KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR.
Vol. 21. No. 3, pp. 256~264(2001)

단기숙성치즈 및 EMC 치즈의 휘발성 풍미성분 신속분석방법으로서 Pyrolysis/GC-Mass Spectrometry의 이용

박승용 · 허강철* · 신중엽** · S. S. B. Haileselassie***
· V. A. Yaylayan*** · B. H. Lee***
연암축산원예대학 축산학부 · *한경대학교 낙농학과 · **충청대학 식품공업과 ·
***Department of Food Science, McGill University, Canada.

Pyrolysis/GC-Mass Spectrometry Analysis for Rapid Identification of Volatile Flavour Compounds of Accelerated Ripened Cheddar Cheese and Enzyme-Modified Cheese

S. Y. Park, K. C. Hur*, J. Y. Shin, S. S. B. Haileselassie***, V. A. Yaylayan*** and B. H. Lee*****

*Faculty of Animal Science, Yonam College of Agriculture, *Department of Dairy Science, Hankyung University, **Department of Food Industry, Chuncheong College, ***Department of Food Science, McGill University, Canada.*

Abstract

Pyrolysis/GC-mass spectrometry(Hewlet-Packard 5890GC/mass selective detector, 5971 BMSD), interfaced to a CDS Pyroprobe 1500 was optimized for rapid analysis of flavour compounds in Cheddar cheese. Twenty flavour compounds, including aldehydes(4), ketones(4), fatty acids(10), alcohol(1), and hydrocarbon(1), were identified from Cheddar cheeses. In total, Twenty-three flavour compounds aldehydes(2), ketones(8), alcohols(3), fatty acids(7), lactone(1), benzene derivative(1) and amide(1) were identified from two samples of accelerated-ripened Cheddar cheese treated with the proteolytic enzymes of *Lactobacillus casei* LGY. In total, Twenty-one flavour compounds: aldehydes(2), ketones (5), alcohols(2), fatty acids(11), and lactone(1) were identified from enzyme-modified cheese(EMC) treated with the combination of the proteolytic enzymes of *Lactobacillus casei* LGY and commercial endopeptidase or lipase. However, All the flavour compounds identified by pyrolysis/GC/MS in samples of ARC and EMC were not determined whether they are recognized as typical Cheddar flavour or not. More studies were requested on the development of methods for a rapid and convienent analysis of dairy fermented products using pyrolysis/GC-mass spectrometry.

Key words: pyrolysis/gas chromatography-mass spectrometry, flavour coumponds, accelerated ripened cheddar cheese(ARC), enzyme-modified cheese(EMC).

서 론

체다치즈의 휘발성 풍미성분은 현재까지 180여종 이상의 화합물이 분리동정되었으며, 치즈의 주요 성분들이 효소의 작용을 받거나 미생물에 의해 또는 화학적 전환경로를 통하여 free fatty acids, esters, aldehydes, alcohols, ketones 및 sulfur compounds 등을 생성하게 되며 이들이 체다치즈의 풍미를 결정하는 주요 성분들로 알려져 있다[2]. Manning과 Nursten[13]은 체다치즈의 휘발성 성분들의 종류와 수는 hydrocarbon 33종, alcohols 12종, aldehydes 12종, ketones 14종, fatty acids 27종, esters 20종, lactones 9종, bases 14종, sulfur compounds 6종, ethers 1종, 할로겐화합물 5종, amides 6종,

Corresponding author : S. Y. Park, Faculty of Animal Science, Yonam College of Agriculture, Soohyang-ri, Sunghwan-eup, ChungNam, Korea, 330-800.

penol 1종, dilactide 1종 등, 총 161종으로 정리하였다. 각종의 풍미성분들은 체다치즈의 품질을 결정하는데 중요한 기여를 하며, 이에 관하여는 Dwivedi[8]가 정리한 바 있다. 치즈 숙성도를 신속하게 판정하는 일은 치즈의 숙성월령을 평가해야 할 경우에 매우 중요한 일이 된다. 치즈의 숙성도는 숙성실 조건이 다르면 제조일자가 동일하더라도 숙성기간과 비례하지 않는다. 특히 단기숙성치즈나 EMC와 같이 정상적인 숙성단계를 거치지 않는 경우에는 숙성도를 판정하는데 어려움이 따르게 된다. 치즈의 화학적 성분의 변화를 통하여 숙성도를 결정하는 실험방법들은 대체로 전처리과정이 오랜 시간 소요된다. 특히 단백질 분해도를 기초로 하여 숙성도의 진행수준을 확인하는 연구방법들로는 dialysis법[19], 수용성 질소추출법[11], *o*-phthaldehyde법[7]을 이용한 방법, ninhydrin법[18]이 있으며, 신속한 숙성도 결정방법에 관한 연구들[16,23]도 수행되었다. 국내에서도 치즈 숙성도 검사법에 관하여 이[25]가 총괄적으로 방법론을 소개하였으며, 금 등[23]은 치즈숙성도 신속검사법 비교에 관한 연구를 하였으며, 또한 신속검사법을 이용한 유당분해효소 첨가 체다치즈의 숙성도 진단에 응용한 연구[24]를 발표하였다. Gas chromatography에 의해 분석하고자 하는 시료의 전처리 방법은 head space 방법[1,4,21,22]으로부터 신속하면서도 간편한 방법으로 발전되고 있으며, 그 중에서 액상 또는 고체상의 환경오염물질로부터 휘발성 성분들을 신속하게 분석 및 동정할 수 있도록 개발된 solid phase microextraction(SPME) 분석기법[14]과 시료의 전처리 없이 소량의 시료를 취하여 200℃의 고온에서 순간적으로 가열하였을 때 생성되는 마이얄 반응 생성물을 신속하면서도 분석 편리성을 높이고자 개발된 pyrolysis/GC-MS spectrometry 분석기법[6,9,10] 등이 개발되었다. *Pyrolysis/ GC-MS spectrometry* 분석기법은 각종 polymer들의 fingerprint identification, 화학조성분석, 구조결정 및 반응기전 및 반응속도론 연구에 응용되고 있으나, 아직까지 낙농제품이나 낙농발효제품의 풍미물질을 정성적 또는 정량적 분석기법으로 확립되지 못한 상태에 있다.

본 연구에서는 pyrolysis GC/mass spectometry 기법을 응용하여 전형적인 체다치즈의 풍미성분 분석조건을 확립하고 동일 분석조건에서 *Lactobacillus casei* LGY로부터 추출한 단백분해효소와 상업용 endopeptidase, lipase를 혼합사용하여 단기숙성치즈와 EMC치즈를 제조하였으며, 풍미성분을 분석하여 전형적인 체다치즈와 비교하고 숙성도를 판정하는 방법을 정립하는데 필요한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

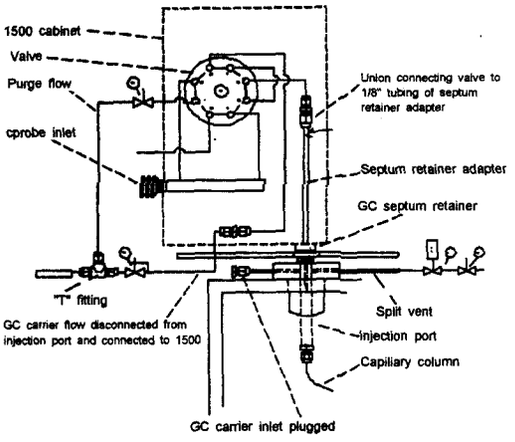

Fig. 1. Installation of CDS Pyroprobe 1500 to GC injection port.

재료 및 방법

미생물 배양과 효소 생산

정상적으로 숙성된 체다치즈로부터 분리동정한 *Lactobacillus casei* LGY는 Lactobacillus MRS broth(Difco)에서 3회 계대배양한 후 배양탱크(500L, Eastern Tech)에서 MRS배지와 동일한 조성을 갖도록 멸균조제한 배지에 접종하고 32℃에서 72시간 배양하였다. 배양완료후 침전된 세포를 회수하여 그중 50g의 wet cell을 600ml의 *phosphate buffer*용액(0.05M, pH 6.8)으로 3회 이상 세척한 후 600ml의 동일 완충용액에 분산시키고 고압균질기(15MR, APV Gaulin)로 600kg/cm^{2}의 압력하에서 4회전하여 균체를 파괴하였다. 분쇄된 추출액은 매 회전마다 연결된 순환냉각기(CH-23, Operon)로 4 ℃로 냉각시켰다. 추출액에 60~90% 황산암모늄을 첨가하여 침전되는 분획을 desalting column (PD-10, Pharmacia)으로 탈염시켰다. 탈염시킨

조효소액은 Centriprep (MWCO 30,000, Amicon)을 사용하여 8,000×g에서 30분간 저온원심분리(Sigma 3K-18, B. Braun International)하는 막여과법으로 분자량 30,000에서 100,000 kDa의 크기를 갖는 단백질 분획으로 부분정제하였으며, 부분정제된 분획은 Leu- 및 Val- aminopeptidase 효소활성을 확인하였다.

체다치즈

분석조건을 확립하기 위한 체다치즈는 국외에서 시판중인 상업용 치즈(Kraft사)를 숙성수준별로 유효기간이내의 Extra-Old, Old, Mild로 구분하여 구입하였으며, EMC제조를 위한 체다치즈는 연암축산원예대학 축산가공실에서 제조하였다. 200L 치즈배트(Eastern Tech.)에서 원료유를 65℃에서 25분간 저온살균한 후 남양유업(주) 체다치즈 제조공정에 따라 체다치즈를 제조하였으며, 스타아터는 상업용 DVS 균주(MA-014, Ezal, Rhodia)를 4units/100L 사용하였으며, 렌넷은 HALA rennet(CHR-Hansen's)을 권장사용량(2.5g/100L)에 맞추어 사용하였다. 응고된 커드는 최종 적정산도가 0.75%가 될 때까지 체다링을 하였으며, 커드매트는 2 × 3 × 5cm크기로 절단한 후 가염(1.5%)하였으며, 성형할 치즈는 2.5 kg/cm^{2}의 압력으로 12시간 압착시켜 성형틀(10kg, Wilson형)을 사용하여 예비성형시킨 후 진공포장하여 4~5℃의 냉장실에서 숙성시켰다.

단기숙성용 체다치즈 제조

체다치즈 제조와 동일하게 커드를 만들어 체다링한 후 커드매트를 2 × 3 × 5cm 크기로 절단한 후 *Lactobacillus casei* LGY로부터 추출한 조효소액(ARC-1) 또는 막여과법에 의해 농축정제한 aminopeptidase(ARC-2)를 5kg의 치즈에 각각 첨가하고 가염(1.5%)과 압착한 후 진공포장하였다. 숙성은 체다치즈와 동일조건에서 실시하였다.

Enzyme-modified cheese(EMC) 제조

EMC제조용 원료치즈는 상기의 방법으로 제조한 1개월 이내의 체다치즈를 사용하였다.

원료치즈를 분쇄하여 가공치즈 용융솥(Eastern Tech.)에서 스팀을 공급하여 용융시켰다. 체다치즈 사용량, 용융염의 사용량 및 용융솥의 운전조건은 각각 아래의 Table 1 및 Table 2와 같다. 용융된 치즈슬러리를 발효하는데 사용한 효소의 종류, 첨가량, 발효온도 및 발효시

Table 1. Formular for preparation of EMC slurry

Raw materials		Amount	Ratio(%)	Remarks
Cheddar cheese		5,000g	94.78	<1 month of age
Emulsifying salts	Joha C	45g	0.85	Adjusted to final
	Joha T	30g	0.57	pH 5.5
Water	Condensed	100ml	1.90	
	Added	100ml	1.90	
Total		5.275kg	100.00	

Table 2. Operation conditions of emulsifying kettle for EMC slurry

Steps	Temperature	Heating time	Agitation speed
Kettle sterilization	100 ℃ by steam	10 min	
Addition of cheese grounded	–	2 min	80 rpm
Addition of emulsifying salts	–	30 sec	120 rpm
Cooking	85℃	90 sec	120 rpm
Addition of water			
Cooking	85℃	120 sec	200 rpm

Table 3. Treatment of EMC cheese slurry by proteolytic and lipolytic enzymes

Treatments	Addition amounts	Temperature	Time
Endopeptidase* and lipase**	0.02%, respectively	45℃	8 hrs
Inactivation		80℃	15 min
Aminopeptidase***	0.5%	35℃	72 hrs
Inactivation		80℃	15 min
Cooling and preservation		5℃	

* & ** : Neutrase 0.5L and Protamex, brands of NOVO Nordisk, were used according to the recommanded dose. *** : Aminopeptidase was purified partially from the crude extract of *Lactobacillus casei* LGY.

간 등은 Table 3과 같다. EMC시료는 *L. casei* LGY로부터 추출한 aminopeptidase와 상업용 endopeptidase를 사용한 EMC-NP, 그리고 두 종류의 단백분해 효소와 lipase를 혼합하여 제조한 EMC-NL을 분석시료로 사용하였다.

Pyrolysis GC/MS spectrometry

Pyrolysis kits(CDS Pyroprobe-1500)의 quarts tube(직경 0.33mm)에 치즈시료를 담고 1분당 50℃로 200℃까지 온도를 상승시키고 20초간 유지시켰다. Proprobe의 인터페이스는 200℃로 셋팅하였다. CDS Pyroprobe-1500에 연결된 gas chromatography(HP5890)의 분석조건으로서 칼람유속은 1분당 0.8ml로 하였으며, split ratio는 92:1로 하였고, septum purge는 1분당 3ml로 하였다. 칼람의 초기온도는 -5℃에서 시작하여 1분당 30℃로 2분간 상승시킨 후 다시 1분당 8℃씩 상승시켜 최종 온도 250℃가 되도록 하였으며, 그 온도에서 5분간 유지하였다. Mass spectrometer(5971 BMSD)의 ionization voltage는 70eV이었으며, electron multiplier는 1,682V로 하였고 mass range는 30~300amu이었으며, MS interface는 180℃, ion source의 온도는 280℃였다.

결과 및 고찰

체다치즈의 휘발성 성분

Pyrolysis/GC-MS 분석기법을 이용하여 숙성 기간이 다른 3종류의 체다치즈의 휘발성 성분을 분석한 결과 총 20여 종의 성분들이 동정되었다(Fig. 2). 동정된 성분들은 aldehydes 4종, ketones 9종, alcohols 5종, fatty acids 10종,

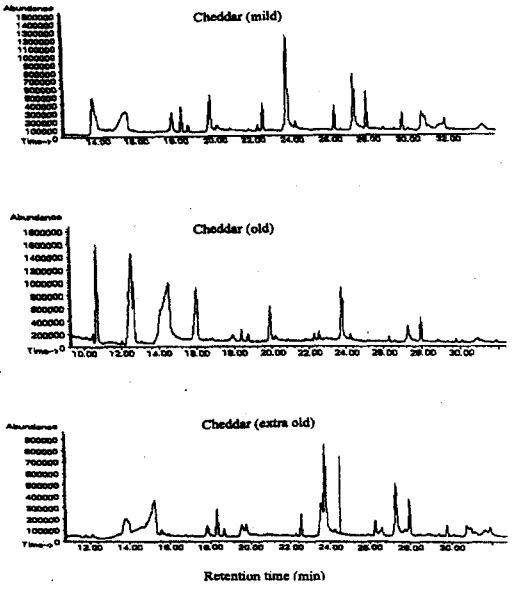

Fig. 2. Pyro-chromatogram of commercial Cheddar cheeses with different ripening ages.

기타 성분 2종이었다(Table 4). 체다치즈 숙성지표로서 단백분해도, 총산도, pH, 유당 및 유기산 등의 화학적 지표에 대하여 연구한 Bouzas 등[5]은 각각의 화학지표성분들은 온도와 시간의 영향을 예측할 수 있는 지표로서 회귀공식을 얻을 수 있었으며, 열전달 모델(heat transfer model)과 결합시키면 치즈의 모양, 성분조성 등에 따른 예측까지도 가능하였다고 함으로써 치즈의 숙성을 화학적 성분의 변화로서 판단할 수 있는 객관적 방법들이 상당한 수준으로 진보되고 있다. Banks 등[3]은 체다치즈의 steam distillates의 휘발성 성분들을 정량적 분석으로 31종류의 성분들을 다변인(multivar-

Table 4. Volatile compounds isolates of commercial Cheddar cheese from different ripening periods

Flavor compounds	Mild cheddar	Old cheddar	Extra old cheddar
	Area/mg	Area/mg	Area/mg
Ethanoic acid	-	4.90E+06	-
2-Propanol	4.30E+06	-	-
Butanoic acid	-	1.87E+07	1.42E+07
2, 3-Butanedione	-	2.70E+06	-
2-Heptanone	-	-	2.30E+06
Hexanoic acid	3.80E+06	4.80E+06	5.80E+06
Benzyl acetaldehyde	1.20E+06	3.90E+05	5.20E+05
2-Nonanone	9.40E+05	5.30E+05	7.60E+05
Nonanal	2.80E+05	3.50E+05	2.30E+05
Octanoic acid	2.30E+06	2.30E+06	1.10E+06
2-Decenal	2.50E+05	3.00E+05	-
2-Undecanone	9.70E+05	3.90E+05	5.40E+05
Decanoic acid	6.40E+06	3.60E+06	5.60E+06
2-Decanoic acid	3.00E+06	1.92E+06	3.20E+07
2-Dodecenal	3.50E+05	-	-
2-Tridecanoic acid	8.90E+05	2.20E+05	4.80E+05
Dodecanoic acid	3.00E+06	1.20E+06	2.30E+06
Propanoic acid	1.40E+06	1.10E+06	1.10E+06
2-Pentadecanone	6.60E+05	1.40E+06	2.90E+05
Tetradecanoic acid	-	-	6.70E+05

iate) 회귀분석하여 화학성분들과 휘발성 성분들간 관련공식을 유도한 결과, 이들이 주관적 평가자료로서 유용하다고 보고함으로써 치즈의 숙성과정에서 일어나는 변화들을 특정 휘발성 성분을 이용하여 추정할 수 있는 가능성을 확인하게 되었다. 그러나 시료의 전처리 과정이 필요없는 Pyrolysis/GC-MS의 분석기법은 전처리 과정 중 형성되는 열분해산물이나 휘발성이 강한 성분의 손실을 배제할 수 있는 장점이 있지만 아직까지 치즈를 대상으로하는 분석기법을 확립하지 못한 상태에 있다. 본 연구에서 시도한 분석조건하에서 치즈숙성의 지표로 활용할 수 있는 특정 휘발성 성분을 분리하여 동정한 결과 Table 4의 결과와 같이 숙성 기간이 다른 3종류의 치즈의 휘발성 성분들 중에서 hexanoic acid가 숙성도를 분별할 만한 지표로서 보여졌으나, 정량분석이 이루어지지 못하여 각 성분 함량을 기초로 다변인회귀분석을 통하여 치즈 숙성지표를 연구한 Banks 등[3]의 결과와 비교할 수는 없었다.

단기숙성치즈의 휘발성 성분

L. casei LGY로부터 추출한 조효소액, 부분정제된 aminopeptidase처리 등 제조조건을 달리한 단기숙성치즈 2종류와 동일 조건하에서 제조한 체다치즈의 휘발성 성분을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 단기숙성된 2종류의 체다치즈의 휘발성 성분들은 aldehydes 2종, ketones 8종, alcohols 3종, free fatty acids 7종, lactone 1종, benzene derivative 1종 및 amide 1종 등, 총 23여종이 발견되었으며, 각각 ARC-1에서는 19종 및 ARC-2에서는 14종으로서 사용효소의 정제수준에 따라서 풍미물질의 종류에 차이가 있었다. 실온상태에서 휘발성이 강하기 때문에 치즈풍미 전체에 매우 중요한 carbonyl화합물로서 8종의 ketones과 2종의 aldehydes가 단기숙성 체다치즈에서 발견되었다. 두 시료에서 발견된 2종류의 aldehydes로는 phenyl acetaldehyde(ARC-1)와 benzyl acetaldehyde(ARC-2) 등이 있으며, 대조 체다치즈에서 발견되는 3-methyl-butanal, hexanal 및 decanal 등 aldehyde와 alcohol의 반응물인

Table 5. Flavour compounds found by pyrolysis/GC/MS from Cheddar cheeses and accelerated ripened Cheddar cheeses

Flavor compounds	Cheddar cheese*	ARC -1**	ARC -2***
Phenyl acetaldehyde	-	◇	-
Benzyl acetaldehyde	-	-	◇
3-Methyl-butanal	◇	-	-
Hexanal	◇	-	-
Decanal	◇	-	-
2-Heptanone	-	◇	-
2-Pyrrolidinone	◇	-	◇
2-Nonanone	◇	◇	◇
2-Undecanone	◇	◇	◇
2-Tridecanone	◇	◇	◇
2-Pentadecanone	◇	◇	◇
Tetradecanone	-	◇	-
Tetrahydro-6-pentyl-2H-pyron-2-one	-	◇	-
Ethanol	◇	◇	◇
2,3-Butanediol	◇	◇	◇
2-Propanol	◇	◇	◇
Ethanoic acid	◇	◇	◇
Butanoic acid	-	◇	-
Hexanoic acid	◇	◇	-
Heptanoic acid	◇	-	-
Octanoic acid	◇	◇	-
Decanoic acid	◇	◇	◇
Dodecanoic acid	◇	◇	◇
Tetradecanoic acid	◇	◇	◇
Hexadecanoic acid	◇	-	-
γ-Dodecalactone	-	-	◇
Octane	◇	-	-
Benzoic acid	-	◇	-
2-Hydroxy-propanamide	-	-	◇

* : Experimatal Cheddar cheese, **&*** : Crude enzyme extract (ARC-1) and partially purified aminopeptidase(ARC-2), obtained from the cell of *L. casei* LGY, were added to cheese slurry, respectively. ◇ : detected, - : not detected.

acetals는 발견되지 않았다. Ketones은 유리지방산보다 많은 8종류가 검출되었으며, 2- heptanone, 2-nonanone, 2-undecanone, 2- tridecanone, 2-pentadecanone 등의 우수 및 기수의 ketones들이 검출된 것은 Banks 등[3]의 결과와 동일하며, 2-pyrrolidinone, tetradecanone, tetrahydro-6-pentyl-2H-pyron-2-one 등이 단기숙성치즈에서만 검출되었는데 2-pyrrolidinone은 바람직하지 못한 성분이다. 단기숙성치즈 및 대조 Cheddar 치즈에서 ethanol, 2,3- butanediol, 2-propanol 등 3종류의 alcohols이 검출되었다. 체다치즈에는 ethanol이 가장 많은 alcohol이며[8], 따라서 ethyl 유도체가 가장 많이 발견되었다는 Arora 등[1]과 Banks 등[3]의 결과와 달리 pyrolysis kit를 사용한 본 연구에서는 ethyl esters들은 발견되지 않았다. 전형적인 치즈보다 ethyl butylate와 ethyl hexanoate 함량이 2배 이상 높은 수준에서는 버터향 및 과일향[8]을 내므로 많은 양의 ethanol생성은 바람직하지 않다. Free fatty acids는 탄소수 4에서 16까지가 주로 발견되었으며, 이 결과는 증기추출(steam distillates)한 시료를 사용한 Banks 등[3]의 연구결과와 같다. 본 연구에서 분석에 사용된 ARC-1에서는 butanoic acid를 포함한 7종류가 검출되었으나, ARC-2에서는 4종류만 검출되었다. Fatty acids는 직접적으로 치즈풍미와 관여성은 적으나 aroma compounds 형성에 필요한 전구물질로서 중요하며, 다른 풍미물질과의 균형(Balance theory)을 유지하는 것이 치즈풍미에 바람직하다. 그 외에도 fatty(aliphatic) acid에서 자유래디칼이 전이된 fragrant (aromatic) acid로서 딸기류에 흔히 존재하는 풍미물질인 benzoic acid, 그리고 lactones으로서 γ-dodecalactone이 ARC-1에서 발견되었다. ARC-2에서는 carboxylic acid의 -OH가 $-NH_2$로 치환된 2-hydroxy-propanamide가 검출되었다. 이러한 결과들을 체다치즈의 steam distillates 등의 풍미성분 추출기법에 의한 분석연구 결과들과 비교해 볼 때, 휘발성 성분들의 분석은 가능하였으나, 시료를 가열하는 온도가 고온에서 이루어졌기 때문에 치즈성분의 열분해산물 생성 가능성이 있어 동정된 성분들이 모두 체다치즈의 유효성분으로 확실하다고 보기 어려운 점이 있었다.

EMC의 휘발성 성분

L. casei LGY로부터 추출한 조효소와 상업용 endopeptidase 또는 lipase를 처리한 두 종류의 EMC의 휘발성 성분을 분석한 pyrogram (Fig. 3)을 보면 각각의 시료로부터 aldehydes 2종, ketones 5종, alcohols 2종, fatty acids 11종

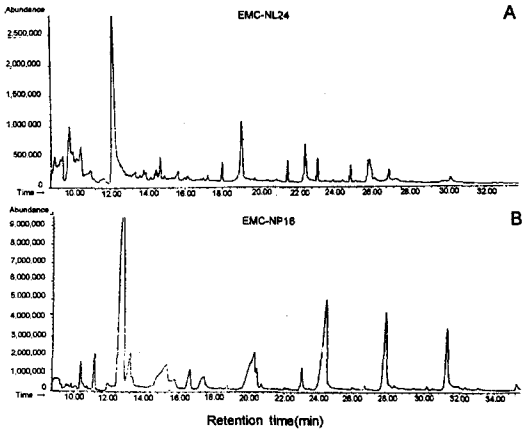

Fig. 3. Pyrograms of EMC prapared by combination of peptidase from *L. casei* LGY with Neutrase 0.5L/Protamex(EMC-NL) and Neutrase 0.5L(EMC-NP).

및 lactone 1종 등, 총 21여 종의 휘발성 성분이 동정되었다(Table 6). *L. casei* LGY로부터 추출한 조효소, endopeptidase 및 lipase를 처리한 EMC-NL의 휘발성 성분들은 2,3-butanedione, acetic acid, tetradecanoic acid, hexadecanoic acid, 그리고 tridecanlactone 등 대조치즈(mild Cheddar)에서 발견되지 않은 5종의 성분 이외에 총 16종이 검출되었다. Lipase를 첨가하지 않은 EMC-NP의 경우 acetic acid, butanoic acid, benzoic acid, undecanoic acid 및 tetradecanoic acid 등 대조치즈에서 발견되지 않은 5종의 휘발성 성분들을 포함하여 총 14종이 검출되었다. EMC-NL의 휘발성 성분중에는 alcohols로서 acetone으로부터 유래된 것으로 보이는 2-propanol이 검출되었으며, 이 성분은 대조치즈에서도 동정된 성분으로서 EMC-NL의

Table 6. Flavour compounds identified by PyrolysisGC/MS from EMC cheeses treated with different combination of enzymes

Flavor compounds	Old cheddar	EMC-NL*		EMC-NP**	
	Area/mg	RT(min)	Area/mg	RT(min)	Area/mg
Benzyl acetaldehyde	3.90E+05	14.44	4.60E+05	–	–
Nonanal	3.50E+05	14.90	1.60E+05	–	–
2-Decenal	3.00E+05	–	–	–	–
2,3-Butanedione	2.70E+01	10.4	2.20E+06	–	–
2-Nonanone	5.30E+05	14.66	7.80E+05	18.76	1.70E+06
2-Undecanone	3.90E+05	17.97	5.70E+05	–	–
2-Tridecanone	2.20E+05	21.46	6.00E+05	26.63	7.40E+05
2-Pentadecanone	1.40E+06	24.87	5.20E+05	30.16	6.80E+05
2-Propanol	–	12.18	1.50E+07	–	–
1,2-Propanediol	–	–	–	12.79	1.10E+08
Ethanoic acid	4.90E+06	8.7	1.50E+05	11.18	8.20E+06
Buanoic acid	1.87E+07	–	–	9.1	3.00E+07
Hexanoic acid	4.80E+06	11.65	6.00E+06	11.94	2.20E+07
Octanoic acid	2.30E+06	15.59	4.70E+06	20.34	3.49E+07
Decanoic acid	6.40E+06	19.02	4.60E+06	24.39	3.60E+07
Undecanoic acid	–	–	–	25.91	3.60E+07
Dodecanoic acid	1.20E+06	22.43	1.92E+06	27.84	3.20E+07
Propanoic acid	1.10E+06	–	–	28.34	1.80E+06
Tetradecanoic acid	–	25.83	6.20E+05	31.28	2.30E+07
Hexadecanoic acid	–	–	–	35.26	2.40E+06
Benzoic acid	–	–	–	20.68	2.00E+06
Tridecanalactone	–	25.9	1.10E+06	–	–

: A combination of the aminopeptidase from *L. casei* LGY with Neutrase 0.5L and Protamex from NOVO Nordisk(*EMC-NL), with Neutrase 0.5L(**EMC-NP), respectively.

관능이 대조치즈와 유사한 이유 중의 하나로 판단된다. 그러나 2-propanol은 숙성이 진행되면서 분해되어 소멸되는 것으로 보이며, 치즈의 중요한 풍미성분이긴 하지만 지나친 함량에 이르면 바람직하지 못한 풍미의 원인이 되기도 한다. 또한 지방분해효소는 산패취를 내는 위험성도 있으나, 조절된 환경하에서는 지방유래성(lipid-derived)의 풍미물질을 생성하여 강한 치즈풍미를 조화시키기도 하는 것으로 여겨진다. 이러한 사실은 esterase 활성이 높은 스타아터에 관한 연구[12]의 필요성을 초래케 하였으며, esterase를 이용한 EMC치즈 제조에 관한 연구로는 Moskowitz와 Noelck [15]과 Park 등[17]이 수행하였다. Park 등[17] *Lactobacillus casei* LLG로부터 추출한 C_8 esterase를 첨가하여 제조한 EMC는 caprylic acid(octanoic acid) 함량과 acetic acid (ethanoic acid)와 butyric aicd(butanoic acid)의 함량을 증가시킴으로서 중쇄지방산에 대한 단쇄지방산의 relative ratio가 정상적으로 숙성된 체다치즈의 풍미와 유사한 결과를 얻었다고 하였다. 그러나, 본 연구에서 제조한 EMC들은 Cheddar치즈와 유사한 지방산 조성을 보였으나 acetic acid와 butyric acid의 함량이 낮았던 원인은 효소의 부분정제 중 분자량이 100,000 dalton 이상인 저급지방산 분해효소들[12]이 상당량 제거되었기 때문이 아닌가 생각된다. 또한 저분자량의 휘발성 성분들과 sulfur compounds가 검출되지 않았는데 그 원인은 시료가 250℃에서 20초간 열처리과정에서 열분해된 것으로 판단된다. 따라서, 풍미성분의 정량분석적 응용성 보다 정성분석을 통한 신속한 분별분석에 중점을 두고 꾸준히 활용성을 연구할 필요성이 있다고 생각된다.

요 약

Pyrolysis/GC-MS 분석방법으로 숙성월령이 다른 3종류의 전형적인 체다치즈에서 aldehydes 4종, ketones 4종, alcohols류 1종, free fatty acids 10종, 기타 성분 1종 등, 총 20종류의 휘발성 성분들이 동정되었다. *Lactobacillus casei* LGY로부터 추출한 aminopeptidase 조효소액 및 부분정제효소를 첨가하여 단기숙성시킨 체다치즈에서는 aldehydes 2종, ketones 7종, alcohols 3종, fatty acids 7종, lactone 1종, aromatic compound 1종 및 amide 1종 등, 모두 23종의 휘발성 성분들이 동정되었다. *L. casei* LGY로부터 추출한 aminopeptidase와 상업용 endopeptidase 또는 lipase를 혼합하여 제조한 EMC에서는 aldehydes 2종, ketones 5종, alcohols 2종, free fatty acids 11종, lactone 1종 등, 총 21종류의 휘발성 성분들이 동정되었다. 그러나, 본 연구에서 제조한 단기숙성치즈와 EMC치즈로부터 동정된 휘발성 성분중의 일부는 체다치즈의 유효 풍미성분인지 불확실하므로 향후 Py/GC-MS 분석기법의 보완연구가 이루어 진다면 발효유제품의 풍미성분들을 신속, 편리하게 정성분석하는데 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 1999년도 농림기술 연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Arora, G., Cormier, F. and Lee, B. H. : Analysis of odor-active volatiles in Cheddar cheese head space by multidimensional GC/MS sniffing. *J. Agri. Food Chem.* 43, 748 (1995).
2. Aston, J. W. and Dulley, J. R. : Cheddar cheese flavour. *Aust. J. Dairy Technol.*, 37, 59 (1982).
3. Banks., J. M., Brechany E. Y., Christie, W. W., Hunter E. A. and Muir, D. D. : Volatile components in steam distillates of Cheddar cheese as indicator indices of cheese maturity, flavour and ordour. *Food Research International*, 25. 365 (1992).
4. Bosset, J. O. and Grauch, R. : Comparision of the volatile flavor compounds of six European "AOC" cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *Int. Dairy J.*, 3, 386 (1993).
5. Bouzas, J., Kantt C. A., Bodyfelt, F. W. and Torres, J. A. : Time and temperature influence on chemical aging indicators for a commercial Cheddar cheese. *J. Food*

Sci., 58, 1307 (1993).
6. CDS Manual. : 1500GC interface operating manual. Oxford, PA. 19363-0277. CDS analytical, INC., (1996).
7. Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. and Catignani G. L. : Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 66, 1219 (1983).
8. Dwivedi, B. K. : The role of enzymes in food flavors, CRC Handbook, Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredents, (1975).
9. Huygues-Despointes, A., Yaylayan, V. A. and Keyhani, A. : Pyrolysis GC/MS analysis of 1-[(2'-carboxyl pyrrolydinyl) -1-deoxy-D-fructose](Amadori proline). *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2519 (1994).
10. Irwin, W. J. : Analytical Pyrolysis - An Overview. *J. of Analytic. & Appl. Pyrolysis.*, 1, 89 (1979).
11. Kuchroo, C. N. and Fox, P. F. : Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedure. *Milchwissenschaft*, 37, 331 (1982).
12. Lee, S. Y. and Lee, B. H.: Esterolytic and lipolytic activities of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LLG. *J. Food Sci.* 55, 119 (1990).
13. Manning, D. J. and Nursten, H. E.: Flavour of milk and milk products In Developments in Dairy Chemistry Ⅲ., Fox, P. F. Elsevier Applied Science, London & New York. pp.217 (1985).
14. Mindrup, R. F. : Analyses of flavor and aroma volatiles in whole fruits, using SPME/GC. *The Reporter, Recent Developments in Separation Technologies.*, 17, 12 (1998).
15. Moskowitz, G. J. and Noelck, S. S. Enzyme-modifiec cheese technology. *J. Dairy Sci.* 70, 1761 (1987).
16. Nooman, A. : A rapid method for the estimation of the dissolved and the undissolved nitrogen compounds in cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, 31, 163 (1977)
17. Park, S. Y. : Effects of *Lactobacillus casei* LLG on flavour of enzyme-modified cheese. II. Effect of esterase on free fatty acid composition. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, 17, 232 (1997).
18. Pearce, K. N., Karahalios, D. and Friedman, M. : Ninhydrin assay for proteolysis inripening cheese. *J. Food Sci.* 53, 432 (1988).
19. Sciancalepore, V. and Alviti, F. S. : A dialysis method for measuring cheese ripening. *Milchwissenschat*, 42, 220 (1987).
20. Sciancalepore, V. and Longone, V. : Rapid methods of measuring the degree of proteolysis as cheese ripening index. *Milchwissenschaft*, 43, 357 (1988).
21. Wood, A. F., Aston, J. W. and Douglas, G. K. : A cold-trap method for the collection and determination of head headspace compounds from cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 49. 42 (1994).
22. Yang, W. T. and Min. D. B. : Dynamic headspace analysis of volatile compounds of Cheddar cheese and Swiss cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*, 59, 1309 (1994).
23. 금종수, 진현석, 박승용, 김종우 : Cheese 숙성지표로서 신속단백질 분해도 측정방법에 관한 연구. 한국낙농학회지, 14, 159 (1992).
24. 금종수, 진현석, 정연도, 김종우 : 단백질 및 지방분해효소 첨가가 Cheddar cheese 숙성에 미치는 영향. 한국낙농학회지, 15, 103 (1993).
25. 이부웅 : 치즈숙성도를 결정하는 생화학적 방법. 한국유가공연구회지, 3, 124 (1984).

(2001년 2월 23일 접수)