

연구노트

Solid-Phase Microextraction(SPME)을 이용한 감식초의 휘발성 성분 분석

서지형 · 박난영* · 정용진**

경북과학대학 첨단발효식품과, *경북대학교 식품공학과, **계명대학교 식품가공학과

Volatile Components in Persimmon Vinegars by Solid-Phase Microextraction

Ji-Hyung Seo, Nan-Young Park* and Yong-Jin Jeong**

Department of Traditional Fermented Food, Kyongbuk College of Science

*Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University

**Department of Food Science and Technology, Keimyung University

Traditional static headspace and headspace solid-phase microextraction(SPME) techniques were compared for their effectiveness in the extraction of volatile flavor compounds from the headspace of persimmon vinegar. The adsorption condition of SPME fiber for equilibrated headspace vapor was selected as 80°C and 20 min. Total FID response for volatiles of persimmon vinegar was exactly higher such as total peak area 18.18×10^6 in SPME-GC technique than total peak area 1.35×10^6 in static headspace-GC. The major volatiles in persimmon vinegar were acetic acid, ethyl acetate, 3-hydroxy-2-butanone, ethanol, phenethyl alcohol. From static headspace-GC technique, 3 acids, 3 aldehydes, 5 alcohols, 9 esters and 1 ketone were identified. From SPME-GC technique, total 34 compounds including 6 acids, 7 aldehydes, 6 alcohols, 9 esters, 2 hydrocarbones, 1 ketone, 3 others were detected. Also the ratio for benzaldehyde, phenethylacetate and phenethylalcohol were higher in SPME-GC.

Key words : SPME, flavor, persimmon vinegar, volatile component

서 론

식품의 flavor는 다양한 종류의 휘발성 성분으로 구성되어 특유의 관능적 특성을 형성한다. 휘발성 성분은 원료자체의 성분 이외에 식품의 제조·가공 중에 형성된 성분으로 구성되며, threshold level이 낮은 경우 미량으로도 식품의 기호도에 영향을 준다. 현재 휘발성 성분의 포집·분석은 headspace vapor를 GC로 주입하는 headspace법이나, 용매로 휘발성 성분을 추출하여 GC로 주입하는 simultaneous distillation extraction(SDE) 및 liquid liquid continous extraction(LLCE) 방법이 주로 이용되고 있다. SDE 및 LLCE-GC법 등은 용매의 성상에 따라 다양한 종류의 휘발성 성분을 포집할 수 있으나 추출과정에서 열변성되거나 농축과정에서 미량의 저비점(低沸點) 성분이 손실되는 것으로 보고되었다⁽¹⁾. 이에 반해 headspace-GC법은 추출·포집과정에서 고유 휘발성 성분의 변화나 손실의 '최소화'란 측면에서는 유리하지만, 추출

효율이 떨어지는 문제점이 있다⁽²⁾. 최근에는 이와 같은 headspace-GC법의 단점을 보완한 solid phase microextraction (SPME)-GC법이 도입되어 오렌지쥬스⁽³⁾, 보드카⁽⁴⁾ 등의 향기 성분 분석에 이용되고 있다. 특히 SPME-GC법은 사용이 간편하고 휘발성이 약한 향기성분의 분석에서도 좋은 결과가 보고되고 있어 점차 활용빈도가 증가할 것으로 기대된다⁽⁵⁾.

식초는 초산 이외의 acid, aldehyde, alcohol, ketone, ester 류 화합물이 상호 복합적으로 작용해서 특유의 flavor를 형성한다. 식초의 휘발성 성분은 다량의 수분과 초산으로 인해 여러 형태로 연구되어 왔다. Kahn 등⁽⁶⁾은 magnesium oxide와 ether-pentane을 이용한 중화·추출법으로, Blanch 등⁽⁷⁾은 SDE-GC법으로, 국내에서 Yoon 등⁽⁸⁾과 Hur 등⁽⁹⁾은 purge and trap 방식의 dynamic headspace-GC법으로 각종 식초의 휘발성 성분에 대해 보고하고 있으나, SPME-GC법을 이용한 식초의 휘발성 성분에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 또한 식초의 flavor는 발효성 미생물의 작용으로 생성된 다양한 휘발성 성분으로 구성됨으로, 휘발성 성분의 추출·분석유형에 따라 차이가 클 것으로 생각된다. 이에 본 연구는 2단계 발효로 제조한 감식초를 이용하여 static headspace-GC법과 SPME-GC법으로 휘발성 성분을 각각 포집·분석하여 상호간의 특성에 대해 조사하였다.

Corresponding author : Ji-Hyung Seo, Department of Traditional Fermented Food, Kyongbuk College of Science, Chilkok, Kyungbuk 718-850, Korea
Tel : 82-53-765-8922
E-mail : iseojh@hanmail.net

재료 및 방법

실험재료

경북 청도군 일대에서 생산된 완숙된 뽕은감(*Diospyros kaki*, T.)을 Jeong 등⁽¹⁰⁾의 방법으로 *Saccharomyces kluyveri* DJ97 (주모)과 *Acetobacter* sp. PA97(중초)을 이용하여 2단계 발효시켜 제조한 감식초를 시료로 하였다.

SPME 포집조건의 설정

감식초의 휘발성 성분 포집을 위해서 Carbowax/divinylbenzene(CW/DVB, 65 µm coating thickness, Supelco Co., USA) fiber는 각각의 분석에 앞서 Supelco에서 표기한 조건(200°C에서 20분간)으로 예열시켜 사용하였다. SPME 포집은 Arthur 등⁽¹¹⁾의 방법에 따라 headspace vial(23×75 mm, PTFE/silicone septa, aluminum seal)에 시료 5 mL를 넣고 NaCl을 25% 첨가한 다음 예열 처리된 SPME fiber를 주입하여 heating block(Dry Thermo bath MG 2000, EYELA Co., Japan)을 이용해서 가열시킨 후, 휘발성 성분이 포집된 SPME fiber를 GC injector에 주입하여 분석하였다. 이때 SPME 최적 포집조건은 각 vial의 가열온도를 25, 40, 60, 80, 100°C로, 가열·포집시간을 5, 10, 20, 30분으로 하여 얻은 각각의 total FID response를 상호 비교하여 설정하였다.

휘발성 성분의 분석

Static headspace-GC법에 의한 휘발성 성분의 분석은 headspace용 vial(23×75 mm)에 시료 5 mL와 NaCl을 25% 첨가한 다음 autoheadspace system(HSS-4A, Shimadzu Co., Japan)을 이용해서 80°C에서 20분간 가열·포집한 후 headspace vapor 0.8 µl를 GC injector에 주입하여 분석하였다. SPME-GC법에 의한 휘발성 성분의 분석은 vial에 시료 5 mL를 넣고 NaCl을 25% 첨가한 다음 위와 동일한 조건으로 예열 처리된 CW/DVB fiber를 vial에 주입하여 heating block(Dry Thermo bath MG 2000, EYELA Co., Japan)을 이용해서 각각 80°C에서 20분간 가열·포집하여 GC injector에 주입하였다. 포집된 각각의 휘발성 성분은 Shimadzu 17A GC와 HP FFAP capillary column(50 m×0.22 mm i.d.×0.25 µm film thickness), FID detector(230°C) 및 carrier gas로 N₂(1.3 mL/min)를 이용하여 50°C(2 min)에서 220°C(20 min)의 column 온도 programing으로 분석하였다. 또한 휘발성 성분의 동정은 Shimadzu QP-5050A GC-MS를 이용하여 GC와 동일한 조건으로 분석하여 준비된 표준품과의 retention time 비교 및 문헌상의 mass spectral data⁽¹²⁾의 대조로써 실시하였다. 이때 MS system 조건은 ionization mode EI, ionization voltage 70eV, mass range 40~300 a.m.u.이었으며, 사용된 library는 Wiley 229이었다.

결과 및 고찰

SPME 포집조건

Fig. 1은 감식초의 휘발성 성분을 SPME-GC법으로 분리·동정함에 앞서서, 휘발성 성분의 최적 포집조건 설정을 위해 각 포집온도 및 포집시간에 따른 total FID response를 조사

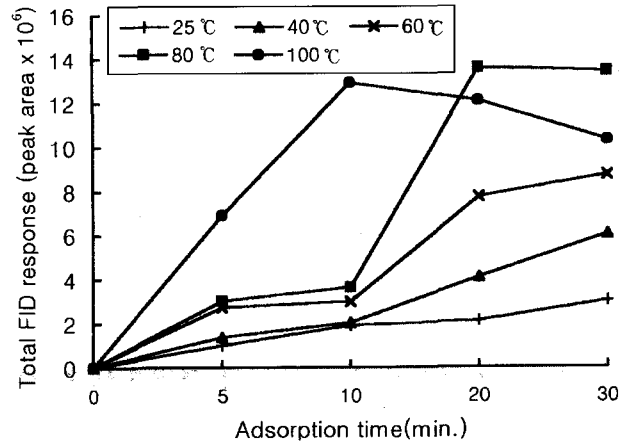


Fig. 1. Effects of temperature and time on the equilibrium of volatile compounds between the SPME coating and the headspace of persimmon vinegar

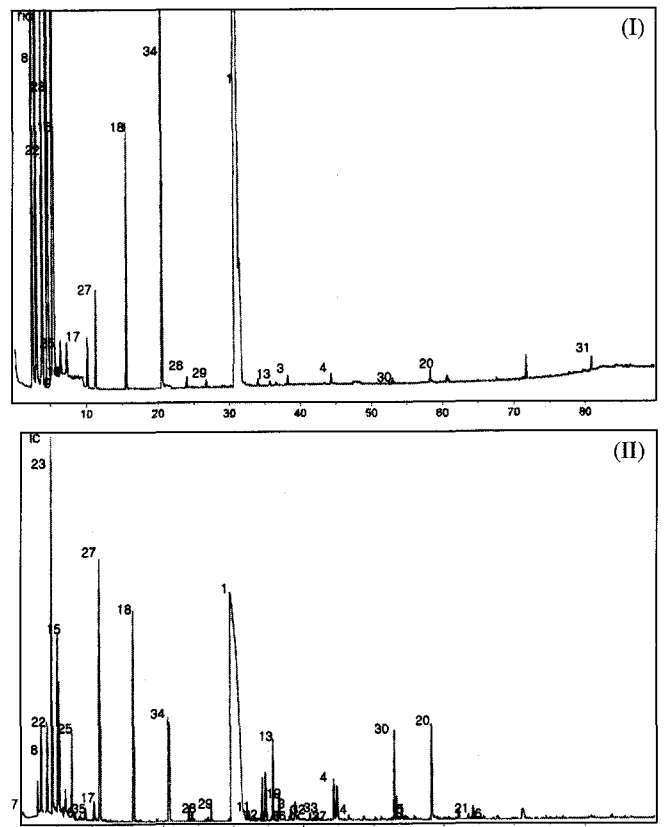


Fig. 2. Gas chromatogram of volatile compounds in persimmon vinegar

I: Static headspace method with autoheadspace system
II: SPME method with 65 µm Carbowax-Divinylbenzene fiber

한 결과이다. Total FID response는 80°C에서 20분간 포집한 경우 가장 높은 값을 나타내었으며, 80°C에서 30분간 포집한 경우나 100°C에서 포집한 경우에는 total FID response가 오히려 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 80°C 이상의 고온에서는 감식초의 휘발성 성분 일부분이 분해되거나 휘발성 성분에 대한 fiber의 흡착성이 감소하는 것을 의미하며, SPME법으로 orange juice의 향기성분에 대해 연구한 Jia 등⁽³⁾

Table 1. Volatile compounds of persimmon vinegar

Peak No.	RT (min)	Compounds	Identification	peak area(%)	
				Adsorption method ¹⁾	
				I	II
Acids					
1	30.66	Acetic acid	MS, RT	43.86	52.57
2	35.10	Formic acid	MS, RT	-	0.08
3	38.23	Isobutyric acid	MS	0.06	0.25
4	44.36	Isovaleric acid	MS	0.09	0.75
5	54.49	Heptanoic acid	MS	-	0.13
6	65.70	Caprylic acid	MS	-	0.07
Aldehydes					
7	0.15	Hexanal	MS	-	0.42
8	3.04	Acetaldehyde	MS, RT	5.95	1.49
9	5.09	3-Methylbutanal	MS	0.01	-
10	8.31	2-Butenal	MS	-	0.07
11	32.21	2-Furaldehyde	MS	-	0.17
12	33.57	Decanal	MS	-	0.06
13	35.73	Benzaldehyde	MS, RT	0.03	1.47
14	46.47	Dodecanal	MS	-	0.13
Alcohols					
15	5.33	Ethanol	MS, RT	13.72	4.00
16	5.60	3-Methyl-2-butanol(isoamyl)	MS, RT	0.17	-
17	10.14	2-Methyl-1-propanol(isobutyl)	MS, RT	0.40	0.38
18	15.62	3-Methyl-1-butanol(isopenta)	MS, RT	1.84	3.64
19	36.58	2,3-Butanediol	MS	-	1.05
20	58.33	Phenethyl alcohol	MS, RT	0.09	1.98
21	63.50	Trimethyl pentadecanol	MS	-	0.11
Esters					
22	3.86	Methylacetate	MS, RT	3.25	1.26
23	4.57	Ethylacetate	MS, RT	20.07	6.78
24	6.15	Propyl acetate	MS	-	0.08
25	7.15	n-Butyl acetate	MS	0.21	0.89
26	8.96	Ethyl isopentanoate	MS	-	0.07
27	11.32	Isoamylacetate	MS	0.75	5.83
28	24.00	Ethyl lactate	MS	0.07	0.14
29	27.08	Ethylidene diacetate	MS	0.05	0.24
30	52.97	Phenethylacetate	MS, RT	0.04	1.67
31	80.90	Diethylphtalate	MS	0.11	-
Hydrocarbones					
32	39.25	Hexadecane	MS	-	0.07
33	41.75	Octadecane	MS	-	0.08
Ketones					
34	20.55	3-Hydroxy-2-butanone	MS, RT	3.48	4.00
Others					
35	9.07	2-Methyl-1,3-dioxane	MS	-	0.14
36	37.97	5-Hydroxy-2-methyl-3-hexanone	MS	-	0.06
37	42.56	Dihydro-2(3H)-Furanone	MS	-	0.10

¹⁾I: Static headspace method with autoheadspace system

II: SPME method with 65 μ m Carbowax-Divinylbenzene fiber

의 보고와 유사한 경향이였다. 따라서 감식초의 휘발성 성분 포집조건은 80°C에서 20분간으로 설정하였다.

감식초 휘발성 성분의 분리 · 동정

Fig. 2는 감식초의 휘발성 성분을 static headspace-GC 및

SPME-GC법으로 각각 포집 · 분석하여 얻은 chromatogram이다. Headspace법과 SPME법 모두 retention time 30분 경과시 까지 대부분의 휘발성 성분이 분리되는 유사한 유형이었으며, 30분 이후에는 peak 유형에서 차이를 확인할 수 있었다. 또한 headspace법에 의한 감식초 휘발성 성분의 total FID

response는 total peak area 1.35×10^6 로, CW/DVB fiber를 이용한 SPME법의 total peak area 18.18×10^6 에 비해 매우 낮았다.

Table 1은 각각의 포집·분석법에 따라 분리된 감식초의 휘발성 성분을 GC-MS의 확인과 표준물질과의 비교를 통해 동정한 결과이다. Acetic acid, ethyl acetate, 3-hydroxy-2-butanone, ethanol, phenethyl alcohol 등이 감식초의 주된 휘발성 성분으로 확인되었으나, 각 분석법에 따라 휘발성 성분의 구성에 차이가 있었다. Headspace-GC법에서는 acid류 3종, aldehyde류 3종, alcohol류 5종, ester류 8종 및 ketone류 1종으로 확인되었으며, hydrocarbone류는 나타나지 않았다. Headspace-GC법에서는 retention time 30분 이내에 acetic acid를 비롯한 대부분의 휘발성 성분이 확인되었으며, 주로 저비점의 휘발성이 큰 성분이었다. 한편 SPME-GC법에서는 acid류 6종, aldehyde류 7종, alcohol류 6종, ester류 9종, hydrocarbone류 2종, ketone류 1종, 기타 3종으로, 총 34종의 휘발성 성분이 확인되었으며, benzaldehyde, phenethylacetate, phenethylalcohol 등 retention time 30분 이후의 비교적 휘발성이 낮고 분자량이 큰 성분의 비율이 static headspace-GC법에 비해 높았다. 특히 hexanal, 2,3-butenediol, heptanoic acid, dodecanal 및 hydrocarbone류 등은 SPME-GC법에서만 확인되었다. 또한 SPME-GC법으로 동정된 감식초의 휘발성 성분은 Yoon 등⁽⁸⁾, Jeong 등⁽¹³⁾의 보고와 유사한 경향이었다. 이상의 결과로 SPME-GC법은 감식초에 대한 특별한 전처리 과정 없이, static headspace-GC법보다 휘발성 성분의 포집효율이 높은 것을 확인할 수 있었으며, 기존의 휘발성 성분 포집법에 비해서 사용하기 쉽고 시료의 처리에 따른 성분변화도 나타나지 않아서 차후 폭넓게 이용될 것으로 기대된다.

요 약

2단계 발효로 제조한 감식초를 static headspace-GC법과 SPME-GC법으로 휘발성 성분을 각각 포집·분석하여 상호간의 특성에 대해 조사하였다. 감식초의 휘발성 성분 포집조건은 80°C에서 20분간으로 설정하였으며, 감식초 휘발성 성분의 total FID response는 CW/DVB fiber를 이용한 SPME법에서 total peak area 18.18×10^6 로, static headspace-GC법의 total peak area 1.35×10^6 보다 현저하게 높았다. 감식초의 주된 휘발성 성분으로 acetic acid, ethyl acetate, 3-hydroxy-2-butanone, ethanol, phenethyl alcohol 등이 확인되었으며, static headspace-GC법에서는 acid류 3종, aldehyde류 3종,

alcohol류 5종, ester류 8종 및 ketone류 1종이 확인되었다. SPME-GC법에서는 acid류 6종, aldehyde류 7종, alcohol류 6종, ester류 9종, hydrocarbone류 2종, ketone류 1종, 기타 3종으로, 총 34종의 휘발성 성분이 확인되었으며, benzaldehyde, phenethylacetate, phenethylalcohol 등의 비율이 headspace-GC법에 비해 높았다.

문 헌

1. Clark, T.J. and Bunch, J.E. Qualitative and quantitative analysis of flavor additives on tobacco products using SPME-GC-mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 45: 844-849 (1997)
2. Kobayashi, A. Recent progress in flavor research. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 44: 169-176(1997)
3. Jia, M., Zhang, Q.H. and Min, D.B. Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2744-2747 (1998)
4. Ng, L.K., Hupe, M., Harnois, J. and Moccia, D. Characterization of commercial vodkas by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J. Sci. Food Agric.* 70: 380-388 (1996)
5. Penton, Z. Flavor volatiles in a fruit beverage with automated SPME. *Food Test Anal.* June: 16-18 (1996)
6. Kahn, J.H., Nickol, G.B. and Conner, H.A. Identification of volatile components in vinegars by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* 20: 214-218 (1972)
7. Blanch, G.P., Tabera, J., Sanz, J., Herrais, M. and Reglero, G. Volatile composition of vinegars. Simultaneous distillation-extraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1046-1049 (1992)
8. Yoon, H.N., Moon, S.Y. and Song, S.H. Volatile compounds and sensory odor properties of commercial vinegars. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 299-305(1998)
9. Hur, S.H. and Lee, W.K. Volatile flavor components in pumpkin vinegar. *J. Food Sci. Nutr.* 3: 119-122 (1998)
10. Jeong, Y.J., Lee, G.D. and Kim, K.S. Optimization for the fermentation condition of persimmon vinegar using response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1203-1208(1998)
11. Arthur, C.L., Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62: 2145-2148 (1990)
12. Wiley/National Bureau of Standards(NBS). Registry of mass spectral data. Wiley Science, N.Y. USA (1989)
13. Jeong, Y.J., Seo, J.H., Park, N.Y., Shin, S.R. and Kim, K.S. Changes in the components of persimmon vinegars by two stages fermentation(II). *Korean J. Postharvest Sci. Tehcnol.*, 5: 233-238 (1999)

(2000년 10월 24일 접수)