

## 기체크로마토그래피법에 의한 유제품내 휘발성 및 비휘발성 유기산의 신속한 스크리닝

김정한·김경래\*·채정영·오창환·박형국·최경숙\*\*

연세대학교 식품생물공학과 생물산업소재 연구센터

\*성균관대학교 약학대학, \*\*영인과학 기술연구소

### Rapid Gas Chromatographic Screening of Dairy Products for Volatile and Nonvolatile Organic Acids

Jung-Han Kim, Kyoung-Rae Kim\*, Jeong-Young Chai,  
Chang-Hwan Oh, Hyung-Kook Park, and Kyoung-Sook Choi\*\*

Department of Food and Biotechnology, Bioproducts Research Center,  
College of Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

\*College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

\*\*Young-In Research Institute of Science and Technology Young-Hwa Bldg, 547, Kang Nam-Ku, Seoul, Korea

#### Abstract

A rapid gas chromatographic (GC) profiling method was applied to dairy products (milk and cheeses) for the simultaneous analysis of volatile and nonvolatile organic acids. Cheese samples were first made into aqueous samples by dissolving in water. The aqueous samples were then extracted with organic solvents after the acidification and NaCl saturation. The organic layers (diethyl ether : hexane = 1 : 1) were extracted with NaHCO<sub>3</sub> saturated solution with subsequent solid-phase extraction of the aqueous phases using Chromosorb P column/diethyl ether followed by triethylamine treatment. The resulting triethylammonium salts of acids were directly converted into volatile *tert.*-butyldimethylsilyl derivatives, which were analyzed by dual-capillary column GC, and GC-mass spectrometry. From milk and four cheese samples studied, 31 organic acids including 21 fatty acids and other hydroxy and dioic acids were tentatively identified. The amounts of the fatty acids were different among the kinds of cheese and thus the simplified retention index (RI) spectra of organic acids were useful for the visual pattern recognition of each sample, when the Direct Comparison method between cheese and a blind sample were attempted, it was quickly recognized to be a gouda cheese with the 999 ppt match quality value.

Key words: organic acids, solid-phase extraction, dairy products, gas chromatographic profiles, pattern recognition.

#### 서 론

유제품속의 유리 지방산은 유지방의 가수분해에 의해 생성되며 bovine의 생화학적 대사과정에 의해 citric, uric, ascorbic acids 등의 유기산들이 생성된다. 또한 발효 유제품에서는 미생물의 대사산물로 pyruvic, lactic, acetic, propionic acid 등이 생성된다<sup>(1)</sup>. 유제품에서 이들 유기산들의 종류와 양은 사용하는 원료와 제조 공정에 따라 다르며, 같은 제품에서도 숙성 정도와 저장조건에

따라 제품의 질을 다르게 결정하는 요인이다<sup>(2)</sup>. 유제품 중 치즈는 제조 과정과 숙성시 생성된 유리 지방산과 유기산 및 휘발성 화합물들에 의해 고유한 맛과 향이 결정되며<sup>(3,4)</sup>, 특히 유리 지방산들은 치즈에 존재하는 펩타이드와 아미노산들과 결합하여 치즈의 조직에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다<sup>(5)</sup>.

치즈의 종류 및 숙성에 따른 향의 특성은 cheese curd가 proteolysis, lipolysis, glycolysis에 의해 분해되어 생성되는 유기산에 의해 결정되며, 이러한 변화를 치즈 숙성의 한 지표로 삼고자 하는 연구가 보고되고 있어<sup>(2,3,6)</sup> 치즈의 유기산의 조성과 함량을 정확하게 분석하는 것은 매우 중요하다.

치즈로부터 유기산을 분리하기 위해서는 일반적으로 용매 추출법과 음이온 교환 수지법이 널리 이용되고

Corresponding author: Kim, Jung-Han, Department of Food and Biotechnology Bioproducts Research Center College of Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

있으나 다량의 시료와 용매를 필요로 하고 분리 농축시 휘발성 유기산의 손실 및 오염의 위험성이 있으며 시간이 오래 걸리는 단점이 있다<sup>(7)</sup>. 또한 추출과정에서 지방과 인지질등이 가수분해되어 실제보다 많은 양의 유리 지방산들이 검출되기도 한다<sup>(8)</sup>.

본 연구실에서는 이미 수용성 및 지용성 시료로부터 다양한 휘발성, 비휘발성 유기산을 동시 분석하고 동정하는 고체상 추출법/ *tert*-butyldimethylsilyl(TBDMS) 유도체화/ dual-capillary column GC system의 신속한 분석법을 개발하여 보고한 바 있다. 본 연구에서는 이 분석법을 우유 및 4종류의 치즈(Cheeddar, Gouda, Emmental, Mozzarella)에 적용하여 휘발성과 비휘발성 유기산들을 신속히 프로파일링하고 스크리닝하였다. 또한 맹검 시료와 4개의 치즈들의 유기산에 대하여 Pearson의 상관분석법을 응용한 Direct Comparison법을 시도하여 각 시료와 맹검시료의 유기산 RI spectrum에 대한 유사도를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 연구에서 분석한 우유 및 4종류의 치즈(Cheeddar, Gouda, Emmental, Mozzarella)는 모두 시중에서 구입하여 냉장보관하면서 사용하였다. 추출용 용매인 HPLC 급 hexane은 Fisher Scientific사(Fair Lawn, NJ, USA)로부터, 시약급 diethyl ether(Duksan, Korea)는 potassium hydroxide상에서 연속 증류한 후 과량의 sodium sulfate를 넣어 4°C에 저장하면서 사용하였다. Silylation 시약인 *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide(MTBSTFA)는 Pierce(Rockford, USA)로부터, 포화탄화수소 표준물질들( $C_8 \sim C_{30}$ )은 Polyscience(Niles, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 고체상 추출용 흡착제인 Chromosorb P(AW, 80~100 mesh)는 Supelco(Bellefonte, USA)의 시약급이었으며, 황산, 소금, isooctane은 Junsei(Japan), sodium bicarbonate는 Yakuri(Japan)회사의 제품을 사용하였다.

### 기기분석

RI값 비교에 의한 유기산 동정의 목적으로 본 연구실의 dual-capillary column system을<sup>(11)</sup> 사용하였다. 컬럼 온도는 60°C에서 2분간 유지한 후 분당 4°C로 상승시켜 280°C에서 30분간 유지하였다. FID의 온도는 300°C였으며 splitless injector의 온도는 220°C였으며, 0.2  $\mu$ l의 시료를 포화탄화수소 혼합 표준용액(isooctane에 100 ppm의  $C_8 \sim C_{30}$ )과 함께 주입하였다. 이 때 purge delay time은 0.7분으로 고정하였다. GC로 동정된 유기산의 재확인인 HP-5890 series II GC와 HP-59940A MS Chemstation이 연결된 HP-5970B MSD를 사용하였으며, 컬럼은 HP-1(12 m  $\times$  0.20 mm I.D., 0.33  $\mu$ m df, Hewlett-Packard, Avondal, USA)을 사용하였고, 컬럼 온도는 80

°C에서 2분간 유지시킨 후 분당 4°C로 280°C까지 상승시켰다. Split injector의 온도는 260°C, split ratio는 30:1이었다. 70 eV의 EI(electron impact) mode로 interface 온도는 280°C로 유지하였다.

### 유제품내 유기산의 분리 및 동정

치즈 시료들은 먼저 약 200 mg씩 갈아 증류수에 용해시킨 뒤 얼음으로 차게 만든 후 진한 황산으로 pH 2 이하로 산성화 시키고 NaCl로 포화시켰다. Diethyl ether와 hexane을 1:1로 혼합한 용매 3 ml로 2회 추출한 후 추출된 용매층을 NaHCO<sub>3</sub> 포화용액 1.5 ml로 다시 추출하고 얻은 수용액 층은 pH 1 이하로 산성화시키고 NaCl로 포화시킨 뒤 Chromosorb P 컬럼에 loading 시켰다. Diethyl ether로 유기산들을 선택적으로 용출시켜 얻은 약 4 ml의 ether층에 triethylamine(TEA) 10  $\mu$ l를 가하고 질소로 농축시키고 MTBSTFA(20  $\mu$ l), isooctane (60  $\mu$ l)를 가하고 반응시킨 뒤 GC 및 GC-MS로 분석하였다. 우유의 경우에는 수용액에 용해시키는 과정없이 상기의 과정을 행하였다.

분리된 유기산 peak들의 RI값을 본 연구실에서 작성한 유기산 RI library(ACIDO. L)와 비교하여 동정하였다. 동정된 각 peak들은 면적비 비교법으로 재확인하였으며 GC-MS의 mass spectrum들은 미리 작성한 MS library (TBDMS. 1)와 비교하여 확인하였다.

### 유기산 RI spectrum 작성 및, 신뢰도와 유사도 평가

DB-5 컬럼으로 얻어진 GC chromatogram에서 유기산들의 피크 면적을 mass spectrum처럼 각 유기산들의 RI 값에 대한 백분 상대치 변화로 표시하여 RI spectrum을 작성하였다. 또한 가장 피크면적이 큰 유기산의 피크면적에 대한 백분 상대치로 계산하여 맹검 시료와 4개의 치즈들의 유기산에 대하여 Pearson의 상관분석법을 응용한 Direct Comparison법을 시도하여 본 분석방법에 의한 맹검 시료에 대한 유사도를 평가하였다.

## 결과 및 고찰

### 유제품의 유기산 프로파일링 및 스크리닝

두 단계의 고체상추출법을 사용하여 우유와 Cheddar, Gouda, Emmental, Mozzarella 치즈 시료로부터 유기산만을 선택적으로 분리하여 각 제품의 유기산들을 dual capillary column system으로 신속히 프로파일링한 후 스크리닝하고 각 동정된 유기산들은 GC-MS로 다시 확인하였다(Table 1).

총 31가지 유기산들이 동정되었는데 이중 21가지가 지방산이었으며 나머지는 hydroxy와 dioic acid류였다. 우유 및 4종의 치즈 모두에서 탄소수 4개의 butyric acid로부터 탄소수 18개의 stearic acid까지 even numbered 포화 지방산들이 동정되었다. 우유에서는 isobuty-

**Table 1. Organic acids found in dairy products**

| Peak No. | Acid                        | Normalized peak area (%) |         |        |          |            |            |
|----------|-----------------------------|--------------------------|---------|--------|----------|------------|------------|
|          |                             | Milk                     | Cheddar | Gouda  | Emmental | Mozzarella | Blind test |
| 1.       | Acetic                      | —                        | 24.72   | 52.76  | 28.34    | 40.81      | 48.32      |
| 2.       | Propionic                   | —                        | 0.80    | 1.31   | 100.00   | 0.70       | 1.02       |
| 3.       | i-Butyric                   | 19.40                    | 0.17    | 0.42   | 0.12     | 0.72       | 0.24       |
| 4.       | Butyric                     | 16.02                    | 14.70   | 12.60  | 5.27     | 4.60       | 10.70      |
| 5.       | i-Valeric                   | —                        | 0.25    | —      | 0.54     | 0.76       | —          |
| 6.       | Valeric                     | —                        | 0.21    | —      | 0.06     | —          | —          |
| 7.       | Caproic                     | 64.68                    | 12.25   | 8.13   | 3.79     | 5.76       | 7.63       |
| 8.       | Enanthic                    | —                        | —       | —      | 0.12     | 0.52       | —          |
| 9.       | Benzoic                     | —                        | —       | —      | 2.44     | —          | —          |
| 10.      | Caprylic                    | 62.55                    | 3.91    | —      | 2.04     | 6.98       | —          |
| 11.      | Lactic                      | —                        | 100.00  | 100.00 | 5.47     | 100.00     | 100.00     |
| 12.      | Glycolic                    | —                        | 1.50    | 0.77   | 0.19     | 3.42       | 0.79       |
| 13.      | Phenyl acetic               | —                        | —       | —      | 0.22     | —          | —          |
| 14.      | Pelargonic                  | —                        | 0.13    | —      | —        | —          | —          |
| 15.      | $\alpha$ -Hydroxy-i-valeric | —                        | 3.71    | 7.83   | 3.65     | 5.54       | 8.34       |
| 16.      | $\alpha$ -Hydroxy-i-caproic | —                        | 19.25   | 12.29  | 8.03     | 13.39      | 14.17      |
| 17.      | Capric                      | 24.96                    | 3.51    | 1.27   | 1.53     | 2.68       | 1.50       |
| 18.      | -Hydroxy-                   | —                        | —       | —      | 0.20     | —          | —          |
| 19.      | Succinic                    | —                        | 3.24    | —      | 5.28     | 1.36       | —          |
| 20.      | Glutaric                    | —                        | 0.27    | —      | 0.08     | —          | —          |
| 21.      | Lauric                      | 19.83                    | 1.84    | 0.37   | 0.42     | 1.39       | 0.45       |
| 22.      | Myristoleic                 | —                        | 0.42    | —      | 0.10     | —          | —          |
| 23.      | Myristic                    | 39.28                    | 2.58    | 0.99   | 0.82     | 1.29       | 0.47       |
| 24.      | p-OH-benzoic                | —                        | —       | —      | 0.20     | —          | —          |
| 25.      | Pentadecanoic               | —                        | —       | —      | 0.06     | —          | —          |
| 26.      | Palmitoleic                 | —                        | 0.49    | —      | 0.14     | —          | —          |
| 27.      | Palmitic                    | 100.00                   | 4.62    | 0.98   | 1.94     | 2.59       | 0.86       |
| 28.      | Linoleic                    | 23.27                    | 2.01    | —      | —        | —          | —          |
| 29.      | Oleic                       | 30.74                    | 0.35    | 0.81   | 0.94     | 0.86       | 0.78       |
| 30.      | Elaidic                     | —                        | —       | —      | 0.10     | —          | —          |
| 31.      | Stearic                     | 19.33                    | 0.54    | —      | 0.34     | 0.52       | —          |

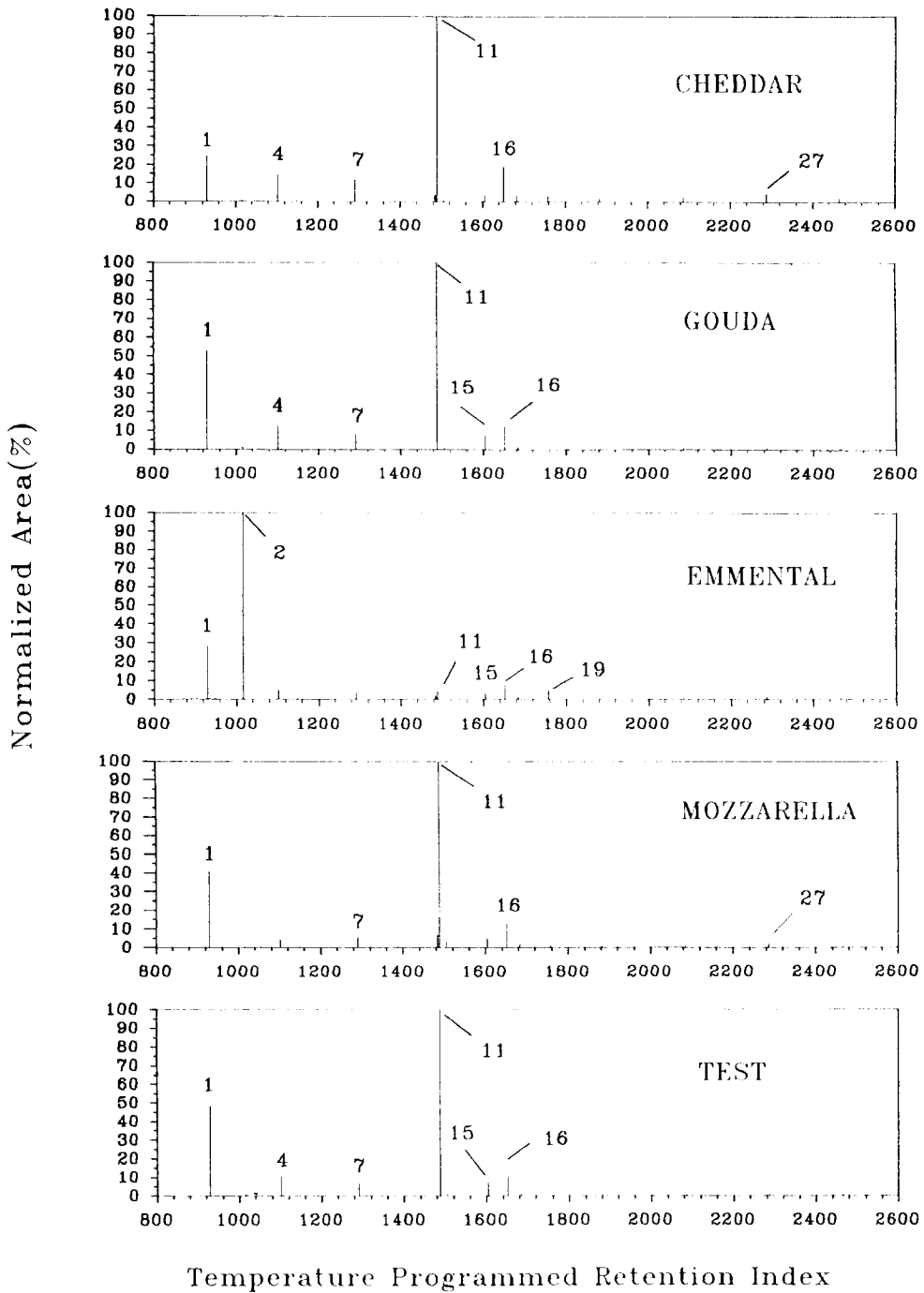
ric acid와 isocaproic acid가 발견되었으며, 4종의 치즈 중 Gouda 치즈에서 발견된 24종의 유기산들은 나머지 3종의 치즈에서 모두 공통적으로 존재하였으나 양적인 차이가 있었다<sup>(6,13)</sup>. 적은 양으로도 강한 향을 주는 isovaleric acid, isocaproic acid 등의 branched chain 지방산들 중 isovaleric acid는 4종의 치즈 모두에서 발견되었다. Mozzarella 치즈와 Cheddar 치즈에서는 pelargonic acid가<sup>(8,14)</sup> 특징적으로 발견되었으며 Emmental 치즈에서는 다른 종류의 치즈에서 보다 많은 종류의 유기산들이 다량 발견되었다. Swiss 치즈의 향기 성분 중 하나로 보고된<sup>(3,4)</sup> 바 있는 pentadecanoic acid, phenylacetic acid는 p-hydroxy benzoic acid와 더불어 Emmental 치즈에서 특징적으로 발견된 유기산들이다<sup>(15)</sup>.

4종의 치즈에 존재하는 유기산들의 GC 프로파일들은 매우 특징적이었는데 Cheddar 치즈에서는  $\alpha$ -hydroxy i-valeric acid의 양이 다른 치즈보다 다소 적었고 문헌의 보고대로 butyric acid는 다른 유기산에 비해

많았다<sup>(7)</sup>. Gouda 치즈는 전체적으로 유기산의 양이 적었으나  $\alpha$ -hydroxy i-valeric acid의 양은 많았다. Emmental 치즈에서는 propionic acid와 i-valeric acid가 많았는데 이는 Emmental 치즈 제조시 다른 cheese와는 달리 starter로 *Propionibacterium Shermanii*를 사용하는데 이 starter의 대사산물로 propionic acid가 특히 많이 존재하는 것으로 생각된다<sup>(6)</sup>. Mozzarella 치즈는 전체적으로 유기산의 양이 적었고 특히 휘발성 저급 지방산이 다른 치즈에 비해 적었다.

#### 유기산 RI spectra 비교 및 유사도

각 치즈의 유기산 패턴을 비교하여 상이성을 찾기 위하여 DB-5 컬럼에 의해 분리, 동정된 유리지방산과 유기산 피크들만을 선택적으로 확대하여 막대그래프 형태의 RI spectra로 단순화하여 GC 프로파일을 단순화시켰다<sup>(11,12)</sup>. 맹검시료를 각 치즈들의 RI spectra와 서로 비교해 볼 때 Gouda 치즈의 패턴과 같음을 신속히 관별할 수 있었다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Temperature programmed retention index spectra of free organic acids from cheese samples. Peak numbers correspond to those in Table 1

작성된 RI spectrum 유사도를 측정하기 위해 맹검시료에 대한 Pearson의 상관분석법을 이용하여 match quality(ppt)를 계산하였다. 맹검시료에 대한 각 표준시

료의 match quality는 Gouda 치즈(999), Mozzarella 치즈(935), Cheddar 치즈(1.0), Emmental 치즈(0.5) 순으로 감소했다. 이 결과는 match quality에 의한

Direct Comparison법이 패턴분별에 손쉽게 이용될 수 있음을 보여주었다.

## 요 약

고체상 추출법을 이용하여 우유와 cheese에 존재하는 유기산들을 분리 농축한 후 tert-butylidimethylsilyl (TBDMS) 유도체화하여 GC와 GC-MS로 분석하였다. 치즈에 존재하는 유기산들을 고체상추출하기 위해서는 먼저 치즈를 증류수에 용해시킨 후 산성화시켜 용매 추출함으로써 염을 제거할 수 있었으며 이어 NaHCO<sub>3</sub> 포화 용액으로 추출해 낸 수용액은 Chromosorb P컬럼으로 고체상 추출하여 유기산들만을 선택적으로 얻을 수 있었다.

TBDMS 유도체화하기 전 유기산들을 triethylammonium 염으로 만들어 줌으로써 휘발성 유기산의 손실도 막을 수 있었다. 우유 및 4종류의 치즈에서는 모두 31가지 유기산들이 동정되었는데 이 중 21가지가 지방산이었으며 나머지는 hydroxy 와 dioic acid류였다. 특히 치즈의 향을 좌우하는 휘발성 지방산들이 다수 발견되었는데 치즈의 종류에 따라 그 양적인 차이를 나타내어 특징적 GC 프로파일들을 나타내었다. 각 치즈의 GC 프로파일의 유기산 조성만을 나타내도록 단순화시킨 RI spectra로 표현한 결과, 각 치즈의 패턴분별이 용이하였으며, Direct Comparison 법을 시도해 본 결과, 999 ppt의 match quality를 나타내어 맹검시료가 Gouda 치즈임을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 일부 1994년도 한국과학재단의 핵심전문연구(과제번호 941-0300-011-2)와 연세대학교 생물산업 소재연구센터의 지원으로 수행되었음.

## 문 헌

- Marsili, R.T., Ostapenko, H., Simmons, R.E. and Green, D.E.: High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. *J. Food Sci.*, **46**, 52(1981)
- Marsili, R.: Monitoring chemical changes in Cheddar cheese during aging by high performance liquid chro-

- matography and gas chromatography techniques. *J. Dairy Sci.*, **68**, 3155(1985)
- Ha, J. Kim and Lindsay, R.C.: Contributions of cow, sheep and goat milks to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheese. *J. Dairy Sci.*, **74**, 3267(1991)
- Woo, A.H. and Lindsay, R.C.: Concentration of major free fatty acids and flavor development in Italian cheese varieties. *J. Dairy Sci.*, **67**, 960(1984)
- Flavor in Light Cheese Products. *Food Technology*, **44**, 94(1990)
- Aishima, T. and Nakai, S.: Pattern recognition of GC profiles for classification of cheese variety. *J. Food Sci.*, **52**, 939(1987)
- Vandeweghe, P. and Reineccius, G.A.: Comparison of flavor isolation techniques applied to Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1549(1990)
- Salih, A.M.A., Anderson, M. and Tuckley, B.: The determination of short- and long-chain free fatty acids in milk. *J. Dairy Research*, **44**, 601(1977)
- 김정례, 김정한, 박형국: TBDMS 유도체로서 수용액 시료중의 유기산 미량 분석 연구. 대한화학회지, **34**, 352(1990)
- Kim, K.R., Kim, J.H., Park, H.K. and Oh, C.H.: Dual capillary column system for the qualitative gas chromatography: 1. Comparison between split and splitless injection modes. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **12**, 87(1991)
- 김정한, 김경례, 채정영, 오창환, 박형국: 기체크로마토그래피법에 의한 식물성 유지내 유리지방산의 신속한 스크리닝. 한국식품과학회지, **25**, 373 (1993)
- 김정한, 김경례, 채정영, 박형국, 최경숙: 기체크로마토그래피법에 의한 알콜 음료내 휘발성 및 비휘발성 유기산의 신속한 스크리닝. 한국식품과학회지, **26**, 162 (1994)
- Nieuwenhof, F.F.J. and Hup, G.: Gas chromatographic determination of free fatty acids in cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, **25**, 175(1971)
- Ha, J. Kim and Lindsay, R.C.: Method for the quantitative analysis of volatile free and total branched-chain fatty acids in cheese and milk fat. *J. Dairy Sci.*, **73**, 1988(1991)
- Ha, J.K. and Lindsay, R.C.: Volatile branched-chain fatty acids and phenolic compounds in aged Italian cheese flavors. *J. Food Sci.*, **56**, 1241(1991)
- Scott, R.: Cheese Making Practice. Applied Science Publishers. (1981)

(1994년 4월 29일 접수)