

자기소화와 효소가수분해 방법을 병용한 효모 추출물의 제조

¹인 만 진 · † 채 희 정

호서대학교 식품생물공학과 및 벤처전문대학원 첨단산업기술전공,

¹청운대학교 식품영양학과

(접수 : 2004. 1. 7., 게재승인 : 2004. 8. 26.)

Production of Yeast Extract by a Combined Method of Autolysis and Enzymatic Hydrolysis

Man-Jin In¹ and Hee Jeong Chaet[†]

Department of Food and Biotechnology, and Department of Innovative Industrial Technology,
Hoseo University, Asan 336-795, Korea

¹Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea

(Received : 2004. 1. 7., Accepted : 2004. 8. 26.)

A combined method of autolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast was developed for the production of yeast extract, which is widely used as a natural food ingredient. From statistical analysis, NaCl and ethanol addition were found to be significantly effective factors in autolysis of yeast. The optimum dosages of salt and ethanol were 3% and 1%, respectively. Heat treatment and the use of cell lytic enzyme were not significantly effecting on the autolysis. Yeast hydrolysate was prepared by autolysis, followed by enzymatic hydrolysis using proteases, nuclease and deaminase. Additionally, the hydrolysate was processed by downstream process including Maillard reaction and debittering. The total dry matter yield and total nitrogen yield for the process were 76% and 59%, respectively. Compared to a process using brewer's yeast, when baker's yeast was used as a raw material, a higher recovery yield was obtained.

Key Words : Yeast extract, baker's yeast, autolysis, enzymatic hydrolysis

서 론

효모는 양조, 제빵산업 등의 식품 분야에서 오래 전부터 여러 가지 유용 물질의 원료로 사용되고 있으며, 균체 내에 50% 내외의 단백질, 지질, RNA 등의 핵산, 각종 비타민 및 미네랄을 함유하고 있다. 효모로부터 제조되는 효모 추출물은 미생물 발효 배지와 고급화, 건강 지향 조미료의 원료로서 사용되며 산분해 HVP (hydrolyzed vegetable protein)의 대체 또는 병합 사용이 가능한 원료이며 MSG (monosodium glutamate)의 대체물로서도 사용되고 있는 제품이다. 또한 효모 추출물은 식품용 효모를 배양한 후 적절한 처리 (NaCl, 에탄올 등의 추출 처리 또는 효소 처리)에 의해 생산되므로 산분해 HVP와 같은 유해성 문제를 유발하지 않는 천연의 식품 소재이다.

효모 추출물의 제법과 응용에 대하여는 꾸준히 연구·보고되고 있다(1-4). 일반적으로 효모 추출물의 원료는 빵 효모가 이용되며 맥주 제조의 부산물인 맥주 효모는 쓴맛 때문에 원료로 사용하는 경우는 많지 않다(4, 5). 효모 추출물의 제조 방법은 크게 자기소화법 (autolysis)과 효소분해법으로 구분되며, 통상적인 자기소화법은 10~20%의 빵효모 현탁액에 식염이나 에탄올을 첨가하고 30~70℃에서 교반하여 효모 세포 내 존재하는 효소의 작용으로 자기분해된 분해물을 얻는 경제적인 효모 추출물 제조방법이다(6). 이 과정에서 자기소화를 촉진하기 위하여 유기용매(7), 세포벽 용해효소(8), 효모 자기소화액(9) 등을 첨가하는 방법이 보고되어 있다. 효소분해법은 기본적으로 세포벽 용해효소, 단백질 분해효소 및 핵산 분해효소 등을 순차적으로 첨가하는 방법(4, 10, 11)으로 자기소화법에 비하여 수율이 향상되는 장점이 있으나 추가 효소의 사용으로 경제적인 측면에서 단점이 있다. 맥주 효모를 원료로 사용하는 경우, 발효 후 효모 균체를 얼처리하는 경우가 대부분이므로 자기소화법만으로는 효율적인 분해가 곤란하다. 그러므로 세포벽 분해효소와 단백질 분해효소를 사용하는 것이 효모 추출물의 제조에 유리하다(4, 5). 효모

† Corresponding Author : Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea
Tel : +82-41-540-5642, Fax : +82-2-6280-6346
E-mail : hjchae@office.hoseo.ac.kr

추출물은 제조 방법에 따라 제품의 품미, 성분조성 및 가격의 편차가 매우 다양하여 여러 가지 종류의 효모 추출물들이 시판되고 있다.

본 연구는 효모 추출물 제조 공정의 개선을 위한 연구의 일환으로 수행되었으며, 제빵용 효모를 1차로 자기소화법으로 분해시킨 후 2차로 단백질 분해효소와 핵산 분해효소를 처리하는 2단계의 효모 추출물 제조 공정에서 효과적인 효모의 자기소화 조건을 실험계획법으로 조사하여 최적화하였다. 또한 단백질 분해효소와 핵산 분해효소는 기존의 방법에 준하여 사용하였으며, 품미 증강과 쓴맛의 제거 공정을 이용하여 효모 추출물 제조를 위한 공정을 확립하였다.

재료 및 방법

실험재료

제빵용 인스턴트 효모 (instant yeast)는 Lesaffre International (Marcq-en-Baroeul, France)의 제품을 사용하였다. 상업용 효소의 사용은 기존의 보고와 동일하게 단백질 분해효소는 Novozyme사 (Bagsvaerd, Denmark)의 Flavourzyme과 Protamex를(5), 세포벽 분해효소는 Biocatalysts사 (Wales, UK)의 DEPOL을, 5'-phosphodiesterase와 AMP-deaminase는 Amano Pharmaceutical사 (Nagoya, Japan)의 Enzyme RP-1과 Deamizyme를 각각 사용하였다(4).

자기소화 조건확립

효모의 자기소화에 영향을 주는 인자를 선별하기 위하여 효모를 건조 균체량 기준으로 15% (w/w)가 되도록 증류수에 현탁한 후 Table 1과 같은 조건으로 처리하여 50℃에서 180 rpm으로 진탕 교반하면서 자기소화를 유도하였다. 구체적으로는 효모의 자기소화시 NaCl, 에탄올, lytic enzyme처리, 열처리의 영향을 조사하기 위하여 Greco-Latin square design (4인자 3수준)을 이용하였다. NaCl 첨가량 (0, 3, 6%), 에탄올 첨가량 (0, 3, 6%), 열처리 조건 (비처리; 80℃, 3 min; 90℃, 5 min), 세포벽 분해효소 첨가량 (0, 0.01, 0.1%) 조건에서 시료를 채취하여 원심분리 후 상등액의 고형분 함량을 경시적으로 분석하였다. 12시간 반응 후 고형분 함량 데이터로 분산분석하여 통계적으로 유의한 요인을 선별하였다.

Table 1. Greco-Latin square experimental designs and dry matter yields

Alignment	Experimental conditions				Dry matter content ¹⁾ (%)
	A (NaCl %)	B (EtOH %)	C (Heat, °C, min.)	D (Lyt. enz %)	
A1B1C1D1	0	0	0	0	5.8
A1B2C2D3	0	3	80, 3	0.5	11
A1B3C3D2	0	6	100, 3	0.05	14.8
A2B1C2D2	3	0	80, 3	0.05	2.6
A2B2C3D1	3	3	100, 3	0	5.6
A2B3C1D3	3	6	0	0.5	6.4
A3B1C3D3	6	0	100, 3	0.5	0.1
A3B2C1D2	6	3	0	0.05	0.8
A3B3C2D1	6	6	80, 3	0	3.2
A1B1C1D3	0	0	0	0.5	3.2

1) Dry matter content after 12 hr autolysis.

효모 추출물의 제조

건조 효모를 증류수에 15% (w/w) 농도로 현탁하고 NaCl 3% (w/w)와 에탄올 1% (w/w)를 첨가하여 50℃에서 150 rpm으로 교반하면서 16시간 동안 자기소화로 효모를 분해한 후 추가로 exopeptidase로 작용하는 Flavourzyme과 endopeptidase로 작용하는 Protamex를 단백질 기준으로 각각 2% (w/w)씩 첨가한 후 pH 7.0과 50℃에서 동일하게 교반하면서 7시간 반응시켰다. 또한 5'-phosphodiesterase와 AMP-deaminase를 각각 0.03%씩 순차적으로 첨가하고 pH 5.5, 50℃에서 동일하게 교반하면서 2시간 반응시켰다. 반응 종료 후 반응액을 끓는 물에 5분간 가열하여 효소를 실활시킨 후 4℃에서 원심분리 (10,000 x g, 15분)하여 불용성 성분을 제거하여 투명한 효모 추출물을 얻은 후 품미 향상을 위하여 Maillard 반응과 쓴맛을 제거하기 위한 흡착수지 처리 방법은 기존의 보고(12)에 준하여 실시하였다.

분석방법

효소분해로 생성된 수용성 성분의 총량은 원심분리 (10000 x g, 15분)로 불용성 성분을 제거하고 상등액의 고형분 함량은 reflectometer (Atago사, Japan)로, 총 질소 (total nitrogen; TN) 함량은 micro-Kjeldahl법으로 측정하였다. 가수분해 후 원료의 고형분 및 단백질의 가용화율을 나타내는 고형분 수율과 단백질 이용률은 기존의 방법(13)에 준하여 원심분리 후 상등액의 고형분 함량과 총 질소함량을 이용하여 계산하였다.

통계분석

통계분석은 SPSS 10.0 For Windows (SPSS Science, USA)을 이용하여 F-검정법에 의해 분석하였다(14).

결과 및 고찰

자기소화 영향인자 선별

효모의 자기소화에 영향을 주는 인자 중 NaCl, 에탄올, 세포벽 분해효소, 열처리의 영향을 조사하기 위하여 Greco-Latin square design (4인자 3수준)을 이용하여 Table 1과 같이 배치하고 50℃에서 180 rpm으로 진탕 교반하면서 경시적으로 시료 채취하여 원심분리 후 상등액의 고형분 함량을 분석하였다. 이때 반응액에 첨가된 NaCl과 에탄올에 의한 고형분 농도 증가량은 대조군으로 보정하였다. 반응시간에 따른 고형분 함량 변화는 12시간까지는 고형분 함량의 증가가 있었으나, 그 후에는 고형분의 증가는 미미하였다. 12시간 반응시킨 후 고형분의 농도를 Table 1에 나타내었다. 이 실험 결과를 F-검정법으로 통계적으로 처리한 결과 반응시간에 따른 고형분 함량의 변화에서 인자 D (lytic enzyme 처리)는 가장 유의하지 않았으므로 (데이터 제시는 생략함), 1차 pooling 후 분산분석을 재실시하였다 (Table 2). NaCl 첨가량 (인자 A)은 $\alpha=0.05$ 수준에서 고형분 함량에 유의하게 영향을 미친다고 할 수 있었으며 무첨가군에서 가장 높은 고형분 함량을 나타냈다. 에탄올 첨가량 (인자 B)은 $\alpha=0.10$ 수준에서 고형분 함량에 유의한 차이를 보였으며, 첨가량과 고형분 함량은 양의 상관관계를 보였다. 인자 C (열처리 조건)의

경우 효모에 heat shock을 가하면 세포 내 효소들의 작용으로 자기소화가 촉진되는 것으로 보고(15)되어 있으나 본 연구에서는 통계적으로 유의하지 않았다. 최종적으로 NaCl과 에탄올의 첨가가 효모의 자기소화에 유의수준 95%에서 통계적으로 유의한 요인으로 판명되었다($F_0 = 52.86 > 19$).

Table 2. Analysis of variance after the first pooling for dry matter content at 12 hr

Variable	Sum of square for treatment (SST)	Degree of freedom (k-1)	Mean squares (MTS)	$F_0^{1)} = MST/MSE^{2)}$
ST	182.53	8		
SA	128.39	2	64.19	52.86*
SB	42.34	2	21.17	17.43
SC	9.38	2	4.69	3.86
SE	2.43	2	1.21	

1) $\square=0.1$, $F_0=9$; $\square=0.05$, $F_0=19$; $\square=0.01$, $F_0=99$.
 2) MSE: mean squares of error.

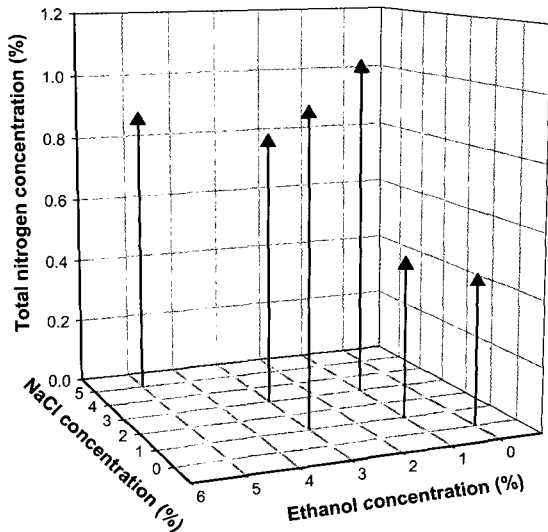


Figure 1. Effects of NaCl and ethanol addition on total nitrogen concentration in yeast autolyzate. All combinations were incubated with 15% (w/w) baker's instant yeast for 12 hr.

효모의 자기소화

효모의 자기소화에서 NaCl과 에탄올의 최적 첨가량을 결정하기 위하여 효모에 NaCl과 에탄올의 첨가량을 변화시킨 후 46시간 자기소화시킨 후 상등액의 고형분과 총 질소 함량의 변화를 측정하였다. 고형분과 총 질소의 함량은 NaCl과 에탄올의 첨가량에 비례하여 어느 정도 증가하는 경향을 보였으나, NaCl과 에탄올을 각각 5% 첨가한 경우에도 더 이상의 고형분이나 총 질소 함량은 증가하지 않았다. 총 질소 함량을 비교한 결과(Fig. 1), 무처리군과 NaCl과 에탄올을 각각 1% 사용한 경우는 상등액의 총 질소의 농도가 0.44-0.48% 수준이었으나 NaCl 3%, 에탄올 1% 첨가시 총 질소 함량은 1.04%로 증가하였으며 85%의 단백질 이용율을 보였다. 또한 고형분 수율은 NaCl 3%, 에탄올 1% 조건에서 가장 높은 78.7%이었다. 효모의 자기소화 과정에서 NaCl 첨가량이 증가할수록 초기의 반응속도가 느려지나, 미생물의 오염을 방지

할 수 있기 때문에 NaCl이 적정 농도로 첨가되는 것이 바람직하다. 에탄올 또한 yeast의 자기소화 과정 중의 부패를 막기 위하여는 일정 수준 이상으로 첨가하는 것이 일반적이다. 그러므로 효모의 자기소화시 NaCl 첨가량은 3%, 에탄올 첨가량 1%가 적절할 것으로 판단되었다.

효모 현탁액에 NaCl 3%와 에탄올 1%를 첨가하고 50℃에서 180 rpm으로 진탕 교반하면서 경시적으로 시료 채취하여 원심분리 후 상등액의 고형분 함량과 총 질소 함량의 변화를 조사하였다(Fig. 2). 그 결과 고형분의 농도는 반응 약 10시간 경과 후 10~11% 정도로 더 이상 증가하지 않았으나, 총 질소의 농도는 약 20시간 이상 반응시킨 후 평형에 도달하였다. 이는 효모 추출물의 제조과정에서 단순히 자기소화 반응만으로 보다는 상업용 단백질 분해효소를 병용하는 것이 필요함을 시사하는 결과이다.

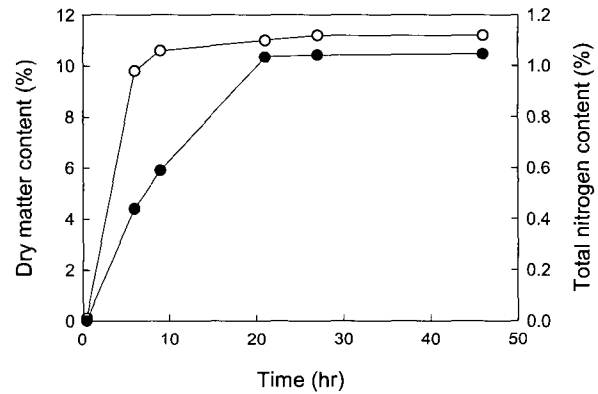


Figure 2. Time courses of dry matter content (open circle) and total nitrogen content (closed circle) in the yeast autolysis. NaCl and ethanol were added to yeast suspension at concentration of 3% and 1%, respectively.

효모추출물 제조 실험

맥주 효모로부터 효모 추출물을 제조하는 보고된 제조 공정(12, 16)을 이용하여 제빵용 인스턴트 효모로부터 효모 추출물을 제조하였다. 전체적인 제조공정을 Fig. 3에 나타내었으며, 각각의 단위 공정에서 고형분과 총 질소의 함량의 변화를 Table 3에 정리하였다. 전체 공정의 개요는 다음과 같다. 본 연구에서 확립된 조건으로 효모를 자기소화시킨 후 단백질의 가수분해도를 향상시킬 수 있는 방법(17)으로 작용기작이 상이한 두 종류의 상업용 단백질 분해효소 (Protamex와 Flavourzyme)를 동시에 처리하였다. 그 결과 총 질소의 함량이 증가하였다. 단백질 분해 효소에 의한 처리 후 효모에 존재하는 핵산을 분해하여 정미성분을 얻기 위하여 nuclease인 5'-phosphodiesterase를, 핵산 분해물 중 정미력이 미미한 AMP를 정미력이 우수한 IMP로 전환시키기 위하여 AMP-deaminase를 처리하였다(4). AMP-deaminase의 처리로 총 질소가 감소하였다. 효소분해 후 원심분리로 불용성 성분을 제거하고, 추가로 환원당과 아미노산은 첨가하지 않고 100℃에서 2시간 건열로 가열하여 Maillard 반응을 통하여 풍미를 향상시켰다. 일반적으로 단백질 분해물은 소수성 아미노산에 의하여 쓴맛이 나타나므로(18) 쓴맛 성분을 제거하는 공정이

Table 3. Change of dry matter content and total nitrogen content during yeast extract production

	Unit operation						Overall yield (%)
	Autolysis	Protease treatment	Nuclease treatment	Deaminase treatment	Maillard reaction	XAD7 treatment	
Dry matter content (%)	13.2	12.6	13.4	13.4	13.0	11.4	76
Total nitrogen content (%)	0.741	0.882	0.982	0.807	0.900	0.803	59

필요하다. 쓴맛 성분을 제거하는 debittering 방법은 주로 흡착수지를 사용(12, 19)하여 소수성 아미노산을 제거하는 것이 경제적이므로 본 연구에서도 aliphatic acrylic polymer 수지인 Amberlite XAD7 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA)을 이용하였다. 최종적으로 얻어진 효모 추출물의 수율은 고형분 기준으로 76%, 총 질소 기준으로 59%이었다.

국내의 맥주 효모(♀) 두산 이천공장)를 입수하여 Fig. 3과 동일하게 처리한 결과 고형분 기준의 수율은 55-56%, 총 질소 기준의 수율은 54%로 계산되었다(4, 12). 제빵용 효모를 이용하여 효모 추출물을 제조하는 것이 맥주 효모를 이용하는 것보다 수율면에서도 유리함을 알 수 있었다. 이것은 맥주 효모의 경우 발효 후 효모 균체를 열처리하여 자기소화함으로써 효율적인 분해가 곤란하기 때문인 것으로 판단된다.

결론적으로 효모에 NaCl과 에탄올을 첨가하여 자기소화시킨 후 효소처리를 병용하여 Fig. 3에 제시된 공정을 이용하면 높은 수율로 효모 추출물을 제조하는 것이 가능하였다.

요약

천연 식품 소재로 널리 사용되는 효모 추출물을 제조하는 공정의 개선을 위하여 제빵용 효모를 이용하여 자기소화법과 효소처리법을 병용하여 효모 추출물을 제조하였다. NaCl과 에탄올이 효모의 자기소화에 영향을 미치는 인자이었으며 최적 첨가량은 각각 3%와 1%이었다. 효모의 열처리와 효모 세포벽 분해효소의 사용은 유의하지 않았다. 효모를 자기소화시킨 후 단백질 분해효소와 핵산 분해효소를 처리하고 Maillard 반응과 debittering 공정을 거쳐 효모 추출물을 제조하였다. 최종적으로 얻어진 효모 추출물의 수율은 고형분 기준으로 76%, 총 질소 기준으로 59%이었다. 맥주 효모를 이용한 결과와 비교하면 제빵용 효모를 이용하는 것이 맥주 효모를 이용하는 것보다 수율면에서도 유리하였다.

REFERENCES

- Hirosh, S. (1974), Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis baker's yeast for preparing food grade yeast extract, *J. Food Sci.* **39**, 939-942.
- Izzo, H. V. and C. T. Ho (1992), Ammonia affects maillard chemistry of an extruded autolyzed yeast extract: pyrazine aroma generation and brown color formation, *J. Food Sci.* **57**, 657-659, 674.
- Choi, S. J. and B. H. Chung (1998), Simultaneous production of invertase and yeast extract from baker's yeast, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 308-311.
- Chae, H. J., H. Joo, and M.-J. In (2001), Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics, *Bioresource Technol.* **76**, 253-258.
- Chung, Y., H. J. Chae, D. C. Kim, N.-S. Oh, M. J. Park, Y. S. Lee, and M.-J. In (1999), Selection of commercial proteolytic enzymes for the production of brewer's yeast extract, *Food Eng. Progress* **3**, 159-163.
- Lee, B. H. (1996), In *Fundamentals of Food Biotechnology*, VCH Publishers, Inc., New York.
- Breddam, K. and T. Beenfeld (1991), Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 323-329.
- Tabata, S. and G. Terui (1965), Digestion of yeast cells by yeast cell wall lytic enzyme, *J. Ferment. Technol.* **43**, 766-771.
- Roman, K., S. Ernest, and F. Vladimir (1991), Induction and acceleration of yeast lysis by addition of fresh yeast autolysate, *Biotechnol. Lett.* **13**, 543-546.
- 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.
- Rayan, E. and O. P. Ward (1988), The application of lytic enzymes from *Basidiomycete aphyllophorales* in production of yeast extract, *Process Biochem.* **23**, 12-16.

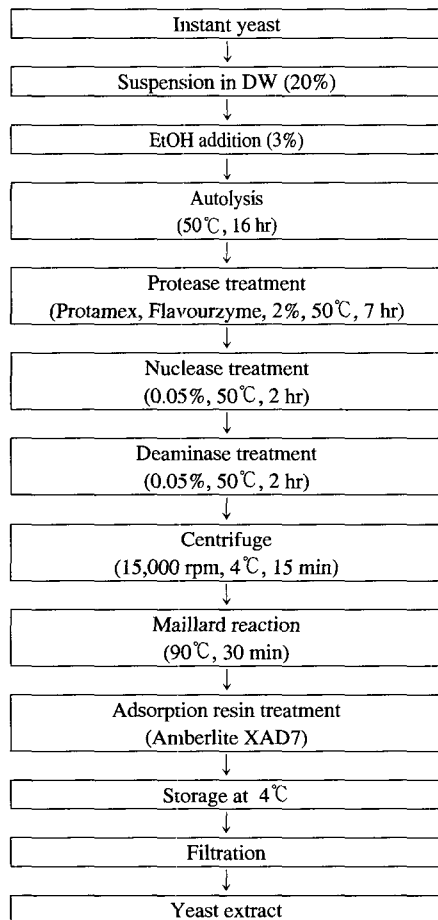


Figure 3. The whole process diagram of yeast extract production using instant yeasts.

12. In, M.-J., D. C. Kim, and H. J. Chae (2004), Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract, Part 2: Downstream process containing debittering step with synthetic adsorption resin, *Bioresource Technol.* (in press).
13. Chae, H. J., M.-J. In, and J. D. Lee (1998), Production of a protein supplement from soymilk residues by combined use of enzymes and microorganisms, *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 73-77.
14. Kang, H. C., S. T. Han, and E. S. Lee (2002), In *SPSS Data Analysis and Application*, Jayu Academy, Seoul, Korea.
15. Lee, Y. C. and Y. S. Kim (1993), Development of a new processing method and quality evaluation of yeast autolyzate, *Korean J. Food Sci. Technol.* **25**, 78-82.
16. Lee, S.-K., K.-H. Park, U.-H. Pek, and J.-H. Yu (1993), Production of brewer's yeast extract by enzymatic method, *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 276-280.
17. Chae, H. J., M.-J. In, and M.-H. Kim (1997), Optimization of enzymatic treatment for the production of hydrolyzed vegetable protein, *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 1125-1130.
18. Adler-Nissen, J. (1986), In *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier Applied Science Publisher, New York, USA.
19. Lin, S. B., L. P. Nelles, C. T. Cordle, and R. L. Thomas (1997), Debittering casein hydrolysates with octadecyl-siloxane (C18) columns, *J. Food Sci.* **62**, 665-670.