

효소를 이용한 부분 가수분해에 의한 isoquercitrin의 합성에 관한 연구

이슬비 · 정대원[†]

수원대학교 공과대학 신소재공학과
(2013년 11월 29일 접수, 2014년 1월 14일 심사, 2014년 2월 6일 채택)

Study on the Synthesis of Isoquercitrin by Enzymatic Partial Hydrolysis

Seul Bi Lee and Dae-Won Chung[†]

Department of Polymer Engineering, College of Engineering, Suwon University, Suwon 400-600, Korea
(Received November 29, 2013; Revised January 14, 2014; Accepted February 6, 2014)

Isoquercitrin (IQ)은 폴리페놀의 일종인 quercetin (QU)의 3번 위치에 glucose가 하나 결합해 있는 배당체로서, 천연에는 미량만이 존재하고 있다. 최근 QU의 2배당체인 rutin (RU)을 기질로 사용하여 효소에 의한 부분 가수분해에 의해 IQ를 합성할 수 있다는 것이 알려졌다. 본 논문에서는, PecinexTM 계열의 복합 효소를 사용하여 RU의 선택적 가수분해에 의해 IQ를 합성하는 반응에서 최적 효소를 선정하고, 효소량 및 반응물의 농도 등의 변수에 따른 반응성을 검토하였다. 그 결과, 50 °C에서 1%의 반응물 농도로 RU 1 g 대비 8 mL의 Ultra Clear를 사용하는 것이 반응 속도 및 IQ의 선택성 측면에서 최적인 것으로 나타났다.

Isoquercitrin (IQ), quercetin monoglycoside, is classified as a polyphenol, and a minute quantity of IQ is known to be present in several plants. Recently, it was reported that IQ can be prepared by the partial enzymatic hydrolysis of quercetin diglycoside (rutin, RU). In this paper, the effects of enzyme types, enzyme amounts, and substrate concentrations on the reactivity were investigated using a series of PecinexTM multi-enzymes. The reaction, when a 8 ml of Ultra Clear to 1 g of RU was applied with the substrate concentration of 1% at 50 °C, was found to be optimum, based on the reaction rate and the selectivity to IQ.

Keywords: isoquercitrin, quercetin, rutin, enzymatic hydrolysis

1. 서 론

폴리페놀은 항산화, 항균, 항바이러스, 항염증, 에스트로젠 유사작용, 항암작용 등의 효과가 있어서 주목을 받고 있다[1]. 폴리페놀의 일종인 quercetin (QU)은 양파의 껍질[2], 구절초[3], 사과 껍질[4], 참가시나무[5] 등에 존재하는 것으로 알려져 있다. QU의 배당체인 isoquercitrin (IQ)은 항산화[6], 항염증[7], 항고혈압성[8] 작용과 항알러지[9], 항암작용[10] 등 다양한 약리효과가 있으나, 그의 연구가 제한적이었다. 그 이유는 천연에서의 IQ의 존재량이 매우 적을 뿐만 아니라 다양한 불순물의 존재 때문에 추출하는 것이 매우 어렵기 때문이다[11]. 반면에 QU의 2배당체인 rutin (RU)은 다양한 식물군에 널리 분포하고 있고[12], 예를 들면 *Alabastrasophora japonica*에는 10-28% 정도 포함되어 있으므로[13], RU로부터 선택적 가수분해에 의해 IQ를 제조하는 것이 공업적으로 접근할 수 있는 타당한 방법으로 인식되고 있다.

그러나 RU로부터 효소에 의한 선택적 가수분해에 의하여 IQ를 합성하는 연구에서는 매우 낮은 반응 전환율을 나타내는 문제점이 있다. 예를 들면, 다양한 효소들을 검토한 결과 hesperidinase이 가장 높은 반응 전환율을 나타냈으나, 최적 반응 조건에서도 IQ로의 전환율은 43% 정도에 지나지 않았다[14]. 이와 같이 낮은 반응성은 RU의 물에 대한 용해도가 20 °C에서 0.12 g/L 정도[15]로 매우 낮기 때문으로 이해되고 있다. 따라서 RU에 대한 용해도가 상대적으로 높은 메탄올[16] 또는 아세톤[15] 등과 같은 유기 용매를 첨가한 상태에서 효소 반응을 검토하는 연구가 있었으나, 이와 같은 경우에는 효소의 활성이 저하될 뿐만 아니라 유기 용매의 사용 그 자체가 상업적인 측면에서 바람직하지 않은 것은 명확하다. 그러나 최근 *Aspergillus terreus*로부터 발효하여 얻어진 α -L-rhamnosidase를 이용한 연구에서는 RU로부터 IQ를 92%라는 매우 높은 전환율로 얻을 수 있었다는 보고가 있었다[17]. 따라서 향후에는 공업적으로 저렴하게 얻을 수 있는 복합 효소를 사용한 연구를 통하여 상업적인 생산을 위한 기초 연구들의 필요성이 대두되고 있다.

저자들은, Figure 1에 나타난 바와 같이 QU의 3' 위치에 -OH기가 없는 것을 제외하고는 동일한 구조의 폴리페놀인 kaempferol (KR)의 배당체의 합성에 관하여 연구하여 왔다. 녹차의 제조 공정에서 부산물로 발생하는 tea seed extract에 KR의 3배당체에 해당하는 CamA 및 CamB가 약 20% 정도 함유되어 있다는 점에 착안하여 효소를 사용한

[†] Corresponding Author: Suwon University, Department of Polymer Engineering, College of Engineering, Wauan-gil 17, Bongdam-eup, Hwaseong-si, yeonggi-do 400-600, Korea
Tel: +82-31-220-2156 e-mail: dwchung@suwon.ac.kr

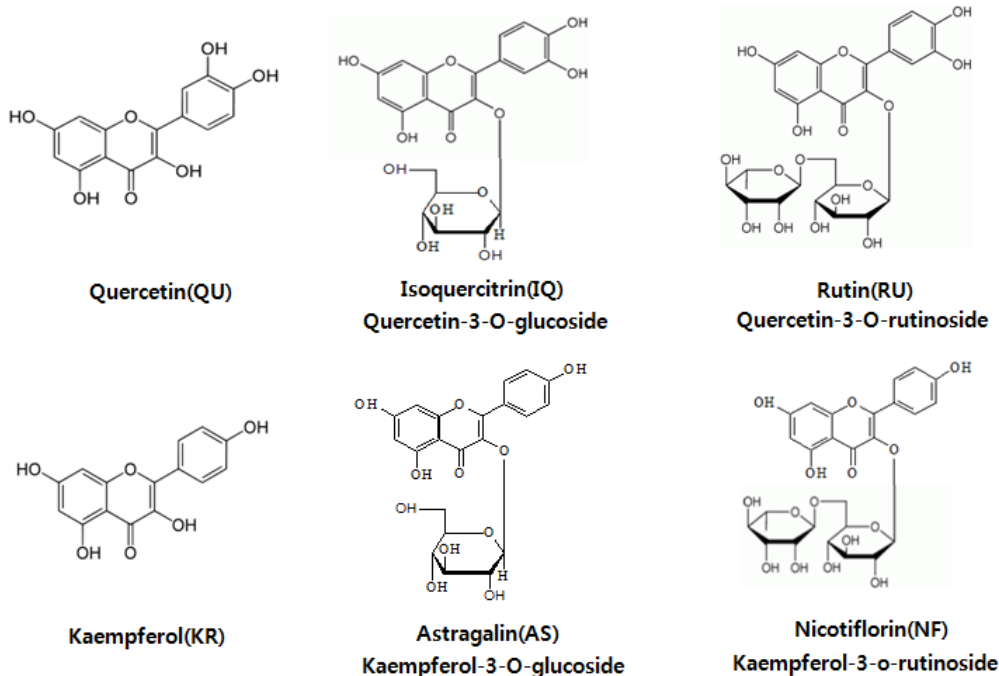


Figure 1. The chemical names and structures of QU, KR and their glycosides.

선택적 가수분해에 의해 2배당체에 해당하는 nicotiflorin (NF)[18] 및 leucoside (LE)[19], 그리고 KR의 3 위치에 glucose가 붙어있는 astragalin (AS)[20,21]을 성공적으로 합성하였다.

본 논문에서는, 비교적 저렴하게 얻을 수 있는 RU을 기질로 사용하여 상업적으로 폭넓게 사용되는 복합효소에 의한 선택적 가수분해에 의해 IQ를 합성하는 기초연구를 수행하였다. 또한 IQ의 구조가 AS와 매우 유사하다는 점에 착안하여, 기존에 저자들의 연구에서 AS를 선택적으로 합성하는 특성을 나타낸 Pectinex 계열의 복합효소들을 검토하였으며, 폴리페놀 계열 물질의 배당체에서 당을 폭넓게 분해하는 것으로 알려진[22] 복합효소인 Viscozyme도 함께 검토하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

희화나무(*sophora japonica*)로부터 추출한 순도 98%의 RU을 Zhengzhou Sigma Chemical Co., LTD. (Zhengzhou City, China)로부터 구입하여 추가 정제없이 사용하였다. Viscozyme 및 Pectinex[®] 계열인 BE 3-L, Ultra AFP, Ultra SP-L, Ultra Mash, Ultra Clear, Mash 등은 Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark)사의 제품으로, 구입 후 4 °C에서 보관하였다.

2.2. 효소 반응의 분석

효소 반응물은 HPLC와 TLC를 사용하여 다음과 같은 방법으로 분석하였다. HPLC 분석은 UV 검출기를 사용하였으며, Monitor[®] C18 역상 칼럼(5 μm, 250×4.6 mm)을 사용하였다. 검출기 파장은 254 nm로 설정하였고, 20 μL를 주입하였다. 이동상은 증류수(A)와 acetonitrile (B)을 혼합하여 사용하였다. 이동상은 등용매 용리(B의 18%)로 14 min 동안 1 mL/min의 조건으로 용출하였고 다음 16 min 동안은 기울기 용리로 B의 함량이 18%에서 32%로 바뀌어 1 mL/min의 조건

으로 용출하였다. 각 피크는 표준 시료에서 얻어진 피크와 비교하여 식별하였다.

TLC 분석은 실리카 겔 판(Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄)을, 전개 용매로는 ethyl acetate : methanol : water (부피비로 16 : 2 : 1)을 사용하였다. TLC 판에서 분리된 spot은 UV lamp를 사용하여 관찰하였고, 다음으로 molybdo(VI)phosphoric acid hydrate을 20 g/L의 농도로 녹인 ethanol 용액에 담가서 착색시켜 관찰하였다.

2.3. Rutin의 효소 가수분해

50 mL 삼각플라스크에서 RU 0.2 g을 증류수 20 mL에 용해시킨 후 각각의 효소 2 mL를 첨가하고, 50 °C에서 교반하였다. 반응의 진행 상황을 확인하기 위하여 0.1 mL의 sample을 채취하여 0.5 mL의 methanol로 희석한 후, 10 min 동안 원심분리 후 TLC로는 정성적으로, HPLC에 의해서는 정량적으로 반응성을 확인하였다. 각각의 효소를 검토한 후 IQ를 합성하는 데 적합한 효소를 선택해 효소량, 반응물의 농도를 변화시켜가며 상기와 동일한 방법에 의해서 RU의 가수분해 반응을 검토하였다. 복합효소의 사용 가능한 최대 온도가 대부분 55 °C이고 이 이상의 온도에서는 효소 활성이 현저하게 떨어지게 된다. 실제적으로 60 °C에서 검토한 예비 실험에서는 어느 정도 반응이 진행되면 반응이 거의 진행되지 않는 것으로 나타났다. 또한 40 °C에서 검토한 예비 실험에서는 반응 속도가 극히 저하되는 현상이 나타났다. 따라서 본 연구에서는 반응 온도를 50 °C로 고정하고 효소 반응을 진행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Rutin 효소 반응의 분석

각각의 효소에 의한 RU의 가수분해 반응의 정도는 HPLC에 의해서 정량적으로 분석하였다. HPLC 상에서의 RU, IQ 및 QU 피크의 확

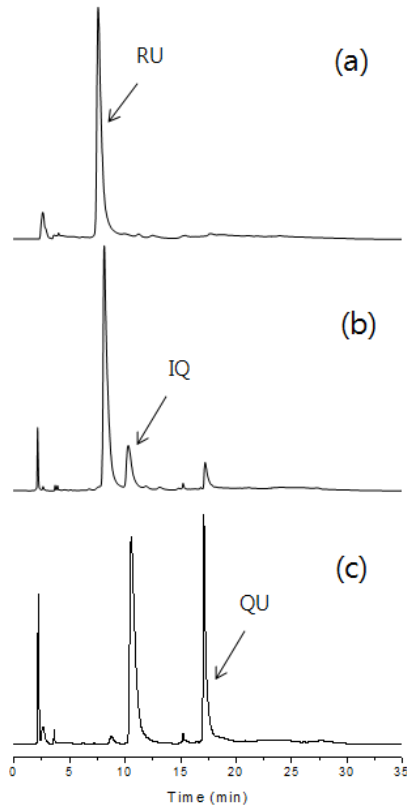


Figure 2. HPLC profiles of RU (a), samples at 50 hr (b) and 133 hr (c) in the enzymatic reactions of RU with Ultra Clear.

인은 표준 샘플을 동일한 조건에서 분석하여 확인하였다. 먼저 Figure 2의 (a)에 반응물인 RU의 HPLC를 나타낸 것과 같이 하나의 피크로 나오며 반응이 진행됨에 따라 RU의 피크는 소멸되며 가수분해 반응에 의해 생성되는 IQ, QU의 피크가 나타난다. 예를 들면, 효소로는 Ultra Clear를 RU 1 g 대비 10 mL 사용하고 반응물의 농도가 1% 인 반응에서 50 h 진행 후의 샘플에는 Figure 2의 (b)에 나타낸 것과 같이 RU이 가수분해 되어 생성된 IQ와 미량의 QU가 나타나고 반응 시간이 지남에 따라 (c)에 나타낸 것과 같이 RU의 피크는 거의 소멸되고 IQ와 QU의 피크만 현저하게 나타난다. 이와 같이 HPLC 상에서 나타나는 각각의 물질에 해당하는 피크의 면적비를 기준으로 반응의 진행 정도를 검토하였다.

3.2. 효소 Screening

반응 온도를 50 °C, 각 효소의 양은 RU 1 g 대비 10 mL, 반응물의 농도를 2%로 고정하여 7개의 복합효소의 반응성을 검토하였다. 이 중, Ultra AFP, Ultra Mash에서는 반응이 전혀 진행되지 않거나 반응이 진행된 경우에도 반응이 매우 느리고 IQ합성에 대한 선택성이 낮아 적합하지 않다고 판단하였다. 이 2개의 효소를 제외하고 IQ가 어느 정도 합성되는 5개의 효소에 대해서만 반응 시간에 따른 IQ의 함량을 Figure 3, QU의 함량을 Figure 4에 나타내었다. 각각의 반응에서 RU이 완전히 반응하여 HPLC 상에서 나타나지 않는 시점에서 반응을 종료하였다. 따라서 Figure 3 및 4에 각각의 효소에 대해서 표기된 마지막 부분에서는 RU이 전부 반응하고 그 후에는 생성된 IQ가 QU로 변환되는 반응만이 일어나는 것이며, 표기된 시간이 짧을수록 RU의

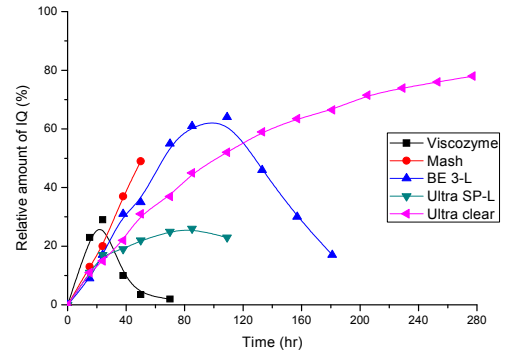


Figure 3. Relative amounts of IQ in each reaction with Viscozyme, Mash, BE 3-L, Ultra SP-L, and Ultra Clear.

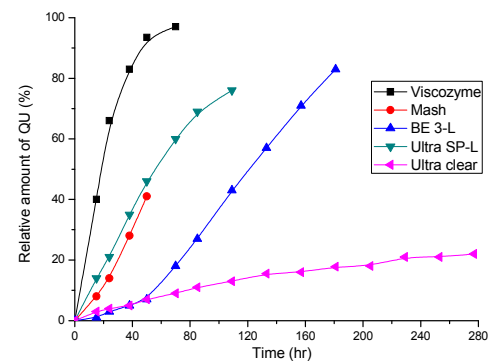


Figure 4. Relative amounts of QU in each reaction with Viscozyme, Mash, BE 3-L, Ultra SP-L, and Ultra Clear.

가수분해 반응이 빨리 진행된 것으로 이해할 수 있다.

전체적으로 반응 속도가 느리지만 Viscozyme의 경우에는 다른 효소에 비해 반응이 빠르게 진행되어 IQ가 합성되는 동시에 QU도 빠르게 합성되면서 IQ 함량이 급격하게 저하되는 것을 알 수 있다. Viscozyme은 cellulase, β-glucosidase, xylanase 등과 같이 당을 가수분해하는 다양한 효소들로 구성되어 있으며[22], 실제적으로 KR의 배당체들의 가수분해에서도 선택성 없이 가수분해가 일어나 최종적으로 KR이 주생성물이 되는 것으로 나타났대[20]. 따라서 본 반응에서도 Viscozyme은 당을 선택성 없이 가수분해하여 RU의 aglycone인 QU가 생성되는 것으로 판단된다. BE 3-L, Mash, Ultra SP-L의 경우에도 Viscozyme보다는 전체적으로 반응 속도가 느리기는 하지만, Viscozyme에서 나타난 현상과 유사하게 생성된 IQ가 빠르게 QU로 전환되어서 반응 전체적으로 IQ 함량이 60% 이상으로 높아지는 결과는 나타나지 않았으므로 IQ 함량을 최고로 하기 위한 반응에는 적합하지 않은 것으로 판단하였다. 특히, Mash는 TSE의 반응에서는 KR에 glucoside가 붙어있는 단당체인 AS를 선택적으로 합성하고 KR로 거의 변화되지 않았으나[20], 본 실험에서는 IQ에서 QU로 빠르게 변환되는 현상이 나타났다.

반면에, Ultra Clear는 나머지 효소에 비해 전체적인 반응속도는 약간 느리지만 반응이 더 진행되어도 QU의 함량이 크게 증가되지 않고 RU이 완전하게 반응되었을 때, IQ 함량이 78% 정도에 도달하므로 검토한 7개의 복합효소 중 IQ를 선택적으로 합성하는 반응에 있어서는 Ultra Clear가 적합하다고 판단되어서 반응의 최적화 연구를 진행하였

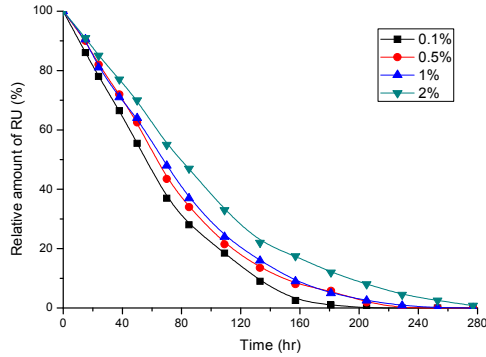


Figure 5. Effect of the substrate concentration on the conversion of RU.

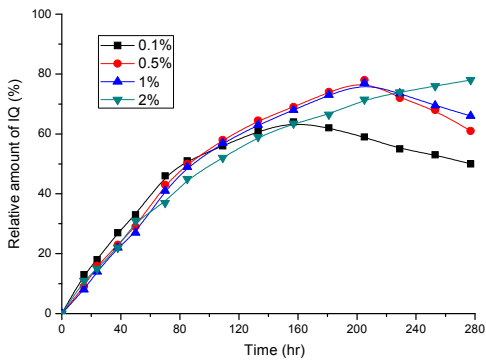


Figure 6. Effect of the substrate concentration on the conversion of IQ.

다.

3.3. 반응물의 농도에 따른 영향

반응 온도를 50 °C, Ultra Clear의 양은 RU 1 g 대비 10 mL로 고정하고 반응물의 농도를 변화시킨 반응에서 시간에 따른 RU의 함량을 Figure 5, IQ의 함량을 Figure 6에 나타내었다. Figure 5에서 반응물의 농도가 낮을수록 RU 함량의 감소가 빨라지는 현상으로 보아 반응물의 농도가 낮을수록 반응성이 좋은 것으로 판단되나, 0.1, 0.5, 1%에서의 차이는 미미해 보인다. 그러나 2%에서는 확실하게 RU 함량의 저하가 느리게 나타나 반응성이 떨어지는 것을 확인할 수 있다. 반면 IQ의 함량을 보면 반응 초기에는 반응물의 농도가 낮을수록 높으나 반응이 진행되면서 QU로 전환되어 IQ 함량이 감소되는 시점(즉, RU이 거의 소멸되는 시점)에서는 농도가 낮을수록 IQ 함량의 감소가 빠르게 나타났다. 이상의 결과를 정리하면, 2%에서는 다른 농도에 비해 확실히 반응성이 떨어지고(Figure 5), 0.1%에서는 최대 IQ 함량이 약 60% (Figure 6)로 다른 농도에 비해서 낮으므로, 0.5% 및 1%가 최적 농도로 판단된다. 이 2개의 농도에서는 반응성에 거의 차이가 없으나, 향후 상업적 제조를 고려한다면 1%가 최적인 것으로 판단되어, 기질 농도를 1%로 고정하고 최적 효소량을 선정하기 위한 연구를 진행하였다.

3.4. 효소량에 따른 영향

기질의 농도를 1%로 고정하고 Ultra Clear의 양을 기질인 RU 1 g 대비 4, 8, 10, 15 mL로 각각 사용하여 진행한 반응의 결과를 Figure 7에 나타내었다. 효소량이 상대적으로 적은 4 mL/g의 경우에는 반응성이 매우 낮았으며, 그림으로는 나타내지 않았지만 600 h이 지나도

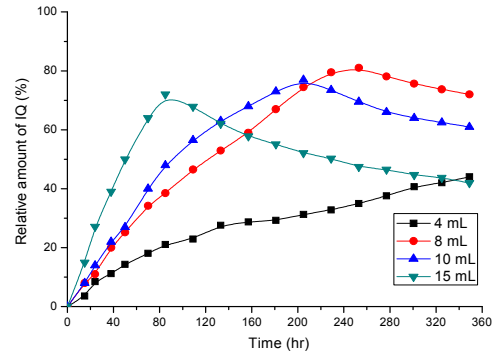


Figure 7. Effect of the amount of Ultra Clear per 1 g of RU on the conversion of IQ.

여전히 RU이 남아있었다. 또한 IQ의 최대 함량도 50% 정도에 지나지 않았다. 그러나 효소량이 늘어나면서 반응 속도도 빨라지고 따라서 최대 IQ 함량에 도달하는 시간도 빨라지는 것으로 나타났으나, 최대 IQ 함량에는 큰 차이가 나타나지 않았다. 그러나 효소량의 증가에 따라 IQ에서 QU로 변환되는 속도도 동시에 증가하여 IQ 함량의 감소도 동시에 현저하게 빨라지는 것으로 판명되었다. 즉, 최대 IQ 함량에 도달하는 시간이 조금 늦어지더라도 IQ 함량이 최대치에 도달한 이후에 그의 감소 현상이 현저하지 않으며, 또한 상대적으로 적은 양인 8 mL/g의 효소를 사용하는 것이 최적으로 판단된다.

4. 결 론

7개의 복합효소를 사용하여 RU의 선택적 가수분해에 의해 IQ를 제조하기에 적합하다고 판단되는 효소를 검토한 결과, Ultra Clear가 나머지 효소에 비해 반응은 약간 느리지만 반응 시간에 비해 QU의 함량이 크게 증가되지 않고 RU이 완전하게 반응되었을 때, IQ 함량이 약 80% 정도에 도달하므로 IQ를 합성하는 최적의 효소로 판단되었다. 따라서 효소를 Ultra Clear로 고정하고, 기질 농도의 변화에 따른 반응성의 차이를 검토한 결과, 2%에서는 다른 농도에 비하여 반응성이 매우 낮았으며, 0.1%에서는 IQ 함량이 최고치일 때의 수치가 다른 농도에 비해서 확실하게 낮았다. 반면에 0.5%와 1%에서는 매우 유사한 반응성 및 최대 IQ 함량(약 80%)을 나타냈으며, 상업적 제조를 고려한다면 1%가 최적인 것으로 판단되었다. 또한, 효소량의 변화에 따른 반응성을 비교한 결과, 최대 IQ 함량에 도달하는 시간이 조금 늦어지더라도 IQ 함량이 최대치에 도달한 이후에 그의 감소 현상이 현저하지 않은 결과를 나타낸 8 mL/g의 효소를 사용하는 것이 최적으로 판단되었다.

이상의 결과를 종합하면, RU의 효소가수분해에 의해 IQ를 제조하는 반응에서는 50 °C에서 1%의 반응물의 농도로 RU 1 g 대비 8 mL의 Ultra Clear를 사용하는 것이 최적으로 판단된다. 본 논문은, 다양한 생리활성 작용에 의하여 기능성 식품 및 화장품 용도로 최근 주목을 받고 있는 IQ의 상업적 제조 연구의 기반 기술로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. P. C. Hollman and M. B. Katan, Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man, *Biomed. Pharmacother.*, **51**,

- 305-310 (1997).
2. E. J. Jeong and Y. J. Cha, Reduction in Residual Pesticides and Quercetin Yields in Onion Peel Extracts by Washing, *J. Life Sci.*, **22**, 1665-1671 (2012).
 3. M. R. Hyun, Y. S. Lee, and Y. H. Park, Antioxidative Activity and Flavonoid Content of Chrysanthemum zawadskii Flowers, *Kor. J. Hort. Sci. Technol.*, **29**, 68-73 (2011).
 4. C. I. Cheigh, S. Y. Yoo, and M. S. Chung, Efficient flavonoid extraction from apple peel by subcritical water and estimation of antioxidant activity, *Kor. J. Food & Nutr.*, **24**, 458-463 (2011).
 5. H. J. Lee and S. N. Park, Antioxidative Effect and Active Component Analysis of Quercus alicina Blume Extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **37**, 143-152 (2011).
 6. R. Li, C. Yuan, C. Dong, S. Shuang, and M. M. F. Choi, In Vivo Antioxidative Effect of Isoquercitrin on Cadmium-induced Oxidative Damage to Mouse Liver and Kidney, *N. Schmied. Arch. Pharmacol.*, **383**, 437-445 (2011).
 7. A. P. Rogerio, A. Kanashiro, C. Fontanari, E. V. da Silva, Y. M. Lucisano-Valim, E. G. Soares, and L. H. Faccioli, Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma, *Inflamm. Res.*, **56**, 402-408 (2007).
 8. A. Gasparotto Junior, F. M. Gasparotto, E. L. B. Lourenco, S. Crestani, M. E. A. Stefanello, M. J. Salvador, J. E. da Silva-Santos, M. C. A. Marques, and C. A. L. Kassuya, Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from Tropaeolum majus L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme, *J. Ethnopharmacol.*, **134**, 363-372 (2011).
 9. H. Inaba, M. Tagashira, D. Honma, T. Kanda, Y. Kou, Y. Ohtake, and A. Amano, Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E2 production by gingival epithelial cells stimulated with periodontal pathogen, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 527-530 (2008).
 10. N. G. Amado, D. M. Cerqueira, F. S. Menezes, J. F. Mendes da Silva, M. Neto Vivaldo, and J. G. Abreu, Isoquercitrin isolated from Hyptis fasciculata reduces glioblastoma cell proliferation and changes β -catenin cellular localization, *Anti Canc. Drugs*, **20**, 543-552 (2009).
 11. B. L. Williams and S. H. Wender, Isolation and identification of quercetin and isoquercitrin from apricots, Prunus armeniaca, *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 319-323 (1953).
 12. J. Wang, D. Lu, H. Zhao, B. Jiang, J. Wang, X. Ling, H. Chai, and P. Ouyang, Discrimination and classification of tobacco wastes by identification and quantification of polyphenols with LC-MS/MS, *J. Serb. Chem. Soc.*, **75**, 875-892 (2010).
 13. R. Mauludin, R. H. Muller, and C. M. Keck, Development of an oral rutin nanocrystal formulation, *Int. J. Pharm.*, **370**, 202-209 (2009).
 14. J. Wang, L. L. Zhao, G. X. Sun, Y. Liang, F. A. Wu, Z. I. Chen, and S. M. Cui, A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin, *Afr. J. Biotechnol.*, **10**, 1460-1466 (2011).
 15. L. Chebil, C. Humeau, J. Anthoni, F. Dehez, J. M. Engasser, and M. Ghoul, Solubility of flavonoids in organic solvents, *J. Chem. Eng.*, **52**, 1552-1556 (2007).
 16. H. J. You, H. J. Ahn, and G. E. Ji, Transformation of rutin to Antiproliferative quercetin-3-glucoside by Aspergillus niger, *Agric. Food Chem.*, **58**, 10886-10892 (2010).
 17. L. Weignerova, P. Marhol, D. Gerstorferova, and V. Kren, Preparatory production of quercetin-3- β -d-glucopyranoside using alkali-tolerant thermostable α -l-rhamnosidase from Aspergillus terreus, *Bioresource Tech.*, **115**, 222-227 (2012).
 18. H. B. Lee, E. K. Kim, S. J. Park, S. G. Bang, T. G. Kim, and D. W. Chung, Isolation and characterization of nicotiflorin obtained by enzymatic hydrolysis of two precursors in tea seed extract, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4808-4813 (2010).
 19. D. W. Chung and S. B. Lee, Novel synthesis of leucoside by enzymatic hydrolysis of tea seed extract, *J. Sci. Food Agric.*, **93**, 362-367 (2013).
 20. H. B. Lee, E. K. Kim, S. J. Park, S. G. Bang, T. G. Kim, and D. W. Chung, Isolation and anti-inflammatory effect of astragalin synthesized by enzymatic hydrolysis of tea seed extract, *J. Sci. Food Agric.*, **91**, 2315-2321 (2011).
 21. S. B. Lee and D. W. Chung, Reaction Optimization for Enzymatic Synthesis of Astragalin, *Appl. Chem. Eng.*, **23**, 394-398 (2012).
 22. M. H. Lee, D. Huh, D. J. Jo, G. D. Lee, and S. R. Yoon, Flavonoids Components and Functional Properties of Citrus Peel Hydrolysate, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **36**, 1358-1364 (2007).