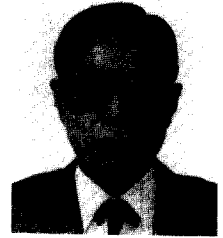


Bioconversion process를 이용한 Aspartame 생산연구

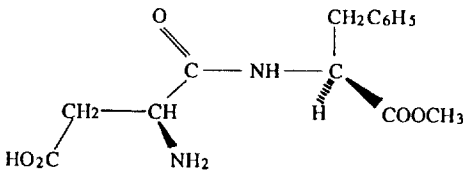


(주)미원 중앙연구소장 최 홍 규

Aspartame(APM)은 설탕에 비해 약 200배의 감미도를 갖는 저칼로리 감미료로서 FDA에 의해 사용이 인가된 이후 각종 식품첨가제로 널리 사용되고 있으며, 세계적으로 그 소비량이 크게 증가하고 있다.

L-Aspartic acid(Asp)와 L-phenylalanine(Phe)이 결합한 dipeptide methyl ester인 APM은 1964년 G.D. Searl & Co.에서 gastrin의 중간체 합성 중 우연히 발견된 것을 시발로, 이의 합성에 관한 수많은 연구논문이 발표되었고 또한 특허출원이 되었다.

대부분의 합성법은 Asp와 Phe를 원료로하여 Asp의 α-카르복시기와 Phe의 α-아미노기를 어떻게 결합시키느냐에 초점을 맞추고 있으며 크게는 화학적 합성법(Chemical Synthesis)과 효소적 합성법(Enzymatic synthesis)으로 구분된다.

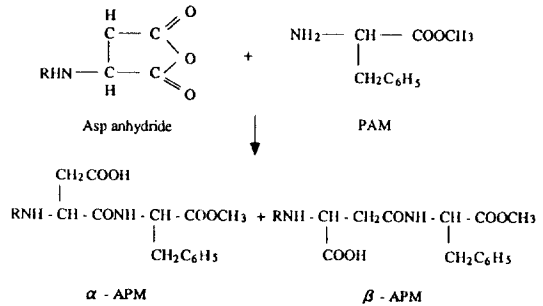


Aspartame ; α - L - Aspartyl - L - phenylalanine methyl ester

먼저 화학적 합성법은, Asp의 α-아미노기를 Cbz(carbobenzoxy), formyl기 등으로 보호하고 anhydride를 만든뒤 phenylalanine methyl ester(PAM)와 반응시키는데 이렇게 만들어진 APM 중에는 단당의 α-form 외에 쓴맛을 내는 β-form이 20-40% 정도 함유되어 있다.

따라서 통상의 화학제조방법에 있어서는 β-APM의 분리가 필수적이다. 한편 toluene과 ethylene ch-

loride 등의 반응용매에서 Asp anhydride의 농도를 변화시켜 α,β-form의 생성비를 조절하고, 농도를 감소시켜 α-form의 비율을 증가시킬 수 있다는 보고도 있다.



여기서 R은 Asp의 N-말단의 보호그룹을 나타낸다. 그러나, 저농도에서는 공업적으로 생산성이 떨어지는 단점이 있으므로 이의 극복을 위해 α-form을 선택적으로 합성하는 방법이 강구되어 왔으며, 그 예로 L-aspartic acid N-thio-carboxyanhydride(NTA)를 PAM과 반응시켜 α-APM만을 합성하는 방법도 있다.

1985년 Monsanto社의 Tou는 β-methyl-L-aspartate-N-carboxyanhydride(NCA)와 Phe를 알칼리 pH에서 반응시키고 곧이어 가수분해와 에스테르화를 거쳐 수율 55%로 α-APM의 염산염을 만드는데 성공하였는데, 이 방법은 NTA에 비해 안정한 화합물인 NCA를 쓴다는 점 외에도 자극적인 황화합물을 사용하지 않고, 비교적 저렴한 비용으로 간단한 제조공정을 거친다는 장점이 있다. 이외에 dehydroaspartame으로부터 α-APM을 합성하는 방법(C. Fuganti) 등의 여러 기술이 알려져 있다.

이상 제시된 화학적 방법들에 비해 효소적 방법은

비교적 온화한 조건에서 반응이 진행된다는 점과, 효소의 기질에 대한 특이성이 높아 부반응이 거의 없으며, racemic 화합물을 사용할 수 있다는 점, 그리고 산업적으로 연속생산이 가능하다는 잇점이 있어 효소를 이용한 peptide 합성에 관한 최근의 연구성과에 힘입어 활발한 논의가 있어 왔다.

Mohr와 Strohschein이 endopeptidase의 일종인 papain을 이용하여 간단한 dipeptide를 합성한 이래 protease로부터 가수분해반응의 역반응인 합성반응을 유도하는 기술이 endopeptidase에 의한 합성반응에 필수적인 보호기 개발 기술과 더불어 크게 향상되었다. 그리하여 1977년 Isowa는 metalloprotease인 thermolysin을 이용하여 N-p-methoxybenzylloxycarbonyl-L-aspartic acid(PMZA)와 PAM을 반응시켜 최초로 APM을 합성하였으며, Oyama(1981년)는 peptide 합성에 유기용매와 고정화효소의 사용을, Nakanishi(1985)는 이를 기초로한 연속적 생산을 각각 시도하였다.

한편 protease에 의한 peptide 합성에 있어서는 가수분해쪽으로 평형이 기울어져 있으므로 실제 합성속도는 느린 편이다. 따라서, 합성쪽으로 평형을 유도(equilibrium shift for synthesis)하는 문제가 APM 합성의 최대관건이 되었다. 그런데, 상기 Isowa의 수용액계에서는 반응생성물이 침전하므로 효소와 생성물의 분리가 어려워 효소의 재사용이 불가능한 난점이 있었다.

따라서, 유기용매를 사용하여 생성물쪽으로 평형을 유도하는 방법이 많이 보고되었는데, 여기에는 크게 2상계(water/water-immiscible organic solvent)를 사용하는 방법과, 단상계(water/water-miscible organic solvent)를 사용하는 방법이 연구되고 있다.

이중 2상계는 반응계 내에서 반응물과 생성물의 선택적 이동원리를 적용한 방법으로 주로 ethyl acetate와 H₂O의 혼합계를 사용하고 있는데 이는 반응기운전의 난점과 효소의 불안정성이 큰 단점으로 지적되고 있다.

최근 이를 보완하여 수용성 유기용매를 사용하는 연구가 진행되고 있는데 이의 문제점은 전환율이 비교적 낮은데 있으나, organic cosolvent(주로 stabilizer)의 도입으로 효소의 불안정성은 어느 정도 극복될 수 있다.

둘째로 Asp의 N-말단기 보호공정을 생략한 APM 합성법이 소개되었다. 미생물이나 그 배양액, 효소 등을 이용하여 Asp와 PAM으로부터 직접 APM을 합성하는 방법으로서 *Corynebacterium*, *Candida*, *Cryptococcus* 등의 미생물을 이용하거나(Ajinomoto), *Micrococcus caseolyticus*에서 분리한 단백질 분해효소인 Rulactine[®]에서 재차분리정제된 효소가 높은 활성을 가진다는 보고도 있으나 아직 산업적으로 이용하기에는 개선할 점이 많은 것으로 보인다.

셋째는 *Staphylococcus aureus*에서 분리한 V-8 protease를 사용하여 Asp의 alpha ester 혹은 alpha amide와 PAM으로부터 APM을 합성하는 방법인데, 수용성 유기용매에서 33%의 전환율을 나타낸다고 한다(Genencor). 그러나 이 반응계에서는 기질인 Asp의 ester bond가 잘 끊어지므로 수율이 저하되며 또한 고가의 효소를 사용해야 하는 단점이 있다.

마지막으로 재조합 유전자(recombinant DNA)를 이용한 APM 합성법으로써 APM의 전구체인 dipeptide, aspartyl phenylalanine에 해당하는 유전자를 화학적으로 합성하여 발현형 vector에 삽입한 후, aspartyl phenylalanine의 연속적인 중합체로 구성된 단백질을 미생물에서 발현시키고, 효소법에 의하여 dipeptide로 절단한 다음 esterification시켜 APM을 합성하는 방법이다.

그러나 이 방법은 산업적 생산에 적용할 경우 공정이 복잡하여 실용화에 문제가 있을 것으로 전망되며 이외에도 효소적 합성법에 관한 새로운 연구가 계속 진행중에 있다.

현재 APM은 화학적 방법으로 연간 8000톤 가량을 생산하는 NutraSweet 회사가 세계시장을 거의 독점하고 있으며, 이에맞서 Toyo Soda는 효소적 방법에 의해 2상계에서 thermolysin을 이용한 APM 생산공정을 채택, 확립하고 네델란드의 DSM과 합작회사인 Holland Sweetner를 설립하여 현재 생산중에 있으며, APM의 미국내 특허만료 시한인 1992년말을 목표로 증설계획중에 있는 것으로 알려지고 있다.

한편 국내현황은 제일제당 및 녹십자가 화학합성으로 생산된 제품을 판매하고 있는데, 이외는 달리(주)미원은 유기용매계에서 고정화효소를 이용하여 APM 전구체를 연속적으로 합성하고, 보호기를 제거하여 APM을 생산하는 방법을 개발하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 APM의 화학적, 효소적 합성방법의 선택은 각기의 장단점을 비교 검토한 후 결정해야 할 문제로서, 수율, 공정의 효율성, 작업환경, 경제성 등의 여러 요인이 영향을 줄 수 있으나, 최근의 연구동향 및 산업적 생산의 추이는 효소를 이용한 bioconversion process에 의한 방식으로 나아가는 듯 하다. 결론적으로 bioconversion process에 의한 APM의 생산은 반응매질로써 유기용매의 사용이 불가피하므로 효소의 안정성을 증가시켜 장기간 사용할 수 있는 신기술의 개발이 필요하며 기존의 고정화 기술은 그 좋은 예가 될 수

있다.

또한 보호기의 도입과 제거과정이 보다 용이해야 하며 더 나아가서 보호기의 부착없이도 반응을 가능케하는, 기질에 대한 특이성이 높은 새로운 효소(예를 들어 exopeptidase를 사용하면 기질에 보호기를 붙일 필요가 없으므로 화학적 방법에 비해 훨씬 유리하다)의 screening이 절실하다.

아울러 유기용매로 인한 효소의 deactivation mechanism의 규명과 반응기운전 system의 개발이 요구된다 하겠다.