

## 곡류 첨가 발효유의 저장 중 HS-SPME를 이용한 휘발성 향기성분 정량분석

임찬묵 · 주진우 · 김거유\*  
강원대학교 동물식품응용과학과

### Determination of Volatile Flavor Compounds during Storage of Cereal Added Yogurt using HS-SPME

Chan-Mook Lim, Jin-Woo Jhoo, and Gur-Yoo Kim\*

Department of Animal Products and Food Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

#### Abstract

In this study, quantitative analysis of major volatile flavor compounds from yogurt was conducted using headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) GC-FID analysis technique, and the changes of volatile aroma compounds during the storage period were evaluated. The yogurt was prepared with the addition of 2% cereals, such as, white rice (WR), brown rice (BR), germinated brown rice (GBR) and saccharified germinated brown rice (SGBR). After fermentation, the products were stored at 5°C for 15 d. The major volatile aroma compounds in yogurt, such as acetaldehyde, acetone, diacetyl and acetoin were able to be extracted using HS-SPME technique efficiently. The regression ( $r^2$ ) value of standard curve prepared with various concentrations of individual flavor chemicals was analyzed over 0.9975, and reproducibility was acceptable to apply quantitative analysis. The analysis of volatile components of control sample during storage showed that the acetaldehyde on 0 d was 10.83 ppm, and that contents were increased to 15.67 ppm after 15 d of storage. However, addition of BR, GBR and SGBR decreased the acetaldehyde contents during storage periods. The acetone content of all treatments during storage was not significantly different. The diacetyl content of all treatments were increased during storage and the addition of SGBR showed the highest amount of diacetyl (0.84 ppm) among treatments on 15 d of storage. The acetoin content of yogurt added with grains was higher than that of control during storage. As a result, the content of volatile aroma compounds in yoghurt during storage period could be analyzed HS-SPME extraction technique effectively, and HS-SPME/GC analysis can be considered for quality control of fermented milk products.

**Key words:** headspace-solid phase microextraction, volatile flavor compounds, quantitative analysis, yogurt, GC-FID

#### 서 론

발효유는 건강을 유지하거나 증진시키기 위해 아이부터 청소년, 그리고 노인층까지 성별구별 없이 섭취되고 있는 식품이며(Beshkova *et al.*, 1998), 최근에는 다양한 종류의 발효유가 개발되어 소비자들은 선택의 폭이 넓어지고 있다. 수많은 발효유 중에서 기능성 또는 제품품질도 중요하지만, 선택의 폭이 넓어진 소비자들에게 향미는 제품선택의 중요한 기준이 된다. 발효유는 제조과정 중 젖산균이 발효산물로 신맛을 내는 젖산을 생성하며, carbonyl 화합물 및 휘발성 지방산, 그리고 알코올 등의 부산물을 생성한다

(Frank and Marth, 1988; Marshall, 1984; Rasic and Kurmann, 1978). 이러한 부산물은 발효유의 독특한 향기에 기여를 하게 되며, 일부는 주요한 향기성분으로써 역할을 하고, 나머지 수많은 화합물들은 전체적인 발효유의 향기에 기여한다(Frank and Marth, 1988). 발효 중 젖산균에 의해 생성되는 carbonyl 화합물의 대표적인 물질은 acetaldehyde, diacetyl, acetoin, acetone 및 2-butanone 등이 있으며(Frank and Marth, 1988; Marshall, 1984; Rasic and Kurmann, 1978), acetaldehyde와 diacetyl, 그리고 acetoin이 발효유에서 중요한 향기성분으로 알려져 있고, 이 중 acetaldehyde 함량이 향기에 미치는 영향이 가장 크다(Rasic and Kurmann, 1978). Diacetyl과 acetoin은 발효유에서 낮은 농도로 존재하고, 보통 acetoin의 함량이 더 높게 존재한다. Rasic과 Kurmann(1978)에 의하면 diacetyl은 매우 소량으로 존재하지만 버터향이 아주 강하기 때문에 발효유의 중요한 성분

\*Corresponding author: Gur-Yoo Kim, Department of Animal Products and Food Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea. Tel: 82-33-250-8647, Fax: 82-33-251-7719, E-mail: [gykim@kangwon.ac.kr](mailto:gykim@kangwon.ac.kr)

이며, 젓산균의 종류나 제조공정 등에 따라 생성되는 양은 달라질 수 있다고 보고하였다.

휘발성 향기성분을 정량분석하기 위해서는 시료로부터 휘발성 향기성분을 추출 또는 농축시키는 과정을 거쳐야 하며, 선택적 추출과정이 용이하지 않다면 정확한 분석을 할 수 없고, 미량의 휘발성 향기성분은 분석이 불가능하다. 휘발성 향기성분을 추출하는 방법으로는 용매추출방법, 증류추출방법 및 headspace(HS) 분석법이 주로 사용되며, headspace법으로는 purge & trap(dynamic headspace), static headspace법 및 solid-phase microextraction(SPME)법 등이 있다 (Park, 1991, 1992). 발효유의 향기성분은 미량으로 존재하기 때문에(Rasic and Kurmann, 1978) 향기성분의 효과적인 추출과정이 이루어져야 한다. 지금까지 증류추출방법을 이용하여 휘발성 향기성분을 추출하는 연구가 활발히 진행되어 왔으나 증류추출방법은 휘발성 향기성분을 농축하는데 많은 시간과 노력이 요구되어 효과적이지 않기 때문에 purge & trap법을 이용하여 추출하는 방법을 개발하여 사용하였다(Jang *et al.*, 2005; Park, 1991, 1992; Werkhoff and Bretschneider, 1987). Purge & trap법은 purge gas를 통과시켜 휘발성 성분을 효과적으로 흡착제 표면에 흡착시키고 다시 열로 탈착시키는 방법으로 시료에 열을 가하지 않아 향기성분의 변화 없이 추출할 수 있다는 장점이 있으며, 농축효과와 재현성이 뛰어나다는 장점이 있어 과거부터 현재까지 많은 연구에서 이용되고 있지만, 시료 purging 및 농축을 위한 복합적인 구성장비가 필요하고 실험장비가 고가라는 단점이 있다(Cha, 1997; Park, 1991, 1992). 또한 static headspace법은 식품 또는 음료 등에서 고유의 향기성분을 추출하거나 열에 의한 변성이 우려될 때 효과적으로 사용할 수 있지만, 미량의 향기성분 분석에는 효과적이지 않다(Park, 1991, 1992). 따라서 미량의 휘발성 향기성분이 다양하게 존재하는 발효유에는 적합하지 않은 방법이다. 최근에는 주류 또는 음료 등에서 특정 향기를 분석하는데 HS-SPME법을 사용한 연구가 활발히 진행되고 있다(Cavalli *et al.*, 2004; Cha, 1997; Jang *et al.*, 2005; Jelen *et al.*, 2000; Park, 1991, 1992; Ulberth and Roubicek, 1995). Solid-phase microextraction(SPME)법은 간단한 방법으로 반응에 민감하여 시료에서 효과적으로 휘발성 화합물의 추출이 가능한 기술이며, 다양한 matrix에 적용이 가능하고, 선택적, 능률적이라는 장점을 갖는 추출방법으로 조작성이 쉽고 비용이 저렴한 특징을 가지고 있다. 또한 fiber coating과 시료 사이에서 흡착의 평형이 이루어지는 시간만 소요되기 때문에 분석시간을 절약할 수 있으며, 미량으로 존재하는 발효유의 향기성분을 효과적으로 추출할 수 있다(Belardi and Pawliszyn, 1989; Kim *et al.*, 2011). 과거에는 향기성분을 추출하기 위해 고농도의 시료를 사용하거나 다량의 용매를 필요로 하고 추출과정 중 오염 또는 열변성에 의한 손실이 많았으나, SPME의 발달로 이를 보

완할 수 있게 되었고, 최근에는 SPME를 이용한 향기성분을 추출하여 분석하는 연구가 증가하고 있다(Buchholz and Pawliszyn, 1994; Contarini and Povolito, 2002; Kataoka *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 1998). 향기성분을 분석하기 위해 추출한 향기성분을 확인하는 GC-MS, GC-FTIR 등의 기기들이 발전하여 미지의 향을 확인하기가 훨씬 쉬워졌지만, 매우 고가의 분석기기로서 지속적인 연구를 하는데 어려움이 있고, 경제적이거나 시간적으로 많은 노력이 필요하기 때문에 국내 발효유의 제조 및 품질특성에 관한 기초 연구 시 쉽게 활용되지 못한 것으로 보인다(Park, 1992). 발효유의 품질을 평가하는데 향미는 관능적으로 중요한 역할을 하고, 휘발성 향기성분이 향미에 중요한 역할을 하므로 앞으로는 발효유의 품질특성 등에 관한 연구에서 휘발성 향기성분에 관한 연구도 함께 진행되어야 한다고 생각된다. 이에 본 연구에서는 고가의 분석기기를 사용하는 대신 HS-SPME/GC를 이용한 발효유의 주요 휘발성 향기성분의 정량 가능성을 검토하고자 곡류를 첨가한 발효유의 저장 중 주요한 휘발성 향기성분의 함량변화를 HS-SPME법을 이용하여 정량분석을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에서 이용한 acetone 및 diacetyl(2,3-Butanedione)은 Sigma-Aldrich(USA)로부터 구입하였으며, acetaldehyde(Fluka, Switzerland) 및 acetoin(Supelco, USA)을 HS-SPME/GC 분석의 표준물질로 사용하였다. Starter 제조에 이용한 균주는 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*가 혼합된 상업용 균주(YCX-11, Christian Hansen, Denmark)를 사용하였다. 발아현미 당화액 제조에 이용한 효소는 *Bacillus amyloliquefaciens*기원의 액화효소(BAN 480L, Novozymes, Denmark) 및 *Aspergillus niger* 기원의 당화효소(AMG 300L, Novozymes, Denmark)를 사용하였다. 백미(white rice)는 농협 조합 공동사업법인에서 2011년 생산된 일반미를 구입하였으며, 현미(brown rice)는 2011년 경북 울진군에서 재배 및 수확한 것을 구매하여 사용하였다.

### 시료의 제조

발아현미, 현미 및 백미는 동결건조(FD-1000, Eyela, Japan)하여 실험에 이용하였으며, 건조 후 80 mesh 크기로 분쇄하여 시료로 사용하였다. 발아현미는 현미를 30°C에서 48 시간 동안 침지하여 발아시켜 실험에 이용하였다. 이때 침지액은 12시간마다 교체하여 신선도를 유지시켰다. 발아현미의 당화액은 발아현미 분말 20 g을 증류수 100 mL에 혼합하고, 80°C에서 10분간 가열하여 전분을 호화시켰으며, 액화효소 0.1 mL를 첨가하여 80°C에서 1시간 동안 반응하여 액화하였다. 액화물에 구연산을 첨가하여 pH 4.8로 조

절한 후 당화효소 0.1 mL를 첨가하여 60°C에서 1시간 반응시켜 시료로 사용하였다. 발효유 제조를 위해 고형분 함량을 12%로 하여 각각의 곡물시료 2%와 탈지분유를 섞어 탈지유를 제조하였으며, 90°C에서 15분간 살균하였다. 상업용 균주(YCX-11, Christian Hansen, Denmark)를 1회 계대 배양한 후 starter를 3%(w/v) 접종하고 37°C에서 8시간 발효하였으며, 발효유는 유리병에 담아 밀봉 후 4°C에서 보관하였다.

### 발효유의 휘발성 향기성분 추출

곡류를 첨가한 발효유의 휘발성 향기성분은 headspace-solid phase microextraction(HS-SPME)법으로 추출하였다. SPME용 50 mL vial에 각각의 시료를 20 g씩 계량하여 septa(20 mm PTFE/Red Rubber, Supelco, USA)와 crimp cap(20 mm Aluminum, Supelco, USA)을 사용하여 밀봉하였다. 밀봉된 vial을 항온수조(Water bath stirrer WBS-80, Japan)에서 350 rpm으로 교반하며 30분 동안 headspace내 휘발성 향기성분의 평형상태를 유도하여 SPME fiber(50/30 µm DVB/Carboxen/PDMS, Supelco, USA)를 이용하여 headspace상에 needle을 노출시켜 휘발성 향기성분을 30분간 흡착시켰다. 그리고 최적의 추출조건을 찾기 위해 항온수조의 온도조건을 달리하여 분석조건을 설정하였다.

### 발효유의 휘발성 향기성분 분석

발효유의 휘발성 향기성분은 HS-SPME/GC-FID를 이용하여 분석을 실시하였으며, 외부 표준물법을 이용하여 농도 별 표준곡선 작성 후 정량분석에 이용하였다. 즉, 발효유의 주요 휘발성 향기성분인 acetaldehyde, acetone, diacetyl 그리고 acetoin의 표준물질을 농도별로 표준시료를 제조하고, 각각의 표준시료를 추출 및 분석하여 정량분석을 위한 standard curve를 작성하였다.

SPME fiber에 흡착된 휘발성 향기성분을 분석하기 위하여 ACME 6000 gas chromatography(Younglin Co., Korea)를 이용하였다. 이동상은 He를 사용하였고, 고정상으로는

HP-FFAP(25 m × 0.32 mm × 0.52 µm, Supelco, USA) column을 사용하였으며, 유속은 1.0 mL/min로 하였다. 주입구(Injector)의 온도는 230°C, 검출기(Detector)의 온도는 250°C로 하였고, 오븐(Oven)은 gradient mode로 40°C에서 4분간 유지하고 5°C/min 속도로 90°C까지 증가시킨 후, 최종 10°C/min의 속도로 150°C까지 증가시켰다(Table 1). SPME fiber에 흡착된 향기성분은 injector에 주입 후 5분간 노출시켜 탈착시켰다. 시료에 함유되어 있는 향기성분은 acetone, diacetyl, acetaldehyde 그리고 acetoin 표준물질과 머무름 시간(retention time)을 비교하여 분석하였고, 검량선(standard curve)에 대입하여 정량분석을 실시하였다.

### 통계분석

실험결과는 SPSS 20.0(SPSS Inc., USA)을 이용하여 분산분석 하였고, 집단 간 비교를 위한 사후분석은 Tukey로 검증하여  $p < 0.05$  이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 모든 분석항목은 3반복 시험하여 얻은 결과를 평균±표준편차로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 발효유의 휘발성 향기성분 추출 조건

발효유의 주요 휘발성 향기성분인 acetaldehyde, acetone, diacetyl 그리고 acetoin을 효과적으로 추출하기 위해 온도 조건(20°C, 35°C, 50°C)에 차이를 두고 분석한 결과는 Table 2에 나타내었다. 온도조건을 달리하였을 때 acetaldehyde 함량의 경우 50°C 조건에서 8.45 ppm으로 분석되어, 20°C와 35°C 조건의 9.82, 9.75 ppm보다 낮은 함량으로 나타났다. Acetone은 모든 온도조건에서 0.09-0.10 ppm으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. Diacetyl의 경우 온도조건 50°C에서 0.44 ppm으로 가장 높은 농도임을 확인하였으며, 50°C(0.44 ppm) > 35°C(0.35 ppm) > 20°C(0.24 ppm) 순으로 나타났다. 온도조건을 달리하였을 때 acetoin의 함량을 분석한 결과, 35°C 조건에서 45.49 ppm으로 20°C 조건의 함량인 41.73 ppm보다 증가하였지만, 50°C 조건에서는 23.14 ppm으로 35°C 조건에서의 acetoin 함량보다 약 2배 낮게 분석되었

**Table 1.** The analytical conditions of gas chromatography

Parameters	Conditions
Instrument	ACME 6000 Gas chromatography (Young Lin Co., Korea)
Detector	FID (Flame ionization detector)
Column	HP-FFAP (25 m × 0.32 mm 0.52 µm)
Air & Hydrogen flow rate	350 & 35 (mL/min)
Injector temp.	230 (splitless mode)
Carrier gas	He
Flow rate	1.0 mL/min
Detector temp.	250°C
Oven Temp.	Hold 4 min at 40°C → 5°C/min up to 90°C → 10°C/min up to 150°C

**Table 2.** Comparison of HS-SPME extraction temperature for major volatile components in yogurt

Compounds	Temperature conditions (unit: ppm)		
	20	35	50
Acetaldehyde	9.82±0.14 <sup>b</sup>	9.75±0.12 <sup>b</sup>	8.45±0.09 <sup>a</sup>
Acetone	0.10±0.01 <sup>a</sup>	0.09±0.01 <sup>a</sup>	0.10±0.01 <sup>a</sup>
Diacetyl	0.24±0.03 <sup>a</sup>	0.35±0.01 <sup>b</sup>	0.44±0.02 <sup>c</sup>
Acetoin	41.73±0.64 <sup>b</sup>	45.49±0.93 <sup>c</sup>	23.14±1.03 <sup>a</sup>

Data are expressed as mean±SD of triplicate experiments.

<sup>a-c</sup>Means in the same row with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

다. Allaoua 등(2006)은 우유의 휘발성향기성분을 분석하기 위해 SPME 분석 조건을 30-70°C 범위에서 검토한 결과 40°C에서 향기성분의 추출이 효과적인 것으로 보고한 바 있다. 본 연구에서 diacetyl 성분은 50°C 조건에서 가장 효과적으로 추출되었으나 분석하고자 하는 4가지 향기성분의 분석조건을 종합적으로 검토하였을 때 35°C 조건에서 acetaldehyde, acetone, diacetyl 그리고 acetoin 성분을 HS-SPME를 이용하여 추출하는 것이 가장 효과적인 것으로 판단된다.

### 발효유의 휘발성 향기성분 정량분석

주요 향기성분의 정량분석을 위해 acetaldehyde, acetone, diacetyl 그리고 acetoin 표준물질을 HS-SPME법에 의해 추출하고 GC-FID를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 농도별로 추출한 각각의 휘발성 향기성분으로 표준곡선을 작성하여 상관관계식을 얻었으며, 이때  $R^2$ 값은 0.9979 이상의 높은 상관관계를 가지는 것으로 나타났다.

젖산 발효중에는 발효유의 향미에 기여하는 다양한 향기성분들이 생성되는데(Rasic and Kurmann, 1978), 탈지유만을 이용하여 제조한 발효유(대조구)와 곡류를 첨가한 발효유의 휘발성 향기성분을 HS-SPME와 GC-FID를 이용하여 추출 및 분석한 chromatogram을 Fig. 2에 나타내었다. 또한 발효유의 주요 향기성분인 acetaldehyde, acetone, diacetyl 그리고 acetoin의 저장기간 중 함량변화는 Figs. 3-6에 나타내었다.

Acetaldehyde의 휘발성 향기성분 함량을 분석한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Acetaldehyde의 경우 대조구 0일차의

휘발성 향기성분은 10.83 ppm으로 분석되었고, 15일차의 향기성분 함량은 15.67 ppm으로 약 1.45배 증가하였고, 백미첨가 발효유의 경우 저장 0일차, 15일차의 휘발성 향기성분은 각각 10.91, 15.13 ppm으로 1.4배 증가하여, 대조구 및 백미첨가 발효유는 저장 중 acetaldehyde의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. Adda(1986)는 젖산균의 미생물학적 작용에 의해서 acetaldehyde가 생성된다고 보고하였는데, 대조구와 백미를 첨가한 발효유에서 acetaldehyde의 함량이 증가한 것으로 보아 저장기간 중 젖산균의 후 발효 작용에 의한 것으로 사료된다. 현미, 발아현미, 그리고 발아현미 당화액을 첨가한 발효유의 저장 0일차 acetaldehyde 함량을 분석한 결과 각각 11.78, 12.39, 12.15 ppm으로 나타났으며, 대조구와 백미의 0일차 acetaldehyde 함량보다 높게 분석되었다. 저장 15일차 acetaldehyde 함량은 11.96, 13.04, 12.10 ppm으로 분석되어 대조구 및 백미첨가 발효유의 15일차 함량보다 유의적으로 낮은 경향을 나타내었다( $p < 0.05$ ). 대조구와 백미를 첨가한 발효유의 경우 저장기간이 지남에 따라 acetaldehyde 함량이 증가한 반면, 현미, 발아현미, 그리고 발아현미 당화액을 첨가한 발효유의 경우 저장 0일차의 acetaldehyde 함량이 대조구 및 백미보다 높게 나타났다. Lee(2005)의 보고에 의하면 발효유 제조 시 발아현미를 첨가한 발효유의 젖산균의 생육이 촉진되어 발효가 빠르게 진행된다고 보고하였다. 또한 Raya 등(1986) 및 Gonzalez 등(1994)은 acetaldehyde가 유당 대사에 의해 주로 생산된다고 보고하였다. 이러한 결과는 현미의 유리당 중 주종을 이루는 glucose와 sucrose에 의해 젖산균의 생육이 촉진되

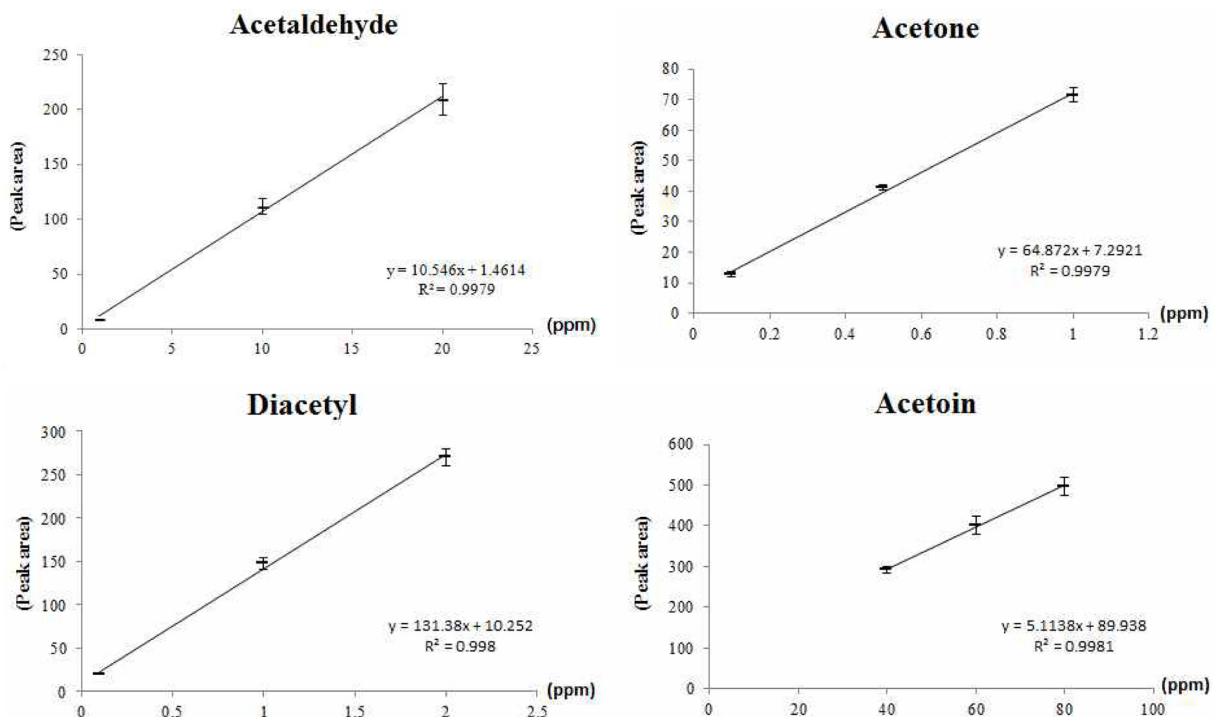


Fig. 1. Calibration curve of four major volatile compounds.

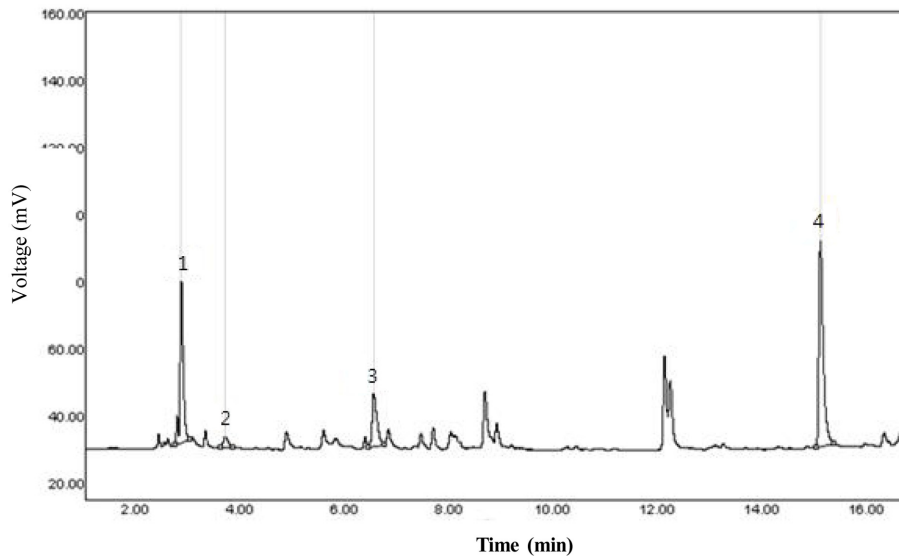


Fig. 2. Gas chromatogram of volatile compounds in yogurt using HS-SPME. 1: acetaldehyde, 2: acetone, 3: diacetyl, 4: acetoin.

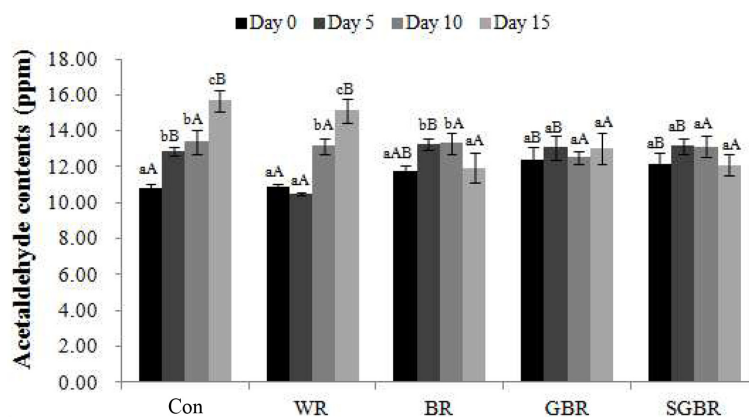


Fig. 3. Acetaldehyde content in the yogurts during storage periods. Con = Yogurt. WR = Yogurt added with 2% white rice. BR = Yogurt added with 2% brown rice. GBR = Yogurt added with 2% germinated brown rice. SGBR = Yogurt added with 2% saccharified germinated brown rice. <sup>A-B</sup>Different letters in the same color bar are significantly different ( $p < 0.05$ ). <sup>a-c</sup>Different letters in the same sample group are significantly different ( $p < 0.05$ ).

어 유당 대사가 활발히 이루어져 현미, 발아현미, 그리고 발아현미 당화액을 첨가한 발효유가 발효종료시점에서 acetaldehyde의 함량이 높게 나타난 것으로 사료된다.

Acetone의 휘발성 향기성분 함량을 분석한 결과(Fig. 4), 네 가지 향기성분(acetaldehyde, acetone, diacetyl, acetoin) 중 가장 낮은 농도로 분석되었으며, 현미첨가 발효유를 제외한 모든 처리구에서 저장기간 중 유의적인 차이를 보이지 않았다( $p < 0.05$ ). 현미첨가 발효유의 경우 저장기간 중에 불규칙적인 차이를 나타냈지만, 저장 0일차, 15일차의 acetone 함량이 각각 0.16 ppm으로 같았다. Rasic과 Kurmann (1978)의 보고에 의하면 acetone은 우유에서 유래된 향기성분이며, 젖산균의 발효에 의해 생성되는 발효산물로 젖소의 품종이나 젖산균의 종류뿐만 아니라 주변환경이나 발효 조건 등에 따라 acetone을 포함한 발효유의 휘발성 향기성

분 함량 변화는 다르게 나타난다. 또한 Frank와 Marth(1988), Ko와 Kyung(1995), Ko 등(2001)은 발효기간 중 acetone 함량이 증가하다가 다시 낮아지는 경향을 나타낸다고 보고하였고, 이는 acetone이 발효 중 생성되지만 휘발성이 강하기 때문인 것으로 사료된다.

Diacetyl의 휘발성 향기성분 함량을 분석한 결과(Fig. 5), 대조구의 경우 저장 0일차의 diacetyl 함량은 0.35 ppm으로 나타났으며, 저장 10일차까지 함량이 유의적으로 증가하였고( $p < 0.05$ ), 저장 15일차에는 0.69 ppm으로 저장기간 중 diacetyl 함량이 약 2배 증가하였다. 백미첨가 발효유의 경우 저장기간 중 diacetyl 함량 변화가 대조구와 비슷한 경향을 나타내어 저장 0일차 함량인 0.48 ppm에서 15일차 함량 0.90 ppm으로 약 2배 증가하였으며, 저장기간 동안 대조구에 비해 유의적으로 높은 함량으로 분석되었다( $p < 0.05$ ).

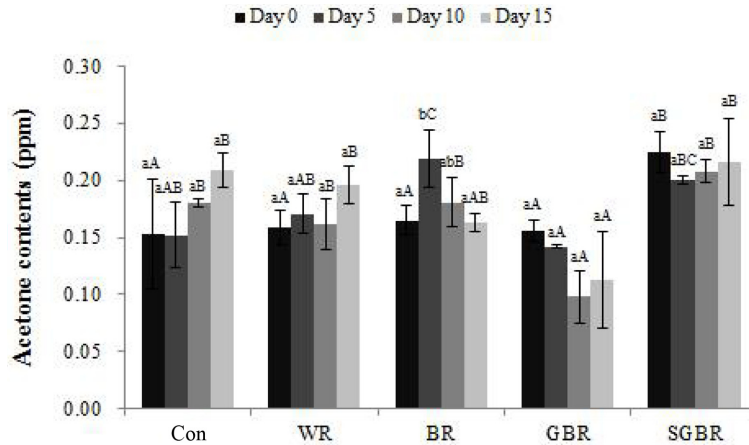


Fig. 4. Acetone content in the yogurts during storage periods. Con = Yogurt. WR = Yogurt added with 2% White rice. BR = Yogurt added with 2% Brown rice. GBR = Yogurt added with 2% Germinated Brown rice. SGBR = Yogurt added with 2% Saccharified Germinated Brown rice. <sup>A-C</sup>different letters in the same color bar are significantly different ( $p < 0.05$ ). <sup>a-b</sup>Different letters in the same sample group are significantly different ( $p < 0.05$ ).

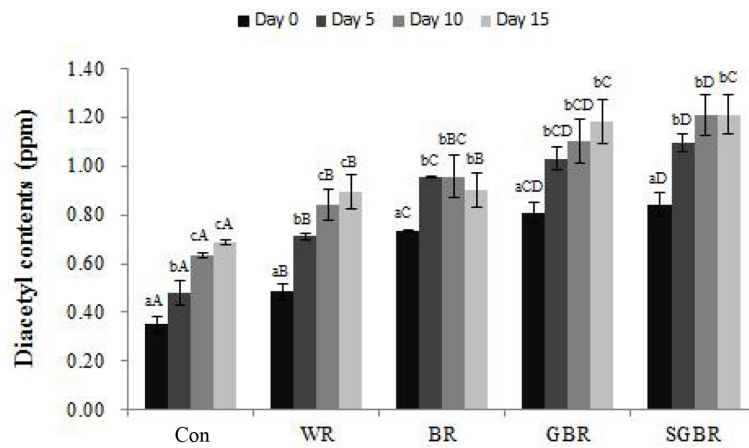


Fig. 5. Diacetyl content in the yogurts during storage periods. Con = Yogurt. WR = Yogurt added with 2% White rice. BR = Yogurt added with 2% Brown rice. GBR = Yogurt added with 2% Germinated Brown rice. SGBR = Yogurt added with 2% Saccharified Germinated Brown rice. <sup>A-D</sup>different letters in the same color bar are significantly different ( $p < 0.05$ ). <sup>a-c</sup>Different letters in the same sample group are significantly different ( $p < 0.05$ ).

현미, 발아현미, 그리고 발아현미 당화액을 첨가한 발효유의 경우 저장 0일차 diacetyl 함량이 각각 0.74, 0.81, 0.84 ppm으로 분석되어 대조구 또는 백미를 첨가한 발효유보다 높게 나타났다. 모든 저장기간 중 diacetyl의 함량은 발아현미당화 > 발아현미 > 현미 순으로 분석되었다. 현미첨가 발효유의 경우 저장 5일차 diacetyl 함량은 0.96 ppm으로 저장 0일차(0.74 ppm) 함량보다 높게 나타났으며, 저장 10일, 15일차에는 각각 0.96, 0.90 ppm으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다( $p < 0.05$ ). 발아현미와 발아현미 당화액을 첨가한 발효유는 현미첨가 발효유와 비슷한 경향을 보여 저장 5일차까지 diacetyl 함량이 증가하였으나, 이후 저장기간이 지남에 따라 경시적인 변화는 나타나지 않았다. 현미와 발아현미, 그리고 발아현미 당화액을 첨가한 발효유는 저장 기간 중 diacetyl 함량이 약 1.4배 증가하였으며, 대조구 및

백미첨가 발효유보다 전체적인 함량은 높았으나 저장기간 중 diacetyl의 생성비율은 다소 낮은 경향을 나타내었다. Ko 등(2001), Kim과 Ko(1993), Ko와 Kim(1995)에 의하면 diacetyl은 발효 중 젖산균에 의해서 생성되며, diacetyl의 함량은 발효시간이 지남에 따라 증가하다가 발효시간 약 20 시간을 전후로 하여 점차 감소하는 경향을 나타낸다고 하였다. 이러한 결과는 발효시간이 늘어날수록 젖산균의 생육이 점차 떨어지면서 diacetyl 생성이 감소 및 휘발하기 때문으로 생각되며, 또한 diacetyl은 acetoin의 전구물질로 발효 또는 저장 중에 생성된 diacetyl이 acetoin으로 전환되었기 때문으로 생각된다(Marshall, 1984; Rasic and Kurmann, 1978). 본 실험에서는 발효실험이 아닌 저장실험으로써 모든 처리구의 발효종료시점을 8시간으로 설정한 후 냉장온도에서 저장했기 때문에 발효유의 후발효가 진행되어 diace-

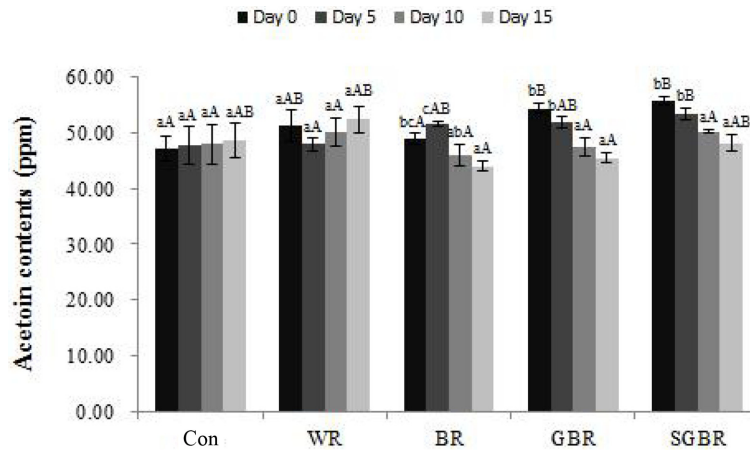


Fig. 6. Acetoin content in the yogurts during storage periods. Con = Yogurt. WR = Yogurt added with 2% White rice. BR = Yogurt added with 2% Brown rice. GBR = Yogurt added with 2% Germinated Brown rice. SGBR = Yogurt added with 2% Saccharified Germinated Brown rice. <sup>A-B</sup>different letters in the same color bar are significantly different ( $p < 0.05$ ). <sup>a-c</sup>Different letters in the same sample group are significantly different ( $p < 0.05$ ).

tyl의 함량이 증가한 것으로 생각된다. 저장기간이 지남에 따라 경시적인 변화를 보이지 않는 것은 diacetyl 생성이 감소 또는 휘발되며, 또한 acetoin으로 전환된 것으로 사료된다. Rysstad와 Abrahamsen(1987) 및 Ko와 Lee(1996)는 보통 발효유에 diacetyl의 함량이 약 0.5-2.0 ppm으로 존재한다고 하였는데 본 실험결과와 유사한 결과를 나타내었다.

Acetoin의 휘발성 향기성분 함량을 분석한 결과(Fig. 6), 대조구의 경우 저장 0일차, 15일차 acetoin 함량은 각각 47.04, 48.66 ppm으로 나타났으며, 백미첨가 발효유의 경우에도 저장 0일차, 15일차 함량이 51.24, 52.31 ppm으로 저장기간 중 유의적인 함량변화를 나타내지 않았다. 현미첨가 발효유의 경우 저장 5일차 acetoin 함량이 51.49 ppm으로 저장 0일차 함량(48.0 ppm)보다 증가하였고, 저장 10일, 15일차에는 각각 45.98, 43.98 ppm으로 점차 낮아지는 경향을 보였다. 발아현미와 발아현미 당화액을 첨가한 발효유는 저장기간 중 acetoin 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 발아현미첨가 발효유의 경우 저장 0일차 acetoin 함량은 54.33 ppm으로 분석되었고, 저장 15일차 함량은 45.47 ppm으로 저장기간 중 약 1.2배 감소하였으며, 발아현미 당화액을 첨가한 발효유의 경우에도 저장 0일, 15일차 함량이 각각 55.67, 48.07 ppm으로 분석되어 감소하는 경향을 나타냈다. 저장 0일차 acetoin 함량은 곡류를 첨가한 발효유에서 전체적으로 높은 함량을 나타내었으며, 발아현미당화 > 발아현미 > 백미 > 현미 순으로 분석되었다. Acetoin은 발효 전에는 존재하지 않다가 발효 중 생성되는 발효유의 휘발성 향기성분으로, 우유에 유래된 구연산(citric acid)에서 생성된다(Frank and Marth, 1988). 저장 0일차에서 곡류를 첨가한 발효유가 acetoin이 더 높은 함량을 나타낸 것은 젖산균의 생육이 활발하여 citric acid로부터 acetoin으로의 전환이 활발하며, 또한 발아현미 당화액을 첨가한 발효유의 경

유 당화액 제조 시 pH를 낮추기 위해 citric acid를 이용한 것이 높은 acetoin 함량을 나타낸 것으로 사료된다. 반면 곡류를 첨가한 발효유에서 저장 중 acetoin 함량이 감소하는 경향은 곡류첨가에 따른 우유 고형분 함량의 감소로 우유에 함유된 citric acid의 양이 상대적으로 적기 때문에 citric acid로부터 유래한 acetoin 함량이 적은 것으로 사료된다(Kim and Lim, 2000). Ko 등(2001)은 12시간 발효시간이 지남에 따라 acetoin 함량이 경시적으로 증가하는 것을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서는 발효 후 저장기간 중 acetoin 함량이 유지되거나 점차 감소하는 경향을 나타내는 것은 저장 중 acetoin 성분이 휘발되기 때문으로 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 발효유의 휘발성 향기성분을 HS-SPME/GC-FID를 이용하여 정량분석의 가능성을 검토하고, 정량분석의 재현성 및 정확성을 확인하여 발효유의 휘발성 향기성분 연구에 접목시키고자 실험을 실시하였다. HS-SPME를 이용하여 발효유의 acetaldehyde, acetone, diacetyl 그리고 acetoin 등의 향기성분 추출 시 35°C에서 가장 효과적으로 추출할 수 있었다. 그리고 발효유의 주요 휘발성 향기성분의 표준물질 농도별로 제조하여 standard curve를 작성하여 상관관계식을 얻을 수 있었으며,  $r^2$ 값은 모든 표준시료에서 0.9979 이상으로 뛰어난 상관관계를 나타냈다. 곡류(백미, 현미, 발아현미, 발아현미당화)를 첨가한 발효유를 제조하여 저장기간 중 휘발성 향기성분의 함량변화를 비교분석하였다. Acetaldehyde의 경우 대조구 및 백미첨가 발효유는 저장기간 중 acetaldehyde의 함량이 약 1.4배 증가하였다. 현미와 발아현미, 그리고 발아현미 당화액을 첨가한 발효유의 경우 저장 0일차 acetaldehyde의 함량이 11.78,

12.39, 12.15 ppm으로 대조구의 0일차 함량(10.83 ppm)보다 높은 함량을 나타냈지만, 저장 15일차에는 acetaldehyde 함량이 각각 11.96, 13.04, 12.10 ppm으로 대조구의 15일차 함량(15.67 ppm)보다 약 1.3배 낮은 함량을 나타냈다. Acetone은 매우 미량으로 분석되었고, 저장기간 중 생성 또는 휘발되어 유의적인 차이는 없었다( $p < 0.05$ ). 대조구 및 백미첨가발효유의 diacetyl 함량은 저장기간 중 약 2배 증가하였고, 현미와 발아현미, 그리고 발아현미 당화액 첨가 발효유의 경우 저장 0일차 함량이 각각 0.74, 0.81, 0.84 ppm으로 대조구 및 백미첨가발효유의 함량(0.35, 0.48 ppm)보다 높게 분석되었다. Acetoin 함량은 곡류를 첨가한 발효유에서 대조구보다 전체적으로 높은 함량을 나타냈고, 대조구 및 백미첨가발효유의 경우 저장기간 중 유의적인 변화를 보이지 않았으며( $p < 0.05$ ), 현미와 발아현미 그리고 발아현미 당화액 첨가 발효유는 저장기간 중 감소하는 경향을 나타냈다.

HS-SPME/GC를 이용하여 곡류를 첨가한 발효유의 저장기간 중 휘발성 향기성분의 변화를 정량 분석한 결과 재현성이 뛰어났으며, 개별 향기성분의 분석도 가능하였다. 따라서 발효유의 휘발성 향기성분을 고가의 장비를 사용하지 않고 간편하고 효율적으로 추출할 수 있는 HS-SPME/GC를 이용하여 정량분석이 가능할 것으로 판단되며, 발효유의 휘발성 향기성분 분석 및 제조 및 품질특성에 관한 기초 연구 시 경제적이고 효율적으로 이용가능할 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Adda, J. (1986) Flavour of dairy products. In: Developments in Food Flavours. Birch, G. G. and Lindley, M. G. (eds) Elsevier Applied Science, London, pp. 151-172.
- Allaoua, A., Joyce Irene, B., and Youness, Z. (2006) Identification of volatile compounds in soymilk using solid-phase microextraction-gas chromatography. *Food Chem.* **99**, 759-766.
- Belardi, R. and Pawliszyn, J. (1989) The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollut. Res. J. Can.* **24**, 179-191.
- Beshkova, D., Simova, E., Frengova, F. and Simov, Z. (1998) Production of flavor compounds by yogurt starter cultures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 180-186.
- Buchholz, K. D. and Pawliszyn, J. (1994) Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. *Anal. Chem.* **66**, 160-167.
- Cavalli, J. F., Fernandez, X., and Lizzani-Cuvelier, L. (2004) Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME identification of quality-freshness markers. *Food Chem.* **88**, 151-157.
- Cha, Y. J. (1997) Fat as a source of food flavor and flavor analysis technology. *Food Sci. Ind.* **30**, 49-64.
- Contarini, G. and Povo, M. (2002) Volatile fraction of milk: Comparison between purge and trap and solid phase microextraction techniques. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 7350-7355.
- Frank, J. F. and Marth, E. H. (1988) Fermentations. In: Fundamentals of dairy chemistry. Wong, N.P. (ed), Van Nostrand Reinhold Co., New York, pp. 684-738.
- Gonzalez, S., Morata de Ambrosini, V., Manca de Nadra, M., Pesce de Ruiz Holgado, A., and Oliver, G. (1994) Acetaldehyde production by strain used as probiotic in fermented milk. *J. Food Prot.* **57**, 436-440.
- Jang, Y. J., Kim, S. H., Kwak, B. M., Ahn, J. H., and Kong, U. Y. (2005) Analysis of volatile flavor compounds in cow's milk by purge & trap method. *Korean J. Food Sci. An.* **25**, 78-83.
- Jelen, H. H., Obuchowska, M., Wojtasiak, R. Z., and Waśkowicz, E. (2000) Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *J. Agr. Food Chem.* **48**, 2360-2367.
- Jia, M. Y., Zhang, Q. H., and Min, D. B. (1998) Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange Juice. *J. Agr. Food Chem.* **46**, 2744-2747.
- Kataoka, H., Lord, H. L., and Paeliszyn, J. (2000) Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.* **880**: 35-62.
- Kim, D. H., Choi, J. W., and In, M. J. (2011) Utilization of *Leuconostocmesenteroides* 310-12 strain in the fermentation of a traditional Korean rice-based beverage. *J. Appl. Biol. Chem.* **54**, 21-25.
- Kim, K. H. and Ko, Y. T. (1993) Volatile aroma compounds of yogurt from milk and cereals. *Korean J. Food Sci. Technol.* **25**, 136-141.
- Kim, S. B. and Lim, J. W. (2000) Studies on the manufacture of adlay Yoghurt, II. The Volatile flavor compounds and the sensory properties of adlay Yoghurt. *Korean J. Food Sci. An.* **20**, 64-71.
- Ko, Y. T., Kim, T. E., and Kang, J. H. (2001) Volatile aroma compounds in Ice cream prepared from lactic fermented egg white food added with cream. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**, 373-377.
- Ko, Y. T. and Kim, K. H. (1995) Growth and acid production by *Leuconostocmesenteroides* in milk added with cereal and analysis of several volatile flavor compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.* **11**, 316-322.
- Ko, Y. T. and Kyung, H. M. (1995) Changes in acid production, sensory properties of yogurt and volatile aroma compounds during lactic fermentation in milk added with egg white powder. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 612-617.
- Ko, Y. T. and Lee, E. J. (1996) The preparation of yogurt from egg white powder and casein. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 337-344.
- Lee, C. B. (2005) Studies on the fermentation properties of yogurt added sprouted brown rice. M.S. thesis, Hankyung National Univ, Gyeonggi-do, Korea.
- Marshall, V. (1984) Flavour development in fermented milks. In: Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Davies, F.L. and Law, B.A. (eds), Elsevier Applied Science Publishers, London, pp.153-186.
- Park, S. G. (1991) What is the study of smell, and how to do? Part 1 What is the study of food products, and go to do? *Food Sci. Ind.* **24**, 88-94.



25. Park, S. G. (1992) What is the study of smell, and how to do? Part 2 Research methods of fragrance precise analytical. *Food Sci. Ind.* **25**, 48-64
26. Rasic, F. and Kurmann, J. (1978) Flavour and aroma in yogurt. In: Yogurt scientific grounds, technology, manufacture and preparations. Rasic, J. and Kurmann, J. (eds) Copenhagen, Denmark: Tech. *Dairy Publ House Distributors*. pp. 90-98.
27. Raya, R. R., Manca de Nadra, M. C., Pesce de Ruiz Holgado, A. and Oliver, G. (1986) Acetaldehyde metabolism in lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* **41**, 397-399.
28. Rysstad, G. and Abrahamsen, R. K. (1987) Formation of volatile compounds and carbon dioxide in yogurt starter growth in cows' and goats' milk. *J. Dairy Res.* **54**, 247.
29. Ulberth, F. and Roubicek, D. (1995) Monitoring of oxidative deterioration of milk powder by headspace gas chromatography. *Int. Dairy J.* **5**, 523-531.
30. Werkhoff, P. and Bretschneider, W. (1987) Dynamic headspace gas chromatography: concentration of volatile components after thermal desorption by intermediate cryofocusing in a cold trap. *J. Chromatogr.* **405**, 87-98.

---

(Received 2013.5.21/Revised 2013.9.23/Accepted 2013.9.27)