

발효식품 중 천연 유래된 프로피온산 함량 조사

식의약품부 기획검사팀

손여준 · 장민수 · 정소영 · 신재민 · 김나영 · 이재인 · 김복순 · 이상미 · 김정현 · 채영주

Monitoring of Naturally Occurring Propionic Acid in Fermented Food Products.

Project inspection team

**Yeo-joon Son, Min-su Chang, So-young Jung,
Jae-min Shin, Na-young Kim, Jae-in Lee, Bog-soon Kim,
Sang-me Lee, Jung-hun Kim and Young-zoo Chae**

Abstract

Naturally derived preservatives such as propionic acid can be produced as metabolites during fermentation. To monitor naturally formed propionic acid, a method was developed using 10 ml of 0.05M phosphoric acid with 1 ml of trans-crotonic acid as internal standards. 2 g of sodium chloride is and 20 ml of ether are added as an extraction solvent. A GC-FID is used for the determination of propionic acid levels. The recovery of the established method for propionic acid is 50~60%, but the recovery of the new rapid determination method reaches 89.6%. A total of 364 commercially available fermented food samples were collected and analyzed. Propionic acid was detected in 14 samples out of 18 Chunggukjangs(N.D~71.7 mg/kg), 11 samples out of 115 soybean pastes and mixed pastes(N.D~78.1 mg/kg), 16 samples out of 67 vinegars (N.D~1,410.2 mg/kg), 15 samples out of 33 vinegar-based drinks(N.D~441.1 mg/kg), and 36 samples out of 41 fish sauces(N.D~611.8 mg/kg). Propionic acid was not detected in hot pepper pastes and soybean sauces.

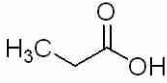
Key words : Propionic acid, Fermented foods, Natural Occurring preservatives

서 론

프로피온산(Propionic acid)은 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ 의 구조를 가지는 단쇄지방산 또는 휘발성 유기산

으로 화학적 성질은 표 1과 같다. 프로피온산은 1840년대에 합성하기 시작한 이후 곰팡이, 효모의 발육을 억제하는 효과가 있음이 밝혀지며 빵류나 치즈제품 등에 보존료로서 첨가되고 있다(1~2).

Table 1. Chemical structure and properties of propionic acid

Compound	Propionic acid
Structure	
Molecular formula	CH ₃ CH ₂ COOH
Molecular weight	74.08
Melting point	-21 ~ -20 °C
Boiling point	140.7 ~ 141.7 °C

그러나 이 프로피온산은 화학적인 합성뿐만 아니라 미생물의 발효과정에서 흔히 생성되어지는 물질로 알려져 있으며, 미국의 CFR(Code of Federal Regulation)에서는 프로피온산은 화학적 합성 혹은 bacteria 발효에 의해 생성이 된다고 하였다(3). 또한 Howard 등에 의한 프로피온산의 대사과정이 1960년에 발표되었으며(4), *Lactobacillus sanfrancisco*에 의한 발효과정 중 프로피온산의 생성(5), 스페인의 전통식품인 발효 그린올리브에서 *Propionibacterium sp.*에 의한 발효단계에서 프로피온산의 생성 등 미생물의 발효 대사산물로서의 프로피온산에 대한 연구들이 발표되고 있다(6~7).

프로피온산의 독성은 고농도일 때 피부에 자극성 및 부식성을 일으키며 과량 섭취 시 체내의 소화기관을 자극할 수 있다고 보고되고 있지만, 1일 섭취허용량(ADI)을 제한하지 않고 있어, 통상의 섭취에서 독성학적 안전성의 문제는 없는 것으로 간주되고 있다(8). 하지만 최근에는 자폐아동이 프로피온산이 함유된 밀가루 혹은 그 식품을 섭취했을 때 자폐증상이 더 심각해진다는 보고가 있었고(9~10), 프로피온산을 비롯한 단쇄지방산과 자폐증상과의 상관관계에 관한 연구가 진행되고 있다(11~12).

이렇듯 보존료로서 사용되고 있는 프로피온산은 비교적 안전한 물질로 여겨지고 있지만 아직도 그 독성에 대해서는 연구가 진행되고 있는 실정이다. 또한 이 프로피온산은 위에서 살펴본 바와 같이 식품 보존의 목적으로 사용되기도 하지만 미생물의 발효과정 중 대사산물로서 자연적으로 생성되

어 인위적으로 첨가하지 않은 제품에서도 상당량의 프로피온산이 검출되고 있는 실정이다.

우리나라에서는 보존료의 사용기준을 식품 유형별로 정하고 있으며 프로피온산은 빵, 케이크, 치즈, 잼 제품에 사용량을 제한하여 허가하고 있으며, 그 외의 식품에서는 그 사용이 금지되어있다(13). 사용이 허가되지 않은 식품에서 보존료가 검출되었을 경우는 식품위생법에 의해 행정처분을 받게 되어있어 인위적 첨가가 아닌 발효 등에 의한 천연유래 량에 대한 DB의 확보가 필요하다.

현행 식품공전 상 식품별 규격 및 기준에 의해 '다음에서 정하는 것 이외의 보존료가 검출되어서는 아니된다.'라는 적용으로 공전에서 규정하고 있는 14개 품목의 보존료를 모두 검정하고 있으나 그 과정 중 합성첨가물과 천연유래 보존료 성분에 대한 구별은 불가능하며, 이러한 이유로 천연유래 보존료에 대한 DB의 구축 및 현 실험실에서 적용할 수 가이드라인이 필요하다.

또한 실험 시 13개 품목의 보존료는 수증기 증류와 HPLC/DAD에 의한 동시분석으로 수행하고 있으나 프로피온산은 수증기 증류 후 추출, 정제 과정을 거치는 등 분석시간과 용매사용 등에서 고비용 저효율적이며, 그 회수율도 50~60%정도로 낮아 검사기관에서 실험하는데 어려움이 있다(14). 따라서 본 연구에서는 앞선 분석법개선 연구 등을 참고로 더 간편하며 회수율도 높은 분석법을 적용, 시중에 판매되는 전통발효식품 중 천연 유래된 프로피온산의 함량을 분석, 그 실태를 파악하여 식품 검정업무에 실제적 도움이 될 수 있는 기본 데이터를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 시약

2011년 서울 시내 재래시장과 대형마트에서 유통되는 식초류 100건, 장류 223건, 액젓류 41건 등 전통발효식품 364건을 구입하여 시료로 사용하였다. 이 시료들은 제조공정상 프로피온산을 사용하지 않은 제품들로 선별하였으며, 시료들의 식품 유형 및 수량은 표 2와 같다.

Table 2. Monitoring sample list for propionic acid analysis

Group	Food Type	Number of samples
Vinegars	Vinegar	67
	Vinegar-based drink	33
Fermented Sauces	Kochujang	55
	Fermented soybean paste	53
	Soy sauce	32
	<i>Chunggukjang</i>	18
	Mixed pastes	62
	Others	3
Fish sauces	Sand lance sauce	14
	Anchovy sauce	21
	Others	6

실험에 사용한 표준물질인 propionic acid는 Aldrich Chemical사 시약을 사용하였으며, 내부 표준물질로는 Johnson Metthey사의 trans crotonic acid를 사용하였다. 그 외 분석에 사용된 시약은 WAKO사 제품을 사용하였고, ethyl ether는 Fisher사 제품을 사용하였다.

2. 표준용액 조제

표준용액은 프로피온산 약 0.1 g을 정확히 취하여 아세톤 100 ml에 녹여 표준원액으로 하고, 이를 5, 10, 50, 100, 200 mg/L 수준이 되도록 아세톤으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 내부표준물질로 trans-crotonic acid를 사용하였는데, 표준물질 중 내부표준물질의 최종농도가 100 mg/L 수준이 되도록 조제하여 사용하였다.

3. 시료처리 및 기기분석

시료를 잘 분쇄한 후 약 5g을 conical tube에 정밀히 취하고, 여기에 0.05M 인산 10 ml, 내부 표준물질인 trans-crotonic acid (2000 mg/L) 1 ml, NaCl 2 g을 가한 후 30분간 초음파한 후 10 분간 진탕하여 주었다. 여기에 ethyl ether 20 ml를 가한 후 1분간 vortexing 하여 추출하였다. 층 분리가 된 후 ethyl ether 층을 취하여 nylon syringe filter(0.45 μ m)로 filter 한 후 시험용액으로 하였다. 기기분석에는 Agilent 7890 GC-FID와 Agilent 7890 A GC/MS를 사용하였으며 기기 조건은 표 3, 4와 같다.

4. 회수율시험

회수율 시험은 각 matrix 특성별로 된장, 식초,

Table 3. The analytical conditions of the GC-FID for propionic acid

Instrument	GC(HP 7890 series, USA) with FID
Column	DB-FFAP (J&W 122-3232 : 30 m \times 0.250 mm \times 0.25 μ m)
Injector Temperature	220 $^{\circ}$ C
Detector Temperature	250 $^{\circ}$ C
Oven Temperature	80 $^{\circ}$ C (for 3min) \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \uparrow \rightarrow 200 $^{\circ}$ C (for 3min)
Injection volume	1 μ l
Carrier gas flow rate	1 ml/min (N ₂)
Split ratio	25 : 1

Table 4. The analytical conditions of the GC/MS for propionic acid

Instrument	GC(HP 7890 series, USA) with MS
Column	VF-Wax ms (30 m × 0.250 mm × 0.25 μm)
Injector Temperature	250 °C
Oven Temperature	50 °C (for 3min) → 10 °C/min ↑ → 230 °C (for 5min)
Injection volume	1 μl (Splitless mode)
Carrier gas flow rate	1 ml/min (He)

Table 5. Recovery in various foods by Distillation & extraction method and Direct extraction method (n=3)

Food Type	Recovery(%) ± RSD(%)	
	Distillation & extraction method	Direct extraction method
Vinegar	65.5 ± 0.89	80.6 ± 1.06
Soybean paste	65.8 ± 4.94	91.0 ± 1.61
Anchovy sauce	42.8 ± 1.01	97.0 ± 3.35

액젓에 대하여 실시하였으며, 수증기증류 한 후 추출한 방법과 수증기증류과정 없이 직접 추출한 방법을 3회씩 실시하여 비교하였다.

수증기증류 후 추출한 방법은 각 시료 50 g에 표준용액(1,000 mg/L) 1 ml와 10% 인산용액 10 ml, NaCl 80g을 첨가한 후 수증기 증류하여 유액 250 ml를 받은 후 이액 20 ml를 취하여 인산 0.2 ml와 NaCl 2 g, 2,000 mg/L농도의 내부표준물질 1 ml를 넣고 Ethyl ether 20 ml로 추출하였다. 직접 추출법은 시료 5 g에 표준용액(1,000 mg/L) 1 ml 및 0.05M 인산 1 ml, NaCl 2 g, 2,000 mg/L 농도의 내부표준물질 1 ml를 첨가한 후 ethyl ether로 추출하여 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 시료처리 방법 비교 및 회수율 분석

기존의 프로피온산 시료처리 방법이 매우 복잡하고 시간도 오래 걸리는 단점이 있어서 본 연구에서는 전처리방법을 간소화하기위해 분석법을 개발하였다. 수증기증류 후 추출하는 방법과 수증기증류과정 없이 바로 ethyl ether로 추출하는 방법을 비교하였는데 그 결과 증류과정 없이 바로 추

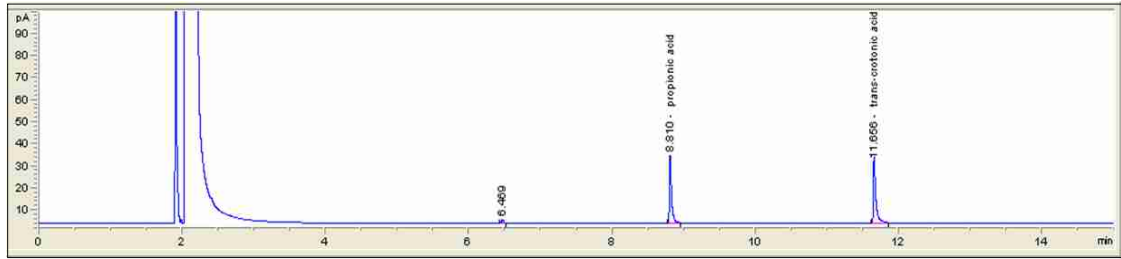
출하는 직접법의 회수율이 89.6%로 수증기증류 후 추출하는 방법의 회수율(58.1%)보다 높게 나타났다. 각 시료의 matrix 특성별로 세 종류로 나누어 실시한 결과는 표 5에서 보는 바와 같이 직접법의 회수율이 된장은 91.0%, 식초는 80.6%, 액젓은 97.0%로 나타났고, 증류 후 추출법의 회수율은 된장이 65.8%, 식초는 65.5%, 액젓은 42.8%로 모두 직접법의 회수율이 높음을 알 수 있었다. 이에 본 연구에서는 회수율도 좋고 분석 시간도 줄일 수 있는 직접법으로 전처리를 실시하였다.

2. 기기분석결과

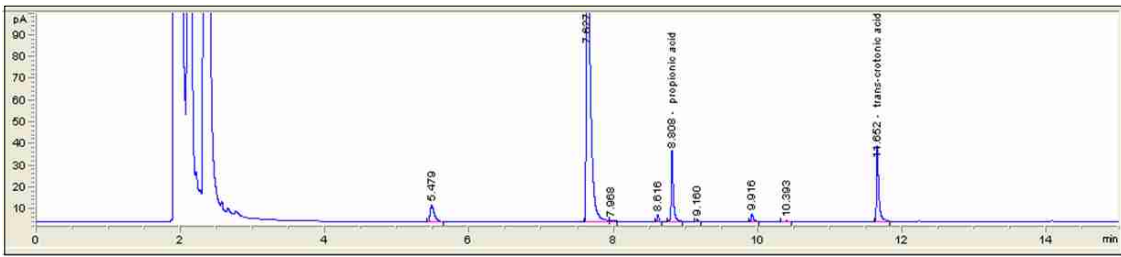
Trans crotonic acid를 내부표준물질로 하여 표준용액 농도별로 검량선을 작성했을 때 직선성의 R²값은 0.999였으며, 내부표준법에 의한 정량으로 분석한 프로피온산의 표준물질과 시료를 전처리한 후 분석한 크로마토그램을 아래 그림 1에 나타내었다. 또한 프로피온산 STD와 프로피온산이 검출된 액젓시료를 GC/MS로 분석한 크로마토그램과 스펙트럼은 그림 2와 같다.

3. 전통발효 식품 중의 프로피온산 함량

시중에서 유통되는 전통발효식품 364건을 분석



(A)



(B)

Fig. 1. Chromatograms of (A) Propionic acid and trans-cotonic acid and (B) Sample by GC-FID.

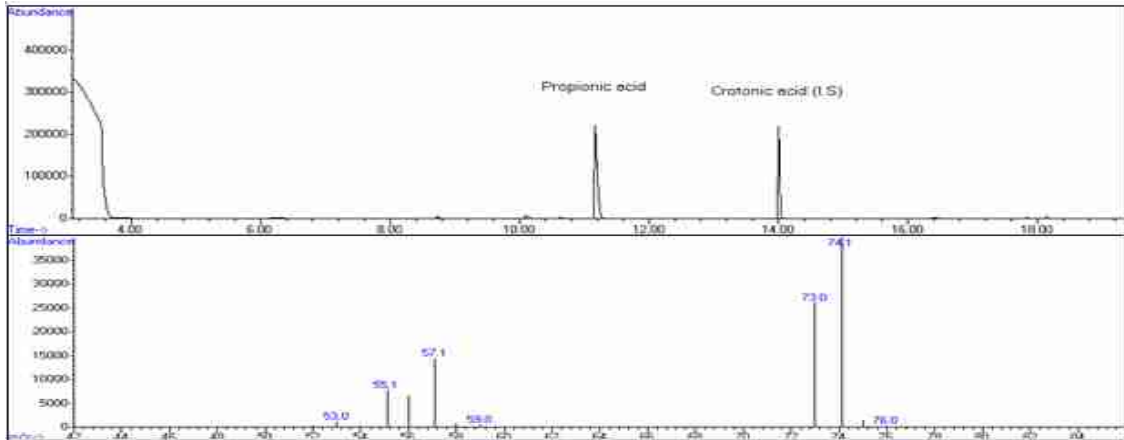
한 결과 92건에서 프로피온산이 검출되었으며, 검출량은 감식초에서 최고 1,410.2 mg/kg 까지 검출되었다.

식초류의 프로피온산 검출률은 31.0%였으며, 이를 일반식초류와 음료용식초류로 나누어서 살펴보면 일반식초류 67건 중 16건, 음료용식초류 33건 중 15건에서 프로피온산이 검출되었고, 검출범위는 불검출~1,410.2 mg/kg이었다. 특히 검출빈도가 높은 검체들이 주로 감식초이었는데, 감식초 17건 중 14건에서 프로피온산이 검출되었으며, 그 농도도 평균 314.8 mg/kg 으로 높은 수준을 나타냈다. 또한 검출되지 않은 3건은 모두 음료용식초로 감식초의 함량이 아주 낮은 제품군으로 나타났다. 이러한 결과는 박 등(15)의 연구 결과인 감식초제품의 평균 프로피온산함량인 553.6 mg/kg보다는 낮은 수치이다. 감식초의 발효기간에 따른 프로피온산의 함량변화를 연구한 박 등(15)의 결과에서 알 수 있듯이 이러한 수치의 차이는 발효기간 및 발효에 관여한 균주의 종류에 기인하는 것으로 생각된다. *Lactobacillus sanfrancisco*는 발효과정 중 프로피온산을 생성한다(5).

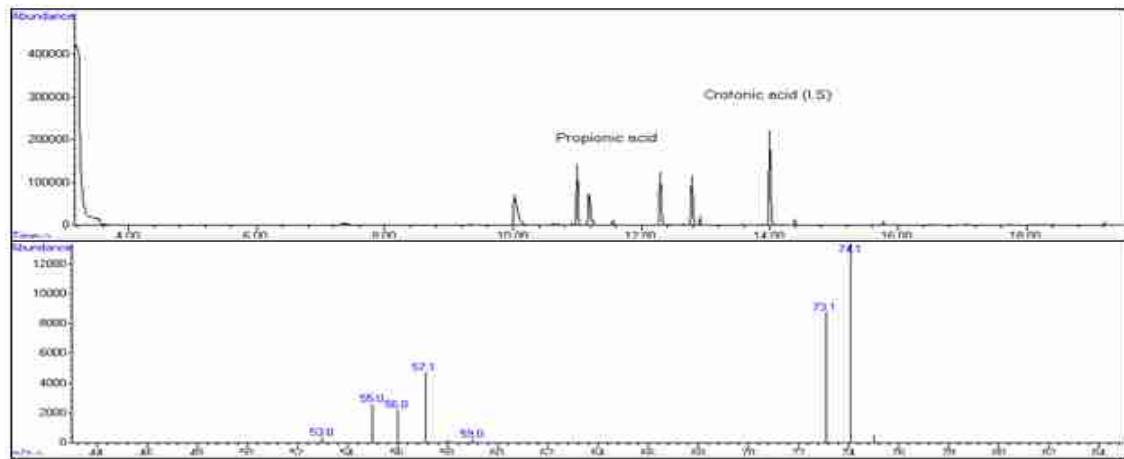
장류의 프로피온산 검출률은 11.2%이었으며, 이를 또한 제품군별로 나누어 살펴보면 된장 53건

중 8건, 청국장 18건 중 14건, 혼합장 62건 중 3건에서 프로피온산이 검출되었고, 고추장, 간장, 기타장류 90건 중에서는 프로피온산이 검출되지 않았다. 이들 장류의 프로피온산 검출 범위는 불검출~78.1 mg/kg 이었다. 장류 중 청국장의 프로피온산 검출률이 18건 중 14건(82.4%)으로 가장 높았는데, 이는 *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis* 등 청국장 발효균주의 발효특성에서 오는 결과라고 생각된다. 이러한 청국장의 프로피온산에 높은 검출률은 다른 연구보고서의 결과와도 일치하는 것이다(16).

프로피온산이 검출된 된장 8건 중 7건은 한식된장으로 양조된장보다 높은 검출률을 보였으며, 이는 Oh 등(17)의 연구에서 나타난 것과 같이 재래식 발효방법을 이용한 한식된장은 발효에 이용되는 미생물의 제한이 없어 여러 미생물군이 작용하여 다량의 휘발성 화합물을 생성하지만, 개량식 방법을 사용하는 양조된장은 제조과정을 엄격히 통제하여 특정 균주만을 순수 배양, 접종하여 유기산 등의 휘발성 화합물의 생성에 제한을 받기 때문으로 생각된다. 반면에 고추장 55건에서는 프로피온산이 전혀 검출되지 않았는데, 이러한 결과는 다른 연구보고 결과와 일치하고 있다(16).



(A)



(B)

Fig. 2. Chromatograms and mass spectra of (A) Propionic acid standard and (B) Fish sauce sample by GC-MS.

액젓은 까나리액젓 14건 중 13건, 멸치액젓 21건 중 18건, 기타액젓 6건 중 5건에서 프로피온산이 검출되었으며, 검출범위는 불검출~611.8 mg/kg 이었다. 액젓의 경우 다른 발효식품군에 비하여 프로피온산의 검출률이 87.8%로 가장 높았으며 그 함량 또한 상당히 높은 편이었다. 액젓 및 젓갈은 원료 어패류의 함량이 증가할수록 프로피온산 생성이 증가하며, 소금의 함량은 프로피온산 생성에 크게 영향을 미치지 않는다는 보고가 있다(16).

각 식품군별 프로피온산 검출건수와 검출범위는 표 6과 같다.

프로피온산은 물론 최근 자폐증상과 단쇄지방산과의 관계를 연구하는 등(9~12) 프로피온산의 유

해성에 관해서 계속 연구가 진행되고 있지만, 통상적으로 프로피온산의 독성은 미비한 것으로 간주되고 있다. Lee 등(18)의 보존료(소르빈산, 안식향산, 테히드로초산, 파라옥시안식향산, 프로피온산 등) 사용실태 및 섭취량에 관한 광범위한 연구에서 프로피온산의 경우 8.3 mg/person/day로 다른 보존료보다 낮은 섭취량을 나타내었다. 또한 미국에서는 프로피온산 및 그 염류를 GRAS (generally recognized as safe) 항목에 포함시켜 규제를 가하고 있지 않으며(14), 오히려 유가공제품 제조 시 프로피온산 생성 균주를 스타터로 사용하여 제품의 풍미 및 보존성 향상 목적으로 천연유래 프로피온산의 생성을 증가시키기도 한다

Table 6. Propionic acid levels in fermented food products

Group	Food Type	Sample No.	Detection Sample No.	Detection Range (mg/kg)
Vinegars	Vinegars	67	16	~ 1410.2
	Vinegars-based drinks	33	15	~ 441.1
Fermented sauces	Hot pepper pastes	55	0	-
	Soybean pastes	53	8	~ 78.1
	Soybean sauces	32	0	-
	<i>Chunggukjangs</i>	18	14	~ 71.7
	Mixed pastes	62	3	~ 56.1
	Others	3	0	-
Fish sauces	Sand lance sauces	14	13	~ 611.8
	Anchovy sauces	21	18	~ 439.0
	Others	6	5	~ 131.5

(5). 이렇듯 우리나라 식품공전에서는 프로피온산의 사용에 규제를 하고 있지만, 상당한 식품에서 천연적으로 프로피온산이 생성되어 이에 대해서는 규제를 하고 있지 않은 실정이다. 이러한 점은 식품검정업무의 어려움은 물론 국민들의 식품선택에도 혼란을 줄 수 있어, 프로피온산의 독성 및 유해성에 대한 연구와 더불어 규제적용의 범위를 명확하게 해야 할 필요가 있을 것이다.

요 약

국내에서는 빵이나 치즈제품에서만 사용이 가능한 프로피온산이 발효식품 중에서 자연적으로 생성되어 인위적으로 첨가하지 않은 제품에서도 검출되는 등 식품 검정업무에 어려움을 야기함은 물론, 그 분석법도 매우 복잡하고 회수율도 낮은 실정이었다. 이에 본 연구에서는 신속하고도 회수율이 높은 전처리 방법을 고안하여 시중에 판매되고 있는 전통발효식품 364건에 대하여 프로피온산 함량 모니터링을 실시하였다. 수증기증류 및 정제과정을 생략하고 직접 추출하는 방법을 사용하여 기존의 방법보다 시간도 절약되었고, 회수율도 89.6%로 50~60%의 기존방법회수율보다 우수한 것으로 나타났다. 전통발효식품 364건을 분석한

결과 92건에서 프로피온산이 검출되었으며, 검출량은 감식초에서 최고 1,410.2 mg/kg 까지 검출되었다. 가장 높은 검출률을 보인 식품군은 액젓류로 87.8%의 검출률을 보였으며, 식초류 중에서는 음료용식초(45.5%)가, 장류 중에서는 청국장(82.4%)의 검출률이 높았다.

참고문헌

1. 국승욱 : 빵의 저장성 증진을 위한 중균배양 방법. 한국식품영양학회지, 9(3):236~241, 1996.
2. Lind H, Jonsson H and Schnürer J : Antifungal effect of dairy propionibacteria-contribution of organic acids. International Journal of Food Microbiology, 98:157~165, 2005.
3. Center for Devices and Radiological Health : Benzoic acid. Code of Federal Regulation 21:3, 184.1021, 2007.
4. Howard G and Stadtman ER : Propionic acid metabolism. J. Biological Chemistry, 253(8):2238~2245, 1960.
5. Gobbetti M and Corsetti A : *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium : A Review. Food Microbiology,

- 14:175~187, 1997.
6. Montaña A, Sánchez AH, Casado FJ, de Castro, A and Rejano L : Chemical profile of fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, 82:297~302, 2003.
 7. Sánchez AH, de Castro A, Rejano L and Montaña A : Comparative study on chemical changes in olive juice and during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 :5975~5980, 2000.
 8. Lueck T : Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 48:423~432, 1980.
 9. Horvath K, Papdimitriou JC, Rabsztyl A, Drachenberg C and Tildon JT : Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *J Pediatr*, 135: 559~563, 1999.
 10. Jyonouchi H, Sun S and Itokazu N: Innate immunity associated with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorder. *Neuropsychobiology*, 46:76~84, 2002.
 11. Derrick FM, Nathan EC, Francis B, Klaus-Peter O and Donald PC : Effect of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats : Relevance to autism spectrum disorder. *Behavioural Brain Research*, 217:47~54, 2011.
 12. Derrick FM, Donald PC, Karina RC, Andrew EF, Jennifer EH, Francis B, A. Roy T, Martin K and Klaus-Peter O : Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats : Possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behavioural Brain Research*, 176:149~169, 2007.
 13. 식품공전 : 식품의약품안전청, 2011.
 14. Chung H, Jang YJ, Lee MS and Oh S : Improvement of distillation and extraction conditions for analysis of propionic acid in bakery products. *Food Sci. Biotechnol*, 12:337~341, 2003.
 15. 박은령, 문춘선, 이선규, 황혜신, 정우영, 광인신, 임철주, 이광호, 김옥희 : 가공식품 중 천연유래 보존료 모니터링. *식품의약품안전청 연구보고서*, 11:2007.
 16. 안현주, 백옥진, 이화정, 김용훈, 신민수, 송경희, 김연주, 강찬순, 고경희 : 식품 중 프로피온산 함유량 조사. *식품의약품안전청연구보고서*, 10:2006.
 17. Oh KS, Kang KJ, Lee JH, Lee KB, Kim JH, Park DH, Ko KH, Lee MH and Ahn SM : Quantitative analysis of organic acids on traditional fermented foods and separation of antioxidative compounds in persimmon vinegars. *The Annual Report of KFDA*, 2:140~153, 1998.
 18. Lee JO, Jang YM, Yoon HJ, Lee CH, Park SK, Jang YJ, Park SY, Lee KJ, Oh SJ and Lee CW : Estimation of concentrations in food and their daily intake for preservatives in Korea : Based on the results of food sanitation inspection agency. *The Annual Report of KFDA*, 5:84~100, 2001.