

***Lactobacillus plantarum*로 발효된 포도 추출물의 항산화 및 tyrosinase 활성 저해 효과**

김송현 · 김정현 · 김희철 · 이은경 · 이은영 · 김선정 · 김규옥

약품화학과

Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Fermented Grape Extracts with *Lactobacillus plantarum*

S. H. Kim, J. H. Kim, H. C. Kim, E. G. Lee, E. Y. Lee, S. J. Kim and G. Y. Kim

Drug Chemical Division

Abstract

In this study, grape extract which contains a large amount of anthocyanin glycosides was Fermented with *Lactobacillus plantarum*. HPLC-MS/MS analysis was performed to analyze the components of Campbell Early(C) and Koyho(K) extracts and fermented Campbell Early(FC) and Koyho(FK) extracts. As a result, bio-conversion of cyanidin, delphinidin and malvidin were able to be identified. In order to verify the anti-oxidant effect of FC and FK extracts, we investigated radical scavenging ability with DPPH, ABTS. In addition, to confirm whitening we investigated tyrosinase inhibition activity. As a result, as FC and FK extracts have anti-oxidant and tyrosinase inhibition effect, we suggest that it might be used as an active ingredient for cosmetics.

Key Words : Grape, *Lactobacillus plantarum*, Anthocyanidin, Antioxidant, Tyrosinase

1. 서 론

현대인에게 이미 필수품이 된 화장품의 소모량은 매년 급격하게 증가하고 있다. 동시에 다기능과 고기능성을 갖춘 화장품이 출시되고 있고, 피부 유형뿐만 아니라 성별, 연령, 기능, 사용목적에 따른 맞춤형 화장품 등으로 분류 될 정도로 다양한 제품이 생산되고 있다. 이처럼 화장품 산업의 시장 규모가 커지면서 자연친화적인 화장품 개발도 활발히 이루어지고 있다.¹⁾

유익 미생물을 이용한 기능성 발효 성분을 함유하고 있어서 자연 친화적이라는 화장품 이미지를 부각시키기 위한 연구, 개발, 제조, 생산, 판매에 대한 폭 넓은 방안이 모색되고 있다. 발효과학이란 유익 미생물을 이용하여 특정성분을 작게 분해시켜 체내에 흡수가 잘 되도록 하거나 새로운 물질로 변화시켜 유익한 기능을 나타내도록 돕는 것을 말한다.²⁾

유산균은 탄수화물 발효를 통해 최종 대사산물로 유산을 생산하는 균이며, 식품의 부패를 방지하고, bacteriocin과 같은 항균 물질을 분비하여 식중독균을 억제하며, 사람의 장내 pH를 낮추어 부패세균의 증식을 억제하는 등의 효과를 가지는 미생물로 알려져 있다.^{3),4)} 유산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로서 300~400여 종이 있는 것으로 알려져 있으며, 대표적인 유산균으로는 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidus* 등이 있으며, 구체적인 기작은 밝혀지지 않았지만, 비병원성으로 안전한 균주이며 장내에서 저해 물질의 생성 등 기능적으로 유용함이

보고되고 있다.⁵⁾ 젖산균(*Lactobacillus*)은 배당체 형태로 존재하는 물질을 발효시켜 당이 없는 비배당체 구조로 생물 전환 시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 비배당체 구조를 가진 물질이 배당체 구조 물질에 비해 항산화 활성 등이 큰 것으로 알려져 있다.⁶⁾⁻⁸⁾

포도는 생물학적 기능을 가진 여러 폴리페놀류를 가지고 있으며 주요 화합물로는 anthocyanin, flavonol, resveratrol, phenolic acid 등이 있다. 포도에 존재하는 페놀계 화합물은 크게 flavonoids와 non-flavonoids로 나눌 수 있는데, flavonoids 물질은 anthocyanin, quercetin, myricetin, catechin 등이 대표적이고 non-flavonoids 물질로는 caftaric acid, gallic acid, resveratrol 등이 대표적이다. 위에 언급한 거의 모든 물질이 인체 기능성을 가지고 있다고 보고되어 있으며, 이 중 대표적으로 색소 anthocyanin은 높은 항산화능을 가진 것으로 보고되어 있다.⁹⁾⁻¹¹⁾

본 연구는 발효 포도 추출물의 이용 가치를 증진시키기 위해 *L. plantarum*를 이용하여 캠벨 열리 및 거봉을 발효시켜 발효 추출물의 안토시아닌 배당체가 비배당체로 생물 전환되는 과정을 알아보고, 항산화 및 tyrosinase 활성 저해 효과를 가지는 기능성 소재를 연구하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 발효조건

본 실험에 사용된 포도품종은 캠벨 열리와

거봉으로 사용하였고, 2022년 8월에 경북 영천시 마트에서 구매했고, 세척, 제경 및 파쇄 후 potassium metabisulfite($K_2S_2O_5$)를 200 mg/L 첨가하여 2시간 방치하였다. 4% 젖산균(*Lactobacillus plantarum*)을 접종하고, 37℃에서 4일간 배양한 후 여과, 동결건조하고 -40℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

2.2. 기기 및 시약

본 실험에 사용된 분광광도계는 VARIAN사의 CARY 100, 굴절 당도계는 ATAGO사의 RX-50000 α , 액체크로마토그래프 질량분석기(HPLC-MS/MS)는 Waters사의 XEVO TQ MS를 사용하였다.

표준품은 Cyanidin chloride, Delphinidin chloride, Malvidin chloride로 Extrasynthese사의 제품을 사용하였다. 시약은 L-DOPA, Mushroom Tyrosinase, L-Ascorbic acid, 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 등은 Sigma사, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)는 Wako사의 것을 사용하였다. 그 외 액체크로마토그래프 질량분석기 분석을 위한 용매는 Fisher Scientific사의 HPLC등급을 사용하였다. 또한 표준 균주는 한국 미생물 보존센터의 *Lactobacillus plantarum*를 사용하였다.

2.3. 당도 및 산도 측정

당도는 굴절 당도계를 사용하였으며, 산도는

0.1 N NaOH로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하였으며, 적정에 사용된 0.1 N NaOH 용액의 소비량을 Tartaric acid 함량으로 환산하여 표시하였다.

2.4. 안토시아닌 시험법 유효성 검증

시험법의 정확성, 정밀성 등의 검증을 위하여 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 실시하였다. LOD 및 LOQ는 직선성 시험에서 구한 1차 회귀 방정식으로 검량선의 기울기(S)를 구하고, 표준물질의 최소농도 6회를 분석한 후 표준편차(σ)를 구한 다음 LOD는 $3 \times \sigma/S$, LOQ는 $10 \times \sigma/S$ 로 계산하였다.

2.5. 안토시아닌 정량

안토시아닌은 Miloslav Šulc의 방법¹²⁾을 변형하여 분석하였다. 각 표준물질의 표준원액은 약 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도가 되도록 메탄올에 녹여 조제한 후 냉장 보관하여 사용하였다. 혼합표준용액은 표준원액을 2 M HCl in 50% methanol로 적정한 농도로 희석하여 사용하였다. 시료는 약 1g에 2 M HCl in 50% methanol 50 mL를 첨가한 후 상온 상태에서 24시간 추출한 후, 원심분리(3,500 rpm, 20분, 4℃)하여 시료추출액으로 사용하였다. 안토시아닌인 cyanidin, delphinidin, malvidin 3종을 동시 분석하였고, HPLC-MS/MS 분석 조건은 Table 1에 나타내었다.¹³⁾

I . 연구사업

Table 1. HPLC–MS/MS conditions for the analysis of cyanidin, delphinidin and malvidin

Instrument	Waters XEVO TQ MS			
Column	C18 column(2.0mm x 150mm, 3 μ m)			
Column temperature	25°C			
Injection volume	10 μ L			
Flow rate	0.35 mL/min			
Mobile phase	A : 0.1% Formic acid in water B : 0.1% Formic acid in acetonitrile			
Gradient program	Time(min)	A (%)	B (%)	
	0.0	90	10	
	1.0	90	10	
	5.0	50	50	
	7.0	50	50	
	10.0	90	10	
MRM conditions	Compounds	Precursor ion(m/z)	Fragment ion(m/z)	Collision energy(eV)
	Cyanidin	286.87	136.79	30
			212.91	30
	Delphinidin	302.94	172.80	30
			229.00	30
	Malvidin	331.09	241.89	33
			286.88	30
			314.90	30
Ionization mode	Electrospray Ionization(ESI, Positive)			
Scan type	Multiple Reaction Monitoring(MRM)			

2.6. DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼소거 활성 실험은 Blois MS의 방법¹⁴⁾을 변형하여 시행하였다. 시료는 0.1, 2.0, 5.0 mg/mL의 농도로 에탄올에 녹여 조제하였다. 시료 1 mL에 0.2 mM DPPH 1 mL를 혼합하여 암실에서 15분간 반응한 다음 분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. ABTS 라디칼 소거 활성

ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) 라디칼 소거 활성 실험은 Re 등의 방법¹⁵⁾에 따라 측정하였다. 7 mM

ABTS와 2.45 mM Potassium persulfate를 1:1로 섞어 암실에 12~18시간 반응시켰다. 이를 에탄올과 희석하여 734 nm에서 control 값이 흡광도 1.2~1.4가 되도록 조절한 ABTS 용액을 사용하였다. 시료 1.5 mL와 ABTS 용액 1.5 mL를 혼합하여 30초간 vortex 후 6분간 상온에 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. Tyrosinase 활성 저해 효과

Tyrosinase 활성 저해는 Flurkey의 방법¹⁶⁾에 따라 tyrosinase의 효소 반응 결과로 생성되는 dopachrome을 비색법을 이용하여 측정하였다. 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 6.8)

Table 2. The total acidity and soluble solids of before and after fermentation Campbell Early and Kyoho extracts

Compounds	Total acidity (%)	Soluble solids(° Brix)
Campbell Early	0.065±0.000 ^{d1)}	16.44±0.03 ^a
Fermented Campbell Early	0.076±0.001 ^c	13.71±0.03 ^b
Kyoho	0.116±0.003 ^b	13.13±0.03 ^c
Fermented Kyoho	0.123±0.001 ^a	5.06±0.04 ^d

¹⁾ Means followed by same letter with in the row are not significantly different ($P<0.05$).

1.0 mL, 시료 0.4 mL, 기질 10 mM L-DOPA 0.2 mL를 넣고 혼합한 혼합액에 효소액(mushroom tyrosinase, 110 unit/mL)을 0.2 mL를 첨가하여 37℃에서 10분 동안 반응시켜 475 nm에서 흡광도를 측정하고 dopachrome의 변화를 저해능으로 환산하였다. 양성 대조군은 L-Ascorbic acid를 사용하였다.

2.9. 통계처리

모든 실험 결과는 3회 반복하여 실시하였고, 그 결과 값을 평균과 표준편차로 표시하고 (Mean±SD), 통계용 프로그램인 SPSS를 이용하여 분산분석과 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 안토시아닌 3종 정량에는 tukey test를 사용하면서 one-way ANOVA 검정을 적용하였으며, $p < 0.05$ 수준에서의 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 당도 및 산도

유산균을 이용하여 배양한 캠벨 얼리 및 거봉

의 발효 전과 후의 당도 및 산도 변화는 Table 2에 나타내었다. 발효 전 당도는 캠벨 얼리는 16.44±0.003° Brix, 거봉은 13.13±0.03° Brix를 나타내었다. 두 품종 모두 발효 후 당도는 감소하였다. 당 성분은 젖산균의 영양원이나 발효 기질로 이용되므로 발효 후에는 총 당 함량은 감소하게 된다.

산도는 캠벨 얼리는 발효 전 0.065±0.000%였으며, 발효 후 0.076±0.001%로 증가하였고 거봉은 발효 전 0.116±0.003%였으며, 발효 후 0.123±0.001%로 다소 증가하는 경향을 나타내었다. 유산균 배양 중 생성된 유기산과 미생물의 유기물 분해 시 발생하는 적은 양의 옥살산, 젖산 및 아세트산 등의 생성으로 산도가 증가되었고, 증가된 산도는 잡균의 생육을 저해시킬 뿐만 아니라, 잡균에 의한 오염 방지 및 추출물의 저장성이 향상될 것으로 기대된다.¹⁷⁾

3.2. 안토시아닌 시험법의 유효성 검토

3.2.1. 직선성

직선성을 평가하기 위하여 5단계로 희석한 혼합표준용액을 HPLC-MS/MS로 분석하여 검

I . 연구사업

Table 3. Regression, R^2 , LOD, LOQ and linear range for the studied compounds

Compounds	Regression equation	R^2	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Linear range ($\mu\text{g/L}$)
Cyanidin	$y=2225.69x+4407.09$	0.9927	0.0004	0.0014	0~200
Delphinidin	$y=1062.71x-4622.76$	0.9987	0.0021	0.0070	0~200
Malvidin	$y=5151.26x-18102.7$	0.9992	0.0002	0.0005	0~200

량선을 구해 1차 회귀방정식($y=Sx+b$)으로 결정계수(R^2)를 구하고 직선성(Linearity)을 검토하였다. 안토시아니딘 3종의 결정계수(R^2) 값은 0.9927~0.9992로 1과 거의 유사한 값이므로 검량선 범위 내에 있는 각각의 성분 대하여 직선성이 확보되었음을 알 수 있었고, Table 3에 나타내었다.

3.2.2. 검출한계 및 정량한계

검출한계와 정량한계는 직선성 시험에서 구한 검량선의 1차 회귀방정식의 기울기와 표준편차를 이용하여 LOD, LOQ를 계산하였다. 안토시아니딘 3종의 LOD는 0.0002~0.0021 $\mu\text{g/L}$, LOQ는 0.0005~0.0070 $\mu\text{g/L}$ 로 검출한계와 정량한계가 매우 낮아 정량 가능한 수준을 보여주었으며, Table 3에 나타내었다.

3.3. 안토시아니딘의 정량

발효에 의한 캠벨 얼리 및 거봉 추출물의 성분 차이를 확인하기 위한 HPLC-MS/MS 분석결에서 안토시아니딘의 cyanidin, delphinidin, malvidin이 생성되는 것을 확인 할 수 있었다. 안토시아니딘 3종에 대한 정량 분석 결과는 Table 4에 나타내었다.

발효 전후 캠벨 얼리의 안토시아니딘 3종의 함량을 비교해보면 발효 전보다 발효 후가 cyanidin은 61%, delphinidin은 195%, malvidin은 25% 더 높게 나타났고, 발효 전후 거봉의 안토시아니딘 3종의 함량을 비교해보면 발효 전보다 발효 후가 cyanidin은 221%, delphinidin은 181%, malvidin은 273% 높게 나타났으며, 두 품종 모두 발효 후에서 cyanidin, delphinidin, malvidin

Table 4. Contents of 3 anthocyanidin compounds in before and after fermentation Campbell Early and Kyoho extracts (mg/L)

	Campbell Early	Fermented Campbell Early	Kyoho	Fermented Kyoho
Cyanidin	$8.6009 \pm 0.1177^*$	$13.8741 \pm 0.3668^*$	$0.3085 \pm 0.0011^*$	$0.9887 \pm 0.0412^*$
Delphinidin	$2.1777 \pm 0.0583^*$	$6.4161 \pm 0.0521^*$	$0.8624 \pm 0.0064^*$	$2.4236 \pm 0.0428^*$
Malvidin	$0.6785 \pm 0.0051^*$	$0.8475 \pm 0.0206^*$	$1.1643 \pm 0.0538^*$	$4.3417 \pm 0.0428^*$

* $P < 0.05$ indicate a significant difference from sample not treated control.

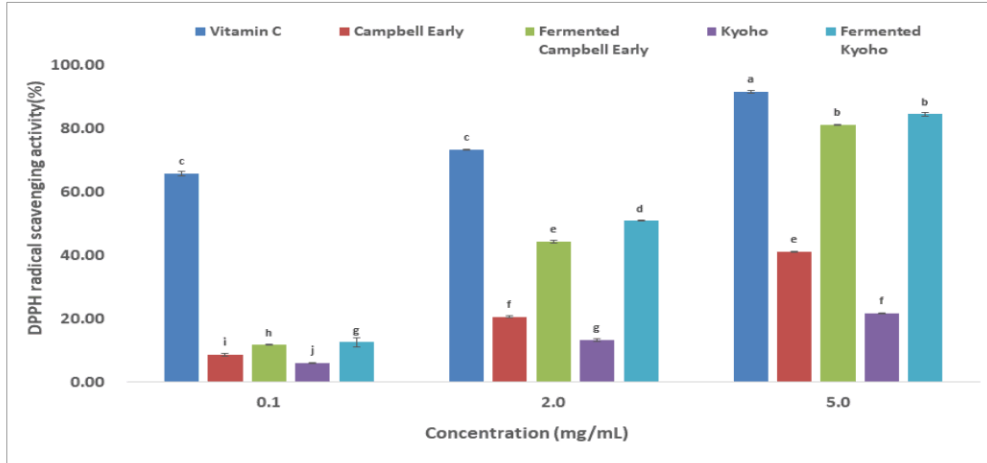


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of samples(0.1 ~ 5.0 mg/mL). Means followed by same letter with above the bars are not significantly different ($P<0.05$).

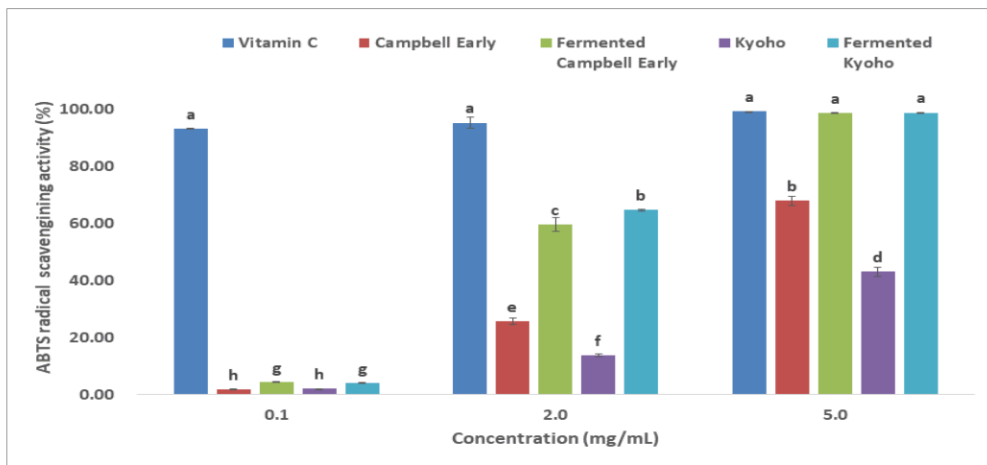


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of samples(0.1 ~ 5.0 mg/mL). Means followed by same letter with above the bars are not significantly different ($P<0.05$).

함량이 증가하였다. 이는 발효 과정 중에 배당체가 비배당체로 전환되면서 안토시아니딘 함량이 증가함을 알 수 있었다.²⁾

3.4. 항산화 효과

유산균 발효에 의한 캠벨 얼리 및 거봉 추출물

의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성은 Fig. 1과 2에 나타내었다. 0.1, 2.0, 5.0 mg/mL 농도에서 측정하였으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 항산화 활성이 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성은 항산화 활성 측정에 널리 사용되고 있으며, DPPH

라디칼 소거 활성은 음이온 라디칼을 생성하며, ABTS 라디칼 소거 활성은 양이온 라디칼을 생성하는 차이가 있다.¹⁸⁾ DPPH 소거 활성은 Fig.1 과 같이 추출물의 농도 5.0 mg/mL에서 발효 전 캠벨 얼리에서 40.85%, 발효 전 거봉에서 21.49%의 소거 활성을 나타내었으며, 발효 후 캠벨 얼리에서 80.89%, 발효 후 거봉에서 83.92%로 나타났다. 또한 ABTS 소거 활성은 Fig. 2와 같이 추출물의 농도 5.0 mg/mL에서 발효 전 캠벨 얼리에서 67.74%, 발효 전 거봉에서 42.91%의 소거 활성을 나타냈으며, 발효 후 캠벨 얼리에서 98.42%, 발효 후 거봉에서 98.73%로 나타났다. 발효 전보다 발효 후 높은 항산화 활성을 보였다.

3.5. Tyrosinase 활성 저해효과

멜라닌은 멜라닌 세포 내의 특수한 세포소기

관인 멜라노솜에서 생성되는 색소이다. 멜라닌은 멜라노솜 내에 있는 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1)과 tyrosinase-related protein 2 (TRP2) 등의 여러 효소의 복합 작용에 의해 생성된다. 특히 tyrosinase는 멜라닌 생합성의 속도 조절단계인 tyrosine이 DOPA로 hydroxylation 된 후 dopaquinone으로 산화되는 과정에 주요 조절 효소이다.^{19)~21)} 포도 발효 추출물의 tyrosinase 활성저해를 평가하기 위하여 L-Ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하고, 발효 전후 캠벨 얼리와 거봉 추출물의 tyrosinase의 효소 활성을 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3과 같이 0.1 mg/mL의 농도에서는 Tyrosinase 저해효과가 명확하게 보이지 않았으나, 5.0 mg/mL의 농도에서 L-Ascorbic acid와 비교하여 발효 후 캠벨 얼리는 66.47%, 발효 후 거봉은 72.05%의 tyrosinase 활성 저해효과를 보였다.

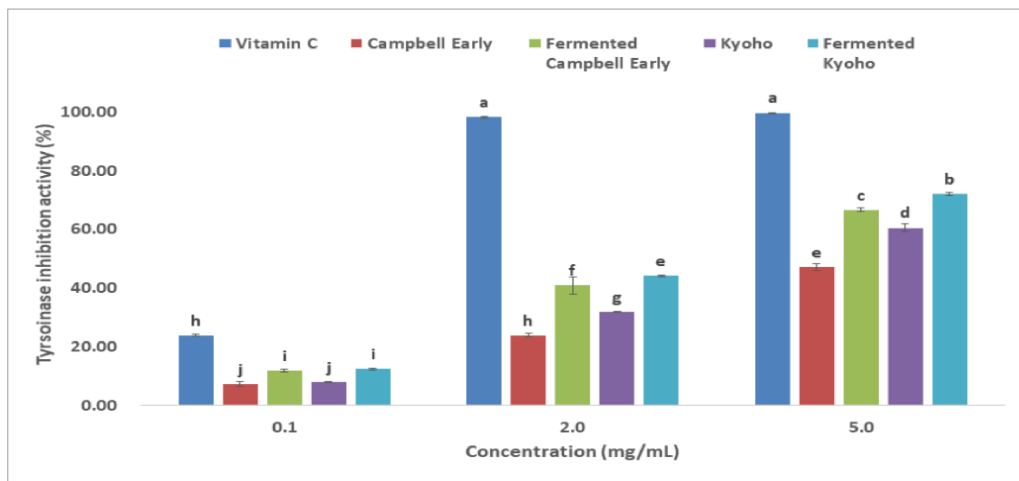


Fig. 3. Tyrosinase inhibition activity of samples(0.1 ~ 5.0 mg/mL). Means followed by same letter with above the bars are not significantly different ($P<0.05$).

4. 결 론

1. 발효에 의한 생물전환으로 생성된 cyanidin, delphinidin, malvidin이 생성되었음을 확인하였고, 각각의 성분이 발효 후 증가하는 것을 확인하였다.

2. 항산화 효과를 알아보기 위한 DPPH, ABTS의 항산화 실험 결과, 항산화물질로 널리 사용되는 L-Ascorbic acid와 비교했을 때 발효된 캠벨 열리, 거봉 추출물이 효과적인 항산화 기능성을 갖는 첨가 물질로서의 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

3. 미백능력을 보여주는 tyrosinase 활성 저해효과에서는 추출농도 5.0 mg/mL에서 발효 후 두 품종 모두 높은 활성도를 보임을 알 수 있었다.

4. 발효된 캠벨 열리 및 거봉은 항산화 및 피부 미백소재로의 활용가치가 있는 것을 확인하였다. 특히 발효 전 보다 발효 후에 항산화, tyrosinase 저해 효과가 증진됨을 확인할 수 있었다.

위와 같은 결과에 따르면 *L.plantarum*을 사용하여 발효시킨 캠벨 열리 및 거봉 추출물은 항산화, 미백효과를 기대 할 수 있어 화장품을 위한 효과적인 원료로 사용 가능할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. G. Y. Kim, A. G. Kim, S. W. Ham and C.H. chin, A Clinical study on effects of the fermented cosmetic products on skin-focused on the skin trouble products of MigadoCos. *Kor J Asethe Cosmetol.* 21-35(2010).
2. J. H. Jang, H. K. Lee, J. T. Bae, J. S. Lee and B. Y. Hwang, Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Fermented Blackcurrant Fruit Extracts with *Saccharomycopsis fibuligera*. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, 46, 403-413(2020).
3. M. S. Kang, H. J. Oh, H. C. Lee and J. S. Oh, Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*., *J Bacteriol Virol*, 39, 11-19 (2009).
4. Y. S. Park and H. G. Jang, Evaluation of lactic fermentation and biological activity of *Rubus coreanus* Miq., *Appl Biol Chem*, 46, 367-375(2003).
5. J. H. Ha, Y. C. Seo, W. Y. Choi, J. S. Kim, H. H. Kim, J. H. Ahn, H. Y. Lee, Enhancement of antioxidant activities of bark of *Berberis Koreana* palibin by lactic acid fermentation., *Korean J Medicinal Crop Sci*, 18, 421-428 (2010).
6. Y. Okabe, T. Shimazu, and H. Tanimoto, Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of aglycone-rich fermented soybeans compared with glucoside-rich non-fermented soybeans in Japanese postmenopausal women., *J Sci. Food Agric.*, 91, 658(2011).
7. C. G. Schmidt, L. M. Gonçalves, L. Prietto, H. S. Hackbart, and E. B. Furlong, Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*, *Food Chem.*, 146, 371 (2014).
8. B. G. Park, H. J. Jung, Y. W. Cho, H. Y. Lim, and C. J. Lim, Potentiation of antioxidative and anti-inflammatory

- properties of cultured wild ginseng root extract through probiotic fermentation, *J. Pharm. Pharmacol.*, 65, 457 (2013).
9. E. Q. Xia, G. F. Deng, Y. J. Guo, H. B. Li, Biological activities of polyphenols from grapes., *Int.J.Mol.Sci.*, 11, 622-646(2010).
 10. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, Biochemistry and molecular biology of plants, American society of plant biologist, Rockville, Maryland, USA(2000).
 11. Han F, Yang P, Wang H, Fernandes I, Mateus N, Liu Y, Digestion and absorption of red grape and wine anthocyanins through the gastrointestinal tract., *Trends in Food sci. Technol.*, 83, 211-224(2019).
 12. Miloslav Šulc, Validation of a UHPLC-ESI-MS/MS Method for Anthocyanidin Quantification in Potato Tubers. *Czech J. Food Sci.*, 223-228(2017).
 13. Choung M.G, Optimal HPLC Condition for Simultaneous Determination of Anthocyanins in Black Soybean Seed Coats. *Korean J. Crop Sci.*, 359-368(2008).
 14. Blois Ms, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 26, 1199-1200(1958).
 15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay, *Ree Radcial Bio Med*, 26, 1231-1237(1999).
 16. Flurkey WH., Identification of tyrosinase in mushrooms by iso-electric focusing. *JFoodSci.*, 56, 93-95(1991).
 17. G. H. Kim and E. K. Bae, Lactic acid bacteria for the preservation of fruit and vegetables. *Korean J Food Preserv*, 6, 245-254(1999).
 18. C. S. Kwak, H. I. Choi, In vitro antioxidant and anti-inflam- matory activities of ethanol extract and sequential fractions of flowers of *Prunus persica* in LPS-Stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 44, 1439-1449(2015).
 19. V. J. Hearing and M. Jimenez, Mammalian tyrosinase -The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem.*, 19(12), 1141(1987).
 20. T. Kuzumaki, A. Matsuda, K. Wakamatsu, S. Ito, and K. Ishikawa, Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes, *Exp, Cell Res.*, 207(1), 33(1993).
 21. V. del Marmol and F. Beermann, Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation, *FEBS Lett.*, 381(3), 165(1996).