



발효 온도에 따른 맥주의 퓨린 함량 분석

곽희재 · 김수경 · 이병섭 · 리시후이 · 이준희* 

부산대학교 약학대학 약학과 미생물학 연구실

Analysis of purine content in beer according to fermentation temperature

Hee-Jae Kwak, Soo-Kyoung Kim, Byung-Seop Lee, Xi-Hui Li, and Joon-Hee Lee* 

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea

(Received August 10, 2018; Revised September 6, 2018; Accepted September 13, 2018)

Beer is the most popular alcoholic fermentation product, but its high purine content has been known to be associated with hyperuricemia and gout. In this study, we examined whether the purine content of beer could be lowered by changing the fermentation temperature during beer-brewing. We brewed beers at different temperatures, 10°C and 20°C, that are two typical beer-brewing conditions for bottom- and top-fermentation, respectively, and the contents of the representative purines, adenine, guanine, and xanthine in each beer were measured by high performance liquid chromatography. As a result, the total purine content of the beer fermented at 10°C was lower than that of fermented beer at 20°C. Especially, the content of adenine was lowered significantly.

Keywords: beer, fermentation, fermenting temperature, purine, yeast

통풍(gout)은 체내 요산(uric acid; 2,6,8-trioxypurine; $C_5H_4N_4O_3$)의 축적으로 인해 발생하는 관절염의 한 형태로, 심한 통증을 유발하는 질병이다(Chen and Schumacher, 2008). 요산, 보통 monosodium urate 결정이 축적된 관절 부위가 붓고, 발적되며, 급성의 경우 가장 흔하게 엄지 발가락의 발허리발가락관절(first metatarsophalangeal joint; 1st MTP)에 발생하고, 발목이나 무릎에서도 발생할 수 있다(Jun *et al.*, 2010; Rymal and Rizzolo, 2014; Ragab *et al.*, 2017). 요산은 동물에서 퓨린의 마

지막 대사산물로 생성된다. 퓨린은 $C_5H_4N_4$ 의 헤테로고리 형태의 방향족 유기화합물로, 자연계에 퓨린 분자 자체는 많이 존재하지 않으나 그 유도체는 매우 풍부하게 존재하며 생명체에서 매우 중요한 역할을 한다. 특히 핵산은 퓨린 계열 염기와 피리미딘 계열 염기로 나누어지며, adenine과 guanine이 퓨린 계열 염기이다. 또한 퓨린 유도체는 NAD, FAD 등의 조효소의 구성성분으로도 존재한다. 퓨린은 몸 밖으로 배출되기 위해 요산으로 변환되는데, 이때 생성된 요산은 대부분 동물에서는 uricase (urate oxidase)에 의해 다시 요산보다 수용성이 강한 allantoin으로 변환되어 신장을 통해 배출된다(de Oliveira and Burini, 2012). 그러나 사람은 uricase 결핍 때문에 다른 동물에 비해 요산 농도가 높다(de Oliveira and Burini, 2012). 생성된 요산의 2/3는 신장을 통해서, 나머지는 장을 통해 배설된다고 알려져 있다(Ragab *et al.*, 2017).

요산이 축적되는 원인에는 유전적 혹은 식습관적 요인에 의해 체내에서 요산이 과다 생성되는 것도 있지만, 생성된 요산이 잘 배출되지 않아서 생기는 경우가 더 많다(Chen and Schumacher, 2008; de Oliveira and Burini, 2012). 따라서 유전적인 요인이 없는 일반인의 경우 요산을 과다 생성시키거나, 요산 배출을 억제하는 성분의 음식을 섭취하였을 때 통풍에 잘 걸릴 수 있는데, 알코올은 체내에서 이러한 작용을 하여 통풍을 악화시키는 대표적 성분으로 알려져 있다(de Oliveira and Burini, 2012). 많은 알코올 음료 중에서도 가장 대중적인 술인 맥주는 알코올을 함유하고 있으면서 퓨린 함량 또한 높아 고요산혈증과 통풍을 발생시킬 수 있다고 생각되어 왔

*For correspondence. E-mail: joonhee@pusan.ac.kr;
Tel.: +82-51-510-2821; Fax: +82-51-513-6754

며, 맥주를 마셨을 때 혈장의 요산이 증가한다는 사실이 일찍부터 보고되어 있었다(Gibson et al., 1984). 또한 와인 등 다른 주류들은 통풍과 중간 혹은 낮은 위험 수준으로 연관되어 있는 반면, 맥주는 통풍과 높은 위험 수준으로 연관되어 있다는 연구 결과도 보고된 바 있다(Lee, 2011; Rymal and Rizzolo, 2014).

맥주는 *Saccharomyces cerevisiae* 효모의 발효를 이용하여 만드는 발효주 중 하나로, 그 제조 방식은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째는 15~25°C에서 발효하는 상면 발효 방식을 이용한 에일 맥주이고 두 번째는 5~15°C에서 발효하는 하면 발효 방식을 이용한 라거 맥주이다. 이렇게 발효 온도에 따라 맥주의 맛과 풍미, 알코올 함량 등이 달라지기 때문에, 발효 온도는 맥주 제조시 매우 중요하면서도 조절 가능한 요소이다. 따라서 같은 원료와 효모를 사용해 만든 맥주라도 발효 온도에 따라 고요산혈증 및 통풍과 관련된 퓨린의 함량에 차이가 날 수 있다. 본 연구에서는 이러한 맥주 발효의 가장 중요한 조건 중의 하나인 온도를 달리함으로써 맥주의 퓨린 화합물 함량을 낮출 수 있는지를 조사하였다.

재료 및 방법

맥주 제조

미스터비어의 아메리칸 에일 비어리필 원액을 사용하여, 제조사에서 제공하는 맥주 발효 방법에 따라 독립적으로 2회 맥주를 제조하였다. 맥주 제조는 크게 알코올 발효가 일어나는 1차 발효, 탄산을 생성하기 위한 2차 발효, 저온 숙성 과정인 라거링(lagering)의 3단계로 진행되었다. 첫 번째 맥주 제조에서는 미스터비어 해당 제품에서 제공하는 에일용 효모(Safale s-04)를 사용하여 각각 20°C, 10°C에서 1, 2차 발효를 진행하였는데, 20°C에서는 발효가 빠르게 진행되어 총 2주간 발효를 진행하였고, 10°C에서는 발효가 느려 총 5주간 발효를 진행하였다. 이후 라거링은 동일하게 수행하였다. 두 번째 맥주 제조에서는 라거 맥주 발효용으로 쓰이는 효모인 Saflager s-189를 사용하였으며, 다른 모든 조건은 첫 번째 맥주 제조 때와 동일하게 진행하였다. 기성 맥주로는 국산 맥주 3종과 외산 맥주 1종을 구매하여 동일한 방법으로 시료를 준비하였다.

맥주 시료 준비

맥주 시료는 크게 gas dissolving, hydrolysis, neutralization

의 세 단계를 거쳐 준비되었다. 먼저 정확한 채취를 위해 맥주 용기를 열고 곧바로 8 mol/L KOH를 넣어 gas를 dissolving 시켰다. 여기서 맥주 4.5 ml을 채취한 후 70% perchloric acid (PCA) 500 µl를 넣고 100°C에서 1시간 가열하여 맥주에 들어 있는 nucleoside, nucleotide, nucleic acid들을 각각 해당 퓨린으로 hydrolysis 시켰다. 여기에 다시 8 mol/L KOH 1,000 µl를 넣고 5분간 얼음에서 중화시킨 후, 0.2 µm 필터로 여과하였다. 이렇게 얻어진 시료를 동결 건조를 통해 농축하였다.

High performance liquid chromatography (HPLC)를 이용한 퓨린 함량 분석

위에서 준비된 시료 20 µl를 취하여 HPLC에 주입하였다. HPLC 펌프와 detector는 각각 Shimadzu사의 LC-20AT와 SPD-20A를 사용하였으며, 분리를 위한 column으로는 ThermoFisher Scientific™ 사의 Hypersil™ ODS C18 HPLC column [4.6 mm diameter (metric) × 200 mm length (metric)]을 사용하였다. 퓨린 분석을 위한 HPLC에서는 flow rate이 0.5 ml/min, detection을 위한 파장은 270 nm, 이동상으로는 methanol을 사용하였다. 퓨린에 대한 standard로는 adenine (DAEJUNG; www.daejungchem.co.kr), guanine (Sigma-Aldrich; https://www.sigmaaldrich.com), xanthine (ACROS ORGANICS; https://www.acros.com)을 사용하였으며, 정량을 위해 각기 다른 양을 HPLC에 주입하여 peak을 얻고, 주입한 양과 peak 영역의 면적으로부터 상관관계를 구하는 외부 표준법(External standard method)을 사용하였다.

유의성 분석

통계적 유의성을 위해서 데이터는 마이크로소프트 사의 MS office Excel을 사용하여 student's *t*-test (two-sample assuming equal variances) 방법으로 분석되었다. *P*-value가 0.05보다 낮으면 유의한 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

맥주 발효

맥주를 제조하는 대표적 방식인 하면 발효와 상면 발효를 위한 두 온도인 10°C와 20°C에서 각각 맥주를 직접 발효하였다. 일반적으로는 상면 발효와 하면 발효에서 다른 종의 효모를 사용하지만, 본 연구에서는 발효 온도 이외의 조건은 모두 동일하게 하기 위하여 발효를 위한 효모도 동일한 종을 사용하였다.

첫 번째 맥주 제조에서는 에일 제조 용으로 사용되는 효모 (Safale s-04)를 사용하였는데, 이 효모 종은 18~24°C 정도가 최적 발효 온도로 알려져 있으나, 10°C에서도 발효가 가능하였다. 다만 저온으로 인해 발효 기간은 훨씬 길어서 1, 2차 발효를 통틀어 20°C 발효의 경우 2주가 소요되었으나, 10°C 발효의 경우 5주가 소요되었다. 효모 종에 의한 차이를 배제하기 위하여 두 번째 맥주 제조에서는 저온 발효에서 주로 사용되는 효모 (Saflager S-189)를 사용하였다. 이 효모 종은 다양한 종류의 라거 및 필스너 맥주의 발효에 사용되며, 9~22°C 정도의 온도 범위에서 발효에 이용될 수 있고, 12~15°C 범위에서 가장 잘 발효를 하는 것으로 알려져 있다(<https://www.northernbrewer.com/products/saflager-s-189>). 두 번에 걸친 맥주 제조에서 맥주 원액, 발효 양, 발효조 등 기타 조건은 모두 동일하였으며, 제조된 맥주는 발효 온도에 따른 풍미의 차이는 있었으나, 두 번의 시행에서의 차이는 미미하여, 식품으로써 시음을 했을 때 일반적으로 인식될 수 있는 수준에서 빛깔, 도수, 탄산의 양에 큰 차이가 없이 유사하게 제조되었다.

수제 맥주 속 퓨린 화합물들의 정량

먼저 HPLC 방법을 이용하여 주요 퓨린 성분인 adenine, guanine, 그리고 xanthine의 peak 위치를 확인하였다(Fig. 1A). 다음 두 가지 다른 온도에서 제조한 수제 맥주로부터 일정량의 시료를 취하여 gas dissolving, hydrolysis, neutralization 등 세 단계의 전처리를 수행하고 농축하였는데, 이 때 PCA를 이용한 hydrolysis 과정에서 맥주에 들어 있는 nucleoside, nucleotide, 그리고 nucleic acid 등으로부터 각 염기들이 해당 퓨린으로 유리된다(Kaneko *et al.*, 2009). 이렇게 얻어진 맥주 농축 시료를 HPLC에 주입하여 분리한 후, 앞에서 얻어진 adenine, guanine, 그리고 xanthine의 기준 peak와 위치를 비교하여 분리된 각 purine 화합물의 peak를 확인하였다(Fig. 1B and C). 10°C와 20°C에서 발효된 맥주 시료에서 이들 퓨린 peak들을 비교해 보았을 때, 특히 10°C 발효 맥주에서 일부 퓨린 peak들이 감소해 있음을 알 수 있었다(Fig. 1C).

이를 보다 정량적으로 측정하기 위해서 외부표준법(External standard method)을 수행하였다. 먼저 일정한 양의 adenine, guanine, xanthine을 HPLC에 주입하여, 각 물질의 peak 면적과 주입한 양 사이의 상관관계를 보여주는 신뢰할 만한 기준 직선을 얻은 후(Fig. 2), 이를 이용해 맥주 시료 속의 adenine, guanine, xanthine의 양을 각각 구하였다. 두 차례 제조한 맥주 시료들로부터 이를 반복하여 평균을 구하였을 때, 20°C로 발효한 맥주의 adenine, guanine, 그리고 xanthine의 양은 각각 187.8 ± 0.6, 117.0 ± 3.4, 23.9 ± 5.8 μmol/L로 측정되었고, 10°C

에서 발효한 맥주의 경우 110.4 ± 17.1, 108.2 ± 4.7, 15.35 ± 14.1 μmol/L로 측정되었다(Fig. 3). 이는 낮은 온도에서 발효시킨 맥주에서 전체적으로 적은 양의 퓨린 화합물이 검출되었음을 의미하는 것으로, 특히 adenine의 양이 많이 감소하였음을 나타내는 결과이다(41.2% 감소)(Fig. 3). 총 퓨린 양은 20°C 발효에서는 328.7 ± 9.8 μmol/L로, 10°C 발효에서는 233.9 ± 1.6 μmol/L로 측정되어, 저온 발효에서 총 28.8%가 감소함을 알 수 있었다(Fig. 3). 본 연구에서는 1차 맥주 제조와 2차 맥주 제조 때 사용 효모를 달리하였는데, 효모의 차이에 의한 퓨린 함량의 변화는 크지 않았다(Table 1).

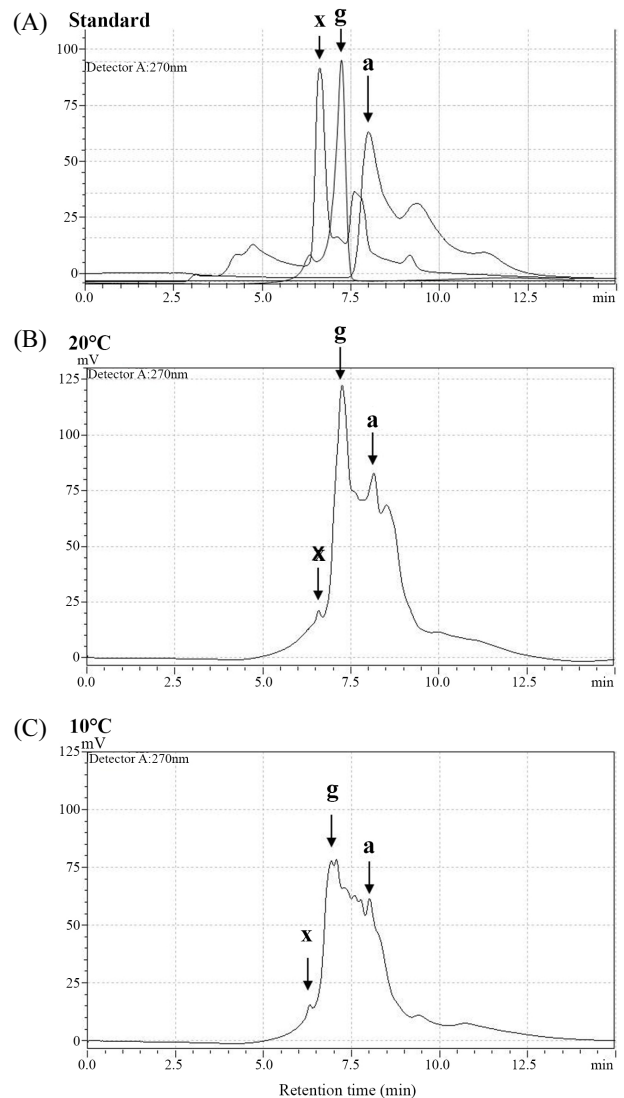


Fig. 1. HPLC profile of standard purines and beer samples. (A) peaks for standard purines are indicated by arrows. Adenine (a) guanine (g) and xanthine (x). (B and C) the HPLC profiles of beer samples that were fermented at 20°C (B) and at 10°C (C).

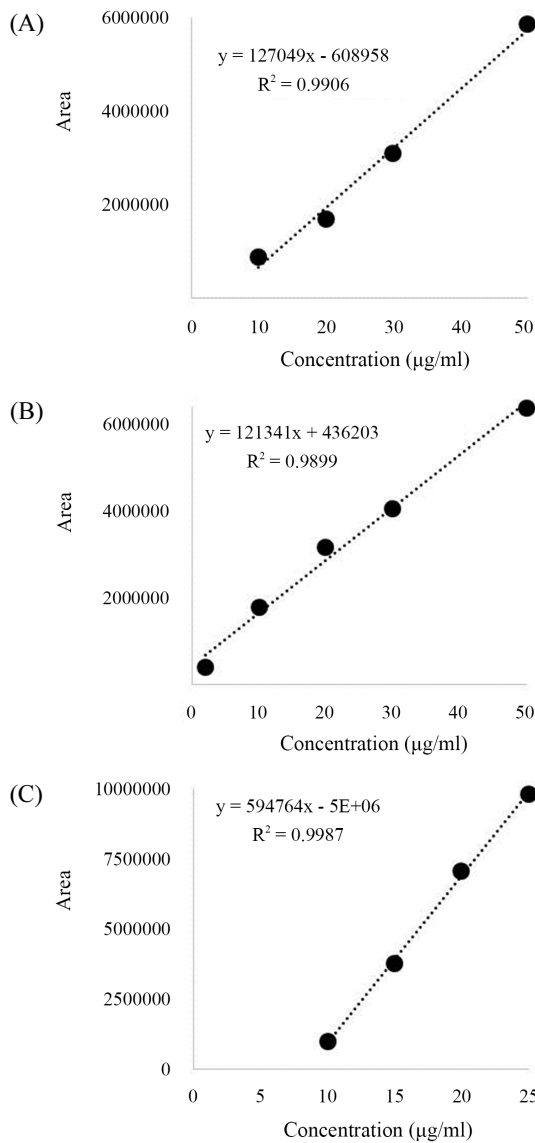


Fig. 2. Standards for purine quantification. (A) adenine, (B) xanthine, and (C) guanine.

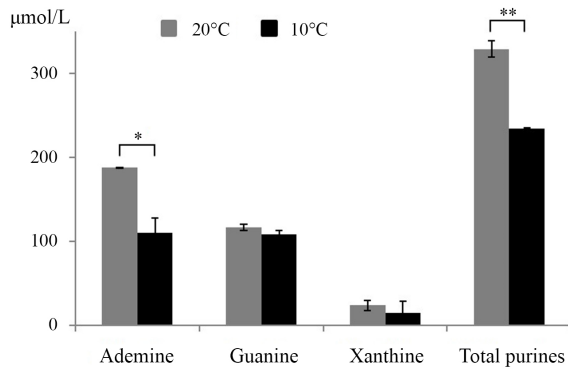


Fig. 3. Contents of purines in the beers fermented at two different temperatures. P-values, * < 0.05; ** < 0.001.

Table 1. Purine contents in the laboratory-brewed beers at two different temperature and commercial beers

	Adenine	Guanine	Xanthine	Total
1 st , 20°C	187.4	114.6	19.8	321.8
1 st , 10°C	98.3	111.5	25.3	235.1
2 nd , 20°C	188.2	119.4	28.0	335.6
2 nd , 10°C	122.5	104.9	5.4	232.8
Domestic 1	145.1	77.2	1.0	223.3
Domestic 2	190.3	95.1	8.4	293.8
Domestic 3	171.4	93.2	44.5	309.1
Imported	155.9	84.1	32.9	272.9

(µmol/L)

수제 맥주와 시중 맥주의 Purine 함량 비교

이렇게 얻어진 수제 맥주의 퓨린 함량을 시중에 판매 되는 기성 맥주들과 비교하기 위해 시중 맥주들로부터 동일한 방법으로 퓨린 함량을 측정하여 보았다. 국산 맥주 3종과 외산 맥주 1종에서 퓨린 양을 측정해 보았을 때, 10°C 발효 맥주는 시중 맥주들 보다는 adenine의 함량이 의미 있게 낮았다. 그러나 guanine의 양은 약간 높아서, 전체적으로 총 퓨린 함량이 낮기는 하였으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다(Table 1 and Fig. 4). 그러나 이는 기성 맥주들이 매우 다양한 방법과 재료를 가지고 제조되기 때문에 편차가 커서 생기는 문제라고 판단되며, 직접 맥주를 제조할 경우 낮은 온도에서 발효시킬 때 퓨린 함량을 낮출 수 있다는 결과와 배치되지는 않는다. 오히려 본 연구에서 제조된 수제 맥주가 기성 맥주들과 비슷한 품질로 제조되었음을 확인해 주는 결과이며, 이러한 조건에서 온도에 따라 퓨린의 함량이 달라졌음을 보여주었기 때문에 의미가 있다.

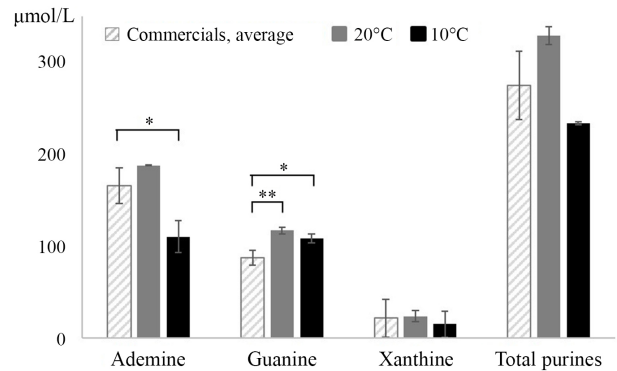


Fig. 4. Comparison of purine contents with commercial beers. 4 commercial beers (3 domestic and 1 imported beers) were quantified for purine contents by HPLC in the same manner and the average was compared with the lab-brewed beers. P-values, * < 0.05; ** < 0.001.

본 연구에서 얻어진 결과를 이전 연구에서 얻어진 결과와 비교해 보면, 시중 맥주를 대상으로 퓨린 함량을 조사한 국내의 한 연구에서는 adenine이 10~30 $\mu\text{mol/L}$, guanine이 10~85 $\mu\text{mol/L}$, xanthine이 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 정도로 조사된 바 있었다 (Jun *et al.*, 2010). 이 연구에서는 수입 맥주와 국산 맥주 사이에, 혹은 브랜드 간에 의미있는 차이는 없었다고 하였으며, 퓨린 총량으로 볼 때 국내 맥주 $77.6 \pm 22.1 \mu\text{mol/L}$, 외산 맥주 $78.3 \pm 39.4 \mu\text{mol/L}$ 로, 본 연구에서 측정된 것에 비해 다소 낮았다 (Jun *et al.*, 2010). 그러나 보다 광범위하게 다양한 맥주에서 퓨린의 양을 조사한 외국의 연구 사례를 보면, 맥주 종에 따라 퓨린 함량에 큰 차이가 있긴 하지만, adenine이 대략 15~340 $\mu\text{mol/L}$, guanine이 60~500 $\mu\text{mol/L}$, xanthine이 20~500 $\mu\text{mol/L}$, 총 퓨린양이 200~1,150 $\mu\text{mol/L}$ 수준으로 측정되어, 국내 연구진의 결과보다 다소 높게 나왔는데 (Kaneko *et al.*, 2009), 이는 본 연구에서의 측정 결과와 비슷한 수준이었다.

본 연구에서는 맥주의 퓨린 함량이 발효 온도에 따라 달라질 수 있고, 10°C와 같이 저온에서 발효시킨 맥주가 20°C에서 발효시킨 맥주보다 더 적은 양은 퓨린을 함유하고 있음을 확인하였다. 그러나 왜 저온에서 발효시키면 맥주의 퓨린 함량이 낮아지는지는 분명하지 않다. 여러 주류들 중에서 특히 맥주가 통풍과 가장 강한 연관성을 보이기 때문에, 여러 그룹에서는 맥주의 퓨린양을 정량한 바 있고, 그 결과 다른 알코올 음료에 비해 맥주의 퓨린 함량이 높게 측정된 바 있다 (맥주, 42.3~146.4 μM ; 약주, 8.2~40.4 μM ; 막걸리, 11.7~24.7 μM ; 소주, 미검출) (Jun *et al.*, 2010). 따라서 고요산혈증과 통풍 위험이 있는 사람들은 가급적 맥주를 마시지 않는 것이 좋겠으나, 가정에서 직접 맥주를 만들어 마신다면 저온에서 발효시킨 맥주를 마시는 것이 도움이 될 것이라 생각된다. 앞으로 맥주를 보다 다양한 온도 조건에서 발효시킨 후 퓨린 성분의 함량을 조사해 본다면, 맥주의 풍미이외에도 퓨린 화합물의 양을 낮추어 고요산혈증과 통풍 관리에 도움을 줄 수 있는 기능성 맥주를 생산할 수 있는데 도움이 될 수 있을 것이다. 최근 수제 맥주 제조가 많은 관심을 받고 있는 상황에서, 이러한 연구는 보다 경쟁력 있는 새로운 상품을 만드는데 도움이 될 것이라 사료된다.

적 요

맥주는 가장 대중적인 알코올 발효주이지만 퓨린(purine) 함량이 높아 고요산혈증 및 통풍 발생과 연관이 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 맥주 발효 온도를 달리함으로써 맥주의 퓨린 함량을 낮출 수 있는지 알아보았다. 맥주 제조의 주된 발효법인 상면 발효와 하면 발효에서 주로 사용되는 20°C와 10°C 온도에서 맥주를 발효한 후, 각각에서 대표적 퓨린 화합물인 adenine, guanine 그리고 xanthine들의 함량을 high performance liquid chromatography 방법으로 측정하였다. 그 결과, 10°C 발효 맥주가 20°C 발효 맥주에 비해 총 퓨린 함량이 낮았으며, 특히 adenine의 함량이 의미있게 낮아져 있음을 확인하였다.

감사의 말

이 과정은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Chen LX and Schumacher HR. 2008. Gout: an evidence-based review. *J. Clin. Rheumatol.* **14**, S55-62.
- de Oliveira EP and Burini RC. 2012. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. *Diabetol. Metab. Syndr.* **4**, 12.
- Gibson T, Rodgers AV, Simmonds HA, and Toseland P. 1984. Beer drinking and its effect on uric acid. *Br. J. Rheumatol.* **23**, 203-209.
- Jun JB, Na YI, Kim HJ, Kim SH, Park YS, and Kang J. 2010. Measurement of purine contents in Korean alcoholic beverages. *J. Korean Rheum. Assoc.* **17**, 368-375.
- Kaneko K, Yamanobe T, and Fujimori S. 2009. Determination of purine contents of alcoholic beverages using high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **23**, 858-864.
- Lee YH. 2011. Measurement of purine contents in Korean alcoholic beverages. *J. Rheum. Dis.* **18**, 1-2.
- Ragab G, Elshahaly M, and Bardin T. 2017. Gout: An old disease in new perspective - A review. *J. Adv. Res.* **8**, 495-511.
- Rymal E and Rizzolo D. 2014. Gout: a comprehensive review. *JAAPA* **27**, 26-31.