

식초의 에탄올 및 초산 함량의 동시분석

윤 회 남

제일제당(주) 건강식품연구소

Simultaneous Gas Chromatographic Analysis of Ethanol and Acetic Acid in Vinegar

Hee-Nam Yoon

Foods R&D Center, Cheiljedang Corporation

Abstract

A method is developed for simultaneously determining ethanol and acetic acid in vinegars by quantitative packed-column gas chromatography. Vinegars were filtrated and directly chromatographed on a 2 m×2 mm stainless steel column packed with Tenax-GC, 80/100. Ethanol, isopropyl alcohol as an internal standard, and acetic acid were completely separated within 20 min of running time without any interfering peaks. The accuracy of packed column gas solid chromatography (PCGSC) was discussed compared to the analytical data by titration, high performance liquid chromatography and capillary column gas liquid chromatography (CCGLC).

Key words: Tenax-GC, packed column, gas chromatography, ethanol, acetic acid

서 론

식초의 최종 산도는 일반적으로 5.0~7.0% 인데 이는 사용 균주의 초산 생산 능력 및 발효 방법에 기인 된다고 말할 수 있다. 특히 발효 방법보다는 초산 생성균의 균주특성에 절대적으로 영향을 받는데 이는 기질로 이용되는 에탄올에 대한 저해작용 및 생성물인 초산 농도에 대한 내성 정도가 최종 산도를 결정하는 것으로 보고되어 있다⁽¹⁾. 즉, 초산의 농도가 내성 정도를 벗어나면 초산균의 생육이 억제되고 초산 생성 속도가 감소되어 더 이상의 산도 증가는 불가능하기 때문이다. 회분식 식초 발효시 많은 연구자들이 초기 에탄올의 농도를 4% 이상으로, 초기 초산 농도를 2% 내외로 조정하였으며^(2,6), 반연속식의 fed-batch type을 1st stage에서 사용한 Lee 등⁽⁷⁾도 배지 성분 중에 포함되는 초산과 에탄올 농도를 각각 2%와 4%로 제조 사용하였다. 이와 같이 식초 발효에 있어서 발효 초기에 에탄올과 초산농도를 균주 특성에 맞도록 조절해주어야 함은 물론 발효가 진행되면서 에탄올과 초산의 농도가 변화하게되고 이들 농도가 균주의 내성 정도를

벗어나게될 경우 생성된 초산농도를 감소시키고 에탄올 농도를 증가시켜 균주의 활성이 유지되도록 할려면 식초 발효중 broth의 산도와 에탄올 함량분석이 빠른 시간내에 이루어져야 한다.

에탄올 분석은 식초를 일단 중화시킨 후 증류하여 증류액을 비중계나 refractometer로 측정하는 방법과 gas chromatography로 분석하는 방법이 있으며, 초산 농도는 대부분의 식초 발효에서 titration에 의한 산도 분석으로 대체하고 있다^(8,9). 즉, 에탄올과 초산 농도의 분석을 각각 분리하여 실시하고 있으며 기기분석으로 에탄올과 초산을 동시에 분석한 예⁽¹⁰⁾는 보고된 적이 있으나 column efficiency가 낮은 것으로 알려져 있다. 또한 비중계나 refractometer로 에탄올을 분석할 때 증류에 따른 시간 소모로 신속한 분석이 이루어지지 않는 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 fed-batch type의 반연속식 식초 발효에 있어서 에탄올과 초산농도를 신속히 정량, feedback할 수 있도록 기기 분석에 의한 동시 분석, 정량 방법을 모색하고자 한다.

재료 및 방법

식초 시료

식초의 에탄올(EtOH) 및 초산(AA) 분석용 시료로

Corresponding author: Hee-Nam Yoon, Foods R&D Center, Cheiljedang Corporation, 636, Guro-dong, Guro-ku, Seoul 152-050, Korea

국내에서 시판되고 있는 19종의 식초를 확보하였으며 종류별로 구분하면 일반 양조식초 4종(산도 6.5~7.5%, w/w), 고산도 양조식초 2종(산도 10~14%), 일반 사과식초 6종(산도 4.5~7.5%), 고산도 사과식초 1종(산도 13~14%), 일반 현미식초 5종(산도 4.5~7%), 고산도 현미식초 1종(산도 13~14%)이었다. 시료의 분석은 아래의 분석 방법에 관계없이 2회 분석치의 평균치로 나타내었다.

에탄올 및 초산 표준용액

증류수에 에탄올 및 초산을 함께 첨가하여 동시 분석용 표준시료 용액을 제조하였다. 에탄올의 농도는 1.0~5.0% (v/v)로 변화시켰으며, 초산의 농도는 3.18~14.62% (w/w)로 다양화하였다.

산도분석

시료를 약 0.5 g 되도록 정확하게 weighing하여 작은 비이커에 넣고 0.1% phenolphthalein 용액을 3~5 방울 첨가하였다. 0.1 N NaOH 용액(수정계수=1.002)으로 분홍색이 30초간 유지할 때까지 적정하여 사용한 NaOH 용액의 양(mL)을 측정하여 다음 아래의 계산식으로 산도를 계산하였다.

$$\text{산도}(\%, \text{w/w}) = \frac{\text{NaOH 사용량}(\text{mL}) \times 0.006 \times \text{수정계수}}{\text{시료무게}(\text{g})} \times 100$$

HPLC Analysis of Acetic Acid

시료를 10 mL methanol로 활성화 시킨 sep-pak C₁₈ (Waters, U.S.A)에 통과시켜 처음 2 mL를 버리고 받은 액을 membrane filter (Millex GV 0.22 μm, Waters)로 여과한 다음 고속액체크로마토그래피법을 이용하여 초산 분석을 실시하였다. 사용된 기기는 HPLC (ACS 3350/04, Applied Chromatography Systems, UK), column은 Aminex HPX-87H ion exclusion column (7.8×300 mm serial No. 254749, Biorad), column oven 온도는 40°C, mobile phase는 0.1 N H₂SO₄ (isocratic), flow rate는 0.6 mL/min의 조건으로 분석하였다. 검출은 UV detector (SLC-200, Samsung, Korea)를 이용하여 210 nm에서 실시하였다. 이 분석조건으로 초산 표준품을 각각 4가지 농도에서 분석하여 검량곡선을 작성하였고 검량곡선의 r²는 0.9903이었다.

GLC Analysis of EtOH & AA with Capillary Column

시료의 에탄올 및 초산 성분은 Dynamic thermal stripper (Dynatherm사, 미국)를 사용하여 purge and trap 방법으로 포집하였다. 시료 1.5 g과 증류수 5.0 g을 20 mL 용량의 strip vial (Supelco사)에 담아 질소 가스(220 mL/min)를 불어넣었다. 시료에서 나오는 휘발 성분은 glass tube (15 cm×4 mm I.D, supelco사)에 충전되어 있는 200 mg의 Tenax-GC (2,6-diphenyl-para-phenylene-oxide polymer, 60/80 mesh, Alltech사)에 40°C에서 3분간 포집시켰다. 포집하는 동안 glass tube를 감싸고 있는 열원의 온도는 50°C를 유지하였다. 휘발 성분의 포집이 끝나면 Tenax glass tube를 gas chromatograph에 200°C의 stainless steel line 으로 연결되어 있는 Thermal Desorption Unit (Dynatherm사)에 loading 시켰다. Tenax-GC에 포집되어 있던 휘발 성분은 20 mL/min으로 흐르는 헬륨 가스로 250°C에서 탈착되어 stainless steel line을 통해 gas chromatograph에 직접 주입되었다.

휘발 성분의 분석에 사용된 gas chromatograph는 Hewlett Packard 5890 Series II이었으며 SE-54 fused silica capillary column (60 m×0.32 mm I.D, 0.25 μm film thickness, J&W Scientific사)을 이용하여 분리한 후 flame ionization detector (FID)로 검출하였다. 이때 injector port와 detector port의 온도는 각각 220°C와 265°C이었으며 column의 온도는 35°C에서 2분간 유지하고 8°C/min으로 250°C까지 증가시킨 후 250°C에서 5분간 유지하였다. Carrier gas로 사용한 헬륨의 유속은 1.5 mL/min 이었고 detection을 위한 공기과 수소 가스의 유속은 각각 270 mL/min, 30 mL/min 이었다.

GSC Analysis of EtOH & AA with Tenax GC-Packed Column

시료를 여과한 후 2 mL screw cap vial에 0.975 mL을 넣고 weighing한 후 internal standard (이하 I.S.로 표기)로 isopropyl alcohol 25 μL을 weighing하여 첨가했다. 5분간 Vortex mixer로 잘 교반한 다음 1~1.5 μL 정도를 gas chromatograph에 직접 주입하였다.

분석에 사용된 gas chromatograph는 HP 5890 Series II Plus이었다. Stainless steel empty column (2 m×2 mm I.D)에 Tenax-GC (80/100 mesh)을 직접 충전, 분석용 column으로 사용하였으며 분리한 후 FID로 검출하였다. 이때 injector port와 detector port의 온도는 각각 220°C와 235°C이었으며 column의 온도는 80°C에서 3분간 유지하고 20°C/min으로 120°C까지 증가시켜 15분간 유지하였으며, 재차 20°C/min으로 170°C까

지 증가시켜 10분간 유지하였다. Carrier gas로 사용한 헬륨의 유속은 50 mL/min 이었고 detection을 위한 공기과 수소 가스의 유속은 각각 250 mL/min, 30 mL/min 이었다.

표준물질로 Aldrich사의 에탄올(99.5%), isopropyl alcohol (99.5%), 초산(99.7% 이상)을 사용하였으며 각각의 머무름 시간(retention time)을 확인하고 isopropyl alcohol에 대한 에탄올, 초산의 response factor을 계산하여 시료내의 에탄올 및 초산의 정량에 활용하였다.

통계처리

Pearson 상관계수와 신뢰구간(p < 0.05)을 계산하는데 SAS program⁽¹⁾을 이용하였다.

결과 및 고찰

Accuracy of packed column GSC analysis

Tenax GC-packed column으로 식초를 분석한 결과 gas chromatogram상에서 에탄올과 초산을 완전하게 분리할 수 있었으며 isopropyl alcohol이 이들 두 물질

과 조금도 겹치지 않아 I.S로 사용할 수 있었다(Fig. 1). Isopropyl alcohol을 I.S로 사용할 때 이에 대한 에탄올과 초산의 response factor는 각각 1.0985 (v/v)와 2.6855 (w/w)로 계산되었으며 에탄올과 초산을 적절한 농도로 조합한 standard mixture을 같은 방법으로 분석, packed column GSC(이하 PCGSC로 표기)의 정확도를 평가한 결과 에탄올의 절대오차 평균값은 1.16% (N=5), 초산은 1.36% (N=5)로 Tenax-GC packed column을 사용한 에탄올과 초산의 동시 분석이 가능함을 확인하였다(Table 1). 절대오차의 신뢰구간을 고려하더라도 최대오차가 에탄올은 3.36%, 초산은 3.96%로 이런 종류의 분석에서 10%이내의 오차 범위를 인정하는 관례⁽¹²⁾에 비추어 보면 매우 정확한 분석 방법임에 틀림없다. 특히 머무름시간이 에탄올은 7.6분, I.S는 10.2분, 초산은 14.3분으로 20분 이내에 분석을 끝낼 수 있으므로 시료가 많을 경우 더욱 더 효과적이며 이러한 Tenax-GC packed column은 주류나 장류같이 효모의 작용으로 에탄올을 함유하는 식품류의 에탄올 농도 분석에도 적절하게 이용할 수 있다.

식초의 주된 성분인 에탄올과 초산을 분석하고자 시료를 packed column에 직접 주입한 경우는 Blanch 등⁽¹⁰⁾에 의해 보고된 적이 있다. 그러나 그들은 Carbowax와 bis-(2-ethylhexyl)sebacate의 혼합물(92:8)을 desilanzed Volaspher A-2에 coating한(4%) 것을 충전물로 사용, packed column 제조가 용이하지 않았으며 머무름 시간을 보면 에탄올은 3.5분, 초산은 50분으로 분석시간이 많이 소요되는 단점을 내포하고 있었다.

Vinegar analysis

Tenax-GC packed column을 사용하여 19종에 이르는 양조, 사과, 현미 식초들의 에탄올과 초산을 동시에 분석하였으며, 아울러 이들 측정치의 신뢰여부를 파악하고자 HPLC로 초산을, titration에 의해 산도를, capillary column GLC (이하 CCGLC로 표기)로 에탄

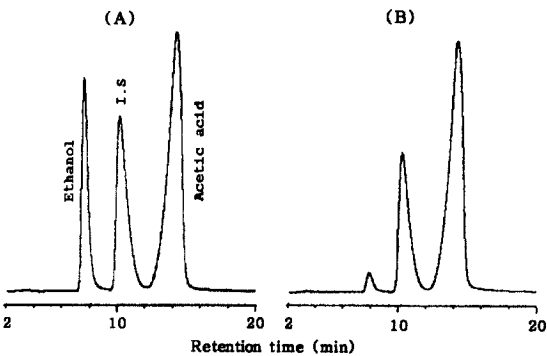


Fig. 1. Representative gas chromatograms of a standard mixture (A) and commercial vinegar (B) on Tenax-GC packed column.

Table 1. Accuracy of simultaneous analyses of ethanol and acetic acid by Tenax-GC packed column GSC in five standard mixtures

Standard mixture no.	Formulated		Recovered			
	Ethanol (%v/v)	Acetic acid (%w/w)	Ethanol (%v/v)	Difference (%)	Acetic acid (%w/w)	Difference (%)
1	1.0	14.62	0.97	-3.0	14.77	1.03
2	2.0	10.48	2.02	1.0	10.35	-1.24
3	3.0	7.36	3.02	0.67	7.24	-0.16
4	4.0	5.28	4.03	0.75	5.46	3.41
5	5.0	3.18	5.02	0.4	3.21	0.94
AAE ¹⁾				1.16		1.36

¹⁾Represents average absolute error.

올과 초산을 추가로 분석, 분석 방법에 따른 측정치의 차이 유무를 비교하였다.

식초의 적정산도(titratable acidity)는 PCGSC로 분석한 초산 함량에 비해 높은 수치를 보였으며 상관계수는 $r=0.9962$ ($p < 0.001$)이었다(Fig. 2). 그리고 HPLC로 분석한 초산 함량 역시 PCGSC로 측정된 식초의 초산 함량과 높은 상관 관계($r=0.9960$, $p < 0.001$)를 나타내었다(Fig. 3). 식초의 경우 초산이외의 다른 유기산의 생성이 가능하므로 적정산도가 초산 함량보다 높고 적정산도와 초산 함량의 비율이 비록 일정하지 않지만⁽¹³⁾ PCGSC로 측정된 초산 함량과 상관관계가 매우 높은 점, 그리고 PCGSC에 의한 식초 시료의 초

산 함량이 HPLC에 의한 초산 함량과도 비슷한 점 등으로 PCGSC를 이용한 초산 함량 분석은 매우 적절한 방법으로 판단되었다.

PCGSC에서는 Tenax-GC를 column의 충전물로 사용하여 에탄올과 초산의 분리를 추구한 반면 CCGLC에서는 Tenax-GC를 두 물질의 흡착제로 사용하였다. Tenax-GC에 흡착된 에탄올과 초산은 탈착하는 과정을 거쳐 CCGLC의 SE-54 column에서 분리되는데 CCGLC에서 두 물질의 정량이 원활하게 이루어질려면 일단 탈착과정 후 CCGLC에 주입되는 에탄올과 초산의 조성비가 시료의 에탄올 및 초산의 조성비와 일치해야 한다. 즉 Tenax-GC에 흡착내지 탈착되는 에탄올과 초산의 양이 시료의 에탄올 및 초산농도에 비례할 때 정량 분석이 가능하다. Fig. 4는 CCGLC에 의한 초산 함량을 integrator counts로 표기했을 때 PCGSC에 의한 시료의 초산 함량과의 관계를 나타낸 그림으로서 식초의 초산 함량이 3.97% (w/w)에서 12.88% (w/w)까지 변화될 때 CCGLC로 분석되는 초산 함량은 식초의 초산 농도에 전혀 비례하지 않음을 알 수 있다. 이는 Tenax-GC에 흡착되었다가 탈착되는 초산의 양이 시료의 초산 농도에 전혀 비례하지 않음을 의미한다. 그러나 PCGSC로 분석했을 때 에탄올 농도가 0.02~2.05% (v/v)인 식초들을 CCGLC 방법으로 분석할 경우 두 개의 분석 방법 상호간에는 상관관계가 매우 높은 것으로($r=0.9982$, $p < 0.001$) 나타났다(Fig. 5). 결론적으로 말해서, Tenax-GC로 흡착, 탈착하여 주입되는 CCGLC 분석 방법은 에탄올 분석에는 유용할 수 있으나, 초산 분석에는 적합하지 않은 방법

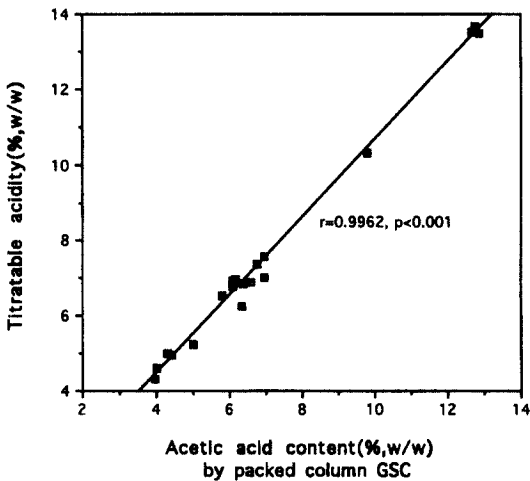


Fig. 2. Relationship between titratable acidity and acetic acid content analyzed by packed column GSC.

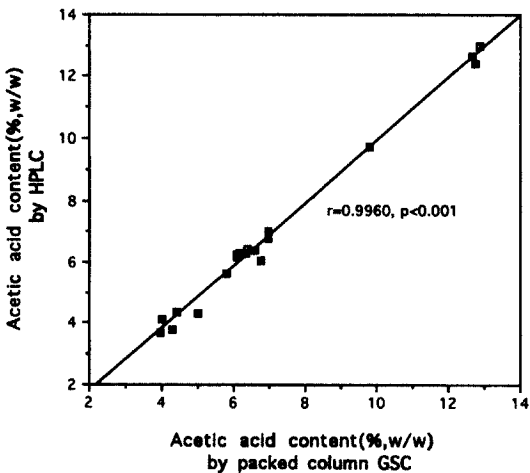


Fig. 3. Interrelationship among the data of acetic acid content analyzed by HPLC and packed column GSC.

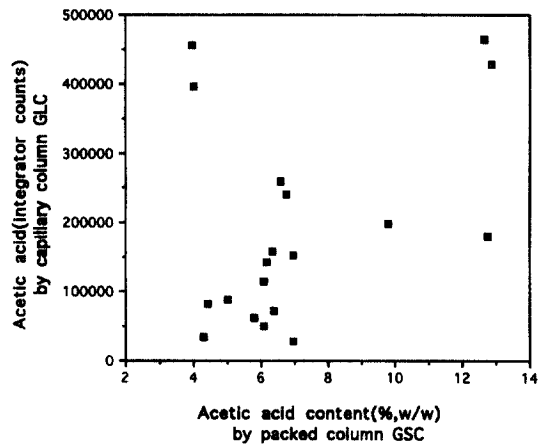


Fig. 4. Plot of acetic acid analyzed by capillary column GLC vs. acetic acid content analyzed by packed column GSC.

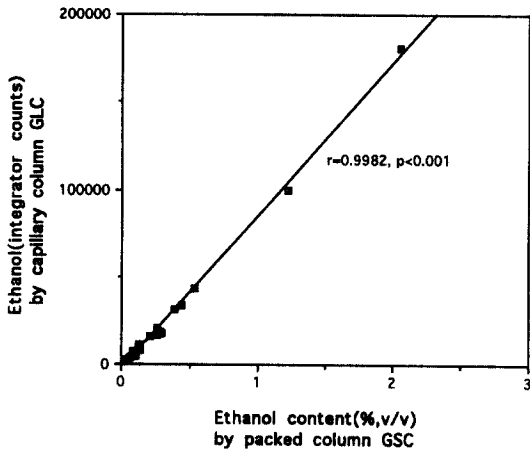


Fig. 5. Interrelationship among the data of ethanol analyzed by capillary column GLC and packed column GSC.

으로 판단되었다.

식초 시료 중에서 양조와 사과식초, 그리고 현미식초의 대부분이 에탄올 함량에 있어서 0.535% (v/v) 미만이었으나 현미 식초의 일부가 1.22% 또는 2.06% (w/w)로 높게 분석되었다. 이와같이 잔류 에탄올 함량이 1% 이상인 현미 식초는 Spanish traditional vinegar로서 효모의 2차 배양이 특징이고 에탄올 함량이 1.0~1.2% (v/v)로 보고된 sherry wine 식초⁽¹⁰⁾와 제조 방법이 유사할 것으로 생각된다. 즉, 당질을 원료로 알코올 발효 및 초산 발효를 연속적으로 거치는 전통적인 식초 제조방법의 특징인 것 같다.

요 약

식초의 에탄올과 초산을 동시에 분석하고자 packed column으로 gas chromatographic analysis을 모색하였다. Tenax-GC를 충전물로 사용하여 2 m×2 mm의 stainless steel column을 제조하고 식초를 여과하여 column에 직접 주입한 결과 내부 표준 물질로 사용한 isopropyl alcohol과 에탄올, 초산이 20분 이내에 완전히 분리되었으며 정확도가 매우 높은 것으로(p < 0.05) 나타났다. 19종의 식초를 이용하여 적정방법으로 산도를, packed column GSC로 에탄올과 초산을, HPLC로 초산을, capillary column GLC로 에탄올과 초산을 각각 분석하여 분석치들을 상호 비교하였다.

문 헌

1. Park, Y.S., Ohtake, H., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y. and Toda, K.: Effect of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 96-101 (1989)
2. Kim, H.J., Park, S.H. and Park, C.H.: Studies on the production of vinegar from barley (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **17**, 350-354 (1985)
3. Jung, G.T., Lee, G.J., Ryu, J., Na, J.S., Park, K.H. and Chio, B.J.: Studies on the production of spirit vinegar from maesil (*Prunus mume*) (in Korean). *Res. Rept. RDA*, **34**, 65-69 (1992)
4. Oh, Y.J.: A study on cultural conditions for acetic acid production employing pear juice (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 377-380 (1992)
5. Hong, J.H., Lee, K.M. and Hur, S.H.: Production of vinegar using deteriorated destringent persimmons during low temperature storage (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**, 123-128 (1996)
6. Kim, Y.D., Kang, S.H. and Kang, S.K.: Studies on the acetic acid fermentation using maesil juice (in Korean). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **25**, 695-700 (1996)
7. Lee, Y.C., Lee, G.Y., Kim, H.C., Park, K.B., Yoo, Y.J., Ahn, P.U., Choi, C.U. and Son, S.H.: Production of high acetic acid vinegar using two stage fermentation (in Korean). *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 663-667 (1992)
8. Kittelmann, M., Stamm, W.W., Follmann, H. and Truper, H.G.: Isolation and classification of acetic acid bacteria from high percentage vinegar fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 47-52 (1989)
9. Stamm, W.W., Kittelmann, M., Follmann, H. and Truper, H.G.: The occurrence of bacteriophages in spirit vinegar fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 41-46 (1989)
10. Blanch, G.P., Tabera, J., Sanz, J., Herraiz, M. and Reglero, G.: Volatile composition of vinegars. Simultaneous distillation-extraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Agri. Food Chem.*, **40**, 1046-1049 (1992)
11. SAS: *SAS/STAT User's Guide*, SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina (1985)
12. Cabezudo, M.D., Gorostiza, E.F., Herraiz, M., Fernandez-Biarge, J., Garcia-Dominguez, J.A. and Molera, M.J.: Mixed columns made to order in gas chromatography. IV. Isothermal selective separation of alcoholic and acetic fermentation products. *J. Chromatog. Sci.*, **16**, 61-69 (1978)
13. Moon, S.Y., Chung, H.C. and Yoon, H.N.: Comparative analysis of commercial vinegars in physicochemical properties, minor components and organoleptic tastes (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 663-670 (1996)

(1998년 4월 27일 접수)