

## 초임계 이산화탄소를 이용한 맥주효모로부터 고미성분 제거

윤성옥·†전병수·<sup>1</sup>김석규·<sup>2</sup>최승태  
 부경대학교 식품생명공학부, <sup>1</sup>일신엔지니어링, <sup>2</sup>창원대학교 유전공학연구소  
 (접수 : 2002. 1. 10., 게재승인 : 2002. 2. 22.)

## Removal of the Bittering Substances from Brewer's Yeast by Supercritical Carbon Dioxide

Sung Ok Yoon, Byung Soo Chun†, Suk Kyo Kim<sup>1</sup>, and Seung Tae Choi<sup>2</sup>  
 Faculty of Food Science & Biotechnology/Institute of sea food science, Pukyong National University, Busan, 608-737, Korea

<sup>1</sup>Department of Engineering, Ilshineng. Taejion 1688-15, Korea

<sup>2</sup>Institute of Genetic Engineering, Changwon National University, Kyongnam 641-773, Korea

(Received : 2002. 1. 10., Accepted : 2002. 2. 22.)

Supercritical Carbon Dioxide was evaluated and optimized for the enrichment and fractionation of the essential oil and the bitter principles of hops, both of which contribute to the flavor of beer. Selected conditions of extraction (pressure, temperature and co-solvent) influenced the composition, the olfactory results and the colour of the extract. Optimal extraction conditions were 30 min, 1800 psia and 45°C with co-solvent. Under these conditions, yield was 65% from brewer's yeast. The bittering substances from brewer's yeasts almost were removed.

**Key Words** : Supercritical Carbon Dioxide, Essential oil, brewer's yeast, Humulones

### 서론

맥주의 중요한 성분인 Hop은 *Humulus lupulus*의 학명을 가진 암수딴그루의 덩굴풀로써 맥주에 특유의 향과 고미를 부여하며, 청징·방부 등의 효능이 있어 단백질 혼탁을 방지하고 맥주의 저장성을 높여주는 작용을 한다.

맥주제조에서 요구되는 Hop 성분은 꽃이 숙성될 때 비늘잎이나 과축 주위에 점착성인 담황색 분말, 즉 Lupulin 입자가 부착되는데, 여기에 고미 물질인 Humulone이나 Lupulone 및 기타 수지의 방향성인 Hop oil이 있어 맥주 특유의 맛을 낸다(1).

페맥주효모는 맥주 제조시 사용되는 Hop의 쓴맛 성분인  $\alpha$ -acids와  $\beta$ -acids를 함유하고 있으며, 또한 이 성분들 중 humulone은 양조과정 (brewing process)에서 3-trans-iso- $\alpha$ -acids와 3-cis-iso- $\alpha$ -acids를 생성시킨다. 이 고미성분은 맥주 고미질의 약 30-50%를 차지하며 맥주고미의 대부분(80-90%)을 부여하는 것으로 알려져 있다.  $\alpha$ -acid는 주로 Humulone, Cohumulone, Adhumulone과 같은 수지성분으로 구성되어 있는데, 수용성을 증가하며, 맥주에서 쓴맛을 내는 주체가 된

다. 구조는 Figure 1에 나타내었다(2,3).

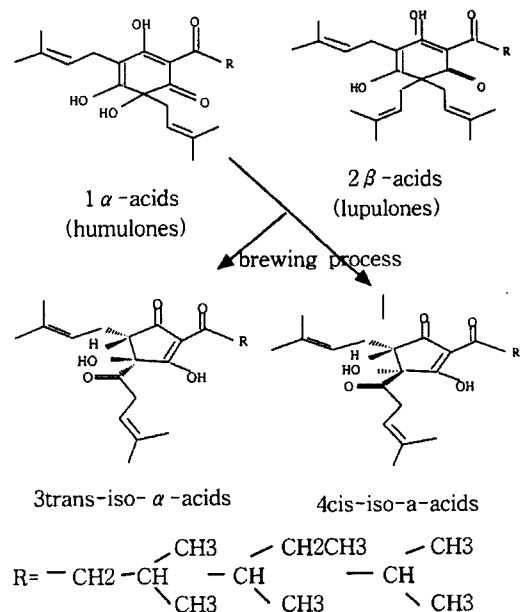


Figure 1. Structures of  $\alpha$  and  $\beta$ -acids and iso- $\alpha$ -beer acids. 1 humulone adhumulone cohumulone, 2 lupulone ad lupulone colupulone, 3&4 iso-humulone iso-adhumulone iso-cohumulone.

†Corresponding Author : Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea  
 Tel : +82-51-620-6428, Fax: +82-51-622-9248  
 E-mail: bschun@pknu.ac.kr.

맥주의 고미에 주로 기여하는 것은 Iso-humulone이며 관련 혼합물들에는 900여 종류가 있다. 이 성분들을 추출하기 위해서는 먼저 폐맥주 효모를 원심 분리시킨 후 폐맥주효모 고형물질을 건조시키고, 이것을 초임계 추출탑에 충전시켜 고체-액체 system의 형태로 추출한다. 이 추출법은 식물 원료로부터 향이나 다른 성분을 선택적으로 추출해 내는 우수성을 입증하고 있는 것은 사실이다(4,5).

초임계 유체 기술(Supercritical Fluid Technology)은 최근 20여 년간 미국, 일본 및 독일 등 선진 외국의 화학산업 분야에서 새로운 관심을 모으고 있는 신분리 기술의 하나라 할 수 있다. 초임계 상태란 유체의 고유 임계점 이상의 압력과 온도에서 기체상과 유사한 확산계수, 점도 등의 전달 물성을 갖고 액체상과 비슷한 밀도를 갖도록 조절시켜 놓은 양면성 상태하의 유체를 말한다(6).

유체가 초임계 상태에 있을 때, 다수의 혼합물 중 특정 성분에 대하여 선택적인 분리능력을 나타내는 등의 특이한 열역학적 거동들은 이미 100여 년 전부터 관찰 연구되어온 분야이다. 반면에 초임계 현상을 실제 혼합물의 분리 문제에 적용하는 연구는 미진한 상태에 있었다. 그러나, 1970년대에 접어들면서 중화학 산업이 부딪치게 된 몇 가지의 사안들에 너지 가격의 급격한 상승, 환경오염문제, 화학 제조산업의 패턴변화에 따라 재래의 분리공정으로는 효과적인 분리나 정제가 어려운 신물질의 창출 등에 힘입어 중·정밀화학, 식품, 의약 그리고 에너지 산업 등에서 실로 다양한 응용가능성을 지닌 대체 신 공정으로 대두되기 시작하였다(7,8).

본 연구에서는 맥주 공장에서 회수된 맥주효모내에 존재하는 일부 고미성분과 Essential oil을 선택적으로 분리하는 최적 추출조건과 분석 결과에 대해서 검토하였다.

**재료 및 방법**

**재 료**

본 실험에서 사용한 원료는 (주)조선맥주(마산공장)에서 폐기되는 폐맥주효모로서 수분함량 90%, 효모 10%, 소량의 맥아즙을 함유하고 있다. 효모를 121℃에서, 20분간 autoclave 살균하여 -4℃에 보관한 후 Figure 2와 같은 전처리 공정에서 거쳐 효모를 불활성 및 분말화 (0.1-1.0 mm) 시켰다.

주 용매인 이산화탄소는 순도 99% 이상인 것을 사용하였으며, 보조용매로는 95% 에탄올을 사용하였다. 그 외의 분석 및 전처리시 사용된 시약은 분석용 1급 시약을 사용하였다.

**초임계 이산화탄소 추출장치**

초임계 이산화탄소를 사용하여 분쇄된 원료로부터 hop의 정유성분 및 고미성분 추출에 대한 흐름 공정은 Figure 3에 나타내었다. 추출탑은 내경 9.5 cm, 500 mL 용량인 고압용 Stainless steel을 사용하였고, 흐름 Line은 1/4", 1/16"의 Stainless steel pipe (316ss)를 사용하였다. 액체 이산화탄소 용매를 초임계 압력으로 변환시키는 고압펌프는 250 kgf/cm<sup>2</sup>의 용량을 가진 삼진(한국)고압펌프이며, 추출탑으로 유입되는 이산화탄소의 유량을 정량적으로 Pumping 하였고, 유입되는 가스의 온도와 압력은 Digital measuring sensor에 의해 측정되었다. 보조용매로서 에탄올을 정량적으로 주입시킬 수

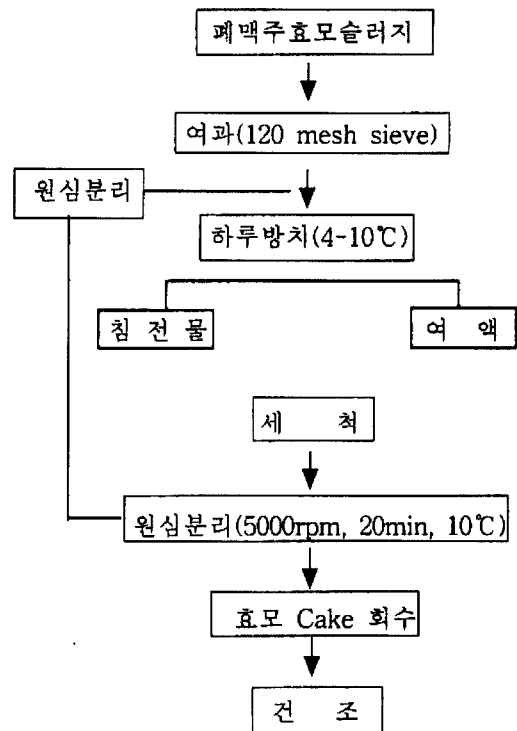


Figure 2. Preparation process of brewer's yeast.

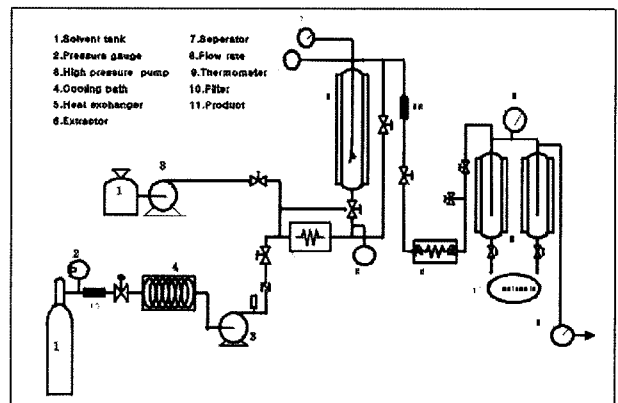


Figure 3. Schematic diagram of supercritical semi-batch type extraction.

있는 보조용매 펌프는 영린기기의 Model 930을 사용하였다. 시스템내의 압력은 Metering valve와 Needle valve로 조절하였다. 추출탑에 충전된 원료로부터 초임계 이산화탄소와 추출물을 분리하는 Separator, 유체의 큰 압력 변화로부터 발생하는 열을 control 하기 위한 열교환기, 추출탑에 유입되는 초임계 이산화탄소의 사용량을 측정하는 Flow meter (model PA-20)로 구성되어 있다.

**초임계 이산화탄소를 이용한 추출방법**

포화 압력 상태인 이산화탄소가 저장 탱크로부터 냉각기 (-10℃)를 통과하여 이산화탄소의 기포가 제거된 후 고압 metering pump에 의해 일정한 유량으로 유입되며, 시스템내의 설정 압력까지 수행되어진다. 고압펌프로부터 추출탑에 유입되기 전에 추출 용매인 CO<sub>2</sub>와 보조용매 Pump로부터 유입되는 에탄올은 설정된 추출온도에 따라 항온조에 의해 예

열되어진 후 추출탑 내의 온도는 thermocouple에 의해 감지되어 추출온도를 결정하였다. 시스템내의 전체 압력은 2개의 압력 조절기를 부착시켜 순간 압력변화로 인한 추출 조건 변화를 방지하였으며, 고압 Pump와 압력 조절기 앞에 Micron filter를 부착하여 추출이 진행되는 동안 용매 CO<sub>2</sub>와 고체시료의 입자에 의한 시스템의 흐름이 중단되는 것을 방지하였고, Safety valve를 부착하여 시스템내의 과잉압력 (Excess pressure)을 제거하였다. 또한 종료 후 시스템내의 고압의 역류 현상으로 인한 압력의 역류로 고압펌프의 손상을 방지하기 위하여 출구에 Check valve를 설치하였다. 초임계 이산화탄소는 추출탑내의 시료로부터 고미성분을 추출한 후 낮은 압력 상태인 분리기에 유입되어 용제와 용매가 쉽게 분리되었으며, 이때 CO<sub>2</sub>는 flow meter에 의해 사용된 CO<sub>2</sub> 양이 측정된 후 대기로 방출시켰다.

### 지방산 분석

추출된 시료 0.2 g을 AOAC법으로 methyl ester화 한 후, capillary column (Hp-Innowax, 30 m×0.32 mm i.d., 0.15 μm Film thickness, Hewlett Packard, USA)이 장착된 GC(Hewlett Packard 5890 II, USA)로 지방산을 분석하였다. Carrier gas는 N<sub>2</sub>(1 mL/min)을 사용하였으며, oven 온도는 150℃에서 210℃까지 3℃/min 증가시켰고, injector의 온도는 250℃, detector온도는 300℃로 설정하였다.

### Hop's essential oil 분석

페맥주 효모에 잔존하는 Hop의 essential oil 분석은 AOAC법으로 Methylation한 후, capillary column (Hp-Innowax, 30 m×0.32 mm i.d., 0.15 μm Film thickness, Hewlett Packard, USA)이 장착된 GC(Hewlett Packard 5890 II, USA)로 지방산을 분석하였다. Carrier gas는 N<sub>2</sub>(1 mL/min)을 사용하였으며, oven 온도는 150℃에서 210℃까지 3℃/min 증가시켰고, injector의 온도는 250℃, detector온도는 300℃로 설정하였다. GC(Hewlett Packard 5890 II, USA)로 분석하였다(9).

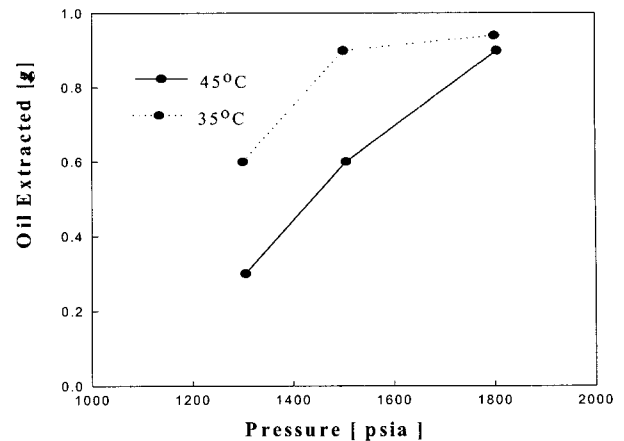
### HPLC에 의한 Hop's α and β-acids 분석

페맥주 효모로부터 제거한 고미성분은 기존의 고미질 HPLC 분석 조건을 활용하여 동일하게 분석하였다. 시료의 전처리 는 건조된 페맥주 효모 10 g을 메탄올:디에틸에테르= 20:100(v/v)에 30분간 침지시킨 후 0.1 M HCl 40 mL을 첨가한 다음 10 분간 방치 후 상등액 5 mL을 취해 50ml Volumetri flask에 넣고 메탄올로 50 mL 정량한 후 여과하여 column은 C18(Nucleosil-5, 250×4 mm, 5 μm OSD, RP18)이 장착된 HPLC로 분석하였다. 이동상으로는 Methanol : H<sub>2</sub>O : HPO<sub>4</sub>=85:17:0.25 (v/v)을 사용하였으며, 용출속도는 0.8 mL/min으로 하였다. 시료는 고미가 제거되지 않은 분말 효모와 초임계 추출물 그리고 추출 후 추출기에 남아있는 효모였으며, 각각의 pattern을 서로 비교 분석하여 고미성분이 Peak를 유추하였다(10).

## 결과 및 고찰

### 지방산의 추출효율

Figure 4은 일정한 압력하에서 온도변화에 따른 지방산의



**Figure 4.** Extraction of Fatty acids from brewer's yeast by supercritical carbon dioxide at different temperature: Sample : 20 g, Size : 0.35 mm, Flow rate : 50 mL/min Extraction time : 30 min, Entrainer(95% EtOH): 4 mL/min.

**Table 1.** Fatty acid compositions of brewer's yeast oil extracted by SC-CO<sub>2</sub> at different temperatures and pressures.

Fatty acids	Peak Area	Area(%)
Caprylic acid (8 : 0)	75,005	0.21
Undecanoic acid (11 : 0)	61,082	1.73
Tridecanoic acid (13 : 0)	2,494	0.70
Myristoleic acid (14 : 1)	2,366	0.67
Palmitic acid (18 : 0)	1,234,071	34.86
Palmitoleic acid (18 : 1)	81,987	2.32
Oleic acid (18 : 1)	134,925	3.81
Elaeic acid (18 : 1)	286,431	8.10
Linolelagic acid (18 : 2)	1,448,350	40.90
γ-Linolenic acid (18 : 3)	133,291	3.76
Arachidic acid (20 : 0)	8,263	0.23
Cis-11-Eicosanoic acid (20 : 0)	18,355	0.52
Nervonic acid (24 : 1)	77,121	2.18

SC-CO<sub>2</sub> : Supercritical CO<sub>2</sub>

추출효율을 나타낸 결과로 이산화탄소 유량 50 mL/min, 입자크기 0.35 mm, 시료 20 g, 보조용매(95% 에탄올) 4 mL/min을 사용하여 총 추출시간 30분으로 실험을 행하였다. 온도와 압력이 증가할수록 추출효율이 증가함을 알 수 있었고, 1800 psia, 45℃일 때 약 65%의 추출효율을 나타내었다. 이는 압력이 일정할 때 온도가 증가함에 따라 초임계 이산화탄소의 밀도가 작아져 용질에 대한 용해력이 감소하기 때문이다, Table 1은 페맥주 효모로부터 추출된 지방산의 종류를 나타낸 결과로 linolelagic acid와 palmitic acid가 대부분 함유되어 있었다.

### 압력변화에 따른 Hop 성분중의 Essential oils 추출효율

Figure 5는 45℃의 일정한 온도하에서 이산화탄소 유량 50 mL/min, 입자크기 0.35 mm, 시료 20 g, 보조용매(95% 에탄올) 4 mL/min을 사용하여 총 추출시간 30분으로 압력에 따른 Hop 성분 중의 Essential oils 추출효율 나타낸 결과이다. 압력이 증가할수록 추출효율이 증가함을 알 수 있었고, Humulene이 가장 많이 추출되었음을 알 수 있었다. 이는 일

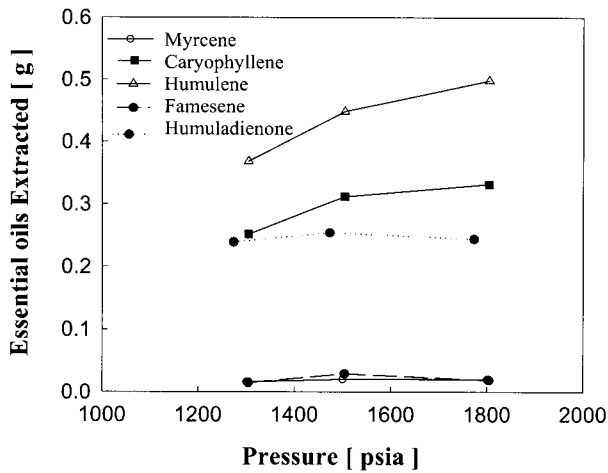


Figure 5. Extraction of Essential oils from brewer's yeast by supercritical carbon dioxide at different pressure. Sample : 20 g, Size : 0.35 mm, Extraction time : 30 min Entrainer(95% EtOH) : 4 mL/min, Flow rate: 50 mL/min.

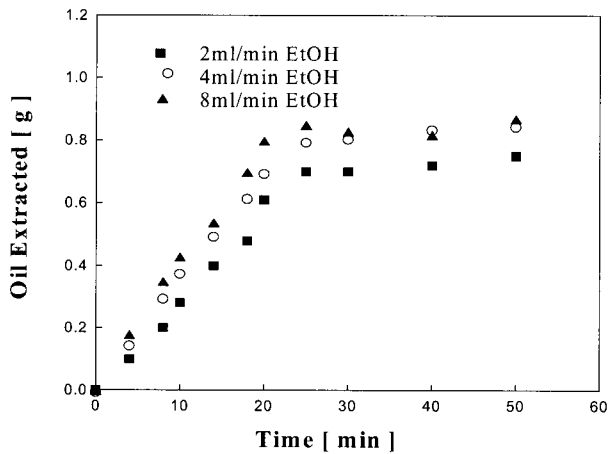


Figure 6. Extraction of Fatty oils from brewer's yeast by supercritical carbon dioxide at different Entrainer Flow rate. Sample : 20 g, Size : 0.35 mm, Flow rate: 50 mL/min, Extraction time : 30 min, Temp.: 45°C, Pres.: 1800 psia.

정 온도하에서 압력이 증가함에 따라 용매 밀도의 증가와 용질의 휘발성의 증가로 용해도가 증가하였기 때문이다.

**보조용매의 영향**

Figure 6은 이산화탄소 유량 50 mL/min, 입자크기 0.35 mm, 시료 20 g, 추출온도 45°C, 추출압력 1800 psia에서 추출시간 변화에 따른 보조용매의 투입량이 추출효율에 미치는 영향을 본 결과이다. 보조용매의 양이 증가할수록 추출속도가 증가함을 알 수 있었고, 이는 초임계 이산화탄소는 비극성 물질만을 선택적으로 이끌어 내는 반면 에탄올은극성과 중성성분까지 추출하기 때문이다. 또한 보조용매 투입량 4 mL/min과 8 mL/min를 비교해 본 결과 거의 추출효율에는 차이가 없음을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 에탄올의 첨가량이 증가할수록 초임계 이산화탄소의 용매력에는 변동이 없음을 알 수 있었다(11,12).

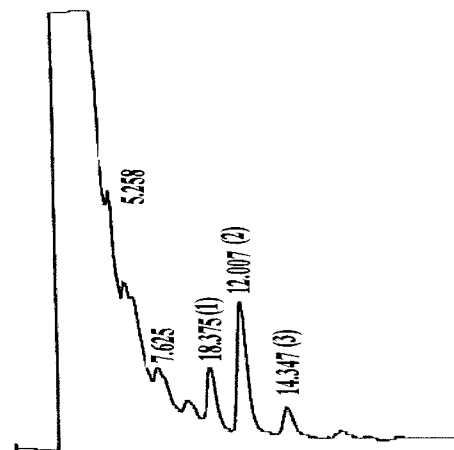


Figure 7. HPLC analysis of hop from brewer's yeast. (1) Co-humulone (2) Humulone (3) Ad-humulone.

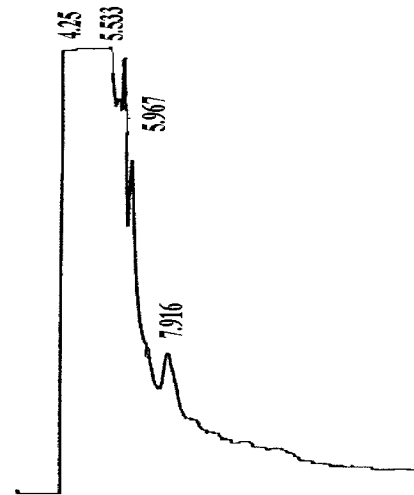


Figure 8. HPLC analysis of hop from extracted brewer's yeast residue by supercritical CO<sub>2</sub>.

**폐맥주효모의 Hop 성분**

추출온도 45°C, 추출압력 1800 psia, 보조용매(95% 에탄올) 4 mL/min, 이산화탄소 유량 50 mL/min의 조건에서 초임계 추출한 폐맥주효모 추잔물과 원료 효모의 Hop의 고미성분을 HPLC로 비교분석한 결과를 Figure 7와 Figure 8에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 원료 효모의 고미성분과 비교해 볼 때 초임계 추출 후 회수된 효모분말에는 고미성분이 제거되었음을 알 수 있었다.

**요 약**

폐맥주효모로부터 Hop의 고미성분을 추출하는 최적조건은 이산화탄소 유량 50 mL/min, 입자크기 0.35 mm, 시료 20 g, 보조용매(95% 에탄올) 4 mL/min, 총 추출시간 30분, 추출온도 45°C, 추출 압력 1800 psia로 원 시료와 비교한 결과 Hop의 향기 성분과 고미성분이 거의 제거됨을 알 수 있었다. 또한 보조용매의 효과는 추출물질의 표면적을 크게 하여 침투력을 높여주고 추출물 중의 휘발성이 강한 성분이나 색의 제

거에 상당한 효과가 있음을 알 수 있었다(13,14).

### 감 사

이 논문은 1999년도 (주) 고려식료에 의하여 수행된 청정 생산기술사업에 의해 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Verzele, M. and De Keukeleire (1991), Chemistry and Analysis of hop and beer bitter acids, Elsevier, Amsterdam.
2. Verschuere, M., F. David, and P. Sandra (1992), Fraction by SFE and Microcolumn Analysis of the Essential Oil and the Bitter Principles of Hops, *J. of Chroma. Sci.* vol.30, Oct, 388-391.
3. David, F., P. Sandra, and W. S. Pipkin (1990), Supercritical Fluid Extraction of Hops, Application note Hewlett-Packard, Avondale, 115-228.
4. Marianne, L. (1974), The influence of alkali and heat treatment on yeast protein, *J. Biotech. and Bioeng.*, **16**, 1495.
5. Palmer, M. V., and S. S. T. Ting. (1995), Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chem.*, **52**, 345.
6. Bartle, K. D., A. A. Clifford, S. B. Howthome, J. J. Langenfeld, D. J. Miller, and R. A. Robinson(1990), Model for dynamic extraction using a supercritical fluid. *Journal of the Supercritical fluids*, **3**, 143-149.
7. Paulaitis, M. E., V. T. Krukonis, R. T. Krunik, and R. C. Reid (1992), Supercritical fluid extraction, *Rev. Chem. Engr.*, **1**(2), 179.
8. Zosel, K. (1978), Separation with supercritical gases: Partical applications, *Angewandte in English*, 702-709.
9. Lam, K. C., G. B. Nickerson, and M. L. Deinzer (1986), A Rapid Extraction Method for Hop Essential Oils, *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 63-66.
10. Sandra, P., G. Steenbeke, M. Ghijs, and G. Schomburg (1990), Micro liquid chromatography-diode array detection of hop bitter acids, *J. High Res. Chromatogr.*, **13**, 527-29.
11. Cocero, M. J., and L. Calv (1996) Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO<sub>2</sub>-ethanol mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 1573-1578.
12. Feral, Temelli (1992), Extraction of triglycerides and phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol, *J. Food. Sci.*, **57**, 440-457.
13. Hong, S. K., and B. S. Chun (2000), The effect of ethanol entrainer on Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of seaweed, International Society for the Advancement of Supercritical Fluids, Proc. the 7rd Meeting on Supercritical Fluids, France, 2, pp 671-676.
14. Imbert, R., M. Mathe, and J. Vandermander (1998), Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Aromatic Hop for use in perfumery, International Society for the Advancement of Supercritical Fluids, Proc. the 5rd Meeting on Supercritical Fluids, France, 2, pp 651-654.