

막걸리로부터 항산화 화합물의 단리·정제 및 동정

왕승진 · 이형재 · 조정용 · 박근형 · 문제학*
전남대학교 식품공학과 및 기능성식품연구센터

Isolation and Identification of Antioxidants from *Makgeolli*

Seung-Jin Wang, Hyoung Jae Lee, Jeong-Yong Cho, Keun-Hyung Park, and Jae-Hak Moon*

Department of Food Science & Technology, and Functional Food Research Center, Chonnam National University

Abstract The present study was carried out to isolate and identify of antioxidants from *makgeolli*. *Makgeolli* (3 L) was filtered and the residue was extracted by MeOH. The combined filtrates and MeOH extracts were successively solvent-fractionated by *n*-hexane, EtOAc, and BuOH. In the antioxidative activity against DPPH and ABTS⁺ radicals of each fraction obtained after solvent-fractionation, EtOAc and BuOH layers showed higher activities than other fractions. Therefore, the two layers were respectively purified by column chromatography and HPLC. The isolated compounds were subjected to NMR and MS analyses and identified as 4-hydroxybenzaldehyde (**1**, 2.0 mg), 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol (**2**, tyrosol, 15.3 mg), *trans*- and *cis*-ferulic acids (**3** and **4**, 1.2 mg), 1H-indole-3-ethanol (**5**, tryptophol, 3.4 mg), dimethyl succinate (**6**, 14.9 mg), succinic acid (**7**, 7.4 mg), and mono-methyl succinate (**8**, 7.8 mg). The presence of **1-5** in *makgeolli* have never before been reported.

Keywords: *Makgeolli*, antioxidant, 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol (tyrosol), phenolic compound, organic acid

서 론

우리나라에서 가장 역사가 오래된 술인 막걸리는 우리의 전통 민속주로서 탁주 또는 농주로도 불리우며, 예로부터 자가 생산하여 널리 음용하여 온 일종의 양주주로 당화와 발효 공정을 병행하여 제조되는 알콜성 음료이다(1).

현재 양조장에서 생산되고 있는 막걸리는 에탄올이 약 6-8% 함유되어 있고, 100 g 당 단백질 1.9 g, 지질 0.1 g, 당질 1.2 g, 회분 0.1 g, 칼슘 14 mg, 인 28 mg, 철 0.8 mg, 나트륨 2 mg, 칼륨 5 mg, 비타민 B₁ 0.01 mg, 비타민 B₂ 0.03 mg 등 각종 유용한 영양소가 다양하게 함유되어(2,4) 있어 영양적 가치가 높을 뿐만 아니라 생효모가 함유되어 있기 때문에 다른 주류와 차별화되는 독특한 맛을 지니고 있다. 그리고 담금 후 누룩 중의 미생물에 의한 효소작용으로 인해 원료성분이 분해되어 생성되는 당분, 아미노산, 유기산 등의 맛 성분과 효모나 젖산균 등의 미생물에 의한 알코올 발효로 휘발성 풍미 성분이 생성되어 막걸리 특유의 색과 함께 품질의 조화를 이룬다(5). 이러한 영양성과 막걸리 고유의 특성이 재인식되면서 최근 국내와 일본 등에서 소비가 크게 증가하고 있는 추세이다.

국내의 2010년 막걸리 출고량은 41만 2,000 kL로 2009년의 26만 kL보다 58.1%의 증가를 기록했으며, 2010년 국외 수출량 또

한 1만 9,407 kL로 전년 6,978 kL보다 178.1% 증가하였다(6). 종래의 막걸리는 우수한 전통 발효식품임에도 불구하고 저장시 및 음용 후에 발생하는 이취, 마시기 불편함, 소량의 fusel oil이 함유되어 있는 등 주질 상의 문제점들이(7) 지적되어 왔다. 그러나, 최근에 이러한 문제점들을 개선하기 위한 연구들이 수행되어 막걸리의 품질이 많이 개선되었다(5,8). 전통적인 막걸리 제조는 곰팡이를 배양하여 얻은 입국에 적당량의 물과 효모를 첨가하여 주모를 제조하고, 제조한 입국과 주모에 효모를 첨가하여 1단 담금하여 효모를 증식시키고, 쌀과 물을 첨가하여 2단 담금한 후 숙성 및 제성하여 막걸리(탁주)를 제조하고 있다(9).

종래의 막걸리에 관한 연구는 당류, 유기산, 아미노산 등의 맛 성분과 관련한 내용과(3,9,10) 전분질 및 누룩의 원료나 종류에 따른 탁주의 휘발성 향기성분의 개선에 관한 내용이였다(8). 최근 막걸리의 생리활성 및 기능성에 대한 연구로 실험동물의 혈중지질 감소효과에 대한 연구와(11) 막걸리가 혈액성분에 미치는 효과에 대한 연구가(12) 일부 행해지긴 하였으나 막걸리의 우수성 및 특성을 제시하기 위해서는 보다 다양한 연구수행이 필요하다고 판단된다. 이처럼 막걸리에 대한 종래의 연구는 첨가 소재 및 누룩 개발 등의 내용에 국한되어 왔으며, 막걸리에 함유된 생리활성 성분 연구는 전무한 실정이다. 그래서 본 연구에서는 막걸리의 세계화 및 우수성을 널리 알릴 기초자료 확보를 위해 분자수준에서 막걸리의 항산화 화합물을 단리·정제하고 그 화합물들의 구조를 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에서 사용된 M사의 막걸리는 2009년 10월 공장에서부터 출하 당일의 제품을 마트에서 구입하였으며, 구입 직후 실험

*Corresponding author: Jae-Hak Moon, Department of Food Science and Technology, and Functional Food Research Center, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel: 82-62-530-2141
Fax: 82-62-530-2149
E-mail: nutrmoon@jnu.ac.kr
Received August 4, 2011; revised October 22, 2011; accepted October 24, 2011

에 이용하였다. 제품의 상표에 백미(25%), 소맥분(65%), 전분당(10%), 아스파탐(0.01%)이 원료로 이용되었음이 표기되어 있었다. 본 실험에서 사용된 methanol(MeOH)과 acetonitril(MeCN)은 Fisher Scientific Korea Ltd.(Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 trifluoroacetic acid(TFA)는 Aldrich Chemical Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, NMR 분석에 사용된 CD₃OD, CDCl₃, acetone-d₆는 Acros Organics(Morris Plains, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 모든 시약은 analytical grade를 사용하였다.

막걸리 함유 성분의 추출 및 용매분획

막걸리 3 L를 12시간 동안 정치하여 침전물이 형성되면 상층을 조심스럽게 다른 용기에 취한 후, 혼탁한 하층을 원심분리(5000 rpm, 10 min, 4°C)하여 다시 상층과 하층을 나누어 상층을 따로 옮겨 전 단계에서 분리된 상층 용액과 합하였다. 이어 원심분리 후 얻어진 하층에 MeOH 2.5 L를 가하여 shaking한 후, 18 시간동안 4°C에 정치하여 상층과 하층을 분리한 다음, 또 다시 분리된 하층을 원심분리(5000 rpm, 10 min, 4°C)하여 분리된 하층에 MeOH 2.5 L를 가해 shaking한 후, 위와 같은 방법으로 상층과 하층을 분리하는 과정을 총 4회 행하였다. 이렇게 모아진 상층 용액을 glass filter(Pyrex 25G4, Iwaki Glass, Kyoto, Japan)로 여과하여 얻어진 여과액을 cooling aspirator(CCA-1110, Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 감압농축한 후, 증류수를 이용하여 최종적으로 1 L가 되도록 정용한 다음, *n*-hexane, ethyl acetate (EtOAc), 그리고 수포화 *n*-butanol(BuOH) 각각 1 L씩으로 3회 반복하여 순차적으로 용매분획하였다.

막걸리의 MeOH 추출물 및 용매분획물들의 TLC-DPPH법에 의한 항산화 활성 검증

막걸리 MeOH 추출물 및 용매분획물들의 항산화 활성 검증은 Thin Layer Chromatography(TLC) plate(aluminium sheets, silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Germany)에 DPPH의 ethanol 용액(200 μM)을 분무하는 방법을 이용하였다(13). 즉 MeOH 추출물 및 용매분획물들 일정량(막걸리 원액 1 μL 상당량)씩을 TLC plate에 spotting 후, BuOH/acetic acid/H₂O=4:2:2(v/v) 혼합 용매로 전개하였다. 전개된 TLC plate를 건조시킨 직후 DPPH의 ethanol 용액을 TLC 상에 분무한 다음, 탈색되어진 획분이나 물질을 항산화 활성의 양성으로 판정하였다. 이하 TLC를 이용한 본 항산화 활성 검증법을 “TLC-DPPH법”이라 표기하였다.

막걸리 MeOH 추출물 및 용매분획물들의 ABTS⁺ Radical-Scavenging 활성 평가

ABTS⁺ radical-scavenging 활성평가는 Dudonne 등의 방법을(14) 참고하여 행하였다. 즉 7 mM ABTS 및 2.5 mM potassium persulfate 수용액을 각각 조제한 후, 95:5(v/v)의 비율로 혼합하여 4°C 암소에서 12시간 동안 반응하여 ABTS⁺ radical(ABTS⁺)용액을 조제하였다. 반응액은 흡광도 값이 735 nm에서 0.7±0.15가 되도록 EtOH로 희석하여 실험에 사용하였다. 희석된 ABTS⁺ radical 용액 500 μL에 막걸리 MeOH 추출물 및 용매분획물들을 막걸리 원액의 70 μL 상당량이 되도록 각각 첨가하여 30분 후 흡광도 값을 측정하였다(RS). ABTS⁺ radical-scavenging 정도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\% \text{ Radical scavenging} = \frac{(\text{Control} - \text{RS})}{\text{Control}} \times 100$$

EtOAc층으로부터 항산화 활성 물질의 분리

막걸리 3 L로부터의 조추출물을 용매분획하여 얻어진 EtOAc층(2.1 g)을 대상으로 octadecylsilane(ODS)을 이용한 open column chromatography를 실시하였다. ODS(70-230 mesh, YMC, Kyoto, Japan)를 MeOH로 상온에서 24시간 동안 팽윤화한 다음, column(4.0 80 cm)에 충전시킨 후, H₂O(pH 2.65 by TFA)로 평행화시키고, 동일 용액에 녹인 시료를 컬럼에 charge한 다음, 동일한 pH 2.65 H₂O 용액 1 L를 용출시켰다. 이어 10, 20, 40, 60, 80 및 100% MeOH, 그리고 acetone를 이동상으로 하여 각 단계별로 1 L씩 순차적으로 흘려보내는 step-wise 용출 방법에 의해 용출·분획(15 mL/fr.)하였다.

EtOAc층을 대상으로 ODS column chromatography를 행하여 얻어진 획분들은 최종적으로 HPLC를 이용하여 더욱 정제하였다. 즉, EtOAc층을 대상으로 ODS open column chromatography를 행한 후 얻어진 획분 129-185는 μBondapak™ C18 column(7.8×300 mm, Waters, Mesachusetts, USA)을 이용하여, 2.5 mL/min(2480 Solvent Delivery System, Waters)의 유속과 280 nm(Dual UV/VIS Absorbance Detector, Waters)에서 20% MeOH을 이동상으로 한 조건에서 정제를 행하였다. 그리고 획분 225와 293은 ODS-80Ts column(4.6×150 mm, Tosoh, Kyoto, Japan)을 이용하여 8% MeCN (pH 2.65, A)과 30% MeCN(pH 2.65, B)을 이동상으로 각각 gradient 용출을 행하였다. 즉, 5분에 100% A, 20분에 25% B를 용출시키고, 30분까지 25% B를 유지시켜 50분에 100% B가 되도록 용출시켰다. 그리고 1.0 mL/min(P580 pump, Dionex, Idstein, Germany)의 유속과 210 nm(UVD-170S UV/VIS detector, Dionex)의 조건에서 정제를 행하였다.

한편 획분 285-292는 μBondapak™ C18 column(7.8×300 mm, Waters)을 이용하여, 2.0 mL/min(LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japan)의 유속과 254 nm(SPD-M20A, Shimadzu)에서 5% MeCN (pH 2.65 by TFA, A)과 30% MeCN(B)을 100% A로 시작하여 60분에 100%가 되도록 gradient 용출시킨 후, 10분동안 100% B를 유지하는 조건에서 정제를 행하였다.

BuOH층으로부터 항산화 활성 물질의 분리

BuOH층(8.81 g)을 대상으로 EtOAc층을 행했던 방법과 동일한 조건으로 ODS open column chromatography를 행하였다. 얻어진 BuOH층의 활성 획분 J를 대상으로 Sephadex LH-20(70-230 mesh, Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 MeOH로 상온에서 24시간 동안 팽윤화한 다음, slurry상의 동일 용매 중의 고정상을 column(2.9×158 cm)에 충전시킨 후, bed volume의 약 5배에 해당하는 50% MeOH을 흘려보내 평행화하고, 시료를 컬럼 상단에 charge한 후, 50% MeOH을 이동상으로 총 1140 mL를 흘려보내 용출·분획(5 mL/fr.)하였다.

얻어진 획분 J-15(39.0 mg)와 J-16(88.9 mg)은 μBondapak™ C18 column을 이용하여, 2.0 mL/min(LC-6AD, Shimadzu)의 유속과 210 nm(SPD-M20A, Shimadzu)의 조건에서 2% MeCN(pH 2.65 by TFA)을 이동상으로 isocratic 용출시켜서 정제를 행하였다. 이상 8종 화합물들의 단리과정을 Fig. 1에 정리하였다.

분리된 활성 물질의 기기분석

활성 물질의 ¹H-NMR(Nuclear Magnetic Resonance)과 ¹³C-NMR은 FT-NMR 기기(™INOVA 500, Varian, Walnut Creek, CA, USA; 한국기초과학지원연구원 광주센터)를 이용하여 분석하였으며, 분석용매는 화합물에 따라 CD₃OD, acetone-d₆ 및 CDCl₃

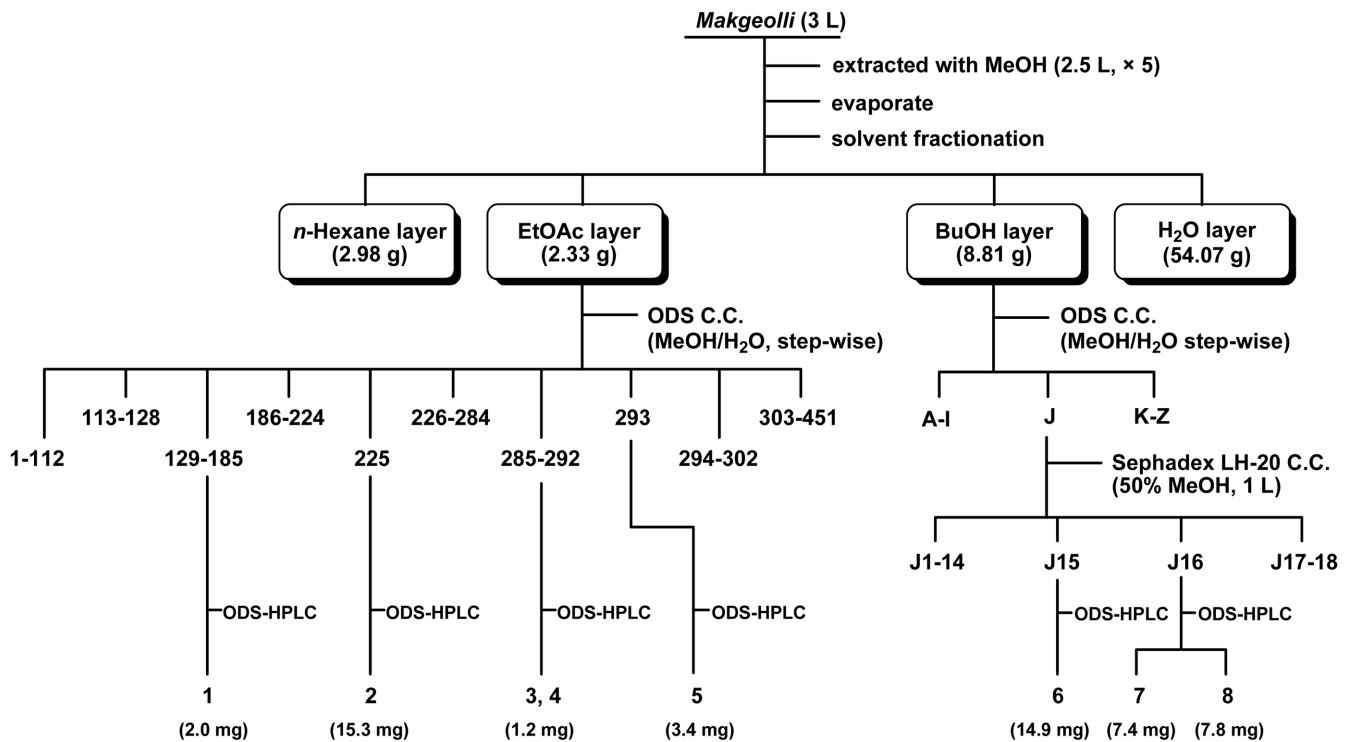


Fig. 1. Isolation and purification procedure of compounds isolated from makgeolli extract.

(내부 표준 물질 tetramethylsilane(TMS) 0.03% 함유)를 사용하였다.

Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry(LC-ESI-MS) 분석은 질량분석기(Shimadzu LCMS-IT-TOF)가 장착된 analysis LC solution 3.0 software(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 수행되었다.

화합물 1: ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.78 (2H, br. d, *J*=8.5 Hz, H-2, 6), 6.92 (2H, br. d, *J*=8.5 Hz, H-3, 5), 9.77 (1H, s, -CHO)

화합물 2: ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.02 (2H, br. d, *J*=8.5 Hz, H-2, 6), 6.70 (2H, br. d, *J*=8.5 Hz, H-3, 5), 2.71 (2H, t, *J*=7.2 Hz, H-7), 3.68 (2H, t, *J*=7.2 Hz, H-8); ESI-MS (positive) *m/z* 161.07 [M+Na]⁺

화합물 3: ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.18 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 6.81 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5), 7.06 (1H, dd, *J*=8.3, 2.0 Hz, H-6), 7.59 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-7), 6.32 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-8), 3.89 (3H, s, -OCH₃)

화합물 4: ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.72 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2), 6.75 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 7.09 (1H, dd, *J*=8.4, 1.8 Hz, H-6), 6.81 (1H, d, *J*=12.6 Hz, H-7), 5.78 (1H, d, *J*=12.6 Hz, H-8), 3.85 (3H, s, -OCH₃)

화합물 5: ¹H-NMR (acetone-*d*₆, 500 MHz) δ 7.16 (1H, s, H-2), 7.56 (1H, br. d, *J*=8.3 Hz, H-4), 7.03 (1H, t, *J*=7.8 Hz, H-5), 7.06 (1H, t, *J*=7.8 Hz, H-6), 7.36 (1H, br. d, *J*=8.3 Hz, H-7), 2.96 (2H, t, *J*=7.0 Hz, H-10), 3.80 (2H, t, *J*=7.0 Hz, H-11); ¹³C-NMR (acetone-*d*₆, 125 MHz) δ 123.40 (C-2), 112.09 (C-3), 128.84 (C-4), 119.41 (C-5), 122.02 (C-6), 119.35 (C-7), 137.59 (C-8), 112.14 (C-9), 49.75 (C-10), 63.27 (C-11); ESI-MS (positive) *m/z* 162.10 [M+H]⁺

화합물 6: ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 3.67 (6H, s,

-O(CH₃)₂), 2.59 (4H, s, -(CH₂)₂-); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 174.96 (C=O), 52.34 (-O(CH₃)₂-), 30.00 (-CH₂)₂-; ESI-MS (positive) *m/z* 171.01 [M+Na]⁺

화합물 7: ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 2.56 (4H, s, -(CH₂)₂-); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 176.26 ((C=O)₂), 30.08 (-CH₂)₂-; ESI-MS (negative) *m/z* 117.02 [M-H]⁻

화합물 8: ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 3.71 (3H, s, -OCH₃), 2.67 (4H, m, H-2, 3); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 177.85 (C-4), 172.62 (C-1), 51.95 (-OCH₃), 28.87 (C-3), 28.61 (C-2); ESI-MS (negative) *m/z* 131.04 [M-H]⁻

결과 및 고찰

막걸리의 추출 및 용매분획

시판용 막걸리(3 L) MeOH 추출물(66.56 g)의 H₂O(1 L)현탁액을 용매분획하여 *n*-hexane층 2.98 g, EtOAc층 2.33 g, BuOH층 8.81 g 및 H₂O층 54.07 g을 각각 얻었다.

막걸리 조추출물과 용매분획물의 TLC-DPPH법에 의한 항산화 활성 평가

얻어진 각 용매 분획물을 대상으로 TLC-DPPH법을 이용하여 항산화 활성을 검정하였다. 막걸리 조추출물, *n*-hexane층, EtOAc층, BuOH층 및 H₂O층을 각각 동일 상당량의 농도(막걸리 원액 1 μL 상당량)로 조제하여 TLC 상에 spotting한 후, BuOH/acetic acid/H₂O=4:2:2(v/v) 용매계를 이용하여 전개한 다음, DPPH ethanol 용액을 분무하여 각 층에 함유된 항산화 물질들의 존재 경향을 비교하였다. 그 결과(data 생략), *n*-hexane층으로부터 *R_f* 0.7-1.0 부분에 강한 항산화 활성을 보이는 spot들이 검출되었다. 그리고 EtOAc층도 다양한 항산화 화합물들의 존재(*R_f* 0.0-0.95) 경향을 보였다. 또한 BuOH층과 H₂O층에서도 활성을 보이는 spot

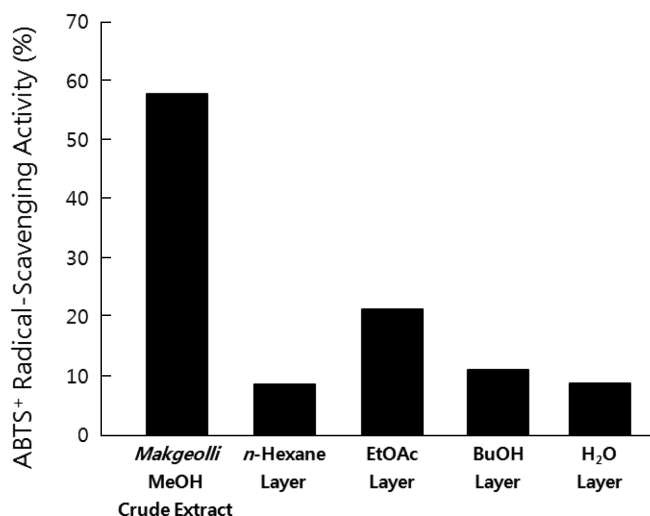


Fig. 2. ABTS⁺ radical-scavenging activity of each fraction obtained by solvent-fractionation of *makgeolli* extract. The data are representative of two experiments.

들(R_f 0.0-0.26, 0.0-0.5)이 검출되었다. 그리고 이 각 획분들에 함유된 화합물들의 존재 경향을 MeOH 조추출물에 함유된 화합물들의 존재 경향과 비교하였을 때, MeOH 조추출물에 함유되어 있는 화합물들이 극성별로 잘 분리되었음을 알 수 있었으며, EtOAc층에 다양한 극성을 갖는 화합물들이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 막걸리 중에 함유되어 있는 활성 화합물의 구명을 위해서는 이들 각 층에 함유되어 있는 화합물들을 체계적으로 구명해 나갈 필요가 있다고 판단되었다.

막걸리 MeOH 추출물 및 용매분획물들의 ABTS⁺ Radical-Scavenging 활성 평가

EtOAc층과 BuOH층을 대상으로 항산화 화합물들의 분리·정제를 실시하기에 앞서 막걸리 조추출물과 용매분획물들의 항산화 활성을 보다 더 명확히 하기 위하여 ABTS⁺ radical-scavenging 활성 평가를 실시하였다. 막걸리 조추출물 및 그 용매분획물들은 막걸리 원액의 70 μ L 상당량을 첨가하여 ABTS⁺ radical과 반응시켜 항산화 활성을 평가하였다. 그 결과(Fig. 2), 용매분획물들 중 EtOAc층의 ABTS⁺ radical-scavenging 활성이 23.2%로 가장 높았으며, 그 다음으로는 BuOH층(8.7%)이었다. 이는 *n*-hexane층과 H₂O층보다 EtOAc층과 BuOH층에 보다 많은 항산화물질이 함유되어 있음을 시사하는 결과라고 판단되었으며, TLC-DPPH법에 의해 확인된 결과와도 연관성이 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과를 통해 상대적으로 높은 활성을 보였으며, TLC-DPPH법의 결과에서도 비교적 단순한 경향과 함께 강한 항산화 활성을 보인 BuOH층과 다수의 활성 화합물들이 존재하는 것으로 판단된 EtOAc층을 대상으로 항산화 화합물의 분리·정제를 실시하였다.

항산화 활성 물질의 분리

먼저 EtOAc층을 대상으로 ODS column chromatography를 실시하여 얻어진 획분들 중 활성 획분 129-185(48.0 mg)에서 HPLC를 이용하여 1종 화합물(화합물 1, 2.0 mg)을 분리하였다. 그리고 활성 획분 225와 293의 HPLC chromatogram들로부터 순도가 높을 것으로 판단된 피크들이 확인되어 HPLC를 이용하여 2종의 화합물들(화합물 2, 15.3 mg; 화합물 5, 3.4 mg)을 분리하였으며, 활성 획분 285-292를 대상으로 HPLC를 행하여 2종의 화합물의

혼합물(화합물 3과 4의 3:1 혼합물, 1.2 mg)을 분리하였다.

이어 BuOH층을 대상으로 활성 화합물들의 분리·정제를 행하였다. 먼저 BuOH층을 이용하여 ODS open column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시한 후, 얻어진 활성 획분을 대상으로 HPLC를 행하여 3종의 화합물들(화합물 6, 14.9 mg; 화합물 7, 7.4 mg; 화합물 8, 7.8 mg)을 분리하였다. 분리된 각 화합물들의 구조를 확인하기 위하여 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 및 MS 분석을 행하였다.

분리된 화합물들의 구조결정

화합물 1의 ¹H-NMR spectrum 상에서 δ 9.77에 나타난 1H분의 singlet signal로부터 aldehyde group의 존재가 시사되었다. 그리고 2종의 4H에 해당하는 방향족 환 유래의 signal들(δ 7.78(2H, br. d, $J=8.5$ Hz, H-2, 6), 6.92(2H, br. d, $J=8.5$ Hz, H-3, 5))이 확인되어 para 치환체의 벤젠환의 존재가 시사되었다. 이상의 data를 종합한 결과, 화합물 1은 4-hydroxybenzaldehyde일 가능성이 높다고 판단되었다. 그래서 보고된 문헌의 data와(15) 비교한 바, 그들의 결과가 일치하여 본 화합물 1을 4-hydroxybenzaldehyde로 (Fig. 3) 동정하였다.

화합물 2의 ¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD, TMS) spectrum으로부터 화합물 1의 패턴과 유사한 δ 7.02(2H, br. d, $J=8.5$ Hz, H-2, 6)와 6.70(2H, br. d, $J=8.5$ Hz, H-3, 5)의 signal들이 관찰되었으며, 이로부터 para 치환체의 벤젠환의 존재가 추측되었다. δ 2.71과 3.68에서 검출된 각각 2H의 2중 등가 triplet signal들($J=7.2$ Hz)의 존재로부터 벤젠환에 ethyl alcohol기가 결합된 구조의 존재가 시사되어 본 화합물은 2-(4-hydroxyphenyl)-ethanol일 것으로 추측되었다. 이에 화합물 2의 ¹H-NMR spectrum을 보고된 화합물의 data와(16,17) 비교한 결과, 그 spectra가 일치함이 확인되었다. 또 LC-ESI-MS spectrum(positive) data에서 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol 분자량 유래의 signal m/z 161.07 [M+Na]⁺이 검출되었다. 이상의 결과로부터 화합물 2를 2-(4-hydroxyphenyl)-ethanol (tyrosol)로 동정하였다(Fig. 3).

화합물 3의 ¹H-NMR spectrum(500 MHz, CD₃OD, TMS)으로부터 서로 매우 유사한 화합물 2종이 약 3:1의 비율로 혼합되어 있음을 알 수 있었다. 그 중 main 화합물(3)의 ¹H-NMR spectrum으로부터 δ 7.18(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2), 6.81(1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5), 7.06(1H, dd, $J=8.3, 2.0$ Hz, H-6)의 signal들이 관찰되어 3치환체 벤젠환의 존재가 시사되었으며, δ 7.59(1H, d, H-7)와 6.32(1H, d, H-8) signal들의 coupling constant 값($J=15.9$ Hz)으로부터 *trans* 형태의 이중결합이 존재함을 알 수 있었다. 그리고, δ 3.89(3H, s)의 signal로부터 methoxyl기의 존재가 시사되어 이 화합물이 *trans*-ferulic acid일 가능성이 강하게 시사되었다. 이에 보고 문헌상의(18) data와 비교를 통해 최종적으로 화합물 3을 *trans*-ferulic acid로 동정하였다(Fig. 3).

화합물 4(화합물 3과 4의 혼합물 중 minor 화합물)의 ¹H-NMR spectrum으로부터 3치환체 벤젠환(δ 7.72(1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2), 6.75(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 그리고 7.09(1H, dd, $J=8.4, 1.8$ Hz, H-6)), 이중결합(δ 6.81(1H, d, $J=12.6$ Hz, H-7)과 5.78(1H, d, $J=12.6$ Hz, H-8)), 그리고 methoxyl기(δ 3.85(3H, s))의 존재가 확인되어 화합물 3과 매우 유사한 화합물일 가능성이 시사되었다. 하지만 δ 6.81과 5.78의 coupling constant 값이 12.6 Hz로 검출되어 olefinic double bond가 *trans* 형이었던 화합물 3과는 달리 화합물 4는 *cis* 형태의 이중결합을 함유하고 있음이 확인되어 화합물 4는 *cis*-ferulic acid인 것으로 추측되었다. 이에 기존에 보고된 data와(19) 비교한 결과, 일치함이 확인되어 화합물 4를 *cis*-

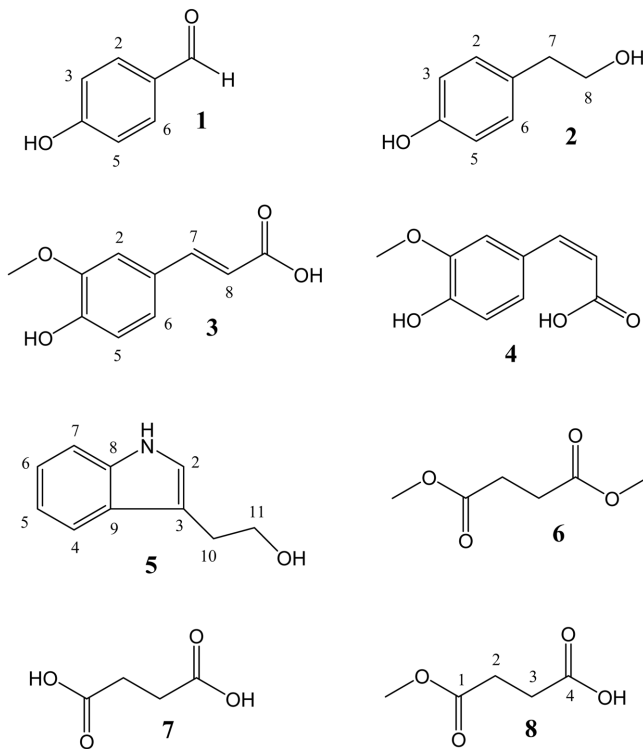


Fig. 3. Structure of the compounds isolated from makgeolli MeOH extract.

ferulic acid로 동정하였다(Fig. 3).

화합물 5의 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) spectrum 상에서 δ 7.56과 7.36의 2종의 doublet signal들과 δ 7.06과 7.03의 2종의 triplet signal들의 존재로부터 1,2 치환체 benzene의 존재가 시사되었다. 또 δ 7.16의 1종의 sp^2 carbon proton signal의 존재로부터 1치환체의 indole환의 존재가 시사되었다. 그리고 δ 3.80과 2.96에서의 2종의 triplet signal들의 존재로부터 화합물 5는 indole 구조에 ethyl alcohol기가 결합된 화합물로서 1H-indole-3-ethanol일 가능성이 강하게 시사되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) spectrum으로부터 indole환 유래로 시사되는 signal들(δ 137.59, 128.84, 123.40, 122.02, 119.41, 119.35, 112.14, 112.09) 및 ethanol 유래 signal들(δ 63.27, 49.75)이 확인되어 $^1\text{H-NMR}$ data로부터 추측된 구조식일 가능성이 더욱 강하게 지지되었다. 그래서 화합물 5의 data를 기존의 결과와(20) 비교하였던 바, 그들 spectra가 일치함이 확인되었다. 또 LC-ESI-MS(positive) 분석을 통하여 분자량을 확인한 결과, 예상 화합물의 분자량에 해당되는 m/z 162.10 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 의 signal이 확인되었다. 이상의 결과를 종합하여 화합물 5를 1H-indole-3-ethanol(tryptophol)로 동정하였다(Fig. 3).

화합물 6의 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD , TMS) spectrum으로부터 δ 3.67(6H, s, $-\text{OCH}_3$), 2.59(4H, s, $-(\text{CH}_2)_2-$)의 2종의 sp^3 carbon proton signal들이 관찰되었다. 이 결과로부터 methoxy기와 methylene기의 존재가 강하게 추측되었다. 이어 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석을 실시한 결과, δ 174.96에서 carboxyl기 유래의 signal이 관찰되었으며, δ 52.34와 30.00의 signal들로부터 $^1\text{H-NMR}$ data에서 시사되었던 methoxy기와 methylene기의 존재를 또 다시 확인하였다. 그래서 화합물 6은 1종의 methylene기를 갖는 malonic acid에 methoxy기가 결합된 mono-methyl malonic acid나 등가의 2종 methylene기를 갖는 succinic acid의 양쪽에 methoxy기가 결합된 dimethyl succinate일 가능성이 강하게 시사되었다. 이에 LC-ESI-

MS(positive) 분석을 통하여 m/z 171.01 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 의 signal이 확인되어, 이 화합물 6은 dimethyl succinate로 동정하였다(Fig. 3).

화합물 7의 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD , TMS) spectrum으로부터는 특이하게도 δ 2.56(4H, s, $-(\text{CH}_2)_2-$)에 sp^3 carbon proton signal 1종만이 관찰되었다. 이 결과로부터 methylene기의 존재가 강하게 시사되었다. 또 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석을 실시한 결과, δ 30.08에 methylene기 유래의 signal에 더하여 δ 176.26에 carbonyl기 유래의 signal이 추가적으로 확인되었다. 이 결과로부터 화합물 7은 1종의 methylene기를 갖는 malonic acid나 등가의 2종 methylene기를 갖는 succinic acid일 가능성이 강하게 시사되었다. 이에 LC-ESI-MS spectrum(negative) 분석을 행한 결과, m/z 117.02 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 의 signal이 확인되어 화합물 7을 결국 succinic acid로 동정하였다(Fig. 3).

화합물 8의 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) spectrum으로부터 δ 3.71(3H, s)와 2.67(4H, m)의 2종의 sp^3 carbon proton signal들이 관찰되었다. 이 결과로부터 1종의 methoxy기와 AB type의 methylene기의 존재가 강하게 시사되었다. 이어 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석을 실시한 결과, δ 177.85와 172.62에 2종의 carbonyl기 유래의 signal들이 관찰되었다. 또 δ 51.95에 1종의 methoxy기 유래의 signal에 더하여 δ 28.87과 28.61에 각각 methylene기 유래로 추측되어지는 signal들이 관찰되었다. 이에 화합물 8은 한쪽 말단만이 methyl ester화된 succinate일 가능성이 매우 강하게 시사되었다. 또 LC-ESI-MS spectrum(negative)으로부터 그 예상 구조식의 분자량에 귀속되어지는 m/z 131.04 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 의 signal이 확인되었다. 이상의 결과들로부터 화합물 8을 mono-methyl succinate로 동정하였다(Fig. 3).

이상 8종의 화합물들(Fig. 4)이 막걸리로부터 단리·동정되었다. 화합물 1은 천연에 널리 존재하는 페놀성 항산화 화합물(21)로서 4-hydroxybenzyl alcohol의 analogue이며, 지질 과산화를 억제하고(22), GABA transaminase의 억제효과를(22) 나타낸다고 보고된 바가 있다. 화합물 2(2-(4-hydroxyphenyl)ethanol(tyrosol))는 천연에 존재하는 페놀성 항산화 화합물로 항동맥경화효과, LDL 산화 억제효과, 심혈관계 질환 예방 등 높은 생물학적 효능을 나타낸다고 보고되었을(23,24) 뿐만 아니라, 레드 와인, 화이트 와인, 맥주, 올리브, 올리브 오일 등에 함유되어 있음이 알려져 있고, 그 항산화 효과 또한 보고된 바 있다(25-27). 그리고 이러한 항산화 효과 외에도 콜레스테롤이 소화기관으로 흡수되는 것을 억제하여 혈중 콜레스테롤 수치를 낮게 해주는 작용이 있음도 보고된 바 있다(28). 또 화합물 2는 항염증과 항암 활성 효과 또한 발휘하는 것으로 알려져 있으며, 페놀성 화합물인 caffeic acid, benzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, vanillic acid, 그리고 syringic acid의 항산화 활성과 비교한 보고에 따르면, tyrosol의 활성이 비교된 다른 화합물들에 비해 더 높은 것으로도 알려져 있다(28). 그리고 화합물 3과 4(trans-ferulic acid와 cis-ferulic acid) 또한 자연계에 널리 분포하고 있는 페놀성 화합물들로서(29) 동양인들이 주식으로 이용하고 있는 보리와(30) 쌀에도(31) 많이 함유되어 있다고 알려져 있다. 그리고 이들 또한 항산화와(32) 항염증(33) 활성이 있으며, 당뇨병(34), 알츠하이머병과(35) 같은 만성적인 질병을 예방하는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 화합물 5인 1H-indole-3-ethanol(tryptophol)은 식물성 병원균 *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*에 대한 항진균 활성을 갖고 있으며, 그 안전성 평가를 실시한 결과, 세포독성, 유전독성, 간효소 활성 저해 작용 등이 모두 없음이 확인되었다(36). 또한 화합물 5는 다양한 식품에 함유되어 있을 뿐만 아니라, *Aspergillus niger*, *fungi Balsania epichloe*, *Dreschlera nodulosum*, *Agrobacterium tumefac-*

ciens, *Ceratocystis* spp., *Rhizobium* spp., marine sponge *Ircinia spinulosa* 등의 대사산물로서도 생성되는 것으로 알려져 있다(37).

BuOH층에서 단리된 화합물 6, 7, 8은 succinic acid 및 그 유도체들로서 주류의 맛과 산성도에 영향을 미치는 성분들로 알려져 있으며(38), 특히 그 중 화합물 7인 succinic acid는 막걸리에 함유된 대표적인 유기산으로 알려져 있다(38). 또한 화합물 6은 succinic acid 양쪽 말단에 methyl기가 ester 결합한 화합물이며, 화합물 8은 succinic acid의 한쪽 말단에만 methyl기가 ester 결합한 화합물이다. 이 화합물 6과 8은 원료 자체에 함유되어 있던 성분일수도 있겠지만, 발효 과정을 거치면서 그 생성량에 변화가 유도되는지에 대해서도 관심이 가져지며, 그들의 함량에 따른 막걸리의 맛과 향의 품위에 대해서도 구체적인 검토가 있어야 할 것으로 판단된다. 또 유기산류에 대한 methyl ester화가 succinic acid에만 국한된 것인지, 아니면 다른 유기산류에도 발생하는 현상인지, 그리고 그 작용이 미생물에 의한 것인지 등 체계적인 검토가 필요한 사항이라 판단된다. 특히 화합물 6과 8은 succinic acid 양쪽 또는 한쪽 말단에 methyl기가 ester 결합된 화합물로서 양쪽 말단이 수산기로 이루어진 succinic acid보다 휘발성이 높을 것으로 추측되어 지는 바, 막걸리의 향에도 영향을 미칠 가능성이 유리형의 succinic acid보다 더 높을 것으로 판단된다.

상기 내용에서도 제시하였듯이 본 연구를 통해 총 8종의 화합물이 막걸리로부터 단리·동정되었다. 그러나, 자세한 데이터는 제시하지 않았으나, 활성 화합물들을 정제하는 과정에서 분리된 획분들의 TLC-DPPH법에 의한 검정 결과, 본 연구로부터 단리된 화합물들 이외에도 일일이 세기 어려울 정도로 많은 종류의 화합물들이 더 존재해있음을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 본 연구로부터 단리된 화합물들은 막걸리 3L(750 mL 용량 4통)로부터 적게는 약 1.2mg(화합물 3과 4의 혼합물)부터 많게는 약 15 mg 정도(화합물 2와 6)까지 단리되었다. 즉, 이것은 단리 과정에 있어 손실되었을 양을 고려하였을 때, 결코 적지 않은 양이 막걸리에 함유되어 있음을 시사하는 결과라 판단된다. 특히 화합물 2와 6은 다른 화합물들에 비해 월등히 높은 함량을 보였다. 유기산계 화합물인 6을 포함하여 화합물 7과 8 또한 각각 7.4와 7.8 mg으로 그 단리된 양이 높은 편이었다. 또 화합물 2는 전술한 바와 같이 매우 다양한 생리활성을 발현하는 것으로 보고되어 있을 뿐만 아니라 우리가 일상적으로 섭취하는 채소나 과일에도 함유되어 있는 성분임을 고려하였을 때, 이 성분이 막걸리에 다량 함유되어 있음은 막걸리의 기능학적 측면에 있어 매우 주목할 만한 부분이라 판단된다. 그리고 본 연구로부터 단리된 화합물들의 개별 향산화 활성을 비교·평가하지는 않았으나 그들의 양적 존재 경향으로 보아 단리된 화합물들이 막걸리의 향산화능에 기여하는 주요 성분일 가능성이 높을 것으로 판단된다.

본 연구에서 수행된 막걸리의 성분연구가 막걸리의 생리활성 평가 및 품질관리 등을 위한 chemical profile 작성에 추후 중요한 기초적 자료로 활용되어지길 기대한다. 그리고 훌륭한 생리활성 화합물이 다량 함유되어 있다고는 하나 막걸리 또한 알콜 음료임을 고려하여 음용에 과함이 없어야 함은 새삼 강조할 필요가 없을 것이다.

요 약

막걸리는 우리의 전통 주류이며, 최근 그 선호도가 높아지고 있음에도 불구하고 그에 함유된 성분들에 관한 체계적인 연구는 거의 전무한 실정이다. 그래서 막걸리에 함유된 향산화 활성 화합물에 초점을 맞추어 column chromatography 및 HPLC를 행하여

화합물을 단리하고, 단리된 화합물들을 MS 및 NMR 분석을 행해 구조를 해석하였다. 그 결과 단리된 8종의 화합물을 4-hydroxybenzaldehyde(1), 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol(2, tyrosol), *trans*-ferulic acid(3), *cis*-ferulic acid(4), 1H-indole-3-ethanol(5, tryptophol), dimethyl succinate(6), succinic acid(7), 그리고 mono-methyl succinate(8)로 동정하였다. 그리고 막걸리로부터 유기산들(화합물 6-8)의 존재가 보고된 바 있으나, 유기산 이외의 화합물 1-5는 본 연구에 의해 막걸리로부터 그 존재가 처음 밝혀졌다.

감사의 글

ESI-MS와 NMR 분석은 각각 한국기초과학지원연구원의 오창과 광주센터에서 수행되었다.

문 헌

1. Shin KR, Kim BC, Yang JY, Kim YD. Characterization of *yakju* prepared with yeasts from fruits. 1. Volatile components in *yakju* during fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 794-800 (1999)
2. Yoo TJ. Korean Famous Wine. Central New Book, Seoul, Korea. p.96 (1981)
3. Cheung JH. Studies on the identification of organic acid and sugars in the fermented mash of the *takju* made from different raw materials. *Agric. Chem. Biotechnol.* 8: 39-43 (1967)
4. RDA. Food Composition Table. 7th revision, National Rural Resources Development Institute, Rural Development Administration, Suwon, Korea (2006)
5. Lee JS, Lee TS, Park SO, Noh BS. Flavor components in mash of *takju* prepared by different raw materials. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 316-323 (1996)
6. NTS. 2011 Alcoholic Liquors Factory Trends. National Tax Service, Seoul, Korea (2011)
7. Lee DH, Kim JH, Lee JS. Effect of pears on the quality and physiological functionality of *makgeolli*. *Korean J. Food Nutr.* 22: 606-611 (2009)
8. Lee TS, Han EH. Volatile flavor components in mash of *takju* prepared by using *Rhizopus japonicus* nuruk. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 691-698 (2000)
9. Kim CH. Studies on the quantitative changes of organic acid and sugars during the fermentation of *takju*. *Agric. Chem. Biotechnol.* 4: 33-42 (1963)
10. Lee WK, Kim JR, Lee MH. Studies on the changes in free amino acid and organic acids of *takju* prepared with different *koji* strains. *Agric. Chem. Biotechnol.* 30: 323-327 (1987)
11. Kim MH, Kim WH, Bae SJ. The effect of *makgeolli* on serum lipid concentration in male rats. *J. Nat. Sci. Silla. Univ.* 9: 73-84 (2001)
12. Shin MO, Kim MH, Bae SJ. The effect of *makgeolli* on blood flow, serum lipid improvement and inhibition of ACE *in vitro*. *J. Life Sci.* 20: 710-716 (2010)
13. Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Bioch.* 58: 1780-1783 (1994)
14. Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agr. Food Chem.* 57: 1768-1774 (2009)
15. Cho JY, Ryu HJ, Ji SH, Moon JH, Jung KH, Park KH. Phenolic compounds from the flower buds of *Camellia japonica*. *Food Sci. Biotechnol.* 18: 766-770 (2009)
16. Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS. Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoids in *Citrus sinensis*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21: 136-142 (1992)
17. Kim SJ, Lee HJ, Park KH, Rhee CO, Lim IJ, Chung HJ, Moon

- JH. Isolation and identification of low molecular phenolic antioxidants from ethylacetate layer of Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel). Korean J. Food Sci. Technol. 40: 129-134 (2008)
18. Park HB, Lee KH, Kim KH, Lee KI, Noh HJ, Choi SU, Lee KR. Lignans from the roots of *Berberis amurensis*. Nat. Prod. Sci. 15: 17-21 (2009)
 19. Salum ML, Robles CJ, Erra-Balsells R. Photoisomerization of ionic liquid ammonium cinnamates: One-pot synthesis-isolation of Z-cinnamic acids. Org. Lett. 12: 4808-4811 (2010)
 20. Matsubara Y, Kumamoto H, Iizuka Y, Murakami T, Okamoto K, Miyake H, Yokoi K. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in *Citrus unshiu* peelings. Agr. Biol. Chem. Tokyo 49: 909-914 (1985)
 21. Tang W, Eisenbrand G. Chinese Drugs of Plant Origin. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 545-548 (1993)
 22. Ha JH, Lee DU, Lee JT, Kim JS, Yong CS, Kim JA, Ha JS, Huh K. 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain. J. Ethnopharmacol. 73: 329-333 (2000)
 23. Lamuela-Raventós RM, Gimeno E, Fitó M, Castellote A-I, Cava M, De la Torre-Boronat MC, López-Sabater MC. Interaction of olive oil phenol antioxidant components with low-density lipoprotein. Biol. Res. 37: 247-252 (2004)
 24. Ramos-Comerzana A, Monteoliva-Sánchez M. Biopharmaceutical potential of olive industrial wastes. Ars. Pharm. 41: 129-136 (2000)
 25. Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Raul D, Maulik N. Akt/FOXO3a /SIRT1-Mediated cardioprotection by *n*-tyrosol against ischemic stress in rat *in vivo* model of myocardial infarction: Switching gears toward survival and longevity. J. Agr. Food Chem. 56: 9692-9698 (2008)
 26. Massimo DA, Carmela F, Roberta DB, Raffaella G, Claudio G, Roberta M. Polyphenols, dietary sources, and bioavailability. Ann. Ist. Super Sanita 43: 348-361 (2007)
 27. Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Samuel SM, Akita Y, Zhan L, Bertelli AAE, Maulik G, Maulik N. White wine induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury is mediated by life extending Akt/FOXO3a/NF κ B survival pathway. J. Agr. Food Chem. 56: 6733-6739 (2008)
 28. Owen RW, Giacosa A, Hull WE. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. Eur. J. Cancer 36: 167-174 (2000)
 29. Mathew S, Abraham TE. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. Crit. Rev. Biotechnol. 24: 59-83 (2004)
 30. Hernanz D, Nunez V, Sancho AI, Faulds CB, Williamson G, Bartolome B, Gomez-Cordoves C. Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barely. J. Agr. Food Chem. 49: 4884-4888 (2001)
 31. Bunzel M, Allerdings E, Sinwell V, Ralph J, Steinhart H. Cell wall hydroxy cinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre. Eur. Food Res. Technol. 214: 482-488 (2002)
 32. Graf E. Antioxidant potential of ferulic acid. Free Radical Bio. Med. 13: 435-448 (1992)
 33. Hirabayashi T, Ochiai H, Sakai S, Nakajima K, Terasawa K. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on murine interleukin-8 production in response to influenza virus infections *in vitro* and *in vivo*. Planta Med. 61: 221-226 (1995)
 34. Balasubashini MS, Rukkumani R, Viswanathan P, Menon VP. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. Phytother. Res. 18: 310-314 (2004)
 35. Wenk GL, McGann-Gramling KS, Hauss-Wegrzyniak B, Ronchetti D, Maucci R, Rosi S, Gasparini L, Ongini E. Attenuation of chronic neuroinflammation by a nitric oxide-releasing derivative of the antioxidant ferulic acid. J. Neurochem. 89: 484-493 (2004)
 36. Kim SM. Antifungal activity of phytopathogenic fungus by phenylethyl alcohol, phenylethyl acetate, tryptopol and characteristics of antifungal proteins. MS thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea (2009)
 37. Erdogan I, Sener B, Higa T. Tryptophol, a plant auxin isolated from the marine sponge *Ircinia spinulosa*. Biochem. Syst. Ecol. 28: 793-794 (2000)
 38. Lee SR. Fermented Foods of Korea. Korea Institute of Culture, Korea Culture Series 15, Ewha Womans University Press, p. 284 (1986)