

초음파 추출공정을 이용한 닥나무로부터 항산화성분의 추출공정 최적화

이승범 · 박보라 · 유봉호^{*,†}

단국대학교 화학공학과, *단국대학교 공과대학
(2018년 6월 1일 접수, 2018년 6월 21일 심사, 2018년 7월 4일 채택)

Statistical Optimization of Antioxidant Extraction from *Broussonetia kazinoki* Using Ultrasound-assisted Extraction

Seung Bum Lee, Bo Ra Park, and Bong-Ho Yoo^{*,†}

Department of Chemical Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea

*College of Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea

(Received June 1, 2018; Revised June 21, 2018; Accepted July 4, 2018)

초 록

본 연구에서는 초음파 용매추출공정을 이용하여 닥나무로부터 항산화성분을 추출하고, 중심합성계획모델을 이용하여 추출공정을 최적화하였다. 중심합성계획모델의 반응치로는 추출수율과 DPPH 라디칼소거활성을 설정하고, 독립변수인 추출시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기에 따른 주효과도와 교호효과도를 해석하였다. 추출수율과 DPPH 라디칼소거활성 모두 계량인자의 주효과도와 교호효과도를 모두 고려하였을 때 가장 큰 영향을 미치는 인자는 주정/초순수 부피비였다. 반응표면분석법을 이용하여 추출공정의 최적화과정을 수행한 결과 최적추출조건은 추출시간 (19.92 min), 주정/초순수 부피비(54.23 vol%), 초음파 조사세기(557.65 W)로 나타났다. 이 조건으로부터 예상되는 반응치의 값은 추출수율(38.93 wt%), DPPH 라디칼소거활성(55.33%)으로 나타났다.

Abstract

In this study, the antioxidant was extracted from *Broussonetia kazinokii* using ultrasound-assisted extraction (UAE) and optimized by using a response surface methodology. The response value of the central composite design model establishes the extraction yield and the DPPH radical scavenging activity. The extraction time and temperature and volume ratio of ethanol/ultrapure water were selected as quantitative factors. When considering both the main and interaction effects, the factor having the greatest influence on the extraction yield and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was the volume ratio of ethanol/ultrapure water. The results of optimal extraction conditions were the extraction time (19.92 min), volume ratio of ethanol/ultrapure water (54.23%), and ultrasonic irradiation power (557.65 W). We could also obtained expected results of the yield = 38.93 wt% and DPPH radical scavenging activity = 55.33% under these conditions.

Keywords: antioxidant, *Broussonetia kazinokii*, central composite design model, ultrasound-assisted extraction (UAE)

1. 서 론

닥나무(*Broussonetia kazinoki*)는 뽕나무과 닥나무속에 속하는 갈잎 떨기 나무로써 아시아가 원산지이며, 한지를 만드는 원료로 쓰인다. 또한 닥나무의 줄기와 뿌리는 항산화와 항암효과에도 탁월한 효능을 갖고 있을 뿐 아니라 닥나무 추출물은 알부틴(arbutin), 나이아신 아마이드(niacinamide) 등과 같이 미백기능을 하는 천연 미백기능성분으로 주목받고 있다. 닥나무가 이러한 항산화 효과와 미백기능을 동시에 갖는 이유는 바로 활성산소종을 제거하는 유효성분이 함유되어 있기

때문이다. 인체의 호흡과 자외선 등으로 인해 생성된 체내의 활성산소는 반응성이 매우 크고 불안정하며 적정량이 있을 때 유익하지만 지나친 생성으로 인해 축적될 경우 세포의 산화를 일으켜 노화를 촉진시키고 이로 인해 다양한 질병을 유발한다[1-2]. 대표적으로는 노화와 활력감소의 직접적인 원인이 되는 과산화지질을 생성하기도 하고, 멜라닌 형성에 관여하는 효소인 tyrosinase를 활성화 시켜 멜라닌의 형성을 촉진한다. 닥나무에 함유되어 있는 폴리페놀 성분들은 활성산소종을 제거하여 이러한 질병을 예방하며 특히 카치놀류는 tyrosinase 활성을 저해하여 미백기능을 갖는 것으로 알려져 있다[3-4].

실험계획법이란 최소한의 실험으로 최대의 정보를 얻을 수 있는 방법으로 반응변수에 영향을 주는 유의한 요인효과들을 찾고 최적화하는 방법이다. 실험계획법 중 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)은 실험인자들의 수준을 변동시켜 어떠한 조합이 가장 최적의 결과를 도출하는지를 결정하는 분석법으로 실험 데이터를 적

† Corresponding Author: Dankook University,
College of Engineering, Gyeonggi 16890, Korea
Tel: +82-31-8005-3464 e-mail: bongho@dankook.ac.kr

Table 1. Response Surface Methodology of Three Variables and Corresponding Response Values

No.	Extraction conditions			Experimental data	
	EtOH (vol%)	Power (W)	Time (min)	Yield (wt%)	DPPH (%)
1	40	400	10	35.61	53.52
2	70	400	10	34.79	50.28
3	40	700	10	35.29	48.91
4	70	700	10	36.79	49.64
5	40	400	25	36.91	52.34
6	70	400	25	36.62	40.54
7	40	700	25	36.30	45.89
8	70	700	25	37.93	44.74
9	29.77311	550	17.5	34.25	44.32
10	80.22689	550	17.5	35.44	37.6
11	55	297.7311	17.5	37.98	44.78
12	55	802.2689	17.5	37.76	49.05
13	55	550	4.886554	37.63	41.76
14	55	550	30.11345	37.86	56.63
15	55	550	17.5	39.94	57.64
16	55	550	17.5	40.01	55.91
17	55	550	17.5	38.40	53.53
18	55	550	17.5	38.92	54.77
19	55	550	17.5	37.41	55.61
20	55	550	17.5	38.42	54.61

절한 모델함수에 적합화시키는 수리 통계적 기술이다[5-7]. 반응표면 분석법은 다양한 분석 방법 중의 하나이며, 이밖에 분산분석, 회귀분석 등이 있다. 본 연구에서 사용한 반응표면분석법은 계량인자(quantitative factor, X)와 반응치(response, Y)의 상관관계를 분석하여 이를 표면적으로 제시해 주어 실제 실험하지 않은 영역의 예상 반응치를 도출하고, 원하는 반응치를 얻을 수 있도록 계량인자의 수준을 최적화하는 통계 분석법이다[8-10]. 계량인자와 반응치는 다중 설정이 가능하며 각 계량인자에 따른 반응치의 상관관계를 회귀방정식으로 얻을 수 있다. 회귀방정식에는 독립적인 계량인자의 영향을 나타내는 항과 계량인자 간의 조합을 통해 나오는 영향을 나타내는 항이 있으며, 이는 각각 주효과(main effect)와 교호효과(interaction effect)라 칭한다. 이러한 회귀방정식을 수치학적으로 해석하여 3차원 표면 그래프와 등고선도 등을 도식화할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 닥나무로부터 항산화성분을 추출하는 초음파 용매추출공정(ultrasound-assisted extraction, UAE)의 최적화를 위해 반응표면분석법 중 중심합성계획모델(central composite design model, CCD model)을 이용하였다. 중심합성계획모델의 반응치로는 추출수율과 DPPH 라디칼소거활성(DPPH radical scavenging activity)을 설정하고, 독립변수로는 추출시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기 등을 설정하였다. 이를 바탕으로 중심합성계획모델로부터 산출된 회귀방정식을 이용하여 추출수율과 DPPH 라디칼소거활성을 동시에 만족하는 공통 최적화조건을 제시하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1. 초음파 용매추출공정

본 연구에서는 닥나무 줄기로부터 유효성분을 추출하기 위해 초음파 용매추출공정을 이용하였다. 실험에 사용된 용매로는 초순수(Vivagenen EXL-III)와 95%-주정(Daehan Ethanol Life Co.)을 이용하였으며, 용매 500 mL를 기준으로 분쇄된 닥나무시료의 양을 25 g으로 고정하여 실험을 수행하였다. 초음파 용매추출을 위해 초음파 발생장치는 Sonics & Material Inc.사의 ultrasonic generator (VCX-600, U.S.A)와 probe type (diameter: 0.5 in, threaded end, amplitude: 124 nm)의 horn을 사용하였다. 반응표면분석법의 계량인자로는 추출시간(10~25 min), 주정/초순수 부피비(40~70%), 초음파 조사세기(400~700 W) 등을 설정하였다. 기초실험으로부터 각 독립변수의 최적 추출범위를 결정된 후 중심합성계획모델을 이용하여 최적화 과정을 수행하였다. 이때 반응치로는 추출된 유효성분의 수율과 DPPH 라디칼소거활성을 선정하였다. 추출이 완료된 추출물은 여과 후 진공회전증발기(EYELA N-N type, Aspirator A-3S)를 이용하여 농축하고, -10 °C로 6 h 동안 동결한 후 냉동건조장치(LP3, Jouan, France)를 이용하여 -40 °C, 0.1 mbar의 조건에서 24 h 동안 건조하였다.

2.2. 추출수율 및 DPPH 라디칼소거활성 분석

닥나무로부터 추출된 유효성분의 추출수율은 추출 후 유효성분을 냉동건조한 양을 추출 전 시료의 양(25 g)으로 나눈 값(wt%)으로 정의하여 계산하였으며, 항산화 분석은 Lu와 Foo 등이 제안한 DPPH 라디칼소거활성을 측정하였다. 방법으로 진행하였다[11]. 0.2 mL의 시료 용액에 0.1 mL의 DPPH (15 mg/100 mL methanol) 용액을 가하여

10 min간 암실에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 무첨가군(control)과 비교하여 다음과 같이 DPPH 라디칼소거활성을 백분율(%)로 나타내었다[12-13].

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(\frac{\text{Abs}_{(\text{control})} - \text{Abs}_{(\text{sample})}}{\text{Abs}_{(\text{control})}} \right) \times 100 \quad (1)$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 중심합성계획모형을 적용한 추출조건 설계

본 연구에서는 실험 계획법 중 하나인 중심합성계획모형을 이용하여 실험 조건을 설계한 후 이에 따른 실험을 통해 추출조건을 최적화하고자 하였다. 중심합성계획모형은 각 계량인자의 최적범위와 최고범위를 설정한 후 꼭지점, 중심점, 축점을 지정하여 실험조건을 설계한다. 추출 공정은 초음파 용매추출을 이용하였으며, 계량인자로는 추출시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기로 설정하였다. 계량인자가 3개이므로 실험 수는 20가지이며, 중심점으로부터 축점까지의 거리를 의미하는 α 는 1.618로 설정하였다. 또한 각 계량인자의 범위는 추출시간은 10~25 min, 주정/초순수 부피비는 40~70 vol%, 초음파 조사세기는 400~700 W로 설정하였다. 실험을 통해 측정하고자 한 반응치는 추출수율과 DPPH 라디칼소거활성으로 설정하였다. 중심합성계획모형에 따라 설계된 실험 조건과 그에 따른 추출수율과 DPPH 라디칼소거활성을 정리하여 나타낸 결과는 Table 1과 같다.

3.2. 중심합성계획모형을 이용한 추출수율 최적화

중심합성계획모형을 적용하여 설계한 실험조건을 바탕으로 실험한 다나무의 추출수율에 관한 회귀방정식은 다음과 같다.

$$Y = 14.39 + 0.613E + 0.0112P + 0.373T - 0.006684E^2 - 0.000019P^2 - 0.00851T^2 + 0.000236EP + 0.00073ET - 0.000109PT \quad (2)$$

여기서 Y 는 반응치인 추출수율이고, E 는 주정/초순수 부피비, P 는 초음파 조사세기, T 는 추출시간이다. Figure 1은 위의 회귀방정식을 활용하여 추출수율에 따른 인자에 대한 영향을 각각 3차원 표면그래프와 등고선도로 나타낸 그림이다. 여기서 세 가지 계량인자 중 두 가지 인자에 대한 한 가지 인자의 고정값은 각각 추출시간 19.92 min, 주정/초순수 부피비 54.23 vol%, 초음파 조사세기 557.65 W로 하였다. 이러한 회귀 방정식을 통해 계량인자의 주효과도, 교호 효과도, 종합 만족도 등을 평가하였다. 본 연구에서 추출수율에 대한 주효과도인 추출시간, 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기가 추출수율에 대해 끼치는 정도를 수치화 하면 (주정/초순수 부피비) : (초음파 조사세기) : (추출시간) = 54.7 : 1.0 : 33.3으로 나타났다. 또한 두 인자의 조합으로 인한 영향을 나타내는 교호효과도의 경우 (주정/초순수 부피비 × 초음파 조사세기) : (주정/초순수 부피비 × 추출시간) : (초음파 조사세기 × 추출시간) = 2.2 : 6.7 : -1.0으로 나타났다. 주효과도에서 가장 큰 영향을 끼치는 인자인 주정/초순수 부피비로 인해 두 인자의 조합으로 나타나는 교호 효과도 또한 주정/초순수 부피비가 포함된 조합이 상대적으로 큰 영향을 끼쳤다. 주정/초순수 부피비와 그 다음으로 큰 효과를 갖는 추출시간의 조합이 교호효과도에서 가장 큰 수치를 보였다. 또한 초음파 조사세기와 추출시간의 조합으로 인한 교호효과도는 가장 낮은 것으로 나타났다. 한 가지 인자를 고정하고 두 가지

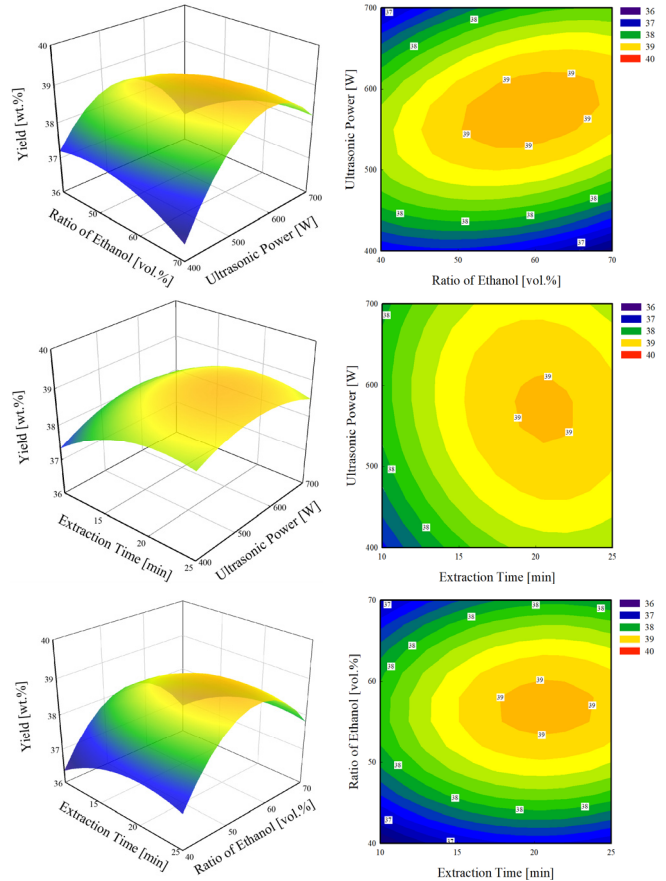


Figure 1. Response surface for yield of *Broussonetia kazinoki* extract at constant values as a function of time, ethanol concentration and power in UAE.

인자의 변화에 따른 추출수율의 경향성은 각 인자별로 다른 경향을 보였다. 주정/초순수 부피비를 54.23 vol%로 고정하였을 경우 초음파 조사세기와 추출시간의 변화에 따라 상대적으로 높은 추출수율을 보였으며, 초음파 조사세기와 추출시간을 각각 고정하였을 경우, 다른 두 인자의 변화에 따라 넓은 범위의 추출수율 변화를 보였다.

Figure 2는 한 가지 인자에 대한 나머지 두 가지 인자의 값을 고정하고 한 가지 인자의 값을 변화에 따른 추출수율의 변화율을 나타낸 그래프이다. 한 가지 인자에 대한 나머지 두 가지 인자의 고정값은 추출시간 19.92 min, 주정/초순수 부피비 54.23 vol%, 초음파 조사세기 557.65 W로 하였다. 또한 동일한 변화 범위를 위해 고정 값을 기준으로 전체 실험 범위의 10% 전후로 설정하였다. 전체 실험범위의 10% 전후에 따른 추출수율의 변화율도 주정/초순수 부피비가 가장 크게 나타났다. 반면에 추출시간과 초음파 조사세기의 경우 추출수율의 변화율은 거의 동일한 변화를 나타내었다. 3차원 표면 그래프와 등고선도, 그리고 섭동(perturbation) 그래프를 통해 추출수율에 가장 큰 영향을 끼치는 것은 주정/초순수 부피비임을 확인하였다[14].

3.3. 중심합성계획모형을 이용한 향산화능 최적화

중심합성계획모형을 적용하여 설계한 실험조건을 바탕으로 실험한 다나무의 DPPH 라디칼소거활성에 관한 회귀방정식은 다음과 같다.

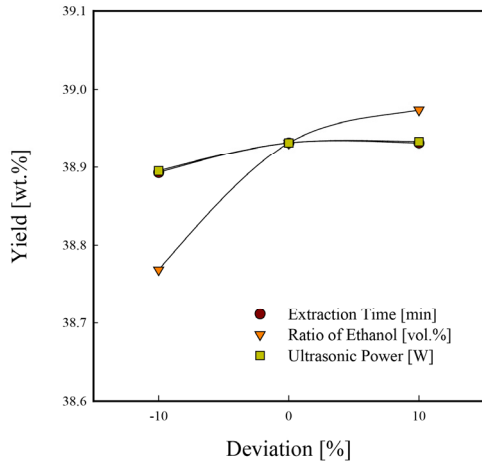


Figure 2. Perturbation plot for the effect of variables on extraction yield.

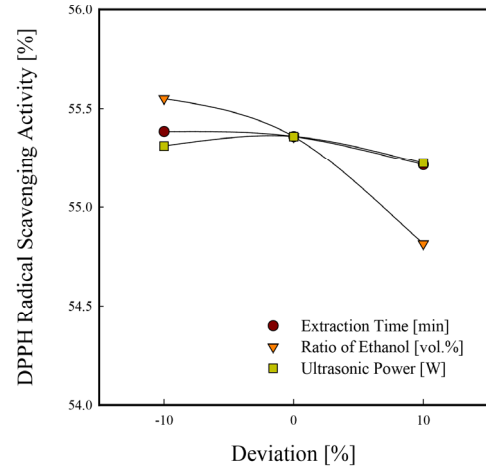


Figure 4. Perturbation plot for the effect of variables on DPPH radical scavenging activity.

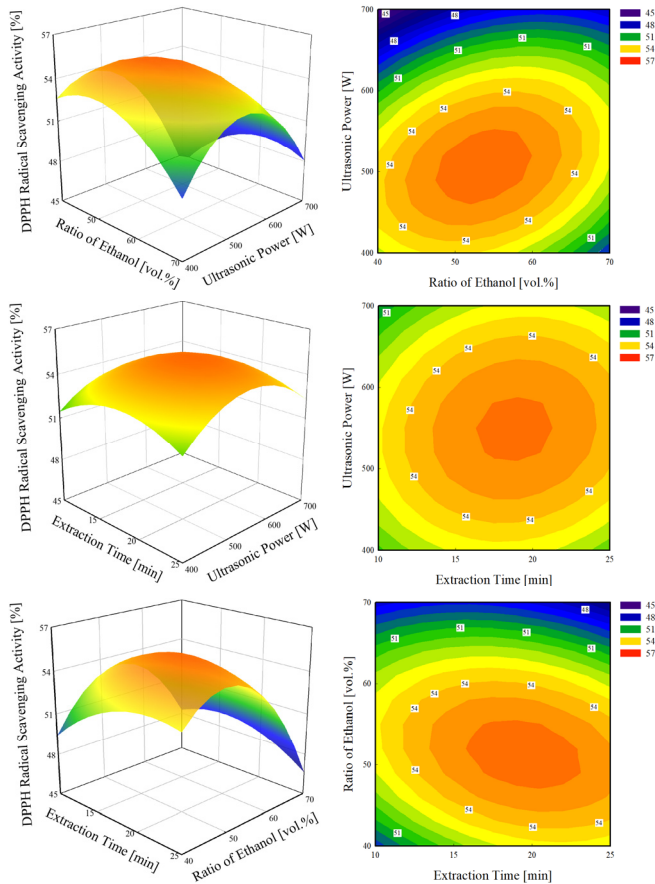


Figure 3. Response surface for DPPH radical scavenging activity of *Broussonetia kazinoki* extract in UAE.

$$D = -20.9 + 1.789E + 0.0628P + 1.46T - 0.01967E^2 - 0.000103P^2 - 0.0269T^2 + 0.000812EP - 0.0116ET + 0.00033PT \quad (3)$$

여기서 D 는 DPPH 라디칼소거활성을 나타내며, E 는 주정/초순수 부피비, P 는 초음파 조사세기, T 는 추출시간이다. 이 회귀방정식을 활용하여 DPPH 라디칼소거활성에 따른 인자에 대한 영향을 Figure 3에

3차원 그래프와 등고선도로 나타내었다. 주정/초순수 부피비, 초음파 조사세기, 추출시간에 대한 주효과도를 수치화하면 (주정/초순수 부피비) : (초음파 조사세기) : (추출시간) = 28.5 : 1.0 : 23.2로 나타났다. 교호효과도는 (주정/초순수 부피비 × 초음파 조사세기) : (주정/초순수 부피비 × 추출시간) : (초음파 조사세기 × 추출시간) = 2.5 : -35.2 : 1.0으로 나타났다. 초음파 조사세기와 추출시간의 조합으로 인한 교호효과도가 절대적으로 컸으며, 그에 반해 (주정/초순수 부피비 × 초음파 조사세기), (초음파 조사 세기 × 추출시간)에 대한 교호효과도는 상대적으로 미미하였다. 한 가지 인자를 최적값으로 고정하고 다른 두 가지 인자에 따른 DPPH 라디칼소거활성은 각 인자별로 다른 경향성을 보였다. 시간을 19.92 min으로 고정하였을 경우, 초음파 조사세기를 강하게 하였을 때, 주정/초순수 부피비에 상관없이 DPPH 라디칼소거활성은 적으로 낮게 나타났다. 주정/초순수 부피비를 54.23 vol%로 고정하였을 경우, 추출시간과 초음파 조사세기가 각각 중간값을 가질 때 가장 높은 DPPH 라디칼소거활성을 보였으며, 다른 3차원 표면그래프에 비해 좁은 범위의 변화를 보였다. 초음파 조사세기를 557.65 W로 고정하였을 때, 주정/초순수 부피비가 일정 범위를 지나 증가하면 추출시간에 관계없이 DPPH 라디칼소거활성은 점점 감소하는 경향을 보였다.

Figure 4는 추출수율과 마찬가지로 한 가지 인자의 전체 실험범위의 10% 전후에 따른 DPPH 라디칼소거활성에 대한 변화율을 나타낸 그래프이다. 주효과도에서 나타낸 크기의 순서와 동일하게 주정/초순수 부피비가 가장 변화율이 컸으며, 추출시간이 그 다음으로 큰 변화를 보였다. 초음파 조사세기의 경우 가장 작은 변화율을 보였다. 이를 통해 추출수율과 마찬가지로 DPPH 라디칼소거활성에 가장 큰 영향을 미치는 것은 주정/초순수 부피비임을 확인하였다[15-16].

3.4. 종합민족도 분석

Figure 5는 실험을 통해 얻은 반응치를 95% 신뢰구간 내의 확률도로 나타낸 그래프이다. 추출수율의 경우, 대부분의 실험 반응치가 예상 반응치와 비슷한 값을 보였으며 좁은 분포도를 보였다. DPPH 라디칼소거활성의 경우, 추출수율에 비해 상대적으로 넓은 분포도를 보였으며 이를 통해 추출수율이 DPPH 라디칼소거활성보다 정확도가 더 높으며 예측성이 좋은 모델이라 판단할 수 있다. 각각의 반응치 모두 상한선과 하한선의 범위 내에 모든 반응치가 존재하고 적합된 분

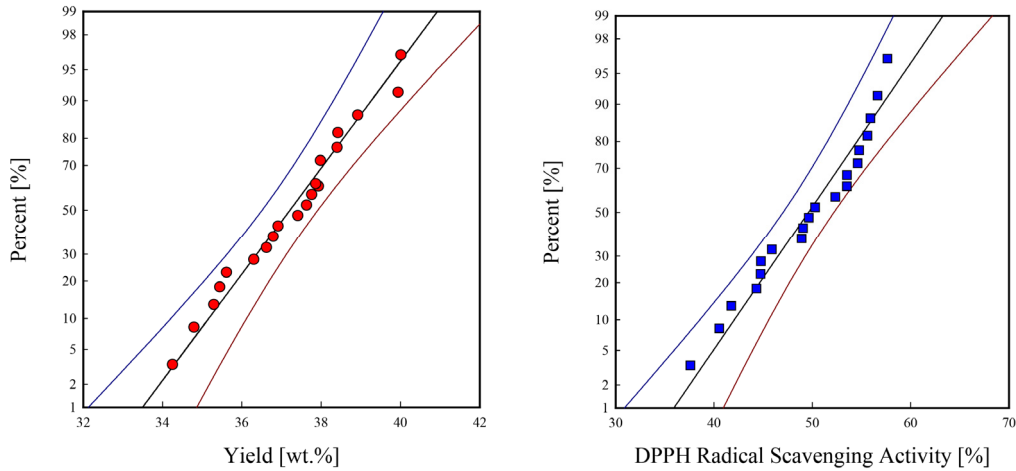


Figure 5. Scatter plot of yield and DPPH radical scavenging activity from *Broussonetia kazinoki* extracts.

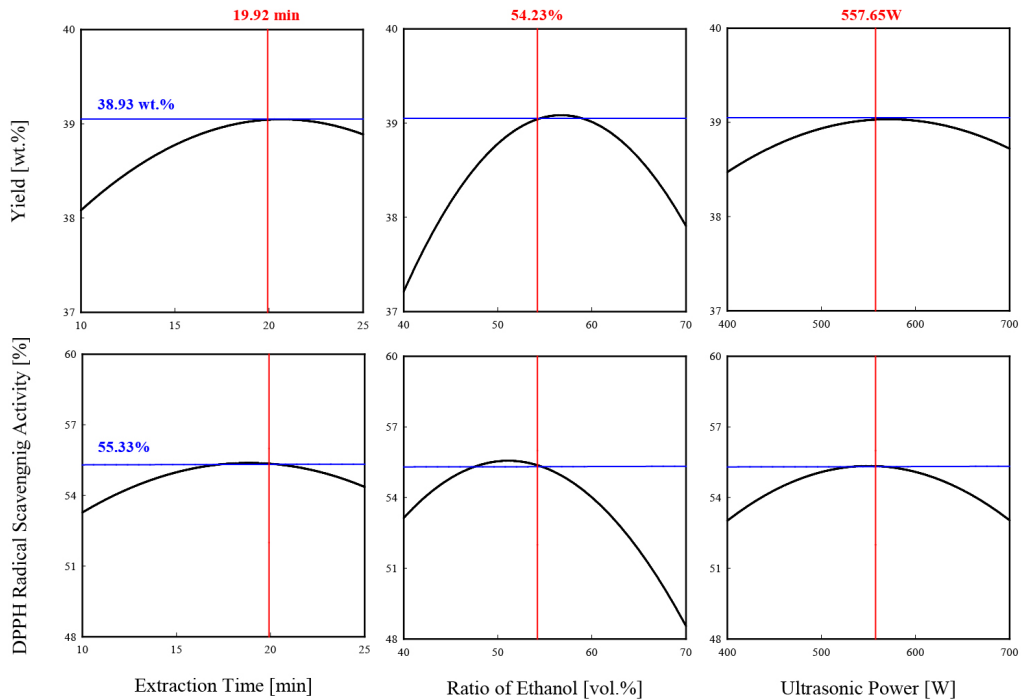


Figure 6. Optimization graph of response surface for yield and DPPH radical scavenging activity of *Broussonetia kazinoki*.

포선 나타내는 기준선을 크게 벗어나지 않으므로 데이터가 정규분포를 잘 따르며 적합한 데이터임을 나타내었다.

Figure 6은 추출수율과 DPPH 라디칼소거활성 등 두 반응치를 모두 만족하는 공통 최적화 종합만족도 그래프이다. 공통 최적조건은 추출시간 = 19.92 min, 주정/초순수 부피비 = 54.23 vol%, 초음파 조사세기 = 557.65 W로 나타났다. 이 조건으로부터 예상되는 반응치의 값은 추출수율 = 38.93 wt%, DPPH 라디칼소거활성 = 55.33%로 나타났다. 최적화에 따른 종합만족도는 $D = 0.85$ 가 나왔으며 수율과 DPPH 라디칼소거활성에 대한 회귀방정식의 결정계수 R^2 은 각각 85.17%, 77.3%이다. 또한 이 조건에서 실제 실험을 통해 확인한 결과 추출수율(38.6%), DPPH 라디칼소거활성(54.8%)으로 측정되어 오차율은 각각 0.84%, 0.96%로 나타났다.

4. 결 론

본 연구에서는 반응표면분석법 중 중심합성계획모델로 실험조건을 설계하고, 초음파 용매추출공정을 이용하여 다나무로부터 항산화성분을 추출하고, 중심합성계획모델을 이용하여 추출수율과 DPPH 라디칼소거활성을 공통 최적화한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 중심합성계획모델을 이용하여 각 독립변수에 대한 추출수율의 영향을 고찰한 결과 주효과도는 주정/초순수 부피비의 영향이 가장 큰 것을 알 수 있었고, 교호효과도의 경우 (주정/초순수 부피비 × 추출시간)의 영향이 가장 크게 나타났다. DPPH 라디칼소거활성의 경우에는 주효과도의 경우 주정/초순수 부피비와 추출시간이 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었고, 교호효과도의 경우에는 (주정/초순수 부피비 × 추출시간)의 영향이 크게 나타났다.

2. 두 가지 반응치인 추출수율과 DPPH 라디칼소거활성을 모두 만족하는 초음파 용매추출공정의 최적화과정을 수행한 결과 공통 최적 조건은 추출시간(19.92 min), 주정/초순수 부피비(54.23 vol%), 초음파 조사세기(557.65 W)로 나타났다. 이 조건으로부터 예상되는 반응치의 값은 추출수율(38.93 wt%), DPPH 라디칼소거활성(55.33%)로 나타났으며, 실제 실험값은 추출수율(38.6%), DPPH 라디칼소거활성(54.8%)로 오차율은 각각 0.84, 0.96%로 나타났다.

References

1. M.-Y. Lee, M.-S. Yoo, Y.-J. Whang, Y.-J. Jin, M.-H. Hong, and Y.-H. Pyo, Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruits peels, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**(5), 540-544 (2012).
2. I. K. Hong, B. R. Park, G. S. Jeon, and S. B. Lee, Extraction of flavonoid components from persimmon leaf, thistle and new green, *Appl. Chem. Eng.*, **27**(3), 276-279 (2016).
3. J.-H. Ryu, H. Ahn, and H. J. Lee, Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kaziniki*, *Fitoterapia*, **74**(4), 350-354 (2003).
4. A. Y. Kim, C. G. Lee, D. Y. Lee, H. Li, R. O. Jeon, J.-H. Ryu, and S. G. Kim, Enhanced antioxidant effect of prenylated polyphenols as Fyn inhibitor, *Free Radic. Biol. Med.*, **53**(5), 1198-1208 (2012).
5. S. Yavari, A. Malakahmad, N. B. Sapari, and S. Yavari, Sorption properties optimization of agricultural wastes-derived biochars using response surface methodology, *Process Saf. Environ. Prot.*, **109**, 509-519 (2017).
6. A. A. D'Archivio and M. A. Maggi, Investigation by response surface methodology of the combined effect of pH and composition of water-methanol mixtures on the stability of curcuminoids, *Food Chem.*, **219**, 414-418 (2017).
7. G. I. Danmaliki, T. A. Saleh, and A. A. Shamsuddeen, Response surface methodology optimization of adsorptive desulfurization on nickel/activated carbon, *J. Ind. Eng. Chem.*, **313**, 993-1003 (2017).
8. P. E. Ohale, C. F. Uzoh, and O. D. Onukwuli, Optimal factor evaluation for the dissolution of alumina from Azaraegbelu clay in acid solution using RSM and ANN comparative analysis, *S. Afr. J. Chem. Eng.*, **24**, 43-54 (2017).
9. P. Verm and M. P. Sharm, Comparative analysis of effect of methanol and ethanol on Karanja biodiesel production and its optimisation, *Fuel*, **180**, 164-174 (2016).
10. S.-M. Huang, C.-H. Kuo, C.-A. Chen, Y.-C. Liu, and C.-J. Shieh, RSM and ANN modeling-based optimization approach for the development of ultrasound-assisted liposome encapsulation of piceid, *Ultrason. Sonochem.*, **36**, 112-122 (2017).
11. Y. Lu and L. Y. Foo, Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols apple pomace, *Food Chem.*, **68**, 81-85 (2000).
12. I. Hamlaoui, R. Bencheraiet, R. Bensegueni, and M. Bencharif, Experimental and theoretical study on DPPH radical scavenging mechanism of some chalcone quinoline derivatives, *J. Mol. Struct.*, **1156**, 385-389 (2018).
13. M. Zamani, A. M. Delfani, and M. Jabbari, Scavenging performance and antioxidant activity of γ -alumina nanoparticles towards DPPH free radical: Spectroscopic and DFT-D studies, *Spectrochim. Acta A*, **201**, 288-299 (2018).
14. S. A. Park, J. H. Ha, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Broussonetia kazinoki* SIEB extracts, *Appl. Chem. Eng.*, **24**(2), 177-183 (2013).
15. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199-1200 (1958).
16. H.-J. Lee, J.-H. Park, D.-I. Jang, and J.-H. Ryu, Antioxidant components from *Broussonetia kazinoki*, *Yakhak Hoeji*, **41**(4), 439-443 (1997).