J. of Korean Dairy Techno. and Sci. 18(1) : 58~70, 2000

Yogurt의 향미성분과 분석기술

장 은 정 · 곽 해 수
세종대학교 식품공학과

Yogurt Flavor Compounds and Analytical Techniques

Eun-Jung Chang and Hae-Soo Kwak
Department of Food Science and Technology, Sejong University

ABSTRACT

Consumers primarily consider flavor when they take yogurt. Recent researches on yogurt flavor productron its analytical technique have been extensively developed. These studies have provided a better understanding on the role of starter culture microorganisms on flavor formation and degradation. Yogurt volatile flavor compounds produced by the lactic cultures include acetaldehyde, diacetyl, ethanol and organic acid. Among them, acetaldehyde is recognized as a principal flavor component. since yogurt contains a delicate and low intense flavor, mild sample isolation techniques and sensitive identification means might be used. This paper attempts to discuss recent findings in yogurt flavor and to describe the application of yogurt flavor separation techniques. The section on practical aspects of culture selection based on flavor compound production and flavor analysis is also included.

(Key words : yogurt, flavor, acetaldehyde, starter culture, analysis)

Ⅰ. 서 론

Yogurt는 오래전부터 세계 각국에서 소비되어 온 대표적인 발효유의 하나로 유산균(lactic acid bacteria)인 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*를 사용하여 우유를 발효시킨 제품이다[1]. 1960년대 이래로 yogurt는 그 독특한 향미(flavor)와 조직감(texture), 그리고 유산균이 인체에 미치는 건강상의 잇점때문에 소비가 증가하고 있는 추세이다[2].

Yogurt의 향미는 점도 및 유산균수와 함께 소비자들의 기호도에 큰 영향을 미치는 yogurt의 주요한 품질 평가 기준으로 yogurt의 특이한 고유 향미는 비휘발성산(non-volatile acid), 휘발성 향미 성분(volatile flavor compound), 아미노산(amino acid), 지방산(fatty acid)등에 기

Corresponding author : Hae-Soo Kwak, Department of Food Science and Technology, Sejong University, 98 Kunja-dong, Kwangjin-gu, Seoul 143-747, Korea.

인[3]하며 그 중 yogurt의 생산과정에서 젖산균에 의해 생성되는 휘발성 향미 성분들이 가장 중요한 영향을 미친다. 1950년대부터 yogurt의 향미 성분들에 대해 많은 연구들이 진행되었는데 여러 연구에 의해 보고된 바에 따르면 현재 약 60가지의 향미성분들이 밝혀져 있고[2], acetaldehyde, acetone, diacetyl등이 yogurt 향미의 주요 성분이며, 이 중 acetaldehyde 함량이 향미에 미치는 영향이 가장 큰 것으로 알려져 있다[4]. 이들 성분의 함량은 starter culture의 종류, 원유의 질, 배양조건, 저장조건 등에 의해 달라질 수 있다[5].

Yogurt의 향미성분들은 ppm 또는 ppb로써도 냄새가 나므로 매우 적은 농도의 향미성분을 갖고 있다. 따라서 향미성분을 분석하기 위해서는 추출이나 농축의 과정을 거치게 되는데 yogurt의 향을 있는 그대로 분석하려면 시료의 종류와 사용방법 등을 고려하여 분석과정에서 화학적인 변화 없이 또는 변화를 최소화하여 분석하는 것이 중요하다. 시료의 추출과 농축과정에서 화학적 변화가 발생할 경우에는 분석결과를 믿을 수 없게 되며 오히려 잘못된 정보를 제공하게 된다. 따라서 정확한 분석을 위해서는 시료의 사용방법, 처리방법, 검출기의 감도 등을 종합적으로 고려해서 분석하는 것이 중요하다[6]. Yogurt의 향미성분을 분석하는 방법으로 일반적으로 GC를 이용한 headspace analysis가 현재 가장 많이 사용되고 있으나, yogurt의 향은 강도가 약하기 때문에 headspace analysis를 하려면 시료를 가열하여 향미성분의 휘발성(volatility)을 증가시켜야 하므로 향미성분의 변화를 가져올 수 있으므로 좀더 효과적이고 신속, 정확하게 향미성분을 분석할 수 있는 방법이 필요한 실정이다[2].

따라서 본고는 yogurt의 향미 성분이 어떻게 형성되며 어떠한 요인들에 의해 변화되는지를 알아보고, 여러가지 현재 시행되고 있는 yogurt의 향미분석방법들을 비교 분석함으로써 우수한 품질의 yogurt를 생산하고 이를 평가할 수 있는 분석방법을 모색하는데 그 목적이 있다.

Ⅱ. Yogurt 향미성분의 형성

Yogurt의 향미는 젖산균이 우유를 발효하는 동안 생성되는 휘발성 carbonyl 화합물에 기인한다. 대표적인 휘발성 carbonyl 화합물로는 acetaldehyde, diacetyl, acetoin(acetyl methylcarbinol), acetone, butanone-2등이 있으며, 특히 acetaldehyde가 yogurt의 향미에 미치는 영향이 가장 크다. Acetaldehyde의 농도가 적합할 경우에는 전체적인 향미를 균형있게 하며 좋은 yogurt의 향미를 부여하지만, 과다할 경우에는 여러 발효유제품에서 yogurt-like 또는 green flavor와 같은 좋지 않은 향미를 부여한다[7]. Yogurt의 starter culture로 사용되는 *Streptococcus thermophilus*와 *Lactobacillus bulgaricus*는 해당과정(glycolysis)을 통해 glucose로부터 pyruvate와 acetyl-CoA를 형성한 후 acetaldehyde를 생산하거나, threonine aldolase의 작용으로 threonine으로부터 acetaldehyde를 생산한다[8,9](Fig. 1). 단일 균주를 배양할 경우, *L. bulgaricus*가 *S. thermophilus*보다 acetaldehyde를 더 잘 생산하지만, Shanker[10]는 혼합균주를 이용할 경우, 대부분의 acetaldehyde를 *S. thermophilus*가 생산한다고 보고하였다. 단백질로부터 acetaldehyde를 생성하는 기작은 *Lactobacillus*의 막표면에 결합된 proteinase에 의해 단백질이 분해되어 생성된 threonine 또는 methionine함유 peptide들이 방출된 후 *Str. thermophilus*의 peptidase와 aldolase의 작용으로 acetaldehyde가 생성된다. 또한 젖산균의 당대사는 젖산생성과 함께 acetaldehyde 생성에도 중요한 역할을 한다[11].

Acetoin과 diacetyl은 우유중에 들어있는 citrate(우유 1ℓ중 약 1g)가 *Str. cremoris, Leu. cremoris, Str. diacetilactis* 등의 젖산균에 의해 생성되며, yogurt나 버터의 좋은 향미를 형성하는데 중요한 성분이 된다. Citrate는 citrate lyase에 의해 acetate와 oxaloacetate로 분해되는데, citrate lyase는 citrate의 혐기분해과정에서 key enzyme이기 때문에 젖산균과 장내세균에 존재

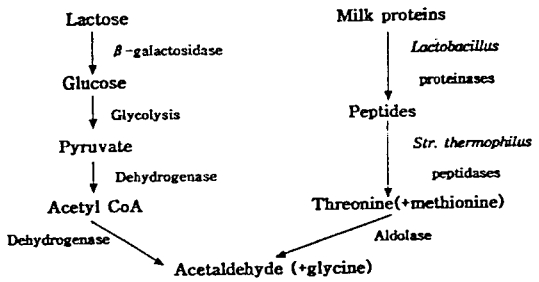


Fig. 1. Pathways to acetaldehyde by yogurt starters[11].

하며, 호기적 조건에서는 citrate의 분해가 일어나지 않는다. 이 과정에서 생성된 acetate는 균체 외부로 분비되고 oxaloacetate는 탈탄산되어 pyruvate로 된다. 이 반응에서 diacetyl은 pyruvate로부터 acetyl-CoA를 거쳐 합성되며 acetoin dehydrogenase의 작용을 받아 환원되어 acetoin으로 되는데, 우유중의 citrate는 $NADH_2$의 생성없이 pyruvate로 전환되기 때문에 diacetyl 생성을 위한 좋은 기질이 된다[12,13].

Ⅲ. Yogurt의 향미성분에 영향을 미치는 요소

1. Starter cultures의 종류

젖산균에 의해서 생성되는 향미성분들은 발효에 이용되는 균종에 따라서 특징지워진다. Yogurt에 있어서 starter culture의 종류가 향미생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 Hamdan 등[7]은 *L. bulgaricus*와 *Str. themophilus*의 혼합균주와 각각의 단일균주를 사용하여 yogurt를 제조한 후 45℃에서 저장하면서 acetaldehyde의 함량을 시간별로 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 단일 균주로 yogurt를 제조할 경우, *L. bulgaricus*가 *Str. thermophilus*보다 더 많은 양의 acetaldehyde를 생산하지만, 혼합균주를 사용하였을 때보다는 적은 양을 생산한다. 세가지의 경우 모두 5시간 배양 후 최고치의 acetaldehyde 함량을 나타내었고 그 이후에는 감소하였으며 이 결과는 Petter 등[13]과 Bautista 등[14]이 발견한 두 균주간의 공생관계를 뒤받침해 준다. 또한 Beshkova 등[15]도 *L. bulgaricus*와 *Str. themophilus*의 혼합균주와 각각의 단일균주를 사용하여 제조한 yogurt의 향미성분을 비교하였다. *L. bulgaricus*는 단일균주와 혼합균주 모두에서 배양 초기에 acetaldehyde의

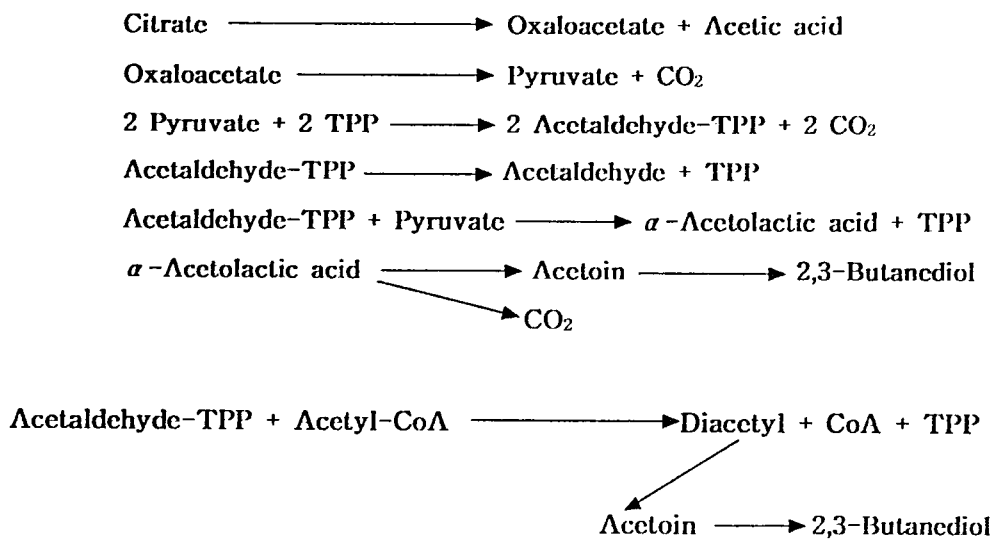


Fig. 2. Pathways for enzymatic conversion of citric acid by *Str. diacetilactis* and *L. citrovorum*[12].

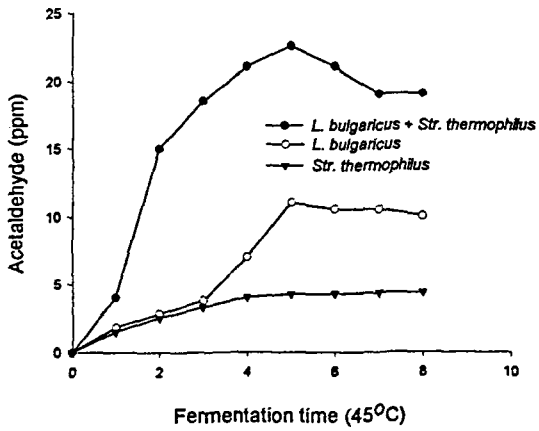
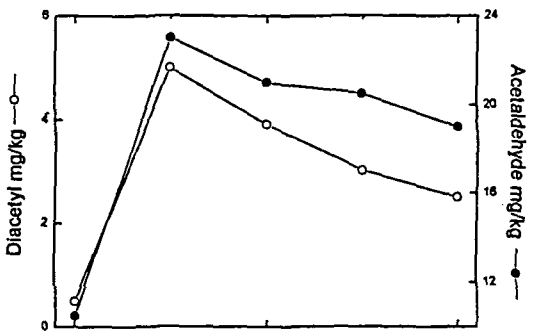


Fig. 3. Acetaldehyde production by a single strain of *Str. thermophilus*, *L. bulgaricus* and a 1:1 mixture of both[7].

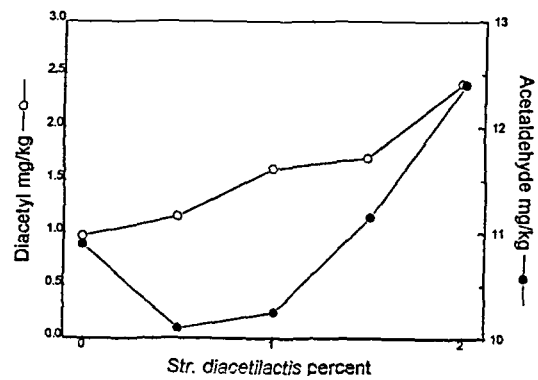
생산이 활발하였고, 배양 22시간후에 가장 높은 acetaldehyde 함량을 나타내었으며, 혼합균주를 이용하여 제조한 yogurt에서 1.5배 정도 acetaldehyde가 더 많이 생성되었다. 혼합균주를 이용하여 22시간 동안 배양한 경우 1734.2ppm로 최고의 acetaldehyde 함량을 나타내었다. Pyruvate가 과량으로 생산되어 세포에 대해 독성작용을 나타낼 경우에 젖산균들은 이를 이용하여 중성화합물인 diacetyl과 acetoin같은 화합물을 생산하게 되는데, diacetyl의 경우는 acetaldehyde와 유사한 경향을 나타내었으나, acetoin은 *Str. thermophilus*를 사용한 혼합균주와 단일균주에서만 생성되었고, 그 함량에 있어서는 큰 차이가 없었다. Acetone과 2-butanone의 경우는 전체적으로 큰 차이를 나타내지 않았으나, *Str. thermophilus* 단일균주일 경우 발효 초기와 후기에는 거의 감지되지 않았다.

Acetaldehyde의 원료가 되는 것은 lactose와 citrate를 우선적으로 지적할 수 있고, 이외에 아미노산(threonine)의 전환도 생각할 수 있다. *L. bulgaricus*와 *L. acidophilus*는 threonine aldolase의 활성을 가지고 있어 threonine으로부터 acetaldehyde를 생성하지만, *L. acidophilus*는 acetaldehyde를 환원하여 ethanol을 생성하는 alcohol dehydrogenase를 가지고 있어 acetaldehyde를 ethanol로 만들어 버리기 때문에 *L. acidophilus*로 yogurt를 제조할 경우 yogurt의 주요 향미성분인 acetaldehyde의 함량이 부족하여 제품의 향미에 결함이 생긴다[16].

*L. bulgaricus*는 다른 균주에 비해 acetaldehyde의 생성이 우수하고 *L. casei*, *L. brevise*, *L. plantarum*은 pyruvate로부터 다량의 diacetyl과 acetone을 생성하여 yogurt의 향미에 영향을 미친다[17,18]. Yogurt에 있어서 diacetyl과 acetoin의 생성은 극히 적은 양이며, 일반적으로 acetoin의 함량이 diacetyl의 함량보다는 상당히 많다. 이



(a) Modified method of manufacture
(incubation at 42℃ for 1hr+30–32℃ for 5–6hrs)



(b) Standard method of manufacture
(Incubation at 41–42℃ for 2–2.5hrs)

Fig. 4. Influence of *Str. diacetilactis*culture on the diacetyl and acetaldehyde production in yogurt[20].

Table 1. Free volatile fatty acid productions by a single stralu *Str. thermophilus*, *L. bulgaricus*, and a mixture of both[15]

Volatilefatty acid(μg /100g)	Sterilized base milk	*S. thermophilus*	*L. bulgaricus*	*L. bulgaricus*+ *S. thermophilus*
Acetic	460.0	960.0	1120.0	1720.0
Propionic	traces	60.0	traces	traces
Butyric	500.0	680.0	860.0	890.0
Isovaleric	traces	30.0	traces	80.0
Valeric	120.0	240.0	290.0	340.0
Caproic	360.0	540.0	680.0	780.0
Caprylic	200.0	230.0	280.0	390.0
Capric	170.0	220.0	190.0	260.0

두 물질은 발효유제품의 향미에 중요한 성분이 되며 yogurt에서 diacetyl의 극소량 또는 0.9ppm 정도는 부드럽고 상쾌한 느낌을 주는 향미를 형성하는데 특히 acetaldehyde의 함량이 적은 경우에 이 두 물질의 작용은 중요하다[19]. 이는 주로 *Str. thermophilus*에 의해 생성되므로 *L. bulgaricus*와 *Str. thermophilus*의 혼합균주일 경우 이들의 비율에 의해서도 diacetyl과 acetoin의 함량은 달라질 수 있다[11]. *L. bulgaricus*는 극미량의 acetoin을 생성하는데, 이 성분은 diacetyl보다는 yogurt의 향미에 큰 영향을 주지 않는다. Yogurt 배양액에 *Str. diacetilactis*를 첨가하면 diacetyl의 함량이 Fig. 4에서 처럼 증가하게 된다[19].

Yogurt의 주요한 향미성분인 휘발성 지방산의 종류와 함량도 starter culture의 균종에 따라 달라지는데, 이는 젖산균에 의해 지방이 가수분해되어 휘발성 유리지방산의 함량이 증가하기 때문이다. 일반적으로 acetic, propionic, butyric, isovaleric, valeric, caproic, caprylic, capric acid가 주로 생성되며, acetic, butyric, capric acid의 함량이 높고, 혼합균주가 단일균주보다 휘발성 지방산의 생산량이 많다[15](Table 1).

2. 배양 조건

Yogurt 제조시, starter culture를 우유에 첨가하여 배양할 때의 온도와 pH는 젖산균에 의한 향미생성에 영향을 미치게 되는데, 일반적으로 acetaldehyde는 저온보다는 고온에서 젖산균에 의한 생산이 더욱 활발하다. Hamdan 등[7]이 세가지 starter를 이용하여 4℃와 45℃에서 배양했을 때, 고온인 45℃에서 acetaldehyde가 더 많이 생성되었고 (Fig. 5), Bills와 Day[21]는 lactic streptococci의 dehydrogenase가 저온에서 활성화되기 때문에 acetaldehyde를 분해하여 그 함량이 감소한다고 하였다. 또한 Keenan 등[22]도 *Lactobacillus* sp.의 dehydrogenase 활성에 대해 보고하였다. Yogurt의 향미성분 생산속도는 산도에 의존하는데, 일반적으로 pH 5.0에서 향미성분의 생산이 시작되고, pH 4.4~4.3(42℃에서 3시간정도)까지는 급격히 생산속도가 증가하다가 그 이후에는 거의 증가가 일어나지 않고 pH 4.0 부근에서 안정화된다[19]. 이러한 현상은 아마도 pH 4.5 부근에서는 pyruvate의 흡수가 증가되어 acetaldehyde 생산이 활발해지다가 그 이하의 pH가 되면 acetaldehyde 생성에 관여하는 효소들이 불활성화되기 때문인 것으로 생각된다[16]. 가장 적합한 yogurt의 향미는 보통 pH 4.4~4.0에서 23~41ppm의 acetaldehyde를 함유하고 있을 때 형성된다[19].

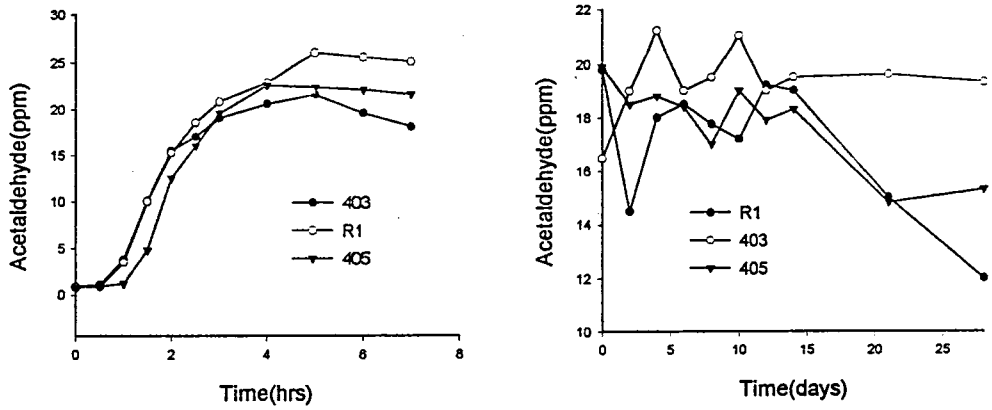


Fig. 5. Acetaldehyde production by three different starter cultures[7].

A : seven hours of incubation at 45℃
B : 4 weeks of storage at 4℃

Ⅳ. Yogurt 향미성분의 분석

1. 추출방법

일반적으로 yogurt의 향미 분석에 가장 많이 사용되는 추출방법은 headspace와 simultaneous distillation-extraction(SDE)인데 yogurt의 향미는 그 강도가 낮기 때문에 향미성분의 휘발성을 향상시키기 위해 시료에 열처리를 한다. 따라서 이 경우 민감한 향미성분들의 조성 및 형태가 변하여 artifacts를 형성할 수 있으므로 실온에 가까운 온화한 조건에서 시료를 처리하는 방법을 고안해야 할 필요가 있다[23]. 일반적으로 closed system에서 일정량의 headspace volume을 syringe로 취하는 방법을 static headspace analysis라 하는데 이 방법의 경우 향미성분의 휘발을 위해 열처리를 하게 되므로 위에서 언급한 문제점들이 발생하게 된다. 그러나 purge-and-trap 시료처리법과 dynamic headspace analysis는 가스를 시료에 주입하여 휘발성 성분을 흡착제나 냉각관에 포집한 후 GC에 주입하게 되므로 static headspace analysis(Fig. 6)에 비해 저온에서 시

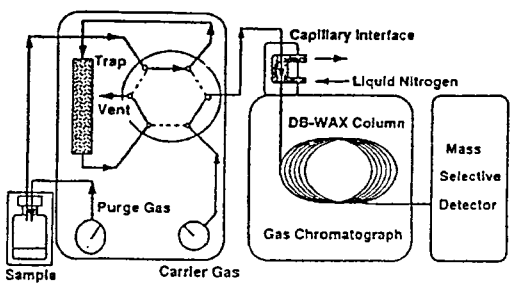


Fig. 6. Fig. 6. Devices of dynamic headspace analysis of gas chromatography and mass selective detector[29]

료를 처리할 수 있으므로 열처리에 의해 발생하는 문제점들을 해결할 수 있다[24]. Laye[25]와 Imhof[26]등은 이러한 방법을 이용하여 각각 23와 33개의 yogurt의 향미성분을 밝혀냈는데 acetaldehyde를 비롯하여 2,3-butanedion, 2,3-pentanedione, dimethyl sulfide, benzaldehyde등이 주요 향미성분임을 제안했다. Ott 등[27]은 static and trapped headspace GC를 이용하여 yogurt의 주요 향미 성분인 α-diketone류(2,3-butanedione, 2,3-pentanedione)와 acetaldehyde를 분석하였

다. 이 방법은 검출한계가 mg/kg에 불과하던 기존의 static headspace 방법을 변형함으로써 열처리없이 향미성분을 고농도로 농축시켜 검출한계를 μg/kg으로 끌어올렸다. 또한 Ulberth[28]는 static headspace 추출법을 이용하여 yogurt의 향미성분인 acetaldehyde, ethanol, acetone, diacetyl, 2-butanone을 분석하였다. Simultaneous distillation-extraction(SDE)는 Lickens와 Nickerson이 고안한 향미성분 추출 장치로 식품의 향을 물과 같이 증발시키고 증발된 용매와 같이 냉각시켜 향은 용매로 옮겨진 후 branch에서 물은 물로, 용매는 용매로 계속 순환하는 연속추출장치로 최근에는 감압장치를 부착하여 휘발성 성분을 더욱 낮은 온도에서 휘발하게 하여 artifact의 형성을 줄이는 장치로 purge-and-trap을 이용한 추출방법과 함께 가장 흔히 사용되고 있다[30].

또 하나의 향미 추출방법인 증류법은 적은 양이나 휘발하는 향미성분의 성질을 사용하여 분석하는 방법이다. 물의 증류시 100℃의 높은 온도로 추출하기 때문에 artifacts의 형성을 초래하지만 이를 줄이기 위해 감압장치를 달아 휘발성 성분과 물이 낮은 온도에서 휘발하게 함으로서 artifact의 생성을 최소화 할 수 있다. 이 방법은 비교적 특별한 장치 없이 간단히 향미성분을 추출할 수 있는 방법으로 yogurt의 향미성분 분석에도 일반적으로 많이 사용되고 있다[30]. 임 등[17]은 다양한 상업적 혼합균주로 제조한 호상요구르트

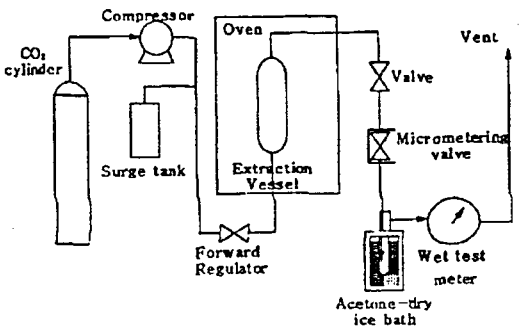


Fig. 7. Flow diagram of supercritical extraction system[31].

의 저장 중 향미성분의 변화를 알아보기 위해 증류법으로 향미성분을 측정하여 acetaldehyde, diacetyl, ethanol, acetone, 2-butanone, 2-heptanone등의 함량을 비교하였고, 곽[5] 역시 같은 향미추출방법을 이용하여 저장중 yogurt의 향미성분의 변화를 측정하였다.

초임계 유체 추출(Supercritical Fluid Extraction)법은 초임계 유체 즉 물질이 갖고 있는 고유의 임계온도와 임계압력을 초월한 상태에 있는 유체를 사용하여 향미성분을 추출하는 방법으로 특히 일반적으로 많이 사용하는 초임계 CO_2는 액체 상태이며 비중과 점도가 낮아 가스와 같은 침투력이 강한 특성을 가지므로 광범위한 식물체의 천연향을 분리할 때 많이 사용[30,31]되고 있으며 아직 yogurt의 향미성분 추출에 이용된 보고는 없다. 그러나, 초임계 유체 추출법은 온화한 온도조건 하에서 추출이 이루어지고 용매가 잔존하지 않으며 무산소 하에서 추출되기 때문에 향미성분의 산화를 억제할 수 있는 다양한 장점들[31]을 가지고 있으므로 yogurt의 향미성분 분석에도 그 이용이 기대된다(Fig. 7).

V. Yogurt의 향미성분 분석

오늘날 여러 가지 향미성분들은 크게 세가지 방법에 의해 측정되고 있는데, 첫번째가 colorimetric method[32-34]이고, 두번째는 polarogarphic method, 마지막으로 세번째가 GC(gas chromatography) method[35]이다. 일반적으로 yogurt의 향미성분들은 normal 또는 capillary column이 연결된 GC(gas chromatography)를 이용하여 정성·정량분석을 하고 새로운 향미성분일 경우에는 GC/MS(gas chromatography/mass spectrophotometry)를 이용하여 동정하고 그 화학구조를 밝혀내고 있다[2,36]. 또한 yogurt의 향미성분 중에 하나인 diacetyl 경우는 GC를 이용한 방법[37]외에도 특별히 colorimetric method(spectrophotometry and fluorimetry)과 최근에는 HPLC를 이용한 방법[38]이 사용되고 있다.

GC의 분석조건은 분석자의 의도나 실험환경

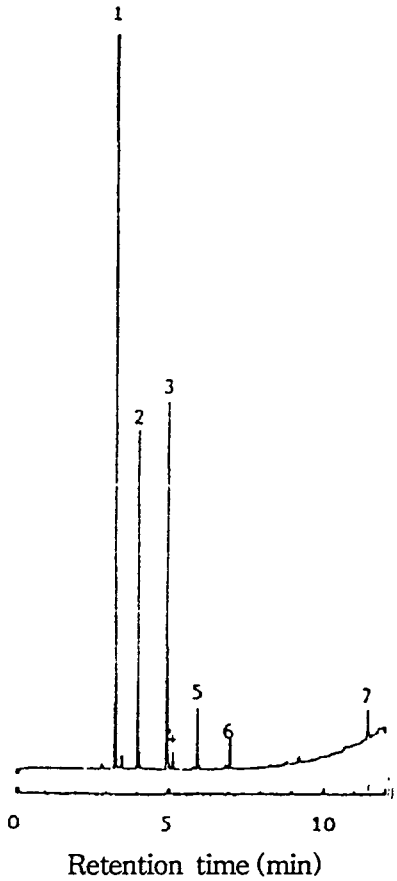


Fig. 8. Typical chromatogram of carbonyl compounds obtained from yogurt stored at 10℃ for 3days[5] The compounds identified are : 1=acetaldehyde, 2=acetone, 3=ehyl acetate (internal standard), 4=2-butanone, 5=ethanol, 6=diacetyl, 7=2-heptanone

Table 2. GC analysis of aromatic-compound recovery in yogurt[a 2)]

Compound	Added (μg/g)	Total (μg/g)	Found (μg/g)	Recovery[b] (%)
Acetaldehyde	5.0	40.3	39.0	96.8
	15.0	50.3	45.3	90.0
	30.0	65.3	65.3	100
	0.75	2.68	2.58	96.3
Acetone	1.50	3.43	3.36	98.0
	3.00	4.93	5.12	104
	0.75	2.13	1.94	91.1
Diacetyl	1.50	2.88	2.62	90.9
	3.00	4.38	4.09	93.4
	5.00	9.10	8.19	90.0
Ethanol	10.0	14.1	13.6	96.6
	15.0	19.1	18.7	98.0
	1.50	3.56	3.48	97.8
Methanol	3.00	5.06	5.16	102
	6.00	8.06	7.66	95.0
	0.75	2.11	1.98	93.8
Propanol	1.50	2.86	2.69	94.1
	3.00	4.36	4.06	93.1

[a] Yogurt contained 35.29μg/g acetaldehyde, 1.93μg/g acetone, 1.38μg/g diacetyl, 4.10μg/g ethanol, 2.06μg/g methanol and 1.36μg/g propanol.
[b] Mean of triplicate

에 따라 조금씩 차이가 있으나 일반적으로 yogurt의 향미성분을 분석하고자 할 때는 capillary column과 FID(flame ionization detector)를 사용[2)]하며, 그외의 carrier gas의 종류나 flow rate, column의 온도 등은 유동적이다. GC는 여러 가지 향미성분을 한꺼번에 정량할 수 있으며 Fig. 8은 yogurt의 향미성분을 GC로 분석한 chromatogram이며, Table 2은 GC 분석방법의 정확도를 평가하기 위하여 여러 가지 yogurt 향미성분의 standard solution으로 recovery test를 한 결과이다. Recovery test의 결과, acetaldehyde 97.7%, acetone 99.4%, methanol 98.27%, ethanol 94.87%, propanol 93.67%로 대체로 90% 이상의 높은 recovery rate를 나타내었다.

비색정량방법(colorimetric method)에는 크게 spectrophotometric method와 fluorimetric method 두가지가 있으며 이 방법들은 yogurt의 향미성분 중 diacetyl 정량에만 사용될 수 있는 방법으로 여러 가지 성분을 한꺼번에 정량할 수 있는 GC 방법과는 차이가 있으나, diacetyl에 대한 감도가 좋고 비교적 GC에 비해 추출하고 분석하는 방법이 쉽고 신속하므로 앞으로의 사용이 기

Table 3. Reaction conditions and analytical characteristics of spectrophotometric and fluorimetric methods in yogurt[2)]

Reaction conditions	Spectrophotometry	Fluorimetry
Isoniazide added to	Excess 300	Excess 1500
Time	10 min	15 min
Temperature	Room temperature	Room temperature
Zr(Ⅳ) added to	Excess 50	Excess 2500
Time	30min	30 min
Temperature	Room temperature	Room temperature
HCl added to pH	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Wavelengths	410nm	Excitation 410nm
		Emission 510nm
Blank	INH+HAc+Zr(Ⅳ)+HCl	INH+HAc+Zr(Ⅳ)+HCl

Table 4. Diacetyl recovery determined by spectrophotometric and fluorimetric methods[2)]

Method	Added (μg/g)	Total (μg/g)	Found (μg/g)	Recovery[a] (%)
Spectrophotometric[b]	5.0	13.7	13.4	97.8
	10.0	18.7	18.0	96.2
	15.0	23.7	23.0	97.0
	20.0	28.7	27.6	96.2
Fluorimetric	0.40	1.72	1.68	97.7
	0.80	2.12	2.14	101
	1.20	2.52	2.14	100
	1.60	2.92	2.86	97.9

[a] Mean of triplicate.
[b] Yogurt contained 1.74μg/g diacetyl
[c] Yogurt contained 1.32μg/g diacetyl

Table 5. Precision of diacetyl and other flavor compounds determined by three different methods[2)]

Method	Compound	Concentration (μg/g)	RSD[a] (%)
Spectrophotometric	Diacetyl	1.55	2.50
Fluometric	Diacetyl	1.55	1.02
Chromatographic	Diacetyl	1.38	2.20
	Acetaldehyde	35.3	1.35
	Acetone	1.93	2.01
	Ethanol	4.10	3.19
	Methanol	2.80	1.59
	Propanol	1.36	9.19

[a] Mean for 10 replicate.

대된다[39]. 이 두가지 방법은 acetic acid 존재하에서 diaceyl이 isoniazide(INH)와 응축결합하고 그후에 다시 Zr(Ⅳ)와 결합체를 형성하는데 기초를 두고 있다. 분석조건은 Table 3과 같으며 이 방법의 정확성을 알아보기 위해 recovery test를 한 결과 대체로 96~101%의 높은 recovery rate를 나타내었고(Table 4) fluorimetric method가 spectrophotometric method에 비해 좀더 높은 recovery rate를 나타내어, 거의 100%에 가까웠다. 이는 GC의 경우보다도 높은 수치이다. 이 세가지 방법의 정확도를 알아보기 위해 10번씩 diacetyl과 다른 몇가지 성분들을 정량했을 때, 모두 만족스러운 결과를 나타내었다(Table 4, 5). 따라서 yogurt의 향미성분을 분석하고자 할 때는 일반적으로 한꺼번에 여러 성분

을 측정할 수 있고 정확도가 높은 GC를 이용한 방법이 가장 적합한 것으로 생각되고 특별히 diacetyl의 향미가 중요한 경우, 신속하고 비교적 간단한 방법으로 정량하고자 할 때는 colorimetric method도 우수한 방법이라 생각된다.

향미성분의 분석은 성분을 정성하는 것뿐만 아니라 정성된 화합물이 그 식품의 향에 어느 정도 기여하는지를 결정하는 것이다. 그러므로 모든 분리된 피크의 관능적인 특성을 평가하기 위해서는 sniffing test를 병해해야 한다. Sniffing test를 통하여 화합물이 향기 활성을 갖는지 또는 향미 활성이 큰 화합물이 전체향의 특성을 대표할 수 있는지를 알 수 있고 나아가서는 제품에 좋은 영향을 미치는 화합물과 좋지 않은 영향을 미치는 화합물을 확인할 수도 있다[23]. 일반적으로 sniffing test는 GC에 olfactory detector를 연결하여 sniffing port에 향이 감지되지 않을 때까지 향추출물을 유출시키고 이때 훈련된 관능 검사자들에 의해 향을 판단하여 묘사하게 함으로써, 각 향 피크가 전체 향에 기여하는 정도를 판단하는 것이다. 가장 많이 사용되는 GC-olfactormetric technique에는 Charm analysis와 aroma extract dilution analysis(AEDA)가 있다. Ott 등[23]이 yogurt의 향미성분을 headspace /GC /sniffing test로 분석한 결과 1-nonen-3-one이 yogurt의 향미를 처음 느낄 때 가장 중요한 성분 중에 하나임을 보고하였다.

Ⅵ. 결 론

Yogurt의 향미는 yogurt의 품질을 좌우하는 중요한 요소로서 acetaldehyde, acetoin, diacetyl, acetone등과 같은 휘발성 carbonyl 화합물이 가장 대표적인 yogurt의 향미성분이며 특히 acetaldehyde가 yogurt의 향미에 미치는 영향은 매우 크다. 이러한 향미성분들의 종류와 함량은 starter culture의 종류 및 배양온도나 pH와 같은 배양조건에 따라 달라진다. 현재까지 yogurt의 향미생성 기작이나, yogurt의 향미에 영향을 미치는 여러 인자들에 대한 많은 연구가 이루져 있으나 이를 좀더 명확히 연구하고 이해함으로써 우수한 품질의 yogurt를 생산할 수 있으리라 생각된다. 더불어 dynamic headspace analysis, SDE, supercritical fluid extraction과 같은 향미의 변화를 최소화시키면서 효과적으로 향미를 추출할 수 있는 다양한 방법들이 개발되고, GC, spectrophotometer, fluorimeter와 같은 기기들이 개발되어 신속하게 향미에 대한 정확한 data를 얻을 수 있게 되었으며, sniffing test의 개발로 단지 화학적인 정량뿐만 아니라 각 화합물이 향에 기여하는 정도도 평가할 수 있게 되었다. 따라서 이는 yogurt나 기타 유가공품의 연구에 더욱 발전을 도모할 수 있고 품질개선을 위한 가공공정에 도움을 줄 것이며, shelf-life의 연장을 위한 연구에도 도움을 주리라 생각된다.

Ⅶ. 참고문헌

1. 김종협 : 낙농미생물학, 선진문화사, p. 328 (1984).
2. Guerra Hernandez, E. J., Garcia Estepa, R. and Rodriguez Rivas, I. : Analysis of diacetyl in yogurt by two new spectrophotometric and fluorimetric methoids. Food Chemistry, 53, 315 (1995).
3. Kang, Y. J., Frank, J. F. and Lilard, D. A. : Gas chromatographic detection of yogurt flavor compounds and changes during refrigerated storage. Cultured Dairy Prod. J. Nov., 6 (1988).
4. Crawford, R. J. M. : How to succeed with yogurt. Dairy Engineering, 79, 4(1962).
5. 곽해수 : 저장중 요구르트의 향미성분이 품질에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 26, 939 (1995).
6. 박승국 : 향미화학과 관능검사-개념과 산업적 응용. 한국식품과학회 창립30주년 기념심포지움, 제61차 학술발표대회 및 정기총회, p. 223 (1998).
7. Hamdan, I. Y., Kunsman, J. E., JR. and

Deane D. D. : Acetaldehyde production by combined yogurt cultures. J. Dairy Sci., 54, 1080 (1971).
8. Lees, G. J. and Jago, G. R. : Acetaldehyde : An intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. J. Dairy Res., 43, 63 (1976).
9. Lees, G. J. and Jago, G. R. : Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. J. Dairy Res., 43, 75 (1976).
10. Shankar, P. A. : Dairy starter culture. PhD Thesis, University of Reading (1977).
11. Law, B. A. : The formation of aroma and flavour compounds in fermented dairy products. Dairy Sci. Abstract, 43, 143 (1981).
12. Lees, G. J. and Jago, G. R. : Role of acetaldehyde in metabolism : A review 2. the metabolism of acetaldehyde in cultured dairy products J. Dairy Sci., 61, 1216 (1978).
13. Petter, J. W., and Lolkema H. : Yogurt Ⅱ: Growth stimulating factors for *S. thermophilus*. Neth. Milk Dairy J., 4, 209 (1950).
14. Bautista, E. S., Dahiya, R. S. and Speck, M. L. : Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. J. Dairy Res., 33. 299 (1966).
15. Beshkova, D., Simona, E., Frengova, G. and Simov, Z. : Prodduction of flavour compounds by yogurt starter cultures J. Industrial Micobiology & Biotechnology, 20, 180 (1998).
16. Keenan, T. W. and Bills, D. D. : Metabolism of volatile compounds by lactic starter culture microorganism. A review. J. Dairy Sci., 51, 1561 (1968).
17. 임미리, 이동국, 안정좌, 곽해수 : 다양한 상업적 혼합균주로 제조한 호상요구르트의 저장 중 향미 성분의 변화. 한국축산식품학회지, 16, 173 (1996).
18. Benito de Cardenas, I. L., Ledesma, O. and Oliver, G. : Effect of pyruvate on diacetyl and acetoin production by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. Milchwissenschaft, 44, 347 (1989).
19. Rasic, J. L. and Kurmann, J. A. : Yogurt. Scientific grounds, technology, manufacture and preparations., *Technical Dairy Publishing House. Copenhagen*. Denmark, p. 90 (1978).
20. Alais, C., Jolles, P. and Kiger, N.: Yogurts. X V Ⅱ Int. Dairy Dongr., B, 341 (1966).
21. Bills, D. D. and Day, E. A. : Dehydrogenase activity of lactic streptococci. J. Dairy Sci., 49, 1473 (1966).
22. Keenan, T. W. and Lindsay R. C. : Dehydrogenase activity of *Lactobacillus* species. J. Dairy Sci., 50, 1585 (1967).
23. Ott, A., Fay, L. B. and Chaintreau A. : Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. J. Agri. Food Chem., 45, 850 (1997).
24. Steffen, A. and Pawliszyn, J. : Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. J. Agric. Food Chem., 44, 2187 (1996).
25. Laye, I., Karleskind, D. and Morr, V. V. : Chemical, microbiological and sensory properties of plain nonfat yogurt. J. Food Sci., 58, 991 (1993).
26. Imhof, R., Glatti, H. and Bosset, J. O. : Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic single strain dairy starter cultures. Lebensm-Wiss-Technol., 28, 78 (1995).

27. Ott, A., Germond, G. E., Baumgartner, M. and Chaintreau, A.: Aroma comparisons of traditional and mild yogurts : headspace gas chromatography quantification of volatiles and origin of α -diketones. J. Agri. Food Chem. 47, 2379 (1999).
28. Ulberth, T. : Headspace gas chromatographic estimation of some yogurt volatiles. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 74, 630 (1991).
29. Lee, Y. B. and Morr, C. V. : Headspace volatile compounds of whey protein concentrate subjected to an accelerated storage condition. Foods and Biotechnology, 4, 249 (1995).
30. 이동선 : 분리분석 시료의 전처리 방법과 기술. 식품과학과 산업, 27, 34 (1994).
31. 우광렬, 김공환, 이미정, 이양봉, 윤정로 : 초임계유체 추출과 SDE에 의한 솔 추출물의 휘발성분 비교. 한국식품과학회지, 31, 1268 (1999).
32. Lindsay, R. C., and Day, E. A. : Rapid quantitative method for determination of acetaldehyde in lactic starter cultures. J. Dairy Sci., 48, 665 (1965).
33. Veringa, H. A. and Schrijver-Davelaar, H. : Determination of diacetyl in dairy products containing α-acetolactatic acid. Neth. Milk Dairy J., 24, 34 (1970).
34. Pack, M. Y., Sandine, W. E., Elliker, P. R., Day, E. A. and Lindsay, R. C. : Owades and Jakovac method for diacetyl determination in mixed-strain starters. J. Dairy Sci., 47, 981 (1964).
35. Palo, V. and Ilkova, H. : Recent developments in the gas chromatographic methods of food flavor analysis. J. Chromatogr., 53, 363 (1970).
36. Hild, J. : Determination of some aroma compounds in dairy products by headspace analysis. In *Applied Headspace Gas Chromatography*, ed. B. Kolb. Heyden & Son Ltd, London, pp. 89-94 (1980).
37. Walsh, B. and Cogan, T. M. : Further studies on the estimation of diacetyl by the methods of Prill and Hammer and Owades and Jakovac. J. Dairy Res., 41, 31 (1974).
38. Matsuura, H., Fujiyama, K., Minagawa, N. and Sawa, J. : Determination of acetoin, diacetyl and acetaldehyde in foods by HPLC. Bunseki Kagaku, 39, 405 (1990).
39. Garcia-Villanova, R. J. and Garcia Estepa, R. : Spectrophotometric determination of total vicinal diketones with isoniazide and a zirconium salt. Fresenius J. Anal. Chem., 347, 276 (1993).