

최 종  
연구보고서

불고기의 세계식품화를 위한 향기활성  
성분의 동정 및 안정성 동위원소  
희석분석법을 이용한 정량

Identification and quantification of  
odor active compounds in bulgogi  
by aroma extract dilution analysis and  
stable isotope dilution assay for the  
globalization of bulgogi

서울대학교  
(강원대학교, 이화여자대학교)

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “불고기의 세계식품화를 위한 향기활성 성분의 동정 및 안정성  
동위원소 회석분석법을 이용한 정량” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 12일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 이 형 주

세부연구책임자 : 이 형 주

연 구 원 : 김 지 연

연 구 원 : 김 태 환

연 구 원 : 유 은 정

연 구 원 : 한 태 운

연 구 원 : 정 성 호

연 구 원 : 고 혜 성

연 구 원 : 최 지 영

연 구 원 : 정 도 원

연 구 원 : 엄 경 화

연 구 원 : 강 민 경

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 이 창 규

연 구 원 : 유 지 숙

연 구 원 : 전 규 옥

연 구 원 : 이 혜 진

협동연구기관명 : 이화여자대학교

협동연구책임자 : 김 영 석

연 구 원 : 조 인 희

연 구 원 : 진 해 령

연 구 원 : 양 지 연

연 구 원 : 한 승 진

연 구 원 : 김 민 정

# 요 약 문

## I. 제 목

불고기의 세계식품화를 위한 향기활성 성분의 동정 및 안정성 동위원소 희석 분석법을 이용한 정량

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

외식산업은 경제규모의 확대와 생활수준의 향상과 더불어 빠른 속도로 증가되고 있으며 앞으로 더욱 커다란 발전이 예상되는 분야이다. 따라서 우리나라 고유 음식문화의 대표 품목인 불고기를 세계 외식산업계에 상품화 및 국제화를 이룬다면, 이는 국내 외식산업과 식품산업의 발전 및 관련 농가의 소득증대에 크게 이바지할 것이다. 이를 위해서 불고기의 풍미특성과 그 우수성을 규명하고, 국제사회에 이를 널리 알리는 일이 중요하며, 구체적으로 이러한 연구는 국내의 식품소재를 응용한 고부가가치 제품의 수출, 제조기술 및 플랜트 수출 등의 발전에까지 기여할 수 있는 매우 의미 있는 일이다.

지금까지 국내에서 발표된 육류식품의 풍미성분에 관한 연구는 6편에 그치고 있으며, 특히 독특한 양념으로 조리된 불고기 특유의 풍미성분에 관한 체계적인 기초 연구는 전무한 상태이다. 또한 현재까지의 풍미성분 분석은 단순한 GC/MS 등에 의한 향기성분의 화학적 분석에만 그치고 있어 olfactometry 분석에 의한 실제 인간이 후각으로 느낄 수 있는 향기특성을 통한 각 식품의 향기활성성분을 규명하지는 못하였다.

본 연구는 우리나라 대표적 전통음식인 불고기의 풍미성분을 체계화하기 위하여 풍미성분의 효율적인 추출방법을 확립하고, GC/MS, GC/Olfactometry 등의 기기분석적 방법과 향추출물희석분석법 (aroma extrat dilution anaylsis, AEDA) 등을 통하여 불고기의 향기활성성분을 규명하고자 하였으며, 불고기의 향기활성 성분의 화학구조를 규명하여 합성한 후, 안정성 동위원소 희석분석법 (stable isotope dilution assay, SIDA)으로 향기활성 성분을 정량하고, 이들 성분의 생시기작, 전

구체 및 반응조건 등의 영향을 분석하고자 하였다. 또한 불고기 향기활성 성분을 이용한 재조합 시스템을 개발하여 관능검사를 통하여 비교분석함으로써 불고기향을 가진 meat flavor를 개발하고자 하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 불고기 조리법의 표준화 및 불고기 풍미성분의 추출법/농축법 확립

‘강’의 방법에 기초하여 불고기의 조리법을 표준화하였다.

불고기 풍미성분의 추출법 최적화를 위하여 용매추출법 (SE), 동시증류추출법 (simultaneous steam distillation and solvent extraction, SDE), 초진공승화법 (high vacuum sublimation, HVS), 고체상미세추출법 (solid phase microextraction, SPME), 고정상기체추출법 (static headspace extraction, SH) 등의 추출방법이 사용되었다. 불고기 풍미성분의 농축법을 최적화시키기 위해서는 질소가스 농축법, Kuderna-Danish법, Vigreux 농축법을 사용하였다.

한편, 효율적인 불고기 풍미성분의 추출법을 개발하고 분석하기 위한 연구의 일환으로, 불고기에서 중요한 화합물로 확인된 향 함유 화합물의 분석조건을 GC/PFPD (pulsed flame photometric detector)를 사용하여 확립하였다.

#### 불고기 향기 활성 성분의 동정, 정량 및 OAV

GC/MS, GC/O 등의 기기 분석적 방법과 향추출물희석분석법 (aroma extract dilution analysis, AEDA) 등을 통하여, 불고기의 향기활성 성분 (odor-active compounds)을 규명하였다. 동정 및 결정된 향기활성 성분의 불고기 내에 존재하는 정확한 농도를 안정성 동위원소 희석분석법 (stable isotope dilution assay, SIDA)을 이용하여 결정하였다. 또한 paired comparison test의 관능검사법을 통하여 향기활성성분의 역치값 (threshold values)을 측정하였다. SIDA를 통하여 얻어진 향기활성 성분의 정확한 농도를 역치값으로 나누어 각각의 odor active value (OAV)를 계산하였다.

불고기의 향기활성성분을 정량하기 위해서 GC/MS에 의해 동정되지 않은 물질

들을 산·염기 분획법이나 column chromatography 등을 통하여 특정종류의 성분들을 선택적으로 추출하여 안정성 동위원소 회석분석법을 시행하였다.

### 불고기 향기활성성분의 합성

향기활성 성분 중 역치가 비교적 높은 화합물인 (1) pyrazine 계 화합물 (2,3,5-trimethylpyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2,3-dimethyl-5-methylpyrazine, 2-acetylpyrazine, 2-isobutyl-3-methylpyrazine); (2) sulfur 계 화합물 (allyl mercaptan, methional, 2-vinyl-4H-1,3-dithiin); (3) carbonyl 계 화합물 (benzaldehyde, phenylacetaldehyde, 2-acetyl-1-pyrroline, 2-acetyl-2-thiazoline, 1-hepten-3-one, 1-octen-3-one, butan-2,3-dione, hexan-3,4-dione); 그리고 (4) alcohol 계 화합물인 linalool의 밀리그램 규모의 합성법을 개발하고 적당한 위치에 중수소가 포함된 화합물을 합성하였다.

### 불고기 재조합 시스템의 개발 및 가열조건의 영향

안정성 동위원소 회석법을 통해 확인된 불고기의 향기활성성분의 정량값에 바탕을 두어 불고기의 재조합 시스템을 개발하여 실제 불고기 향과 비교분석하고자 관능검사를 실시하였다.

또한, 불고기의 가열방법에 따른 풍미성분의 차이를 비교하기 위하여 convection oven, 전기 후라이팬, 솥 등의 세 가지 가열방법을 사용하였고, 이때 불고기의 풍미성분은 초진공승화법을 이용하여 추출하였다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 불고기의 풍미성분 분석을 위한 효율적인 추출방법 확립

불고기의 향미특성을 이해하기 위하여 5가지의 추출방법 (용매추출법, 동시증류추출법, 초진공승화법, 고체상미세추출법, static headspace)을 사용하였으며, 그 중에서 동시증류추출법, 고체상미세추출법, 초진공승화법 등의 추출법이 불고기의

풍미성분을 추출하는데 적합한 방법으로 판단되었다. 따라서 이 세 가지 추출방법 등을 바탕으로 불고기의 휘발성 향미성분을 추출 후 기기분석 하였다. 동시증류추출법, 고체상미세추출법, 초진공승화법의 추출방법을 통하여 78, 48, 55개의 향미성분이 각각 동정되었으며, 동정된 불고기의 향미성분은 총 8개의 pyrazines, 10개의 sulfur 계 화합물, 11개의 carbonyls, 9개의 alcohols, 2개의 esters, 11개의 aliphatic hydrocarbons, 27개의 terpene hydrocarbons, 그리고 기타 1개의 화합물이었다. 한편, diallyl disulfide ( $33.98\pm 7.75\%$ ), allyl propyl disulfide ( $2.22\pm 0.51\%$ ), dipropyl disulfide ( $2.72\pm 0.27\%$ ), 3-vinyl-4H-1,2-dithiin ( $1.06\pm 0.35\%$ ), 2-vinyl-4H-1,3-dithiin ( $2.18\pm 0.63\%$ ) 등의 sulfur를 함유하고 있는 화합물은 다른 두 추출방법에 비해 초진공승화법을 이용하였을 때, 비교적 더 많은 양이 확인되었다. 또한 동시증류추출법이나, 고체상미세추출법으로는 동정되었으나, 초진공승화법으로는 동정되지 않았던 화합물들이 silica gel의 컬럼 분획법에 의해 다수 동정되었다. 특히, 이전에 동정된 불고기 향기성분과 비교하였을 때, diallyl tetrasulphide, tert-dodecanethiol, 2-acetyl-4-methylthiazole, benzothiazole, 1,4-naphthalenediol, 2-butyl-benzothiazole, 5-methyl furfural, 2-acetyl pyrazine, 3,5-dimethyl-2-methyl pyrazine 등의 새로운 화합물이 확인되었다. 불고기 풍미성분의 분석을 위해 확립된 추출법 및 분석법은 불고기의 풍미성분을 이해하는데는 물론, 기타 다른 여러 가지 육류의 풍미성분 분석에 활용될 수 있다.

### 불고기의 향기활성성분 동정, 정량 및 OAV

고체상미세추출법을 이용한 불고기의 향기활성성분의 분석 결과, GC/MS에 의해 동정된 40개의 휘발성분 중 allyl mercaptan이 가장 많은 양을 차지하였으며, limonene, diallyl disulfide 그리고  $\beta$ -caryophyllene의 순서로 많은 양을 차지하였다. 두 개의 극성이 다른 컬럼 (DB-5ms, DB-WAX)을 이용한 GC/O 평가에서 allyl mercaptan (described as garlic/bulgogi), methional (described as boiled potato/soy sauce), 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (described as nutty/soy powder/coffee/chocolate), acetylpyrazine (described as nutty/peanut/cooked rice) 등의 32개의 향기활성성분이 동정되었다. 그 중 향기의 특성과 강도를 고려해 allyl mercaptan 등이 불고기의 풍미 특성에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 또한, HVS-GC/MS에 의해 60개의 휘발성분이 동정되었으며, 그 중  $\beta$

-caryophyllene이 가장 많은 양을 차지했고 diallyl disulfide,  $\beta$ -phellandrene, acetic acid, 2-hydroxy-2-butanone의 순으로 그 양을 차지했다. DB-5ms, DB-WAX을 이용한 HVS-GC/O에 의해 32개의 불고기의 향기성분들이 확인되었으며, 중요한 향기활성성분으로 methional (described as boiled potato-like/soy sauce-like), furaneol (described as caramel-like/sweet), 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (described as coffee-like/nutty/toasted laver-like), 2-acetyl-2-thiazoline (described as nutty/popcorn-like/peanut-like), 3-isobutyl-2-methoxy pyrazine (described as bell pepper-like/metallic/earthy)가 동정되었다.

향기활성성분의 역치값은 이점검사에 의해 측정되었다. 측정된 향기활성성분의 역치값은 다음과 같다: methional ( $0.08\mu\text{g/L}$ ), furaneol ( $6.25\mu\text{g/L}$ ), 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine ( $1.56\mu\text{g/L}$ ), 3-isobutyl-2-methoxy pyrazine ( $0.31\mu\text{g/L}$ ), 1-octen-3-one ( $50\mu\text{g/L}$ ), 2-acetylpyrazine ( $12.5\mu\text{g/L}$ ), linalool ( $89.4\mu\text{g/L}$ ), phenylacetaldehyde ( $78.23\mu\text{g/L}$ ), allylmercaptan ( $0.32\mu\text{g/L}$ ). 대부분의 향기활성성분들은 역치값이 낮고 높은 FD factor를 가지기 때문에 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, linalool, phenylacetaldehyde를 제외하고는 GC/MS에 의해 동정될 수 없었다. 향기활성성분을 정량하기 위해서 GC/MS에 의해 동정되지 않은 물질들을 산·염기 분획법, column chromatography, 그리고 목표물질에서 특성이온을 선택하여 분석을 하는 SIM mode에 의해 분석하였다. GC/MS에 의해 동정된 불고기의 향기활성성분 중 acetylpyrazine, linalool, methional이 SIDA에 의해 각각  $96.81\mu\text{g/kg}$ ,  $92.64\mu\text{g/kg}$ ,  $145.47\mu\text{g/kg}$ 로 불고기 내에서 농도가 결정되었다. 이들 세 화합물의 OAV는 각각 7.74, 1.04, 1818.38로 계산되었으며, 이 중 methional이 가장 높은 OAV를 나타냈다.

이 실험에서 불고기의 향기활성성분이 GC/MS와 GC/O에 의해 동정뿐 아니라 정량도 이루어졌다. 이 결과들은 국제 저널에 발표되었고, 불고기의 향미특성에 대한 결과를 국제사회에 발표할 예정이다.

### 불고기 향기활성성분의 합성

역치가가 높은 화합물 중 동위원소를 포함하는 화합물인 2-( $\beta,\beta,\beta$ -trideuterioethyl)-3,5-dimethylpyrazine, 2-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trideuterio)acetylpyrazine, 2,3-dideuterioallyl mercaptan, trideuteriomethional, 2,3,4,5,6-pentadeuteriobenzaldehyde, ( $\alpha,\alpha$ -dideuterio)phenylacetaldehyde,

4,5-di-deuterio-1-octen-3-one 등의 합성을 완료하였다. 동위원소가 치환된 향기 활성성분들을 일정량 이상 합성하여 “동위원소 화합물 은행”을 신설하여 보관하는 제도가 마련된다면 향료화학 연구에 획기적인 발전을 이룰 수 있으리라 기대된다. 또한 향료물질의 다량 합성을 추구하는 벤처사업에 본 합성기술을 이전할 수도 있으리라 예상된다.

## 불고기의 재조합 시스템 개발 및 가열조건의 영향

실제 불고기의 향 특성을 8명의 패널을 이용하여 묘사분석한 결과, roasted 고기향과 고기 누린내, 탄내 고기향, 느끼한 기름 냄새, 카라멜향, 생강향, 양파와 파의 혼합향, 마늘향, 후추향 등으로 총 9개가 묘사용어가 개발되었다. 제1협동과제팀에서 실시한 SIDA의 결과를 토대로 불고기 향을 재조합한 후 이를 묘사분석을 실시한 결과, 고기향과 누룽지 구수함, 익은 감자향, 양파향, 마늘향, 카라멜향, 꽃단내 등으로 총 7개가 묘사용어가 개발되었다. SIDA를 통하여 정량된 농도에서 몇 개의 화합물에 농도변화를 주어서 실제 불고기의 향과 비교하였다. 2-Methyl-3-furanthiol을 더 첨가한 시료가, phenylacetaldehyde를 적게 넣은 시료와 OAV의 비율로 넣은 재조합 시료보다도 불고기향에 가까웠으나, 전체적으로 3개의 조합한 향이 불고기 향과 크게 비슷하지는 않았다. 향후 SIDA를 이용하여 좀 더 정확한 관능검사가 실시되어야할 것이다. 본 연구에서 확립된 관능검사법은 기타 육류 제품의 풍미특성 분석에 이용될 수 있으며, 완성된 재조합 시스템 불고기 풍미특성을 가진 meat flavor 개발에 이용될 수 있다.

초진공승화법의 추출법을 이용하여 convection oven, 전기 후라이팬, 슛 등의 서로 다른 가열방법에 의해 형성된 불고기의 휘발성 향미성분들을 비교하였다. 그 결과, sulfur 함유 화합물과 carbonyl 류 화합물을 제외하고는 정성적 및 정량적으로 세 가지 가열방법에 의한 불고기의 향기성분 간에는 큰 차이가 나타나지 않았다. 반면, methyl allyl trisulfide, diallyl trisulfide 등의 sulfur 함유 화합물은 convection oven을 이용하여 조리된 불고기에서만 동정되었으며, 이에 비해 furfural, benzaldehyde, (E,E)-2,4-decadienal과 같은 carbonyl 계 화합물은 슛을 이용하여 조리된 불고기에서만 검출되었다. 이러한 연구결과는 불고기 가열방법에 따른 불고기 풍미성분의 차이가 어떤 풍미성분에 의한 것인지 밝혀주었으며, 앞으로 불고기 풍미개선을 위한 가열조건 확립에 이용될 수 있다.

## Summary

Various extraction methods, including solvent extraction (SE), static headspace (SH), simultaneous steam distillation and solvent extraction (SDE), solid phase microextraction (SPME), and high vacuum sublimation (HVS), were used to investigate aroma property of bulgogi. Then, the three different extraction methods, such as SDE, SPME, and HVS, were selected and compared to understand a comprehensive flavor profile of bulgogi. For SPME, three different types of fibers, CAR/PDMS, PDMS/DVB, and PDMS, which were suitable for the extraction of volatile compounds with various polarities, were employed. A total of 78, 48, and 55 volatiles were detected in bulgogi by three different extractions, SDE, SPME, and HVS, respectively. SDE showed high extraction efficiency for the non-polar and semi-polar compounds. However, the contents of sulfur-containing compounds, easily degraded by high heating temperatures, were significantly lower in bulgogi volatiles extracted by SDE compared to SPME and HVS. On the other hand, some sulfur-containing compounds, diallyl disulfide, allyl propyl disulfide, dipropyl disulfide, 3-vinyl-4H-1,2-dithiin, and 2-vinyl-4H-1,3-dithiin, were present in relatively larger amounts in bulgogi volatiles isolated using HVS than the other two extraction methods. Allyl methyl disulfide, 3-vinyl-4H-1,2-dithiin, hexanal, and furfuryl alcohol were only found in SPME using CAR-PDMS fiber. (E,E)-2,4-Decadienal, borneol, geraniol,  $\alpha$ -pinene, and (E,E)- $\alpha$ -farnesene were only detected on PDMS/DVB fibers. Many pyrazines and sulfur containing compounds, 2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, 2-ethyl-6-methylpyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, (E)-1-propenyl propyl disulfide, and methyl allyl trisulfide, were not extracted by SPME using PDMS fiber.

To establish an efficient method for the analysis of sulfur-containing compounds, seven sulfur-containing compounds, including dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophene, allyl mercaptan, 2-methyl-3-furanthiol, and methional, were extracted by SPME and SH, and then analyzed by GC

equipped with pulsed flame photometric detector (PFPD). Compared to SPME, less sulfur compounds could be analyzed by SH, mainly due its low extraction efficiency. 2-Methyl-3-furanthiol could not be analyzed by both SH and SPME, even though it was contained in the original sample.

Volatile flavor compounds of bulgogi were analyzed through headspace SPME-GC/MS-O. A Carboxen-polydimethylsiloxane fiber showed high extraction efficiency for bulgogi volatiles. Among the fifty volatile compounds identified by GC/MS, allyl mercaptan was the most abundant, followed by limonene, diallyl disulfide, and  $\beta$ -caryophyllene. Thirty three aroma-active compounds were detected by SPME-GC/O conducted on two GC columns of different polarity (DB-5ms and DB-WAX). The most potent aroma-active compounds were allyl mercaptan (described as garlic/bulgogi), methional (describe as boiled potato/soy sauce), 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (described as nutty/soy powder/coffee/chocolate), and acetylpyrazine (described as nutty/peanut/cooked rice). Volatile flavor compounds of bulgogi were also analyzed by HVS-GC/MS-O). Among sixty volatile compounds identified by GC/MS,  $\beta$ -caryophyllene was the most abundant, followed by diallyl disulfide,  $\beta$ -phellandrene, acetic acid, and 2-hydroxy-2-butanone. Thirty two aroma-active compounds were detected by HVS-GC/O conducted on two GC columns of different polarity (DB-5ms and DB-Wax). The most potent aroma active compounds were methional (described as boiled potato-like/soy sauce-like), furaneol (described as caramel-like/sweet), 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine (described as coffee-like/nutty/toasted laver-like), 2-acetyl-2-thiazoline (described as nutty/popcorn-like/peanut-like) and 3-isobutyl-2-methoxy pyrazine (described as bell pepper-like/metallic/earthy).

In addition, the odor threshold values of potent aroma compounds were determined by paired comparison test. Odor threshold values of potent aroma active compounds were as follows; methional (0.08 $\mu$ g/L in oil), furaneol (6.25 $\mu$ g/L in oil), 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1.56 $\mu$ g/L in oil), 3-isobutyl-2-methoxy pyrazine (0.31 $\mu$ g/L in oil), 1-octen-3-one (50 $\mu$ g/L in oil), 2-acetylpyrazine (12.5  $\mu$ g/L in oil), linalool (89.4 $\mu$ g/L in oil), phenylacetaldehyde (78.23 $\mu$ g/L in oil), and allylmercaptan (0.32 $\mu$ g/L in oil). Although most potent aroma active compounds in bulgogi had high FD factors, they were not detected by GC/MS,

except for 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine, linalool, and phenylacetaldehyde. In order to quantify aroma-active compounds, not detected by GC/MS, the bulgogi extracts were fractionated through acidic/basic fractionation and silica gel column chromatography before analyzed by GC/MS (SIM mode). Among the odor active compounds of bulgogi identified by GC/MS, the concentrations of acetylpyrazine, linalool and methional were determined through stable isotope dilution assay. The concentrations of acetylpyrazine, linalool and methional were 96.81 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 92.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 145.47 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The OAVs of three odor active compounds were obtained from dividing their concentrations by threshold values in oil. The OAVs of potent aroma active compounds were as follows; acetylpyrazine (7.74), linalool (1.04) and methional(1818.38). As shown above, methional showed the highest OAV.

It was essential to have isotopically ( $^2\text{H}$  or  $^{13}\text{C}$ ) labeled compounds of the odor-active components in bulgogi in order to analyze their concentrations effectively by SIDA. Therefore, the synthesis of the isotopically labeled compounds was critical process for this study. It was desirable to develop a synthetic procedure in milligram scale without the isotope establishing conditions for the synthesis and accumulating necessary physical and spectral properties of the compounds. Such skills should be the base for the preparation of the isotopically labelled compounds. The objective of the present research was synthesizing the isotopically labeled compounds for the odor-active components of bulgogi. Development of the synthetic methods for such labeled compounds should be important to the accurate analysis of volatile compounds in bulgogi. The compounds with high potency among odor-active components were (1) pyrazine derivatives (2,3,5-trimethylpyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2,3-dimethyl-5-methylpyrazine, 2-acetylpyrazine, 2-isobutyl-3-methylpyrazine); (2) sulfur-containing compounds (allyl mercaptan, methional, 2-vinyl-4H-1,3-dithiin); (3) carbonyl compounds (benzaldehyde, phenylacetaldehyde, 2-acetyl-1-pyrroline, 2-acetyl-2-thiazoline, 1-hepten-3-one, 1-octen-3-one, butan-2,3-dione, hexan-3,4-dione); and (4) alcohols such as linalool. Accordingly, we, at first, attempted to develop procedures for the preparation of these compounds in milligram scale, and then prepared the compounds with at least two deuterium or  $^{13}\text{C}$  atoms at appropriate positions. The isotope-labelled compounds of 2-( $\beta,\beta,\beta$ )

-trideuterioethyl-3,5-di-methylpyrazine, 2-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trideuterio)acetylpyrazine,  
2,3-dideuterioallyl mercaptan, trideuteriomethional,  
2,3,4,5,6-pentadeuteriobenzaldehyde, ( $\alpha,\alpha$ -dideuterio)phenyl-acetaldehyde,  
4,5-dideuterio-1-octen-3-one were prepared by following the established  
synthetic procedures.

In addition, three different cooking methods, convection oven, electric pan, and charcoal grill, were used to investigate the effects of different heat transfer on the formation of flavor in bulgogi. Using HVS, a total of 55, 50, and 47 volatile compounds were found in bulgogi cooked by three different heating methods, convection oven, electric pan, and charcoal grill, respectively. The difference in the volatile compounds, except for sulfur-containing compounds and carbonyls, was not considerable in bulgogi using three different heating methods. More sulfur-containing compounds, such as allyl propyl disulfide, methyl allyl trisulfide, and diallyl trisulfide, were found in bulgogi cooked by convection oven whereas some carbonyls, such as furfural, benzaldehyde, and (E,E)-2,4-decadienal, were detected only in bulgogi grilled by charcoal.

# CONTENTS

Presentation note .....	1
Summary in Korean .....	2
Summary in English .....	8
Contents in English .....	12
Contents in Korean .....	14
Chapter 1. Introduction .....	19
Chapter 2. Domestic and international trends of research and development ...	20
Chapter 3. Results and discussion .....	22
Paragraph 1. Development of stabilization of bulgogi recipe, extraction and concentration .....	22
1. Introduction .....	22
2. Contents and category of research .....	23
3. Results and discussion .....	32
Paragraph 2. Identification, quantification and OAVs of odor active compounds in bulgogi .....	59
1. Introduction .....	59
2. Contents and category of research .....	60
3. Results and discussion .....	66
Paragraph 3. Development of the synthesis using stable isotope of odor active compounds in bulgogi .....	109
1. Introduction .....	109
2. Contents and category of research .....	111

3. Results and discussion .....	134
Paragraph 4. Development of recombinant study and Sensory evaluation .....	137
1. Introduction .....	137
2. Contents and category of research .....	138
3. Results and discussion .....	144
APPENDIX .....	167
Publications	
Patents	

# 목 차

제출문 .....	1
요약 .....	2
영문요약 .....	8
영문목차 .....	12
국문목차 .....	14
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	19
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	22
제 1 절 불고기 조리법의 표준화 및 불고기 풍미성분의 추출법/농축법 확립 ..	22
1. 서론 .....	22
2. 연구개발의 내용 및 방법 .....	23
가. 불고기 조리법의 표준화 .....	23
나. 불고기 풍미 성분의 추출법 최적화 .....	23
1) 용매추출법 (solvent extraction, SE) .....	23
2) 동시증류추출법 (simultaneous steam distillation and solvent extraction, SDE) .....	24
3) 초진공승화법 (high vacuum sublimation, HVS) .....	25
4) 고체상미세추출법 (solid phase microextraction, SPME) .....	26
5) 고정상기체추출법 (static headspace extraction, SH) .....	27
다. 불고기 풍미 성분의 농축법 최적화 .....	27
라. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)에 의한 분석 .....	27
마. 불고기 풍미성분의 추출법 개선 .....	28
바. 황 함유 화합물들의 효율적인 분석 조건 .....	28

1) 시약 .....	28
2) 표준 시료와 시료의 준비 .....	28
3) 실험기구와 방법 .....	30
가) 미세고체상추출법과 고정상기체추출법의 분석조건 .....	30
나) GC와 GC/MS의 분석 조건 .....	31
3. 연구 결과 및 고찰 .....	32
가. 각 추출방법에 따른 휘발성 성분 비교 .....	32
나. 불고기 향미 성분의 동정 .....	42
다. 황 함유 화합물들의 효율적인 분석 조건 .....	47
1) 황 함유 화합물의 회석 용매에 따른 결과 .....	47
2) 황 함유 화합물의 검량 .....	49
3) 황 함유 화합물의 추출법 비교 .....	51
가) 미세고체상 추출법의 fiber 간의 비교 .....	51
나) 고정상기체 추출법 .....	54
제 2 절 불고기 향기 활성 성분의 동정, 정량 및 OAVs .....	59
1. 서론 .....	59
2. 연구개발의 내용 및 방법 .....	60
가. 불고기 재료 준비 .....	60
나. 휘발성 향기성분의 추출 .....	61
1) 고체상미세추출법 .....	61
2) 초진공승화법 .....	61
다. 휘발성 향기성분의 분석 .....	61
라. 향기활성 성분의 동정 .....	62
마. 향추출물 회석분석법 (aroma extract dilution analysis, AEDA) .....	62
바. 불고기 향기활성성분의 역치값 (threshold value) .....	62
사. 안정성 동위원소 회석법 (stable isotope dilution assay, SIDA)를 위한 standard curve 작성 .....	63
아. 불고기 향기활성성분의 분획 (fractionation) .....	64
1) 산·염기 분획 (acidic/basic fractionation) .....	64
2) 칼럼 크로마토그래피 (column chromatography) .....	65
자. 안정성 동위원소 회석분석법 이용한 정량 .....	65

3. 연구 결과 및 고찰 .....	66
가. 고체상미세추출법을 이용한 불고기 풍미성분의 동정 .....	66
1) fiber 코팅 물질에 따른 추출 효율 .....	66
2) SPME를 이용한 불고기 휘발성물질의 GC/MS 분석 .....	66
3) SPME를 이용한 불고기 휘발성물질의 GC/O 분석 .....	69
나. 초진공승화법에 의한 불고기 풍미성분의 동정 .....	73
1) 초진공승화법에 의한 불고기 휘발성 성분의 GC/MS분석 .....	73
2) 초진공승화법에 의한 불고기 휘발성 성분의 GC/O분석 .....	76
다. 불고기 향기활성성분의 역치값 .....	82
라. 불고기 향기활성성분의 안정성 동위원소법을 이용한 정량 .....	87
1) 안정성 동위원소법을 이용한 정량을 위한 standard curve 그리기... 87	
2) 안정성 동위원소법을 이용한 정량위한 불고기의 향기활성성분의 분획	
가) allyl mercaptan의 분획 .....	93
나) 산·염기 분획에 의한 불고기 향기활성성분의 분획 .....	95
다) 컬럼 크로마토그래피 (column chromatography)에 의한 불고기향기	
활성성분의 분획 .....	98
라) 안정성 동위원소 회석법을 이용한 불고기 향기활성성분 정량	103
마) OAVs .....	103
제 3 절 안정성 동위원소 이용 합성법 개발 .....	109
1. 서론 .....	109
2. 연구개발의 내용 및 방법 .....	111
가. Pyrazine 계 화합물의 합성 .....	111
1) 2,3,5-Trimethylpyrazine (1) .....	111
2) 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine (2) .....	112
가) 2-( $\beta,\beta,\beta$ -Trideuterioethyl)-3,5-dimethylpyrazine (2D) .....	113
3) 2,3-Diethyl-5-methylpyrazine (3) .....	114
4) 2-Acetylpyrazine (4) .....	114
가) 2-( $a,a,a$ -Trideuterio)acetylpyrazine (4D) .....	115
5) 2-Isobutyl-3-methylpyrazine (5) .....	115
나. Sulfur 계 화합물의 합성 .....	116

1) Allyl mercaptan (6) .....	116
가) 2,3-Dideuterioallyl mercaptan (6D) .....	117
2) Methional (8) .....	118
가) Trideuteriomethional (8D) .....	119
다. Carbonyl 계 화합물의 합성 .....	121
1) Benzaldehyde (10) .....	121
가) 2,3,4,5,6-Pentadeuteriobenzaldehyde (10D) .....	122
2) Phenylacetaldehyde (11) .....	124
3) ( <i>a,a</i> -Dideuterio)phenylacetaldehyde (12D) .....	127
4) 2-Acetyl-1-pyrroline (13) .....	128
5) 2-Acetyl-2-thiazoline (14) .....	129
6) 1-Hepten-3-one (15) .....	130
7) 4,5-Dideuterio-1-octen-3-one (16D) .....	131
라. Alcohol 계 화합물의 합성 .....	133
1) Trideuteriolinalool (19D) .....	133
3. 연구 결과 및 고찰 .....	134
가. Pyrazine 계 화합물의 합성 .....	134
나. Sulfur 계 화합물의 합성 .....	135
다. Carbonyl 계 화합물의 합성 .....	135
라. Alcohol 계 화합물의 합성 .....	136
 제 4 절 불고기 재조합 시스템의 개발 및 가열조건의 영향 .....	 137
1. 서론 .....	137
2. 연구개발의 내용 및 방법 .....	138
가. 불고기 재조합 시스템 개발 .....	138
나. 관능검사 .....	138
1) 불고기의 묘사용어 .....	138
2) 재조합 시스템의 묘사용어 .....	140
3) 농도를 달리하여 재조합된 시스템과 실제 불고기향과의 비교 .....	140
다. 불고기 가열조건에 따른 풍미성분의 비교 .....	144
3. 연구 결과 및 고찰 .....	144

가. 관능검사 .....	144
1) 불고기의 묘사용어 .....	144
2) 재조합 시스템의 묘사용어 .....	145
3) 농도를 달리하여 재조합된 시스템과 실제 불고기향과의 비교 .....	145
나. 불고기 가열조건에 따른 풍미성분의 비교 .....	145
제 4 장 목표 달성도와 관련분야에의 기여도 .....	153
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	157
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	159
제 7 장 참고문헌 .....	162
부록 .....	167
학회 발표 및 논문 발표	
특허출원	

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

향료산업은 1999년을 기준으로 전 세계적으로 약 110-150억불의 시장을 형성하고 있으며, 2004년에는 약 184억불로 시장규모가 커질 것으로 예견되고 있다 (www.leffingwell.com/top\_10.htm). 우리나라는 1997년을 기준으로 연간 약 1,200억 원 규모를 사용하고 있으나, 여전히 완제품을 수입에 의존하고 있는 실정이다.

미국, 스위스, 프랑스, 영국, 독일, 일본 등의 선진국들은 이러한 향료산업의 중요성과 가치를 좀더 빠르게 인식하고 기술개발에 많은 투자를 기울여 일부 선진국 소재 상위 10개사가 전 세계 시장의 75%를 점유하고 있다. 우리나라도 이러한 향료산업의 중요성을 인식하고 관련업체와 제품을 육성하여야 하겠지만, 향료산업의 특성상 100-300여년간의 정밀화학을 바탕으로 한 노하우와 기술개발에 전력해 온 선진업체와 경쟁하기는 쉽지 않은 실정이다.

한편, 소득증대와 함께 진행되는 “입맛”의 서구화는 meaty, roasted, brothy, vegetable-like으로 표현되는 savory-type의 향에 대한 소비를 촉진시키고 있다. 따라서 우리나라의 전통음식이며 대표적인 savory 식품인 불고기의 풍미성분을 체계적으로 분석하는 일은 국내 향료산업의 성장 뿐 아니라 외식산업에서 한식문화의 세계화에 크게 기여할 것으로 예상된다.

본 연구에서는 이러한 국내 대표의 전통식품인 불고기의 풍미성분을 종합적이고 체계적으로 분석하기 위하여 불고기 풍미성분의 효율적인 추출방법을 확립하고, GC/MS, GC/O 등의 기기분석적인 방법과 향추출물회석분석법 등을 통하여 불고기의 향기활성 성분을 규명하고자 하였다. 또한, 불고기의 향기활성 성분의 화학구조를 규명하여 안정성 동위원소로 처리된 향기성분을 유기합성한 후, 안정성 동위원소 회석분석법 등의 방법으로 향기활성 성분을 정량하고, 이들 성분의 생성기작, 전구체 및 반응조건 등의 영향을 분석하였다. 이렇게 정량된 불고기 향기활성 성분들을 여러 가지 농도로 재조합한 시스템을 개발하여 관능검사를 통해 실제 불고기향과 비교분석함으로써 불고기향을 가진 savory-type의 meat flavor를 개발하는데 이용하고자 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

이제까지 국내에서 발표된 육류식품의 풍미성분에 관한 연구로는 초산, 유산균, 냉동저장 등이 돼지고기 풍미에 미치는 영향 관련 논문 3편, 소 품종에 따른 풍미 특성 관련논문 1편, 지방산의 조성파 적색육의 풍미 관련논문 1편, 소시지 풍미 관련논문 1편 등 모두 6편이 있었다. 그러나 불고기 등 우리나라의 대표적인 조리 육제품의 풍미특성에 관하여는 전혀 보고된 바가 없다. 또한, 우리나라 음식문화의 대표라고 할 수 있는 불고기의 국제화를 위한 풍미성분의 체계적인 기초연구가 되어있지 않는 실정이다. 또한, 불고기 풍미성분의 GC-MS/Olfactometry 분석이 이루어지지 않아 불고기 특유의 향기성분이 밝혀져 있지 않고, 풍미의 품질 평가를 위한 지표성분이 알려져 있지 않았다.

외국의 경우 조리된 육류의 풍미성분에 관하여는 많은 연구보고가 있었다. 소 고기의 경우 약 70편의 논문에서 880종의 풍미성분이 동정되었고, 돼지고기에서는 11편의 논문에서 361 종의 풍미성분, 양고기에서는 12편의 논문에서 271종의 풍미 성분, 닭고기에서는 20편의 논문에서 468종의 풍미성분이 보고된 바 있다. 그러나 불고기는 우리나라의 고유한 음식이므로 외국에서 불고기의 풍미성분에 대하여는 전혀 연구된 바가 없고 따라서 풍미성분도 알려진 것이 없다.

유기합성의 전반적인 기술은 국내에서도 대학, 연구소, 기업체의 많은 연구진들에 의해서 지난 20 여 년간 괄목할 만한 성장을 이뤘으며 선진국의 수준에 근접하여 있다. 그러나 동위원소 표지 화합물의 합성 기술은 이제까지 연구 대상으로 주목을 받지 못하였었다. 이에 관한 연구의 필요성이 크게 대두되지 못하였으며 반응 메카니즘이나 생합성 경로를 규명하기위한 목적으로 극소수의 화합물들만이 합성되었음이 보고된 바 있다. 한편  $^{19}\text{F}$  또는  $^{130}\text{I}$ 을 포함하고 방사성 동위원소를 포함하는 물질들을 진단시약으로 합성하여 즉시 사용하는 연구가 몇몇 대학 병원에서 이뤄지고 있을 뿐이다. 한편, 일부 시판되는 동위원소 처리 물질은 매우 고가이어서 이러한 동위원소 화합물을 구입하는 것은 연구비 규모상 매우 어렵고, 장차 이 연구가 상용화되기 위해서는 향기활성 물질의 합성 방법이 정립될 필요성이 매우 큰 실정이다.

본 연구의 총괄 및 제1세부과제 책임자인 서울대학교 이형주 교수는 풍미화학 전공자로서 한국식품과학회, 한국조리과학회 등에서 맛과 향기의 인식기작 등에

관한 초청강연, 한국식품과학회, 한국생물공학회, 한국식품위생학회 등에서 향료 및 풍미료 등의 식품소재 개발 등에 관한 초청강연 등을 여러 차례 한 바 있다. 이제까지 전통식품의 풍미성분 특성, *Kluyveromyces* 등 미생물학적 방법에 의한 풍미성분 생산, 식품세포공학에 의한 peppermint, spearmint의 풍미성분 생산, enzyme modified cheese에 의한 풍미성분 생산 등에 관하여 연구경험을 축적하였다. 현재에도 국내외 향료식품의 향기성분을 GC/MS, GC/O, AEDA 등의 방법으로 분석하여 산썩, 오리방풀, 오미자 등 15종 자생 향료식품의 향기활성 성분을 학계 최초로 보고한 바 있다.

본 연구의 제1협동과제 책임자인 강원대학교 화학과 이창규 교수는 유기화학 전공자로서 유기합성 및 화합물 구조 분석에 관하여 다수의 우수 논문을 국제학회지에 발표한 바 있다. 특히 불고기의 풍미에는 pyrazine, pyrrole, pyridine, thiophene, thiazole, thiane, oxazole, lactone 등의 헤테로고리 화합물이 많이 관여되며, 제 1협동과제 책임자는 특히 이에 관한 연구경험이 많으므로 불고기의 향기활성 성분의 동정, 안정성 동위원소 합성, 안정성 동위원소 희석분석법 등 본 연구과제 전체에 관하여 유기적인 협조를 가능하게 할 것이다.

본 연구의 제2협동과제 책임자인 이화여자대학교 김영석 교수는 미국에서 가공풍미의 생성기작과 반응조건에 관하여 박사학위를 취득한 풍미학 전공자이다. 학위 취득 후 다년간 학계 및 산업체에서 고기향 등의 가공 풍미성분 (processed flavor)의 생산과 식품 중 미량으로 존재하여 향기활성성분과 이취 (off-flavor)의 분석법 개발에 관한 연구를 수행하였다. American Chemical Society의 초청강연 등에서 풍미형성에 미치는 지방분해 산물의 상호반응 기작에 관한 논문들을 발표한 바 있으며, 연구과정 중 풍미성분의 추출이나 분석을 위한 다양한 방법들을 경험하였다. 동시증류추출법, 용매 및 진공추출, 고체상미세추출, molecular distillation, static and dynamic headspace 등 다양한 풍미성분 추출법과 GC/MS, GC/O, HPLC, IR, NMR 등의 기기분석에 관하여 풍부한 연구경험이 있어 본 연구진행에 직접적인 기여가 가능할 것으로 여긴다.

이러한 제1세부과제팀, 제1협동과제팀과 제2협동과제팀의 유기적인 공동연구를 통하여 국내의 대표적인 전통식품인 불고기의 풍미성분 추출법 및 분석법을 최적화하고, 안정성 동위원소 처리 성분의 합성법을 확립하여 불고기의 풍미특성을 규명하고, 향기활성 성분을 동정 및 정량하고자 하였다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 불고기 조리법의 표준화 및 불고기 풍미성분의 추출법/농축법 개발

#### 1. 서론

불고기는 간장, 파, 마늘, 생강, 설탕, 참기름, 깨, 후추 등의 갖은 양념을 넣어 미리 간이 베게 한 후 뜨거워진 불판에 구어 먹는 음식으로, 고구려시대에는 맥적이라 불리웠으며, 조선 시대 궁중요리 너비아니에서 현재 불고기로 발전한 대표적인 전통식품이다. 불고기는 양질의 고기에 여러 가지 부재료로 만들어진 양념장을 첨가한 후 가열 조리하여 만들어지는 식품으로 특유의 독특한 맛과 향을 나타낸다. 특히, 불고기 특유의 풍미는 조리된 고기에서 그 질을 높이는데 가장 큰 역할을 하는 것 중에 하나이다. 고기의 풍미는 맛과 향에 의해 사람들의 감각을 자극시킨다. 고기를 굽는 동안에 발생하는 풍미성분들은 Strecker degradation, Maillard reaction, 그리고 다양한 단백질과 지방의 상호작용 등 다양한 반응에 의해서 발생하는 것이다. 구워진 고기의 향미는 혀에서 맛을 보는 감각에 기여하는 비휘발성 성분들에 의해서도 영향을 받지만, 굽는 동안에 발생하는 휘발성 향기 성분에 의해서 더 큰 영향을 받게 된다. 이와 같이 불고기의 풍미는 매우 복잡한 양상을 보이고 있는데, 이의 적합한 분석을 위해서는 시료 제조의 표준화 및 추출법과 기타 분석법의 최적화가 매우 중요하다. 본 실험에서 사용된 불고기 조리법 표준화는 "강" (Taste of Korea, Daehan Textbook Co., Seoul, Korea. pp 178-179)의 방법을 일부 수정 및 보완하여 사용하였다. 또한 불고기의 풍미성분의 추출을 최적화하기 위해, 용매 추출법 (SE), 동시증류추출법 (SDE), 초진공승화법 (HVS), 고체상미세추출법 (SPME), 고정상기체추출법 (SH) 등의 추출방법이 이용되었다. 또한 추출된 불고기 풍미성분을 농축하기 위해서 질소가스, Kuderna-Danish과 Vigreux 농축법이 시도되었다. 또한 불고기 주요 향기활성성분 중 황 함유 화합물들이 중요한 역할을 하는 것에 착안하여 황을 함유한 화합물들을 분석하기 위한 새로운 방법을 확립하고자 하였다.

## 2. 연구개발의 내용 및 방법

### 가. 불고기 조리법의 표준화

불고기는 Table 3-1-1에 기재된 재료와 분량으로 조리법을 표준화하였으며, 이는 "강"의 방법을 일부 수정, 보완한 것이었다. 양념장은 Table 3-1-1의 재료와 분량으로 양파, 파, 마늘, 생강을 칼로 다졌고, 배즙은 강판을 이용하여 갈아서 준비하는 등 기타 부재료를 모두 섞어 양념장을 만들었다. 소고기 등심 부위를 양념장으로 상온에서 1시간 동안 재운 후 가열 조리하였다. 표준화된 조리법의 확립을 위하여 일정하게 온도가 유지된 convection oven (Toastmaster 1 NC, 7091E)을 사용하여 220℃에서 30분간 예열한 후 불고기 양면을 각각 4분씩 구웠다.

Table 3-1-1. Materials used for preparation of bulgogi

재료	제조사	분량(g)
쇠고기(등심)	상등품	150.0
불고기 양념장		
간장	샘표, 서울	20.0
설탕	제일제당, 서울	10.0
참기름	제일제당, 서울	6.0
참깨	삼양청, 서울	3.0
후추	오뚜기, 서울	1.0
배즙	청환, 충청도	25.0
양파(다진 것)	무안, 전라도	12.0
파(다진 것)	하남, 경기도	5.0
마늘(다진 것)	고양, 전라도	8.0
생강(다진 것)	한국	3.0

### 나. 불고기 풍미 성분의 추출법 최적화

#### 1) 용매추출법 (solvent extraction, SE)

용매추출법은 불고기의 풍미성분 뿐만 아니라 함께 추출되는 지방의 함량이 많은 이유로 적합하지 못했다. 따라서 풍미성분 추출법을 최적화시키기 위하여 다른 추출 방법, 즉, 동시증류추출법과 vacuum sublimation 추출법 등과 연계하여 사용하였다.

2) 동시증류추출법 (simultaneous steam distillation and solvent extraction, SDE)

용매추출법과 연계된 동시증류추출법이 사용되었다. 불고기 100g을 용매 dichloromethane 200mL에 혼합하여 350rpm으로 30분간 stirring시킨 뒤, Whatman No. 41 filter paper를 사용하여 vacuum으로 여과시켰다. 한번 추출한 시료를 50mL의 dichloromethane을 넣어 재추출하였고, 그것도 위와 같은 과정으로 여과시킨 뒤 여과액을 먼저 추출하여 나온 여과액과 합하였다. 추출된 용매는 1L의 둥근 플라스크에 300mL의 증류수와 함께 넣은 후, Liken-Nickerson (L-N) apparatus를 2시간 동안 실시한 뒤, 불고기의 풍미성분은 aqueous fraction과 organic fraction의 두 분획으로 나뉘었다. Organic fraction은 무수 sodium sulfate로 수분을 제거시킨 후, 55-60°C에서 Kuderna-Danish distilling column을 사용하여 5mL까지 농축시키고, 마지막으로 질소가스를 사용하여 최종 부피 0.1mL까지 농축시켰다.

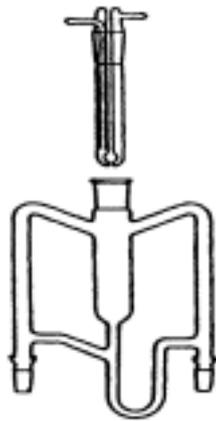


Figure 3-1-1. Simultaneous steam distillation and extraction (SDE) apparatus modified (Parliament, 2002).

### 3) 초진공승화법 (high vacuum sublimation, HVS)

초진공승화법은  $1 \times 10^{-5}$  torr이하의 초진공을 이용하여 휘발성 성분들을 3개의 액체 질소 cold traps에 포집시키는 방법으로, 비교적 낮은 온도(40°C 내외)에서 추출이 이루어져 열에 의한 휘발성 성분의 변화가 적은 방법이다. 그러나 이 방법은 추출과정이 다소 어려운 단점을 가진다. 본 연구에서는 용매추출법과 연계하여 사용되었다. 불고기 80g을 150mL의 diethyl ether에 혼합하여 350rpm으로 30분간 stirring시킨 뒤, Whatman No. 41 filter paper를 사용하여 vacuum으로 여과시켰다. 한번 추출한 시료를 30mL의 diethyl ether를 넣어 재추출하였고, 그것도 위와 같은 과정으로 여과시킨 뒤 여과액을 먼저 추출하여 나온 여과액과 합하였다. 추출된 용매는 Vigreux column (50cm×3cm)을 사용하여 40°C의 water bath에서 50mL까지 농축하였고, 그 용매를 high vacuum sublimation (Model VPC-250F, ULVAC KIKO, Inc., Yokohama, Japan)의 과정을 거침으로써, 불고기의 휘발성 성분이 비휘발성 성분과 분리되었다.

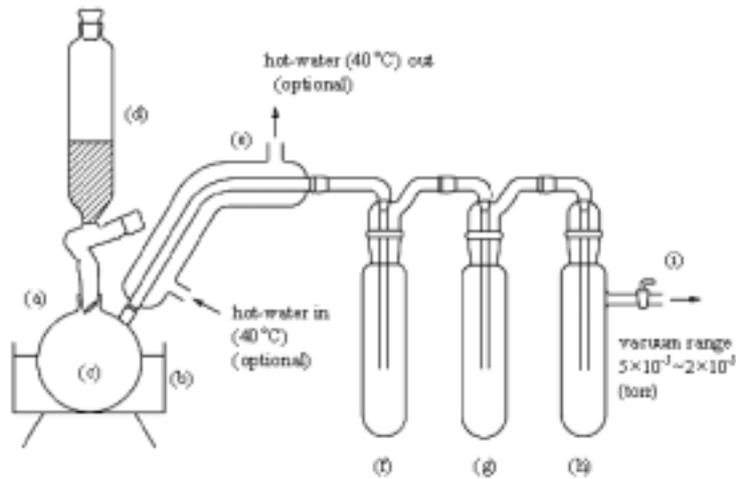


Figure 3-1-2. High vacuum sublimation apparatus (Sen et al., 1991). (a) two-necked distillation flask; (b) water bath; (c) magnetic stirrer; (d) addition funnel; (e) tube with water jacket which was held by a thermostat at the temperature of the water bath; (f-h) traps cooled with liquid nitrogen; (i) pump system which includes a rotary vacuum pump and an oil diffusion pump (ULVAC KIKO, Inc., Yokohama, Japan)

4) 고체상미세추출법 (solid phase microextraction, SPME)

본 연구에서는 carboxen/polymethylsiloxane (CAR/PDMS), polymethylsiloxane.divinylbenzene (PDMS/ DVB), polymethylsiloxane (PDMS) 의 세 fiber가 사용되었다. 40mL의 SPME 유리병에 10g의 갈아놓은 불고기를 넣은 뒤 silicon/Teflon septum으로 입구를 봉하고, 60℃에서 1시간동안 평형상태를 만들었다. 유리병에 SPME fiber needle을 넣고 30분간 휘발성 성분을 흡착시키고, 200℃의 GC injection port에서 5분간 탈착시켰다. 이 방법은 용매를 사용하지 않아 용매로 인해 추출되지 못하는 화합물의 동정이 가능하며, 비교적 간편한 추출 방법이다. 하지만 일반적으로 추출효율이 낮은 단점을 가지고 있다.

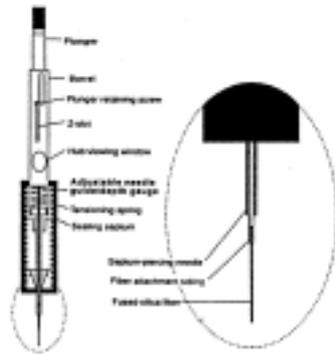


Figure 3-1-3. Commercial solid phase microextraction (SPME) device made by Supelco (Bellefonte, PA, USA) (Harmon, 2002).

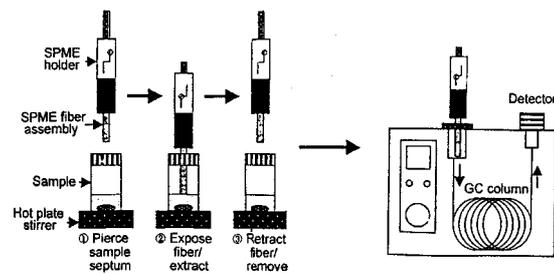


Figure 3-1-4. Extraction process by SPME and desorption system for GC analysis (Kataoka et al., 2000).

#### 5) 고정상기체추출법 (static headspace, SH)

추출효율이 다른 방법들에 비해 매우 낮아, 불고기의 휘발성 성분을 분리하는 방법으로는 적합하지 못했다.

#### 다. 불고기 풍미 성분의 농축법 최적화

동일 추출방법 (용매추출 및 동시증류추출법)을 이용하여 얻어진 불고기 풍미 추출물을 서로 다른 세 가지 방법을 사용하여 농축한 후 GC에 주입하였다. 이 때 얻어지는 크로마토그램으로 불고기 풍미 성분을 비교하였다. 질소 가스를 이용하여 농축 시 얻어지는 불고기 풍미성분이 정성 및 정량적으로 가장 낮은 효율을 보였고, 나머지 두 가지 농축방법에 따른 불고기 풍미성분에는 큰 차이가 없었다. Kuderna-Danish는 Vigreux에 비해 실험이 용이하나 시간이 오래 걸리고, 비교적 고온 (55~60°C)에서 농축시켜야 하는 단점이 있었다. 따라서 고온에서 추출하는 방법인 동시증류추출법에는 Kuderna-Danish를, 비교적 낮은 온도에서 추출하는 vacuum sublimation 추출법에는 Vigreux 농축법 (40~45°C 유지)을 사용하여 실험을 수행하였다.

#### 라. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)에 의한 분석

분리된 휘발성 성분은 GC/MS에 의하여 분석하였다. GC/MS는 HP 5980A series II GC/HP 5972 mass selective detector (Hewlett-Packard Co., USA)로 수행하였으며, column은 DB-5ms(30m length × 0.25mm i.d. × 0.25 μm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였다. 이동상 기체는 helium으로 유속은 0.8mL/min을 유지하였다. Dichloromethane을 사용하여 얻은 추출물 1μL는 splitless mode에서 주입하였다. SPME에서는 fiber에 흡착된 휘발성 성분을 initial purge off time을 5분으로 하여 splitless mode로 GC/MS에서 시행하였다. 오븐 온도는 40°C에서 5분간 유지한 후, 200°C까지 4°C/min의 속도로 상승시킨 후 20분간 유지하였다. 주입구와 검출기 온도는 각각 200과 250°C였다. 휘발성 향기성분은 각 성분의 standard를 구하여 그것의 mass spectra, RI를 비교함으로써 동정하였다. 이때 RI는 GC 크로마토그램에서 확인된 C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub>의 *n*-paraffins

표준물질의 retention time을 통해 각 화합물의 retention index를 구하였다. 나머지 mass selective detector의 조건은 다음과 같다 : ionization energy, 70eV; scanning range 33-550 amu.

#### 마. 불고기 풍미성분의 추출법 개선

불고기 향미 성분의 추출 방법은, 1차 년도에 이어서 초진공승화법으로 추출하였다. 그러나, 그 전처리 과정에 있어서는 변화를 주었다. 기존에는 불고기 시료 80g에 150mL의 용매를 350rpm에서 30분간, stirring 하였다. 하지만, 미량의 성분들을 동정에 있어서, 80g의 시료만으로는 동정이 힘들다고 사료되어 시료의 양을 늘리기로 결정하였다. 시료의 양이 늘어남에 따라, 그에 따른 처리 방법에도 변화를 가져왔다. 시료의 양은 3배로 늘어나 총 240g이 사용되었다. 이 시료를 3번에 나누어 추출하였다. 즉 기존의 방법을 그대로 사용하되, 3번 반복 실험하여, 결과물을 합치는 것을 선택하였다. 그리고 용매의 추출 방법에 있어서도, 400rpm으로 stirring 속도를 높였다. 또한 추출 시간도 두 배로 늘여 1시간을, 두 번에 나누어 추출하였다. 이렇게 추출한 시료를 vigreux를 사용하여, 총 150mL이 되게 농축하여 초진공승화법으로 추출하였다.

#### 바. 황 함유 화합물들의 효율적인 분석 조건

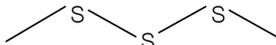
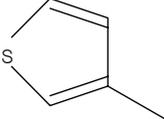
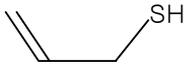
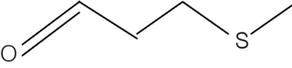
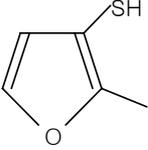
##### 1) 시약

실험에 사용된 황 함유 화합물은 dimethyl disulfide (purity 98+%), dimethyl trisulfide (purity 98+%), 3-methyl thiophen (purity 98%), allyl mercaptan [2-Propen-1-thiol] (purity =80%), 2-methyl-3-furanthiol, methional [3-(methylthio)propionaldehyde] 이다. 이 중 allyl mercaptan 은 Fluka (Madrid, Spain)로부터 구입했고, 나머지 시약들은 Aldrich (Beerse, Belgium)에서 구입하였다. 모든 시약들은 별도의 purification 과정 없이 사용되었다. 이 각각의 황 함유 화합물들의 특징과 분자구조는 Table 3-1-2를 보면 알 수 있다

##### 2) 표준 시료와 시료의 준비

각각의 황 함유 화합물들은 10,000 ppm(무게/무게) 농도의 표준 화합물들로 만들어졌다. 각 표준 화합물은 HPLC 용의 순도를 가지는 용매 dichloromethane, hexane, ethanol (Fisher Scientific, Korea Ltd., Seoul, Korea)로 희석하였다. 각 황 화합물의 희석은 실온에서 이루어졌으며, 표준물질들은 빛이 없는 영하 18℃의 온도에서 보관되었다.

Table 3-1-2. Formulas, structures, molecular weights, and boiling points of sulfur compounds.

Compound	Formula	Structure	M/W	BP(°C)
Dimethyl disulfide	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>2</sub>		94.2	109
Dimethyl trisulfide	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>3</sub>		126.27	58
3-methyl thiophene	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> S		98.17	114
Allyl mercaptan	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> S		74.15	66-68
Methional	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> OS		104.17	165-166
2-methyl-3-furanthiol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> OS		114.17	57-60

각 시료들은 크게 두 가지 형태로 준비하였다. 가스 크로마토그래프에 액체 상

태로 주입했던 시료들은 준비된 표준 시료와 같은 유기용매를 사용하여, 필요한 농도를 얻을 때까지 희석하였다. 기체 상태의 시료를 만드는 과정에서는 각각의 황 함유 화합물들을 에탄올에 녹인 뒤 다시 증류수로 희석하였다. 먼저, 기체질량 분석기에 직접 주입할 시료들은 두 가지 용매인 dichloromethane과 hexane를 사용하여, 그 최종 농도가 1ppm 이 될 때까지 희석하였다. 그 후 각기 다른 황 함유 화합물의 검량선을 그리기 위해 사용한 시료는 앞의 용매 비교실험에서 좀 더 바람직한 결과를 보이는 가져오는 유기용매를 사용하여 희석한 뒤 실험하였다. 반면에, 기체추출 분석법에 사용될 시료는 물에 녹는 유기 용매인 에탄올에 각각 10,000ppm 까지 희석된 표준 시료를 다시 증류수로 10ppm 까지 녹인 후 사용하였다. 시료에 사용된, 에탄올의 최종 농도는 0.1%였다.

### 3) 실험기구와 방법

#### 가) 미세고체상 추출법과 고정상기체추출법의 분석조건

황 함유 화합물의 분석은 SPME와 SH의 두 가지 추출 방법을 사용하였다. 분석에 사용된 시료는 이전 실험에서 사용한 여섯 개의 황 함유 화합물의 혼합물이다. Dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophen, allyl mercaptan, 2-methyl-3-furanthiol, methional의 화합물을 각각 에탄올을 사용하여 10,000ppm (무게/무게)의 농도까지 희석한다. 10,000 ppm (sulfurs in ethanol) stock solution 을 증류수로 희석하여 최종 농도는 0.1% 에탄올 수용액에서 10ppm이었다. SPME 에 사용된 장치는 Supelco (Bellefonte, PA, USA)에서 구입하였고, 코팅물질이 다른 세 개의 fiber 가 사용되었다. 실험에 사용된 fiber들은 각각 75  $\mu\text{m}$  carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), 65  $\mu\text{m}$  polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), 100  $\mu\text{m}$  polydimethylsiloxane (PDMS)로 코팅된 것이다. SPME 시 시료 5g을 22-mL headspace glass vial (Supelco. Co., Bellefonte, PA, USA)에 넣어 silicon/teflon재질의 뚜껑으로 밀폐하여 보관하였고 40°C에서 30분간 평형상태를 유지하였다. 3가지 종류의 SPME fiber는 기체상의 향기화합물을 추출하는데 사용되었다. 향기화합물은 40°C에서 10분간 fiber에 흡착되었고, splitless mode로 200°C에서 3분간의 초기 purge-off 동안 탈착 되었다. 사용된 fiber는 200°C의 주입기에서 5분씩, 기존의 남아있는 향기

화합물이 제거될 때까지 수 회 방치하였다. Static headspace autosampler의 작동 조건은 plate temperature 40°C, platen equilibrium time 0.5min, sample equilibrium time 30min, loop size 1ml, vial size 22ml, loop equilibrium time 0.2min, injection time 3min, sample loop temperature 200°C, line temperature 200°C, 그리고 transfer line pressure 9psi이었다.

미세 고체상 추출법과 고정상 기체 추출법에 의한 향기화합물 분석 시, GC 오븐 온도는 GC/PFPD에서와 동일하게 하였다. 미세 고체상 추출법과 고정상 기체 추출 시, 칼럼 주입부의 25cm부분을 액체질소를 이용하여 냉각시킴으로써 향기화합물을 탈착되는 시간 동안 칼럼 앞부분에 머물도록 하였다.

#### 나) GC와 GC/MS의 분석 조건

Sulfur mode의 flame photometric detector (PFPD)와 Varian 1079 split/splitless 주입기가 구비되어 있는 Varian 3800CT GC (Walnut Creek, CA, USA)가 사용되었다. GC에는 headspace autosampler 7000 (Tekmar Dohrmann, Ohio, USA)이 장착되었다 주입기와 검출기의 온도는 200°C였고, 검출기의 수소기체 유속은 13ml/min, air 1의 유속은 17mL/min, air 2의 유속은 10mL/min 이었으며, 이 기체유속은 황 함유 화합물의 검출에 최적인 것으로 예비실험을 통해 판명되었다. 100% Dimethylpolysiloxane으로 코팅된 DB-1 capillary column (30 m length 0.25 mm i.d. 0.25 µm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)을 이용하여 각 화합물을 분리하였다. 이동상인 헬륨 가스의 유속은 1 mL/min이었다. 희석된 시료는 25:1의 split비율로 GC-PFPD에 1µl를 주입하였다. GC 오븐의 온도는 초기에 30°C에서 1분 동안 유지하였으며, 5°C/min의 속도로 200°C까지 승온 하였고, 200°C에서 1분간 머물렀다. 각 황 함유 화합물들의 동정은 HP 5890A series II gas chromatograph/5972 mass selective detector (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 주입기의 온도는 200°C로, 검출기의 온도는 280°C로 유지하였고, 칼럼의 oven 온도 조건은 GC/PFPD와 동일하게 조절하였다. 황 화합물 분석을 위해 DB-1 칼럼 (30 m length 0.25 mm i.d. 0.32 µm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) 을 사용하였다. 이동상인 헬륨 가스의 유속은 0.8 mL/min이었다. Mass spectra는 70eV에서 electron ionization(EI)에 의해서 얻어졌고, mass scan range

는 50에서 550이고, scanning rate는 1.4scan/sec였다.

향기화합물은 각 화합물의 스펙트럼을 on-computer library (Wiley 275, 1995) (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)상의 스펙트럼과 비교하여 정성 분석하였다. 각 authentic 향 화합물은 고체상 미량추출법과 독립적으로 실험이 수행되었다.

### 3. 연구 결과 및 고찰

가. 각 추출방법에 따른 휘발성 성분 비교

사용한 추출방법에는 용매추출법, 동시증류추출법, 초진공승화법, 고체상미세추출법, 고정상기체추출법으로 총 5가지였다. 그 중에서 용매추출법은 풍미 성분과 함께 추출되는 지방의 함량이 많은 이유로 불고기 풍미 분석에는 적합하지 않았으며, 반면 고정상기체추출법은 추출효율이 다른 방법들에 비해 매우 낮아 불고기의 휘발성 성분을 분리하는 방법으로는 적합하지 못했다. 따라서 추출방법에 따른 휘발성 성분 비교에는 용매추출법과 연계된 동시증류추출법과 초진공승화법, 그리고 고정상미세추출법이 사용되었다.

불고기에서 동정된 휘발성 성분은 Table 3-1-3과 같다. SDE, headspace SPME, 그리고 HVS에 의해 동정된 것은 각각 78, 48, 55개로 나타났다. 불고기에 소량 존재하는 2-acetyl-3-methylpyrazine ( $0.07 \pm 0.03\%$ )과 2-(2-furyl)-pyrazine ( $0.06 \pm 0.00\%$ )은 SE에서만 동정되었고, 2-Undecanone, 2-pentadecanone 그리고 hexadecanal은 SDE를 사용한 추출물에서만 감지되었다. 이 휘발성 성분은 SDE apparatus를 사용하는 동안 열처리에 의해서 형성이 증가되었다. HVS와 SPME를 통해서 추출되지 않은 다른 성분들은 상대적으로 끓는점이 높았고, 9-octadecenoic acid와 germacrenes B와 D가 여기에 포함된다. 반면에 상대적으로 높은 휘발성 성분인 hexanal ( $3.85 \pm 0.46\%$ )은 CAR-PDMS fiber인 SPME headspace에서 주요 성분 중에 하나다 (Fig 3-1-5). Allyl methyl disulfide는 CAR-PDMS fiber를 사용한 SPME와 HVS를 통해서 감지되었다. 그러나 이 요소는 SDE에서는 검출되지 않았다. SDE와 HVS에서 감지된 3-Hydroxy-2-butanone과 furfural은 SPME의 세 가지 fiber에서 휘발성 성분이 감지되지 않았다. 반면에 좀더 지용성이면서 황을 함유하고 있는 성분은 SDE와 SPME보다 HVS에서 추출

된 것에서 발견되었다. 특히 dipropyl trisulfide는 HVS 과정에서만 감지되었다. 마늘을 굽는 과정에서 나왔을 것이라 예상되는 diallyl disulfide ( $33.98 \pm 7.75\%$ )의 양은 HVS로 추출하기에 그 양이 매우 미량이었다. 그러나 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine과 2-acetyl-3-methylpyrazines은 고기에서 중요한 역할을 한다고 기록되었으나 HVS에서 감지되지 않았다. Figure 3-1-6는 SPME fiber로 동정된 불고기 휘발성 성분인 total ion chromatograms인데, CAR, DVB, PDMS로 한 것이다.

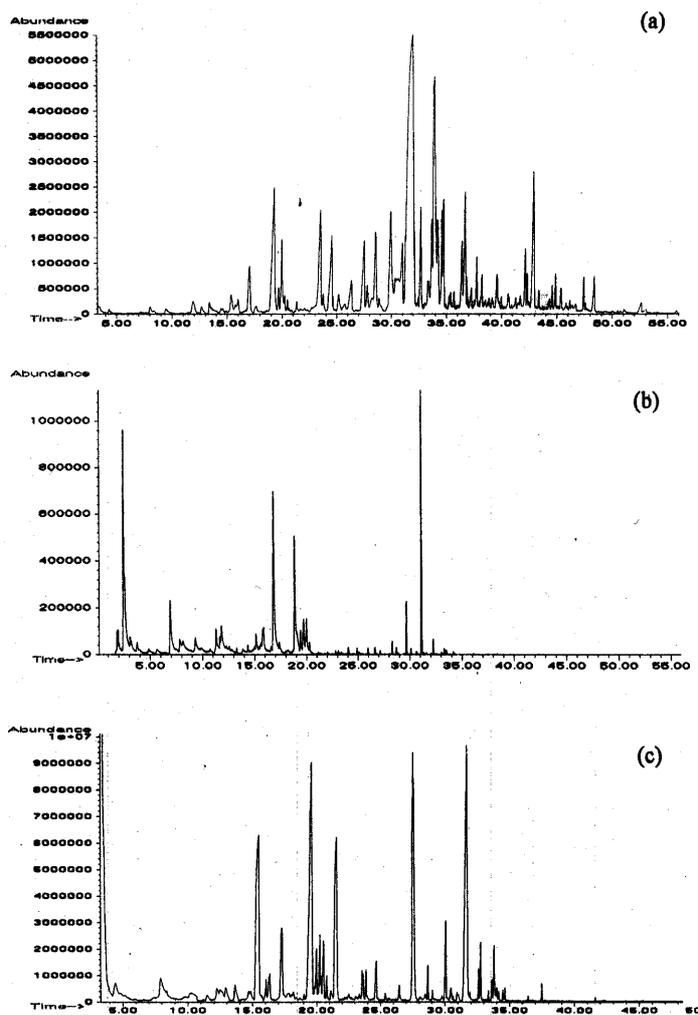


Figure 3-1-5. MS total ion chromatograms of bulgogi volatiles isolated by the three different extractions. (a) SDE; (b) SPME/CAR; (c) HVS.

Table 3-1-3. Volatile compounds in bulgogi isolated by three different extraction methods

No.	Possible compounds	SE <sup>a</sup>		SPME <sup>b</sup>			HVS <sup>c</sup>		ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>	
		RI <sup>d</sup>	P.A (%) <sup>e</sup>	CAR	DVB	PDMS	RI	P.A (%)			
				RI	P.A (%)	P.A (%)					P.A (%)
<b>Pyrazines</b>											
1	2-methyl pyrazine	823	0.31±0.32	821	0.56±0.17	0.06±0.03	- <sup>h</sup>	827	0.10±0.03	MS/RI	C
2	2,5-dimethyl pyrazine	912	0.14±0.04	909	0.08±0.01	0.24±0.30	-	919	0.24±0.20	MS/RI	B
3	2,6-dimethyl pyrazine	913	0.27±0.07	910	0.18±0.04	0.19±0.07	-	925	0.40±0.24	MS/RI	A,B
4	2-ethyl-6-methyl pyrazine	996	0.08±0.07	994	0.08±0.01	0.27±0.01	-	1002	0.23±0.01	MS	
5	trimethyl pyrazine	1000	0.20±0.16	997	-	0.30±0.17	0.11±0.03	-	-	MS/RI	C
6	2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine	-	-	1073	0.10±0.01	0.39±0.02	-	-	-	MS/RI	F
7	2-acetyl-3-methyl pyrazine	1119	0.07±0.03	-	-	-	-	-	-	MS/RI	B
8	2-(2'-furyl) pyrazine	1257	0.06±0	-	-	-	-	-	-	MS	
<b>Sulfur-containing compounds</b>											
9	allyl methyl disulfide	-	-	912	1.38±0.19	-	-	915	1.35±1.04	MS/RI	A,E
10	diallyl disulfide	1085	3.57±2.66	1077	5.43±0.80	7.79±1.05	2.59±0.49	1089	33.98±7.75	MS/RI	D
11	allyl propyl disulfide	1094	1.25±1.40	1090	0.87±0.13	1.31±0	-	1097	2.22±0.51	MS	

(continued)

No.	Possible compounds	SE <sup>a</sup>		SPME <sup>b</sup>			HVS <sup>c</sup>		ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>	
		RI <sup>d</sup>	P.A (%) <sup>e</sup>	CAR		DVB	PDMS	RI			P.A (%)
				RI	P.A (%)	P.A (%)	P.A (%)				
12	dipropyl disulfide	1108	0.17±0.06	1105	0.12±0.14	1.38±0.30	0.52±0.15	1111	2.72±0.27	MS/RI	A
13	( <i>E</i> )-1-propenyl propyl disulfide	1114	0.15±0.03	1112	0.31±0.06	0.65±0.14	-	1118	0.72±0.06	MS	
14	methyl allyl trisulfide	1136	0.14±0.05	1135	0.07±0.02	0.18±0	-	1135	0.14±0	MS	
15	3-vinyl-4 <i>H</i> -1,2-dithiin	1187	0.53±0.31	1186	0.21±0.12	-	-	1192	1.06±0.35	MS	
16	2-vinyl-4 <i>H</i> -1,3-dithiin	1219	0.47±0.57	1212	0.34±0.15	1.04±0.15	0.41±0.01	1220	2.18±0.63	MS	
17	diallyl trisulfide	1304	1.38±0.42	1298	0.22±0.09	1.57±0.16	-	1305	1.46±0.33	MS/RI	A,D
18	dipropyl trisulfide	-	-	-	-	-	-	1330	0.32±0.11	MS	
<b>Carbonyls</b>											
19	3-hydroxy-2-butanone	714	0.26±0.15	-	-	-	-	712	2.24±0.97	MS/RI	A,C
20	hexanal	803	0.07±0.06	800	3.85±0.46	-	-	-	-	MS/RI	A,C
21	furfural	831	0.11±0.07	-	-	-	-	-	-	MS/RI	A,B
22	benzaldehyde	961	0.08±0.06	959	0.16±0.09	0.31±0.02	-	-	-	MS/RI	B
23	benzeneacetaldehyde	1044	0.21±0.12	1041	0.23±0.04	0.78±0.06	-	1052	0.30±0.18	MS/RI	B
24	neral	1238	0.50±0.15	1235	0.29±0.07	1.20±0.14	0.99±0.55	1241	0.27±0.06	MS/RI	B
25	geranial	1271	0.90±0.42	1265	0.31±0.08	1.56±0.15	1.35±0.75	1272	0.58±0.25	MS/RI	A,B

(continued)

No.	Possible compounds	SE <sup>a</sup>		SPME <sup>b</sup>			HVS <sup>c</sup>		ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>	
		RI <sup>d</sup>	P.A (%) <sup>e</sup>	CAR		DVB	PDMS	RI			P.A (%)
				RI	P.A (%)	P.A (%)	P.A (%)				
26	2-undecanone	1292	5.66±7.92	-	-	-	-	-	MS/RI	B,C	
27	( <i>E,E</i> )-2,4-decadienal	1317	0.08±0	1316	-	0.18±0	-	-	MS/RI	B,C	
28	2-pentadecanone	1698	0.33±0.23	-	-	-	-	-	MS/RI	A	
29	hexadecanal	1826	3.97±9.78	-	-	-	-	-	MS/RI	A	
					<b>Alcohols</b>						
30	furfuryl alcohol	855	0.10±0.11	852	0.04±0	-	-	868	0.99±0.37	MS/RI	A,B
31	2-methoxy phenol (guaiacol)	1086	0.24±0.13	1082	-	0.75±0.08	-	1094	0.23±0.08	MS/RI	B,C
32	linalool	1102	0.50±0.52	1098	0.56±0.21	1.30±0.24	-	1105	0.46±0.13	MS/RI	B,C
33	borneol	1172	0.25±0.20	1170	-	0.28±0.03	-	1176	0.14±0.04	MS/RI	B
34	4-terpinenol	1180	0.22±0.12	1179	0.17±0	0.37±0	-	1183	0.24±0.10	MS/RI	A,B
35	geraniol	1253	0.27±0.15	1248	-	0.26±0.01	-	-	-	MS/RI	A,B
36	4-vinyl-2-methoxy phenol	1312	0.33±0.14	-	-	-	-	-	-	MS	
37	elemol	1550	0.14±0.06	-	-	-	-	-	-	MS/RI	B
38	spathulenol	1633	0.49±0.16	-	-	-	-	1632	0.04±0	MS/RI	A

(continued)

No.	Possible compounds	SE <sup>a</sup>		SPME <sup>b</sup>				HVS <sup>c</sup>		ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>
		RI <sup>d</sup>	P.A (%) <sup>e</sup>	CAR		DVB	PDMS	RI	P.A (%)		
				RI	P.A (%)	P.A (%)	P.A (%)				
<b>Esters and Acids</b>											
39	bornyl acetate	1282	0.05±0.01	-	-	-	-	-	-	MS/RI	B
40	9-octadecenoic acid (oleic acid)	2134	0.08±0.05	-	-	-	-	-	-	MS/RI	A
<b>Terpene-Hydrocarbons</b>											
41	α-pinene	931	0.45±0.31	929	-	0.51±0.09	-	931	1.37±0.34	MS/RI	B,C
42	camphene	947	0.76±0.60	946	0.13±0.01	0.88±0.12	1.07±0	947	1.43±0.29	MS/RI	A,B
43	sabinene	971	0.85±1.33	970	0.24±0.04	0.37±0.01	0.23±0	971	0.57±0.11	MS/RI	A,B
44	β-pinene	974	0.12±0.09	-	-	-	-	975	0.65±0.06	MS/RI	A,B
45	myrcene	989	0.07±0.04	987	0.70±0.12	0.47±0.03	-	993	0.31±0.03	MS/RI	A,B
46	α-phellandrene	1004	0.27±0.38	1003	0.83±0.09	0.24±0.06	0.46±0	-	-	MS/RI	B,C
47	δ-3-carene	1007	0.17±0.12	1004	0.82±0.15	0.66±0.02	-	1009	1.57±0.50	MS/RI	A
48	limonene	1027	0.23±0.20	1026	1.07±0.24	1.07±0.19	0.56±0	-	-	MS/RI	B,C
49	β-phellandrene	1031	1.17±1.03	1027	7.25±1.26	4.14±0.08	1.85±1.09	1031	5.75±0.68	MS/RI	A,B
50	δ-elemene	1337	1.25±0.56	1333	0.40±0.05	0.98±0.04	-	1336	1.03±0.26	MS/RI	A,B
51	α-cubebene	1347	0.28±0.10	1345	0.22±0.04	0.49±0.01	-	1347	0.27±0.05	MS/RI	A,B

(continued)

No.	Possible compounds	SE <sup>a</sup>		SPME <sup>b</sup>			HVS <sup>c</sup>		ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>	
		RI <sup>d</sup>	P.A (%) <sup>e</sup>	CAR			RI	P.A (%)			
				RI	P.A (%)	P.A (%)					
52	$\alpha$ -copaene	1379	2.66±0.44	1373	1.65±0.28	3.30±0.14	4.61±0.03	1378	3.24±0.67	MS/RI	B
53	$\beta$ -elemene	1390	0.79±0.44	1387	0.22±0.04	0.52±0.01	-	1390	0.73±0.25	MS/RI	B
54	$\beta$ -caryophyllene	1437	12.02±9.78	1419	7.63±0.70	22.25±0.88	40.29±1.28	1429	24.36±5.75	MS/RI	A
55	( <i>E</i> )-caryophyllene	-	-	-	-	-	-	1432	0.15±0.07	MS/RI	B
56	$\alpha$ -guaiene	1441	0.21±0.09	-	-	-	-	1436	0.21±0.05	MS/RI	B
57	( <i>E</i> )- $\beta$ -farnesene	1454	0.09±0.04	-	-	-	-	1451	0.07±0	MS/RI	A,B
58	$\alpha$ -humulene	1462	1.21±0.26	1454	0.44±0.06	0.52±0.02	1.99±0.06	1458	0.95±0.26	MS/RI	B
59	ar-curcumene	-	-	-	-	-	-	1482	0.29±0.10	MS/RI	B
60	$\beta$ -selinene	1494	0.93±0.22	1488	0.22±0.03	0.91±0.03	-	1491	0.66±0.19	MS/RI	B
61	zingiberene	1502	3.61±0.93	1492	0.10±0.01	3.16±1.60	4.86±0.62	1496	1.57±0.56	MS	
62	germacrene D	1505	0.23±0.09	-	-	-	-	-	-	MS/RI	A
63	( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -farnesene	1510	0.32±0.34	1501	-	0.49±0.47	-	1503	0.27±0.12	MS/RI	B
64	$\beta$ -bisabolene	1513	0.34±0.14	1506	-	0.50±0.22	0.75±0.09	1508	0.24±0.08	MS/RI	B
65	$\delta$ -cadiene	1524	0.88±0.34	1516	0.09±0	0.60±0.02	1.23±0.01	1519	0.34±0.11	MS/RI	B
66	$\beta$ -sesquiphellandrene	1530	1.40±0.41	1522	0.02±0	0.73±0.10	0.91±0.09	1524	0.37±0.12	MS/RI	B

(continued)

No.	Possible compounds	SE <sup>a</sup>		SPME <sup>b</sup>				HVS <sup>c</sup>		ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>
		RI <sup>d</sup>	P.A (%) <sup>e</sup>	CAR		DVB	PDMS	RI	P.A (%)		
				RI	P.A (%)	P.A (%)	P.A (%)				
67	germacrene B	1559	0.10±0.05	-	-	-	-	-	-	MS/RI	B
<b>Aliphatic Hydrocarbons</b>											
68	1-decene	991	0.79±0.51	-	-	-	-	-	-	MS/RI	B
69	decane	-	-	-	-	-	-	1000	0.40±0.34	MS/RI	C
70	1-dodecene	1193	2.71±1.03	-	-	-	-	1190	0.87±0	MS/RI	B
71	dodecane	1200	0.23±0.10	-	-	-	-	1197	0.14±0.02	MS/RI	B,C
72	1-tetradecene	1393	1.52±1.01	-	-	-	-	1395	0.15±0	MS/RI	B
73	tetradecane	1400	0.31±0.26	-	-	-	-	1402	0.13±0.09	MS/RI	B,C
74	1-hexadecene	1597	2.02±0.76	-	-	-	-	-	-	MS/RI	B
75	hexadecane	1600	0.23±0.06	-	-	-	-	1597	0.04±0	MS/RI	B,C
76	heptadecane	1700	0.12±0.03	-	-	-	-	1697	0.03±0	MS/RI	B
77	1-octadecene	1795	0.67±0.32	-	-	-	-	-	-	MS/RI	B
78	octadecane	1800	0.26±0.05	-	-	-	-	-	-	MS/RI	B,C
<b>Miscellaneous</b>											
79	caryophyllene oxide	1586	0.88±0.31	1581	0.02±0	0.06±0	0.86±0.01	1585	0.18±0.08	MS/RI	B

<sup>a</sup> Solvent extraction (SE).

<sup>b</sup> Solid phase microextraction (SPME): CAR, CAR/PDMS fiber; DVB, PDMS/DVB; PDSM, PDMS fibers.

<sup>c</sup> High vacuum sublimation (HVS).

<sup>d</sup> Retention indices were determined using *n*-paraffins C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub> as external references.

<sup>e</sup> Average of relative percentage of peak area in MS total ion chromatogram (*n*=3) ± standard deviation.

<sup>f</sup> Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures [A, Kondjoyan and Berdague (1996); B, Adams (2002); C, Acree and Arn (1997); D, Kubec et al. (1997); E, Ansorena et al. (2001); F, Kerler and Grosch (1996) ]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

<sup>g</sup> References.

<sup>h</sup> not detected.

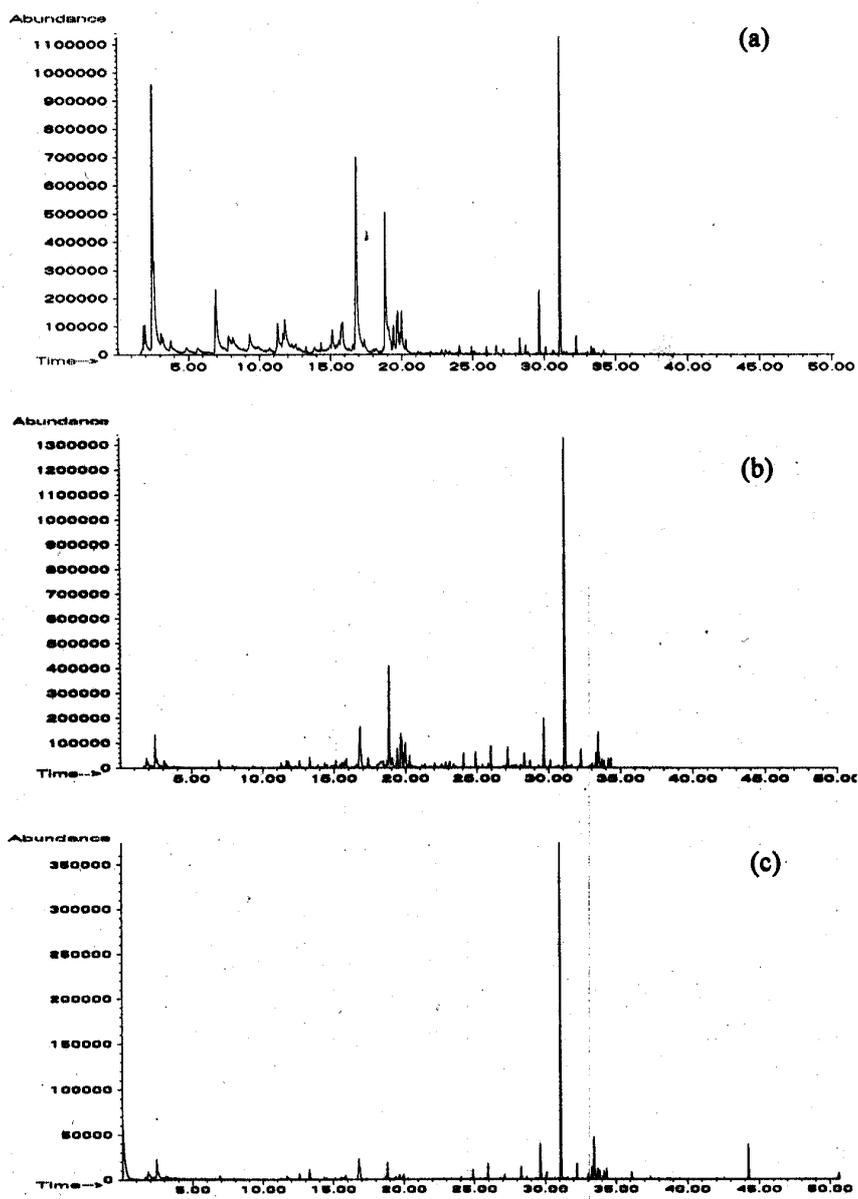


Figure 3-1-6. MS total ion chromatograms of bulgogi volatiles isolated by the three different SPME fibers. (a) CAR; (b) DVB; (c) PDMS

나. 불고기 향미 성분의 동정

불고기의 향미성분은 on-computer의 Wiley library 275.I을 이용하여 동정하였으며, 정량은 전체 peak area에 대한 동정 화합물의 peak area의 percentage로 계산하였다.

이전 1차 보고서에서 SDE나, SPME 방법으로는 동정되었으나, high vacuum sublimation 방법으로 동정되지 않았던 향미성분들이 다수 동정되었다. 특히, 이전에 동정된 불고기 향미 compounds와 비교하였을 때, dially tetrasulphide, tert-dodecanethiol, 2-acetyl-4-methylthiazole, benzothiazole, 1,4-naphthalenediol, 2-butyl-benzothiazole, 5-methyl furfural, 2-acetyl pyrazine, 3,5-dimethyl-2-methyl pyrazine 등의 새로운 향미성분들이 발견되었다.

Table 3-1-4. Fraction I (Pentane 100%)

No.	Retention Time(min)	Possible compounds	P.A(%)
1	5.93	<b>2-methyl-tridecane*</b>	
2	10.24	methyl allyl disulfide	
3	10.52	<b>(1-methylethyl)-benzene</b>	0.28
4	10.86	$\alpha$ -pipene	0.43
5	11.44	camphene	0.79
6	12.22	sabinene	0.19
7	12.85	<b><math>\beta</math>-myrcene</b>	
8	13.16	<b>n-decane</b>	
9	13.42	<b><math>\gamma</math>-terpinene</b>	0.49
10	14.26	$\beta$ -phelladrene	2.74
11	16.01	allyl disulfide	6.77
12	16.05	<b>terpinolene</b>	
13	16.76	dipropyl-disulfide	0.62
14	16.94	trans -propenyl propyl disulfide	0.22
15	19.48	dodecane	0.53
16	21.57	<b>2-methyl-dodecane</b>	
17	22.50	allyl trisulfide	1.05
18	23.39	$\delta$ -elemene	1.29

(continued)

No.	Retention Time(min)	Possible compounds	P.A(%)
19	24.30	<b>cycloisosativene</b>	
20	24.57	$\alpha$ -copaene	2.99
21	24.83	$\beta$ -selinene	0.84
22	25.30	tetradecane	0.53
23	26.04	$\beta$ -caryophyllene	25.04
24	26.10	$\alpha$ -guaiene	0.35
25	26.67	$\alpha$ -humulene	1.21
26	26.75	<b>aromadendrene</b>	0.26
27	27.03	<b><math>\alpha</math>-amorphene</b>	0.18
28	27.21	<b>1-(1,5-dimethyl-4-hexyl)benzene</b>	0.54
29	27.49	(E)-farnesene	1.43
30	27.65	zingiberene	3.25
31	27.90	$\beta$ -bisabolene	0.42
32	28.05	germacrene	
33	28.16	$\delta$ -cadinene	0.28
34	28.29	$\beta$ -sesquiphellandrene	0.82
35	29.12	<b>2-methyl-pentadecane</b>	0.18
36	29.28	<b>3-methyl-pentadecane</b>	
37	30.06	hexadecane	1.04
38	32.48	heptadecane	3.94
39	33.32	<b>2-methyl-octadecane</b>	0.62
40	34.76	octadecane	5.84

\*bold체로 쓰여진 compound는 이번 실험을 통해 새롭게 동정된 것이다.

Table 3-1-5. Fraction II (Pentane 80% - Ether 20%)

No.	Retention Time(min)	Possible compounds	P.A(%)
1	3.09	<b>2,2-dimethoxy-propane</b>	
2	10.26	$\delta$ -3-carene	0.82
3	11.43	camphene	0.21
4	13.41	<b><math>\nu</math>-terpinene</b>	0.18
5	14.21	$\beta$ -phellandrene	1.55
6	16.20	allyl disulfide	34.08
7	16.81	dipropyl disulfide	0.84
8	16.99	trans -propenyl propyl disulfide	0.32
9	20.22	2-vinyl-[4H]-1,3-dithin	5.67
10	22.60	allyl trisulfide	4.52
11	22.97	3-vinyl-[4H]-1,2-dithin	0.09
12	23.63	$\alpha$ -cubebene	0.09
13	24.46	$\alpha$ -capaene	0.71
14	24.81	$\beta$ -elemene	0.42
15	25.08	tetradecane	
16	25.24	trans-caryphyllene	0.15
17	25.81	$\beta$ -caryophyllene	10.38
18	25.98	$\alpha$ -guaiene	0.08
19	26.57	$\alpha$ -humulene	0.51
20	27.13	<b>1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-benzene</b>	0.21
21	27.18	germacrene	
22	27.41	trans-farnesene	0.44
23	27.51	zigiberene	1.23
24	27.58	<b>aromadendrene</b>	0.28
25	27.66	<b>farnesene</b>	0.41
26	27.78	$\beta$ -bisabolene	0.18
27	28.05	$\delta$ -cadinene	0.10
28	28.19	$\beta$ -sesquiphellandrene	0.42
29	28.70	<b>diallyl tetrasulphide</b>	0.09

Table 3-1-6. Fraction III (Pentane 60% - Ether 40%)

No.	Retention Time(min)	Possible compounds	P.A(%)
1	8.48	<b>O-(3-methylbutyl)-hydroxylamine</b>	4.84
2	14.21	<b>tert-dodecanethiol</b>	4.67
3	15.29	<b>1-phenyl ethanone</b>	0.22
4	15.90	2-methoxyl phenol	0.68
5	16.08	<b>2-nonanone</b>	
6	16.43	linalool	1.33
7	16.66	<b>2-acetyl-4-methylthiazole</b>	
8	17.99	<b>citronellal</b>	
9	18.92	terpinene-4-ol	0.58
10	19.60	<b>1-undecene</b>	
11	19.81	<b>chrysanthenone</b>	
12	19.94	2-vinyl-4H-1,3-dithin	0.26
13	20.26	<b>benzothiazole</b>	0.76
14	20.64	<b>cis-citral</b>	6.76
15	21.51	geranial	4.21
16	21.62	<b>4-ethyl-2-methoxy-phenol</b>	
17	21.91	bornyl acetate	
18	22.07	2-undecanone	0.26
19	22.58	<b>P-hydroxyamphetamine</b>	
20	22.81	2,4-decadienal	
21	23.34	<b>1,3-benzodioxole-5-carboxaldehyde</b>	0.23
22	24.34	geranyl acetate	
23	26.48	<b>2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadiene</b>	0.16
24	27.14	<b>1,4-naphthalenediol</b>	
25	28.16	<b>2-butyl-benzothiazole</b>	
26	30.27	<b>trans-3,4-dimethyl-1-cyclohexene carbaldehyde</b>	
27	30.65	neral	0.42
28	32.60	<b>4-nonyl phenol</b>	0.17

Table 3-1-7. Fraction IV (Pentane 40% - Ether 60%)

No.	Retention Time(min)	Possible compounds	P.A(%)
1	7.86	<b>4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone</b>	2.05
2	8.43	furfuryl alcohol	1.95
3	9.88	<b>2-heptanol</b>	0.21
4	11.56	<b>3-heptyne-2-one</b>	0.29
5	11.79	<b>5-methyl furfural</b>	0.26
6	13.83	<b>2-acetyl pyrazine</b>	0.25
7	14.71	benzeneacetaldehyde	0.61
8	15.19	<b>ethyl levulinate</b>	0.53
9	15.60	cis-sabinene	
10	15.97	<b>2-methoxy phenol</b>	0.62
11	16.07	<b><math>\alpha,\alpha</math>-dimethyl-benzenemethanol</b>	0.24
12	16.51	<b><math>\alpha</math>-terpinolene</b>	1.34
13	18.05	<b>3,5-dimethyl-2-methyl-pyrazine</b>	
14	18.40	<b><math>\alpha,\alpha</math>-4-trimeth-3-cyclohexene-1-methanol</b>	0.17
15	18.76	borneol	1.07
16	18.95	terpineol-4	0.37
17	19.16	<b>4-(1-methylethyl)-benzenemethanol</b>	0.23
18	19.41	camphene	0.90
19	20.25	<b>citronellol</b>	0.66
20	20.95	geraniol	0.88
21	21.24	<b>5-quinazolinol</b>	0.23
22	22.60	<b>2,5,6,6,-tetramethylcyclohexa-2,4-diene-1-one</b>	0.40
23	22.89	<b>1,3-benzodioxol-5-ol</b>	0.23
24	23.20	<b>1-undecene</b>	0.15
25	23.33	<b>heliotropine</b>	0.18
26	24.29	<b>1-undecanol</b>	0.74
27	24.95	tetradecane	
28	29.90	hexadecane	
29	30.66	spathulenol	0.19
30	31.07	<b>torreyol</b>	0.20

Table 3-1-8 Fraction V (Ether 100%)

No.	Retention Time(min)	Possible compounds	P.A(%)
1	5.05	3-hydroxy-2-butanone	1.92
2	7.15	(2S,4S)-(+)-pentanediol	0.40
3	7.42	4-penten-2-one	0.17
4	8.17	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone	1.88
5	8.54	furfuryl alcohol	0.74
6	13.10	2-ethyl-6-methyl-pyrazine	0.23
7	14.07	cycloheptanone	0.74
8	15.63	3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine	0.37
9	16.48	1-methyl-4-(1-methylethyl)-2-cyclohexen-1-ol	0.44
10	16.82	benzeneethanol	
11	19.39	2-methyl-3-propyl oxirane	0.18
12	20.15	3,3-trimethylenedi sydnone	0.43

다. 황 함유 화합물들의 효율적인 분석 조건

1) 황 함유 화합물의 희석 용매에 따른 결과

총 여섯 개의 황 함유 화합물(dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophen, allyl mercaptan, 2-methyl-3-furanthiol, methional)을 dichloromethane 과 hexane의 두 가지 서로 다른 용매로 각각 1ppm (무게/무게)까지 희석한 후, GC-PFPD에서 3회 반복 실험하였다. 각각의 황 함유 화합물들의 정량 된 면적의 평균과 표준편차(SD), 상대 표준편차(RSD)는 Table 3-1-9와 같다. 두 가지 용매로 희석한 황 함유 화합물의 정량적인 분석결과, 전반적으로 hexane으로 희석한 시료 군에서 더 많은 양이 정량 되었다. 그러나 allyl mercaptan의 경우에는 dichloromethane으로 희석했을 때, 더 많은 양이 정량되었다. Dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophene은 두 가지 용매에서 모두 낮은 상대 표준 편차값을 가진다. 이를 통해서 전자의 세 화합물은 용매에는 크게 영향을 받지 않으며, 분석 과정을 거치면서도 비교적 안정된 상태를 유지한다는 점을 짐작할 수 있었다. 그러나, 그 외의 화합물인 allyl mercaptan, methional,

2-methyl-3-furanthiol은 평균값과 상대 표준편차 모두에서 큰 차이를 보였다. 특히, allyl mercaptan의 경우에는 예외적으로 dichloromethane에서 더 많은 양이 측정되는데, 이 것은 두 용매간의 차이가 의한 결과로 사료된다. 두 용매의 전반적인 특성은 Table 33에 나타내었다.

Table 3-1-9. Comparison of peak areas of sulfur compounds dissolved in different solvents.

Sulfur	Hexane			Dichloromethane		
	PA <sup>a</sup>	SD <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup>	PA	SD	RSD
dimethyl disulfide	1071.16	9.3	0.87	907.6	37.7	4.15
dimethyl trisulfie	1257.04	5.6	0.44	505.5	27.1	5.41
3-methyl thiophene	829.12	41.5	5.0	253	9.5	3.74
allyl mercaptan	79.28	39.3	49.6	354.5	50.5	14.2
Mehional	174.33	8.8	5.05	69.5	50.8	73.1
2-methyl-3-furanthiol	1043.32	77.8	7.46	149.5	22.1	14.8

a Average of peak areas (square root) in GC-PFPD chromatogram (n=3)

b Standard diviation

c Relative standard deviation (%)

Table 3-1-10. Structures, polarities, viscosities, boiling points, and densities of solvents

Solvent	Structure	Polarity	Viscosity	Boiling point(°C)	Density (d <sub>4</sub> <sup>20</sup> )
n-Hexane	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	0.0	0.313	68.8	0.659
Dichloromethane	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.4	0.44	39.8	1.326

(Maryadele, 2001)

희석에 사용된 두 용매 들은 극성, 끓는점 및 분자 구조 모두에서 차이를 가지지만, 본 연구의 결과에 영향을 미치는 것은 용매 간의 극성차이와 분자 구조로 사료된다. 여기서 나타나는 끓는점의 차이가 실험의 차이를 나타내는 원인이라고 보기는 어렵다. 다만 끓는 점이 낮을수록 상온에서 쉽게 휘발되어, 무게를 측정할 때 오차가 더 커질 수 있을 것으로 생각된다. 그래서, 끓는점이 낮은

dichloromethane으로 희석한 황 함유 화합물은 hexane으로 희석한 것에 비해서 상대적으로 큰 표준편차를 가지는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나, 이것은 실험에 있어서 나타날 수 있는 오차 가능성일 뿐이지, 용매가 황 함유 화합물에 주는 주요한 차이라고 보기는 어렵다. 황 함유 화합물의 분석에 크게 영향을 주는 부분은 극성도와 분자구조이다. Dichloromethane은 hexane과는 달리 탄소(C)와 수소(H) 이외에 염소 분자(Cl)를 가지고 있어 실제로, 용매만을 GC에 주입하였을 때, 용매가 나오는 시간이라고 추측되는 3분 이전에 약 1-5mV의 높이를 가지는 물질이 나타났다. 그리고 이 물질을 기점으로 base line이 hexane에 비교하여 전체적으로, 약 50%정도 더 증가했다. 특히 dichloromethane을 용매로 사용하였을 때, allyl mercaptan이 hexane에서 보다 더 많은 양 정량 되는 것은 이것이 용매의 극성도에 민감하게 반응하기 때문인 것으로 추측 되어진다. 본 실험을 통하여, 황 함유 화합물의 분석 시에 용매의 선택이 분석 결과에 영향을 미침을 알 수 있었다. 따라서 분석 시 사용되는 용매의 선택에 있어서는 용매의 극성도와 detector와의 반응성 등이 고려되어야 한다.

## 2) 황 함유 화합물의 검량

GC를 통해서 분석한 모든 황 함유 화합물은 각각 3회 반복 실험하였다. 각 시료들의 GC 주입량은  $1\mu\text{l}$ 이었고, 검출 가능한 최소값 (limit of detection: LOD)을 구하기 위해서 splitless 조건에서 분석하였다. LOD 값을 구하기 위해서는 GC에 적은 양의 시료를 주입하는 것이 더 효율적이다 (Kalontarov et al, 1995). 이는 분석하고자 하는 시료의 양이 적으면, column에서 일어날 수 있는 분석물질의 감소 (quenching effect)를 줄일 수 있기 때문이다. 각각의 황 함유 화합물들은 LOD 수준의 농도에서부터 선형의 직선 (linear range)을 그릴 때 오차범위가 5% 미만인 범위까지 농도를 10 배수씩 희석하여 측정하였다. Table 3-1-11는 이들 각각의 황 함유 화합물들의 선형식(Linear equation)과 회귀계수 (Regression coefficients), LOD 값을 보여준다. LOD 값은 공시료와 낮은 농도의 분석물질을 분석하여 signal을 비교함으로써 결정하였으며, signal대 noise의 비율이 3이 되는 것을 기준으로 계산하였다. 이때의 신뢰도는 99%에 상응하는 수준이어야 한다 (Keith et al, 1983). table 3-1-11를 보면, 각각의 황 함유 화합물들의 linear range, LOD값, linear equation 등의 결과를 비교해 볼 수 있다. 전체적으로 보았

을 때, linear range의 범위는 102 부터 104 (ppb)까지의 간격을 가진다. dimethyl trisulfide가 가장 작은 LOD 값과 가장 넓은 linear range를 가지는 것과는 반대로, methional은 가장 큰 LOD 값과 가장 좁은 linear range를 가진다. 황 함유 화합물 간의 LOD 값의 차이는 각 화합물들의 분자구조와 pulsed flame photometric detection (PFPD)의 원리에 따라 정해진다. PFPD는 들뜬 상태의 황 분자(S2\*) 형태를 감지해 내는 원리로 작동된다. 따라서, S2\*가 생성되기 위해서는 그에 필요한 황 원자(S)가 있어야 한다. 상대적으로 많은 양의 S가 있으면, 더 많은 양의 S2\* 생성될 수 있다. dimethyl trisulfide는 분석한 황 함유화합물 중에 가장 많은 S를 가지고 있고, 이것은 LOD값에 영향을 미친다. 반면에 methional의 경우에는 알데하이드기에 일산화 탄소(CO) 분자를 가지고 있는데, 이 CO는 S와 반응하여 COS 분자를 형성한다. 이렇게 S가 COS 형태로 바뀌게 되면, S2\*를 형성하는데 쓰이지 못한다. 따라서, CO 분자가 있으면, 황 함유 화합물의 분석을 저해하는 작용을 한다 (Kalontarov et al, 1995). PFPD는 flame photometric detector (FPD)와 유사한 원리로 작동되며, 비슷한 수준의 linear range를 가진다.

Table 3-1-11. Linear regression and detection limits in gas chromatograph-pulsed photometric detector (GC-PFPD)

Compound	Linear equation	Regression coefficients	Linear range <sup>a</sup>	Limit of detection <sup>b</sup>
dimethyl disulfide	$y=0.7523x+192$	0.999	10-1000ppb	61.7ppt
dimethyl trisulfide	$y=0.9387x+115.51$	0.9967	0.1-1000ppb	15.2ppt
3-methyl thiophene	$y=0.5614x+61.252$	0.9977	1-1000ppb	229.4ppt
allyl mercaptan	$y=0.0841x+43.568$	0.9905	10-10000ppb	4.6ppb
Methional	$y=0.1393x+24.467$	0.9991	100-10000ppb	70.5ppb
2-methyl-3-furanthiol	$y=0.1248x+45.597$	0.9907	10-10000ppb	9.5ppb

a linear range is from the limit of detection to the concentration level which produces a deviation from linearity of about 5%.

b limit of detection is based on signal /noise =3

그렇지만, LOD 값은 FPD보다 더 작은 단위까지 측정가능 하다 (Mistry et al, 1994). 그러나 실제 실험을 진행하는데, PFPD의 안정성에 문제점이 있다는 것을 발견하게 되었다. PFPD의 경우 매번, 분석을 시작할 때마다, PFPD쪽으로 가는 기체의 유량을 조절해 주어야만 했는데, PFPD가 기체의 흐름에 매우 민감하기 때

문에, 작은 차이에도 결과 값의 차이가 커지는 어려움을 겪었다 (Sergey et al, 1993). 따라서, 적어도 한가지 시료를 분석 하는데 있어서는, 기기를 처음 켜진 상태에서 모든 실험이 수행되게 조절하였다.

### 3) 황 함유 화합물의 추출법 비교

#### 가) 미세 고체상 추출법(SPME) fiber 간의 비교

황 함유 화합물은 서로 다른 세 fiber를 사용하여 각기 세 반복 하여 추출되었고, GC-PFPD를 이용하여 정량 되었다. 이 실험에 사용된, fiber는 CAR/PDMS(75  $\mu$ m), PDMS/DVB(65 $\mu$ m), PDMS(100 $\mu$ m)이다. 각기 다른 fiber를 사용하여 추출한 Gas chromatography-pulsed flame photometric detector (GC-PFPD) 에서 얻어진 gas chromatogram은 Figure 3-1-7와 같다. CAR/PDMS fiber 는 가장 좋은 추출 효율을 보이고, 반대로 PDMS/DVB fiber는 가장 낮은 결과값을 나타내었다. 각기 다른 fiber에 따른 결과를 보면, PDMS/DVB에서는 총 5개, CAR/PDMS와 PDMS fiber에서는 14개의 황 함유 화합물이 동정되었다. Table 3-1-11는 황 함유 화합물들은 기체상태에서 SPME를 이용하여 분석된 시료들의 결과값을 보여준다. 시료에 들어간 총 6개의 황 함유 화합물 중에서 동정 및 정량이 가능한 황 함유 화합물은 dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophen, allyl mercaptan이다. 2-methyl 3-furanthiol은 발견되지 않았다. 그리고 시료에 넣지 않은 methyl 2-propenyl disulfide, di-2-prophenyl disulfide, methyl 2-prophenyl disulfide, methyl 2-prophenyl trisulfide 등 같은 새로운 황 함유 화합물이 생성된 것을 볼 수 있었다. 2-methyl-3-furanthiol의 경우는 빛에 매우 민감하고 공기 중에서 쉽게 산화될 가능성이 있기 때문에, 추출과 분석 과정을 거치면서 다른 화합물로 변했을 것으로 유추할 수 있다. 2-methyl-3-furanthiol가 변형되어 만들어진 것 이라고 생각 되는 황 함유 화합물은 bis(2-methyl-3-furyl)disulfide 이다. 이 두 황 함유 화합물의 분자구조는 Figure 3-1-8에 나와 있다 (Rowe, 2000). bis(2-methyl-3-furyl)disulfide은 2개의 2-methyl-3-furanthiol이 합쳐진 구조를 가지고 있다. 대기 중에 있는 산소와 2-methyl-3-furanthiol의 변형을 가져오는 역할을 한 것으로 추측할 수 있다. bis(2-methyl-3-furyl)disulfide는 세가지 다른 종류의 모두에서 다량으로 추출되었다. 전체적으로 보았을 때, CAR/PDMS와 PDMS fibers와의 결과는 정량적인 차이가 있을 뿐, 거의 유사한 결과를 보였다.

CAR/PDMS fiber를 사용하여 추출했을 때, 시료로 사용한 5개의 황 함유 화합물들이 가장 많이 분석되었다. 그러나 PDMS/DVB fiber를 사용하여 추출했을 경우, 추출 효율이 지나치게 낮아서, 시료에 들어간 6개의 황 함유 화합물 중, dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophen 만을 동정할 수 있었다. 이것은 fiber의 극성과 분석하고자 한 성분들간의 극성이 일치하지 않기 때문이라고 짐작할 수 있다. 분명 황 함유 화합물의 추출 효율만을 비교했을 때는 CAR/PDMS가 가장 좋은 fiber가 될 것이다. 그러나 추출 효율이 높고, 많은 황 함유 화합물들이 동정 된다고 해서 가장 좋은 fiber라고 결론 내릴 수는 없을 것이다. 미지의 시료를 분석할 때, 분석이 이루어지는 동안 새로운 황 함유 화합물이 생성된다면, 원래 동정하고자 한 시료와는 다른 결과를 나타내는 것이다. 따라서 이것은 분석이 이루어지는 동안의 새로운 오차로 작용한다고 할 수 있다. 하지만 추출 효율이 지나치게 낮으면, 시료에 포함되어 있는 황 함유 화합물 조차도 동정해 내지 못할 수도 있다. 그 예로 PDMS/DVB fiber를 사용한 경우 다른 fiber를 사용했을 때는 동정할 수 있었던, allyl mercaptan과 methional이 동정되지 않았다. 이처럼, fiber에 따라서 다른 결과가 나온 이유는 각 fiber들마다 서로 다른 흡, 탈착 기전을 갖기 때문이라고 사려된다. 이것은 분석하고자 하는 물질의 휘발성과 극성도에 따라서 달라진다. 극성이 큰 물질은 극성이 큰 fiber에서 더 쉽게 흡착되거나 잘 탈착 되지는 않는다. 그래서 분석하고자 하는 화합물의 극성도와 같은 극성을 가진 fiber에서 더 좋은 결과를 기대할 수 있다. 결국, fiber를 선택할 때는 분석하고자 하는 물질의 특성을 고려하여 선택하는 것이 중요하다. PDMS fiber는 비교적 넓은 조건에서 안정성을 가진다. 그리고 이것은 비극성 물질에 대해서 높은 민감성을 가지고 있다. 그래서 보편적으로 미지의 물질을 동정할 때, 가장 많이 쓰이는 fiber이다. 극성이 큰 물질을 분석하는 데는, bipolar PDMS/DVB, CAR/PDMS fibers 등이 더 적절하다. 이 fiber들은 극성인 부분과 비극성인 부분을 동시에 가지고 있다. CAR/PDMS fiber는 특히 작은 분자량을 가진, acetic, propanoic acid와 같은 물질에 민감하고, PDMS/DVB fiber는 휘발성이 낮고 극성이 높은 물질에서 민감하게 반응한다. 본 연구에서도 이 같은 특성은 적용된다. 실험에 사용된 황 함유 화합물은 비교적 휘발성이 높은 편이다. 그래서 전체적으로 PDMS/DVB에서 낮은 효율을 보인다. 특히, 분자량이 비교적 작은 편이고, 휘발성이 높은 allyl mercaptan과 methional과 같은 황 함유 화합물들은 CAR/PDMS fiber에서 가장 좋은 효율을 보였고, PDMS/DVB fiber에서는 동정되지 않았다.

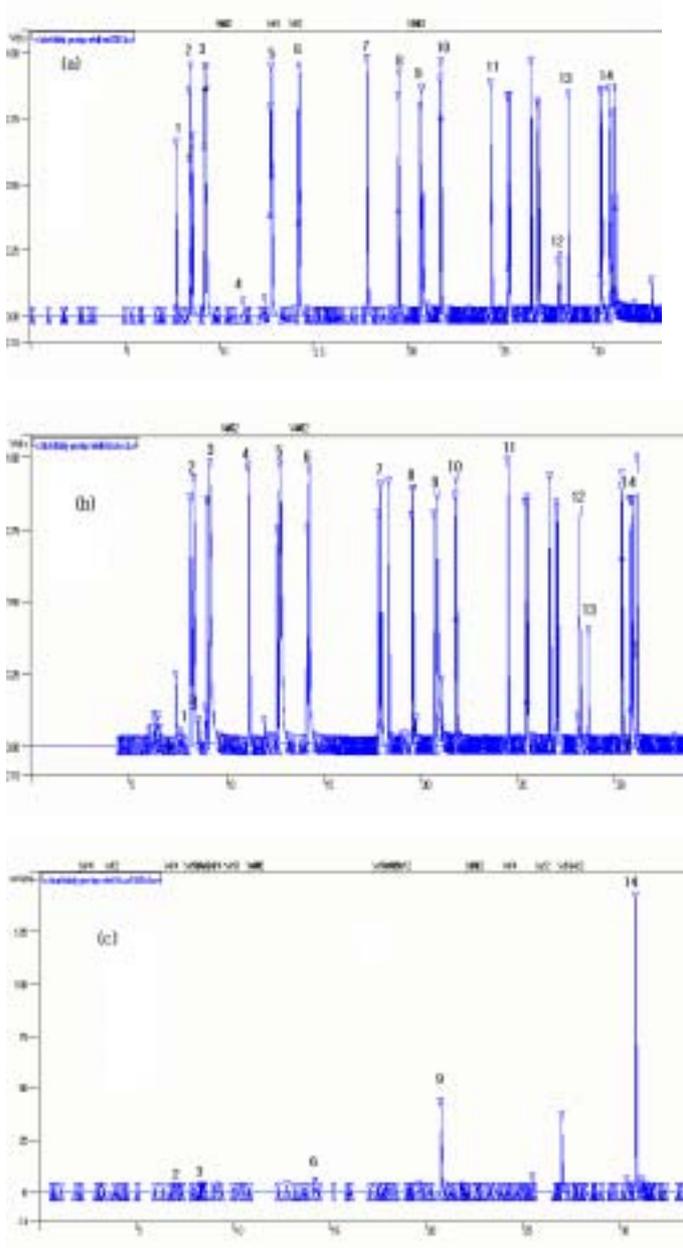


Figure 3-1-7. Gas chromatograms of sulfur compounds isolated by SPME with the three different fibers. (a) PDMS; (b) CAR/PDMS; (c) PDMS/DVB

1: allyl mercaptan, 2: dimethyl disulfide, 3: 3-methyl thiophene, 4: methional, 5: methyl 2-propenyl disulfide, 6: dimethyl trisulfide, 7: di-2-propenyl disulfide, 8: methyl 2-propenyl disulfide, 9: methyl 2-methyl-3-furyl disulfide, 10: 1,4-dethyltetrasulfide, 11: di-2-propenyl trisulfide, 12: bis(3-methylbutyl) disulfide, 13: cyclic ethylene mercaptal fucose, 14: bis(2-methyl-3-furyl)disulfide

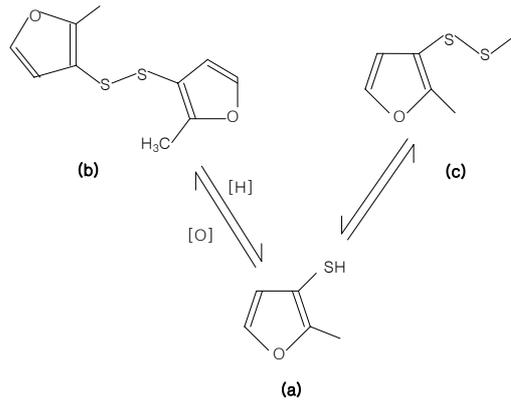


Figure 3-1-8. Structure formulas of sulfur-containing compounds. (a) 2-methyl-3-furanthiol, (b) bis(2-methyl-3-furyl)disulfide, (c) methyl oxycyclosulfide

나) 고정상 기체 추출법 (static headspace; SH)

고정상 기체 추출법(SH)으로 황 함유 화합물 분석에 사용한 조건은 SPME에서 사용한 분석조건과 모두 동일하게 유지 하였다. Figure 3-1-9는 CAR/PDMS fiber를 사용한 SPME 추출법과 SH를 사용한 추출법의 GC-PFPD chromatogram을 보여준다. SPME fiber 중에서 CAR/PDMS fiber를 비교한 이유는, 이 fiber가 추출효율이 가장 높기 때문에, 상대적으로 SH분석법과 가장 큰 차이를 보여주기 때문이다. SH 추출법은 SPME와 비교했을 때, 더 적은 수의 황 함유 화합물을 감지해 낸다. 이 같은 추출 효율의 차이는 olive oil을 분석한 다른 논문에서도 확인할 수 있었다 (Cavali et al, 2003). SH 추출법을 사용했을 때, 대부분의 황 함유 화합물은 상대적으로 GC chromatogram 상의 앞쪽 시간대에 분석된다. 반면에 SPME 추출법의 경우에는 분석시간 전체에 걸쳐서 나타난다. 본 실험에 사용된 황 함유 화합물들은 비교적 낮은 분자량과 높은 휘발성을 가지기 때문에 GC chromatogram의 앞부분에서 주로 나타난다. 따라서 SPME에서 GC chromatogram 뒤쪽에서 나타나는 황 함유 화합물들은 기존의 시료에 포함된 물질이 아닌, 새롭게 생성된 것들임을 추측할 수 있었다. 본 연구의 목적이 황 함유 화합물에 맞는 적절한 추출법을 찾아내는 것에 있음을 감안하면, 우리가 목표로

한 것 이외의 물질들이 생겨나지 않는 것이 바람직한 결과가 될 것이다. 그런 측면에서 SH 추출법은 SPME와 비교하여 더 나은 결과를 보여준다. 이렇게 SPME 추출법에서 새로운 화합물들이 많이 생성된 것은 SH 추출법에는 없는 fiber의 흡·탈착 과정이 포함되어 있기 때문이라고 여겨진다. Table 3-1-13은 SH 추출법을 통해서, 동정된 황 함유 화합물의 평균면적과 SD, RSD 등의 결과를 보여준다. 여기에서 보면, 모두 9개의 황 함유 화합물이 분석되었는데, 이중에 5개는 우리가 실험에 사용한 황 함유 화합물들이었다. 이 물질들은 SPME에서 동정된 5개의 황 함유 화합물들과 일치한다. 그러나 3-(methylthio) 1-propene, methyl 2-propenyl disulfide, methyl oxycyclosulfide, bis (2-methyl-3-furyl) disulfide와 같이 새롭게 생성된 화합물들도 있었다. 황 함유 화합물 사이에 반응을 통해서 생성된 것들 중 methyl oxycyclosulfide는 SH에서는 동정되지 않은 것으로 시료에 원래 포함된, 6개의 황 함유 화합물들을 제외하고는, 가장 많은 양이 정량되었다. 반면에, methional은 5개의 기준이 되는 황 함유 화합물 중, 가장 적은 양이 정량되었다. SH 추출법을 통해서도, 2-methyl 3-furanthiol은 분석되지 않았다. 이를 통해 황 함유 화합물의 변화를 추정해 볼 수 있었다. Figure 3-1-8를 보면, 2-methyl-3-furanthiol 과 methyl oxycyclosulfide의 분자 구조가 있다. methyl oxycyclosulfide는 2-methyl-3-furanthiol에서 수소(H) 분자 하나가 빠지고, methylthio(-SCH<sub>3</sub>)기가 결합된 형태를 가지고 있다. 따라서, 다른 황 함유 화합물에서 떨어져 나온 -SCH<sub>3</sub> 기와 2-methyl-3-furanthiol이 추출과정 중에 만나 결합되었다고 추측할 수 있었다. 이를 뒷받침 해줄 수 있는 또 다른 근거로, methional이 다른 황 함유 화합물들에 비해 현저하게 적게 정량되었다는 점을 들 수 있을 것이다. Methional을 구성하고 있는 methylthio기가 분해 되어 상대적으로 적은 양이 나타나는 것으로 사료된다. 같은 이유로 SPME를 사용한 추출방법에 있어서는 methional의 정량 값은 SH추출 방법을 통한 정량 값과 비교하였을 때보다 더 크게 나타났다. 2-methyl-3-furanthiol이 meaty 하고 roasted 한 향기 성분에 있어서 가장 특징적인 황 함유 화합물 중에 하나 라는 사실을 감안하면, 이 황 함유 화합물의 정확한 분석 방법의 발견은 중요한 과제가 될 것이다. SH 추출방법처럼, 추출이 일어나는 동안 시료의 변화가 가장 적다고 가정하는 분석법에서 조차도 변형이 일어 난다는 것은 황 함유 화합물 분석의 난점을 다시 한번 확인시켜주는 일이다. 이 같은 변형을 가능한 줄이기 위해서는 몇 가지 방법이 보완될 수 있다. Thiol (-SH) 기는 매우 산화되기 쉽고, 산소에 의해서 disulfide형태로 빠르게 변

형되는 특징을 가지고 있다. 이런 thiol기를 함유한 화합물의 변화를 막기 위해서, 시료는 질소 기체와 낮은 온도(4°C) 아래서 준비되어야 한다 (Mestres et al, 1997). 황 함유 화합물의 정확한 분석을 위해서는 분석을 통해서 일어날 수 있는 변성을 최소한으로 줄여야 한다. 그런 측면에서 SH법은 SPME법보다 더 적절한 추출법이다. 그러나 본 연구의 경우에는, 10ppm 이라는 큰 농도의 시료를 분석한 것이다. 따라서, 비교적 효율이 낮은 SH법으로도 충분히 정량이 가능하였다. 그러나, 실제로 식품에서 존재하는 황 함유 화합물의 농도는 ppb 수준이다. 따라서 추출의 효율성을 높이는 것도 중요한 변수가 된다. 따라서, 분석하고자 하는 황 함유 화합물에 따라, 가능한 시료의 변성을 막고, 충분한 효율성을 만족 시키는 방법을 선택해야 할 것이다.

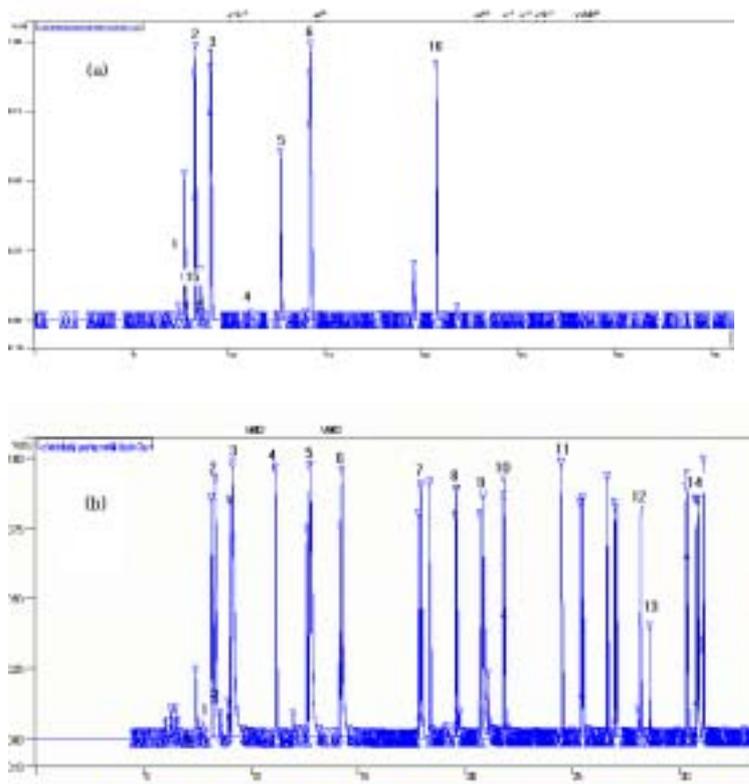


Figure 3-1-9. Gas chromatograms of sulfur compounds isolated by the two different methods. (a) static headspace extraction (SH) (b) solid phase microextraction (SPME) with CAR/PDMS fiber.

\* 15: 3-(methylthio) 1-propene, 16: methyl oxycyclosulfide

Table 3-1-12. Sulfur compounds isolated by solid phase microextraction (SPME) with different fiber.

No.	Compounds	SPME <sup>a</sup>						ID <sup>d</sup>
		DVB		CAR		PDMS		
		P.A. <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup>	P.A.	RSD	P.A.	RSD	
1	allyl mercaptan	- <sup>g</sup>	-	156.6	11.7	102.8	4.8	MS <sup>e</sup> /RT <sup>f</sup>
2	dimethyl disulfide	53.4	15	2696.1	0.7	2443.6	4.1	MS/RT
3	3-methyl thiophene	52	25.7	2792.5	1.8	2444.3	1.1	MS/RT
4	Methional	-	-	1548.1	17.5	321.8	20.8	MS/RT
5	methyl 2-propenyl disulfide	-	-	2422.8	12.8	1909	4.1	MS
6	dimetyl trisulfide	94.4	6.8	2575.1	5.7	2273	2.2	MS/RT
7	di-2-propenyl disulfide	-	-	1470.3	7.7	1932.5	4.4	MS
8	methyl 2-propenyl disulfide	-	-	1947	1.2	2043.1	5.2	MS
9	methyl 2-methyl-3-furyl disulfide	333.9	7.06	1805.6	12	2006.8	0.5	MS
10	1,4-dethyltetrasulfide	-	-	2042.7	2.3	2087.1	2.7	MS
11	di-2-propenyl trisulfide	-	-	1585.4	15.4	1270.2	23.6	MS
12	bis(3-methylbutyl) disulfide	-	-	1532.2	2.3	750.2	4	MS
13	cyclic ethylene mercaptal fucose	-	-	1021.2	9.5	1611.4	8.6	MS
14	bis(2-methyl-3-furyl)disulfide	576.2	5.9	1998.9	2.5	1881	6.1	MS

a Solid phase microextraction(SPME): CAR, CAR/PDMS fiber; DVB, PDMS/DVB fiber; PDMS, PDMS fibers.

b Average of peak area (square root) in GC-PFPD chromatogram (n=3)

c Relative standard deviation (%)

d Tentative identification was performed as follows:

e mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA)

f Retention times were determined using the sulfur compounds as external standard

g - not detected

Table 3-1-13. Sulfur compounds isolated by static headspace extraction (SH)

No.	Compounds	P.A <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>
1	allyl mercaptan	1080.2	8.5	MS <sup>d</sup> /RT <sup>e</sup>
2	3-(methylthio) 1-propene	232.3	12.1	MS
3	dimethyl disulfide	2531.4	3.1	MS/RT
4	3-methyl thiophene	2271.1	5.1	MS/RT
5	methional	378.1	7.6	MS/RT
6	methyl 2-propenyl disulfide	1274.4	2.2	MS
7	dimethyl trisulfide	2384.3	4.6	MS/RT
8	methyl oxycyclosulfide	1655.3	13.1	MS
9	bis(2-methyl-3-furyl)disulfide	- <sup>f</sup>	-	MS

a Average of peak(square root) area in GC-PFPD chromatogram (n=3)

b Relative standard deviation (%)

c Tentative identification was performed as follows:

d mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (Hewlett Packard Co., Palo Alto, CA, USA)

e Retention times were determined using the sulfur compounds as external standard

f - not detected

## 제2절 불고기 향기 활성 성분의 동정, 정량 및 OAVs

### 1. 서론

지금까지 다양한 식품에서 약 6900여종의 향미성분이 발견되었으며, 이 중 약 3500여종의 향미 성분이 시판되어 식품산업에 이용되고 있다. 단일 식품을 살펴보다라도 커피나 소고기 등에서는 약 900여개 이상의 휘발성 향미 성분이 발견되어 보고되고 있으니, 향미 성분은 그 다양성과 복잡성에서 식품 중 다른 어떤 성분들 과도 비교할 수 없다고 할 수 있다.

식품의 풍미에 대한 연구는 지금까지 GC/MS에 의한 분석에 주로 의존하여 식품 향에 대한 실제적인 기여도를 알아내기 어려웠다. 이런 단점을 보완하기 위해 개발된 방법이 관능적 평가와 기계적 방법을 결합한 Gas chromatography-olfactometry (GC/O) 방법 (Marsili, 1997)이며 이를 이용하여 향기활성성분을 방법으로는 aroma extract dilution analysis (AEDA) (Marsili, 1997), CharmAnalysis (Cunningham *et al.*, 1986), Osme (Miranda *et al.*, 1992)등이 있다. AEDA는 향 추출물을 단계적으로 희석하여 각 희석물을 대상으로 냄새가 나지 않는 시점까지 GC/O를 실시하는 방법으로, 그 결과는 향기가 나는 마지막 희석배수인 flavor dilution (FD) factor로 나타낸다. 그러나, FD factor는 향기활성성분의 상대적인 중요도를 평가하는데 좋은 지표가 되기는 하지만, 시료의 추출 및 농축 과정 중 일어나는 향기성분의 손실과 식품에 있는 macromoles과의 상호작용을 고려하지 않는 문제점이 있다. 따라서, AEDA를 통해서 밝혀진 높은 FD factor를 가진 향기활성성분을 정량하고, 그것의 Odor activity values (OAVs)를 구하는 것이 그 식품에 미치는 향기활성성분의 기여도를 정확하게 밝혀내는 방법이라고 할 수 있다.

식품의 OAVs를 알기위해서는 먼저 각 향기활성성분의 정확한 정량이 선행되어야 하는데 이를 위해서 사용되는 안정성 동위원소 희석법은 식품 matrix에 있는 향기활성성분을 정확하게 정량하는데 쓰이는 방법이다. 즉, 이 방법은 정량을 하려고 하는 향기활성성분과 동일 구조를 가지나 일부성분의 중수소나  $C_{13}$ 의 안정성 동위원소 (stable isotope)로 치환된 isotope-labeled된 표준물질을 합성하고, 이

물질을 내부표준 물질로 이용하여 GC/MS (SIM mode)로 정량을 시도하는 것이다.

## 2. 연구개발의 내용 및 방법

### 가. 불고기 재료 준비

불고기는 제 2 협동과제 팀에 의한 확립된 방법으로 준비되었다. Table1에서 보는 것과 같이 불고기양념은 간장, 설탕, 참기름, 참깨, 후추, 배즙, 그리고 다진 양파, 파, 마늘을 골고루 섞여 준비 되었다. 준비된 채끝살(150g)을 불고기 양념과 섞어 실온에서 1시간을 재어놓았다. 220℃에서 30분 동안 오븐(Model 7091, Toastmaster Inc., Boonville, USA)을 예열한 후 불고기를 190 ± 3℃에서 앞뒤를 4분씩 구운 후 구워진 불고기를 액체 질소에 얼려 blender (HMC-400T, Hanil Electric Co., Seoul, Korea)로 가루형태로 만들었다.

Table 3-2-1. Materials used for preparation of bulgogi

materials	origin/manufacturer	amount(g)
sliced beef (sirloin)	Korean grade A	150.0
bulgogi sauce		
soy sauce	Sempio Co., Seoul, Korea	20.0
sugar	Cheil Jedang Co., Seoul, Korea	10.0
sesame oil	Cheil Jedang Co., Seoul, Korea	6.0
roasted sesame seeds	Samyangchung Co., Seoul, Korea	3.0
black pepper powder	Ottoogi Co., Seoul, Korea	1.0
pear (juice)	Seonghwan, Chungcheongdo, Korea	25.0
onion (chopped)	Muan, Jeonlado, Korea	12.0
welsh onion (chopped)	Hanam, Kyonggido, Korea	5.0
garlic (chopped)	Goheung, Jeonlado, Korea	8.0
ginger (chopped)	Korea	3.0

#### 나. 휘발성 향기성분의 추출

##### 1) 고체상 미세추출법 (solid phase microextraction, SPME)

SPME의 장치와 fiber는 Supelco (Bellefonte, USA)에서 구입하였다. 10g의 불고기 sample을 vial (40ml)에 넣었다. 이를 30분동안 60°C에서 평형을 시킨 후 3개의 다른 fiber(100 $\mu$ m polymethylsiloxane(PDMS), 75 $\mu$ m Carboxen (CAR)/PDMS, and 65 $\mu$ m PDMS/divinylbenzene (DVB))을 사용하여 휘발성성분을 추출하였다. 추출은 SPME의 needle이 20mm의 길이에서 30분동안 60°C에서 수행되었다. GC-MS에 injection시 needle을 완전하게 10mm의 길이에서 탈착하였다. GC-O의 경우 추출 시 길이는 5mm, 2.5mm 그리고 1.2mm를 사용하여 불고기 휘발성성분을 dilution 시켰고 (Deibler *et al.*, 1999) 탈착 시 2분 동안 200°C 탈착되었다.

##### 2) 초진공승화법 (high vacuum sublimation, HVS)

가루형태의 불고기(80g)를 diethyl ether(150ml), Fisher Scientific Korea Ltd., Seoul, Korea)와 함께 stirring (400rpm, 30min) 시켰다. 진공 하에서 추출물을 filtering 하고 Vigreux column (50cm\*3cm i.d.)를 이용하여 150ml까지 농축 후 기온기구의 단점을 보완하여 자체 제작한 초자로 vacuum sublimation(range:  $3 \times 10^{-5}$  torr~)하여 비 휘발성 물질과 분리시켰다.

#### 다. 휘발성 향기성분의 분석, 동정

휘발성 향기성분 농축물은 Gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS)에 의하여 분석하였다. GC-MS는 HP 5890 series II GC/HP 5972 mass selective detector (Hewlett-packard Co., USA)로 수행하였으며 column은 극성이 다른 DB-5ms와 DB-WAX(30m  $\times$  0.25mm i.d.  $\times$  0.25mm film thickness, J & W Scientific, USA), 두 가지를 사용하였다. 향기성분 농축물은 1 $\mu$ l 를 주입하였다. 온도 program은 40°C에서 5분간 유지한 후 200°C까지 2°C/min의 속도로 상승시켜 20분간 유지하였으며 Injector와 detector의 온도는 각각 200과 250°C이며, 운반

기체는 helium으로 유속은 0.8ml/min을 유지하였다. 화합물의 동정을 위해 GC chromatogram에서 확인된 C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub>의 *n*-paraffins 표준물질의 retention time을 통해 각 화합물의 retention index를 구하였다. 나머지 mass selective detector의 조건은 다음과 같다. : ionization energy, 70 eV; mass range, 33-550 a.m.u.; scanning rate, 1.4 scans/s.

#### 라. 향기활성 성분의 동정

향기활성 성분은 gas chromatography/olfactometry (GC/O)를 통해 동정하였다. 이때 사용한 GC (Varian 3900 GC, Walnut Creek, USA) 는 flame ionization detector (FID)와 sniffing port (ODO II, SGE Ringweed, Australia)를 설치한 것이었다. GC column의 끝은 FID와 sniffing port 사이에서 1:1로 분지하였으며 이때는 deactivated capillary column (0.5 m length 0.25 mm i.d.)을 사용하였다. GC 오븐 온도는 40°C에서 5분 유지한 후 200°C까지 10°C/min로 상승시켜 24분 동안 유지하였다. 나머지 실험 조건은 GC/MS의 것과 동일하게 하였다.

#### 마. 향추출물 희석분석법 (aroma extract dilution analysis, AEDA)

특정식품에서의 각각의 향기 활성성분이 전체적인 식품의 풍미에 얼마나 기여하는지를 측정하기 위하여 향 희석추출분석법을 실시하였다. 원래의 농축물을 추출 시 사용한 용매로 일정한 배수 (1:2 또는 1:3)만큼 희석한 후 각 희석물을 대상으로 하여 향이 나지 않는 희석배수까지 GC/O를 시행하였다. AEDA의 결과는 flavor dilution (FD) factor로써 나타내었다. SPME를 이용하여 실험한 경우 상공기체를 희석하기 위하여 GC의 split ratio를 조절하였으며, split ratio는 4, 8, 16, 31, 64, 128로 일정하게 2배수씩 증가시켜 각 배수마다 GC/O를 시행하였다.

#### 바. 불고기 향기활성성분의 역치값 (threshold value)

불고기 향기활성성분의 역치값을 결정하기위한 관능검사로써 이점검사를 시행하였다. 샘플을 준비하기 위해서 불고기 향기활성성분을 예비실험을 통해 결정된

양을 ethanol에 희석한 후 냄새가 제거된 sunflower oil (200ml)에 넣었다. 이를 10분 동안 stirring(400rpm)한 후 sunflower oil로 2배수로 희석했다. 2배수로 희석된 샘플을 뚜껑이 테프론으로 코팅된 60ml (I-CHEM, U.S.A)에 유리병에 20ml씩 넣었다. 준비된 샘플을 15명에 패널 (graduate students at Seoul national university)에게 농도가 증가되는 순서대로 배열하여 실험을 진행하였다. 패널은 24세-28세 사이의 10명의 여자와 5명의 남자로 구성되었다. 실험은 시료를 처리하지 않은 blank와 시료 처리한 샘플 차이를 묻는 방식으로 진행되었다. 역치값을 정하기 위한 통계처리로 유의성 검증표 (one tailed,  $p=1/2$ ), ( $\alpha=0.05$ ), (O'Mahony, 1986)를 이용하였다.

사. 안정성 동위원소 희석법 (SIDA)를 위한 standard curve 작성

불고기의 향기활성성분을 정량하기 위해 standard curve를 완성하였다. standard curve는 weight ratio [ $\mu\text{g}$  labeled compound / ( $\mu\text{g}$  labeled compound +  $\mu\text{g}$  unlabeled compound)] 와 MS (SIM mode) response ratio [labeled compound / unlabeled compound] 의 관계를 그래프로 그린 것으로 불고기에 labeled compound를 넣어 GC/MS를 이용하여 y값을 구한 후 수식에 적용하여 목표한 물질의 양을 구할 수 있다. table 3-2-1은 acetylpyrazine의 standard curve를 구하기 위한 예이다. 즉 같은 농도의 unlabeled compound(SD)와 labeled(SI)를 table 3-2-2와 같은 비율로 만들어 GC/MS의 SIM mode를 이용하여 완성하였다.

Table 3-2-2. Weight ratio of labeled acetylpyrazine/ unlabeled acetylpyrazine for standard curve

SD( $\mu\text{l}$ ):SI ( $\mu\text{l}$ )	Weight ratio
800:200	0.2
400:200	0.33
200:200	0.5
100:200	0.67
50:200	0.8

SD: unlabeled acetylpyrazine SI: labeled acetylpyrazine SD:20mg/20ml, SI:20mg/20ml  
weight ratio = SI (labeled compound)/SD (unlabeled compound)

아. 불고기 향기 활성성분의 분획 (fractionation)

1) 산·염기 분획 (acidic/basic fractionation)

HVS에 의해 얻어진 불고기 추출물 (320 g)에서 불고기 향기성분을 추출 후 HVS로 지방 성분을 제거한 후 vigreux column을 이용하여 50ml까지 농축하였다. 이 추출물에서 basic fraction을 30분씩 stirring해 줬다. figure 3-2-1.에서 보여주는 것과 같이 효율적인 분리를 얻기 위해서 hydrochloric acid (2M, 3 times; total volume 120ml)를 가하여 각각위해서 aqueuse layer를 NaCl로 각 단계마다 포화시켰다. 그 후 separatory funnel를 이용하여 basic fraction이 있는 aqueuse layer를 분리한 후 중화를 위해 sodium hydroxide (12M, pH 12)를 넣었다. 중화된 aqueuse layer에서 pyrazine류를 얻기 위해 dichloromethane (3 times; total volume 150ml)을 이용하여 재추출한 후 얻어진 basic fraction을 GC/MS에 분석하기 전에 질소로 50 $\mu$ l까지 농축했다.

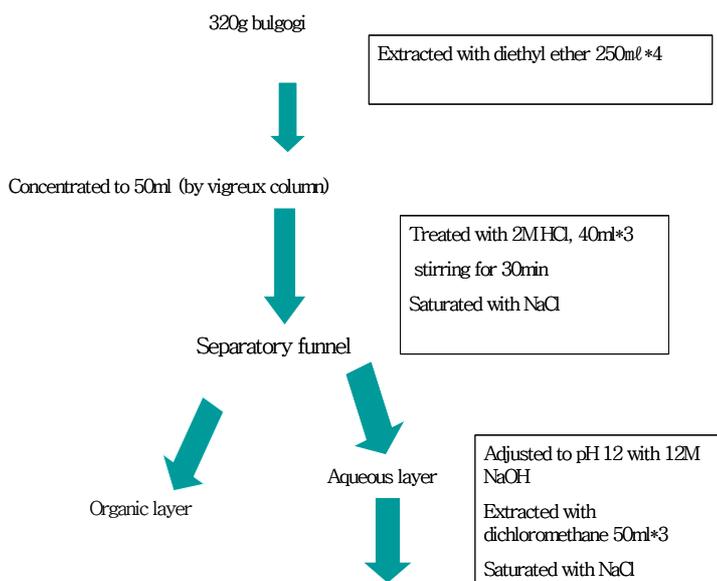


Figure 3-2-1. Scheme of Preparation of Volatile Basic Fraction concentrate

2) 칼럼 크로마토그래피 (column chromatography)

GC/MS에서 동정할 수 없었던 불고기 향기활성성분들을 분획하기 위해서 column chromatography를 수행하였다. HVS에서 얻어진 불고기 추출물을 silica gel(Aldrich chemical Company, Inc., USA)로 충전된 column을 이용하여 냉각 상태 (10-12°C)에서 실험을 진행하였다. Table 3-2-3 와 같이 fraction A는 pentane 50ml, fraction B; pentane 40ml/ether 10ml, fraction C; pentane 30ml /ether 20ml, fraction D; pentane 20ml/ether 30ml, fraction E 10ml/ether 40ml과 fraction F; ether 50ml를 사용하였다. 각 fraction의 volume은 50ml이며 GC/MS 분석을 위해 질소로 50 $\mu$ l까지 농축하였다.

Table 3-2-3. composition of eluting solvent for column chromatography

No. fraction	Pentane	Diethyl ether
A	100%(50ml)	0%
B	80%(40ml)	20%(10ml)
C	60%(30ml)	40%(20ml)
D	40%(20ml)	60%(30ml)
E	80%(30ml)	20%(20ml)
F	0%	100%(50ml)

자. 안정성 동위원소 희석분석법 이용한 정량 (SIDA, stable isotope dilution assay)

‘가’에 의해 불고기(320 g)를 조리, 처리한 후 일정 양의 internal standard ( [<sup>2</sup>H] <sub>3</sub>-Acetylpyrazine; 80 $\mu$ g, Tetrahydro linalool; 124 $\mu$ g, methional; 5 $\mu$ g)를 불고기에 첨가했다.. internal standard가 불고기에 평형을 이룰 수 있도록 실온(26°C)에서 1시간을 방치하였다. 그 후 시료의 공기에 접촉에 의한 산화를 방지하기 위해 아르곤 가스를 불어넣어 일정시간 stirring(400rpm, 8 hour) 시켜 추출하였다.

추출된 시료를 ‘나-2’의 방법과 같이 처리한 후 column chromatography를 이용하여 분획하였다. 분획된 시료를 GC/MS에서 SIM mode에 의해 불고기 향기활성 성분을 정량하였다.

### 3. 연구결과 및 고찰

가. HS-SPME (headspace solid phase microextraction)를 이용한 불고기 풍미성분의 동정

#### 1) fiber 코팅 물질에 따른 추출 효율

SPME에서 fiber에 코팅된 물질의 차이는 absorption efficiency에 커다란 영향을 준다 (Shirey, 1999). Table 3-2-4 은 100 $\mu$ m PDMS, 75 $\mu$ m CAR/PDMS와 65 $\mu$ m PDMS/DVB fiber를 사용하여 불고기의 주요 휘발성성분의 추출정도를 실험한 것이다. 3개의 fiber 코팅 물질 중 75 $\mu$ m CAR/PDMS가 특히 allyl mercaptan과 diallyl sulfide와 같은 황화합물을 포함해서 가장 불고기 휘발성물질에 효과적으로 나타났다. 비록 100 $\mu$ m PDMS fiber가 75 $\mu$ m CAR/PDMS (0.436 mm<sup>3</sup>)과 65 $\mu$ m PDMS/DVB (0.357 mm<sup>3</sup>)보다 코팅 volume이 크지만 불고기 휘발성물질 추출에는 적당하지 않은 것으로 나타났다. 그러므로 75 $\mu$ m CAR/PDMS가 본 실험에서 적당한 fiber로 적절한 것으로 여겨진다.

#### 2) HS-SPME를 이용한 불고기 휘발성물질의 GC/MS 분석

Table 3-2-5은 CAR/PDMS 75 $\mu$ m fiber를 사용하여 GC/MS로 분석한 불고기 휘발성물질의 RI와 peak면적을 보여준다. 총 50여개의 물질이 동정되었고 이 중 황화합물(no. 1, 3, 4, 7, 9, 12, 15, 30, 31, 34, 35, 37 그리고 39)이 ~30%, terpene류 (no. 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 26, 28, 33, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 47 그리고 48)가 ~20%가 상대적인 양으로 나타났다. 전체적으로 불고기의 휘발성물질의 구성은 cooked beef(Shahi et al., 1986; Min et al., 1979; Mottram et al., 1982; Hartman et al., 1983; Galt and MacLeod, 1984)과 다른 것으로 나타났다. 이는 불고기의 많은 재료들로 인한 것을 보인다. pyrazine류(nos. 11, 13, 14, 22, 23, 29 그리고 49)

는 황 화합물이나 terpene hydrocarbon류 보다 훨씬 적은 것으로 나타났다.

Table 3-2-4. Peak areas of the major volatile compounds extracted by different fibers and total areas in HS-SPME of bulgogi

compound	peak area ( $10^4$ ) <sup>a</sup>		
	PDMS <sup>b</sup>	CAR/PDMS <sup>c</sup>	PDMS/DVB <sup>d</sup>
allyl mercaptan	175 ± 27	6066 ± 218	500 ± 34
limonene	154 ± 30	5612 ± 299	1208 ± 149
diallyl disulfide	99 ± 20	4961 ± 244	1785 ± 164
β-caryophyllene	1474 ± 265	3084 ± 142	5180 ± 763
total	3940 ± 451	62640 ± 3221	22144 ± 1313

<sup>a</sup> The averages ± standard deviations ( $n=4$ ) on total ion chromatogram in GC-MS.

<sup>b</sup> PDMS 100 m fiber.

<sup>c</sup> CAR/PDMS 75 m fiber.

<sup>d</sup> PDMS/DVB 65 m fiber.

황 화합물은 meat와 meat product에서 많이 동정되었는데, 본 실험에서 allyl mercaptan (no. 3)과 diallyl disulfide (no. 30)가 가장 많은 황화합물로 나타났다. 이는 마늘과 양파의 중요 풍미성분이기도 하다 (Fenaroli, 1994; Kim et al., 1995; Yu et al., 1989; Yu et al., 1994). 지방성 황화합물은 일반적으로 낮은 역치값을 가지고 있기 때문에 익힌 고기의 풍미에 중요한 역할을 한다 (Mottram, 1991). 두 개의 방향족 황화합물 3-vinyl-4H-1,2-dithiin 과 2-vinyl-4H-1,3-dithiin 또한 동정되었다. 그러나 thiophenes, thiazoles과 thiazolines같은 고기에 중요한 풍미성분인 방향족 황화합물은 GC/MS로 동정되지 않았다 (Mottram, 1991). 동정된 18개의 terpene류 중 12개는 monoterpene류이고 6개는 sesquiterpene류였다. sesquiterpene류는 SPME를 이용한 본 실험에서 적은 양을 나타내는데 이는 상대적으로 높은 끓는점과 낮은 휘발점을 가졌기 때문으로 보여진다. terpene류 중 Limonene (no. 26)가 가장 많은 양을 가진 것으로 나타났다. 이는 오렌지 (Owusu-Yaw et al., 1986), 레몬 (Staroscik and wilson, 1982) 그리고 자몽 (Wilson and Shaw, 1980)과 같은 감귤류에 중요 풍미성분으로 보고되었다.

Table 3-2-5. Volatile compounds identified in HS-SPME-GC-MS of bulgogi using a CAR/PDMS fiber

no. <sup>a</sup>	compound name	RI <sup>b</sup>		rel % <sup>c</sup>		ID <sup>d</sup>
		DB-5MS	DB-WAX	DB-5MS	DB-WAX	
1	methanethiol	<500	689	0.06	0.04	A
2	ethanol	<500	942	0.46	0.23	A
3	allyl mercaptan	594	890	9.68	9.50	A
4	1-propanethiol	608	834	NA <sup>e</sup>	0.40	A
5	ethyl acetate	609	895	4.48	3.62	B
6	2-methylbutanal	658	ND <sup>f</sup>	0.49	ND	B
7	allyl methyl sulfide	698	950	1.38	1.09	C
8	3-hydroxy-2-butanone	708	1292	0.64	0.76	A
9	dimethyl disulfide	736	1071	0.25	0.19	B
10	hexanal	801	1084	0.40	0.38	A
11	methylpyrazine	823	1274	0.35	0.24	A
12	diallyl sulfide	857	1145	4.49	4.26	A
13	2,5-dimethylpyrazine	912	1331	NA	0.35	A
14	2,6-dimethylpyrazine	914	1337	NA	0.29	A
15	allyl methyl disulfide	915	1281	4.73	4.50	C
16	-thujene	925	1022	1.02	0.61	B
17	-pinene	931	ND	0.42	ND	A
18	camphene	947	1058	0.12	0.16	A
19	sabinene	971	1111	0.86	0.86	A
20	-pinene	975	ND	0.20	ND	A
21	myrcene	990	1163	0.50	1.01	A
22	2-ethyl-6(or 5)-methylpyrazine	997	1394	0.07	0.16	B
23	trimethylpyrazine	1001	1415	0.22	0.19	A
24	-3-carene	1008	1142	4.35	2.72	B
25	<i>p</i> -cymene	1025	1269	1.67	3.14	A
26	limonene	1029	1195	8.96	7.20	A
27	phenylacetaldehyde	1043	1646	0.29	0.16	A
28	-terpinene	1058	1243	0.19	0.38	A
29	2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine	1077	1456	NA	0.21	A
30	diallyl disulfide	1080	1485	7.92	9.36	A
31	allyl propyl disulfide	1092	1430	0.95	0.98	C
32	undecane	1100	1100	1.91	0.78	A
33	linalool	1101	1561	NA	0.32	A
34	dipropyl disulfide	1107	1378	0.32	0.23	A
35	3-vinyl-4 <i>H</i> -1,2-dithiin	1188	1739	0.20	0.53	B

<sup>a</sup> Numbers correspond to those in Table 3-2-6.

<sup>b</sup> Retention indices were determined using *n*-paraffins C5-C22 as external references.

<sup>c</sup> Average percentages of peak areas (*n* = 4).

<sup>d</sup> Identification: A, mass spectrum and retention index were consistent with those of an authentic standard; B, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (Hewlett-Packard Co., 1995), and retention index was consistent with that of literature (Adams, 2001; Kondjoyan and Berdagu, 1996; Acree and Ahn, 1997; Rychlik et al., 1998); C, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database (tentative identification).

<sup>e</sup> Not available due to either low abundance or peak co-elution. <sup>f</sup> Not detected.

### 3) SPME를 이용한 불고기 휘발성물질의 GC/O 분석

Table 3-2-6은 CAR/PDMS fiber에 의해 동정된 향기활성성분을 보여주고 있다. SPME에 의한 추출물은 GC split ratios (dilution range =  $2^2 - 2^7$ )이나 fiber의 노출 길이 (dilution range =  $2^8 - 2^{10}$ )를 달리하여 dilution을 수행했다. 총 33개의 물질에 두개의 column (DB-5ms and DB-WAX)에서 동정되었다. 이 물질들 중 8개 (nos. 1, 3, 4, 27, 29, 30, 33 and 49) 성분들이 GC/MS(table 4)에서 동정되었고, 6개의 물질 (nos. II, III, IV, V, VI and XI)는 그들의 RI와 향기 특성을 비교에 의해 동정되었다. 황화합물들 (no. 1, 3, 4, 30, II, and VII)과 pyrazine류 (no. 29, 49, VI, and XI)가 불고기가 중요 향기성분으로 나타났다. 불고기에서 linalool를 외에 terpene류들의 양이 많지만 불고기 풍미에 대한 영향은 적은 것으로 GC/O 결과 나타났다.

Allyl mercaptan (no. 3, garlic/bulgogi)은 두 column에서 가장 중요한 향기활성성분 ( $\log_2 \text{FD} \geq 10$ )로 나타났다. 이의 역치값은 상대적으로 매우 낮은 것으로 ( $0.005-0.04 \mu\text{g}/\ell$  in air), (Van Gemert, 1999) 알려져 있다. 풍미특성, 낮은 역치값 그리고 높은 함량을 고려 했을 때 allyl mercaptan은 불고기의 풍미의 key compound인 것을 알 수 있다. methional (no. II, boiled potato/ soy sauce)은 불고기에서 동정된 중요한 황화합물로 나타났다. 이는 익은 감자의 character impact compound (McGorin, 2002; Mutti and Grosch, 1999)로 보고된 물질로 그 외에 nonfat dry milk (karagum-Yuceer et al., 2001), toasted wheat bread (Rychlik and Grosch, 1996), roasted sesame seeds (Shieberle, 1996), boiled beef (Kerscher and Grosch, 1997) 그리고 stewed beef juice (Guth and Grosch, 1994)등 여러 가지 식품에서 중요한 풍미성분으로 동정되었다. 비록 methional은 GC/MS에서 동

정되지 않았지만 이의 낮은 역치값( $0.063\mu\text{g}/\ell$  in air), (Van Gemert, 1999) 으로 인해 풍미에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

pyrazine류는 GC와 GC/MS에서 적은 양이 동정된 것에 비해 높은  $\log_2$  FD factor를 나타냈다. popcorn (Schieberle, 1991), french fries (Wagner and Grosch, 1997)에서 key compound들인 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (no. VI, nutty/soy powder/coffee/chocolate), acetylpyrazine (no. 49, nutty/peanut/coffee), 그리고 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (no. 29, nutty/coffee/earthy)은 불고기에서도 동정되었다. 이들 중 roasted beef (Cerny and Grosch, 1992)의 character impact compound인 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine과 2,3-diethyl-5-methylpyrazine은  $0.007-0.014$ 과  $0.009-0.018$  ( $\mu\text{g}/\ell$  in air), (Van Gemert, 1999) 낮은 역치값을 가진 물질로 나타났다. GC/MS에서 동정되었던 methyl기를 가진 pyrazine류는 GC/O에서는 동정되지 않았다. 이는 높은 역치값에 인한 것으로 불고기의 풍미에는 영향을 적은 것으로 보인다. 황 화합물과 pyrazine류와 함께 phenylacetaldehyde (no. 27, stale/pungent/hyacinth), linalool (no. 33, floral/lemon/sweet), 2-acetyl-1-pyrroline (no. III cooked rice/bread crust/nutty), 그리고 1-octen-3-one (no. IV, mushroom/metallic/earthy)는 GC/O에서 중요 향기성분으로 나타났다.

본 실험에서는 불고기의 다양한 재료와 HS-SPME의 낮은 추출력으로 인해 많은 향기활성성분이 동정되지 못했다. 그러나 이는 초 진공승화법(HVS)으로 보완할 수 있을 것으로 여겨져 실험을 진행 하였다.

Table 3-2-6. Aroma-active compound detected in HS-SPME-GC-O of bulgogi using a CAR/PDMS fiber

No <sup>a</sup>	compound name	RI <sup>b</sup>		aroma property	log2 FD <sup>c</sup>		ID <sup>d</sup>
		DB-5MS	DB-WAX		DB-5MS	DB-WAX	
1	methanethiol	<500	665	sulfuric, rotten, kimchi	6.0	5.0	A
3	allyl mercaptan	594	880	garlic, bulgogi	10.0	10.0	A
4	1-propanethiol	610	828	garlic, onion, sulfuric	3.0	4.5	A
I	unknown	868	1310	chemical, medicinal, burnt rubber	8.5	6.0	
II	methional	908	1461	boiled potato, soy sauce	9.0	7.5	B
III	2-acetyl-1-pyrroline	923	1345	cooked rice, bread crust, nutty	3.5	4.5	C
IV	1-octen-3-one	979	1302	mushroom, metallic, earthy	3.0	3.0	B
V	unknown	1010	ND <sup>e</sup>	nutty, coffee, boiled potato	5.5	ND	
49	acetylpyrazine	1026	1644	nutty, peanut, cooked rice	6.0	7.0	A
27	phenylacetaldehyde	1049	1656	stale, pungent, urine, hyacinth	5.0	5.5	A
29	2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine	1079	1455	nutty, coffee, earthy	3.5	3.5	A
VI	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	1083	1471	nutty, soy powder, coffee, chocolate	7.0	7.0	B
30	diallyl disulfide	1086	1491	sulfuric, garlic	4.0	2.5	A
33	linalool	1101	1551	floral, lemon, sweet	5.0	5.0	A
VII	2-acetyl-2-thiazoline	1111	1781	nutty, popcorn, peanut	6.0	6.0	C
VIII	unknown	1117	1827	welsh onion, sulfuric, spicy	4.5	7.0	
IX	unknown	1132	ND	sesame oil, fatty	3.5	ND	
X	unknown	1147	ND	sulfuric, pungent	6.5	ND	
XI	2,3-diethyl-5-methylpyrazine	1154	1504	nutty, boiled potato, peanut, coffee	5.0	6.5	B
XII	unknown	1164	1545	dry cleaning, earthy, fatty	3.0	5.0	
XIII	unknown	1179	ND	medicinal, chemical	3.0	ND	
XIV	unknown	1187	ND	plastic, gasoline, adhesive tape	7.5	ND	

Table 3-2-6. Continued

No. <sup>a</sup>	compound name	RI <sup>b</sup>		aroma property	log <sub>2</sub> FD <sup>c</sup>		ID <sup>d</sup>
		DB-5MS	DB-WAX		DB-5MS	DB-WAX	
XV	unknown	1192	1721	sesame oil, nutty, pepper, spicy	8.0	6.0	
XVI	unknown	1343	ND	chemical, medicinal	3.0	ND	
XVII	unknown	ND	1386	chemical, spicy	ND	2.5	
XVIII	unknown	ND	1439	coffee, burnt	ND	9.0	
XIX	unknown	ND	1448	floral, sweet, fatty	ND	3.5	
XX	unknown	ND	1573	soy sauce, boiled potato, nutty	ND	3.5	
XXI	unknown	ND	1596	fatty, meaty	ND	3.0	
XXII	unknown	ND	1609	burnt, sulfuric, nutty	ND	5.0	
XXIII	unknown	ND	1689	burnt, cooked rice, nutty	ND	4.0	
XXIV	unknown	ND	1735	fatty, meaty	ND	2.0	
XXV	unknown	ND	2056	yogurt, sweet	ND	4.0	

*a* Numbers correspond to those in Table 6-3. Roman numerals represent unknown compounds.

*b* Retention indices were determined using *n*-paraffins C5C22 as external references.

*c* Averages of log<sub>2</sub> (flavor dilution factor) by two panelists.

*d* Identification: A, mass spectrum, retention index, and aroma property were consistent with those of an authentic standard; B, retention index and aroma property were consistent with those of an authentic standard; C, retention index and aroma property were consistent with those in the literature (Rychlik et al., 1998).

*e* Not detected.

나. 초진공승화법에 의한 불고기 풍미성분의 동정 (high vacuum sublimation, HVS)

1) 초진공승화법에 의한 불고기 휘발성 성분의 GC/MS분석

Table 3-2-7은 두개의 다른 컬럼 (DB-5ms and DB-WAX)에서 HVS-GC-MS에 의해 동정된 60개의 물질들을 보여주고 있다. 25개의 Terpene-hydrocarbon류, 9개의 황화합물, 8개의 pyrazine류, 4개의 carbonyl류, 8개의 alcohol류, 3개의 acid류 그리고 4개의 miscellaneous compound로 나타났다. 이들 중 terpene류와 황화합물은 각각 53%와 27%를 차지하는 중요물질로 나타났다. 대부분의 terpene류는 불고기양념의 더해진 과일, 야채, 향신료에 의한 것으로 보이며,  $\beta$ -caryophyllene (no. 12)이 가장 많은 양을 차지하며 그 뒤를  $\beta$ -phellandrene (no. 7)과  $\alpha$ -copaene (no. 10)이 차지했다. 그러나 이들 terpene류는 황화합물이나 질소 함유 물질에 비해 역치값이 매우 높아 불고기의 풍미에는 영향이 적은 것으로 여겨진다.

황 화합물은 고기나 고기관련식품의 풍미연구(Hirai et al., 1973; Liebich et al., 1972; Mottram, 1991; Mussinan and Katz, 1973) 에서 많이 동정될 뿐 아니라 마늘, 양파, 같은 *Allium* species의 중요풍미성분 (Kim et al., 1995; Kuo and Ho, 1992; Schulz et al., 1998; Yu et al., 1989)으로 알려졌다. 본 실험에서도 diallyl disulfide (no. 26), allyl propyl disulfide (no. 27), dipropyl disulfide (no. 28), cis-propenyl propyl disulfide (no. 29), allyl methyl trisulfide (no. 30), 2-vinyl-[4H]-1,2-dithiin (no. 31), 2-vinyl-[4H]-1,3-dithiin (no. 32), allyl trisulfide (no. 33)와 dipropyl trisulfide (no. 34)와 같은 황화합물이 동정되었다. 황화합물 중 가장 많은 양을 차지한 diallyl disulfide는 마늘에서 동정되는 물질이기도 하다 (Kim et al., 1995; Yu et al., 1989). Maillard 반응 (Elmore et al., 1999)에 의해 생성되어지는 pyrazine류는 불고기에서 8개가 동정되었고, 이중 2,6-dimethyl pyrazine이 가장 많은 양을 차지했다. Carbonyl들 중 3-hydroxy-2-butanone, phenylacetaldehyde, neral과 gernanial이 불고기에서 동정되었다. 이 중 canned beef stew (Peterson et al., 1975)과 boiled beef (Hirai et al., 1973)에 동정되었던 3-hydroxy-2-butanone (acetoin)이 가장 많은 양을 차지했다. Alcohol류는

furfuryl alcohol, guaiacol, linalool, borneol, terpinen-4-ol, geraniol, 1-undecanol 과 citronello이 동정되었다. 이 중 guaiacol이 가장 많은 양을 차지하였다. Acid류 에서 동정된 acetic acid와 butyric acid는 meat patties (kerler and Grosch, 1996) 에서 동정된 물질이기도 하다. 또한 2-acetylpyrrole, dodecane, caryophyllene oxide와 cis sabinene hydrate도 동정되었다.

Table 3-2-7. Volatile compounds of bulgogi by HVS-GC-MS

No. <sup>a</sup>	compound name	RI <sup>b</sup>		peak area(%)		ID <sup>c</sup>
		DB-5ms	DB-WAX	DB-5ms	DB-WAX	
Terpene-Hydrocarbon						
1	$\alpha$ -pinene	927	ND <sup>d</sup>	1.04	ND	A
2	camphene	943	1031	1.75	1.38	A
3	sabinene	967	1102	0.40	0.83	C
4	$\beta$ -terpinene	970	ND	0.49	ND	A
5	$\beta$ -pinene	988	ND	0.56	ND	A
6	$\delta$ -3-carpinene	1004	1125	2.09	2.12	B
7	$\beta$ -phellandren	1029	1184	7.29	6.35	B
8	$\delta$ -elemene	1330	ND	1.50	ND	B
9	$\alpha$ -cubebene	1340	ND	0.27	ND	B
10	$\alpha$ -copaene	1370	1469	2.95	2.92	B
11	$\beta$ -cubebene	1380	ND	0.39	ND	B
12	$\beta$ -caryophyllene	1421	1575	27.89	25.85	A
13	$\beta$ -guaiene	1428	ND	0.26	ND	B
14	$\alpha$ -humulene	1447	1634	1.14	0.52	B
15	aromadendrene	1450	ND	0.11	ND	B
16	germacrene D	1471	ND	0.34	ND	B
17	$\alpha$ -curcumene	1476	1746	0.28	0.40	B
18	$\beta$ -selinene	1480	1685	0.62	0.36	B
19	$\alpha$ -selinene	1487	ND	0.75	ND	B
20	zingiberene	1489	ND	0.37	ND	B
21	farnesene	1503	ND	1.47	ND	B
22	$\delta$ -cadinene	1511	1725	0.32	0.27	B
23	$\beta$ -sesquiphellandrene	1519	1742	0.98	1.19	B

Table 3-2-7. continued

No <sup>a</sup>	compound name	RI <sup>b</sup>		peak area(%)		ID <sup>c</sup>
		DB-5ms	DB-WAX	DB-5ms	DB-WAX	
24	β-phellandrene	ND	1184	ND	6.35	B
25	β-bisabolene	ND	1703	ND	0.42	B
Sulfur-containing compounds						
26	diallyl disulfide	1085	1461	21.15	21.03	A
27	allyl propyl disulfide	1093	1404	1.24	0.66	A
28	dipropyl disulfide	1107	1353	1.19	1.66	A
29	cis-propenyl propyl disulfide	1113	ND	0.96	ND	B
30	allyl methyl trisulfide	1131	ND	0.10	ND	B
31	2-vinyl- [4H] -1,2-dithin	1179	ND	0.20	ND	C
32	2-vinyl- [4H] -1,3-dithin	1206	1943	0.82	0.68	C
33	allyl trisulfide	1295	1750	1.40	1.01	C
34	dipropyl trisulfide	1319	ND	0.33	ND	C
Pyrazines						
35	2-methyl pyrazine	825	1252	0.43	0.91	A
36	2,6-dimethyl pyrazine	911	1317	1.50	0.26	A
37	2-ethyl-6-methyl pyrazine	993	1372	0.14	0.13	A
38	trimethyl pyrazine	998	1394	0.47	0.25	A
39	2-acetyl-3-methyl pyrazine	1118	ND	0.22	ND	C
40	2,5-dimethyl pyrazine	ND	1311	ND	0.28	A
41	2-ethyl-5-methyl pyrazine	ND	1378	ND	0.09	A
42	2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine	ND	1435	ND	0.14	A
Carbonyls						
43	3-hydroxy-2-butanone	711	1269	2.91	3.09	B
44	phenylacetaldehyde	1038	ND	0.31	ND	A
45	neral	1237	1661	0.95	0.81	B
46	geranial	1269	1714	1.65	1.45	B
Alcohols						
47	furfuryl alcohol	854	1647	1.08	1.26	A
48	Guaicol	1086	1832	0.61	0.27	A
49	linalool	1105	1541	1.47	0.69	A
50	borneol	1170	ND	0.39	ND	A

Table 3-2-7. continued

No. <sup>a</sup>	compound name	RI <sup>b</sup>		peak area(%)		ID <sup>c</sup>
		DB-5ms	DB-WAX	DB-5ms	DB-WAX	
51	terpinen-4-ol	1178	1584	0.52	0.56	A
52	geraniol	1253	ND	0.15	ND	A
53	1-undecanol	1377	ND	0.27	ND	B
54	citronellol	ND	1754	ND	0.11	A
Acids						
55	acetic acid	ND	1406	ND	4.61	A
56	butyric acid	ND	1605	ND	0.46	A
Miscellaneous						
57	2-acetylpyrrole	1069	1943	0.61	0.40	A
58	dodecane	1198	ND	0.17	ND	A
59	caryophyllene oxide	1570	ND	0.26	ND	B
60	cis-sabinene hydrate	ND	1536	ND	0.19	C

<sup>a</sup> Numbers correspond to those in Table 3-2-8.

<sup>b</sup> Retention indices were determined using *n*-paraffins C5-C22 as external references.

<sup>c</sup> Identification: A, mass spectrum and retention index were consistent with those of an authentic standard; B, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (Hewlett-Packard Co., 1995), and retention index was consistent with that of literature (Kondjoyan and Berdagu, 1996; Acree and Ahn, 1997; Rychlik et al., 1998); C, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database (tentative identification).

<sup>d</sup> Not detected

## 2) 초진공승화법에 의한 불고기 휘발성 성분의 GC/O분석

Table 3-2-8은 HVS-GC-O의한 불고기의 향기활성성분과 향기특성을 보여주고 있다. 불고기의 각 향기활성성분의 불고기 풍미에의 기여도를 실험하기 위해 AEDA (Grosch, 1993)이 이용되었다. 총 31개의 향기활성성분이 두 가지 다른 극성을 가진 컬럼 (DB-5ms and DB-WAX)에서 동정되었다. 이중 8개 (no. 55, 43, 56, 36, 44, 42, 49, and 28)은 GC/MS에 의해 동정된 물질이었고 9개 (no. I, IV, V, VIII, X, XI, XII, XV and XVIII)은 RI값, 향의 특성, 그들의 authentic standard를 통한 비교와 문헌 (Acree and Ahn, 1997;Kondjoyan and Berdague, 1996;

Rychlik et al., 1998)을 통해 동정되었다. methional, 2-acetyl-2-thiazoline, furaneol, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2-isobutyl-2-methoxypyrazine, 2-acetyl-1-pyrroline, 1-octene-3-one, acetylpyrazine, linalool, phenylacetaldehyde와 allylmercaptan이 높은 flavor dilution (FD) factor를 가지는 것으로 나타났다.

Methional (no. IV, boiled potato-like/soy sauce-like)은 methionin이 Strecker degradarion (Lindsay and Rippe, 1986)에 의해 생성된 물질로써 실험한 두 가지 컬럼 (DB-5ms, DB-WAX)에서 가장 높은 FD factor ( $\log_3FD=8$ )를 가진 황 화합물로 나타났다. methional은 boiled potato (Mutti and Grosch, 1999), french fries (Wagner and Grosch, 1997), boiled beef (Kerscher and Grosch, 1997), roasted beef (Cerny and Grosch, 1992), stewed beef (Guth and Grosch, 1994)와 roasted sesame seeds (Schieberle, 1996)와 같은 많은 식품에서 동정되었다. 비록 이는 GC/MS에서 동정되지 않았지만 낮은 역치값( $0.063\mu\text{g}/\ell$  in air), (Van Gemert, 1999)에 의해서 풍미에 큰 영향을 미치는 것으로 보인다. 방향족 황화합물인 2-acetyl-2-thiazoline (no. XII, nutty/popcorn-like/peanut-like)은 FD factor 7 (DB-WAX)과 8(DB-5ms)로 높은 값을 나타냈다. 이 물질은 cysteamine과 2-oxopropanal의 반응 (Hofmann and Schidberle, 1995)에 의해 생성된 물질로써 roasted beef (Cerny and Grosch, 1992), stewed beef (Guth and Grosch, 1994)과 boiled beef (Kerscher and Grosch, 1997)에서 key aroma compound로 동정되었다. 황화합물인 allyl mercaptan (no. I, welsh onion-like/garlic-like)과 dipropyl disulfide (no. 28, welsh onion-like/onion-like)은 낮은 FD factor를 나타냈다. 그러나 allyl mercaptan은 SPME-GC-O를 이용한 실험에서는 가장 높은 flavor dilution (FD) factor를 나타냈는데 이는 다른 추출방법에 따른 수율의 차이인 것으로 보인다.

Pyrazine류 중 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (no. 42 coffee-like/nutty/toasted laver-like), 2-isobutyl-2-methoxypyrazine (no. XV, bell pepper-like/metallic/earthy)과 2-acetylpyrazine (no. X, nutty/cooked rice-like)가 높은 FD factor를 보였지만 오직 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine만 GC/MS에 의해 동정할 수 있었다. 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine은 roasted beef (Cerny and Grosch, 1992)와 french fries (Wagner and Grosch, 1997)에서

3-isobutyl-2-methoxypyrazine은 french fries (Wagner and Grosch, 1997), french beans (Hinterholzer et al., 1998)과 boiled potatoes (Mutti and Grosch, 1999)에서 2-acetylpyrazine은 popcorn (Schieberle, 1991)과 french fries (Wagner and Grosch, 1997)에서 향기활성성분으로 보고 되었다.

Furaneol (no. XI, caramel-like/sweet)은 두개의 다른 극성 컬럼 (DB-5ms, DB-WAX)에서 높은 FD factor (DB-5MS ;  $\log_3$  FD=7, DB-WAX ;  $\log_3$  FD=7)를 나타냈다. 이 물질은 roasted beef (Cerny and Grosch, 1992)의 character impact compound로 보고된 물질로 hexose (e.g. glucose or fructose)의 Maillard reaction에 의해 생성되는 것으로 불안정한 것으로 알려졌다(Macleod, 1998).

2-Acetyl-1-pyrroline (no. V, nutty/cooked rice-like/bread crust-like), phenylacetaldehyde (no. 44, hyacinth/honey-like), linalool (no. 49, floral/sweet)과 1-octen-3-one (no. VIII, metallic/mushroom-like/earthy)은 각각 popcorn (Schieberle, 1991), honey (McGorin, 2002), orange (Ahmed et al., 1979)과 mushroom (Whitfield and Last, 1991)에서 향기활성물질로 보고 되었다.

즉, 불고기의 주요향기활성물질로는 methional, furaneol, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2-acetyl-2-thiazoline, 3-isobutyl-2-methoxy pyrazine, acetylpyrazine, linalool, phenylacetaldehyde, 1-octen-3-one과 2-acetyl-1-pyrroline으로 나타났다.

Table 3-2-8. Aroma active compounds of bulgogi by HVS-GC-O

no. <sup>a</sup>	Compound name	RI <sup>b</sup>		Aroma description	log <sub>3</sub> FD <sup>c</sup>		Id <sup>d</sup>
		DB-5ms	DB-WAX		DB-5ms	DB-WAX	
I	allyl mercaptan	<700	<1000	bulgogi-like, garlic-like	3	3	B
55	acetic acid	<700	ND	vinegar-like, sour, kimchi juice-like	3	NDe	A
43	3-hydroxy-2-butanone (acetoin)	724	ND	sulfuric, gas-like, buttery	1	ND	C
56	butanoic acid	812	1633	cheese-like, nasty	2	3	A
II	unknown	868	ND	medicinal, chemical	4	ND	
III	unknown	887	ND	garlic-like	5	ND	
36	2,6-dimethyl-pyrazine	899	1315	nutty, peanut-like	3	1	A
IV	methional	906	1456	boiled potato-like, soy sauce-like	8	8	A
V	2-acetyl-1-pyrroline	921	1330	nutty, cooked rice, bread crust-like	4	6	D
VI	unknown	946	1681	gasoline-like, bean curd, nutty	4	6	
VII	unknown	975	1506	rubbery, plastic-like	4	7	
VIII	1-octene-3-one	983	1254	metallic, mushroom-like, earthy	5	5	B
IX	unknown	1016	ND	tosted laver-like, oily	5	ND	

Table 3-2-8. continued

no. <sup>a</sup>	Compound name	RI <sup>b</sup>		Aroma description	log <sub>3</sub> FD <sup>c</sup>		Id <sup>d</sup>
		DB-5ms	DB-WAX		DB-5ms	DB-WAX	
X	2-acetylpyrazine	1025	1644	nutty, cooked rice-like	6	6	B
44	phenylacetaldehyde	1048	1653	hyacinth, honey-like	4	6	A
XI	furaneol	1062	2044	caramel-like, sweet	7	7	B

<sup>a</sup> Numbers correspond to those in Table 3-2-7. Roman numbers represent the compounds which were not detected by GC-MS.

<sup>b</sup> Retention indices were determined using *n*-paraffins C5C22 as external references.

<sup>c</sup> log<sub>3</sub> (flavor dilution factor).

<sup>d</sup> Identification: A, mass spectrum, retention index, and aroma property were consistent with those of an authentic standard; B, retention index and aroma property were consistent with those of an authentic standard; C, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (Hewlett-Packard Co., 1995), retention index and aroma property were consistent with that of literature (Kondjoyan and Berdagu, 1996; Acree and Ahn, 1997; D, retention index and aroma property were consistent with those in the literature (Acree and Ahn, 1997). <sup>e</sup> Not detected.

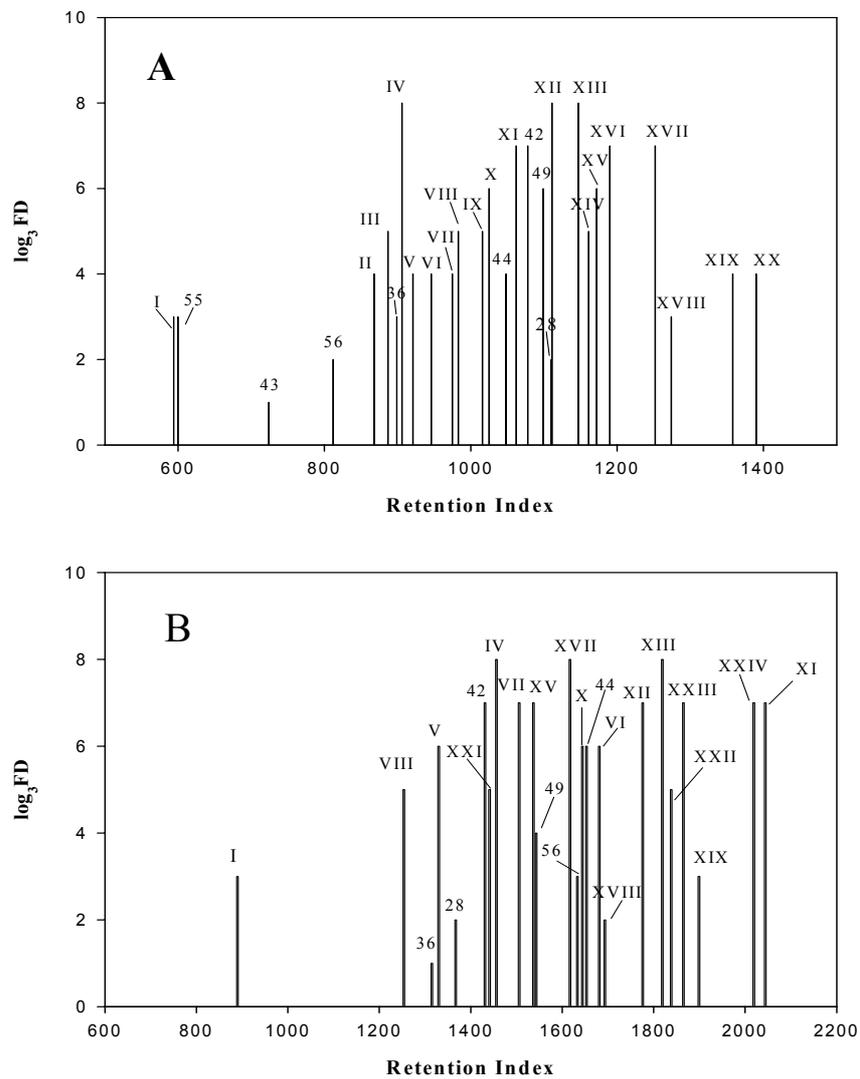


Figure 3-2-2. Flavor dilution chromatograms of bulgogi on DB-5MS column (A) and DB-WAX column (B). Numbers correspond to those in Table 3-2-8.

다. 불고기 향기활성성분의 역치값

불고기의 향기활성성분의 역치값을 구하기 위한 관능검사 방법으로 이점검사 (paired comparison test)를 시행하였다. 이점검사는 패널들에게 2개의 시료를 제시한 후 두 시료 간에 차이를 구별하는 실험이었다. 이는 다른 방법에 비해 적은 시료가 필요하면서 더 민감한 방법으로 알려진 방법이다 (O'Mahony, 1986). 불고기의 대부분의 향기성분들이 지방층에 있다고 가정하여 matrix로 sunflower oil을 이용하였다. Table 3-2-18은 이점검사에 의해 향기활성성분의 역치값을 결정하는 표이다. table은 본 실험에서 결정된 역치값과 문헌에 나와 있는 역치값을 비교한 표이다.

Table 3-2-9. Determination of odor threshold values of methional by paired comparison test

concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	No. of correct judgements	% correct judgement
0.01	7	47
0.02	10	67
0.04	10	67
0.08	12	80
0.15	13	87
0.32	12	80
0.63	15	100
1.25	15	100
2.50	15	100
5.00	15	100

GC/O 실험에서 가장 높은 FD factor (DB-5ms ;  $\log_3\text{FD}=8$ , DB-WAX ;  $\log_3\text{FD}=8$ )을 나타낸 methional은 실험을 진행한 9개 중 가장 낮은 역치값을 나타냈다. 반면 가장 낮은 FD factor (DB-5MS ;  $\log_3\text{FD}=6$ , DB-WAX ;  $\log_3\text{FD}=4$ )를 나타낸 linalool은 가장 높은 역치값을 나타냈다.

2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, linalool과 phenylacetaldehyde를 제외한 불고기의 향기활성성분이 GC/MS에서 동정되지 않는 이유는 그것의 낮은 역치값과 관련

이 있는 것으로 보인다. 참고 문헌과 비교했을 때 methional, furaneol, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine과 3-isobutyl-2-methoxypyrazine은 더 낮게 나타났다. 이는 관능검사 방법의 차이, 실험에 참여한 패널과 환경등에 기인한 것으로 보인다. 또한 oil에서의 phenylacetaldehyde, linalool과 allylmercatan은 본 실험에서 처음으로 보고 되었다.

Table 3-2-10. Determination of odor threshold values of furaneol by paired comparison test

concentration( $\mu\text{g/L}$ )	No.ofcorrectjudgements	%correctjudgement
0.39	7	47
0.78	8	53
1.56	11	73
3.13	8	53
6.25	13	87
12.50	13	87
25.00	14	93
50.00	15	100
100.00	15	100
200.00	15	100

Table 3-2-11. Determination of odor threshold values of 3-isobutyl-2-methoxy pyrazine by paired comparison test

concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	No. of correct judgements	% correct judgement
0.02	9	60
0.04	11	73
0.08	12	80
0.15	8	53
0.31	14	93
0.61	13	87
1.23	14	93
2.45	15	100
4.90	15	100

9.80

15

100

Table 3-2-12. Determination of odor threshold values of phenylacetaldehyde by paired comparison test

concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	No. of correct judgements	% correct judgement
0.30	8	53
0.61	8	53
1.22	10	67
2.44	6	40
4.89	7	47
9.78	10	67
19.56	9	60
39.11	10	67
78.23	15	100
156.45	15	100

Table 3-2-13. Determination of odor threshold values of linalool by paired comparison test

concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	No. of correct judgements	% correct judgement
0.35	8	53
0.70	11	73
1.40	6	40
2.79	10	67
5.59	11	73
11.18	7	47
22.35	10	67
44.70	10	67
89.40	12	80
178.80	14	93

Table 3-2-14. Determination of odor threshold values of 2-acetylpyrazine by paired comparison test

concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	No. of correct judgements	% correct judgement
0.39	8	53
0.78	8	53
1.56	8	53
3.13	7	47
6.25	10	67
12.50	12	80
25.00	15	100
50.00	14	93
100.00	15	100
200.00	15	100

Table 3-2-15. Determination of odor threshold values of allylmercaptan by paired comparison test

concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	No. of correct judgements	% correct judgement
0.02	6	40
0.04	5	33
0.08	8	53
0.15	11	73
0.32	14	93
0.63	12	80
1.25	12	80
2.50	15	100
5.00	15	100
10.00	15	100

Table 3-2-16. Determination of odor threshold values of 2-ethyl-3,5-dimethyl pyrazine by paired comparison test

concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	No. of correct judgements	% correct judgement
0.10	6	40
0.20	5	33
0.39	9	60
0.78	10	67
1.56	14	93
3.13	14	93
6.25	15	100
12.50	15	100
25.00	14	93
50.00	15	100

Table 3-2-17. Determination of odor threshold values of 1-octen-3-one by paired comparison test

concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	No. of correct judgements	% correct judgement
0.39	8	53
0.78	7	47
1.56	5	33
3.13	7	47
6.25	11	73
12.50	10	67
25.00	11	73
50.00	14	93
100.00	15	100
200.00	14	93

Table 3-2-18. Odor threshold values of potent aroma active compounds of bulgogi in deodorized sunflower oil determined in this study and references

compounds	odor threshold	odor threshold	ref.
	( $\mu\text{g/L}$ )	references ( $\mu\text{g/L}$ )	
methional	0.08	0.2	A
furaneol	6.25	25	A
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	1.56	2.2	B
3-isobutyl-2-methoxypyrazine	0.31	0.8	B
1-octene-3-one	50	10	C
acetylpyrazine	12.5	10	D
linalool	89.4	—	—
phenylacetaldehyde	78.23	—	—
allyl mercaptan	0.32	—	—

A : (Preininger and Grosch, 1994)

B : (Wagner and Grosch, 1998)

C : (Guth and Grosch, 1990)

D : (Schieberle, 1993)

라. 불고기 향기활성성분의 안정성 동위원소법 (SIDA)을 이용한 정량

1) 동위원소법 (SIDA)를 이용한 정량을 위한 standard curve 그리기

acetylpyrazine, linalool과 methional의 정량을 수행하기 위해 standard curve를 완성하였다. standard curve를 정량시 이용할 특정 Ion을 선택하여 GC/MS로 SIM mode에 의해 완성되었다. acetylpyrazine은 unlabeled compound는 122, labeled compound에서 125를 선택하여 그래프를 완성하였다 (figure 3-2-3). linalool에 경우 동위원소로 치환된 internal standard를 이용하지 않았지만 grapefruit juice (Schieberle et al., 2001)와 hand-squeezed orange juices (Schieberle et al., 2001)에서 이용된 적 있는 일반적으로 linalool로 유사한 성질을 나타낸다고 알려진 tetrahydro linalool를 이용하였다. 이 경우 선택한 이온의 양이

상대적으로 작아 linalool은 136과 139, tetrahydro linalool은 140과 143을 선택하여 standard curve를 완성하였다. Methional은 unlabeled compound는 104, labeled compound는 107를 선택하여 standard curve를 완성하였다. x축은 weight ratio로  $[\mu\text{g labeled compounds}/(\mu\text{g labeled compounds} + \mu\text{g unlabeled compounds})]$ 이고, y축은 이에 대응하는 Response ratio로  $[\text{labeled compounds}/\text{unlabeled compounds}]$ 이다. Figure 3-2-6, 7, 8은 label된 acetylpyrazine, methional의 stable isotope와 unlabeled 표준화합물을 이용하여 작성한 standard curve 이다 . Figure 3-2-3, 4, 5는 standard curve를 그리기위해 GC/MS를 이용하여 SIM mode의한 목표물질의 peak를 보여주고 있다 . acetylpyrazine(labeled: 125, unlabeled: 122), linalool(linalool: 136-139, tetrahydro linalool: 140-143)과 methional(labeled; 104, unlabeled: 107)의 특징이온을 선택하여 curve를 완성하였다.

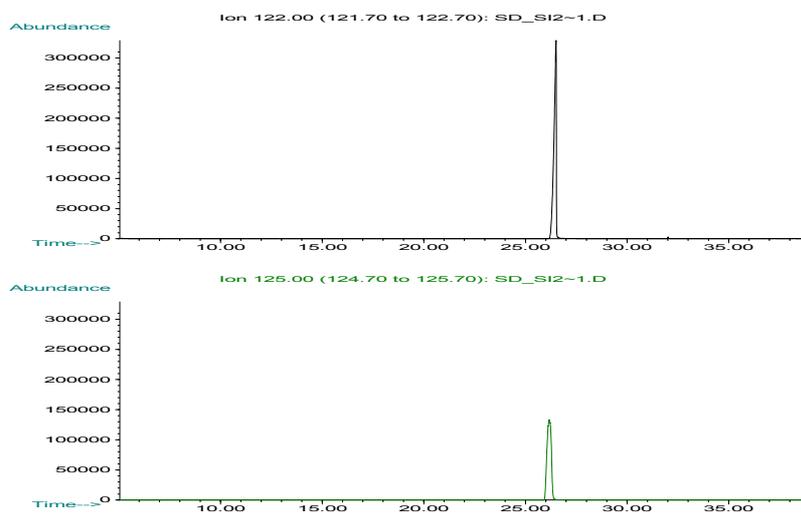


Figure 3-2-3. GC/MS chromatogram of labeled and unlabeled acetylpyrazine recorded at the ion  $m/z$  122 and 125

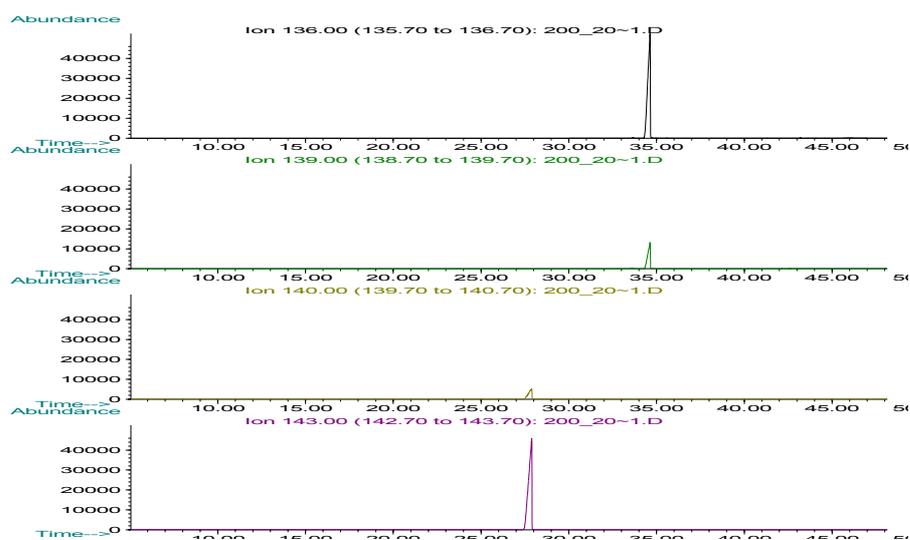


Figure 3-2-4. GC/MS chromatogram of linalool and tetrahydro linalool recorded at the ion  $m/z$  136, 139, 140 and 143.

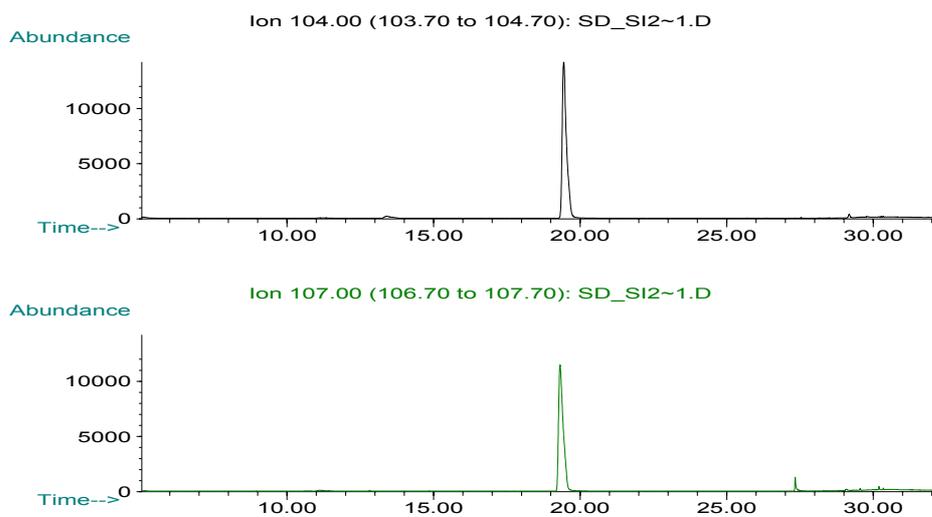


Figure 3-2-5. GC/MS chromatogram of labeled and labeled methional recorded at the ion  $m/z$  104 and 107

### standard curve of acetylpyrazine

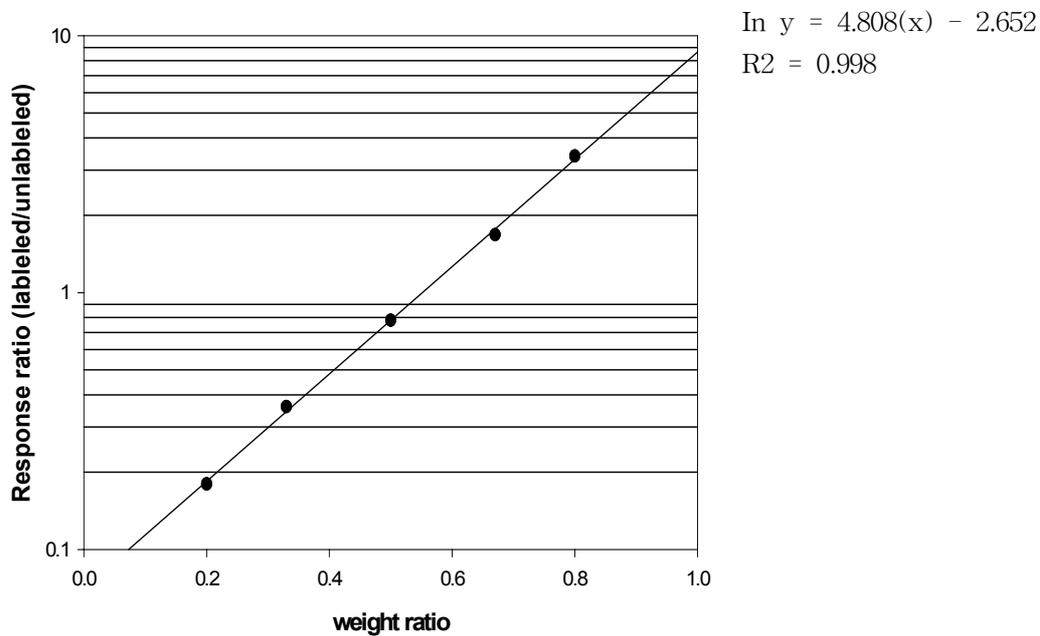
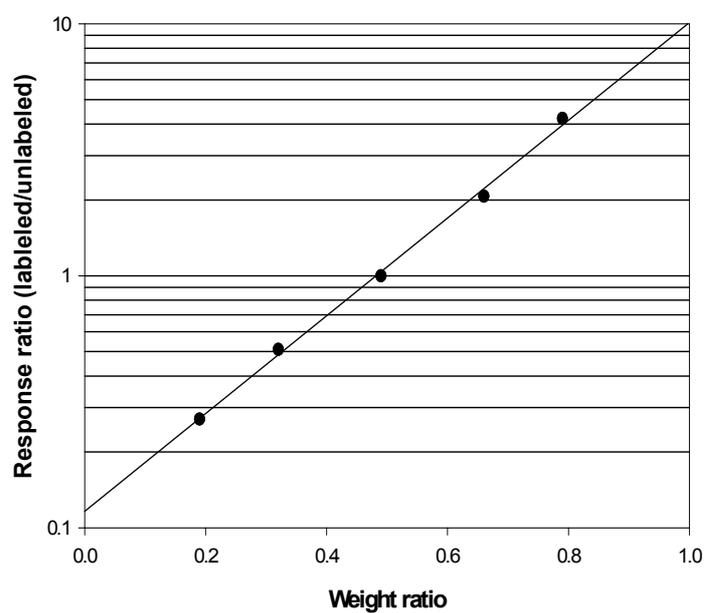


Figure 3-2-6. Standard curve and regression equation for the mass spectrometer response of acetylpyrazine. The ratio of relative abundances of  $m/z$  122/ $m/z$  125 vs. weight ratio [ $\mu\text{g}$  labeled acetylpyrazine/ $\mu\text{g}$  labeled acetylpyrazine +  $\mu\text{g}$  unlabeled acetylpyrazine]

### Standard curve of linalool



$$\ln y = 4.467(x) - 2.152$$
$$R^2 = 0.997$$

Figure 3-2-7. Standard curve and regression equation for the mass spectrometer response of linalool. The ratio of relative abundances of  $m/z$  136-139/ $m/z$  140-143 vs. weight ratio [ $\mu\text{g}$  tetrahydrolinalool/ $\mu\text{g}$  tetrahydrolinalool +  $\mu\text{g}$  linalool]

### standard curve of methional

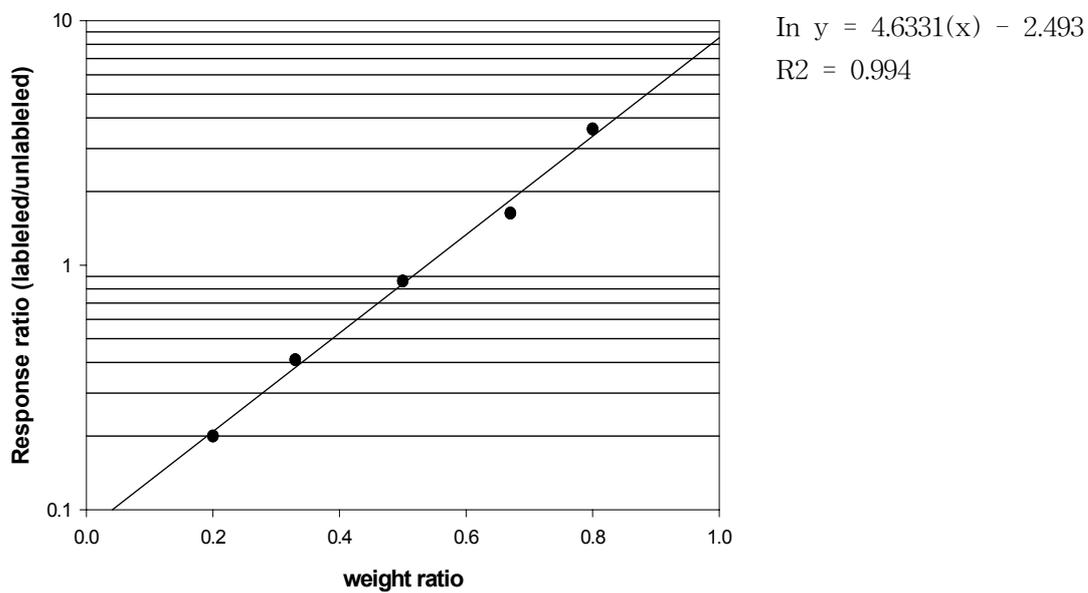


Figure 3-2-8. Standard curve and regression equation for the mass spectrometer response of methional. The ratio of relative abundances of  $m/z$  104/ $m/z$  107 vs. weight ratio [ $\mu\text{g}$  labeled methional/ $(\mu\text{g}$  labeled methional +  $\mu\text{g}$  unlabeled methional)]

## 2) 동위원소 회석 분석법 (SIDA)를 이용한 정량 위한 불고기의 향기활성성분의 분획

동위원소 회석분석법(SIDA)를 적용하기 전에 정량할 목표 물질의 분획이 가장 중요한 부분이라고 할 수 있다. 불고기는 여러 가지 재료를 이용하여 조리한 식품으로 추출물 분석 시 복잡한 형태의 peak 패턴을 보여준다. GC/O에 의해 동정된 불고기의 중요 향기활성성분들은 GC/MS로 peak가 동정될 수 없었다. 그리하여 목표 물질을 농축 및 분리하여 동위원소 회석분석법에 의한 정량을 정확하게 적용하기 위하여 산·염기 분획법, 컬럼 크로마토그래피와 SIM mode를 이용하여 불고기의 향기활성성분들을 분획하였다.

### 가) allyl mercaptan의 분획

회석 분석 분석법을 진행하기 위해서 peak를 다른 peak와 분리해야 하는 작업이 먼저 진행되어야 한다. 불고기의 향기활성성분 중 중요한 allylmercaptan은 HS-SPME 방법로는 분획되는 compound지만 HVS로는 추출 시 사용하는 용매와 같은 시간(retention time, RT)에 분리가 되어 분획이 불가능 하였다. 이를 분획하기 위해 용매를 diethyl ether 대신에 allylmercaptan의 spectrum (Figure 3-2-9) 중 정량에 이용될 ion 74를 가지고 있지 않은 용매 dichloromethane을 이용하여 SIM mode를 이용하여 peak를 분리 하였다. figure는 불고기추출물에서 분리된 allylmercaptan(ion: 74)를 보여주고 있다.

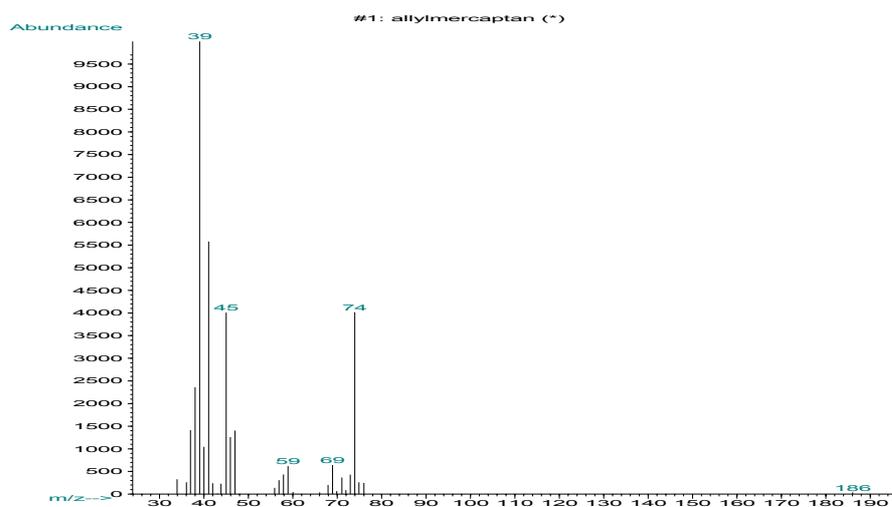


Figure 3-2-9. Mass spectra fragmentation patterns of allyl mercaptan

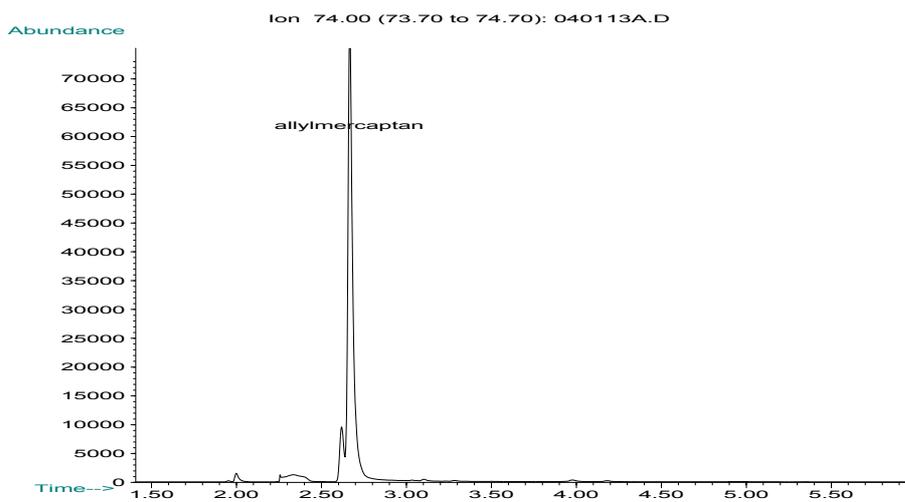


Figure 3-2-10. GC/mass chromatogram of allyl mercaptan in bulgogi extract recorded at the ion m/z 74

나) 산·염기 분획에 의한 불고기 향기활성성분의 분획

불고기의 향기활성성분 중 pyrazine류 (3-isobutyl-2-methoxypyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine)를 분획하기 위하여 산·염기 분획법을 이용하였다. pyrazine류가 염기성을 가지는 점을 이용하여 불고기 추출물에서 산과 염기를 가해 basic fraction만 선택적으로 취할 수 있었다 (figure 3-2-11). Figure 3-2-12는 3-isobutyl-2-methoxypyrazine의 GC/MS에 의한 spectrum과 특정 ion 124에 의해 분리된 모습이고 figure 3-2-14, 15는 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine의 spectrum과 특정 ion 136에 의해 분리된 peak 모습을 보여준다.

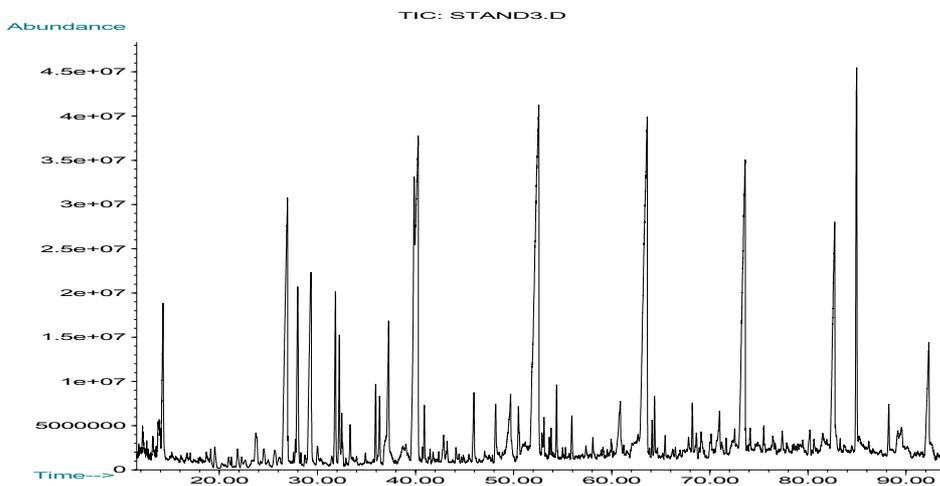


Figure 3-2-11. GC/MS chromatogram of basic fraction in bulgogi

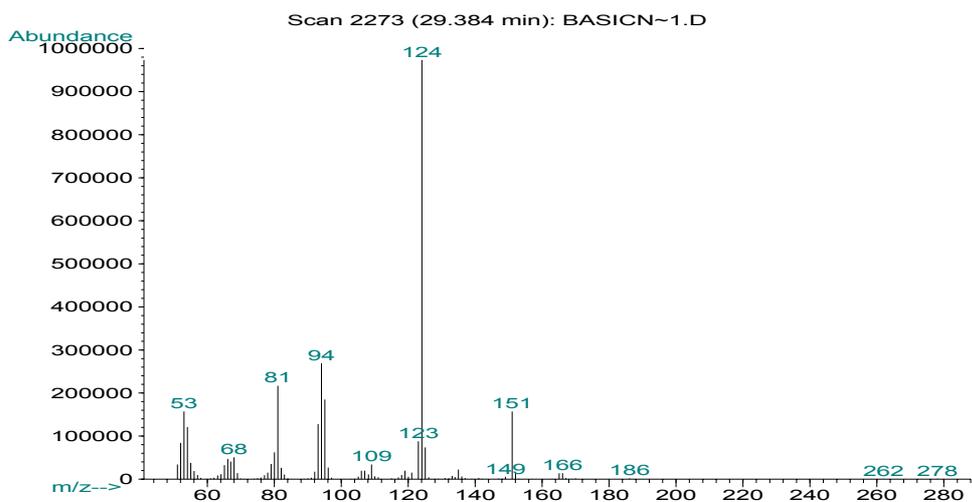


Figure 3-2-12. Mass spectra fragmentation patterns of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine

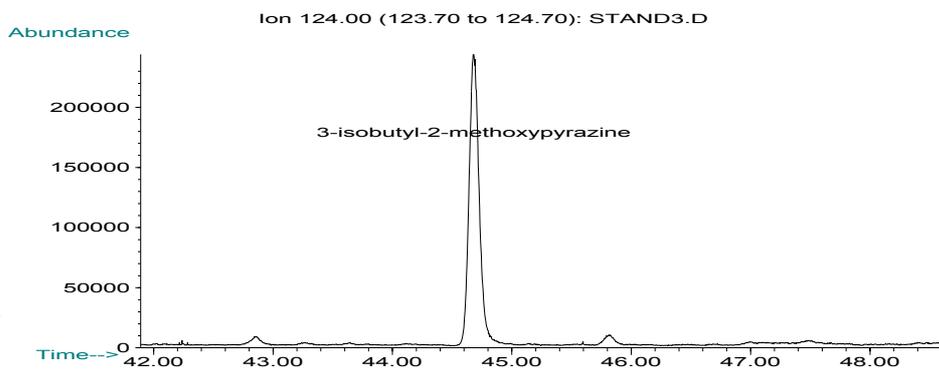


Figure 3-2-13. GC/mass chromatogram of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine in bulgogi extract recorded at the ion m/z 124

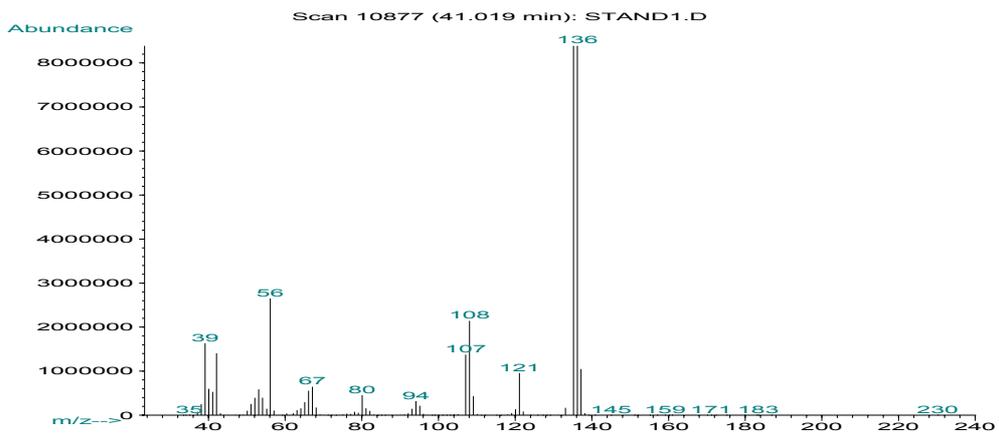


Figure 3-2-14. Mass spectra fragmentation patterns of 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine

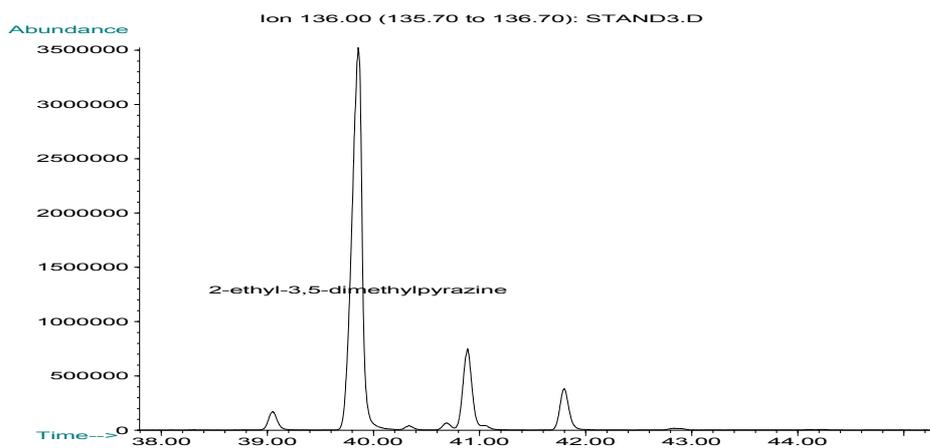


Figure 3-2-15. GC/MS chromatogram of 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine in bulgogi extract recorded at the ion m/z 136

다) 컬럼 크로마토그래피 (column chromatography)에 의한 불고기향기활성성분의 분획

불고기의 향기활성성분들 중 phenylacetaldehyde, 1-octen-3-one, linalool, 2-acetyl-2-thiazoline, methional, acetylpyrazine과 furaneol을 분리하기 위해 column chromatography를 이용하였다. 극성에 따라(fraction A : pentan 50ml; fraction B : pentane 40ml, ether 10ml; fraction C : pentane 30ml, ether 20ml; fraction D : pentane 20ml, ether 30ml; fraction E : pentane 10ml, ether 40ml; fraction F : ether 50ml) 나뉘었는데 대부분이 향기활성성분들은 fraction C-F에 분포하였다. fraction C에서 phenylacetaldehyde와 1-octen-3-one을 분획하여 동정할 수 있었고, fraction D는 linalool, fraction E는 2-acetyl-2-thiazoline, linalool과 methional을 fraction F에서는 acetylpyrazine과 furaneol을 분획하여 동정할 수 있었다. phenylacetaldehyde는 fraction C와 D에서 동정되고, linalool 경우 fraction D와 E 양쪽에서 동정되어 정량 시 두 fraction의 peak 면적의 합이 필요할 것으로 보인다.

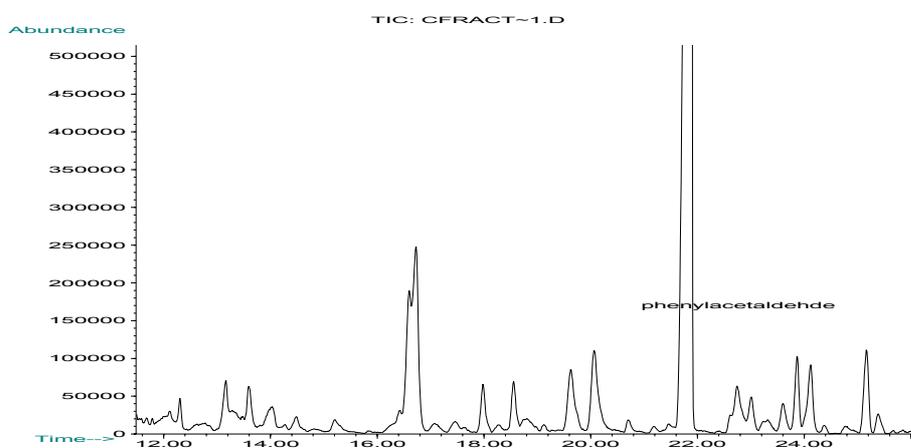


Figure 3-2-16. GC/mass chromatogram of phenylacetaldehyde in fraction C

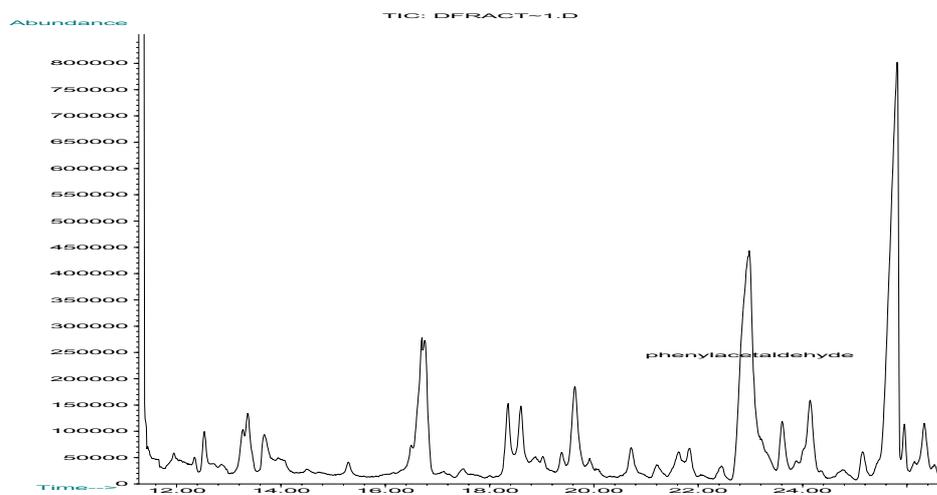


Figure 3-2-17. GC/mass chromatogram of phenylacetaldehyde in fraction D

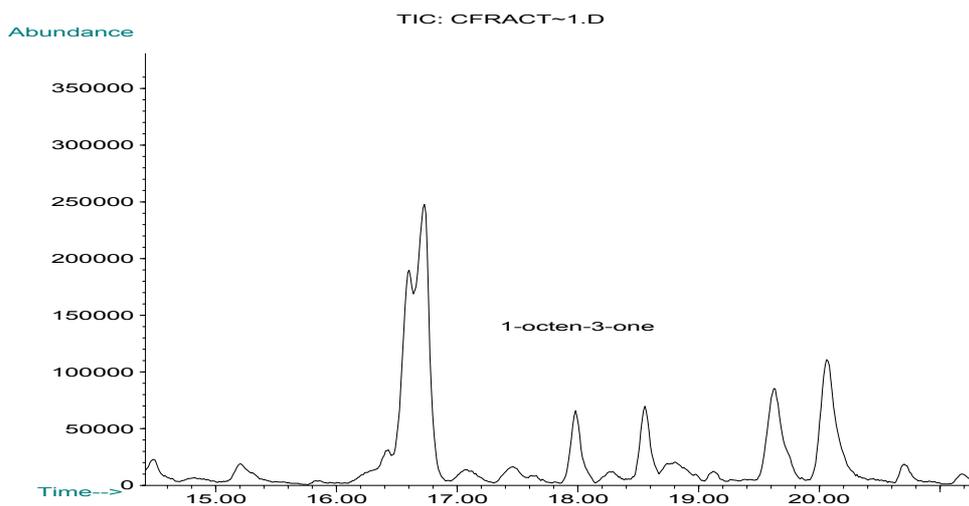


Figure 3-2-18. GC/mass chromatogram of 1-octen-3-one in fraction C

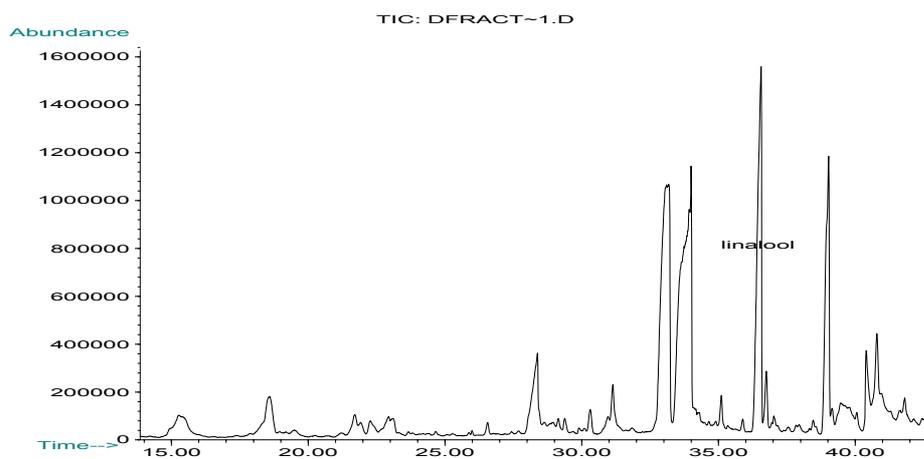


Figure 3-2-19. GC/mass chromatogram of linalool in fraction D

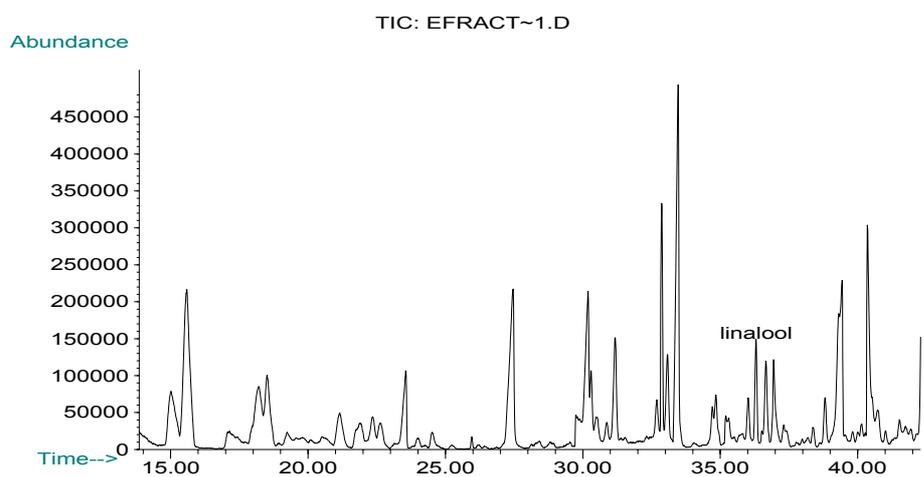


Figure 3-2-20. GC/mass chromatogram of linalool in fraction E

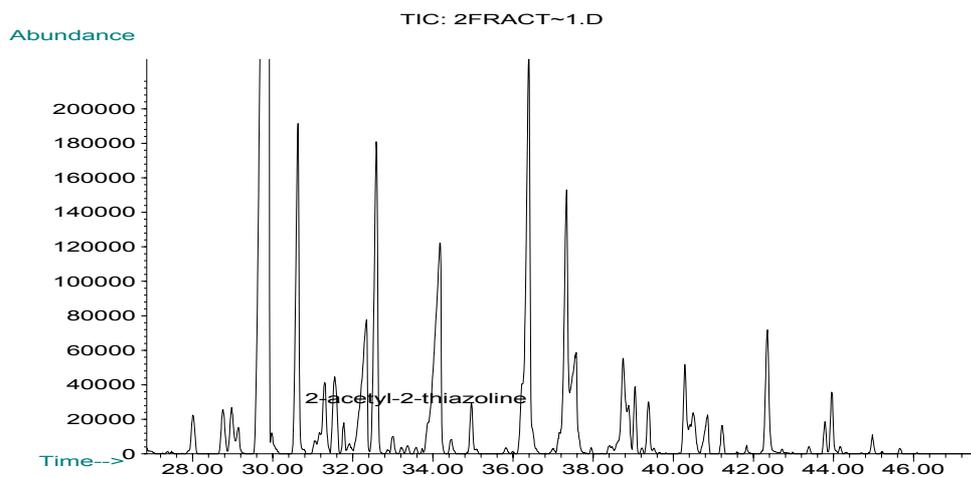


Figure 3-2-21. GC/mass chromatogram of 2-acetyl-2-thiazoline in fraction E

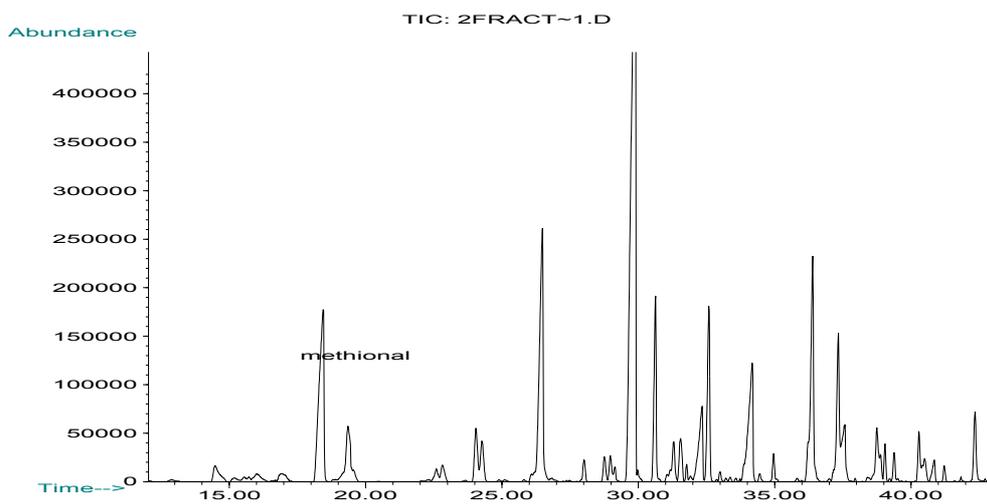


Figure 3-2-22. GC/mass chromatogram of methional in fraction E

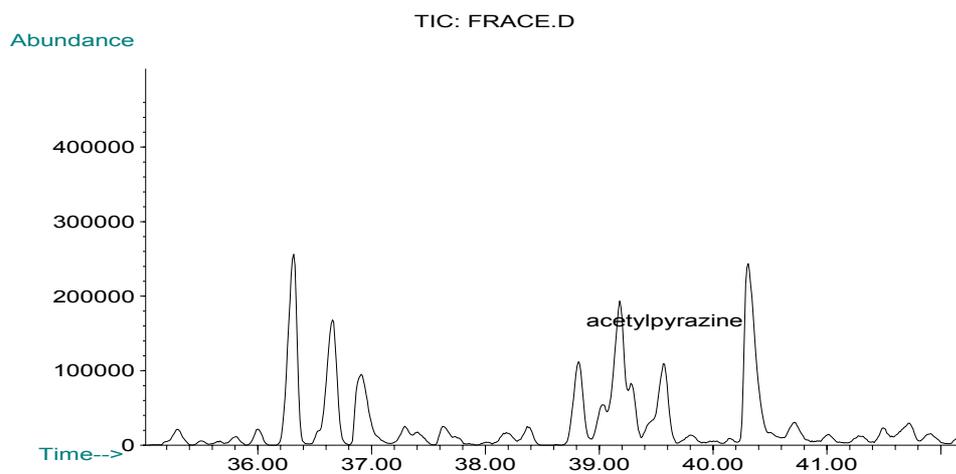


Figure 3-2-23. GC/mass chromatogram of acetylpyrazine in fraction F

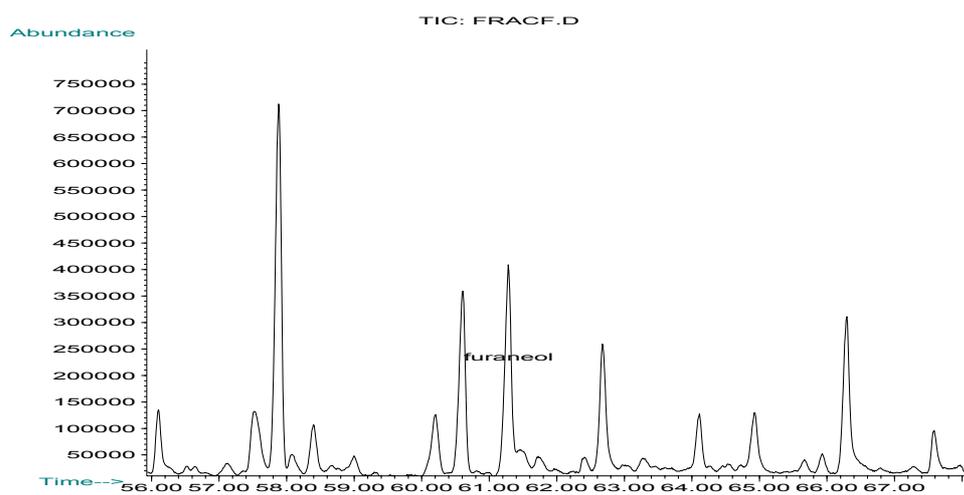


Figure 3-2-24. GC/mass chromatogram of furaneol in fraction F

라) 동위원소 회석법 (SIDA)을 이용한 불고기 향기활성성분 정량

불고기 향기활성성분 중 acetylpyrazine, linalool과 methional를 동위원소 회석법(SIDA)를 이용하여 정량하였다. figure 3-2-(25-30) 은 정량을 목표로 한 물질과 물질을 정량하기 위해 이용된 internal standard의 spectrum을 보여주고 있다. figure 3-2-(25-30)에서 선택한 정량에 이용할 특정 ion과 함께 목표물질의 separation과 resolution을 고려하여 stationary phase를 선택하였다 (table 3-2-19). acetylpyrazine을 정량하기 위해서 unlabeled compound의 ion 122와 labeled compound의 ion 125, linalool은 ion 136-139와 tetrahydro linalool ion 140-143를 methional은 unlabeled compound의 ion 104와 labeled compound의 107를 선택하여 SIM mode에 의해 정량하였다. figure 3-2-31은 불고기의 향기활성성분인 acetylpyrazine을 정량하기위해서 internal standard와 함께 SIM mode의한 chromatogram 이다 . 즉 acetylpyrazine은 96.81 $\mu$ g/kg, linalool은 92.64 $\mu$ g/kg 그리고 methional은 145.47 $\mu$ g/kg으로 3가지 물질 중 methional이 가장 많은 양을 나타냈다.

마) OAVs (odor activity values)

향기활성성분의 상대적인 기여도를 평가하기위해서 물질들의 OAV는 본 실험에서 구해진 역치값을 기준으로 계산되었다 (table 3-2-21). OAV는 동위원소 회석분석법으로 구해진 향기성분의 양에 그 물질의 역치값을 나누어 계산되어졌다.

#### 불고기 향기활성성분의 양

---

#### 불고기 향기활성성분의 역치값

계산된 OAV는 acetylpyrazine 7.74, linalool 1.04과 methional 1818.38로 나타났다. 상대적으로 물질들의 양이 유사한데 비해 OAV가 상당한 차이를 보이는 것은 table 3-2-20에 나타난 것과 같이 methional의 역치값의 영향으로 보인다. 또한 methional의 OAV 결과는 두 컬럼 (DB-5ms, DB-WAX)을 이용한 AEDA에서

가장 높은 FD factor ( $\log_3\text{FD}=8$ )를 나타낸 것과 같은 결과를 보여준다.

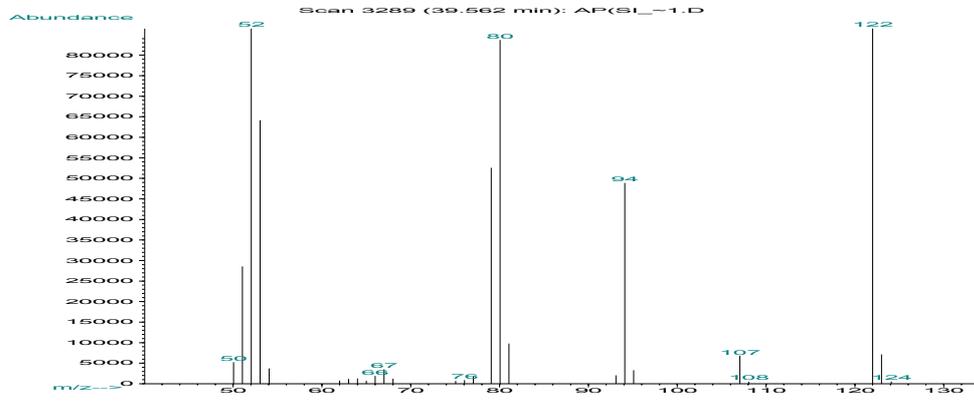


Figure 3-2-25. Mass spectra fragmentation patterns of acetylpiazine

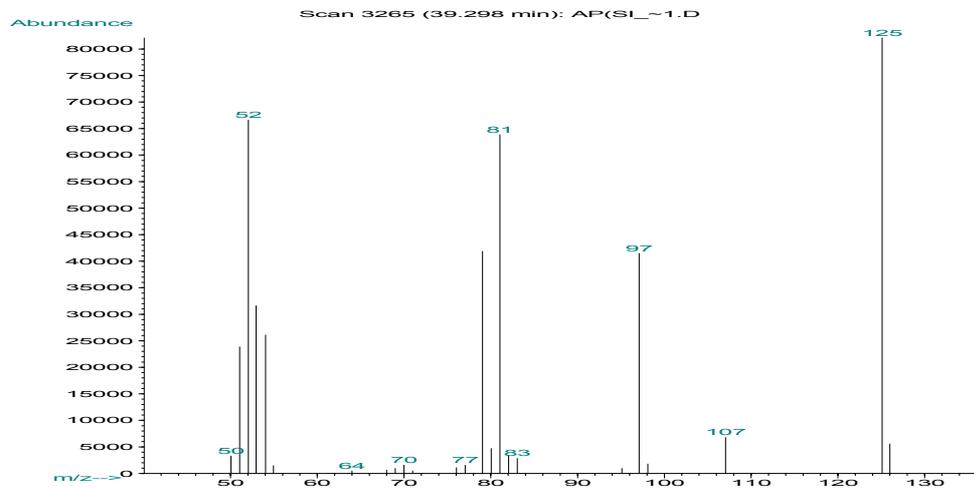


Figure 3-2-26. Mass spectra fragmentation patterns of  $[^2\text{H}]_3$ -acetylpiazine

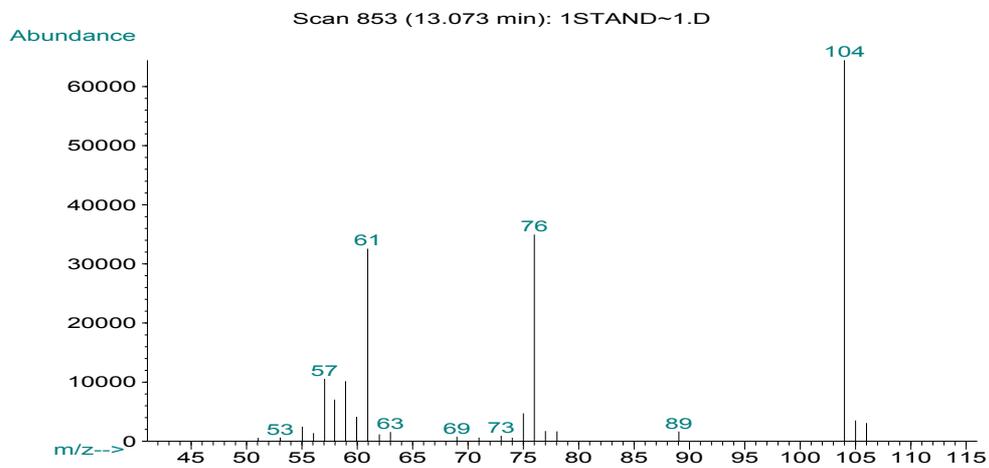


Figure 3-2-27. Mass spectra fragmentation patterns of methional

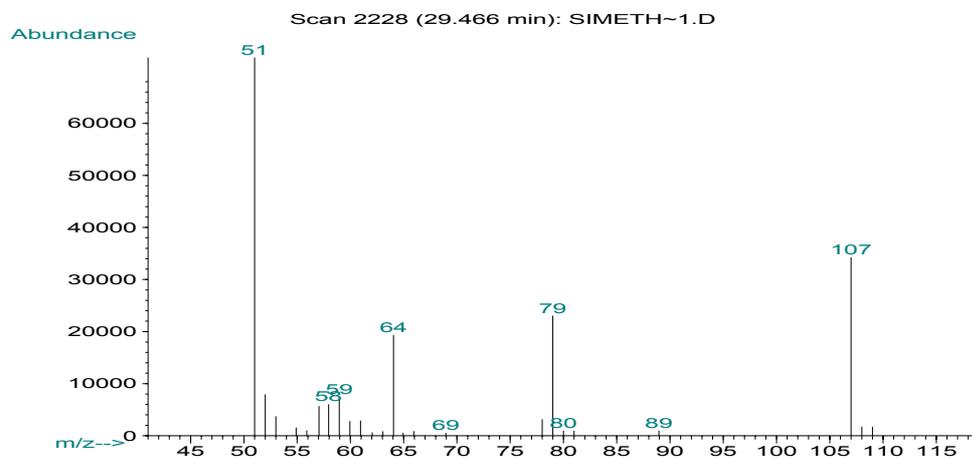


Figure 3-2-28. Mass spectra fragmentation patterns of  $[^2\text{H}]_3$ -methional

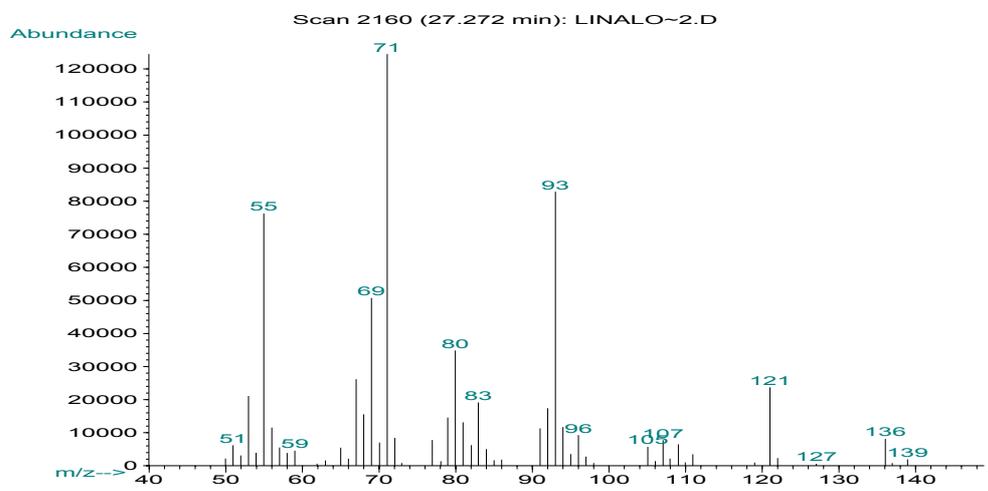


Figure 3-2-29. Mass spectra fragmentation patterns of linalool

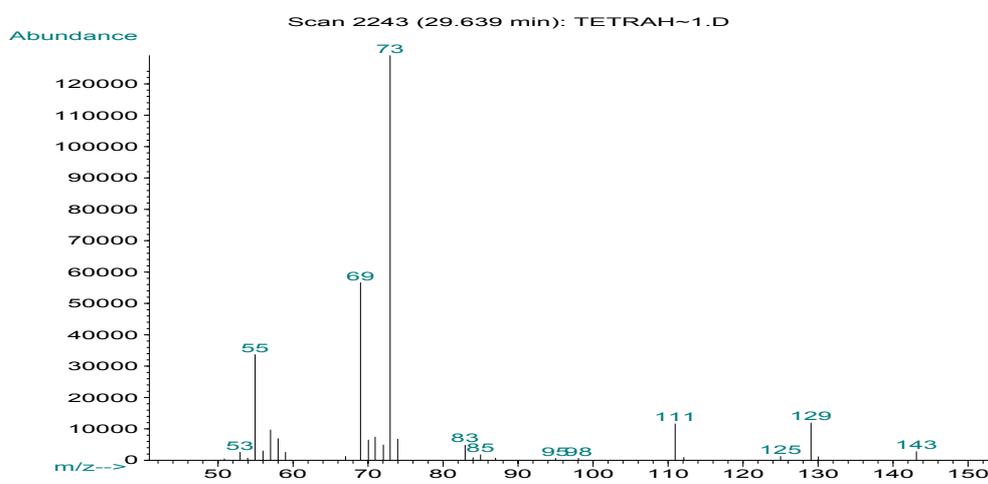


Figure 3-2-30. Mass spectra fragmentation patterns of tetrahydro linalool

Table 3-2-19. Fragment Ions and stationary gas chromatography phases and response factor used in the SIDA

Odorant	No.	Fragment(m/z)	Internal standard	No.	Fragment (m/z)	Stationary Phase	Ionisaion mode
Acetylpyrazine	I	122	<sup>2</sup> H] <sub>3</sub> -Acetylpyrazine	d- I	125	DB-1701	EI
Linalool	II	136-139	Tetrahydro linalool		140-143	DB-FFAP	EI
methional	III	104	<sup>2</sup> H] <sub>3</sub> -Methional	d-III	107	DB-1701	EI

Table 3-2-20. Odor threshold values of potent aroma active compounds of bulgogi in deodorized sunflower oil determined in this study and references

compounds	odorthreshold( $\mu\text{g/L}$ )	odorthresholdreferences ( $\mu\text{g/L}$ )	references
Acetylpyrazine	12.5	10	D
Linalool	89.4	—	—
Methional	0.08	0.2	A

Table 3-2-21. Concentration of potent Odorants of bulgogi

Odorant	Conc <sup>a</sup>	Odor act. values <sup>b</sup>
Acetylpyrazine	96.81 $\mu\text{g/kg}$	7.74
Linalool	92.64 $\mu\text{g/kg}$	1.04
Methioanl	145.47 $\mu\text{g/kg}$	1818.38

<sup>a</sup> Values in micrograms per kilogram of bugogi

<sup>b</sup> The odor activity values were calculated by dividing the concentration by the odor threshold listed in Table 3-2-18

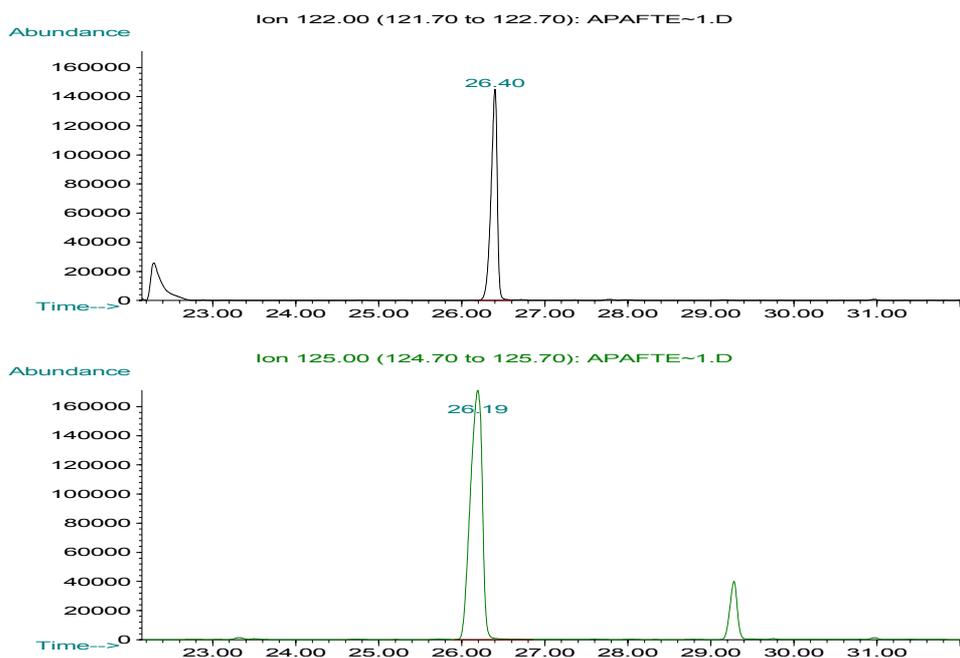


Figure 3-2-31. GC/mass chromatogram of labeled and unlabeled acetypyrazine in bulgogi extract recorded at the ion  $m/z$  122 and 125

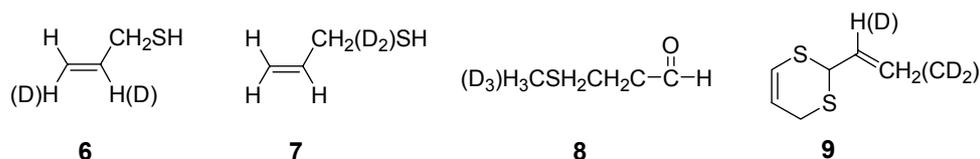
### 제3절 안정성 동위원소 이용 합성법 개발

#### 1. 서론

불고기의 향기활성 성분 중 주요 화합물인 (1) pyrazine 계 화합물 (2,3,5-trimethylpyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2,3-dimethyl-5-methylpyrazine, 2-acetylpyrazine, 2-isobutyl-3-methylpyrazine); (2) sulfur 계 화합물 (allyl mercaptan, methional, 2-vinyl-4H-1,3-dithiin); (3) carbonyl 계 화합물 (benzaldehyde, phenylacetaldehyde, 2-acetyl-1-pyrroline, 2-acetyl-2-thiazoline, 1-hepten-3-one, 1-octen-3-one, butan-2,3-dione, hexan-3,4-dione); (4) alcohol 계 화합물인 linalool의 밀리그램 규모의 합성법을 개발하고 적당한 위치에 중수소가 포함된 화합물을 합성하고자 하였다.

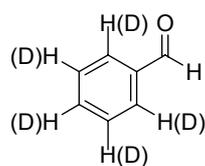
Pyrazine 계 화합물은 1,2-diaminoalkane과 1,2-dicarbonyl 화합물의 축합 반응을 이용하여 pyrazine 골격을 형성하는 경로와 기존의 pyrazine 유도체의 작용기를 전환하는 방법을 이용하여 합성을 시도하였다.

황(sulfur)을 포함하는 화합물들은 6-9와 같은 물질들인데 이중 allylmercaptan과 methional의 FD factor가 높아 불고기 풍미에 중요한 역할을 하는 것으로 예상되어 이들의 합성에 주력하였다. 중수소를 vinyl 탄소에 도입하는 방법과 methylene 탄소에 도입하는 방법을 모두 개발하고자 하였다.

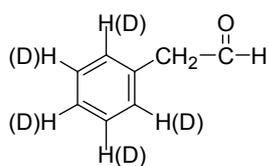


Carbonyl 계 화합물로 11-18과 같은 화합물이 합성 목표 물질로 선정되었다. 이중 benzene 고리를 포함하는 화합물은 hexadeuteriobenzene으로부터 합성할 수 있을 것으로 예상되지만 pyrroline이나 thiazoline의 acetyl 유도체는

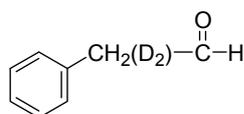
중수소의 도입 위치가 매우 난제였다. 이는 acetyl 그룹의 수소원자들이 쉽게 교환될 수 있기 때문이다. H-D 교환반응은 화합물 12에서도 문제가 될 수 있다. 따라서 우선은 합성이 용이할 것으로 판단되는 deuterioacetyl 유도체를 합성하여 불고기 활성성분 정량에 응용해보고 결과에 따라 안정한 위치에 중수소가 치환된 화합물을 합성하기로 하였다. 화합물 17과 18은 pyrazine 유도체의 합성 출발물질로도 사용되므로 이들의 합성법 개발차원에서 연구가 필요하였다.



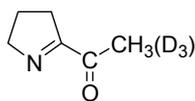
10



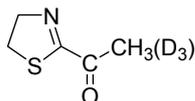
11



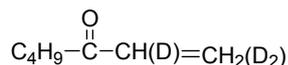
12



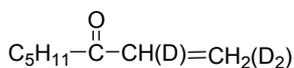
13



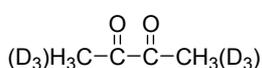
14



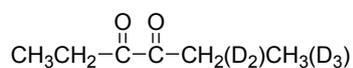
15



16

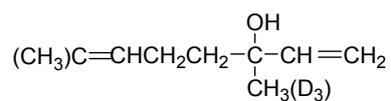


17



18

Alcohol 계 화합물로는 linalool이 유일하게 주요 향기활성 성분으로 밝혀졌기 때문에 이 물질을 합성하는데 주력하였다. Linalool은 일종의 monoterpene계통의 화합물인데 Grignard 시약을  $\alpha,\beta$ -불포화 carbonyl화합물에 Michael 첨가반응을 시켜 2차 알콜을 합성한 후 다시 ketone으로 전환시키고, 동위원소가 치환된 화합물을 만들기 위해서 다시  $CD_3I$ 로부터 얻어 Grignard 시약을 가지고 3차 알콜인 목표물질로 전환하는 과정을 연구하기로 하였다.

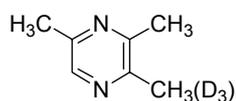


19

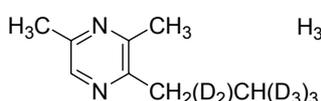
## 2. 연구개발의 내용 및 방법

### 가. Pyrazine 계 화합물의 합성

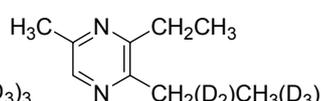
Pyrazine 계 화합물 화합물로는 다음 1-5와 같은 목표물질을 정하여 합성을 시도하였다.



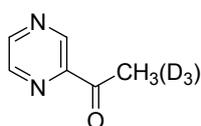
1



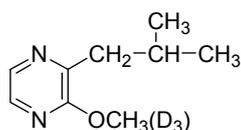
2



3

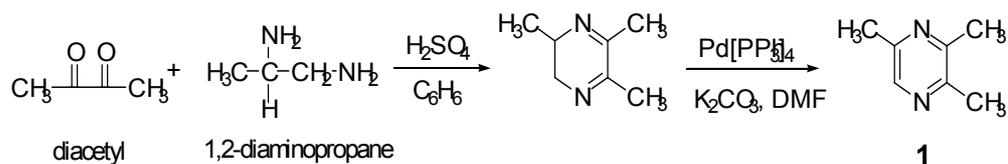


4



5

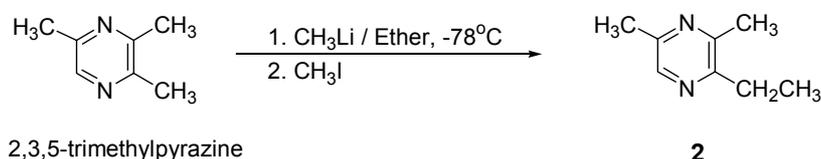
#### 1) 2,3,5-Trimethylpyrazine (1)



100 ml 둥근 바닥 플라스크에 건조된 benzene (70 ml)과 진한 황산 한 방울을 넣고 교반시켰다. Diacetyl (3 ml, 0.0342 mol)과 1,2-diaminopropane(3ml, 0.0352 mol)을 천천히 넣어주었다.<sup>1</sup> Dean-Stark trap을 사용하여 약 36 시간 동안 환류시켰다. 회전증발기로 benzene을 제거한 후 진공 증류하여 순수한 물질인 2,3,5-trimethyl-5,6-dihydropyrazine을 얻었다.

25 ml 둥근 바닥 플라스크에 Pd[PPh<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (0.1690 g, 0.0002 mol)과 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.9 g, 0.0065 mol)을 넣었다. 건조된 DMF (5 ml)에 앞에서 얻은 2,3,5-trimethyl-5,6-dihydropyrazine (0.22 g, 0.0018 mol)를 넣어 녹인 후 이 용액을 둥근 바닥 플라스크에 넣고 DMF (1 ml)를 더 넣어주었다. 기름 증탕에서 70 °C 정도 약 29 시간 동안 가열하였다. NaCl 수용액을 천천히 넣어 주면서 교반하고, 과량의 증류수를 넣고 ether (20 ml × 6)로 추출하고 유기층은 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 건조하였다. 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전증발기로 농축하였다. 그러나 triphenylphosphine oxide 가 많이 남아 있어 hexane을 이용하여 제거를 시도하였으나 완전히 제거하지는 못하였다.

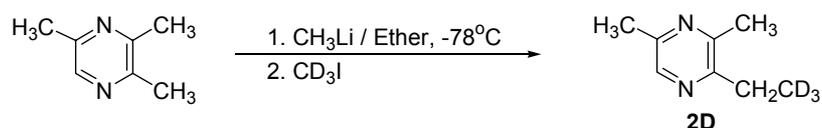
## 2) 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine (2)



250 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (15 ml)를 넣고 질소 가스를 흘려주었다. 2,3,5-Trimethylpyrazine (0.5 ml, 0.0040 mol)을 주사기로 취하여 넣어준 후 플라스크를 저온 반응기에서 -78 °C로 충분히 냉각시켰다. 주사기로 methyl lithium (14 ml, 0.0056 mol)을 천천히 적가 하였다. 약 10 분 경과 후 iodomethane (0.35 ml, 0.0056 mol)을 주사기로 취하여 천천히 적가 하였다. 저온 반응기의 온도를 서서히 상온으로 올려주었다. 플라스크를 다시 얼

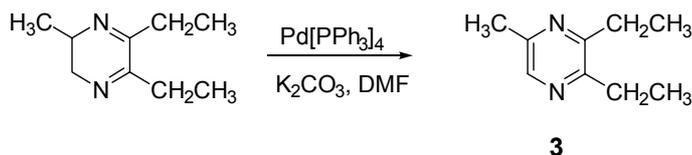
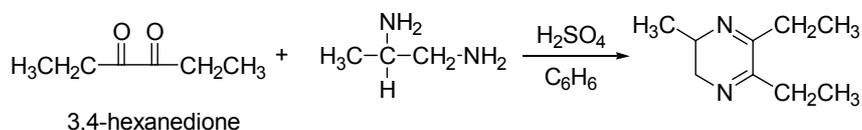
음 중탕에서 냉각시키고 증류수와 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만들었다. Ether (20 ml × 5)로 추출하고 유기층은 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조시킨 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전 증발기를 이용하여 농축시켰다. NMR 확인 결과 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2,3-dimethyl-5-ethylpyrazine과 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine이 섞여 있음을 알 수 있었다.

가) 2-(β,β,β-Trideuterioethyl)-3,5-dimethylpyrazine (2D)



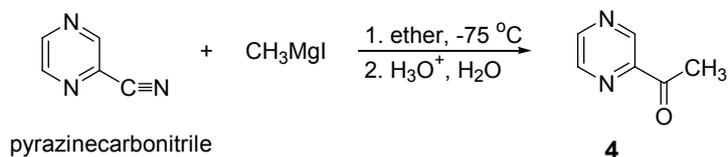
250 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (50 ml)를 넣고 질소 가스를 흘려 주었다. 2,3,5-Trimethylpyrazine (2 ml, 0.0160 mol)을 주사기로 취하여 넣어 준 후 플라스크를 저온 반응기에서 -78 °C로 충분히 냉각시켰다. 주사기로 methyl lithium (14 ml, 0.0224 mol)를 천천히 적가 하였다. 약 10 분 경과 후 iodomethane-*d*<sub>3</sub> (14 ml, 0.0225 mol)을 주사기로 취하여 천천히 적가 하였다. 저온 반응기의 온도를 서서히 상온으로 올려주었다. 플라스크를 다시 얼음 중탕에서 냉각시키고 증류수와 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만들었다. Ether (25 ml × 5)로 추출하고 유기층은 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조시킨 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전 증발기를 이용하여 농축시켰다. 잔액은 ethyl acetate : hexane = 1 : 1로 실리카겔 컬럼을 이용하여 분리하였다.

3) 2,3-Diethyl-5-methylpyrazine (3)



100 ml 둥근 바닥 플라스크에 benzene (70 ml)와 진한 황산 한 방울을 넣고 교반시켰다. 3,4-Hexanedione (3 ml, 0.0247 mol)과 1,2-diaminopropane (2.3 ml, 0.0270 mol)을 천천히 넣어주었다. Dean-Stark trap을 사용하여 약 36 시간 동안 환류시켰다. 회전 증발기로 benzene을 제거한 후 진공 증류하여 dihydropyrazine 유도체를 얻었다.

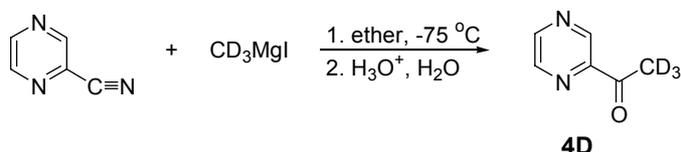
4) 2-Acetylpyrazine (4)



50 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (20 ml)와 pyrazinecarbonitrile (0.5 ml, 0.0056 mol)을 넣고 질소 가스를 흘려주었다. 저온 반응기에서 -75 °C로 충분히 냉각시킨 후, methylmagnesium bromide (3.0 M solution in ether, 2.3 ml, 0.0069 mol)를 주사기로 취하여 천천히 적가하였다. 반응 온도를 서서히 상온으로 올린 후 반응물을 분별 깔대기에 옮겨 담고 증류수와 HCl 수용액을 사용하여 산성용액으로 만들었다. Ether (20 ml × 6)로 추출하고 유기층은 MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 건조하였다. 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액

은 회전증발기로 농축하여 2-acetylpyrazine을 얻었다. (무게 : 0.19 g, 수율 : 28 %)

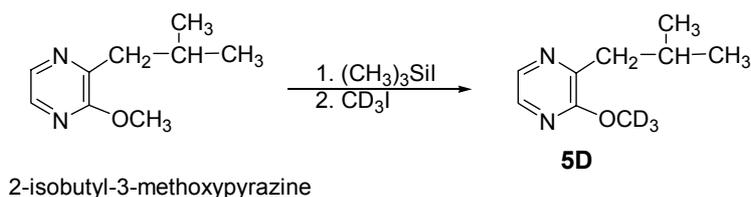
가) 2-(*a,a,a*-Trideuterio)acetylpyrazine (**4D**)



50 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (10 ml)와 magnesium (0.19 g, 0.008 mole)을 넣고 질소 가스를 흘려주었다. Iodomethane-*d*<sub>3</sub> (0.5 ml, 0.008 mole)을 넣어 methyl-*d*<sub>3</sub> magnesium iodide를 먼저 합성하였다.

50 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (10 ml)와 pyrazinecarbonitrile (0.4 ml, 0.004 mole)을 넣고 질소 가스를 흘려주었다. 저온 반응기에서 -75 °C로 충분히 냉각시킨 후, methyl-*d*<sub>3</sub> magnesium iodide를 주사기로 취하여 천천히 적가하였다. 반응 온도를 서서히 상온으로 올린 후 반응물을 분별 깔대기에 옮겨 담고 증류수 (50 ml)와 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만들었다. Ether (20 ml × 6)로 추출하고 유기층은 MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 건조하였다. 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전증발기를 사용하여 농축하여 2-(*a,a,a*-trideuterio)acetylpyrazine을 얻었다. (무게 : 0.21 g, 수율 : 45 %); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ9.24 (d, 1H), 8.76 (d, 1H), 8.66 (dd, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 199.55, 147.78, 147.71, 143.61, 143.56, 25,100(m)

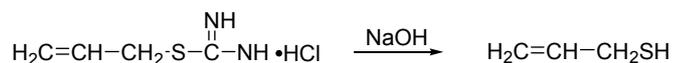
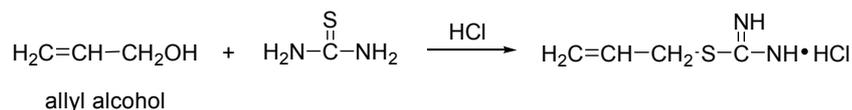
5) 2-Isobutyl-3-methylpyrazine (**5**)



50 ml 둥근 바닥 플라스크에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml)와 2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine (1 g, 0.0060 mol)을 넣고 교반시켰다. Dropping funnel에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml)와 iodotrimethylsilane (1 ml, 0.0070mol)을 넣은 후 이 용액을 천천히 적가하였다. 상온에서 교반시킨 후 증류수를 넣고 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml × 4)로 추출하여 유기층에 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣어 건조한 후 감압 여과하여 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 제거하고 여액을 회전 증발기로 농축하였다. 이 액체를 NMR로 확인해 본 결과 반응이 진행되지 않았음을 알 수 있었다.

#### 나. Sulfur 계 화합물의 합성

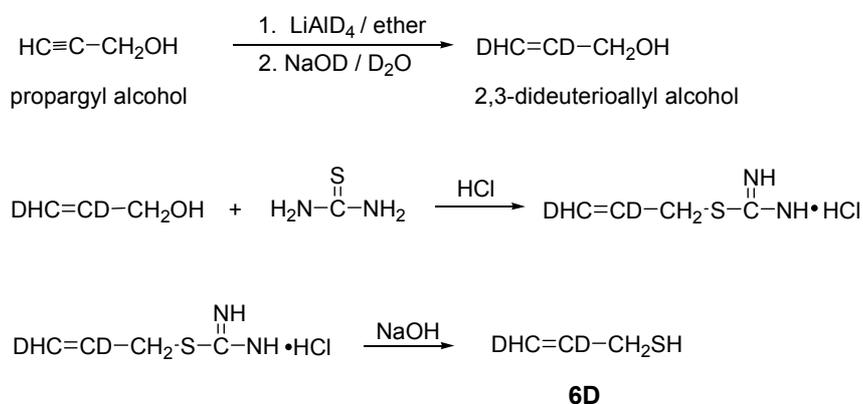
##### 1) Allyl mercaptan (6)



**6**

50 ml 둥근 바닥 플라스크에 증류수 (6 ml)와 thiourea (5.70 g, 0.0749 mol)을 넣고 교반시켰다. 진한 HCl (7 ml)을 넣고 기름 중탕에서 30℃로 가열하였다.<sup>2</sup> Dropping funnel에 allyl alcohol (5 ml, 0.0735 mol)을 넣어 천천히 적가한 후 기름 중탕의 온도를 80 ℃로 올려주었다. 20 시간 후 가열을 중단하고 상온으로 식히고 NaOH 수용액을 천천히 적가하였다. 단순 증류하여 allyl mercaptan을 얻었다. (무게 : 2.11 g, 수율 : 39 %)

가) 2,3-Dideuterioallyl mercaptan (6D)



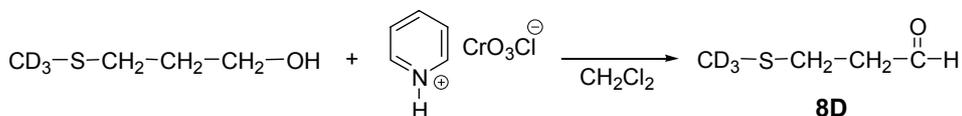
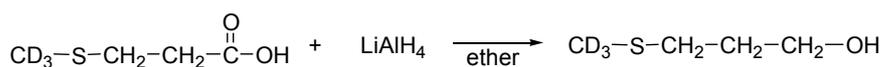
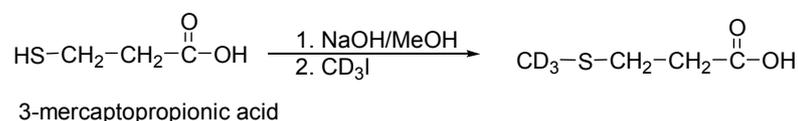
250 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (100 ml)를 넣고 얼음 중탕으로 냉각시킨 다음 lithium aluminum deuteride (LAD) (2.2 g, 0.052 mole)를 가하였다.<sup>3,4</sup> 혼합물을 계속 냉각시키면서 propargyl alcohol (2 ml, 0.0340 mole)을 적가 하였다. 적가 후 얼음 중탕을 제거하고 11 시간 동안 환류 시킨 다음 다시 얼음 중탕으로 냉각시켰다. D<sub>2</sub>O와 NaOD (40 wt% 용액)용액으로 반응하지 않은 LAD를 파괴하였다 (총 3.5 ml 소요). 혼합물을 감압 여과 한 다음 여액에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 가하여 약 1시간 방치한 후 다시 감압 여과하였다. 여액을 회전 증발기로 농축하여 2,3-dideuterated allyl alcohol을 얻었다.

25 ml 둥근 바닥 플라스크에 thiourea (1.81 g, 0.024 mole)와 증류수 (2 ml)를 넣은 후 진한 염산 (2.2 ml)을 천천히 가하여 모두 균일 용액이 되게 하였다. 이 용액에 2,3-dideuterated allyl alcohol (1.4 g, 0.023 mole)을 적가하고 condensor를 설치한 후 기름 중탕에서 80 °C로 24 시간 가열하였다. 실온으로 냉각한 다음 NaOH (1.50 g)와 증류수 (2 ml)의 용액을 천천히 가하였다. 혼합 용액을 증류하여 2,3-dideuterioallyl mercaptan을 얻었다. (무게 : 0.82 g, 수율 : 46 %); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 5.01 (s, 1H), 3.17 (d, 3H), 1.43 (t, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 136.85 (m), 115.11 (m), 27.45



250 ml 둥근 바닥 플라스크에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 ml)와 PCC (5.60 g, 0.0261 mole)를 넣고 얼음 중탕에서 냉각시킨 다음 dropping funnel에 위에서 얻은 propanol 화합물을 넣고 천천히 적가하였다. 적가 후 얼음 중탕을 제거하고 30 시간 동안 환류 시킨 후 실온으로 식혔다. 반응물을 분별 깔때기에 옮겨 담고 증류수와 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만들었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml × 3)로 추출하고 유기층은 증류수 (35 ml)로 한 번 씻어 주었다. 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조시킨 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 단순 증류하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 제거하였다. 잔액을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>으로 실리카겔 컬럼을 이용하여 methional을 분리하였다 (무게 : 0.26 g, 수율 : 12 %).

가) Trideuteriomethional (**8D**)



50 ml 둥근 바닥 플라스크에 methanol (10 ml)과 NaOH (6.30 g, 0.1575 mole)를 넣고 교반시켜 sodium methoxide를 합성하였다. 100 ml 둥근 바닥 플라스크에 methanol (10 ml)과 3-mercaptopropionic acid (8 ml, 0.0754 mole)을 넣어 섞은 후 sodium methoxide 용액을 천천히 적가하였다. Dropping funnel에 iodomethane-d<sub>3</sub> (7.1 ml, 0.1133 mole)를 넣어 천천히 적가하였다. 증류수와 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만든 후 ether (25 ml × 8)로 추출하고 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조하였다. 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하여

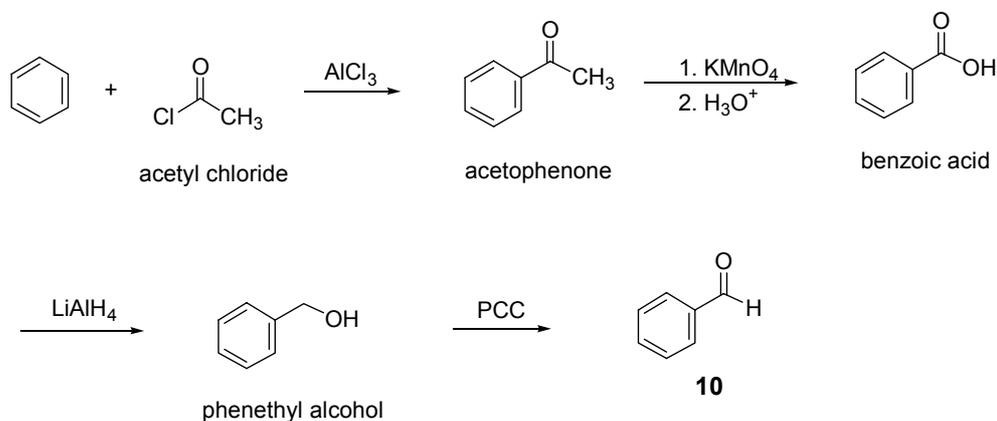
3-(trideuteriomethylthio)propionic acid를 얻었다.

100ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (150 ml)를 넣고 얼음 중탕으로 냉각시킨 다음 LAH (3.51 g, 0.0925 mole)를 가하였다. Dropping funnel에 위에서 얻은 acid를 넣고 천천히 적가하였다. 적가 후 얼음 중탕을 제거하고 12 시간 동안 환류 시킨 다음 다시 얼음 중탕으로 냉각시켰다. 증류수와 15 % NaOH 수용액을 사용하여 반응하지 않은 LAH를 파괴하였다. Ether층을 따로 받아내고 수용액 층은 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만들고 ether (25 ml × 5)로 추출하였다. 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조한 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하였다. 여액을 회전 증발기로 농축하여 3-(trideuteriomethylthio)propan-1-ol을 합성하였다.

250 ml 둥근 바닥 플라스크에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml)와 PCC (5.90 g, 0.0274 mole)를 넣고 얼음 중탕에서 냉각시킨 다음 dropping funnel에 위에서 얻은 propanol 화합물을 넣고 천천히 적가 하였다. 적가 후 얼음 중탕을 제거하고 30 시간 동안 환류 시킨 후 실온으로 식혔다. 반응물을 분별 깔때기에 옮겨 담고 증류수 (50 ml)와 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만들었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml × 3)로 추출하고 유기층은 증류수 (35 ml)로 한 번 씻어 주었다. 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조시킨 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 단순 증류하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 제거하였다. 잔액을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>으로 실리카겔 컬럼을 이용하여 methional-*d*<sub>3</sub>를 분리하였다 (무게 : 0.25 g, 수율 : 13 %); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 9.79 (s, 1H), 2.77 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 200.63, 43.29, 26.31

다. Carbonyl 계 화합물의 합성

1) Benzaldehyde (10)



50 ml 둥근 바닥 플라스크에  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml)과 aluminum chloride (2.2380 g, 0.0168 mol)을 넣고 교반 시켰다. Dropping funnel에  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml)과 acetyl chloride (0.95 ml, 0.0134 mol)를 넣은 후 이 용액을 방울 방울 적가 하였다. 플라스크를 얼음 증탕에서 충분히 냉각시켰다. Dropping funnel에  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml)과 benzene (1 ml, 0.0113 mol)을 넣은 후 이 용액을 적가 하였다. 얼음 증탕을 제거하고 24 시간 동안 환류 시킨 다음 다시 얼음 증탕으로 냉각시켰다. 증류수를 넣고 sodium bicarbonate 포화수용액을 사용하여 염기성 용액으로 만들었다.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml  $\times$  3)로 추출하였다. 유기층에 무수제  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 가하여 건조한 후 감압 여과하여  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 제거하였다. 여액은 회전 증발기를 사용하여 농축하여 acetophenone을 얻었다.

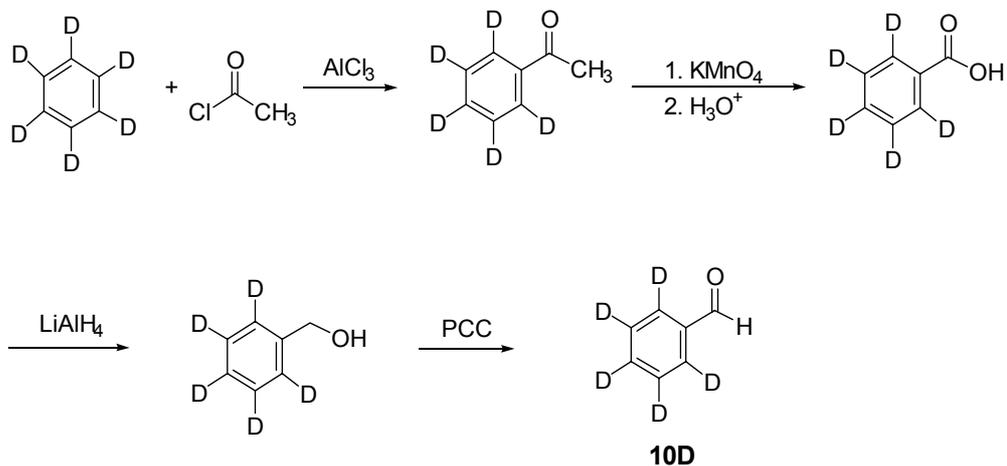
50 ml 둥근 바닥 플라스크에 증류수 (15 ml)와 potassium permanganate (1.4950 g, 0.0095 mol)을 넣어 교반시키고 위에서 얻은 화합물을 천천히 적가 하였다. Mantle을 사용하여 12 시간 동안 가열한 다음 상온에서 식혔다. 증류수와 HCl 수용액을 사용하여 산성용액으로 만든 후 ether (20 ml  $\times$  3)로 추출하였다. 유기층에 무수제  $\text{MgSO}_4$ 를 가하여 건조한 후 감압 여과하여  $\text{MgSO}_4$ 를 제거하였다. 여액은 회전 증발기를 사용하여 농축하여 benzoic acid

를 얻었다.

50 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (30 ml)와 위에서 얻은 acid를 넣고 교반시켰다. 여기에 LAH (0.3 g, 0.0079 mol)을 천천히 넣어 주었다. 약 24 시간 동안 환류 시킨 다음 얼음 중탕에서 냉각시킨 후, 증류수와 15 % NaOH 수용액을 사용하여 반응하지 않은 LAH 를 파괴 하였다. Ether 층을 따로 받아내고 수용액층은 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만들고 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml × 4)으로 추출하였다. 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조시킨 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하였다. 여액은 회전 증발기로 농축하여 benzyl alcohol 을 얻었다.

100 ml 둥근 바닥 플라스크에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml)와 PCC (0.0764 g, 0.0004 mol)을 넣고 교반시켰다. Dropping funnel에 위에서 얻은 alcohol과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml)를 넣은 후 이 용액을 천천히 적가 하였다. 7 시간 동안 환류 시킨 다음 상온에서 냉각시켰다. 증류수와 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만든 후 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml × 4)로 추출하고 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조 시킨 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하였다. 여액은 회전 증발기로 농축하여 benzaldehyde를 얻었다.

가) 2,3,4,5,6-Pentadeuteriobenzaldehyde (10D)



50 ml 둥근 바닥 플라스크에  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml)과 aluminum chloride (2.2800 g, 0.0171 mol)을 넣고 교반 시켰다. Dropping funnel에  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml)과 acetyl chloride (1 ml, 0.0141 mol)을 넣은 후 이 용액을 방울 방울 적가 하였다. 플라스크를 얼음 중탕에서 충분히 냉각시켰다. Dropping funnel에  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml)과 benzene- $d_6$ (1 ml, 0.0113 mol)을 넣은 후 이 용액을 적가 하였다. 얼음 중탕을 제거하고 24 시간 동안 환류 시킨 다음 다시 얼음 중탕으로 냉각시켰다. 증류수를 넣고 sodium bicarbonate 포화수용액을 사용하여 염기성 용액으로 만든 후  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml  $\times$  4)로 추출하였다. 유기층에 무수제  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 가하여 건조한 후 감압 여과하여  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 제거하였다. 여액은 회전 증발기를 사용하여 농축하였다. 잔액을 ethyl acetate : hexane = 1 : 3 으로 실리카겔 컬럼을 이용하여 acetophenone- $d_5$ 를 분리하였다.

50 ml 둥근 바닥 플라스크에 증류수 (20 ml)와 potassium permanganate (1.4299 g, 0.0091 mol)을 넣어 교반시키고 위에서 얻은 화합물을 천천히 적가 하였다. Mantle을 사용하여 12 시간 동안 가열한 다음 상온에서 식혔다. 증류수 (60 ml)를 넣고 HCl 수용액을 사용하여 산성용액으로 만든 후 ether (30 ml  $\times$  4)로 추출하였다. 유기층에 무수제  $\text{MgSO}_4$ 를 가하여 건조한 후 감압 여과하여  $\text{MgSO}_4$ 를 제거하였다. 여액은 회전 증발기를 사용하여 농축하여 benzoic- $d_5$  acid를 얻었다.

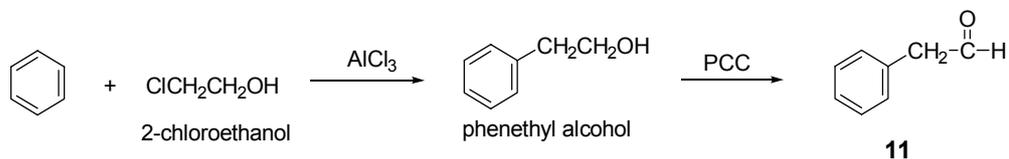
50 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (30 ml)와 위에서 얻은 acid를 넣고 교반시켰다. 여기에 LAH(0.3 g, 0.0079 mol)을 천천히 넣어 주었다. 약 24 시간 동안 환류 시킨 다음 얼음 중탕에서 냉각시킨 후, 증류수와 15 % NaOH 수용액을 사용하여 반응하지 않은 LAH 를 파괴 하였다. Ether 층을 따로 받아내고 수용액층은 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만들고  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml  $\times$  3)으로 추출하였다. 유기층에 무수제  $\text{MgSO}_4$ 를 넣어 건조시킨 후 감압 여과하여  $\text{MgSO}_4$ 를 제거하였다. 여액은 회전 증발기로 농축하여 benzyl-2,3,4,5,6- $d_5$  alcohol을 얻었다.

100 ml 둥근 바닥 플라스크에  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml)와 PCC (0.9188 g, 0.0043 mol)을 넣고 교반시켰다. Dropping funnel에 위에서 얻은 alcohol과  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

(10 ml)을 넣어 천천히 적가 하였다. 7 시간 동안 환류 시킨 다음 상온에서 냉각시켰다. 증류수와 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만든 후  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $30 \text{ ml} \times 4$ )로 추출하고 유기층을 증류수 ( $20 \text{ ml} \times 3$ )으로 씻어주었다. 유기층에 무수제  $\text{MgSO}_4$ 를 넣어 건조 시킨 후 감압 여과하여  $\text{MgSO}_4$ 를 제거하였다. 여액은 회전 증발기로 농축하였다. 잔액을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 으로 실리카겔 컬럼을 이용하여 benzaldehyde- $d_5$ 를 얻었다. (무게 : 0.21 g, 수율 : 68 %);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.03 (s) ;  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 192.37, 136.29, 133.95 (t), 129.33 (t), 128.50 (t)

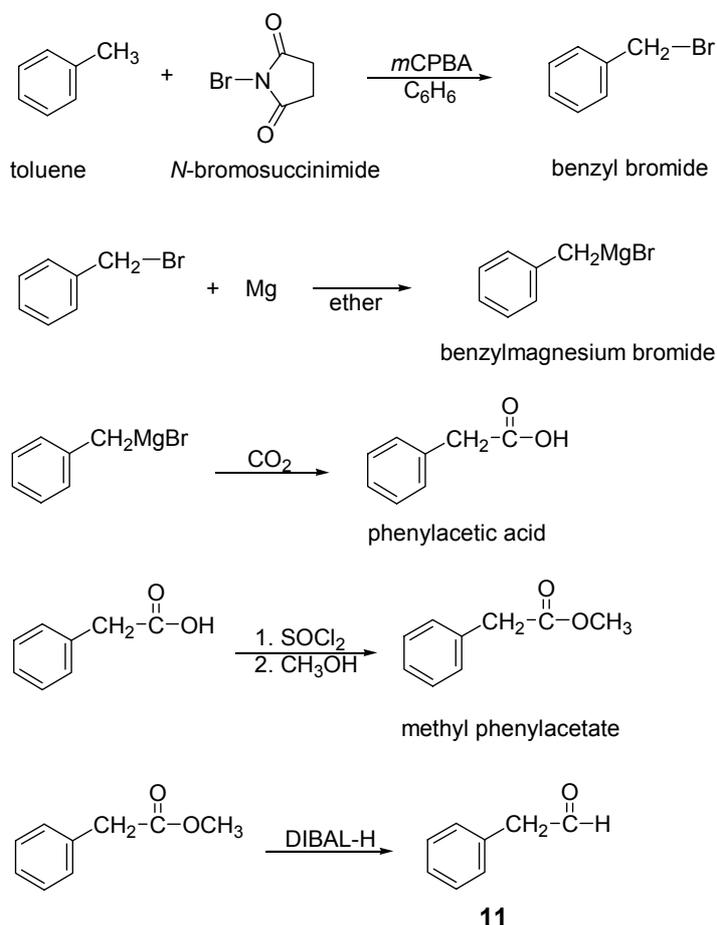
## 2) Phenylacetaldehyde (11)

Scheme 1.



100 ml 둥근 바닥 플라스크에 benzene (50 ml)와 aluminum chloride (5.97 g, 0.0448 mol)을 넣고 교반시켰다. 2-Chloroethanol (2 ml, 0.0298 mol)을 천천히 적가하였다. 기름 중탕에서 40 °C로 가열하였다.<sup>5</sup> 1 시간 후 가열을 중단하고 상온에서 식히고 얼음 중탕에서 충분히 냉각 시켰다. 증류수와 sodium bicarbonate 포화수용액을 사용하여 중화시키고  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $25 \text{ ml} \times 3$ )으로 추출하였다. 유기층에 무수제  $\text{MgSO}_4$ 를 넣어 건조한 후 감압 여과하여  $\text{MgSO}_4$ 를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하였다. 잔액을 NMR로 확인한 결과 phenethyl alcohol이 합성되기는 하였으나 수율이 매우 낮아 다음 반응을 진행시킬 수 없었다.

Scheme 2.



50 ml 둥근 바닥 플라스크에 benzene (10 ml, 0.1119 mol), toluene (3 ml, 0.0282 mol)과 *m*-chloroperoxybenzoic acid(*m*CPBA) (0.0412 g)을 넣고 교반시켰다. *N*-Bromosuccinimide(NBS) (4.4656 g, 0.0251 mol)과 *m*CPBA (0.0424 g)을 각각 순서대로 넣어 주었다.<sup>6</sup> 약 1 시간 동안 환류 시키고 상온에서 식혔다. 감압 여과하여 흰색의 고체 물질을 제거하고 여액은 회전 증발기를 이용하여 농축하였다.

100 ml 둥근 바닥 플라스크에 magnesium (0.49g, 0.0202 mol)과 ether

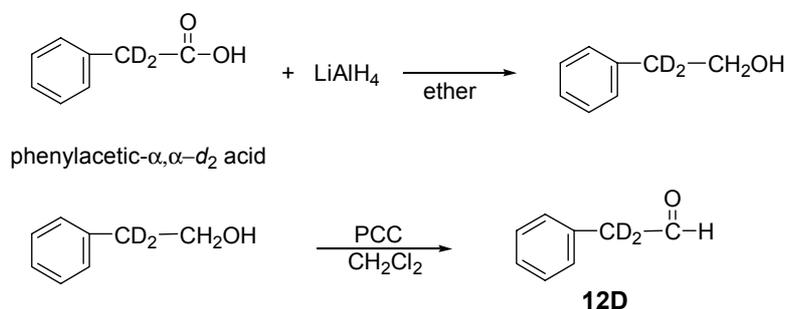
(25 ml)를 넣고 교반시켰다. Benzyl bromide (2 ml, 0.01681 mol)를 천천히 적가 하였다. 약 20분 정도 환류 시킨 후 상온에서 식혔다. 얼음 중탕에서 충분히 냉각시키고 잘게 부순 dry ice를 충분히 넣어주었다. 증류수와 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만들고 ether (25 ml × 4)로 추출하였다. 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조한 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하였다.

50 ml 둥근 바닥 플라스크에 phenylacetic acid (1 g, 0.0073 mol)와 thionyl chloride (3 ml, 0.0411 mol)을 넣고 환류시켰다. Aspirator를 이용하여 과량의 thionyl chloride를 제거하였다.

100 ml 둥근 바닥 플라스크에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml), methanol (0.6 ml, 0.0148 mol)과 triethylamine (1.5 ml, 0.0108 mol)을 넣고 교반시켰다. Dropping funnel에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml)과 앞서 합성한 phenylacetyl chloride를 넣고 이 용액을 천천히 적가 하였다. 약 12 시간 동안 환류시킨 후 상온에서 식혔다. 증류수와 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만들었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml × 3)으로 추출하고 유기층에 무수제 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣어 건조한 후 감압 여과하여 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하였다.

100 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (30 ml)와 위에서 얻은 methyl phenylacetate (1.09 g, 0.0073 mol)을 넣고 질소 가스를 흘려주었다. 저온 반응기에서 -78℃로 충분히 냉각시킨 후 주사기로 diisobutylaluminum hydride(DIBAL-H) (1.0 M solution in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3.6 ml, 0.0036 mol)를 천천히 적가 하였다. 저온 반응기의 온도를 서서히 상온으로 올린 후 반응물을 분별 깔대기에 옮겨 담고 증류수 (50 ml)와 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만들었다. Ether (25 ml × 4)로 추출하고 유기층은 MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 건조하였다. 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전증발기를 사용하여 농축하였다.

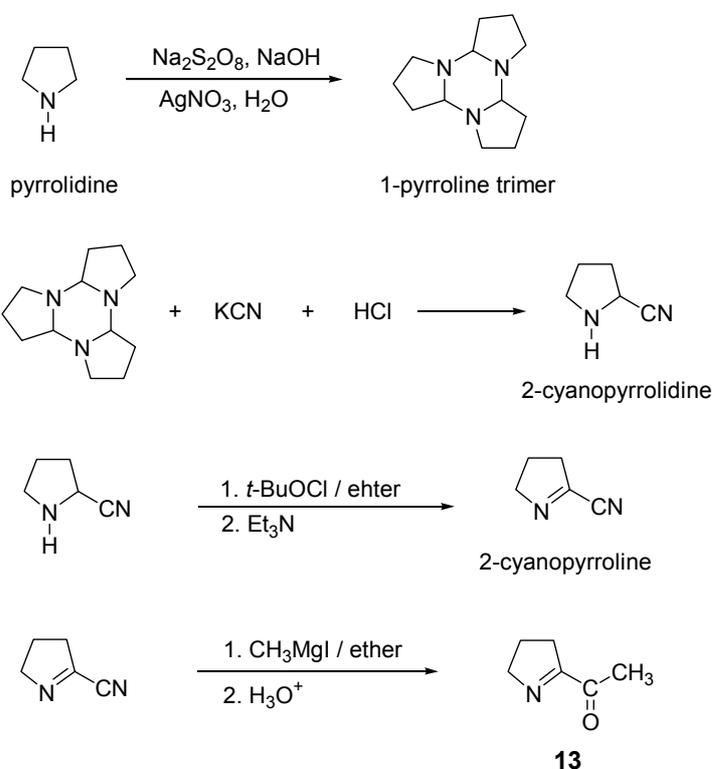
3) (*a,a*-Dideuterio)phenylacetaldehyde (**12D**)



250 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (100 ml)와 LAH (0.2215 g, 0.0058 mol)을 넣고 얼음 중탕에서 충분히 냉각시켰다. Dropping funnel에 ether (30 ml)와 phenylacetic-*a,a*-d<sub>2</sub> acid (1 g, 0.0072 mol)을 넣은 후 이 용액을 천천히 적가 하였다. 30 시간 동안 환류 시킨 다음 다시 얼음 중탕으로 냉각시켰다. 증류수와 15% NaOH 수용액을 사용하여 반응하지 않은 LAH를 파괴하였다. Ether 층을 받아내고 수용액 층은 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만들고 ether (30 ml × 5)로 추출하였다. 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조한 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하였다.

250 ml 둥근 바닥 플라스크에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml)와 PCC (0.87 g, 0.0040 mol)을 넣고 교반시켰다. Dropping funnel에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml)와 위에서 합성한 alcohol을 넣은 후 이 용액을 천천히 적가 하였다. 상온에서 12 시간 동안 교반시킨 후 증류수와 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만들었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (35 ml × 4)로 추출하고 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조한 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하였다. 잔액은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 실리카겔 컬럼을 이용하여 분리하였다 (무게:0.34g, 수율:28%).

4) 2-Acetyl-1-pyrroline (13)



500 ml 둥근 바닥 플라스크에 증류수 (100 ml)와 sodium persulfate (23.81 g, 0.1000 mol)을 넣고 교반시켰다. 반응 용기를 얼음 중탕에서 충분히 냉각시킨 후 pyrrolidine (8.3 ml, 0.0994 mol)을 천천히 적가하였다.<sup>7</sup> Sodium hydroxide (8.00 g, 0.2000 mol)와 silver nitrate (0.0887 g, 0.0005 mol)을 넣고 기름 중탕에서 약 65 °C로 가열하였다. 12 시간 후 가열을 중단하고 상온에서 식혔다. Sodium chloride를 충분히 넣어주었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (35 ml × 5)로 추출하고 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조하고 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하였다. 여액은 회전 증발기로 농축하였다.

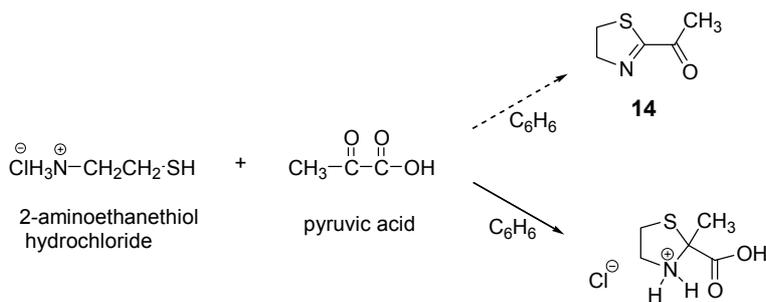
250 ml 둥근 바닥 플라스크에 potassium cyanide (4.16 g, 0.0639 mol)를 넣고 얼음 중탕에서 충분히 냉각시켰다. 4N HCl 수용액 (16 ml)을 천천히

적가한 후 앞에서 합성한 1-pyrroline trimer를 방울 방울 적가 하였다.<sup>8</sup> 12 시간 동안 상온에서 교반시킨 후 얼음 중탕에서 냉각시키고 sodium hydroxide를 넣었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml × 5)를 추출하고 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조하고 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하였다. 여액은 회전 증발기로 농축하였다.

250 ml 둥근 바닥 플라스크에 앞에서 얻은 2-cyanopyrrolidine (6.40 g, 0.0667 mol)과 ether (50 ml)를 넣고 얼음 중탕에서 충분히 냉각시켰다. *tert*-Butyl hypochlorite<sup>9</sup> (7.23 g, 0.669 mol)을 천천히 넣은 후 얼음 중탕에서 2 시간 정도 교반시켰다. Triethylamine (9.3 ml, 0.0667 mol)을 넣은 후 상온에서 19 시간 동안 교반시켰다. 감압 여과하여 고체를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하였다.

250 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (70 ml)와 magnesium (1.92 g, 0.0790 mol)을 넣고 질소 가스를 흘려주었다. 주사기로 iodomethane (4.1 ml, 0.0659 mol)을 천천히 적가하였다. 상온에서 1 시간 동안 교반시켰다. 주사기로 앞서 합성한 2-cyano-1-pyrroline (4.13 g, 0.0490 mol)을 천천히 적가하였다. 상온에서 18 시간 교반시킨 후 얼음 중탕에서 충분히 냉각시키고 증류수와 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만들었다. Ether (30 ml × 5)로 추출하고 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조한 후 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하였다. 여액은 회전 증발기로 농축하였다.

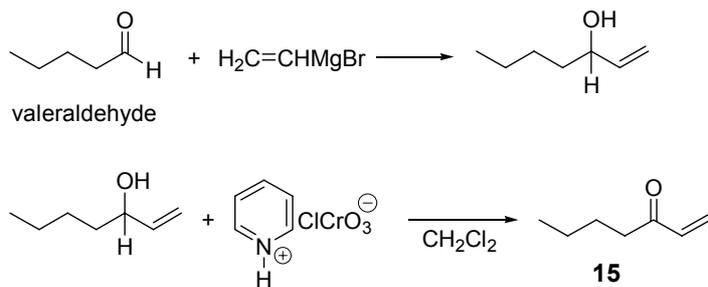
5) 2-Acetyl-2-thiazoline (14)



100 ml 둥근 바닥 플라스크에 benzene (45 ml), 2-aminoethanethiol

hydrochloride (3.02 g, 0.0270 mol)와 pyruvic acid (2.48 g, 0.0270 mol)를 넣고 Dean-Stark trap을 설치한 후 환류시켰다.<sup>10</sup> 12 시간 후 가열을 중단하고 상온에서 식힌 후 감압 여과하여 고체 물질을 얻었다. NMR 과 x-ray 분석 결과 원하는 물질이 아님을 확인하였다.

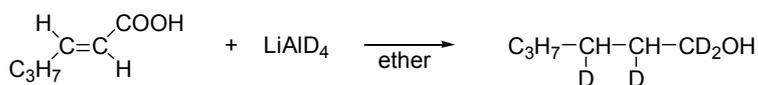
6) 1-Hepten-3-one (15)



100 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (30 ml)와 valeraldehyde (2 ml)를 넣고 얼음 중탕에서 충분히 냉각시킨 후 syringe로 vinylmagnesium bromide(1.0 M solution in THF, 23 ml)를 취하여 천천히 적가시켰다. 약 12 시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응 용기에 HCl 수용액을 천천히 넣어 용액을 산성으로 만든 후 ether (20 ml × 5)로 추출하였다. 유기층은 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 건조하고 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하였다. 여액은 회전증발기로 농축하였다.

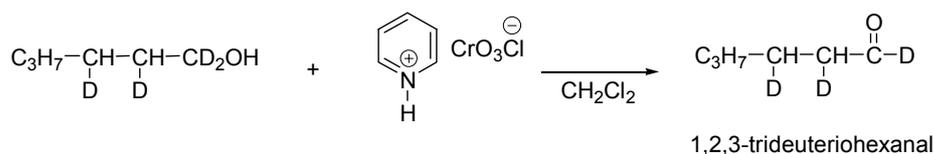
100 ml 둥근 바닥 플라스크에 건조된 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 ml)와 PCC (4.70 g)을 넣고 얼음 중탕에서 충분히 냉각시켰다. 위에서 얻은 화합물을 천천히 적가시키고 약 10 시간 동안 환류시켰다. 반응물을 과량의 증류수에 넣고 NaOH 수용액을 넣어 염기성으로 만든 후 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml × 4)로 추출하였다. 유기층에 증류수와 HCl 수용액을 넣고 충분히 교반시켰다. 유기층을 받아내어 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 사용하여 건조하고 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전증발기로 농축하였다. (무게 : 1.26 g, 수율 : 68%)

7) 4,5-Dideuterio-1-octen-3-one (16D)

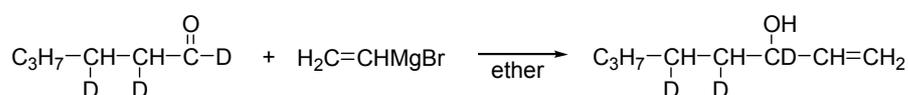


*trans*-2-hexenoic acid

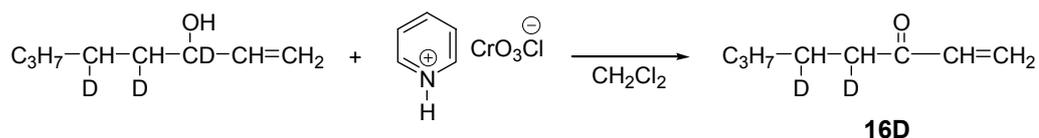
1,1,2,3-tetradeuterio-1-hexanol



1,2,3-trideuteriohexanal



3,4,5-trideuterio-1-octen-3-ol



**16D**

250 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (100 ml)를 넣고 얼음 증탕으로 냉각시킨 다음 LAD (1.20 g, 0.029 mole)을 가하였다, 혼합물을 계속 냉각시키면서 *trans*-2-hexenoic acid (1.90 g, 0.017 mole)을 적가하였다. 적가 후 얼음 증탕을 제거하고 36 시간 동안 환류시킨 다음 다시 얼음 증탕으로 냉각시켰다. D<sub>2</sub>O와 NaOD (40 wt% 용액)용액으로 반응하지 않은 LAD를 파괴하였다. HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만들고 ether (20 ml × 4 번)로 추출하였다. 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 가하여 약 1시간 방치한 후 감압 여과하였다. 여액은 단순 증류하여 ether를 제거하여 1,1,2,3-tetradeuterio-1-hexanol을 얻었다.

250 ml 둥근 바닥 플라스크에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml)와 PCC (9.54 g, 0.0443 mol)을 넣고 얼음 증탕에서 충분히 냉각시켰다. Dropping funnel에 앞에서

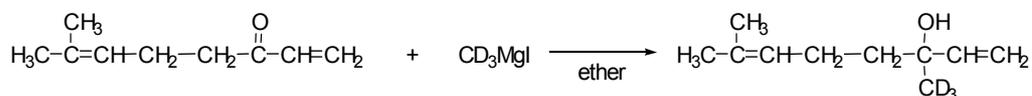
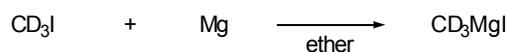
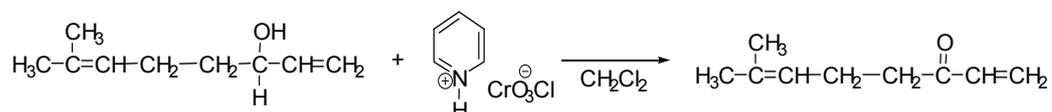
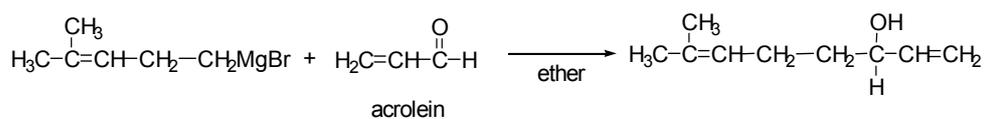
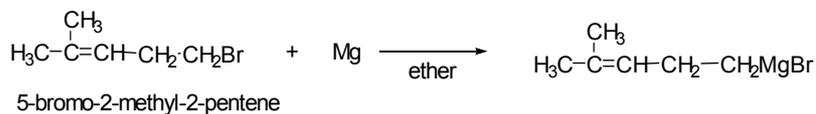
얼음 alcohol과  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml)을 넣은 후 이 용액을 천천히 적가 하였다. 약 2 시간 동안 환류 시킨 후 상온에서 식혔다. 증류수와 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만들고  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml  $\times$  3)으로 추출하였다. 유기층에 무수제  $\text{MgSO}_4$ 를 넣어 건조 한 후 감압 여과하여  $\text{MgSO}_4$ 를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하였다.

250 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (100 ml)와 위에서 얻은 물질을 넣고 얼음 중탕에서 충분히 냉각시켰다. 주사기로 vinylmagnesium chloride (30 ml, 0.048 mol)를 취하여 천천히 적가 하였다. 약 12시간 동안 상온에서 교반 시킨 후 얼음 중탕에서 냉각시키고 증류수와 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만들었다. Ether (30 ml  $\times$  4)로 추출하고 유기층을 무수제  $\text{MgSO}_4$ 를 넣어 건조한 후 감압 여과하여  $\text{MgSO}_4$ 를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하였다.

250 ml 둥근 바닥 플라스크에  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (80 ml)과 PCC (7.22 g, 0.0335 mol)을 넣고 교반하였다. Dropping funnel에  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml)와 위에서 얻은 alcohol을 넣은 후 이 용액을 천천히 적가 하였다. 약 2 시간 동안 환류 시키고 상온에서 식혔다. 증류수와 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만든 후  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml  $\times$  4)로 추출하였다. 유기층에 무수제  $\text{MgSO}_4$ 를 넣어 건조한 후 감압 여과하여  $\text{MgSO}_4$ 를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하였다. 잔액은  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 으로 실리카겔 컬럼을 이용하여 분리하였으나 carbonyl 그룹의  $\alpha$  위치의 D가 쉽게 H로 전환되므로 이 화합물에는 D가 한 개 존재하므로 부적절하였다.

라. Alcohol계 화합물의 합성

1) Trideuteriolinalool (19D)



**19D**

50 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (10 ml)와 magnesium (0.08 g, 0.0033 mol)을 넣고 질소 가스를 흘려주었다. 5-Bromo-2-methyl-2-pentene (0.4 ml, 0.0030 mol)을 넣어 Grignard 시약을 합성하였다.

100 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (10 ml)와 acrolein (0.2 ml, 0.0030 mol)을 넣고 질소 가스를 흘려주었다. 앞에서 합성한 Grignard 시약을 주사기로 취하여 천천히 적가 하였다. 약 7 시간 동안 환류 시킨 다음 상온에서 식

했다. 증류수와 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만들고 ether (20 ml × 4)로 추출하고 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조 시켰다. 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하여 3-hydroxy-7-methyl-1,6-octadiene을 얻었다.

50 ml 둥근 바닥 플라스크에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml)과 PCC (0.53 g, 0.0025 mol)를 넣고 교반 시켰다. Dropping funnel에 위에서 얻은 alcohol과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml)을 넣고 이 용액을 천천히 적가한 후 7 시간 동안 환류 시켰다. 상온에서 식히고 증류수와 HCl 수용액을 사용하여 산성 용액으로 만들었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml × 3)으로 추출하고 유기층은 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조 시켰다. 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전 증발기로 농축하여 ketone 화합물을 얻었다.

50 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (8 ml)와 magnesium (0.10 g, 0.0041 mol)을 넣고 질소 가스를 흘려 주었다. Iodomethane-*d*<sub>3</sub> (0.2 ml, 0.0032 mol)을 넣어 methyl-*d*<sub>3</sub> magnesium iodide를 합성하였다.

100 ml 둥근 바닥 플라스크에 ether (10 ml)를 넣고 질소 가스를 흘려 주었다. 위에서 합성한 methyl-*d*<sub>3</sub> magnesium iodide를 주사기로 취하여 천천히 적가 하였다. 상온에서 19 시간 정도 교반 시킨 후 증류수와 HCl 수용액을 넣어 산성 용액으로 만들었다. Ether (25 ml × 4)로 추출하고 유기층에 무수제 MgSO<sub>4</sub>를 넣어 건조 시킨 후, 감압 여과하여 MgSO<sub>4</sub>를 제거하고 여액은 회전 증발기를 사용하여 농축하였다. 잔액은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>으로 실리카겔 컬럼을 이용하여 linalool-*d*<sub>3</sub>를 분리하였다. (무게 : 0.17 g, 수율 : 24 %); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 5.91 (dd, 1H), 5.14 (m, 3H), 2.02 (m, 4H), 1.68 (s, 3H), 1.60 (s, 3H)

### 3. 연구 결과 및 고찰

#### 가. Pyrazine 계 화합물의 합성

1,2-Diketone 과 1,2-diamine 사이의 축합반응에 의해서 dihydropyrazine 화합물들을 합성하는 과정은 용이하게 진행되었으나 dihydropyrazine을

pyrazine으로 전환시키는 반응은 매우 어려웠다. 여러 조건을 시도하였으나 만족할 만한 성과를 거두지 못하다가 Pd[PPh<sub>3</sub>]<sub>4</sub>를 사용하였을 때 산화반응이 완전하게 진행됨을 발견하였다. 그러나 이 시약의 사용 시 부산물인 triphenylphosphine oxide를 관크로마토그래피를 이용하여 분리하는 것이 어려웠다. 반응 규모가 클 경우는 큰 문제가 안되지만 밀리그램 단위의 반응에서는 다루기가 어려웠다.

Trimethylpyrazine을 강염기인 CH<sub>3</sub>Li로 처리하여 양성자를 한개 제거한 후 CH<sub>3</sub>I와 반응시켜 methyl 그룹을 ethyl 그룹으로 전환하는 반응을 수행하였는데 위치이성질체의 혼합물이 생성되었다.

Pyrazinecarbonitrile을 Grignard 시약과 반응시켜 acetylpyrazine으로 전환하는 반응은 예상대로 잘 진행되었다.

#### 나. Sulfur 계 화합물의 합성

Allyl alcohol을 acrylic acid의 환원을 통하여 합성하고자 여러 가지 반응 조건을 시도하였으나 carbonyl 그룹만 환원되지 않고 탄소-탄소 이중결합도 환원되어 1-propanol이 주생성물로 얻어졌다. 이것은 문헌에 보고된 것과는 매우 다른 결과이어서 이 반응을 보다 정밀하게 조사하게 되었다. 또한 propiolic acid를 LiAlH<sub>4</sub>로 환원시켰을 때 allyl alcohol 단계에서 반응이 멈추는 것을 확인하고 중수소의 위치선택적인 도입 조건을 광범위하게 연구하였다. 이 결과는 2,3-dideuterioallyl alcohol의 합성 일환으로 논문으로 발표하였다.

#### 다. Carbonyl 계 화합물의 합성

Benzene에 Friedel-Crafts 아실화반응을 통하여 acetophenone을 합성하여 haloform반응을 이용하여 methyl 그룹을 제거한 다음 생성된 benzoic acid을 benzyl alcohol로 환원시키고 다시 재산화시켜 benzaldehyde를 얻는 방법은 4단계에 걸치지만 사인화수소(HCN)나 일산화탄소(CO)를 사용하는 반응에 비하여 안전하였고 각 단계의 수율도 80% 정도이어서 가격이 비싼 deuteriobenzene을 사용하는 것이 큰 부담은 되지 않았다. 그러나

phenylacetaldehyde(**12**)의 경우 시판되는  $\alpha,\alpha$ -dideuteriophenylacetic acid로부터 얻은 aldehyde(**12D**)가 정량과정에서 교환반응을 진행한다는 사실이 관찰되어 benzene 고리에 중수소가 치환된 출발물질로부터 합성하였는데 여러 가지 시도한 경로 중 Grignard반응을 이용한 것이 가장 효율적이었다.

2-acetylpyrroline(**13**)은 문헌의 방법에 따라 합성을 시도하였으나 최종 산화과정이 문헌과는 달리 진행되지 않았다. 2-acetylthiazolinine(**14**)도 문헌의 방법대로 2-aminoethanethiol과 pyruvic acid의 반응을 통하여 얻고자 하였으나 carboxylic acid의 carbonyl 그룹 대신 ketone의 carbonyl 그룹이 반응하여 특이한 5각형 고리를 형성하였다.

1-hepten-3-one과 1-octene-3-one은 vinyl 그룹에 중수소가 포함된 Grignard시약을 사용하여 합성할 수 있었다.

#### 라. Alcohol계 화합물 합성

Grignard 시약의 Michael 첨가반응과 1,2-첨가반응이 경쟁함으로 생성물의 분리가 필수적인데 두 생성물이 실리카겔 컬럼에서 잘 분리되지 않았기 때문에 전체적인 수율을 향상시키기 어려웠다. 분리하지 않고 그대로 산화시킨 다음 다음 단계를 진행하는 방법을 나중에 시도하여 최종 정제를 위한 크로마토그래피를 1회만 실시하는 것으로 필요한 양의 동위원서가 표지된 목표물질을 얻을 수 있었다.

## 제4절 불고기 재조합 시스템개발 및 가열조건의 영향

### 1. 서론

재조합 시스템은 식품 중의 주요 향기활성 성분들을 SIDA를 통해서 알아낸 특정 농도로 혼합한 것을 말하는 것으로, 보통 재조합된 것과 실제 식품과의 차이를 알아보는 것이 중요 목적이다. 그리고 훈련된 패널들을 통해서 재조합 시스템이 실제 시료와 얼마나 가까운지를 알아본다. 따라서 재조합 과정은 식품 중에서 우리가 분석한 key odorants가 실제 그 식품의 중요한 향기 성분인지 확인하는 중요한 과정이다. 그리고 이러한 재조합 시스템 연구는 AEDA와 SIDA의 여러 가지 제한점을 극복할 수 있다.

관능검사란 식품이나 물질의 특성을 평가하는 데 있어서 기계가 아닌 사람이 이를 측정을 하는 방법이다. 식품 중에 있는 향기활성성분이 무엇인지, 어느 성분이 향을 내는 것인지 여러 방법을 사용하여 알아낼 수 있으나, 최종적으로 사람이 직접 맛을 보고 평가하는 것이 필요하다. 예를 들어서, 특정 식품의 향기활성성분을 AEDA와 SIDA방법을 거쳐서 동정 및 정량하고, 이를 최종적으로 재조합하여 사람이 평가하면 조합한 향미와 실제 시료와의 차이를 알아낼 수 있다.

관능검사에는 차이식별검사와 묘사분석, 그리고 소비자 검사, 3가지 종류가 있다. 그 중에서 묘사분석은 소수의 패널을 구성하여 식품의 관능적 특성을 질적으로 묘사하는 방법으로, 그 종류에는 향미 프로파일(Flavor profile) 방법, 스펙트럼 묘사분석 (Spectrum descriptive analysis), 텍스처 프로파일 (Texture profile), 정량적 묘사분석 (Quantitative descriptive analysis), Profile attribute analysis (P.A.A), 시간-강도 묘사분석 등 여러 가지 방법이 있다.

이 중에서 Flavor Profile은 6~8명의 훈련된 패널들로 이루어진다. 훈련시간은 보통 1시간에서 1시간 반 정도이지만, 향과 같은 경우에는 둔화가 빨리 일어나기 때문에 더 짧은 시간이 소요된다. 그리고 묘사분석을 하는데 있어서 가장 중요한 것은 용어를 개발하고 이를 일치시키는 것이 절대적으로 필요하다. 'concept alignment'라고도 하는 용어 일치는 패널리더가 주도를 하되, 패

널들과 같이 의견일치를 시켜야 한다. 이밖에 향미 프로필 방법은 각 향미특성의 규명, 각각의 특성강도의 측정, 각각의 특성이 출현하는 순서 결정, 후미의 규명 및 강도 측정, 그리고 전체적인 인상 측정을 포함한다.

본 실험에서는 AEDA에 의해 밝혀진 불고기의 주요 향기활성 성분을 SIDA로 함량을 정량하고, 각각의 역치값을 고려하여 구해진 OAV를 이용하여 재조합 시스템을 만들고자 하였으며, 재조합 시스템과 실제 불고기 향과의 유사성을 평가하고자 하였다. 따라서 본 실험에서는 묘사분석 중에서 향미 프로필 방법을 사용할 예정이고, 향만을 평가하였다.

## 2. 연구개발의 내용 및 방법

### 가. 불고기 재조합 시스템 개발

재조합 시스템을 개발하기 위해서 선행되어야 하는 것이 Aroma Extract Dilution Analysis와 Stable Isotope Dilution Assay로써, SIDA를 통해서 식품 중에 포함되어있는 화합물의 농도를 알아낼 수 있고, 그것을 바탕으로 재조합 시스템을 만들었다. 그리고, 관능검사를 실시하여 재조합 시스템이 실제로 불고기향과 비슷한지를 알아보았다. 따라서, 재조합 과정은 식품 중에서 우리가 분석한 key odorants가 실제 그 식품의 중요한 향기 성분인지 확인하는 중요한 과정이다.

SIDA를 통해서 재조합된 시스템이 실제와 가깝지 않을 수도 있기 때문에, 주요 향기성분이라고 여겨지는 화합물의 농도를 조절하여 실제 불고기 향과 비슷한 재조합 시스템이 무엇인지 알아보았다.

### 나. 관능검사

#### 1) 불고기의 묘사용어

묘사분석을 하기 위해서는 우선 묘사분석에 경험이 있고 그 방법에 의해 훈련된 패널 지도자에 의해 진행되어야 한다. 이 연구에서 실시할 묘사분석은

향미 프로파일 방법이다. 일반적으로 향미 프로파일을 하기 위해서는 최소 4명의 패널 요원이 요구된다.

불고기의 묘사분석을 위한 패널요원을 선발하기 위하여 이화여자대학교 식품학 대학원에 재학 중인 학생들 중에서 관능검사에 관심이 많고 경험이 많은 여자 대학원생 8명을 패널로 선정하였다.

#### 가) 불고기 시료 제조 및 제시

불고기를 조리하기 위해서 선정한 재료는 1차년도와 동일하다. 불고기 상등 품은 신촌 현대백화점에서 구매하였고, 그 외의 재료는 신촌 그랜드마트에서 구입하였다. 필요한 재료는 Table 3-4-1과 같다.

Table 3-4-1. 불고기 재료와 필요량

재료	필요량(g)	재료	필요량(g)
불고기	450	배즙	75
간장	60	양파	36
설탕	30	파	15
참기름	18	마늘	24
깨소금	9	생강	9
후추	3		

양념장을 만드는 순서는 간장에 설탕을 더하고 그 다음에 참기름, 깨소금, 후추, 배즙, 양파, 파, 마늘, 그리고 생강 순서로 혼합을 한 후, 양념장을 불고기에 넣고 상온에서 1시간 동안 재운 후 가열 조리하였다. 이때 양파, 파, 마늘, 생강은 칼로 다졌고, 배즙은 신선한 배를 갈아서 만들었다. 그 양념장으로 소고기 등심 부위를 상온에서 1시간 동안 재운 후 가열 조리하였다. 표준화된 조리법의 확립을 위하여 일정하게 온도가 유지된 convection oven을 사용하여 220℃에서 30분간 예열한 후 불고기 양면을 각각 4분씩 구웠다. 불고기를 다 굽고 약 1.5×1.5cm<sup>2</sup>의 크기로 자른 후, 8g의 불고기를 갈색의 vial에 넣었다. 한 명당 3개의 vial을 줄 수 있도록 총 24개의 vial에 불고기 8g을 넣고, 보온고에

서 70℃에서 10분간 보관 후 패널들에게 제시하였다.

8명의 패널에게 불고기 시료가 들어있는 갈색 vial (40ml)을 1개씩 나누어 주었다. 그리고 그 향을 맡도록 하였다. 그 향을 맡는 방법은 모든 패널이 일괄적으로 cap을 열어 숨을 2~3회에 걸쳐서 힘차게 들이마시게 하였다. 그리고 5분 후에 보존고에 있는 다른 시료를 같은 방법으로 제시하고 향을 맡도록 하였다. 그리고 각 시료를 맡을 때마다 나누어준 하얀 종이에 불고기 향을 묘사하도록 하였다.

## 2) 재조합 시스템의 묘사용어

### 가) 재조합 시료 제조 및 제시

재조합에 쓰이는 시료를 제조하기 위해서, 먼저 1ml의 ethyl alcohol에 1 $\mu$ l의 chemicals을 각각을 넣고 shaking을 하였다. chemicals의 원액을 넣기에는 그 향이 너무 강하고, 양이 너무 적기 때문에, 적은 양의 chemicals을 넣기 위해서 희석시켰다. 희석을 시킨 후 odor threshold  $\times$  FD factor(A)로 계산을 해서 그 비율로 재조합 시료를 만들었다. 그러나 패널들이 감지를 못하는 상황이 발생하여 A의 10배수를 다시 제조하였다. 원래 OAV라 하는 것은 ‘농도/역치값’이라 할 수 있는데, 이는 FD factor는 비례한다. 우리가 재조합 시스템을 시행하는 데 있어서 필요한 것이 농도인데, 이러한 식에 의해서 각 성분의 농도를  $n \times \text{FD factor} \times \text{역치값}$ 으로 계산을 하였다.

이러한 재조합 비율로 ethyl alcohol에서 V/V의 비율로 각각을 추출하여 해바라기유에 넣고 30분간의 stirring 후, 40ml의 갈색 vial에 8ml씩 넣은 후 냉장보관하고, 관능검사 시작 전에 상온에서 30분간 놓은 후 관능검사를 실시하였고 이 때 하얀 종이를 주어서 향을 묘사한 용어를 기록하도록 하였다.

## 3) 농도를 달리하여 재조합된 시스템과 실제 불고기향과의 비교

### 가) 훈련

패널 훈련은 재조합에 쓰이는 chemical을 사용하여 시행하였다. Chemical은 allyl mercaptan, acetylpyrazine, methional, 1-octen-3-one, phenylacetaldehyde, furaneol, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, linalool, 3-isobutyl-2-methoxypyrazine, 2-acetyl-1-pyrroline, 그리고 2-acetyl-2-thiazoline로 총 11가지였다. 11개의 250ml 삼각 플라스크에 100ml의 sunflower oil을 넣고 Table 25에 있는 양을 각 플라스크에 넣어 30분간 stirring시킨다. 훈련시키기 위한 chemicals의 양은 패널들이 각각의 chemical에 대한 감지 정도가 다르기 때문에, 그 향에 대한 인식을 시키기 위해서 위에서 재조합에 쓰인 양과는 달리하였다.

Table 3-4-2. The concentration of recombined material

Chemical	A: Odor threshold ( $\mu\text{g/L}$ )	B: FD factor ( $\log_3 A$ )	$A \times B \times 10$ ( $\mu\text{g/L}$ )
2-methyl-3-furanthiol	0.004	7	0.28
acetylpyrazine	12.5	6	750
linalool	89.4	6	5364
furaneol	6.25	7	437.5
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	1.56	7	109.2
3-isobutyl-2-methoxypyrazine	0.31	6	18.6
1-octen-3-one	50	5	2500
phenylacetaldehyde	78.23	4	3129.2
methional	0.08	8	6.4
allyl mercaptan	0.32	3	9.6
1-propanethiol	5.2	4	208

30분간의 stirring 후, 각 chemical이 들어있는 해바라기유를 20ml의 투명 vial에 8ml씩 넣은 후 냉장보관하고, 훈련시키기 전에 상온에서 30분간 놓은 후 훈련을 시켰다. 훈련은 위에 제시한 각 chemical의 강도를 9점 척도 중에서 5점이라 가정하고 그 향을 기억할 수 있도록 하루에 2번씩 일주일에 3회로 하여, 총 2달간 실시하였다.

Table 3-4-3. 불고기 chemical과 함량

Chemical	필요량( $\mu\text{g}/100\text{L}$ )
allyl mercaptan	240
acetylpyrazine	$2.5 \times 10^4$
methional	100
1-octen-3-one	5000
phenylacetaldehyde	391.15
furaneol	1875
1-propanethiol	0.078
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	$1.1 \times 10^4$
linalool	6
3-isobutyl-2-methoxypyrazine	80
2-acetyl-1-pyrroline	0.1
2-acetyl-2-thiazoline	0.0052

나) 재조합

재조합을 실시한 후 sunflower oil에 넣어 30분간 stirring 시킨 후, 투명 vial에 넣어 제시하고, 재조합 sheet도 같이 제시하였다.

총 3가지의 재조합한 향을 비교하였는데, 비교 방법은 혼련하는 동안에 5점으로 인식시킨 향과 비교해서 어느 정도의 향이 나는지 비교를 해 보았다. 3가지의 재조합한 향은 재조합한 향의 용어를 뽑아내기 위해 만들었던 그대로의 농도와, 그것에 비해서 2-methyl-3-furanthiol의 양을 늘린 것, 그리고 phenylacetaldehyde의 양을 줄인 것 세 가지로 주었다. 2-methyl-3-furanthiol가 감지가 잘 안 되었기 때문에, phenylacetaldehyde의 향이 너무 강하였기 때문에 그 양을 조절한 것이었다.

Table 3-4-4. 재조합 sheet

										이름:
고기향										
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
누룽지 구수함										
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
익은 감자향										
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
양파향										
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
마늘향										
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
카라멜 향										
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
꽃단내										
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
_____	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

다. 불고기 가열 조건에 따른 풍미성분의 비교

1차 년도부터 조리법을 표준화하여 만들었던 불고기를 가열방법을 달리 하여서 그 영향을 살펴보기로 하였다. 세 가지 가열 방법은 convection oven, electric pan, 그리고 솥을 이용하였다. 기타 조리과정은 앞에서 기술한 것과 같다.

3. 연구 결과 및 고찰

가. 관능검사

1) 불고기의 묘사용어

불고기를 8g씩 갈색 vial에 넣어 제시하여 8명의 패널에게 불고기에 대한 향을 묘사한 결과 Table 3-4-5의 결과가 나왔다. 불고기 향을 묘사한 용어는 구운 고기향과 고기 누린내, 탄내 고기향, 기름 느끼, 카라멜향, 생강향, 양파와 파의 혼합향, 마늘향 그리고 후추향으로 총 9개가 묘사용어로 선택되었다.

Table 3-4-5. 불고기 향 묘사 용어와 설명

묘사 용어	설명
구운 고기향	고기가 구워진 향으로써, 고소함이 섞인 향
고기 누린내	불고기의 off-flavor로써, 불쾌취
탄내 고기향	고기가 약간 타면서 생기는 향
기름(느끼)	지방의 기름과 같은 느끼
카라멜 향	단백질과 탄수화물이 반응이 일어나서 생기는 향으로 약간의 탄내 함유
생강향	생강을 익혀서 나는 향
양파향+파향	양파와 파를 약간 익혔을 때 나는 향
마늘향	마늘을 구웠을 때 나는 향
후추향	후추에서 나는 향

## 2) 재조합의 묘사용어

재조합을 8g씩 갈색 vial에 넣어 제시하여 8명의 패널에게 불고기에 대한 향을 묘사한 결과 Table 3-4-6의 결과가 나왔다. 재조합한 향을 묘사한 용어는 고기향과 누룽지 구수함, 익은 감자향, 양파향, 마늘향, 카라멜 향, 그리고 꽃단내로 총 7개가 묘사용어로 선택되었다.

Table 3-4-6. 불고기 향 묘사 용어와 설명

재조합 묘사용어	설명
고기향	2-methyl-3-furanthiol
누룽지 구수함	acetylpyrazine
익은 감자향	methional
양파향	
마늘향	allyl mercaptan
카라멜 향	furaneol
꽃단내	linalool

## 3) 농도를 달리하여 재조합된 시스템과 실제 불고기향과의 비교

3개의 재조합한 향에 대한 그 차이를 실시한 결과, 2-methyl-3-furanthiol을 더 첨가한 시료가, phenylacetaldehyde를 적게 넣은 시료와 OAV의 비율로 넣은 재조합 시료보다도 불고기향에 가까웠으나, 전체적으로 3개의 조합한 향이 불고기 향과 크게 비슷하지는 않았다. 앞으로 좀더 정확한 정량이 진행되고 재조합 결과를 토대로 recombinant study가 이루어질 예정이다.

## 나. 불고기 가열조건에 따른 풍미성분의 비교

세 가지 가열 방법은 convection oven을 이용한 것과 electric pan 그리고 솥으로 굽는 방법이었다. 각 방법에 따라 동정된 물질과 함량은 Table 3-4-7

과 같고, MS total ion chromatograms은 Figure 3-4-1과 같다.

실험 결과 솥을 이용하여 불고기를 조리한 경우가 다른 두 경우보다 더 다양한 종류의 carbonyls이 발견되었다. 특히 furfural, benzaldehyde 그리고 (E,E)-2,4-decadienal과 같은 경우는 솥을 사용하여 불고기를 구웠을 경우에만 감지되었다. 반면에 2-ethyl-6-methyl pyrazine, allyl propyl disulfide, neral, borneol, 4-terpinenol, 4-vinyl-2-methoxy phenol, 그리고 myrcene은 convection oven과 electric pan에서 구웠을 경우에만 발견되었고 솥을 사용하여 구운 경우에는 발견되지 않았다.

이 연구에서는 총 61개의 향기성분 발견되었는데, 4개의 pyrazines, 10개의 황함유 물질, 7개의 carbonyls, 7개의 alcohols, 7개의 지용성 hydrocarbons, 25 terpene hydrocarbons, 그리고 miscellaneous compound가 동정되었다.

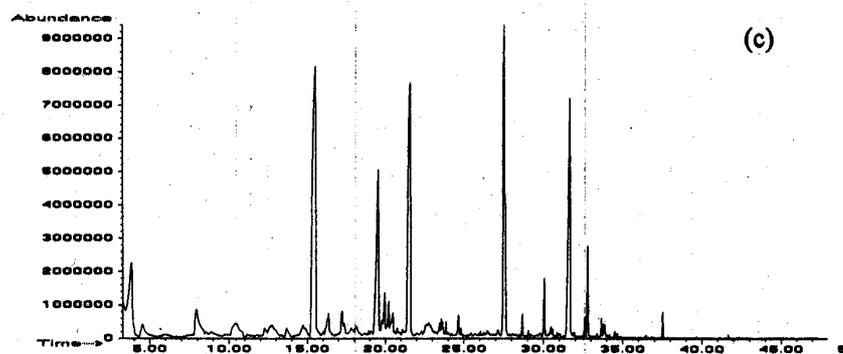
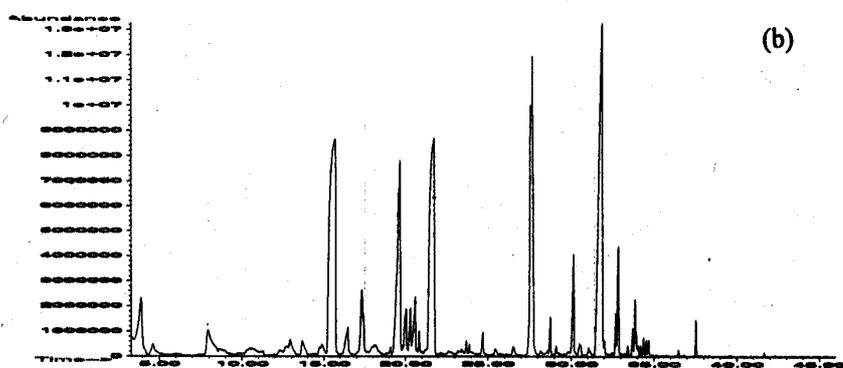
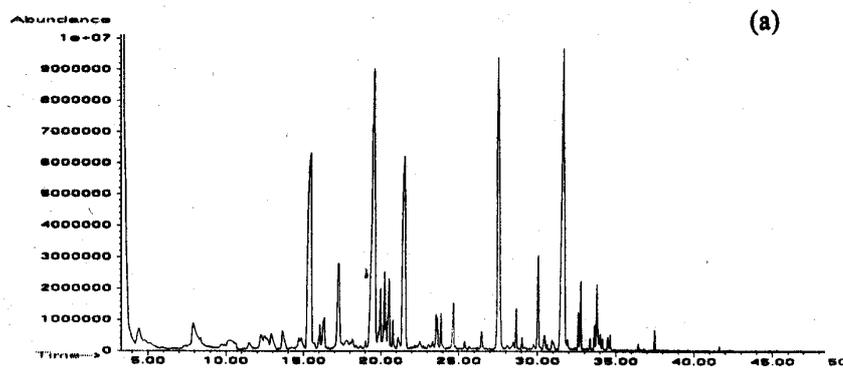


Figure 3-4-1. MS total ion chromatograms of bulgogi volatiles cooked by the three different heating methods. (a) a convection oven; (b) an electric pan; (c) a charcoal grill.

Table 3-4-7. Volatile compounds in bulgogi cooked by three different heating methods

No.	Possible compounds	RI <sup>a</sup>	P.A <sup>b</sup>			ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>
			oven <sup>c</sup>	pan <sup>d</sup>	charcoal <sup>e</sup>		
<b>Pyrazines</b>							
1	2-methyl pyrazine	828	0.02±0.01	0.11±0.01	0.04±0.01	MS/RI	C
2	2,5-dimethyl pyrazine	922	0.05±0.04	0.08±0.01	0.03±0.01	MS/RI	B
3	2,6-dimethyl pyrazine	925	0.09±0.06	0.08±0.01	0.04±0.02	MS/RI	A,B
4	2-ethyl-6-methyl pyrazine	1002	0.05±0.03	0.05±0	- <sup>h</sup>	MS	
<b>Sulfur-containing compounds</b>							
5	allyl methyl disulfide	916	0.30±0.21	0.20±0.07	0.09±0.02	MS/RI	A,E
6	diallyl disulfide	1088	7.73±1.14	8.23±4.35	2.30±0.53	MS/RI	D
7	allyl propyl disulfide	1097	0.51±0.08	0.08±0	-	MS	
8	dipropyl disulfide	1111	0.63±0.10	0.13±0.77	0.20±0.07	MS/RI	A
9	( <i>E</i> )-1-propenyl propyl disulfide	1121	0.17±0.02	0.30±0.04	0.04±0	MS	
10	methyl allyl trisulfide	1135	0.03±0	-	-	MS	
11	3-vinyl-4 <i>H</i> -1,2-dithiin	1192	0.25±0.09	0.20±0.13	0.06±0.01	MS	
12	2-vinyl-4 <i>H</i> -1,3-dithiin	1220	0.51±0.17	0.48±0.33	0.11±0.02	MS	
13	diallyl trisulfide	1305	0.33±0.10	-	-	MS/RI	A,D
14	dipropyl trisulfide	1330	0.07±0.02	0.02±0	-	MS	

(continued)

No.	Possible compounds	RI <sup>a</sup>	P.A <sup>b</sup>			ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>
			oven <sup>c</sup>	pan <sup>d</sup>	charcoal <sup>e</sup>		
<b>Carbonyls</b>							
15	3-hydroxy-2-butanone	713	0.51±0.19	0.56±0.25	0.42±0.15	MS/RI	A,C
16	furfural	837	-	-	0.16±0.11	MS/RI	A,B
17	benzaldehyde	968	-	-	0.01±0.01	MS/RI	B
18	benzeneacetaldehyde	1052	0.07±0.04	0.16±0	0.11±0.05	MS/RI	B
19	neral	1244	0.06±0.02	0.52±0	-	MS/RI	B
20	geranial	1272	0.14±0.07	0.47±0	0.06±0.04	MS/RI	A,B
21	( <i>E,E</i> )-2,4-decadienal	1327	-	-	0.04±0.01	MS/RI	B,C
<b>Alcohols</b>							
22	furfuryl alcohol	871	0.23±0.07	0.56±0.16	0.50±0.16	MS/RI	A,B
23	2-methoxy phenol (guaiacol)	1093	0.05±0.02	0.09±0	0.11±0	MS/RI	B,C
24	linalool	1105	0.11±0.04	0.13±0	0.04±0	MS/RI	B,C
25	borneol	1178	0.03±0.01	0.09±0.03	-	MS/RI	B
26	4-terpinenol	1184	0.05±0.02	0.05±0	-	MS/RI	A,B
27	4-vinyl-2-methoxy phenol	1323	-	0.10±0.10	-	MS	
28	spathulenol	1632	0.01±0	0.03±0.01	-	MS/RI	A

(continued)

No.	Possible compounds	RI <sup>a</sup>	P.A. <sup>b</sup>			ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>
			oven <sup>c</sup>	pan <sup>d</sup>	charcoal <sup>e</sup>		
<b>Terpene Hydrocarbons</b>							
29	⌘-pinene	931	0.31±0.07	0.54±0.15	0.20±0.10	MS/RI	B,C
30	camphene	948	0.33±0.06	0.93±0.37	0.15±0.05	MS/RI	A,B
31	sabinene	972	0.13±0.03	0.18±0.06	0.11±0.07	MS/RI	A,B
32	β-pinene	975	0.15±0.02	0.31±0.15	0.09±0.03	MS/RI	A,B
33	myrcene	994	0.07±0.01	0.07±0	-	MS/RI	A,B
34	δ-3-carene	1010	0.37±0.14	0.48±0.10	0.24±0	MS/RI	A
35	limonene	1030	-	-	0.18±0.01	MS/RI	B,C
36	β-phellandrene	1032	1.33±0.16	2.59±1.35	0.17±0.13	MS/RI	A,B
37	1,8-cineole	1035	-	0.37±0.13	0.06±0.02	MS/RI	B
38	δ-elemene	1337	0.24±0.07	0.52±0	0.20±0	MS/RI	A,B
39	α-cubebene	1348	0.06±0.02	0.24±0.14	0.04±0.02	MS/RI	A,B
40	α-copaene	1379	0.76±0.21	2.48±0.80	0.48±0.22	MS/RI	B
41	β-elemene	1391	0.17±0.07	0.52±0.18	0.06±0.01	MS/RI	B
42	β-caryophyllene	1430	5.70±1.69	12.82±10.31	3.85±1.72	MS/RI	A
43	(E)-caryophyllene	1433	0.03±0.02	0.10±0.01	0.02±0.01	MS/RI	B

(continued)

No.	Possible compounds	RI <sup>a</sup>	P.A. <sup>b</sup>			ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>
			oven <sup>c</sup>	pan <sup>d</sup>	charcoal <sup>e</sup>		
44	$\alpha$ -guaiene	1437	0.05±0.02	0.16±0.05	0.03±0.02	MS/RI	B
45	( <i>E</i> )- $\beta$ -farnesene	1451	0.02±0	-	-	MS/RI	A,B
46	$\alpha$ -humulene	1459	0.22±0.07	1.62±0.05	0.13±0.05	MS/RI	B
47	ar-curcumene	1482	0.07±0.03	0.27±0.13	0.03±0.01	MS/RI	B
48	$\beta$ -selinene	1491	0.16±0.05	0.52±0.17	0.12±0.04	MS/RI	B
49	zingiberene	1496	0.37±0.15	1.67±1.19	0.09±0.05	MS	
50	( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -farnesene	1503	0.06±0.03	0.14±0.01	0.01±0	MS/RI	B
51	$\beta$ -bisabolene	1508	0.06±0.02	0.21±0.11	0.02±0.01	MS/RI	B
52	$\delta$ -cadiene	1519	0.08±0.03	0.25±0.05	0.04±0.01	MS/RI	B
53	$\beta$ -sesquiphellandrene	1524	0.09±0.03	0.35±0.22	0.03±0.01	MS/RI	B
<b>Aliphatic Hydrocarbons</b>							
54	decane	1000	0.09±0.08	-	0.01±0	MS/RI	C
55	1-dodecene	1190	0.21±0	-	-	MS/RI	B
56	dodecane	1200	0.03±0.01	0.15±0.07	0.08±0.04	MS/RI	B,C
57	1-tetradecene	1395	0.04±0	-	0.04±0.01	MS/RI	B
58	tetradecane	1400	0.03±0.02	-	0.03±0.01	MS/RI	B,C

(continued)

No.	Possible compounds	RI <sup>a</sup>	P.A. <sup>b</sup>			ID <sup>f</sup>	Ref <sup>g</sup>
			oven <sup>c</sup>	pan <sup>d</sup>	charcoal <sup>e</sup>		
59	hexadecane	1600	0.01±0	0.03±0.01	-	MS/RI	B,C
60	heptadecane	1700	0.01±0	0.03±0	0.01±0	MS/RI	B
<b>Miscellaneous</b>							
61	caryophyllene oxide	1585	0.04±0.02	0.10±0.03	0.02±0	MS/RI	B

<sup>a</sup> Retention indices were determined using *n*-paraffins C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub> as external references.

<sup>b</sup> Average of relative ratio of peak area in MS total ion chromatogram (*n*=3) ± standard deviation.

<sup>c</sup> Convection oven. <sup>d</sup> Electric pan. <sup>e</sup> Charcoal.

<sup>f</sup> Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database (1995) (HewlettPackard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures [A, Kondjoyan and Berdague (1996); B, Adams (2002); C, Acree and Arn (1997); D, Kubec et al. (1997); E, Ansorena et al. (2001); F, Kerler and Grosch (1996)]; MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

<sup>g</sup> References.

<sup>h</sup> not detected.

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 연구 개발 목표의 달성도

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
1차년도 ('01-'02)	<p>불고기 향기활성 성분의 동정</p> <p>불고기 향기활성 성분의 화학 구조 규명 및 기초 합성법 확립</p> <p>불고기 시료 조제의 표준화 및 불고기 풍미성분의 추출법 개발</p>	<p>GC-Olfactometry, aroma extract dilution analysis (AEDA), GC-MS 등</p> <p>furans, pyrans, pyrroles, pyridines, pyrazines, oxazoles, oxazolines, thiophenes, thiazoles, thiazolines, disulfides, thiolanes, aldehydes, ketones, lactones 등</p> <p>용매 추출법, 용매 및 진공 추출법, 동시증류추출법, solid phase micro-extraction (SPME), static head space extraction 등</p>	100
2차년도 ('02-'03)	<p>불고기 향기활성 성분의 정량 및 향기활성도 (odor activity value, OAV) 측정</p> <p>안정성 동위원소를 이용하여 치환된 (labeled) 불고기 향기활성 성분의 합성</p>	<p>제2협동 1차년도에 확립된 방법을 이용한 불고기 향기활성 성분의 추출, 안정성 동위원소 희석분석법 (stable isotope dilution assay, SIDA) 이용한 정량, 관능 검사법에 의한 각 향기활성 성분의 역치값 (threshold value) 측정</p> <p>제1협동 1차년도에 확립된 합성법 사용, 제1세부 1차년도에 동정된 향기활성 성분의 labeling</p>	100

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
	<p>합성된 향기활성 성분의 시료내 처리법, 추출법 및 분석법 확립</p> <p>1차년도에 미동정된 향기활성 성분의 분획, 농축법 확립 및 동정</p>	<p>합성된 안정화 동위 원소의 시료내 처리법, GC-MS (selected ion monitoring, SIM) 분석법, 용매 및 진공 추출법 등, Vigreux column 농축법, 산-염기 분획법, column chromatography, 끓는점에 따른 분획법 등 사용</p>	
3차년도 ('03-'04)	<p>불고기 풍미 성분의 재조합 시스템과 시제품 개발 및 향기활성 성분의 확인</p> <p>불고기 향기활성 성분의 생성 기작 규명</p> <p>불고기 풍미 성분의 객관적, 주관적 품질 특성 비교</p>	<p>모형 식품 제조 등을 통한 재조합 시스템과 불고기향 시제품 개발과 이를 이용하여 향기활성 성분의 확인 및 상호 미치는 영향 고찰</p> <p>제1세부 1차년도에 동정된 향기활성 성분의 전구체, 생성 기작, 반응 조건 등</p> <p>불고기 조리, 가공 조건, 원료 배합비 등의 영향 고찰, 기기 및 관능 검사법</p>	95

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도 (점수)
1차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○불고기 향기활성 성분의 동정 <ul style="list-style-type: none"> <li>-불고기 풍미 성분의 추출 및 농축 (10)</li> <li>-향추출물 회석분석에 의한 향기활성 성분의 동정 (30)</li> </ul> </li> <li>○불고기 향기활성 성분의 화학구조 규명 및 기초 합성법 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>-불고기 향기활성성분의 화학 구조 규명 (15)</li> <li>-기본 풍미 성분들의 유기 합성법 확립 (15)</li> </ul> </li> <li>○불고기 풍미 성분의 추출법 개발 및 최적화 <ul style="list-style-type: none"> <li>-불고기의 가열, 가공 조건 확립 및 표준화 (5)</li> <li>-불고기 풍미 성분의 추출법 및 농축법 최적화 (25)</li> </ul> </li> </ul>	40 (10) (30) 30 (15) (15) 30 (5) (25)
2차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○불고기 향기활성 성분의 정량 및 향기활성도 (OAV)의 측정 <ul style="list-style-type: none"> <li>-안정성 동위원소 회석분석법을 이용한 향기활성성분의 정량 (25)</li> <li>-역치값 결정에 의한 향기활성도 측정 (15)</li> </ul> </li> <li>○안정성 동위원소를 이용한 불고기 향기활성 성분의 합성 <ul style="list-style-type: none"> <li>-유기합성법으로 안정성 동위원소로 치환된 향기활성 성분의 합성 (25)</li> <li>-합성된 향기활성 성분의 분리 (5)</li> </ul> </li> <li>○합성된 향기활성 성분의 분석법 및 미동정된 향기활성 성분의 동정 <ul style="list-style-type: none"> <li>-합성된 안정성 동위원소 치환 향기활성 성분의 시료내 처리법 및 추출법 개발 (10)</li> <li>-GC/MS(SIM)을 이용한 향기활성 성분의 정량법 확립 (10)</li> <li>-1차년도에 미동정된 향기활성 성분의 동정 (10)</li> </ul> </li> </ul>	40 (25) (15) 30 (25) (5) 30 (10) (10) (10)
3차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○불고기 풍미 성분의 재조합 시스템과 시제품 개발 및 향기활성 성분의 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>-향기활성성분을 재조합한 모형 식품과 시제품의 개발 (15)</li> <li>-관능검사법에 의한 향기활성 성분의 검증 및 보완 (25)</li> </ul> </li> </ul>	40 (15) (25)

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도 (점수)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○불고기 향기활성 성분의 생성기작 규명 및 전구체, 반응 조건 고찰</li> <li>-향기활성 성분의 생성기작 규명 (15)</li> <li>-향기활성 성분의 전구체 및 반응 조건의 영향 분석 (15)</li> <li>○불고기 풍미 성분의 객관적, 주관적 품질 특성 비교</li> <li>-불고기 가열 조건, 원료 배합비 등이 향기활성 성분의 형성에 미치는 영향 (20)</li> <li>-향기활성 성분의 차이에 따른 불고기 풍미 및 품질특징 비교 (10)</li> </ul>	30
최종 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○불고기 향기활성 성분의 동정, 정량</li> <li>○불고기 풍미 재조합 시스템과 시제품 개발</li> <li>○불고기 향기활성 성분의 안정성 동위원소 합성법 개발 및 생성기작 규명</li> <li>○불고기 향기활성 성분의 추출법 및 분석법 개발과 객관적, 주관적 품질 비교</li> </ul>	30 10 30 30

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 불고기의 풍미성분 분석을 위한 효율적인 추출방법 확립

불고기 풍미성분의 분석을 위해 확립된 추출법 및 분석법은 불고기의 풍미성분 및 특성을 이해하는 데는 물론, 기타 다른 여러 가지 육류의 풍미성분 분석에 활용될 수 있다. 또한, 이를 위해서 확립된 방법을 기타 식품의 풍미특성, 특히, 극미량으로 존재하거나 불안정한 성분들의 추출 및 분석에 이용될 수 있다. 그리고, 황 함유 성분들의 분석을 위해 본 연구에서 수행하고 확립된 방법은 다양한 식품 중 황 함유 성분 규명에 적극 활용될 수 있다.

### 불고기의 향기활성성분 동정, 정량 및 OAV 결정

본 연구에서 밝혀진 불고기의 향기활성성분의 분자구조 함량 및 각각의 odor active values (OAV)에 대한 결과는 불고기 풍미의 savory flavor 개발, 불고기 소스 및 양념장류 개발, 기타 불고기 관련 제품의 산업화 시 이용될 수 있으며, 이들 제품의 품질관리 시 지표 성분으로 활용할 수 있다. 또한 국내외 주요 학술지에 그 결과를 발표하여 불고기의 향미 특성 및 우수성을 널리 홍보하여 불고기의 세계 식품화에 기여할 계획이다.

### 불고기 향기활성성분의 합성

동위원소가 치환된 향기활성 물질들을 일정량 이상 합성하여 “동위원소 화학물은행”을 신설하여 보관하는 제도가 마련된다면 향료 화학 연구에 획기적인 발전을 이룰 수 있으리라고 기대된다. 또한 향료 물질의 다량 합성을 추구하는 벤처 사업에 본 합성 기술을 이전할 수도 있으리라고 예상된다.

### 불고기의 재조합 시스템 개발 및 가열조건의 영향

본 연구에서 확립된 관능검사법은 기타 육류 제품의 풍미특성 분석에 이용될

수 있으며, 완성된 제조합 시스템 결과는 불고기 풍미특성을 가진 meat flavor 개발에 이용될 수 있으며, 이를 국내외 특허를 출원할 계획이다.

또한, 본 연구에서 밝힌 가열조건이 불고기 풍미특성에 미치는 연구결과는 불고기 관련제품의 산업화 시 제품 공정개발에 활용될 수 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 불고기 시료 조제의 표준화 및 불고기 풍미성분의 추출법 개발

#### 향기 성분의 추출법

1. Chun, H.N., Ho, C.T. and Kim, J.H. Selective headspace purge- and- trap method for the analysis of volatiles in roast pork and roast chicken. *Food Sci. Biotechnol.* **2000**, *9*, 391-394
2. Gorecki, T., Yu, X and Pawliszyn, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibers. *Analyst.* **1999**, *124*, 643-649
3. Harmon, A.D. Solid phase microextraction for the analysis of aromas and flavors. In: Flavor, Fragrance, and Odor Analysis. Marsili, R. (ed.). *Marcel Dekker, Inc.*, NY, USA, **2002** 75-106
4. Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.*, **2000**, *880*, 35-62

### 불고기 향기 활성 성분의 동정, 정량 및 OAVs

#### 식품의 향기 활성 성분의 정량 및 OAVs

1. Guth H, Grosch W. 1990. Deterioration of soya-bean oil: Quantification of primary flavour compounds using a stable isotope dilution assay. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1990**, *23*, 513-22.
2. Guth, H.; Grosch, W. Identification of the character impact odorants of stewed beef juice by instrumental analyses and sensory studies. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2862-2866.
3. Preininger M, Grosch W. 1994. Evaluation of key odorants of the neutral volatiles of emmentaler cheese by the calculation of odour activity values. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1994**, *27*, 237-44.

4. Schieberle, P. Primary odorants in popcorn. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1141-1144.
5. Wagner R, Grosch W. 1998. Study on the key odorants of french fries. *J. Am. Oil Chem.*, **1998**, *75*, 1385-92.

#### 향기 활성 성분의 역치값 측정

1. Amirav, A., Jign, H. Pulsed flame photometer detector for gas chromatography. *J. Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3305-3318
2. Eckert, S.E., Hawthorn, S. B., Miler, D. J. Comparison of commercially available atomic emission and chemiluminescence detectors for sulfur-selective gas chromatographic detection. *J. Chromatogr.* **1992**, *591*, 313-323
3. Manley, C.H., Vallon, P.P. and Erickson, R.E. Some aroma components of roasted sesame seed (*Sesamum indicum*L.), *J. Food Sci.*, **1974**, *39*, 73-76
4. Nielsen, A. T., Jonsson S. Quantification of volatile sulfur compounds in complex gaseous matrices by solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, **2002**, *963*, 57-64

#### 제조합 시스템 개발 및 관능검사를 이용한 평가

##### 식품의 관능검사

1. 김광옥, 이영춘, 식품의 관능검사, *학연사*, **2001**
2. Buettner. A. and Schieberle. P. Evaluation of key aroma compounds in hand-squeezed grapefruit juice (*Citrus paradisi Macfayden*) by quantitation and flavor reconstitution experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1358-1363
3. Guth. H. and Grosch. W. Identification of the character impact odorants of stewed beef juice by instrumental analyses and sensory studies. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2862-2866
4. Hofmann, T, Czerny, M, Calligaris, S. and Schieberle, P, Model Studies on

the Influence of Coffee Melanoidins on Flavor Volatiles of Coffee Beverages,  
*J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49(5), 2382-2386.

## 제 7 장 참고문헌

### 불고기 시료 조제의 표준화 및 불고기 풍미성분의 추출법 개발

1. Acree, T.E. and Arn, H. *Flavornet*. <http://www.nysaes.cornell.edu/flavornet/>. Cornell University, Geneva, USA, 1997
2. Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. *Allured Publishing Co., Carol Stream, USA, 2001*
3. Alabran, D.A. Isolation and identification of additional beef flavor precursors. *J. Agric. Food Chem.* 1982, 30, 486-488
4. Amirav, A., Jign, H. Pulsed flame photometer detector for gas chromatography. *J. Anal. Chem.* 1995, 67, 3305-3318
5. Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasaran, I. and Bello, .Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. *J. Food Research International*, 2001, 34, 67-75
6. Bender, A.E. and Ballance, P.E. Preliminary examination of the flavor of meat extract. *J. Sci. Food Agric.* 1961, 12, 683-678
7. Bezman, Y., Rouseff, R. L., Naim, M. 2-methyl-3-furanthiol and methional are possible off-flavors in stored orange juice: aroma-similarity, NIF/SNIF GC-O and GC analyses. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5425-5432
8. Carson, J.F. Chemistry and biological properties of onions and garlic. *Food Rev. Int.* 1987, 3, 71-103
9. Cavalli, J. F., Louissette, L. C., Loiseu, A. M. Comparison of static headspace, headspace solid phase microextraction, headspace sorptive extraction, and direct thermal desorption techniques on chemical composition of french olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7709-7714
10. Chang, C.S. and Peterson, R.J. Recent developments in the flavor of meat. *J. Food Sci.* 1977, 42: 298-305
11. Cheskis, S., Atar, E., Amirav, A. Pulsed-flame photometer: a novel gas chromatography detector. *J. Anal. Chem.* 1993, 65, 593-555

12. Chin, H. W., Robert, G. L. A. Modulation of volatile sulfur compounds in cruciferous vegetable. In Sulfur compounds in Foods, Mussinam, C. J., Keelan, M. E., (ed.). *ACS Symp. Ser. 564, American Chemical Society, 1994*, Washigton DC, USA, 90-104
13. Chun, H.N., Ho, C.T. and Kim, J.H. Selective headspace purge- and- trap method for the analysis of volatiles in roast pork and roast chicken. *Food Sci. Biotechnol.* **2000**, *9*, 391-394
14. Eckert, S.E., Hawthorn, S. B., Miler, D. J. Comparison of commercially available atomic emission and chemiluminescence detectors for sulfur-selective gas chromatographic detection. *J. Chromatogr.* **1992**, *591*, 313-323
15. Ekundayo, O., Laakso, I. and Hiltunen, R. Composition of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) volatile oils from Nigeria. *Flavour Fragrance J*, **1988**, . *3*, 85
16. Elmore, J.S., Mottram, D.S., Enser, M. and Wood, J.D. Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, *47*, 1619-1625
17. Eriksson, C. Maillard reactions in food : chemical, physiological and technological aspects, Erisson, C.,(ed.). *Progress in Food and Nutrition Science*, vol. 5, Permagon Press, Oxford, NY, USA **1981**,
18. Erler, J., Vostrowsy, O., Strobel, H. and Knobloch, K. Essential oils from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1988** 186-231
19. Fan, X., Sommers, C. H., Thyer, D. W., and Lehotay, S. J. Volatile sulfur compounds in irradiated precooked turkey breast analyzed with pulsed flame photometric detection, *J. Agrc. Food Chem.*, **2002**, *50*, 4257-4261
20. Fenwick, G.R. and Hanley, A.B. The genus *Allium* part 2. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* **1985**, *22*, 273-377
21. Gorecki, T., Yu, X and Pawliszym, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibers. *Analyst.* **1999**, *124*, 643-649
22. Grosch, W. Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution

- analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **1993**, *4*, 68-73
23. Harmon, A.D. Solid phase microextraction for the analysis of aromas and flavors. In: Flavor, Fragrance, and Odor Analysis. Marsili, R. (ed.). *Marcel Dekker, Inc.*, NY, USA, **2002** 75-106
  24. Hill, P. G., Smith, R. M. Determination of sulfur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection. *J. Chromatogr.* **2000**, *872*, 203-213
  25. Hirai, C., Herz, K.O., Pokorny, J. and Chang, S.S. Isolation and identification of volatile flavor compounds in boiled beef. *J. Food Sci.*, **1973**, *38*, 393-397
  26. Horstein, I. and Crowe, P.F. Flavor studies in beef and pork. *J. Agric. Food Chem.* **1960**, *8*, 494-498
  27. Jacobsen, J. A., Stuer-Lauridsen, F., Pritzl, G.. Organotin speciation in environmental samples by capillary gas chromatography and pulsed photometric detection (PFPD) *Appl. Organomet Chem.*, **1997**, *11*, 737-741
  28. Jella, T. and Grosch, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.) 1. Evaluation of potent odorants of black pepper by dilution and concentration techniques. *Eur. Food Res. Technol.*, **1999**, *209*, 16-21
  29. Kalontarov, L., Jing, H., Amirav, A., and Cheskis, S. Mechanism of sulfur emission quenching in flame photometric detectors, *J. Chromatogr. A.* **1995**, *696*, 245-256
  30. Kang, I.H. Taste of Korea. *Daehan Textbook Co.*, Seoul, Korea. pp. **1987**, 178-179
  31. Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.*, **2000**, *880*, 35-62
  32. Keith, L. H., Crummett, W., Deegan, J., Libby, R. A., Taylor, J. K., Wentler, G.. Principles of environmental analysis. *Anal. Chem.*, **1983**, *55(14)*, 2210-2218
  33. Kerler, J. and Grosch, W. Odorants contributing to warmed-over flavor (WOF) of refrigerated cooked beef. *J. Food Sci.*, **1996**, *61*, 1271-1274, 1284

34. Kondjoyan, N. and Berdague, J.L. Compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds: Laboratoire Faveur, Station de Recherches sur la Viande. Clermont-Ferrand, France, **1996**.
35. Kubec, R., Velisek, J., Dolezal, M. and Kubelka, V. Sulfur-containing volatiles arising by thermal degradation of alliin and deoxyalliin. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 3580-3585
36. Kubec, R. and Velisek, J. Thermal degradation of the lachrymatory precursor of onion, pp. 193-197. In: The Maillard Reaction in Foods and Medicine. O'Brien, J., Nursen, H.E., Crabbe, M.J.C. and Ames, J.M. (eds.). Cambridge, U.K., **1998**
37. Kuo, M.C. and Ho, C.T. Volatile constituents of the distilled oils of welsh onions (*Allium fistulosum*L. variety Maichuon) and scallions (*Allium fistulosum* L. variety Caespitosum). *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, *40*, 111-117
38. Liebrich, H.M., Douglas, D.R., Ziotkis, A., Muggler-Chavan, F. and Donzel, A. Volatile components in roast beef. *J. Agric. Food Chem.*, **1972**, *20*, 96-99
39. Mabrouk, A.F. Nonvolatile nitrogen and sulfur compounds in red meats and their relation to flavor and taste. ACS Symp Ser. No. 26, pp. 146. Am. Chem. Soc., Washington, DC., **1976**
40. Manley, C.H., Vallon, P.P. and Erickson, R.E. Some aroma components of roasted sesame seed (*Sesamum indicum*L.), *J. Food Sci.*, **1974**, *39*, 73-76
41. Maryadele J. O., Ann S., Heckelman, P. E. The Merck Index, Thirteenth edition Merck research laboratories. Merck & CO., INC. Whitehouse Station, NJ., **2001**
42. Mestres, M., Busto, O., Gusch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile sulphide and disulphides in wine aroma. *J. Chromatogr. A*, **1998**, *808*, 211-218
43. Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. Chromatographic analysis of volatile sulphur compounds in wines using the static headspace technique with flame photometric detection. *J. Chromatogr. A.*, **1997**, *773*, 261-269

44. Min, D.B.S., Ina, K., Peterson, R.J. and Chang, S.S. Preliminary identification of volatile flavor compounds in the neutral fraction of roast beef. *J. Food Sci.*, **1979**, *44*, 639-642
45. Mistry, B. S., Reineccius, G. A., Jasper, B. L. Comparison of gas chromatographic detectors for analysis of volatile sulfur compounds in foods. In Sulfur compounds in Foods, Mussinan, C. J., Keelan, M. E., (ed.). ACS Symp. Ser. 564, *American Chemical Society*, Washington DC, USA, **1994**, 8-12
46. Moody, W.G. Beef flavor - A review. *Food Technol.*, **1983**, *37*, 227-232, 238
47. Mottram, D.S. Flavour formation in meat and meat products - A review. *Food Chem.*, **1998**, *62*, 415-424
48. Mottram, D.S. Meat, pp. 107-177. *In Volatile Compounds in Foods and Beverages*.
49. Munoz, J. A., Gonzalez, E. F., Ayuso, L. E., Casado, A. G., and Rodriguez, L. C. A new approach to qualitative analysis of organophosphorus pesticide residues in cucumber using a double gas chromatographic system: GC-pulsed-flame photometry and retention time locking GC-mass spectrometry, *Talanta*, **2003**, *60*, 433-447
50. Mussinan, C. J., Keelan, M. E. Sulfur compounds in Foods. In Sulfur compounds in Foods, Mussinan, C. J., Keelan, M. E., (ed.). ACS Symp. Ser. 564, American Chemical Society, Washington DC, USA, **1994**, 1-6
51. Nedjama, M., Maujean, A. Improved chromatographic analysis of volatile sulfur compounds by the static headspace technique on water-alcohol solutions and brandies with chemiluminescence detection, *J. Chromatogr. A*, **1995**, *704*, 495-502
52. Nielsen, A. T., Jonsson S. Quantification of volatile sulfur compounds in complex gaseous matrices by solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, **2002**, *963*, 57-64
53. Nickerson, G.B. and Likens, S.T. Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *J. Chromatog.*, **1966**, *21*, 1-3

54. Nijssen, L.M., Visscher, C.A., Maarse, H., Willemsens, L.C. and Beolens, M.H. Volatile Compounds in Food. Qualitative and Quantitative Data (7th ed.). TNO Nutrition and Food Research Institute. Zeist, The Netherlands., **1996**
55. Nishimura, O. Identification of the characteristic odorants in fresh rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) using aroma extract dilution analysis and modified multidimensional gas chromatography-mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, *43*, 2941-2945
56. Nunomura, N., Sasaki, M. and Asao, Y. Isolation and identification of 4-hydroxy-2(or 5)-furanone, as a flavor component in shoyu (soy sauce). *Agr. Biol. Chem.*, **1976**, *40*, 491-495
57. Nunomura, N., Sasaki, M. and Asao, Y. Shoyu (soy sauce) volatile flavor components: Basic fraction. *Agr. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 2123-2128
58. Nunomura, N., Sasaki, M. and Yokoyama, T. Shoyu (soy sauce) flavor components: Acidic fractions and the characteristic flavor component. *Agr. Biol. Chem.*, **1980**, *44*, 339-351
59. Nunomura, N., Sasaki, M. and Yokoyama, T. Shoyu (soy sauce) flavor components: Neutral fraction. *Agr. Biol. Chem.*, **1984**, *48*, 753-762
60. Nunomura, N. and Sasaki, M. Japanese soy sauce flavor with emphasis on off-flavors, pp. 287-312 In: Off-Flavors in Foods and Beverages. *Charalambous, G. (ed.)*. Elsevier Science Publishers B.V., **1992**
61. Parliament, T. Solvent extraction and distillation techniques, pp. 1-23. In: *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis. Marsili, R. (ed.)*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, **2002**
62. Peterson, R.J., Izzo, H.J., Jungermann, E. and Chang, S.S. Changes in volatile flavor compounds during the retorting of canned beef stew. *J. Food Sci.*, **1975**, *40*, 948-954
63. Ramarathnam, N., Rubin, L.J. and Diosady, L.L. Studies on meat flavor. 2. A quantitative investigation of the volatile carbonyls and hydrocarbons in uncured and cured beef and chicken. *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, *39*, 1839-1847

64. Rozum, J. Smoke flavourings in processed meats, pp. 342-354. Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods. Shahidi, F. (ed.). Blackie Academic and Professional, London, UK, **1998**
65. Sen, A., Laskawy, G., Schieberle, P. and Grosch, W. Quantitative determination of b-damascenone in foods using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 757-759
66. Shahidi, F. Flavour of muscle foods an overview, pp. 1-4. In: Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods. Shahidi, F. (ed.). Blackie Academic and Professional, London, UK, **1998**
67. Shimoda, M., Shiratsuchi, H., Nakada, Y., Wu, Y. and Osajima, Y. Identification and sensory characterization of volatile flavor compounds in sesame seed oil. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 3909-3912
68. Shirey, R.E. SPME fibers and selection for specific applications, pp. 59-110. In: Solid Phase Microextraction. Wercinski, S.A.S. (ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, **1999**
69. Siegmund, B. and Pfannhauser, W. Changes of the volatile fraction of cooked chicken meat during chill storing: results obtained by the electronic nose in comparison to GC-MS and GC olfactometry. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, **1999**, *208*, 336-341
70. Soliman, M.A., Ei-Sawy, A.A., Fedel, H.M. and Osman, F. Effect of antioxidation of volatiles of roasted sesame seeds. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 523-528
71. Soliman, M.A., Ei-Sawy, A.A., Fedel, H.M. and Osman, F. Identification of volatile flavour components of roasted white sesame see, *Acta Alimentaria*, **1986**, *15*, 251-263
72. van den Dool, H. and Kratz, P.D. A generalisation of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.*, **1963**, *11*, 463-471
73. Wasserman, A.E. and Gray, N. Meat flavor. 1. Fractionation of water-soluble flavor precursors of beef. *F. Food Sci.*, **1965**, *30*, 801-807
74. Whitefield, F.B. and Last, J.H. Vegetables, pp. 203-281. In: Volatile

compounds in Foods and Beverages. Maarse, H. (ed.). Marcel Dekker, New York, USA, 1991

75. Yang, X. and Peppard, T. Food and flavor applications, pp. 177-201. In: Solid Phase Microextraction. A Practical Guide. Wercinski, S.A.S. (ed.). Marcel Dekker, New York, USA, 1999
76. Yu, T.H., Wu, C.M. and Ho, C.T. Meat-like flavor generated from thermal interactions of glucose and alliin or deoxyalliin. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, 1005-1009
77. Yu, T.H., Wu, C.M. and Liou, Y.C. Volatile compounds of garlic. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, 725-730

#### 불고기 향기 활성 성분의 동정, 정량 및 OAVs

1. Acree TE. 1993. Bioassays for flavor. In: Acree TE and Teranishi R. Flavor Science: Sensible Principles and Techniques. Washington, DC: American Chemical Society. 1-20.
2. Acree, T. E.; Ahn, H. *Flavornet* Cornell University: Geneva, NY, 1997; <http://www.nysaes.cornell.edu/flavornet/>.
3. Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy* Allured Publishing: Carol Stream, USA, 2001.
4. Ahmed, E. M.; Dennison, R. A.; Dougherty, R. H.; Shaw, P. E. Flavor and odor thresholds in water of selected orange juice components. *J. Agric. Food Chem.* 1978, 26, 187-191.
5. Cerny, C.; Grosch, W. Evaluation of potent odorants in roasted beef by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1992, 194, 322-325.
6. Cho, I. H.; Kim, T. H.; Cho, S. K.; Lee, H. J.; Kim, Y. S. Analysis of volatile compound in bulgogi. *Food Sci. Biotechnol.* 2002, 11, 303-309.
7. Chang SS, Peterson RJ. . Recent developments in the flavor of meat. *J. Food Sci.*, 1977, 42, 298-305.
8. Deibler, K. D.; Acree, T. E.; Lavin, E. H. Solid phase microextraction application in gas chromatography/olfactometry dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1616-1618.

9. Elmore JS, Mottram DS, Enser M, Wood JD. Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 1619-1625.
10. Engel W, Bahr W, Schieberle P. Solvent assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.*, **1999**, *209*, 237-241.
11. Fenaroli, G. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*, Vol II; Burdock, G. A., Ed.; CRC Press: Boca Ranton, USA, **1995**.
12. Galt, A. M.; MacLeod, G. Headspace sampling of cooked beef aroma using Tanax GC. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 5964.
13. Grosch W. Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis. *Trends Food Sci. Technol.*, **1993**, *4*, 68-73.
14. Guadagni, D. G.; Buttery, R. G.; Turnbaugh, J. G. Odor threshold and similarity ratings of some potato chip components. *J. Sci. Food Agric.* **1972**, *23*, 1435-1444.
15. Guth H, Grosch W. 1990. Deterioration of soya-bean oil: Quantification of primary flavour compounds using a stable isotope dilution assay. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1990**, *23*, 513-522.
16. Guth, H. Grosch, W. Identification of the character impact odorants of stewed beef juice by instrumental analyses and sensory studies. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2862-2866.
17. Hartman, G. J. Jin, Q. Z. Collins, G. J. Lee, K. N.; Ho, C. T.; Chang, S. S. Nitrogen-containing heterocyclic compounds identified in the volatile flavor constituents of roasted beef. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 1030-1033.
18. Hinterholzer A, Lemos T, Schieberle P. Identification of the key odorants in raw french beans and changes during cooking. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1998**, *207*, 219-222.
19. Hirai C, Herz KO, Pokorny J, Chang SS. Isolation and identification of volatile compounds in boiled beef. *J. Food Sci.*, **1973**, *38*, 393-397.
20. Hofmann T, Schieberle P. Studies on the formation and stability of the roast-flavor compound 2-acetyl-2-thiazoline. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2946-2950.
21. Karagl-Yceer, Y.; Drake, M.; Cadwallader, K. R. Aroma-active components of nonfat dry milk. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2948-2953.

22. Kerler J, Grosch W. Odorants contributing to warmed-over flavor (WOF) of refrigerated cooked beef. *J. Food Sci.*, **1996**, *61*, 1271-1274, 1284.
23. Kerscher, R. Grosch, W. Comparative evaluation of potent odorants of boiled beef by aroma extract dilution and concentration analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1997**, *204*, 36.
24. Kim, S. M. Wu, C. W. Kobayashi, A. Kubota, K. Okumura, J. Volatile compounds in stir-fried garlic. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2951-2955.
25. Kim T. H. Development of a new dilution analysis for headspace solid phase microextracts and identification of aroma-active compounds in some food and plant cell cultures. DPhil, Seoul National Univ., **2003**.
26. Kondjoyan, N. Berdagu, J. L. *A Compilation of Relative Retention Indices for the Analysis of Aromatic Compounds* Laboratoire Flaveur SRV: Ceyrat, France, **1996**.
27. Kuo MC, Ho CT. 1992. Volatile constituents of the distilled oils of welsh onions (*Allium fistulosum* L. Variety Maichuon) and Scallions (*Allium fistulosum* L. Variety Caespitosum). *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, *40*, 111-117.
28. Liebich HM, Douglas DR, Zlatkis A, Muggler-Chavan F, Dozel A. 1972. Volatile components in roast beef. *J. Agric. Food Chem.*, **1972**, *20*, 96-99.
29. Lindsay RC, Rippe JK. Enzymic generation of methanethiol to assist in the flavor development of cheddar cheese and other food. In: Parliment TH and Croteau R. Biogenesis of Aromas. Washington, DC: *American chemical Society*. **1986**, 286-308.
30. Mani, V. Properties of commercial SPME coatings. In *Application of Solid Phase Microextraction*; Pawliszyn, J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **1999**, 57-72.
31. Macleod G. The flavour of beef. In: Shahidi F. Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods. London: Blackie academic & professional, **1998**
32. McGorin, R. J. Character impact compounds: flavors and off-flavors in foods. In *Flavor, Fragrance and Odor Analysis*; Marsili, R., Ed.; Marcel Dekker: New York, USA, 2002, pp 375-413.
33. Min, D. B. S.; Ina, K.; Peterson, R. J.; Chang, S. S. Preliminary identification of volatile flavor compounds in the neutral fraction of roast beef. *J. Food Sci.* **1979**, *44*, 639-642.
34. Moody WG. Beef flavor-a review. *Food Technol.*, **1983**, *37*, 227-32, 238.

35. Mottram, D. S.; Edwards, R. A.; MacFie, H. J. H. A comparison of the flavour volatiles from cooked beef and pork meat systems. *J. Sci. Food Agric.* **1982**, *33*, 934-944.
36. Mottram DS. Flavour formation in meat and meat product: a review. *Food Chem.*, **1998**, *62*, 415-424.
37. Mottram, D. S. Meat. In *Volatile Compounds in Foods and Beverages* Maarse, H., Ed.; Marcel Dekker: New York, USA, **1991** pp 107-177.
38. Mussinan CJ, Katz I. 1973. Isolation and identification of some sulfur chemicals present in two model systems approximating cooked meat. *J. Agric. Food Chem.*, **1973**, *21*, 43-45.
39. Mutti, B.; Grosch, W. Potent odorants of boiled potatoes. *Nahrung* **1999**, *43*, 302-306.
40. O'Mahony M. Sensory Evaluation of Food-Statistical Method and Procedure. New York: Marcel Dekker, **1986**.
41. Owusu-Yaw, J.; Matthews, R. F.; West, P. F. Alcohol deterpenation of orange oil. *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 1180-1182.
42. Parliment T. 2002. Solvent extraction and Disillation Techniques. In: Marsili R. *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*. New York: Marcel Dekker., **2002** 1-23.
43. Paterson, A., Eds.; Blackie Academic & Professional: Glasgow, UK, **1994**, 140-163.
44. Peterson RJ, Izzo HJ, Jungermann E, Chang SS. Changes in volatile flavor compounds during the retorting of canned beef stew. *J. Food Sci.*, **1975**, *40*, 948-54.
45. Preininger M, Grosch W. Evaluation of key odorants of the neutral volatiles of emmentaler cheese by the calculation of odour activity values. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1994**, *27*, 237-44.
46. Rychlik, M. Grosch, W. Identification and quantification of potent odorants formed by toasting of wheat bread. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1996**, *29*, 515-525.
47. Rychlik, M.; Schieberle, P. Grosch, W. *Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants* Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München: Garching, Germany, **1998**.
48. Schieberle, P. Odour active compounds in moderately roasted sesame. *Food*

- Chem.* **1996**, *55*, 145-152.
49. Schieberle, P. Primary odorants in popcorn. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1141-1144.
  50. Schieberle P. Studies on the flavour of roasted white sesame seeds. In: Schreier P and Winterhalter P. Progress in flavour precursor studies. Carol Stream: Allured Publishing Corporation. **1993**
  51. Schulz H, Kruger H, Liebmann J, Peterka H. Distribution of volatile sulfur compounds in an interspecific hybrid between onion (*Allium cepa L.*) and Leek (*Allium porrum L.*). *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 5220-5224.
  52. Shahidi, F.; Rubin, L, J. D'Souza, L, A. Meat flavor volatiles: a review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1986**, *24*, 1412-1443.
  53. Shirey, R. E. SPME fibers and selection for specific applications. In *Solid Phase Microextraction: A Practical Guide*; Wercinski, S. A. S., Ed.; Marcel Dekker: New York, USA, **1999**, 59-110.
  54. Sinha, N. K.; Guyer, D. E.; Gage, D. A.; Lira, C. T. Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavors and their analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 842-845.
  55. Staroscik, J. A.; Wilson, A. A. Seasonal and regional variation in the quantitative composition of cold-pressed lemon oil from California and Arizona. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 835-837.
  56. van den Dool, H.; Kratz, P. D. A generalisation of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **1963**, *11*, 463-471.
  57. van Gemert, L. G. *Compilations of Odour Threshold Values in Air and Water*; Boelens Aroma Chemical Information Service: Huizen, The Netherlands, **1999**.
  58. Wagner R, Grosch W. Evaluation of potent odorants of french fries. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1997**, *30*, 164-169.
  59. Wagner R, Grosch W. 1998. Study on the key odorants of french fries. *J. Am. Oil Chem.*, **1998**, *75*, 1385-1392.
  60. Whitfield F. B, Last J. H. Vegetables. In: *Maarse H. In Volatile Compounds in Foods and Beverages*. New York: Marcel Dekker. **1991**, 203-280.

61. Wilson, C. W. Shaw, P. E. Glass capillary gas chromatography for quantitative determination of volatile constituents in cold-pressed grapefruit oil. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 919-922.
62. Yu, T. H.; Lin, L. Y. Ho, C. H. Volatile compounds of blanched, fried blanched, and baked blanched garlic slices. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1342-1347.
63. Yu, T. H.; Wu, C. W.; Liou, Y. C. Effects of pH adjustment and subsequent heat treatment on the formation of volatile compounds of garlic. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 632-635.
64. Yu, T. H.; Wu, C. M. Stability of allicin in garlic juice. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 977-981.

#### 불고기 향기활성성분의 안정성 동위원소 이용 합성법 개발

1. G. W. H. Cheeseman and E. S. G. Werstiuk, *Advances in Heterocyclic Chemistry*, **1972**, *14*, 112
2. H. Koeod, *Organic Syntheses*, **1963**, *IV*, 491
3. R. F. Nystrom and W. G. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 2548
4. G. E. Benedict and R. R. Rssell, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 5444
5. P. Münch and P. Schieberle, *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *46*, 4695
6. E. Campaigne and B. F. Tullar, *Organic Syntheses*, **1963**, *IV*, 921
7. K. Ogawa, Y. Nomura, Y. Takeuchi and S. Tomoda, *J. Chem. Soc. Perkin trans I*, **1982**, 3031
8. N. G. De Kimpe, C. V. Stevevs, and M. A. Keppens, *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *41*, 1485
9. M. J. Mintz and C. Walling, *Organic Syntheses*, **1973**, *V*, 184
10. X. femandez, R. Fellous and E. Duñach, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3381
11. K. O. Jeon, J. S. Yu and C. K. Lee, *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2002**, *24*, 1845

#### 제조합 시스템 개발 및 관능검사를 이용한 평가

1. 김광옥, 이영춘, 식품의 관능검사, *학연사*, **2001**
2. 김광옥, 김상숙, 성내경, 이영춘, 관능검사 방법 및 응용, *신광 출판사*, **2000**

3. Buettner, A. and Schieberle, P. Evaluation of key aroma compounds in hand-squeezed grapefruit juice (*Citrus paradisi Macfayden*) by quantitation and flavor reconstitution experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1358-1363
4. Chun, H. N., Ho, C. T. and Kim, J. H. Selective headspace purge- and- trap method for the analysis of volatiles in roast pork and roast chicken. *Food Sci. Biotechnol.* **2000**, *9*, 391-394
5. Guth, H. and Grosch, W. Identification of the character impact odorants of stewed beef juice by instrumental analyses and sensory studies. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2862-2866
6. Grosch, W. Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **1993**, *4*, 68-73
7. Harmon, A.D. Solid phase microextraction for the analysis of aromas and flavors. Flavor, Fragrance, and Odor Analysis. Marsili, R. (ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, **2002**, 75-106
8. Hirai, C., Herz, K.O., Pokorny, J. and Chang, S.S. Isolation and identification of volatile flavor compounds in boiled beef. *J. Food Sci.* **1973**, *38*, 393-397
9. Hofmann, T, Czerny, M, Calligaris, S. and Schieberle, P, Model Studies on the Influence of Coffee Melanoidins on Flavor Volatiles of Coffee Beverages, *J. Agric. Food Chem*, **2001**, *49(5)*, 2382-2386.
10. Jezussek, M, Juliano, B. O. and Schieberle, P, Comparison of Key Aroma Compounds in Cooked Brown Rice Varieties Based on Aroma Extract Dilution Analyses, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50(5)*, 1101-1105.
11. Kataoka, H., Lord, H.L. and Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *880*, 35-62
12. Kerler, J. and Grosch, W. Odorants contributing to warmed-over flavor (WOF) of refrigerated cooked beef. *J. Food Sci.* **1996**, *61*, 1271-1274,1284
13. Kirchhoff, E. & Schieberle, P. Determination of Key Aroma Compounds in the Crumb of a Three-Stage Sourdough Rye Bread by Stable Isotope Dilution Assays and Sensory Studies. *J. Agric. Food Chem*, **2001**, *49*, 4304-4311

14. Kirchoff, E. and Schieberle, P. Quantitation of Odor-Active Compounds in Rye Flour and Rye Sourdough Using Stable Isotope Dilution Assays, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50(19)*, 5378-5385.
15. Liebrich, H.M., Douglas, D.R., Ziotkis, A., Muggler-Chavan, F. and Donzel, A. Volatile components in roast beef. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 96-99
16. Mabrouk, A.F. Nonvolatile nitrogen and sulfur compounds in red meats and their relation to flavor and taste. ACS Symp Ser. Am. Chem. Soc., Washington, DC. **1976**, *26*, 146.
17. Michael O'Mahony, Sensory and Consumer testing, 2003
18. Munch. P. and Schieberle. P. Quantitative studies on the formation of key odorants in thermally treated yeast extracts using stable isotope dilution assays. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4695-4701
19. Schieberle. P. and Hofmann. T. Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 227-232
20. Schieberle. P. Odour-active compounds in moderately roasted sesame. *Food Chemistry*, **1996**, *55(2)*, 145-152
21. Schieberle. P. & Hofmann. T. Evaluation of the Character Impact Odorants in Fresh Strawberry Juice by Quantitative Measurements and Sensory Studies on Model Mixture. *J. Agric. Food Chem*, **1997**, *45*, 227-232
22. Shimoda, M., Shiratsuchi, H., Nakada, Y., Wu, Y. and Osajima, Y. Identification and sensory characterization of volatile flavor compounds in sesame seed oil. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3909-3912
23. Steinhaus. M and Fritsch H T. Schieberle.P. Quantitation of (R)- and (S)-Linalool in beer Using Solid Phase Microextraction (SPME) in Combination with a Stable Isotope Dilution Assay(SIDA), *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7100-7105

부 록

학회 발표 및 논문 발표

## Preparation of Novel Dideuterioallyl Mercaptan

Kyu Ok Jeon, Ji Sook Yu, and Chang Kiu Lee\*

Department of Chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Received August 18, 2003

**Key Words :** Dideuterioallyl mercaptan, Acrylic acid, Propargyl alcohol, Reduction, Lithium aluminum hydride

Mass spectrometry is known to be the most accurate method for the quantitative analysis of flavor ingredients in food. For successful analysis with the method called 'stable isotope dilution assay', the isotopically labeled compound of each component is necessary.<sup>1</sup> A difference in mass units of two or more gives the best results in the quantitative determination of each ingredient.

In order to analyze the allyl mercaptan present in the odor of *baigogi* (a popular Korean dish) we needed to have allyl mercaptan-1,1-*d*<sub>2</sub> or allyl mercaptan-2,3-*d*<sub>2</sub>. Neither compound has been reported in the literature. One of the logical schemes for the synthesis is to preparing corresponding allyl alcohol (2) and converting it to the corresponding mercaptan. Allyl alcohol-*d*<sub>3</sub> (CD<sub>2</sub>=C(D)CD<sub>2</sub>OH) is commercially available, but the -1,1-*d*<sub>2</sub> or -2,3-*d*<sub>2</sub> alcohol is not. Allyl alcohol-1,1-*d*<sub>2</sub> has been reported to be prepared by reduction of acryloyl chloride with LiAlD<sub>4</sub>.<sup>2</sup>

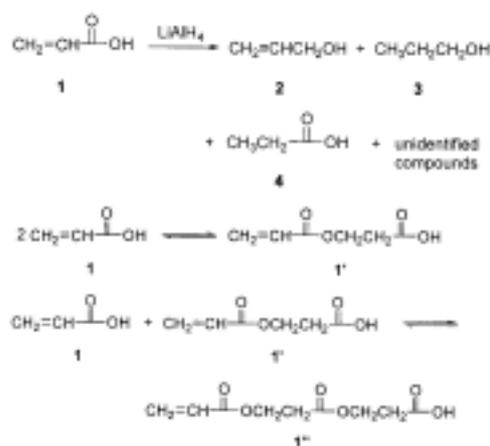
There are numerous citations of the use of LiAlH<sub>4</sub> for the reduction of α,β-unsaturated carboxylic acids to alkenols. For example, a reference book states that lithium aluminum hydride reduces exclusively the carbonyl group, even in an unsaturated acid with α,β-conjugated double bonds.<sup>3</sup> The reference that was cited for the statement reported the reduction of acetylenedicarboxylic acid to 2-butene-1,4-diol (84% yield with 98% purity), fumaric acid to 2-butene-1,4-diol (78% yield), acrylic acid (1) to allyl alcohol (2, 68% yield), and propiolic acid (5) to allyl alcohol (2, 85% yield).<sup>4</sup>

Allyl alcohol (2) was not reduced to *n*-propyl alcohol (3) under the conditions, but such reduction was accomplished in 26% yield by heating the mixture in dibutyl ether at 100 °C for 3 h.<sup>5</sup> It should be pointed out that 0.75 mole of LiAlH<sub>4</sub> is required for reduction of 1 mole of RCOOH to RCH<sub>2</sub>OH and H<sub>2</sub>. But 0.283 mole of 1 and 0.35 mole of LiAlH<sub>4</sub> in ether was reacted at room temperature for 16 h for the reduction of 1 to 2.<sup>4</sup>

Therefore, we attempted the reduction of acrylic acid (1) with LiAlH<sub>4</sub> to establish the suitable reaction conditions which would be adapted for the reduction with LiAlD<sub>4</sub>.

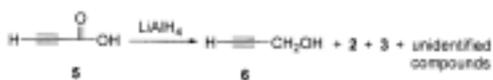
To our surprise the reaction was not as simple as described in the literature.<sup>3,4</sup> When we slowly added acrylic acid (1) in ether to a mixture of LiAlH<sub>4</sub> in ether at 0 °C, refluxed for 18 h, and followed the typical work-up procedure (H<sub>2</sub>O and NaOH) involving extraction with diethyl ether, the reaction mixture was quite complex. Its NMR spectrum clearly showed the presence of allyl alcohol (2) and *n*-propyl

alcohol (3) in a ratio of ca. 1 : 8 (Table 1, Entry 1). There were also some unidentified compounds which could have formed from dimer (1') and trimer (1'') of 1.



On the other hand, when the aqueous layer was acidified with aq. HCl and then extracted with diethyl ether, the starting acid (1) was recovered in about 5% yield along with propionic acid (4) in about 45% yield. The relative ratio of the products varied depending on the reaction conditions, but the recovery of the acids 1 and 4 was more than 50% in our attempts. Compound 3 was the major component in the ethereal extract as shown in Table 1. It seems apparent that the reduction of 1 cannot be the method of choice because not only was the yield of 2 low but the separation of 2 from the mixture was difficult.

Propiolic acid (5) has also been known to give allyl alcohol (2).<sup>4</sup> Reduction with LiAlD<sub>4</sub> may give trideuterated allyl alcohol, which should be acceptable for preparation of a deuterated allyl mercaptan and eventually for the analysis of the odor component. However, our attempt to reduce 5 with LiAlH<sub>4</sub> was also troublesome because not only 2 but 3 and propargyl alcohol (6) were also present in the reaction mixture (Table 1, Entries 3, 4).



\*Corresponding author. e-mail: cklee410@kangwon.ac.kr

## Analysis of Volatile Compounds in Bulgogi

In Hee Cho, Tae Hwan Kim<sup>1</sup>, Somi Kim Cho<sup>2</sup>, Hyong Joo Lee<sup>1</sup>, and Young-Suk Kim\*

<sup>1</sup>Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

\*CheBiGen Inc., Sejong University, Seoul 143-747, Korea

**Abstract** Volatile compounds in bulgogi, a traditional cooked meat with unique sauce, were extracted using simultaneous steam distillation and extraction (SDE) combined with solvent extraction, and solid phase microextraction (SPME). Seventy-five compounds were identified in the volatile compounds extracted from bulgogi, including 8 pyrazines, 9 sulfur-containing compounds, 11 carbonyls, 9 alcohols, 2 esters, 10 aliphatic hydrocarbons, 25 terpene hydrocarbons, and 1 miscellaneous compounds. Most volatile compounds identified in this study could be formed from thermal degradation and/or thermal interactions of components in meat and ingredients used for bulgogi sauce. Terpene compounds were major components quantitatively of bulgogi flavor. The amounts of most heterocyclic compounds such as pyrazines, which could be formed via Maillard-type reaction, were not significant.

**Keywords:** bulgogi, volatile, analysis, SDE, SPME

### Introduction

Bulgogi, one of the most popular traditional foods in Korea, is meat marinated in a unique sauce containing a variety of food ingredients (1), such as soy sauce, sugar, sesame oil, roasted sesame seeds, black pepper powder, pear juice, onion, Welsh onion, garlic, and ginger.

Flavor is one of the most important quality attributes of cooked meat. The flavor of meat is a result of sensations arising from two distinct responses, taste and aroma, as well as less clearly defined contributions from the pressure- and heat-sensitive areas of the mouth (2). Since uncooked meat has little flavor except blood-like taste, the majority of meat flavor components are believed to be thermally derived (3). During cooking, a complex series of thermally induced reactions occur from non-volatile components of lean and fatty tissues, resulting in a large number of reaction products. Although the flavor of cooked meat is influenced by

compounds contributing to the sense of taste, it is the volatile compounds, formed during cooking, that determine the aroma attributes and contribute most to the characteristic flavor of cooked meat (4). Several studies on the volatiles produced in cooked meat have been done during the past decades. Recently, flavors in meat and their formation were reviewed by Mottram (4). Previous studies on the volatile compounds found in meat show that over 1,000 volatile compounds have been identified (4). These volatiles include most classes of organic compounds, such as hydrocarbons, alcohols, carbonyls, esters, and heterocyclics containing oxygen, sulfur, and nitrogen (5). In particular, heterocyclic compounds are important flavor compounds, mainly produced via Maillard-type reactions, leading to savory, meaty, roasted, and boiled flavor qualities of cooked meat (6). Although several results on meat flavors have been reported, no study has been made on the flavor of bulgogi, which have different flavor profile from those of other cooked meats.

In this study, volatile compounds in bulgogi were isolated and analyzed to investigate the aroma property of bulgogi. To extract volatile compounds from bulgogi, simultaneous steam distillation and extraction (SDE) combined with solvent extraction, and solid phase microextraction (SPME) methods were used. SDE provided high extraction efficiency for diverse range of compounds, covering from volatiles to semi-volatiles. However, poor recovery of polar and water-soluble compounds as well as low boiling point compounds, which were eluted earlier or together with solvent used, could not be avoided. On the other hand, efficient extraction of high boilers with low boiling points, on the other hand, efficient extraction of high boilers with low boiling points could be achieved through SPME, applied in head space, could be achieved through SPME. Furthermore, polar as well as non-polar compounds could be analyzed using SPME with various fibers of different polarity. Therefore, both extraction methods could compensate for each other, covering from low to high boilers, in diverse polarity and chemical property for analysis.

### Materials and Methods

**Preparation of bulgogi** Fresh sliced Korean sirloin (grade A) was purchased from a local market, stored at

\*Corresponding author: Dept. of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University, 11-1 Daehyun-dong, Sadaemun-ku, Seoul 120-750, Korea  
Tel: 82-2-3277-3091  
Fax: 82-2-3277-2862  
E-mail: yskim109@nms.ewha.ac.kr

Analytical, Nutritional and Clinical Methods

## Aroma dilution method using GC injector split ratio for volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction

Tae Hwan Kim<sup>a</sup>, Sang Mi Lee<sup>b</sup>, Young-Suk Kim<sup>b</sup>,  
Kyoung Heon Kim<sup>b</sup>, Sangsuk Oh<sup>b</sup>, Hyong Joo Lee<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science and Technology, School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, South Korea

<sup>b</sup>Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Women's University, Seoul 120-750, South Korea

Received 20 November 2002; received in revised form 28 April 2003; accepted 28 April 2003

### Abstract

Dilution methods are widely used for the screening of aroma-active compounds in gas chromatography-olfactometry (GC-O). An aroma dilution method for the samples extracted by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) was developed using GC injector split ratio. In an aqueous model system containing seven authentic standards, the relationship between logarithmic peak area and logarithmic split ratio showed a high linearity as indicated by the good agreement between calculated and experimental data. This result suggests that the split ratio is a suitable and reliable tool for the successive dilution of volatiles in HS-SPME-GC-O. When this method was applied to yun (Citrus javes) tea, linalool (floral/lemon) and decanal (orange/waxy) were identified as the most intense aroma-active compounds.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Split ratio; Gas chromatography-olfactometry; Headspace solid phase microextraction; Aroma dilution; Citrus javes

### 1. Introduction

During the past decade, solid phase microextraction (SPME) has been widely practiced for extracting volatile and semivolatile compounds from biological, environmental, and food samples (Berlardi & Pawliszyn, 1989; Kataoka, Lond, & Pawliszyn, 2000). SPME is a simple, rapid, and solvent-free sampling procedure, in which samples taken from either liquid phase (direct immersion sampling) or vapor phase (headspace sampling) are absorbed onto a phase-coated fused silica fiber. Headspace SPME (HS-SPME), in particular, has been largely applied to flavor analyses in combination with gas chromatography (GC) and GC-mass spectrometry (GC-MS).

GC-olfactometry (GC-O) is a valuable analytical procedure for the detection of aroma-active compounds among various volatiles extracted from food samples

(Grosch, 1993). The methodology of GC-O can be classified into dilution, intensity, and detection frequency methods (van Ruth & O'Connor, 2001), among which dilution methods such as CharmAnalysis (Acree, Bernard, & Cunningham, 1984) and aroma extract dilution analysis (AEDA) (Ullrich & Grosch, 1987) have been generally used as quantitative GC-O. In AEDA, stepwise dilutions of an aroma extract are perceived to provide flavor dilution (FD) factors, which are proportional to the relative aroma potency of each compound.

When SPME was first used in combination with GC-O by Ulrich, Krumbelt, Schonhof, and Hoberg (1998), the absorption time was consecutively reduced by half to achieve the effect of stepwise dilution. The concentrations of volatiles, however, did not decrease proportionally to the absorption time. Deibler, Acree, and Lavin (1999) combined SPME with CharmAnalysis by varying the thickness and length of polydimethylsiloxane (PDMS) fiber to obtain various absorbent volumes. They showed that the concentration of an absorbed compound is proportional to the volume of the exposed fiber, and applied this procedure to HS-SPME-

\* Corresponding author. Tel.: +82-31-290-2585; fax: +82-31-293-4789.

E-mail address: leohjo@plaza.snu.ac.kr (H.J. Lee).

submitted

1                                   **Aroma Active Compounds of Bulgogi**

2

3                                   H.S. Ko, T.H. Kim, I.H. Cho, J.-Y. Yang, Y.-S. Kim, and H.J. Lee

4

5    Authors Ko, T.H. Kim, and Lee are with Dept. of Food Science and Technology,

6    School of Agricultural and Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742,

7    South Korea.

8    Authors Cho, Yang, and Y.-S. Kim are with Dept. of Food and Nutritional Sciences,

9    Ewha Womans University, Seoul 120-750, South Korea

10   Direct inquires to author Lee (E-mail: [leehyjo@snu.ac.kr](mailto:leehyjo@snu.ac.kr)).

11

12

13

14

15   Short version of title: Aroma active compounds

16   JFS: Sensory and Nutritive Qualities of Food

17

submitted

1                   **Analysis of volatile compounds in bulgogi prepared**  
2                   **by different heating procedures**

3  
4                   **In Hee Cho, Hyong Joo Lee<sup>1</sup> and Young-Suk. Kim\***

5    *Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University, Seoul 120-*  
6    *750, Korea*

7    <sup>1</sup>*Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Seoul 151-*  
8    *742, Korea*

9

10

11

12

13

14    **\*Corresponding author: Dept. of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans**

15    **University, 11-1 Daehyun-dong, Seodaemoon-gu, Seoul 120-750, Korea.**

16    **Tel: +82-2-3277-3091**

17    **Fax: +82-2-3277-2862**

18    **E-mail: yskim10@mm.ewha.ac.kr**

submitted

**Concomitant Addition and Acetalization of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes with Diols**

Kyu Ok Jeon, Ji Sook, Yu, and Chang Kiu Lee\*

Department of Chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701

**Abstract**

$\alpha,\beta$ -Unsaturated aldehydes such as acrolein and crotonaldehyde were reacted with diols in the presence of conc. sulfuric acid to give products of which concomitant addition to C-C double bond and acetalization took place. Boron trifluoride etherate and titanium tetrachloride gave only acetalization products.

**Key Words:**  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes, acetalization, addition

Corresponding author:

Chang Kiu Lee

Tel: 033-250-8482

e-mail: [cklee410@kangwon.ac.kr](mailto:cklee410@kangwon.ac.kr)

# 대한화학회 제91회 총회 및 학술발표회 진행표 및 논문초록

The 91st National Meeting of the Korean Chemical Society  
Program and Abstracts

ISSN 1229-6708

• 일시 2003년 4월 18~19일(금~토) April 18~19, 2003	기 조 강 연	36
• 장소 서울 코엑스	기 념 강 연	37
	고분자화학	2
	고분자화학	11
	고체·무기화학	4
	고체·무기화학	3
	무기 화학	5
	물 리 화 학	19
	분 석 화 학	20
	분 석 화 학	21
심 포 지 영	생 명 화 학	6
	생 명 화 학	10
	유 기 화 학	13
	유 기 화 학	14
	유 기 화 학	15
	의 약 화 학	8
	중 등 화 학	1
	중 등 화 학	22
	중 등 화 학	16
	화 학 교 육	7
	화 학 교 육	18
	산학협력사업	17
	산학협력사업	12
	산학협력사업	9
분 과 기 념 심 포 지 영 · 구 두 · 포 스 터	고 분 자 화 학	24
	고 체 화 학	25
	공 업 화 학	26
	무 기 화 학	27
	물 리 화 학	28
	분 석 화 학	29
	생 명 화 학	30
	유 기 화 학	31
	의 약 화 학	32
	전 기 화 학	33
	화 학 교 육	35

II 31P107포 Reduction of Unsaturated Carboxylic Acids with Lithium Aluminum Deuteride

금요일 13:00~ 전규옥 이창규  
강원대학교 화학과

In order to prepare partially deuterated allyl mercaptan and vinyl alkyl ketones which are useful standards for flavor analysis reductions of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes and carboxylic acids by lithium aluminum deuteride were investigated. Propenoic acid gave both propanol-1,1,3- $d_3$  and allyl alcohol-1,1- $d_2$  by quenching the reaction with  $H_2O$ . Upon quenching with  $D_2O$  propanol-1,1,2,3- $d_4$  and allyl alcohol-1,1- $d_2$  were isolated. Propynoic acid gave allyl alcohol-1,1,3- $d_3$  by quenching  $H_2O$  and allyl alcohol-1,1,2,3- $d_4$  by quenching  $D_2O$ . Allyl alcohol-1,1- $d_2$  was isolated as a byproduct in both cases. The results indicate that the deuteride ion adds to  $\beta$ -carbon and carbonyl carbon competitively and complete reduction of C-C triple bond is not possible because the negatively charged double bond does not undergo further reduction.

II 31P108포 Determination of Aromaticity Indices of Five-membered Monoheterocycles by NMR Spectroscopy of Their Benzoyl Derivatives

금요일 13:00~ 전규옥 유지숙 이창규  
강원대학교 화학과

Benzophenones, 2-benzoylthiophenes, 2-benzoylpyroles, and 2-benzoylfurans which have substituents at *m*- and *p*-positions of the benzoyl ring were prepared and their NMR spectra were obtained in 0.1 M chloroform- $d$  solution. The chemical shift values of each series were plotted against the Hammett substituent parameters to give good correlation except the *ortho*-H and -C. The slopes as well as the difference in chemical shift gave sets of meaningful values for the indices of aromaticity. For example, the correlation of the chemical shifts of a series of substituted benzophenones to identical series of substituted benzoyl derivatives of thiophene, pyrrole, and furan, provides a set of 0.72, 0.44, and 0.35, respectively.

# 대한화학회 제93회 총회 및 학술발표회 진행표 및 논문초록

The 93rd National Meeting of the Korean Chemical Society  
Program and Abstracts

ISSN 1229-6708

- 일시  
2004년 4월 22~23일(목~금)  
April 22~23, 2004
- 장소  
서울 전국경제인연합회(전경련)회관

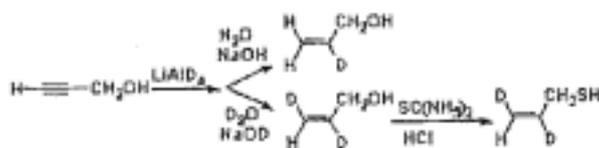
	기 초 강 연	31
	기 념 강 연	32
심 포 지 역	고분자화학 고분자 I : 광감응성 고분자소재 및 소재	1
	고분자화학 고분자 II : 고분자 신합성법	2
	전기화학 광전기화학 및 태양에너지 변환	3
	물리화학 나노복합소재 및 항지특성	4
	무기화학 무기 I : 첨단 무기화학	5
	무기화학 무기 II : 무기 신소재 화학	6
	무기화학 무기 III : 전이금속 촉매화학	7
	분석화학 분석기술의 새로운 동향 및 도전	8
	산학협력포럼 산학협력포럼 I : 최첨단 정보 디스플레이의 현황과 전망	9
	산학협력포럼 산학협력포럼 II : 나노기술의 발전과 미래	10
	분석생물화학 생물학적 미량분석	11
	생명화학 신약개발을 위한 가상 스크리닝	12
	유기화학 유기 I : 기능성 유기분자	13
	유기화학 유기 II : 유기반응에서의 입체선택성	14
	재료화학 천연소재 전극물질	15
	초종동 항미적 사고력 신장을 위한 초종동 과학수업의 실제	16
	공업화학 청정화학	17
	화학교육 화학교육 I : 화학에 대한 우리 사회의 인식	18
	화학교육 화학교육 II : 학교 화학실험의 현황과 개선 방안	19
분 과 기 별 심 포 지 역 · 구 두 · 포 스 터	고 분 자 화 학	20
	공 업 화 학	21
	무 기 화 학	22
	물 리 화 학	23
	분 석 화 학	24
	생 명 화 학	25
	무 기 화 학	26
	의 약 화 학	27
	재 료 화 학	28
	전 기 화 학	29
	화 학 교 육	30



I 25P109포 Preparation of Dideuterioallyl Mercaptan

포스터 I 전규욱 이창규  
강원대학교

The reduction of propargyl alcohol to allyl alcohol with lithium aluminum hydride was reexamined in order to prepare allyl alcohol efficiently so that the methodology could be applied for the preparation of the dideuterated derivative. Hydride added to the  $\beta$ -carbon during the reaction and a proton added to the  $\gamma$ -carbon during the quenching to transform the C-C triple bond to a C-C double bond. The deuterated allyl alcohol was converted to corresponding mercaptan by treatment with thiourea.



V 26P54포 Oxidation of Phenethyl Alcohol by Pyridinium Chlorochromate

포스터 V 이창규 전규욱  
강원대학교 화학과

Treatment of phenethyl alcohol by pyridinium chlorochromate (PCC) (1:1 by mole) in dichloromethane at room temperature gave benzaldehyde, phenylacetaldehyde, phenethyl formate, and phenethyl phenylacetate in a ratio of 1.0 : 1.75 : 0.35 : 0.7. The results are quite different from the description in any general organic chemistry textbook. When the molar ratio of the alcohol and PCC is 1 : 0.5 the major products are phenylacetaldehyde and benzaldehyde in a ratio of 1.0 : 0.18. A plausible mechanism for the formation of the products are discussed.

V 26P55포 Reaction of Pyruvic acid with 2-Aminoethanethiol hydrochloride

포스터 V 이창규 윤지순 주현주  
강원대학교 화학과

Heating a mixture of pyruvic acid and 2-aminoethanethiol hydrochloride (1:1 by mole) in benzene gave 2-methylthiazolidine-2-carboxylic acid as a salt form of hydrochloride over 90% yield. There was no indication of the formation of 2-acetyl-2-thiazoline in the reaction. <sup>13</sup>C NMR spectrum of the salt in DMSO-*d*<sub>6</sub> show five peaks of near equal intensities at 24.37, 31.52, 49.74, 72.27, and 171.70, which are quite unusual for quaternary and carbonyl carbons. The structure was conformed by X-ray crystallography.

2002년도 한국식품과학회

## 임시총회 및 제68차 학술발표회

〈클로렐라의 기능성 심포지엄〉

〈Chromium picolinate의 기능성 심포지엄〉

2002년 5월 25일 (토)

서울산업대학교 응용화학공학과



사단  
법인

한국식품과학회

P1-04

### Analysis of volatile compounds in bulgogi

In Hee Cho\*, Tae Hwan Kim<sup>1</sup>, Somi Kim Cho<sup>2</sup>, Hyong Joo Lee<sup>1</sup>, Young-Suk Kim

Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University,

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, School of Agricultural Biotechnology,  
Seoul National University,

<sup>2</sup>CheBiGen Inc., Sejong University

Volatile compounds in bulgogi, a traditional cooked meat with its unique sauce in Korea, were extracted by using two different extraction methods, such as simultaneous steam distillation and extraction (SDE) combined by solvent extraction and solid phase microextraction (SPME). A total of 75 compounds were identified in the volatile compounds extracted from bulgogi. The identified compounds included 8 pyrazines, 9 sulfur-containing compounds, 11 carbonyls, 9 alcohols, 2 esters, 10 aliphatic hydrocarbons, 25 terpene hydrocarbons, and 1 miscellaneous compound. Most volatile compounds identified in this study could be formed from thermal degradation of components, such as proteins, lipids, carbohydrates, and thiamine, and/or thermal interactions between them in meat and other ingredients used for bulgogi sauce.

P1-20

### Aroma Dilution Analysis of Headspace Solid Phase Microextract Changing Injector Split Ratios of a Gas Chromatograph

Tae Hwan Kim\*, Sang Mi Lee<sup>1</sup>, Young-Suk Kim<sup>1</sup>, Hyong Joo Lee

Dept. of Food Science and Technology, Seoul National University

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University

For the stepwise dilutions of volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction (HS-SPME), the split ratio was increased successively prior to injection into a gas chromatograph. A high linearity of relation in the plots of peak areas versus split ratios was obtained in an aqueous model system including seven authentic standard compounds, which indicated that the increase of split ratio was suitable for the dilution analysis of headspace volatiles. This method was also applied to aroma extract dilution analysis (AEDA) of yuzu (*Citrus junos*) tea. Polydimethylsiloxane fiber was efficient for the extraction of the yuzu volatiles, in which terpene hydrocarbons constituted the main components. On the other hand, monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons showed different extraction patterns according to absorption time. Linalool (floral/lemon) and decanal (orange/waxy) were identified as the most intense aroma-active compounds representing the characteristic aroma of yuzu tea in HS-SPME-AEDA.

# 2003년 한국식품과학회 제70차 학술대회

Nutrigenomics Symposium  
Recent Trends in Food Science and Technology

.....  
기간 : 2003년 6월 26일(목)~28일(토) / 장소 : 경주 교육문화회관



식단  
법원 한국식품과학회

Korean Society of Food Science & Technology

• 후원 : 한국과학기술단체총연합회  
한국학술진흥재단

**P2-41**  
**Identification of Aroma Active Compounds**  
**of Bulgogi**

Hye Sung Ko, Tae Hwan Kim, Je-Yeon Yang,  
In Hee Cho<sup>1</sup>, Young-Suk Kim<sup>1</sup>, Hyong Joo Lee  
Department of Food Science and Technology,  
Seoul National University  
<sup>1</sup>Department of Food and Nutritional Sciences,  
Ewha Womans University

Volatile components in bulgogi were extracted by solid phase microextraction (SPME) and high vacuum sublimation (HVS), respectively. The extracts were then analyzed by gas chromatography/olfactometry (GC-O) conducted on two columns with different polarity (DB-5ms, DB-wax). Aroma dilution methods were employed by changing GC injector split ratios in SPME-GC-O or using a serial dilutions of the extract in HVS-GC-O. In SPME-GC-O, allyl mercaptan (described as garlic/bulgogi) showed the highest flavor dilution (FD) factor, followed by methional (boiled potato/soy sauce), 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (nutty/soy powder/ coffee/ chocolate), and acetylpyrazine (nutty/peanut/cooked rice). In HVS-GC-O, methional revealed the highest FD factor, followed by 2-acetyl-2-thiazoline (nutty/cooked rice), furaneol (caramel/sweet), and 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine.

# 2004년 한국식품과학회 제71차 학술대회

International Symposium on FUSION TECHNOLOGY

기간 : 2004년 6월 23일(수)~25일(금)  
장소 : 강원도 용평리조트

Fusion Technology in Food Science



 한국식품과학회

후원 : 강원도청, 한국학술진흥재단  
한국과학기술단체총연합회

**P1-002**

**Analysis of Volatile Compounds in Bulgogi : Comparison of Heating Procedures**

In Hye Cho<sup>1</sup> and Young-Suk Kim

Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University

To compare the volatile profiles in bulgogi cooked by different heating methods, a convection oven, an electric pan, and charcoal grill were used to prepare for the cooked bulgogi. The high vacuum sublimation was employed as isolation technique, mainly due to its high extraction efficiency and mild extraction condition. A total of 61 volatile compounds, including 4 pyrazines, 10 sulfur-containing compounds, 7 carbonyls, 7 alcohols, 7 aliphatic hydrocarbons, 25 terpene hydrocarbons, and 1 miscellaneous compound, were identified in this study. On the other hands, a total of 55, 50, and 47 volatile compounds were found in bulgogi cooked by three different heating methods, a convection oven, an electric pan, and charcoal grill, respectively. The difference in the amounts of each volatile compounds found in bulgogi using three heating methods were not significant, except for sulfur-containing compounds and carbonyls. Especially, sulfur-containing compounds, such as allyl propyl disulfide, methyl allyl trisulfide, and diallyl trisulfide, were found only in bulgogi cooked by convection oven whereas some carbonyls, such as furfural, benzaldehyde, and (E,E)-2,4-decadienal, were detected only in bulgogi grilled by charcoal.

**P1-004**

**Solid phase microextraction과 static headspace를 이용한 황 함유 화합물 추출법 비교**

양지연, 한승진\*, 김영석

이화여자대학교 식품영양학과

황 함유 화합물을 분석하는데 있어서, 서로 다른 두 가지의 추출방법 즉, 고체상 미세 추출법(SPME)과 고정상 기체 추출법(SH)으로 사용하여 이들의 분석방법을 비교하였다. 총 여섯 가지의 황 함유 화합물(dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-methyl thiophen, ally mercaptan, 2-methyl-3-furanthiol, methional)을 회색하여 각각의 방법으로 추출한 후 Sulfur mode의 flame photometric detector(PFPD)가 장착된 기체 크로마토그래프로 분석하였다. CAR/PDMS fiber를 사용한 SPME법과 SH법의 두 추출법을 비교한 결과, SPME법이 SH법 보다 추출효율은 상대적으로 높았으나, 추출과정 중 변형 물질들이 더 많이 생성되었다. SPME법으로 추출한 경우에는 여섯 가지의 황 함유 화합물 외에 화합물들 간의 반응 산물로 추정되는 많은 수의 화합물이 함께 검출된 데 반해 SH법에서는 이런 변형 물질들이 미량 확인되었다. 고체상 미세 추출법(SPME)에서 새로운 화합물들이 많이 생성된 것은 SH 추출법에는 없는 fiber의 흡착 탈착 과정이 포함되어 있기 때문이라고 사료된다.

**PI-014**

**Determination of Odor Threshold Values of Aroma Active Compounds in Bulgogi by Paired Comparison Test**

Hye Sung Ko<sup>1</sup>, Kyoung Hwa Um<sup>1</sup>, Kwang-Ok Kim<sup>1</sup>, Young-Suk Kim<sup>1</sup>, and Hyong Joo Lee  
Department of Food Science and Technology, Seoul National University, <sup>1</sup>Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University

Bulgogi is one of the Korean traditional foods and cooked by broiling or roasting beef with its unique sauce. The most intense aroma active compounds of bulgogi were identified by gas chromatography-olfactometry (GC-O) based on aroma extract dilution analysis (AEDA). The olfactometric analysis revealed the presence of thirty two compounds with odor-activity. Among them, methional (cooked potato-like), furaneol (yogurt-like, sweet), 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (coffee-like, nutty), 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (bitter, metallic, grassy), 1-octen-3-one (metallic, mushroom-like), acetylpyrazine (nutty, cooked rice-like), linalool (floral, sweet), phenylacetaldehyde (hyacinth, honey-like) and allyl mercaptan (bulgogi-like, garlic-like) were the most important contributors to the olfactory property of bulgogi, considering their high flavor dilution (FD) factors. To determine odor threshold values of aroma active compounds in bulgogi, paired comparison test was employed. Odor threshold values of potent aroma active compounds were as follows : methional (0.08 µg/L), furaneol (6.25 µg/L), 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1.56 µg/L), 3-isobutyl-2-methoxy pyrazine (0.31 µg/L), 1-octen-3-one (50 µg/L), 2-acetylpyrazine (12.5 µg/L), linalool (89.4 µg/L), phenylacetaldehyde (78.23 µg/L), and allylmercaptan (0.32 µg/L).

IFT 2004  
**ANNUAL  
MEETING  
+  
FOOD EXPO**

## Book of Abstracts



Monday, July 12 – Friday, July 16, 2004

Las Vegas Convention Center  
LAS VEGAS, NEVADA, USA



INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS

The Society for Food Science and Technology

## 114B-10

### **Analysis of volatile compounds in bulgogi, a Korean broiled beef**

K. H. UM, H. S. Ko, T. H. Kim, H. J. Lee, Food Science and Technology, Seoul National Univ., Silim-dong, Seoul, 151-742, South Korea, J. Y. Yang, I. H. Cho, Y. S. Kim, Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans Univ., 11-1 Daehyun-dong, Seoul, 120-750, South Korea

Bulgogi, a Korean traditional cooked meat with unique sauce, has its own characteristic meaty odor. Volatiles of bulgogi were isolated and analyzed using high vacuum sublimation method and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and gas chromatography / olfactometry (GC/O). Among the sixty compounds identified by GC-MS,  $\beta$ -caryophyllene and diallyl disulfide were major components, followed by  $\beta$ -phellandren, acetic acid and 3-hydroxy-2-butanone. The olfactometric analysis revealed the presence of thirty two compounds with odor-activity. Methional (cooked potato-like), furaneol (yogurt-like, sweet) 2-ethyl-3, 5-dimethyl pyrazine (coffee-like, nutty), 2-acetyl-2-thiazoline (welsh onion-like, nutty) and 3-isobutyl-2-methoxy pyrazine (bitter, metallic, grassy) were the most important contributors to the olfactory property of bulgogi, considering their high flavor dilution(FD) factors. Most volatile compounds found in this study could be formed from thermal degradation of components and /or thermal interactions between them in meat and other ingredients used for bulgogi sauce. Terpene compounds, derived from bulgogi sauce, were quantitatively major components in bulgogi flavor. On the other hand, the amounts of most hetero-