

Alcohol oxidase 효소센서를 이용한 알코올 음료 중의 에탄올 정량

이옥경·김태진*·노봉수

서울여자대학교 식품·미생물공학과, *수원대학교 화학공학과

Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages by Alcohol Oxidase Sensor

Ok-Kyung Lee, Tai-Jin Kim* and Bong-Soo Noh

Department of Food and Microbial Technology, Seoul Woman's University

*Department of Chemical Engineering, The University of Suwon

Abstract

In order to measure alcohol contents with speed and accuracy, alcohol sensor was prepared. Alcohol sensor was made by connecting with oxygen electrode after immobilized alcohol oxidase on nylon net with glutaraldehyde. Alcohol was determined by changing the rate of dissolved oxygen consumption using D.O. analyzer. Alcohol contents in alcoholic beverages were determined under the optimum conditions. The results were 0.71% in low-alcohol beverage, 4~5% in beers, 10.06% in wine, 16.12% in *chungju*, 25.71% in soju, and 6.18% in *takju*, respectively. The values by alcohol sensor showed an excellent correlation($r=0.999$) with GC method.

Key words: alcohol oxidase sensor, ethanol, alcoholic beverages

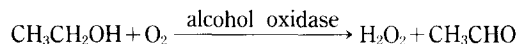
서 론

알코올 함량 측정에는 양조과정이나 발효공정 및 주류 산업에 있어서 가장 중요하게 요구되는 부분이다. 그러므로, 산업공정과 품질관리에 있어서 정밀도와 정확성을 유지한 빠른 화학적 측정방법이 요구되고 있다. 알코올 측정법으로 주정계⁽¹⁾의 경우, 선택적 특이성이 낮고, 낮은 농도의 경우 사용상의 어려움이 있으며, A.O.A.C.법⁽²⁾의 경우 정밀도는 좋으나 절대적 정확도는 좋지 않은 결과를 나타냈다. 일반적으로 가스 크로마토그래피⁽³⁾나 증류법⁽⁴⁾이 이용되어 왔으나, 전처리 과정이나 실험과정에서 많은 시간과 노력을 소비하므로 근래에 들어서는 점차적으로 flow-injection 방법으로 발전해 가고 있다^(4,5). 이에 전기 화학적 센서와 효소의 고정화를 복합시킨 효소적 전극이 발전되어 왔다⁽⁶⁻⁸⁾. 바이오센서는 신속성, 기질에 대한 특이성, 높은 감응도, 시료에 대해 최소한의 전처리만을 요구하므로 alcohol oxidase, alcohol dehydrogenase, 미생물 등을 사용하여 알코올 측정법으로 발전되어 왔다. Clark와 Lyons⁽⁹⁾가 효소전극을 소개한 후로 많은 효소적 분석방법이 발전되어 왔다. 그러나, 실용화에는 다소간의 제한이 있었다. 이것은 효소의 반응이나, 적절한 효소의 이용성, 고정화 방법, 효소의 수명 정도, 생성물 및 기질의

감응도에 좌우되는 전극의 기술적인 문제 등이 뒤따르기 때문이다⁽¹⁰⁾.

바이오센서는 일반적으로 의학이나 임상분야에서 널리 이용되고 있으나, 식품분야에 있어서는 많은 응용이 이루어지지 못한 실정이다. 바이오센서를 직접 식품에 이용하게 될 경우 기질에 대한 특이성이 뚜렷하므로 색소가 존재하거나 혼탁한 시료라 할지라도 특별한 전처리 과정을 통해 색소물질이나 혼탁물질을 제거하지 않아도 측정이 가능하며^(6,11) 시료의 증류과정이 생략되어 실험 오차도 줄일 수 있다. 따라서 기존방법들에 비해 신속하고 간편한 방법이다.

Alcohol oxidase 센서를 사용하여 알코올을 측정하는 경우 이 효소가 고정화된 효소막에서 기질의 하나인 산소가 소비되는 정도를 전기화학 반응을 통하여 용이하게 측정되는 것이다⁽¹²⁾



본 연구에서는 alcohol oxidase를 고정화시킨 효소센서를 제조하여 알코올 음료에 응용하여 알코올 함량을 정량하고, 가스 크로마토그래피로 정량한 값과 비교해 보고자 한다.

재료 및 방법

효소의 고정화

직경이 11 mm되게 nylon net(경사 7.8 tex, 위사 7.8

Corresponding author: Bong-Soo Noh, Department of Food and Microbial Technology, Seoul Woman's University, 126 Kongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-774, Korea

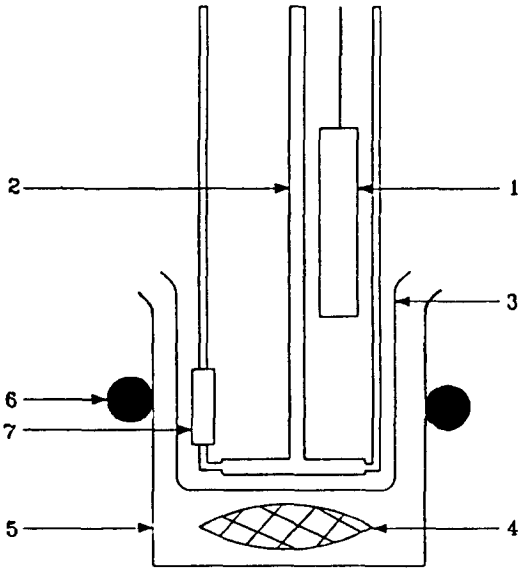


Fig. 1. Schematic diagrams of the tip of the enzyme electrode

1. Ag anode, 2. Au cathode, 3. teflon membrane, 4. immobilized alcohol oxidase on nylon net, 5. dialysis membrane, 6. O-ring, 7. thermistor

tex, 밀도 214×150/5 cm, Kolon Co.)을 자른 후 dimethyl sulfate(Yakuri pure Chem. Co. Ltd.)에 담근 다음 수욕조에서 5분간 끓였다. Ice bath로 옮겨 반응을 정지시키고, 준비해 둔 30 ml anhydrous methanol(Hyman Co. Ltd)에 30~40초간 담가두었다. Methylation이 일어난 뒤 다른 anhydrous methanol에 1분간 더 담가둔 후 0.5 M lysine(pH 9.0)에 2시간 동안 방치해 두었다. 이때 lysine은 나일론 구조와 효소분자 사이의 spacer로 작용한다. 0.1 M borate 완충용액(pH 8.5)으로 만든 12.5% glutaraldehyde solution(Sigma Chem. Co.)에 45분간 담가두었다. 이러한 과정을 마친 nylon net을 물기가 없도록 말리고, 0.1 M phosphate 완충용액(pH 7.0)에 녹인 alcohol oxidase(Sigma Chem. Co. 0.4 units/mg) solution을 nylon net 위에 떨어뜨려 효소를 고정화시켰다⁽¹³⁾. 24시간 동안 4℃ 냉장 보관하여 안정화시킨 후 사용하였다.

효소센서의 제조

선택성 산소막인 teflon membrane(0.001 inch thickness, YSI 5775) 위에 alcohol oxidase가 고정화 된 nylon net을 dialysis membrane(M.W.C.O., 12,000 : Sigma Chem. Co.)으로 덮어 씌어 산소전극(YSI model 5739)에 고정하였다(Fig. 1). 효소전극을 제조하여 용존산소측정기(YSI model 59)에 연결했고, 이 효소전극은 0.1 M phosphate 완충용액(pH 7.5)에 담가 4℃ 냉장 보관하였다. 시료의 온도는 효소의 thermistor로 측정이 가능하므로

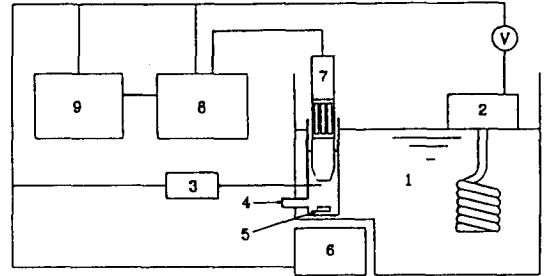


Fig. 2. Schematic diagrams of the apparatus for measuring alcohol using enzyme electrode:

1. water bath, 2. circulating system, 3. air bubbling kit, 4. injection septor, 5. stirrer bar, 6. magnetic stirrer, 7. alcohol sensor, 8. dissolved oxygen analyzer, 9. computer

항상 일정한 온도를 유지할 수 있었으며, cell내의 용존 산소를 포화시키기 위해 air bubbling kit를 사용하였다. Cell내의 stirring bar의 회전속도를 일정하게 유지하면서 기질이 효소센서와 반응하도록 하였다. 수욕조의 온도는 circulating system(Jeio Tech Co., model P-11, Korea)를 이용하여 30.0±0.1℃를 항상 유지하면서 용존산소 소비량을 측정하였다(Fig. 2).

알코올 음료 중의 에탄올 정량

효소센서를 이용해 측정할 값의 신뢰성을 알아보기 위해 가스 크로마토그래피 측정법과 비교해 보았다. 시중에서 판매되고 있는 주류음료(맥주, 포도주, 청주, 과일주, 소주, 탁주)를 시료로 사용하였다. 탁주는 원심분리하여 상등액을 분석하였다. 효소센서의 경우에는 완충용액으로 희석하여 주사하였다. 가스 크로마토그래피 분석시료는 20 ml에테르에 10 ml 시료를 넣고, 교반하여 에탄올을 추출한 후 anhydrous sodium sulfite를 넣어 수분을 제거하였다. Butanol을 internal standard로 사용하였다. GC는 Shimadzu GC-17A, column은 PEG fused silica capillary(CBP20, length 25 m, I.D. 0.22 mm, Shimadzu)를 사용하였다. 반복실험은 5번씩 시행되었다.

결과 및 고찰

Alcohol oxidase가 고정화된 효소센서로 알코올 음료의 알코올을 정량해 본 결과, Table 1과 같았다. 알코올센서와 가스크로마토그래피로 측정할 값을 비교해 보면, 알코올센서의 정량값이 회사에서 표시한 알코올 함량에 더 근접한 분석치를 나타내었다. 알코올센서는 전처리 과정이 필요없이 측정이 가능한 반면, 가스 크로마토그래피의 경우에는 유기용매를 사용하여 정량하고자 하는 성분을 추출해야 하므로 시간과 노력이 소비되며, 또한 전처리 과정중 분석하고자 하는 성분의 추출과정에서 휘발 가능성이 있으므로 상대적으로 오차가 커지는

Table 1. Determination of alcohols in alcoholic beverages by alcohol sensor and GC

Samples	Ethanol(%)		Manufacturer(%)
	Alcohol sensor	GC	
beer A	4.69±0.09	4.23±0.13	4.5
B	4.54±0.02	4.26±0.12	4.5
C	4.13±0.06	3.78±0.11	4
D	5.14±0.07	4.75±0.12	5
E	0.71±0.01	0.62±0.04	0.7
F	4.09±0.04	3.88±0.06	4
chungju	16.12±0.01	14.50±0.75	16
wine	10.06±0.03	9.65±0.17	10
soju	25.71±0.36	23.50±0.75	25
liquor	15.23±0.12	13.80±0.60	15
takju	6.18±0.09	5.88±0.13	6

것으로 여겨진다. 가스 크로마토그래피법에 비해 전체적으로 알코올 센서에 의한 측정값의 표준편차값이 적었으며 알코올 효소 센서의 경우 제조회사에서 표시한 함량보다 많은 반면, 가스 크로마토그래피의 경우는 적었다.

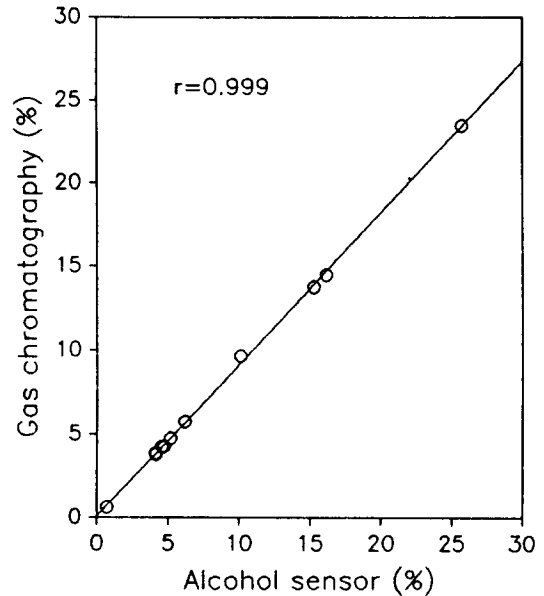
맥주류의 경우 대부분 4~5%에 해당하는 알코올을 함유하고 있으며, 맥주 A, B, C 등의 경우 각각 4.69%, 4.54%, 4.13%로, 저알코올성 음료(E)는 0.71%로 각 회사의 출하 알코올 함량과 유사하게 나타났다.

이⁽⁴⁾는 에탄올과 구조적으로 유사하거나 반응생성물로 여겨지는 알코올류인 methanol, n-propanol, n-butanol, isopropanol, isobutanol, isoamylalcohol, acetylacetone, ethylacetate, diacetyl에 대해 저해실험을 하였는데, 메탄올에서만 약 25~30%의 저해하는 것을 제외하고는 거의 영향을 받지 않는다고 하였다. 일반적으로 식품에서는 메탄올이 거의 포함되지 않으며, 있는 경우라도 미량으로 존재하므로 본 실험의 에탄올 정량에는 별 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

효소 센서와 가스 크로마토그래피로 측정된 값간의 상관관계는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 0.999로 나타나 본 실험에서 사용된 alcohol oxidase 센서에 의해 정확한 값을 얻을 수 있다. 효소 센서에 의한 알코올 정량법은 종래에 행해졌던 분광광도법이나 가스 크로마토그래피법에 비해 전처리 과정이 없어 신속하고 간단하여, 효소의 가격이나 효소의 열안정성 등이 개선되면 산업적으로 매우 유용할 것으로 여겨진다.

요 약

알코올 함량을 보다 신속하고 정확하게 측정하고자, 알코올 센서를 사용하였다. Alcohol oxidase를 glutaraldehyde로 nylon net에 고정화시킨 다음 산소전극에 연결하여 기질과의 반응에서 소모되는 용존산소 소비량의 변화를 용존산소 측정기로 측정하여 알코올을 정량하였다. 알코올 센서의 최적조건에서 시판되는 각종 주류를

**Fig. 3. Correlation of alcohol sensor method and gas chromatography for determination of ethanol**

측정해 본 결과, 각각 맥주는 4~5%, 저알코올성 음료는 0.71%, 포도주는 10.06%, 청주는 16.12%, 소주는 25.71%, 탁주는 6.18%로 정량되었으며, 이는 가스 크로마토그래피로 측정된 값과 좋은 상관관계를 가졌다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단의 특정연구과제(93-04-00-22)에 의하여 수행되었음을 감사드립니다.

문 헌

1. A.O.A.C.: Official Methods Analysis. 14th ed. Procedure 9.014, 9.015 Association of Official Analytical Chemists., Washington, D.C. (1984)
2. A.O.A.C.: Official Methods Analysis. 14th ed. Procedure 11.005 Association of Official Analytical Chemists., Washington, D.C. (1984)
3. A.O.A.C.: Official Methods Analysis. 14th ed. Procedure 11.012, Association of Official Analytical Chemists., Washington, D.C. (1984)
4. Kunnecke, W. and Schmid, R.D.: Gas-diffusion dilution flow-injection method for the determination of ethanol in beverages without sample pretreatment. *Anal. Chim. Acta.*, **234**, 213 (1990)
5. Ukeda, H., Imabayashi, H., Matsumoto, K. and Osajima, Y.: Co-immobilization of alcohol dehydrogenase, diaphorase, and NAD⁺ and its application to flow injection analytical system for ethanol. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2909 (1989)
6. Mason, M.: Ethanol determination in wine with an

- immobilized enzyme electrode. *J. Am. Enol. Vitic.*, **34**, 173 (1983)
7. Miyamoto, S., Murakami, T., Saito, A. and Kimura, J.: Development of an amperometric alcohol sensor based on immobilized alcohol dehydrogenase and entrapped NAD^+ . *Biosen. Bioelectron.*, **6**, 135 (1983)
 8. Utecht, R.E.: A kinetic study of yeast alcohol dehydrogenase. *J. Chem. Educ.*, **71**, 436 (1994)
 9. Clarke, L. and Lyon, C.: Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962)
 10. Martens, N. and Hall, E.A.H.: Model for immobilized oxidase enzyme electrode in the presence of two oxidants. *Anal. Chem.*, **66**, 2763 (1994)
 11. Smith, V.J., Green, R.A. and Hopkins, T.R.: Determination of aspartame in beverages using an alcohol oxidase enzyme electrode. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 30 (1989)
 12. Hitchman, M.L.: Measurement of dissolved oxygen-chemical analysis., Ed. by Elving, P.J. and Winefordner, J.D., A Wiley-Interscience Publication, p.124 (1989)
 13. Mascini, M., Iannello, M. and Palleschi, G.: Enzyme electrodes with improved mechanical and analytical characteristics obtained by binding enzymes to nylon nets. *Anal. Chim. Acta.*, **146**, 135 (1983)
 14. 이옥경: Alcohol oxidase 효소센서를 이용한 알코올 음료 중의 에탄올 정량. 서울여자대학교 석사학위논문 (1994)
-
- (1995년 1월 3일 접수)