

Validation of an enzymatic microplate assay for ethanol in foods, comparison with GC-FID, and application to commercial product monitoring

Sun Hye Hwang[★], Yong Sun Cho, and Jun-Young Lee

Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, 245 Nongsaeangmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea

(Received January 6, 2026; Revised February 12, 2026; Accepted March 9, 2026)

식품 중 미량 에탄올 분석을 위한 효소 미세플레이트 분석법 검증 및 GC-FID 비교와 시판 제품 모니터링

황선혜[★] · 조용선 · 이준영

식품분석연구센터, 한국식품연구원

(2026. 1. 6. 접수, 2026. 2. 12. 수정, 2026. 3. 9. 승인)

Abstract: Ethanol may be present in a wide range of foods due to natural fermentation, carry-over from ingredients, or the use of ethanol-containing preservatives, and even trace levels are important for halal compliance and “no- and low-alcohol (NoLo)” labeling. In this study, a single-laboratory validation of an enzymatic microplate assay was conducted for three Korean food matrices (rice cake, gochujang, and fruit-vegetable beverages) and the performance was compared with that of a GC-FID method based on an AOAC INTERNATIONAL (AOAC). The enzymatic assay showed limits of quantification (LOQs) of 0.030–0.076 mg/mL, which were comparable to or lower than those of GC-FID (0.037–0.109 mg/mL) depending on the matrix. Calibration curves were linear over 0.01–0.25 mg/mL with acceptable linearity ($R^2 \geq 0.991$), and spike recoveries (after correcting for background ethanol) were approximately 95–105 % across low, medium, and high levels with practical precision. GC-FID also provided excellent linearity ($R^2 \geq 0.9998$) and generally lower RSDs. In addition, commercial product monitoring data were generated for rice cake ($n = 14$), gochujang ($n = 12$), and fruit beverages ($n = 18$), showing that the enzymatic microplate assay provides comparable quantitative results to GC-FID across diverse matrices, supporting its utility for routine trace-ethanol monitoring.

요 약: 에탄올은 자연 발효, 원료 유입, 보존제 사용 등으로 다양한 식품에 존재할 수 있으며, 미량 수준이라도 할랄 인증 및 무알코올/저알코올(no- and low-alcohol) 표시 관리 측면에서 중요하다. 본 연구에서는 쌀떡, 고추장, 과·채 혼합음료를 대상으로 효소 기반 미세플레이트 분석법의 밸리데이션을 수행하고, AOAC INTERNATIONAL 공인시험법을 기반으로 한 GC-FID 방법과 성능을 비교하였다. 효소분석법의 정량한계는 0.030–0.076 mg/mL로 평가되었으며, GC-FID(0.037–0.109 mg/mL)와 동등하거나 일부 매트

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)63-219-9328 Fax : +82-(0)63-219-9280

E-mail : hsh0514@kfri.re.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

릭스에서 더 우수하였다. 보정곡선은 0.01–0.25 mg/mL 범위에서 양호한 직선성($R^2 \geq 0.991$)을 보였고, 저·중·고 3수준 스파이크 농도에서 기저 에탄올 농도를 보정한 회수율은 약 95–105 % 범위, 정밀도 또한 기준을 만족하였다. GC-FID 분석법 역시 우수한 직선성($R^2 \geq 0.9998$)과 전반적으로 낮은 RSD를 나타냈다. 추가로 시판 제품 모니터링(쌀떡 $n=14$, 고추장 $n=12$, 과·채 혼합음료 $n=18$)을 수행한 결과, 효소분석법은 다양한 매트릭스에서 GC-FID와 유사한 정량 결과를 제공하며 일상적 모니터링 적용 가능성을 확인하였다. 본 연구 결과는 효소분석법이 미량 에탄올의 모니터링을 위한 실용적 대안이 될 수 있음을 시사한다.

Key words: ethanol, enzymatic assay, gc-fid, monitoring

1. 서 론

에탄올은 발효, 원료의 잔류, 보존료로의 의도적 사용 등 여러 경로를 통해 다양한 식품에 존재할 수 있다. 과실·채소 주스, 제과·제빵류, 소스류처럼 일반적으로 비알코올 제품으로 인식되는 식품에서도 저농도 에탄올이 검출되며, 일부 경우에는 어린이의 일상적 노출에 의미 있게 기여한다는 연구도 있다.¹ 저농도 에탄올 노출에 대한 위해성 평가에서는 이와 같은 수준의 저농도 에탄올이 독성학적으로 큰 우려를 야기할 가능성은 낮다고 보면서도, 실제 식품 중 발생 수준과 인구집단별 노출량에 대한 정량적 자료가 충분하지 않음을 지적하고 있다.² 특히 취약 집단과 법적 또는 표시 기준에 따라 에탄올 함량 0.5 % (v/v) 미만으로 분류되는 “no- and low-alcohol (NoLo)”제품의 경우, 보다 신뢰성 있는 모니터링 데이터 축적이 필요하다고 강조한다.^{2,3}

무알코올 제품의 정의와 허용 기준은 국가 및 제도에 따라 상이하다. 일부 규정에서는 0.5 % alcohol by volume(ABV)까지도 non-alcoholic 또는 alcohol-free로 허용하지만, 다른 기준에서는 0.0–0.05 % ABV만을 엄격한 무알코올로 인정하고, 탈알코올 와인·맥주 등에는 1.2 % ABV까지 허용하기도 한다.³ 할랄 관점에서는 농도뿐 아니라 에탄올의 발생 기원과 사용 목적이 중요하며, 자연 발효 등으로 비의도적으로 존재하는 에탄올에 대해서는 인증기관·국가 표준에 따라 허용 범위가 달라질 수 있다.^{4–6} 이처럼 규제·종교·시장 요구가 복합적으로 얹혀 있기 때문에, 식품 중 미량 에탄올의 존재 여부와 수준을 정량적으로 뒷받침할 수 있는 분석기술의 중요성이 커지고 있다.

한국 전통·가공 식품은 이러한 이슈를 잘 보여준다. 고추장은 곡류와 콩을 원료로 한 발효식품으로 에탄

올은 발효 과정에서 생성되는 주요 휘발성 대사산물로 보고되며, 전통·소규모 제조 제품에서는 상대적으로 높은 수준으로 보고된 바 있다.^{7,8} 떡볶이용 떡류는 유통기한 연장을 위해 에탄올을 분무·처리하는 경우가 있어, 의도적 처리가 잔류 에탄올의 주요 원인이 될 수 있다.⁹ 과·채 혼합음료 역시 원료 특성과 제조·유통 과정의 미세 발효로 인해 0.1–0.3 % (v/v) 수준의 에탄올이 검출될 수 있어, 노출·표시 관리 측면에서 관심이 필요하다.^{1,2}

식품 중 에탄올 분석에는 기체크로마토그래피-불꽃 이온화검출(gas chromatography-flame ionization detection, GC-FID) 방법이 널리 사용되며, AOAC Official Method 984.14는 여러 음료류에 적용 가능한 공인 시험법으로 활용되어 왔다.¹⁰ GC-FID는 우수한 감도와 재현성을 제공하지만, 고가 장비와 숙련된 인력, 긴 분석 시간, 그리고 고형 또는 점도가 높은 시료에서 종류·정제 등의 복잡한 전처리가 필요하다는 한계를 가진다.

이러한 한계를 보완하기 위해 alcohol dehydrogenase (ADH)와 aldehyde dehydrogenase(ALDH)의 연속 반응 및 NAD⁺/NADH 흡광도(340 nm) 측정을 이용하는 효소 기반 에탄올 분석법이 대안으로 주목받고 있다. 이 효소 분석법은 콤부차에 대한 AOAC Official Method 2019.08의 기반 기술로 채택되었으며,^{11,12} 음료 매트릭스에서 우수한 직선성, 회수율 및 정밀도를 보고한 검증 연구들이 제시된 바 있다. 그러나 이러한 효소분석법 검증은 대부분 투명하고 점도가 낮은 음료를 대상으로 수행되어 왔으며, 떡과 고추장처럼 점도와 색도, 고형분이 높은 매트릭스에 대한 정보는 아직 부족하다.

따라서 본 연구에서는 떡, 고추장, 과·채 혼합음료를 대상으로 효소 기반 미세플레이트 분석법의 특이성, 직선성, 검출·정량한계, 정밀도 및 정확도를 단일실험실 조건에서 평가하고, GC-FID(AOAC 984.14 기반)

방법과 성능을 비교하였다. 검증 설계 및 판정은 식품의약품안전처(Ministry of Food and Drug Safety, MFDS, 2012), AOAC, Codex, IUPAC 단일실험실 검증 가이드 등을 참고하였다.¹⁴⁻¹⁷ 또한 시판 제품(쌀떡 $n=14$, 고추장 $n=12$, 과·채 혼합음료 $n=18$)을 대상으로 에탄올 함량 모니터링을 수행하고, 두 방법의 결과 일치성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 및 매트릭스

시험 매트릭스로는 떡볶이용 원통형 쌀떡(고형), 할랄 인증 고추장(반고형), 할랄 인증 과·채 혼합주스(액상)를 선정하였다. 쌀떡은 에탄올 보존제 사용 가능성을 최소화하기 위해 전북지역 방앗간에서 당일 생산된 제품을 구입하여 즉시 분석하였다. 고추장과 혼합주스는 에탄올 함량이 할랄 기준(0.1% v/v 미만) 내에 있을 것으로 예상되는 제품을 온라인을 통해 구입하였다. 세 매트릭스는 고형·반고형·액상 제품을 대표하며, 국내 저에탄올 모니터링 대상 식품으로 제시된 바 있다.

추가로 분석법의 실제 적용성을 확인하기 위해 시판 제품 모니터링을 수행하였다. 모니터링 대상은 시판 떡 제품 14종(떡국 떡/떡볶이 떡 등), 시판 고추장 12종, 시판 과·채(과일 포함) 음료 18종이었다. 제품명에 따른 상표 노출을 방지하기 위해 각 시료는 매트릭스별로 R1-R14(떡), G1-G12(고추장), J1-J18(음료)로 코드화하여 표기하였다. 모니터링 시료는 제조사 표기 보관 조건에 따라 보관하면서 유통기한 내 분석하였고, 각 시료는 동일 전처리 후 효소분석법과 GC-FID로 병행 분석하여 평균과 표준편차로 제시하였다.

2.2. 시약 및 기기

본 연구에서 사용한 에탄올 표준용액과 내부표준물질 acetonitrile은 Merck(Darmstadt, Germany)의 분석급 시약을 사용하였다. 효소 기반 에탄올 분석에는 효소분석 키트(Neogen Megazyme, Bray, Ireland)를 사용하였으며, 키트에는 완충용액(buffer), NAD⁺, ADH 및 ALDH가 모두 포함되어 있다. 모든 용액은 에탄올이 포함되지 않은 초순수(ethanol-free ultrapure water)를 사용하여 제조하였다.

GC-FID 분석은 Shimadzu 가스크로마토그래프 시스템(Shimadzu, Kyoto, Japan)에 HP-FFAP 모세관 컬럼(50 m × 0.32 mm i.d., 0.50 µm film thickness; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)과 flame-ionisation

detector(FID)를 장착하여 수행하였다. 흡광도 측정에는 Epoch microplate reader(BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하였으며, 떡 시료의 에탄올 추출에는 60 °C로 유지되는 셰이킹 워터배스를 사용하였다. 효소 분석법 및 GC-FID의 주요 기기조건은 Table 1에 정리하였다.

2.3. 시료 전처리

2.3.1. 떡

쌀떡 시료를 균질화한 후, 10 g을 취하여 50 mL 증류수와 함께 60 °C로 유지되는 진탕 수조에서 30 min 동안 추출하였다. 추출액은 냉각 후 100 mL 정용플라스크에 옮겨 증류수로 정용하고, 필요에 따라 약 1:10-1:20 비율로 희석하여 효소분석법 측정 시 ΔA340가 약 0.1-1.0 범위가 되도록 조정하였다.

2.3.2. 고추장 및 과·채 혼합음료

고추장 또는 혼합주스 2 g을 100 mL 증류수에 분산시키고 잘 혼합한 후 원심분리하여 상등액을 취하였다. 얻어진 상등액은 효소분석법 및 GC-FID 분석에 적합한 농도가 되도록 추가 희석하였다.

2.3.3. 시판 제품(모니터링) 시료

시판 제품 모니터링 시료는 매트릭스 특성에 따라 2.3.1(떡) 또는 2.3.2(고추장·음료)의 전처리 절차를 밸리데이션 방법과 동일하게 적용하였다. 시료별 기저 에탄올 농도 및 희석 후 측정 범위를 고려하여 희석 배수를 개별 조정하였으며, 효소분석법의 경우 ΔA340가 약 0.1-1.0 범위가 되도록 맞추었다.

2.4. 효소분석법

미세플레이트 효소분석법은 AOAC 2019.08 및 제조사 프로토콜에 따라 수행하였다.^{11,13} 증류수(blank), 시료 또는 표준용액 0.100 mL, 완충용액(buffer) 0.050 mL, NAD⁺ 용액 0.020 mL, ALDH 용액 0.005 mL를 96-well 마이크로플레이트의 각 well에 순차적으로 첨가하여 최종 부피가 0.257 mL가 되도록 하였다.

혼합 후 2 min 동안 반응을 평형시킨 뒤 340 nm에서 1차 흡광도(A₁)를 측정하였다.

이후 ADH 용액 0.002 mL를 첨가하고 약 5 min 후 340 nm에서 2차 흡광도(A₂)를 측정하였다. 공시험 보정 후 ΔA = A₂ - A₁ 값을 사용하여 정량하였고, 에탄올 표준용액(쌀떡·주스: 0.01-0.25 mg/mL, 고추장: 0.025-0.25 mg/mL)으로 검량선을 작성하였다. 효소분석법의 주요기

Table 1. Operating conditions for the enzymatic microplate assay and GC-FID

Instrument	Parameter	Conditions
Enzymatic assay	Instrument	Microplate reader (96-well plate, flat-bottom)
	Measurement wavelength	340 nm (NADH absorbance)
	Reaction temperature	25 °C
	Final reaction volume	0.257 mL per well
	Measurement mode	A ₁ at 2 min after mixing → add ADH → A ₂ at ~5 min
GC-FID	GC system	GC-FID equipped with HP-FFAP capillary column (50 m × 0.32 mm i.d., 0.50 µm film)
	Injection mode	Split (13:1), 1 µL injected
	Oven temperature program	50 °C (1 min) → 5 °C/min to 160 °C (1 min hold)
	Carrier gas	Helium, 1.0 mL/min
	Quantification	Peak area ratio of ethanol to internal standard (acetonitrile)

기 조건과 운전 파라미터는 Table 1에 요약하였다.

2.5. GC-FID 분석법

GC-FID 분석은 AOAC 984.14를 기반으로 하였다.¹⁰ 추출액에 아세토니트릴 내부표준을 첨가한 후 1 µL를 split 13:1 조건으로 주입하였다. 오븐 온도 프로그램은 50 °C에서 1 min 유지 후 5 °C/min 속도로 160 °C까지 승온하고 1 min 유지하는 조건을 사용하였다. 이때 에탄올과 아세토니트릴의 머무름 시간은 각각 약 9.47 min 및 11.5 min이었다. 검량선은 내부표준을 포함하는 매트릭스에서 0.01–0.25 mg/mL 범위의 에탄올 표준용액으로 작성하였으며, 에탄올/내부표준 피크 면적비를 이용해 정량하였다. GC-FID의 주요기 조건과 운전 파라미터는 Table 1에 요약하였다.

2.6. 밸리데이션 설계 및 계산

밸리데이션 항목과 허용 기준은 식품의약품안전처의 시험방법 밸리데이션 가이드라인과 AOAC 및 Codex Alimentarius Commission(Codex)에서 제시한 방법 성능 기준을 참고하여 설정하였다.¹⁴⁻¹⁹ 쌀떡의 첨가농도는 0.01, 0.05, 0.25 mg/mL, 고추장은 0.025, 0.075, 0.25 mg/mL, 주스는 0.01, 0.05, 0.25 mg/mL로 설정하였다. 효소분석법의 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각 매트릭스별 최저 첨가농도에서 24회 반복 측정된 ΔA 의 표준편차에 3배 및 10배 계수를 곱하여 산출하였고, GC-FID는 낮은 농도의 스파이크 시료 9회 주입에서 얻은 피크 면적비의 표준편차를 이용해 동일한 방식으로 계산하였다. 정밀도는 분석자 내 반복 정밀도 및 분석자 간 중간정밀도에 대한 RSD로 표현하였고, 정확도는 기저 에탄올 농도를 보정한 회수율(%)로 평가하였다. 허용기준은 $R^2 \geq 0.99$, 회수율 80–

120%, RSD는 가능하면 5% 이하로 하되, 복잡 매트릭스의 미량 분석 특성을 고려하여 10% 수준까지 수용 범위로 보았다.

또한 시판 제품 모니터링 결과는 매트릭스별로 두 분석법의 정량값을 1:1 비교(산점도)하여 일치선($y=x$) 기준으로 경향을 확인하였다. 방법 간 일치도 평가는 단순 상관성 분석에 의존하지 않고, Bland-Altman 분석을 적용하여 평균 편차(mean bias)와 95% 일치 한계(95% limits of agreement, LoA)를 산출하였다. 편차는 각 시료에서 효소분석법의 평균 정량값에서 GC-FID의 평균 정량값을 차감하여 계산하였으며, LoA는 $\text{bias} \pm 1.96 \times \text{표준편차}$ 로 산출하였다. 또한 큰 편차를 보인 시료에 대해서는 민감도 분석(sensitivity analysis)을 수행하여 해당 시료 제외 시 일치 한계의 변화를 확인하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. 효소분석법 및 GC-FID 분석법의 특이성

효소분석법의 특이성 평가는 ADH 첨가 유무에 따른 흡광도 변화(ΔA_{340})를 비교하여 수행하였다. AOAC 2019.08의 원리에 따라, ADH를 첨가하지 않은 well에서는 세 매트릭스 모두에서 ΔA 가 0.013 이하로 매우 작게 나타난 반면, 동일 시료에 ADH를 첨가한 조건에서는 떡, 고추장, 과·채 혼합주스에서 각각 약 0.237, 1.591, 0.529 수준의 뚜렷한 신호 증가가 관찰되었다. 이는 측정된 신호가 매트릭스 기인 비특이 반응이 아니라 에탄올의 효소적 산화 과정에서 생성된 NADH에 기인함을 시사한다.

GC-FID의 경우 AOAC 984.14 기반 조건에서 공시료 추출물의 크로마토그램에서는 에탄올 및 내부표준물

질의 머무름시간에서 방해 피크가 관찰되지 않았으며, 에탄올을 스파이킹한 시료에서는 세 매트릭스 모두에서 에탄올과 내부표준 피크가 충분한 분리도와 신호 세기를 보였다. 이상의 결과는 두 분석법 모두 떡, 고추장, 과·채 혼합주스와 같은 복합 식품 매트릭스에서 에탄올에 대한 선택성이 충분함을 보여준다.

3.2. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

민감도 평가는 각 매트릭스에 저농도 에탄올을 스파이킹한 후 반복 측정값의 표준편차(s_0)를 이용하여 검출한계(LOD, $3 \times s_0$)와 정량한계(LOQ, $10 \times s_0$)를 산출하였다.^{16,17} 효소분석법의 LOQ는 떡, 고추장, 과·채 혼합주스에서 각각 0.0304, 0.0759, 0.0487 mg/mL로 나타났으며, LOD는 0.0091–0.0228 mg/mL 범위였다 (Table 2). 동일 매트릭스에서 GC-FID의 LOQ는 각각 0.0368, 0.1088, 0.0457 mg/mL, LOD는 0.0110–0.0326 mg/mL 범위로 평가되었다 (Table 2).

전처리 및 회석 배율을 고려하여 원래 식품 중 에탄올 농도로 환산하면, 본 연구에서 확보한 LOQ 수준은 할랄

및 무알코올(NoLo) 표시에서 흔히 논의되는 허용 범위 (예: 0.1–0.5 % 수준의 산업용 에탄올 허용 논의, 국가·제도별 상이한 NoLo 정의)와 비교할 때 충분히 낮은 농도 영역까지 정량이 가능함을 의미한다.^{3,6} 특히 효소분석법은 고추장과 같이 점도와 색도가 높은 매트릭스에서도 GC-FID와 동등하거나 더 나은 LOQ를 보여, 저농도 에탄올 모니터링에 적합한 민감도를 확보한 것으로 판단된다.

3.3. 직선성 평가

검량선 직선성은 각 매트릭스에 대해 설정된 농도 범위에서 결정계수(R^2)를 통해 평가하였다. 효소분석법의 검량선 R^2 는 떡, 고추장, 과·채 혼합주스에서 각각 0.991, 0.993, 0.996으로 나타나, 사전에 설정한 수용 기준($R^2 \geq 0.99$)을 모두 만족하였다 (Table 2). GC-FID 방법의 R^2 는 모든 매트릭스에서 0.9998 이상(떡 및 고추장은 1.0000, 과·채 혼합주스는 0.9998)으로, 기준을 만족하는 직선성을 보여 주었다 (Table 2).

두 방법 모두 정량 구간 전반에서 응답이 농도에

Table 2. Validation performance of the enzymatic microplate assay and GC-FID for ethanol determination in Korean food matrices

Matrix	Method	Calibration range (mg/mL)	R^2	LOD (mg/mL) ^a	LOQ (mg/mL) ^a	Spike level (mg/mL)	Precision (RSD, %) ^b	Recovery (%) ^c
Rice cakes	Enzymatic assay	0.01–0.25	0.991	0.0091	0.0304	0.25	0.39	99.7 ± 0.4
						0.05	1.63	100.2 ± 1.0
						0.01	1.22	101.5 ± 1.7
	GC-FID	0.01–0.25	1.000	0.011	0.0368	0.25	1.04	94.2 ± 1.1
						0.05	1.14	102.1 ± 1.2
						0.01	4.06	94.7 ± 3.9
Gochujang	Enzymatic assay	0.025–0.25	0.993	0.0228	0.0759	0.25	3.93	100.3 ± 3.9
						0.075	2.95	97.7 ± 1.6
						0.025	2.35	99.4 ± 2.9
	GC-FID	0.025–0.25	1.000	0.0326	0.1088	0.25	1.58	103.5 ± 2.6
						0.075	2.51	99.3 ± 2.3
						0.025	3.54	98.6 ± 3.5
Fruit-vegetable beverage	Enzymatic assay	0.01–0.25	0.996	0.0146	0.0487	0.25	4.89	97.4 ± 4.8
						0.05	4.67	95.1 ± 0.5
						0.01	2.95	103.9 ± 4.9
	GC-FID	0.01–0.25	0.999	0.0137	0.0457	0.25	0.53	97.6 ± 4.2
						0.05	4.34	104.1 ± 3.1
						0.01	2.47	97.9 ± 2.4

a) LOD and LOQ were estimated from replicate measurements at the lowest spike level in each matrix ($3 \times s_0$ and $10 \times s_0$, respectively).

b) RSD values are based on recovery data; values are pooled across two analysts.

c) Mean recoveries were calculated after correction for native ethanol in each matrix; pooled means were used where two analysts contributed data

비례하는 양호한 직선성을 나타내었으며, 특히 고형(떡)과 반고형(고추장) 매트릭스에서 직선성이 크게 저하되지 않았다. 이는 단순 수용액뿐 아니라 점성이 높고 고형분이 많은 식품에서도 안정적인 정량이 가능함을 의미한다.

3.4. 정밀도 및 정확도

정밀도는 실험자 내 반복정밀도에 대한 상대표준편차(RSD, %)로 평가하였으며, 정확도는 시료의 기저 에탄올 농도를 보정한 회수율(%)을 지표로 하여 평가하였다(Table 2). 단일실험실 밸리데이션에서 적용 가능한 성능 판단 기준은 기관/가이드라인에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 직선성(R^2), 회수율 및 정밀도(RSD)를 함께 고려하여 적합성을 판단한다.

효소분석법에서 떡 매트릭스의 RSD는 실험자 내 기준 0.39–1.63 % 수준이었고, 전 농도 구간에서 평균 회수율은 99.7–101.5 %로 기준을 만족하였다. 고추장의 경우 RSD는 2.35–3.93 % 이었고, 평균 회수율은 97.7–100.3 %로 양호하였다. 과·채 혼합주스에서는 2.95–4.89 %의 RSD를, 95.1–103.9 %의 회수율을 나타내었다.

GC-FID 분석법은 세 매트릭스 전반에서 균일한 정밀도를 보여 RSD 범위가 0.53–4.34 % 수준에 머물렀으며, 평균 회수율 역시 94.2–104.1 %로 우수하였다(Table 2).

종합하면, 효소분석법은 일부 저농도 조건에서 RSD가 증가하는 경향이 있었으나, 회수율이 전반적으로

95.0–105.0 % 내에 위치하고 중·고농도 구간에서는 RSD가 1.0–5.0 % 수준에 머물러, 단일실험실 검증 기준(예: AOAC/IUPAC 가이드라인 등)^{15,17}을 고려할 때, 효소분석법은 본 연구의 3개 매트릭스에서 미량 에탄올 정량에 필요한 정확도·정밀도를 충족하는 것으로 판단된다. GC-FID는 정밀도 측면에서 우수하지만, 고가 장비와 숙련된 분석자, 상대적으로 긴 분석 시간을 필요로 한다는 점을 함께 고려할 필요가 있다.

3.5. 분석 효율성과 실용성 평가

실험실 운영 관점에서 효소분석법과 GC-FID의 가장 큰 차이는 시료 처리량, 분석 시간 및 비용이다. 효소분석법은 96-well 포맷을 사용하여 다수의 시료를 병렬로 처리할 수 있으며, 반응 단계 자체는 A_1 측정 전 평형(약 2 min)과 ADH 첨가 후 반응(약 5 min)으로 구성되어, 플레이트 단위 결과를 비교적 짧은 시간(전처리 제외 시 대략 1 h 이내)에 확보할 수 있다. 또한 본 연구 조건에서 시약 및 소모품(마이크로플레이트 포함)을 반영한 시료당 총 비용은 GC-FID의 시료당 분석 비용 대비 현저히 낮았다.

GC-FID 방법은 공인 시험법으로서의 높은 신뢰도와 참조 방법으로서의 위상을 가지고 있지만, 시료 1건당 오븐 프로그램 런타임이 약 25 min이며, 시료 전처리와 기기 안정화까지 고려하면 대량 모니터링에는 부담이 크다. 반면 효소분석법은 마이크로플레이트 리더와 기본적인 온도 유지 장비만으로 분석이 가능하여 장비 구축 부담이 상대적으로 낮고, 표준화된 절차에 따라

Table 3. Ethanol content of commercial rice cake products determined by GC-FID and the enzymatic assay (Unit : mg/mL)

Code	Product type	GC-FID (mean $\pm$ SD)	Enzymatic assay (mean $\pm$ SD)	Difference ^a
R1	Rice ball tteok	9.0 $\pm$ 0.6	8.5 $\pm$ 0.5	-0.5
R2	Rice soup cake	7.3 $\pm$ 0.5	7.0 $\pm$ 0.5	-0.3
R3	Rice soup cake	4.7 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.2	-0.8
R4	Rice soup cake	3.2 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.3	-0.2
R5	Glutinous rice soup cake	2.6 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.2	0.7
R6	Rice soup cake	11.5 $\pm$ 0.3	12.0 $\pm$ 0.1	0.5
R7	Rice soup cake	8.2 $\pm$ 0.1	9.2 $\pm$ 0.1	1.0
R8	Rice tteokbokki cake	2.3 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.5	0.2
R9	Rice garaetteok	2.0 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.0	0.8
R10	Plant-based tteokbokki cake	4.4 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.5	0.6
R11	Rice tteokbokki cake	4.9 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.6	-0.4
R12	Wheat tteokbokki cake	7.6 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.2	-3.3
R13	Wheat tteokbokki cake	3.8 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.3	0.1
R14	Rice tteokbokki cake	3.7 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.1	-0.2

a) Difference = mean value of the enzymatic assay – mean value of GC-FID.

운용이 가능하다는 장점이 있다.

따라서 효소분석법을 1차 스크리닝 및 일상 모니터링에 적용하고, 경제값에 근접하거나 분쟁 가능성이 있는 시료에 대해서는 GC-FID를 확인 시험으로 병행하는 단계적 적용 전략이 합리적인 것으로 판단된다.

3.6. 시판 제품 모니터링 결과 및 방법 간 일치도 밸리데이션 결과가 실제 시판 식품에 적용 가능한지

확인하기 위해, 떡(n=14), 고추장(n=12), 과·채 혼합음료(n=18) 시판 제품을 대상으로 에탄올 모니터링을 수행하였다. 모니터링 결과는 각 시료의 전처리 및 회석배율을 반영하여 시료 기준 농도(mg/mL)로 환산해 제시하였다(Table 3-5). 방법 간 차이는 절대차(mg/mL)와 함께 상대차(%)를 산출하였으며, 두 방법의 일치도는 Bland-Altman 분석을 통해 평균 편차(mean bias) 및 95 % 일치 한계(95% limits of agreement)를

Table 4. Ethanol content of commercial gochujang products determined by GC-FID and the enzymatic assay (Unit : mg/mL)

Code	Sample	GC-FID (mean $\pm$ SD)	Enzymatic assay (mean $\pm$ SD)	Difference ^a
G1	Rice-based gochujang	27.7 $\pm$ 1.5	25.6 $\pm$ 3.4	-2.1
G2	Commercial gochujang	31.7 $\pm$ 1.8	22.6 $\pm$ 3.3	-9.1
G3	Brown-rice gochujang	25.9 $\pm$ 1.7	24.0 $\pm$ 3.0	-1.9
G4	Taeyangcho gochujang	32.0 $\pm$ 2.2	32.0 $\pm$ 3.8	0.0
G5	Rice-based gochujang	23.8 $\pm$ 0.6	19.9 $\pm$ 3.5	-3.9
G6	Mild gochujang	30.5 $\pm$ 2.0	30.8 $\pm$ 0.9	0.3
G7	Hot gochujang	30.2 $\pm$ 2.1	29.2 $\pm$ 3.1	-1.0
G8	Hot gochujang	34.5 $\pm$ 0.1	32.5 $\pm$ 2.8	-2.0
G9	Premium gochujang	32.3 $\pm$ 1.9	31.0 $\pm$ 8.1	-1.3
G10	Rice-based gochujang	36.6 $\pm$ 2.5	35.6 $\pm$ 3.2	-1.0
G11	Traditional-style gochujang	48.7 $\pm$ 2.7	48.5 $\pm$ 3.8	-0.2
G12	Low-sodium gochujang	26.8 $\pm$ 0.5	25.4 $\pm$ 2.4	-1.4

a) Difference = mean value of the enzymatic assay – mean value of GC-FID.

Table 5. Ethanol content of commercial fruit beverages determined by GC-FID and the enzymatic assay (Unit : mg/mL)

Code	Sample	GC-FID (mean $\pm$ SD)	Enzymatic assay (mean $\pm$ SD)	Difference ^a
J1	Pomegranate low-sugar 1.5 L	0.43 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.02	-0.03
J2	Maesil low-sugar 1.5 L	0.13 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.01	-0.03
J3	Orange 100% 1.5 L	0.38 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.03	-0.07
J4	Mango low-sugar 1.5 L	0.35 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.02	-0.05
J5	Grape 100% 1.5 L	0.59 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.03	0.03
J6	Stevia tomato 1.5 L	0.25 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01	0.05
J7	Apple drink 235 mL	0.50 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.05	0.07
J8	Pear drink 210 mL	0.29 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.02	0.04
J9	Orange-mango 200 mL	0.25 $\pm$ 0.00	0.24 $\pm$ 0.01	-0.01
J10	Orange 200 mL	0.25 $\pm$ 0.00	0.26 $\pm$ 0.04	0.01
J11	Safari 200 mL	0.27 $\pm$ 0.00	0.26 $\pm$ 0.00	-0.01
J12	Apple 200 mL	0.24 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.02	-0.04
J13	100% apple 730 mL	0.10 $\pm$ 0.00	0.15 $\pm$ 0.00	0.05
J14	Tomato 180 mL	0.26 $\pm$ 0.00	0.27 $\pm$ 0.03	0.01
J15	Grape 180 mL	0.59 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.09	-0.06
J16	Orange 180 mL	0.40 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.02	0.08
J17	Apple drink zero 190 mL	0.54 $\pm$ 0.01	0.52 $\pm$ 0.05	-0.02
J18	Grape drink 190 mL	0.16 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01	-0.01

a) Difference = mean value of the enzymatic assay – mean value of GC-FID.

Table 6. Bland–Altman analysis for agreement between the enzymatic assay and GC–FID

Matrix	n	Mean bias ^a	SD ^b	95% LoA ^c
Rice cakes	14	-0.13	1.06	-2.21 to 1.95
Rice cakes (excluding R12)	13	0.12	0.57	-0.99 to 1.22
Gochujang	12	-1.97	2.51	-6.89 to 2.96
Gochujang (excluding G2)	11	-1.32	1.18	-3.63 to 0.99
Fruit–vegetable beverages	18	0.00	0.05	-0.09 to 0.09

a) Bias = mean of paired differences (enzymatic assay – GC–FID).

b) SD = standard deviation of paired differences.

c) 95% limits of agreement (LoA) = bias $\pm$ 1.96 SD.

R12 (rice cake) and G2 (gochujang) were excluded in sensitivity analyses due to relatively large deviations.

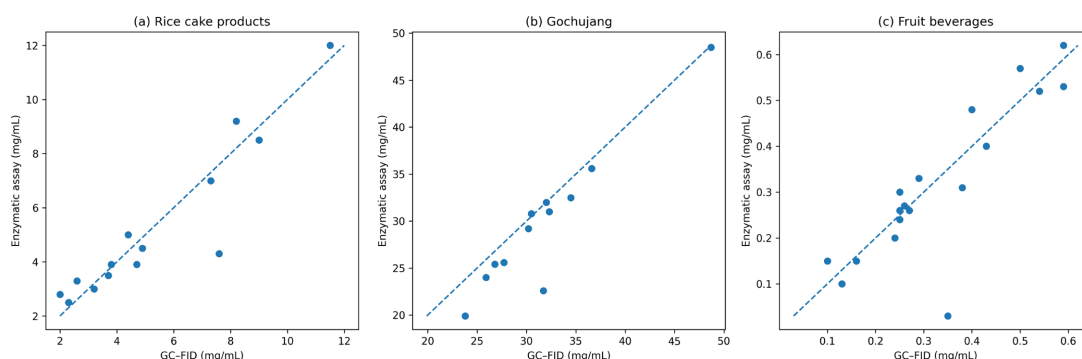


Fig. 1. Comparison of ethanol concentrations determined by GC–FID and the enzymatic assay in different food matrices: (a) commercial rice cake products (n = 14), (b) commercial gochujang samples (n = 12), and (c) commercial fruit beverages (n = 18). Each point represents one product. All values are expressed as mg/mL. The dashed line indicates the line of identity ($y = x$).

평가하였다(Table 6).¹⁸

떡 제품의 에탄올 농도는 GC–FID 기준 2.0–11.5 mg/mL, 효소분석법 기준 2.5–12.0 mg/mL 범위였다. 평균 편차는 -0.13 mg/mL, 95% 일치 한계는 -2.21와 1.95 mg/mL 사이로 나타나 전반적인 체계적 편향은 크지 않았다. 다만 떡(R12)에서 -3.3 mg/mL의 비교적 큰 음의 편차가 확인되었으며, 이는 복합 전분·단백질 매트릭스 특성에 따른 추출 효율 차이 또는 잔류 미세 고형분에 의한 광 산란 간섭 가능성을 시사한다. 흡광 기반 분석에서는 탁도 및 색도 성분이 측정 신호에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고되어 있으며, 이러한 매트릭스 요인이 일부 시료에서 편차 확대에 기여했을 가능성이 있다.¹⁹

고추장은 GC–FID 기준 23.8–48.7 mg/mL, 효소분석법 기준 19.9–48.5 mg/mL 범위로 나타났으며, 평균 편차는 -1.97 mg/mL, 95% 일치 한계는 -6.89와 2.96 mg/mL 사이였다. 효소분석법이 다소 낮은 값을 나타내는 경향이 관찰되었으며, 특히 G2 시료에서 -9.1

mg/mL의 큰 음의 편차가 확인되었다. 고추장은 발효 과정에서 생성된 색소, 유기산, 염류 및 다양한 저분자 화합물이 공존하는 복합 매트릭스로 알려져 있으며, 이러한 성분들은 효소 반응계 또는 NADH 흡광 측정에 영향을 미칠 수 있다. 발효식품에서의 매트릭스 효과는 식품 분석 분야에서 일반적으로 보고되어 있으며, 이는 고염·고색도 매트릭스에서 편향을 유발할 수 있는 요인으로 고려된다. 또한 GC–FID 분석 과정에서의 전처리 및 내부표준 보정 차이도 일부 편차에 기여했을 가능성을 배제할 수 없다.^{20–21}

과·채 혼합음료는 GC–FID 기준 0.10–0.59 mg/mL, 효소분석법 기준 0.10–0.62 mg/mL 범위였으며, 평균 편차는 0.00 mg/mL, 95% 일치 한계는 -0.09와 0.09 mg/mL 사이로 나타나 두 방법 간 일치도가 매우 우수하였다. 저점도·저고형분 매트릭스에서는 광학적 간섭 요인이 상대적으로 적어 효소 기반 정량이 안정적으로 수행되는 것으로 판단된다.

세 매트릭스를 통합한 산점도(Fig. 1)에서도 대부분의

데이터가 $y = x$ 직선 부근에 분포하였으며, 통계적 평가 결과 전반적으로 유의한 비례 편향은 관찰되지 않았다. 일부 복합 매트릭스 시료에서 편차 확대 사례가 확인되었으나, 이는 매트릭스 간섭, 추출·희석 과정의 변동성, 또는 효소 반응계의 특이적 영향에 기인한 것으로 해석된다. 이러한 특성을 고려할 때, 효소분석법은 대량 모니터링 및 1차 스크리닝 목적에 적합하며, 고염·고색소 또는 경계값 근접 시료에 대해서는 GC-FID를 확인시험으로 병행하는 전략이 분석 신뢰도를 높일 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 효소 기반 미세플레이트 분석법을 쌀떡, 고추장, 과·채 혼합음료에 적용하여 밸리테이션을 수행하고, AOAC 984.14 기반 GC-FID 방법과 분석 성능 및 방법 간 일치도를 비교하였다. 효소분석법은 세 매트릭스에서 우수한 직선성($R^2 \geq 0.991$), 0.030–0.076 mg/mL 범위의 정량한계, 약 95.0–105.0 % 수준의 평균 회수율 및 실용적인 정밀도를 확보하였다.

시판 제품 44건을 대상으로 한 Bland-Altman 분석 결과, 떡 및 과·채 혼합음료에서는 평균 편차가 거의 0에 근접하거나 매우 제한적인 범위로 나타났으며, 고추장에서는 다소 음의 편향 경향이 관찰되었으나 전반적으로 허용 가능한 범위 내에 분포하였다. 일부 복합 매트릭스 시료에서 큰 편차가 확인되었으나, 이는 전분·고형분, 고염·고색소 성분 등에 의한 매트릭스 간섭 가능성을 시사한다.

종합적으로 효소분석법은 GC-FID와 통계적으로 비교 가능한 정량 성능을 보였으며, 고처리량 모니터링 목적에 적합한 실용적 대안 분석법으로 활용 가능하다. 다만 복합 매트릭스 또는 경계값 근접 시료에 대해서는 GC-FID를 확인시험으로 병행하는 2단계 전략이 현장 적용 측면에서 합리적이다. 향후 다양한 식품군에 대한 적용 사례 확대와 다기관 공동연구를 통해 재현성을 추가 검증함으로써, 참조 분석법과의 조합 운용 및 현장 표준화 적용 기반을 더욱 강화할 필요가 있다.

감사의 글

이 논문은 2025년 네오젠코리아 유한회사와 한국식품연구원으로부터 지원을 받아 수행된 결과(10250400-01, T1260100-01)로 이에 감사드립니다.

References

1. E. Gorgus, M. Hittinger, and D. Schrenk, *J. Anal. Toxicol.*, **40**, 537-542 (2016). <https://doi.org/10.1093/jat/bkw046>
2. S. Reimann, T. Pflaum, E. Gorgus, K. Gunkel, D. W. Lachenmeier, and D. Schrenk, *Food Chem. Toxicol.*, **173**, 113633 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113633>
3. A. O. Okaru and D. W. Lachenmeier, *Nutrients*, **14**, 3873 (2022). <https://doi.org/10.3390/nu14183873>
4. J. Alzeer and K. A. Abou Hadeed, *Trends Food Sci. Technol.*, **58**, 14-20 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.018>
5. M. van der Spiegel, H. J. van der Fels-Klerx, P. Sterrenburg, S. M. van Ruth, I. M. J. Scholtens-Toma, and E. J. Kok, *Trends Food Sci. Technol.*, **27**, 109-119 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.04.005>
6. N. Pauzi, S. Man, A. H. Abas, A. Zulfakar, and M. S. A. M. Nawawi, *Trends Food Sci. Technol.*, **86**, 375-380 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.042>
7. S. Ramalingam, A. Bahuguna, S. Lim, A.-R. Joe, J.-S. Lee, S.-Y. Kim, and M. Kim, *Foods*, **11**, 375 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11030375>
8. S. H. Park, J. Y. Kim, R. N. Yu, K. Y. Kim, Y. S. Lee, S. H. Lee, and B. S. Noh, *LWT - Food Sci. Technol.*, **74**, 563-570 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.030>
9. D. H. Oh and H. Kim, *Foods*, **10**, 2291 (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10102291>
10. AOAC INTERNATIONAL, Official Method 984.14-1988, Ethanol in beer. Gas chromatographic method, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA (1988).
11. AOAC INTERNATIONAL, Official Method 2019.08, Ethanol concentration in kombucha beverages, Enzymatic method, First Action 2019, Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, AOAC INTERNATIONAL, Rockville/Gaithersburg, MD, USA (2019).
12. R. Ivory, E. Delaney, D. Mangan, and B. V. McCleary, *J. AOAC Int.*, **104**, 422-430 (2021). <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa122>
13. Neogen Megazyme, Ethanol Assay Kit (microplate format) Instruction Booklet, Neogen Megazyme, Bray, Ireland (accessed 2025).
14. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Guide to Validation of Test Methods, Cheongju, Korea (2012).

15. AOAC INTERNATIONAL, Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2016).
16. Codex Alimentarius Commission, Guidelines on Analytical Terminology (CXG 72-2009), FAO/WHO, Rome, Italy (2009).
17. M. Thompson, S. L. R. Ellison, and R. Wood, *Pure Appl. Chem.*, **74**, 835-855 (2002). <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>
18. D. Giavarina, *Biochem. Med.*, **25**, 141-151 (2015). <https://doi.org/10.11613/BM.2015.015>
19. Eurachem, Use of uncertainty information in compliance assessment, 2nd ed., Eurachem Guide (2019). <https://www.eurachem.org>
20. P. J. Taylor, *J. Chromatogr. A*, **1058**, 1-10 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.034>
21. N. Gros, T. Gorjanc, and A. B. S. Prezelj, *Trends Anal. Chem.*, **37**, 1-15 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.005>