

홍화씨로부터 Phytosterol 추출의 최적화 및 재구성지질의 합성

박래균 · 이기택*
충남대학교 식품공학과

Optimization for the Phytosterol Extraction and Production of Structured Lipids from Safflower seed

Rae-Kyun Park and Ki-Teak Lee*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

Abstract

Response surface methodology was used for monitoring and optimizing the extraction conditions of campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, and total sterols from the safflower seed. The conditions of phytosterol extraction were optimized by using central composite design with the temperature(35~75°C, X₁), the time (1~11hr, X₂), and the preheating temperature(60~100°C, X₃) as three variables. The extraction conditions for maximum campesterol content were 59.01°C(X₁), 2.88hr(X₂), and 75.04°C(X₃). But stigmasterol, β -sitosterol and total sterols were not significantly different under designed extraction condition in this study. Besides, oil was extracted from safflower seed at various conditions and yields were 23.44% at 35°C and 20.05% at 80°C, respectively. Total tocopherol content increased from 0.172% to 0.207% as the extraction temperature increased from 35°C to 80°C. A structured lipids(SL) was synthesized enzymatically by extracted safflower oil and conjugated linoleic acid(CLA). After 24hr reaction, 31.79 mol% CLA was incorporated into the extracted safflower oil.

Key words : safflower oil, RSM, phytosterol, tocopherol, structured lipids

서 론

국화과(Compositae)에 속하는 홍화(safflower, 학명 *Carthamus tinctorius* L.)는 1년 생 목본으로 기름함량이 29%정도로 비교적 기름을 많이 함유하는 작물로 알려져 있으며, 한국, 일본, 중국 등지에서는 주로 약용 및 유지 생산용으로 재배하고 있다(1,2). 오래 전부터 꽃은 천연색소 및 약재로 이용되었으며, 홍화씨는 품종개량의 결과 식용유 채취용으로 사용되었다. 홍화씨유에는 특히 linoleic acid가 다량 함유되어 있어 고혈압, 동맥경화, 심근경색 등의 순환기질환과 관절염, 골다공증, 콜레스테롤(cholesterol) 저하에 탁월한 효과를 나타낸다고 보고되었다(3,4,6). 한편, 최근 식생활이 서구화되면서 콜레스테롤의 함유량이 높은 식품의 섭취가 증가함에 따라 콜레스테롤의 흡수 저해연구가 활발히 이루어지고 있다. 콜레스테롤은 세포막의 재생, 담즙산과 호르몬의 전구체로써 기능을 지니며, 신경계의 구성성분이나 혈관내 고농도로 존재할 경우 순환기질환의 주요 원인이 된다(5). 콜레

스테롤 저해 물질인 식물성 sterol은 콜레스테롤과 구조적으로 매우 유사한 구조를 가지며, 그 종류로는 campesterol, β -sitosterol, stigmasterol 등이 있다. 이들 식물성 sterol은 장내 cholesterol 흡수를 저해하는 효능을 가지며, serum cholesterol level과 LDL cholesterol level을 저하 작용이 보고되었다(6). 한편, 식물성 유지는 필수지방산 linoleic acid 및 tocopherol의 중요 공급원으로 알려져 있다. 식물성 유지는 tocopherol과 같은 항산화제가 존재하여 유지의 산화안전성을 부여 해줄 뿐만 아니라 생체내에서 과산화물의 생성을 억제하는 항산화효과를 가진다(7). 또한 식물 유에 다량 존재하는 linoleic acid는 화학적 또는 미생물에 의한 방법으로 이성체인 conjugated linoleic acid(CLA)를 생성하는데 이는 항암성, 콜레스테롤 축적 억제, 항산화성, 면역증강, 항균 효과 등의 기능성을 가진 것으로 알려져 있다(8,9).

최근 유지의 영양학적 특성을 개선시키기 위하여 재구성 지질에 대한 연구가 많이 행해지고 있다. 유지의 물리적 또는 화학적 특성을 바꾸거나 공업적, 영양학적 특성을 개선하기 위하여 triacylglycerol의 지방산 조성, 또는 지방산의 위치(regiospecific position)를 글라이세롤(glycerol) 분자 안에서 화학적 또는 효소반응으로 바꾸어 합성된 지질을 재구성 지질(structured lipids)이라 칭한다(10). 재구성 지질의 합성을

Corresponding author : Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Gung-dong 220, Yuseung-gu, Daejeon, 305-764, Korea
E-mail : ktleee@cnu.ac.kr

위하여 생물학적 촉매인 lipase가 이용될 수 있는데 본 연구에서는 *Rhizomucor miehei*로부터 유래한 lipase를 macroporous anion exchange resin에 고정화시킨 상업용 lipase를 효소로 이용하였다. 이 효소는 triacylglycerol의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 fatty acid로 분해한 후 다시 역으로 esterification합성하는 작용을 가지며 이 효소는 sn-1,3 specific으로써 triacylglycerol 분자의 sn-1과 3의 위치에 특이적으로 작용하는 성질을 가지고 있다(11).

이에 본 연구에서는 홍화유의 중심합성실험계획(central composite design)에 따른 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용(12,13) 추출온도, 추출시간, 전처리 가공온도 등의 추출조건 따른 phytosterol 추출 최적조건을 연구하였으며, 지방산 조성 분석, tocopherol 분석함량 분석 및 홍화유와 CLA를 이용한 재구성 지질 생성 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 홍화씨는 2002년 8월 대전 유성 인근 시장에서 구입한 후 정선, 선별, 분쇄하여 polyethylene film에 넣어 -20℃의 냉동고에 저장하면서 본 실험에 이용하였다. 재구성 지질 합성에 사용한 IM60 효소는 Novo Nordisk Biochemical(Danbury, USA)에서 구입하여 사용하였다.

최적화를 위한 실험계획

추출조건에 따른 홍화씨 phytosterol 추출량을 모니터링하고자 중심합성실험계획(central composite design)(12,13)에 따라 각각의 조건에서 홍화유를 추출하여 phytosterol 함량 비교 실험하였으며, 실험결과의 반응표면분석(RSM)을 위해서 SAS(statistical analysis system) program을 이용하였다. 이 때 phytosterol의 독립변수로서 추출온도(35~75℃, X_1), 추출시간(1~11시간, X_2), 시료의 전처리 가공 온도(60~100℃, X_3)이었으며, 이들 독립변수(조건)들은 Table 1과 같이 -2, -1, 0, 1, 2로 5단계로 부호화 하였다. 또한 종속(반응)변수(Y_n)로서는 campesterol(Y_1), stigmasterol(Y_2), β -sitosterol(Y_3) 및 total sterol(Y_4)로 하였으며, Table 2와 같은 16개의 설정된 조건으로 실험을 실시하였다.

분쇄된 홍화씨(20-40 mesh)를 독립변수 전처리 가공 온도(60~100℃, X_3)에 따라 incubator에서 24시간 동안 예열 건조 후 시료 40 g에 시료 량의 0.01%의 BHT(Junsei Chemical Co., Ltd. Japan)과 n-hexane 50 mL를 가한 후 독립변수 추출 온도(35~75℃, X_1), 추출시간(1~11hr, X_2) 16개의 설정된 조건에 따라 항온교반수조(Hanil Science Industrial, BS-21. Korea)를 사용하여 175rpm에서 추출하였다. 이후 rotary

evaporator(EYELA, N-1000, Japan)와 N_2 를 이용하여 n-hexane을 제거시키고 sodium sulfate anhydrous(Junsei Chemical Co., Ltd. Japan) column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거하였다.

Table 1. Levels for extraction conditions in experimental design

Variables	Symbols	Level				
		-2	-1	0	1	2
Extraction temp.(℃)	X_1	35	45	55	65	75
Extraction time(hr)	X_2	1	3.5	6	8.5	11
Preheating temp.(℃)	X_3	60	70	80	90	100

Table 2. Experiment combinations according to codes of experimental design at various conditions of extraction temperature, extraction time, and preheating temperature

Treatment No.	Variables			Actual parameters		
	X_1	X_2	X_3	Extraction temp.(℃)	Extraction time(hr)	Preheating temp.(℃)
1	-1	-1	-1	45	3.5	70
2	1	-1	-1	65	3.5	70
3	-1	1	-1	45	8.5	70
4	1	1	-1	65	8.5	70
5	-1	-1	1	45	3.5	90
6	1	-1	1	65	3.5	90
7	-1	1	1	45	8.5	90
8	1	1	1	65	8.5	90
9	0	0	0	55	6	80
10	0	0	0	55	6	80
11	-2	0	0	35	6	80
12	2	0	0	75	6	80
13	0	-2	0	55	1	80
14	0	2	0	55	11	80
15	0	0	-2	55	6	60
16	0	0	2	55	6	100

Phytosterol 함량 측정

추출된 홍화유 0.1 g에 2N KOH(ethanol) 2 mL을 test tube(25 mL)에 넣고 100℃ water bath에서 15분간 saponification한 후 냉각하였다. test tube에 2 mL의 증류수와 2 mL의 n-hexane을 넣고 상징 액인 n-hexane층을 분리한 후, 다시 2 mL의 n-hexane을 넣었다. 분리된 n-hexane층을 sodium sulfate anhydrous를 통과시켜서 수분을 제거하였다. 분석 시료에 Internal standard로 5-cholestane(1 mg/1 mL in n-hexane) 100 μ L를 넣은 후 Gas chromatography를 사용하여 phytosterol 분석을 하였다. GC는 HP 6890 series(USA)를 사용하였으며, column은 Ultra 2(HP, USA)를, column temperature는 285℃, injection temperature는 300℃, 검출기는 FID(Flame Ionized Detector, 300℃)를 사용하였으며, carrier gas는 N_2 (25.0 mL/min)를 사용하였다.

여러 추출 조건에서의 추출유지, phytosterol 과 tocopherol의 분석

분쇄된 홍화씨 40 g에 시료 량의 0.01%의 BHT(Junsei Chemical Co., Ltd. Japan)과 n-hexane 50 mL를 가한 후 항온 교반수조(Hanil Science Industrial, BS-21. Korea)에서 1, 3, 6 시간 단위로 35°C와 175rpm 에서 추출하였다. 80°C 조건하에서는 1, 3, 6 시간 단위로 soxhlet extractor(Daihan Labtech Co., Ltd. Korea)로 사용하여 홍화씨유를 추출하였다. Sterol 분석은 위에 언급한 방법과 동일하였다.

α, γ, δ -tocopherol 정량 및 성분 분석을 위하여 Younglin Acme HPLC 기기를 사용하였으며 column은 LiChrosorb DIOL(5 μ m \times 3 \times 100mm)를 사용하였다. detector는 Younglin Absorbance Detector(UV730D)를 사용하였으며 측정 파장은 295nm이었다. n-hexane과 acetic acid의 1000대1 비율 용매를 유속은 0.5 mL/min에서 측정하였으며 sample 주입 량은 10 μ L이었다. 시료 준비는 유지 0.06 g를 n-hexane 10 mL에 희석 후 PTFE syringe filter(25mm 0.2 μ m, Whatman)를 사용하여 여과시킨 후 분석하였다.

지방산 조성 분석

Methylation을 위해 시료 (100 mg)에 6% H₂SO₄ in methyl alcohol 3 mL를 넣고 Heptadecanoic acid(1 mg/1 mL in n-hexane) 10 μ L을 넣은 후 vortex를 하고 100°C water bath에서 20분간 중탕을 시켰다. 그후 n-hexane 2 mL를 넣어서 n-hexane층을 취해 sodium sulfate anhydrous를 통과시켜서 수분을 제거하였다. 수분 제거 후 gas chromatography(GC)에 1 μ L를 주입하여 지방산 분석을 하였다. GC 기기는 Hewlett-Packard 6890 series(USA)를 사용하였으며 column은 SupelcowaxTM-10을 이용하였다. column 온도는 100°C에서 5분간 유지시킨 후 분당 4°C씩 올려 220°C에서 20분간 유지시켰다. Injection temperature는 250°C, 검출기는 FID(Flame Ionized Detector, 260°C)를 사용하였으며, carrier gas는 N₂(52.5 mL/min)를 사용하였다.

추출된 홍화유로부터 재구성지질의 제조 및 분석

추출된 홍화유(0.2 g)와 CLA(0.1926 g)의 1 : 3 mol 비율 혼합물을 test tube(25mL)에 넣고 n-hexane 2 mL과 lipozyme RM IM60(from *Rhizomucor miehei*, Novo Nordisk) 효소를 전체 sample 무게의 15%(0.0589 g) 넣은 후 water sharking bath에서 55°C, 175rpm 조건하에서 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간, 24시간 각각 반응시킨 후 재구성 지질을 생성하였다. 재구성지질의 지방산 조성을 분석하기 위하여 TLC(n-hexane, diethyl ether, acetic acid의 50 : 50 : 1 부피 비 전개용매 사용)를 사용하여 triacylglycerol(R_f 0.58) 만을 분리하고 위의 지방산 분석 방법과 같은 methylation 방법과 GC

를 사용하여 재구성 지질의 지방산 조성을 분석하였다.

결과 및 고찰

Phytosterol 추출 최적화

중심합성 실험계획에 따라 추출 조건에 따른 campesterol의 추출량을 조사한 결과는 Table 3과 같았다. 추출온도(35~75°C, X₁), 추출시간(1~11시간, X₂) 및 시료의 전처리 가공 온도(60~100°C, X₃)에 따른 campesterol 추출량의 taylor second equation(14,17)은 다음과 같다.

$$Y_1 = -0.547732 + 0.032992X_1 + 0.0346237X_2 - 0.003132X_3 - 0.000227X_1^2 - 0.000336X_1X_2 - 0.002494X_2^2 - 0.000069375X_1X_3 - 0.0000055X_2X_3 + 0.00004825X_3^2$$

Table 3. Extraction yields of campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, and total sterol from safflower seed (unit : % weight)

Treatment	Variables			Responses			
	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Y4
	Extraction temp.(°C)	Extraction time(hr)	Preheating temp.(°C)	Campe sterol	Stigma sterol	β -sito sterol	Total sterol
1	45 (-1)	3.5 (-1)	70 (-1)	0.3154	0.1643	1.1282	1.6079
2	65 (1)	3.5 (-1)	70 (-1)	0.3090	0.1576	1.0385	1.5051
3	45 (-1)	8.5 (1)	70 (-1)	0.2466	0.1471	0.8908	1.2845
4	65 (1)	8.5 (1)	70 (-1)	0.2604	0.1441	0.9654	1.3699
5	45 (-1)	3.5 (-1)	90 (1)	0.3382	0.1911	1.1596	1.6888
6	65 (1)	3.5 (-1)	90 (1)	0.3579	0.2238	1.3165	1.8982
7	45 (-1)	8.5 (1)	90 (1)	0.3227	0.1951	1.1773	1.6950
8	65 (1)	8.5 (1)	90 (1)	0.2549	0.1610	0.8850	1.3009
9	55 (0)	6 (0)	80 (0)	0.3392	0.1799	1.1884	1.7075
10	55 (0)	6 (0)	80 (0)	0.3392	0.1799	1.1884	1.7075
11	35 (-2)	6 (0)	80 (0)	0.2211	0.1277	0.7502	1.0990
12	75 (2)	6 (0)	80 (0)	0.2755	0.1684	1.0152	1.4590
13	55 (0)	1 (-2)	80 (0)	0.3604	0.1912	1.2373	1.7889
14	55 (0)	11 (2)	80 (0)	0.1933	0.1409	0.7211	1.0553
15	55 (0)	6 (0)	60 (-2)	0.3645	0.1981	1.2322	1.7948
16	55 (0)	6 (0)	100 (2)	0.3525	0.0785	1.0183	1.4492

R-Square는 0.8794이었으며 유의확률은 0.0339 이었다. 정상 점의 좌표는 독립변수 범위 기준으로 추출온도(Extraction temp, X₁), 추출시간(Extraction time, X₂) 및 시료의 전처리 가공 온도(Preheating temp, X₃)가 각각 59.01°C, 2.88시간, 75.04°C 이며, 추출된 반응 값은 0.3579%이다. 예측된 정상 점은 안장점이었으며, 능선분석 결과 추출온도, 추출시간 및 시료의 전처리 가공 온도는 각각 54.69°C, 4.02시간, 98.37°C 이었을 때 campesterol 추출 최대 값은 0.3852%으로 예측되

었다. 실험변수에 따른 contour map 과 반응표면(15,16)을 보면 campesterol 추출량은 추출온도 55°C 부근에서 추출시간이 짧고 전처리 온도가 증가할수록 최대 추출율을 보였다. 또한 β -sitosterol, stigmasterol 및 total sterol 추출을 반응표면 분석은 유의 차가 없었다. Table 3은 독립변수에 따른 종속 변수들의 결과 값이다.

홍화씨유 추출

35°C 1, 3, 6시간 추출조건에서 홍화의 유지 추출율은 각각 23.31%, 23.35%, 23.65% 이었으며, 80°C 1, 3, 6시간 실험 조건에서 추출율은 각각 18.83%, 19.72%, 21.61% 이었다. 홍화유는 35°C 저온 추출에서 높은 추출율을 보였으며 추출시간에 따른 증가 추이는 적은 것으로 나타났다. 홍화유의 추출시간과 온도에 따른 추출수율은 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Extraction yield of safflower seed oil at various conditions (unit: % weight)

	Temp.(°C)	Extraction time		
		1 hr	3 hr	6 hr
Safflower seed	35	23.31	23.35	23.65
	80	18.83	19.72	21.61

Tocopherol 정량

각 추출 조건에 따른 α, γ, δ -tocopherol 함량은 Table 5에 나타내었다. 추출된 홍화유를 HPLC 사용하여 α, γ, δ -tocopherol 정량 결과 α -tocopherol 함량이 γ -tocopherol 함량 보다 높게 나타났으며 δ -tocopherol은 검출하지 못하였다. 35°C, 80°C 추출조건에서 α -tocopherol 함량은 유사하게 나타났으며 γ -tocopherol 80°C 추출 조건에서 함량이 높게 분석되었다. 총 tocopherol 함량은 80°C, 6시간 추출 조건에서 0.23%으로 최대 함량을 나타냈으며 35°C조건보다 80°C 추출 조건에서 높은 tocopherol 함량을 나타내는 경향을 보였다.

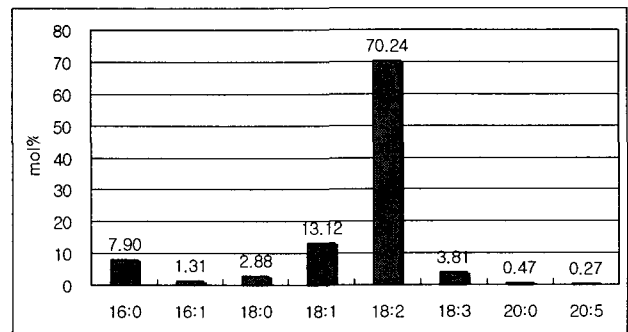
Table 5. α, γ and δ -tocopherol content of extracted safflower oil at various conditions (unit: % weight)

	Temp.(°C)	Time(hr)	α	γ	δ	Total
3	0.131	0.079	-	0.210		
6	0.102	0.050	-	0.152		
80	1	0.109	0.068	-	0.177	
	3	0.123	0.093	-	0.216	
	6	0.124	0.106	-	0.230	

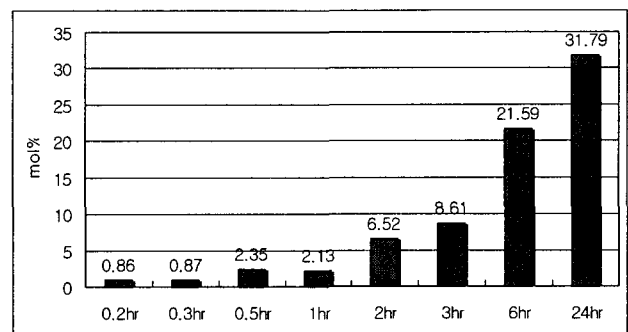
지방산 조성 분석 및 재구성 지질의 CLA 함량 분석

지방산 조성 분석결과 palmitic acid(16:0), stearic acid(18:0), oleic acid(18:1), linoleic acid(18:2) 및 linolenic acid(18:3)가 각각 7.90, 2.88, 13.12, 70.24, 3.80 mol%으로 분석되었다. 혈관계질환 원인 물질인 콜레스테롤 농도 저하 효과(3,4)를 가지는 linoleic acid가 70.24%로 다른 식물성 유지들과 비교하여 현저하게 높게 나타났다. 김 등(1)은 한국산 홍화종실과 볶음 홍화종실의 linoleic acid 함량이 각각 74.00%, 69.10% 이라고 보고하였는데 본 실험과 유사한 경향을 보였다. 또한 홍화유의 총 불포화지방산의 함량은 87.16% 매우 높은 것으로 분석되었다.

시간대 별 재구성 지질에 함유된 CLA 함량을 분석해본 결과 10분, 20분, 30분 1시간 반응 재구성 지질에서는 0.86, 0.87, 2.35, 2.13 mol% 순으로 증가하였고 2, 3, 6, 24시간 동안 반응 시에는 각각 6.52, 8.61, 21.59, 31.79 mol%으로 CLA 함량이 반응시간의 증가에 따라 함량이 증가되었다. 20분에서 30분으로 반응시간이 증가되어질 때 시간당 증가율이 8.71%로 가장 높은 증가율을 보였으며 CLA 함량은 초기반응부터 6시간까지는 시간당 CLA mol% 증가율이 증가하다 그후 다소 감소하는 추세를 보였다. 24시간반응 조건에서 CLA 함량이 31.79 mol%인 재구성 지질을 합성 할 수 있었다. 홍화유의 지방산 조성 결과와 반응시간에 따른 재구성 지질의 CLA 함량변화는 Fig. 1에 나타내었다.



(A)



(B)

Fig. 1. Fatty acid compositions of extracted safflower oil(A) and CLA content in produced structured lipids(B).

요 약

반응표면분석에 의하여 홍화유 추출조건에 따른 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol 및 total sterol의 추출 최적화를 모니터링 하였으며, 추출온도(35~75℃, X₁), 추출시간(1~11시간, X₂), 시료의 전처리 가공 온도(60~100℃, X₃)를 변수로 한 중심합성계획으로 추출조건을 최적화 하였다. campesterol 최적 추출범위는 추출온도, 추출시간 및 시료의 전처리 가공 온도가 각각 59.01℃, 2.88시간, 75.04℃ 이었다. 그러나 β -sitosterol, stigmasterol 및 total sterol 추출을 반응표면분석은 유의차가 없었다. 한편 홍화의 35℃ 유지 추출수율은 평균 23.44% 이었으며 80℃ 추출조건에서는 평균 20.05% 이었다. 추출온도가 35℃에서 80℃ 높아짐에 따라 홍화유의 추출온도에 따른 평균 총 tocopherol 함량이 0.172% 에서 0.207%으로 증가하였다. 지방산 분석 결과 linoleic acid의 함량은 70.24%이었다. 홍화유와 CLA를 이용한 재구성 지질 합성 결과 24시간 반응 재구성 지질에 함유된 CLA 함량은 31.79 mol% 이었다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 한국과학재단의 목적기초 연구 (지역 우수과학자 지원사업, R05-2002-000-00033)지원으로 연구된 결과로 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Kim, J.H., Kwak, D.Y., Choi, M.S. and Moon, K.D. (1998) Comparison of the chemical compositions of korean and chinese safflower seed. Korean J. Food Sci. Technol., 30, 1203-1208
2. Kang, M.H., Song, E.S., Chung, H.K., Shim, K.B., Kang, C.W., Ryu, Y.H. and Lee, J.B. (2001) Comparison of oxidation stability in sesame, corn and safflower oils. Kor. J. Intl. Agri., 13, 115-120
3. Namba, T. (1986) Coloured illustrations of wakan-yaku, 1st ed., vol. 2, Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka Japan.
4. Baek, N.I., Bang, M.H., Song, J.C., Lee, S.Y. and Park, N.K. (1999) N-feruloylserotonin, antioxidative component from the seed *Carthamus tinctorius* L.. J. Korean Soc. agric. Chem. Biotechnol., 42, 366-368

5. Kim, E.Y. (2001) Synthesis of stigmastanol as a serum cholesterol-lowering substance using Pd catalyst. Korean J. Biotechnol. Bioeng., 16, 76-81
6. 김봉현 (2001) 식용유지 그 이용과 유지 식품. Naeha publishing company. pp. 88-91
7. Lee, I.B., Choi, K.J., Yu, K.K. and Chang, K.W. (1992) Tocopherols and fatty acids in plant seeds from Korea. J. Korean Agric. Chem. soc., 35, 1-5
8. Ha, Y.L. and Micheal, W.P. (1991) Naturally-occurring novel anticarcinogens : Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid(CLA). J. Kor. Soc. Food Nutr., 20, 401-407
9. Hur, S.J., Lee, J.I., Ha, Y.L., Park, G.B. and Joo, S.T. (2002) Biological activities of conjugated linoleic acid(CLA) and animal products. J. Anim. Sci. & Technol., (Kor) 44, 427-442
10. Lee, K.T. and Akoh, C.C. (1998) Structured lipids : synthesis and application. Food Rev. Int., 14, 17-34
11. Lee, K.T. and Akoh, C.C. (1996) Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. J. Am. Oil Chem. Soc., 73, 611-615
12. 이기동, 이정은, 권중호. (2000) 식품공업에서 반응표면분석의 응용. 한국식품과학회. 33, 33-63
13. 성내경 (1994) SAS/STAT 회귀분석/제3권 자유아카데미 서울, 한국
14. Bae, D.K., Choi H.J., Son J.H., Park, M.H., Bae, J.H., An, B.J., Bae, M.J. and Choi, C. (2000) Optimization for the process of extracts of persimmon leaf using response surface methodology. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 43, 218-224
15. Jeong, Y.J., Lee, G.D. and Kim, K.S. (1998) Optimization for fermentation condition of persimmon vinegar using response surface methodology. Korean J. Food Sci. Technol., 30, 1203-1208
16. Jeong, Y.J., Lee, M.H. and Lee, G.D. (1999) Monitoring for the process conditions of chitosan using response surface methodology. Korean J. Food Sci. Technol., 31, 558-563
17. Jeong, Y.J., Lee, M.H., Lee, G.D., Seo, J.H. and Kim, O.M. (2001) Establishment on the preparation condition of pumpkin honey *Kochujang* by response surface methodology. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30, 1102-1107