

기술 정보

# 단백질과 폴리페놀에 의한 음료의 혼탁현상

이 부 용  
 특용작물가공팀

맥주나 포도주, 청정과일주스에서 발생하는 혼탁이나 침전물 문제는 여러가지 원인이 있으나(그림 1 참조) 대부분은 단백질과 폴리페놀류들의 상호반응때문에 발생한다. 따라서 이런 음료류들은 지금까지 단백질과 폴리페놀 반응에 의한 혼탁생성의 시작을 늦추는 측면에서 제품의 안정성을 추구해 왔다.

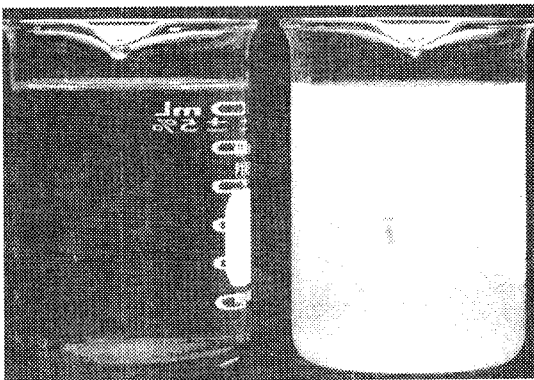


그림 1. 청정 및 혼탁 사과주스

단백질이나 폴리페놀들이 혼탁형성물질(HA, Haze-Active)이라는 보고는 1982년 Asano등, 1987년 Moll등이 하였으며, 최근 1996년에

Siebert등은 단백질과 폴리페놀 두 물질의 비율에 따라 혼탁물질의 생성량이 달라진다는 연구결과를 발표하여 혼탁형성물질을 측정하는 분석법과 혼탁방지 등의 안정화 연구에 큰 진전을 이끌어 냈다.

음료에서 혼탁형성물질의 실체를 밝히기 위한 많은 연구들이 수행되었는데, 맥주에서 생성된 혼탁물질은 상당한 양의 탄수화물, 과량의 단백질 및 소량의 폴리페놀로 구성되어 있었다. 탄수화물은 상당한 양이 다른 성분들과 함께 응집되어 혼탁을 형성하기 때문에 시간이 지남에 따라 혼탁물질속에서 그 농도가 계속 증가하는 것이다. 그러나 이런 음료류에서 안정성을 높이기 위해서 탄수화물들을 제거시키기 위한 특별한 처리를 하기보다는 단백질과 폴리페놀의 함량을 낮추는 것이면 충분할 것으로 판단된다.

맥주는 혼탁을 형성하는 단백질의 함량은 높지만 혼탁형성 폴리페놀의 함량은 낮다. 반면에 사과주스의 경우는 반대이고, 포도주스의 경우 혼탁형성 단백질 함량은 높지만 혼탁형성 폴리페놀 물질의 함량은 경우에 따라 다양하다. Vinifera 품종으로 제조한 백포도주의 경우 혼탁형성 폴리페놀 함량이 대개 낮지만 미국산 포도 품종으로 제조한 백포도

주는 폴리페놀 함량이 매우 높으며, 교배종들은 중간 정도의 함량을 갖는다. 백포도주의 혼탁형성 단백질 함량은 낮으며, 적포도주는 백포도주보다 높은 폴리페놀 함량을 갖고 있다. Vinifera나 미국산 품종으로 제조한 적포도주의 혼탁형성 단백질 함량은 낮지만 교배품종으로 제조한 포도주의 단백질 함량은 적당한 중간 정도이다.

## 1. 혼탁형성 단백질과 폴리페놀

맥주의 혼탁형성 단백질은 아미노산 분석 결과 주로 보리의 hordein이라는 단백질로부터 유래된 것으로 나타났다. 카테킨(catechin)이 함유된 모델 시스템에서 혼탁의 생성량은 단백질 중의 프롤린(proline) 함량과 비례하여 증가하였다. 즉 프롤린이 함유되지 않은 많은 단백질들은 혼탁을 일으키지 않았다.

맥주의 혼탁형성 단백질에 대해서는 잘 알려져 있지만 과일주스나 포도주의 경우에는 상대적으로 제대로 밝혀져 있지 않다. 맥주에서의 연구처럼 많은 학자들은 혼탁형성 단백질들이 일정한 범위의 분자량과 등전점을 갖고 있음을 알아냈으며, 분리된 단백질들의 아미노산 조성도 밝혀보았지만 불행하게도 많은 분석에서 분석법 자체가 프롤린의 함량까지 측정할 수 있는 분석방법을 사용하지 않아서 큰 실수를 했었다.

사과주스에서 분리된 혼탁물질을 분석한 결과 혼탁형성 단백질중 프롤린 함량이 5~16%나 되었다. 이것은 곡류(보리)와 과일(사과)이 함량은 서로 다르다 할지라도 혼탁형성 단백질에는 모두 프롤린이 많이 함유되어 있다는 것을 암시하는 결과이다.

혼탁형성 폴리페놀의 경우에는 간단한 페놀들이나 대부분의 폴리페놀들이 모델 시스템에서는 맥주의 혼탁형성 단백질들과 결합하여도 혼탁을 일으키지 않았다. 에피카테킨(epicatechin)이나 카테킨은 가열했을때 소량의 혼탁을 일으켰으며, dimers나 프로안토시아닌(proanthocyanidin)의 중합도 정도가 증가할수록 혼탁형성 능력은 증가하는

것으로 나타났다.

일반적으로 맥주에서 발견되는 혼탁형성 폴리페놀들은 프로안토시아닌들로서 카테킨, 에피카테킨, 갈로카테킨(gallocatechin)들의 monomer나 dimer, trimer, polymer들이 있다. 프로안토시아닌의 중합도 정도가 ring구조에 있는 OH기의 숫자보다도 더 크게 혼탁형성에 영향을 미친다. 맥주의 혼탁형성에 대해서는 민감한 단백질들(혼탁을 일으키는 탄닌들)이나 dimeric proanthocyanidins(catechin-catechin-), procyanidin B<sub>3</sub>(gallocatechin-catechin)들에 의한 생성물로 잘 설명되고 있다. 이 혼탁형성 모델 시스템은 proanthocyanidin 만을 고려하고 있지만 매우 성공적으로서, 맥주는 보리의 가공 과정에서 성분의 손실이 생기고 malt로부터 추출되어 나오는 양도 제한되어 있기 때문에 실제 맥주속에 존재하는 trimer나 고중합화합물의 양은 매우 적다. 사과주스에 많이 함유되어 있는 proanthocyanidin은 procyanidin B<sub>2</sub> (epicatechin-epicatechin), 이며 포도주스는 procyanidin B<sub>1</sub>(epicatechin-catechin), B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>(catechin-epicatechin)등을 함유하고 있다.

## 2. 혼탁형성 단백질과 폴리페놀 사이의 반응

단백질과 폴리페놀 반응에 대해서는 많은 연구가 진행되었다. 적어도 반응의 초기 단계에서는 공유결합이 관여하지는 않는 것으로 나타났다. 왜냐하면 대부분의 혼탁은 부분적으로 냉각될 때 발생하며, 혼탁된 음료가 가온되면 혼탁물질이 용해되는 것으로 관찰되기 때문이다. 일반적으로 단백질과 폴리페놀 결합은 수소결합과 소수성 결합의 조합으로서 최근 연구결과에 의하면 폴리페놀과 프롤린 함유 펩타이드 사이의 반응에는 두 화합물이 중첩되는 P-결합의 복합물을 형성하기도 한다고 보고되고 있다.

혼탁형성 단백질(gelatin, gliadin 등)이나 혼탁

형성 폴리페놀(tannic acid 등)들이 여러가지 함량 비율로 결합하는 예가 모델 시스템으로 그림 2에 나타나 있다. 단백질 함량이 일정하고 폴리페놀 함량이 증가하면 혼탁이 증가되면서 폴리페놀 함량이 감소한다. 마찬가지로 폴리페놀 농도가 일정할 때 단백질함량이 증가하면 혼탁 역시 최고에 달하며 단백질 함량이 감소하기 시작한다.

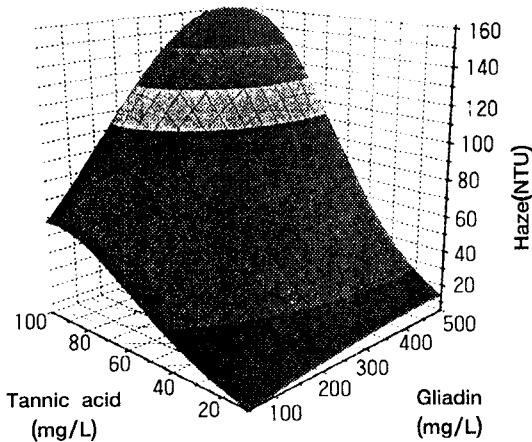


그림 2. 모델시스템내에서 혼탁형성에 대한 gliadin과 tannic acid의 비율 영향

위와같은 현상을 설명할 수 있는 모델이 그림 3과 같이 제안되었다. 혼탁형성 단백질이 한개의 폴리페놀이 붙을 수 있는 고정된 숫자의 부위를 갖고 있고(대개는 proline 잔기), 혼탁형성 폴리페놀들은 혼탁형성 단백질이 붙을 수 있는 두개나 그 이상의 부위를 갖고 있어서 폴리페놀의 총 말단갯수가 단백질의 결합부위 갯수와 일치할때 결과적으로 콜로이드 입자나 빛의 산란현상에 상응하는 큰 network결합이 발생한다는 것이다. 혼탁형성 폴리페놀에 비해 과량의 혼탁형성 단백질이 존재하면 각각의 폴리페놀 분자들은 두개의 단백질에 결합해야만 한다. 그러나 믿기지 않지만 폴리페놀 분자가 샌드위치처럼 사이에 끼거나 단백질과 dimer를 형성한다고 생각된다. 한편 입자의 크기가 작을수록 혼탁은 덜 형성된다. 혼탁형성 단백질에 비해서 과

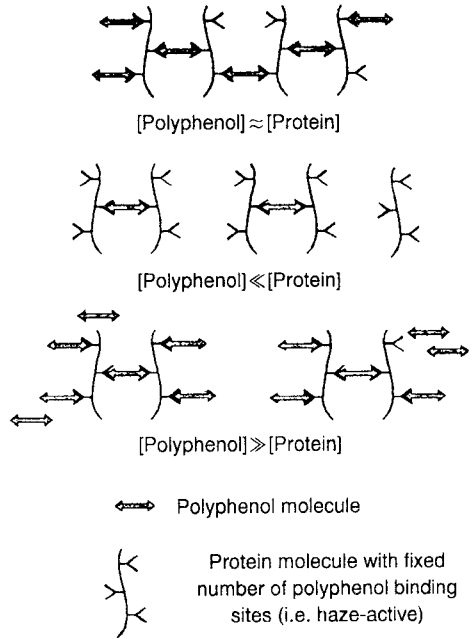


그림 3. 단백질과 폴리페놀 반응의 개념적 기작

량의 혼탁형성 폴리페놀이 존재할때는 단백질의 거의 모든 결합부위가 채워져서, 단백질에 결합되어 있는 한개의 폴리페놀분자가 결합할 수 있는 부위를 갖고 있는 또다른 단백질 분자를 발견하기는 매

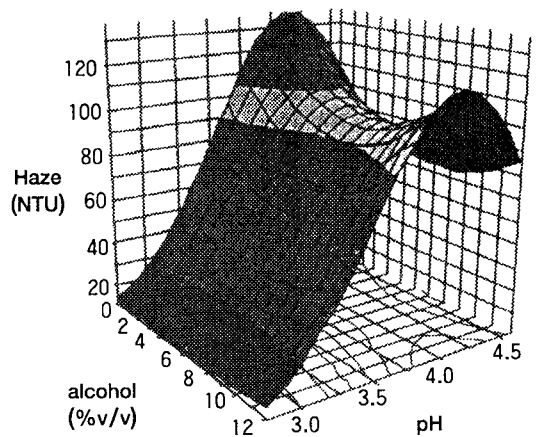


그림 4. 275mg/L의 gliadin과 55mg/L의 tannic acid 농도에서 혼탁형성에 대한 에탄올과 pH의 영향.

우 어렵다. 결과적으로 입자가 작을수록 빛의 산란 현상이 적다. 즉 혼탁현상이 적게 나타난다.

Siebert 등은 모델시스템에서 pH와 에탄올 농도에 따른 혼탁형성 현상을 관찰했는데 그림 4와 같이 pH가 큰 영향을 미치고 있음을 알아냈다.

같은 양의 폴리페놀과 단백질이 존재할 때 pH 3.0보다는 pH 4.0~4.2 사이에서 더 많은 혼탁이 형성되었으며 pH 4.2 이상에서는 혼탁이 감소되었다. 이 현상은 단백질의 등전점을 기준으로 하여 그 이상이나 이하의 pH에서 단백질이 띠는 전하량에 따라 영향을 받는 것으로 판단된다. 포도주스나 포도주의 pH 근처에서는 에탄올이 혼탁에 별 영향을 미치지 못하지만 맥주나 사과주스의 pH에서는 에탄올 농도가 증가할 수록 혼탁이 완만하게 감소한다. 비극성 용매가 혼탁형성을 방지할 수 있다고 알려져 있으므로 에탄올과 같은 반극성 용매도 어느 정도까지는 혼탁형성을 방지 할 수 있다고 판단된다. 그러나 농도가 너무 높으면 단백질의 침전을 야기시키기도 한다.

### 3. 안정화의 기작

음료의 혼탁형성을 방지하기 위한 안정화에 대한 많은 연구가 진행되었다. 그림 3에서 본것과 같이 맥주에서는 혼탁형성 물질을 제거시키고 거품형성 단백질을 보존시키는 것이 바람직하다. 전통적인 방법은 발효가 끝난 맥주를 탱크에 넣고 인위적으로 어는점 바로 위까지 냉각을 시켜서 혼탁을 형성시킨뒤 침전물 형태로 혼탁 물질을 제거시켜 왔다. 그러나 이 방법은 수개월동안 탱크를 채워 놓아야 하기때문에 몇몇의 대형 회사들만이 할 수 있었다. 종종 이 과정을 단축시키기 위해서 gelatin이나 isinglass, tannic acid 등으로 정제하고, 규조토 등을 이용하여 냉각상태에서 정밀 여과를 시키기도 한다. 오늘날 맥주의 안정화에 사용되는 대부분의 처리 방법은 혼탁을 일으킬 수 있는 단백질이나 폴리페놀들을 제거시키는 마무리 제제나 흡착제를 사용하는 것이다.

Bentonite는 혼탁형성 단백질뿐만 아니라 거품형성 단백질까지 제거시키기 때문에 상업적으로 적용하기에는 적당하지 못하다. Silica gel(hydrogel 이나 xerogel 등)들은 너무 많이만 사용하지 않는다면 거품형성 단백질에 영향을 주지 않고 그림 5나 6과 같이 혼탁형성 물질들을 제거시킨다. 이와같이 선별성은 silica gel이 혼탁형성 단백질의 혼탁형성 폴리페놀이 결합하는 부위에 가서 결합하기 때문이다. 폴리페놀이 많이 함유되어 있는 음료에서는 silica gel이 맥주에서 처럼 작용을 못하는데 그 이유는 단백질 중의 대부분의 프롤린 부위가 이미 폴리페놀들에 의해 결합되었기 때문이다. PVPP(poly vinyl poly pyrrolidone)는 혼탁형성 폴리페놀들을 흡착하는데, polyproline과 유사하게 5개의 질소함유 ring구조를 갖고 있으며 amide 결합도 갖고 있다. 최근 연구결과에 의하면 PVPP와 혼탁형성 단백질들이 같은 방식으로 혼탁형성 폴리페놀에 결합하는 것으로 나타났다. PVPP는 맥주에서보다는 폴리페놀이 많이 함유된 음료에서 더욱 효과적이라고 알려져 있다. 맥주에서는 대부분의 혼탁형성 폴리페놀들이 혼탁형성 단백질의 양쪽 끝부위에 결합하기 때문에 PVPP와 같은 흡착제는 활용될 수가 없다.

Bentonite는 종종 과일주스나 포도주의 안정화에 사용된다. 이것은 단백질들을 구별하지 않고 효과적으로 모두 제거시키기 때문이다. 모든 단백질들을 제거시키는 한외여과 방법도 과일주스의 안정화 방법으로 많이 사용되지만 맥주에서는 혼탁형성 단백질뿐만 아니라 거품형성 단백질까지 제거시키므로 바람직하지 못하다.

### 4. 분석 방법에 대한 영향

음료류에 함유되어 있는 총 단백질 중 일부만이 혼탁형성에 참여하게 되는데 아미노산 조성은 좀 특별하다. 즉 모든 경우에서 프롤린 함량이 높으며 맥주의 경우에는 글루타민(glutamine)의 함량도 높다. 결과적으로 많은 일반적인 단백질 분석 방법

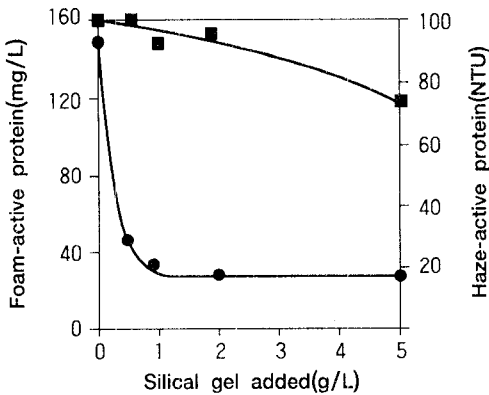


그림 5. 맥주의 혼탁형성 단백질(●)과 거품형성 단백질(■)에 대한 silica hydrogel 처리의 영향

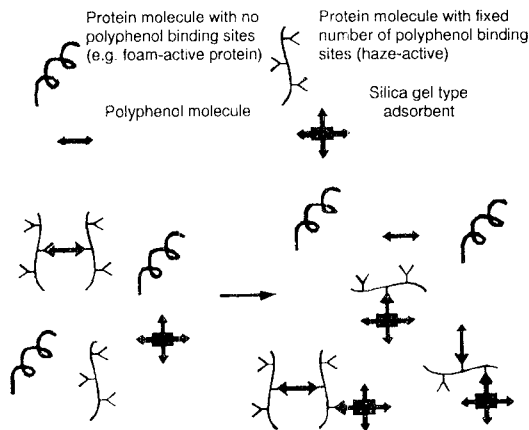


그림 6. 맥주속의 혼탁형성 단백질에 대한 silica gel의 흡착기작. Silica gel은 단백질의 프롤린 잔기와 결합하여(이 잔기에는 폴리페놀도 같이 결합한다) 혼탁형성을 방지한다.

들의 가정이 적용되지 않을 수도 있는 것이다.

Coomassie blue 염료는 보통 용액속의 단백질 양이나 전기영동 겔의 단백질을 정량하는데 사용되고 있다. 그러나 이 Bradford 방법은 bovine serum albumin을 표준 물질로 검량선을 작성하여 맥주의 단백질량을 측정해보면 실제 함유되어 있는 단백질 중 약 1/7밖에 검출하지 못하는 문

제가 있다. 이것은 Coomassie blue가 아르기닌(arginine)같은 염기성 및 방향족 아미노산이 많이 포함된 단백질에는 민감하게 반응하고 이것들이 덜 함유된 단백질에는 거의 반응을 안하기 때문이다. 보리에 있는 hordein 단백질은 프롤린(약 20 mole%)과 글루타민(약 30 mole%)을 많이 함유하고 있는데 이 아미노산들의 중합체는 Coomassie blue와 거의 반응을 하지 않기 때문에 공정중에 hordein은 많이 제거되어 맥주에는 거의 함유되어 있지 않다. 맥주에 함유되어 있는 평균적인 단백질 함량보다도 hordein은 적게 반응하는 것이다. 즉 더 적은 함량으로 측정된다는 것이다. 포도주의 혼탁형성 단백질도 맥주의 경우와 유사하게 Coomassie blue로 정량하면 50~80% 정도만이 검출된다.

Bichinchonic acid에 의한 단백질 분석법은 Coomassie blue보다는 혼탁형성 단백질에 대한 분석오차가 적다. 그러나 이 물질은 1차 아민으로 구성된 펩타이드와는 직선적으로 반응하지만 프롤린의 중합체인 polyproline이나 hydroxyprolin과 같은 2차 아민의 중합체와는 곡선 형태(curvilinear)로 비례 반응한다. 따라서 아직 프롤린이 많이 함유되어 있는 단백질들에 대한 영향은 잘 알려져 있지 않다.

위에서 계속 설명한 'sensitive protein' 분석법의 일종인 turbidimetric 분석법은 혼탁을 형성하는 폴리페놀과 반응하는 단백질 양에 비례하여 반응한다는 장점을 갖고 있지만 혼탁이 형성되는 동안의 혼탁형성 폴리페놀에 반응하는 혼탁형성 단백질만이 반응하므로 내재하는 폴리페놀들이 영향을 미치게 된다. 혼탁형성 단백질 함량이 낮은 음료(사과주스 등)에서는 혼탁형성 단백질 양이 거의 없어서 첨가되는 tannic acid가 거의 반응을 일으키지 않는다.

지금까지 설명한 민감한 단백질을 기준으로 하여 단백질함량을 분석하는 것과 마찬가지로 시료에다가 혼탁형성 펩타이드를 더 첨가하여 혼탁형성 폴리페놀의 양을 측정하는 turbidimetric 방법도 개

발되었다.

젤라틴은 사과주스에서 상당한 반응을 나타내지만 맥주에서는 별 반응을 하지 않는다. polyprolin은 더욱 효과적인데 이것은 혼탁형성 폴리페놀에 결합할 때 혼탁형성 단백질보다 더 우세하게 결합하기 때문이다. polyprolin은 포도주나 사과주스의 혼탁형성 폴리페놀을 정량하는데 있어서 젤라틴보다 훨씬 직선적으로 비례하여 반응한다. 한편 합성된 polyprolin은 넓은 범위의 분자량을 갖는 polyprolin들로 구성되어 있어서 반응시 직선상이 아닌 곡선상으로 비례하는 경향도 있음을 알아야 한다.

## 5. 앞으로의 연구전망

단백질과 폴리페놀의 반응에 대한 많은 흥미있는 사실들이 밝혀 졌지만 아직도 우리는 포도주와 과일주스 속의 혼탁형성 단백질에 대해서는 잘 모르고 있다. 이 반응의 정확한 본질과 이에 대한 pH의 영향에 대한 많은 연구가 있어야 하겠다. 혼탁형성물들의 입자 크기가 과연 혼탁형성 단백질과 폴리페놀의 함량비에 따라 달라지는지 검증해보는 것도 매우 흥미있는 일이다. 앞으로 혼탁형성 단백질과 폴리페놀의 반응에 대한 더 많은 연구 결과와 이해가 있어야 효율적인 혼탁방지 기술이 확립될 것으로 보인다. 이와 더불어 혼탁형성물질의 정확한 측정법과 제품의 유통기간 예측법도 좀 더 개선되어야 한다.

## 참 고 문 헌

- Asano, K., Shinagawa, K., and Hashimoto, N. 1982. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 40(4):147-154.
- Belleau, G. and Dadic, M. 1981. Beer hazes. II. Further analyses of basic components by high performance liquid chromatography. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 39(4):142-146
- Beveridge, T. and Tait, V. 1993. Structure and composition of apple juice haze. *Food Structure* 12(2):195-198
- Bianco, A., Chiacchio, U., Rescifina, A., Romeo, G., and Uccella, N. 1997. Biomimetic supramolecular biophenol-carbohydrate and biophenol-protein models by NMR experiments. *J. Agric. Food Chem.* 45:4281-4285
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bio-chem.* 72(1/2):248-254
- Compton, S. J. and Jones, C.G. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 151:369-374
- Eastmond, R. and Gardner, R.J. 1974. Effect of various polyphenols on the rate of haze formation in beer. *J. Inst. Brew.* 80(2):192-200.
- Hii, V. and Herwig, W.C. 1982. Determination of high molecular weight proteins in beer using Coomassie blue. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 40(2):46-50
- Hsu, J.C., Heatherbell, D.A., Flores, J.H., and Watson, B.T. 1987. Heat-unstable proteins in grape juice and wine. II. Characterization and removal by ultrafiltration. *Am. J. Enol. Vitic.* 38(1):17-22
- Jerumanis, J. 1979. Separation et identification de fla-vanoides par chromato-

- graphie liquide a haute performance (HPLC). [Separation and identification of flavanoids by high-performance liquid chromatography(HPLC).] In Proc. of European Brewery Convention, 17th Congress, Berlin, pp. 309-319.
- Johnson, G., Donnelly, B.J., and Johnson, D.K. 1968. The chemical nature and precursors of clarified apple juice sediment. *J. Food Sci.* 33:254-257
- McMurrough, I., Kelly, R., and Byrne, J. 1992. Effect of the removal of sensitive proteins and proanthocyanidins on the colloidal stability of lager beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 50(2):67-76.
- Moll, M. 1987. Colloidal stability of beer. In "Brewing Science", Vol. 3, ed. J.R.A. Pollock, pp. 1-327. Academic Press, New York.
- Mulkay, P. and Jerumanis, J. 1983. Effets du poids moleculaire et du degre d'hydroxylation des proanthocyanidines sur la stabilite colloïdale de la biere. [Effects of molecular weight and degree of hydroxylation of proanthocyanidins on the colloidal stability of beer.] *Cerevisia* 8(1):29-35.
- Siebert, K.J. and Lynn, P.Y. 1997a. Haze-active protein and polyphenols in apple juice assessed by turbidimetry. *J. Food Sci.* 62:79-84.
- Siebert, K.J. and Lynn, P.Y. 1997b. Mechanisms of adsorbent action in beverage stabilization. *J. Agric. food Chem.* 45:4275-4280
- Siebert, K.J. and Lynn, P.Y. 1997c. Mechanisms of beer colloidal stabilization. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 55(2):73-78
- Siebert, K.J. and Lynn, P.Y. 1998. Comparison of polyphenol interactions with PVPP and haze-active protein. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56(1):24-31.
- Siebert, K.J., Carrasco, A., and Lynn, P.Y. 1996a. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J. Agric Food Chem.* 44:1997-2005.
- Siebert, K.J., Lynn, P.Y., and Carrasco, A. 1996b. Analysis of haze-active polyphenols and proteins in grape juices and wines. In Proc. of 4th Intl. Cool Climate Symp. on Viticulture and Enology, Rochester, N.Y., pp. VII-18-VII-21.
- Sibert, K.J., Troukhanova, N.V., and Lynn, P.Y. 1996c. Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.* 44:80-85.
- Spanos, G.A. and Wrolstad, R.E. 1992. Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage-A review. *J. Agric. Food Chem.* 40:1478-1487
- Thompson, C.C. and Forward, E. 1969. Towards the chemical prediction of shelf life. *J. Inst. Brew.* 75(1):37-42.
- Waters, E.J., Wallace, W., and Williams, P.J. 1991. Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(2):123-127.
- <출처:Food Technology 53(1), 54(1999)>