구연산 처리에 의한 고욤나무 잎 Myricitrin의 Myricetin으로 전환 최적화

강현진¹ · 오현화² · 송근섭² · 장선일³ · 김영수²

¹(재)발효미생물산업진흥원

²전북대학교 식품공학과

³전주대학교 보건관리학과

Optimization of Conversion of *Diospyros lotus* L. Myricitrin to Myricetin by Citric Acid Treatment

Hyeon-Jin Kang¹, Hyeon Hwa Oh², Geun-Seoup Song², Seon-Il Jang³, and Young-Soo Kim²

¹Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI)

²Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University

³Department of Health Management, Jeonju University

ABSTRACT Citric acid treatment conditions for converting *Diospyros lotus* leaves to myricetin were optimized using the response surface methodology. The contents of myricitrin and myricetin in extracts of *Diospyros lotus* leaves were measured using high performance liquid chromatography (HPLC). From several organic acids screened, citric acid produced the highest content of myricetin, and was therefore selected for the conversion of myricitrin from *Diospyros lotus* leaf extracts. The treatment method of adding citric acid was optimized by the response surface methodology (RSM) using the Box-Behnken design (BBD) with three variables: molar concentration of citric acid (X_1 : 50~150 mM), reaction temperature (X_2 : 85~95°C) and reaction time (X_3 : 3~7 h). RSM analysis revealed that the content of myricitrin and myricetin was highly impacted by the citric acid concentration, whereas reaction temperature had the lowest effect. To verify accuracy of the prediction, the myricetin content was determined under optimal conditions, and the result obtained (1,224.99 mg/100 g DLP) was similar to those predicted. Based on these results, we propose the use of citric acid treatment to increase the yield of myricetin from *Diospyros lotus* leaves.

Key words: *Diospyros lotus* leaf, myricitrin, myricetin, citric acid, response surface methodology

서 론

고욤나무(*Diospyros lotus* L.)는 한국, 중국, 일본 등 아시아 및 유럽 전역에 분포되어 자생하는 감나무과 낙엽교목으로(Uddin 등, 2011), 열매, 껍질, 잎과 같은 부위들은 전통 의약 분야에서 인체질환을 개선하는 데 사용되어 왔다(Ganapaty 등, 2006; Rauf 등, 2014). 특히 고욤나무 잎은 요통을 줄여주는 효과가 있어 한방 및 민간에서 차로 이용되어 왔으며(Rauf 등, 2015), 고욤나무 잎에 함유된 myricitrin은 항염증, 항알레르기 및 항가려움증 등에 효과적인 생리활성 성분으로 알려져 있다(Cho 등, 2017; Kim 등, 2013; Uddin 등, 2014).

Myricitrin은 고욤나무 잎에서 myricetin의 3번째 탄소

에 rhamnose가 결합한 배당체 형태로 존재하며(Kim 등, 2015) 주로 에탄올 및 유기용매에 대한 용해성이 크다(Kim 등, 2014). 한편, rhamnose가 없는 myricetin은 myricitrin보다 수용성이 낮지만 항산화, 항염증 및 항암 효과 등의 기능성이 높은 것으로 알려져 있다(Kumar와 Pandey, 2013; Ferreira 등, 2013; Xu 등, 2013). 식물체 내에서는 대부분의 생리활성 성분들이 배당체 형태로 존재하기 때문에 가공 공정을 통해 비배당체로 전환하려는 연구가 보고되고 있다(Jang 등, 2018). 또한, 아이스크림 쿵 잉으로부터 추출된 myricitrin의 myricetin으로의 전환이 산가수분해 조건에 따라 증대되었다는 보고가 있어(Tolosa 등, 2018), myricitrin 함량이 높은 고욤나무 잎에 산가수분해 방법을 적용하면 myricetin의 수율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

산을 촉매로 하는 산가수분해 방법은 배당체를 가수분해하여 비배당체로 전환하기 위해 사용된다. 강산을 이용한 산가수분해는 낮은 공정비용, 간단한 반응과정, 짧은 반응시간 및 대량생산이 가능한 장점이 있으나, 장비부식 및 선택적 가수분해를 어렵게 만드는 첨가반응, 산화반응 등의 부반응을 유발하는 것으로 알려져 있다(Faaij, 2006; Yang과

Received 6 Jan 2021; Revised 22 Apr 2021; Accepted 23 Apr 2021
Corresponding author: Young-Soo Kim, Department of Food Science and Technology, Jeonbuk National University, 567, Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 54896, Korea,
E-mail: ykim@jbnu.ac.kr

Author information: Hyeon Hwa Oh (Researcher), Geun-Seoup Song (Professor), Seon-Il Jang (Professor), Young-Soo Kim (Professor)

Le, 2008). 한편 약산인 유기산을 이용한 가수분해는 강산에 비해 부반응 및 생성물의 분해를 최소화할 수 있기 때문에 유기산을 이용한 가수분해가 고욤나무 잎의 myricitrin 전환 수율 증가에 유리할 것으로 판단된다(Lee와 Jeffries, 2011). Tolosa 등(2018)은 산가수분해에 의한 myricitrin 전환 최적화를 위해 적용되는 산의 농도, 반응온도, 반응시간 등의 여러 독립변수의 영향을 파악하기 위해서 반응표면분석법을 이용하였고, 여러 독립변수가 하나의 종속변수에 미치는 영향을 분석하기에 적합하다고 하였다.

따라서 본 연구에서는 고욤나무 잎 myricitrin의 가수분해 최적화를 위해 적합한 유기산을 선택하고, 선택된 구연산의 최적 가수분해 조건을 얻기 위해 반응표면분석법을 사용하였다. 반응표면분석에 사용된 실험조건(구연산 처리농도, 반응온도, 반응시간)은 myricitrin의 비배당체인 myricetin 생성량을 최대화하기 위해 설계되었다. 반응표면모델에 의한 고욤나무 잎의 구연산 최적 가수분해조건에서 생성된 myricetin의 함량은 HPLC 분석을 통해 정량화하여 검증을 실시하였다. 이와 같은 결과를 통해 고욤나무 잎으로부터 유용성이 높은 myricetin의 최대 획득을 위한 구연산 최적 가수분해 조건을 설정하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 고욤나무 잎은 (주)아토크엔에이(Jeonju, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 고욤나무 잎을 수세하여 40°C에서 12시간 동안 건조한 후 roll mill(single type stainless roller, Shinpoong Eng., Ltd., Gwangju, Korea)을 사용하여 분쇄한 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 추출을 위한 에탄올은 대정화금(Siheung, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 유기산 처리를 위한 acetic acid, succinic acid, lactic acid, malic acid, citric acid와 표준물질인 myricitrin, myricetin은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며 그 밖의 분석에 사용된 시약들은 HPLC grade를 사용하였다.

유기산 처리 및 에탄올 추출

고욤나무 잎 건조 분말(*Diospyros lotus* leaf powder, DLP) 10 g에 0.1 M로 조제된 유기산(acetic acid, succinic acid, lactic acid, malic acid, citric acid) 용액을 20배수(w/v) 첨가하여 혼합한 후 90°C 항온수조(TW-PC-1, Universal Scientific Industrial Co., Ltd., Shanghai, China)에서 2시간 동안 반응시켰다. Control은 유기산 용액 대신 증류수를 첨가하여 동일 조건에서 반응시켰다. 반응물은 실온에서 냉각한 후 95% 에탄올을 첨가하여 에탄올의 최종농도를 60%로 조정하였다. 이후 20°C 항온항습기(GC-300 TLH, Jeiotech Co., Ltd., Daejeon, Korea)에서 12시간 동안 교반 추출하였다. 각 추출물은 원심분리기(Avanti J-26

XP, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 사용하여 원심분리(10,000×g, 4°C, 10 min)한 후 상등액을 취해 정량분석에 이용하였다.

구연산 처리 및 에탄올 추출

DLP 10 g에 0.1 M로 조제된 구연산 용액을 20배수(w/v) 첨가하여 혼합한 후 30, 60, 90°C 항온수조에서 각각 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6시간 동안 반응시켰다. 반응물에 95% 에탄올을 첨가하여 에탄올의 최종농도를 60%로 조정한 후 20°C 항온항습기에서 12시간 동안 교반 추출하였다. 각 추출물은 원심분리(10,000×g, 4°C, 10 min)하여 상등액을 취해 정량분석에 이용하였다.

구연산 가수분해 조건 설정을 위한 실험계획

구연산 처리를 통한 고욤나무 잎 myricitrin의 myricetin으로 전환조건의 최적화를 위해 반응표면분석법을 사용하였고, 실험계획법인 Box-Behnken design(BBD)에 따라 실험을 설계하였다. 실험조건은 구연산 농도(mM, X_1), 반응온도(°C, X_2) 및 반응시간(h, X_3)을 독립변수로 설정하였고, 실험의 범위는 -1, 0, 1의 3단계 수준으로 나누어 부호화하였다(Table 1). BBD에 따라 3개의 중심점을 포함하는 15구간을 설정하여 실험을 진행하였고 종속변수로는 myricetin 함량을 분석하였다. 선행연구를 통해 구연산 농도(50~800 mM), 반응온도(90°C)와 반응시간(1~4 h)에 대해 myricitrin의 전환율을 비교하여 중심점을 구연산 농도 100 mM, 반응온도 90°C, 반응시간 5 h로 하였다(Kang, 2020). BBD 설계에 따른 실험 결과로부터 각 독립변수와 종속변수 myricetin의 함량에 대해 분산분석(ANOVA)과 회귀분석(regression analysis)을 통해 반응모델 유의성 및 적합성을 검증하였다. 변수들의 특성과 그에 상응하는 최적 구연산 처리조건은 Design-Expert software(V.11.1.2.0, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하였다. 독립변수(X_1 , X_2 , X_3)에 대한 반응변수(Y)의 예측 회귀식을 다음식(1)과 같이 나타내었다.

$$Y \text{ (mg/100 g DCP)} = \beta_0 + \beta_{X_1}X_1 + \beta_{X_2}X_2 + \beta_{X_3}X_3 + \beta_{X_1^2}X_1^2 + \beta_{X_2^2}X_2^2 + \beta_{X_3^2}X_3^2 + \beta_{X_1X_2}X_1X_2 + \beta_{X_1X_3}X_1X_3 + \beta_{X_2X_3}X_2X_3 \quad (1)$$

β_0 : 상수 계수(constant coefficient)

β_i : 1차 계수($i=X_1, X_2, X_3$)

β_{ii} : 2차 계수($i=X_1^2, X_2^2, X_3^2$)

Table 1. Coded and actual levels of three independent variables

Independent variable	Coded and original value of variable		
	-1	0	1
Citric acid concentration (X_1) (mM)	50	100	150
Reaction temperature (X_2) (°C)	85	90	95
Reaction time (X_3) (h)	3	5	7

β_{ij} : 교호작용 계수($ij=X_1X_2, X_2X_3, X_3X_1$)

예측 회귀식을 바탕으로 반응변수에 따른 독립변수들의 영향은 Design-Expert software(V.11.1.2.0, Stat-Ease)를 사용하여 등고선도와 3차원 그래프로 나타내었다. 최적의 구연산 처리조건은 최대 myricetin 함량을 나타내는 조건으로 설정하였고, 예측된 최적조건에서 실제 실험을 통해 얻은 실험값과 예측값을 비교하여 유의성을 검증하였다.

HPLC를 이용한 정량분석

고욤나무 잎의 myricitrin 및 myricetin 분석은 Tsao 등(2003)의 방법을 변형하여 사용하였다. 시료는 추출 용매를 이용하여 5배 희석한 후 0.22 µm membrane filter(Futecs Co., Ltd., Daejeon, Korea)로 여과하여 HPLC system(e2695, Waters, Milford, MA, USA)으로 분석하였다. 컬럼은 Waters X-bridge(4.6×250 mm, 5 µm, Waters)를 사용하였고, 컬럼 온도는 35°C, 유속은 0.8 mL/min, 시료 주입량은 10 µL였다. 검출기는 photodiode array detector(Waters 996, Waters), 검출파장은 354 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. 표준 검량선을 작성하여 표준물질의 농도와 peak area의 상관회귀식을 얻어 정확성(accuracy), 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 계산하였다(Table 2). 검량회귀식을 이용하여 반응 후 에탄올 추출물의 myricitrin과 myricetin 함량(µg/mL)을 산출하였고 각 성분의 함량은 다음의 식을 이용하여 DLP 100 g당 mg으로 나타내었다.

$$\frac{\text{함량}}{(\text{mg}/100 \text{ g DCP})} = S \times \frac{1 \text{ mg}}{1,000 \text{ } \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ mL}}{A} \times D \times 100$$

S: myricitrin 및 myricetin 함량(µg/mL)

A: DLP의 양(g)

D: 희석배수

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 하였으

며, Duncan's multiple range test를 통해 유의성에 대한 동질집단을 분류하였다.

결과 및 고찰

고욤나무 잎 에탄올 추출물의 myricitrin 및 myricetin 함량 분석

표준물질 myricitrin 및 myricetin의 직선성, 검출한계, 정량한계 및 회수율의 확인 결과는 Table 2와 같다. HPLC 크로마토그램 상에서 표준물질 myricitrin과 myricetin의 머무름 시간은 각각 12.63분과 25.61분으로 명확하게 분리되었으며 표준물질과 고욤나무 잎 에탄올 추출물의 peak 머무름 시간이 일치됨을 확인하였다(Fig. 1). 표준물질 myricitrin과 myricetin은 12.5~200 µg/mL 농도 범위에서 0.9999의 상관계수(R^2)를 나타내어 높은 직선성을 보였고, 회수율은 각각 99.33%와 101.24%로 5% 이내의 오차를 나타내었다. 검출한계는 myricitrin과 myricetin이 각각 2.51 µg/mL와 3.04 µg/mL로 나타났고, 정량한계는 각각 7.62 µg/mL와 9.22 µg/mL로 확인되었다. 따라서 시료의 myricitrin 및 myricetin 함량은 정량한계치 이상의 정량값을 제시하였고 정량한계치 이하는 trace로 표기하였다. Araújo 등(2016)은 myricitrin에 대한 검출파장을 254 nm로 하여 분석하였으며, Kim 등(2020)은 고욤나무 잎 추출물의 경우 260 nm에서 myricitrin 이외에 6가지의 폴리페놀 화합물이 검출될 수 있다고 하였다. 그러나 본 연구에서 사용된 HPLC system에서 myricitrin과 myricetin의 UV-spectrum(200~400 nm)을 분석한 결과, 354 nm에서 다른 화합물의 영향이 적은 것으로 확인되었다(Fig. 1B). 이전 연구에서 Kim 등(2020)은 고욤나무 잎 70% 에탄올 추출 건조물에 대한 myricitrin의 함량을 44.18 mg/g으로 보고하고 있으나 고욤나무 잎에 함유된 myricitrin 함량을 비교할 수 없었다. 한편 선행연구에서 확인된 고욤나무 잎 60% 에탄올 추출물에 함유된 myricitrin 함량은 2,032.02 mg/100 g DLP였다(Kang, 2020).

유기산 종류에 따른 myricitrin의 전환

유기산 종류별 가수분해 반응 전후 고욤나무 잎 에탄올 추출물의 myricitrin과 myricetin의 함량 변화는 Table 3과 같다. 유기산 처리물의 대조구로 증류수를 유기산 용액 대신 반응시킨 후 에탄올을 후첨하여 추출조건(60% 에탄올, 20°C, 12 h)에서 추출하였을 때, myricitrin 함량은 1,816.73 mg/100 g DLP로 반응 전 2,032.02 mg/100 g DLP보다

Table 2. Linearity, limit of detection, and limit of quantification of myricitrin and myricetin

Standard materials	Linear regression equation	Recovery (%)	Linearity (R^2)	LOD ¹⁾ (µg/mL)	LOQ ²⁾ (µg/mL)
Myricitrin	$y = 19,720x + 13,003$	99.33	0.9999	2.51	7.62
Myricetin	$y = 30,752x - 80,460$	101.24	0.9999	3.04	9.22

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.

Fig. 1. HPLC chromatogram for myricitrin conversion in *Diospyros lotus* leaf powder under citric acid treatment condition. A, standard materials (myricitrin and myricetin) mixtures; B, *Diospyros lotus* leaf ethanol extract; C, citric acid-treated *Diospyros lotus* leaf ethanol extract for control condition (100 mM citric acid, 25°C, and 0 h); D, citric acid-treated *Diospyros lotus* leaf ethanol extract for reaction condition (100 mM citric acid, 90°C, and 5 h).

Table 3. Comparison of contents of myricitrin and myricetin according to the types of organic acid before and after reaction in *Diospyros lotus* leaf powder

Organic acid (0.1 M)	pH	Contents (mg/100 g DLP ¹⁾)			
		Before		After	
		Myricitrin	Myricetin	Myricitrin	Myricetin
Control ²⁾	7.00	2,032.02±11.18 ^{a3)4)}	trace	1,816.73±0.84 ^f	45.98±0.01 ^a
Acetic acid	2.88	2,038.79±8.13 ^a	trace	1,612.30±1.88 ^e	212.87±0.60 ^b
Succinic acid	2.61	2,024.70±7.09 ^a	trace	1,486.91±7.10 ^d	314.95±6.84 ^c
Lactic acid	2.44	2,038.56±9.53 ^a	trace	1,315.28±9.53 ^c	426.85±4.28 ^d
Malic acid	2.21	2,031.27±9.05 ^a	trace	816.13±4.93 ^b	518.88±3.39 ^e
Citric acid	2.08	2,020.15±9.72 ^a	trace	620.91±5.70 ^a	642.36±6.04 ^f

¹⁾DLP is the dry weight of *Diospyros lotus* leaf powder.

²⁾Control is *Diospyros lotus* leaf extract with water added instead of organic acid solution.

³⁾Values are mean±SD (n=3).

⁴⁾Different lower-case letters (a-f) in the same column indicate a significant difference according to Duncan's multiple test ($P<0.05$).

약 200 mg/100 g DLP 감소하였다. 반면에 myricetin은 45.98 mg/100 g DLP로 증가하는 경향을 보였다. 즉, 60% 에탄올의 직접적인 첨가반응보다 증류수로 반응(90°C, 2 h) 시켰을 때, myricetin 함량이 소량 증가하는 것으로 확인되었다. 한편 개별적인 유기산 첨가 직후에 에탄올을 추출한 경우에는 myricitrin 함량이 2,020.15~2,038.79 mg/100 g DLP로 control의 2,032.02 mg/100 g DLP와 유의적인 차이가 없었다. 그러나 유기산 반응(0.1 M, 90°C, 2시간) 후 에탄올 추출물의 myricitrin 함량은 620.91~1,612.30 mg/100 g DLP였고, myricetin 함량은 212.87~642.36 mg/100 g DLP였다. 유기산 중 myricetin 증가에 가장 효과

적인 것은 구연산으로 myricitrin과 myricetin 함량은 각각 620.91 mg/100 g DLP와 642.36 mg/100 g DLP였다. Tolosa 등(2018)에 의하면 myricitrin의 가수분해 최적조건은 2.5 M HCl, 75°C, 60분이었고 온도나 시간이 증가함에 따라 myricetin 함량은 감소하였다. 즉, 산에 노출되는 시간과 반응온도가 증가하면 비배당체 형태의 구조적 안정성에 영향을 미쳐 분해되는 것으로 판단된다. Jang 등(2018)은 ginsenoside Rg1의 당을 가수분해하기 위해 유기산 종류별 가수분해 영향을 보고하였는데 pKa 값이 상대적으로 작은 구연산이 가장 효과적이었으며, 생성되는 저분자 ginsenoside 함량이 감소하지 않아 HCl보다 유기산의 가수분

해 효과가 더 높을 것으로 예상된다. 본 연구에 사용된 유기산의 농도는 0.1 M 수준으로 고욤나무 잎에 직접적인 가수분해 효과를 기대하고자 하였고, myricetin의 열 안정성을 고려하여 90°C에서 2시간 반응시킴으로써 myricetin 함량이 가장 많이 증가한 유기산을 선정하고자 하였다. 본 연구 결과 pH가 낮아짐에 따라 가수분해 효과는 증가하여 구연산 처리구에서 myricetin 함량이 642.36 mg/100 g DCP로 가장 높았으며, myricitrin 잔량을 고려하였을 때 반응조건 설정에 대한 필요성이 요구되었다.

구연산 처리조건이 myricetin 전환에 미치는 영향

구연산 용액의 농도를 100 mM로 하여 반응온도(30, 60, 90°C) 및 시간(0~6 h)에 따른 myricitrin 및 myricetin의 함량 변화를 확인하였다(Table 4). 그 결과, myricitrin 함량은 30°C, 60°C, 90°C 모두 반응시간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었고 반응온도가 높을수록 myricitrin 함량이 더 많이 감소하는 경향을 보였다. 이는 반응온도가 myricitrin의 가수분해 속도로 작용하기 때문에 온도가 높을수록 반응시간에 따라 myricitrin 감소가 증가한 것으로 판단된다. 반면 myricetin 함량은 myricitrin과 반대로 반응시간에 따라 증가하는 경향을 나타내었고 반응온도가 높을수록 myricetin 함량이 증가하는 경향을 보였다. 90°C에서는 반응시간에 따라 5시간까지 myricetin 함량이 증가하였으나 6시간에서는 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). Han 등(2006)은 가수분해 시간이 길어질수록 이소플라본 함량이 증가하다가 일정시간 이상에서는 오히려 감소한다고 보고하였고, Wang 등(2011)은 rutin의 가수분해에서 인산 농도에 따라 2.5%까지 isoquercetin이 증가하는 경향을 보였으나 이상의 농도에서는 감소한다고 하였는데 본 연구에서도 비슷한 결과를 나타내었다. 이는 myricetin이 가수분해 반

응의 지속에 의해 파괴되어 감소한 것으로 판단된다. 또한 myricitrin에 대한 myricetin의 전환 백분율은 90°C, 5시간에서 86%로 가장 높았으며 이후 시간에서 감소하는 것으로 확인되어, 구연산 100 mM을 이용한 고욤나무 잎의 myricetin 전환은 90°C에서 5시간이 효과적인 것으로 평가되었다. 약산인 구연산의 경우 강산 또는 인산을 이용한 가수분해보다 반응온도를 증가시킴에 따라 반응속도를 증가시킬 수 있고, 산의 노출 시간에 대한 비배당체의 분해에 의한 손실을 감소시킬 수 있다고 판단된다(Tolosa 등, 2018; Wang 등, 2011).

구연산 처리 전후 고욤나무 잎 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램을 비교하였을 때, 구연산 비첨가구(Fig. 1B)와 구연산 첨가구(Fig. 1C)의 myricitrin 함량은 각각 2,019.15 mg/100 g DLP와 2,046.09 mg/100 g DLP로 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). 또한 구연산 최적 처리조건에 근접한 조건(Fig. 1D)에서 myricitrin의 잔량은 53.97 mg/100 g DLP였고, myricetin 함량은 1,208.35 mg/100 g DLP으로 myricetin으로 대부분 전환되었다. Myricitrin의 식이에 의한 생체 이용은 소장에서 가수분해되거나 대장 내 미생물에 의해 전환되어 myricetin의 형태로 장관에 흡수되는 것으로 보고되었다(Bravo, 1998; Griffiths와 Smith, 1972). 그러나 myricetin으로 전환되지 않은 myricitrin은 흡수되지 못하고 체외로 배출되어 이용률이 현저히 감소하기 때문에 myricitrin을 myricetin으로 전환하는 기술이 필요하다. 본 연구에서는 구연산을 이용한 myricitrin의 가수분해 조건으로부터 90°C에서 5시간 이상 반응시켰을 때 myricetin 함량의 감소가 확인되었기 때문에 구연산 처리농도뿐만 아니라 온도와 시간이 가수분해 최적화에 영향을 미치는 요인이 될 것이라 판단된다.

Table 4. Effects of reaction time and temperature on conversion of myricitrin to myricetin under citric acid treatment condition with *Diospyros lotus* leaf powder (DLP)

Time (h)	Myricitrin (mg/100 g DLP)			Myricetin (mg/100 g DLP)			[Myricetin]/[Myricitrin] (%)		
	30°C	60°C	90°C	30°C	60°C	90°C	30°C	60°C	90°C
0	2,046.09 ±4.28 ^{e1)2)}	2,046.09 ±4.28 ^g	2,046.09 ±4.28 ^g	20.21 ±0.52 ^a	20.85 ±0.29 ^a	21.85 ±0.89 ^a	1.44 ±0.04 ^a	1.49 ±0.02 ^a	1.56 ±0.06 ^a
1	2,044.24 ±3.89 ^{de}	1,934.28 ±2.38 ^f	1,404.04 ±7.56 ^f	30.85 ±0.37 ^b	63.88 ±0.81 ^b	383.52 ±1.91 ^b	2.20 ±0.03 ^b	4.56 ±0.06 ^b	27.35 ±0.14 ^b
2	2,041.71 ±5.93 ^{de}	1,846.80 ±4.93 ^e	873.56 ±4.36 ^c	44.32 ±0.62 ^c	120.38 ±1.23 ^c	669.41 ±3.11 ^c	3.16 ±0.04 ^c	8.59 ±0.09 ^c	47.74 ±0.23 ^c
3	2,033.24 ±2.58 ^{cd}	1,686.40 ±1.06 ^d	536.24 ±2.94 ^d	52.07 ±0.54 ^d	215.41 ±0.14 ^d	867.97 ±0.76 ^d	3.44 ±0.04 ^d	11.94 ±0.01 ^d	54.92 ±0.06 ^d
4	2,027.79 ±5.61 ^c	1,517.12 ±6.51 ^c	256.46 ±7.81 ^c	67.6 ±4.46 ^e	377.12 ±1.61 ^e	1,055.2 ±6.58 ^e	4.83 ±0.32 ^e	26.90 ±0.12 ^e	75.25 ±0.47 ^e
5	2,007.91 ±8.71 ^b	1,315.68 ±2.91 ^b	54.22 ±0.90 ^b	70.75 ±0.05 ^e	515.05 ±1.13 ^f	1,205.85 ±1.62 ^g	5.05 ±0.01 ^e	36.73 ±0.08 ^f	86.00 ±0.11 ^g
6	1,989.41 ±1.01 ^a	1,132.14 ±1.74 ^a	0.00 ±0.00 ^a	83.04 ±0.65 ^f	612.9 ±1.62 ^g	1,096.1 ±7.37 ^f	5.92 ±0.04 ^f	43.71 ±0.11 ^g	78.17 ±0.52 ^f

¹⁾Values are mean±SD (n=2).

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

반응표면모델의 적합성 및 영향

BBD에 따라 설계된 15구간의 구연산 처리조건과 그에 따른 반응변수 myricetin 함량의 결과는 Table 5와 같다. 분산분석 및 회귀분석을 통해 도출된 반응변수(Y)의 회귀식 (2)은 다음과 같으며 이를 바탕으로 myricetin 함량에 대한 모델 적합성을 평가하였다(Table 6).

$$Y = 1,208.35 + 56.56X_1 + 28.38X_2 + 33.14X_3 - 104.18X_1X_2 - 212.01X_1X_3 - 173.12X_2X_3 - 250.66X_1^2 - 166.27X_2^2 - 147.26X_3^2 \quad (2)$$

분산분석 결과 myricetin 함량에 대한 모델의 P -value 값은 0.0001 이하로 높은 유의수준을 보였으며, 회귀식의 R^2 , $\text{Adj-}R^2$ 및 $\text{Pred-}R^2$ 값은 각각 0.9988, 0.9966 및 0.9823으로 모두 0.95 이상의 높은 신뢰도를 보였다. 한편 적합성 검정(lack of fit)의 P -value 값은 0.05보다 큰 0.1383으로 유의차가 없어 반응표면모델이 myricetin의 함량 변화를 설명하는 데 적합한 것으로 확인되었다. 또한 myricetin 함량에 대한 구연산 농도(X_1), 반응온도(X_2) 및 반응시간(X_3)의 P -value 값은 각각 0.0001, 0.0019 및 0.0009로 나타나 주효과도와 교호효과도를 모두 고려하였을 때, 가장 큰 영향

Table 5. Experimental data obtained during the study on the citric acid hydrolysis with *Diospyros lotus* leaf powder

Run	Experimental condition			Myricetin (mg/100 g DLP ¹⁾)
	Citric acid conc. (mM), X_1	Reaction temp. (°C), X_2	Reaction time (h), X_3	
1	50	85	5	590.50±8.13 ^{b2)3)}
2	150	85	5	915.80±4.85 ^g
3	50	95	5	875.39±11.25 ^f
4	150	95	5	783.97±2.40 ^e
5	50	90	3	511.23±3.48 ^a
6	150	90	3	1,044.54±8.07 ⁱ
7	50	90	7	1,000.32±6.62 ^h
8	150	90	7	685.60±4.04 ^d
9	100	85	3	669.46±1.40 ^c
10	100	95	3	1,052.68±5.05 ⁱ
11	100	85	7	1,083.19±9.04 ^j
12	100	95	7	773.94±2.64 ^e
13	100	90	5	1,202.71±7.21 ^k
14	100	90	5	1,206.85±5.75 ^k
15	100	90	5	1,215.48±4.82 ^k

¹⁾DLP is *Diospyros lotus* leaf powder.

²⁾Values are mean±SD (n=3).

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

Table 6. Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model of apparent myricetin released after the citric acid hydrolysis with *Diospyros lotus* leaf powder

Variables	Sum of square	DF ¹⁾	Mean square	F-value ²⁾	P-value ³⁾
Model	747,671.21	9	83,074.58	462.06	<0.0001
X_1	25,591.14	1	25,591.14	142.34	0.0001
X_2	6,442.83	1	6,442.83	35.84	0.0019
X_3	8,787.40	1	8,787.40	48.88	0.0009
$X_1 \times X_2$	43,413.89	1	43,413.89	241.47	<0.0001
$X_1 \times X_3$	179,788.72	1	179,788.72	999.99	<0.0001
$X_2 \times X_3$	119,878.68	1	119,878.68	666.77	<0.0001
X_1^2	231,995.47	1	231,995.47	1,290.37	<0.0001
X_2^2	102,074.43	1	102,074.43	567.74	<0.0001
X_3^2	80,070.47	1	80,070.47	445.35	<0.0001
Residual	898.95	5	179.79		
Lack of fit	814.05	3	271.35	6.39	0.1383
Pure error	84.90	2	42.45		
Cor total	748,570.16	14			
Std. dev.	13.41		R^2 ⁴⁾	0.9988	
Mean	907.44		Adj- R^2	0.9966	
CV %	1.48		Pred- R^2	0.9823	

¹⁾Degrees of freedom.

²⁾Fisher test.

³⁾Significant at $P<0.05$ and not significant $P>0.05$.

⁴⁾ R^2 is coefficient of determination.

Fig. 2. Response surface and contour plot of myricetin contents formed by hydrolysis with 100 mM citric acid concentration as a function of the interaction between the time (X_3) and temperature (X_2) of the reaction medium.

을 미치는 요인은 구연산 농도로 확인되었고 가장 낮은 영향을 미치는 요인은 반응온도로 확인되었다(Table 6).

회귀방정식(2)를 활용하여 구연산 농도를 100 mM로 고정하고 다음 myricetin 함량에 따른 반응온도(X_2)와 반응시간(X_3)의 효과를 반응표면과 등고선으로 Fig. 2에 나타내었다. 구연산의 농도를 100 mM로 고정하고 반응시간(X_3)과 반응온도(X_2)의 2차 회귀식의 계수를 이용하여 작성된 반응표면도는 등고선 상의 정상점인 최대점이 정상능선을 이루어 실험범위 안에 존재하였고, 붉게 표시된 영역 내에서 최적조건을 추정할 수 있었다. 반응표면도의 정상점과 Table 5의 실험값에서 구연산 농도가 150 mM이었을 때 90°C에서 3시간 반응으로 얻어진 myricetin 함량이 구연산 50 mM 및 90°C에서 7시간 반응시켰을 때보다 증가하였으나 구연산 농도 100 mM 및 90°C에서 5시간 반응시켰을 때보다 감소하였다. 이와 같은 결과는 산의 농도가 증가하였을 때 고온 처리하면 비배당체 형태인 myricetin의 안정성이 감소한다는 보고와 일치한다고 판단된다(Tolosa 등, 2018).

최적 구연산 처리조건의 예측 및 검증

고욤나무 잎 myricitrin의 myricetin으로 전환을 위해 예측된 회귀식을 이용하여 최대 myricetin 함량을 나타내는 구연산 처리조건을 분석하였다. 그 결과 최적의 구연산 처리조건은 구연산 농도, 반응온도 및 반응시간이 각각 104.83 mM, 90.24°C와 5.03시간으로 나타났고, 이때 myricetin 함량은 1,212.00 mg/100 g DLP로 예측되었다. 예측된 최적의 구연산 처리조건으로 실험을 반복 수행하여 반응표면모델의 예측 정확성을 검증하였다. 그 결과 최적 구연산 처

리조건에서 myricetin 함량 및 전환율은 각각 1,224.99 mg/100 g DLP와 87%로 예측값과 비교하였을 때 유의적인 차이가 없는($P>0.05$) 것으로 나타나 본 실험의 반응표면모델이 적절한 것으로 판단된다. Myricitrin의 가수분해 최적화 연구 중 반응표면모델을 사용한 Tolosa 등(2018)은 최적조건(2.4 M HCl, 75°C, 1 h)에서 81.15%의 myricetin 회수율을 보고하였는데, 본 연구에서는 최적조건(0.1 M citric acid, 90°C, 5 h)으로 처리하였을 때 myricetin 회수율이 87%로 나타나 더 우수한 방법으로 판단된다. 결과적으로 이와 같은 방법을 사용하면 강산 및 열처리 온도에 민감한 플라보노이드 물질들의 전환 연구에 유용할 것으로 기대된다.

요 약

구연산 처리를 통하여 고욤나무 잎의 주요 생리활성 성분인 myricitrin을 myricetin으로 전환하기 위해 반응표면분석법을 이용하여 최적의 전환조건을 설정하였다. 고욤나무 잎의 60% 에탄올 추출물에 함유된 myricitrin 함량은 2,032.02 mg/100 g DLP였으며, 유기산 반응(0.1 M, 90°C, 2시간) 후 에탄올 추출물의 myricitrin 함량은 620.91~1,612.30 mg/100 g DLP였고 myricetin 함량은 212.87~642.36 mg/100 g DLP였다. 구연산 농도를 0.1 M 수준으로 처리하였을 때 myricitrin 함량은 30°C, 60°C, 90°C 모두 반응시간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었고, 반응온도가 높을수록 myricitrin 함량이 많이 감소하는 경향을 보였다. 실험 계획법인 Box-Behnken design에 따라 구연산 농도(X_1), 반응온도(X_2) 및 반응시간(X_3)을 독립변수로 설정하였고, myricetin 함량을 측정하여 구연산 처리조건을 최적화하였다. 그 결과 myricetin 함량에 대한 모델의 P -value 값은 0.0001 이하로 높은 유의수준을 보였으며, 회귀식의 R^2 은 0.95 이상의 높은 신뢰도를 보여 반응표면모델이 myricitrin의 함량 변화를 설명하는 데 적합하였다. 구연산 처리조건에서 가장 큰 영향을 미치는 요인은 구연산 농도로 확인되었고 가장 낮은 영향을 미치는 요인은 반응온도로 확인되었다. 최적의 구연산 처리조건은 구연산 농도, 반응온도 및 반응시간이 각각 104.83 mM, 90.24°C 및 5.03시간으로 나타났고, 최적 구연산 처리조건에서 실제 myricetin 함량과 예측값을 비교하였을 때 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

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

- Araújo MCPM, Ferraz-Filha ZS, Ferrari FC, Saúde-Guimarães DA. *Campomanesia velutina* leaves extracts exert hypouricemic effects through inhibition of xanthine oxidase and ameliorate inflammatory response triggered by MSU crystals. *Rev Bras Farmacogn*. 2016. 26:720-727.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998. 56:317-333.
- Cho BO, Che DN, Shin JY, Kang HJ, Kim JH, Kim HY, et al. Ameliorative effects of *Diospyros lotus* leaf extract against UVB-induced skin damage in BALB/c mice. *Biomed Pharmacother*. 2017. 95:264-274.
- Faaij APC. Bio-energy in Europe: changing technology choices. *Energy Policy*. 2006. 34:322-342.
- Ferreira LC, Grabe-Guimarães A, de Paula CA, Michel MCP, Guimarães RG, Rezende SA, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J Ethnopharmacol*. 2013. 145:100-108.
- Ganapaty S, Thomas PS, Karagianis G, Waterman PG, Brun R. Antiprotozoal and cytotoxic naphthalene derivatives from *Diospyros assimilis*. *Phytochemistry*. 2006. 67:1950-1956.
- Griffiths LA, Smith GE. Metabolism of myricetin and related compounds in the rat metabolite formation *in vivo* and by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem J*. 1972. 130:141-151.
- Han JS, Hong HD, Kim SR. Analysis of isoflavone contents of soybean by-products with acid hydrolysis method. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2006. 35:1420-1426.
- Jang GY, Kim MY, Lee YJ, Lee SH, Hwang IG, Choi J, et al. Influence of ethanol concentration and organic acids on conversion of ginsenoside Rg1. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2018. 47:813-819.
- Kang HJ. Conversion of *Diospyros lotus* L. myricitrin to myricetin by citric acid treatment. Master's thesis. Jeonbuk National University, Jeonbuk, Korea. 2020.
- Kim HS, Jeon IH, Mok JY, Kang HJ, Shin JH, Park YK, et al. Anti-allergy and anti-pruritic effects of *Diospyros lotus* L. leaf extract. *Kor J Pharmacogn*. 2013. 44:60-69.
- Kim SJ, Kim JA, Kim DH, Kwak SH, Yu KY, Jang SI, et al. Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Diospyros lotus*. *Kor J Pharmacogn*. 2015. 46:105-108.
- Kim SY, Kim SJ, Kim JA, Kim DH, Kwak SH, Chung CH, et al. Anti-oxidant and α -glucosidase inhibition activity of extracts or fractions from *Diospyros lotus* L. leaves and quantitative analysis of their flavonoid compounds. *J Life Sci*. 2014. 24:935-945.
- Kim YJ, Lim HS, Kim JH, Na M, Jeong SJ. Quantitative analysis of 7 compounds in *Diospyros lotus* leaf extract and its biological effects on neuroprotection and antineuroinflammation. *Nat Prod Commun*. 2020. 15:1-12. <https://doi.org/10.1177/1934578X20924859>
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci World J*. 2013. Article ID 162750. <https://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>
- Lee JW, Jeffries TW. Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. *Bioresour Technol*. 2011. 102:5884-5890.
- Rauf A, Uddin G, Siddiqui BS, Khan H. *In vivo* sedative and muscle relaxants activity of *Diospyros lotus* L.. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015. 5:277-280.
- Rauf A, Uddin G, Siddiqui BS, Muhammad N, Khan H. Antipyretic and antinociceptive activity of *Diospyros lotus* L. in animals. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014. 4:382-386.
- Tolosa TC, Rogez H, Silvab EM, Souza JNS. Optimization of acid hydrolysis of myricetin-3-O-rhamnoside using response surface methodology. *J Braz Chem Soc*. 2018. 29:2475-2481.
- Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem*. 2003. 51:6347-6353.
- Uddin G, Rauf A, Siddiqui BS, Muhammad N, Khan A, Shah SUA. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and sedative activities of the extracts and chemical constituents of *Diospyros lotus* L.. *Phytomedicine*. 2014. 21:954-959.
- Uddin G, Rauf A, Siddiqui BS, Shah SQ. Preliminary comparative phytochemical screening of *Diospyros lotus* stewart. *Middle East J Sci Res*. 2011. 10:78-81.
- Wang J, Zhao L, Sun GX, Liang Y, Wu FA, Chen ZL, et al. A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. *Afr J Biotechnol*. 2011. 10:1460-1466.
- Xu R, Zhang Y, Ye X, Xue S, Shi J, Pan J, et al. Inhibition effects and induction of apoptosis of flavonoids on the prostate cancer cell line PC-3 *in vitro*. *Food Chem*. 2013. 138:48-53.
- Yang DC, Le QC. Bio-conversion technology of ginseng saponin for production of functional foods. *J Ginseng Res*. 2008. 2:13-21.