

The Food and Life has published all type articles such as research articles, review articles, survey articles, research note, short communication or editorial since 2020. It covers the all scientific and technological aspects of food and life science.

<https://www.foodnlife.org>



반응표면분석법을 이용한 유자 과피 내 휘발성 성분의 초음파 추출 조건 최적화

김보경, 최윤상, 김범근, 박민경*

한국식품연구원 가공공정연구단

Optimization of ultrasound system for the extraction of volatile compounds in *Citrus junos* (yuzu) peel using response surface methodology

Bo-Gyeong Kim, Yun-Sang Choi, Bum-Keun Kim, Min Kyung Park*

Food Processing Research Group, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea

Abstract

The aim of this study was to study the optimum condition of ultrasound system for the extraction of volatile compounds in *Citrus junos* (yuzu) peel using response surface methodology in combination with a Box-Behnken experimental design. The effects of ultrasound amplitude (X_1), sonication temperature (X_2), and sonication time (X_3) on the changes of volatile compounds were investigated. The response variables, such as the total peak area of volatile compounds (Y_1) and the peak area of limonene (Y_2), were obtained using gas chromatography-mass spectrometry. Based on the results, the predicted optimal extraction conditions for Y_1 included an ultrasound amplitude of 65.56%, sonication temperature of 62.14°C, and sonication time of 57.85 min. The predicted optimization extraction conditions for Y_2 were an ultrasound amplitude of 74.94%, sonication temperature of 64.12°C, and sonication time of 61.00 min. In conclusion, this study provided useful information on the ultrasound system, which is a non-thermal extraction method for volatile compounds.

Keywords: yuzu peel, volatile compound, response surface methodology, D-limonene

서론

유자(*Citrus junos*)는 동북아시아인 중국, 일본, 한국에서 재배되는 citron에 속하는 과일이다. 유자는 두꺼운 과피를 가지고 있으며, 과피의 바깥 부분에는 거친 감축의 껍질을 포함하고 있다. 유자는 다른 감귤류 과일과 다른 특유의 향을 지니고 있어 식품, 화장품, 제약, 향수 등 다양한 산업에서 널리 사용되고 있는 과일이다. 유자에는 플라보노이드에 속하는 쓴맛 성분인 hesperidin과 naringin이 다량 함유되어 있으며, 과피에서 분리된 hesperidin은 혈압저하, 항산화, 항 알레르기, 항암작용 등의 건강기능성을 지닌 생리활성 물질로 보고되고 있다(Hwang et al., 2014; Moon et al., 2015). 유자의 건강기능성이 보고됨에 따라 유자 첨가음료(Lee et al., 2021), 유자청 첨가 젤라틴(Kwon et al., 2021), 유자 과피 첨가 쿠키(Kwon et al., 2021), 유자 과피 첨가 증편(Choi et al., 2019) 등 유자의 특성을 활용한 가공 식품에 대한 연구도 활성화 되고 있다. 이러한 연구들을 보면 일반적으로 유자는 생과의 형태로는 잘 사용되지 않으며, 식품

산업에서 유자와 같은 과육과 과피를 모두 포함한 절임 가공 과정이나 과피 건조과정을 거쳐 사용되고 있다(Miyazawa et al., 2010). 이는 유자 과피에 존재하는 독특한 향과 기능성분을 가공을 통해 식품에 활용하기 위함이다(Lee et al., 2010). 과피에 존재하는 생리활성 물질과 휘발성화합물을 산업에 활용하기 위해서는 에센셜 오일의 형태로 정유성분을 추출하는 가공 공정이 주로 사용되고 있다(Choi et al., 2016). 일반적으로 과피의 정유성분을 추출하기 위한 공정으로는 수증기 증류법(hydrodistillation extraction), SDE 추출법(simultaneous steam distillation and extraction apparatus), 속슬렛법(soxhlet extraction)이 쓰인다(Choi et al., 2008; Lee, 2009; Lim et al., 2009). 이러한 방법들은 추출 효율이 높고 공정이 간편하다는 장점이 있지만, 고온에 의해 유자의 주요 유용성분의 파괴 및 변성을 야기하여 그 기능성과 향기성분의 소실을 일으킨다(Lee et al., 2014). 이와 같은 문제를 보완하기 위한 대표적인 물리적 방법으로는 초음파 추출법(ultrasonic extraction)이 있다. 초음파 처리방법

*Corresponding author : Min Kyung Park. Food Processing Research Group, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea. Tel: +82-63-219-9582, Fax: +82-63-219-9876, E-mail: mk.park@kfri.re.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>).

은 20-500 kHz 주파수의 초음파를 이용하는 추출방법으로, 다른 추출 방법에 비해 추출 속도가 빨라 추출 시간을 최소화 하기 때문에 효율적이다(Majid et al., 2015). 초음파 추출은 초음파에 의해 시료의 조직 파괴, 입자 표면의 물질 전달력 향상, 내부확산(intra-particle diffusion)의 효과로 추출 시간을 단축시키고 추출 수율을 향상시킨다(Vilkhu et al., 2008).

반응표면분석법(response surface methodology, RSM)은 여러 개의 독립변수(independent variable, X_n)를 사용하여 최적조건을 확립하고, 서로 다른 변수들의 상호작용으로 인한 종속변수(dependent variables, Y)를 측정하여 변수들의 최적 값을 추정하는 방법이다(Park et al., 2017). 식품산업에서 반응표면분석은 추출 최적화를 통해 추출 조건을 확립하여 품질향상과 가공비용 절감을 위한 방법으로 주로 사용되고 있다(Kim et al., 2015).

유자 추출물의 비타민이나 hesperidin(Yu et al., 2011), 항산화 활성(Yoo et al., 2004), 향균 특성(Majid et al., 2015)에 관한 연구는 보고되었지만, 유자 과피 초음파 추출물의 휘발성 향기 성분 추출의 최적화에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 유자 과피의 초음파 추출 조건에 따라 유자 과피에 존재하는 휘발성 향기 성분의 추출을 최적화하고자 한다. Gas chromatography-mass spectrometry를 이용하여 유자 과피 초음파 추출물을 분석하였으며, 초음파 진폭, 처리 시간, 처리 온도의 추출 조건에 따라 총 향기 성분의 정량 값과 D-limonene의 정량 값을 통해 최적 추출조건을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 유자(*C. jomos*)는 전라남도 고흥군에서 구입하여 과피의 상태가 양호하고 그 크기가 균일한 것을 선별하여 사용하였다. 연구에 사용된 시약 methylene chloride와 anhydrous sodium sulfate는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사에서 구입하여 사용하였다.

유자 과피 초음파추출

유자는 세척 후 물기를 제거한 후 과피 부분을 치즈 그라인더를 이용해 껍질(rind) 부분 만을 분리한 것을 유자 과피 시료로 사용하였다. 이후 유자 과피 시료 40 g에 3차 증류수 120 mL을 비커에 넣고 초음파 장치(Mirae Ultrasound, Bucheon, Korea)를 이용하여 해당 조건에서 추출하였다. 초음파 장치의 water bath를 통해 온도를 조절하였으며, frequency는 21 kHz로 고정하여 사용하였다. 초음파 추출 조건은 Box-Behnken 디자인 모델(Box-Behnken experimental design, BBD)에 의해 15가지 조건을 수립하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. The coded level of independent variables used in response surface methodology (RSM) design

Variable	Symbol	Coded level		
		-1	0	1
Amplitude (%)	X_1	33	66	100
Temperature (°C)	X_2	30	50	70
Time (min)	X_3	30	60	90

유자 과피의 휘발성 향기성분의 추출 및 분석

유자 과피와 증류수 혼합물을 초음파 처리한 후 methylene chloride(Sigma-Aldrich) 100 mL을 넣고 30분간 400 rpm으로 교반하여 휘발성 향기성분의 용매 추출을 진행하였다. 추출물은 왓만 No. 2(WM1002090, Whatman, UK) 여과지를 사용하여 여과한 후, 분액깔대기로 층을 분리하였다. Methylene chloride 층을 회수하여 anhydrous sodium sulfate(Sigma-Aldrich)를 이용하여 수분을 제거한 후, 질소가스(99.99%)를 이용하여 1 mL까지 농축한 후 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) 분석을 실시하였다.

GC-MS 분석은 7890A Agilent GC system(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)와 5975C mass detector(Agilent Technologies)를 결합하여 사용하였다. DB-WAX Ultra Inert capillary column(30 m×0.25 mm i.d×0.25 μm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)는 휘발성 향기성분 분리를 위해 사용되었다. Helium(99.999%)이 carrier gas로 사용되었으며, flow rate는 0.8 mL/min으로 적용하였다. Split ratio 100:1로 1 μL의 유자 과피 추출물을 주입하였다. Injector와 transfer line의 온도는 각각 230°C와 250°C이며, 오븐 온도는 40°C에서 5분으로 시작해서 200°C까지 4°C/min 속도로 승온한 후, 2분간 유지시켰다. 휘발성 향기성분의 이온화는 electron impact ionization로 수행하였으며, ionization voltage는 70 eV로 분석되었다. 분석 분자량 범위는 35-350 a.m.u(atomic mass units)으로 설정하였다.

GC-MS에서 획득한 데이터는 MS-DIAL 프로그램(ver. 4.92, <http://prime.psc.riken.jp/compms/index.html>, RIKEN, Kanagawa, Japan)을 이용하여 deconvolution 및 각 시료의 피크를 alignment 하였다. 총 132개의 피크가 검출되었으며, 이 중 GC 컬럼에서 유래하는 siloxane류 및 signal to noise 비율이 5 이하의 피크는 제외하여 총 126개의 피크를 대상으로 통계분석을 실시하였다. D-limonene은 표준품의 Retention Index와 비교하여 확인하였다. 각 휘발성 향기성분의 휘발성 향기성분의 함량은 내부표준 물질을 이용하여 상대적 함량으로 환산하였다.

반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 활용한 실험설계

유자 과피의 휘발성 향기성분의 초음파 최적 추출 조건을 예

측하기 위해 반응표면분석법(RSM)을 실시하였다. 실험계획법은 Design Expert 9(Stat-Easy, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 BBD를 설계하였다. 초음파 추출에 영향을 미치는 인자(parameter)인 공정상의 독립변수로 초음파 진폭(X_1)과 초음파 처리 온도(X_2), 초음파 처리 시간(X_3)을 설정하였고, 독립변수에 대한 실험범위는 3단계(-1, 0, 1)로 부호화 하였다(Table 1). 반응변수인 Y값으로는 유자 과피의 초음파 추출 시 그 효율을 나타낼 수 있는 인자로 total peak area의 정량 값(Y_1)과 유자 과피의 대표적인 휘발성 향기성분인 D-limonene의 정량 값(Y_2)을 설정하여 나타냈다. BBD에 의해 시료는 총 15개로 무작위로 실시하여 실험을 진행하였다.

통계처리

유자 과피의 초음파 추출 최적조건을 확인하기 위해 회귀분석을 이용하였으며, 각 독립변수와 종속변수의 관계를 통한 model의 적합성 여부는 F-test로 검정하여 회귀계수들의 유의성을 검증하였다($p < 0.05$). 각 변수들의 반응을 보기 위해 perturbation plot과 response surface 3D plot을 R program ('rsm', 'perturb' package)을 이용하여 도출하였다.

결과 및 고찰

초음파처리 조건에 의한 휘발성 향기성분의 추출 효과

본 연구는 유자 과피의 초음파 추출 조건에 따른 휘발성 향기성분의 최적 추출 조건을 찾기 위해 BBD를 통해 15개의 반응 표면 설계를 생성하였다. 독립변수로는 초음파 추출에 관여하는 주요 변수인 초음파 진폭(X_1), 초음파 처리 온도(X_2), 초음파 처리 시간(X_3)로 설정하였으며, 반응 변수로는 동정한 총 휘발성 향기성분의 정량 값(Y_1)과 유자의 주요 휘발성 향기성분인 D-limonene의 정량 값(Y_2)으로 설정하였다. 초음파 추출 조건에 따른 유자 과피 추출물을 GC-MS로 분석하여 추출 조건 최적화 결과는 Table 2에 나타내었다. 가장 높은 Y_1 값을 나타낸 조건은 sample 10으로 나타났으며, 그 조건은 초음파 진폭 66%, 처리 온도 70°C, 처리 시간 90분으로 나타났다. 반면, 가장 낮은 총 휘발성 향기성분 정량 값(Y_1)을 나타낸 조건은 sample 1로 나타났으며, 그 조건은 초음파 진폭 33%, 처리 온도 30°C, 처리 시간 60분으로 나타났다. 이를 통해 유자 과피의 초음파 추출 시 최대 추출 효율을 위해서는 초음파 진폭, 처리 온도, 처리 시간의 최적 조건에서의 처리가 필요함을 알 수 있다.

Limonene은 citrus속 과일의 정유성분에 70% 이상 함유하고

Table 2. Box-Behnken response surface design and respond values

Sample	Parameters ¹⁾			Relative peak area ²⁾	
	X_1	X_2	X_3	Y_1 ³⁾	Y_2 ⁴⁾
1	33	30	60	822.91	463.05
2	100	30	60	778.28	435.27
3	33	70	60	1,169.80	635.89
4	100	70	60	1,166.63	673.91
5	33	50	30	1,146.99	668.44
6	100	50	30	1,175.70	664.76
7	33	50	90	1,197.80	671.68
8	100	50	90	1,132.09	627.36
9	66	30	30	1,015.60	559.82
10	66	70	90	1,213.81	684.21
11	66	30	90	879.36	485.76
12	66	70	30	1,205.36	682.34
13	66	50	60	1,158.44	635.28
14	66	50	60	1,157.70	632.48
15	66	50	60	1,147.52	633.35

¹⁾ Ultrasound amplitude (X_1 ; 33%, 66%, and 100%), sonication temperature (X_2 ; 30°C, 50°C, and 70°C), sonication time (X_3 ; 30, 60, and 90 min).

²⁾ Mean values of relative peak area to the area of internal standard.

³⁾ The content of total peak area.

⁴⁾ The content of D-Limonene.

있는 주요 monoterpene hydrocarbon류이다(Song et al., 2000). 가장 높은 Y_2 값은 sample 10의 조건이었고, 가장 낮은 Y_2 값은 sample 1의 조건으로 Y_1 에서의 결과와 같은 결과를 나타내는 것으로 확인되었다. 모든 추출 조건에서 총 휘발성 향기성분의 정량 값 대비 D-limonene의 함량을 보면 54.36%-58.28%로 나타났다. 이는 Lan Phi and Sawamura(2008)의 연구에서 재배 지역에 따른 유자 과피 정유의 주요 화합물 중 limonene이 55.86%-64.79%의 범위에 있는 것과 유사한 결과이다. Limonene이 향기성분의 정량 결과의 대부분을 차지하기 때문에 총 휘발성 향기성분의 정량 값과 유사한 결과를 나타내는 것으로 보인다.

Table 3의 결정계수(coefficient of determination, R^2)는 RSM 모델에서 전체 변동을 설명해주는 정도의 지표로 0과 1 사이의 값을 지니며, 1에 가까울수록 그 설명력이 높다고 할 수 있다(Lee and Kim, 2010). Y_1 값의 경우 $R^2=0.9731$ 으로 나타났으며, Y_2 의 결과에서는 $R^2=0.9835$ 로 X_1 , X_3 를 제외한 X_2 가 $p<0.01$ 으로 모두 유의성이 높은 결과로 확인되었다.

유자 과피의 휘발성 향기성분 초음파 추출을 위한 최적화 분석

유자 과피의 초음파추출 최적화 조건을 도출하기 위해 RSM 모델을 통해 2차 회귀방정식을 도출한 결과 다음과 같다.

$$Y = 1154.55 - 9.19X_1 + 157.35X_2 - 14.90X_3 - 41.36X_1^2 + 10.60X_2X_1 - 127.38X_2^2 - 23.00X_3X_1 + 36.17X_3X_2 + 51.36X_3^2$$

BBD를 통한 각 독립변수에 따른 Y_1 값의 2차 회귀방정식의 계수와 p -value는 Table 3에 나타내었다. 초음파 추출 조건에 따라 각 독립변수의 2차 회귀방정식은 $p=0.0021(p<0.005)$ 으로

유의적인 값을 나타냈다. 2차 회귀방정식에서 일차항은 주효과도를 나타내며, 서로 다른 변수로 이루어진 교차항은 교호효과도를 나타낸다(Han et al., 2019). 주효과도를 나타내는 일차항(linear: X_1 , X_2 , X_3)에서 독립변수인 초음파 진폭(X_1)과 초음파 처리 시간(X_3)은 감소요인으로, 초음파 처리 온도(X_2)는 증가요인으로 나타났다. 독립 변수 중 초음파 처리 온도(X_2)는 $p<0.0001$ 으로 가장 유의성의 높은 변수로, 유의적으로 영향을 미치는 요인임을 유추할 수 있다. 또한, 초음파 진폭(X_1)과 초음파 처리 시간(X_3)은 부정적인 상호작용을 나타낸 반면, 초음파 처리 온도(X_2)는 초음파 진폭(X_1)과 초음파 처리 시간(X_3) 모두 긍정적인 상호작용을 나타내었다. 2개 이상의 독립변수에서의 교호작용효과를 교차항(cross-product: X_1X_2 , X_2X_3 , X_1X_3)을 통해 확인한 결과 X_1X_2 과 X_1X_3 보다 Y_1 값에 X_2X_3 가 더 높은 영향을 미치는 것으로 확인할 수 있는데, 이는 X_2X_3 에서 $p=0.1293$ 으로 다른 교호작용효과에 비해 낮은 p -value로 확인되었지만 5%의 유의성이 인정되지 않았다. 회귀식에 따른 이차항(quadratic: X_1^2 , X_2^2 , X_3^2)의 유의성을 확인하였을 때, X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 의 p value는 각각 0.0952, 0.0017, 0.0562로 X_3^2 에서 $p<0.005$ 으로 유의성이 인정되었다.

변수간의 상호관계와 2개의 독립변수에 따른 Y_1 의 최적 추출 조건을 확립하기 위해 RSM을 통해 3차원 반응 표면도와 perturbation plot을 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1A의 그래프를 보면 초음파 처리 온도와 초음파 진폭이 증가함에 따라 Y_1 값이 증가하다가 정상점인 초음파 진폭 65.00%과 초음파 처리 온도 61.96°C에서 최대값인 1,233.33을 나타내고 일정 조건 이상에서 감소하는 추세를 나타냈다. 이는 Sandhu 등(2021)의 연구에서 초음파 진폭이 증가할수록 오렌지 정유성분의 수율이 증가하다가 일정하게 유지되는 것과 유사한 결과로, 초음파 진폭의

Table 3. The regression coefficients and probability (p -value) or corresponding response

	Total peak area (Y_1)		D-Limonene (Y_2)	
	Coefficient	p -value	Coefficient	p -value
Intercept	1,154.55	<0.0001	633.7046	<0.0001
X_1	-9.19	0.5381	-4.2584	0.5273
X_2	157.35	<0.0001	91.4329	<0.0001
X_3	-14.90	0.3389	-13.219	0.0922
X_1X_2	10.60	0.6126	16.3703	0.1238
X_1X_3	-23.00	0.2942	-9.939	0.3127
X_2X_3	35.17	0.1293	18.9825	0.0885
X_1^2	-41.36	0.0952	-12.8638	0.2159
X_2^2	-127.38	0.0017	-68.3523	0.0008
X_3^2	51.36	0.0562	37.6797	0.0101
Model		0.0021		0.0006
R^2		0.9248		0.9537

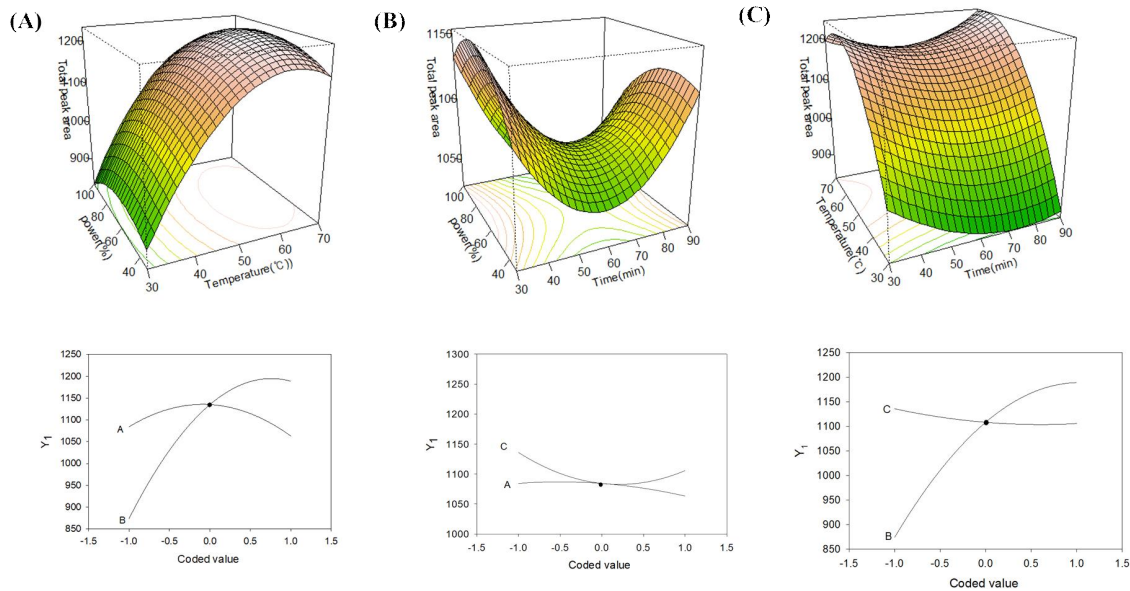


Fig. 1. Response surfaces and perturbation plot for the effects of ultrasound extraction on total peak area with independent variables (A) ultrasound amplitude and sonication temperature, (B) ultrasound amplitude and sonication time, (C) sonication temperature and sonication time. A, ultrasound amplitude; B, sonication temperature; C, sonication time.

증가에 따른 공기 방울의 형성으로 추출 효율의 감소를 야기한다고 보고하였다. 두 변수에 대한 이차 회귀방정식의 R^2 값은 0.909이고, p -value는 0.0002로 유의성이 높은 반응표면도임을 알 수 있다. Fig. 1C의 반응표면 그래프에서도 초음파 처리 온도가 증가함에 따라 Y_1 값이 증가하는 경향을 나타내다가 정상점인 62.48°C와 57.94분에서 최대값인 1,177.90으로 나타난 후 감소 또는 유지되는 경향을 보였다. 초음파 처리 시간은 증가함에 따라 그 추출 효과가 감소하였으며, 일정 시간 이후에는 Y_1 값이 증가하는 경향을 나타냈다. 이는 Mollaci 등(2021)의 연구에서 초음파 처리 온도가 증가할수록 정유성분의 수율이 증가하였다가 일정시간 이후부터 감소하고, 초음파 처리시간 30분 이후부터 수율이 감소하는 결과와 상응하는 결과이다. 초음파 처리 시간이 증가함에 따라 공동현상에 의해 조직의 팽윤과 수화가 이루어져 추출 효율이 감소하였다가 일정시간 이후 그 물질이 용해되어 향기성분의 증가가 이루어진 것으로 보인다. 두 변수에 대한 2차 회귀방정식의 R^2 은 0.9389, $p < 0.0001$ 으로 유의적인 결과 값을 나타낸다. Fig. 1B에서는 말 안장형의 그래프 모양을 나타내며, 안장점인 초음파 진폭 60.04%와 62.63분에서 1,076.36의 정상점을 나타냈다. 두 변수에 대한 R^2 값은 0.08111, $p = 0.9716$ 으로 초음파 진폭(X_1)과 초음파 처리 시간(X_3)에 대한 2차회귀방정식의 유의성이 없음을 알 수 있었다. 이를 통하여 Y_1 값의 경우에는 초음파 진폭보다 초음파 처리 시간과 초음파 처리 온도에 따라 영향을 더 많이 받을 것을 알 수 있었으며, 주 효과 인자는 초음파 진폭(X_1 , 9.29), 초음파 처

리 온도(X_2 , 157.35), 초음파 처리 시간(X_3 , 14.90)으로 회귀식으로부터 얻은 계수의 강도는 $X_2 > X_3 > X_1$ 으로 확인되었다.

유자 과피에 함유된 D-limonene의 초음파 추출을 위한 최적화 분석

유자 과피에 함유된 D-limonene의 초음파 추출 최적화 조건을 도출하기 위해 RSM 모델을 통해 2차 회귀방정식을 도출한 결과 다음과 같다.

$$Y = 633.70 - 4.26X_1 + 91.43X_2 - 13.22X_3 - 12.86X_1^2 + 16.37X_2X_1 - 68.35X_2^2 - 9.94X_3X_1 + 18.98X_3X_2 + 37.68X_3^2$$

Limonene은 레몬과 같은 신 향을 내는 citrus류의 주요 성분으로 유자 정유에 가장 많이 포함된 물질로 알려져 있다(Song et al., 2000). Limonene은 항산화활성 및 생체면역조절 능력이 있는 기능성 물질로, citrus류 과실에서 주요 물질인 limonene을 분리하기 위해 용매나 증류수를 이용한 증류 추출 과정을 거친다(Ahn et al., 2020). BBD를 이용하여 유자 과피의 초음파 추출물에서 유자의 주요 성분인 D-limonene의 peak area값을 통해 정량 값을 나타내었으며, 각 독립변수에 따라 2차 회귀방정식의 계수와 p -value를 Table 2에 나타냈다. 초음파 추출 조건에 따라 2차 회귀방정식은 $p = 0.0006$ ($p < 0.001$)으로 높은 유의성을 나타냈다. 회귀방정식의 계수를 확인해 보았을 때, 독립변

수인 초음파 진폭(X_1)과 초음파 처리 시간(X_3)은 감소요인으로, 초음파 처리 온도(X_2)는 증가요인으로 나타났다. 독립 변수 중 초음파 처리 온도(X_2)는 $p < 0.0001$ 으로 유의성이 높은 변수이며, 세 가지 독립변수 중 가장 영향을 미치는 요인임을 유추할 수 있다. 또한, 초음파 진폭(X_1)과 초음파 처리 시간(X_3)은 음의 상호작용을 나타낸 반면, 초음파 처리 온도(X_2)는 초음파 진폭(X_1)과 초음파 처리 시간(X_3) 모두 양의 상호작용을 나타내었다. 2개 이상의 독립변수에서의 교호작용효과를 교차 항(cross-product: X_1X_2 , X_2X_3 , X_1X_3)을 통해 확인한 결과, X_1X_2 과 X_1X_3 보다 Y_2 의 값에 X_2X_3 가 더 높은 유의적인 영향을 미치는 것으로 확인할 수 있는데, 이는 X_2X_3 에서 $p = 0.0885$ 으로 다른 교호작용효과에 비해 낮은 p -value로 확인할 수 있지만 모두 5%의 유의수준에서 유의성이 인정되지 않았다. 회귀식에 따른 이차항(quadratic: X_1^2 , X_2^2 , X_3^2)의 유의성을 확인하였을 때, X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 의 p -value는 각각 0.2159, 0.0008, 0.0101로 X_2^2 과 X_3^2 에서 $p < 0.05$ 으로 5%에서 유의성이 인정되었다. 이중 X_2^2 은 $p < 0.001$ 으로 높은 유의성을 나타내는 이차 항임을 알 수 있다.

변수 간의 상호관계와 2개의 독립변수에 따른 최적 추출 조건을 확립하기 위해 RSM을 통해 3차원 반응 표면도와 perturbation plot을 Fig. 2에 나타내었다. 독립변수 초음파 진폭(X_1)과 초음파 처리 온도(X_2)에 대한 그래프 Fig. 2A를 보면 초음파 진폭 73.09%와 초음파처리온도 63.33°C이 정상점으로 최대값인 686.9를 나타내었다. 초음파 진폭과 초음파 처리 온도가 증가함에 따라 Y_2 의 추출 효율이 증가하였다가 일정 지점에서 다시

감소하는 경향을 보인다. Fig. 2C의 반응표면 그래프에서도 초음파 처리 온도가 증가함에 따라 Y_2 값이 증가하는 경향을 나타내다가 정상점인 63.61°C와 60.15분에서 최대값인 656.7으로 나타낸 후 감소하는 경향을 보였다. 초음파 처리 시간은 증가함에 따라 감소하였다가, 일정 시간 이후 다시 증가하는 경향을 나타내었다. Akhavan-Mahdavi 등(2022)는 dl-limonene이 높은 온도와 산소 접촉으로 인한 산화로 인해 변성되고 열화되어 이취를 발생시키는 hydroperoxide 형태의 물질로 변성된다고 보고하였다. 따라서, 초음파 진폭의 증가로 인해 공동현상(cavitation)이 다량 발생하게 되어 처리 중 산소와 접촉하는 정도가 많아짐에 따라 산화가 이루어지고, 높은 온도로 인해 limonene이 열화하여 그 함량이 감소하는 것으로 보인다. 또한, Park 등(2015)의 감귤과피에서의 D-limonene 추출 최적화 연구에서 추출 시간이 1시간에서 2시간으로 증가함에 따라 D-limonene의 함량이 지속적으로 증가하였지만, 최대치에 도달한 후 시간이 지남에 따라 증발량이 증가하면서 그 함량이 유지되거나 감소되는 경향을 나타내었다. 이는 유자과피에서 추출 시간에 따라 Y_2 의 함량이 감소하였다가 일정 시간 이후 증가하는 것과 대비되는 결과인데, 본 연구에서의 초음파 처리 시간이 30, 60, 90분으로 60분 이후 그 함량이 증가하는 것과는 유사한 결과이다. Fig. 2B의 경우에는 말 안장형의 그래프 모양을 나타내며 안장점인 초음파 진폭 54.24%와 63.38분에서 591.68의 정상점을 나타냈다. 이를 통하여 Y_2 값의 경우에는 초음파 진폭보다 초음파 처리 시간과 초음파 처리 온도에 따라 영향을 더

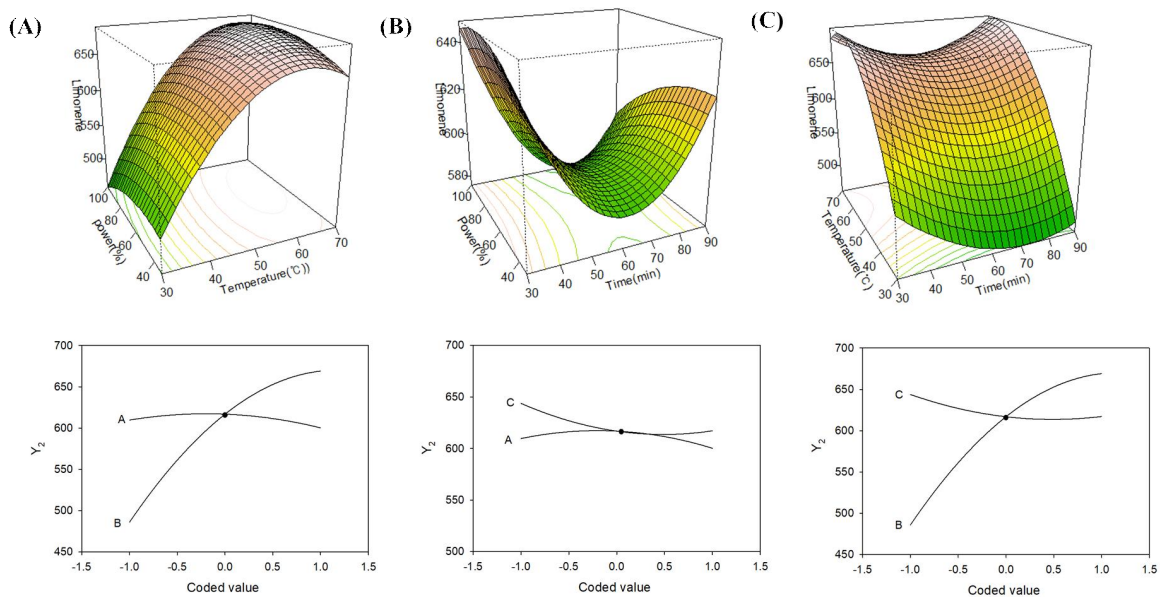


Fig. 2. Response surfaces and perturbation plot for the effects of ultrasound extraction on limonene peak area with independent variables (A) ultrasound amplitude and sonication temperature, (B) ultrasound amplitude and sonication time, (C) sonication temperature and sonication time. A, ultrasound amplitude; B, sonication temperature; C, sonication time.

많이 받는 것을 알 수 있었으며, 주 효과 인자는 초음파 진폭(X_1 , 4.26), 초음파 처리 온도(X_2 , 91.43), 초음파 처리 시간(X_3 , 13.22)으로, 회귀식으로부터 얻은 계수의 강도는 $X_2 > X_3 > X_1$ 으로 확인되었다.

유자 과피의 초음파 최적 추출 조건 예측

종속변수인 Y_1 값과 Y_2 값에 영향을 미치는 인자를 비교해보면, 초음파 진폭(X_1)은 그 값이 증가함에 따라 추출 효율이 증가하다가 일정 지점 이상에서 유지되거나 감소하는 경향을 나타내었다. 초음파를 이용한 추출 시 초음파 진폭이 커질수록 공기방울의 공동현상(cavitation)을 일으켜 시료의 파괴 통해 시료 중의 성분의 추출을 가속화하지만, 그 진폭이 커짐에 따라 공동현상의 정도가 과도하게 증가하게 되면 공기방울의 응집을 야기하여 공기방울의 크기가 커지게 된다. 공기방울의 응집은 공기방울이 오랫동안 잔존하게 하고 이는 초음파 강도를 약하게 만들어 추출 효율을 감소시킨다(Filgueiras et al., 2000; Mollaei et al., 2021). 또한, 공기방울들이 생성되어 초음파 추출 장치의 probe를 감싸게 되고 이는 초음파 에너지 전달력을 감소시켜 추출 효율을 떨어뜨린다(Kumar et al., 2021). 초음파 처리 온도(X_2)의 경우, 온도가 증가함에 따라 추출 효율도 증가하였지만 일정 온도에서 감소하는 경향을 나타내었다. 초음파 추출 시 처리 온도가 증가함에 따라 추출 효율이 증가하지만 일정 온도 이상에서 용매의 증기압을 상승시켜 기포 안으로 용매가 들어가고 많은 양의 공기방울이 발생하여 초음파 효과를 감소시킨다(Chemat et al., 2017). 또한, 초음파 처리 온도에 따라 추출물의 변성 및 향기 성분 증발량의 증가로 인해 추출 효율이 감소한다. 초음파 처리 시간(X_3)은 초음파 지속 시간의 증가에 따라 추출 효율이 일부 감소하다가 다시 증가하는 경향을 나타냈다. 초음파 추출 시간이 일정시간 지나면 공동현상에 의해 조직의 팽윤과 수화, 분열을 일으켜 용매에 물질의 용해력을 증가시키지만, 용매에 용해된 물질들이 공기방울에 의해 충돌과 손상, 포화 등의 이유로 효율의 감소로 이어질 수 있다. 또한, 추출 시간이 증가할수록 용매에 용해되어 있는 물질들이 변성되어 추출 효율이 감소한다(Rao et al., 2021). 따라서, 온도, 시간, 초음파 진폭의 최적화를 통해 추출물의 변성을 최소화하고 추출 효율을 최대화하여야 한다.

RSM을 통해 예측된 Y_1 과 Y_2 의 최적 추출 조건을 Table 4에 나타냈다. 3가지 독립변수 조건 안에서 Y_1 값의 최적 추출 조건은 초음파 진폭 65.56%와 초음파 처리 온도 62.14°C 및 초음파 처리시간 57.85분으로 산출되었다. Y_2 는 초음파 진폭 74.94%, 초음파 처리 온도 64.12°C, 초음파 처리 시간 61.00분이 최적 추출 조건으로 산출되었다. 최적의 반응 예상 값은 Y_1 값 1,202.90와 Y_2 값 665.18으로 예측되었다.

Table 4. The predicted optimization extraction conditions in total peak area (Y_1) and limonene peak area (Y_2)

	Total peak area (Y_1)	D-Limonene (Y_2)
X_1	65.56	74.94
X_2	62.14	64.12
X_3	57.85	61.00
Predicted values in stationary point	1,202.90	665.18

요약 및 결론

본 연구는 유자 과피의 휘발성 향기성분의 다양한 추출 방법 중 비가열 추출 방법 중 하나인 초음파 추출 방법을 적용하여 최적 추출 조건을 수립하고자 BBD를 통해 15개의 조건을 수립하여 RSM으로 최적 추출 조건을 탐색하였다. 독립변수로 초음파 진폭(X_1), 초음파 처리 온도(X_2), 초음파 처리 시간(X_3)을 설정하였고, 총 향기성분의 정량 값(Y_1)과 D-limonene의 정량 값(Y_2)을 반응변수로 설정하였다. 이차 회귀방정식을 통해 유의성을 검증한 결과, 각 모델은 $p < 0.05$ 로 5% 수준에서 유의성이 인정되었으며, R^2 값은 각 0.9248과 0.9537로 모델의 설명도가 유의성이 높음을 알 수 있었다. Y_1 의 주효과인자는 초음파 처리 시간과 초음파 처리 온도로 $X_2 > X_3 > X_1$ 순으로 나타났다. Y_2 값의 경우에도 초음파 처리 시간과 초음파 처리 온도에 따라 영향을 더 많이 받는 것을 알 수 있었으며, 계수의 강도는 $X_2 > X_3 > X_1$ 으로 확인되었다. 최적 추출 조건을 최적 반응 예상 값을 통해 산출한 결과, Y_1 은 초음파 진폭 65.56%, 처리 온도 62.14°C, 처리 시간 57.85분으로 1,202.90의 최적 반응 예상 값을 나타냈다. Y_2 은 초음파 진폭 74.94%, 처리 온도 64.12°C, 처리 시간 61.00분으로 665.18의 최적 반응 예상 값을 산출하였다. 일반적으로 휘발성 향기성분을 추출하기 위한 방법으로 간편성이나 경제성이 높은 측면에서 수증기 증류추출법이 많이 이용되고 있는데, 100°C 이상의 고온 수증기를 이용한다. 본 초음파 추출 방법은 물리적인 원리에 의해 상대적으로 낮은 온도에서 효율적으로 휘발성 향기성분의 추출이 가능하다. 이와 같은 연구 결과는 초음파 추출 방법을 통해 유자 과피의 휘발성 향기성분의 최대 추출 조건을 수립할 수 있어, 유자 과피의 비가열 추출 방법의 유용한 자료로 활용될 수 있을 것으로 보인다. 또한, 유자의 향을 부여하는 식품이나 화장품 등의 제품 개발에 기초자료로 제공되어 산업적 가치를 창출할 수 있을 것으로 사료된다.

Conflicts of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the Main Research Program [grant number E0211200-03] of the Korea Food Research Institute funded by the Ministry of Science.

Ethics Approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

Author Contributions

Conceptualization: Kim BK, Choi YS, Park MK.

Data curation: Kim BG, Park MK.

Formal analysis: Kim BG.

Methodology: Kim BG, Park MK.

Writing - original draft: Kim BG.

Writing - review & editing: Kim BG, Choi YS, Kim BK, Park MK.

Author Information

Bo-Gyeong Kim (Intern, Korea Food Research Institute)
<https://orcid.org/0000-0002-3509-9077>

Yun-Sang Choi (Principal Researcher, Korea Food Research Institute)
<https://orcid.org/0000-0001-8060-6237>

Bum-Keun Kim (Principal Researcher, Korea Food Research Institute)
<https://orcid.org/0000-0002-9752-741X>

Min Kyung Park (Researcher, Korea Food Research Institute)
<https://orcid.org/0000-0002-3619-9491>

References

- Ahn JH, Lim HH, Hwang SG, Nam IS. 2020. Studies on efficient extraction of limonene from citron and immunomodulation activity for development of environmentally friendly material. *Korean J Org Agric* 28:591-604.
- Akhavan-Mahdavi S, Sadeghi R, Faridi Esfanjani A, Hedayati S, Shaddel R, Dima C, Malekjani N, Boostani S, Jafari SM. 2022. Nanodelivery systems for *d*-limonene; techniques and applications. *Food Chem* 384:132479.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem* 34:540-560.
- Choi ES, Park YM, Yoon HH. 2019. Quality characteristics of *Jeung-pyun* added with *Citrus junos* powder. *Culin Sci Hosp Res* 25:112-118.
- Choi HJ, Wang HY, Kim YN, Heo SJ, Kim NK, Jeong MS, Kim SM. 2008. Composition and cytotoxicity of essential oil extracted by steam distillation from horseweed (*Erigeron canadensis* L.) in Korea. *Appl Biol Chem* 51:55-59.
- Choi MS, Lim MH, Lee IC. 2016. Comparison of antioxidant activities and chemical compositions of essential oils extracted from yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) and Orange (*Citrus sinensis*). *J Korean Soc Cosmetol* 22:299-307.
- Filgueiras AV, Capelo JL, Lavilla I, Bendicho C. 2000. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* 53:433-441.
- Han K, Jang HS, Hong IK. 2019. Optimization of antioxidant extraction from dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves using BBD-RSM. *Appl Chem Eng* 30:408-414.
- Hwang SH, Jang JS, Kim MJ, Kim KS. 2014. The change of free sugar, hesperidine, naringin, flavonoid contents and antihypertensive activities of yuzu variety according to harvest date. *Korean J Food Nutr* 27:1051-1058.
- Kim J, Yi H, Lee K, Hwang KT, Yoo G. 2015. Optimization of the extraction of bioactive compounds from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) by the response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 47:233-239.
- Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS. 2021. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrason Sonochem* 70:105325.
- Kwon R, Shin M, Hwang S, Kim D, Lee S, Jin-hyo P, Jeong-kyun K. 2021. Processing and quality characteristics of high value-added low-salt fermented sea squirt *Halocynthia roretzi* with yujacheong. *J Fish Mar Educ Res* 33:1013-1026.
- Lan Phi NT, Sawamura M. 2008. Characteristic aroma composition profile of mature stage *Citrus junos* (yuzu) peel oil from different origins. *Food Sci Technol Res* 14:359-366.
- Lee CJ, Lee WJ, Park JS, Kim SW, Jung SK. 2021. Optimization of the preparation method of citron (*Citrus junos* Sieb.) beverage containing hibiscus using response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 53: 187-194.

- Lee MS. 2009. Simple rapid quality estimation method in black and white pepper grounds by determination of volatile oil content. *Korean J Food Nutr* 22:352-356.
- Lee S, Shin J, Kang M, Jeong C, Joo J, Seong N. 2010. Physicochemical properties, free sugar and volatile compounds of Korean citrons cultivated in different areas. *Korean Soc Food Sci Nutr* 39:92-98.
- Lee SE, Kim S, Lim WC, Kang KC, Pyo HB. 2014. Comparison of volatile compounds from *Thymus magnus* Nakai by three different extraction methods. *J Soc Cosmet Sci Korea* 40:171-178.
- Lee SJ, Kim IG. 2010. Reliability analysis for composite laminated plate using hybrid response surface method. *Compos Res* 23:40-47.
- Lim SH, Park YH, Ham HJ, Kim HY, Jeong HN, Kim KH, Ahn YS. 2009. Comparison of volatile compounds in plant parts of *Angelica gigas* Nakai by extracting methods. *Korean J Med Crop Sci* 17:427-433.
- Majid I, Nayik GA, Nanda V. 2015. Ultrasonication and food technology: A review. *Cogent Food Agric* 1:1071022.
- Miyazawa N, Fujita A, Kubota K. 2010. Aroma character impact compounds in Kinokuni mandarin orange (*Citrus kinokuni*) compared with Satsuma mandarin orange (*Citrus unshiu*). *Biosci Biotechnol Biochem* 74:835-842.
- Mollaei S, Mamizadeh Z, Hazrati S, Hashempour H. 2021. The effect of ultrasonic pre-treatment on the yield, chemical composition and biological activity of essential oil in *Olivaria decumbens* flowers. *J Appl Res Med Aromat Plants* 24:100313.
- Moon SH, Assefa AD, Ko EY, Park SW. 2015. Comparison of flavonoid contents and antioxidant activity of yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) based on harvest time. *Hortic Sci Technol* 33:283-291.
- Park MJ, Kim SB, Kim SJ, Kim KM, Choi SY, Chang M, Kim GC. 2017. Optimization of spray drying conditions of soft persimmon and milk mixture using response surface methodology. *Korean J Food Preserv* 24:957-964.
- Park SM, Ko KY, Kim IH. 2015. Optimization of *d*-limonene extraction from tangerine peel in various solvents by using soxhlet extractor. *Korean Chem Eng Res* 53:717-722.
- Rao MV, Sengar AS, Sunil CK, Rawson A. 2021. Ultrasonication - a green technology extraction technique for spices: A review. *Trends Food Sci Technol* 116:975-991.
- Sandhu HK, Sinha P, Emanuel N, Kumar N, Sami R, Khojah E, Al-Mushhin AAM. 2021. Effect of ultrasound-assisted pretreatment on extraction efficiency of essential oil and bioactive compounds from citrus waste by-products. *Separations* 8:244.
- Song HS, Sawamura M, Ito T, Kawashimo K, Ukeda H. 2000. Quantitative determination and characteristic flavour of *Citrus junos* (yuzu) peel oil. *Flavour Fragr J* 15:245-250.
- Vilkhu K, Mawson R, Simons L, Bates D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry: A review. *Innov Food Sci Emerg Technol* 9:161-169.
- Yoo KM, Lee KW, Park JB, Lee HJ, Hwang IK. 2004. Variation in major antioxidants and total antioxidant activity of Yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) during maturation and between cultivars. *J Agric Food Chem* 52:5907-5913.
- Yu HY, Park SW, Chung IM, Jung YS. 2011. Anti-platelet effects of yuzu extract and its component. *Food Chem Toxicol* 49:3018-3024.

© Copyright. Korean Society for Food Science of Animal Resources.

Date Received Feb. 17, 2023

Date Revised Mar. 11, 2023

Date Accepted Mar. 16, 2023