

맥주효모로부터 효모 추출물의 제조를 위한 산업용 단백질 분해효소의 선별

정영선 · 채희정 · 김동청 · 오남순* · 박미자** · 이양순** · 인만진***

대상(주) 중앙연구소, *공주대학교 식품공학과,
공주대학교 식품영양학과, *청운대학교 식품영양학과

Selection of Commercial Proteolytic Enzymes for the Production of Brewer's Yeast Extract

Youngsun Chung, Hee Jeong Chae, Dong Chung Kim, Nam-Soon Oh*, Mie Ja Park**,
Yang Soon Lee** and Man-Jin In***

R & D Center, Daesang Corp.

*Department of Food Science and Technology, Kongju National University

**Department of Food and Nutrition, Kongju National University

***Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University

Abstract

Proteolytic enzymes were screened to obtain acceptable taste and cost-effectiveness for the enzymatic production of brewer's yeast extract. Commercially available food-grade proteases were tested in the hydrolysis of yeast protein. Among the eight tested proteases, Flavourzyme was selected as an exopeptidase because of the lowest cost per unit activity in spite of low protein availability. Protamex was selected as an endoprotease to be used in combination with exopeptidase. By co-treatment using Flavourzyme and Protamex, higher protein availability and more acceptable taste of yeast hydrolysate were obtained.

Key words: brewer's yeast extract, Flavourzyme, Protamex, selection

서 론

효모는 양조, 제빵산업 등의 식품분야에서 오래 전 부터 여러 가지 유용물질의 원료로 사용되고 있으며, 균체 내에 50% 내외의 단백질, 지질, RNA 등의 핵산, 각종 비타민 및 미네랄을 함유하고 있다. 효모로부터 제조되는 효모 추출물은 미생물 발효배지, 조미료, 건강식품 등의 원료로 전세계적으로 많은 양이 소비되고 있으며, 효모 추출물의 제법과 응용에 대하여는 꾸준히 연구, 보고(Hirosh, 1974; 최순자와 정봉현, 1998; Ames와 MacLeod, 1985; Izzo와 Ho, 1992)되고 있다. 일반적으로 효모 추출물의 원료는 빵효모가 이용되며 맥주제조의 부산물인 맥주효모를 쓴맛 때문에 원료로 사용하는 경우는 많지 않다. 효

모 추출물의 제조방법은 크게 자기소화법(autolysis)과 효소분해법으로 구분되며, 통상적인 자기소화법은 10~20%의 빵효모 또는 맥주효모에 식염이나 에탄올을 첨가하고 30~70°C에서 교반하여 효모 세포 내 존재하는 효소의 작용으로 자기분해된 분해물을 얻는 방법(Lee, 1996)이다. 이 과정에서 자기소화를 촉진하기 위하여 유기용매(Breddam와 Beenfeld, 1991), 세포벽 용해효소(Tabata와 Terui, 1965), 효모 자기소화액(Roman *et al.*, 1991) 등을 첨가하는 방법이 보고되어 있으나 자기소화법으로 고농도로 효모 추출물을 제조하는 경우 수율이 낮아 추출 후 잔사의 여과가 곤란하며 핵산성분의 분해가 낮기 때문에 정미성이 떨어지는 문제가 있다. 효소분해법은 기본적으로 단백질 분해효소를 첨가(Knorr *et al.*, 1979)하고 추가로 세포벽 용해효소(Rayan와 Ward, 1988), 핵산 분해효소(임억규, 1997) 등을 추가로 사용하는 방법으로 자기소화법에 비하여 수율이 향상된 방법이다. 또

Corresponding author: Man-Jin In, Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, San 29, Namjang-Ri, Hongsung-Eup, Honsung-Gun, ChungNam 350-800, Korea

한 식품제조 부산물이며 저렴한 원료인 맥주효모를 사용하여 효모 추출물을 제조하는 경우에는 발효 후 효모 균체를 열처리하는 경우가 대부분이므로 자기 소화법을 사용하기 어렵다. 이 경우에는 단백질 분해 효소를 사용하는 효소분해법에 의해서 효모 추출물의 제조가 가능하다. 그러므로 효모를 분해하여 효모 추출물을 제조하는 공정에서 적절한 단백질 분해효소의 사용은 맛과 수율 뿐만 아니라 제조원가면에도 매우 중요하다.

본 연구에서는 맥주공장의 부산물인 맥주효모에 몇 가지 상업용 단백질 분해효소를 처리하여 경제적인 부담이 적으며 수율과 품질을 극대화할 수 있는 효소를 선별하였다. 이로부터 수율과 품질이 향상된 효모 추출물의 새로운 제조공정을 확립하기 위한 기초 자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

효모 균체는 맥주발효 후 부산물로 얻어지는 *Saccharomyces* sp.를 진로 쿠어스(주) 청원공장과 (주)두산의 이천공장에서 구하여 사용하였으며, 단백질 분해효소는 Novo Nordisk사(Bagsvaerd, Denmark), Amano Pharmaceutical사(Nagoya, Japan), Daiwa Kasei사(Osaka, Japan)와 Kyowa-Solzyme사(Tokyo, Japan)의 제품 8종을 입수하여 비교하였다.

효모 단백질 분해효소의 선별

Exopeptidase 선별: 건조 맥주효모 30 g을 증류수 120 g에 현탁시킨 후 95°C에서 5분간 열처리하여 원료를 준비하였다. 준비된 원료들을 각 효소의 반응 최적 pH로 조절한 다음 *exopeptidase* 활성을 갖고 있는 효소들을 원료의 단백질 1 g당 21 LAPU씩 첨가하고 효소제조사에서 제공하는 자료를 근거로 효소의 열안정성을 고려하여 45°C에서 200 rpm으로 교반하면서 15시간 가수분해를 실시하였다. 끓는 물에 10분간 가열하여 반응을 정지시키고 원심분리하여 투명한 효모 추출물을 얻었다.

Endoprotease 선별: 동일하게 준비한 효모 현탁액에 선별한 2종의 *exopeptidase*를 21 LAPU/g-protein으로 첨가하고 *exopeptidase*의 활성이 거의 없는 2종의 *endoprotease*를 각각 추가하여 최종 11.7 mAU/g-protein으로 균일하게 하였다. 반응 pH는 6~7로 조정하고 *exopeptidase*의 실험과 동일하게 처리하여 효모 추출물을 얻었다.

효소활성측정

*Endoprotease*의 활성은 casein을 기질로 하여 개량된 Anson법(단위: AU)에 준하여 측정하였으며(Novo Industry A/S) 이미 활성이 알려져 있는 단백질 분해 효소를 표준품으로 한 검정곡선으로부터 활성도를 계산하였다. *Exopeptidase*의 활성은 Leucine aminopeptidase(LAP)법(단위: LAPU)에 근거한 Sigma사(Sigma Chemical Co., St. Louise, Mo.)의 분석용kit를 이용하여 분석하였으며 1 LAPU는 L-leucyl-β-naphthylamide를 기질로 1분당 1 μmole의 L-leucine을 생성하는 효소량으로 정의하였다(Sigma Diagnostics).

분석방법

효소분해로 생성된 수용성 성분의 총량은 원심분리(10000 g, 20분)로 불용성 성분을 제거하고 상등액의 고형분 함량을 Brix meter(Atago사, Japan)로 측정하였으며, 총 질소(total nitrogen; TN) 함량은 microkjeldahl법을 이용하였다. 고형분 수율과 단백질 이용률은 모두 가수분해에 의한 원료의 고형분 및 단백질의 가용화율로서 다음과 같이 계산하였다(채희정 등, 1998).

고형분 수율(Dry matter yield) (%)

$$= W_1 \times C_1 / (W \times C_0) \times 100$$

여기서 W_1 : 원심분리한 상등액의 중량 (g)

W : 채취한 효소분해물의 중량 (g)

C_1 : 원심분리한 상등액의 고형분 농도 (%)

C_0 : 원료의 반응초기 고형분 농도 (%)

단백질 이용률(protein availability) (%)

$$= W_1 \times P_1 / (W \times P_0) \times 100$$

여기서 P_1 : 원심분리한 상등액의 단백질 농도 (%)

P_0 : 원료의 반응초기 단백질 농도 (%)

관능검사

관능검사에 경험이 있는 패널요원 10명을 선정하여 실험의 취지를 인식시킨 후 실시하였다. 효모 추출물에 대한 관능적 품질평가는 전체적인 향과 맛을 평가하여 5점 척도법으로 측정하였으며 점수가 높을수록 맛이 좋은 것으로 평가하였다.

결과 및 고찰

효소활성 분석

산업용으로 이용할 수 있는 단백질 분해효소 8종을 입수하여 효소의 반응특성을 정리하고 *exopeptidase*와 *endoprotease*의 활성을 각각 측정하여 비교

Table 1. Comparison of endoprotease and exopeptidase activities of commercially available proteolytic enzymes

Commercial name	Origin	Optimum pH	Optimum temperature(°C)	Endoprotease activity (mAU/g)	Exopeptidase activity (LAPU/g)	Activity ratio*
Novo Nordisk (Denmark)						
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	7.0	60	585.2	1.2	487.67
Protamex	<i>Bacillus licheniformis</i>	6.0	50	398.7	1.0	398.70
Flavourzyme	<i>Aspergillus oryzae</i>	7.0	50	92.3	1046.1	0.09
Daiwa Kasei (Japan)						
Protein FN	<i>Aspergillus oryzae</i>	7.0	55	217.7	311.6	0.70
Amano Pharmaceutical (Japan)						
Protease Amano A	<i>Aspergillus oryzae</i>	7.0	50	240.8	782.9	0.31
Protease Amano P	<i>Aspergillus melleus</i>	8.0	45	230.8	472.9	0.49
Protease Amano M	<i>Aspergillus oryzae</i>	4.5	50	104.4	737.2	0.14
Kyowa-Solzyme (Japan)						
Peptidase FP	<i>Aspergillus oryzae</i>	6.0	50	278.4	1013.3	0.27

*Activity ratio = endoprotease activity / exopeptidase activity.

하였다(Table 1). 실험에 사용한 제품은 모두 미생물 기원의 효소로 제조사에서 제공하는 자료에 의하면 반응의 최적 온도는 50~60°C, pH는 6~7로 유사하였다. 단, Amano Pharmaceutical사의 Protease Amano P와 M 두 제품은 최적 pH가 8.0과 4.5로 예외였는 바, 이는 유당 분해효소인 β-galactosidase의 최적 pH가 효소의 기원에 따라 산성조건(pH 2.5~4.5)과 중성 조건(pH 6~7.5)으로 보고(Gekas와 Lopez-Leiva, 1985)되어 있는 것과 유사하게 효소를 생산하는 미생물의 차이와 특성에 기인하는 것으로 사료된다. 각 효소의 최적 반응조건에서 활성을 측정할 결과 대부분의 단백질 분해효소는 exopeptidase 활성과 endoprotease 활성을 모두 보유하고 있는 것으로 분석되었으나, Novo Nordisk사의 Alcalase와 Protamex는 exopeptidase의 활성이 거의 없었다. 그러므로 먼저 exopeptidase를 Alcalase와 Protamex를 제외한 나머지 6종의 효소 중에서 선별하고 endoprotease는 선별된 exopeptidase를 기준으로 Alcalase와 Protamex의 조합으로 선별하였다. 선별과정에서 효소반응 조건 중 pH는 대량생산 및 맛에 미치는 영향을 고려하여 완충액을 사용하지 않고 효모를 증류수에 현탁하고 최적pH로 조정하였으며, 반응온도는 장시간 분해하므로 효소의 열안정성을 고려하여 최적온도보다 낮은 온도로 설정하였다.

Exopeptidase의 선별

건조 맥주효모를 20%(w/w)로 현탁한 후 6종의 효소를 exopeptidase활성을 기준으로 21 LAPU/g-protein

로 균일하게 첨가하여 반응시킨 후 단백질 이용률과 고형분 수율을 비교하였다(Fig. 1A). 단백질이 가용화된 정도는 효소의 종류에 따라 다양하였으며 Protein FN과 Protease Amano P가 78.9%와 78.4%로 우수하였으며, Flavourzyme이 66.4%로 가장 낮은 값을 보였다(Fig. 1A). 고형분의 수율도 유사한 양상이었다. 이러한 효소간의 차이는 동일한 exopeptidase의 활성으로 가수분해하였으나 상업용 효소에 공존하는 endoprotease의 활성에 기인하는 것으로, Table 1에 나

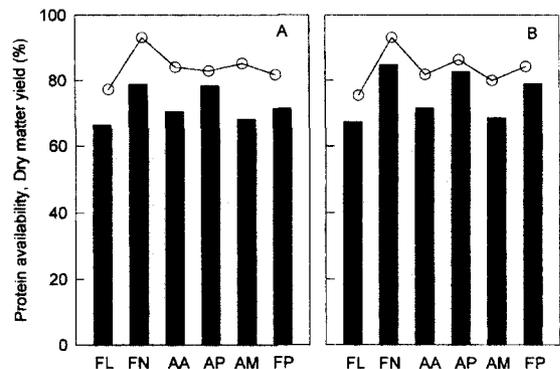


Fig. 1. Effects of different exopeptidases on the protein availability and dry matter yield. Each exopeptidase(21 LAPU/g-protein) was incubated with 20%(w/w) brewer's yeast suspension for 15 hrs. The hydrolysis results of the two brewer's yeast sources were showed as panel A and B, respectively. Closed bar and open circle indicated protein availability and dry matter yield, respectively. FL: Flavourzyme, FN: Protein FN, AA: Protease Amano A, AP: Protease Amano P, AM: Protease Amano M, FP: Peptidase FP.

타넨 활성비(activity ratio)와 일치하는 경향이였다. 다른 맥주 효모를 사용한 결과(Fig. 1B)에서도 동일한 양상이었고, 원료B의 결과가 약간 높은 값을 보이는 것은 맥주발효 후 효모의 처리방법에 따른 차이에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 10명의 패널 요원들의 향과 맛에 대한 관능검사 결과(Table 2)에 상대적으로 exopeptidase활성 대비 endoprotease의 활성이 높은 Protein FN을 이용하여 가수분해한 효모 추출물이 우수한 관능을 나타내었다. Protein FN은 맥주 효모 원료의 종류와 무관하게 수율과 관능면에서 우수하였다. 그러나 경제적인 측면에서 효소들의 exopeptidase단위 활성당 비용을 비교하면 Protein FN >Protease Amano M>Protease Amano P>Protease Amano A>Flavourzyme>Peptidase FP의 순이였다. 효소처리 비용이 효모 추출물 직접제조원가의 대략 30-40% 수준 소요되는 것을 고려하면 효소 비용 또한 효소선별 시의 중요한 인자로 판단된다. 낮은 단백질 이용률을 보인 Flavourzyme과 Peptidase FP는 활성을 기준으로 비용을 비교하면, 최고의 이용률을 나타낸 Protein FN에 비하여 12~15%, 나머지 효소들의 15~30% 수준으로 Flavourzyme과 Peptidase FP를 제외한 나머지 효소의 사용을 최적화하여도 두 효소의 경제적인 장점을 극복하기 곤란할 것으로 판단된다. 비록 단백질 이용률과 관능적인 측면에서는 Protein FN이나 Protease Amano P가 우수하였으나, 경제적인 관점에서 장점이 있는 Flavourzyme이나 Peptidase FP를 exopeptidase로 이용하고, 비용면에서 exopeptidase에 비해 월등히 저렴한 endoprotease와 병용하면 Protein FN이나 Protease Amano P를 이용하여 가수분해한 것과 유사한 수율과 관능을 나타낼 것으로 사료되었다.

Endoprotease의 선별

효모 추출물의 제조에서 Flavourzyme 또는 Pep-

Table 2. Sensory evaluation of brewer's yeast extract produced by exopeptidase treatment

	A		B	
	Flavor	Taste	Flavor	Taste
FL	2.9±0.57	3.2±0.92	3.4±0.70	3.4±0.84
FN	4.1±0.74	4.2±0.63	4.3±0.68	4.1±0.74
AA	3.1±0.74	3.2±0.42	3.8±0.79	3.8±1.13
AP	3.5±0.85	3.7±0.82	3.1±0.74	3.3±0.82
AM	2.9±0.57	3.0±0.82	3.4±0.70	3.5±0.84
FP	3.8±0.42	4.0±0.67	3.6±0.84	3.5±0.71

tidase FP와 함께 효모 단백질 분해에 적합한 endoprotease를 선별하였다. Endoprotease는 exopeptidase의 활성이 거의 없는(Table 1) Novo Nordisk사의 Protamex와 Alcalase를 이미 선별한 Flavourzyme또는 Peptidase FP와 조합으로 exopeptidase와 endoprotease를 각각 21 LAPU/g-protein과 11.7 mAU/g-protein되도록 균일하게 첨가하여 동시에 반응시킨 후 exopeptidase의 선별과 동일하게 분석하였다(Fig. 2). 단백질 이용률은 모든 실험군에서 endoprotease중 Protamex로 가수분해한 경우가 병용한 exopeptidase의 종류 및 원료의 차이와 무관하게 Alcalase를 사용한 경우보다 5~20% 높았다. 또한 원료A(Fig. 2A)와 B(Fig. 2B)에서 공히 Peptidase FP-Protamex의 조합으로 가수분해한 결과가 가장 높은 단백질 이용률을 나타내었으나 원료B에서는 그 차이가 미미하였다. Flavourzyme 또는 Peptidase FP 단독으로 효모를 분해한 결과(Fig. 1)와 비교하면 endoprotease와 병용한 경우 단백질 이용률과 고형분 회수율이 모두 증가하였으며 이러한 결과는 endoprotease의 작용으로 효모단백질의 중간 부위가 가수분해되어 중·저분자의 polypeptide의 수가 증가되고, 동시에 exopeptidase의 작용에 의해 펩타이드 말단으로부터 아미노산이 유리되기 때문으로 해석되었다. 이는 endoprotease와 exopeptidase를 병용하여 단백질을 분해하면 가수분해도가 향상되었다는 보고(Adler-Nissen, 1986)와 일치하였다. 효소 반응액

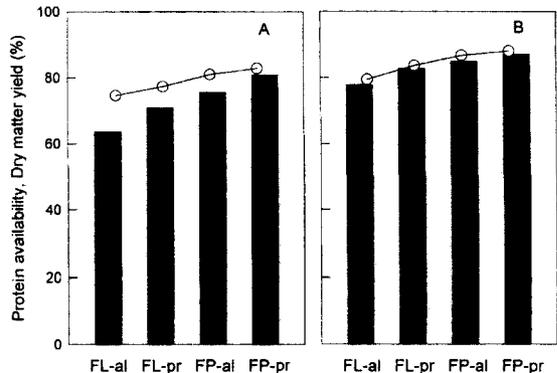


Fig. 2. Effects of co-treatment of exopeptidase and endoprotease on the protein availability and dry matter yield. Exopeptidase(21 LAPU/g-protein) and endoprotease(11.7 mAU/g-protein) were incubated with 20%(w/w) brewer's yeast suspension for 15 hrs simultaneously. The hydrolysis results of the two brewer's yeast sources were showed as panel A and B, respectively. Closed bar and open circle indicated protein availability and dry matter yield, respectively. FL-al: Flavourzyme-Alcalase, FL-pr: Flavourzyme-Protamex, FP-al: Peptidase FP-Alcalase, FP-pr: Peptidase-Protamex.

Table 3. Sensory evaluation of brewer's yeast extract produced by exopeptidase and endoprotease treatment

	A		B	
	Flavor	Taste	Flavor	Taste
FL-al	3.8±0.63	3.7±0.68	3.7±0.48	3.8±0.63
FL-pr	4.1±0.74	4.0±0.67	4.1±0.74	4.0±0.82
FP-al	3.4±0.69	3.4±0.69	3.3±0.48	3.4±0.52
FP-pr	3.3±0.95	3.4±0.52	3.2±0.42	3.3±0.48

의 고형분 농도를 2.5%로, 식염농도를 1.5%로 조절하여 관능을 조사한 결과(Table 3), 두 종류의 원료에 대하여 동일하게 관능적 우수성이 Flavourzyme>Protamex>Flavourzyme-Alcalase>Peptidase FP-Alcalase>Peptidase FP-Protamex의 순으로 평가되었으며, 사용한 endoprotease의 종류와 무관하게 Peptidase FP를 사용한 분해물에서는 Flavourzyme으로 가수분해한 시료보다 쓴 맛이 감지되었다. 단백질 효소분해물에서 주로 소수성 아미노산에 기인하는 쓴 맛은 품질을 저하시키는 중요한 요인으로 쓴 맛을 제거하는 방법이 여러 가지 보고(Ge와 Zhang, 1996; Lin et al., 1997)되어 있다. 그러므로 쓴 맛의 발현이 적은 Flavourzyme과 단백질 이용률을 향상시키는 Protamex를 맥주 효모 추출물의 제조에 이용하는 것이 품질과 경제성 측면에서 우수하다고 판단되었으며, 또한 원료B가 효모 추출물의 제조에 적합하였다. 향후 맥주효모 추출을 제조하는 공정에서 Flavourzyme과 Protamex의 첨가 농도와 순서, 두 효소의 혼합비율 등과 같은 추가적인 최적화 연구가 필요하다.

요 약

효소공법에 의해 맥주효모로부터 효모추출물을 제조하기 위하여 단백질 분해효소를 단백질 이용률과 효소 분해물의 관능 및 경제성을 기준으로 선별하였다. 식품용으로 시판중인 단백질 분해효소 8종에서 exopeptidase로는 단위활성에 대한 비용부담이 적은 Flavourzyme이 선별되었고, exopeptidase와 병용하여 사용할 endoprotease로는 Protamex가 선별되었는데 이는 단백질 이용률과 관능적 특성을 상당히 증진시켰다. 이 두 효소의 복합사용에 의해 경제적이면서도 높은 품질의 효모 추출물을 얻을 수 있었다.

참고문헌

임억규 . 1997. 리보핵산 관련물질을 함유한 Yeast Extracts 제조에 *Streptomyces faecalis* MSF 배양액의 이용 . 산업미생물학회지 **25**(5): 512-519

채희정, 인만진, 이종대 . 1998. 효소와 미생물의 복합처리에 의한 두유박 단백질 소재의 제조 . 한국농화학회지 **41**(1): 73-77

최순자, 정봉현 . 1998. Baker's yeast로부터 invertase 및 yeast extract 동시 생산공정 . 한국생물공학회지 **13**(3): 308-311

Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publisher, NY, USA

Ames, J.M. and G. MacLeod. 1985. Volatile components of a yeast extract composition. *J. Food Sci.* **50**(1): 125-131

Breddam, K. and T. Beenfeld. 1991. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 323-329

Ge, S.J. and L.X. Zhang. 1996. The immobilized porcine pancreatic exopeptidases and its application in casein hydrolysates debittering. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **59** (2): 159-165

Gekas, V. and M. Lopez-Leiva. 1985. Hydrolysis of lactose: A literature review. *Process Biochem.* **20**(2): 2-12

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**(3): 657-659, 674

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

Lee, B.H. 1996. *Fundamentals of Food Biotechnology*. VCH Publishers, Inc., NY, USA

Lin, S.B., L.P. Nelles, C.T. Cordle and R.L. Thomas. 1997. Debittering casein hydrolysates with octadecylsiloxane(C18) columns. *J. Food Sci.* **62**(4): 665-670

Novo Industry A/S. Anson hemoglobin method for determination of bacterial proteinase activity. AF 4.2/5, Novo Industry A/S, Bagsvaerd, Denmark

Rayan, E. and O.P. Ward. 1988. The application of lytic enzymes from *Basidiomycete aphyllphoroides*. in production of yeast extract. *Process Biochem.* **23**: 12-16

Roman, K., S. Ernest and F. Vladimir. 1991. Induction and acceleration of yeast lysis by addition of fresh yeast autolysate. *Biotechnol. Lett.* **13**(8): 543-546

Sigma Diagnostics. Leucine aminopeptidase(LAP) procedure No. 251. Sigma Diagnostics, St. Louise, MO, USA

Tabata, S. and G. Terui. 1965. Digestion of yeast cells by yeast cell wall lytic enzyme. *J. Ferment. Technol.* **43**: 766-771