

통계학적 최적화를 이용한 아마란스 잎으로부터 폴리페놀 열수추출조건 최적화

조재민 · 최강훈 · 신슬기 · 이지현 · 김진우[†]

선문대학교 식품과학과
31460 충남 아산시 탕정면 선문로 221번길 70
(2016년 1월 23일 접수, 2016년 2월 5일 수정본 접수, 2016년 2월 6일 채택)

Optimization of Extraction Conditions of Polyphenolic Compounds from Amaranth Leaf using Statistically-based Optimization

Jo Jaemin, Choi Kanghoon, Shin Seulgi, Lee Jihyun and Kim JinWoo[†]

Department of Food Science, Sunmoon University, 70, Sunmoon-ro 221beon-gil, Tangjeong-myeon, Asan, Chungnam, 31460, Korea
(Received 23 January 2016; Received in revised form 5 February 2016; accepted 6 February 2016)

요 약

아마란스 종실 생산의 부산물인 아마란스 잎으로부터 폴리페놀 추출 증대를 위해 열수추출의 주요 공정조건인 추출 시간, 추출온도와 에탄올 농도 중심합성법을 이용해 최적화하였다. 폴리페놀의 추출은 추출온도와 시간이 증가함에 따라 증가하였으며 추출에 에탄올 농도와 추출시간이 유의한 효과를 보였다($p < 0.05$). 열수추출의 에탄올 농도는 61.6 (v/v%)에서 최대 폴리페놀 추출성능을 보이며 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다. 중심합성법에 의해 제시된 2차 회귀방정식의 예측값과 실험값을 비교했을 때 매우 높은 합치도($R^2=0.9566$)를 보였으며 추출온도 90.1 °C, 추출시간 50 min과 에탄올 61.6 (v/v%) 공정조건에서 최대 농도인 12.6 mg GAE/g DM 폴리페놀을 얻을 수 있었다.

Abstract – This study examined the optimization of hot-water extraction conditions for maximizing the total polyphenol compounds (TPC) extracted from amaranth leaf. The effects of three independent variables, including extraction temperature, extraction time and ethanol concentration on TPC were investigated using central composite design (CCD). The concentration of TPC increased with increased levels of extraction temperature and time. The extraction temperature and the ethanol concentration showed the significant effect on TPC production ($p < 0.05$). The predicted values at the optimized condition were acceptable when compared to the experimental values ($R^2=0.9566$). The optimum extraction conditions were as follows: temperature of 90.1 °C, time of 50 min and ethanol concentration of 61.6% (v/v) for the maximum TPC of 12.6 mg GAE/g DM.

Key words: Amaranth, byproduct, Polyphenol, Extraction, Optimization

1. 서 론

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포하는 화학물질로 분자에 페놀그룹이 한 개 이상 존재하여 다양한 구조와 분자량을 가지며 벤젠의 수소원자 하나 또는 이상이 히드록시기로 치환된 것을 페놀 또는 폴리페놀이 부르다[1]. 폴리페놀은 식물의 다양한 부위에 존재하는 2차 대사산물로 식물의 대사 조절, 세포 형태와 분화에 영향을 미치며 특히 항균과 항염증 작용을 통한 자기 방어 기작에 이용된다[2,3]. 생체 내에서 폴리페놀은 인체 내외부의 스트레스 인자인 자외선 및 활성산소 등의 전자수용체로 작용하여 지질막의 산화를 억제

하는 항산화제로 작용하여 암, 염증 및 노화 예방에 효능이 있다고 알려져 있다. 특히, 근래에 합성항산화제에 대한 인체사용 거부감이 확산되면서 식물유래 천연항산화제인 폴리페놀에 대한 관심과 연구가 진행되고 있다[4]. 식물체에 존재하는 많은 색소들은 폴리페놀화합물을 포함하고 있으며 대표적인 식물유래 폴리페놀화합물로 카테킨, 타닌, 이소플라본, 리그난, 레스베라트롤 등이 있다[5].

아마란스(*Amaranthus ssp* L.)는 비름과에 속하는 일년생 식물로 분류학상 옥수수, 귀리, 벼, 밀과 같은 단자엽 식물과 구별되는 쌍자엽 식물로 지구상에 대략 60여종 밝혀져 있으나 대부분이 야생종이며 종실 재배용으로 사용되는 것은 단 몇 종에 불과하다. 아마란스 종실은 다른 곡류에 비해 지방질의 함량이 높고 불포화도가 높은 양질의 지방산인 스쿠알렌을 함유하며, 라이신과 황 함유 아미노산이 풍부하고 아미노산 조성이 뛰어난 단백질질을 함유한 영양학적 가치가 우수한 작물로 알려져 있다[6,7]. 현재 국내에서는 아마란스 종실의 높은 영양가와 고수익성으로 재배가 빠르게 보급되고 있으며

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kimjw1028@sunmoon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

향후에도 스쿠알렌과 단백질의 충분한 영양성분과 기능성 홍보에 따라 그 재배가 더욱 확대되리라 예상하고 있다.

아마란스의 종실 수확 후, 식물성체의 대부분을 차지하는 대, 뿌리, 꽃, 잎은 활용도가 낮은 이유로 부산물로 취급되고 있는 현실이다. 이에 종실 수확 후 버려지는 아마란스 잎을 이용하여 생리활성 물질 생산을 통한 고부가가치 수요를 창출할 필요가 있다. 본 연구의 목적은 아마란스 종실 부산물인 잎으로부터 고부가가치 항산화 물질인 폴리페놀 생산을 위한 상업화에 적합한 추출공정을 제안함에 있다. 이를 위해 열수추출 공정에서 추출온도, 추출시간 및 알코올 농도를 통계학적 기법을 통해 최적화하여 아마란스 부산물로부터 생리활성을 가진 고부가가치 소재 생산을 하고자 한다.

2. 실험

2-1. 실험 재료

본 연구에 사용된 아마란스 잎은 충남 성거읍 성거산약초(주)에서 2015년 7월에 수확한 종실이 제거된 상태로 공급받아 60 °C 오븐(OF-22GW, Jeiotech, Daejeon, Korea)에서 12시간 건조 후 5 °C 냉동보관하여 사용하였다. 추출용매로 사용한 유기용매는 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, USA)와 Samchun Pure Chemical 사(Seoul, Korea)의 순도 95 (v/v%) 이상 시약을 사용하였으며 분석에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich사의 일급 이상 시약을 사용하였다.

2-2. 추출 조건

건조 아마란스 잎은 식품분쇄기(HMF-3000S, Hanil, Korea)를 사용하여 분쇄하여 0.05 mm 이상 입자와 이물질을 제거한 후 사용하였다. 시료 중의 유용성분 추출을 위해 밀폐형 유리튜브에 건조 시료 1 g과 용매 20 ml을 첨가하여 추출 조건에 따라 온도와 시간을 변화시켜(KMC-1205SW1, Vision, Daejeon, Korea)에서 추출을 진행하였다. 추출 후, 1 ml의 추출시료를 원심분리 후 상등액을 회수하여 사용하였다. 실험에 사용된 추출조건은 Table 1과 같으며 희석한 시료는 필요에 따라 희석하여 폴리페놀 측정에 사용하였다.

2-3. 폴리페놀 함량 분석

폴리페놀 함량은 Milutinović 등의 방법에 따라 수행하였다[8]. Folin-Ciocalteu's 페놀용액을 희석 추출물에 첨가하여 폴리페놀 화합물에 의해 청색으로 환원 발색하는 원리에 근거하여 흡광도 변화로 폴리페놀 농도를 측정하였다. 각 추출물을 1 mg/mL로 희석한 후, 희석한 각 추출물을 0.125 mL 취하고 여기에 0.5 mL 증류수를 넣은 후 0.125 mL의 Folin-Ciocalteu reagent를 가하여 5분간 반응시킨 후 1.25 mL의 7% sodium carbonate 용액을 첨가하여 실온에서 1시간 반응을 진행시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 농도별 galic acid를 이용한 standard curve와 비교하여 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry matter (DM)으로 표시하였다.

Table 1. Independent variables and their levels for central composite design

Variables	Coded and actual level				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68
X ₁ Temperature (°C)	50	60	75	90	100
X ₂ Time (min)	13.2	20.0	30.0	40.0	46.8
X ₃ Ethanol conc. (%)	50	60	75	90	100

Table 2. Central composite design for optimization of extraction parameters. Second-order regression model calculates the predicted values based on the experimental date

Run No	X ₁	X ₂	X ₃	Phenolic compounds (mg GAE/g DM)	
				Experimental	Predicted
1	60.0	20.0	60.0	10.07	10.76
2	90.0	20.0	60.0	12.12	12.03
3	60.0	40.0	60.0	11.68	11.50
4	90.0	40.0	60.0	12.36	12.41
5	60.0	20.0	90.0	7.01	6.84
6	90.0	20.0	90.0	9.53	9.59
7	60.0	40.0	90.0	7.81	7.79
8	90.0	40.0	90.0	10.98	10.18
9	49.8	30.0	75.0	9.09	8.84
10	100.0	30.0	75.0	11.52	11.95
11	75.0	13.2	75.0	10.67	10.33
12	75.0	46.8	75.0	10.94	11.45
13	75.0	30.0	49.8	12.19	11.86
14	75.0	30.0	100.2	6.19	6.7
15	75.0	30.0	75.0	11.21	10.95
16	75.0	30.0	75.0	11.00	10.95
17	75.0	30.0	75.0	10.67	10.95

R² = 0.9566; X₁: Temperature; X₂: Time; X₃: ethanol concentration

2-4. 추출조건 최적화 실험계획법

건조된 아마란스 잎의 열수추출공정의 조건을 탐색하기 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 사용하였다. 기존 본 실험실에서 수행한 단일변수 최적화에 기반하여 추출공정에서 중요한 변수인 추출온도(X₁), 추출시간(X₂)과 에탄올 농도(X₃)를 독립변수(independent variables)로 하여 Table 1에서와 같이 각각 5단계의 수준에서 중심합성계획(central composite design, CCD)에 따라 실험을 진행하였다. 독립변수인 폴리페놀 추출에 미치는 영향을 평가하기 위해 Table 2에 나타난 바와 같이 CCD 설계에 따라 3개의 독립변수를 변화시켜 17회 독립실험을 통해 2차 회귀방정식을 식 (1)과 같이 도출하여 공정변수간의 상호작용, 경향성, 신뢰성 및 예측 등을 SuperPro Designer 9.0(Intelligen, Inc., US) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 반응표면분석은 독립변수 X_i와 X_j에 대한 종속변수 Y(폴리페놀 함량)는 다음과 같이 표현된다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{13} X_1 X_3 \quad (1)$$

Y=predicted response; β_0 =intercept; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ =linear coefficients; $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ =squared coefficients; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ =interaction coefficients.

종속변수와 독립변수간의 관계를 Design-Expert를 이용하여 다중회기분석 및 분산분석을 수행하여 유의성이 인정되는 변수만을 채택하여 각 종속변수 별 모델을 설정하고 이를 이용하여 반응표면분석법에 의해 최적조건을 탐색하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 추출조건 최적화

최적화 기법 중, 기본 추출조건에 하나의 독립변수를 변화시키는 단일변수 최적화법은 복수의 독립변수가 종속변수에 미치는 상관관

Table 3. Analysis of variance of the regression parameters of the predicted response surface quadratic models

ANOVA for response surface quadratic model			
	Sum of Squares	F value	P level
Model	50.73	17.15	0.0006
X ₁	11.45	34.83	0.0006
X ₂	1.51	4.60	0.0691
X ₃	32.28	98.23	< 0.0001
X ₁ ²	0.066	0.20	0.6668
X ₂ ²	1.09	3.31	0.1116
X ₃ ²	0.021	0.065	0.0003*
X ₁ X ₂	0.068	0.021	0.8891
X ₁ X ₃	0.054	0.017	0.9007
X ₂ X ₃	0.0057	0.0018	0.9678

X₁: Temperature; X₂: Time; X₃: ethanol concentration

계와 통계학적 유의성 및 실험범위 외의 결과 예측에 어려운 한계점을 지닌다. 본 실험에서는 통계학적 최적화 기법의 일종인 반응표면 분석법을 도입하여 독립변수 상호영향을 고려하여 최적조건을 예측하고자 통계학적 최적화를 수행하였다[9]. 아래 식 (2)에 보여지는 바와 같이 반응표면 분석법 중 하나인 중심합성계획법 이용하여 2차 회귀방정식을 아래와 같이 구하였다.

$$Y = 1.63 + 0.0904X_1 - 0.0657X_2 + 0.1599X_3 - 0.00060X_1X_2 + 0.0016X_1X_3 + 0.00037X_2X_3 - 0.00089X_1^2 - 0.00021X_2^2 - 0.00026X_3^2 \quad (2)$$

식 (2)를 이용하여 종속변수인 폴리페놀 농도의 실험값과 모델을 통해 얻은 예측값을 Table 2에 비교하였다. *p* value는 각 계수의 중요성을 확인하는 도구로 유의 확률을 확인하는 지표가 되며, 값이 0.05 보다 작으면 모델이 유효하다고 판단할 수 있다[5,10]. 표에서 보는 바와 같이, 실험값과 예측값은 매우 잘 일치하며 회귀분석 결과 전체 회귀모델의 유의성이 인정되었고(*p*<0.05) 일차와 이차항 모두 유의함을 알 수 있었다(Table 2). Table 3은 종속변수의 일차항, 이차항과 교차항의 계수의 유의성을 판단하기 위한 ANOVA 표이다. 일차항에서 추출온도(X₁)와 에탄올 농도는(X₃)가 유의한 영향을 미치는 것으로 나타났다(*p*<0.05). 각 독립변수의 영향을 평가했을 때, Fig. 1에서 보는 바와 같이 추출온도와 추출시간이 증가할수록, 에탄올 농도

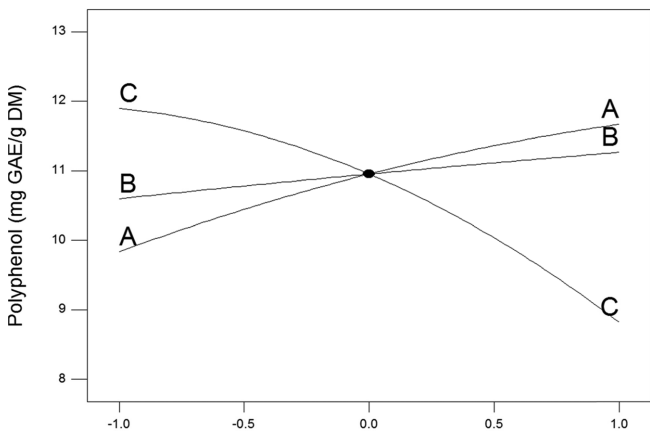


Fig. 1. Effect of independent variables on TPC. Each level of variables was expressed as the code value. A: extraction temperature; B: extraction time; C: ethanol concentration.

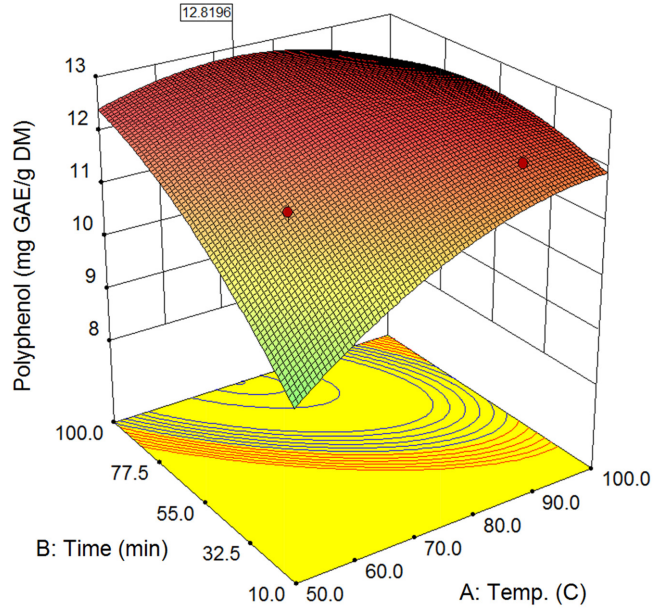


Fig. 2. Response surface curve for the relative effects of extraction temperature and time at fixed level of ethanol concentration of 60%.

가 감소할수록 폴리페놀의 추출이 증가하는 경향을 보임으로 최대 폴리페놀 추출은 낮은 에탄올 농도와 높은 수준의 추출온도와 추출시간에서 형성될 것으로 예측할 수 있다.

Fig. 2은 아마란스 잎의 열수추출을 이용한 폴리페놀 추출 시 추출온도와 추출시간이 폴리페놀 추출에 미치는 영향을 보여준다. 폴리페놀 추출은 온도가 높아질수록 크게 증가함을 보이나 시간에 따른 증가량은 크지 않은 것을 확인할 수 있었다. 온도증가에 따른 폴리페놀 농도 증가는 분명하지만 증가속도는 50~60 °C 이후로 서서히 감소하는 경향 보이고 있다. 여러 추출공정에서 폴리페놀의 열안정성에 대해 연구가 진행되었고 상반된 결과들이 보고 되고 있다. Adil 등 [11]은 사과와 복숭아 pomace의 폴리페놀 추출 시 추출온도가 증가할수록 폴리페놀 함량이 증가하다가 50 °C 이상에서는 다시 감소하며 이는 폴리페놀의 열안정성이 약해 고온에서 분해된다고 보고하고 있다. 하지만 Park [12] 등이 모과로부터 초임계추출을 수행한 결과에 따르면 폴리페놀은 260 °C까지 온도에 비례하여 증가하며 280 °C 고온에서도 매우 안정하다고 보고하고 있다. 본 실험에서 50 °C 이상에서 폴리페놀 농도가 감소하는 것은 추출 진행에 따른 고-액간의 농도차 감소로 추출의 driving force가 약해져 추출속도가 낮아진 것이 이유일 수 있다. 향후, 아마란스 폴리페놀의 열안정성 실험을 통해 판단할 필요가 있다. 열수추출공정의 최적화 조건인 71.9 °C, 99.3과 60 (v/v%) 에탄올에서 최대 폴리페놀 농도 12.8 mg GAE/g DM이 예측되었다.

Fig. 3은 열수추출을 이용한 폴리페놀 추출에 있어 추출시간이 40분으로 고정되었을 때, 추출온도와 에탄올 농도가 폴리페놀 추출에 미치는 영향을 보여준다. 에탄올의 농도가 증가함에 따라 폴리페놀 농도가 증가하다 60% 부근에서 다시 감소하는 형태로 변화를 보여주며 50~60 °C 사이에서 최대값이 나타남을 확인할 수 있다. 낮은 에탄올 농도에서 추출온도에 따라 폴리페놀의 증가량이 미미한 것을 확인할 수 있었지만 에탄올 농도가 높은 조건에서는 온도의 영향이 상대적으로 크게 나타나는 것으로 나타났다. 최고 폴리페놀 농도

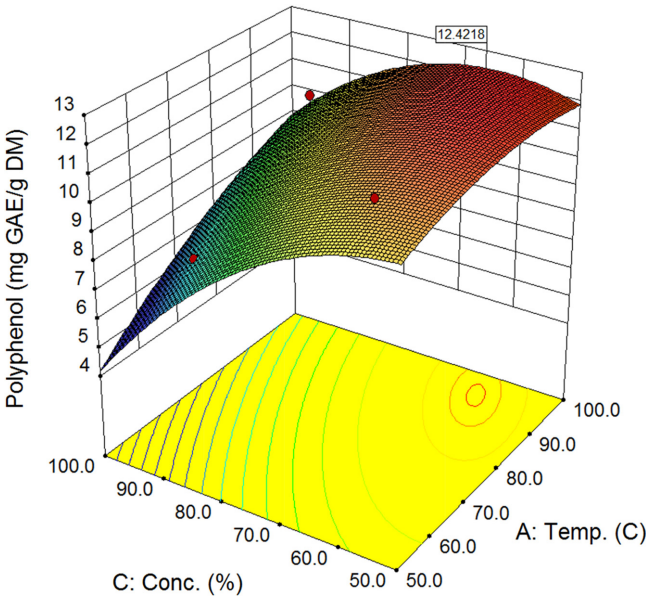


Fig. 3. Response surface curve for the relative effects of extraction temperature and ethanol concentration at fixed level of extraction time of 40 min.

12.4 mg/g DM가 93.5 °C, 62.1 (v/v%) 에탄올 농도와 40 min 추출 조건에서 얻어졌다. 아미란스 잎의 폴리페놀을 물이나 단일 유기용매로 추출하는 것보다 물-에탄올 용매로 추출 시 우수한 효과를 보이고 있는데 이는 Kim [13] 등의 사과 부산물로부터 폴리페놀 추출 실험에서 70% 에탄올 용액의 효율이 가장 높다는 결과와 매우 유사한 결과이다.

폴리페놀 추출에 있어 열수추출의 온도와 시간의 상관관계를 평가하기 위해 추출온도를 95 °C로 고정하고 온도와 시간에 영향을 3차원 그래프상에서 예측하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 추출시간

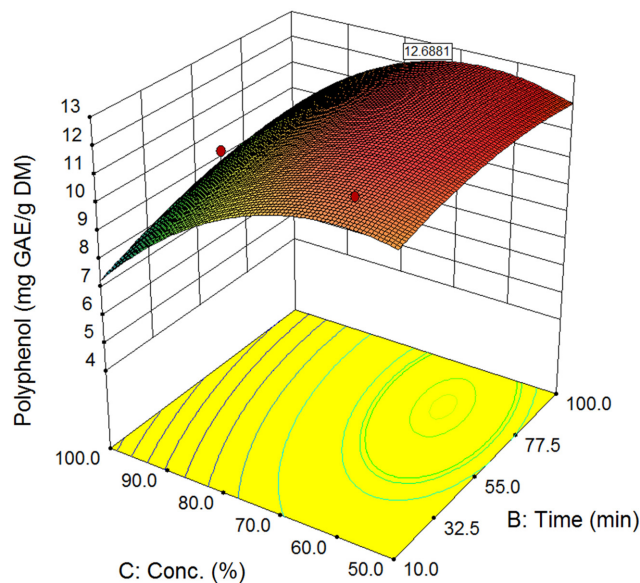


Fig. 4. Response surface curve for the relative effects of extraction time and ethanol concentration at fixed level of extraction temperature of 90 °C.

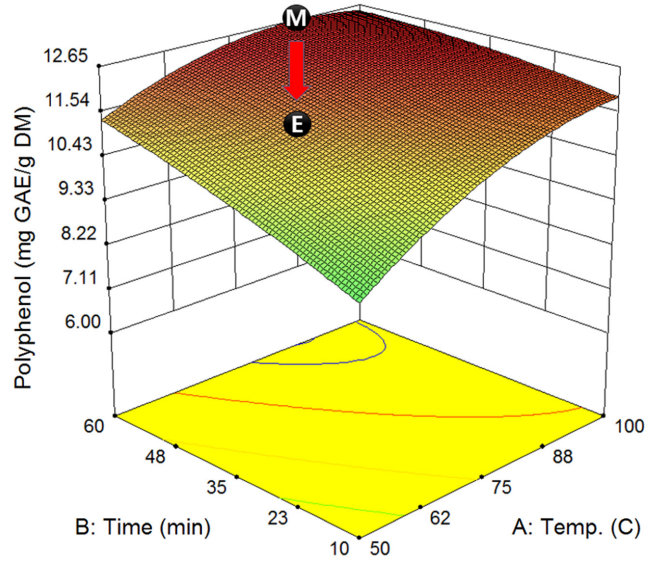


Fig. 5. Optimization of TPC extraction conditions based maximum production and economic constrain. M: optimization point based on maximum production constrain. E: Optimization point based on economic production constrain.

에 따라 폴리페놀 농도가 증가하는 것을 확인할 수 있으나 영향은 매우 미미한 것으로 보인다. 반면 에탄올 농도가 변화에 따른 폴리페놀 농도의 민감도는 크며 50~60% 사이에서 최대값을 가짐을 재확인 할 수 있었다. 본 실험에서 76.3 min, 63.3 (v/v%)와 90 °C 열수 추출 조건에서 최대 폴리페놀 농도인 12.7 mg GAE/g DM를 얻을 수 있었다. Fig. 3과4에서 본 바와 같이, 에탄올 농도 60% 부근에서 최대 폴리페놀 추출성능을 보이는데, 이는 차원에서 폴리페놀 추출 시, 시간의 영향은 크지 않으며 에탄올 40~50%에서 최대 폴리페놀을 추출할 수 있다는 Peiro [14]등의 보고와 경향성은 일치하지만 에탄올 농도의 불일치를 보이는 결과이다. 또한 Lee [15]등의 연구결과에서도 산수유열매 최적추출 에탄올 농도가 3~33%임을 보고한 바가 있어 원료물질 별 최적농도가 다를 수 있으며 원료물질에 적합한 용매농도 선택이 중요함을 알 수 있다.

3-2. 폴리페놀 최적 추출조건

열수추출의 최적조건을 도출하기 위해 SuperPro Designer 9.0을 사용하여 필요한 제한조건을 부여하여 최적조건을 탐색했다. 먼저, 폴리페놀 최대 생산 조건을 예측하기 위해 종속변수인 폴리페놀의 목적값을 최대로 설정하고 독립변수에 제한사항을 두지 않고 최적조건을 예측하였을 때, 90.1 °C, 61.6 (v/v%)와 50분 추출조건이 최적조건으로 확인되었으며 예측 된 폴리페놀 함량은 12.6 mg GAE/g DM 이었다. 보다 경제적인 추출공정 운영을 위해서는 폴리페놀 생산량은 최대로 유지하면서 에너지와 재료투입 최소화가 필요하다. 이를 위해 폴리페놀 농도는 목적값을 최대로 설정하고 추출온도, 추출시간과 에탄올 농도를 최소로 제한조건을 설정하여 최적조건을 탐색하였다. 공정시간 단축과 낮은 에탄올 농도는 생산성 향상과 원료비 절감효과가 있으며 낮은 추출온도는 운전비용과 설비의 절감효과를 예상할 수 있다. 세 가지 공정변수의 수준을 최소로 하여 최적화를 수행했을 때 70.5 °C, 17.9 min, 50% (v/v%) 에탄올 조건에서 최대 폴리페놀 농도 11.5 mg GAE/g DM가 예측되었다.

4. 결 론

아마란스 잎은 폴리페놀 성분을 함유하고 있어 유망한 천연 항산화 후보이다. 아마란스 잎을 이용한 폴리페놀 열수추출공정 최적화 연구는 보고 된 바가 없으며 아마란스로부터 폴리페놀과 같은 유용산물을 생산함에 있어 추출조건 최적화를 통한 수율을 향상을 도모함으로써 보다 경제적이고 경쟁력 있는 추출공정을 제안했다는데 연구의 의의가 있다. 본 연구를 통해 아마란스 잎 유래 폴리페놀 추출을 최대화 할 수 있는 열수추출 조건을 확립하여 최대 12.6 mg GAE/g DM 폴리페놀 추출이 예측되었다. 아마란스 잎 유래의 폴리페놀 추출에 대한 연구결과는 많지는 않으나 Lopez-Mejia [7] 등이 Soxhlet에서 유기용매를 이용하여 추출한 결과인 6.19 mg GAE/g DM에 비해 최적화 된 열수추출에서 2배 가량 높은 폴리페놀 농도를 확인할 수 있었다. 열수에 의해 추출되는 폴리페놀의 양은 추출온도와 에탄올농도에 유의한 영향을 받으며($p < 0.05$) 추출온도와 시간이 증가할수록 비례하여 증가함을 알 수 있었다. 폴리페놀 생산을 최대화 하기 위해 90.1 °C, 61.6 (v/v%)와 50분 추출조건이 필요하나 에너지와 원료투입을 고려한 추출에서는 70.5 °C, 50 (v/v%), 17.9 min 추출이 경제적인 대안으로 제안되었다. 경제적 측면을 고려한 추출방법이 에너지비용과 설비비를 낮추고 생산성을 높이는 조건이긴 하나 폴리페놀 농도가 12.6에서 11.5 mg GAE/g DM로 낮아지는 trade-off가 있어 향후 두 조건에 의한 열수추출의 경제성 비교를 보다 면밀히 수행할 필요성이 있다.

감 사

본 연구는 선 2015학년도 선문대학교 교내 신진교원 지원 프로그램에 의한 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사합니다.

References

- Chon, S. W., Kim, D. K. and Kim, Y. M., "Phenolics Content and Antioxidant Activity of Sprouts in Several Legume Crops," *Korean J. of Plant Resour.*, **26**, 159-168(2013).
- Kang, C. D., Park, T. K. and Sim, S. J., "Biological CO₂ Fixation to Antioxidant Carotenoids by Photosynthesis Using the Green Microalga *Haematococcus Pluvialis*," *Korean Chem. Eng. Res.*, **44**, 46-51(2006).
- Jeong, G. K., Lee, K. M. and Park, D. H., "Study of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Rumex crispus* Extract," *Korean Chem. Eng. Res.*, **44**, 81-86(2006).
- Lee, Y. J., Kim, E. O. and Choi, S. W., "Isolation and Identification of Antioxidant Polyphenolic Compounds in Mulberry," *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**, 517-524(2011).
- Jeong, G. T., Yang, H. S., Park, S. H. and Park, D. H., "Optimization of Biodiesel Production from Rapeseed Oil Using Response Surface Methodology," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 222-227(2007).
- Hong, S. Y., Cho, K. S., Jin, Y. I., Yeon, Y. H., Kim, S. J., Nam, J. H., Jeong, J. C., Kwon, O. K. and Sohn, H. B., "Comparison of Growth Characteristics, Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents of Amaranthus Species according to the Different Cultivation Regions and Varieties in South Korea," *Korean J. Crop Sci.*, **59**, 16-21(2014).
- López-Mejía, A., López-Malo, A. and Palou, E., "Antioxidant Capacity of Extracts from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) Seeds or Leaves," *Ind. Crops Prod.*, **53**, 55-59(2014).
- Milutinović, M., Radovanović, N., Čorović, M., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M. and Dimitrijević-Branković, S., "Optimisation of Microwave-assisted Extraction Parameters for Antioxidants from Waste *Achillea Millefolium* Dust," *Ind. Crops Prod.*, **77**, 333-341(2015).
- Min, D. L., Lim, S. W., Ahn, J. B. and Choi, Y. J., "Optimization of Ethanol Extraction Conditions for Antioxidants from *Zizyphus jujuba* Mill. Leaves Using Response Surface Methodology," *Korean J. Food Sci. Technol.*, **42**, 733-738(2010).
- Kim, J. W., "Response Surface Optimization of Fermentation Parameters for Citric Acid Production in Solid Substrate Fermentation," *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**, 879-884(2012).
- Adil, I. H., Cetin, H. I., Yener, M. E. and Bayindirli, A., "Subcritical (carbon dioxide+ethanol) Extraction of Polyphenols from Apple and Peach Pomaces, and Determination of the Antioxidant Activities of the Extracts," *J. Supercrit. Fluid.*, **43**, 55-63(2007).
- Park, J. N., Ali-Nehari, A., Woo, H. C. and Chun, B. S., "Thermal Stabilities of Polyphenols and Fatty Acids in *Laminaria japonica* Hydrolysates Produced Using Subcritical Water," *Korean J. Chem. Eng.*, **29**, 1604-1609(2012).
- Kim, Y. S., Kim, R. S., Moon, J. H., Ji, J. R., Choi, H. D. and Park, Y. K., "Optimization of Extraction Conditions of Polyphenolic Compounds from Apple Pomace by Response Surface Methodology," *Korean Soc. Food Sci. Technol.*, **41**, 245-250(2009).
- Peiró, S., Gordon, M. H., Blanco, M., Pérez-Llamas, F., Segovia, F. and Almajano, M. P., "Modelling Extraction of White Tea Polyphenols: The Influence of Temperature and Ethanol Concentration," *Antioxidants*, **3**, 684-699(2014).
- Lee, H. J., Do, J. R., Kwon, J. H. and Kim H.K., "Optimization of *Corni fructus* Extracts by Response Surface Methodology," *Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**, 390-395(2012).