

Baker's yeast로부터 invertase 및 yeast extract 동시 생산공정

최 순 자 · 정 봉 현

생명공학연구소 생물분리공정 Research Unit
(접수 : 1998. 2. 18., 게재승인 : 1998. 3. 30.)

Simultaneous Production of Invertase and Yeast Extract from Baker's Yeast

Soon Ja Choi and Bong Hyun Chung†

Bioseparation Process R.U., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115,
Yusong Taejon, Korea

(Received : 1998. 2. 18., Accepted : 1998. 3. 30.)

A novel process was developed to simultaneously produce invertase and yeast extract from baker's yeast using ultrafiltration (UF) and microfiltration (MF) membrane processing. After the extraction of invertase under the optimal condition obtained in this study, invertase was separated from yeast cells using a hollow fiber membrane with a pore size of 0.1 μm . The resulting permeate containing invertase was concentrated using a hollow fiber membrane with a nominal molecular weight cut-off of 30 kDa. The yeast cell and permeate solutions, which were obtained after MF and UF membrane processing, respectively, were mixed together, and the autolysis was performed at 50°C in the presence of 5% (v/v) ethanol and 1% (w/v) NaCl. As a result, the yeast extract and invertase could be simultaneously produced from baker's yeast by this novel process.

Key Words: baker's yeast, invertase, yeast extract, autolysis

서 론

효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 인체에 무해한 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물로서 오래전부터 주류, 제빵 산업 등에 대규모로 사용되어 왔다. 주류 및 제빵용 효모는 본래의 목적 이외에도 여러 유용물질의 원료로도 사용되고 있다. 즉, 효모는 단백질, nucleic acids, 효소, 지질, 비타민 등의 원료로 사용되고 있으며 (1), 효모의 자가소화 (autolysis)에 의해 생산된 yeast extract는 미생물 발효 배지, 조미료, 건강식품 등의 원료로 현재 전세계적으로 큰 시장을 형성하고 있다 (2). 효모로부터 추출 생산되는 주 효소제품 중의 하나는 이당류인 설탕을 단당류인 포도당과 과당으로 전환하는 invertase로써, invertase는 현재 제빵, 제과, 농업, 주류 산업에 이용되고 있으며 연구용으로도 많이 이용되고 있다 (3). Nucleic acids는 효모의 주요 성분으로써, RNA의 경우 식품 풍미제 등의 원료로 사용될 수도 있다 (4). Yeast extract 제조시 부산물로 얻게 되는 cell wall은 다양한 생리활성물질들의 원료로 최근 주목을 받고 있으며, 특히 최근 가장 활발히 연구되고 있는 생리활성물질로

는 glucan을 들 수 있다. Glucan은 비수용성의 다당류로써 면역조절 (immunomodulatory) 기능을 지니고 있어 의약품 및 건강식품용으로 개발되고 있으며 (5), food thickener로서도 개발되고 있다 (6). 이 외에도 효모 cell wall은 비타민 D₂ ergocalciferol의 원료인 ergosterol의 주 공급원이기도 하다 (7).

그러나, 현재까지 대부분의 공정은 효모로부터 개별 성분의 추출 분리에 초점을 맞추어 왔으며 여러 유용물질들을 동시에 분리 생산하는 공정은 거의 개발되고 있지 못한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 baker's yeast로부터 여러 유용물질들을 동시에 추출 생산하는 공정개발의 일환으로써, baker's yeast로부터 invertase 및 yeast extract를 동시에 추출 생산할 수 있는 새로운 공정개발에 초점을 맞추었다. 본 연구에서 개발한 invertase와 yeast extract 동시 추출 생산방법은 효모를 고부가가치로 활용할 수 있는 실용적이며 새로운 공정으로써 산업적 응용이 가능할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

재 료

시중에서 판매되고 있는 압축 (compressed) baker's yeast (Jenico Foods Co., LTD., Korea)를 원료로 이용하였다. 본 실험에 들어가기전에 멸균된 증류수로 세척한 후 10%(w/v)로 희석하여 사용하였다. 효모 자가소화 (autolysis)를 촉진하는 물질로는 NaCl, 에탄올, papain (Sigma) 등을 사용하였다. 0.1 μm

† Corresponding author: Bioseparation Process Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O.Box 115, Yusong, Taejon, Korea
Tel : 042-860-4442. Fax : 042-860-4594.
e-mail : chungbh@kribb4680.kribb.re.kr

인 MF용 hollow fiber membrane (CFP-1-E-4A, A/G Technology Corporation, USA)과 molecular wt. cut-off=30,000인 UF용 hollow fiber membrane (UFP-30-E-4A, A/G Technology Corporation, USA)을 분리 및 농축에 사용하였다.

효모 자가소화 및 invertase 추출

효모의 자가소화 및 invertase 추출은 멸균된 증류수로 baker's yeast를 세척, 10%(w/v)으로 희석한 후 shake-flask 또는 jar fermentor (Korea Fermentor Co., Korea)를 이용하여 50°C에서 수행하였다.

Invertase 및 단백질 정량

Invertase 활성의 측정을 위하여 10%(w/v) sucrose를 50 mM acetate buffer (pH 4.7)에 용해한 950 μ L 용액에 효모 자가소화 상등액 50 μ L를 첨가하여 25°C water bath에서 20 분 동안 반응시켰다. 반응 후 100°C에서 효소활성을 실행시킨 다음 glucose analyzer를 이용하여 glucose 양을 측정하여 unit (μ mol/min)으로 환산하였다. 단백질의 정량은 autolysis 시킨 sample을 원심분리하여 상등액을 회수하고 적당한 농도 (1~5 μ g/mL)로 희석하여 micro tube에 500 μ L 분주한다. 그 다음 동량의 Micro BCA protein assay reagent kit (MA 50:MB 48:MC 2)를 넣은다음 mixing 하여 60°C에서 60분 반응시킨다. 반응 후 spectrophotometer를 이용 562 nm에서 단백질을 정량하였다.

효모엑기스 제조

0.5%(w/v) papain을 넣어 8~10 시간 정도 자가소화를 해서 invertase 활성이 가장 높은 시점에서 MF (0.1 μ m)와 UF (Mol. wt. cut-off=30,000)를 이용하여 invertase를 회수하여 invertase 농축액을 얻은 후, UF permeate와 MF concentrate를 혼합한 용액에 5% 에탄올과 1% NaCl를 첨가하여 18~20 시간 정도 더 autolysis 시킨다. MF용 hollow fiber membrane을 이용하여 cell wall과 상등액을 따로 분리하고 상등액을 spray drying하여 효모엑기스를 얻었다.

결과 및 고찰

효모 자가소화 (autolysis) 최적화

Fresh한 baker's yeast (Jenico Foods Co., LTD.)를 10%(w/v) 농도로 희석한 후 50°C shaking water bath에서 자가소화를 수행하였다. 자가소화를 촉진하기 위하여 에탄올, NaCl, papain 등을 첨가하여 24시간 자가소화 후 supernatant의 단백질 농도를 정량하므로써 자가소화 정도를 비교 검토하였다 (Figure 1). 자가소화 정도는 supernatant에 release된 단백질 농도를 최대 효모 단백질 농도로 나눈 값으로써 최대 단백질 농도는 10%(w/v) 효모 용액에 lyticase (Sigma)를 첨가, bead beater로 충분히 효모를 파쇄한 후 단백질 농도를 측정하여 결정하였다. 자가소화 촉진제를 첨가하지 않고 24시간 자가소화한 경우 15.8% 정도 자가소화되었으나 5% 에탄올, 1% NaCl, 0.5% papain을 첨가한 경우 약 49% 자가소화된 결과를 얻을 수 있었다. 본 실험 이외에도 Kollar 등 (8)이 실험한 바와 같이 효

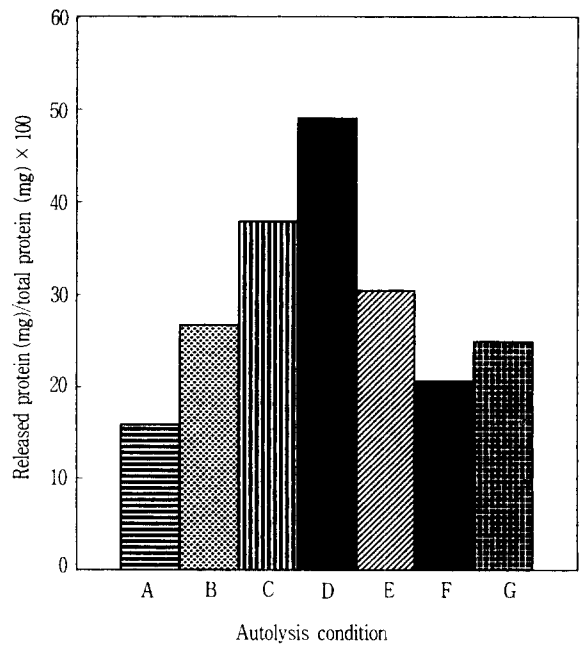


Figure 1. Effect of various accelerators on the autolysis of baker's yeast. A, control; B, 5% ethanol; C, 5% ethanol + 1% NaCl; D, 5% ethanol + 1% NaCl + 0.5% papain; E, 1% ethanol; F, 1% ethanol + 0.5% papain; G, 5% ethanol + 0.5% papain; H, 0.5% papain

모 자가소화 용액을 초기에 첨가하여 자가소화를 촉진하는 방법도 시도해 보았으나 별 효과가 없는 것으로 나타났다. 또한, 단백질 분해효소인 Alcalase 0.6L (NOVO, Denmark)를 자가소화 촉진제로 papain 대신 첨가한 실험을 수행하였으나 papain보다 효율이 낮은 것으로 나타났다. 따라서, 5% 에탄올, 1% NaCl, 0.5% papain 첨가를 최적 자가소화 조건으로 설정하였다.

Invertase 추출조건 최적화

Baker's yeast를 위의 자가소화 조건으로 자가소화시 시간에 따른 invertase 추출속도 및 양을 비교 검토하였다. 50°C shaking water bath에서 control, 5% 에탄올, 5% 에탄올 + 1% NaCl, 5% 에탄올 + 1% NaCl + 0.5% papain, 1% 에탄올, 1% 에탄올 + 0.5% papain, 5% 에탄올 + 0.5% papain, 0.5% papain 등의 다양한 조건에서 자가소화시 invertase의 활성을 시간에 따라 측정하였다 (Figure 2). 앞서 효모의 자가소화 실험에서는 5% 에탄올, 1% NaCl, 0.5% papain을 첨가하였을 때 최대의 자가소화율을 얻을 수 있었으나, invertase 추출에서는 0.5% papain만 첨가하였을 경우 최대의 invertase를 추출할 수 있었다. 이 조건에서 10시간 후 약 118 unit/mL의 invertase를 얻을 수 있었으나 최적 자가소화 조건 (5% 에탄올 + 1% NaCl + 0.5% papain)에서는 10시간 후 약 20 unit/mL의 invertase를 얻을 수 있었다. 이론적으로 최적 자가소화 조건에서 최대의 invertase가 추출될 것으로 예상하였으나 이와 상반된 결과를 얻은 것은 invertase가 5% 에탄올, 1% NaCl 조건에서 활성이 손실되는 것에 기인하는 것으로 추측된다. 따라서, invertase와 효모엑기스를 동시에 제조하기 위해서는 invertase 추출과 효모

효모엑기스를 동시에 제조하기 위해서는 invertase 추출과 효모 자가소화를 동시에 최적화 할 수 있는 새로운 공정의 개발이 요구된다고 할 수 있다.

Invertase 최적 추출조건인 0.5% papain 첨가 조건에서 온도에 따른 invertase 추출 실험을 수행하였다. 30℃, 40℃, 50℃에서 invertase를 추출하였을 경우 50℃에서 가장 좋은 결과를 얻었다 (Figure 3). 따라서 온도에 따른 invertase 최적 추출 조건은 자가소화 온도 조건과 일치하는 결과를 얻을 수 있었다.

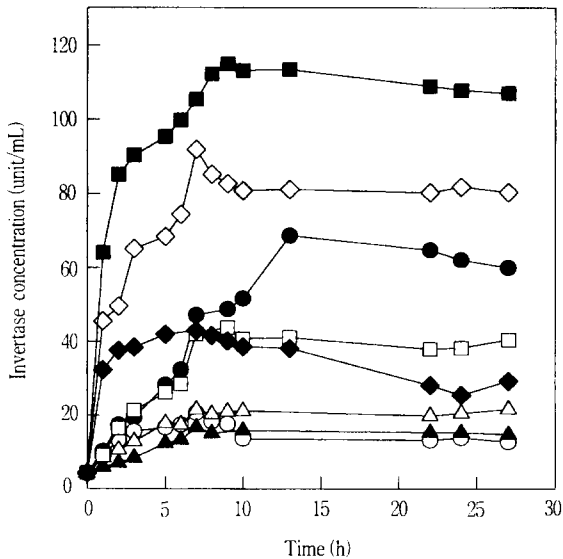


Figure 2. Effect of various accelerators on the extraction of invertase from baker's yeast. ●, control; ○, 5% ethanol; ▲, 5% ethanol + 1% NaCl; △, 5% ethanol + 1% NaCl + 0.5% papain; □, 1% ethanol; ◇, 1% ethanol + 0.5% papain; ◆, 5% ethanol + 0.5% papain; ■, 0.5% papain

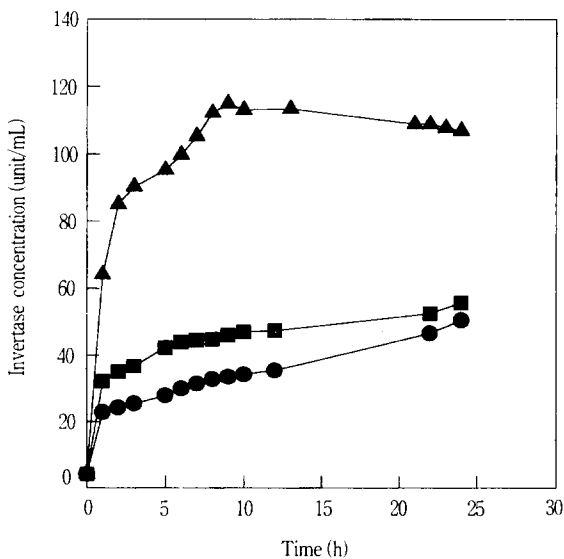


Figure 3. Effect of temperature on the extraction of invertase. ●, 30℃; ■, 40℃; ▲, 50℃

Invertase와 효모엑기스 동시 제조공정 (KRIBB-IY Process)

Invertase와 효모엑기스를 baker's yeast로부터 동시에 생산하기 위해서 새로운 공정을 개발하였다. 50℃, 0.5% papain 첨가 조건에서 jar fermentor를 이용 200 rpm, 10시간 교반하여 invertase를 최대한 추출한 후 0.1 μm MF용 hollow fiber membrane을 이용 cell과 상등액을 분리하였다. 추출된 invertase 농도는 91 unit/mL로써 shake-flask에서 보다 다소 낮았는데 이것은 교반 조건 등의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 상등액은 다시 mol. wt cut-off=30,000의 UF용 hollow fiber membrane을 이용하여 invertase를 농축하였다. Permeate는 cell 농축액과 혼합하여 5% 에탄올, 1% NaCl을 첨가하여 효모 자가소화 반응을 수행하였다. 20 시간 자가소화 후 MF용 hollow fiber membrane을 이용하여 cell wall과 상등액을 분리하였으며 상등액은 진공 농축후 spray drying을 하여 효모엑기스 분말을 얻었다. 본 공정은 Figure 4와 같으며 각 단계에서 invertase와 단백질 농도는 표 1과 같다. Kollar 등 (1)은 효모 자가소화가 종료된 후 invertase와 yeast extract를 제조하는 공정을 개발한 바 있다. 본 공정은 invertase를 최대한 추출한 후 yeast extract를 제조하므로써 Kollar 등의 방법보다 invertase 생산 측면에서 큰 장점을 가질 것으로 판단된다. 본 공정 각 단계에서 invertase 활성은 표 1과 같다. 10%(w/v) 효모 용액의 경우 초기에도 약간의 invertase가 상등액에서 검출이 되었다. 10시간 추출 후 MF permeate에 45,860 unit의 invertase가 얻어졌으며 UF concentrate 용액에서 최종적으로 23,492 unit의 invertase가 얻어졌다. UF permeate와 UF concentrate에서 얻어진 총 invertase는 38,628 unit으로써 7,232 unit의 invertase가 막 공정중 손실되었는데 이것은 invertase가 여과 공정 중 막에 흡착되어 회수되지 않은 것으로 추정된다. 또한, molecular weight cut-off=30,000 Da의 UF 공정에서 일부 invertase는 막을 통과하여 permeate 부분에서 얻어졌다. Invertase의 분자량은 intracellular인 경우 약 135,000 Da이며 extracellular인 경우 당쇄 형태로 존재하며 약 270,000 Da인 것으로 알려져 있다 (9). 따라서, invertase 활성이 UF permeate에서 검출된 것은 예상치 못한 결과였으며, 이것은 본 연구에서 사용된 UF막의 rejection 효율 문제에 기인하는 것으로 추정된다. 따라서, invertase의 회수율을 더욱 향상시키기 위해서는 molecular rejection 효율이 높은 UF막의 사용이 요구되며, invertase의 흡착을 억제할 수 있는 보다 효율적인 막분리

Table 1. Invertase activity in each step of KRIBB-IY process.

Step	Invertase activity (unit/mL)	Total invertase activity (unit)
10%(w/v) 초기효모 용액(900mL)	4.0	3600
MF permeate (500mL)	91.7	45850
UF permeate (430mL)	35.2	15136
UF concentrate (70mL)	335.6	23492
After autolysis (900mL)	16.8	14760

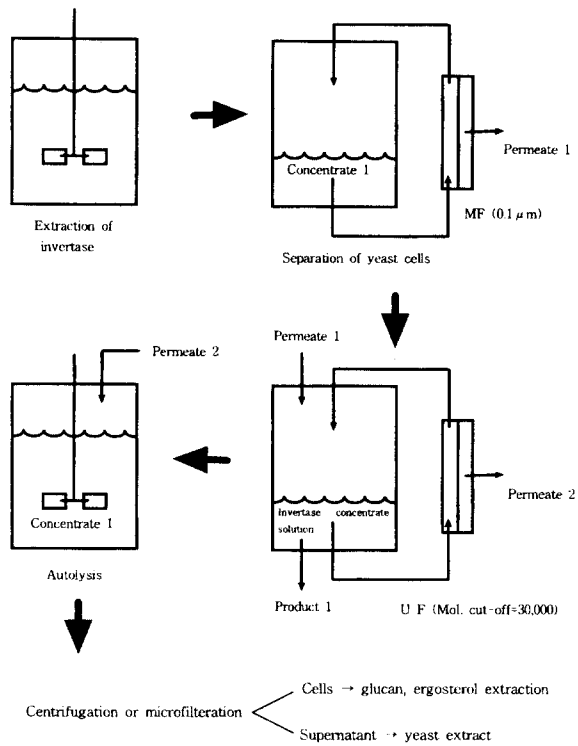


Figure 4. KRIBB-IY process for the simultaneous production of invertase and yeast extract from baker's yeast.

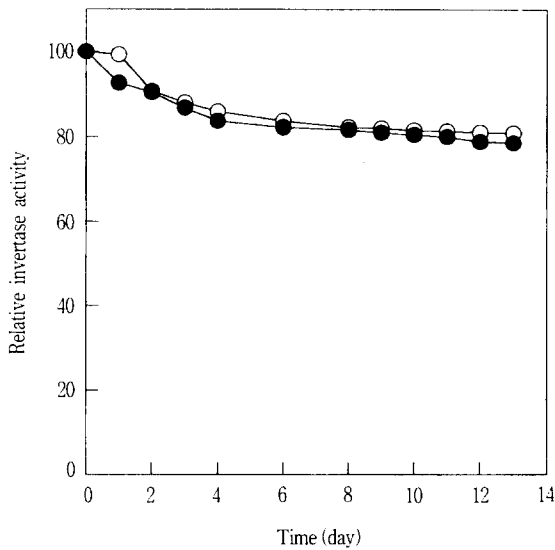


Figure 5. Storage stability of the concentrated invertase solution produced by KRIBB-IY process. ○, 4°C; ●, 20°C

공정의 개발이 요구된다. 자가소화 후에 14,760 unit의 invertase가 supernatant에서 얻어졌으며 이것은 invertase 추출 단계에서 추출되지 않은 invertase 일부가 autolysis 과정에서 추출된 것으로 생각된다.

농축된 invertase의 storage stability

Figure 4의 공정으로 얻은 invertase를 4°C, 20°C에 incubation

한 후 storage stability를 측정하였다. 본 공정에서는 papain을 invertase 추출에 이용하였으므로 추출된 invertase가 papain에 의해 분해될 가능성도 있어 본 실험은 실용적인 의미에서 매우 중요하다고 할 수 있다. Figure 4에서 볼 수 있듯이 오랜시간 저장에도 불구하고 invertase 활성은 거의 변화가 없음을 알 수 있다. 따라서 본 공정에 의해 생산된 invertase 농축액은 농축액 자체로도 상업적으로 사용하는데도 큰 문제가 없을 것으로 판단되며 freeze drying 등을 통한 invertase 분말제품의 상품화도 가능할 것이다. 또한 시약용 등 고순도 invertase 원료로의 개발을 위해 invertase 농축액을 이용 고순도의 invertase를 정제하는 공정도 추후 개발할 예정이다.

요 약

Baker's yeast로부터 UF와 MF 막분리공정을 이용 invertase와 yeast extract를 동시에 생산할 수 있는 새로운 공정을 개발하였다. Invertase 추출을 위한 최적 조건에서 invertase를 추출한 후 0.1 μm MF hollow fiber막을 이용 효모와 invertase를 분리하고, invertase를 포함한 permeate는 30 kDa UF hollow fiber 막을 이용 invertase의 농축액을 얻었다. MF concentrate와 UF permeate는 혼합한 후 최적의 효모 자가소화 조건에서 자가소화시켜 yeast extract를 얻었다.

참 고 문 헌

- Roman K., Ernest S., and S. Jan (1992), Complete Fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* Biomass, *Food Biotechnology*, 6(3), 225-237.
- BIOIndustry (1997), 14(2), pp. 53-55, CMC, Tokyo
- Montenecourt, B. S., Carrol, J. O., and R. P. Lanzilotta (1985), Assay of Industrial Microbial Enzymes, *Comprehensive Biotechnology* (M. Moo-Young, ed.), Vol. 4, p.329, Pergamon Press Ltd., Kronberg-Taunus.
- Andrev, Benaiges, M. D., Lopez, Y., and C. Sola (1988), A Simple Method for RNA Extraction from Yeasts, *Biotechnol. and Bioeng.*, 32, 927-929.
- Kery, V., Novotny, L., Tihlarik, K., Haplova, J., Kacurakova, M., Sandula, J., and E. Balazova (1990), Preparation, Properties and Antileukemic Activity of Arabinosylectosine Polysaccharide Conjugates, *International J. of Biochem.*, 22, 1203-1207.
- Paul, F., Morin, A., and P. Monsan (1986), Microbial Polysaccharides with Actual Potential Industrial Applications, *Biotechnology Advances*, 4, 245-259.
- Arnezder, C. and W. A. Hanmpel (1990), Influence of Growth Rate on the Accumulation of Ergosterol in Yeast Cells, *Biotechnol. Lett.*, 12(4), 277-282.
- Roman K., Ernest S., and F. Vladimir (1991), Induction and Acceleration of Yeast Lysis by Addition of Fresh Yeast Autolysate, *Biotechnol. Lett.*, 13(8), 543-546.
- Neuman, N. P. and J. O. Lampen (1967), Purification and Properties of Yeast Invertase, *Biochemistry*, 6, 468-475.