

HVP를 이용한 Maillard 반응에 의한 Meatlike Flavor의 생성

윤석환 · 이정근 · 남희섭 · 이형재

(주)농심 기술개발연구소

Formation of Meatlike Flavors by Maillard Reaction Using Hydrolyzed Vegetable Protein (HVP)

Suk-Hwan Yoon, Jung-Keun Lee, Hee-Sop Nam and Hyung-Jae Lee

Research and Development Center, Nong-Shim

Abstract

Meatlike flavors were manufactured using hydrolyzed vegetable protein (HVP) with several reactive precursors at different reaction conditions. Both pH and temperature affected significantly on brown colority of reaction product, whose velocity became fast with increasing pH and temperature. Drastic decrease in residual reducing sugars and free amino acids appeared until 1 hour, being little affected by reaction temperature. Glutamic acid and cysteine were decreased with reaction time, whereas glycine and methionine remained constant. Forty nine aroma compounds formed through Maillard reaction were isolated and identified with GC/MSD, including 3-methyl butanal, 2-methyl tetrahydrothiophen-3-one, 3,4-dimethylthiophene and 2,4-dimethyl thiazole previously known as natural meat flavors. The sensory evaluation showed that one-hour reaction product was the highest in savory taste and the lowest in nasty taste on the level of 5% significant difference among all reaction products tested in this experiment. From the results above, it could be speculated that the initial stage of Maillard reaction in this experimental system occurred until one hour, thereafter, savory taste decreased accompanied by increasing nasty taste with elapsed reaction time.

Key words: hydrolyzed vegetable protein (HVP), Maillard reaction, meatlike flavor

서 론

세계 제 2차대전 이후, 유럽에서 식량난, 특히 고기 섭취의 부족으로 인해 meat 대체품을 개발하려는 노력이 있었고, 그 결과로 reaction flavoring(processed flavoring) 기술이 발달하게 되었다. 이 reaction flavoring 기술의 주요 근간이 되는 반응은 Maillard 반응이다⁽¹⁾.

Maillard 반응은 식품의 가열 및 저장중에 광범위하게 일어나는 반응으로, 환원당과 아미노산의 반응을 통해 많은 향미물질과 melanoidin이라는 색소 물질을 생성시키는 반응이다. Maillard 반응에서는 먼저, 환원당과 아미노산의 반응으로 N-substituted glycosylamine이 형성되고, Amadori rearrangement 및 일련의 반응 과정을 거쳐 여러 종류의 furfural, dicarbonyl, aldehyde, hydrogen sulfide와 같은 중간 반응물이 생성된다. 계속해서 이들이 전구물질이 되어 pyrazine, pyridine, pyrrole, thiazole, thiophene, oxazole과 같은 meat 계열의 향기

성분이 생성된다⁽²⁾. 이와 같은 Maillard 반응은 당과 아미노산의 종류, 가열 온도 및 시간, 수분 활성도, pH 등에 의해 영향을 받고, 이들 요인에 따라 다양한 향미 물질이 생성된다⁽³⁾. 이러한 여러 반응 인자가 향미물질의 생성과 반응 기작에 미치는 영향은 당과 아미노산만으로 이루어진 model system에서 많이 연구되어 왔다^(4,5).

한편, 산업적으로 생산되고 있는 meatlike flavor(processed flavor)들의 기본 원료는 hydrolyzed vegetable protein(HVP)을 많이 사용하고 있다. HVP는 주로 soy, wheat 그리고 corn 등을 산 또는 효소로 분해한 액으로, 풍부한 유리 아미노산(탈지대두 산분해액의 경우, 23%, 이 중 50~60%가 glutamic acid)과 값싼 가격으로 인하여 식품 산업에서 조미액으로 널리 사용되고 있다. 이 HVP와 여러 당과의 반응에서 model system보다 훨씬 다양하고 풍부한 향미 물질을 얻을 수 있다⁽⁶⁾.

본 연구에서는 HVP를 기본 원료로하여, 몇몇 반응 전구물질을 첨가하여 반응 온도, 반응 시간 그리고 pH 별로 가열 반응을 시킴으로써 meat 계열의 반응액(meatlike flavor)을 제조하였고, 제조된 반응액의 반응 조건에 따른 성분의 변화와 생성되는 향기성분의 동성 그리고 관능 평가 결과를 보고하고자 하였다.

Corresponding author: Hee-Sop Nam, Research & Development Center, Nong Shim Co., Ltd., 203-1, Dangjeong-Dong, Kunpo-si, Kyungki-do 435-030, Korea

재료 및 방법

Meatlike flavor의 제조

본 연구에서 meatlike flavor의 특성을 갖는 반응액은, 탈지 대두박에 20% HCl을 가하여 105°C에서 18시간 가수분해한 후, 중화, 여과시킨 HVP를 기본 원료로 하였다. HVP를 30L pressure cooker(Shinko Pantec, Japan)에 넣고, fructose syrup, cystine, methionine, glycine, succinic acid, thiamine, beef fat, monosodium glutamate(MSG), inosine monophosphate(IMP), guanosine monophosphate(GMP)등의 조성물을 첨가하여 전체 용액이 30 Brix가 되게한 후 가열하였다. 이 때 초기 pH는 4.8이었다. 반응액의 온도가 각각 100°C, 120°C가 되었을 때를 반응 0시간으로 하여, 7시간 동안 반응시키면서 적당한 시간대에서 sampling을 하였다. 반응 pH의 영향을 알아보기 위한 실험에서는, 위의 조성물과 HVP를 2 L glass reactor에 투입하고, 85% phosphoric acid와 Na₂CO₃를 첨가하여 pH를 각각 3.0과 9.0으로 조절한 후 100°C에서 반응을 시켰다.

일반 분석

반응액의 갈변화도는 적당량의 증류수를 가하여 희석한 뒤 spectrophotometer(Uvikon Model 930, Kontron, Switzerland)로 420 nm에서 흡광도를 측정하고⁽⁷⁾, 여기에 희석 배수를 곱하여 총흡광도로 나타냈다. 환원당은 di-nitrosalicylic acid(DNS) 변법⁽⁸⁾을 사용하여 정량하였다.

유리 아미노산

제조된 반응액 시료의 유리 아미노산 분석은 서 등⁽⁹⁾과 Chang 등⁽¹⁰⁾의 방법에 따랐다. 먼저, 시료를 적당히 희석한 후, Sep-pak C₁₈ cartridge(Waters, U.S.A.)를 통과시켜 단백질, 지질 등의 고분자 물질과 색소를 제거하였다. 전처리된 시료 용액 50 μl를 취하여 진공 펌프가 장착된 Pico-Tag Workstation(Waters)에서 건조를 한 후, water : methanol : triethylamine(2 : 2 : 1) 혼합 용액 10 μl를 첨가하여 위와 같은 방식으로 재건조를 시켰다. 재건조된 시료에 methanol : water : triethylamine : phenylisothiocyanate(7 : 1 : 1 : 1) 혼합 용액을 20 μl 첨가하여 phenyl thiocarbonyl-아미노산으로 유도체화시킨 후, 앞에서와 같이 Pico-Tag Workstation에서 건조를 시켰다. 여기에 Sample diluent(Waters) 250 μl를 첨가하여 건조된 시료를 용해시킨 후, HPLC 분석을 행하였다. 분석은 Waters 510 HPLC system, 486 UV detector, 746 data module로 이루어진 HPLC system에서 행하였고, column은 Pico-Tag column(3.9×150 mm, Waters)을 사용하였으며, 분석중에는 45°C로 유지를 시켰다. 이 때 mobile phase로는 Eluent A(Waters)를 사용하였고, Eluent B는 60% acetonitrile을 제조하여 사용하였다.

Aroma 성분

반응액 시료에서 aroma 성분의 추출은 Likens-Nickerson 장치를 이용한 simultaneous distillation and extraction(SDE)법으로 실시하였다. 즉, 반응액 시료 100 ml에 증류수 200 ml를 혼합한 후, ethyl ether 50 ml로 3시간 동안 추출하였으며, 포집된 aroma성분을 무수 황산나트륨 처리하여 수분을 제거하고, acetone/dryice로 온도를 낮춘 상태에서 질소로 purging하여 300 μl까지 농축을 시켰다.

추출된 aroma 성분 농축물의 분석을 위해서 Gas chromatography/mass-selective detector(GC/MSD)를 이용하였다. 사용된 GC는 Hewlett Packard(HP) 5890 series II였고, column은 Ultra 1(25 m×0.22 mm i.d.×25 μm, Hewlett Packard)을 사용하였다. Column 온도는 초기에 15°C에서 10분간 유지한 후, 180°C까지 3°C/min으로 승온시켜 180°C에서 1분간 유지하고, 다시 240°C까지 2°C/min으로 승온한 후, 최종적으로 240°C에서 10분간 유지시켰으며, 검출기 및 주입구의 온도는 각각 240°C, 270°C였다. 운반 기체로는 He gas를 사용하였으며, 유속은 1 ml/min였다. MSD는 Hewlett Packard사의 mass selective detector 5971 series를 사용하였고, ionization voltage를 70 eV, ion source의 온도를 200°C, electron multiplier voltage를 2,000 V로 하여 분석하였다. 분리된 peak는 Wiley Library(John Wiley & Sons, Inc.)의 mass spectrum과 비교하여 동정하였다.

관능검사

관능 검사는 훈련받은 8명의 panel에 의해 meatlike flavor의 관능적 품질을 대표할 수 있는 네가지 묘사(구수한 내, 황취(자극취), 고기국 맛, 이미)를 선정케한 후, 각 묘사에 대해 7점 채점법을 2회 실시하여 행하였고, 그 결과를 SPSS program을 이용하여 Anova 및 Duncan 검증을 실시하여 나타내었다. 관능 검사에 사용된 반응액 시료는 4 Brix로 맞추어, 45°C로 데워서 제시되었다.

결과 및 고찰

pH와 반응 온도는 Maillard 반응에 의한 갈변화도에 크게 영향을 미친다⁽³⁾.

반응 pH에 따른 반응물의 갈변화도를 측정해 본 결과, pH 3.0 및 pH 4.8에서는 반응액의 갈변화도가 서로 유사한 값을 나타냈고, 반응 시간에 따른 차이가 크지 않았으나, pH 9.0에서는 갈변화도가 반응 시간이 경과함에 따라 급격히 증가하였다(Fig. 1). 이것은 Kawashima 등⁽¹¹⁾의 dihydroacetone과 아미노산들과의 반응에서 반응 pH가 높을수록 갈변화도가 증가한다는 사실과, Ashoor 등⁽¹²⁾의 당, 아미노산 model계에서 반응 pH가 10일 때 갈변화 속도가 최대였다는 결과와 유사하였다. 이와 같이

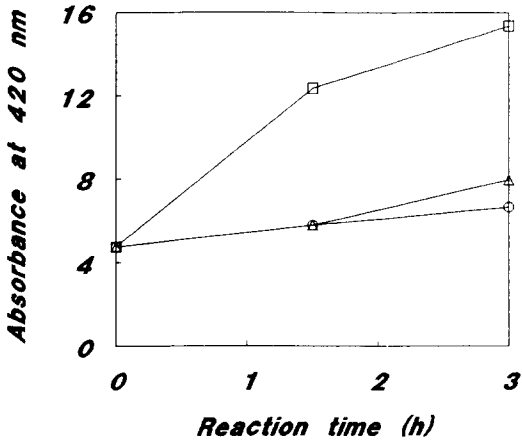


Fig. 1. Effect of pH on the brown colority with reaction time

○-○; pH 3.0, △-△; pH 4.8, □-□; pH 9.0

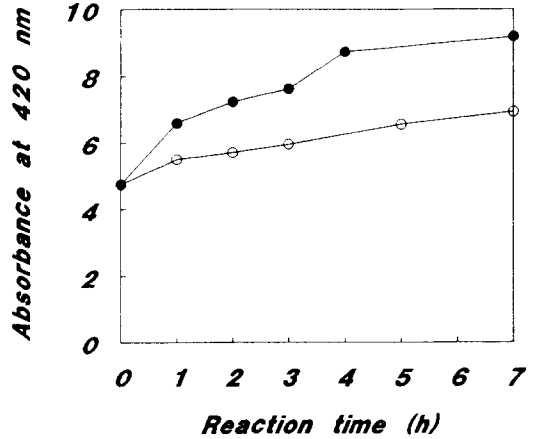


Fig. 2. Effect of temperature on the brown colority with reaction time

○-○; 100°C, ●-●; 120°C

높은 pH 범위에서 Maillard 반응에 의한 갈변화 속도가 증가하는 것은, Maillard 반응의 초기 반응인 glucosylamine의 생성과 이 화합물의 keto형으로의 전위가 촉진되어 Maillard 반응의 후기 반응이 잘 진행되기 때문이며⁽¹³⁾, 또 높은 pH에서는 아미노산들의 아미노기가 protonation 및 deamination이 쉽게 일어나 ammonia가 많이 생성되면서 아미노산보다 먼저 당과 반응을 일으켜, flavor 생성보다는 갈변화 증가쪽으로 반응이 유도되기 때문으로⁽¹⁴⁾ 보여진다. 따라서 좋은 flavor를 갖는 반응액을 얻기 위해서는 높은 pH에서의 반응을 피해야 할 것으로 사료되었다.

pH 4.8에서 반응 온도별 반응 시간에 따른 갈변화도를 측정해 본 결과(Fig. 2), 100°C 보다 120°C 에서 갈변화도가 크게 증가하는 것을 알 수 있는데, 이것은 다른 보고자들^(13,15)과 일치하는 결과이다.

한편, 반응 시간 경과에 따른 환원당과 아미노산 농도의 감소는, 반응 온도에 큰 영향을 받지 않았지만(Fig. 3), 반응 초기에 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 환원당의 경우, 반응 1시간내에 초기 농도의 79~83% 정도가 감소하였으며, 총유리 아미노산의 농도는 초기 농도의 13~23%가 감소하였다. 이 결과에서 본 반응액은 Maillard 반응의 초기 반응인 당과 아미노산의 결합으로 N-glucosylamine이 생성되는 반응이 급격히 일어나고, 그 이후에는 초기 반응이 거의 일어나지 않았음을 알 수 있었다. 이때 Maillard 반응의 제한 요인은 환원당의 농도로, 본 반응 system에서 환원당을 더 첨가하면, 더 많은 flavor 생성을 기대할 수 있을 것으로 사료되었다. 이와 더불어 본 반응액 제조시 첨가되는 유리 아미노산의 변화를 보면, glutamic acid와 cysteine의 경우 반응 시간이 경과함에 따라 두드러지게 감소하나, glycine과 methionine의 경우 반응 시간에 따른 변화가 크지 않음을

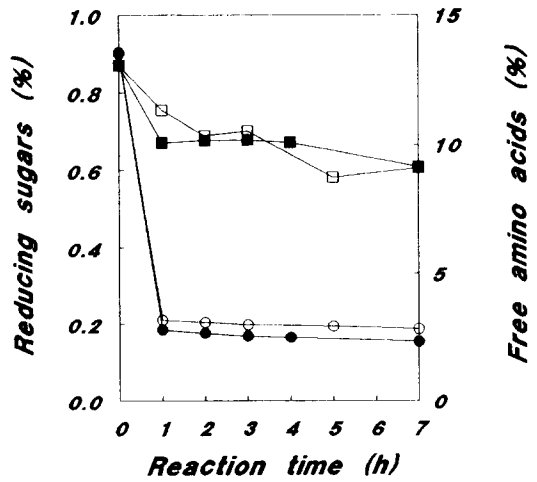


Fig. 3. Decrease of residual reducing sugars and free amino acids with reaction time

○-○; reducing sugar (100°C), ●-●; reducing sugar (120°C), □-□; free amino acid (100°C), ■-■; free amino acid (120°C)

알 수 있었다(Fig. 4). 이와 같은 사실에서 본 반응액에서 각 아미노산들의 Maillard 반응 속도는 다르다는 것을 알 수 있었다. 이것은 Pinto 등⁽¹⁶⁾이 cocoa bean을 roasting할 때, Maillard 반응에 의해 glutamic acid는 급격히 감소하는데 비해, glycine과 methionine은 거의 감소하지 않는다는 사실과 일치하였다.

위 조성물을 120°C 에서 3시간 반응 제조한 반응액의 aroma 성분을 SDE법으로 추출한 후 GC/MSD에서 분석하였다. 그 결과 Fig. 5에서와 같이 49가지의 aroma 성분을 분리할 수 있었으며, 그 종류로는 aliphatic hyd-

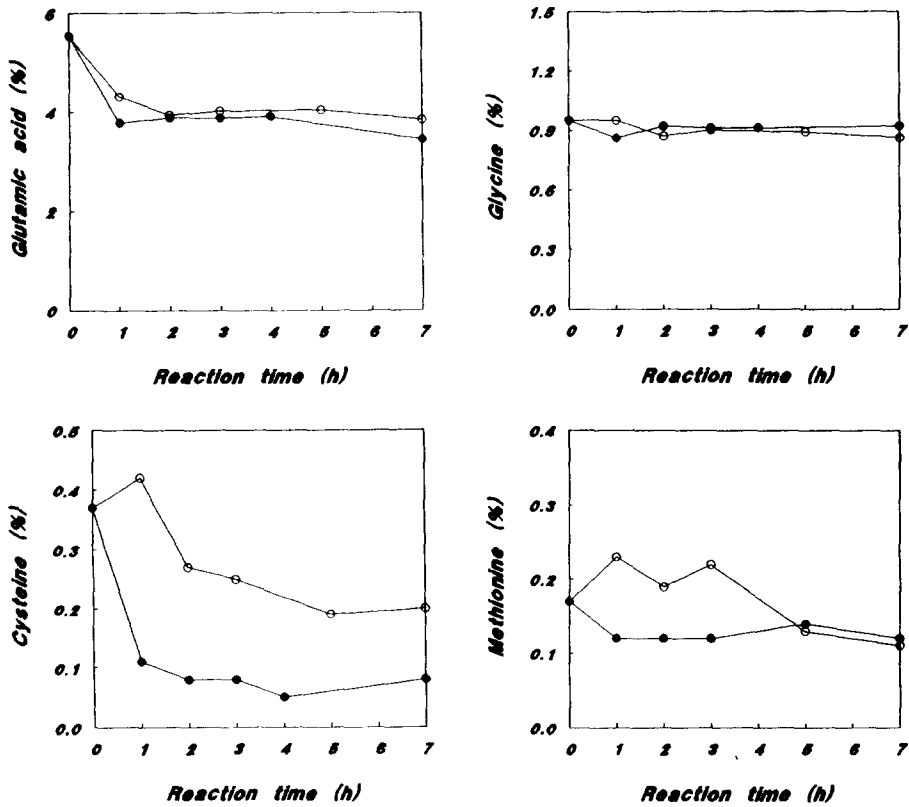


Fig. 4. Change of free amino acids added with reaction time
 ○—○; 100°C, ●—●; 120°C

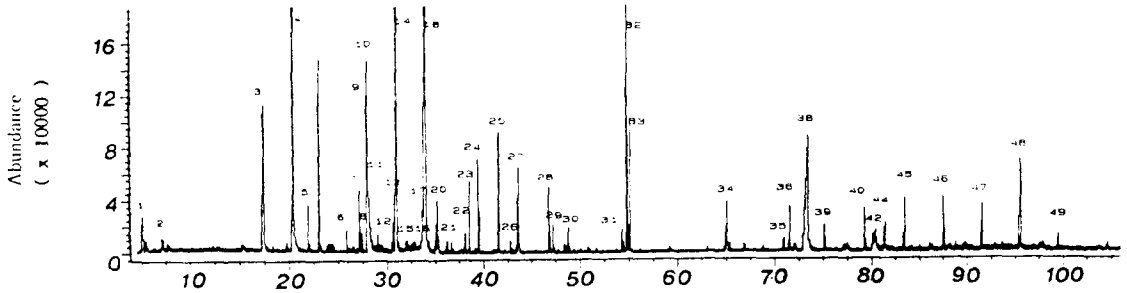


Fig. 5. Gas chromatogram of meatlike flavor

rocarbon류가 10종, aromatic hydrocarbon 6종, alcohol 류가 2종, aldehyde류가 2종, ketone류가 2종, carboxylic acid류가 7종, furan류가 2종, thiophene 류가 6종, thiazole류가 5종, pyrrole류가 2종, quinone류가 2종, 기타 base류가 2종 그리고 기타 1종이었다(Table 1).

이들 중 3-methyl butanal, 2-methyltetrahydrothiophen-3-one, 3,4-dimethyl thiophene, 2,4-dimethyl thiazole 등은 natural meat flavor로 잘 알려진 aroma 성분들이며, benzaldehyde 및 chromatogram상의 뒷쪽에

나타나는 long chain hydrocarbon류도 meat flavor의 구성 성분들로 알려져 있다(17). 한편, 본 반응액에서 검출된 2종류의 furan(methylthiofuran, 2,5-furandione), 4종류의 thiophene(5-methyl-2(5H)-thiophenone, 2-methyl-3-tert-butoxy thiophene, 2-formyl-5-methylthio thiophene, 5-methyl-3H-1,2-dithiole-3-thioene), 4종류의 thiazole(2-methoxy thiazole, 2-ethyl thiazole, 2-methyl-4-propyl thiazole, 4-methyl-5-thiazoleethanol)들도 알려진 natural meat flavor는 아니지만, meat flavor로 중요한

Table 1. Volatile constituents of meatlike flavor

Peak No.	Compound
1	3-Methyl butanal
2	4-Methyl pentanone
3	2,5-Furandione
4	Methylthiofuran
5	3-Methylthiopropanal
6	Benzaldehyde
7	2-Methyltetrahydro thiophen-3-One
8	3,4-dimethylthiophene
9	2-Methoxy thiazole
10	5-Methyl-2(5H)-thiophenone
11	2-Methyl-3-tert-butoxy thiophene
12	2-Phenoxy ethanol
13	Decane
14	Benzene acetaldehyde
15	1-Nitroso piperidine
16	2-Ethyl thiazole
17	1-(1H-pyrrol-2-yl)-ethanone
18	Thenyl alcohol
19	3-Hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one
20	2-Formyl-5-methylthio-thiophene
21	2-Octyldodecane
22	2-Hydroxy-2-methyl-propanoic acid
23	2-Methyl-4-propyl thiazole
24	5-Methyl-3H-1,2-dithiol-3-thioene
25	Cyclic 1,2-ethenediyl mercapt-D-glucose
26	6-Quinazolinol
27	4-Methyl-5-thiazole-ethanol
28	2,6-Dimethoxyphenol
29	2-Hydroxy-3-methyl-quinozaline
30	2,4-Dimethyl thiazole
31	1-(2-Thienyl) ethanone
32	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl phenol
33	3-Ethyl-3-methyl-2,5-pyrrolidinedione
34	Tetradecanoic acid
35	2,2-Dimethyl butane
36	Bis(2-methyl)-1,2-benzene-carboxylic acid
37	Decanoic acid
38	Tridecanoic acid
39	3,3-Dimethyl heptane
40	Hexacosane
41	11-Tricosene
42	Heptadecanol
43	Octadecanoic acid
44	2,3-Dihydroxypropyl ester decanoic acid
45	Eicosane
46	Nonacosane
47	Tetratri acontane
48	Diisooctyl-1,2-benzene-carboxylic acid
49	Octacosane

역할을 할 것으로 생각된다. 이상의 aroma 성분들은 HVP에서는 검출되지 않은 것으로, 본 실험의 조건에서 aroma 성분들이 Maillard 반응에 의해 생성되어, 반응액에 meatlike flavor를 부여해 주는 것으로 사료되었다.

Table 2. Sensory evaluation scores of meatlike flavor

Description	Reaction time (hrs)				
	1	2	3	4	7
Savory aroma	4.10	4.00	3.70	3.80	3.50
Sulfuric aroma	3.80	3.20	3.00	2.90	3.20
Brothy taste*	4.80 ^a	3.70 ^{ab}	3.50 ^b	3.10 ^b	2.90 ^b
Nasty taste*	2.80 ^a	3.90 ^{ab}	4.00 ^{ab}	4.30 ^b	4.80 ^b

*: means same superscripts in the row are not significantly different at $p < 0.05$

120°C 에서 반응 시간별 반응액을 관능 평가한 결과, 반응 1시간대의 반응액이 5% 유의 수준에서 구수한 맛이 가장 강하였고 이미지가 가장 적게 나타났다. 그러나, 구수한 향과 황취의 경우에는 시간별 제조 반응액 간의 유의차는 없었다(Table 2). 결과적으로 120°C 제조의 경우에 있어서 반응 1시간대의 반응액이 관능적으로 가장 좋았음을 알 수 있었다. 이 결과와 환원당, 아미노산이 반응 1시간까지 거의 분해가 이루어진다는 결과(Fig. 3)를 통해, 본 반응액에 있어서, 반응 1시간 이후에는 당, 아미노산의 분해 반응보다는 Maillard 반응의 중간 및 후기 반응이 계속 진행된다는 사실을 알 수 있었다. 이런 Maillard 반응의 중간 이후의 반응이 경과됨에 따라, 향의 관능적인 변화는 거의 없었으나, 맛에 있어서는 구수한 맛을 나타내는 물질들은 줄어들고 이미지를 나타내는 물질들은 증가하는 것으로 사료된다.

요 약

HVP를 기본 원료로 하여 몇몇 반응 전구물질을 첨가하여 여러 가지 반응 조건에 따라 meatlike flavor를 제조하였다. pH와 온도는 반응액의 갈변화도에 큰 영향을 미쳐, pH와 온도가 높을수록 갈변화 속도는 빨라졌다. 반응액에 잔존하는 환원당과 유리 아미노산은 반응 1시간까지 급격히 감소하였으나 반응 온도의 영향은 거의 받지 않았다. 각 아미노산의 경우, glutamic acid와 cysteine은 반응 시간이 경과함에 따라 감소하나, glycine과 methionine은 거의 변화가 없었다. Maillard 반응을 통해 생성되는 meatlike flavor의 향기 성분은 49종이 동정되었으며, 이중에 3-methyl butanal, 2-methyl tetrahydrothiophen-3-one, 3,4-dimethyl thiophene, 2,4-dimethyl thiazole 등의 잘 알려진 natural meat flavor 성분들도 포함되어 있었다. 120°C 에서 제조된 반응액을 관능 평가한 결과, 반응 1시간대의 반응액이 5% 유의 수준에서 구수한 맛이 가장 강하였고, 이미지가 가장 적었다. 이상의 결과에서, 본 반응 system에서는 반응 1시간내에 대부분의 Maillard 초기 반응이 일어나고, 그 이후, 반응이 진행될수록 구수한 맛을 내는 성분은 줄어들고, 이미지를 나타내는 성분이 증가한다고 추정되었다.

문 헌

1. May, C.G.: Processed Flavorings. In *Food Flavorings*, ed. by Ashurst, P.R. AVI Publishing Co.Inc., Westport, p.257(1991)
2. Nursten, H.E.: Aroma Compounds from the Maillard Reaction. In *Developments in food flavors*. Birch, G.G. and Lindley, M.G.(ed), Elsevier Applied Science Co. Inc., New York, p.173(1986)
3. Ames, J.M.: Control of Maillard reaction in food system. *Trends in Food Sci. Technol.*, Dec., 154(1990)
4. Ames, J.M. and Apriyanyono, A.: Volatile reaction products from a heated xylose-lysine model system. *Food Chem.*, **48**, 271(1993)
5. Zhang, Y.G. and Ho, C.T.: Comparison of the volatile compounds formed from the thermal reaction of glucose with cysteine and glutathione. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 760(1991)
6. Manley, C.H., McCann, J.S. and Swaine, R.L., Jr.: The Chemical Bases of the Taste and Flavor Enhancing Properties of Hydrolyzed Protein In *The Quality of Foods and Beverage*. Charamlambous, G. and Inglett, G.(ed), Academic Press Inc., New York, p.61(1981)
7. Chong, M.L.: Evaluation of kinetic parameters for a glucose-lysine Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 379(1984)
8. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
9. 서동순, 김광욱, 김용수, 이영춘: 효모 자가 분해물을 사용한 된장 찌개 믹스 조성비의 최적화. 한국식품과학회지, **25**(5), 411(1993)
10. Chang, K.C., Skauge, L.H. and Satterlee, L.D.: Analysis of amino acids in soy isolates and navy beans using precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reverse-phase high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, **54**(3), 756(1989)
11. Kawashima, K.: Nonenzymatic browning reactions of dihydroacetone with amino acids or their esters. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1595(1980)
12. Ashoor, S.H. and Zent, J.B.: Maillard reaction of common amino acids and sugars. *J. Food. Sci.*, **49**, 1206 (1984)
13. 권영혜, 김종근, 김우성: 당의 종류, pH 및 온도가 마야르 반응 속도에 미치는 영향. 한국식품과학회지, **18** (1), 55(1986)
14. Izzo, H.V. and Ho, C.T.: Ammonia affects Maillard chemistry of an extruded autolyzed yeast extract: Pyrazine aroma generation and brown color formation. *J. Food Sci.*, **57**(3), 657(1992)
15. 이진호, 한강왕: Fructose-Glycine 혼합계에 있어서 Amino-Carbonyl 반응. 한국식품과학회지, **21**(3), 351 (1989)
16. Pinto, A. and Chichester, C.O.: Changes in the content of free amino acids during roasting of cocoa beans. *J. Food Sci.*, **31**, 726(1966)
17. MacLeod, G. and Seyyedain-Ardebili, M.: Natural and simulated meat flavors (with particular reference to beef). *CRC Crit. Rev. in Food Sci. Nutri.*, Aug., 309 (1981)

(1994년 10월 12일 접수)