

Antimicrobial and Antioxidative Activities of the Extracts from Walnut (*Juglans regia* L.) Green Husk

Kook-Il Han¹, Mi ran Kim², Bu Kyung Jo², Min Ji Kim², Min Joo Kang², Ki-hyoun Park², Ye eun Koo¹, Byeongseong Kim¹, Eui-Gil Jung¹ and Man-Deuk Han^{1*}

¹Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 336-745, Korea

²Department of Medical Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 336-745, Korea

Received February 8, 2015 / Revised April 14, 2015 / Accepted April 23, 2015

Several studies suggest that regular consumption of walnuts may have beneficial effects against oxidative stress-mediated disease such as cancer. The present study reports the total phenolic and flavonoid contents, together with the antioxidant and antibacterial activities of several solvent extracts (methanol, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, and water) obtained from walnut (*Juglans regia* L.) green husk. MIC (minimal inhibitory concentration) values of the walnut extracts for 8 human pathogenic bacteria strain were determined using agar dilution method. Antioxidant activity of extracts were assessed using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) assays, EC₅₀ of DPPH and ABTS scavenging activities, and determination of total phenolic and flavonoid content and its correlation with DPPH and ABTS scavenging capacities. Among the six extracts, ethyl acetate extract (EtOAc Ex) showed the highest antimicrobial activity at 3.2 mg/ml of MICs against *Staphylococcus aureus* SG511. Total flavonoids and polyphenol contents of EtOAc Ex were 42.48 mg of quercetin equivalents (QE)/g and 223.25 mg of gallic acid equivalents (GAE)/g respectively. The highest antioxidative potential was shown by the sample extracted with EtOAc Ex (EC₅₀=13.43 µg/ml for DPPH and EC₅₀=41.83 µg/ml for ABTS radical scavenging activity assay). These results showed that *J. regia* green husk extracts can be used as an easily accessible source of natural antibacterial agents and natural antioxidants.

Key words : Antimicrobial activity, antioxidant, *Juglans regia* L., natural compound, walnut

서 론

호두(Walnut, *Juglans regia* L.)는 전 세계에 널리 분포하며, 많은 사람이 즐기는 견과식품으로 작물학적 가치가 큰 식물이다. 호두(*Juglans regia* L.)는 호두나무과(*Juglandaceae*) 호두나무(*Juglans regia* L.)속에 속하는 낙엽 활엽 교목의 열매로서 호두수(胡桃樹), 강도(羌桃), 당추자(唐楸子), 핵도(核桃)라고도 불린다. 호두는 페르시아 호두(*J. regia*)를 비롯하여 전 세계적으로 10여 종이 주종을 이루고 있다[3]. 특히 호두의 열매에는 불포화 지방산 오메가-3인 알파-리놀렌산(ALA)이 주를 이루며 비타민 B1, B2 등이 풍부하여 식품이나 화장품 원료 등으로 널리 활용되고 있다[14]. 또한, 호두나무는 과피(green husk), 껍질(Walnut shell), 씨앗 알맹이(walnut kernel and seed), 나무껍질과 잎(bark and leaves)에 기능성 성분이 존재하여 화장

품 및 제약산업에서 활용되어 왔다[17, 29]. 서양의 경우 전통 민간요법에서 호두 잎을 피부 염증, 다한증 및 궤양 치료, 구충 치료 등에 사용되어 왔다[2]. 이 같은 활용은 호두에는 많은 페놀성분이 함유되어 있기 때문에[22, 34] 항균, 항산화, 항돌연변이 및 항암 활성을 나타내는 것으로 보고되었다[4]. 지금까지 호두의 부위에 따른 연구로는 호두 껍질[1], 잎[9, 22], 호두 씨앗[21], 호두에서 분리한 Juglone [9] 등에서 생리활성 연구가 이루어 졌다. 특히 호두에는 페놀 화합물인 Juglone이 다량 존재하는 것으로 보고되었다[29]. Juglone은 호두나무가 속한 가래나무과(*Juglandaceae* family)에 다량으로 포함된 페놀성분으로 항생 및 방부 효과가 우수하여 항생물질이나 방부제 대용 가능성 때문에 여러 산업 분야에서 천연 항균소재로 주목받는 물질이다[19, 22, 28]. 최근 화학합성 제품은 천연물과 비교할 때 자연에서 분해되는 기간이 길거나 분해되지 않아 환경오염의 문제가 있고, 또한 화학합성물의 원료가격 비용이 급증하여 경쟁력이 저하되고 있어 천연물로 대체하려는 경향이 증가하고 있다. 식물에 다량으로 포함된 천연페놀화합물은 항산화 특성으로 산화 스트레스(oxidative stress)를 감소시켜 퇴행성 질환 발생을 줄이거나, 고분자의 산화(macromolecular oxidation)을 억제하여 인체건강에 매우 유익한 특성이 있어 그 활용이 더해 가고 있다[23, 27]. 본 연구에

*Corresponding author

Tel : +82-41-530-4702, Fax : +82-41-530-1256

E-mail : mdhan@sch.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 실험재료로 사용한 호두과피(walnut's green husk)는 호두 수확 시 생산되는 부산물로 호두씨앗과 같이 항산화 기능이 우수할 것으로 예측된다. 따라서 호두과피가 식물화학 물질(phytochemicals)의 소재로 이용될 수 있는지 그 가능성을 탐색하여 호두 작물의 생산 가치를 탐색하였다. 또한, 호두는 항산화 활성이 우수하여 식품학적으로 가치가 큰 견과류이다[3]. 지금까지 호두의 부위에 따른 항균과 항산화 활성에 관한 연구는 호두씨앗(fruits) [11, 16], 호두잎[22], 호두과피를 발효시킨 리큐어(liqueurs) [29] 등을 대상으로 일부 있었으나[7, 20], 한국에서 자생하고 생산된 호두를 대상으로는 이루어 지지 않았다.

따라서 본 연구는 국내에서 자생하는 호두(*J. regia* L.) 수확 시 다량으로 생산되는 부산물인 과피를 이용하여 여러 용매로 분획 추출시료를 얻고, 이를 Gram 양성균(*Streptococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*)과 Gram 음성균(*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella oxytoca*) 8 균주에 대하여 항균 효과를 알아보았다. 또한, 각 용매에 따라 추출된 시료의 총 플라보노이드 및 페놀 함량을 측정하여 항산화 작용과의 상관성을 알아보았다. 항산화 작용은 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [5]와 ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonate)] [25] 라디칼 소거활성 정도를 butylated hydroxyanisole (BHA)와 Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)을 기준물질을 각각 사용하여 평가하였다.

재료 및 방법

호두의 유기용매 추출물 제조

본 실험에서 사용한 호두는 2014년 9월 충남 천안 광덕산에

서 채집하였다. 과피가 붙어 있는 호두는 물로 세척하여 60℃에서 3일간 음건 열풍 건조한 후 호두 과피(green husk)만 취하여, 분쇄기로 분말시켜 추출용 시료로 사용하였다. 각 시료에 5배량의 메탄올을 첨가하여 70℃에서 4시간 동안 5회 반복 추출하였다. 얻은 메탄올 추출액은 여과지(Whatman No. 2, pore size; 8 μm)로 거른 후 50℃에서 회전진공농축기(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)로 감압 농축하여 메탄올 추출물(MeOH Ex)을 분획하였다. 메탄올 추출 이후 용매에 따른 분획 별 추출(Fig. 1)은 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 순에 따라 추출하였다. 두 번째 용매인 헥산 추출물은 이미 얻은 메탄올추출물에 물과 헥산을 1:9:10의 비율로 혼합한 후 분액깔대기에 넣고, 강한 혼합과 정치를 12시간 동안 반복하며, 3회 반복하여 헥산 추출물(Hexane Ex)을 얻었다. 이후 차례대로 클로르포름 추출물(CHCl₃ Ex), 에틸아세테이트(EtOAc Ex) 및 부탄올(BuOH Ex) 순으로 분액깔대기에서 각 용매를 이용하여 각각 3회 반복 분획한 후, 마지막으로 남은 물 잔류액을 회수 물 추출물(Water Ex)을 분획화 하였다. 각 추출물은 용매와 수분을 제거하기 위하여 50℃에서 감압 농축하고 동결건조기(Deep Freezer, DF5508, Ilshin Lab. Co. Ltd, Korea)에서 건조한 후 -70℃에 보관, 항산화 및 항균 실험에 사용하였다.

최소저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

호두 추출물의 항균활성을 알아보기 위한 최소억제농도(MIC)는 미국의 National Committee for Clinical Laboratory standards (NCCLS)의 한천 희석법[30]을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료를 Müller-Hinton agar (Difco, Detroit, MI, USA)

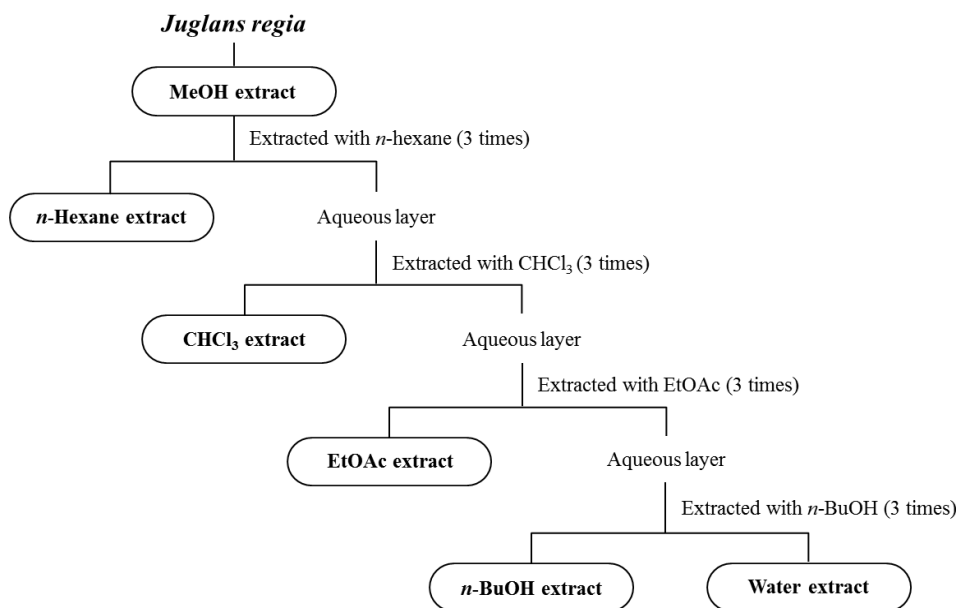


Fig. 1. Sequential steps of preparing the several solvent and aqueous extracts from *Juglans regia* L.

Table 1. List of bacterial strains used for antibacterial activity test

Strain No.	Strains	Gram staining
1	<i>Streptococcus faecium</i> MD8b	+
2	<i>Staphylococcus aureus</i> SG511	+
3	<i>Escherichia coli</i> O75	-
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771M	-
5	<i>Salmonella typhimurium</i> 14028	-
6	<i>Klebsiella oxytoca</i> 1082E	-
7	<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522E	-
8	<i>Enterobacter cloacae</i> P99	-

배지에 최초 농도 204.8 mg/ml에서 0.05 mg/ml농도가 되도록 연속 2배 희석하여 13단계의 희석배지를 제조하였다. 항균 실험에 사용된 8개 균주는 IL-YANG Pharm (Youngin, Korea)에서 분양받아 사용하였다(Table 1). 균주의 전 배양은 Fleisch extract broth (Beef extract 0.1%, peptone 0.1%, NaCl 0.03%, Na₂HPO₄·12 H₂O 0.02%, pH 7.5) 액체배지에서 12시간 정지 배양한 후, 균주의 수가 1×10⁴ CFU (colony forming unit)/ml가 되도록 Cathra replicator system (Oxoid Inc., Ogdensburg, New York, USA)에 분주하였다. 분주된 균액은 호두과피의 용매추출물이 2배 연속 희석된 각 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 집락의 형성유무로 MIC를 결정하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

호두과피의 여러 용매추출물 속에 총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법으로 측정하였다[18]. 우선 각 호두 용매 추출물을 3차 증류수에 1 mg/ml이 되도록 녹인 후 0.20 μm의 실린지 필터로 여과한 후 stock액으로 사용하였다. 제조된 용매 추출물 150 μl에 메탄올 450 μl, 10% aluminum nitrate 30 μl, 1 M potassium acetate 30 μl 및 distilled water 840 μl를 차례로 가하여 최종 용량이 1.5 ml가 되도록 혼합하였다. 이와 같이 조성된 혼합물은 자외선분광기(UV-1800, Shimadzu Corporation, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan)를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 얻은 검량선으로부터 계산하였다.

총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 International Organization for Standardization (ISO) 방법[15]을 변형하여 사용하였다. 우선 각 호두 용매 추출물을 3차 증류수에 1 mg/ml이 되도록 녹인 후 0.20 μm의 실린지 필터로 여과한 후 stock액으로 사용하였다. 제조된 각 용매 추출물 150 μl에 10% Foline-Ciocalteau (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, USA) 시약을 750 μl와 Sodium carbonate 용액(7.5% w/v)을 600 μl를 첨가하여 최종

용량이 1.5 ml가 되도록 혼합한 후 실온 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응된 혼합액은 자외선분광기(UV-1800, Shimadzu Co., Nakagyo-ku, Kyoto, Japan)로 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로는 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA)를 사용하여 얻은 검량선으로부터 총 페놀 함량을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거활성 측정

호두과피에서 여러 유기용매를 이용한 극성 별 추출물의 항산화 작용은 Blois[5]의 자유라디칼 소거효과(free radical scavenging effect) 방법을 변형하여 측정하였다. 우선 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 메탄올에 0.2 mM 농도로 제조하였다. 제조된 0.2 mM DPPH 용액 180 μl에 농도별 시료 조제액 20 μl를 혼합하여 실온 암실에서 20분간 반응시킨 후 ELISA 멀티리더기(Epoch; BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로는 Sigma사의 butylated hydroxyanisole (BHA)을 사용하였으며 시료의 농도와 함께 제조하여 사용하였다. 모든 시료는 혼합 후 최종농도는 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μg/ml가 되도록 제조하였다. DPPH radical scavenger activity (%)는 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 차를 백분율로 표시하였다. 이때 유효농도 50 (EC₅₀) 값은 자유라디칼 소거가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도(Effect concentration, EC₅₀, μg/ml)로 표기하였다.

$$DPPH\ radical\ scavenger\ activity\ (\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: 517 nm에서의 시료첨가군의 흡광도

B: 517 nm에서의 무첨가군의 흡광도.

ABTS 라디칼 소거활성 측정

ABTS [2, 2-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonate), Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA] 라디칼 소거활성은 Re의 ABTS 방법[25]을 사용하였다. 우선 7 mM ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해한 후 암실에서 12시간 동안 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정된 ABTS 용액을 제조하였다. ABTS 용액 180 μl에 시료 20 μl를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA 멀티리더기(Epoch; BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 Sigma사의 Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 시료의 농도와 함께 제조하여 사용하였다. 모든 시료는 혼합 후 최종농도는 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μg/ml가 되도록 제조하였다. ABTS radical scavenger activity (%)는 시료 무첨가군에 대한 시료 첨가군의 흡광도 차를

백분율로 계산하였다. 이때 유효농도 50 (EC₅₀) 값은 자유라디칼 소거가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도(Effect concentration, EC₅₀, mg/ml)로 표기하였다.

$$ABTS\ radical\ scavenger\ activity\ (\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A: 734 nm에서의 시료첨가구의 흡광도
 B: 734 nm에서의 무첨가구의 흡광도.

통계처리

모든 실험은 독립적으로 3회 반복한 결과로 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 각각의 시료에 대한 유의적 검정은 Student's t-test (두 집단간 등분산 검정)로 p<0.01 수준에서 통계적 유의성을 분석하였다.

결과 및 고찰

항균활성 효과

여러 용매를 이용하여 호두과피로부터 얻은 추출물들을 2종의 Gram 양성균(*Streptococcus faecium* MD8b, *Staphylococcus aureus* SG511)과 6종의 Gram 음성균(*Escherichia coli* O78, *Pseudomonas aeruginosa* 1771M, *Salmonella typhimurium* 14028, *Klebsiella oxytoca* 1082E, *Klebsiella aerogenes* 1522E, *Enterobacter cloacae* P99)을 대상으로 항균활성을 MIC 농도로 확인 한 결과, Table 2와 같다.

5가지 용매 추출물 가운데 에틸아세테이트 추출물(EtOAc Ex)와 클로로포름 추출물(CHCl₃ Ex)은 메탄올 추출물(MeOH Ex), 헥산 추출물(Hexane Ex), 물 추출물(Water Ex)보다 상대적으로 우수한 항균활성을 보였다. 그람양성균인 *Staphylococcus aureus* SG511의 경우, CHCl₃ Ex > EtOAc Ex, MeOH Ex > Hexane Ex, Water Ex 순으로 추출물에 대한 MIC 감수성을 보였다. 특히 *S. aureus* 은 CHCl₃ Ex 3.2 mg/ml의 농도에서

MIC를 나타내어 실험된 세균가운데 가장 감수성 있었다. 이 같은 결과는 황색포도상구균이 여러 종류의 장관독소(enterotoxins)를 생산하여 장염과 식중독을 일으키는 균임을 고려할 때 의미가 있다. 또한, EtOAc Ex는 *S. aureus*에 3.2 mg/ml, 장내 세균인 *S. typhimurium*에 6.4 mg/ml 농도에서 우수한 MIC 활성을 보였으며 CHCl₃ Ex는 *E. cloacae* P99에 역시 6.4 mg/ml의 MIC를 보여 EtOAc Ex보다 2배 높은 항균 활성 보였다. Fernández-Agullóa [12]는 호두과피로부터 열수 추출을 통해 MIC 측정 결과 Gram 양성균에서만 작용하였고, *S. aureus* 에 대한 MIC로 50 mg/ml인 것으로 보고한 바 있으나 본 연구 결과 물 추출물의 경우 102.4 mg/ml로 약 2배 낮은 활성을 보였다. CHCl₃ Ex의 경우, *S. aureus* SG511에 3.2 mg/ml의 농도에서 감수성을 나타내어 약 1.5배 우수한 항균 활성을 보였다. 또한, Fernández-Agullóa [12]의 연구결과에서는 호두의 물 추출물이 Gram 음성균에는 항균활성이 없었으나 본 연구에서는 Water Ex의 경우, 102-204 mg/ml에서 MIC를 나타내었으며 EtOAc Ex의 경우 *E. cloacae* P99에 6.4 mg/ml에서 MIC를 보였다. 또한, Oliveira 등[20]은 호두 5 품종(Franquette, Marbot, Mayette, Mellanaise, Parisienne)에서 열수추출물을 얻고 이들의 MIC 농도를 측정한 결과, Gram 양성균에서만 활성을 나타내었으며, 품종에 따라 차이가 있는 것으로 보고하였다. 이러한 항균활성은 천연물 속에는 flavonoids, quercetin, 페놀 화합물 등과 같은 항균활성물질(anti-bacterial agents)이 많이 존재하며, 이들 물질이 세균의 DNA gyrase와 같은 효소활성을 억제하여 증식을 차단하기 때문이다[10].

미국 암 연구소(NCI)/국립보건원(NIH)의 NIH/DTP Repositories는 1992년부터 전 세계의 식물과 해양생물로부터 100,000개의 추출물을 대상으로 생리활성물질을 검색하고 있다. 이들 기관에서는 보통 천연물의 생리활성 유효 농도를 1 mg/ml로 설정하여 검색하고 있으며[32], 2000년부터 2008년까지 발표된 연구문헌을 조사한 결과, 유효농도보다 우수한

Table 2. Antibacterial activities [minimum inhibitory concentration, MIC (mg/ml)] of solvent extracts obtained from walnut green husk of *Juglans regia* L.

Microorganisms	MIC (mg/ml) of extracts				
	MeOH Ex	Hexane Ex	CHCl ₃ Ex	EtOAc Ex	Water Ex
<i>Streptococcus faecium</i> MD8b	51.2	204.8	12.8	25.6	204.8
<i>Staphylococcus aureus</i> SG511	25.6	102.4	3.2	25.6	102.4
<i>Escherichia coli</i> O78	25.6	102.4	12.8	12.8	204.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771M	51.2	204.8	12.8	25.6	204.8
<i>Salmonella typhimurium</i> 14028	25.6	204.8	6.4	12.8	204.8
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1082E	25.6	204.8	12.8	12.8	204.8
<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522E	25.6	204.8	12.8	12.8	204.8
<i>Enterobacter cloacae</i> P99	25.6	204.8	12.8	6.4	204.8

*The pre-culture of bacteria is done in Fleisch extract broth medium, and antibacterial activities were done in Müller-Hinton agar media.

천연물 가운데 10 µg/ml 이하에서 항균활성을 나타낸 식물의 2차대사 물질은 300여 종류인 것으로 보고되었다[26]. 본 연구 결과 호두과피의 CHCl₃ Ex는 피부질환과 식중독 원인균인 황색포도상 구균(*S. aureus*)에 3.2 mg/ml 항균효과를 나타내어 NCI의 천연물 1차 유효 농도 1 mg/ml 보다 약 3.2배 낮은 항균 활성을 보였으나, 향후 분리 정제 과정을 거치면 보다 우수한 항균활성 MIC를 얻을 것으로 기대 된다. 또한, EtOAc Ex는 장내세균인 *E. cloacae*에 6.4 mg/ml의 MIC를 나타내었다. 이 같은 농도의 항균활성은 의약품으로 활용되기에 어려우나, 식품방부제, 항생제의 모핵(scaffolds), 또는 화장품 등의 원료로 활용 가능성이 있으며, 특히 작물학 분야에서 호두과피를 활용한 천연 씨앗 썩음병 방지제, 또는 항진균제 등으로 활용이 가능할 것으로 사료 된다.

추출수율, 총 페놀 및 플라보노이드 함량

호두의 건조분말 시료를 유기용매 추출공정에 따라 추출한 결과 메탄올 추출물(MeOH Ex)이 42.6%로 가장 높은 수율을 보였으며 다음으로 Water Ex > Hexane Ex > EtOAc Ex > BuOH Ex > CHCl₃ Ex 순으로 나타났다(Table 3). 또한, 호두과피를 여러 용매 추출물의 총 플라보노이드와 총 페놀함량을 측정된 결과, Table 3과 같다. 총 플라보노이드 함량의 경우 EtOAc 추출물이 42.48 mg QE/g로 가장 높았으며, 다음으로 MeOH 추출물에서 32.20 mg QE/g로 높았다. 또한 총 페놀 함량은 EtOAc Ex에서 223.25 mg GAE/g로 가장 높았으며, 다음은 CHCl₃ Ex 126.88 mg GAE/g 이었고, BuOH Ex > Water Ex 순으로 총 페놀함량이 높았다. 일반적으로 식물의 총 폴리페놀성분에는 안토시안과 플라보노이드류 화합물로서 anthocyanins, chalcones, aurones, flavones, flavonols과 관련된 유도체를 의미하며[33], 이 같은 물질들은 자유라디칼과 반응하여 수소 원자를 환원시켜 안정화된 라디칼을 생성함으로써 항산화 효과와 밀접한 관련이 있으며[8], 고혈압 억제 및 항암 효능을 나타내기도 한다[6].

DPPH 라디칼 소거활성

생명체의 노화와 세포 손상에 따른 질병은 생체 내에서 생

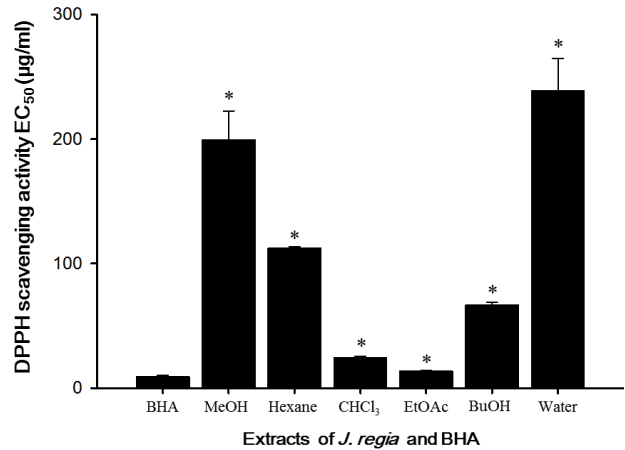


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activities of various solvent extracts from *Juglans regia* L. EC₅₀ values were defined as the sample concentrations required for 50% the radical to be scavenged. BHA, butylated hydroxyanisole. The values are significantly different when compared to the BHA (*p<0.01).

성되는 자유라디칼에 의해 일어난다. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)는 자유라디칼 소거능력 측정에 이용되는 안정된 자유라디칼 화합물로서 방향족 화합물 및 아민류인 ascorbic acid 및 tocopherol 등의 환원능을 이용해 항산화능 측정에 사용된다[31].

본 연구에서 호두과피 추출물의 분획별 항산화 효과는 다양한 식물의 항산화 활성 물질을 측정하는데 활용되는 DPPH 자유라디칼 소거활성법[5]을 이용하여 대조물질인 BHA와 비교 실험하였다. DPPH 결과는 Table 3와 Fig. 2에 effect concentration 50 (EC₅₀) 값으로 나타내었다. 전자공여능(electron donating ability, EDA)에 의해 얻은 대조군인 BHA의 항산화능은 8.78 µg/ml 보다는 높으나 에틸 EtOAc Ex에서 13.43 µg/ml로 추출물 중 가장 우수하였으며 다음으로 CHCl₃ Ex에서 34.38 µg/ml의 값을 보였다(Fig. 2). Fernández-Agulló[11]은 호두(*Juglans regia* L.)의 과피에서 메탄올 및 열수추출물의 DPPH 자유라디칼 소거능을 EC₅₀으로 확인한 결과, 각각 항산화 활성이 380 µg/ml 및 720 µg/ml의 농도에서 나타났다고

Table 3. Total flavonoid contents (TFC), Total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity of the extracts tested in study

Sample	Extraction yield (%)	TFC (mg QE/g)	TPC (mg GAE/g)	DPPH (EC ₅₀)	ABTS (EC ₅₀)
MeOH Ex	42.6	32.20	0.36	199.31	996.32
Hexane Ex	3.52	9.65	0.37	112.21	652.98
CHCl ₃ Ex	0.35	3.56	126.88	34.38	147.04
EtOAc Ex	2.32	42.48	223.25	13.43	41.83
BuOH Ex	1.49	5.33	72.55	66.45	567.84
Water Ex	11.04	5.88	10.27	238.58	1519.74
Control	—	—	—	8.78 ^a	26.30 ^b

Results are the mean of three independent experiments. QE, quercetin equivalent; GAE, gallic acid equivalent. Control ^a), Butylated hydroxyanisole (BHA). Control ^b); 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox).

발표하였다. 본 연구에서는 호두과피의 MeOH Ex 및 Water Ex의 EC₅₀은 각각 199.31 µg/ml 및 238.58 µg/ml로 나타났다. 이는 MeOH Ex의 경우 약 1.9배, Water Ex의 경우 약 3배 높은 항산화 효과를 나타내어 우리나라에서 자생하는 호두의 항산화 효능이 더 우수한 것으로 나타났다. 또한, 순차적인 유기용매 추출법을 사용할 경우 EtOAc Ex에서 가장 우수한 항산화 효과를 나타내어 향후 단일 성분에 관한 추가 연구가 요구된다.

ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거활성측정은 ABTS가 potassium persulfate에 의해 전자가 산화되어 청녹색을 나타내지만, 항산화 물질의 전자공여능으로 환원됨에 따라 색이 열리는 과정을 측정하는 방법이다[24]. ABTS 라디칼 소거활성법을 이용한 호두과피 추출물의 분획별 항산화 효과를 대조구인 Trolox와 비교하였다. ABTS 결과는 Table 3와 Fig. 3에 effect concentration 50 (EC₅₀) 값으로 나타내었다. 표준물질인 Trolox는 ABTS 라디칼 소거활성 EC₅₀ 값이 26.30 µg/ml 이며, 호두추출물 중 EtOAc Ex가 41.83 µg/ml로 가장 우수하였으며, 다음으로 CHCl₃ Ex에서 147.04 µg/ml의 값을 나타내었다.

이상과 같이 호두과피로부터 용매 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위해, DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성 정도를 BHA와 Trolox을 기준물질과 비교 평가한 결과, 호두 EtOAc Ex는 DPPH 라디칼 소거활성 EC₅₀은 13.43 µg/ml의 농도에서 나타내었다. 이는 대표적인 항산화 물질인 BHA의 EC₅₀은 8.78 µg/ml 보다 4.8배 낮았다. 또한, EtOAc Ex의 ABTS 라디칼 소거활성 EC₅₀은 41.83 µg/ml의 농도에서 활성을 보여, 양성대조물질인 Trolox의 EC₅₀인 13.43 µg/ml 보다 3.1배 낮았으나, 이는 천연물로서 매우 우수한 항산화 활성을 보였다.

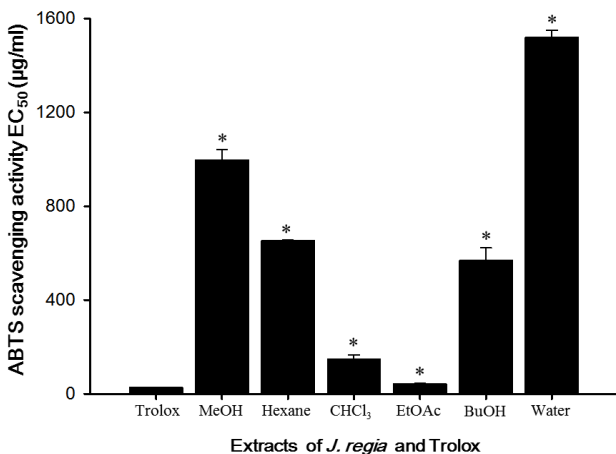


Fig. 3. ABTS free radical scavenging activity of various solvent extracts from *Juglans regia* L. EC₅₀ values were defined as the sample concentrations required for 50% the radical to be scavenged. 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox). The values are significantly different when compared to the Trolox (*p<0.01).

Qusti 등(2010)은 건조된 천연물(dried natural products)의 항산화 활성을 유효농도를 3단계로 구분하였다. 즉, DPPH 라디칼 소거활성이 EC₅₀ < 0.01 mg/ml 일 경우, 항산화 농도는 매우 우수 한 것으로 평가했고, EC₅₀ < 1 mg/ml는 우수, 1 mg/ml < EC₅₀ < 10 mg/ml 사이의 농도는 보통, 그리고 EC₅₀ > 10 mg/ml 이상의 경우 낮음으로 판정하였다[24]. 본 연구에서 호두과피 추출물 가운데 EtOAc Ex의 DPPH 및 ABTS의 항산화능은 각각 EC₅₀ = 13.43와 EC₅₀ = 41.83 µg/ml로 Qusti 등 이 판정한 기준으로 볼 때 우수 항산화 물질인 것으로 평가 된다.

총 플라보노이드, 페놀 함량, DPPH와 ABTS 자유라디칼 소거활성 및 항균활성에 대한 상관관계 분석 결과, 총 페놀함량이 높을수록 DPPH 와 ABTS의 항산화능이 우수한 것으로 나타났다. 이는 추출물 중 EtOAc Ex이 우수한 항균 및 항산화 효과를 나타내고 있으며 다음으로 CHCl₃ Ex이 우수한 것으로 나타났다. 천연물 추출물 성분 중 페놀성 물질은 항산화 활성을 포함하여 다양한 생리활성 효능을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 페놀성분과 항산화 활성은 양의 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다[13]. 또한, 총 플라보노이드 함량의 경우 EtOAc Ex이 가장 우수하였으나 다음으로 우수한 메탄올 추출물의 경우 항산화능은 낮아 상관관계는 없었다. 이는 시료에 함유된 플라보노이드의 종류에 따라 다양한 환원성 작용기를 나타내기 때문에 차이가 있는 것으로 사료된다. 항산화 및 항균측정 결과 EtOAc Ex 및 CHCl₃ Ex에서 가장 우수한 것으로 나타남에 따라 호두과피 추출물에 포함된 페놀성 성분은 항균 및 항산화능이 우수한 성분이 포함된 것으로 여겨진다.

따라서 본 연구는 국내에서 자생하는 호두의 부산물인 과피를 활용하여 유기용매 추출법으로 분리한 추출물의 항균 및 항산화 효과를 측정된 결과 EtOAc Ex이 가장 우수한 항균 및 항산화 효과를 나타냈다. 또한 본 연구결과 호두 부산물인 과피를 이용한 EtOAc Ex는 산업적으로 활용이 가능한 항균물질 및 산화적 스트레스를 방지할 수 있는 항산화 물질로서 개발이 가능 할 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 순천향대학교 학술연구조성비 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

References

1. Alkhawajah, A. M. 1997. Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia*. *Am. J. Chin. Med.* **25**, 175-180.
2. Almeida, I. F., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Costa, P. C. and Bahia, M. F. 2008. Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavenger of pro-oxidant reactive species. *Food Chem.* **106**, 1014-1020.

3. Arranz, S., Pérez-Jiménez, J. and Saura-Calixto, F. 2008. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *Eur. Food. Res. Technol.* **227**, 425-431.
4. Barreira, J. C. M., Ferreira, I. C. F. R., Oliveira, M. B. P. P. and Pereira, J. A. 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food. Chem.* **107**, 1106-1113.
5. Biois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
6. Birt, D. F., Hendrich, S. and Wang, W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* **90**, 157-177.
7. Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C. and Silva, B. M. 2010. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food. Chem. Toxicol.* **48**, 441-447.
8. Choi, S. Y., Lim, S. H., Kim, J. S., Kim, S. R., Kang, K. S. and Hwang, I. K. 2005. Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **37**, 549-556.
9. Clark, A. M., Jurgens, T. M. and Hufford, C. D. 1990. Antimicrobial activity of juglone. *Phytother. Res.* **4**, 11-14.
10. Cushnie, T. P. and Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **26**, 343-356.
11. Espín, J. C., Soler-Rivas, C. and Wichers, H. J. 2000. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food. Chem.* **48**, 648-656.
12. Fernandez-Agullo A., Pereira, E., Freire, M. S., Valentao, P., Andrade, P. B., Gonzalez-Alvarez, J. and Pereira, J. A. 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial. Crops Products* **42**, 126-132.
13. Foti, M. C. 2007. Antioxidant properties of phenols. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**, 1673-1685.
14. Grosso, G., Galvano, F., Marventano, S., Malaguarnera, M., Bucolo, C., Drago, F. and Caraci, F. 2014. Omega-3 Fatty Acids and Depression: Scientific Evidence and Biological Mechanisms. *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi: 10.1155/2014/313570.
15. ISO 14502-1: 2005. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.
16. Li, L., Tsao, R., Yang, R., Liu, C. M., Zhu, H. H. and Young, J. C. 2006. Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *J. Agric. Food. Chem.* **54**, 8033-8040.
17. Martínez, M. L., Labuckas, D. O., Lamarque, A. L. and Maestri, D. M. 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *J. Sci. Food. Agric.* **12**, 1959-1967.
18. Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **71**, 109-114.
19. Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P., Ferreira, I. C. F. R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L. and Pereira, J. A. 2007. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food. Chem.* **105**, 1018-1025.
20. Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L. and Pereira, J. A. 2008. Total phenols antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husk. *Food. Chem. Toxicol.* **46**, 2326-2331.
21. Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A. and Estevinho, L. 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food. Chem. Toxicol.* **46**, 2103-2111.
22. Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C. F. R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R. and Estevinho, L., 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food. Chem. Toxicol.* **45**, 2287-2295.
23. Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food. Chem.* **48**, 3396-3402.
24. Qusti, S. Y., Abo-khatwa, A. N. and Bin Lahwa, M. A. 2010. Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holly Quran. *Eur. J. Biol. Sci.* **2**, 40-51.
25. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free. Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
26. Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H, Lee, Y. S., Riaz, N. and Jabbar, A. 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 238-254.
27. Silva, B. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F. Seabra, R. M. and Ferreira, M. A. 2004. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *J. Agric. Food. Chem.* **52**, 4705-4712.
28. Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Calheta, R., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. and Pereira, J. A., 2006. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives "alcaparra". *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 8533- 8538.
29. Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R. and Colaric, M., 2006. Traditional walnut liqueur - cocktail of phenolics. *Food. Chem.* **95**, 627-631.
30. Wayne, P. A. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. M45-A.
31. Wei, C. C., Yu, C. W., Yen, P. L., Lin, H. Y., Chang, S. T., Hsu, F. L. and Liao, V. H. 2014. Antioxidant activity, de-

- layed aging, and reduced amyloid- β toxicity of methanol extracts of tea seed pomace from *Camellia tenuifolia*. *J. Agric. Food. Chem.* **62**, 10701-10707.
32. Zgoda, J. R. and Porter, J. R. 2001. A convenient micro-dilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm. Biol.* **39**, 221-225
33. Zhang, M. W., Guo, B. J., Zhang, R. F., Chi, J. W., Wei, Z. C., Xu, Z. H., Zhang, Y. and Tang, X. J. 2006. Separation, purification and identification of antioxidant composition in black rice. *Agric. Sci. China* **5**, 431-440.
34. Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, J. and Wang, Z., 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food. Chem.* **113**, 160-165.

초록 : 호두과피 추출물의 항산화 및 항균활성

한국일¹ · 김미란² · 조부경² · 김민지² · 강민주² · 박기현² · 구예은¹ · 김병성¹ · 정의길¹ · 한만덕^{1*}
(¹순천향대학교 생명시스템학과, ²순천향대학교 의료공학과)

호두껍질을 둘러싸고 있는 과피는 식품으로서 효율성이 떨어지지만, 생리활성물질로서 항산화 및 항균효과의 가치를 지니고 있다. 본 연구에서는 호두(*Juglans regia* L.)의 열매과피를 5종류 용매(methanol, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol)로 추출하여 6종 추출물(MeOH Ex, Hexane Ex, CHCl₃ Ex, EtOAc Ex, BuOH Ex, Water Ex)을 얻어, 총 폴리페놀과 총 플라보노이드함량을 특정하고, 항균 및 항산화 활성을 시험하였다. 각 추출물의 항균 활성은 병원균 8종에 대해 최소억제농도를 한천희석법으로 측정하였고, 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)와 ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) 라디칼 소거능을 측정하여 EC₅₀ 값으로 평가하고, 총 플라보노이드 및 페놀함량과 상관관계를 분석하였다. 호두추출물 가운데 항균활성이 가장 우수한 것은 에틸아세테이트 추출물(EtOAc Ex)로서 *Staphylococcus aureus* SG511에 대해 3.2 mg/ml의 MIC을 나타내었다. 또한, EtOAc Ex는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성 EC₅₀ 값이 13.43 μ g/ml과 41.83 μ g/ml로 각각 나타내어 가장 우수한 항산화 활성을 보였다. 이러한 EtOAc Ex의 총 플라보노이드 및 페놀 함량은 각각 2.48 mg QE/g 및 223.25 mg GAE/g였다. 특히 총 페놀함량과 항균활성 및 항산화 활성은 양의 상관관계가 있어 추출액 속에 페놀함량이 높으면 생리활성도 높은 것이 확인되었다. 결론적으로 호두의 과피는 우수한 천연 항균 및 항산화 물질이 포함된 소재로서 이용 가능성을 제시한다.