Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 21, No. 3, 276-280 (1993)

효소 분해법에 의한 맥주효모 추출물의 제조

이시경* · 박경호 · 백운화 · 유주현[1]
두산기술원 발효연구실, [1]연세대학교 식품공학과

Production of Brewer's Yeast Extract by Enzymatic Method

Lee, Si-Kyung*, Kyung-Ho Park, Un-Hua Pek and Ju-Hyun Yu[1]
Microbial fermentation Lab., Doosan Technical Center, Yongin 449-840, Korea
[1]Department of Food engineering, Yonsei Univ.

Abstract — Cell lytic enzyme, 5′-phosphodiesterase, and AMP-deaminase were used to produce yeast extract as a natural seasoning from beer yeast cells. Prior to the addition of cell lytic enzyme, heat treatment was performed to increase the cell wall degradation; the optimum condition of the cell lytic enzyme was 50℃ at pH 7.0. The production yields by the enzymatic method and conventional autolysis method were 42% and 35%, respectively. The total quantity of 5′-nucleotides, GMP and IMP, produced by enzymatic method was increased by 45% than that by the conventional method. Futhermore, the operation time of enzymatic method was only 6.5 hrs, significantly reduced from 24 hrs of the conventional method.

효모는 인류역사와 함께 오랫동안 사용되어 왔으며 특히 양조와 제빵에 사용되어 왔고 균체내에 많은 단백질과 RNA 등의 핵산, 아미노산, 비타민, 미량의 무기성분(1, 2), glucose tolerance factor 등(3-5)을 함유하고 있다. 따라서 효모를 이용하여 영양원과 조미료를 만들기 위하여 추출물을 만드는 방법(6-19)에 대하여 연구되어 상업화되어 있다.

천연물 엑스는 추출형과 분해형으로 구분할 수 있다. 추출형은 축육 엑스와 어류엑스의 동물계와 야채엑스의 식물계로 분류된다(20). 분해형은 HVP(Hydrolyzed vegetable protein)와 HAP(Hydrolyzed animal protein) 등의 동·식물성의 가수분해계와 효모엑스 등의 자기소화계가 있다. 자기소화계는 균체내의 효소에 의해 균체가 분해되는 autolysis 방법으로 yeast extract가 대표적이라 할 수 있다.

국내에서도 최근 천연조미료의 수요증가에 따라 점차 그 시장이 확대되어 가고 있는 추세이다. 이의 연구에 관하여는 이 등(7)이 대수적 성장기에 수확한 효모에 plasmolyzer로 식염이나 에틸 알콜을 첨가하여 자기소화율을 향상시킨 방법과 네슬사(6)에서의 효모균체를 기계적으로 분쇄한 후 효모현탁액에 오염방지를 위한 아황산염 첨가와 상등액을 정화시키기 위한 칼슘화합물을 첨가하는 방법 및 송 등(8)의 *Candida* 효모에 단백질 분해효소와 자기소화 촉진제로 염화칼륨을 첨가하는 방법 등이 알려져 있다.

그러나 이러한 자기분해에 의한 효모의 분해물 속에는 리보핵산이 정미성이 낮은 구조를 한 nucleotide로 분해된 경우가 많기 때문에 실질적으로 효모추출물의 정미성이 낮다고 생각된다. 또한 이러한 목적으로 사용한 효모는 빵효모가 대부분이나 맥주효모를 사용한 경우는 국내에서는 없다. 맥주공장에서 부산물로 나오는 맥주효모는 동물사료와 영양보조제(nutritional supplement)로 주로 쓰이고 있다. 또한 맥주효모의 건강과 질병에 대하여 유효한 작용의 보고도 나오고 있다(21).

따라서 본 연구에서는 영양성분이 풍부한 맥주효모를 원료로 하여 세포벽용해효소, 5′-phosphodiesterase, AMP-deaminase를 사용하여 추출물의 수율 향상과 정미성이 강한 5′-nucleotide 함량이 많은 효모추출물을 제조하기 위하여 맥주효모의 전처리 및 효모분해 조건을 검토하였으며, 또한 기존의 autolysis

Key words: Brewer's yeast extract, cell lytic enzyme, AMP-deaminase
***Corresponding author**

법과 수율, 반응시간 및 GMP와 IMP 함량을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

재료 및 균주

효모균체는 동양맥주(주) 서울공장에서 맥주발효 후 얻어지는 *Saccharomyces* sp.를 사용하였으며, 효소는 일본 아마노 제약회사의 *Achromobacter lunatis*가 생산하는 cell lytic enzyme과 *Penicillium citrinum*이 생산하는 5′-phosphodiesterase, *Aspergillus melleus*가 생산하는 AMP-deaminase를 사용하였다.

맥주효모의 고미제거

효모의 고미제거를 위하여 Mac Donough 등의 방법을 개량하여(22, 23) 효모균체의 표면에 부착되어 있는 hop에서 유래되는 고미성분은 0.25% NaOH로 처리하여 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 분리하는 알카리 세척법으로 고미가 없는 효모를 얻었다.

세포벽 용해효소의 활성측정

효모현탁액 29 m*l*에 효소액 1 m*l*를 가해 50℃에서 15분간 반응시켜 660 nm에서의 흡광도를 UV-VIS spectrophotometer(Perkin Elmer 555, USA)를 사용하여 세포의 용해활성을 측정하였다.

GMP 및 IMP 분석

5′-nucleotides 정량은 일정량의 샘플을 취해 10배로 희석 후 10 μm filter를 통과시킨 후 HPLC(Perkin Elmer Series 3-B, USA)를 사용하여 표준물질과 비교하여 정량하였다. 이때 column은 Lichrosorb RP-18을 사용하였으며 flow rate는 1.5 m*l*/min이었다.

맥주 효모 추출물의 제조

고미를 제거한 맥주효모를 10% 효모현탁액으로 만들어 열처리 후 세포벽 분해효소를 가하여 50℃에서 5시간 세포질을 용출시켰다. RNA가 함유된 용출액에 5′-phosphodiesterase를 가하여 RNA를 5′-nucleotides로 가수분해하였다. 그 후 생성된 5′-nucleotides 중 정미성이 없는 AMP를 AMP-deaminase를 가하여 정미성이 있는 IMP로 전환시켰다. 이를 원심분리하여 효모 추출물로 하였다.

결과 및 고찰

맥주효모 용해에 미치는 열처리 효과

효모 희석액을 각 온도에서 일정시간별로 열처리를 한 후 cell lytic enzyme 0.1%를 가하여 50℃에서 15분간 효모를 분해시켰다. 이때 Fig. 1에서와 같이 50℃에서 가열처리하는 것이 효모의 분해율이 가장 좋았으며, 열처리 시간 120분까지는 시간의 경과에 따라 효모의 분해가 다소 높은 것으로 나타났으나, 열처리 시작부터 30분 사이에 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 따라서 이후의 실험은 50℃에서 30분간 열처리한 것을 실험에 사용하였다.

Tabata 등(24)이 효모세포벽 용해효소를 처리하기 전에 열처리를 하면 분해율이 증가되며 효모추출물을 많이 얻을 수 있다고 보고한 내용과 본 실험의 결과는 유사하였다. 이는 세포벽 구조가 β-(1-3)linked glucan과 β-(1-6)glucan의 결합으로 구성되고 매우 치밀한 microfibrillar network(25)를 형성하고 있으므로 이 network가 열처리에 의해 느슨하게 되는 효과가 있다고 추정된다. 또한 효모균체내에 3′-phosphodiesterase와 phosphomonoesterase 등이 존재하면 5′-nucleotide 수율이 감소하므로 이들 효소를 불활성화시키는 효과도 함께 나타날 것으로 생각된다.

효모용해에 미치는 용해효소(cell lytic enzyme) 반응온도의 영향

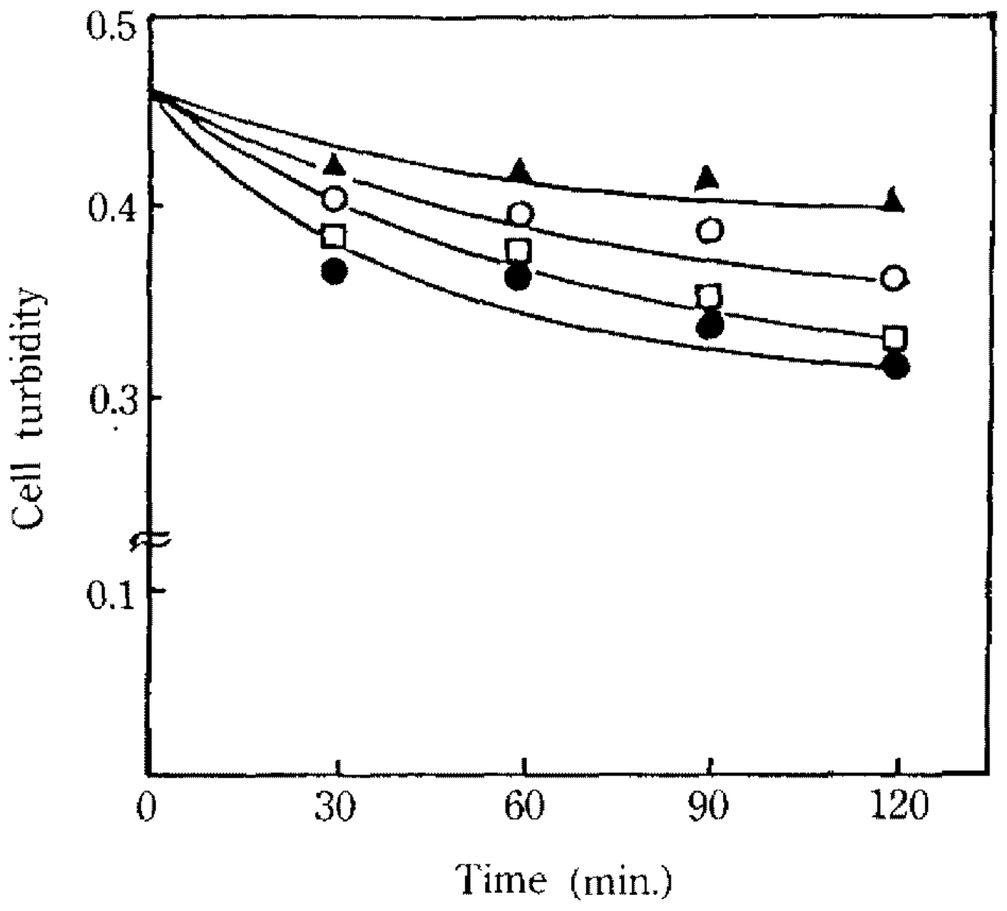

Fig. 1. Effect of heating time and temperature on lysis of beer yeast before cell lytic enzyme treatment.
Heating temperature of beer yeast cell: □ 40℃, ● 50℃, ○ 60℃, ▲ 70℃.

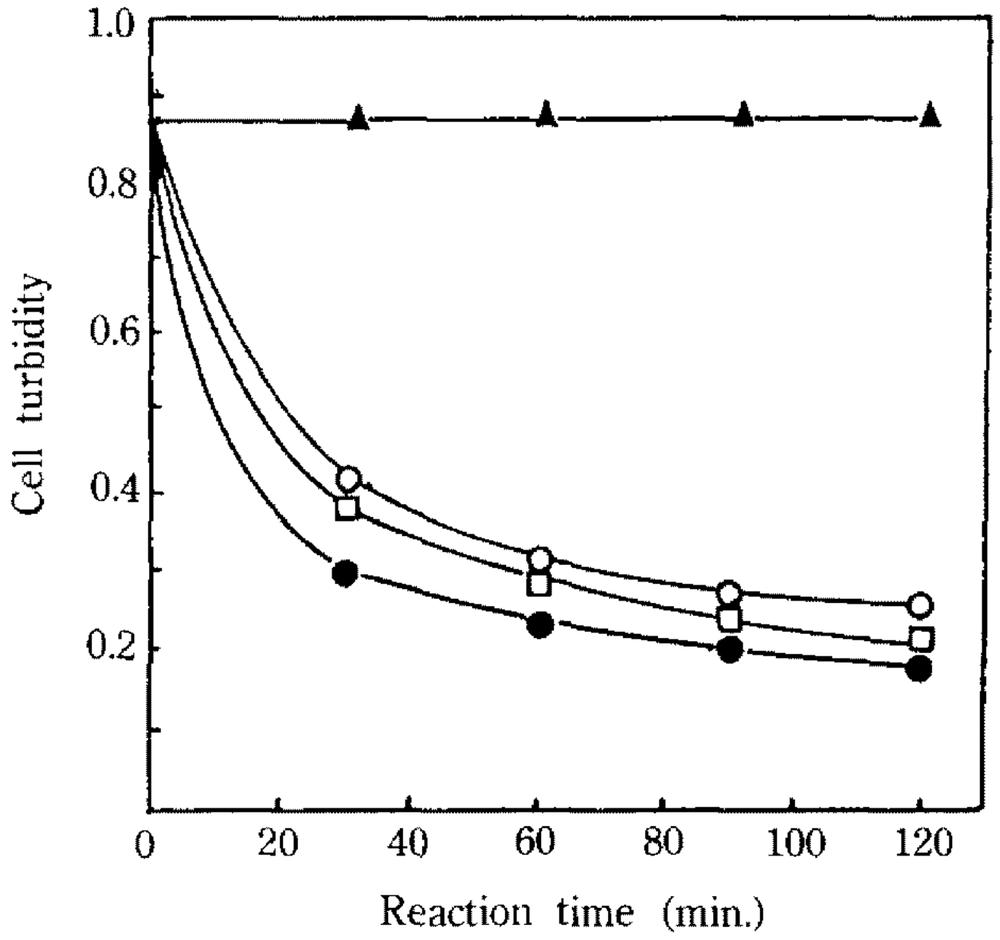

Fig. 2. Effect of reaction temperature of cell lytic enzyme on lysis of beer yeast.
Reaction temperature of lytic enzyme: □ 40℃, ● 50℃, ○ 60℃, ▲ Control.

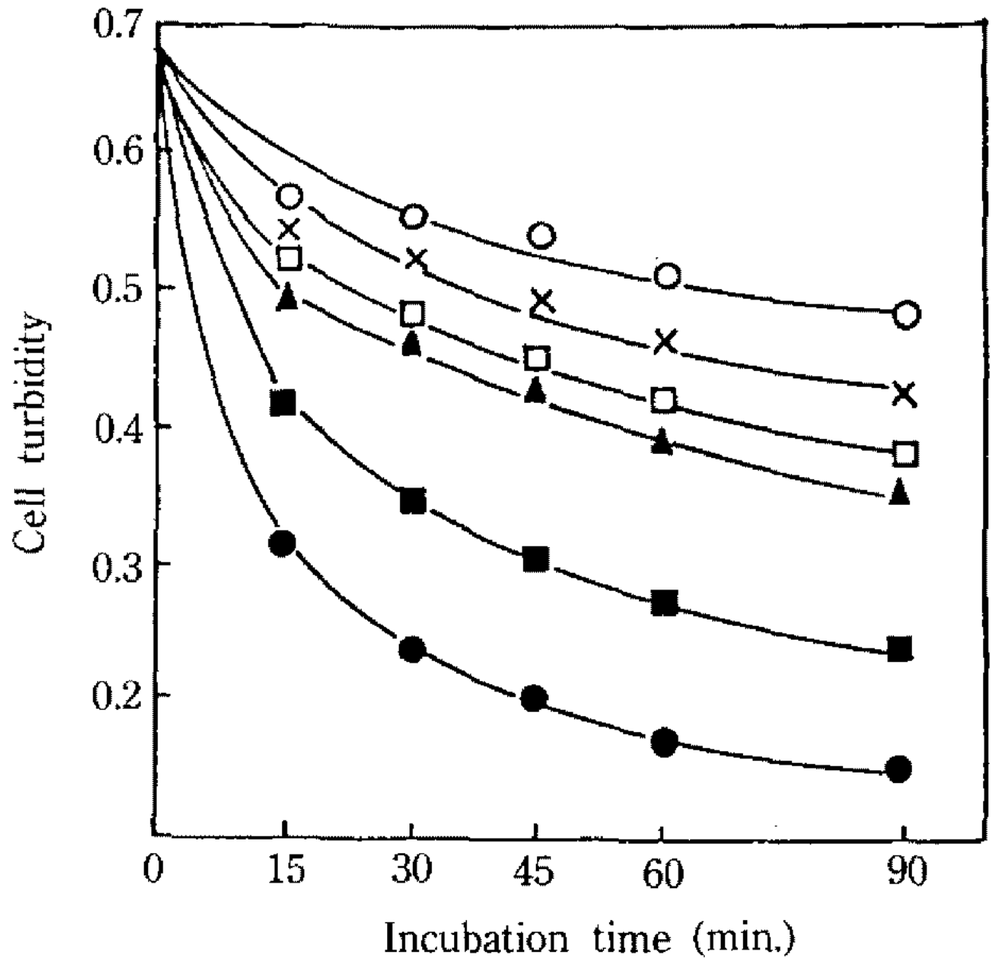

Fig. 3. Effect of enzyme concentration on lysis of beer yeast.
Concentration of cell lytic enzyme: ○ Control, × 0.05%, □ 0.1%, ▲ 0.2%, ■ 0.5%, ● 1.0%.

효모현탁 희석액에 건조 효모 균체량 대비 1% 효소액 0.5 ml를 첨가하여 각 반응온도별로 시간에 따른 흡광도를 측정하였다. Fig. 2에서와 같이 효소 무첨가구는 50℃에서 120분 반응시켰을 때까지 거의 같은 수준의 흡광도를 나타내어, 효모의 분해가 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나 효소를 첨가하여 50℃에서 반응시켰을 때의 흡광도가 가장 낮았다. 이는 이 조건에서 효모세포벽이 가장 많이 분해되었다고 생각할 수 있다. 또한 60℃에서는 40℃에서 반응시켰을 때보다 용해정도가 다소 낮았다.

고농도 효모현탁에 미치는 세포벽 용해효소의 경시적 작용

효소농도에 따른 세포벽 용해의 정도를 조사하기 위해 건조 균체량의 0.05%에서 1%까지의 효소량을 가하여 시간별로 반응시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 첨가 농도 1%까지는 효소농도가 높아짐에 따라 세포벽이 빨리 분해됨을 알 수 있었다. 그러나 이는 효모농도가 낮아 높은 분해율을 얻을 수 있었으나, 추출액의 고형물질의 농도가 낮아 농축에 문제점이 많다. 이를 해결하기 위해서는 가능한한 고농도 효모현탁액을 사용할 필요가 있다. 효모현탁액의 농도를 10%로 제조, 세포벽 용해효소를 1% 첨가하여 반응후 3배 희석액을 만들어 OD_{660}을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 즉, 반응 초기부터 5시간까지는 상당히 분해속도가 빨랐고 그 후부터는 완만하게 분해되었으며, 현미경 관찰에서도 많은 양의 효모세포벽이 분해된 것으로 나타났다. 한편 24시간 분해되었을 때에도 10% 효모현탁액의 분해정도는 5~8시간 분해시켰을 때와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이 결과로부터 작업 회전율, 작업중 오염의 문제 등을 고려하여 맥주효모 10% 현탁액을 5시간 반응시키는 것이 적합하다고 생각되었다.

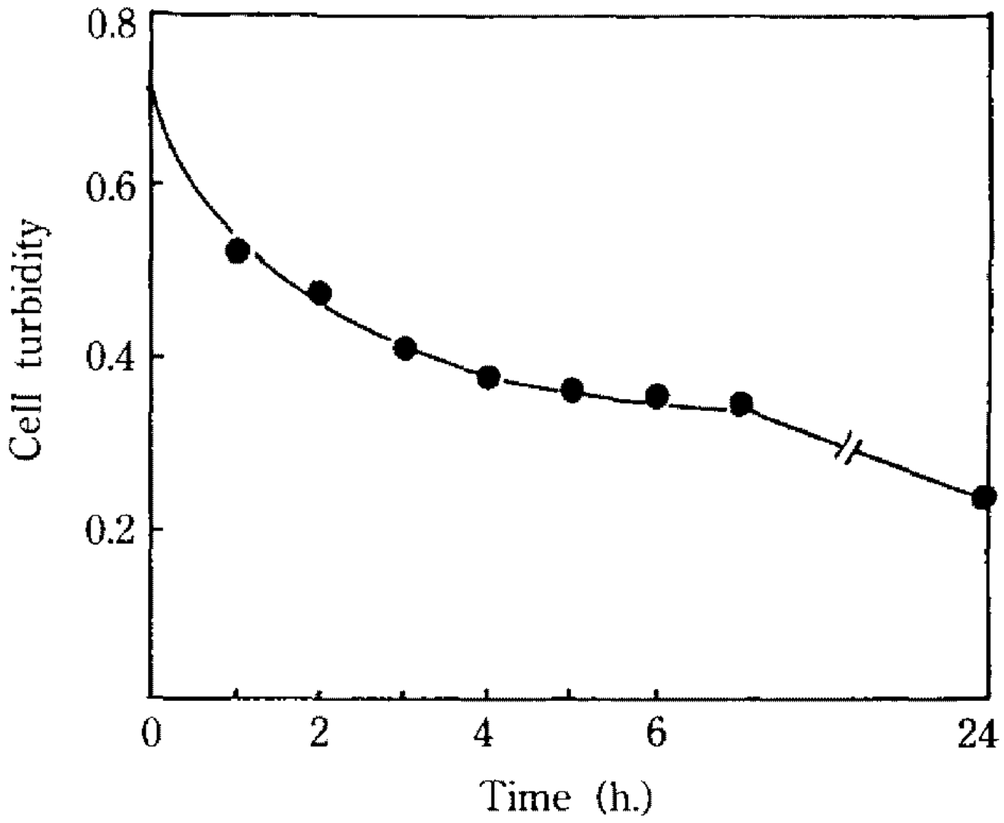

Fig. 4. Effect of reaction time of cell lytic enzyme on lysis of beer yeast.

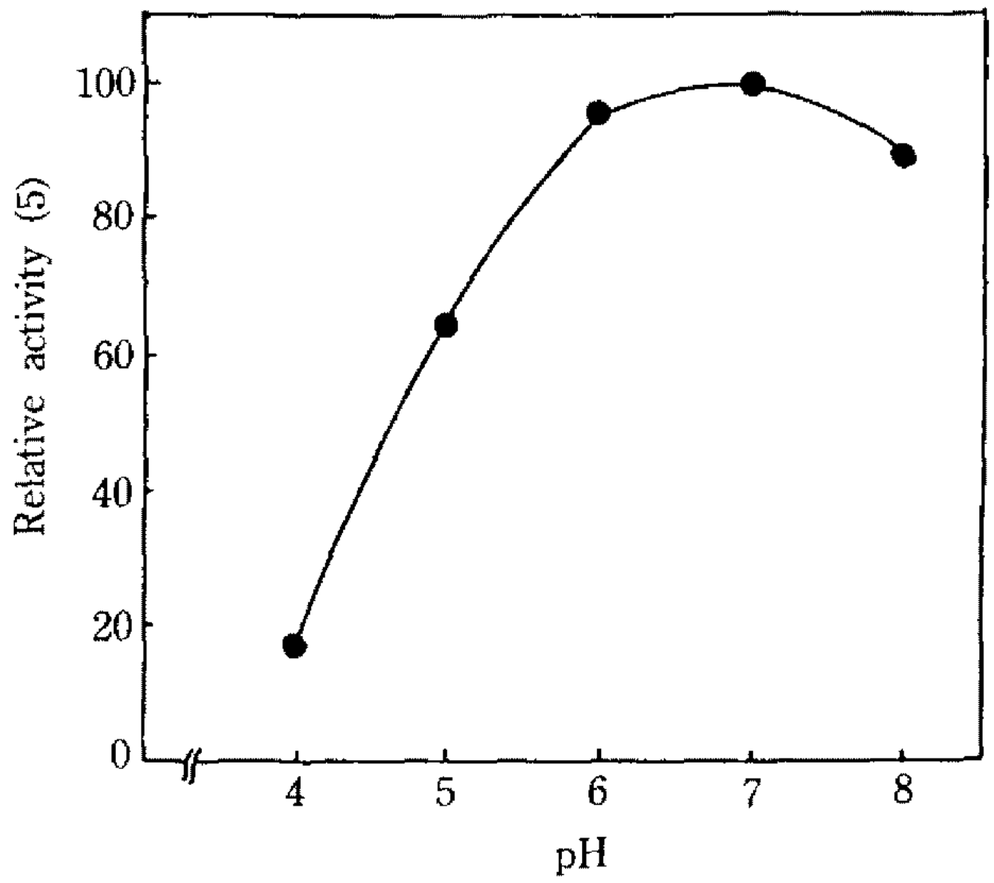

Fig. 5. Effect of pH on lysis of beer yeast by lytic enzyme.

세포벽 용해에 미치는 pH의 영향

맥주효모에 대한 세포벽 용해효소의 최적 pH를 얻기 위해 효모를 각 pH별로 Mactivain buffer(pH 4~8)에 현탁시켜 효소용액을 가하여 50℃에서 5시간 반응 시킨 후 OD_{660}을 측정하였다. Fig. 5에서와 같이 최적 반응 pH는 7.0이었다.이때 pH 6과 8에서도 최대 분해 대비 80% 이상 분해된 것으로 나타났으나 pH 5 이하에서는 현저히 감소됨을 알 수 있었다.

이상의 용해효소를 사용하여 맥주효모를 용해시키기 위한 반응 조건은 10% 효모현탁액의 pH를 7.0으로 조절하여 효소를 1% 첨가한 후 50℃에서 5시간 반응시킨 것이 최적이었다. 일반적인 빵효모의 경우는 pH 5.0, 55℃에서 24시간 자기소화를 시키는 방법 등(7)이 있으나 처리시간은 일반적으로 오랜시간이 요구되었다.

효소 사용법에 의한 맥주효모 추출물의 제조

NaOH 용액으로 고미를 제거한 맥주효모를 고형분함량 10%되게 조절한 현탁액(pH 7.0) 100 g을 500 ml 삼각 flask에 넣어 50℃에서 30분간 열처리를 하였다. 그 후 맥주 효모현탁액에 세포벽 용해효소(cell lytic enzyme)를 1%되게 첨가한 다음 50℃에서 5시간 세포물질을 용출시켰다. RNA가 세포물질내에 함유되어 있는 맥주효모 용출액에 5′-phosphodiesterase를 가하여 RNA를 5′-nucleotides로 분해시키기 위하여 효모 용출액의 pH를 5.5로 조절하여 70℃에서 30분간 반응시켰다.

Table 1. Comparison of yeast extract by two methods

	Enzyme method	Autolysis method
	Quantity (dry basis)	Quantity (dry basis)
Yeast slurry (g)	100(10)	100(10)
Dry wt. of yeast extract (g)	75(4.2)	73.7(3.51)
Relative yield*	42%(120)	35.1%(100)
GMP+IMP (g)	0.126(145)	0.087(100)

$$*\text{Relative yield} = \frac{\text{Dry wt. of yeast extract}}{\text{Dry wt. of yeast slurry}} \times 100(\%)$$

Table 2. Composition of brewer's yeast extract

Item	Content
Moisture	94.9%
Amino nitrogen	3.6 g %
Total nitrogen	10.65 g %
Crude protein	66.5 g %
Ash	15.34 g %

또한 이반응액 중에 함유되어 있는 AMP(adenosine 5′-monophosphate)는 정미성분이 아닌 것으로 알려져 있어 purine 염기의 6′위치에 -OH기가 있어 정미성이 있는 IMP(inosine 5′-monophosphate)로 전환(deamination)시킬 목적으로 반응액을 40℃로 냉각한 후 AMP-deaminase를 0.01%되게 첨가하여 30분간 반응시켰다.

이 반응액을 원심분리하여 상등액 중에 있는 yeast extract의 건조량 및 정미성을 갖는 GMP와 IMP의 함량 및 일반성분을 분석한 결과는 Table 1 및 2와 같았다. 이때 기존의 Autolysis 방법과 수율, GMP+IMP 함량을 비교하기 위하여 Hirosh(26)의 방법에 따라 고형분 함량 10%의 맥주 효모현탁액을 55℃에서 24시간 반응시켜 맥주효모 추출물을 얻었다. 이의 결과는 Table 1에서와 같이 효소를 사용한 경우 yeast extract의 건조량은 4.2 g이었고 GMP와 IMP의 함량은 0.126 g이었다. 이는 효소를 첨가하지 않은 autolysis법에 비하여 건조 yeast extract량은 1.2배, GMP와 IMP 함량은 1.45배 증가한 것을 알 수 있었다. 또한 cell lytic enzyme, 5′-phosphodiesterase, AMP-deaminase 등의 효소를 미량 사용하면 제조시간이 6시간 30분이 소요되므로 일반적인 autolysis법이 24시간 이상인 것과 비교할 때 약 1/4로 단축되어 추출물

제조시 오염의 위험없이 생산 수율과 GMP와 IMP 등의 조미성이 높은 맥주 효모 추출물을 만들 수 있었다.

요 약

천연 조미료의 수요증가에 따라 맥주공장에서 부산물로 나오는 맥주효모를 효소에 의해 분해하여 정미력이 높은 5′-nucleotides가 함유된 맥주효모 추출물(yeast extract)을 제조하였다. 이때 세포벽 용해효소로 효모를 처리하기전 50℃에서 30분간 열처리가 필요하였으며, 맥주효모에 대한 cell lytic enzyme의 최적 pH는 7.0, 최적 반응온도는 50℃이었다. 맥주효모를 원료로 하여 효소 분해법과 기존의 autolysis법으로 효모 추출물(yeast extract)을 제조 비교시, 수율은 각각 효모현탁액 중의 고형분 대비 42%, 35%로 효소 분해법이 autolysis법에 비하여 20% 증가하였으며, 효모 추출물 중의 GMP와 IMP의 함량도 효소 분해법이 autolysis법에 비하여 45% 증가하였다. 또한 효소 분해법에 의한 반응시간은 전처리 공정을 제외하면 6.5시간으로 추출물 제조시 미생물 오염방지와 공정 회전율 향상에 효과적이라 생각된다.

참고문헌

1. Farre, R., M.J. Gimeno and M.J. Lagarda. 1987. The occurrence of chromium in raw materials and fate in the brewing process. *J. Inst. Brew.* **93**: 394-395.
2. Henry, J.P. 1965. Amino acid composition of yeast grown different spent sulfite liquers. *J. Agri. Food Chem.* **13**: 34-36.
3. Robert, W.T., T.B. James and J.D. Richard. 1978. Comparison and effects of natural and synthetic glucose tolerance factor in normal and genetically diabetic mice. *J. Diabetes.* **27**: 49-56.
4. Edward, W.T., M. Walter, E.R. Edward and R.W. Wayne. 1977. Preparation of chromium containing material of glucose tolerance factor activity from brewer's yeast extract and by synthesis. *J. Agri. Food Chem.* **25**: 162-166.
5. Holdsworch, E.S. and G. Appleby. 1984. Assay of glucose tolerance factor and its mode of action with brewer's yeast. *J. Inorg. Biochem.* **21**: 31-43.
6. 한국특허 81-1376(Rehasek, J.(Nestle)): 효모추출물의 제조방법.
7. 한국특허 80-2743(이철호): 효모엑기스의 제조방법.
8. 한국특허 83-5058(송인상): 계량된 효모엑기스의 제조방법.
9. Japan patent 54-14176(Ajinomoto): ビール酵母エキスの製造法.
10. Japan patent 57-71376(Ajinomoto): 酵母エキスの製造方法.
11. Japan patent 51-32766(出光興産): 酵母エキスの製造方法.
12. Japan patent 54-28467(出光興産): 酵母エキスの製造方法.
13. U.S. patent 3961080(Kikkoman): Process for autolysis of yeast.
14. Japan patent 54-13496(Kikkoman): 酵母エキスの製造法.
15. Knorr, D., K.J. Shetty, L.F. Hood and J.E. Kinsella. 1979. An enzymatic method for yeast autolysis. *J. Food Sci.* **44**: 1362-1365.
16. Hough, J.S. and I.S. Maddix. 1970. Yeast autolysis, Process Biochemistry, May, 50-53.
17. 이철호, 박장열, 정경식. 1981. 자기소화시간에 따른 효모 extract의 성분과 풍미변화. 한국식품과학회지 **13**: 181-187.
18. U.S. patent 4264628(Henkel): Process for the production of a yeast autolysis.
19. U.S. patent 4285976(Standard Oil Co.): Method for accelerating autolysis of yeast.
20. 赤澤好溫: ビール酵母の驚異, 講談社, p. 51 (1984).
21. 富田剛: 日本食品工業, 4月(下), Pp. 27-33 (1985).
22. Donough, M.J.V. and T.C. Haffenreffer. 1944. Brewer's yeast. *Wallerstein Labs Communs* **7**: 31-35.
23. Nay, E.V. 1954. Brewer's yeast, washing and debettering. *Brewer's Digest*, **29**: 51-57.
24. Tabata, S., and G. Terui. 1965. Digestion of yeast cells by yeast cell wall lytic enzyme. *J. Ferment. Technol.* **43**: 766-771.
25. Rombouts, F.M. and H.J. Phaff. 1976. Lysis of yeast cell wall. *Eur. J. Biochem.* **63**: 109-120.
26. Hirosh, S. 1974. Synergistic effect of ethanol and sodium chroride on autolysis baker's yeast for preparing food grade yeast extract. *J. Food Sci.* **39**: 939-942.

(Received May 12, 1993)