

## 미수계내에서의 유리 및 고정화 Thermolysin에 의한 펩티드 합성

김 남 수\*  
한국식품개발연구원

### Peptide Synthesis in Microaqueous System with Free and Immobilized Thermolysin

Kim, Namsu

Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong,  
Bundang-ku, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

**Abstract** — A model peptide, N-carbobenzoxy-L-phenylalanyl-L-phenylalanine methyl ester, was synthesized with free and immobilized thermolysin in a microaqueous system. The model peptide was formed mostly during the initial phase of the reaction. The yields of the compound with free and immobilized thermolysin after 4 hr of reaction were 77.8 and 71.2%, respectively. In prolonged reaction, however, the immobilized thermolysin was superior to the free enzyme concerning the synthetic efficiency of the compound, showing a yield over 95%.

효소적 펩티드 합성은 감미 펩티드, 염미 펩티드, 펩티드 호르몬 등과 같은 고부가가치의 식품 및 의약품 신소재의 합성에 유용한 수단이므로 그 중요성은 매우 높다고 할 수 있다(1). 펩티드의 효소적 합성방법으로는 아미노 아실 전달 RNA 합성효소를 이용하는 방법(2)과 단백질분해효소의 반응평형이 역반응 쪽으로 일어나게 하는 방법(3)이 알려지고 있다. 전자의 경우에는 펩티드 합성시 효소가 엄격한 기질특이성을 가지지 않으므로 D형의 아미노산들도 효율성 있는 기질로 사용될 수 있으나 반응 시스템이 복잡하므로 실제 적용이 문제가 되고 따라서 효소적 펩티드 합성방법으로 널리 사용되고 있지 않다(2). 반면 단백질분해효소에 의한 펩티드 합성시에는 효소의 기질특이성으로 인하여 기질로 사용될 수 있는 아미노산들에 제한이 있으나 유기용매 첨가 등과 같은 간단한 조작에 의해서도 손쉽게 펩티드 합성이 이루어지므로 이와 관련된 많은 연구가 보고되고 있다(4-7). 저자는 아스파탐을 대체할 수 있는 새로운 고감미 펩티드 감미료 합성에 관한 연구를 수행해오고 있고

그러한 노력의 일환으로서 본 연구에서는 유리 및 고정화 thermolysin을 사용한 미수계내에서의 효소 반응 시스템을 N-carbobenzoxy-L-phenylalanyl-L-phenylalanine methyl ester(N-Cbz-Phe-Phe-OMe)를 모델 펩티드로 사용하여 정립하고자 하였다.

#### 효소 고정화

효소 고정화는 미수계내에서의 펩티드 합성시 야기될 수 있는 효소의 안정성 저하현상을 막아주기 위한 목적으로 행하였으며 기존의 방법들(8, 9)을 약간 변형시켜 다음과 같이 실시하였다. 즉 Amberlite XAD-7 수지를 에탄올로 4회 1차 씻어주고 2차로는 25 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5, 20 mM CaCl<sub>2</sub> 포함)으로 10회 세척하였다. 정제 thermolysin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 미리 냉각시킨 상기 완충용액에 50 mg/ml 비율로 용해시킨 다음 30 ml vial에서 위의 수지 1g에 대하여 250 mg의 비율로 효소를 가하여 섞어주고 KMC 8480 SR 진탕배양기(Vision Scientific Co., Seoul, Korea)상에서 4°C에서 130 rpm으로 24시간 반응시켜 수지에 효소를 결합시켰다. 반응액 절반을 덜어내어 단백질 정량(10)을 행하여 고정화율을 측정하는 한편 나머지 반응액에 25%

**Key words:** Microaqueous peptide synthesis, thermolysin

\*Corresponding author

glutaraldehyde 용액(Sigma Chemical Co.)을 가하여 전체의 glutaraldehyde 농도를 12.5%로 조정해준 후 4°C에서 6시간 동안 150 rpm으로 교반하여 효소분자의 교차결합을 유도하였다. 효소결합수지는 냉각된 상태의 100 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>와 1 M NaCl 포함)으로 3회 씻어준 후 염화나트륨이 배제된 상기 완충용액을 사용하여 추가로 10회 씻어주었다. 최종 씻기가 끝나면 여지상에서 수지를 건조한 후 작은 vial에 담아 냉장보존하면서 실험에 사용하였다.

### 효소적 펩티드 합성

미수계내에서의 모델 펩티드 N-Cbz-Phe-Phe-OMe의 효소적 합성은 Clapés 등의 방법(4)을 응용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 10 ml vial에서 유리 및 고정화 thermolysin을 단백질 기준으로 동량 가한 다음 250 mM의 Tris 용액(30 mM CaCl<sub>2</sub> 포함)으로 미리 포화된 1 ml의 ethylacetate에 각각 20 및 30 mM 농도로 용해된 기질인 N-Cbz-L-phenylalanine(N-Cbz-Phe, Sigma Chemical Co.)과 L-phenylalanine methyl ester(Phe-OMe, HCl 유리형)를 가하고 25°C에서 125 rpm으로 교반하면서 24시간 반응시켰다. 30분, 1, 2, 4, 6, 24시간 간격으로 시료를 채취하여 ethylacetate를 휘발시키고 HPLC 용리액에 용해시킨 다음 0.2 µm 막 필터(Gelman Co.)로 여과한 후 HPLC 분석을 행하였다. 이때 HCl 유리형의 Phe-OMe의 제조방법은 다음과 같다. 50 mmol의 Phe-OMe(HCl 결합형, Sigma Chemical Co.)를 25 mmol의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 포함하고 있는 100 ml의 증류수에 용해시킨 다음 분액여두로 옮기고 여기에 100 ml의 chloroform을 가한 후 진탕하여 정치시키고 Phe-OMe를 포함하고 있는 chloroform층을 분리하여 삼각플라스크로 옮겼다. 위의 과정을 2회 더 반복하여 약 300 ml의 chloroform층을 모은 후 MgSO<sub>4</sub>로 탈수하고 감압하에서 건조하여 Phe-OMe를 기름상태로 얻었다.

### HPLC 분석조건

모델 펩티드 합성시의 기질 및 생성물에 대한 HPLC 분석조건은 다음과 같다. 분석용 column은 µBondapak™C<sub>18</sub>(Waters Co., Milford, MA), 용리액은 60% acetonitrile(인산을 사용하여 pH 2.5로 조정), 유속은 0.8 ml/min였으며 Applied Biosystems사(Foster City, CA)의 1000S diode-arrayed detector를 사용하여 220 nm에서의 흡광도(absorbance units full

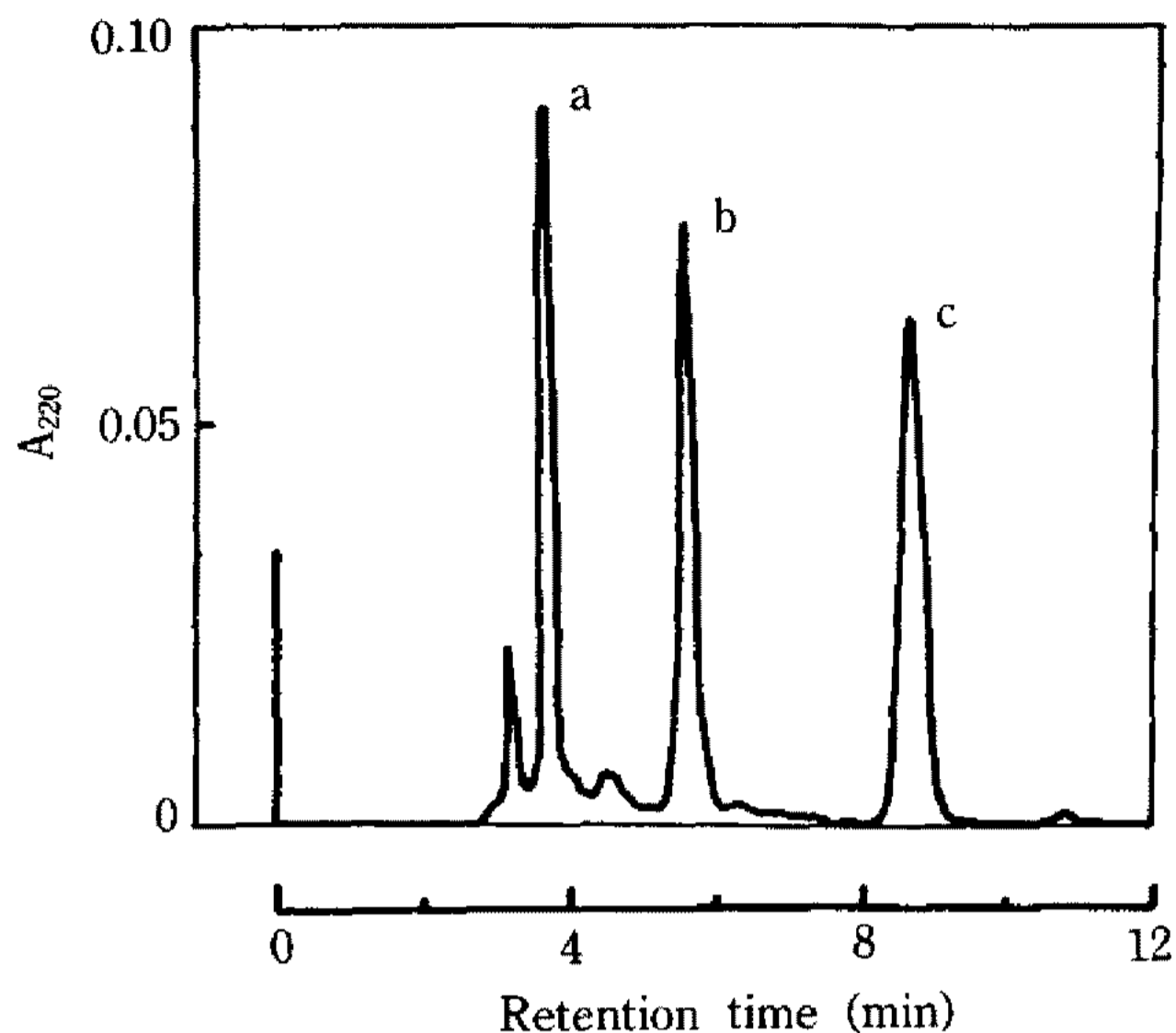


Fig. 1. HPLC chromatogram of the substrates and product for the synthesis of N-Cbz-Phe-Phe-OMe.

a, Phe-OMe; b, N-Cbz-Phe; c, N-Cbz-Phe-Phe-OMe.

scale range 0.1)를 측정하였으며 피크면적은 Waters사의 Data Module 745 적산계를 사용하여 계산하였다. 이때 시료 주입량은 10 µl였다.

### HPLC 크로마토그램

Thermolysin을 사용한 미수계내에서의 효소적 펩티드 합성시의 기질과 생성물의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 이때 기질인 Phe-OMe와 N-Cbz-Phe, 생성물인 모델 펩티드 N-Cbz-Phe-Phe-OMe의 머무름 시간은 각각 3.64, 5.60, 8.74분이었다.

### 모델 펩티드의 경시적 생성

본 실험에서는 thermolysin을 Amberlite XAD-7 수지에 고정화하였는데 이때의 고정화율은 76.6%(bovine serum albumin 기준)로 나타났다. Fig. 2에는 유리 및 고정화 thermolysin을 사용한 미수계내에서의 펩티드 합성시 모델 펩티드의 경시적 생성 정도가 표시되어 있다. 모델 펩티드는 양 효소 공히 반응초기에 주로 형성되었으며 4시간 반응 후의 수율은 유리 및 고정화 thermolysin의 경우 각각 77.8, 71.2%였다. 고정화 thermolysin에 있어서는 반응시간이 6시간보다 길어지면 생성물의 수율이 유리형의 효소의 경우보다 높아지며 24시간후에는 95% 이상의 높은 수율을 나타내었다.

이와같이 미수계내에서 고정화 thermolysin에 의한 펩티드 합성효율이 높은 것은 아스파탐 전구물질 합성에 관한 Nakanishi 등의 보고(8)에서도 잘 나타나

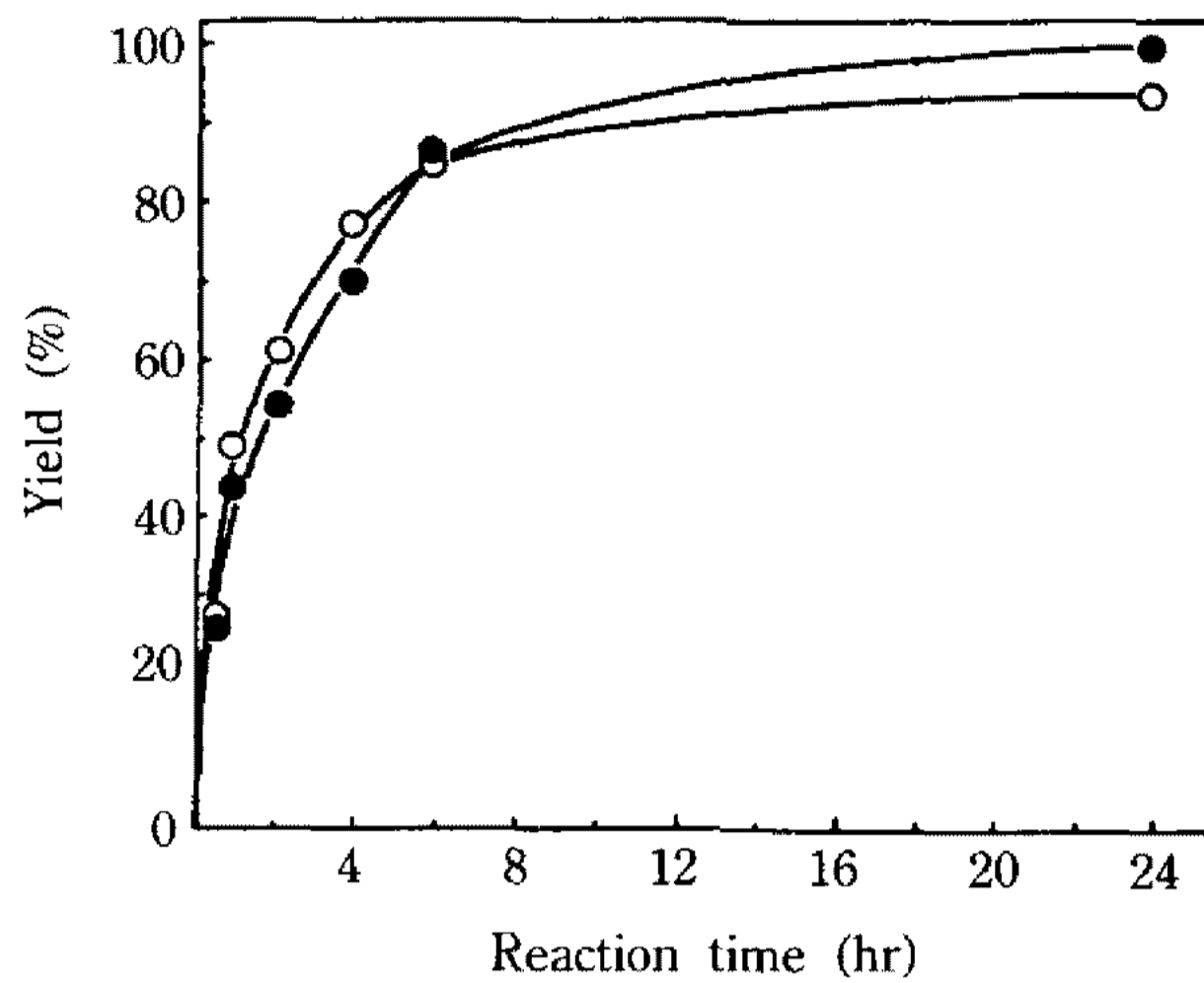


Fig. 2. Time-dependent syntheses of N-Cbz-Phe-Phe-OMe with free and immobilized thermolysin.

—○—, free thermolysin; —●—, immobilized thermolysin.

있다. 본 연구에서는 유리 thermolysin도 포화 ethylacetate내에서 모델 펩티드 합성을 매우 효율적으로 행하는 것으로 나타났는데 이는 thermolysin이 소수성 아미노산 함량이 높아 포화 ethylacetate에 잘 현탁되며 안정성이 높는데 기인하는 것으로 보인다(1, 6). 이 경우도 반응시간이 길어지면 고정화 thermolysin보다 안정성이 떨어질 것으로 보이며 경제성 및 자기소화 방지 등의 관점에서 볼 때 효소적 펩티드 합성에는 고정화 thermolysin을 사용하는 것이 보다 바람직할 것으로 사료된다(8, 11).

### 참고문헌

1. Kimura, Y. 1990. *Studies on Proteinase-Catalyzed Oligopeptide Syntheses in Bioreactors with Organic Solvent*, Pp. 1-4. Ph.D. Thesis, Kyoto University,

Kyoto, Japan.

- Soda, K. and K. Yonaha. 1987. Application of free enzymes in pharmaceutical and chemical industries, Pp. 605-652. In J.F. Kennedy (ed.), *Biotechnology*, VCH Co., Weinheim, Germany.
- Galss, J.D. 1981. Enzymes as reagents in the synthesis of peptides. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 2-8.
- Clapés, P., P. Adlercreutz, and B. Mattiasson. 1990. Enzymatic peptide synthesis in organic media: nucleophile specificity and medium engineering in  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed reactions. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**: 376-386.
- Cramer, S.M. and C. Horváth. 1989. Peptide synthesis with immobilized carboxypeptidase Y. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 344-353.
- Oka, T. and K. Morihara. 1980. Peptide bond synthesis catalyzed by thermolysin. *J. Biochem.* **88**: 807-813.
- Uemura, T., K. Kato, and K. Aso. 1990. Stereospecificity in papain-catalyzed oligopeptide synthesis. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 3009-3010.
- Nakanishi, K., T. Kamikubo, and R. Matsuno. 1985. Continuous synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester with immobilized thermolysin in an organic solvent. *Biotechnol.* **3**: 459-464.
- Kimura, Y., T. Yoshida, K. Muraya, K. Nakanishi, and R. Matsuno. 1990. Continuous synthesis of a tripeptide by successive condensation and transesterification catalyzed by two immobilized proteinases in organic solvent. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1433-1440.
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, N.E. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Klibanov, A.M. 1979. Enzyme stabilization by immobilization. *Anal. Biochem.* **93**: 1-25.

(Received November 11, 1992)