셀러리 잎 에탄올 추출물 Apiin의 생물전환을 위한 구연산 및 베타-글루코시데이스 처리 효과

김하림¹ · 오현화¹ · 장선일² · 김영수¹

¹전북대학교 식품공학과

²전주대학교 보건관리학과

Bioconversion of Apiin in Celery Leaf Ethanol Extract with Citric Acid and β -Glucosidase Treatment

Ha-Rim Kim¹, Hyeon Hwa Oh¹, Seon-Il Jang², and Young-Soo Kim¹

¹Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University

²Department of Health Management, Jeonju University

ABSTRACT The effect of citric acid and β -glucosidase treatments on the conversion of apiin to apigetrin and apigenin in celery leaf ethanol extract (CE) was studied. The content of apiin in CE was 889.85 mg/100 g dried celery powder (DCP). In the citric acid treatment conditions, the independent variables were temperature (30°C, 60°C, and 90°C), time (1~4 h), and citric acid concentration (0.25~1 M). The content of apigetrin in the citric acid-treated CE increased significantly with increasing temperature. When CE was treated with citric acid at a minimum concentration of 0.25 M at 90°C for 4 h, the apigetrin content was 639.30 mg/100 g DCP, more than 10 times higher than that of the control (0 M, 90°C, and 4 h). The apiin to apigetrin conversion ratio with citric acid treatment was 93.82%. When the citric acid-treated celery leaf ethanol extract (CCE) was further treated with β -glucosidase, the conversion ratio of apigetrin to apigenin was 62.63%. Interestingly, the conversion ratio of apigetrin standard to apigenin was also found to be 64.45%, similar to CCE. This finding revealed that the citric acid treatment of CE at the concentration of 0.25 M did not affect the enzyme reaction. Also, the amount of apigenin obtained following β -glucosidase treatment of CCE was calculated to be 330.71 mg/100 g DCP. The study presents a novel technique for increasing the apigetrin and apigenin contents of celery leaves that may enhance their biological activities.

Key words: apiin, apigetrin, apigenin, citric acid, β -glucosidase

서 론

셀러리(*Apium graveolens* L., Celery)는 미나릿과(Umbelliferae)에 속하는 약용식물로 중동 및 지중해 지역에서 재배되기 시작하였다(Trichopoulou 등, 2000). 셀러리 종자(seed)는 향신료로 이용되어 왔으나 셀러리 잎에 함유된 flavone인 apigenin의 항암(Dai 등, 2016), 항염증(Li 등, 2017), 항바이러스(Zhang 등, 2014)에 대한 기능성 연구가 보고되면서 이들 성분의 효과적인 회수를 위해서 셀러리 잎의 가공에 대한 관심이 증대되었다(Kooti 등, 2014). 셀러리 잎에 존재하는 apigenin은 flavonoid glycosides의 형태로

apigenin 7-O-apiosylglucoside(apiin)가 대부분이며, 산 가수분해를 통해 얻을 수 있는 apigenin의 양은 74.33~142.85 mg/100 g으로 보고되었다(Yao 등, 2010; Hostetler 등, 2013).

배당체 형태로 존재하는 apiin은 apigenin에 glucose가 결합된 apigenin 7-O- β -D-glucoside(apigetrin)이 합성되고, glucose 2번 탄소에 apiose가 결합하여 apigenin 7-O-apiosylglucoside 구조를 이룬다(Fig 1). 비배당체 형태인 apigenin은 소장 점막을 통한 흡수가 쉬워 생체이용률이 높은 반면(Meyer 등, 2006), apiin처럼 이당류가 결합된 형태는 β -glucosidase에 저항성이 있어 분해가 어렵기 때문에 이용률이 낮은 것으로 알려져 있다(Németh 등, 2003). 따라서 셀러리에 많이 함유된 apiin을 생체이용률이 높은 구조인 apigenin으로 전환시키기 위해 셀러리에 직접적인 초음파 처리(Zhang 등, 2011), 효소를 이용한 가수분해(Bolarinwa와 Linseisen, 2005), 산 가수분해(Miean과 Mohamed, 2001) 등의 연구가 진행되었다. Hostetler 등(2012)은 셀러리로부터 효소, 열처리, 산처리 등을 혼합 이용하여 apiin

Received 13 Oct 2020; Revised 20 Nov 2020; Accepted 23 Nov 2020
Corresponding author: Young-Soo Kim, Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University, 567, Baekje-dearo, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 54896, Korea,
E-mail: ykim@jbnu.ac.kr

Author information: Ha-Rim Kim (Graduate student), Hyeon Hwa Oh (Researcher), Seon-Il Jang (Professor), Young-Soo Kim (Professor)

Fig. 1. Hydrolysis of apiin by citric acid and β -glucosidase.

의 전환을 연구하였는데, pH 3 이하의 산과 열처리 공정이 apigetrin으로의 전환을 증가시키는 데 효과적이라고 보고하였다. 한편 apigenin으로의 전환을 위해서는 더 낮은 pH와 열처리 공정이 요구되며, 특히 apigenin은 apigetrin에 비해 산 안정성이 낮기 때문에 이러한 공정에 노출되었을 경우 apigenin의 일부가 분해되는 현상이 발생한다(Hostetler 등, 2013). Apiin의 당을 제거할 목적으로 1~2 M 염산이나 무기인산 등의 산을 첨가하여 열처리 조건과 병행한 연구에서 apigenin의 함량이 감소하는 경향이 보고되었다(Park 등, 2010; Hostetler 등, 2013). 이처럼 강산에 의한 가수분해는 배당체뿐만 아니라 비배당체의 분해에도 영향을 미치기 때문에 약산인 유기산의 적용에 대한 연구의 필요성이 대두된다.

유기산 중 구연산은 식품 가공 공정 중 산화 및 갈변 방지 목적으로 식품첨가물로 사용돼왔다. Kong 등(2009)은 구연산 처리 인삼과 홍삼에서 비배당체 형태인 esculetin과 quercetin 함량이 증가함을 보고하였다. 또한, 선행연구에서도 셀러리 잎 에탄올 추출물에 구연산, 사과산, 젖산, 숙신산, 초산 등의 유기산을 1 M 수준으로 처리하였을 때, 구연산 처리물에서 apigetrin의 전환율이 가장 높았다(Kim, 2020). 즉, 구연산을 apiin의 전환에 활용한다면 apigetrin의 전환율 및 식품 안전성을 확보하기에 유용할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 셀러리 잎 에탄올 추출물로부터 apiin을 얻고, apigetrin으로 최대 전환을 위한 구연산 처리조건에 대해 분석하였으며, 셀러리 잎 에탄올 추출물과 구연산 처리물에 대해 β -glucosidase의 가수분해를 통한 apigenin으로의 전환율을 평가하고자 하였다. 이와 같은 결과를 토대로 생체 이용율이 높은 구조인 apigenin으로의 전환율 증가와 flavonoid glycosides에 대한 유기산과 효소를 병용하는 가수분해 방법에 기초를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 연구에서 사용한 건조 셀러리(*Apium graveolens* L.) 잎은 부산지역에서 생산된 것을 구입하여 사용하였다. 건조 셀러리 잎은 제분기(stainless roller, Shinpoong Eng., Ltd., Gwangju, Korea)를 사용하여 분말형태(Dried Celery Powder, DCP)로 분쇄하여 -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다. 추출을 위한 에탄올은 대정화금(Siheung, Korea)으로부터 구입하여 사용하였고, apiin, apigetrin, apigenin, luteolin은 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.(95~98%, Chengdu, China)로부터 구입하여 표준물질로 사용하였다. Citric acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), β -glucosidase from *Aspergillus niger*(Megazyme, Bray, Ireland)와 HPLC 분석용매(Baker™, Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였다.

에탄올 추출

셀러리 잎 분말(DCP) 15 g에 50 mM phosphate buffer (pH 7) 300 mL를 가하여 상온에서 2시간 교반한 다음 최종 에탄올 농도가 60%(v/v)가 되도록 95% 에탄올을 첨가하여 50°C 항온수조(TW-PC-1, Universal Scientific Industrial Co., Ltd., Shanghai, China)에서 overnight 교반추출 하였다. 추출액을 원심분리기(Avanti J-26XP, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 사용하여 원심분리(4°C , $10,000\times g$, 10분)한 다음 상층액을 회수하였다. 상층액은 회전감압 농축기(Eyela coolace CCA-110, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 에탄올을 제거한 후 소량의 증류수로 추출농축액을 회수하였다. 농축액은 동결건조(Supermodul YO-220, Thermo Electron, Waltham, MA, USA)하여 -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였고, 셀러리 잎 에탄올 추출물(celery leaf ethanol extract, CE)이라 명명하였다. 추출 수율은 DCP 100 g에 대해 회수되는 CE의 무게를 백분율로 표현하였다.

구연산 처리

구연산 수용액을 0.25, 0.5, 0.75, 1 M 농도로 제조하여 CE에 10배수를 가한 다음 항온수조를 사용하여 30, 60, 90°C 온도조건에서 0~4시간까지 1시간 간격으로 반응시킨

후 실온에 냉각하였다. Control은 구연산 수용액 대신 증류수를 동량 첨가하여 반응시켰다. 각 반응물에 95% 에탄올을 첨가하여 최종 에탄올 농도가 60%가 되도록 하여 정량분석 시료로 사용하였다.

표준물질을 이용한 정량분석 결과 apigetrin이 가장 높게 생성된 반응물을 동결건조하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였고, 구연산 처리 셀러리 잎 에탄올 추출물(citric acid celery leaf ethanol extract, CCE)이라 명명하였다.

β-Glucosidase의 처리

CE와 CCE는 각각의 시료에 함유된 apiin과 apigetrin 농도를 기준(250 µg/mL)으로 증류수에 현탁시켜 200 µL씩 취한 후 50 mM sodium citrate buffer(pH 4) 90 µL와 β-glucosidase 효소액(40 unit/mL) 10 µL를 첨가하였다. Apiin과 apigetrin 표준물질은 각각 500 µg/mL 농도로 증류수에 현탁시켜 1.5 mL micro-tube에 100 µL씩 취한 후 50 mM sodium citrate buffer(pH 4) 190 µL와 β-glucosidase 효소액(40 unit/mL) 10 µL를 첨가하였다. 각 실험구는 40°C에서 0~120분 동안 반응시키면서 30분 간격으로 반응액을 회수하여 95% 에탄올을 450 µL 첨가하였고, 85°C에서 30분 동안 두어 효소반응을 정지하였다. 최종농도 60% 에탄올에 회수된 반응액은 원심분리(4°C, 10,000×g, 5분)하여 상층액을 회수한 후 0.22 µm membrane filter (Futecs Co., Ltd., Daejeon, Korea)로 여과하여 정량분석하였다.

HPLC를 이용한 정량분석

시료는 60% 에탄올로 희석한 후 0.22 µm membrane filter로 여과하여 HPLC system(Waters e2695, Milford, MA, USA)으로 분석하였다. 컬럼은 Waters X-bridge(4.6×250 mm, 5 µm; Milford, MA, USA)를 사용하였고, 컬럼온도는 35°C, 유속은 0.8 mL/min, 시료 주입량은 10 µL였다. 검출기는 photodiode array detector(Waters 996)이며 검출파장은 330 nm를 사용하였다. 이동상은 1% acetic acid가 첨가된 acetonitrile(v/v, 용매 A)과 1% acetic acid가 첨가된 water(v/v, 용매 B)였으며, 농도 경사는 0~10 min은 용매 A를 15%로 유지, 10~30 min은 22%로 증가, 30~35 min은 90%로 증가시키고 40 min까지 90%로 유지하도록 설정하였다. 표준검량선을 작성하여 표준물질의 농도와 peak area의 검량회귀식을 얻어 정확성(accuracy), 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 계산하였다(Table 1). 검

량회귀식을 이용하여 시료의 apiin, apigetrin 및 apigenin 함량(µg/mL)을 산출하였고, 각 성분의 함량은 다음의 식을 이용하여 셀러리 잎 건조물 100 g당 mg으로 표현하였다.

$$\text{함량(mg/100 g)} = A \times \frac{V}{S} \times \frac{1}{1000} \times D \times Y$$

A: 검량 회귀식으로부터 도출된 정량값(µg/mL)

V: 사용된 용매량(mL)

S: 동결 건조물 무게(g)

D: 희석배수

Y: 추출 수율(%)

통계분석

각 실험은 3회 반복하여 얻은 결과를 SPSS package program(Ver. 12.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 간의 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 one-way ANOVA로 분산분석 하였으며, Duncan's multiple range test로 비교하였다. 구연산 처리조건의 요인들 간의 상관관계는 Pearson's correlation analysis를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

셀러리 잎 에탄올 추출물의 apiin 함량 분석

셀러리 잎 분말의 에탄올 추출효율을 증가시키는 방법으로 Hostetler 등(2013)은 pH를 조절하기 위해 완충용액을 사용하였고, pH가 높아짐에 따라 추출 수율이 증가한다고 보고하였다. 특히 에탄올의 농도를 선정하기 위한 선행연구에서 60% 에탄올 농도에서 apiin의 함량이 가장 높은 것으로 확인되었고, 완충용액의 pH 7 및 9가 pH 4인 경우보다 apiin의 함량이 약 2배 정도 증가하는 것으로 분석되었다(Kim, 2020). 따라서 셀러리 잎 에탄올 추출물에 함유된 apiin의 추출효율을 증가시키고자 50 mM phosphate buffer(pH 7)를 첨가하여 2시간 동안 반응시킨 다음 첨가된 에탄올의 최종농도를 60%로 하여 추출했을 때, apiin의 함량을 889.85 mg/100 g까지 증가시킬 수 있었다(Table 2). 이와 같은 추출조건에서 셀러리 잎 에탄올 추출물의 추출수율은 39.79%였다.

본 연구에서의 셀러리 잎 에탄올 추출물(CE)은 대부분이 apiin이었으며, apigetrin과 apigenin 함량은 정량한계 미만으로 존재하였다(Table 2). 결과적으로 에탄올 추출을 통해

Table 1. Linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) of apiin, apigetrin, and apigenin

Standard materials	Linear regression equation	Recovery (%)	Linearity (R^2)	LOD ¹⁾ (µg/mL)	LOQ ²⁾ (µg/mL)
Apiin	$y = 27673x - 20932$	101.02	0.99	2.56	7.74
Apigetrin	$y = 37519x - 62445$	100.76	1.00	1.92	5.81
Apigenin	$y = 70231x - 137243$	101.03	0.99	2.53	7.66

¹⁾LOD: limit of detection based on $3.3 \times \sigma/S$ of method blanks.

²⁾LOQ: limit of quantification based on $10 \times \sigma/S$ of method blanks.

Table 2. Effect of citric acid treatment conditions on apiin, apigetrin, and apigenin contents of CE

Citric acid concentration (M)	Time (h)	Apiin			Apigetrin			Apigenin		
		30°C	60°C	90°C	30°C	60°C	90°C	30°C	60°C	90°C
Control	0	889.85±28.09 ^{defgA1-3)}	889.85±28.09 ^{mA}	889.85±28.09 ^{gA}	23.39±0.38 ^{bA}	23.39±0.38 ^{aA}	23.39±0.38 ^{aA}	tr ⁴⁾	tr	tr
	1	900.72±34.15 ^{fgA}	841.82±7.69 ^{ijklmA}	837.07±2.90 ^{fA}	24.27±0.22 ^{bcA}	25.00±0.17 ^{aA}	34.07±1.08 ^{bB}	tr	tr	tr
	2	851.97±0.23 ^{cdefgC}	842.22±1.53 ^{ijklmB}	829.23±3.32 ^{efA}	24.08±0.19 ^{bcA}	25.42±0.60 ^{aB}	42.96±0.24 ^{cC}	tr	tr	tr
	3	820.23±17.38 ^{cA}	874.11±15.30 ^{lmB}	841.43±1.29 ^{fAB}	23.83±0.72 ^{bcA}	25.72±0.72 ^{aA}	52.10±0.13 ^{dB}	tr	tr	tr
	4	763.07±15.31 ^{bA}	849.10±3.82 ^{klmB}	834.14±5.05 ^{efB}	20.48±1.07 ^{aA}	25.96±0.54 ^{aB}	60.73±1.09 ^{cC}	tr	tr	tr
0.25	0	836.95±7.70 ^{cdeA}	836.95±7.70 ^{ijklmA}	836.95±7.70 ^{fA}	24.23±0.17 ^{bcA}	24.23±0.17 ^{aA}	24.23±0.17 ^{aA}	tr	tr	tr
	1	897.52±41.18 ^{efgC}	813.73±7.85 ^{ghijkB}	269.18±3.29 ^{dA}	24.15±2.07 ^{bcA}	48.15±0.33 ^{bB}	401.56±1.63 ^{fC}	tr	tr	tr
	2	858.27±51.08 ^{cdefgB}	767.21±13.74 ^{fgB}	89.35±3.53 ^{cA}	23.48±1.27 ^{bA}	72.76±4.02 ^{cB}	569.87±1.48 ^{hC}	tr	tr	9.43±0.14 ^a
	3	846.40±38.19 ^{cdefB}	778.52±6.06 ^{fghB}	37.01±0.83 ^{bA}	23.37±1.25 ^{bA}	97.91±1.36 ^{dB}	635.02±1.75 ^{oC}	tr	tr	12.88±0.01 ^b
	4	875.77±0.32 ^{cdefgC}	645.37±59.82 ^{dB}	14.30±1.34 ^{aA}	22.87±0.31 ^{bA}	102.82±8.59 ^{deB}	639.30±2.19 ^{pC}	tr	tr	15.41±0.24 ^c
0.5	0	830.66±0.01 ^{cdA}	830.66±0.01 ^{hijklA}	830.66±0.01 ^{efA}	23.89±0.51 ^{bcA}	23.89±0.51 ^{aA}	23.89±0.51 ^{aA}	tr	tr	tr
	1	893.88±16.66 ^{efgC}	788.87±19.37 ^{fghijB}	80.82±2.69 ^{cA}	24.30±1.38 ^{bcA}	75.61±2.23 ^{cB}	543.42±0.97 ^{gC}	tr	tr	9.10±0.14 ^a
	2	902.77±28.26 ^{fgC}	740.45±26.00 ^{efB}	11.34±0.94 ^{aA}	23.57±0.01 ^{bA}	121.10±4.36 ^{efB}	620.65±2.71 ^{nC}	tr	tr	15.76±0.17 ^{cd}
	3	912.81±35.68 ^{gC}	736.99±55.47 ^{efB}	9.21±0.25 ^{aA}	23.52±0.39 ^{bA}	174.76±12.61 ^{gB}	635.60±1.90 ^{qC}	tr	tr	23.22±0.05 ^f
	4	887.15±9.68 ^{defgC}	538.66±20.61 ^{bcB}	7.64±0.45 ^{aA}	23.50±0.69 ^{bA}	194.26±42.43 ^{gB}	633.88±0.88 ^{oC}	tr	tr	28.25±0.35 ^g
0.75	0	821.70±4.80 ^{cA}	821.70±4.80 ^{ghijklA}	821.70±4.80 ^{eA}	24.34±0.02 ^{bcA}	24.34±0.02 ^{aA}	24.34±0.02 ^{aA}	tr	tr	tr
	1	897.90±33.76 ^{fgC}	782.21±30.55 ^{fghiB}	27.05±0.46 ^{bA}	24.00±0.85 ^{bcA}	106.79±0.08 ^{deB}	589.74±1.28 ^{iC}	tr	tr	12.49±0.00 ^b
	2	880.42±32.52 ^{defgC}	660.16±4.70 ^{dB}	9.48±0.15 ^{aA}	24.18±0.38 ^{bcA}	184.19±4.02 ^{gB}	605.77±2.31 ^{lC}	tr	tr	22.44±0.24 ^c
	3	883.65±29.79 ^{defgC}	534.00±11.35 ^{bcB}	7.96±0.76 ^{aA}	24.35±0.73 ^{bcA}	257.97±2.76 ^{iB}	632.94±2.16 ^{oC}	tr	tr	33.04±0.34 ^h
	4	713.30±36.29 ^{bC}	501.63±54.03 ^{bB}	8.24±0.88 ^{aA}	24.25±1.13 ^{bcA}	284.93±15.5 ^{jB}	618.81±2.10 ^{nC}	tr	tr	41.65±0.30 ⁱ
1	0	821.57±0.46 ^{cA}	821.57±0.46 ^{ghijklA}	821.57±0.46 ^{eA}	24.72±0.19 ^{bcA}	24.72±0.19 ^{aA}	24.72±0.19 ^{aA}	tr	tr	tr
	1	866.67±3.02 ^{cdefgC}	691.52±4.99 ^{deB}	9.66±0.50 ^{aA}	24.19±0.09 ^{bcA}	137.24±7.25 ^{fb}	600.73±0.57 ^{kC}	tr	tr	16.00±0.05 ^d
	2	868.86±4.18 ^{cdefgC}	557.48±22.29 ^{cB}	7.35±0.41 ^{aA}	24.55±0.37 ^{bcA}	235.34±7.55 ^{hB}	593.16±2.15 ^{jC}	tr	tr	28.79±0.21 ^g
	3	869.21±12.25 ^{cdefgC}	449.43±20.16 ^{aB}	8.40±0.89 ^{aA}	25.70±1.12 ^{cA}	321.56±2.98 ^{kB}	610.20±1.25 ^{mC}	tr	tr	43.25±0.47 ^j
	4	650.26±15.24 ^{aC}	428.98±13.35 ^{aB}	8.74±1.05 ^{aA}	23.37±0.27 ^{bA}	378.45±0.84 ^{lB}	587.10±2.50 ^{iC}	tr	tr	53.41±0.45 ^k

1) Values are mean±SD (n=3).

2) Different lower-case letters (a-k) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test ($P<0.05$).3) Different upper-case letters (A-C) in the same row indicate a significant difference according to Duncan's multiple test ($P<0.05$).

4) tr, trace

셀러리 잎으로부터 0.8% apiin을 함유한 추출물을 얻을 수 있었으며, 이것을 동결건조한 후 glycosidic linkage의 가수분해에 대한 연구를 수행하였다.

구연산 처리에 의한 가수분해

구연산 처리조건인 농도, 온도 및 시간에 대한 CE에 함유된 apiin의 가수분해 결과는 Table 2에 나타났다. 구연산 처리조건 영향은 온도 > 농도 > 시간 순으로 apigetrin의 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 90°C의 경우, 처리시간이 증가함에 따라 apiin의 함량이 감소한 반면 apigetrin의 함량은 유의적으로 증가하였고, 구연산을 첨가하지 않은 control의 경우에도 상대적으로 함량은 낮았지만 비슷한 경향을 보였다. 60°C에서는 구연산 첨가농도에 대한 영향으로 처리시간이 증가함에 따라 전반적으로 apiin 함량은 감소하고 apigetrin 함량이 증가하는 것으로 확인되었으나, 30°C에서는 시간의 증가에 따라 유의적인 변화가 없었다. 특히, 90°C에서 구연산 처리농도를 증가시켰을 때 apiin의 가수분해 속도는 증가하였으며, 10 mg/100 g DCP 이하로 감소하는 데 소요되는 시간은 0.5, 0.75와 1 M에서 각각 3, 2와 1시간이었고 0.25 M에서는 4시간 이상으로 추정되었다.

Apiin의 구연산 처리를 통한 가수분해는 apiin으로부터 5탄당인 apiose를 제거하여 apigetrin으로 전환시키는데 효과적이었다. 이와 같은 결과는 인산(pH 2.7)을 이용하여 apiin을 가수분해했을 경우, 100°C에서 90분간 처리했을 때 높은 효율로 apigetrin으로 전환된다는 보고와 유사한 경향을 보였다(Hostetler 등, 2013). 즉, pH 3 이하에서 불안정한 apiin은 100°C의 열처리 공정이 더해져 apiose의 결합이 끊어지고 상대적으로 안정한 apigetrin의 구조를 유지하는 것으로 판단된다. 구연산은 0.25(pH 1.67)~1 M(pH 1.17) 수준에서 동일 농도의 다른 유기산에 비해 pH가 낮은 편이다. 본 연구에서 구연산 처리농도 1 M, 반응온도 90°C에서 반응시켰을 때 apiin이 apigetrin으로 전환되는 속도가 가장 빨랐으나, 시간이 경과함에 따라 4시간 반응 이후 apigetrin 함량이 감소하고 apigenin 함량이 53.41 mg/100 g DCP로 1시간 반응 때보다 3배 이상 증가하였다. 그러나 구연산 0.25 M(pH 1.67), 반응온도 90°C에서 4시간 반응시켰을 때 apigetrin이 가장 높은 함량인 639.30 mg/100 g DCP을 나타내었다. Apiin으로부터 apigetrin으로의 전환을 분석한 결과, CE에 함유된 apiin의 함량은 889.85 mg/100 g, DCP는 약 15.76 mM이며 구연산 처리 후 최대 apigetrin 함량은 639.30 mg/100 g DCP로 이는 14.78 mM에 상당하였다. 구연산 처리에 의한 가수분해 결과 apiin으로부터 apigetrin으로의 전환율은 대략 93.82%로 분석되었다. 한편, apigenin의 산 가수분해 연구에서 1 N HCl에 24시간 노출 시 90% 이상이 분해된다고 하였고(Subramanian 등, 2019), 비배당체 형태의 apigenin은 고온과 낮은 pH에 대해 안정성이 감소하는 것으로 보고된 바 있다(Németh 등, 2003). 따라서 apiin으로부터 산 가수분해에 의한 apigenin으로의 전

환보다는 산에 비교적 안정한 apigetrin으로 전환이 더 효율적일 것으로 판단된다. 본 연구에서 에탄올 추출을 통해 얻어진 셀러리 잎의 apiin 성분의 apigetrin으로의 고효율 전환과 apigenin 성분의 분해 최소화를 위한 가장 효과적인 조건은 구연산 농도 0.25 M, 반응온도 90°C 및 반응시간 4시간으로 추정된다.

구연산 처리조건(온도, 시간, 구연산 농도)에 대한 apigetrin의 함량과의 상관성을 분석하기 위해 Table 2 자료를 이용하여 다중회귀분석을 실시하였고, 각 변수의 Pearson 상관계수를 구하여 상관성을 판단하였다. Apigetrin의 함량을 종속변수(Y)로 하여 독립변수를 각각 온도(X_1), 시간(X_2), 구연산 농도(X_3)로 하였을 때 비표준화 계수를 사용한 회귀방정식은 다음과 같다.

$$Y = -384.024 + 6.161X_1 + 49.662X_2 + 188.771X_3$$

R^2 값은 0.607이었으며, 유의확률이 $P < 0.001$ 로 독립변수들에 대한 종속변수의 설명력이 높은 수준이었다. Pearson 상관계수는 apigetrin 함량에 대해 온도가 0.656으로 상관성이 높았으며, 시간(0.305)과 구연산 농도(0.290)와는 상관성을 보이지 않았다. 따라서 구연산을 이용한 가수분해반응을 위해 구연산 농도는 0.25 M이어도 충분하며 반응시간의 증가에 따라 apigetrin의 평균함량은 증가하는 경향을 보였으나, 1시간 이후부터는 통계적으로 유의차($P < 0.05$)가 없이 4시간 반응까지도 apigetrin의 함량이 감소하지 않아 안정성을 유지하는 것으로 판단된다.

β -glucosidase의 처리에 의한 가수분해

에탄올 추출물 CE와 CE를 구연산 처리(0.25 M citric acid, 90°C, 4 h)한 CCE에 각각 β -glucosidase를 처리하여 정량분석한 결과와 apiin과 apigetrin 표준물질의 β -glucosidase 가수분해 효과를 Table 3에 나타냈다. CE의 경우 β -glucosidase를 첨가하여 120분간 반응시켰음에도 apiin의 농도변화가 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 CCE의 경우 효소 첨가 후 30분 반응물에서 83% 이상이 분해되어 apigenin으로 전환되었으며, 전환율은 58.96%였다. Apiin과 apigetrin 표준물질에서도 이와 유사한 결과를 나타내었는데, apiin은 β -glucosidase에 의한 영향을 받지 않았으나 apigetrin은 β -glucosidase 반응 후에 크게 감소하여 apigenin으로 전환되었으며 반응 30분에서 전환율은 52.61%를 나타내었다. CCE의 경우에는 효소반응 30분 이후에도 apigenin의 농도가 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다.

CE와 CCE에 β -glucosidase를 처리하여 120분간 반응시켜 얻은 HPLC chromatogram은 Fig. 2와 같다. CE의 경우 효소반응 전후에도 apiin의 peak area의 변화가 없었으며, luteolin과 apigenin의 peak area가 반응 전과 비교해 소량, 증가하는 경향을 보였다. 이와 같은 경향은 CE에 소량 존재하는 luteolin 7-O-glucoside와 apigenin 7-O-glu-

Table 3. Effect of β -glucosidase reaction time on apigenin concentrations of CE and CCE

Sample ¹⁾	Time (min)	Concentration (μ mole)			Apigenin conversion ratio (%)
		Apiin	Apigetrin	Apigenin	
CE	0	121.08 $\pm$ 3.82 ^{a2)3)}	tr ⁴⁾	tr	—
	30	119.84 $\pm$ 2.06 ^a	tr	tr	—
	60	122.77 $\pm$ 0.52 ^a	tr	tr	—
	90	122.52 $\pm$ 0.46 ^a	tr	tr	—
	120	119.14 $\pm$ 2.69 ^a	tr	tr	—
CCE	0	tr	142.10 $\pm$ 21.56 ^c	tr	—
	30	tr	23.33 $\pm$ 1.17 ^b	94.80 $\pm$ 6.84 ^a	58.96 $\pm$ 4.81 ^a
	60	tr	13.63 $\pm$ 2.76 ^a	95.81 $\pm$ 13.11 ^a	59.67 $\pm$ 9.23 ^a
	90	tr	12.21 $\pm$ 3.78 ^a	100.01 $\pm$ 26.44 ^a	62.63 $\pm$ 18.61 ^a
	120	tr	11.05 $\pm$ 1.69 ^a	94.50 $\pm$ 12.48 ^a	58.75 $\pm$ 8.79 ^a
Ref_A	0	116.92 $\pm$ 0.40 ^a	ND ⁵⁾	ND	—
	30	120.63 $\pm$ 0.29 ^b	ND	ND	—
	60	116.49 $\pm$ 0.69 ^a	ND	ND	—
	90	120.31 $\pm$ 0.32 ^b	ND	ND	—
	120	120.08 $\pm$ 1.2 ^b	ND	ND	—
Ref_B	0	ND	152.64 $\pm$ 2.00 ^c	ND	—
	30	ND	47.75 $\pm$ 16.21 ^d	88.37 $\pm$ 7.85 ^a	52.61 $\pm$ 5.15 ^a
	60	ND	40.09 $\pm$ 14.77 ^c	94.74 $\pm$ 11.86 ^a	56.78 $\pm$ 7.77 ^a
	90	ND	21.93 $\pm$ 9.53 ^b	104.12 $\pm$ 5.11 ^a	62.92 $\pm$ 3.35 ^a
	120	ND	14.64 $\pm$ 5.74 ^a	106.45 $\pm$ 5.33 ^a	64.45 $\pm$ 3.50 ^a

¹⁾CE is celery leaf extract and CCE is citric acid celery leaf extract. Ref_A and Ref_B are standard materials of apiin and apigetrin, respectively.

²⁾Values are mean $\pm$ SD (n=3).

³⁾Different lower-case letters (a-e) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test ($P<0.05$).

⁴⁾tr, trace.

⁵⁾ND, not detected.

coside(apigetrin)으로부터 glucose의 가수분해에 의해 증가하는 것으로 추정된다. CCE의 경우에는 120분 효소반응 후 apigetrin의 peak가 거의 사라진 반면, apigenin의 peak area가 증가하여 apigetrin이 β -glucosidase에 의해 대부분 전환된 것으로 분석되었다.

Flavone glycosides는 소장 내 β -glucosidase에 의해 가수분해가 가능하지만, glycoside 부분이 이당류나 malonyl 구조를 포함하고 있을 경우 단당류에 비해 장내 β -glucosidase에 대한 저항성이 있어 분해가 어렵다(Németh 등, 2003). Apiin은 apigenin에 apiosylglucoside의 이당류가 결합한 apigenin 유도체로서 β -glucosidase에 의한 가수분해가 일어나지 않는 반면 apigetrin은 apiin에서 apiose가 제거되어 apigenin과 β -glucosidic 결합을 하고 있기 때문에 β -glucosidase에 의한 분해가 가능했을 것이라고 추정된다(Fig. 1). 셀러리에 함유된 apigenin은 대부분 apiin의 구조를 이루고 있어서 apigenin을 얻기 위해 효소처리 이외에 강산을 이용한 산 가수분해 방법이 보고되었는데, 2 M HCl로 4시간 동안 처리했을 경우 최대 108 mg/kg(10.8 mg/100 g)이었다(Hertog 등, 1992). 본 연구에서는 apiin으로부터 apigenin을 효과적으로 분리하기 위해 셀러리 잎 에탄올 추출물에 구연산을 처리한 후 β -glucosidase를 순차적으로 처리한 결과, apiin으로부터 apigetrin으로의 전환을 위해 β -glucosidase의 효소반응이 효과적임을 확인하였

다. 따라서 구연산 처리 후 β -glucosidase 처리에 의한 apigenin의 수득 함량을 셀러리 잎 원물(DCP) 기준으로 환산했을 때, 최대 330.71 mg/100 g DCP으로 분석되었다(Table 4).

요 약

셀러리 잎(DCP)으로부터 에탄올 추출을 통해 얻은 apiin에 대해 구연산 처리조건과 β -glucosidase 반응이 apigetrin 및 apigenin으로의 전환에 미치는 효과를 연구하였다. 셀러리 잎의 에탄올 추출물(CE)에 함유된 apiin의 함량은 889.85 mg/100 g DCP였다. 구연산 처리조건은 온도(30°C, 60°C, 90°C), 시간(1~4 h), 구연산 농도(0.25~1 M)를 독립변수로 하였다. 구연산을 처리한 결과, 온도와 상관성(0.656)이 가장 높았으며 90°C에서 반응시간에 따라 apigetrin 함량이 유의적으로 증가하였다. 구연산 처리 최소농도 0.25 M에서 90°C 온도조건으로 4시간 동안 반응시켰을 때 apigetrin 함량은 639.30 mg/100 g DCP로 대조구(0 M, 90°C, 4 h)에 비해 10배 이상 증가하였고, apiin의 apigetrin으로의 전환율은 93.82%였다. 구연산 처리 셀러리 잎 에탄올 추출물(CCE)의 β -glucosidase에 의한 가수분해 결과, apigetrin으로부터 apigenin으로 전환되는 전환율이 최대 62.63%였고, apigetrin 표준물질에서도 apigenin으로의 전환율이

Fig. 2. HPLC chromatograms for apiin bioconversion in CE and CCE with β -glucosidase treatment. A: standard materials (apiin, apigetrin, luteolin, and apigenin) mixture, B: a, celery leaf extract (CE); b, enzyme treated celery leaf extract; c, citric acid celery leaf extract (CCE); d, enzyme treated citric acid celery leaf extract. The concentration of standard mixture is 100 μ g/mL.

Table 4. Apiin, apigetrin, and apigenin contents (mg/100 g) of CE and CCE treated with β -glucosidase

Sample ¹⁾	Time (min)	Contents (mg/100 g DCP)		
		Apiin	Apigetrin	Apigenin
CE	0	836.95 $\pm$ 26.43 ²⁾³⁾	tr ⁴⁾	tr
	30	828.37 $\pm$ 14.24 ^a	tr	tr
	60	848.61 $\pm$ 3.66 ^a	tr	tr
	90	846.85 $\pm$ 3.22 ^a	tr	tr
	120	823.50 $\pm$ 18.60 ^a	tr	tr
CCE	0	tr	752.34 $\pm$ 114.15 ^c	tr
	30	tr	123.56 $\pm$ 6.20 ^b	313.48 $\pm$ 22.63 ^a
	60	tr	72.20 $\pm$ 14.64 ^a	316.83 $\pm$ 43.35 ^a
	90	tr	64.65 $\pm$ 20.03 ^a	330.71 $\pm$ 87.43 ^a
	120	tr	58.55 $\pm$ 8.97 ^a	312.48 $\pm$ 41.29 ^a

¹⁾CE is celery leaf extract and CCE is citric acid celery leaf extract.

²⁾Values are mean $\pm$ SD (n=3).

³⁾Different lower-case letters (a-c) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test ($P < 0.05$).

⁴⁾tr, trace.

64.45%로 CCE와 유사한 결과를 보였다. 구연산 처리 후 β -glucosidase 처리에 의한 apigenin의 수득 함량을 셀러리 잎 원물(DCP) 기준으로 환산하면 최대 330.71 mg/100 g DCP으로 분석되었다. 이와 같은 결과를 기반으로 셀러리 잎에 함유된 apiin의 물리 화학적인 성질을 이해하고, 구연산과 β -glucosidase의 반응조건을 확립하여 생체 유용물이 높은 apigenin 회수율 향상이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2019년 지역특화(주력)산업육성 기술개발(고기능성 바이오 활성물질 기반 과민 피부상태 개선 기능성 식품 개발 및 사업화, 과제번호: P0002904)사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Bolarinwa A, Linseisen J. Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection. *J Chromatogr B*. 2005. 823:143-151.
- Dai J, Van Wie PG, Fai LY, Kim D, Wang L, Poyli P, et al. Downregulation of NEDD9 by apigenin suppresses migration, invasion, and metastasis of colorectal cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016. 311:106-112.
- Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem*. 1992. 40:2379-2383.
- Hostetler GL, Riedl KM, Schwartz SJ. Effects of food formulation and thermal processing on flavones in celery and chamomile. *Food Chem*. 2013. 141:1406-1411.
- Hostetler GL, Riedl KM, Schwartz SJ. Endogenous enzymes, heat, and pH affect flavone profiles in parsley (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum*) and celery (*Apium graveolens*) during juice processing. *J Agric Food Chem*. 2012. 60:202-208.
- Kim HR. Enhancement of apigenin content in celery leaf ethanol extract. Master's thesis. Jeonbuk National University, Jeonbuk, Korea. 2020.
- Kong YH, Rho J, Cho CW, Kim MH, Lee YC, Kim SS, et al. Variation of phenolic ingredient and ginsenoside content in red ginseng extract by acid treatment. *J Ginseng Res*. 2009. 33:194-198.
- Kooti W, Ali-Akbari S, Asadi-Samani M, Ghadery H, Ashtary-Larky D. A review on medicinal plant of *Apium graveolens*. *Adv Herb Med*. 2014. 1:48-59.
- Li F, Lang F, Zhang H, Xu L, Wang Y, Zhai C, et al. Apigenin alleviates endotoxin-induced myocardial toxicity by modulating inflammation, oxidative stress, and autophagy. *Oxid Med Cell Longev*. 2017. 2017:Article ID 23028906. <https://doi.org/10.1155/2017/2302896>
- Meyer H, Bolarinwa A, Wolfram G, Linseisen J. Bioavailability of apigenin from apiin-rich parsley in humans. *Ann Nutr Metab*. 2006. 50:167-172.
- Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem*. 2001. 49:3106-3112.
- Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr*. 2003. 42:29-42.
- Park JS, Hwang IW, Zheng HZ, Kim SK, Chung SK. Determination of optimum hydrolysis conditions for flavonoid analysis in plant leaves. *Korean J Food Preserv*. 2010. 17:261-266.
- Subramanian G, Meyyanathan SN, Byran G. Stability-indicating reverse-phase high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of apigenin and luteolin from *Achillea millefolium* Linn. *Asian J Pharm Clin Res*. 2019. 12:169-172.
- Trichopoulou A, Vasilopoulou E, Hollman P, Chamalides C, Foufa E, Kaloudis T, et al. Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the mediterranean diet. *Food Chem*. 2000. 70:319-323.
- Yao Y, Sang W, Zhou M, Ren G. Phenolic composition and antioxidant activities of 11 celery cultivars. *J Food Sci*. 2010. 75: C9-C13.
- Zhang Q, Zhou MM, Chen PL, Cao YY, Tan XL. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis for the extraction of luteolin and apigenin from celery. *J Food Sci*. 2011. 76: C680-C685.
- Zhang W, Qiao H, Lv Y, Wang J, Chen X, Hou Y, et al. Apigenin inhibits enterovirus-71 infection by disrupting viral RNA association with *trans*-acting factors. *PLoS ONE*. 2014. 9: 110429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110429>