

대산(大蒜)을 포함하는 복합발효물의 에틸아세테이트 분획으로부터 Tyrosinase 저해활성 성분의 분리 및 동정

송효남^{1*}, 백남인²

¹세명대학교 보건바이오대학 바이오식품산업학부, 교수, ²경희대학교 생명과학대학 한방재료공학과, 교수

Isolation of Bioactive Compounds from the Ethylacetate Fraction of Fermented Garlic Complex and their Tyrosinase Inhibition Activities

Hyo-Nam Song^{1*} and Nam-In Baek²

¹Professor, School of Food and Nutrition Science for Bioindustry, Semyung University, Jecheon 27136, Korea

²Professor, Graduate School of Biotechnology and Department of Oriental Medicinal Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea

Abstract - Fermented complex from garlic and nine medicinal plants were developed as a natural whitening material. Tyrosinase inhibition activity was determined and four active compounds were isolated. The nutritional components of fermented garlic complex (FGC) were analyzed to confirm the applicability as a functional food material. Tyrosinase inhibitory effect of FGC was 88.6%. Methanol extract was partitioned with EtOAc, *n*-BuOH and H₂O. From the EtOAc fraction (47 g), which showed the highest yield, active fractions were separated by repeated TLC, silica gel and ODS column chromatography to isolate active compounds. The chemical structures of the isolated compounds were analyzed by NMR and MS spectra. Phenylpropanoid compounds of 2,4,5-trihydroxy-benzenepropanoic acid (1) (1.9 mg) and 2,3,5-trihydroxy-benzenepropanoic acid (2) were confirmed. In addition, 2,4-dihydroxy-hydrocinnamic acid (3) (3.3 mg) and (+)sesamin (4) (6.1 mg) were isolated. These compounds will be useful as index compounds or functional compounds in FGC.

Key words - 2,4-Dihydroxy-hydrocinnamic acid, 2,3,5-Trihydroxy-benzenepropanoic acid, 2,4,5-Trihydroxy-benzenepropanoic acid, Fermented garlic complex, Tyrosinase inhibition activity

서 언

갈색색소인 멜라닌(melanin)은 피부, 머리카락 및 눈동자의 색소화에 관여하여 피부의 색조를 결정하는 중요한 인자이다(Lee *et al.*, 2003). 타이로시네이즈(tyrosinase)는 멜라닌의 인체 내 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도 결정단계에 관여하는 핵심효소(key enzyme)로 작용한다. 즉, 기질인 타이로신(tyrosine)이 tyrosinase에 의해 산화되는 초기반응 결과 도파퀴논(dopaquinone)이 생성되며, 이후 시스테인(cysteine)의 존재여부에 따라 두 종류의 멜라닌 색소가 생성된다. Cysteine

이 없는 경우 도파크롬(dopachrome)과 DOPA (3,4-dihydroxy phenylalanine)가 생성되는데, dopachrome은 분해되어 여러 중간생성물들을 만들고, 최종적으로 흑색의 유멜라닌(eumelanin)을 생성한다. Cysteine이 존재할 경우 dopaquinone과 반응하여 여러 중간생성물들을 거친 후 최종적으로 갈색의 페오멜라닌(pheomelanin)을 생성하며 이들의 생성으로 피부색이 영향을 받는다(Shosuke, 2003). 따라서 tyrosinase의 활성 억제는 피부세포내 멜라닌 중합체 생합성의 효과적인 저해방법이기 때문에 미백 기능성화장품의 유효성 평가를 위한 시험관내(*in vitro*) 시험법으로 인정되고 있다(Ministry of Food and Drug Safety, 2005).

Melanin 색소에 대응하는 미백(whitening) 화장품 소재 발굴에 업계의 치열한 경쟁이 벌어지고 있는 가운데 천연물로부터

*교신저자: E-mail hnsong@semyung.ac.kr
Tel. +82-43-649-1430

터 보다 안전한 미백활성 소재 연구가 집중적으로 이루어지고 있다. 이미 연교(Koreana Cosmetics, 2006), 복분자(Yang, 2000), 어성초(Nadri Cosmetics, 2000), 잎새버섯(Hanbul Cosmetics, 2004), 무(Han, 2001), 산약(DBIO, 2003), 밤(Chung, 2001) 등을 이용한 미백조성물이 개발되었으며 대부분의 많은 선행 연구에서 tyrosinase의 작용에 대한 억제제를 탐색하는 *in vitro* 시험을 적용하고 있다. 최근의 연구결과에 의하면 국화과 식물의 꽃 18종 중에서 쑥부쟁이, 하얀 코스모스, 분홍 코스모스, 빨간 코스모스 및 하이마야 등이 우수한 tyrosinase 저해 활성을 지닌 소재로 밝혀졌고(Lee *et al.*, 2017), 그밖에 금잔화(Kim, 2019), 아가위열매(Park *et al.*, 2017), 흰색느티만가닥버섯(Kim *et al.*, 2018), 외송(Lim *et al.*, 2017), 부평초(Kim *et al.*, 2019), 비트루트(Yoo *et al.*, 2019) 등 수많은 식품원료와 약용식물 등이 tyrosinase 저해활성을 지닌 것으로 보고되고 있다.

그러나, 이와 같은 대부분의 선행연구는 활성검토만 했을 뿐 정확하게 해당 천연물의 어떤 성분이 이러한 활성을 나타내는지 밝히지 못한 경우가 많다. 다만 일반적으로 천연식물에 풍부한 phenolic compound 및 flavonoid류의 성분에 의한 효과라고 제시하고 있을 뿐이다(Cha *et al.*, 2010). 현재까지 천연물에서 분리된 tyrosinase 활성 억제 물질 중 누룩곰팡이에서 분리된 kojic acid, 우바우르시알에서 분리된 arbutin, 상백피로부터 분리된 oxyresveratrol, 인삼으로부터 분리된 ferulic acid, 대두의 isoflavonoids 등이 있으며, 이중 arbutin과 kojic acid는 미백 기능성 제품의 첨가제로 이미 상용화되어 있는 정도이다.

이와는 달리 몇몇의 연구에서는 천연물의 단순용매 추출물에 대한 tyrosinase 저해 활성 검토에서 더 나아가 발효공법을 적용하여 효소저해 활성을 높이고자 하였으며 그 발효 방법 또한 매우 다양하였다. Cha *et al.* (2010)은 40종의 한방 생약재 열수 추출물을 만든 후 이를 상향버섯 균사체로 발효시킴으로써 감초, 천궁, 정향의 3종의 원료에서 tyrosinase 저해활성과 kojic acid가 증가되었음을 보고하였다. Um *et al.* (2017)은 인삼에서 분리한 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*을 이용한 황금 발효물이 우수한 멜라닌 생성 억제효과를 나타내었다고 하였다. 이 외에도 무기질 배지에 전통발효액을 접종하여 플라스크 배양을 실시한 이카시아꽃잎(Kim *et al.*, 2017b), 김치에서 분리한 유산균 *Lactobacillus sakei* (ATCC 15521)를 이용한 복합해조류 발효추출물(Kang *et al.*, 2018), 다수의 복합유산균으로 발효한 대마씨(Yoon *et al.*, 2018) 및 유산균으로 발효한 마늘껍질(Kim *et al.*, 2010) 등이 보고된 바 있다.

생약명으로 대산(大蒜)이라 불리는 마늘은 주지하다시피

다양한 생리활성과 약효를 지니고 있어 기능성 식품의 소재로 주목받고 있다. 뿐만 아니라 외용제로서도 각종 피부병과 아토피성 피부염, 원형탈모증, 항노화 및 미백 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구팀은 천연물로부터 보다 우수한 미백활성 소재를 발굴하기 위하여 마늘을 주원료로 하고 9종의 약용식물을 포함한 복합발효물을 개발하였다. 전술한 바와 같이 천연물 각각의 원료에 대한 미백 효과가 확인된 경우는 많지만 이들 원료가 실제 산업현장에서 미백활성 성분으로 이용될 경우 그 첨가량이 과량이어야 하거나 실용화 단계에서는 만족할 만한 효과를 나타내지 않는 경우도 많다. 이러한 단점을 극복하기 위한 노력으로 본 연구에서는 마늘과 약용식물을 배합하고 발효함으로써 시너지 효과를 볼 수 있는 조성물을 개발하고자 하였다. 마늘복합발효물의 methanol 추출물로부터 tyrosinase 활성 억제 효과를 확인하였고, 그 중 수득률이 가장 많고 강한 활성을 보인 에틸아세테이트(EtOAc) 분획에서 주요 활성성분을 분리·동정함으로써 신규화합물 및 활성 성분을 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시료 제조

마늘 및 약용식물 원료는 충북 제천의 대형마트 및 약업상에서 모두 한국산으로 구입하였다. 표본시료는 세명대학교 한방기능식품연구실(SMU-0601)에 보관되어 있다(Table 1). 마늘을 주재료로 하고, 도라지, 고삼, 감초, 우방자, 솔잎, 알로에, 흑임자, 호두 및 건강을 부재료로 한 복합발효물은 전보(Jung

Table 1. Ingredients of the fermented garlic complex

Scientific name	Korean name	Amount(%)
<i>Allium sativum</i>	대산(大蒜)	50.00
<i>Platycodon glaucum</i>	길경(桔梗)	6.25
<i>Sophorae Radix</i>	고삼(苦蔘)	6.25
<i>Glycyrrhizae Radix</i>	감초(甘草)	6.25
<i>Arctium lappa</i> Linné	우방자(牛蒡子)	6.25
<i>Pinus densiflora</i>	솔잎	5.00
<i>Aloe arborescens</i>	알로에(Aloe)	5.00
<i>Sesamum indicum</i>	흑임자(黑荳子)	5.00
<i>Juglans sinensis</i>	호두(胡桃)	5.00
<i>Zingiberis Rhizoma</i>	건강(乾薑)	5.00

and Song, 2006)와 같이 (주)아미올이 보유한 발효방법에 따라 제조하였다. 즉, 세척된 각각의 원료에 누룩을 투입하여 7일간 1차 발효 후 건조 및 분말화하였다. 수분을 30% 공급하여 2일간 방치한 후 효모를 투입하여 2일간 2차 발효하였다. 각각의 모든 발효물을 혼합하고 다시 누룩으로 3차 발효시켜 발효원액을 얻었으며 분석시료는 최종적으로 수분함량 10%가 되도록 분말로 제조하여 사용하였다.

시약 및 기기

Silica gel column chromatography용 silica gel과 octadecyl silica gel (ODS)은 각각 silica gel 60 (63–200 μm , Merck, Darmstadt, Germany)과 LiChroprep RP-18 (40–63 μm , Merck)을 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 Kieselgel 60F₂₅₄ 및 RP-18F_{254s} (Merck)를 사용하였다. 시료의 TLC 발색에는 UV lamp Spectroline Model ENF-240 C/F (Spectronics Co., Westbury, NY, USA)와 10% H₂SO₄를 사용하였다.

시료의 추출과 분획에 사용한 유기용매는 모두 1급 시약을 사용하였고, NMR용 CD₃OD 용매를 비롯한 시약은 모두 Merck사의 특급시약을 사용하였다. Tyrosinase (mushroom, [EC 1.14.18.1]), DOPA, kojic acid, ascorbic acid는 모두 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

¹H-과 ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra는 400 MHz FT-NMR Spectrometer (Varian Inova AS-400, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고, ¹H은 400 MHz 및 ¹³C은 100 MHz에서 분석하였다.

일반성분

일반성분은 AOAC (1990) 방법에 준하여 분석하였다. 수분함량은 105°C 상압건조법, 회분함량은 550°C에서 직접회화법으로 분석하였다. 조단백질 함량은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법으로 분석하였다. 탄수화물은 전체 100%에서 수분, 조단백질, 조지방과 조회분 함량을 제외한 값으로 나타내었다. 열량, 식이섬유, 총당, 비타민 A, 비타민 C, 철, 칼슘 및 나트륨의 함량은 식품공전의 방법에 의거하여 분석하였다.

추출 및 분획

마늘복합발효 분말 시료 1 kg에 80% MeOH 용액을 5 L 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 여과지(Toyo No. 2, Φ 380 mm, Advantec, Japan)로 여과하는 과정을 3회 반복하였다. 얻어진 여액을 감압농축하여 MeOH을 제거한 후 EtOAc와 H₂O로 분배

추출하였고, 다시 H₂O층을 *n*-butanol (*n*-BuOH)로 분배 추출하였다. 각 층을 40°C에서 감압농축하여 EtOAc 분획(WSE, 47 g), *n*-BuOH (WSB, 26 g) 및 H₂O (WSW, 10 g)을 얻었다.

TLC 확인

분배 추출로 얻어진 3가지 분획물에 대하여 일차적으로 TLC를 사용하여 물질을 확인하였다. TLC 전개를 위해 EtOAc 분획에는 *n*-hexane/EtOAc = 1:5와 CHCl₃/MeOH = 10:1의 혼합용매를 사용하였고, *n*-BuOH 과 물 분획에는 CHCl₃/MeOH/H₂O = 6:4:1의 혼합용매를 사용하였다. 전개 후 UV lamp의 파장 254 nm와 365 nm에서 형광 또는 흡수가 있는 부분을 확인하고, 10% H₂SO₄ 수용액 분무와 가열 후 발색되는 양상과 R_f 값을 확인하였다. 그 결과 EtOAc 분획에서 가장 진하고 많은 양의 spot을 확인하여 해당 분획에 대한 분리를 실시하였다.

EtOAc 분획의 column chromatography

전체적인 분리동정의 과정은 Fig. 1에 나타내었다. EtOAc 분획에 대하여 silica gel (SiO₂) column chromatography (CC)를 실시하였다. Glass column (Φ 9 × 17 cm)에 silica gel을 충전하고 시료를 주입한 후 전개용매를 *n*-hexane/ EtOAc = 7:1 → 5:1 → 3:1 → CHCl₃/ MeOH = 20:1 → 15:1 → 5:1 → 3:1의 농도구배로 용출하여 총 32개의 분획물을 얻었다(WSE1~WSE32). 얻어진 모든 분획물에 대하여 효소저해활성을 측정하였고(Fig. 2), TLC 발색 결과 fraction 7~9번에서 뚜렷하고 진한 농도의 spot이 확인되어 주요성분의 분획으로 추정하였으며, 이중 효소저해 활성이 가장 높은 9번 분획을 선별하였다.

화합물 1, 2, 3의 분리

Tyrosinase 저해활성이 가장 높은 9번 분획(WSE9, 355.4 mg)에 대하여 다시 SiO₂ CC (Φ 3.8 × 2.0 cm)를 실시하였다. 전개용매는 *n*-hexane/EtOAc = 5:1 → 3:1로 사용하였고, UV와 TLC로 확인하여 최종적으로 13개의 분획물(WSE9-1 ~ WSE9-13)을 얻었다. 이들 분획을 TLC로 확인한 결과 WSE9-7과 WSE9-10이 가장 뚜렷하고 진하게 나타나 활성성분의 major fraction으로 추정되어 추가적인 정제를 실시하였다.

WSE9-7의 분획물에 대해 octadecyl silica gel (ODS) CC (Φ 3.0 × 6.5 cm)를 분리 정제를 실시하였다. MeOH/H₂O = 1:1 → 3:1의 용매 구배로 전개하였고, 용출속도를 증진시키기 위하여 가압펌프를 사용하였다. 최종적으로 6개의 분획을 얻었으며, 이중 TLC 발색결과 single band로 얻어진 4번(WSE9-7-4, 1.9

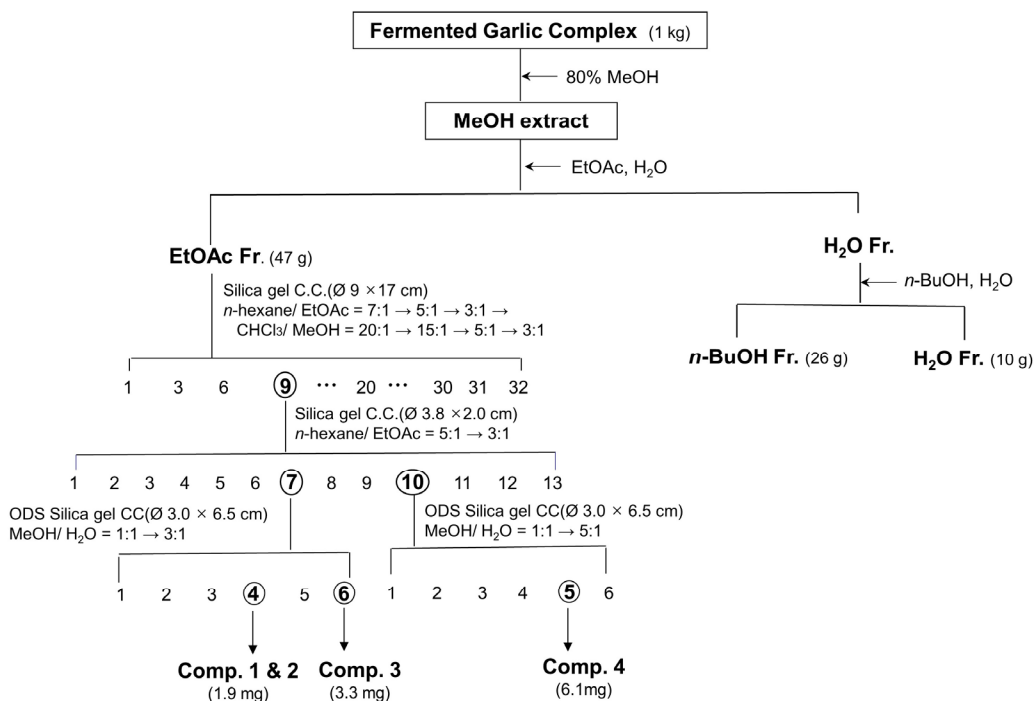


Fig. 1. Overall scheme for the isolation of four compounds by column chromatography from the fermented garlic complex.

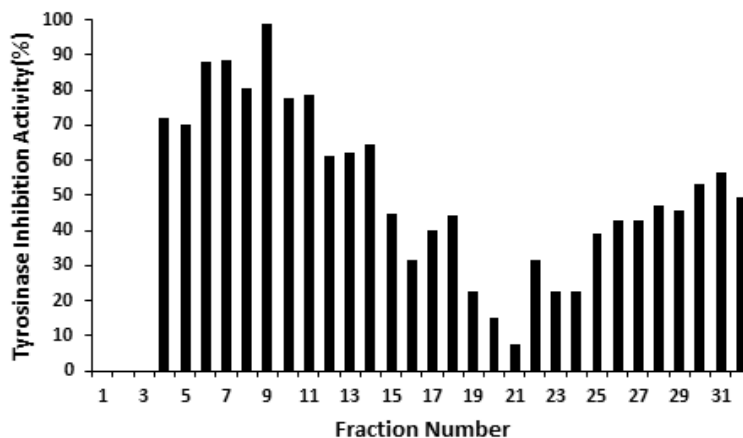


Fig. 2. Tyrosinase inhibition activity of 32 fractions obtained from silica gel column chromatography of ethyl acetate fraction. The concentration of the each fraction was 1.0 mg/mL.

mg)과 6번(WSE9-7-6, 3.3 mg) 분획을 확인하여 NMR 구조분석으로 화합물 **1**, **2**, **3**을 동정하였다(Fig. 3).

화합물 **1**, C₁₀H₁₂O₅, Proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) (400 MHz, CD₃OD, δ) 7.46 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-6), 7.26 (1H, s, H-6), 7.02 (1H, s, H-3), 6.61 (1H, dd, *J*=2.4, 0.8 Hz, H-4), 3.66 (3H, s, -OCH₃), 2.97 (2H, t, *J*=6.4 Hz, H-7), 2.74 (2H, t, *J*=6.4 Hz, H-8); Carbon nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR) (100 MHz, CDCl₃, δ) 176.01 (s, C-9),

154.32 (s, C-4 or C-3), 152.08 (s, C-2), 144.01 (d, C-6), 123.81 (s, C-1), 121.59 (d, C-6), 105.94 (d, C-4), 99.90 (d, C-3), 52.34 (q, -OCH₃), 24.78 (t, C-8), 23.90 (t, C-7).

화합물 **2**, C₁₀H₁₁O₄, Proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) (400 MHz, CD₃OD, δ) 8.07 (1H, s, H-3), 7.03 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 6.96 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-6), 3.68 (3H, s, -OCH₃), 2.95 (2H, t, *J*=6.4 Hz, H-7), 2.74 (2H, t, *J*=6.4 Hz, H-8); Carbon nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR)

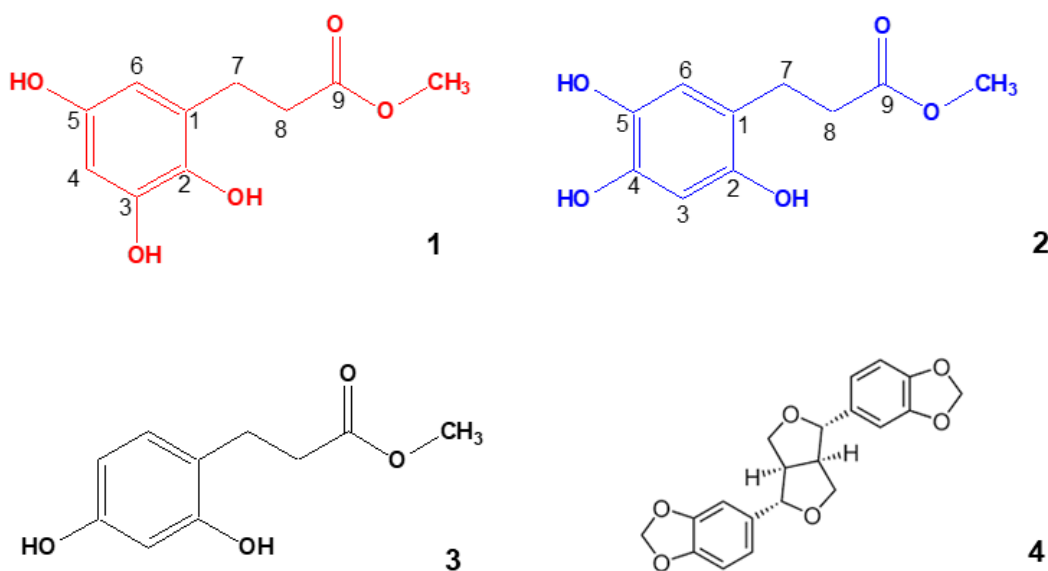


Fig. 3. Chemical structures of the four compounds from the fermented garlic complex.

(100 MHz, CDCl₃, δ) 176.90 (s, C-9), 147.32 (s, C-2), 143.68 (d, C-3), 126.61 (d, C-6), 121.59 (d, C-1), 117.35 (s, C-4), 104.28 (d, C-5), 52.55 (q, -OCH₃), 35.72 (t, C-8), 23.88 (t, C-7).

화합물 3. C₁₀H₁₂O₄. Proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ) 8.07 (1H, s, H-3), 7.03 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 6.96 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-6), 3.68 (3H, s, -OCH₃), 2.95 (2H, t, *J*=6.4 Hz, H-7), 2.74 (2H, t, *J*=6.4 Hz, H-8); Carbon nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR) (100 MHz, CDCl₃, δ) 176.90 (s, C-9), 147.32 (s, C-2), 143.68 (d, C-3), 126.61 (d, C-6), 121.59 (d, C-1), 117.35 (s, C-4), 104.28 (d, C-5), 52.55 (q, -OCH₃), 35.72 (t, C-8), 23.88 (t, C-7)

화합물 4의 분리

WSE9-10(54 mg)의 분획물에 대한 ODS CC (φ4.0 × 5.0 cm, MeOH/ H₂O = 1:1→ 5:1) 실시 결과 6개의 분획을 얻었다. 이 중에서 가장 뚜렷하고 진한 5번(WSE9-10-5, 6.1 mg)의 분획에 대한 NMR 구조분석 결과 화합물 4를 동정하였으며, 이는 잘 알려진 (+)sesamin으로 확인되었다(Fig. 3).

Tyrosinase 저해활성

Kubo *et al.* (1994)에 따라 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.2 mL, 5 mM L-DOPA solution 0.2 mL 및 시료용액

0.5 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (230 units/mL) 0.1 mL를 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시킨 다음 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소저해율(%)은 tyrosinase 효소와 시료액을 모두 넣고 측정한 흡광도(S)와 효소 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 측정한 흡광도(B), 시료액 대신 증류수 0.5 mL를 첨가하여 측정한 흡광도(C)를 측정하여 아래의 수식으로부터 산출하였고, 모든 측정은 3반복으로 실행하였다. Positive control로 kojic acid와 ascorbic acid를 사용하였고, 발효원액 이외 모든 시료는 1.0 mg/mL의 농도에서 측정하였다.

$$\text{Inhibition effect (\%)} = [1 - \{(S-B) / C\}] \times 100$$

결과 및 고찰

미늘복합발효물의 각종 성분 분석 결과는 Table 2와 같다. 비교적 다양한 성분이 분포되어 있으며 특히 섬유소, 철분, 칼슘 등의 함량이 높아 기능성식품의 원료로도 활용이 가능할 것으로 사료된다.

화합물 1은 WSE9-7-4에서 분리된 화합물이며, 다음과 같은 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 결과를 통해 구조를 확인하였다. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum에서 1개의 ester를 이루는 δ_C 176.01과 1 개의 phenyl기를 이루는 탄소 [154.32 (s), 152.08 (s), 123.81 (s), 121.59 (d), 99.90 (d)와 154.32 (s), 152.08 (s), 144.01 (d), 123.81 (s), 105.94 (d)] 및 1 개의 methoxy (δ_C

Table 2. Contents of nutritional components in fermented garlic complex

Components	Contents
Crude Protein	18.9%
Crude Lipid	9.6%
Carbohydrates	55.5%
Dietary Fiber (non-soluble)	21.5%
Total Sugars	2.0%
Calory	298.0 kcal
Vitamin A	N.D. ^z
Vitamin C	0.7 mg/100 g
Iron (Fe)	25.4 mg/100 g
Calcium (Ca)	391.6 mg/100 g
Sodium (Na)	40.1 mg/100 g

^zN.D. = not detected.

52.34)와 고자장 영역에서 2개의 methylene (δ_c 24.78, 23.90) signal이 관측되어 각 다른 2 개의 phenylpropanoid가 혼재하는 것으로 예상하였다. ¹H-NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃)에서도, 2,3,5-삼치환 벤젠 유래의 olefine methine [7.46 (1H, d, $J=2.4$ Hz), 6.61 (1H, dd, $J=2.4, 0.8$ Hz)]과 [7.26 (1H, s, H-6), 7.02 (1H, s, H-3)], 1개의 methoxy (δ 3.66, s), 2개의 methylene [2.97 (2H, t, $J=6.4$ Hz), 2.74 (2H, t, $J=6.4$ Hz)] signal이 관측되었다. 이상의 결과를 종합하여 화합물 **1**의 구조를 2,3,5-trihydroxy-benzenepropanoic acid, methyl ester로 동정하였으며 이는 신규한 물질로 확인되었다 (Jung and Song, 2006).

화합물 **2**는 WSE9-7-4에서 분리된 화합물이며, 다음과 같은 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 결과를 통해 구조를 확인하였다. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum에서 1개의 ester를 이루는 δ_c 176.90과 1개의 phenyl기를 이루는 탄소 [147.32 (s), 143.68 (d), 126.61 (d), 121.59 (d), 117.35 (s), 104.28 (d)] 및 1개의 methoxy (δ_c 52.55)와 고자장 영역에서 2개의 methylene (δ_c 35.72, 23.88) signal이 관측되어 1개의 phenylpropanoid로 예상하였다. ¹H-NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃)에서도, 2,3-이치환 벤젠 유래의 olefine methine [8.07 (1H, s), 7.03 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 6.96 (1H, d, $J=8.4$ Hz)], 1개의 methoxy (δ 3.68, s), 2개의 methylene [2.95 (2H, t, $J=6.4$ Hz), 2.74 (2H, t, $J=6.4$ Hz)] signal이 관측되었다. 이상의 결과를 문헌값(Li *et al.*, 1996)과 비교하여 화합물 **2**를 2,4,5-trihydroxy-

benzenepropanoic acid, methyl ester로 구조 동정하였고, 화합물 **1**과 **2**는 1:1의 비율로 존재하는 것으로 예상되었다.

화합물 **3**은 WSE9-7-6에서 분리된 화합물이며, 다음과 같은 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 결과를 통해 구조를 확인하였다. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum에서 1개의 ester를 이루는 δ_c 176.90과 1개의 phenyl기를 이루는 탄소 [147.32 (s), 143.68 (d), 126.61 (d), 121.59 (d), 117.35 (s), 104.28 (d)] 및 1개의 methoxy (δ_c 52.55)와 고자장 영역에서 2개의 methylene (δ_c 35.72, 23.88) signal이 관측되어 1개의 phenylpropanoid로 판명되었다. ¹H-NMR spectrum (400 MHz, CDCl₃)에서도, 2,3-이치환 벤젠 유래의 olefine methine [8.07 (1H, s), 7.03 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 6.96 (1H, d, $J=8.4$ Hz)], 1개의 methoxy (δ 3.68, s), 2개의 methylene [2.95 (2H, t, $J=6.4$ Hz), 2.74 (2H, t, $J=6.4$ Hz)] signal이 관측되었다. 이상의 결과를 종합하여 WSE9-7-6에서 분리된 물질의 구조를 2,4-dihydroxy-benzenepropanoic acid (methyl ester)로 결정하였다. 화합물 **3**은 2,4-dihydroxy-hydrocinnamic acid (methyl ester)로도 명명되어 있으며 미백 화장품의 소재로도 이용되고 있다.

화합물 **4**는 WSE9-10-5에서 분리된 화합물이며, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 결과를 통해 구조를 확인하였다. C₂₀H₁₈O₆, Proton data의 저자장 영역에서는 6.75 ppm 근처에서 8 Hz의 coupling constant값을 가지는 1개의 olefinic methine proton과 6.78 ppm에서 이와 coupling을 이루는 olefinic methine proton 1개를 관측할 수 있었고 저자장 영역에서는 1.6 Hz로 long range coupling을 하고 있는 olefinic methine proton 1개를 관측할 수 있었다. 6 ppm 근처에서는 겹쳐져 있는 두개의 dioxy methylene을 관측할 수 있었으며, 2개의 oxygenated methine proton과 split 되어 있는 각각 2개씩의 oxygenated methylene proton을 관측할 수 있었다. 고자장 영역에서는 겹친 두개의 methine proton을 확인할 수 있었다. Carbon data에서 총 탄소수는 20개이며, 저자장 영역에서는 각각 2개씩의 산소가 결합한 olefinic quaternary carbon을 확인할 수 있었고, 2개의 olefinic quaternary carbon과 총 6개의 olefinic methine proton을 관측할 수 있었다. 100 ppm 근처에서는 dioxy methylene으로 보이는 signal을 확인하였고 2개의 oxygenated methine, 2개의 oxygenated methylene을 확인할 수 있었다. 마지막으로 54 ppm 근처에서는 methine carbon 2개를 관측할 수 있었다. 이 모든 data를 종합하고 문헌과 비교한 결과 이 화합물은 (+)sesamin으로 예상하였다(Fig. 3) (Kim *et al.*, 2008).

더욱 정확한 구조 확인을 위하여 2D-NMR을 측정하였다.

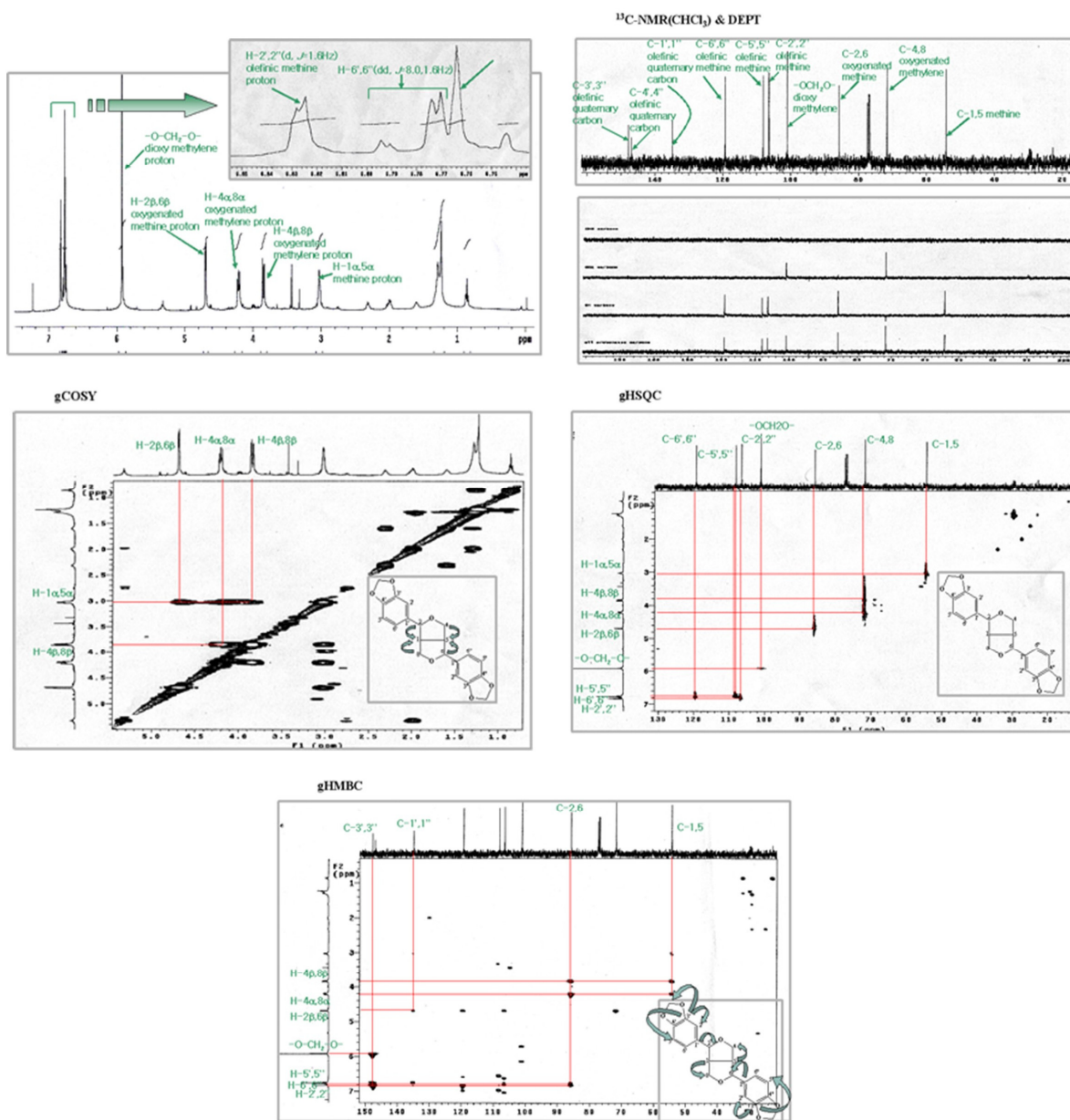


Fig. 4. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) & DEPT spectra, $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum, HSQC spectrum and HMBC spectrum of (+)sesamin isolated from the fermented garlic complex.

COSY data는 한 proton과 이웃한 proton과의 correlation을 보여주는 data로서 2번과 1번, 8번과 1번 proton이 서로 correlation 관계에 있었고, 4번과 5번, 6번과 5번 proton 또한 correlation 하는 것을 확인할 수 있었다. HSQC는 한 carbon과 그 carbon에 결합되어 있는 proton과의 correlation을 보여주는 data로서 dioxy methylene carbon이 correlation하는 proton이 바로 dioxy methylene proton임을 확인할 수 있는 data이다. HMBC는 한

carbon과 그 이웃한 proton과의 long range correlation을 보여주는 data로서 3번 탄소가 dioxy methylene과 correlation을 보이고 2', 5번 proton과 correlation하는 것으로 보아 dioxy methylene의 위치를 확인할 수 있었고 1번 탄소가 2번 proton과 correlation하는 것으로 보아 이 벤젠고리가 2번 탄소에 결합되어 있다는 것을 알 수 있었다. 이 모든 data를 종합하여 화합물 4를 (+)sesamin으로 확인하였다(Fig. 4).

Table 3. Tyrosinase inhibition activity of fermented garlic complex and their fractions by column chromatography

Samples	Inhibition Activity (%) ^a
FGC ^y	88.6 ± 0.8 ^x
EtOAc	91.2 ± 0.7
WSE9 ^w	98.9 ± 0.6
WSE9-7 ^v	98.1 ± 1.2
WSE9-10 ^v	97.3 ± 0.8
Kojic acid	95.6 ± 3.1
Ascorbic acid	99.7 ± 0.1

^aData were measured at the concentration of 1.0 mg/mL except FGC.

^yFGC stands for undiluted solution of fermented garlic complex.

^xData are presented as the mean±standard deviation (n=3).

^wWSE9 stands for the 9th fraction in 32 fractions from the ethyl acetate layer.

^vWSE9-7 stands for the 7th fraction in 13 fractions from the WSE9.

Tyrosinase 저해활성

각 분획별 시료의 tyrosinase의 저해효과는 Table 3에 나타내었다. 마늘복합발효 원액은 88.6%의 효소저해 효과를 나타내었고, 이의 에틸아세테이트 분획에서는 91.2%였다. 에틸아세테이트 32분획 중 9번 분획(WSE9)은 98.9%의 높은 활성을 나타내었으며, 이를 다시 분획하여 화합물 **1**, **2**, **3**을 얻은 7번 분획(WSE9-7)과 화합물 **4**를 얻은 10번 분획은 각각 98.1% 및 97.3%의 활성을 보였다. Positive control로서 사용한 kojic acid나 ascorbic acid는 각각 95.6% 및 99.7%으로 나타났다.

일반적으로 4-hydroxy-3-methoxyphenyl skeleton을 포함하고 있는 화합물은 잠재적인 tyrosinase 효소 저해 성분으로 알려져 있어(Wu *et al.*, 2015) 이와 유사한 화합물 **1**, **2**, **3**이 확인된 것은 매우 일치하는 결과이다. 화합물 **4**의 sesamin은 이미 잘 알려져 있는 물질이다.

한편, 마늘복합발효물에 사용한 각 원재료의 tyrosinase 효소 저해 활성 성분에 대한 분리동정 연구를 살펴보면 다음과 같다. 감초의 메탄올 추출물에 대한 tyrosinase 저해 효과(Choi *et al.*, 1998)과 그 활성 성분으로 isoliquiritigenin-2'-O-methyl ether가 분리 정제된 바 있다(Lee *et al.*, 2003). 고삼에서는 kushnol의 6개의 화합물이 tyrosinase 저해 활성이 있는 것으로 분리되었고(Kang, 2002), 우방자에서는 arctigenin (Kim *et al.*, 2015)이 분리되었다. 솔잎의 70% 에탄올 추출물에서는 catechin, shikimic acid, icaric acid E4 및 (+)-isolaricresinol 등 4종의 화합물이 분리되었으며(Kang, 2015), 알로에는 aloin

B를 비롯한 8종의 화합물(Kim *et al.*, 2017a) 활성 성분으로 밝혀져 있다. 이 모든 것을 종합했을 때 상기에서 분리 확인된 화합물 **1**, **2**, **3** 등은 원재료에 함유된 화합물들이 그대로 이행된 것이 아니라 발효를 통해 분해 및 합성되는 과정에서 생성된 것으로 추정된다. 그러나 이를 확인하기 위해서는 개별 생약재 원료에 대한 성분 분리동정을 통한 비교 및 발효 전후의 성분 비교 분석과 같은 더욱 심도있는 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 세포실험에서도 이러한 tyrosinase 저해 활성이 효과적으로 나타나는지에 대한 확인이 추가적으로 필요할 것으로 보인다. 이러한 결과들을 통해 상기 화합물들이 향후 본 조성물의 지표성분 및 기능성 성분으로 활용된다면 기업에서의 원천기술 확보를 통한 제품개발과 산업화에 매우 유용할 것으로 사료된다.

적 요

천연미백소재를 개발하기 위하여 대신(마늘)을 포함한 총 10종의 약용식물 혼합물을 발효하여 얻은 발효물로부터 tyrosinase inhibition 활성을 확인하고, 이로부터 신규한 화합물 1종의 3종의 활성 성분을 분리하였다. 마늘복합발효물의 영양성분 13항목을 분석하여 기능성 식품 소재로의 활용가능성을 확인하였다. 발효원액의 tyrosinase 저해효과는 88.6%로 나타났고, 활성성분의 분리를 위하여 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O로 분배, 추출하였다. 이중 수득률이 가장 높은 EtOAc 분획물(47g)로부터 silica gel 및 ODS column chromatography를 반복하면서 TLC와 효소저해 효과로부터 확인한 활성분획을 순차적으로 분리하였다. 화합물의 화학구조를 NMR 및 MS 등의 스펙트럼으로 분석한 결과 phenylpropanoid류의 신규 화합물인 2,4,5-trihydroxy-benzenepropanoic acid (**1**) (1.9 mg) 및 화합물 **1**과 동량으로 혼재하는 2,3,5-trihydroxy-benzenepropanoic acid (**2**)를 확인하였다. 이외에 2,4-dihydroxy-hydrocinnamic acid (**3**) (3.3 mg) 및 (+)sesamin (**4**) (6.1 mg)을 분리·동정하였다. 이 화합물들이 향후 본 조성물의 지표성분 및 기능성 성분으로 활용된다면 기업에서의 원천기술 확보를 통한 제품개발과 산업화에 매우 유용할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2017년 세명대학교 교내학술연구비의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA.
- Cha, J.Y., H.J. Yang, J.J. Jeong, W.S. Seo, J.S. Park, M. Ok and Y.S. Cho. 2010. Tyrosinase inhibition activity and antioxidant capacity by fermented products of some medicinal plants. *J. Life Sci.* 20(6):940-947 (in Korean).
- Choi, B.W., B.H. Lee, K.J. Kang, E.S. Lee and N.H. Lee. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 29(3):237-242 (in Korean).
- Chung, S.K. 2001. Preparation of antioxidative and anti-browning fraction and purification of active compounds from chestnut outer peel. Korea Patent 1020010057283.
- DBIO. 2003. Melanin synthesis inhibition compound and its composition containing *Dioscorea rhizoma* extract. Korea Patent 1020010058894.
- Han, Y.H. 2001. Isolation and utility of whitenings and antioxidants from *Raphanus sativus*. Korea Patent 1020010050197.
- Hanbul Cosmetics Co., Ltd.. 2004. A cosmetic composition containing an extract of *Grifola frondosa*. Korea Patent 1004380090000.
- Jung, K.S. and H.N. Song. 2006. Fermented product, new compound obtained therefrom, and skin whitening products containing the same. Korea Patent 1006402460000.
- Kang, N.S. 2002. Study on whitening substances from *Sophora flavescens*. Masters Thesis, Kyungsang Univ., Korea. pp. 38-40 (in Korean).
- Kang, S.H. 2015. Identification of anti-oxidative, skin whitening and anti-wrinkle constituents from the leaves of *Pinus densiflora* and *Sargassum Muticum*, Masters Thesis, Jeju Univ., Korea. pp. 20-23 (in Korean).
- Kang, S.W., E.J. Kim, Y.R. Jung and H.J. Ko. 2018. The anti-oxidant and whitening activities of seaweeds mixture fermentation extracts. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 44(3):327-334 (in Korean).
- Kim, D.H., T.S. Park and S.G. Kim. 2019. Whitening and anti-wrinkle effect of *Spirodela polyrhiza* extracts. *J. Appl. Biol. Chem.* 62(4):391-398 (in Korean).
- Kim, H.S. 2019. Effect of *Calendula arvensis* extract on anti-melanogenesis and antimicrobial activity. *J. Appl. Biol. Chem.* 62(2):137-141 (in Korean).
- Kim, J.H., J.Y. Yoon, S.Y. Yang, S.K. Choi, S.J. Kwon, I.S. Cho, M.H. Jeong, Y.H. Kim and G.S. Choi. 2017a. Tyrosinase inhibitory components from Aloe vera and their antiviral activity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32(1):78-83 (in Korean).
- Kim, M.H., J.M. Lee, J.Y. Park, S. Lee., S. Han, J.Y. Kim, D. Son, S.Y. Choi and S.P. Lee. 2008. Phtosterols and lignans from the sesame dregs of *Sesamum indicum*. *Korea J. Plant Res.* 21(5):420-426.
- Kim, R.J., M.J. Kang, S.J. Lee, J.H. Shin and N.J. Sung. 2010. Physicochemical characteristics and antioxidant activities of fermented garlic husk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39(12):1731-1738 (in Korean).
- Kim, S.C., H.S. Kim and S.J. Cho. 2018. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of white beech mushroom (*Hypsizygus marmoreus*) extracts. *J. Mushrooms* 16(4):324-330 (in Korean).
- Kim, T.H., J.K. Park and N.H. Jeong. 2015. Whitening effects of arctigenin extracted from the *Arctii Fructus*. *J. Kor. Oil Chemists Soc.* 32(3):505-511 (in Korean).
- Kim, Y.G., D.N. Pham, Y.H. Lee, J.J. Jo, E.Y. Choe, Y.H. Lee, S.B. Kim and C.H. Kim. 2017b. Whitening and antioxidant activities of fermentation broth of acacia flower (*Robinia pseudoacacia*). *Clean Technol.* 23(4):401-407 (in Korean).
- Koreana Cosmetics Co., Ltd.. 2006. Skin whitening composition containing the fruit extracts of *Forsythia suspensa*. Korea Patent 1006380560000.
- Kubo, I., I. Kinst-Hori and Y. Yokokawa. 1994. Tyrosinase Inhibitors from *Anacardium occidentale* Fruits. *J. Nat. Prod.* 57(4):545-551.
- Lee, J.S., J.A. Kim, S.H. Cho, A.R. Son, T.S. Jang, M.S. So, S.R. Chung and S.H. Lee. 2003. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Glycyrrhiza glabra* L. *Kor. J. Pharmacogn.* 34(1):33-39 (in Korean).
- Lee, Y.G., J. Lee, N.Y. Lee, N.K. Kim, D.W. Jung, W. Wang, Y. Kim, H.G. Kim, T.N. Nguyen, H. Park and N.I. Baek. 2017. Evaluation for the flowers of compositae plants as whitening cosmetics functionality. *J. Appl. Biol. Chem.* 60(1):5-11 (in Korean).
- Li, J, F.J. Zhang and B.M. Christensen. 1996. Involvement of lactones in the formation of 6-hydroxydopa and 6-hydroxyhydrocaffeic acid during oxidation of dopa and hydrocaffeic acid. *J. Electroanal. Chem.* 412(1):19-29.
- Lim, S.M., H.J. Park and Y.J. Cho. 2017. Antioxidative and biological activity of extracts from *Orostachys japonicus*. *J. Appl. Biol. Chem.* 60(4):293-300 (in Korean).

- Ministry of Food and Drug Safety. 2005. Guideline for the effectiveness evaluation of functional cosmetics I. pp. 2-3 (in Korean).
- Nadri Cosmetics Co., Ltd. 2000. Inhibition agent of tyrosinase composed of *Houttuynia cordata* extract and cosmetic composition having whitening effect containing the same. Korea Patent 1020000073163.
- Park, S.J., S.P. Kwon and Y.A. Rha. 2017. Antioxidative activities and whitening effects of ethanol extract from *Crataegus pinnatifida* bunge fruit. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 46(10): 1158-1163 (in Korean).
- Shosuke, I. 2003. A Chemist's view of melanogenesis. Pigment Cell Res. 16:230-236.
- Um, J.N., J.W. Min, K.S. Joo and H.C. Kang. 2017. Enhancement of antioxidant and whitening effect of fermented extracts of *Scutellariae baicalensis*. J. Soc. Cosmet. Sci. Korea 43(3): 201-210 (in Korean).
- Wu, Y., Z.R. Wu, P. Chen, Y. Lib, W.R. Deng, Y.Q. Wang and H.Y. Li. 2015. Effect of the tyrosinase inhibitor (S)-N-trans-feruloyloctopamine from garlic skin on tyrosinase gene expression and melanine accumulation in melanoma cells. Bioorgan. Med. Chem. Letters 25(7):1476-1478.
- Yang, B.C. 2000. Cosmetic composition for skin whitening comprising and the extract from *Rubus coreanus* Miq. Korea Patent 1020000073267.
- Yoo, J.H., H.K. Kim, T.W. Yoon, M. Mekapogu, M.S. Ahn, O.K. Kwon, K.S. Bang and Y.J. Kim. 2019. Determination of tyrosinase inhibitory activity and betanin content changes in beetroot (*Beta vulgaris*) extracts fermented by EM. Proceedings of Symposium. April 2019. Korean J. Plant Res. p. 110.
- Yoon, Y.C., B.H. Kim, J.K. Kim, J.H. Lee, Y.E. Park, G.S. Kwon, H.S. Hwang and J.B. Lee. 2018. Verification of biological activities and tyrosinase inhibition of ethanol extracts from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) fermented with lactic acid bacteria. J. Life Sci. 28(6):688-696 (in Korean).

(Received 13 March 2020 ; Revised 14 March 2020 ; Accepted 14 March 2020)