

工學碩士 學位論文

Headspace법에 의한
국내산 꿀의 품질평가

指導教授 李 養 鳳

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함



2002年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

金 種 珽

金種秘의 工學碩士 學位論文을 認准함

2001年 12月 18日

主 審 農學博士 양 지 영



委 員 農學博士 안 동 현



委 員 農學博士 이 양 봉



목 차

Abstract	3
서 론	5
재료 및 방법	10
1. 실험 재료	10
2. 실험 방법	10
2.1 일반 성분 및 HMF 분석	10
2.1.1 수분	10
2.1.2 HMF(Hydroxymethylfurfural) 함량분석	12
2.1.3 당분석	12
2.2 휘발성 성분 분석	14
2.2.1 Dynamic Headspace Analysis법	14
2.2.2 Solid Phase Microextraction법	14
2.2.3 Gas Chromatography-flame Ionization Detector에 의한 분석	18
2.3 GC-Mass Selective Detector에 의한 휘발성 성분의 동정	18
2.4 통계 처리	18

결과 및 고찰	21
1. 일반성분 및 HMG 함량 분석	21
2. Purge and Trap 장치를 이용한 휘발성 성분 분석	24
2.1 벌꿀의 종류에 따른 휘발성 성분 분석	24
2.2 벌꿀의 저장기간에 따른 휘발성 성분 분석	29
2.3 아카시아 꿀의 가공 공정 중에 생긴 변화 고찰	33
3. Solid Phase Microextraction를 이용한 휘발성 성분 추출 및 분석	36
3.1 벌꿀 휘발성 성분의 최적화 분석	36
3.2 반응 표면 분석법을 이용한 최적화 결정	37
3.3 휘발성 성분 분리 및 동정	45
요 약	49
References	51

Quality Evaluation of Korean honeys by Headspace Analyses

Jong-Pil Kim

*Department of Food Science and Technology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Honey has been widely known as a natural sweetener from bee and its quality is mainly determined by color, isotope of carbon and other components. Flavor quality of honeys are thought to depend on the kind of honeys. The chemical compositions of the used Korean honeys were the ranges of 18.3~25.6% moisture, 67.8~71.1% invert sugar, 1.8~3.2% sucrose, 8.5~40.7mg/kg HMF, 1.2~1.6% F/G. In addition to these components, flavor qualities of such Korean honeys as chestnut, acacia, tangerine and Korean traditional honeys could be evaluated by measuring the headspace volatile compounds isolated with purge & trap and solid phase microextraction(SPME).

By purge and trap, one of the most dynamic headspace flavor isolation, the numbers of headspace volatile compounds identified from chestnut, acacia and tangerine honeys were 67, 44 and 41 compounds, respectively.

Ethanol, 2-furancarboxaldehyde, ethylacetate and benzaldehyde were abundant compounds in chestnut honey and the amounts of these compounds were increased by 130, 19, 16 and 8 times for 1 year, respectively. The number of compounds identified from aqueous layer during honey processing were 17 including 8 alcohols.

For the SPME, another isolation method of headspace volatile compounds, the optimum condition for extraction of volatile compounds was studied by surface response method, and its optimum condition was 60°C, 40min and 60ml/min. The most abundant compounds among headspace volatile compounds isolated from Korean honeys by SPME were 21.4% and 20.1% 2,6,10-trimethyl pentadecane in acacia and chestnut honeys, respectively, and 15.8% octacosane in traditional Korean honeys, and 25.3% hexadecanoic acid ethyl ester in tangerine honeys. While the main volatile compounds from Korean honeys by purge and trap were the compounds having lower temperature boiling points, those by SPME were higher in boiling points.

The chemical compositions and headspace volatile compounds of honeys provide a reliable index for the evaluation of qualities of honeys. The modified sampling device using a magnetic bar for isolating headspace volatile compounds from viscous honeys was proved to analyze the flavor compounds of honeys as a better analytical isolation method.

서 론

벌꿀은 꽃의 밀선에서 빨아내어 축적한 감미료로서 빛깔, 향기, 맛, 성분은 봉군이나 꽃의 종류에 따라 다르지만 일반적으로 수분 17%, 비중 1.41이다. 고형분의 대부분은 당분으로서 거의 같은 양의 과당과 포도당으로 되어 있으며, 수크로오스는 약 2%이다. 이러한 벌꿀은 식물의 밀선에서 분비하는 물질을 일벌이 수집하여 벌집에서 증발·농축시켜 그들의 식량으로 저장해 놓은 것을 말한다.(Kim 등, 1996) 1930년 필립(Phillips)이라는 학자는 「벌꿀이란 꿀벌이 여러 식물의 밀선에서 수집한 향기롭고 점조성(粘稠性)이 있는 단 물질인데, 꿀벌 등에 의하여 그들의 식량으로 전화(轉化)되어 벌집 내에 저장된 것으로 산성반응을 나타내며 2개의 단당류로 되어 있고 때로는 더 복잡한 탄수화물, 무기물, 식물성 색소, 효소 및 화분을 함유하고 있는 것」이라고 정의하였으며, 우리 나라의 식품공전에는 보다 간단하게 「벌꿀이라 함은 꿀벌들이 꽃꿀을 채집하여 벌집에 저장·숙성한 것을 말한다.」고 정의 되어있다.

벌꿀에 대한 최초의 기록은 BC 7,000년경으로 추정되는 스페인 동굴벽화에서부터 라고 추정된다. 고대 이집트(BC 3,200년경) 문자에서는 꿀벌의 모양이 왕권을 의미하는 것으로 사용되어 왔고 왕의 피라미드에도 꿀단지를 함께 넣어 벌꿀의 귀중함을 나타내었다. 의학의 아버지로 불리는 히포크라테스는 열이 날 때 벌꿀을 권유했다고 기록하고 있어 벌꿀을 의학용으로 사용했음을 말해주고 있다. 기원전 600년경 고대 그리스의 철학자인 아리스토텔레스는 꿀벌의 상태를 연구하여 그 습성을 이미 기록해 놓았으며, 「일본서기(日本書紀)」에 보면 백제의 태자 「풍(風)」에 의하여 일본에 양봉이 전해졌다는 기록이 있는 것으로 미루어 우리나라에서도 삼국시대에 이미 양봉이 활성화되었던 것을 알 수 있다.

또한 성경에는 하나님이 가라고 명한 가나안 땅을 「젓과 꿀이 흐르는」 선택 받은 곳으로 묘사할 만큼 벌꿀은 온 인류가 오래 전부터 귀하게 애용하여 온 자연건강식품인 것을 알 수 있다.

벌꿀의 채취 원은 수목과 식물들의 화밀에 있으므로 밀원(蜜源)종류에 따라 '아카시아꿀', '유채꿀' '밤꿀' 등으로 구분하는데 이들은 맛, 향미 그리고 외양에 따라 품질을 결정하며 최고급품으로는 '아카시아꿀'과 같이 물같이 맑은 색깔(water white)을 띄는 꿀제품이다. 이처럼 벌꿀은 밀원에 따라 아카시아나 밤 꿀과 같이 나무에서 나는 목본류 꿀과 유채·자운영·매밀·잡화 등 일년생 초본류의 꿀로 크게 나누어진다. 초본류 꿀은 전화당의 구성성분 중 포도당과 과당의 비율이 0.8~1.1정도로 과당에 비해 포도당이 많거나 비슷한 구성을 이루고 있어 쉽게 결정되는 경향이 있다. 그러나 아카시아나 밤꿀과 같은 경우는 포도당에 비해 과당의 비율이 매우 높아 1.50가량 나타나게 되며 이 벌꿀들이 잘 거의 결정되지 않는 것은 이러한 이유 때문이다. 이와 같이 벌꿀이 어떤 원인에 의해 응고되는 경우가 있는데, 과거에는 자당을 혼합한 가짜 꿀로 오인하여 구입을 기피하는 경우도 있었으나, 오늘날에는 잦은 외국 여행이나 국내에 수입된 외국산 꿀 등을 통하여 많은 꿀들이 결정된 상태인 것을 보아왔기 때문에 오히려 순수성을 나타내는 것이라 하여 소비자들이 선호 하는 경우가 많다. 더욱 호주 등지에서는 벌꿀을 더욱 결정이 잘되는 조건에서 생산하여 비누와 같이 종이에 포장해서 판매하는 등, "결정 꿀은 설탕을 섞은 가짜꿀"이라는 등식을 정면으로 거부하고 있기도 하다. 벌꿀은 온도, 강한 열, 교반 및 결정유도물(화분)의 첨가 등에 의해 결정이 진행된다. 벌꿀의 결정은 벌꿀의 진위여부 보다는 밀원의 종류에 따라 그 진행정도가 차이가 난다. 즉, 벌꿀을 구성하고 있는 당의 성질에 따라 결정이 된다. 벌꿀을 이루고

있는 주요성분은 전화당과 자당이며, 전화당은 포도당과 과당으로 구성되어 있는데 포도당과 과당의 구성비율이 벌꿀의 결정에 중요한 작용을 한다. 포도당은 단맛이 설탕보다 덜하며 체내흡수가 빠른 반면 결정력이 강하고, 과당은 단맛이 설탕보다 강하며, 점도가 작고, 매우 강한 흡습조해성을 가지고 있어 좀처럼 결정되지 않는다. (Chang 등, 1997)

자연그대로의 감미료인 벌꿀은 포도당과 과당을 주성분으로 구성된 단당류(單糖類)이기 때문에 체내 장벽에 직접 흡수되어 영양제가 된다. 포도당과 과당은 장벽에서 흡수되면 글리코겐(glycogen)이 되어 간에 저장된다. 포도당은 주로 체내의 근육세포에서 연소하여 생명을 지속하는데 필요한 에너지를 발생한다. 사람이 필요한 무기물의 대부분을 벌꿀이 함유하고 있어 체내에 있어서 중요한 생리작용을 원활하게 하고 골조직(骨組織)의 발육을 완전하게 해준다. 영양회복, 심장질환의 치료에 포도당 주사를 행하고 있는데 이때 포도당을 다량 함유한 벌꿀을 내복하는 것은 다소 목적이 다르지만 영양장애, 피로회복에 현저한 효과가 있다. 벌꿀을 아이들에게 1일 2회 복용시켜 적혈구(赤血球)가 85%나 증가하였음이 보고되고 있다. 혈액응고작용(血液凝固作用)이 저하된 사람이 부상을 당하거나 이를 빼었을 때 출혈을 막을 수 있다. 벌꿀 1파운드(453.6그램)당 1,602칼로리의 열량을 내는데, 이것은 우유에 비하여 약 6배나 된다. 벌꿀은 당분의 중요한 공급원이 됨은 물론 그밖에 자양식료(滋養食料)로서 중요하다. (Han 등, 1995)

1998년부터 추진되어 왔던 식품공전 개정작업이 완료됨에 따라 벌꿀의 HMF(hydroxy methyl furfural)함량이 종전의 40mg/kg에서 유럽이나 미국 등과 같은 80mg/kg으로 바뀌게 되었다. 이와 같은 사실은 지난 4월18일자로 고시된 "식품의 기준 및 규격 중 개정고시"를 통해 2000년 9월 1일부터 시행하

는 것으로 확인되었다. 이에 따라 그 동안 벌꿀에서 자연적으로 증가하는 HMF로 인해 많은 어려움을 겪었던 국내의 양봉업계는 큰 부담을 덜 수 있게 되었다. 그러나 그 동안 업계에서 HMF기준을 상향 조정하기 위해 많은 노력을 기울여 온 것과 더불어 캐나다 등으로부터 꾸준히 이의 시정을 요구하는 목소리가 들려왔던 것에 미루어 이번 조치가 외국 벌꿀의 수입을 용이하게 했다는 것 또한 간과 할 수 없는 사실이다.

벌꿀의 주성분은 과당과 포도당이며 미량의 서당, dextrin등이 있고, 그 외 질소화합물, 효소류, 비타민류, 무기물, 유기산류등이 포함되어 있으며, 이러한 벌꿀에 대한 보건사회부에서 제정한 식품 등의 규격 및 기준에 관한 규정을 보면 꿀의 성상은 고유의 색택, 향미를 가지고 점조성이 있어야 하고, 수분 21.0%이하, 회분 0.6%이하, 산도는 40.0meq/kg이하, 전화당 65.0%이상, 자당 7.0이하, 히드록시메틸 푸르푸랄 40.0mg/kg이하, 이어야 하며 타르색소, 인공 감미료는 검출되어서는 안되며, 이성화당은 음성이어야 한다고 하였다. 이에 대하여 부산직할시 보건환경연구소와 서울대학교 농화학과에서 실험하였는데, 아카시아꿀, 잡화꿀, 밤꿀을 대상으로 일반성분 및 유리당을 정량분석하고 지방산을 gas chromatography-mass selective detector로써 분석한 결과 아카시아꿀, 잡화꿀, 밤꿀의 평균 수분 함량은 각각 19.7, 19.1, 18.9%이었으며 회분은 각각의 평균이 0.028, 0.050, 0.050%로서 아카시아꿀에서 비교적 낮았다.

벌꿀의 HMF는 아카시아꿀과 잡화꿀의 평균함량이 18mg/kg정도이나 밤꿀은 다소 높은 20.21mg/kg으로서 가장 낮았다. 유리당의 함량은 밀원의 종류에 관계없이 3종 모두 포도당 31.0~32.0%, 과당 35.0~36.0%이었고 과당/포도당의 비율도 3종 모두 거의 동일한 1.14 정도이었다. Gas chromatography mass selective detector에 의한 지방산의 분석에서는 분석에서는 dodecanoic acid,

10-hydroxydecanoic acid, 6, 9-undecenoic acid, tetradecenoic acid, 12-(acetyloxy)-9-octadecenoic acid 및 14-octadecenoic acid가 확인되었으며, 벌꿀의 품질판정에 이용되고 있는 10-hydroxydecanoic acid의 함량은 3종 모두 10mg% 내외이며 20~30mg%에 달하는 시료도 있는 반면 검출되지 않는 시료도 있었다.

본 연구에서는 품종별 벌꿀이 가지는 휘발성 성분에 대한 품질 평가의 기준을 설정하기 위해서 아카시아꿀, 밤꿀, 토종꿀, 밀감꿀 등의 한국산 벌꿀의 향기성분에 대하여 headspace법인 purge and trap장치와 solid phase microextraction을 이용하여 휘발성 성분을 분석한 후, 분석방법과 꿀의 종류에 따른 휘발성 성분의 차이를 비교하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 재료는 1997, 98년도와 2000년도에 경남 거창 지역에서 채밀한 밤꿀과 같은 지역에서 1998년도와 2000년도에 채밀한 아카시아꿀, 역시 같은 기간에 강원도에서 생산된 토종꿀, 마지막으로 제주도에서 1998년과 2,000년에 채밀한 밀감꿀을 농협연구소로부터 제공받아, 완전 밀봉하여 4℃ 저온고에 보관하면서 필요에 따라 적당량을 취하여 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

2.1 일반성분 및 HMF 분석

2.1.1 수분

벌꿀의 수분함량 측정은 결정생성 유무에 관계없이 모두 60-65℃의 수욕 중에서 30분간 가열하여 완전히 녹인 다음 빨리 식히고 잘 휘저은 다음, 20℃ 부근의 일정 온도에서 굴절률을 측정하여 Table 1에 따라 수분량을 구한다. 온도 보정으로 20℃ 이상의 온도에서는 굴절율이 +0.00023/℃, 20℃ 이하의 온도의 보정계수를 -0.00023/℃로 한다.

2.1.2 HMF 함량분석

벌꿀 5.0g을 50ml 메스플라스크에 취하여 15% potassium ferrocyanide(페로시안화칼륨) 0.5ml와 30% zinc acetate(초산아연)용액 0.5ml를 넣고 혼합한 다음 물을 가하여 표시선까지 채운 후 여과하여 처음 10ml는 버리고 나머지 액

Table 1. Moisture content and refractive index of honey

굴절률(20℃)	수분(%)	굴절률(20℃)	수분(%)	굴절률(20℃)	수분(%)
1.4992	15.0	1.4905	18.4	1.4820	21.8
1.4987	15.2	1.4900	18.6	1.4815	22.0
1.4982	15.4	1.4895	18.8	1.4810	22.2
1.4976	15.6	1.4890	19.0	1.4805	22.4
1.4971	15.8	1.4885	19.2	1.4800	22.6
1.4966	16.0	1.4880	19.4	1.4795	22.8
1.4961	16.2	1.4875	19.6	1.4790	23.0
1.4956	16.4	1.4870	19.8	1.4785	23.2
1.4951	16.6	1.4865	20.0	1.4780	23.4
1.4946	16.8	1.4860	20.2	1.4775	23.6
1.4940	17.0	1.4855	20.4	1.4770	23.8
1.4935	17.2	1.4850	20.6	1.4765	24.0
1.4930	17.4	1.4845	20.8	1.4760	24.2
1.4925	17.6	1.4840	21.0	1.4755	24.4
1.4920	17.8	1.4835	21.2	1.4750	24.6
1.4915	18.0	1.4830	21.4	1.4745	24.8
1.4910	18.2	1.4825	21.6	1.4740	25.0

을 사용하였다. 이때, 생성된 거품은 알코올을 가하여 제거하고, 여과는 No. 2 filter paper를 사용하였다. 이 용액 각 5ml를 2개의 시험관에 취하고 시험용액 관에는 물 5ml를, 공시험용액 관에는 0.2% 아황산수소나트륨 용액 5ml를 넣어 잘 혼합한 다음 시험용액은 물을, 공시험용액은 0.1% 아황산수소나트륨용액을 대조액으로 하여 284nm와 336nm에서 각각의 흡광도를 측정하였다.

$$\text{계산식 : HMF(mg/kg)} = \frac{A_{284} - A_{336} \times 149.7 \times 5}{S}$$

$A_{284} - A_{336}$: 각 파장에서의 흡광도치(시험용액-공시험용액)
 S : 검체의 채취량

2.1.3 당분석

Standard 용액은 2% fructose, 2% glucose, 0.2% sucrose, 0.2% maltose 용액으로 희석한다. Sample 용액은 벌꿀 약 3g을 정밀히 달아 100ml 메스플라스크에 물 25ml로 녹여 옮기고, 아세토니트릴로 표선까지 채워 여과(0.45 μ m 여과지)한 후 HPLC(Waters 600E, Waters Co., U.S.A)로 분석하여 sample 용액 중의 전화당(포도당+과당) 및 자당의 양을 산출하였다. 이때의 HPLC 분석 조건은 Table 2과 같다.

$$\text{계산식 : 당(\%)} = \frac{\text{pH}}{\text{pH}'} \times \frac{V}{V'} \times \frac{W'}{W} \times 100$$

pH, pH' : 검액과 Standard액의 높이 또는 면적
 V, V' : 검액과 Standard액의 전량(ml)
 W, W' : 검체 및 Standard당의 채취량(g)

Table 2. HPLC Condition for honey analysis

Items	Conditions
Detector	RI detector (Waters M410)
Column	Carbohydrate column(300mm × 3.9mm × 10 μ m)
Attenuation	64
Control Program	Millenium (Waters, Ver 1.25)
Inj. volume	20 μ l(Auto sampler : Waters M600)
Mobile phase	Acetonitile : Water = 80 : 20 (0.5 μ m FH type Filterate)
Flow rate	1.5 ml/min
Outernal temp.	45°C
Internal temp.	40°C

2.2 휘발성 성분 분석

2.2.1 Purge and Trap 장치를 이용한 휘발성 성분 분석

Purge and Trap 장치를 단일화시킨 dynamic headspace sampler(DHS, LSC3000, Tekman Co., USA)를 GC에 부착시켜 사용하였다. 시료를 밀봉한 상태로 60°C에서 총 60분간 가열하면서, 질소가스를 불어넣어 purge시키고, Tenax chemical column에 휘발성 성분이 흡착시켰다. 흡착된 휘발성 성분들은 -120°C로 유지되는 cryogenic focussing interface로 탈착되고, 일분내에 180°C까지 승온시켜 GC에 주입되어 분석이 이루어졌다. 자세한 조건은 Fig. 1과 Table 3에 나타내었다.

2.2.2 Solid phase microextraction법을 이용한 휘발성 성분 분석

휘발성 성분의 최적조건을 알아보기 위해 온도 및 시간조건과 N₂가스의 유량을 조절하여 최적조건을 확인하였다. 시료병(바닥 지름 3.0cm × 높이 8.0cm)에 각각의 꿀을 10g씩 취하고 magnetic bar(2cm)와 함께 넣고 밀봉을 하였으며, Fig. 2에서처럼 샤프펜슬모양의 플린저를 눌러서 화이버(fiber assembly 100 μ m polydimethylsiloxane coating for manual holder red)가 밖으로 나오도록 고정한 후, headspace법으로 휘발성 물질을 고정상에 흡착·추출했다. 이때, 휘발성 성분 추출의 효율을 높이기 위하여 일반 질소 가스를 분당 60ml씩 흘려주었다. 일정 시간 흡착 후, 플린저를 다시 위로 올려 화이버가 들어가고 GC주입구의 고온으로 열탈착 후 분리하였다. 동일 조건에서 교반을 실시하며 실험을 행하였다. 온도조건은 40, 50, 60, 80, 100°C이고, 시간은 20, 40, 60, 80, 100, 120분이며, N₂가스의 유량은 분당 20, 40, 60, 80, 100ml로 각각 구분하여 향기성분을 포집한 다음 GC분석에 의해 얻어진 peak area에 의해 SPME의 최적 포집조건을 설정하였다. 이때 사용된 SPME fiber는 polydimethylsiloxane coating (100 μ m coating thickness, Supelco Co., USA)였다. 이상의 조건으로 3회 반복 실험하였다.

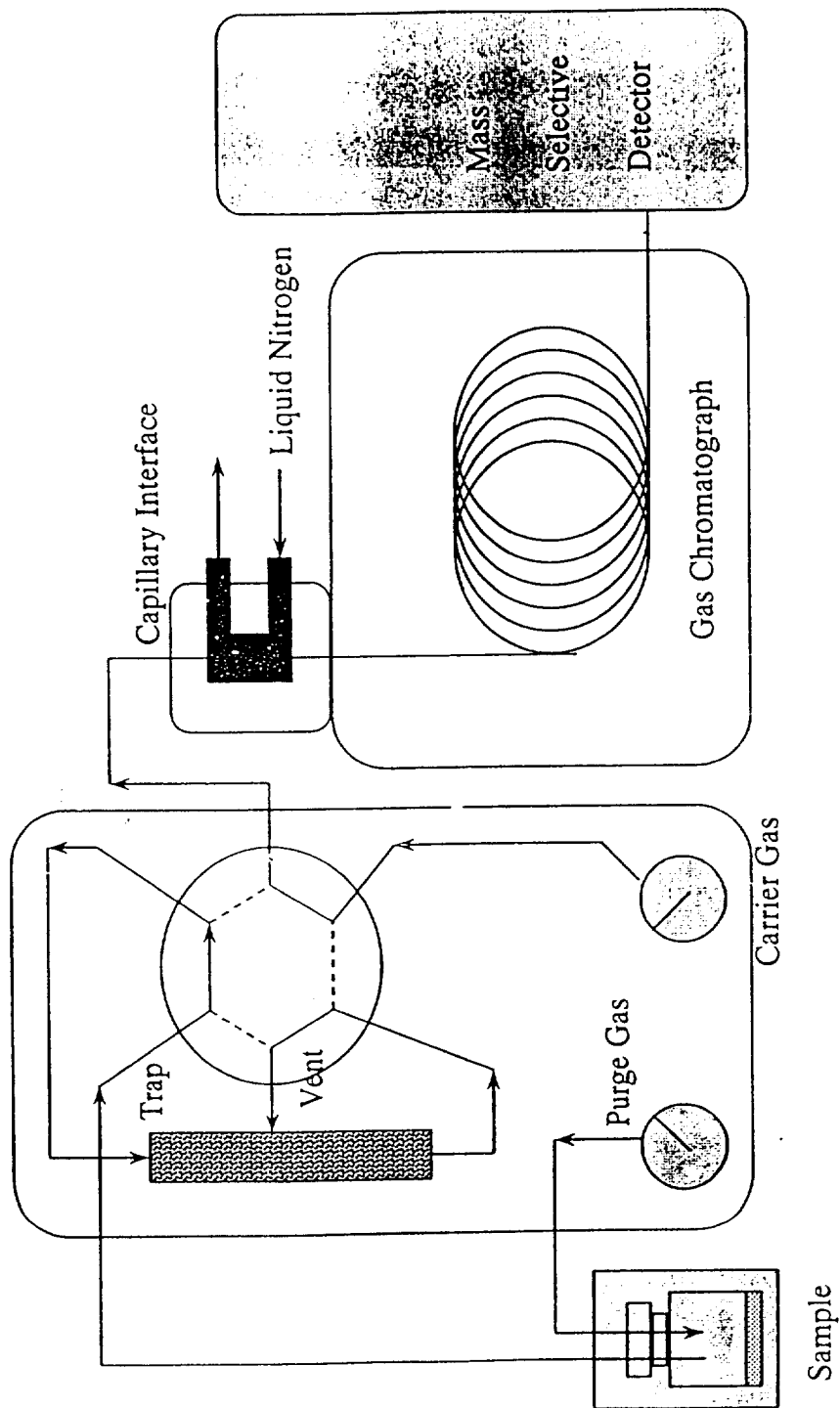


Fig. 1. Diagram of purge & trap with gas chromatography.

Table 3. The operating condition of dynamic headspace sampler for flavor analysis

Items	Conditions	Items	Conditions
Sample Heater	ON	Desorb Time	4.00min
PrePurge Time	0.00min	Desorb Temp	160°C
PreHeat Time	0.1min	Sample Drain	OFF
Sample Temp	60°C	Bake Time	10.00min
Purge Time	60min	Bake Temp	225°C
DryPurge Time	10min	BGB On Delay	0.00
GC Start	DesEnd	MCS Bake Temp	100°C
Cryo Focuser	ON	Line Temp	160°C
GC Cycle Time	0.00min	Valve Temp	160°C
Cryo Standby	160°C	Mount Temp	100°C
CryoFocus Temp	-120°C	MCS Line Temp	100°C
Inject Time *	1.00min	PurgeRdy Temp	35°C
Cryo Inj Temp	180°C	Purge Temp	35°C
Desorb Preheat	155°C	Turbocool Temp	30°C

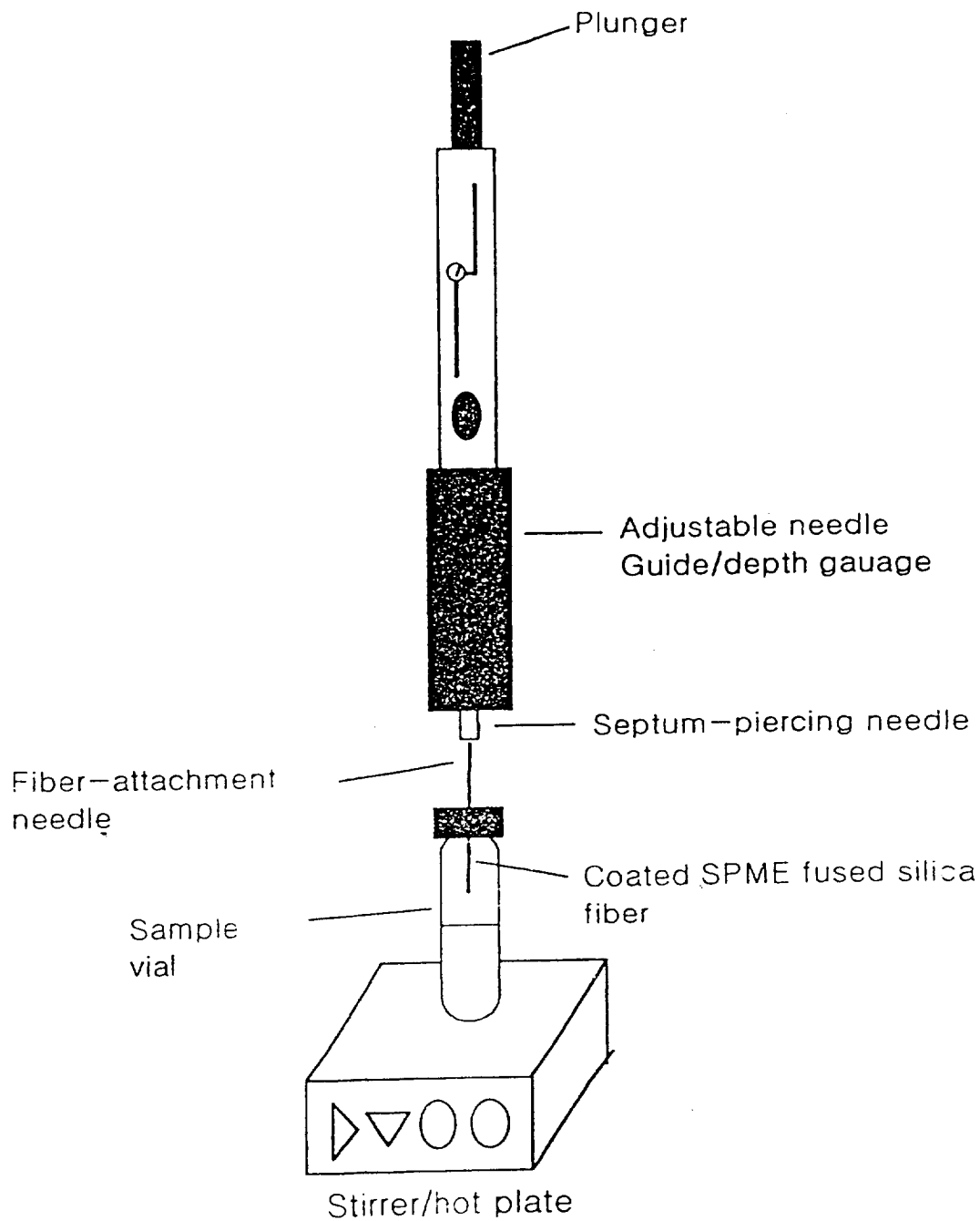


Fig. 2. Solid phase microextraction procedure.

2.2.3 Gas chromatography-flame ionization detector에 의한 분석

SPME법으로 휘발성 성분을 needle 부위에 흡착시킨 후, 다음의 GC조건으로 분리하였다. GC오븐의 온도 조건은 초기온도 50℃에서 3℃/min의 속도로 증가하다가 240℃에서 20분간 머무른 다음 작동이 멈춘다. Column은 polar성을 가진 HP-INNOWax(30m×0.25mmI.D.×0.25 μ m film thickness)를 사용하였다. 이 때, carrier gas의 유속은 5ml/min 이었다.

2.3 GC-mass selective detector에 의한 휘발성 성분의 동정

GC의 주입부에 주입된 총 휘발성 성분은 GC-MSD에 의해 분리·동정하였고 GC(HP-5890 plus, Hewlett Packard Co., U.S.A)와 MSD(HP-5972, Hewlett Packard Co., U.S.A)의 작동 조건은 Table 3에 나타내었다.

2.4 통계 처리

통계적인 접근을 위해 최적화 추적에서 요인분석 실험은 SAS(statistical analysis system) program(SAS Institute Inc., U.S.A)을 이용하였다. 향기성분 포집에 영향을 미치는 흡착온도와 흡착시간 그리고 질소가스의 유속을 실험적 변수로 두었다.

요인분석 실험 design은 최적이라고 추정되는 지점을 기준점으로 동일한 범위의 range로 상위와 하위로 배열하여 능선분석(ridge of maximum response)을 수행하여 최적점이 산출되는 그래프를 설정한다.

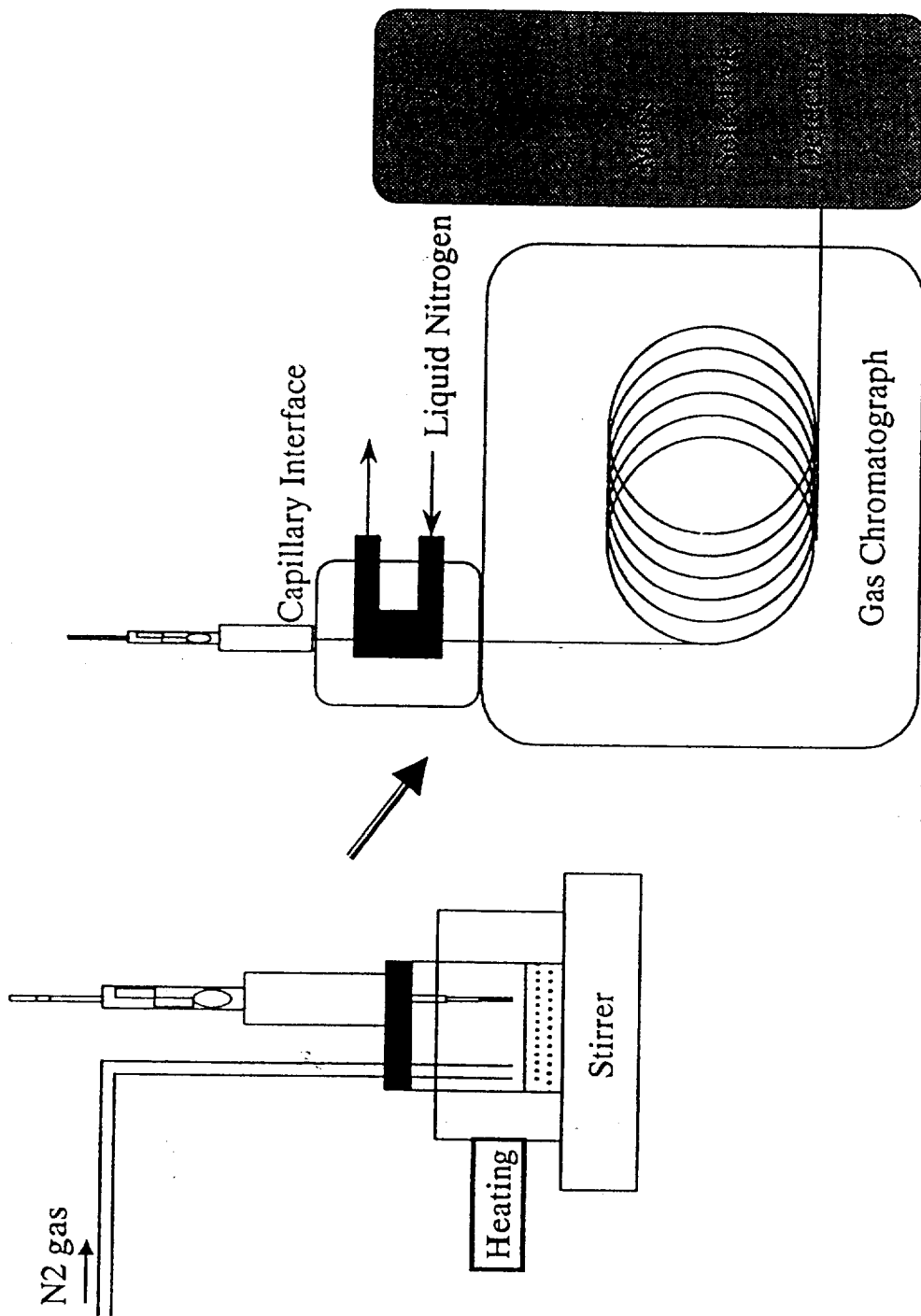


Fig. 3. Diagram of SPME with gas chromatography.

Table 4. GC-MS conditions for flavor analysis

Items	Conditions
Column	HP-INNOWax(Crosslinked Polyethylene Glycol), 30m × 0.25mm × 0.25 μ m
Carrier gas	He, 1ml/min.
Heated zones	Purge off time : 0.00min Initial temp : 30 $^{\circ}$ C Initial time : 5min Rate : 3 $^{\circ}$ C/min Final temp : 200 $^{\circ}$ C Final time : 5min Total time : 66.7min
Inj. port temp	180 $^{\circ}$ C
Det. port temp	230 $^{\circ}$ C
Mass range	33.0-300.0m/z
Ion voltage	70eV
Mass spectrum library	Willey/NBS

결과 및 고찰

1. 일반 성분 및 HMF 함량 분석

벌꿀의 수분함량은 기후, 채밀의 시기, 채취후의 보존 등 여러 요인의 영향을 받으나 한편 발효를 유발시키는 원인이 되므로 양호한 품질 보존을 위하여 18-21% 이하가 요망된다. 본 연구에서의 수분함량은 18-21%로서 토종꿀과 밀감꿀이 각각 18.0, 20.5%로 비교적 수분을 적게 함유한 것으로 나타났다. 밤꿀과 아카시아 꿀은 각각 21.0, 25.0%로서 미국 F.D.A 규제 한계인 25%에는 적합하나 Codex 및 국내 식품, 첨가물 규격 기준인 21%를 초과하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 채밀시의 기후, 시기 등이 불량한 조건에서 행한 것이 원인인 듯하다.

벌꿀은 주로 단당류로 이루어져 있고 산성이기 때문에 열을 가하든가 장시간 저장하게 되면 fructose와 같은 hexose로부터 탈수 반응이 일어나 HMF가 생성된다. 그러나, HMF함량이 40 mg/kg 이상으로 높은 수치를 나타내는 벌꿀은 열처리 하였거나 HMF함량이 높은 산분해당을 첨가한 것으로 연구결과 밝혀진바 있다. 본 실험에서는 HMF함량을 측정한 결과, 모두 40mg/kg 이하로서 열처리 되지 않은 신선한 꿀임을 확인하였다. 그 결과는 Table 5에 나타내었다.

벌꿀은 자연 식품 중에서 가장 복잡한 당 혼합물로서 glucose와 fructose가 주성분인데, HPLC를 이용하여 토종꿀에 함유된 이들의 함량을 분석한 결과는 Table 6과 같다. 총시료의 결과 범위는 fructose 29.2-38.7%, glucose 21.3-28.7%로 시료간의 차이를 나타내었다. White(1984) 등은 꿀 중의 유리당 함량을 fructose 35.1-38.3%, glucose 23.1-33.6%으로 보고하였으며, Chang(1987) 등은 fructose 29.4-41.4%, glucose 25.9-42.2%의 결과를 보인 바 본 실험 결과와 비슷한 것으로 나타났다. 벌꿀의 결정화에 미치는 원인으로는 fructose와 glucose의 비가 클수록 그 속도가 느려진다고 보고되었다. 이에 비추어 볼 때, 아카시아꿀의 결정화 속도가 비교적 느릴 것으로 추정된다.

Table 5. Contents of moisture and hydroxymethyl furfural in honey samples

Honeys	Moisture(%)	HMF(mg/kg)
Acacia	25.0	14.2
Chestnut	21.0	8.5
Native-bee	18.0	13.1
Tangerine	20.5	18.0

Table 6. Composition of fructose, glucose and sucrose in honey samples (unit: %, w/w)

Honeys	Fructose	Glucose	Sucrose	F/G ¹⁾
Acacia	38.70	24.81	1.80	1.56
Chestnut	30.80	23.51	3.00	1.31
Native-bee	29.20	21.31	2.20	1.37
Tangerine	35.30	28.70	3.20	1.23

¹⁾Fructose/Glucose ratio

2. Purge and Trap 장치를 이용한 휘발성 성분 분석

2.1 벌꿀의 종류에 따른 휘발성 성분 분석

신선한 꿀 4종류, 아카시아꿀과 밤꿀, 토종꿀, 그리고 밀감꿀의 휘발성 성분을 분리 및 동정을 하였다. 결과는 Fig. 4-5와 Table 7에 나타내었다. Fig. 4-5를 보면, 4가지의 벌꿀 중에 밤꿀의 휘발성 성분이 가장 많은 것을 알 수 있었다. 다음은 토종꿀이었고, 아카시아꿀과 밀감꿀은 우위를 가리기 힘들었다. 마찬가지로, Table 8의 결과에서도 밤꿀의 휘발성 성분의 종류가 36개로 가장 많은 것으로 나타났다. 나머지 아카시아꿀과 토종꿀, 밀감꿀에서는 각각 23개, 19개, 19개로 비슷한 개수를 나타냈다. 그 성분들을 살펴보면, 아카시아꿀에서는 ethanol이 가장 많았고, 다음 2-methyl-1-propanol과 acetaldehyde가 차지하였으며, 밤꿀에서는 benzene 성분의 양이 다른 어떤 성분보다도 특히나 많은 것으로 나타났고, 그 절반가량의 hexane도 포함하고 있었으며, acetone, 2,3-butanedione이었으며, 토종꿀은 아카시아꿀과 마찬가지로 ethanol 성분이 가장 많았고, ethyl acetate, 2-methyl-1-propanol, 마지막으로 밀감꿀은 octane, benzene, 2,3-butanedione의 순이었다. 그리고, 각각의 꿀은 벌에 의해 채취된 밀원이 다 다르기 때문에 Table 7에 정리한 총 45가지의 휘발성 성분들 중 4종류의 벌꿀이 다 같이 함유하고 있는 성분들은 총 10가지로, hexane, octane, acetone, ethyl acetate, 2,4-dimethyl-heptane, benzene, 2,3-butanedione, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, 3-methyl-1-butanol 등이 그것이다. 이들은 그 함량 또한 높은 것으로 나타나 어느 정도의 일관성을 보였다. 하지만, 이 10개의 성분들간의 조성은 일정하지 않은 것으로 관찰되었다. 특이한 것은 나머지 3종의 벌꿀에서는 ethanol 성분이 높은 함량을 차지한 것으로 나타났었는데, 밀감꿀에서는 전혀 나타나질 않았다.

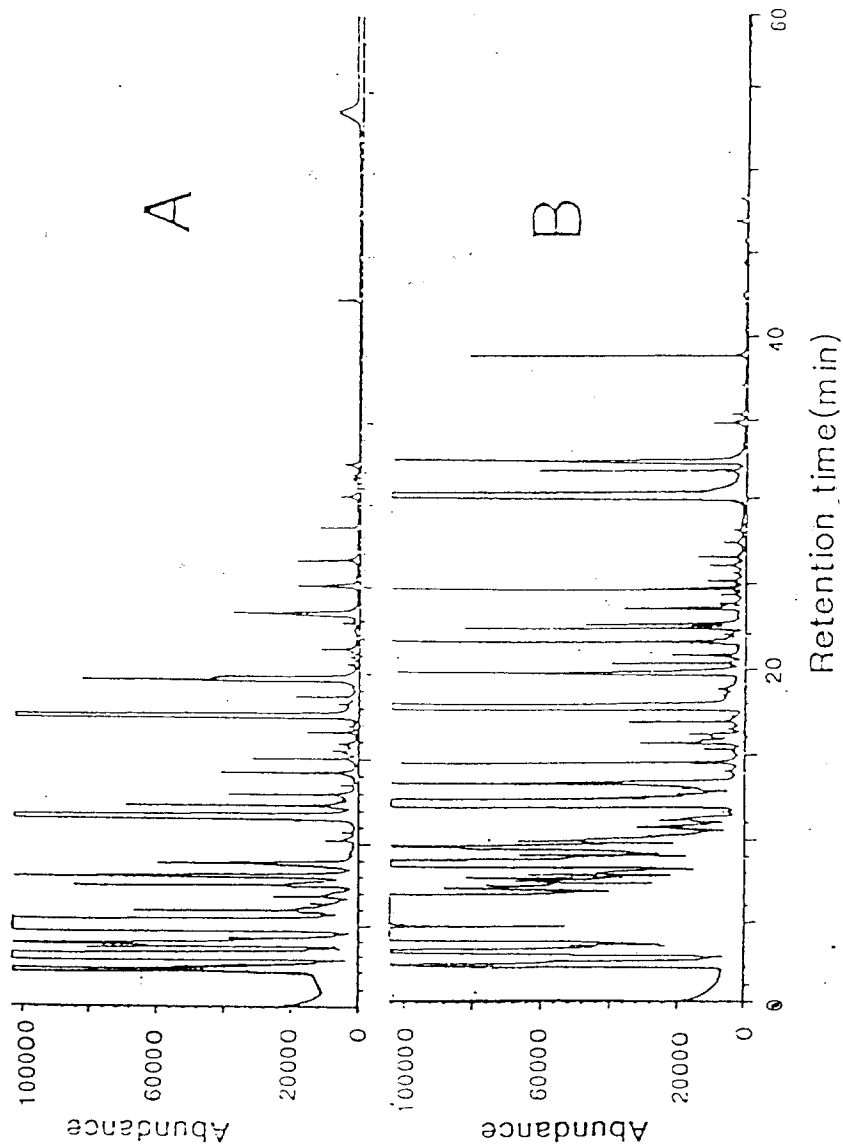


Fig. 4. Total ion chromatograms of volatile compounds separated from honeys by purge & trap concentrator.

A. Acacia honey B. Chestnut honey

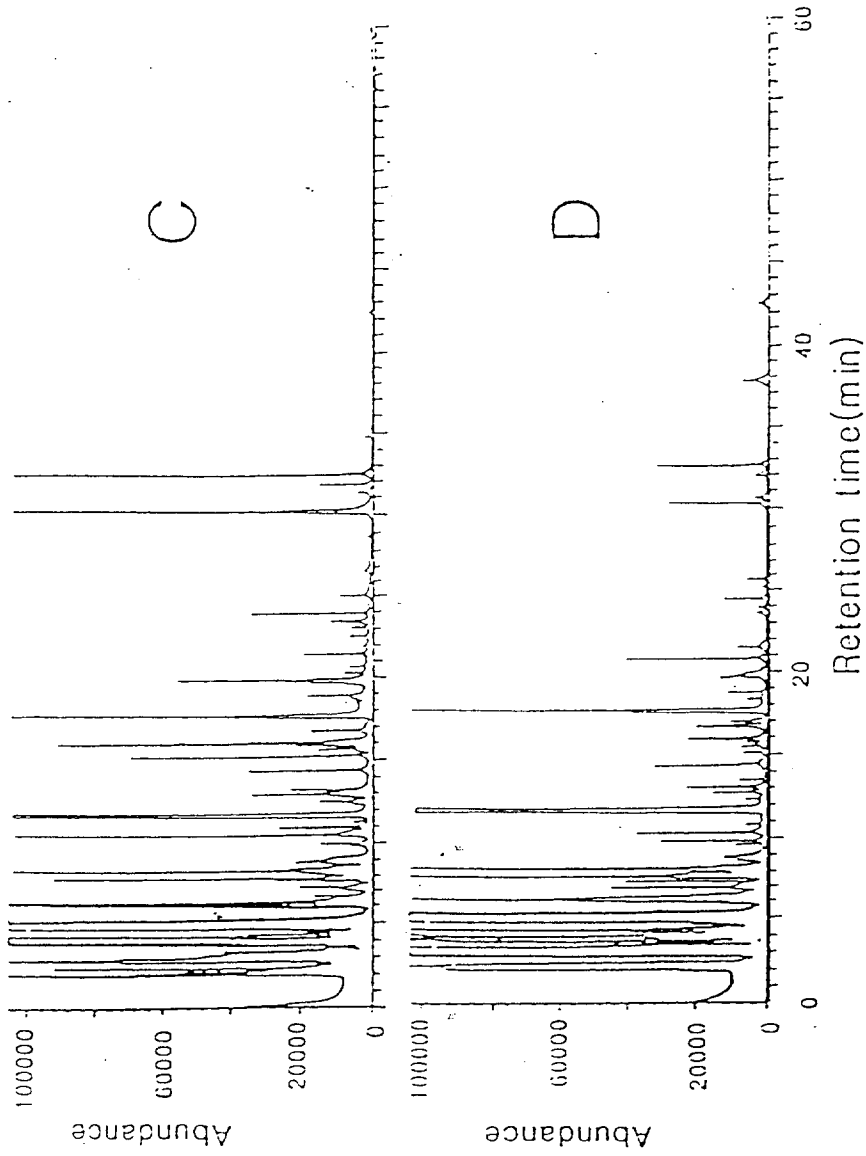


Fig. 5. Total ion chromatograms of volatile compounds separated from honeys by purge & trap concentrator.

C. Native-bee honey

D. Tangerin honey

Table 7. Comparisons of volatile compounds identified from honeys

Chemical names ¹⁾	RT ²⁾	(unit: peak area × 10 ⁶)			
		Acacia	Chestnut	Native-bee	Tangerine
Pentane	1.8	- ³⁾	0.3	0.8	0.2
Hexane	2.0	16.7	279.2	13.8	22.6
Ether	2.2	8.3	-	7.5	8.3
Acetaldehyde	2.3	52.7	-	-	-
Cyclohexane	2.3	-	3.9	-	3.3
Octane	2.8	18.9	21.8	11.9	35.0
Acetone	2.9	46.4	41.4	11.2	5.7
Ethyl acetate	3.7	22.6	8.5	22.9	8.9
2,4-Dimethyl-heptane	3.9	1.5	6.3	4.0	6.7
2-Butanone	3.9	14.7	-	-	-
2-Methyl-butanal	4.2	-	5.2	4.3	-
3-Methyl-butanal	4.3	1.5	9.4	7.7	-
Benzene	4.6	32.1	567.5	8.6	29.7
Ethanol	5.0	345.2	16.2	160.0	-
2,3-Butanedione	6.0	3.3	41.4	8.8	27.1
Decane	6.1	-	7.2	-	2.0
2-Anthracenamine	6.8	19.5	-	12.9	7.9
2,2-Dimethyl-heptane	8.0	-	11.5	-	-
1-Propanol	8.7	-	1.6	-	-
Hexanal	9.9	-	3.2	-	2.3
Undecane	10.4	1.4	1.6	-	-
2-Methyl-1-propanol	11.8	55.9	10.9	16.4	15.0
Ethyl benzene	12.0	-	1.9	-	-
1-Butanol	13.2	2.0	2.5	1.8	1.8

continued to next page

Continued

2-Pentanol	14.2	-	0.9	-	-	-
1,3-Dimethyl-benzene	15.2	-	1.3	-	-	-
1,2-Dimethyl-benzene	15.4	-	1.6	-	-	-
2-Heptanone	15.7	-	2.5	-	-	-
Heptanal	15.8	-	4.4	-	-	-
2-Pentenal	16.3	0.8	0.8	-	-	-
3-Methyl-3-butenal	16.7	-	1.5	-	-	-
3-Methyl-1-butanol	17.6	42.0	21.8	13.7	-	1.3
Styrene	19.3	-	3.3	-	-	0.5
3-Methyl-3-buten-1-one	19.7	7.1	6.1	-	-	-
1-Ethyl-3-methyl-benzene	20.3	-	0.4	-	-	-
1,2,3-Trimethyl-benzene	20.5	-	1.6	-	-	-
2-Hydroxy-2-butanone	21.5	-	1.9	-	-	-
1-Pentanol	22.2	-	-	2.1	-	-
2-Methyl-2-buten-1-ol	23.4	-	3.6	-	-	-
3-Hydroxy-2-but-1-ol	23.5	3.1	-	2.1	-	-
1-Hexanol	24.8	1.8	-	-	-	-
3-Hexen-1-ol	26.3	1.3	-	-	-	-
2-Furancarboxaldehyde	29.9	-	2.2	-	-	1.3
Acetic acid	31.0	2.8	-	5.2	-	-
Benzaldehyde	32.4	-	2.2	-	-	1.8

¹⁾ Chemical names stand for the compound identified tentatively by MS only.

²⁾ RT means retention time.

³⁾ "-" means that the peak area is not detected or less than 1.0×10^6 .

2.2 벌꿀의 저장기간에 따른 휘발성 성분 분석

벌꿀의 저장기간에 따른 휘발성 성분의 차이를 알아보기 위하여, 97년, 98년 산인 벌꿀 두 종을 가지고, 실험하였다. 즉, 97년도산은 저장한지 2년 된 꿀이고, 98년도산은 저장 1년 된 것으로 규명하였다. 그 결과는 Fig. 6과 Table 8에 나타내었다. 가스 크로마토그램에서 한 눈에 알아볼 수 있듯이 저장 시간에 대해 많은 차이를 나타내고 있었다. Table 8을 살펴보면, 저장 1년 된 것에서는 많은 양을 드러내던 성분들이 저장 2년 된 것의 분석결과에서는 전혀 나타나지 않는다면, 그 양이 확연히 줄어든 것을 보였다. 또, 저장 기간의 연장에 맞추어 그 양이 많게는 100배 가량 늘어난 것도 확인할 수 있었다. 분리된 성분들을 대략 간추려 보면, 1년 저장한 벌꿀에서는 alcohol류가 10개, alkane류가 8개, aldehyde류가 8개, benzene류가 6개로 총 43종의 성분들을 확인했다. 이들 중 hexane, octane, acetone, benzene, 2,3-butanedione, 3-methyl-1-butanol이 주된 성분으로 나타났다. 이에 반해, 2년 저장한 벌꿀에서는 분석된 휘발성 성분 중 역시 alcohol류가 8개로 가장 많은 것으로 나타났고, 다음은 benzene류가 5개, aldehyde류가 3개, alkane류가 2개로 총 22종이 확인되어 저장 1년된 벌꿀의 반이 소실되었거나, 다른 성분으로 변환된 것으로 생각된다. 주된 성분을 살펴보면, ethyl acetate, 3-methyl butanal, ethanol, 1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 2-furancarboxaldehyde들로 집중된 것을 알 수 있었다. 이러한 성분들은 1년 저장한 벌꿀에서도 나타났었는데, 그 양을 비교해 보면, 적게는 10에서 많게는 100배가량 그 양이 늘어난 것으로 확인되었다. 하지만, benzene의 경우는 반대로 1년된 벌꿀보다 약 37배 가량 그 휘발성 성분의 양이 줄어든 것으로 나타났다.

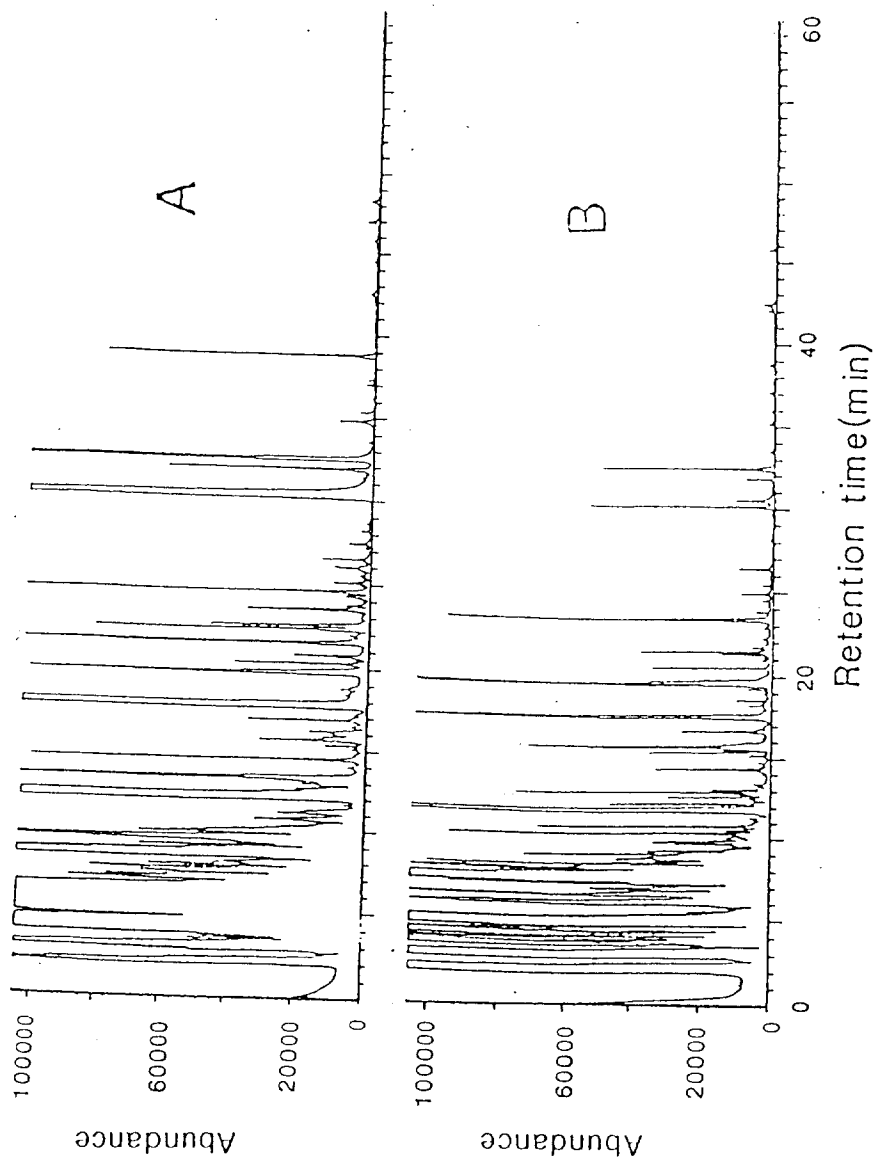


Fig. 6. Total ion chromatograms of volatile compounds separated from chestnut by purge & trap concentrator.

A is the chestnut honey stored for one year

B is the chestnut honey stored for two years

Table 8. Comparisons of volatile compounds identified from chestnut honeys for storage periods

(unit: peak area $\times 10^6$)

Chemical names ¹⁾	RT ²⁾	1 year	2 years
Pentane	1.8	0.3	- ³⁾
Hexane	1.9	279.2	9.9
2-Methyl-1-butanol	2.2	8.0	-
Ether	2.2	-	17.3
Cyclohexane	2.3	3.9	-
2-Methyl propanal	2.8	-	5.8
Octane	2.8	21.8	-
Acetone	3.2	41.4	-
Carbon tetrachloride	3.5	5.9	-
Ethyl acetate	3.7	8.5	80.7
2-Butanone	3.9	6.3	-
2-Methyl-butanal	4.1	5.2	-
3-Methyl-butanal	4.2	9.4	28.4
Benzene	4.6	567.5	15.6
Ethanol	5.0	16.2	1261.3
2,3-Butanedione	5.8	41.4	-
Decane	6.1	7.2	10.3
2,2-Dimethyl-heptane	8.0	11.5	-
2-Methyl-3-buten-ol	8.3	3.5	-
2-Butanol	8.6	-	11.2
1-Propanol	8.7	1.6	24.5
3,8-Dimethyl-undecane	9.1	3.8	-
2,2,4-Trimethyl-heptane	9.3	2.0	-
Butylester acetic acid	9.6	0.5	-
Hexanal	10.0	3.2	-
Hexanone	10.0	-	9.4
Undecane	11.2	1.6	-
2-Methyl-1-propanol	11.6	10.9	164.3
Ethyl benzene	12.0	1.9	1.1
p-Xylene	12.6	1.5	-
1-Butanol	13.2	2.5	4.3

continued to next page

Continued

2-Pentanol	14.2	0.9	-
1,2-Dimethyl-benzene	15.2	1.6	1.7
1,3-Dimethyl-benzene	15.4	2.7	4.3
2-Heptanone	15.7	2.5	-
Heptanal	15.8	4.4	-
(E)-2-Pentenal	16.3	0.8	-
3-Methyl-3-butenal	16.7	1.5	-
3-Methyl-1-butanol	17.6	21.8	75.0
Styrene	19.3	3.3	2.2
3-Methyl-3-buten-1-ol	19.7	6.1	3.4
1-Ethyl-3-methyl-benzene	20.3	0.4	-
1,2,3-Trimethyl-benzene	20.5	1.6	1.5
Octanal	21.3	0.8	-
2-Hydroxy-2-butanone	21.5	1.9	-
2-Methyl-butene-1-ol	23.4	3.6	2.9
2-Furancarboxaldehyde	29.9	2.2	193.4

¹⁾ Chemical names stand for the compound identified tentatively by MS only.

²⁾ RT means retention time.

³⁾ "-" means that the peak area is not detected or less than 1.0×10^6 .

2.3 아카시아 꿀의 가공 공정 중에 생긴 변화 고찰

아카시아 꿀을 가공하는 중간에 탈수되어 나온 것으로 생각되어지는 수용층에서 아카시아 꿀의 향기를 배어 있어 본 꿀과의 차이와 어떠한 성분이 함유되어 있는지 알아보았다. 그 결과는 Fig. 7과 Table 9에 나타내었다. 가스 크로마토그램에서 볼 수 있듯이, 아카시아 꿀의 결과는 수용층에 비해 여러개의 peak로 나누어져 나타난 데 반해 수용층의 경우에는 낮은 온도의 비점을 가지고 있는 성분들이 그리고, 물에 쉬이 녹는 성분들을 중심으로 그 양 또한 집중되어진 것으로 생각되었다. 분석 및 동정된 성분들을 살펴보면, 먼저, 벌꿀에서는 alcohol류가 9개로 가장 많이 나타났고, alkane류 3개, aldehyde류 2개, acid류 2개로 확인되었으며, 탈수되어진 수용층에서는 역시 alcohol류가 8개로 그 중에 가장 많은 성분을 차지하였으며, alkane류 2개, acid류 1개로 확인되었다. 아카시아 벌꿀의 주된 성분으로는 ethanol, 2-methyl-1-propanol, acetaldehyde, 2-methyl-1-butanol 순으로 나타났으며, 수용층에서는 ethanol이 벌꿀에서보다 약 4배가량 더 많은 양을 함유한 것으로 나타났고, 다음 2-methyl-1-propanol, ethyl acetate, bezene, 2-butanol 순으로 나타났다. 이처럼 수용층에서 함유하고 있는 성분들은 벌꿀이 시간이 지남에 따라 잃어버리는 향기 성분을 대표하는 것으로 추정되어지는데, 경과시간에 따라 휘발되어지는 이러한 성분들을 벌꿀이 더 오래 간직할 수 있다면, 그 품질을 높이는 좋은 본보기가 될 것으로 생각된다.

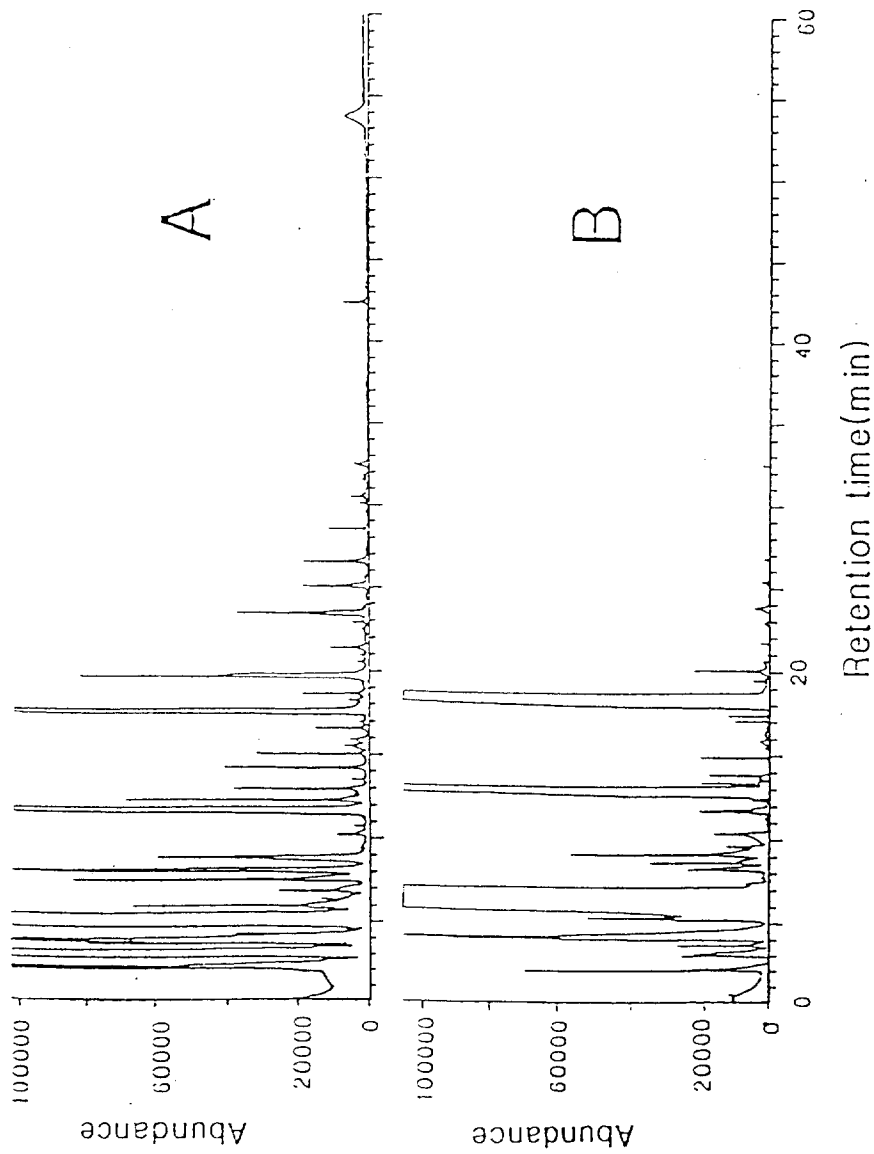


Fig. 7. Total ion chromatograms of volatile compounds separated from acacia honey and water extraction by purge & trap concentrator.

- A. Acacia honey
- B. Water formed in processing from acacia honey

Table 9. Volatile compounds identified from acacia honeys and aqueous solution in honey processing

(unit: peak area $\times 10^6$)

Chemical names ¹⁾	RT ²⁾	Acacia	Aqueous
Hexane	1.9	16.7	- ³⁾
Ether	2.2	8.3	17.0
Acetaldehyde	2.3	52.7	-
Octane	2.8	18.9	-
Ethyl acetate	3.7	22.6	281.2
2,4-Dimethyl-heptane	3.9	14.7	-
3-Methyl-butanal	4.3	1.5	5.3
Benzene	4.6	32.1	51.8
Ethanol	4.8	345.2	1370.2
2,3-Butanedione	6.0	3.3	-
Undecane	10.4	1.4	-
2-Methyl-1-propanol	11.8	55.9	438.6
p-Xylene	13.7	-	2.6
1,3-Dimethyl-benzene	14.4	1.1	-
1-Butanol	14.6	2.0	9.8
2-Butanol	14.9	-	48.3
1-Penten-3-ol	15.0	1.6	-
2-Pentanol	16.6	0.8	-
3-Pentanol	17.4	-	10.2
2-Methyl-1-butanol	17.6	42.0	-
3-Methyl-2-butanol	17.9	-	7.9
3-Methyl-3-buten-1-ol	19.7	7.1	6.1
3-Hydroxy-2-buten-1-ol	23.5	3.1	-
1-Hexanol	24.8	1.8	2.1
Acetic acid	30.4	2.8	-
Benzaldehyde	32.5	-	1.6

¹⁾ Chemical names stand for the compound identified tentatively by MS only.

²⁾ RT means retention time.

³⁾ - means that the peak area is not detected or less than 1.0×10^6 .

3. SPME를 이용한 휘발성 성분 추출 및 분석

3.1 벌꿀 휘발성 성분의 최적화 분석

SPME를 이용하여 벌꿀의 향기성분 분석의 최적화 조건을 알아보기 위해서 흡착온도와 흡착시간 그리고 이동기체(N_2)의 유속 이 세 가지 인자에 대한 향기성분의 분석을 실시하였다.

온도에 관한 조건을 알아보기 위해서 흡착 온도를 40°C부터 10°C간격으로 100°C까지 승온시키면서 향기성분의 변화를 알아보았다. Fig. 8에서 나타낸 것처럼 흡착온도가 초기 40°C부터 60°C까지는 향기성분의 양이 서서히 증가함을 보이다가 60°C 이후부터는 향기성분의 증가비율이 완만함을 알 수 있었다. 이 결과로 추론해 본 결과 SPME를 이용한 흡착온도의 최적온도는 60°C인 것으로 판단하였다. Fig. 9에서는 흡착시간에 대한 최적화 곡선을 나타내었다. 흡착시간을 20분에서 10분 간격으로 120분까지의 시간의 증가 범위에서의 향기성분의 변화를 알아보았다. 흡착시간이 40분까지는 향기성분의 변화가 증가함을 알 수 있었다. 40분 이후에서부터 60분 사이에서는 약간 줄어드는 것을 제외하고는 대체적으로 평이한 곡선을 나타내었다. 40분 이상의 흡착시간에 대한 향기성분의 증가는 거의 나타나지 않았다. Fig. 9에서의 추론결과 SPME의 최적 흡착시간은 40분이라는 것을 알 수 있었다. Fig. 10은 SPME에 대한 이동기체(N_2)에 대한 흐름속도를 나타내었다. 기체의 흐름속도를 높임에 따라서 향기성분의 양이 증가한다는 것을 알 수 있었다. 이동 기체를 흘려 보내기 전부터 시작해서 40ml/min의 유속조건까지는 서서히 증가함을 보였던 반면에 60ml/min에서는 급작스런 향기성분의 증가를 알 수 있었으나, 오히려 60ml/min 이후에서는 이전보다 향기성분의 양이 서서히 감소하는 추세를 보인다는 것을 알 수 있었다. 이로써 Fig. 10에서의 추론결과 SPME의 이동기체

통과량은 60ml/min가 가장 최적조건이라고 판단하였다. 위의 결과를 판단해 보건데 흡착온도와 흡착시간의 결과는 온도나 시간을 증가시켜도 서서히 증가하거나 거의 증가하지 않는 추세를 보이거나 이동기체의 통과량은 최적조건을 넘어서면 다른 조건과는 달리 이전의 결과보다 오히려 감소하는 추세를 보인다는 것을 알 수 있었다. 이로써 위의 Fig. 8, 9, 10의 결과를 종합해 볼 때 SPME를 이용한 벌꿀의 최적 흡착 온도와 시간 그리고 이동기체의 유속은 60°C에서 40분간 흡착하고 유속을 60ml/min 조건 하에서 기체를 흘려보내며 향기성분을 포집한 후 측정하는 것이 최적 조건이라는 것을 알 수 있었다.

3.2 반응 표면 분석법을 이용한 최적화 결정

3.2.1 3³ 요인분석 실험법

통계적인 접근을 위해서 최적화 추적에서 요인분석 실험법을 인용하였다. 요인분석 실험 design은 최적이라고 추정되는 지점을 기준점으로 동일한 범위의 range로 상위와 하위로 배열하여 최적점이 산출되는 그래프를 설정한다. T 흡착온도와 흡착시간 그리고 질소가스의 유속의 실험적 최적점을 두고 흡착온도의 경우 30°C, 흡착시간의 경우 40min 그리고 질소가스의 유속의 경우 40mL/min로 설정하여 결과를 배열하였다. 요인에 대한 영향은 반응 표면 분석법에서 구체적으로 다루기로 한다.

3.2.2 SAS의 반응표면 분석법

SAS에서 나타나는 ANOVA table에 의하면 유속의 F-ratio가 56.197이며 흡착온도가 16.255, 흡착시간 조건이 2.809로 유속이 가장 기여도가 높으며 그 다음이 흡착온도이며 흡착시간이 가장 기여도가 낮은 factor로 인지되어진다.

하지만 F에 대한 probability가 흡착온도와 유속에 있어서 0으로 나오기 때문에 흡착온도 조건과 유속 조건은 그리 큰 차이를 보이지는 않는 것으로 보인다. 반응표면 분석법에 의한 회귀 곡선을 그렸을 때 r^2 값이 0.9462일 때 다음의 식에서 최적화 되어진다.

$$y = 0.028696 + 0.008761x_1 - 0.001406x_2 + 0.033212x_3 - 0.000036420x_1^2 + 0.000015972x_2^2 - 0.000298x_3^2 - 6.16791 \cdot 10^{-19}x_1x_2 + 0.000020139x_1x_3 + 0.000015104x_2x_3$$

흡착온도의 조건을 고정하였을 경우, 반응시간과 유속의 상호 반응표면 분석 그래프를 보면 유속의 경우 포물선을 그리는 linear data를 보이고 있어서 최적점 산출이 가능하지만 흡착시간의 경우 계속적인 증가 곡선에서 안정되는 경향을 보이고 있기 때문에 경향 분석을 통하여 정하여진 range에서 추적된 값이 최적점으로 나타나게 되는 형의 곡면(angle)을 나타내고 있다. 흡착시간 고정의 경우에도 흡착온도 고정의 경우와 유사한 경향을 보이게 되지만 흡착 온도 factor의 증가 경향이 흡착시간 보다는 두드러지게 나타나지만 그다지 포물선 형이 되지 않는 형태의 그래프를 보인다. 이는 유속 고정상의 반응 표면 분석 그래프에서 드러나는데 흡착온도와 흡착시간이 일정적으로 계속 증가하여 안정화 되는 경향이다. 3가지 요인 중에서 두가지 요인이 상승 안정되는 경향이므로 3가지에 대한 반응 표면 분석은 실험적인 범위 (coded range)에서 벗어난 계산 영역에서 최적화되어지는 것으로 추적되었는데 그 값은 137.1℃에서 15.3 min에서 60.8 mL/min에서 1.63의 peak area의 최적화 값을 가진다.

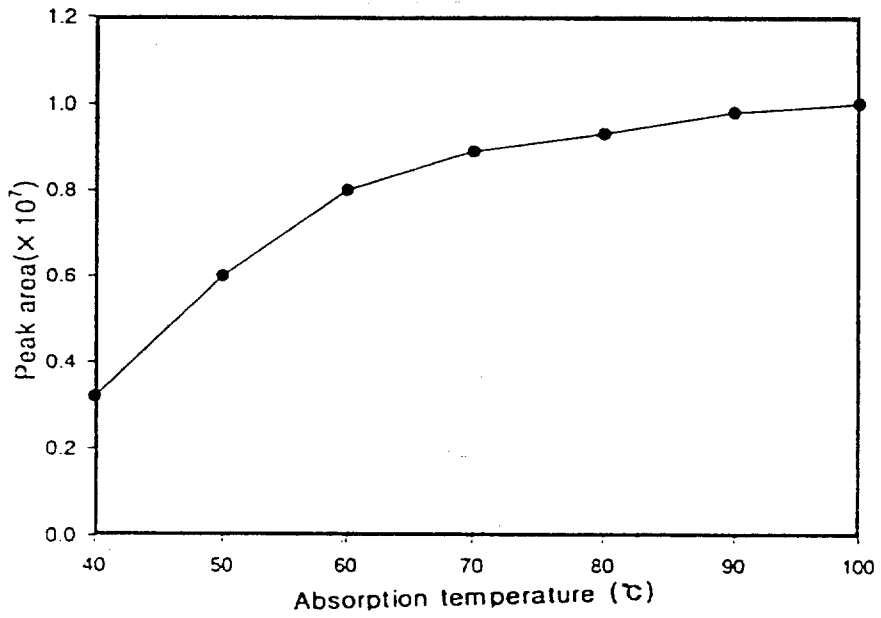


Fig. 8. Optimization by SPME on the absorption temperature in the headspace analysis

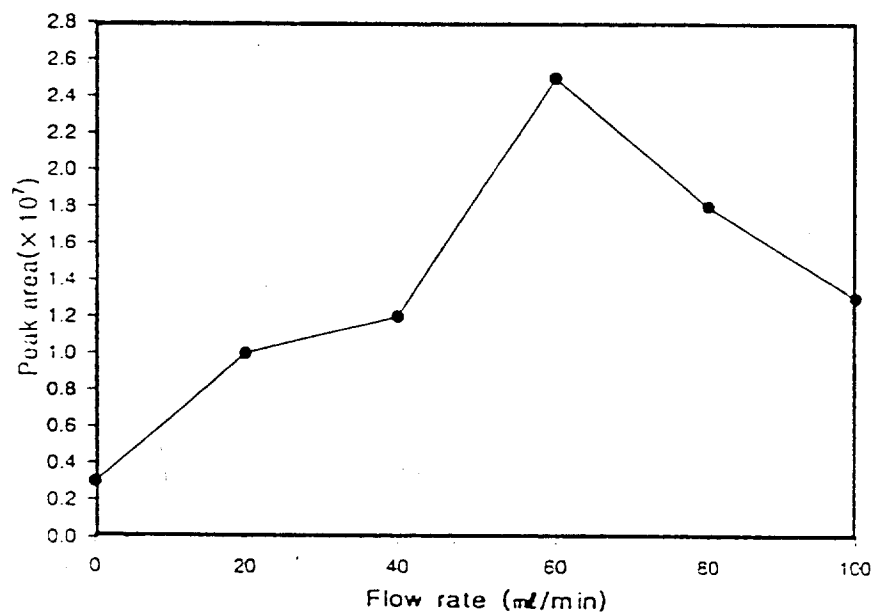


Fig. 9. Optimization by SPME on the absorption time in the headspace analysis

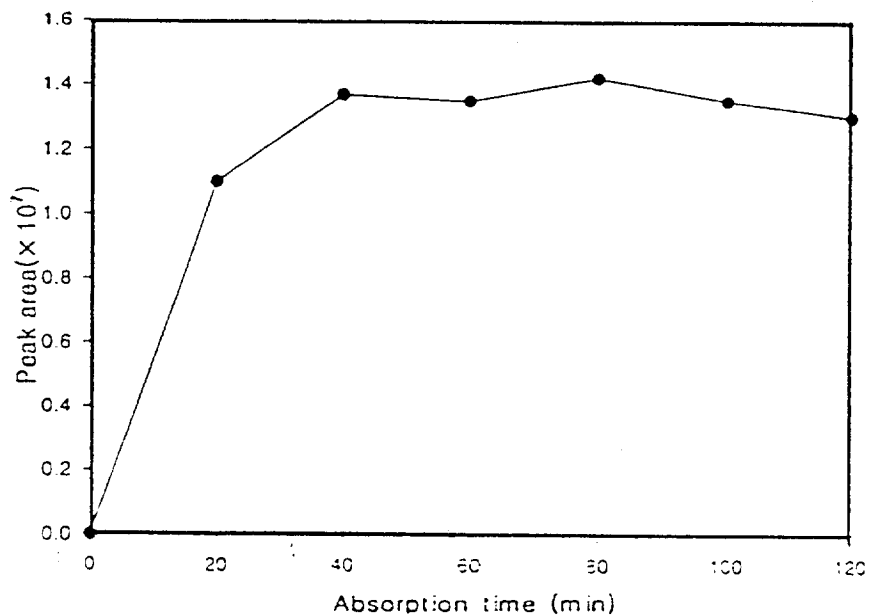
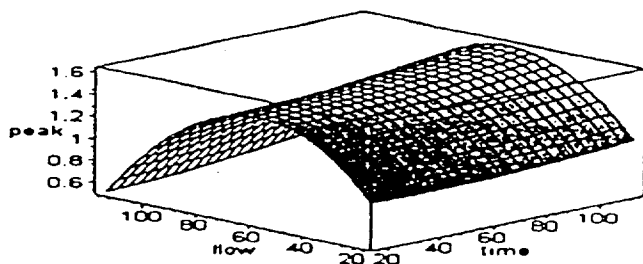
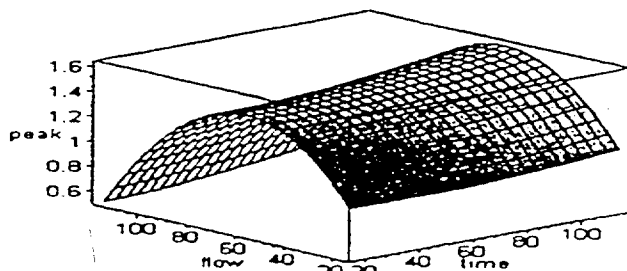


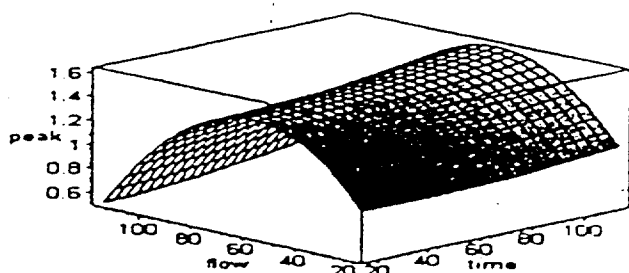
Fig. 10. Optimization by SPME on the flow rate in the headspace analysis



(A)

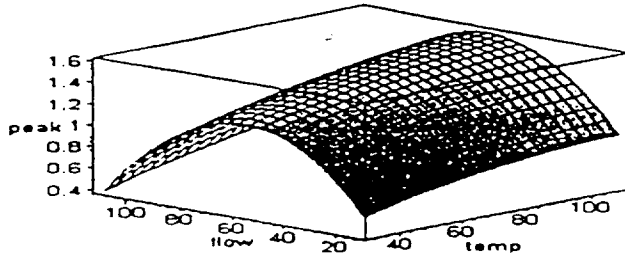


(B)

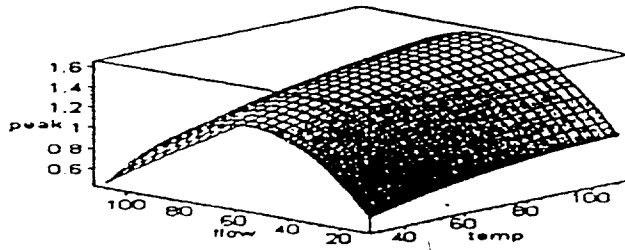


(C)

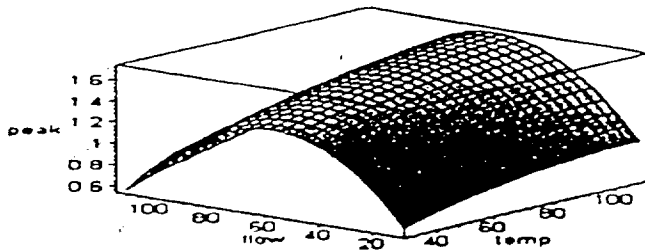
Fig. 11. Peak area as a relationship of N_2 flow rate and absorption time range $40^\circ C$ (A), $70^\circ C$ (B) and $100^\circ C$ (C)



(A)

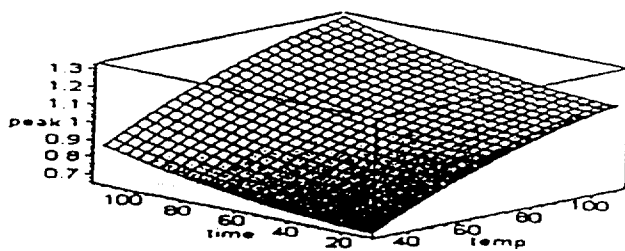


(B)

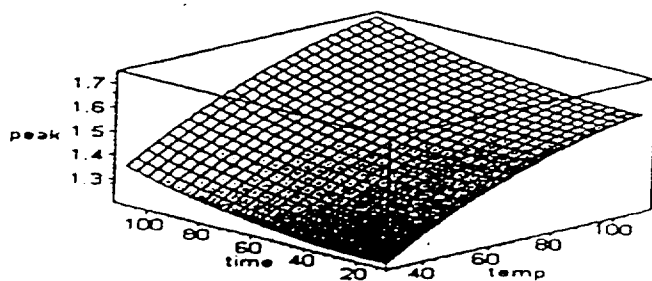


(C)

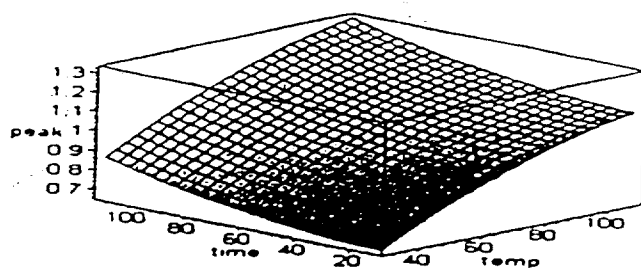
Fig. 12. Peak area as a relationship of N₂ flow rate and absorption temperature range 20min(A), 60min(B) and 100min(C)



(A)



(B)



(C)

Fig. 13. Peak area as a relationship of absorption time and absorption temperature range 20ml/min(A), 60ml/min(B) and 100ml/min(C).

3.3 휘발성 성분 분리 및 동정

SPME를 이용한 벌꿀 휘발성 성분의 최적 흡착 온도와 시간 그리고 이동 기체의 유속은 60°C에서 40분간 흡착하고 유속을 60ml/min 조건하에서 기체를 흘려보내며 향기성분을 포집하는 것이 가장 수율이 좋은 것으로 나타났다. 그러므로, 이러한 최적 조건하에서 SPME를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 14-15와 Table 10에 나타내었다. 4종류의 벌꿀 중 토종꿀과 밀감꿀은 그 향기성분의 양이 많은 것으로 분리되었으나, 아카시아꿀과 밤꿀은 상대적으로 아주 적은 것으로 나타났다. 이처럼, 각 성분의 양은 차이를 많이 보였으나, 벌꿀들이 포함하고 있는 휘발성 성분의 종류는 작게는 15개에서 많게는 17개로 별 차이를 보이지 않았다. 각 벌꿀의 성분 중 그 양이 가장 많은 것으로는 아카시아꿀과 밤꿀에서는 2,6,10-trimethylpentadecane이 각각 21.4, 20.1%로 나타났으며, 토종꿀에서는 octacosane이 15.8%, 밀감꿀에서는 hexadecanoic acid ethyl ester가 25.3%를 차지하였다. SPME의 결과에서는 150°C이상의 높은 비점을 가지는 휘발성 성분들이 다량 분리 동정되었으나, purge & trap의 결과에서는 100°C이하의 비점이 낮은 휘발성 알콜 성분이 나타나 방법간의 차이를 보였다.

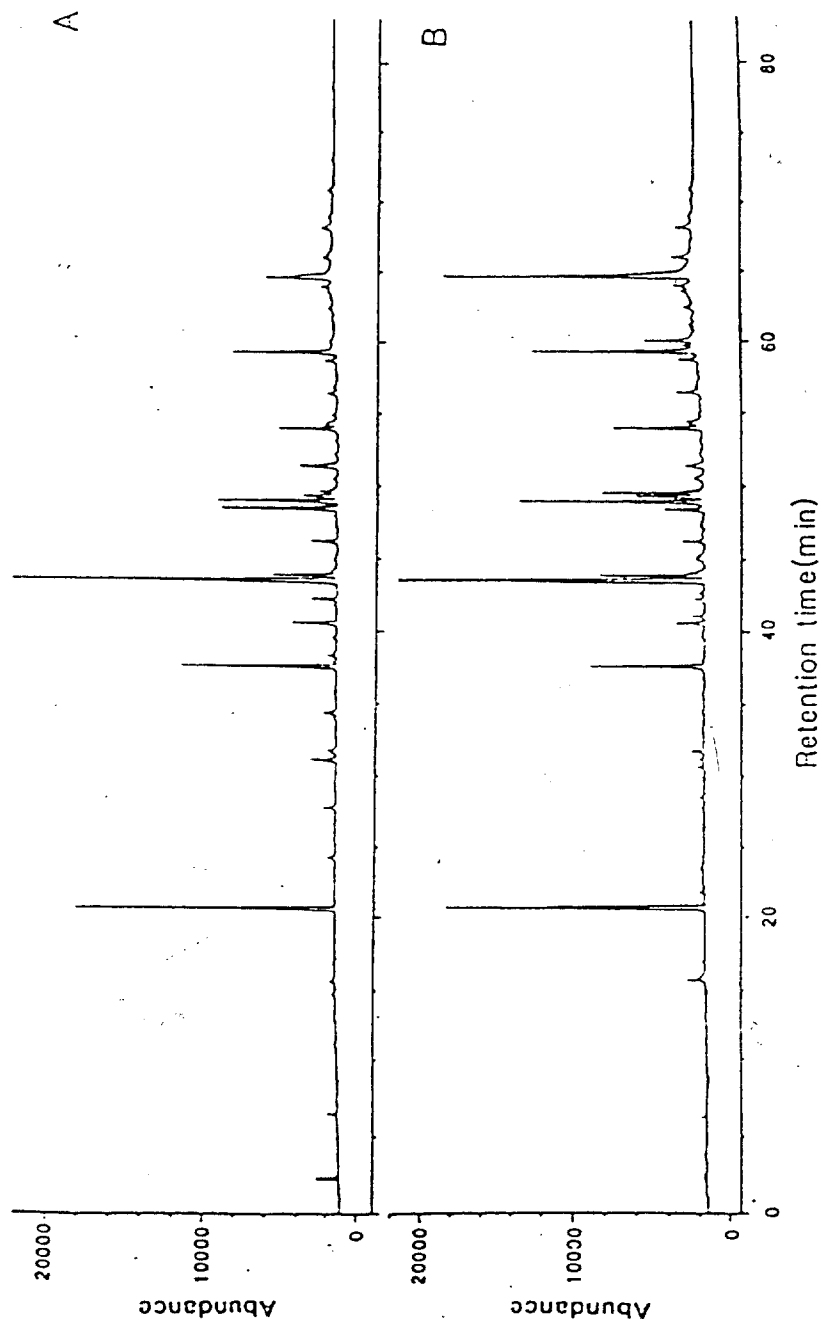


Fig. 14. Gas chromatograms of volatile compounds separated from honeys by solid phase microextraction.

A. Acacia honey B. Chestnut honey

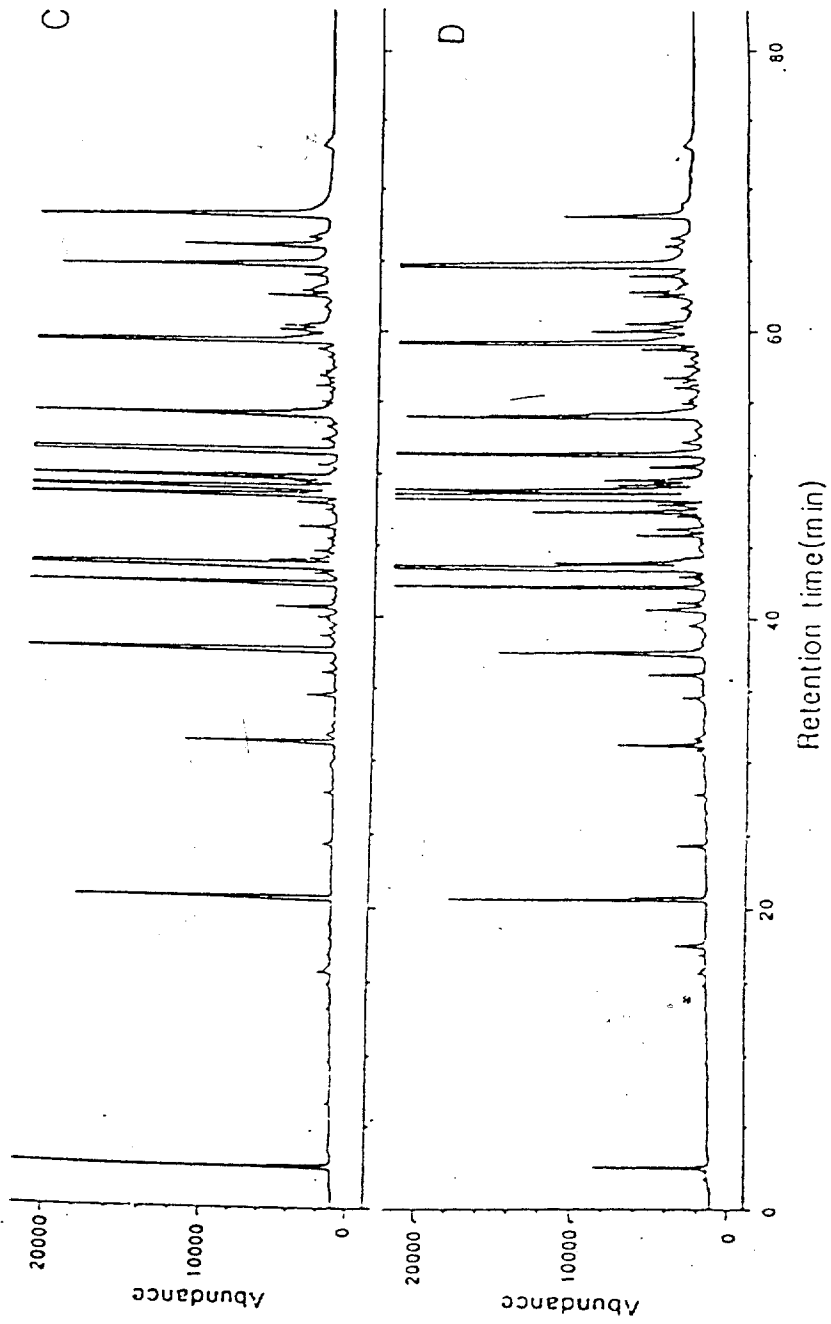


Fig. 15. Gas chromatograms of volatile compounds separated from honeys by solid phase microextraction.

C. Native-bee honey D. Tangerine honey

Table 10. Comparisons of volatile compounds identified from Korean honeys by SPME¹⁾

Chemical names ²⁾	RI ³⁾	(unit: peak area %)			
		Acacia	Chestnut	Native-bee	Tangerine
2-Cyclopentene-1-undecanoic acid	1819	1.31	0.18	1.35	0.67
6,9-Dimethyltetradecane	2145	8.16	4.49	6.58	0.92
2-Ethyl-1-decanol	2293	2.53	1.24	0.71	0.28
2,6,10-Triethylpentadecane	2445	21.44	20.08	10.15	10.08
Heptadecane	2577	1.52	0.94	0.38	0.47
Hexadecanoic acid, ethyl ester	2688	6.38	1.61	7.13	25.25
Henicosane	2717	6.85	7.97	5.84	4.69
5-Octadecene	2734	2.34	2.93	0.49	0.75
5-Eicosene	2751	1.01	3.64	5.65	0.98
Octacosane	2841	2.64	1.27	15.84	2.64
Heptadecanoic acid, ethyl ester	2925	- ⁴⁾	-	0.17	-
9-Octadecenoic acid	2967	3.44	4.01	3.43	2.63
6-Methyloctadecane	2987	-	0.65	0.23	1.40
1-Hexacosanol	3090	0.55	1.11	0.14	0.30
9-Octadecenal	3230	5.85	7.29	9.42	8.21
Methyl linolenate	3499	6.02	14.90	3.90	11.01
2-Ethyl-1-decanol	3676	0.64	1.10	6.73	1.78

¹⁾ SPME was solid phase microextraction.

²⁾ Chemical names stand for the compound identified tentatively by only GC-MSD.

³⁾ RI means Kovats' retention indices.

⁴⁾ "-" means that the peak area is not detected or less than 1.0×10^6 .

요 약

벌꿀은 꽃의 밀선에서 빨아내어 축적한 감미료로서 빛깔, 향기, 맛, 성분은 봉군이나 꽃의 종류에 따라 다르지만 일반적으로 수분 17%, 비중 1.41이다. 고형분의 대부분은 당분으로서 거의 같은 양의 fructose와 glucose로 되어 있으며, sucrose는 약 2%이다. 이러한 벌꿀은 식물의 밀선에서 분비하는 물질을 일벌이 수집하여 벌집에서 증발·농축시켜 그들의 식량으로 저장해 놓은 것을 말한다. 벌꿀의 품질 평가 기준으로는 색깔로 분류하는 방법과 탄소안정동위 원소법 등을 비롯한 여러 가지가 이용되고 있다.

본 연구에서는 품종별 벌꿀이 가지는 휘발성 성분에 대한 품질 평가의 기준을 설정하기 위해서 아카시아꿀, 밤꿀, 토종꿀, 밀감꿀 등의 한국산 벌꿀의 향기성분에 대하여 headspace법인 purge and trap장치와 solid phase microextraction을 이용하여 휘발성 성분을 분석한 후, 분석방법과 꿀의 종류에 따른 휘발성 성분의 차이를 비교하였다.

1. 4종류의 수분함량은 토종꿀과 밀감꿀이 각각 18, 20.5%로 비교적 수분을 적게 함유한 것으로 나타났고, 밤꿀과 아카시아 꿀은 각각 22.5, 25%로서 미국 F.D.A 규제 한계인 25%에는 적합하나 Codex 및 국내 식품, 첨가물 규격 기준인 21%를 초과하는 것으로 나타났다.

2. HMF함량을 측정한 결과, 아카시아 꿀과 밤꿀, 토종꿀, 밀감꿀 모두 40mg/kg 이하로서 열처리되지 않은 신선한 꿀임을 확인하였다.

3. 벌꿀은 자연 식품 중에서 가장 복잡한 당 혼합물로서 glucose와 fructose가

주성분인데, HPLC를 이용하여 토종꿀에 함유된 이들의 함량을 분석한 결과, 총시료의 범위는 fructose 29.2-38.7%, glucose 21.3-28.7%로 시료간의 차이를 나타내었다.

4. 신선한 꿀 4종류, 아카시아꿀과 밤꿀, 토종꿀, 그리고 밀감꿀의 휘발성 성분을 purge and trap 장치를 이용하여 분리 및 동정을 한 결과, 밤꿀의 휘발성 성분이 36개로 가장 많은 것으로 나타났고, 아카시아꿀과 토종꿀, 밀감꿀에서는 각각 23개, 19개, 19개로 비슷한 개수를 나타냈다. 그 성분들을 살펴보면, 아카시아 꿀에서는 ethanol이 가장 많았고, 다음 2-methyl-1-propanol과 acetaldehyde가 차지하였으며, 밤꿀에서는 benzene, hexane, acetone, 2,3-butanedione이었으며, 토종꿀은 ethanol, ethyl acetate, 2-methyl-1-propanol, 마지막으로 밀감꿀은 octane, benzene, 2,3-butanedione의 순이었다.

5. 실험에 이용된 아카시아꿀과 밤꿀, 토종꿀, 밀감꿀 등 각각의 꿀은 벌에 의해 채취된 밀원이 다 다르므로 조사된 총 45가지의 휘발성 성분들 중 4종류의 벌꿀이 다 같이 함유하고 있는 성분들은 총 10가지이다. 이들은 그 함량 또한 높은 것으로 나타나 어느 정도의 일관성을 보였다. 4가지의 벌꿀이 가장 많이 함유하고 있는 성분은 alcohol류로 나타났는데, 아카시아와 토종꿀, 밤꿀 그리고 밀감꿀 간의 비율은 27:12:3:1이었다. 하지만, 이 10개의 성분들간의 조성은 일정하지 않은 것으로 관찰되었다.

6. SPME를 이용한 벌꿀 휘발성 성분의 최적 흡착 온도와 시간 그리고 이동 기체의 유속에 관한 최적조건은 60°C, 40분 그리고 60ml/min 이었다.

7. 최적 조건 하에서 SPME를 이용하여 분석한 결과, 아카시아꽃과 밤꽃에서는 2,6,10-trimethylpentadecane이 각각 21.4, 20.1%로 가장 많았으며, 토종꽃에서는 octacosane이 15.8%로 나타났고, 밀감꽃에서는 hexadecanoic acid ethyl ester가 25.3%를 차지하였다.

References

- Chang, H.G., J.H. Bae, D.T. Lee, S.K. Chun and J.G. Kim. 1987. Mineral constituents of honey produced in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 19(5), 426-428.
- Chang, H.G., M.K. Han and J.G. Kim. 1988. The chemical composition of Korean honey. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 20(5), 631-636.
- Chung, W.C., M.W. Kim, K.J. Song and E.H. Choi. 1984. Chemical composition in relation to quality evaluation of Korean honey. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 16(1), 17-22.
- El-Etre, A.Y. 1998. Natural honey as corrosion inhibitor for metals and alloys. I. Copper in neutral aqueous solution. *Corrosion Science*, 40(11), 1845-1850.
- Ferreres, F., P. Andrade and F.A. Tomas-Barberan. 1996. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *J. Agric. Food Chem.*, 44(8), 2053-2056.
- Gil, M.I., F. Ferreres, A. Ortiz, E. Subra and F.A. Tomas-Barberan. 1995. Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *J. Agric. Food Chem.*, 36(11), 453-460.

- Graddon, A.D., J.D. Morrison and J.F. Smith. 1979. Volatile constituents of some unifloral australian honey. *J. Agric. Food Chem.*, 27(4), 453-460.
- Horvath, K. and I. Molnar-Perj. 1997. Simultaneous quantitation of mono-, di- and trisaccharides by GC-MS of their TMS ether oxime derivatives. *Chromatographia*, 45, 328-335.
- Horvath, K. and I. Molnar-Perl. 1998. Simultaneous GC-MS quantitation of O-phosphoric, aliphatic and aromatic carboxylic acid, proline, hydroxymethylfurfural and sugars as their TMS derivatives. *Chromatographia*, 48(12), 120-126.
- Han, J.G., K. Kim, D.Y. Kim and S.K. Lee. 1985. Composition, the changes of diastase activity and hydroxymethylfurfural content during storage of the various honey samples. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 17(3), 197-203.
- Kang, K.H. 1998. Volatile flavor components of chestnut honey produced in Korea. *J. Korean Agric. Chem.*, 36, 58-64.
- Kim, E.S. and C.O. Rhee. 1996. Comparison of quality attributes of Korean native-bee honey and foreign-bee honey by K/Na ratio. *J. Korean*

Soc. Food Sci. Nutr., 25(4), 672-679.

Lee, D.C., S.Y. Lee, S.H. Cha, Y.S. Choi and H.I. Rhee. 1997.
Characteristics of native-bee honey harvested in Kangwon-area.
Korean J. Food Sci. Technol., 29(6), 1082-1088.

Lee, Y.G., B.U. Min and S.U. Lim. 1991. Comparative study on some
quality-related components of different floral honeys. J. Korean
Agric. Chem. Soc., 34(2), 102-109.

Lee, D.C., S.Y. Lee, S.H. Cha, Y.S. Choi and H.I. Rhee. 1998.
Discrimination of native bee-honey and foreign bee-honey by
SDS-PAGE. Korean J. Food Sci. Technol., 30(1), 1-5.

Lee, S.W., K.S. Kim, K.R. Lee, S.Y. Cho, K.J. Lee and K.H. Kim. 1971.
Studies on tasty constituents in various foodstuffs. Korean J. Food
Sci. Technol., 3(3), 168-171.

Martos, I., M. Cossentini, F. Ferreres and F.A. Tomas-Barberan. 1997.
Flavonoid composition of trunisian honeys and propolis. J. Agric.
Food Chem., 45, 2824-2829.

Mendes, E., E.B. Proenca, I.M.P.L.V.O. Ferreira and M.A. Ferreira. 1998.

- Quality evaluation of portuguese honey. *Carbohydrate Polymers*, 37, 219-223.
- Maga, J.A. 1983. Honey flavor. *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, 16, 65-68.
- Overton, S.V. and J.J. Manura. 1999. Flavor and aroma in natural bee honey. *Scientific Instrument Services*, No. 25a.
- Seo, J.H., N.Y. Park and Y.J. Jeong. 2001. Volatile components in persimmon vinegars by solid-phase microextraction. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 33(1), 153-156.
- Sabatier, S., M.J. Amiot, M. Tacchini and S. Aubert. 1992. Identification of flavonoids in sunflower honey. *Journal of Food Science*, 57(3), 773-777.
- Tan, S.T., A.L. Wilkins, P.T. Holland and T.K. McGhie. 1988. Extractives from New Zealand honeys. 1. White clover, manuka, and kanuka unifloral honeys. *J. Agric. Food Chem.*, 36(3), 453-460.
- Tan, S.T., A.L. Wilkins, P.T. Holland and T.K. McGhie. 1990. Extractives from New Zealand honeys. 3. Unifloral thyme and willow honey constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 38(9), 1833-1838.

- Tan, S.T., A.L. Wilkins, P.T. Holland and T.K. McGhie. 1989. Extractives from New Zealand unifloral honeys. 2. Degraded carotenoids and other substances from heather honey. *J. Agric. Food Chem.*, 37(5), 1217-1221.
- Val, A., J.F. Huidobro, M.P. Sanchez, S. Muniategui, M.A. Fernandez-Muino and M.T. Sancho. 1998. Enzymatic determination of galactose and lactose in honey. *J. Agric. Food Chem.*, 46(4), 1381-1386.
- Visser, F.R., J.M. Allen and G.J. Shaw. 1988. The effect of heat on the volatile flavour fraction from a unifloral honey. *J. Agricultural Research.*, 27(3), 175-181.
- Wilkins, A.L., Y. Lu and S.T. Tan. 1993. Extractives from New Zealand honeys. 4. Linalool derivatives and other components from nodding thistle (*Carduus nutans*) honey. *J. Agric. Food Chem.*, 41(6), 873-878.
- Youn, J.H., W.C. Chung and E.H. Chai. 1989. Change in storage quality of acasia and buckwheat honeys. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 31(1), 58-64.

Yoo, K. S., Park, S. Y., Yang, S. B. and Woo, S. B. 1997 : Determination of THM(trihalomethane) in rain by using solid phase microextraction(SPME) fiber assembly. J. Korean Agric. Chem. Soc., 31(1), 58-64. **6(3)**, 277-283.

동아출판사. 1996. 세계 대백과 사전. p.37.

한국 식품 공업협회. 1995. 식품공전. p.581

한국 식품 공업협회. 1995. 식품공전. p.582~586

감사의 글

지난 10년동안 저에게 학문의 길을 열어주시고 학·석사과정에 이르기까지 많은 관심과 배려로, 그리고 세심한 가르침을 아끼지 않으셨던 이양봉 지도 교수님께 진심으로 무한한 감사를 드립니다. 거칠고 부족한 논문의 심사를 맡아 지도를 해주신 양지영 교수님, 안동현 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 저의 배움의 과정 동안 많은 격려와 도움을 주신 장동석 교수님, 이근태 교수님, 조영제 교수님, 김선봉 교수님, 전병수 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다. 이 논문의 완성에 심혈을 기울여 여러 가지로 도움을 아끼지 않으신 농협 식품연구소의 조현종 선생님, 권혜순 박사님, 배민정 선생님을 비롯하여 모든 임직원에게도 감사의 말씀을 전해드립니다. 저에게 항상 관심과 믿음으로 끝까지 지켜봐 주신 주)키토라이프의 정특래 사장님을 비롯하여, 평택 기술연구소에서 실험에 많은 도움을 준 양현필 책임연구원님과 모든 임직원에게도 감사드립니다. 그리고 식품생화학 실험실에서 매일 저와 함께 동고동락하면서 이 논문이 완성될 때까지 온갖 실험과 어려운 일을 마다하지 않고 곁에서 도와준 신의철 후배님, 멀리 있지만 항상 걱정해주는 박해룡 선배님, 조봉수 선배님, 양훈석 선배님을 비롯하여 정은주, 이신조, 장해진, 남승진, 이창봉 후배님들께 고마운 마음을 전하며 그 외 많은 도움을 주신 선후배님들께도 감사의 마음을 전합니다. 멀리서 항상 격려와 관심을 가져주신 전유진 선배님, 이민수 선배님, 박표잠 선배님, 김규형 선배님, 최정호 선배님에게도 감사를 드립니다.

마지막으로, 오늘의 제가 있기까지 인내와 사랑으로 보살펴 주신 부모님과 장인어른, 장모님 그리고 모든 친족들에게도 감사를 드리며, 끝으로 이 모든 영광과 결실을 아내 미정이와 함께 나누고 싶습니다.