ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2011** Vol. 21. No. 6. 858~864 DOI : 10.5352/JLS.2011.21.6.858

Functional Properties of Walnut in Cosmetics

Mee-Kyung Kim[1], Jin-Sung Kim[2], Bun-Sung Jo[2], Jeung-Hoan Kim[3], In-Cheol Lee[1], Myung-Sup Lee[4] and Young-Je Cho[5]*

[1]*Center for Senior Industry, Youngdong University, Yeongdong 370-701, Korea*
[2]*School of Food Science, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea*
[3]*School of Nano Material Engineering. Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea*
[4]*Department of Cosmetic Science and Technology, Youngdong University, Yeongdong 370-701, Korea*
[5]*School of Food Science & Biotechnology, Food &Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

Received April 4, 2011 / Accepted May 18, 2011

The phenolic compounds of walnut extracts by various solvents were shown to be 24.3 mg/g in hot water, 34.4 mg/g in ethanol, 32.5 mg/g in methanol and 15.1 mg/g in acetone. In a comparison of phenolic compounds from hot water and different concentrations of ethanol, which are harmless, 60% ethanol extract and hot water extract were 34.7 mg/g, 24.6 mg/g. The electron donating ability (EDA) of walnut extracts in hot water and 60% ethanol were 78.1% and 80.6%. According to ABTS radical cation decolorization for antioxidant activity, hot water and 60% ethanol extract showed high antioxidant activities of 98.1% and 98.3%. Antioxidant protection factor (PF) were 1.1±0.2 PF and 1.1±0.4 PF in hot water and 60% ethanol extract. In TBARs inhibitory activity, each extract showed high antioxidant activities at 60% and 75%. Anti-inflammation effects of walnut extract were tested, and inhibition of NO was 50% in 100 μg/ml phenolics. Inhibitory activity against iNOS and COX-2 were shown, through Western blot, to be 10% in 100 μg/ml phenolics. Tyrosine inhibitory activity of 60% ethanol extract was 43%, and astringent effect of 60% ethanol extract was 55%. These results suggest that walnut extracts are suitable for functional cosmetics requiring skin-whitening and anti-wrinkle activity.

Key words : Walnut, functional activities, cosmetic, antioxidant, tyrosinase activity, anti-inflammation effect, astringent activity

서 론

성인병 및 만성질환 등에 심각하게 노출되어있는 현대인들은 과도한 업무와 불규칙적인 식습관으로 인하여 체내에 prooxidant와 antioxidant의 불균형으로 초래되는 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의해 잠재적인 세포손상 및 병리적 질환에 노출되어있다 할 수 있다[3]. 특히 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성산소(reactive oxygen)는 여러 생체물질과 쉽게 반응하고, 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하게 되며[21,22], 향장분야에서는 피부 노화나 여러 가지 피부 트러블을 야기하게 된다. 이러한 활성산소를 조절하기 위하여 합성항산화제가 널리 쓰여 왔지만, 웰빙이라는 문화적 이슈로 인하여 인공 합성물에 대한 인식의 변화와 안전성의 논란이 지속되고 있어, 안전한 천연물로 이를 대처하고자 천연물을 이용한 기능성 식품과 기능성 화장품의 개발이 활발히 이루어지고 있다[13,16]. 특히 지금까지 피부노화를 억제하는 천연 항산화제의 경우 주로 식물에서 유래된 폴리페놀성 물질이 보고 되어있는데, flavonoid, tannin, carotenoid 등이 노화억제 및 염증 그리고 각종 암등을 예방하는데 효과적이라고 알려져 있다[6,19,23,24].

호두(*Juglans regia*)는 가래나무과 호두나무(*Juglans sinensis*) 속에 속하는 소교목의 열매로 전 세계적으로 널리 분포, 재배되고 있는 작물로서 페르시아 호두(*Juglans regia*)를 비롯하여 10여 종이 주종을 이루고 있다[12]. 호두는 지질 및 단백질뿐만 아니라 무기질까지 풍부한 영양원으로 특유의 향미가 있어서 아이스크림, 호두기름 향유, 호두기름 화장품, 그림물감용 등으로 널리 사용되고 있으며, 예로부터 우리나라에서는 두뇌작용은 물론 머리카락을 검게 한다고 하여 한방의 약재로도 사용되고 있다. 이러한 호두를 이용하여 매우 효력이 있고 안전하면서 기능성을 활용하고자 하는 연구가 계속되고 있으며, 생리활성 및 화합물 분리 정제에 대한 논문들이 발표되고 있으나[12] 피부미용에 적용 하기위한 화장품 기능성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 한국에서 자생하는 호두추출물로부터 항산화, 항염증효과와 미백 및 수렴효과 등의 화장품 생리활성을 검토하여 기능성 화장품에 적용하기위한 자료로 활용

***Corresponding author**
Tel : +82-53-950-7755, Fax : +82-53-950-7762
E-mail : yjcho@knu.ac.kr

하고자 하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조

호두추출물의 제조는 충북 영동지방에서 구매한 호두시료를 에탄올, 메탄올, 아세톤, 물 등을 추출용매로 하여 100 mesh로 걸러진 호두과육과 껍질 혼합시료 1 g에 추출용매 100 ml를 가하여 24시간 동안 진탕 추출하였으며, 추출액은 Whatman No. 1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Japan)에서 농축하여 사용하였다.

총 phenol성 화합물 정량

총 phenol성 화합물은 Folin-Denis 방법[9]으로 측정하였으며, 시료 1 ml에 95% ethanol 1 ml와 증류수 5 ml를 첨가하고 1 N Folin-ciocalteu reagent 0.5 ml를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, Na_2CO_3 1 ml를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다.

전자공여능 측정

호두추출물의 전자공여능(electron donating abilities, EDA)은 Blois의 방법[4]에 준하여 측정하였다. 각 시료용액 1.0 ml에 60 μM의 1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 3.0 ml를 넣고 교반한 후, 15분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 다음 식에 의해 나타내었다.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도-반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

ABTS radical cation decolorization의 측정

ABTS radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin 등의 방법[18]에 의해 측정하였다. 즉, 7 mM ABTS 5 ml와 140 mM $K_2S_2O_8$ 88 μl의 비율로 섞어 어두운 곳에 14~16시간 방치시킨 후, 이를 absolute ethanol과 1:88의 비율로 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.002가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용하였다. 시료용액 50 μl와 ABTS solution 1 ml를 30초 동안 섞은 후 2.5분간 incubation하여 734 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의해 저해율을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical 저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Antioxidant protection factor (PF) 측정

PF는 Andarwulan과 Shetty의 방법[1]으로 측정하였다. 10 mg의 β-carotene을 50 ml의 chloroform에 녹인 용액 1 ml를 evaporator용 수기에 넣고 40℃ water bath에서 chloroform을 증류시킨 후 20 μl linoleic acid, 184 μl Tween 40과 50 ml H_2O_2를 가하여 emulsion을 만들고, 5 ml의 emulsion에 시료용액 100 μl를 혼합하여 vortex로 잘 섞어준 뒤 50℃에서 30분간 반응시켜 냉각시킨 다음, 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{PF} = \frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}$$

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 측정

TBARS는 Burge와 Aust의 방법[5]에 따라 측정하였다. 1% linoleic acid와 1% Tween 40으로 emulsion을 만들고 emulsion 0.8 ml와 시료 0.2 ml를 섞은 후 50℃ water bath에서 10시간 반응시켰다. 반응 후 반응액 1 ml에 TBA regent 2 ml를 가하고 15분간 boiling한 다음 10분간 냉각시킨 후 15분간 1,000 rpm (vision, VS-5500N)으로 원심분리하여 실온에서 10분간 방치 후 상징액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, TBARS 값은 흡광도 수치×0.0154로 1 ml 반응혼합물에 대해서 생성된 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 μM로 표시하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 TBARs μM}}{\text{대조구의 TBARs μM}}\right) \times 100$$

Nitric oxide 저해활성 측정

Nitric oxide (NO) 측정은 cell의 supernatant에서의 nitric oxide (NO)의 량을 nitrite and nitrate로서 측정을 하였다. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent (Sigma, USA)를 사용하였으며, 6 well plate에 2×10^6개의 cell을 confluence가 80%일 때, PBS로 2번 washing한 후에 무혈청 배지를 사용하여 12시간 이상 배양시킨 후에 lipopolysacchride (LPS) 10 μg/ml를 control군을 뺀 모든 well에 다 넣어서 자극시켰다. 1시간 후에 시료를 농도별로 처리하여 실험하였으며, NO 생성량은 시간별로 supernatant를 모아 griess reagent로 10분간 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도로 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blot을 이용한 iNOS 및 COX-2 활성 측정

iNOS protein 활성측정을 확인하기 위하여 대식세포주인 Raw 264.7 세포의 suspension을 100π tissue culture dish에 각 well당 2×10^4 cell로 가한 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 아세톤 추출물, 발효 상징액,

발효 후 아세톤 추출물을 농도별(10 μg/ml, 100 μg/ml)로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 또 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척한 후 Lysis buffer (RIPA buffer 10 ml에 complete mini 1 tab을 가함) 100 ul로 용해해서 4℃ 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상징액만을 모아 새 튜브로 옮긴 후 단백질 정량을 하거나 또는 차후 사용하기 위해 -20℃에 보관하였다. 원심 분리하여 얻은 상징액은 Bradford assay로 정량하여 20 μl의 단백질을 10%의 SDS-PAGE사에서 전기 영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semidry transfer cell 기기(Bio Rad)를 이용하여 PVDF membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. 10분 간격으로 TBST로 3회 washing하고 iNOS (BD Biosience 1:1,000), COX-2 (cayman 1:1,000), GAPDH (Santacruz 1:1,000) 1차 항체를 희석하여 4℃에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 washing하고 mouse anti-rabbit IgG HRP, bovine anti-goat IgG HRP (santacruz 1:1,000)의 각각의 2차 항체를 1 : 1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 3회 washing한 뒤 암실에서 ECL (Millipore)용액으로 반응시키고 X-ray film에 노출시켜 각각의 band를 Molecular Imager (Bio-Rad)를 이용하여 band를 정량화하였다.

Tyrosinase 저해(미백) 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[26]에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 ml에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 unit/ml) 0.2 ml를 첨가하여 25℃에서 2분간 반응시킨 후 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{저해율}(\%)=\left(1-\frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right)\times 100$$

Astringent activity (수렴성) 측정

원심분리관 용기에 각각의 시료용액과 헤모글로빈 용액을 1:1의 비율로 넣어 진탕 혼합한 다음 1,500 rpm에서 3분간 원심분리 후 576 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 감소율로 수렴성을 측정하였다[17].

결과 및 고찰

호두 추출물의 추출조건 및 페놀성 화합물 함량

호두시료로 부터 다양한 추출용매를 이용하여 phenolic compounds를 추출한 결과 Fig. 1과 같이 ethanol 추출물에서

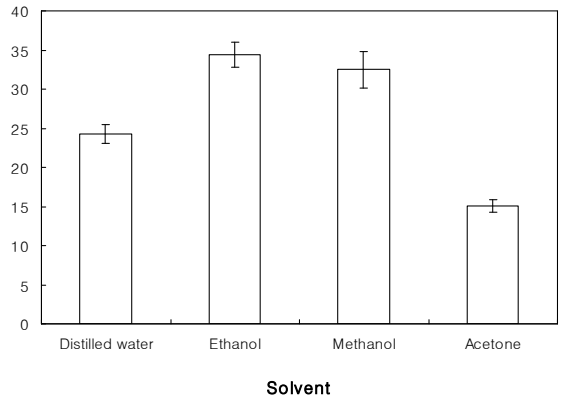

Fig. 1. The effect of solvent type on content of total phenolic compounds in extracts from walnut.

31.9 mg/g의 가장 높은 phenolic compounds의 함량을 나타내었으며, 인체에 무해한 추출용매인 물과 ethanol을 가지고 농도별로 추출한 결과 Fig. 2와 같이 phenolic compounds가 ethanol 60%의 농도에서 33.1 mg/g으로 추출수율이 가장 높았으며, 열수추출에서는 24.6 mg/g로 Moon 등[15]이 보고한 녹차(10.9 mg/g), 상황버섯(17.9 mg/g), 인지(6.7 mg/g)의 추출물의 phenolic compounds 함량 보다 높은 함량을 나타내었다. 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 분자구조와 분자량을 가지며, 구조적으로 phenolic hydroxyl (OH)기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하여, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다[10]. 따라서 본 시료의 60% ethanol 추출물에서 약 33 mg/g의 phenolic compounds 함량을 나타내어 생리활성도 우수할 것이라 판단되었다.

항산화 효과

전자공여능은 phenolic acid와 flavonoids 및 기타 phenol

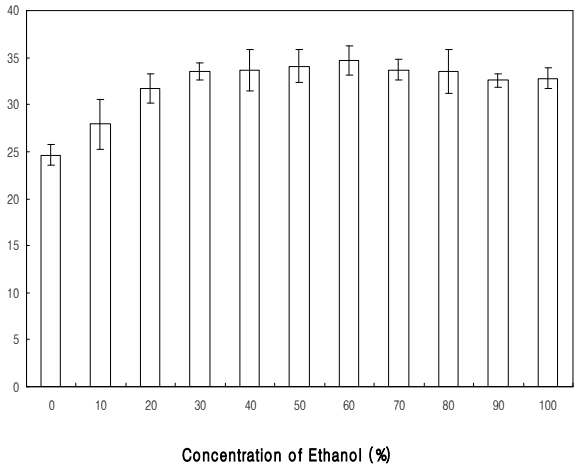

Fig. 2. The effect of ethanol concentration on content of total phenolic compounds in extracts from walnut.

성 물질에 대한 항산화 작용의 지표라 할 수 있으며, 이러한 물질들이 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소에 대한 소거활성을 기대할 수 있다[4]. DPPH 라디칼 소거능을 알아본 결과 Table 1과 같이 대조구인 vitamin C를 200 μg/ml 처리하였을 때의 87%에 비해 열수추출물과 60% ethanol 추출물을 200 μg/ml씩 처리하였을 때에서 각각 78.1%와 80.6%를 나타내어 두 추출물 모두 높은 전자공여능을 가지고 있다고 판단되었다. DPPH 라디칼 소거능이 높다는 결과로 본 시료에 함유된 페놀성 화합물들이 자유라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력을 수행하여 화장품에 적용하였을 때 피부에서 자유 라디칼에 의한 노화를 억제하는 역할을 수행할 수 있을 것이라 판단하였다[2,11]. 수용성 물질에 대한 항산화력을 측정하기 위하여 200 μg/ml의 동일한 처리 농도에서 ABTS radical cation decolorization을 측정한 결과, Table 1과 같이 열수 추출물에서 98.1% 그리고 60% ethanol 추출물에서 98.3%로 높은 저해율을 나타내어 대조구인 vitamin C의 98%와 유사하게 측정되어 우수한 항산화력을 가진 것으로 확인되었다. 이는 윤 등[27]이 보고한 추출용매 비에 따른 백부자(*Aconiti koreani Rhizoma*) 추출물의 항산화 실험에서 에탄올 추출물 및 열수추출물의 항산화력보다 우수한 결과를 나타내었다. 지용성 물질에 대한 항산화력을 알아보기 위하여 PF를 측정한 결과 Table 1과 같이 열수 추출물과 60% ethanol 추출물 모두에서 vitamin C의 1.2보다 다소 낮은 1.1 정도의 PF 값을 나타내었으나, Duval과 Shetty [8]가 완두에 함유되어있는 phenol성 물질의 PF가 1.1~1.3 정도였다고 보고한 결과와 유사한 경향을 보였다. 지질의 산화억제효과를 측정하는 지표로 TBARs 생성의 감소정도를 측정한 결과 Table 1과 같이 열수 추출물에서 60% 그리고 60% ethanol 추출물에서 75%의 억제효과를 나타내어 vitamin C보다 지용성 물질에 대한 항산화력은 더 높게 측정되어 비교적 높은 항산화력을 가졌음을 알 수 있었다.

염증 억제 효과

염증은 외부자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로서 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등을 인식하면 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다. Nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-argine으로부터 생성되는데, NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하며, 특히 대식세포가 LPS로 자극될 때 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO을 생성하게 되는데, 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다. 따라서 호두의 항염증활성을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 10 μg/ml의 LPS를 1시간 동안 처리한 후 호두 에탄올추출물을 5, 10, 50, 100 μg/ml 농도별로 처리하여 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 3과 같이 호두 에탄올추출물의 농도가 증가함에 따라 NO의 생성량이 감소하는 경향을 나타내었다. LPS만 처리한 군에 비해 5 μg/ml 처리군에서는 2%, 10 μg/ml 처리군에서는 10%, 10 μg/ml 처리군에서는 35%, 100 μg/ml 처리군에서는 50% 정도 감소시키는 것으로 확인되었다. LPS 자극에 의해 발현된 iNOS는 많은 양의 NO를 생성하게 되며 이때 염증반응 및 종양발생 등에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응과 관련된 조직에서 NO와 iNOS의 발현이 증가되는 현상이 일어나게 된다[25]. 본 실험에서 LPS만 처리한 군에 비해 100 μg/ml 호두 에탄올 처리군에서는 50% 정도 NO의 양이 감소되는 것으로 보아 피부의 염증 억제에도 효과적으로 작용할 것이라 판단되었다. NO의 생성에는 NOS라는 효소가 작용하는데, NOS에는 constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS) 두 종류가 있다. 특히, 자극에 유도된 iNOS인 경우 오랜 기간 동안 다량의 NO를 생성하게 되고, 생성된 NO는 guanyl cyclase의 활성과 동시에 주위 조직에 세포독성을 나타내는 것이 특징이다. 즉 LPS로 유도되어진 RAW 264.7 cell에서 iNOS의 protein level의 감소에 의해 항염증 효과를 기대할

Table 1. Antioxidant activity of extracts from walnut

Antioxidant assay	Antioxidant activity		
	Water extracts	60% Ethanol extracts	Vitamin C
DPPH (%)	78.1±3.6	80.6±2.5	87±4.7
ABTS (%)	98.1±2.8	98.3±5.1	98±3.7
Antioxidant profection factor (PF)	1.1±0.2	1.1±0.4	1.2±0.3
TBARs (%)	60±2.1	75±1.9	52±3.2

Water, ethanol extracts and vitamin C were treated with 200 μg/ml.

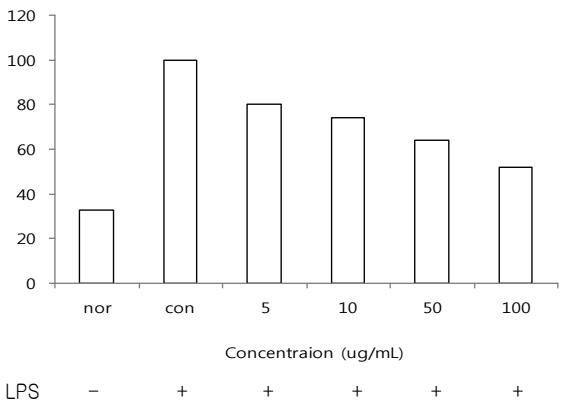

Fig. 3. Effects of walnut extracts on the production of nitric oxide in Raw 264.7 cell. Raw 264.7 cell were treated for 24 hr.

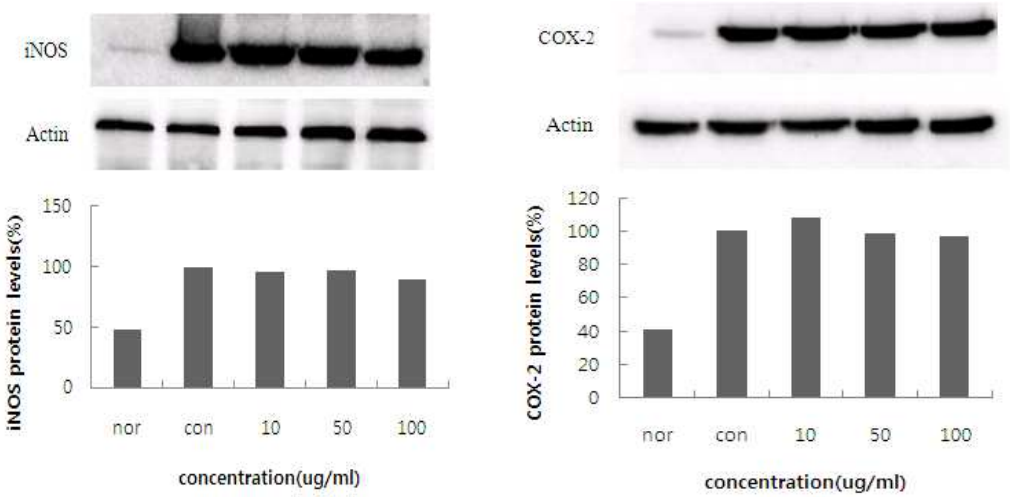

Fig. 4. Effects of walnut extracts on the production of iNOS and COX-2 in Raw 264.7 cell. Raw 264.7 cell were treated for 24 hr.

수 있으며, 또한 세포와 같은 macrophage 또한 monocyte에서 tumor necrosis fzctor-alpha (TNF-α), Interleukin-6 (IL-6)와 같은 proinflam matory cytokine을 증가시키는 요인 중 하나인 COX-2의 protein level을 측정함으로써 항염증 효과를 기대할 수 있다. 호두추출물에 의한 NO 생성 저해 기전을 확인하기 위해 western blot으로 iNOS의 단백질 생성을 측정한 결과 Fig. 4와 같이 호두추출물의 경우 대조군에 비해 100 μg/ml의 농도에서 10%의 억제효과를 나타내어 대식세포에서 호두추출물에 의해 iNOS 발현이 억제되는 결과를 나타내었으나 그 효과는 높지 않았다. 또 다른 염증인자인 COX-2의 단백질 발현을 측정한 결과 호두추출물의 경우 100 μg/ml에서 5%의 저해 효과만을 나타내었다. iNOS와 COX-2의 발현은 둘 다 염증반응에 관련된 분자이지만 처리하는 약물에 의한 결과는 서로 다른 기전을 가지고 있는 것으로 판단되며, 앞에서 언급한 NO생성 억제 결과에 비하여 낮은 결과를 나타낸 것은 macrophage에서 inducible NOS의 발현에 의한 NO생성 이외의 다른 mechanism에 의한 NO 생성이 이루어지는지에 대한 연구와 TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8 등 cytokine에 대한 연구를 병행하여 차후 지속적인 연구가 이루어져야 한다고 판단되었다.

미백 활성

피부의 색조를 결정하는 주요한 인자인 melanin은 표피 기저층의 melanocyte라고 불리는 색소세포 내의 melanosome에서 생합성 된다. 멜라닌을 합성하는데 있어서의 출발물질은 아미노산의 일종인 tyrosine이다. Tyrosinase는 피부의 표피 기저층에 존재하는 멜라조사이트에서 tyrosine을 산화시켜 멜라닌의 생성을 촉진시키는 효소로서, 이들의 활성 억제는 피부 미백에 매우 효과적이다. 그리하여 호두추출물의 tyrosinase 활성저해를 측정해 본 결과 Table 2와 같이 200 μg/ml의 열수 추출물에서는 저해효과가 나타나지 않았으나, 200 μg/ml의 60% ethanol 추출물의 경우 43%의 저해율을 나타나, 대조구인 200 μg/ml vitamin C보다는 낮게 나타나났으나, Shin [20]의 연구 결과인 홍경천, 인삼, 갈근, 오미자, 연교, 홍화씨, 창출 추출물을 이용한 실험결과보다 높은 tyrosinase 활성억제를 보여 주었으며, 이는 호두추출물이 멜라닌 색소의 억제를 통한 미백화장품의 원료 소재로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

Table 2. Inhibitory activity on tyrosinase of extracts from walnut

Sample	Inhibition on tyrosinase (%)
Water extracts	0
60% Ethanol extracts	43±5.7
Vitamin C	82±3.4

Water, ethanol extracts and vitamin C were treated with 200 μg/ml.

수렴 효과

수렴작용이란 피부 단백질이 고분자 flavonoids와 결합하여 가교결합을 형성하여 피부가 수축되는 현상을 말한다. 일반적으로 수렴제는 단백질과 결합하는 성질을 가지기 때문에 헤모글로빈 단백질이 추출물과 결합하는 정도에 따라서 수렴성의 효과 정도를 판단 할 수 있다. 따라서 수렴작용에는 외용 혹은 내용에 의해서 피부와 점막의 표면에 난용성의 피막을 형성하고 그 결과 구조를 보호하거나, 혹은 조직을 조밀하게 하여 세포막의 투과성을 감소시키는 효과가 있다고 할 수 있다. 그러므로 수렴성이 존재함은 피부를 수축시키므로 주름개선 효과가 있다고 할 수 있다[17]. 본 실험 결과 200 μg/ml의 동일한 처리 농도에서 열수추출물의 경우에는 수렴작용이 나타나지 않았으나, 60% ethanol 추출물의 경우 Table 3과 같

Table 3. Astringent activity of extracts from walnut

Sample	Astringent activity (%)
Water extracts	0
60% Ethanol extracts	55±2.6
Vitamin C	34±3.2
Tannic acid	58±2.1

Water, ethanol extracts and vitamin C were treated with 200 μg/ml.

이 55%의 억제효과를 나타내어 수렴활성이 우수한 것으로 판단되었으며, 대조구인 vitamin C의 34%보다는 높았고, tannic acid의 58%와 비슷한 수준으로 측정되었다. 이러한 결과로 보아 호두추출물은 피부 단백질의 고분자 flavonoids와 결합하여 가교결합을 형성하고 피부가 수축되는 현상이 발생하여[14], 외용화장품에 적용함으로써 피부와 점막 표면에 난용성의 피막을 형성하여 국소를 보호하거나, 조직을 조밀하게 하여 세포막의 투과성을 감소시킴으로 인해 주름개선효과를 기대할 수 있어, 주름개선용 화장품의 소재로서 개발이 가능하다고 판단되었으며, 향후 이러한 생리활성물질의 정제 및 동정을 통하여 기능성 화장품소재로서의 추가 연구개발이 진행되어야한다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 고령친화산업 기업지원센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Reference

1. Andarwulan, N. and K. Shetty. Phenolic content in differentiated tissue cultures of untansformed and roots of anise(Pimpinella anisum L.). *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1776-1780.
2. Aoshima, H., H. Tsunoue, H. Koda, and Y. Kiso. 2004. Aging of whiskey increases 1,1 - diphenyl -2 - picrylhydrazyl radical scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5240-5244.
3. Balavoine, G. G. and Y. V. Genleti. 1999. Peroxynitrite scavenging by different antioxidants, Part I: convenient assay. *Nitric Oxide* **3**, 40-54.
4. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* **26**, 1198-1199.
5. Buege, J. A. and S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol.* **105**, 302-310.
6. Choi, H R., J. S. Choi, Y. N. Han, S. J. Bae, and H. Y. Chung. 2002. Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytother. Res.* **16**, 232-235
7. Dietz, B. M., Y. H. Kang, G. Liu, A. L. Eggler, P. Yao, L. R. Chadwick, G. F. Pauli, N. R. Farnsworth, A. D. Mesecar, R. B. van Breemen, and J. L. Bolton. 2005. Xanthohumol isolated from Humulus lupulus Inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 1296-1305.
8. Duval, B. and K. Shetty. 2001. The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea(*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed Anise root extract. *J. Food Biochem.* **25**, 361-377.
9. Folin, O. and W. Denis. 1912. On phosphotungasticphosphomolybetic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-249.
10. Jung, M. S., G. S. Lee, and H. J. Chae. 2004. *In vitro* biological activity assay of ethanol extract of Radish. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 67-71.
11. Kim, H. K., Y. E. Kim, J. R. Do, Y. C. Lee, and B. Y. Lee. 1995. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 80-85.
12. Lee, M. S., S. H. Lee, S. K. Park, D. H. Bae, S. D. Ha, and K. B. Song. 2004. Changes in quality of pine nuts and walnuts coated with protein film containing green tea extract during storage. *Korean J. food Sci. Technol.* **36**, 842-846.
13. Lee, K. S., Z. H. Mbwambo, H. S. Chung, L. Luyengi, E. J. C. Gamez, R, G Mehta, D. Kinghorn, and J. M. Pezzuto. 1988. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **1**, 35-46.
14. Lodetti, G., F. D. Abrosca, P. Fontana, E. Pavoni, and P. Gigola. 2004. Set up of in vitro methods able to detect the safety of astringent liquids. *Minerva Stomatol.* **53**, 361-367.
15. Moon, J. S., S. J. Kim, Y. M. Park, I. S. Hwang, and E. H. Kim. 2004. Antimicrobial effect of methanol extracts from some medicinal herbs and the content of phenolic compounds. *Korean J. Food Pre.* **11**, 207-213.
16. Moure, A., J. M. Cruz, C. Franco, H. Dominguez, M. J. Nunez, and J. C Parajo. 2001. Natural antioxidant from residual sources. *Food Chem.* **72**, 145-171.
17. Okuda, K. 1986. Astringent function of plant ingredient. *Fragrance J.* **6**, 270-274.
18. Pellegrin, N., R. Roberta, Y. Min, and R. E. Catherine. 1998. Screening of diatry carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2′-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Method Enzymol.* **299**, 379-389.
19. Pessuto, J. M. 1996. Plant derived anticancer agents. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 121-133.
20. Shin, J. Y. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J. Food Nutr.* **14**, 568-572.
21. Singfh, A. 1989. Chemical and biochemical aspects of acti-vated oxygen: singlet oxygen, superoxide anion, and related spectes, In Miquel, J., A. T. Quintanilha, and H. Weber. (eds.). CRC Hanbook of free radicals and antioxidants in Biomedicine. CRC Press, Inc., Boca Raton, *Floriad.* **1**, 1728.
22. Squadrito, G. L. and W. A Pryor. 1998. Oxidative chemi-stry of nitric oxide : the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. Free. *Radic. Biol. Med.* **25**, 392-403.
23. Torel, J., J. Chillard and P. Chillard. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxyradical. *Phytoichem.* **25**, 383-385

24. Ulrich, K., S. Yasser, E. S. harty, E. S. hary, A. Bader, E. Zeany, B. Pabel, and G. R. Berger. 2000. Antioxidant activity of extracts from roasted wheat germ. *Food Chem.* **71**, 91-95
25. Weisz, A., L. Cicatiello, and H. Esumi. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-γ, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* **316**, 209-215.
26. Yagi, A., T. Kanbara, and N. Morinobu. 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica.* **3981**, 517-519.
27. Yoon, S. J., J. H. Kim, K. H. Lee, H. J. Kwon, S. S. Chun, and Y. J. Cho. 2005. Antimicrobial effects and antioxidative activity of Baek-bu-ja (*Aconiti koreani Rhizoma*) by extraction solvent ratio. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 258-262.

초록 : 호두의 화장품 기능성

김미경[1] · 김진성[2] · 조분성[2] · 김정환[3] · 이인철[1] · 이명섭[4] · 조영제[5]*
([1]영동대학교 고령친화산업기업지원센터, [2]경북대학교 식품과학부, [3]경북대학교 나노소재공학부, [4]영동대학교 화장품과학과, [5]경북대학교 식품공학부, 식품생물산업연구소)

호두과육으로부터 용매별로 추출한 추출액중의 phenolic compound 함량은 열수, 에탄올, 메탄올, 아세톤 추출물 순서로 24.3, 34.4, 32.5, 15.1 mg/g의 함량을 나타내어 에탄올 추출물의 phenolic compound 함량이 가장 높았으며, 인체에 무해한 추출 용매인 열수 및 에탄올 농도별 추출물의 phenolic compound 비교한 결과 60% 에탄올 추출물에서 34.7 mg/g과 열수 추출물에서 24.6 mg/g 함량의 phenolic compound를 나타내었다. 호두추출물의 항산화 활성 중 전자공여능의 경우 열수추출물에서 78.1%, 60% 에탄올추출물에서 80.6%의 활성을 나타내었으며, ABTS radical cation decolorization 측정에서는 열수추출물과 60% 에탄올추출물 각각 98.1%와 98.3%의 높은 항산화 활성을 나타내었다. Antioxidant protection factor (PF)의 경우는 열수추출물과 60% 에탄올추출물에서 각각 1.1±0.2 PF와 1.1±0.4 PF로 높지는 않았으며, TBARs inhibitory activity 측정에서는 열수추출물과 60% 에탄올추출물에서 각각 60%와 75%로 비교적 높은 항산화력을 가졌음이 확인되었다. 호두추출물의 항염증효과를 살펴본 결과 100 μg/ml의 농도에서 50%의 NO발현이 억제되었고, western blot에 의한 iNOS 및 COX-2의 억제효과는 대조군에 비해 100 μg/ml의 농도에서 10% 정도의 낮은 저해 효과를 나타내었다. Tyrosinase의 저해 활성의 경우 60% 에탄올추출물에서 43%의 저해율을 보였으며, 수렴효과의 경우 60% 에탄올추출물에서 55%의 억제효과를 나타내어, 호두추출물은 미백 및 주름개선용 화장품소재로서 개발이 가능하다고 판단되었다.