

대사체학 기법을 적용한 식품의 휘발성 향기성분 분석

Application of Metabolomics Approach in Volatile Flavor Analysis

조예진¹, 신동빈², 서혜영^{3*} | CJ 제일제당 식품연구소¹, 식품분석센터², 세계김치연구소³

Ye-Jin Jo¹, Dong-Bin Shin², Hye-Young Seo^{3*} |

CJ CheilJedang Food R&D¹, Food Analysis Center², World Institute of Kimchi³

서론

식품의 향미는 식품의 첫인상과 품질을 좌우하는 주요 인자이며, 특히 향기성분은 사람의 후각을 자극함으로써 소비자의 기호를 향상시켜 식품을 선택하는데 결정적인 역할을 한다. 최근에는 식품뿐만 아니라 화장품, 의약품, 의류, 마케팅 등 다양한 분야에 걸쳐 향기산업이 중요한 위치를 차지하고 있으며 품질 평가 및 개선, 상품의 원산지 구별, 이취의 저감화, 천연향료 대체 등 상품의 부가가치를 높이기 위한 목적으로 향기성분에 대한 관심 또한 증가하고 있다. 식품에서의 향기성분은 식품 내 화학적, 물리적 상호작용에 의해서 생성되며, 화합물 조성, 농도, matrix에 의해 향이 발현되는 정도가 다르게 나타난다. 또한 다양한 비휘발성 성분들과 복합체를 이루어 존재하는 특징이 있어 향기성분을 안정적으로 분리하고 정교하게 분석하는 기술이 요구된다. 일반적으로 식품에서 휘발성 향기성분을 분석할 때는 시료 전처리 및 향기성분 추출, 기기분

석, 향기성분 동정 및 정량의 순서로 이루어져 왔다 (Fig. 1). 휘발성 향기성분의 분석은 정밀 분석 기기의 발달을 토대로 비약적으로 발전해 왔으며, 특히 분자구조의 추정이 가능한 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)로 명확한 향기성분 정보를 얻을 수 있게 됨에 따라 보다 객관적인 향기성분 분석이 가능하게 되었다. 나아가 최근에는 gas chromatograph-olfactometry(GC-O), 전자코(electronic nose) 등을 통하여 인간이 냄새를 인지하는 기전과 거의 흡사하게 향기성분을 분석할 수 있는 수준에 이르고 있다. 이러한 기술적 발전에 힘입어 현재에는 식품에서 발견된 향기성분들이 약 10,000개 이상에 이르는 것으로 보고되고 있다. 그러나 아직까지 밝혀지지 않은 다양한 향기성분이 식품 내에 존재할 것으로 추정되어 계속적으로 분석 기술의 발달이 요구되는 실정이며, 휘발성 향기성분을 biomarker, quality control 등의 지표로써 활용하기 위한 도구가 필요하게 되었다.

대사체학(metabolomics)은 생체 내에 분포하는

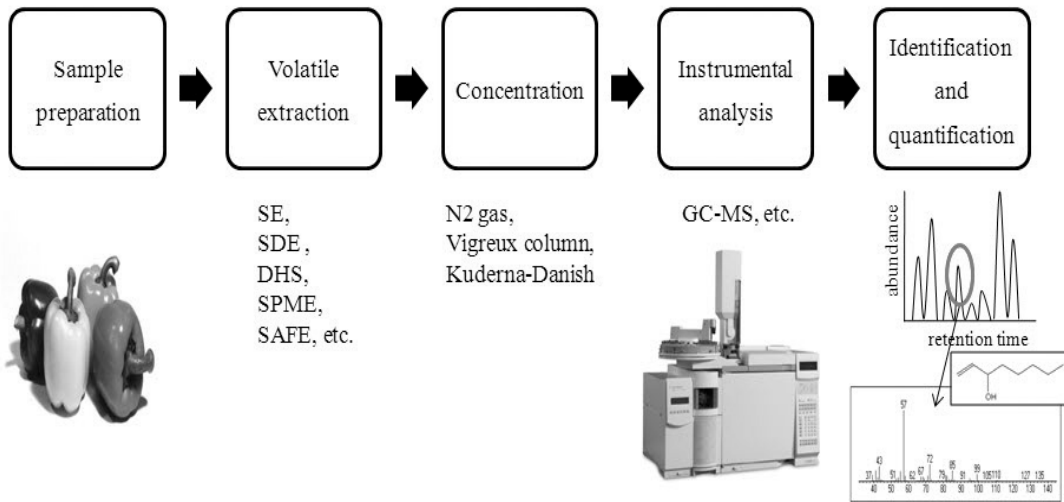


Fig. 1. General scheme of the GC-MS based flavor analysis

저분자 화합물인 대사체(metabolome)를 분석하는 기술을 의미하며, 동식물 체내에 합성되어 저장된 전체 대사체 분석(global analysis)을 통해 유전적 환경이나 기타 외부 환경의 변화에 대한 생체 조절 시스템 변화 및 기준에 보고되지 않은 새로운 물질 발견에 연구가능성이 높은 새로운 기법이다. 대사체학 연구는 크게 특정 대사체를 분석하는 target analysis와 모든 대사체를 총체적으로 분석하는 non-target analysis로 구분될 수 있다. 그러나 기술적, 기기분석적인 한계로 인해 아직까지는 식품 내에서 추출된 모든 대사체를 완전히 분석해내지 못하며, 현재에는 이전에 정의된 대사체들에 한하여 그 변화양상을 평가할 수 있는 metabolite profiling 기법이 가장 많이 활용되고 있는 수준이다. 그러나 분석법의 표준화, mass spectral alignment 소프트웨어 개발 노력 등이 지속적으로 이루어지고 있어 대사체학 기법의 적극적인 활용을 기대할 수 있게 되었다. 대사체학은 식품 소재의 종류별, 원산지

별, 부위별 대사체들의 차이를 규명하고 이와 관련된 지표물질 탐색에 이용될 수 있는 획기적인 연구 분야이다. 이러한 기법을 이용하여 분석한 식품 소재의 휘발성, 비휘발성 향미성분들은 제품의 품질 및 소비자들의 기호도를 결정짓는 중요한 요소이며, 식품 생산 환경이나 경각지별 분류 및 상품의 질을 결정하는 요인이 될 수 있다. 그 예로, 일본의 녹차 시료의 품질과 등급이 metabolomics target analysis를 통한 휘발성 성분 연구에 의해 결정된 바 있으며, non-target analysis를 이용하여 토마토의 휘발성 성분을 분석하여 토마토의 종류 구별 및 숙성 정도를 구분하는 평가 지표 선정에 사용된 바 있다. 이와 같은 관점에서 향기성분 분석은 대사체학 기법의 적용으로 정성 및 정량적 차원을 뛰어넘어 식품에 영향을 미치는 내·외적 변수를 통합적으로 반영하는 다학제적 연구의 틀을 마련하게 되었으며, 환경적, 물리적 조건에 따라 변화하는 향기성분의 규명 가능성을 높게 되었다.

대사체학 기법의 개요

대사체학 기법은 (1) 시료준비, (2) 기기분석, (3) 데이터분석의 단계를 포함하며(Fig. 2), 각 단계마다 다양한 분석방법을 통합하여 활용하는 것을 추구한다. 대사체학 기법이 적용된 휘발성 향기성분 프로파일링은 기기 분석과 데이터 분석 측면에서 기존의 향기성분 분석과 차이를 가진다. 그러나 향기성분 분석의 대부분은 GC-MS에 근거하여 이루어지기 때문에 분석법 자체보다는 어떠한 방식으로 데이터를 처리했는지가 핵심으로 작용하게 될 것이며, 데이터 프로세싱은 두 가지 방법으로

접근이 가능하다. 첫째는 GC-MS로 분석된 전체 대사체들 중에서 정성, 정량적으로 프로파일링된 특정 대사체들의 차이를 비교, 확인하는 target analysis이며, 둘째는 몇몇의 특정 대사체보다는 모든 대사체에 대한 전반적인 패턴 변화를 조사하는 non-target analysis이다(Fig. 2).

Target analysis에서는 먼저 GC-MS에서 분리된 휘발성 성분들을 mass spectral database의 비교를 통해 프로파일링하고 정량 값을 구한 다음, predefined된 성분들에 대하여 다변량 분석을 수행한다. 이 접근 방식은 분석하고자 하는 성분들의 동정이나 정량에 초점을 두는 특징이 있어 향기성분

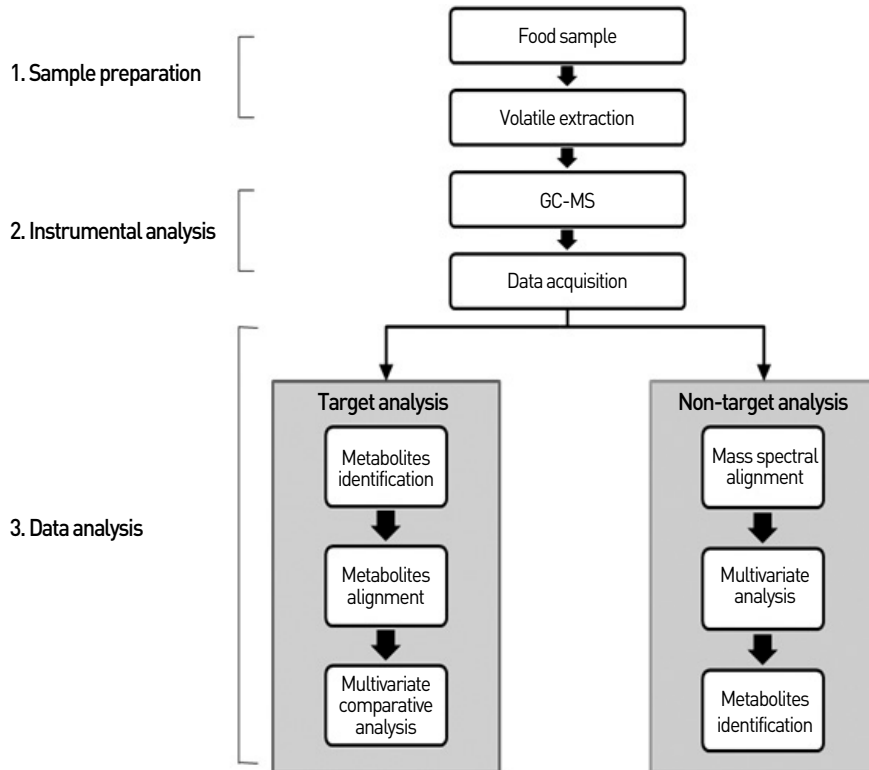


Fig. 2. Diagram of flavor analysis using GC-MS based metabolomics

의 조성이 시료 간 차이에 얼마나 기여하는지 등의 정보를 얻는데 유리하다. 그러나 시료 간 구분이 선택 및 동정된 성분들에 한해서 이루어지기 때문에 총체적인 접근이 어려워진다는 단점이 있다. 이를 극복하기 위한 대안이 non-target analysis로, 이는 mass spectral pattern과 강도의 통계적인 비교에 중점을 두며 프로파일링의 범위가 기존의 몇몇 선택된 single target에 머물지 않고 multi target으로 확대되어 대사체들에 대한 통합적인 접근이 가능한 방법이다. 이와 같은 분석을 위해서는 각 peak의 특징적인 ion을 분리하여 대사체를 정의할 수 있도록 도와주는 데이터 작업이 수행되어야 한다. 이 단계를 바로 대사체에 대한 어떤 bias를 반영하지 않고 mass spectrum을 비교하는 peak alignment라 일컫는다. 이러한 full spectral alignment 과정은 GC-MS로 얻은 각 fragmentation과 머무름 시간(retention time)의 일치를 통해 chromatogram상의 peak들을 다시 자동적으로 정렬시키는데, 그 이론적 원리는 (1) 동일한 대사체에서 유래한 fragment는 특정 머무름 시간에서 나타난다는 것, (2) 같은 대사체에서 나온 fragment의 상대적 비율과 강도는 일정하다는 것에 바탕을 둔다. 또한 이 작업을 통해 mass spectrum의 겹침으로 찾아내지 못했던 peak들의 ion을 구분할 수도 있어 보다 확장된 프로파일링 범위를 가질 수 있고, non-target analysis는 기존 방식을 따를 때보다 많은 대사체 데이터를 획득할 수 있다는 차이점을 가지게 된다.

두 접근법은 GC-MS 데이터를 프로세싱하는 순서가 다르기 때문에 어떠한 접근방식을 따르는가에 의해 프로파일링 결과가 확연히 달라지며, 실험 초기 단계에서 어떠한 기법으로 접근할 것인지에

대한 충분한 설계를 거쳐야 하며, 이에 맞게 추출법과 분석장비 등을 결정해야 한다.

휘발성 향기성분의 추출

식품 내 향기성분 프로파일링의 범위는 각 성분의 휘발되는 정도, 극성 등의 영향을 받기 때문에 적절한 추출법의 선택은 대사체 프로파일링 결과를 좌우할 수 있는 중요한 요소가 될 수 있다. 일반적으로 식품의 향기성분의 추출을 위해 사용되는 방법으로는 용매추출(solvent extraction, SE)법, 동시 수증기 증류 추출(simultaneous steam distillation extraction, SDE)법, static headspace(SHS) 등이 있고, 앞선 추출법의 단점을 보완시킨 dynamic headspace(DHS), 고체상 미세추출(solid-phase microextraction, SPME)법, solvent-assisted flavor evaporation(SAFE) 등도 함께 사용되고 있다. 그러나 대사체학 기법에서는 전처리 과정을 최소화하여 시료의 변화를 줄이고 대사체를 있는 그대로를 추출하여 최대한 많이 검출해내는 것이 중요하기 때문에, 용매를 사용하지 않고 비교적 빠른 시간 내에 분석이 가능하여 많은 시료를 처리하기에 편리한 SPME가 많이 사용되고 있다. SPME는 headspace에 존재하는 향기성분만 추출하여 실제로 우리가 가장 먼저 냄새를 맡는 성분과 가장 가깝게 프로파일링 할 수 있지만, SDE, SAFE 등의 추출법에 비해 감도가 낮고, 향기성분의 추출 범위가 headspace로 이동된 성분들에만 국한되며 fiber의 선택에 따라 달라질 수 있기 때문에 향기성분 분석이 제한적일 수 있다. 또한 같은 시료라 하더라도 서로 다른 추출법을 사용하면, 대사체에 따른 시료

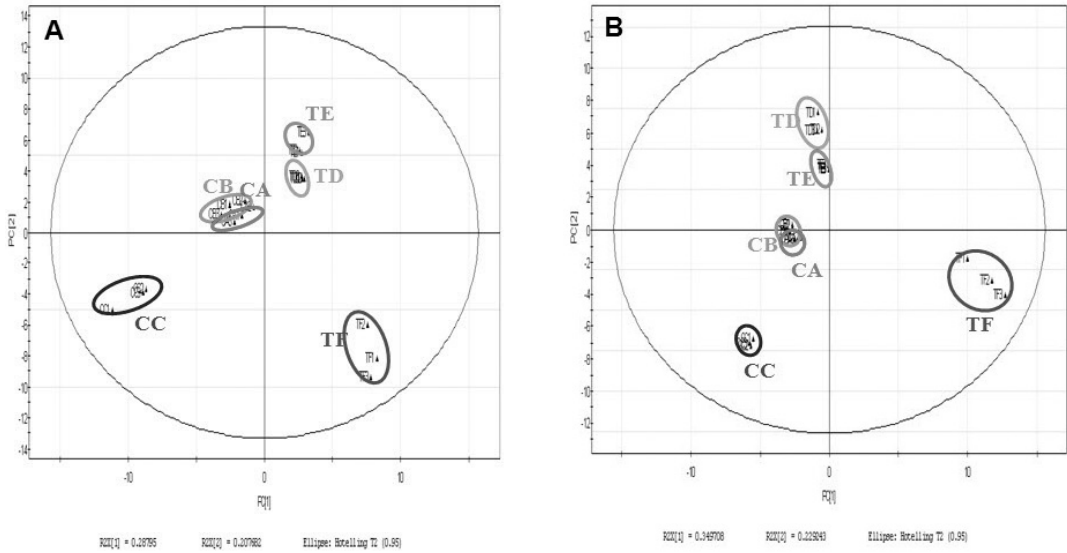


Fig. 3. Differences of sample distribution depending on the extraction methods: (A) SAFE, (B) SPME

의 구별 정도에 차이가 생기기도 한다(Fig. 3). 따라서 분석 목적과 시료의 특성을 충분히 고려한 추출법의 선택이 요구된다.

기기분석

GC-MS는 1950년대 이후로 휘발성 향기성분 분석에 주로 사용되어 온 기기로, LC-MS, NMR 등과 함께 대사체학 분야에서도 널리 사용되고 있다. GC-MS는 감도와 분리능이 뛰어나고 재현성이 좋으며, 성분 동정에 mass spectral database를 활용할 수 있어 특히 선호된다. 또한 데이터 획득과 분석단계가 표준화되어 있고, electron-ionization(EI)법을 사용했을 때 각 성분들에서 쪼개져 나오는 많은 fragment들이 지문과 같은 역할을 하면서 성분의 구조를 유추할 수 있게 하기 때문에 대사체의 동정

을 쉽게 한다는 것이 강점으로 작용할 수 있다. GC-MS는 비교적 넓은 spectrum범위에서 다양한 대사체들을 안정적으로 분리할 수 있으나, 분석하고자 하는 물질의 scan range를 지정하여야 한다. 이러한 단점을 보완할 수 있는 GC-TOF-MS는 scan 속도가 빠르고, mass scan range에 한계가 없으며 겹친 peak의 ion을 구분할 수 있는 deconvolution 기능으로 분석 정확도를 높여주기 때문에 가능한 많은 물질을 분석하고자 할 때 적합하며, 다양한 혼합물로 구성되어 있는 향기성분 분석에도 유용할 수 있다. 대사체학 연구는 대사체 혼합물을 분리하고 정량할 수 있는 MS를 중심으로 기술적 발전을 거듭해가고 있지만, 분석기기의 종류에 따라 분석 가능한 대사체의 종류가 한정되며 민감도의 차이가 있기 때문에 어느 하나의 장비로 분석한 대사체 프로파일링으로는 전체 대사체 네트워크를 이해하기에 제한적이다.

데이터 분석

대사체학 연구에서는 시료로부터 얻은 모든 대사체 정보를 최대한으로 해석하는 것이 관건이며, 이를 위해서는 mass spectrum pattern을 확인하면서 대사체 변화와 차이를 비교하는 작업이 필요하다. 그러나 대사체 데이터는 각 peak가 가지고 있는 방대한 양의 정보를 모두 포함하고 있기 때문에 chromatogram상에서 잘못된 signal을 제거하고 각 pattern을 판독할 수 있는 프로그램이 필요하게 되었다. 이러한 기능을 수행할 수 있는 소프트웨어는

MetAlign(www.metalign.nl), AMDIS(www.amdis.net) 등이 알려져 있으며(Fig. 4), 대개 mass spectral database를 이용하여 noise peak는 제거하고 머무름 시간에 따라 peak를 자동적으로 정리해준다. Peak alignment 작업은 각 소프트웨어마다 가지고 있는 데이터베이스의 양에 따라 그 결과가 달라질 수 있는데, 최근 많이 사용되고 있는 AMDIS는 NIST database를 기반으로 하여 mass spectral 정보를 제공하기 때문에 GC-MS 데이터와의 조합이 용이한 편이다.

대사체학 기법으로 데이터 분석 시 가장 중요한

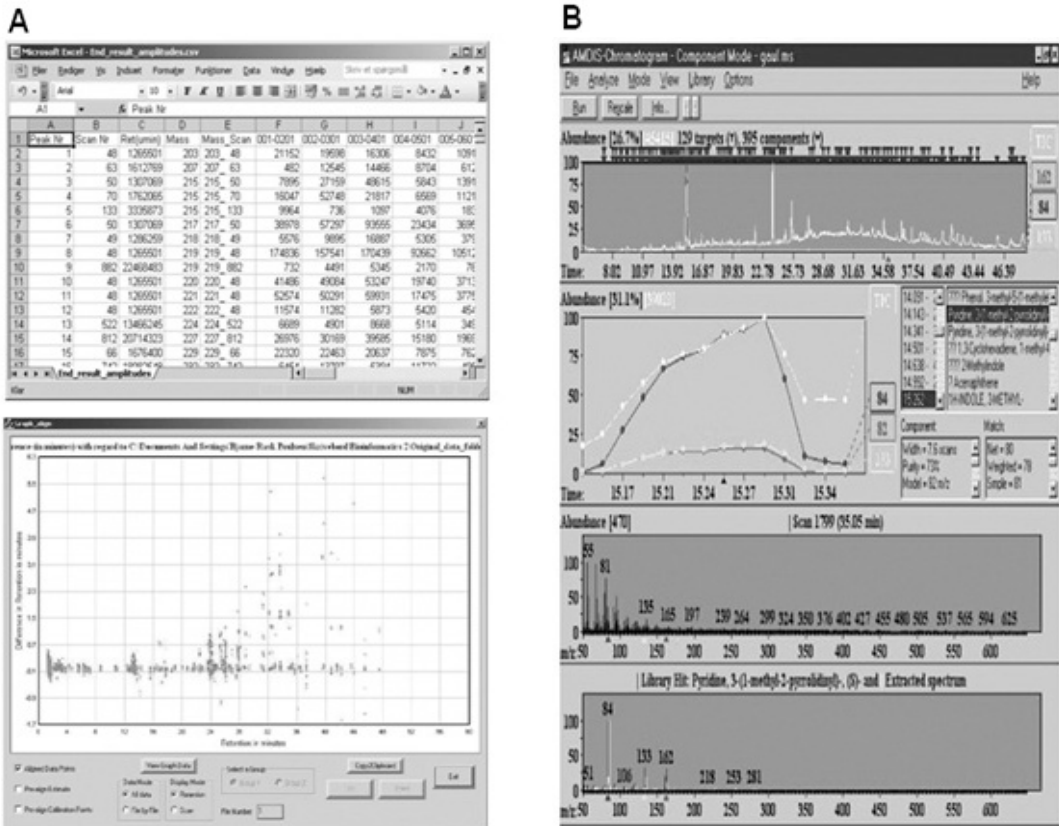


Fig. 4. Peak alignment software for GC-MS based metabolomics: (A) MetAlign, (B) AMDIS

부분을 차지하는 것은 다변량 통계분석으로, 대사체 변화를 식품의 물리, 화학적 상태변화와 연관지어 해석하기 위한 기초자료를 제공한다. 또한 복잡한 대사체 데이터를 빠르게 분석할 수 있는 도구로써 많은 양의 데이터를 축소화하여 시료들의 특징에 따른 대사체들의 차이와 분포를 보기 쉽고 총체적으로 이해할 수 있게 도와준다. 더불어 다변량 분석은 scaling 방법이 다양하여 시료 간 오차를 줄일 수 있기 때문에, 많은 시료를 다루는 대사체학에서 유용하게 활용되고 있다. 향기성분 프로파일링에서 다변량 분석은 시료에 따라 달라지는 대사체의 분포를 보여주고 이들의 기여도를 확인할 수 있어 시료와 대사체와의 관계를 쉽게 해석할 수 있게 한다. 다변량 분석에서도 어떤 방법을 사용하는가에 따라 얻을 수 있는 정보와 해석의 범위가 달라지는데, 각 연구목적에 맞게 주성분 분석(principle component analysis, PCA), 군집 분석(cluster

analysis, CA), 부분 최소 제곱 분석(partial least squares, PLS), 부분 최소 제곱 판별 분석(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA), 직각 부분 최소 제곱 판별 분석(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 등의 방법을 적절히 사용하는 것이 좋다. 특히 PCA는 변수들과 시료의 관계를 몇 개의 주성분으로 나타내고 다차원의 데이터를 구조적으로 단순화시켜 보여주는 방법으로 가장 널리 사용되는 다변량 분석법의 하나이다. 주로 한 시료가 다른 시료와 얼마나 차이 나는지 확인하기 위해 사용되며, 나아가 어떤 변수가 그 차이에 기여하는지 등의 정보를 얻는데 활용할 수 있다(Fig. 5). 반면 PLS는 시료에 대한 반응변수가 2개 이상일 때, 각 변수들의 상관관계를 찾아 다음 변수의 값을 예측하는 방법으로 대개 기기분석(X 데이터)과 관능검사(Y 데이터) 결과의 상관관계를 분석할 때 자주 사용된다. PLS는 판별 분석

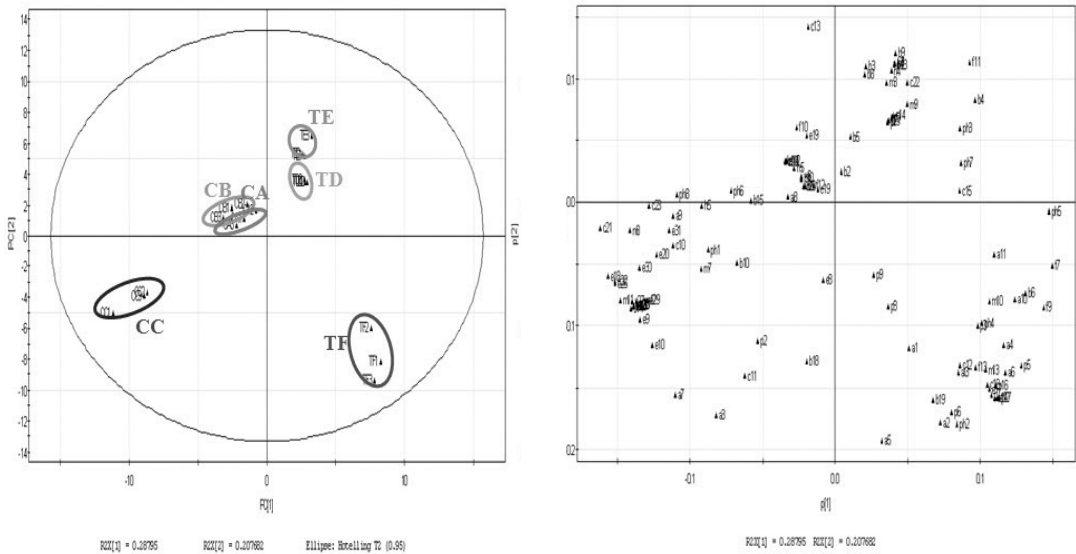


Fig. 5. PCA score (A) and loading (B) plots with GC-MS data sets

(discriminant analysis, DA)과 결합하여 PLS-DA로도 활용되고 있는데, 이는 PCA의 기본적인 이론을 따르고 있지만, PCA에서의 주성분을 구조적으로 회전시켜 개체를 그룹화(classification)하여 그룹 내 variability는 줄이고, 그룹 간 분리는 크게 하기 때문에 PCA에서보다 시료 간 구분을 극대화시킨다. 반면 PLS 분석의 확장된 개념인 OPLS는 Y 데이터에 관계가 없는 X 데이터의 변수를 제거함으로써 예측 값을 높이는 새로운 분석방법이다. 마찬가지로 OPLS-DA 역시 PLS-DA의 X축 변수들을 Y축의 직각이 되도록 하는데, OPLS-DA에 적용된 변수들은 PLS-DA나 PCA보다 더 높은 설명력을 가진다. 또한 OPLS-DA에서 나타난 변수들의 분산 정도는 시료 간 차이에 기여하는 정도가 높을수록 크게 나타나므로 다른 방법보다 차이유발인자를 보다 더 효과

적으로 표시할 수 있다(Fig. 6).

앞서 언급했듯이, 대사체학은 다양한 방법을 사용하는 통합적 기술이기 때문에 목적에 따라 다변량 분석의 접근방식이 달라진다. Target analysis는 선택적으로 동정된 성분들 중에서 가장 중요한 biomarker나 정보를 획득하기 위한 목적을 갖는다. 때문에 다변량 분석은 반드시 '정성 및 정량 분석'을 마친 다음에 수행하여야 한다. 그러나 non-target analysis의 경우, 처음부터 모든 대사체에 대한 특정 관점이 배제되어야 하므로 다변량 분석 전에 대사체를 동정하거나 정량하지 않는다. 두 가지 접근 방식은 대사체와 시료의 관계를 포괄적으로 이해하기 위한 도구로 다변량 분석이라는 공통분모를 갖지만, 이를 활용하여 얻고자 하는 정보의 범위가 다르므로 실험 목적에 맞게 다변량 분석을 수행하는 것이 요구된다.

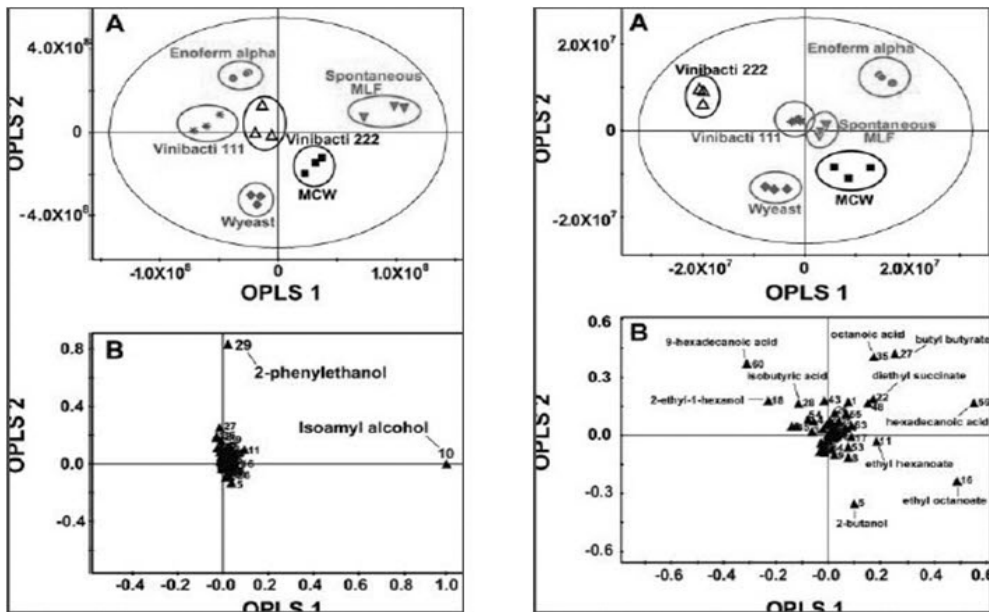


Fig. 6. OPLS-DA score (A) and loading (B) plots with GC-MS data sets

향기성분 분석에서 대사체학의 응용

향기성분 분석이 대사체학 기법과 직·간접적으로 접목되면서, 향기성분의 연구영역과 그 활용 범위가 점차 확대되고 있다. Tikunov 등은 토마토의 종류와 숙성도에 따른 휘발성 대사체를 구별하였고, 다변량 분석을 이용하여 대사체들의 전구체를 그룹화하여 설명하였다. Lee 등은 머루 와인의 발효에 따른 휘발성 및 비휘발성 대사체를 분석하였고, 대사체학 기법을 이용하여 와인의 후기 숙성과 관련된 향기성분을 2-phenylethanol, isoamyl alcohol, 2-butanol, ethyl octanoate, ethyl hexanoate 등 총 12가지로 규명하였다. 또한 Beleggia 등은 파스타의 휘발성 및 비휘발성 대사체를 분석하고, 밀의 경작지에 따라 파스타의 향미가 유의적으로 차이가 있음을 설명하였으며 이를 뒷받침하기 위해 대사체학 기법과 상관관계 분석을 활용하였다. 더불어 Aliferis 등은 최근 연구에서 77가지의 서로 다른 꿀에 있는 휘발성 향기성분을 대사체학 기법을 이용하여 SPME-GC-MS로 분석하여 다양한 꿀에 존재하는 향기성분의 조성을 원산지별로 분류하고, phenolics, terpenoids 등을 꿀 시료를 구별할 수 있는 biomarker 성분으로 규명한 바 있다. 이처럼 최근 선행연구들은 식품의 휘발성 향기성분이 어느 특정한 몇몇 대사체에서 유래되는 것이 아니라 여러 가지 복합적인 상호작용에 의해 생성된다는 점을 깊이 반영하였으며, 향기성분을 총체적으로 이해하기 위한 도구로 대사체학 기법을 적용하여 식품의 향기성분에 대한 의미 있는 정보를 얻었음을 보여주었다.

요 약

식품의 향미는 매우 복잡하다. 때문에 지난 50년 동안은 향기성분을 정확하게 분리할 수 있는 정교한 기기를 바탕으로 향기성분의 분석이 이루어져 왔다. 그러나 이제는 단순히 기기에 의존하여 향기성분을 화학적인 조성에 따라 나열하는 틀을 벗어나서 이들의 유의적 차이를 통합적으로 해석하여 향기성분 분석을 고부가가치 기술로 이해해야 할 필요성이 도래하였다. 이와 같은 요구에 맞춰 접근할 수 있는 새로운 방법인 대사체학 기법은 궁극적으로 생체, 식품, 식물 등 다양한 개체 내에 있는 모든 저분자 화합물까지 분석하는 것을 목표로 하며 시료의 추출물뿐만 아니라 세포, 조직, 체액에 존재하는 대사체들까지 전체적으로 분석하는 기술이다. 아직까지는 대사체 관련 database 기반이 부족하고, 표준화해야 할 용어 및 절차가 남아 있어 향기성분 분석과의 접목이 쉽지 않다. 그러나 target analysis, non-target metabolite profiling(global analysis) 등 여러 가지 대사체학 기법과의 조합으로 향기성분 분석은 식품 내부 상호 간의 영향 및 외부 화합물들과의 반응을 검토하는 총체적 연구로 거듭날 수 있을 것이다.

● 참고문헌 ●

1. Fisher C, Scott T, Food Flavours, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997
2. Mestres M, Busto O, Guasch J, Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma, J

- Chromatogr A, **881**, 569-581, 2000
3. d' Acampora Zellner B, Dugo P, Dugo G, Mondello L, Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis, *J Chromatogr A*, **1186**, 123-143, 2008
 4. Grosch W, Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission, *Chem Senses*, **26**, 533-545, 2001
 5. Villas-Bôas SG, Mas S, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J, Mass spectrometry in metabolome analysis, *Mass Spectrom Rev*, **24**, 613-646, 2005
 6. Tikunov Y, Lommen A, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Bino RJ, Hall RD, Bovy AG, A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles, *Plant Physiol*, **139**, 1125-1137, 2005
 7. Kim HK, Verpoorte R, Sample preparation for plant metabolomics, *Phytochem Anal*, **21**, 4-13, 2010
 8. Lee JE, Hong YS, Lee CH, Characterization of fermentative behaviors of lactic acid bacteria in grape wines through ¹H NMR and GC-based metabolic profiling, *J Agric Food Chem*, **57**, 4810-4817, 2009
 9. Beleggia R, Platani C, Spano G, Monteleone M, Cattivelli L, Metabolic profiling and analysis of volatile composition of durum wheat semolina and pasta, *J Cereal Sci*, **49**, 301-309, 2009
 10. Aliferis KA, Tarantilis PA, Harizanis PC, Alissandrakis E, Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds, *Food Chem*, **121**, 856-962, 2010
 11. Rochfort S, Metabolomics reviewed: A new 'omics' platform technology for systems biology and implications for natural products research, *J Nat Prod*, **68**, 1813-1820, 2005
 12. Wishart DS, Metabolomics: applications to food science and nutrition research, *Trends Food Sci Technol*, **19**, 482-493, 2008
 13. Noble AC, Ebeler SE, Use of multivariate statistics in understanding wine flavor, *Food Rev Int*, **18**(1), 1-21, 2002
 14. Jo YJ, Metabolite profiling of fermented soybean paste, prepared by different methods, MS Thesis, Ewha womans Uni., Korea, 2010

서혜영 이학박사

소 속 : 한국식품연구원 부설 세계김치연구소
 전문분야 : 식품화학분석
 (식품 향기성분 분석, 식품 위해물질 분석)

E-mail : hyseo@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9340