

## 반응표면 분석법을 이용한 치아씨 항산화 활성 추출의 최적화 조건

한 기 영 · \*최 진 영\*

서울여자대학교 식품공학과, \*신한대학교 식품조리과학부

### Optimization for Chia Seed Antioxidative Activity of Solvent Extraction Using the Response Surface Methodology

Kee-Young Han and \*Jin-Young Choi\*

Dept. of Food Science and Technology, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea

\*Division of Food Science and Culinary Arts, Shinhan University, Uijeongbu 11644, Korea

#### Abstract

The purpose of this study was to determine the optimum conditions of solvent extraction type and solvent concentration (60, 70, 80%, v/v), extraction time (30, 80, 130 mins) and extraction temperature (10, 15, 20°C) in order to increase the antioxidant activity of the chia seed. The total polyphenol content and DPPH radical scavenging activity was measured by using response surface methodology (RSM) to establish the optimal conditions. Using ethanol and methanol extractions at extraction concentrations of 60%, and time and temperature of 130 mins and 20°C, the maximum total polyphenol content was 871.00 mg% ( $R^2=0.9507$ ) and 557.70 mg% ( $R^2=0.9784$ ) for ethanol and methanol extraction respectively. Using the same extraction conditions, the maximum level of DPPH radical scavenging activity was 72.14% ( $R^2=0.9675$ ) and 52.79% ( $R^2=0.9524$ ) for ethanol and methanol extraction respectively. The results indicate that ethanol extracts showed a higher antioxidant activity than methanol extracts. The ethanol extraction conditions of response surface analysis (RSA) were affected more by ethanol concentration than by extraction time or temperature. In contrast, the methanol extraction conditions of response surface analysis (RSA) were affected more by extraction time. Based on the RSM, the optimum ethanol extraction conditions were the following: extraction concentration, 63%; time, 100 mins; and temperature, 18°C. The optimum methanol extraction conditions were the following: extraction concentration, 65%; time, 120 mins; and temperature, 16°C.

Key words: chia seed, antioxidative activity, solvent extraction, response surface methodology

#### 서 론

치아씨(*Salvia hispanica* L.)는 'chia'라 불리며, 차조기과(Lamiaceae)의 민트 속에 1년생 식물로(Cha KY 2011), 치아씨 100 g에 식이섬유 39 g, 단백질 14 g, 지방 31 g, 기타 등으로 이루어져 식이섬유가 많이 함유되어 있고(USDA 2010), 치아씨의 지방은 총지방의 25~38%를 차지하며, 몸에 좋은 불포화지방산인  $\alpha$ -linolenic acid가 많이 함유되어 있다고 한다(Ayerza JR 1995). 이와 같이 고농도의 불포화지방산을 가지

고 있는 치아씨는 천연 지질의 산화 방지제로 연구되기 시작하였고(Taga 등 1984), 치아씨의 미정제 추출물에서 확인된 주요 화합물로는 quercetin과 kaempferol이 있으며, caffeic acid와 chlorogenic acid는 저농도로 존재하였다고 한다(Reyes-Caudillo 등 2008). 치아씨는 항산화 잠재력을 가지고 있어 혈압을 내리는 작용을 하기 때문에 인간의 식이 요법에서 중요한 요소가 될 수 있다고 보았으며(Orona-Tamayo 등 2015), 식이섬유 함량이 높아 변비예방 및 치료에 효과를 보일 수 있어 치아씨 분말을 첨가한 식빵으로도 개발되어졌다(Lee SB 2013). 또한

\* Corresponding author: Jin-Young Choi, Division of Food Science and Culinary Arts, Shinhan University, Uijeongbu 11644, Korea. Tel: +82-31-870-3517, Fax: +82-31-870-3519, E-mail: bluechoi@shinhan.ac.kr

기름과 계란의 대용품으로 치아씨 겔을 사용한 케이크(Borneo 등, 2010), 안정제와 유허제로서 치아씨 점질물을 사용한 아이스크림(Campos 등 2016) 등에도 치아씨를 사용하였다. 그리고 치아씨로부터 추출한 검류가 다른 검류보다도 우수한 증점제로서의 가능성을 보였고(Timilsena 등 2016), 치아씨 점질물로부터 생산한 edible film의 잠재력을 확인할 수 있었다(Dicka 등 2015).

최근에는 항산화 작용에 대한 연구들이 증가하고 있는 추세이다. 녹차, 우롱차, 홍차(Lee 등 1998), 석류씨(Koh 등 2005), 복분자(Cho 등 2005), 감초(Kim 등 2006), 차조기 잎(Kim 등 2007), 산사(Nam 등 2015) 등 다양한 재료를 대상으로 한 추출물들의 항산화 활성에 대한 연구가 있었고, 산딸기(Lee & Lee 2015), 진피(Lee 등 2015), 오미자(Kim 등 2009) 등의 재료에서 추출용매나 추출조건을 달리하여 항산화 활성을 높이고자 하는 연구가 이루어지고 있다. 이러한 논문들의 항산화 조건 측정 시 추출용매로 대부분 물, 에탄올, 메탄올을 많이 사용하고 있다. 복숭아의 항산화 측정을 위해 에탄올, 메탄올, 아세톤, 물의 네 가지 추출용매, 추출용매의 농도와 산도, 추출온도, 추출시간을 다르게 한 결과, 산을 넣지 않은 60% 아세톤으로 25°C에서 180분 추출한 것이 가장 항산화력이 높은 추출조건으로 나타났다(Mokrani & Madani 2016). 발효된 콩가루의 항산화 측정을 위해 물:에탄올:메탄올의 비율을 달리하여 분석한 결과, 총 페놀 함량의 최적조건은 0.5:0.375:0.125 (wt/wt/wt)로 나타나, 한 가지 용매로 추출하는 방법뿐만 아니라, 두 가지 이상의 용매로 비율을 달리하여 추출하는 방법을 보여주어(Handa 등 2016) 항산화 분석에서 물, 에탄올, 메탄올 등을 추출용매로 많이 사용한다는 것을 알 수 있었다. Ixtaina 등(2011)의 치아씨 기름 특성연구에서 n-헥산, acetonitrile, 초산과 같은 추출용매는 기름추출용으로 사용되었고, 페놀함량 측정을 HPLC를 이용해 분석하였기 때문에 용매로 acetonitrile 과 초산을 이동상으로 사용하여 지방을 중요한 요소로 본 실험에서 헥산, 초산과 같은 용매를 추출용매로 사용했다는 것을 알 수 있었다. 치아씨는 물과 만나면 복잡한 고분자의 다당류가 추출되어져서 용매의 점도가 증가하게 되고(Lin & Daniel 1994), 치아씨와 물의 비율을 1:40으로 하여 추출하면

(pH 8.0, 80°C), 2시간 후 물의 흡수가 완전히 끝났기 때문에 치아씨의 무게가 그대로 유지된다고 하여(Muñoz 등 2012) 치아씨의 추출용매로 사용하기에는 물의 흡수능력을 고려해서 선택해야할 것이다.

이처럼 치아씨에 대한 항산화 활성의 연구는 미비한 실정이고, 용매의 종류에 따른 항산화 활성의 최적 추출조건에 대한 연구도 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 치아씨 항산화 활성을 규명하기 위하여 추출용매의 종류나 농도, 시간, 온도를 달리하여 항산화 활성 실험을 수행하였고, 반응표면분석을 통하여 추출조건 최적조건을 구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 연구의 실험 재료인 치아씨(chia seed)는 온라인 쇼핑몰에서 구입하였으며, 2014년에 파라과이에서 생산된 것을 구입하여 가정용 분쇄기(Hanil HMF-600, Korea)로 분쇄 후, 20 mesh체를 통과시켜 실험에 사용하였다.

### 2. 시료 추출방법

시료의 추출방법은 치아씨 10 g을 취하여 메탄올과 에탄올(60, 70, 80%)을 용매로 사용하였으며, 추출장치는 온도, 시간, 진탕속도를 조절할 수 있는 shaking incubator(Vision Scientific Co., Ltd., Buchon, Korea)를 사용하였다. 이때 온도 조건은 10°C, 15°C, 20°C에서 각각 30분, 80분, 130분 동안 추출하였다. 추출 후 3,000 rpm으로 20분간 원심분리를 한 후 각각의 조건별로 여과하여 추출물의 항산화 특성 측정에 사용하였다.

### 3. 추출조건 최적화를 위한 실험 계획

용매 추출조건 최적화를 시키기 위하여 추출조건 실험계획은 중심합성계획에 따라 독립변수( $X_n$ )는 에탄올 농도비(60, 70, 80%,  $X_1$ ), 추출 시간(30, 80, 130 mins,  $X_2$ ) 및 추출 온도(10, 15, 20°C,  $X_3$ )로 추출 공정의 주요 변수로 작용할 수 있게 하였으며, Table 1과 같이 3단계로 부호화하여 20구간으로 추출 공정을 설정하였다. 이들 요인에 의해 영향을 받는

Table 1. Level in extraction condition for chia seed based fractional factorial design

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
$X_1$	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1	-1	1	
$X_2$	-1	-1	-1	0	0	0	1	1	1	-1	-1	-1	0	0	0	1	1	1	-1	1	
$X_3$	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0

$X_1$ : Solvent extraction concentration (%)

$X_2$ : Solvent extraction time (min)

$X_3$ : Solvent extraction temperature (°C)

치아씨 추출물의 항산화 활성에 관한 종속변수로는 추출물의 총 페놀 화합물( $Y_1$ )과 DPPH 라디칼 소거활성( $Y_2$ )을 중심으로 회귀분석하였다. 이들은 각각 3회 반복 측정하여 평균 값을 회귀분석에 사용하였으며, 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_{11} + b_{22}X_{22} + b_{33}X_{33} + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

이때  $Y$ 는 종속변수로서 용매로 추출한 치아씨의 항산화 특성이고,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ 는 독립변수로서 용매추출조건,  $b_0$ 는 회귀계수이다.

#### 4. 분석방법

##### 1) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법에 따라 Folin-Ciocalteu's phenol reagent가 각 시료의 페놀성 화합물에 의해 환원된 결과, 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 분석하였다 (Hong 등 1995). 각 처리조건별 치아씨 추출시료 80  $\mu$ L에 2% sodium carbonate 용액 100  $\mu$ L를 가한 후 5분간 방치한 후 50% Folin-Ciocalteu reagent(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 20  $\mu$ L를 가하였다. 상온에서 30분간 방치 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선(에탄올  $y = 0.0086x + 0.103132$ ,  $R^2 = 0.98$ , 메탄올  $y = 0.0086x + 0.1130$ ,  $R^2 = 0.97$ )으로 부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

##### 2) DPPH 라디칼 소거능

추출물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 처리조건별로 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 의한 전자공여능(electron donating ability, EDA)은 Blois MS(1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉,  $1 \times 10^{-4}$  M DPPH(Sigma-Aldrich) 용액(99.9% methanol에 용해) 150  $\mu$ L를 치아씨 추출물 시료 50  $\mu$ L와 혼합하여 상온의 암소에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 셀에 분주되는 각 시료에 의한 흡광도의 차이는 각각의 용매만의 흡광도를 측정하여 보정해 주었고, DPPH 라디칼 제거능은 다음의 식에 의해 전자공여능을 산출하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \frac{\text{무첨가구의 흡광도} - \text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \times 100$$

##### 5. 통계처리

각 추출조건별 3회 이상 반복 실험한 결과에 대하여 SAS (statistical analysis system, Version 9.1) 프로그램을 이용하여

반응표면분석(response surface methodology, RSM)으로 실시하였다. 각 실험군에 대한 유의차 검정은 분산분석을 한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하여 추출 조건에 따른 활성을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 총 폴리페놀 함량

에탄올과 메탄올의 농도, 온도와 시간별 추출조건을 달리 하여 치아씨 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과, Table 2 및 Fig. 1과 같이 나타났다. 치아씨 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 ANOVA test와 Duncan 사후검정을 한 결과, 에탄올 추출농도 60%, 추출시간 130분과 추출온도 20°C에서 871.00 mg%로 가장 많은 함량은 나타났으며, 80% 30분과 10°C에서는 258.66 mg%( $F$ -value: 33.745,  $p < 0.0001$ )로 가장 적은 함량을 보였다( $p < 0.05$ ). 에탄올 추출물에서는 에탄올 함량이 적을수록 추출시간과 추출온도는 높을수록 총 페놀 함량이 유의적으로 증가함을 보였으며, 가장 추출량이 많은 것은 에탄올 농도는 60%, 추출시간은 130분, 추출온도는 20°C임을 알 수 있었다. 또한 메탄올의 치아씨 추출 시 총 폴리페놀 함량은 60%, 130분과 20°C에서 557.70 mg%로 가장 많은 함량을 보였으며, 80%, 30분과 10°C에서 269.22 mg%( $F$ -value: 14.97,  $p < 0.0001$ )로 가장 적은 함량을 보였다( $p < 0.05$ ). 그러나 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 60%, 130분, 20°C의 추출조건에서 최대값을 보였으나, 같은 시간, 온도에서 70%와 80% 메

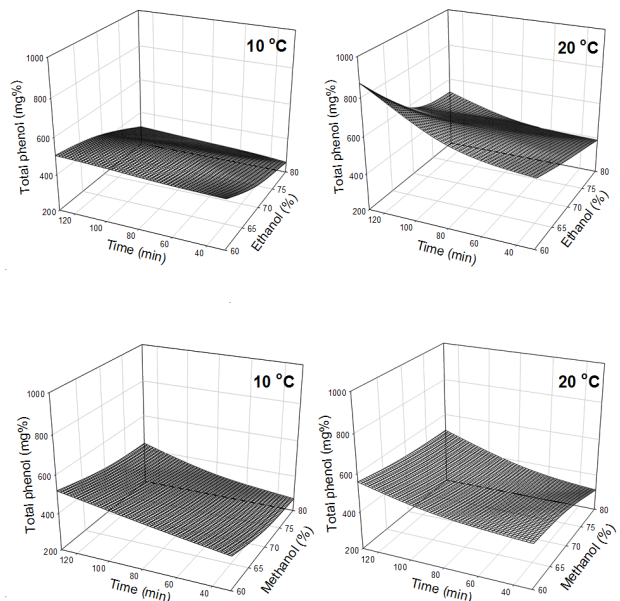


Fig. 1. Total polyphenol of chia seed by central composite experimental design for response surface analysis.

**Table 2. Extraction total polyphenol content and DPPH scavenging activity of chia seed by central composite experimental design for response surface analysis**

Response variables			Total polyphenol (mg%)		DPPH (%)	
			Ethanol	Methanol	Ethanol	Methanol
60	30	10	468.76±47.31 <sup>fighi</sup>	378.52±18.6 <sup>fighi</sup>	41.00±2.64 <sup>fg</sup>	30.43±2.13 <sup>gh</sup>
70	30	10	333.05±47.66 <sup>kl</sup>	299.07±5.29 <sup>j</sup>	36.36±3.31 <sup>hi</sup>	26.40±0.17 <sup>i</sup>
80	30	10	258.66±27.10 <sup>m</sup>	269.22±46.66 <sup>j</sup>	18.94±0.96 <sup>m</sup>	19.89±1.01 <sup>j</sup>
60	80	10	483.80±49.43 <sup>efghi</sup>	444.39±29.00 <sup>cdef</sup>	42.17±2.53 <sup>ef</sup>	38.41±3.37 <sup>de</sup>
70	80	10	433.04±48.81 <sup>hij</sup>	385.00±35.15 <sup>figh</sup>	37.65±2.92 <sup>gh</sup>	36.34±0.94 <sup>ef</sup>
80	80	10	287.38±31.42 <sup>lm</sup>	323.37±44.46 <sup>hij</sup>	22.60±2.47 <sup>l</sup>	33.28±1.35 <sup>figh</sup>
60	130	10	503.74±29.75 <sup>defgh</sup>	517.74±30.18 <sup>ab</sup>	45.31±1.29 <sup>de</sup>	48.56±0.32 <sup>b</sup>
70	130	10	436.58±40.88 <sup>hij</sup>	456.00±39.40 <sup>bcd</sup>	40.82±1.74 <sup>fg</sup>	46.55±1.31 <sup>bc</sup>
80	130	10	308.91±25.78 <sup>lm</sup>	435.75±37.52 <sup>defg</sup>	30.13±0.71 <sup>ik</sup>	37.83±2.23 <sup>de</sup>
60	30	20	568.87±42.10 <sup>cd</sup>	434.79±13.95 <sup>defg</sup>	52.93±0.58 <sup>c</sup>	33.38±2.59 <sup>figh</sup>
70	30	20	473.38±38.22 <sup>efghi</sup>	399.07±22.96 <sup>efg</sup>	37.39±1.25 <sup>b</sup>	38.67±2.19 <sup>de</sup>
80	30	20	387.73±46.34 <sup>ik</sup>	314.23±49.63 <sup>ji</sup>	29.25±1.10 <sup>k</sup>	32.16±1.31 <sup>gh</sup>
60	80	20	644.38±38.94 <sup>b</sup>	469.73±13.83 <sup>bcd</sup>	57.99±2.05 <sup>b</sup>	44.75±0.72 <sup>c</sup>
70	80	20	547.65±66.10 <sup>cde</sup>	406.64±28.41 <sup>defg</sup>	46.02±3.63 <sup>d</sup>	40.61±1.83 <sup>d</sup>
80	80	20	411.82±49.45 <sup>ji</sup>	374.85±39.36 <sup>ghi</sup>	33.25±2.48 <sup>ji</sup>	35.22±0.83 <sup>efg</sup>
60	130	20	871.00±32.05 <sup>a</sup>	557.70±67.47 <sup>a</sup>	72.14±2.92 <sup>a</sup>	52.79±3.27 <sup>a</sup>
70	130	20	587.37±44.83 <sup>bc</sup>	518.05±49.12 <sup>ab</sup>	52.65±1.41 <sup>c</sup>	45.34±2.88 <sup>bc</sup>
80	130	20	521.69±35.45 <sup>cdef</sup>	506.60±37.13 <sup>abc</sup>	41.74±2.66 <sup>ef</sup>	38.58±1.83 <sup>de</sup>
60	30	15	500.86±23.85 <sup>efgh</sup>	402.84±29.24 <sup>defg</sup>	47.08±1.04 <sup>d</sup>	31.46±1.08 <sup>h</sup>
80	130	15	511.63±31.49 <sup>defg</sup>	515.98±24.06 <sup>ab</sup>	38.40±1.69 <sup>figh</sup>	35.89±0.77 <sup>ef</sup>

<sup>1)</sup> The number of experimental condition by central composite design.

<sup>2)</sup> Results were expressed as the average of triplicate samples with mean±S.D. (n=3).

<sup>3)</sup> Any means in the same column followed by the same letter are not significantly ( $p<0.05$ ) different by Duncan's multiple range test.

탄을 추출물의 총 폴리페놀 함량과는 유의적인 차이가 없었다. 따라서 메탄올 추출물에서는 메탄올의 농도는 총 폴리페놀 함량에 크게 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 이는 메탄올은 휘발성이 강하여 온도에 대한 영향이 크게 작용하지 않은 것으로 사료되며, 이는 낮은 온도로 추출한 메탄올 추출 조건에서도 10℃의 낮은 온도조건에서는 용매농도 70%와 80%에서도 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 80% 메탄올 농도에서는 10℃ 온도에서는 30분과 80분에서는 총 폴리페놀 함량에 유의적 차이가 없었으며, 메탄올 추출시간이 30분 일 때는 10℃와 20℃에서도 차이가 없었다( $p<0.05$ ). 따라서 메탄올 추출조건에서는 메탄올추출 농도보다는 130분 추출 시간과 20℃ 추출온도에서 가장 많은 총 폴리페놀 함량을 보여, 추출시간과 온도가 더 큰 영향을 미친 것으로 보였다. 에탄올과 메탄올의 추출조건에 따른 총 폴리페놀의 함량을 비교한 결과에서는 60%, 130분과 20℃에서 총 폴리페놀 함량이 최대값을 보인 추출조건에서는 에탄올이 메탄올보다 300 mg%

이상의 함량 차이를 보였으며, 이는 용매의 휘발성과도 차이를 보인다고 생각된다. 결과적으로 치아씨 추출조건을 달리 한 총 폴리페놀 함량을 측정 한 결과에서는 용매별로는 에탄올로 추출 시, 추출시간은 130분, 추출온도는 20℃에서 유익적으로 가장 많은 총 폴리페놀 함량을 보였다. 이는 Kim 등 (1996)이 대두 추출물에서 물과 에탄올, 물과 메탄올을 10%에서 100%로 사용하여 냉추출과 환류추출하였을 때 냉추출에서는 용매농도가 작을수록, 환류추출 시에는 용매농도가 높을수록 대두추출물의 수율이 증가하는 것을 볼 수 있어 본 논문의 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다.

## 2. DPPH에 의한 전자공여능

DPPH에 의한 전자공여능은 천연물의 활성 라디칼에 전자를 공여하고 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 특성을 가지고 있어 항산화 효과를 나타내는데 중요한 역할을 하고 있다 (Kim 등 2001). 본 실험에서는 에탄올과 메탄올의 농도, 온도

와 시간별 추출조건을 달리하여 치아씨 추출물의 DPPH 전자공여능을 측정 후 ANOVA test와 Duncan 사후검정을 한 결과는 Table 2 및 Fig. 2와 같이 나타났다. 치아씨 에탄올 추출물의 DPPH 전자공여능은 에탄올 추출농도 60%, 추출시간 130분과 추출온도 20°C에서 72.14%로 가장 많은 항산화능을 보였고, 80%, 30분과 10°C에서는 18.94%( $F$ -value: 95.31,  $p < 0.0001$ )로 가장 낮은 항산화능을 나타냈다( $p < 0.05$ ). 에탄올 추출농도, 시간과 온도에 따라 3배 이상의 유의적 차이를 보였으며, 에탄올 농도별로는 60%에서 가장 전자공여능의 활성이 높았고, 에탄올 추출시간은 130분에서 가장 높았고, 추출온도에서는 10°C보다는 20°C에서 전자공여능 활성이 높게 나타났다( $p < 0.05$ ). 따라서 치아씨의 에탄올 추출물의 DPPH 전자공여능 활성은 총 폴리페놀에서와 같은 추출조건을 보여 60% 추출농도, 130분 추출시간과 20°C 추출온도에서 가장 높은 활성을 보였다. 한편, 메탄올을 이용한 치아씨 추출조건에서는 60%, 130분과 20°C에서 72.14%로 가장 전자공여능 활성을 보였으며, 80%, 30분과 10°C에서 19.89%( $F$ -value: 53.36,  $p < 0.0001$ )로 가장 적은 함량을 보였다( $p < 0.05$ ). 메탄올 추출조건에서는 에탄올보다는 전자공여능 활성이 적게 나타났으나, 10°C 온도조건에서는 에탄올 추출물보다 전자공여능 활성이 높게 나타났다. 이는 메탄올 추출 조건에서는 추출온도가 10°C에서는 추출시간이 길어질수록 전자공여능 활성이 높아지나, 반면에 추출온도 20°C에서는 추출시간이 길어질수록 전자공여능의 활성이 80% 메탄올 농도보다는 60%와 70% 메탄올 추출조건에

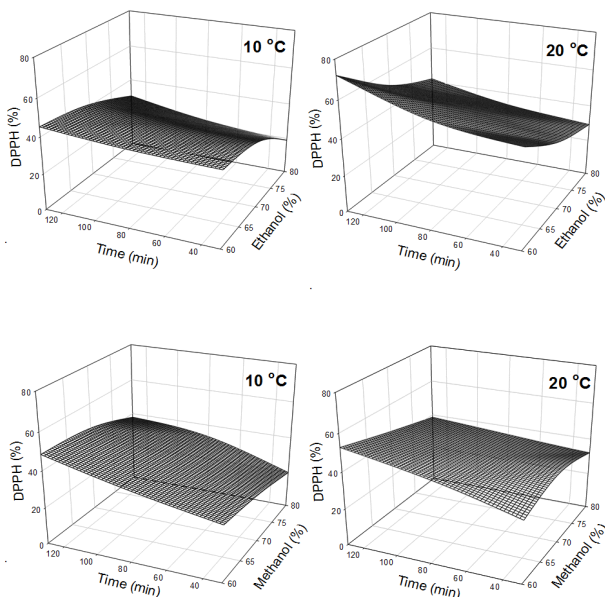


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of chia seed by central composite experimental design for response surface analysis.

서 전자공여능 활성이 높게 나타남을 보였다. 따라서 메탄올 추출조건은 농도보다는 온도에 영향을 더 많이 받는 것을 알 수 있었다. 결과적으로 메탄올을 추출용매로 사용할 경우에는 추출온도 조건을 낮게 조정하는 것이 더 이상적인 추출 방법인 것으로 생각된다. 에탄올과 메탄올의 용매별로는 같은 추출조건에서는 에탄올 추출조건에서 20% 이상의 DPPH 전자공여능 활성을 보여 메탄올보다는 에탄올 추출조건이 더 항산화 활성에 좋은 효과를 보이는 것으로 나타났다. Choi 등(2008)은 유자종실류에서 물, 메탄올과 에탄올 등의 용매 종류를 달리하여 항산화 활성을 측정한 결과, 과채류에서 총 폴리페놀 화합물과 DPPH 라디칼 소거활성은 큰 상관관계가 있는 것으로 보고하여 본 논문과 일치하는 결과를 보였다.

### 3. 반응표면 통계분석

치아씨 항산화 효과를 측정하기 위하여 에탄올과 메탄올을 이용하여 추출한 뒤, 반응표면분석(Table 2)에 따라 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능을 SAS를 이용하여 최적화를 시킨 결과는 Table 3-5와 같았다. 치아씨 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량의 회귀분석 결과, Table 3과 같이 결정계수  $R^2=0.9507$ 로 유의성이 인정되었으며( $p < 0.0001$ ), 일차항에서만 영향력을 미치는 것을 알 수 있었다( $p < 0.0001$ ). 또한 총 폴리페놀 함량(Y)에 대한 추출농도( $X_1$ ), 추출시간( $X_2$ )와 추출온도( $X_3$ ) 간의 관계를 반응표면으로 분석한 결과(Table 4)  $Y=450.67 - 113.70X_1+61.57X_2+83.33X_3+30.11X_2X_3$ 의 회귀방정식을 얻었으며, 추출농도, 시간과 온도에 유의적으로 영향을 받는 것으로 나타났다( $p < 0.001$ ). 이때 추출조건인 에탄올 농도( $F=20.32$ )에서 음의 효과로 가장 큰 영향력을 주었으며, 다음이 추출온도( $F=17.49$ ) 조건으로서 총 폴리페놀 함량을 증가시켰다. 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량에서도 반응표면분석 후 회귀분석 결과(Table 3~5), 결정계수는  $R^2=0.9784$ 로 유의성이 인정되었으며( $p < 0.0001$ ), 일차항에서만 영향력을 미치는 것을 알 수 있었다( $p < 0.0001$ ). 또한  $Y=385.24 - 48.24X_1+74.75X_2+26.26X_3 - 2.37X_2X_3$ 의 회귀방정식을 얻었으며, 추출조건인 메탄올 추출농도( $X_1$ ), 추출시간( $X_2$ )와 추출온도( $X_3$ ) 효과는 유의적으로 나타났으며( $p < 0.001$ ), 이때  $F$ 값은 37.03, 64.46, 11.64로 추출시간이 가장 많은 영향을 미치며, 다음으로는 추출농도가 영향력을 주어 총 폴리페놀 함량을 증가시켰다. 치아씨 DPPH 라디칼 소거능에서는 에탄올 추출물의 반응표면분석 후 회귀분석 결과, Table 3~5와 같이 결정계수  $R^2=0.9675$ 로 유의성이 인정되었으며( $p < 0.0001$ ), 일차항에서만 영향력을 미치는 것을 알 수 있었다( $p < 0.0001$ ). 회귀방정식은  $Y=40.73 - 11.30X_1+5.57X_2+6.04X_3+2.25X_2X_3$ 로 이때 추출조건인 메탄올 추출농도( $X_1$ ), 추출시간( $X_2$ )와 추출온도( $X_3$ ) 효과는 유의적으로 나타났으며( $p < 0.001$ ) DPPH 라디칼 소거능에

**Table 3. Determination of total polyphenol and DPPH radical scavenging activity in chia seed**

		Regression	R-square	F value	Probability >F
Total polyphenol	Ethanol	Linear	0.9034	154.99	<.0001
		Quadratic	0.0030	0.18	0.9050
		Crossproduct	0.0443	2.70	0.1086
	Total model		0.9507	19.29	<.0001
	Methanol	Linear	0.9435	131.08	<.0001
		Quadratic	0.0225	3.13	0.0803
Crossproduct		0.0124	1.72	0.2314	
Total model		0.9784	45.31	<.0001	
DPPH radical scavenging activity	Ethanol	Linear	0.9257	85.35	<.0001
		Quadratic	0.0058	0.53	0.6705
		Crossproduct	0.0360	3.32	0.0707
	Total model		0.9675	29.73	<.0001
	Methanol	Linear	0.8750	59.79	<.0001
		Quadratic	0.0217	1.49	0.2832
Crossproduct		0.0594	4.06	0.0444	
Total model		0.9561	21.78	<.0001	

영향을 주는 추출농도, 시간과 온도의  $F$ 값은 38.89, 10.95, 18.69로 추출농도가 가장 음의 효과로 큰 영향력을 주었고, 다음이 추출온도가 영향력을 주었다. 메탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능에서는 회귀분석결과(Table 3~5), 결정계수는  $R^2=0.9561$ 로 유의성이 인정되었으며( $p<0.0001$ ), 일차항과 상호항에서 영향력을 미치는 것을 알 수 있었다( $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ). 또한 회

귀분석 결과  $Y=38.34 - 4.28X_1+7.39X_2+2.43X_3 - 1.98X_2X_3$ 의 방정식을 얻었으며, 이때 추출조건인 에탄올 농도( $F=20.32$ )에서 음의 효과로 가장 큰 영향력을 주었으며, 다음이 추출온도( $F=17.49$ ) 조건으로서 DPPH 라디칼 소거능을 증가시키는데 영향을 주었다( $p<0.001$ ). 결과적으로 에탄올 추출조건을 이용한 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능에서는 추출농도가 음의 효과로 가장 큰 영향력을 주었고, 메탄올 추출조건에

**Table 5. Analysis of variance for total polyphenol, DPPH radical scavenging activity of extracts on chia seed**

		Factor	df	Sum of squares	F value
Total phenol	Ethanol	$X_1$	4	160,469	20.32***
		$X_2$	4	59,589	7.54***
		$X_3$	4	138,159	17.49***
	Methanol	$X_1$	4	29,541	27.03***
		$X_2$	4	70,438	64.46***
		$X_3$	4	12,720	11.64***
DPPH radical scavenging activity	Ethanol	$X_1$	4	1,578.238	38.89***
		$X_2$	4	444.285	10.95***
		$X_3$	4	758.631	18.69***
	Methanol	$X_1$	4	255.820	11.32***
		$X_2$	4	725.762	32.11***
		$X_3$	4	154.417	6.83***

\*Significant at  $p<0.05$ .

\*\*Significant at  $p<0.01$ .

\*\*\*Significant at  $p<0.001$ .

$X_1$ : Solvent concentration (%),  $X_2$ : Extraction temperature ( $^{\circ}$ C),  $X_3$ : Extraction times (min)

**Table 4. Regression coefficients of predicted quadratic polynomial models for the different response**

Parameter	Polyphenol		DPPH	
	Ethanol	Methanol	Ethanol	Methanol
Intercept	450.679583***	385.240417***	40.728333***	38.342500***
$X_1$	-113.695833***	-48.237500***	-11.302500***	-4.280000***
$X_2$	61.569167***	74.745000***	5.570833***	7.393333***
$X_3$	83.332222***	26.255556***	6.044444***	2.433889***
$X_1X_1$	7.882500	8.269167	-1.107500	-1.878333
$X_2X_1$	-19.111250	12.096250	0.020000	-1.647500
$X_2X_2$	8.632500	23.231667	1.677500	-0.553333
$X_3X_1$	-13.472500	3.814167	-1.834167	0.120000
$X_3X_2$	30.110833*	-2.368333*	2.247500*	-1.976667*
$X_3X_3$	12.077083	9.910139	-0.118333	1.011389

\*Significant at  $p<0.05$ .

\*\*\*Significant at  $p<0.001$ .

$X_1$ : Solvent concentration (%),  $X_2$ : Extraction temperature ( $^{\circ}$ C),  $X_3$ : Extraction times (min)

서는 추출시간이 가장 큰 영향력을 주었다.

#### 4. 최적 추출조건 예측

치아씨 총 페놀 함량과 DPPH 전자공여능을 이용한 항산화 효과에 대하여 에탄올과 메탄올을 이용한 최적 추출조건을 나타낸 결과는 Table 6과 같다. 총 페놀 함량은 에탄올을 용매로 추출한 조건에서는 63.30%, 101.06분, 17.86°C였고, 메탄올 추출조건에서는 66.59%, 123.06분, 16.10°C로 나타났다. 에탄올과 메탄올의 최적추출 농도와 시간은 메탄올이 에탄올보다 약간 높은 농도와 시간에서 최적 총 페놀함량을 보였으며, 온도조건에서는 메탄올이 더 낮은 온도조건에서 최적 조건을 보였다. 이는 메탄올이 낮은 온도에서 휘발이 이루어지기 때문에 낮은 온도조건에서 치아씨의 항산화 성분을 추출하기에 더 좋은 최적조건이라고 생각된다. 또한 DPPH 라디칼 소거능에서도 에탄올의 최적조건은 63.30%, 103.85분, 17.56°C 조건이었고, 메탄올은 65.18%, 120.83분, 15.54°C로 나타났으며, DPPH에서도 총 페놀의 최적조건과 같이 추출용매 농도와 시간은 메탄올에서 높게 나타났으며, 추출온도는 에탄올이 더 높게 나타났다. 결과적으로 에탄올 추출조건은 에탄올 농도 63%, 추출시간 100분과 추출온도 18°C가 최적조건이었고, 메탄올 추출조건에서는 추출농도 65%, 추출시간 120분과 추출온도 16°C를 보였다.

이는 Kang 등(1992)은 에탄올을 이용한 대추씨에서 가용성 고형분을 추출 시 추출온도에 따라 가용성 고형분의 함량이 증가하고, 낮은 추출온도에서는 추출시간이 증가할수록 가용성 고형분 함량이 증가한다는 것과 비슷한 결과를 보였으며, 또한 Choi 등(2003)은 노루궁뎅이 버섯의 에탄올을 이용한 추출물에서 최적 추출조건은 에탄올 농도 36-52%였으며, 페놀성 화합물의 함량이 에탄올 농도가 낮을수록, 시료 용매비가 높을수록 그 함량이 증가한다고 보고하여, 본 실험의 결과와 일치하였다. 또한 Choi 등(2011)은 오가피 뿌리, 줄기, 열매, 잎부위를 용매종류별로 추출하였을 때 메탄올 농도는 50%에서 추출최적 조건으로 하였으며, Lee 등(2013)은 로즈마리의 폴리페놀 함량과 항산화력에 따른 용매별 최적조건을 실험한 결과, 메탄올 추출물에서는 75%, 60°C, 30분에서

최적조건을 설정하였다. 이는 높은 온도조건과 낮은 추출시간에서는 메탄올의 농도를 높게 하여 추출한 것으로 사료된다. 따라서 치아씨 항산화력을 높게 하기 위한 메탄올과 에탄올의 추출조건에서는 추출온도가 높을수록 추출용매 농도는 높게 하고, 낮은 온도조건에서는 용매의 농도가 작을수록 항산화력이 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 치아씨의 항산화 활성을 증가시키기 위하여 추출용매 종류와 용매농도, 추출시간과 추출온도를 달리 하여 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능을 측정하고 후 반응표면분석을 이용하여 최적조건을 수립하였다. 치아씨 추출조건은 에탄올과 메탄올용매 모두에서 추출용매 60%, 추출시간 130분과 추출온도 20°C에서 총 폴리페놀 871.00mg%( $R^2=0.9507$ ), 557.70mg%( $R^2=0.9784$ )로 가장 함량이 많았고, DPPH 라디칼 소거능은 72.14%( $R^2=0.9675$ ), 52.79%( $R^2=0.9524$ )의 항산화력을 보였다. 용매종류에서는 에탄올 추출용매가 메탄올 추출용매보다 같은 조건에서는 월등히 높은 항산화력을 보여 에탄올이 치아씨 추출용매로 더 우수한 용매로 선정되었다. 또한 반응표면분석 결과, 용매추출 조건에서는 에탄올 용매에서는 용매추출 시간이나 온도보다는 용매농도에 가장 큰 영향을 받았고, 메탄올 추출조건에서는 용매추출 시간에서 가장 큰 영향력을 주었다. 반응표면분석 후 용매 농도, 시간과 온도의 최적 추출조건 범위는 에탄올 추출조건은 에탄올농도 63%, 추출시간 100분과 추출온도 18°C가 최적 조건이고, 메탄올 추출조건에서는 추출농도 65%, 추출시간 120분과 추출온도 16°C를 보였다.

## References

- Ayerza JR. 1995. Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *J Am Oil Chem Soc* 72:1079-1081
- Blois MS 1958. Antioxidant determinations by the use of a

**Table 6. Predicted levels of optimum extraction condition for the maximum responses of variables by the ridge analysis**

Response variables	Total polyphenol (mg%)		DPPH radical scavenging activity (%)	
	Ethanol	Methanol	Ethanol	Methanol
Solvent concentration (%)	63.30	66.59	63.30	65.18
Extraction times (mins)	101.06	123.06	103.85	120.83
Extraction temperature (°C)	17.86	16.10	17.56	15.54
Maximum	632.45	492.09	55.59	46.75
Morphology	Saddle point	Saddle point	Saddle point	Saddle point

- stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Borneo R, Aguirre A, León AE. 2010. Chia (*Salvia hispanica* L) gel can be used as egg or oil replacer in cake formulations. *J American Dietetic Association* 110:946-949
- Campos BE, Ruivo TD, Scapim MRS, Madrona GS, Bergamasco RC. 2016. Optimization of the mucilage extraction process from chia seeds and application in ice cream as a stabilizer and emulsifier. *Food Sci Technol* 65:874-883
- Cha KY. 2011. Effects of linseeds and chiaseeds dietary feeding on the quality characteristics and functionality of milk. MS Degree, Kangwon Univ. Korea
- Cho YH, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Yoon SJ, Lee KY. 2005. Comparison of physiological activities between hot-water and ethanol extracts of *Bokbunja* (*Rubus coreanum* F.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:790-796
- Choi IW, Choi SY, Nam BR, Kim YS, Choi HD. 2008. Contents of polyphenols and limonoids in citron (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) seed extracts and their antioxidant properties. *Food Sci Biotechnol* 17:373-378
- Choi JM, Kim KY, Lee SH, Ahn JB. 2011. Functional properties of water extracts from different parts of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Food Eng Prog* 15:130-135
- Choi MA, Park NY, Woo SM, Jeong YJ. 2003. Optimization of extractions from *Hericium erinaceus* by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 35:777-782
- Dicka M, Costaa TMH, Gomaac A, Subiradec M, Riosa AO, Flóresa SH. 2015. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physico-chemical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers* 130:198-205
- Handa CL, Lima FS, Guelfi MFG, Georgetti SR, Ida EL. 2016. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food Chem* 197:175-184
- Hong JI, Kweon MH, Ra KS, Sung HC, Yang HC. 1995. Free radical scavenging activities and inhibitory effects on xanthine oxidase by ethanol extract from *Capsella bursa-pastoris*. *Agri Chem Biotechnol* 38:590-595
- Ixtaina VY, Martínez ML, Spotorno V, Mateo CM, Maestri DM, Diehl BWK, Nolasco SM, Tomás MC. 2011. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *J Food Composition Anal* 24:166-174
- Kang KC, Park JH, Back SB, Jhin HS, Rhee KS. 1992. Optimization of beverage preparation from *Schizandra chinensis* Baillon by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 24:74-81
- Kim JY, Maeng YS, Lee KY, Lee ST. 1996. Antioxidant activity of soybean extracts by mixed solvents ethanol-water and methanol-water. *Korean J Soc Food Sci* 12:493-498
- Kim MH, Kang WW, Lee NH, Kweon DJ, Choi UK. 2007. Antioxidant activities of extract with water and ethanol of *Perilla frutescens* var. *acuta* kudo leaf. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50:327-333
- Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. 2009. A study on antioxidative and hypoglycemic activities of *Omija* (*Schizandra chinensis* Baillon) extract under variable extract conditions. *Korean J Food & Nutr* 22:41-47
- Kim SJ, Kweon DH, Lee JH. 2006. Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). *Korean J Food Sci Technol* 38:584-588
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33:626-632
- Koh JH, Hwang MO, Moon JS, Hwang SY, Son JY. 2005. Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extracts. *Korean J Food Cookery Sci* 21:171-179
- Lee CY, Kim KM, Son HS. 2013. Optimal extraction conditions to produce rosemary extracts with higher phenolic content and antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 45:501-507
- Lee MH, Lee JE. 2015. Antioxidant and antimicrobial properties of various solvent extracts from *Robus idaeus*. *Korean J Food Nutr* 28:774-781
- Lee SB. 2013. Quality characteristics if bread added on chia seed powder. *Kor J Human Ecology* 22:723-736
- Lee SG, Oh SC, Jang JS. 2015. Antioxidant activities of *Citrus unshiu* extracts obtained from different solvents. *Korean J Food Nutr* 28:458-464
- Lee YJ, Ahn MS, Oh WT. 1998. A study on the catechins contents and antioxidative effect of various solvent extracts of green, oolong and black tea. *J Food Hyg Safety* 13:370-376
- Lin KY, Daniel JR. 1994. Structure of chia seed polysaccharide exudates. *Carbohydrate Polymers* 23:13-18
- Mokrani A, Madani K. 2016. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation Purification Technol* 162:68-76



- Muñoz LA, Cobos A, Diaz O, Aguilera JM. 2012. Chia seeds: microstructure, mucilage extraction and hydration. *J Food Eng* 108:216-224
- Nam SM, Kang IJ, Shin MH. 2015. Anti-diabetic and anti-oxidative activities of extracts from *Crataegus pinnatifida*. *J East Asian Soc Dietary Life* 25:270-277
- Orona-Tamayo D, Valverde ME, Nieto-Rendon B, Paredes-Lopez O. 2015. Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *Lebens Wissen* 64:236-242
- Reyes-Caudillo E, Tecante A, Valdivia-Lopez MA. 2008. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chem* 107:656-663
- Singleton VL, Rossi Jr JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158
- Taga MS, Miller EE, Pratt DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 61:928-931
- Timilsena YP, Adhikari R, Kasapis S, Adhikari B. 2016. Molecular and functional characteristics of purified gum from Australian chia seeds. *Carbohydrate Polymers* 136:128-136
- USDA (United States Department of Agriculture) SR21 Nutrient Data. 2010. Nutrition facts for dried chia seeds one ounce

Received 21 March, 2016

Revised 28 March, 2016

Accepted 18 April, 2016