

N-Benzoylaspartame의 효소적 합성을 위한 용매계의 선정

한민수 · 김우정*

미원 중앙연구소, *세종대학교 식품공학과

Development of Solvent System for Enzymatic Synthesis of N-Benzoylaspartame

Min-Su Han and Woo-Jung Kim*

Miwon Reserch and Development center

*Department of Food Science, Sejong University

Abstract

Several single or mixed water-miscible organic solvent systems were investigated to develop the most effective solvent system for enzymatic synthesis of N-benzoylaspartame(BzAPM). The BzAPM was prepared by immobilized thermolysin with using N-benzoyl-L-aspartic acid(Bz-Asp) and L-phenylalanine methyl ester(PheOMe). The solubilities of BzAPM and L-phenylalanine were highest in 4.5% methanol(1.89 and 1.79%, respectively) among the solvents system investigated while a mixed solvent system of 25% dimethyl sulfoxide(DMSO) and 20% polyethylene glycol(PEG) 200 showed relatively high values. The synthetic activity of BzAPM as well as initial reaction rate were found to be high in 45% methanol, 45% DMSO and a mixed solvent of 25% DMSO and 20% PEM 200. The imobilized thermolysin was most stable in 25% DMSO and 20% PEG 200 during storage at 40°C for 42 days. PheOMe in the same solvent system was also found fairly stable against non-enzymatic decomposition at 40°C. Based on the synthetic efficiency and stability, the solvent system containing 25% DMSO and 20% PEG 200 was selected to be appropriate for the enzymatic synthesis of BzAPM.

Key words: N-benzoylaspartame, solubility, thermolysin, stability, solvent system

서 론

아스파탐은 L-aspartic acid(Asp)와 L-phenylalanine methyl ester(PheOMe)로 구성된 dipeptide계의 물질로서, 현재 사용중인 다른 인공 감미료보다 설탕과 가장 유사한 단맛을 가지고 있으며, 감미도가 설탕의 150~200배에 달하는 저칼로리 감미료의 일종이다¹⁾. 아스파탐의 제조방법으로는 화학적 합성법과 효소적 합성법이 알려져 있다²⁾.

효소적 합성법은 metalloendopeptidase의 일종인 thermolysin을 사용하여 α -아스파탐의 전구체를 합성하는 것으로서 β -아스파탐이 생성되지 않는 장점이 있다³⁾. Thermolysin을 사용한 아스파탐 전구체의 합성에 관하여는 N-benzyloxycarbonyl-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester(ZAPM)의 합성기구의 해석⁴⁾, 2상계에서 ZAPM 합성시의 반응속도 및 반응평형인구⁵⁾, 각종 유기용매에서 고정화 효소 또는 고체 유리 효소에 의한 ZAPM의 합성^{6,7)}, 여러 종류의 담체에 고정화한 thermolysin에 의한 ZAPM의 합성^{8,9)} 및 고정화한 thermoly-

sin에 의한 ZAPM의 연속 합성 등에 관한 연구가 이루어져 왔다. 그러나 column형 반응기에서 고정화 thermolysin에 의한 ZAPM의 연속합성법은 유기용매로서 ethyl acetate를 사용한 겔보기 단상계 또는 2상계를 이용한 방법이 있으나, 연속 운전시 효소 활성이 저하되거나, 불용성 침전물에 의하여 반응기가 폐색되어 장시간 연속 운전이 곤란한 것으로 알려져 있다^{7,8)}.

한편, 수용성 유기공용매인 glycerol이 선택적 수화에 의해 단백질을 안정화시키며¹⁰⁾ polyol이나 당류가 효소의 안정성을 향상시킨다는 보고가 있다¹⁰⁾. Homandberg 등¹¹⁾은 glycerol과 같은 수용성 유기용매가 chymotrypsin에 의한 Z-Trp-Gly-NH₂의 합성을 촉진시키며, 1,4-butane-diol의 경우는 80배나 합성활성을 높인다고 하였고, Durrant 등¹²⁾은 생성물의 용해도가 낮은 반응계에서는 glycerol 등의 수용성 유기용매계의 사용이 효과적이라고 주장하였다. 그러나 고정화 효소를 사용한 아스파탐 전구체의 합성을 위하여 수용성 유기용매계의 선정에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

그리하여 본 연구에서는 고정화 thermolysin을 충전한 column형 반응기에서 아스파탐 전구체의 하나인 N-Benzoylaspartame(BzAPM)의 효율적인 합성을 위하여 효소의 안정성과 합성 활성이 우수하면서 BaAPM의 평형능도가 높고, 기질 및 생성물에 대한 용해도를 고려한 수

Corresponding author: Woo-Jung Kim, Department of Food Science and Technology, Sejong University, Gunjodong, Sungdong-gu, Seoul 133-747, Korea

용성 혼합 유기용매계를 선정하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

이 실험에 사용한 thermolysin(9.724 U/mg, solid, lot S 160)은 Daiwa Kasei회사의 제품을 사용하였으며, 고정화 담체인 Amberlite XAD-7은 Rohm & Haas회사의 제품을 사용하였다. L-phenylalanine(Phe)은 (주)미원의 USP규격 제품(함량 99% 이상)을 사용하였으며, L-aspartic acid(Asp)는 Tanabe Seiyaku회사의 제품을 사용하였다. 그리고 benzoyl chloride, polyethylene glycol (PEG), dimethyl sulfoxide(DMSO) 등의 시약은 일급시약을 사용하였으며, 분석용 시약은 HPLC용 시약을 사용하였다.

N-Benzoyl-L-aspartic acid의 제조

N-Benzoyl-L-aspartic acid(Bz-Asp)는 표준 Schotten-Baumann의 방법⁽¹³⁾에 따라 다음과 같이 제조하였다. 교반장치가 부착된 반응기에 Asp 133.1g(1 mole)과 증류수 500 ml를 넣고 10N NaOH를 가하여 pH 9.0으로 조정하여 용해시키고, benzoyl chloride 116 ml(1 mole)를 25°C에서 2시간에 걸쳐 서서히 가하면서 10N NaOH를 사용하여 pH 9.0으로 조정하였다. Benzoyl chloride 첨가 완료후에 추가로 3시간 동안 25°C에서 교반한 다음 toluene을 가하여 미반응 물질을 추출분리하였다. 분리한 물층에 35% HCl을 가하여 pH 1.5로 조정한 다음 5°C 냉장고에서 하룻밤 방치하여 석출된 결정을 여과하여 조결정을 회수하였다. 이 조결정을 다시 수용액에서 재결정하여 순수한 Bz-Asp의 결정을 얻었다.

L-Phenylalanine methyl ester 염산염의 제조

L-Phenylalanine methyl ester 염산염(PheOMe·HCl)은 표준 Fischer의 에스테르화 방법⁽¹⁴⁾을 응용하여 다음과 같이 제조하였다. 교반장치와 냉각용측장치가 부착된 반응기에 methanol 800 ml와 Phe 165.2g(1 mole)을 넣고 5°C로 냉각한 다음 thionyl chloride 87 ml(1.1 mole)를 10°C 이하에서 2시간에 걸쳐 서서히 가하였다. Thionyl chloride 첨가가 끝난 후 온도를 서서히 올려 65~70°C에서 2시간 동안 methanol을 환류시킨 다음 진공하에서 methanol을 증류하여 제거하고, ethyl acetate를 가하여 PheOMe·HCl 결정을 석출시켰다. 석출된 결정을 여과하여 건조시킨 다음 methanol/ethyl acetate용매로 재결정하여 순수한 PheOMe·HCl의 결정을 얻었다.

BzAPM 및 Phe의 용해도 측정

CaCl₂ 5 mM을 함유한 각각의 용매계에 과량의 BzAPM 또는 Phe를 가하여 40°C, pH 6.0에서 15시간 동안 교반하였다. 용해되지 않은 결정을 여과하여 제거한 여액을 HPLC(Waters Associates, U.S.A.)로 분석하여

각각의 용매계에서의 BzAPM 및 Phe의 용해도를 구하였다.

각 용매계에서의 고정화 thermolysin에 의한 BzAPM 합성

Bz-Asp 200 mM, PheOMe 300 mM 및 CaCl₂ 5 mM, CoCl₂ 5 mM이 함유된 각각의 용매계 50 ml에 Amberlite XAD-7에 고정화⁽¹⁵⁾시킨 thermolysin 5g씩을 넣고 pH 6.0으로 조정하여 40°C와 120 rpm의 진탕 항온 수조에서 12시간까지 반응시키면서 생성된 BzAPM의 농도를 HPLC로 분석하였다.

고정화 thermolysin의 안정성 측정

2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid(MES) 10 mM과 CaCl₂ 10 mM이 함유된 각각의 용매계를 pH 6.0으로 조절하고 고정화 thermolysin 5g씩을 가하여 40°C의 항온수조에 보관하였다. 각각 7, 14, 28일 및 42일에 고정화 효소를 꺼내어 여과한 다음 CaCl₂ 5 mM 함유 MES 완충액으로 세척하여 유기용매를 제거하였다. 이 효소 0.2 g씩을 달아 기질용액(Bz-Asp 200 mM, PheOMe 300 mM, CaCl₂ 5 mM, CoCl₂ 5 mM, PEG 200 20%, DMSO 25%, pH 6.0) 100 ml에 넣어 40°C의 진탕 항온수조(120 rpm)에서 2시간 동안 반응시킨 다음 BzAPM의 초기 합성 속도를 측정하여 각각의 용매계에서의 고정화 thermolysin의 안정성을 비교하였다.

PheOMe의 안정성

위의 실험에서 사용한 각각의 용매계에 PheOMe·HCl을 300 mM로 가하고, 5N NaOH로 pH 6.0으로 조정한 다음 40°C에서 24시간 동안 보관하면서 시료를 채취하여 HPLC로 PheOMe를 분석하여 PheOMe의 비효소적 분해정도를 조사하였다.

BzAPM, Phe, PheOMe의 분석

BzAPM 등의 물질은 HPLC를 사용하여 분석하였다. 분석을 위하여 사용된 column은 Alltech Econosphere C₁₈ cartridge(4.6 mm×250 mm)이었고 mobile phase는 0.1M ammonium phosphate와 methanol 12%, acetonitrile 25%로 pH 6.5로 조절하였다. 또한 flow rate는 1.0 ml/min, injection volume는 10 µl이었으며 이들 물질은 254 nm에서 측정하였다.

BzAPM의 확인

IR 및 ¹H-NMR spectrum과 보호기 제거 후 생성된 아스파탐의 HPLC chromatogram에 의하여 BzAPM을 확인하였다. IR spectrum은 BzAPM 1g을 KBr 5g과 혼합하여 disc를 만든 다음, Perkin-Elmer model 782 IR spectrophotometer를 사용하여 얻었으며, ¹H-NMR spectrum은 BzAPM 300 mg을 DMSO-d₆ 0.5 ml에 용해하여 Varian XL-200 spectrometer(200 MHz)에서 얻었

Table 1. Solubilities of BzAMP and L-phenylalanine in water-miscible organic solvent systems at 40°C

Solvent system ¹⁾	BzAMP (%)	L-phenylalanine (%)
DMSO 45%	1.47	1.46
Methanol 45%	1.89	1.79
DMSO 25% + methanol 20%	1.58	1.57
DMSO 25% + EG 20%	0.79	1.47
DMSO 25% + DEG 20%	0.94	1.37
DMSO 25% + TEG 20%	1.37	1.36
DMSO 25% + PEG 200 20%	1.64	1.36

¹⁾Each solvent system was buffered with 0.01M MES(pH 6.0)

다. 보호기의 제거는 전기환원 방법을 사용하였다⁽¹⁶⁾.

결과 및 고찰

BzAMP 및 Phe의 용해도

Nakanishi 등⁽⁸⁾은 고정화 thermolysin에 의한 아스파탐의 전구체인 N-benzyloxycarbonyl-L-aspartyl-L-phenylalanine methylester(ZAPM)의 연속합성시에 column형 반응기의 폐색 원인 물질은 PheOMe가 비효소적으로 분해되어 생성되는 Phe으로서, 반응 용매인 ethyl acetate에 용해되지 않기 때문이라고 하였으며, Oyama⁽⁷⁾도 폐색의 원인이 고정화 효소에 ZAPM과 반응물질이 침착되기 때문이라고 하였다. 그리고 수상계에서의 반응시에는 효소반응에 의하여 생성된 ZAPM가 고정화 효소의 표면에 부착되어 효소와 생성물의 분리가 곤란하며, 반응속도가 저하된다고 하였다. 한편, Nilsson과 Mosbach⁽¹⁷⁾는 수불용성 용매계 대신에 수용성 용매계를 사용함으로써 기질과 생성물의 용해도를 증가시킬 수 있기 때문에 peptide의 효소합성에 있어서 수용성 용매계를 사용함이 유리하다고 하였다.

Table 1은 고정화 thermolysin에 의한 효율적인 BzAMP의 효소합성을 위한 반응용매계 선정실험의 일부로서, pH 6.0으로 조절된 수용성 유기용매를 포함한 각각의 용매계에 대한 BzAMP 및 Phe의 40°C에서의 용해도를 측정된 결과이다. BzAMP의 용해도는 methanol 45%의 수용액에서 1.89%로 가장 높았으며, DMSO 25%와 PEG 200 20%를 함유하는 용매계에서도 1.64%의 비교적 높은 용해도를 나타내었다. DMSO와 ethylene glycol(EG), diethylene glycol(DEG), triethylene glycol(TEG), PEG 등 ethylene glycol류의 탄소수가 증가함에 따라 증가하였으며 이는 BzAMP의 분자 구조와 관련이 있는 것으로 보인다. 한편 Phe의 용해도는 조사한 용매계 모두에서 큰 차이를 나타내지 않았으나 methanol 45%를 함유하는 용매계에서 1.79%로서 다른 용매계에서 보다 다소 높은 용해도를 나타내었다. Phe의 물에 대한 용해도는 40°C에서 3.77%이나 유기용매에서는 거의 녹지

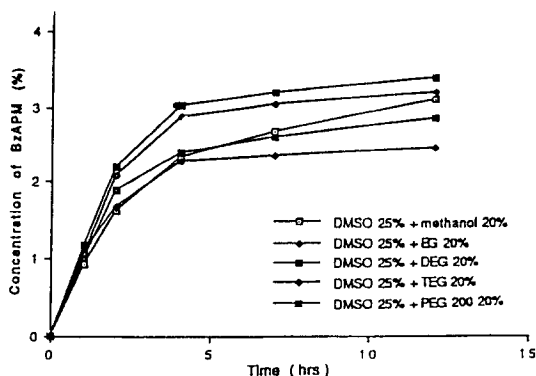


Fig. 1 Comparison of different water-miscible organic solvent systems for the production of BzAMP using immobilized thermolysin at pH 6.0 and 40°C

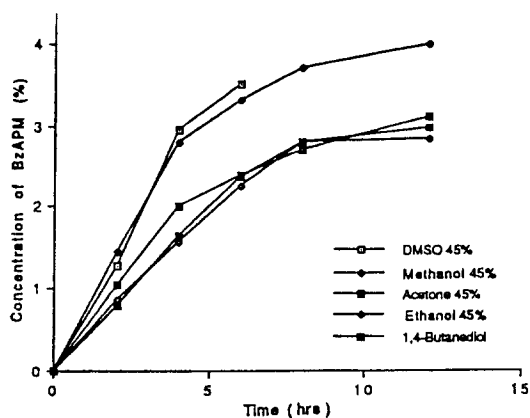


Fig. 2 Comparison of different water-miscible organic solvent systems for the production of BzAMP using immobilized thermolysin at pH 6.0 and 40°C

않아⁽¹⁸⁾ 유기용매계에서 Phe의 용해도가 감소하는 것으로 생각된다.

고정화 thermolysin에 의한 BzAMP 합성

Amberlite XAD-7에 흡착, 가교화하여 고정화된 효소로 Bz-Asp와 PheOMe로부터 BzAMP를 합성할 때 수용성 유기용매계의 종류에 따른 BzAMP의 생성 농도는 Fig. 1, 2와 같다. DMSO 25%에 methanol 또는 ethylene glycol류가 20%씩 들어있는 용매계에서 12시간까지 반응시키면서 BzAMP의 생성농도를 분석한 결과, PEG 200이 20% 함유된 용매계(DMSO 25% + PEG 200 20%)에서 초기 합성속도가 빠르고 평형농도도 3.5% 정도로 높게 나타났다. EG 20%가 함유된 용매계에서는 BzAMP의 초기 합성속도도 낮고 평형농도도 2.5% 이하였다. 그리고 ethylene glycol류의 탄소수가 증가할수록 초기 합성속도와 BzAMP의 생성 평형농도가 증가하는 경향을 보였다.

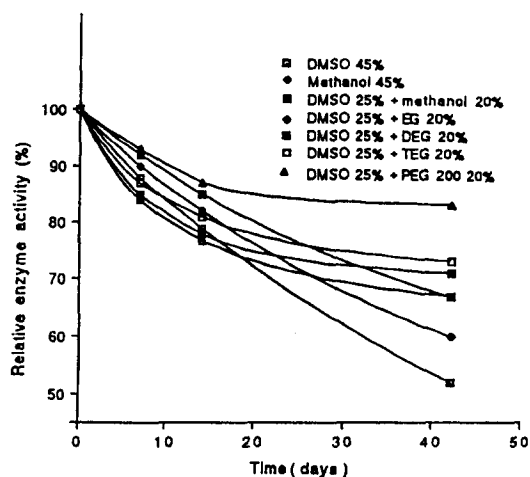


Fig. 3 Stability of immobilized thermolysin in water-miscible organic solvent systems at pH 6.0 and 40°C

한편, methanol이 20% 함유된 용매계(DMSO 25% + methanol 20%)에서는 다른 용매계에서보다 상대적으로 초기 합성속도가 늦었으나, 12시간 반응시 DMSO나 methanol만이 45% 함유된 용매계에서 가장 빠르고도 높은 것으로 나타났으며 acetone, ethanol 또는 1,4-butane-diol이 45% 함유된 용매계에서는 초기 합성속도도 낮고, BzAPM의 생성농도도 낮은 것으로 나타났다(Fig. 2).

이는 Rodgers 등⁽¹³⁾이 유리 thermolysin을 사용하여 수용성 유기용매의 2M 수용액에서 ZAPM의 합성역가를 비교하였을 때, methanol 함유시는 수용액에서보다도 합성역가가 높았으나 ethanol 및 1,4-butanediol의 수용액에서는 낮았다고 하는 보고와 비슷하였다. 한편, DMSO 45% 함유된 용매계에서는 7시간 이후 BzAPM의 결정이 생성되어 더 이상의 분석이 곤란하였다.

고정화 thermolysin의 안정성

수용성 유기용매가 함유된 용매에서 Amberlite XAD-7에 고정화한 thermolysin의 안정성을 조사한 결과(Fig. 3), DMSO 25% + PEG 200 20%의 용매계에서 고정화 thermolysin의 안정성이 가장 우수한 것으로 나타났다. DMSO 25% + methanol 20%의 용매계에서 14일까지는 고정화 thermolysin의 안정성이 양호하였으나, 42일 후에는 안정성이 비교적 낮아져 대조구에 비하여 70% 이하의 합성역가를 나타내었다. DMSO 25%와 ethylene glycol류가 20% 함유된 용매계에서는 TEG, DEG 및 EG의 순으로 고정화 효소의 안정성이 높았다. 그리고 ethylene glycol류가 함유된 용매에서 14일까지는 안정성이 급격히 저하되었다가 그 후에 서서히 저하되는 경향을 보였다. glycerol 등의 polyol이나 당류가 thermolysin을 포함한 효소의 안정성을 높인다는 보고^(10,12,13,19,20)가 있는데, polyol의 일종인 ethylene glycol류도 고정화

Table 2. Decomposition rate constant(k) of PheOMe in water-miscible organic solvent systems at 40°C¹⁾

Solvent	k(hr ⁻¹)×10 ²
MES/NaOH buffer (10 mM)	2.09
DMSO 45%	1.24
DMSO 25% + methanol 20%	1.00
DMSO 25% + EG 20%	1.53
DMSO 25% + DEG 20%	1.57
DMSO 25% + TEG 20%	1.53
DMSO 25% + PEG 200 20%	1.56

¹⁾Initial concentration of PheOMe in each solvent system was adjusted to 300 mM and pH was 6.0

thermolysin의 안정성을 향상시키는 작용이 있는 것으로 보이며, 특히 탄소수가 많아질수록 안정화 효과가 큰 것으로 추정된다.

한편, DMSO와 methanol이 각각 45%가 함유된 용매계에서는 고정화 thermolysin의 안정성이 급격히 저하되는 현상을 나타내어, BzAMP의 합성활성은 양호함에도 불구하고 반응용매로 사용하기에는 부적합하다고 판단되었다.

Nakajima 등⁽²¹⁾은 유기용매의 농도가 50% 이상일 때는 thermolysin의 구조에 변화가 생기고, 활성에도 영향이 있는 것 같다고 하였으며, Oyama 등⁽⁷⁾도 겔 여과용수지인 Toyopearl에 ethylenediamine-glutaraldehyde를 사용하여 고정화시킨 thermolysin이 DMSO, methanol, tetrahydrofuran 등의 용매 중에서는 매우 불안정하다고 하였는데, Amberlite XAD-7에 고정화한 thermolysin이 DMSO와 methanol 함유 용매계에서 안정성이 저하되는 것도 이러한 이유 때문인 것으로 생각된다.

PheOMe의 안정성

저분자의 ester는 촉매가 존재하지 않아도 원래의 산과 알코올로 서서히 분해되고, 산이나 알칼리 촉매하에 고온에서는 분해가 촉진되며⁽²²⁾, 아미노산의 저급 알코올 에스테르는 유기산의 에스테르보다 더 쉽게 가수분해된다고 하였다⁽²³⁾. PheOMe는 OH⁻ 이온의 촉매하에 Phe과 methanol도 가수분해되고 Tris분자에 의해서도 부분적으로 aminolysis되며, PheOMe의 가수분해 상수는 pH가 낮아질수록 작게 된다는 보고가 있다⁽²⁴⁾.

앞의 실험에서 사용한 각 용매계에서 PheOMe의 안정성을 조사한 결과(Table 2), PheOMe는 DMSO 25% + methanol 20%의 용매계에서 분해 속도상수가 $1.0 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ 로 가장 안정하였으며, 유기용매가 들어 있지 않은 완충액에서는 $2.09 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ 로 가장 불안정한 것으로 나타났다.

그리고 DMSO 25%와 ethylene glycol류가 20% 들어 있는 용매계에서는 $1.53 \sim 1.57 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ 로 수용액에서 보다는 안정한 것으로 나타났다.

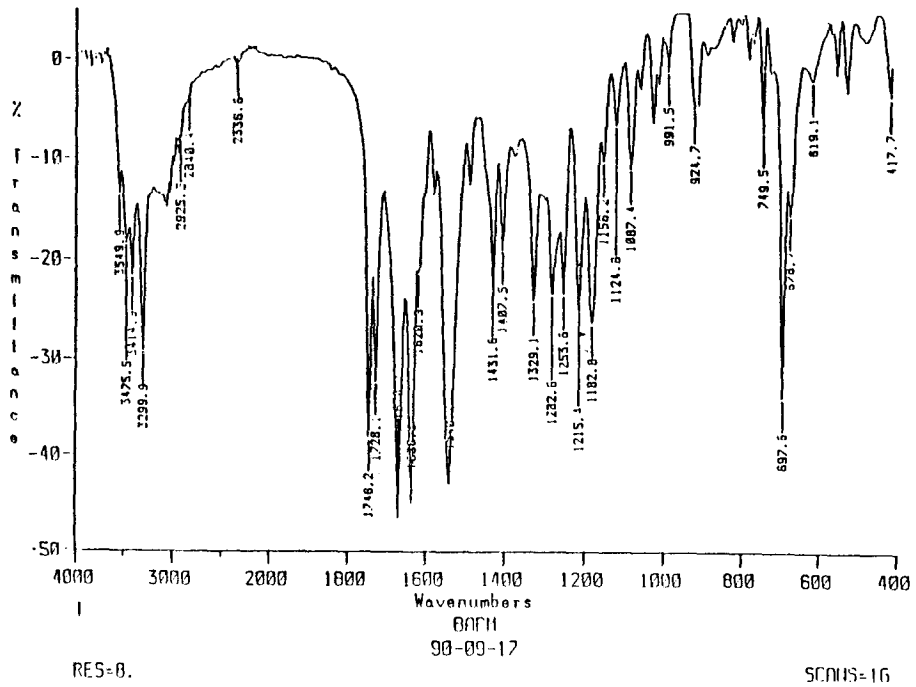


Fig. 4. IR spectrum of BzAPM

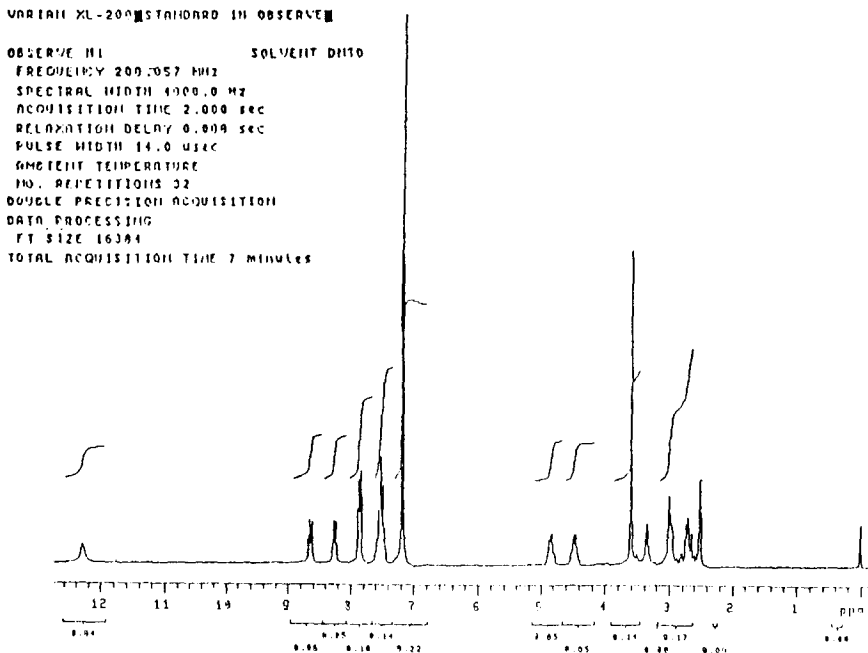


Fig. 5. ¹H-NMR spectrum of BzAMP

BzAPM의 확인

고정화 thermolysin에 의하여 기질인 Bz-Asp와 PhOMe로부터 합성된 BzAPM의 IR Spectrum 및 ¹H-

NMR Spectrum은 각각 Fig. 4, 5와 같다. 그리고 BzAPM의 보호기 제거에 의해 생성된 아스파탐의 HPLC chromatogram은 Fig. 6과 같다.

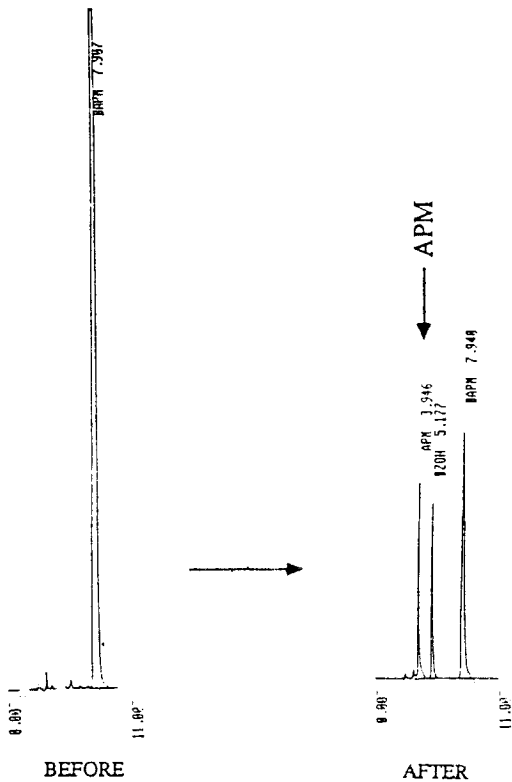


Fig. 6. HPLC chromatograms of APM produced after deprotection of BzAPM

요 약

고정화 thermolysin에 의한 아스파탐 전구체의 하나인 N-Benzoylaspartame(BzAPM)의 합성을 효율적으로 할 수 있는 수용성 유기용매가 함유된 용매제를 선정하고자 하였다. BzAPM 및 L-phenylalanine(Phe)의 용해도는 methanol 45%가 함유된 용매제에서 각각 1.84 및 1.79 %로 가장 높았으며, dimethyl sulfoxide(DMSO) 25%와 polyethylene glycol(PEG) 200 20%가 함유된 혼합 용매제도 비교적 높은 용해도를 보였다. BzAPM의 용해도는 ethylene glycol류의 분자량이 커질수록 용해도가 증가하였으나, Phe의 경우에는 이러한 경향을 나타내지 않았다. 고정화 thermolysin에 의한 BzAPM의 합성역가는 methanol 45% 및 DMSO 45%의 단일 유기용매제와 DMSO 25% 및 PEG 200 20%가 함유된 혼합 용매제에서 높게 나타났으며, 초기 합성속도도 빠른 것으로 나타났다. 40°C 에서 42일간 고정화 효소를 보관하였을 때, thermolysin은 DMSO 25%와 PEG 200 20%가 함유된 용매제에서 가장 안정하였다. L-phenylalanine methyl ester의 비효소적 가수분해 속도는 methanol함유 용매제에서 가장 낮았고, DMSO 25%와 PEG 200이 함유된 용매제에서는 이들의 중간 정도인 것으로 확인되었다. 그리하여 고정화 thermolysin에 의한 BzAPM의 합성에 적합한 용매제로서 DMSO 25% 및 PEG 200 20%가 함유된 용매제를 선정하였다.

감사의 글

이 논문은 "N-Benzoylaspartame의 효소적 합성을 위한 용매제의 선정"의 일부로 1991년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유응용과제 학술연구 조성비에 의하여 연구된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Mazur, R.H., Schlatter, J.M. and Goldkamp A.H.: Structure-taste relationships of some dipeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2684(1969)
2. 小山清孝: アスパラーム製造技術開發の動向. *Bio Industry*, **2**(9), 693(1985)
3. Oyama, K., Kihara, K. and Nonaka, Y.: On the mechanism of the action of thermolysin: Kinetic study of the thermolysin-catalyzed condensation reaction of N-benzoyloxycarbonyl-L-aspartic acid with L-phenylalanine methyl ester. *J. Chem. Soc. Perkin II*, 356(1981)
4. Nakanishi, K., Kimura, Y. and Matsuno R.: Kinetics and equilibrium of enzymatic synthesis of peptides in aqueous/organic biphasic system. Thermolysin-catalyzed synthesis of N-(benzyloxycarbonyl) L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester. *Eur. J. Biochem.*, **161**, 541(1986)
5. Oyama, K., Nishimura, S., Nonaka, Y., Kihara, K. and

IR(KBr); cm⁻¹

1746(—COOCH₃의 —C— stretching)

1723(—NHα의 —C— stretching)


1670(—NHβ의 —C— stretching과 —COH의

—C— stretching)

¹H-NMR(DMSO-d₆)

2.3 ppm(—CH₂β—), 2.7 ppm(—CHβ—)

3.3 ppm(—CH₂α—), 3.4 ppm(—CHα—),
3.6 ppm(—OCH₃)

4.5 ppm(—NHβ—), 4.8 ppm(—NHα—),
7.2~8.7 ppm(2×) , 12.3 ppm(—COOH)

- Hashimoto, T.: Synthesis of an aspartame precursor by immobilized thermolysin in an organic solvent. *J. Org. Chem.*, **46**, 5241(1981)
6. Ooshima, H., Mori, H. and Harano, Y.: Synthesis of aspartame precursor by solid thermolysin in organic solvent. *Biotechnol. Lett.*, **7**(11), 789(1985)
 7. Oyama, K.: Enzymatic synthesis of aspartame in organic solvents. *Proc. Int'l. Sym. Wageningen*, 209(1987)
 8. Nakanishi, K., Takeuchi, A. and Matsuno, R.: Long-term continuous synthesis of aspartame precursor in a column reactor with an immobilized thermolysin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 633(1990)
 9. Gekko, K. and Timasheff, S.N.: Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochem.*, **20**, 4667(1981)
 10. Larreta-Garde, V., Xu, Z.F. and Thomas, D.: Behavior of enzymes in the presence of additives. Influence of alcohols, polyols, and sugars on activity and stability of yeast alcohols dehydrogenase. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, **542**, 294(1988)
 11. Homandberg, G.A., Mattis, J.A. and Laskowski, M.Jr.: Synthesis of peptide bonds by proteinases. Addition of organic cosolvents shifts peptide bond equilibria toward synthesis. *Biochem.*, **17**(24), 5220(1978)
 12. Durrant, I., Beynon, R.J. and Rodgers, P.B.: Effect of glycerol on thermolysin-catalyzed peptide bond synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**(2), 280(1986)
 13. Rodgers, P.B., Durrant, I. and Beynon, R.J.: Effect of water miscible organic solvents on activity and thermostability of thermolysin. *Proc. Int'l. Sym. Wageningen*, 405(1987)
 14. Steiger, R.E.: Benzoylation of amino acids. *J. Org. Chem.*, **9**, 396(1944)
 15. 한민수 : 수용성 유기용매계와 고정화 Thermolysin을 이용한 N-Benzoyl-L-Aspartyl-L-Phenylalanine Methyl Ester의 합성. 세종대학교 박사학위 논문(1992)
 16. Marinovsky, V.G.: Electro-deprotection-Electrochemical removal of protecting groups. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **15**(5), 281(1976)
 17. Nilsson, K. and Mosbach, K.: Peptide synthesis in aqueous-organic solvent mixtures with α -chymotrypsin immobilized to tresyl chloride-activated agarose. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1146(1984)
 18. 鮫島廣年 : "아미노산의 분리精製法", 아미노酸發酵, 上卷, 330, 公立出版(株), 東京(1972)
 19. Uedaira, H.: The effect of sugars on the thermal denaturation of lysozyme. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 2451(1980)
 20. Cimbes, D. and Monsan, P.: Effect of polyhydric alcohols on invertase stabilization. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, **434**, 61(1984)
 21. 中島 宏, 鈴木紘一, 令堀和友 : サーモライ신의 활성에及ぼす 有機溶媒의 影響, 農化, **49**(6), 317(1975)
 22. Mark, H.F., et al(ed): "Hydrolysis, organic esters", Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd ed., **9**, 314, John Wiley & Sons, NY(1980)
 23. Bodanszky, M. et al(ed): "Methyl and ethyl esters", Peptide synthesis. 2nd ed., 51, John Wiley & Sons, NY(1976)
 24. Inada, Y., Yoshimoto, T., Matsushima, A. and Saito, Y.: Engineering physicochemical and biological properties of proteins by chemical modification. *Trends Biotechnol.*, **4**, 68(1986)

(1992년 9월 8일 접수)