

## 고정화 Thermolysin을 사용한 아스파탐 전구체의 최적 합성조건 선정

한민수 · 김우정\*

미원 식품건강연구소, \*세종대학교 식품공학과

### Synthetic Conditions of an Aspartame Precursor by Immobilized Thermolysin

Min-Su Han and Woo-Jung Kim\*

Miwon Food R&D Center

\*Department of Food Science and Technology, Sejong University

#### Abstract

N-Benzoyl-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester(BzAPM), a novel aspartame precursor, was investigated for its enzymatic synthesis by immobilized thermolysin using a water-miscible organic solvent system. The substrate used were N-benzoyl-L-aspartic acid(BzAsp) and L-phenylalanine methyl ester (PheOMe). Synthetic conditions such as substrates concentration, temperature, pH, and some metallic ions were varied to study their effects on BzAPM synthesis. The synthetic reaction rate increased linearly as the PheOMe concentration increased at a constant concentration of BzAsp(100 mM), and the maximum reaction rate was obtained at BzAsp concentration of 200 mM when 300 mM PheOMe was used. The optimum pH and temperature were found to be 6.1 and 40°C, respectively. The metallic ions such as Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> at 5 mM level showed inhibitory effect on BzAPM synthesis, while Co<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ion increased synthesis. Co<sup>2+</sup> ion was also found to have synergistic effect with Ca<sup>2+</sup> ion. Benzoic acid, L-phenylalanin and NaCl showed inhibitory effect.

Key words: aspartame precursor, synthesis, thermolysin, substrates, pH, metallic ion

#### 서 론

*Bacillus thermoproteolyticus*가 생산하는 내열성 단백질 분해 효소인 thermolysin<sup>(1)</sup>에 의해 아스파탐 전구체의 하나인 N-benzoyloxycarbonyl-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester(ZAPM)가 N-benzoyloxycarbonyl-L-aspartic acid(Z-Asp)와 PheOMe로부터 합성된다는 사실이 Isowa 등<sup>(2)</sup>에 의해 보고된 이래, 아스파탐 전구체의 효소적 합성<sup>(3-5)</sup>과 고정화 thermolysin을 이용한 ZAPM의 연속적 합성에 대한 연구가 다수 진행되어 왔다<sup>(6,7)</sup>. 효소적 방법에 의한 아스파탐의 합성은 화학적 방법에 비하여 쓴맛을 가진 β-이성체를 생성하지 않는 등의 여러가지 장점이 있는 것으로 알려져 있다<sup>(8)</sup>. Metalloendoproteinase의 일종인 thermolysin에 관하여는 이 효소의 구조<sup>(9,10)</sup>, 활성부위<sup>(11)</sup>와 효소의 특성인 열안정성<sup>(1,12)</sup>, 활성 pH<sup>(1,13)</sup>, 기질 특이성<sup>(14,15)</sup> 및 효소의 저해물질<sup>(1,15,16,17)</sup>, 금속 치환<sup>(18)</sup> 등에 관하여 다수의 보고가 있다. 그리고, thermolysin을 이용한 ZAPM의 합성시에 미치는 기질의 농도, pH, Ca 이온<sup>(19)</sup> 및 Co 등 2가 금속 이온<sup>(20)</sup>의 영향을 조사한 보고가 있으나, 저해 물질의 영향을 조사한 보

고는 되어 있지 않으며, 특히 고정화 thermolysin에 의한 ZAPM의 합성시에 이들 영향 인자의 종합적인 검토는 되어 있지 않은 실정이다.

아스파탐의 효소적 방법에 의한 산업적 생산을 위해서는 고정화 효소의 사용과 함께 공정의 연속화와 자동화가 고려되어야 하며, 이를 위해서는 최적 조건의 선정이 매우 중요하다 하겠다. 따라서 저자들은 고정화 thermolysin에 의한 새로운 아스파탐 전구체의 하나인 N-benzoyl-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester (BzAPM)의 효율적인 합성을 위하여 수용성 유기 용매가 함유된 용매제를 개발하여 보고<sup>(21)</sup>한 바 있어, 이 연구에서는 BzAPM 합성의 최적 조건을 확립하고자 농도, pH, 온도, 금속 이온이 미치는 영향과 합성 공정 중에 생성되는 L-phenylalanine(Phe), NaCl, benzoic acid 등의 영향을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

이 실험에 사용한 고정화 thermolysin, Bz-Asp 및 Phenylalanine methyl ester 염(PheOMe·HCl)은 전보의 방법<sup>(21)</sup>에 의하여 제조하여 사용하였다. 그리고, CaCl<sub>2</sub>와 polyethylene glycol 200(PEG 200) 등의 시약은 일급 시약을, 분석용 시약은 HPLC용 시약을 사용하였다. 그

Corresponding author: Woo-Jung Kim, Department of Food Science and Technology, Sejong University, Kunja-Dong 98, Sungdong-Ku, Seoul 133-747, Korea

리고 BzAPM의 합성에는 전보<sup>(21)</sup>에서 선정된 용매계로 만든 기본 기질용액(Bz-Asp 200 mM, PheOMe 300 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, CoCl<sub>2</sub> 5 mM, DMSO 25%, PEG 200 20%, pH 6.0)을 사용하였다.

### 기질 농도

기본 기질용액 중의 Bz-Asp와 PheOMe를 각각 200 mM 및 400 mM 이하의 농도로 조합하여 만든 각각의 기질 용액(pH 6.0) 100 ml에 고정화 thermolysin 0.2g씩을 넣고 40°C의 진탕 항온수조에서 2시간 동안 반응시킨 다음 생성된 BzAPM의 농도를 분석<sup>(21)</sup>하여 초기합성 속도를 구하였다.

### 반응 pH와 온도

기본 기질용액의 pH를 각각 5.1, 5.6, 5.8, 6.1, 6.4, 6.6으로 조정하여 각각의 기질용액 50 ml에 고정화 thermolysin 5g씩을 넣고 40°C의 진탕 항온수조에서 12시간 반응시켰다. 반응온도는 pH 6.0으로 조절된 반응용액을 30, 40 및 50°C의 진탕 항온수 조에서 12시간 반응시킨 다음 생성된 BzAPM의 농도를 분석하였다.

### 금속 이온의 종류와 농도

pH 6.0으로 조절된 기본 기질 용액 중의 CaCl<sub>2</sub> 농도를 각각 0, 2, 5, 10, 15 mM로 하여 40°C의 진탕 항온수조에서 12시간 반응시킨 후 생성된 BzAPM의 농도를 분석하여 Ca<sup>2+</sup> 이온의 영향을 조사하였다. 그리고, CoCl<sub>2</sub>를 첨가하지 않은 기본 기질용액에 5 mM 농도의 Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 이온을 각각 첨가하여 위와 같이 반응시킨 후 생성된 BzAPM의 농도를 측정하였으며, 기본 기질 용액중의 CoCl<sub>2</sub> 농도를 각각 0.5, 1, 3, 5, 7, 10 mM로 조정된 기질용액과 CoCl<sub>2</sub>를 제외하고 FeCl<sub>3</sub> 및 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>를 각각 50 ppm, 100 ppm 및 5 mM로 첨가한 기질 용액으로 위와 같이 반응시켰다.

### Benzoic acid, L-phenylalanine, NaCl의 농도

benzoic acid의 첨가 영향은 benzoic acid의 첨가 농도를 0.2, 0.4, 0.6 및 0.8%로 하여 반응시켰고 Phe는 0.25, 0.5, 0.75 및 1.0%, NaCl은 2, 4, 6, 8, 10%가 되게 첨가하여 반응시킨 후 BzAPM의 합성에 미치는 NaCl 농도의 영향을 조사하였다. 반응 pH와 온도는 각각 pH 6.0과 40°C였다.

## 결과 및 고찰

### BzAPM의 합성속도에 미치는 기질농도의 영향

고정화 thermolysin에 의하여 BzAPM을 합성할 때 기질인 Bz-Asp와 PheOMe의 농도가 합성속도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. Bz-Asp의 농도를 100 mM로 하고 PheOMe의 농도를 각각 100, 200, 300 및 400 mM로 하여 반응시켰을 때의 반응속도는 거의

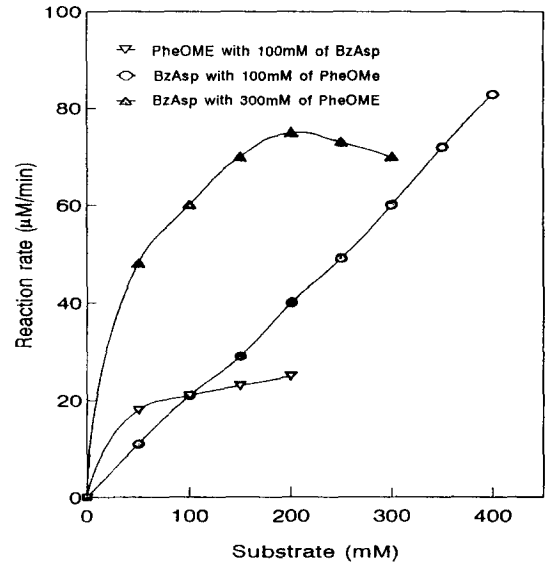
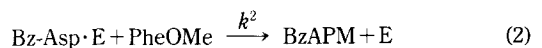
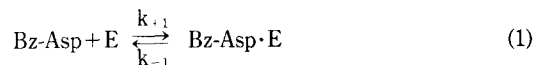


Fig. 1. Effects of Bz-Asp and PheOMe concentration on the initial rate of BzAPM synthesis by immobilized thermolysin in the water-miscible organic solvent system at pH 6.0 and 40°C

직선적으로 증가한 반면, PheOMe를 100 mM로 고정시키고 Bz-Asp를 각각 50~200 mM 범위로 첨가하여 반응시켰을 때 100 mM 이상에서는 반응속도가 더 이상 증가하지 않았으며, 반응속도도 낮아졌다. 그리고 PheOMe의 농도를 300 mM로 고정시키고 Bz-Asp의 농도를 각각 50~300 mM로 하여 반응시켰을 때, Bz-Asp의 농도 200 mM에서 BzAPM 생성속도가 70 μmole/min로써 최대치를 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 BzAPM의 생성속도가 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다.

이상의 결과는 Oyama 등<sup>(7)</sup>이 Z-Asp와 PheOMe로부터 ZAPM을 합성할 때의 결과와 일치하는 것으로 보인다.

Bz-Asp와 PheOMe로부터 thermolysin에 의한 BzAPM의 합성 반응은



와 같으며 반응속도식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$v = \frac{d[\text{BzAPM}]}{dt} = \frac{k_2[E_0][\text{PheOMe}]}{1 + (k_{+1} + k_2[\text{PheOMe}])/k_{-1} + [\text{Bz-Asp}]}$$

여기서 2번째 단계가 반응속도의 결정 단계이면  $k_{-1} \gg k_2[\text{PheOMe}]$ 가 되어 반응속도  $v$ 는 Bz-Asp의 농도가 일정할 때는 PheOMe의 농도에 대하여 1차 직선을 나타내게 된다. 그리고,  $k_{+1}/k_{-1} = K$ 라 하면 반응속도는

$$v = \frac{k_2[E_0][Bz-Asp][PheOMe]}{K + [Bz-Asp]}$$

가 되어 PheOMe의 농도가 일정할 때 Bz-Asp에 대하여 Michaelis-Menten 형식을 따르게 되어 이 실험 결과와 잘 일치한다고 할 수 있어 2번째 단계가 반응속도 결정 단계임을 알 수 있다. 그리고, Bz-Asp의 농도가 일정할 때 PheOMe의 농도에 대하여 1차 직선을 나타내는 것은 효소에 의한 peptide의 합성시에 친핵 수용체(nucleophilic acceptor)의 농도가 높을수록 합성속도가 증가한다는 Morihara 등<sup>(22)</sup>의 보고와 마찬가지로 친핵 수용체인 PheOMe의 농도가 높을수록 BzAPM의 합성속도가 증가하는 것으로 풀이할 수 있었다.

#### 반응 pH와 온도의 영향

고정화 thermolysin으로 BzAPM을 합성할 때 반응 pH와 온도의 영향을 조사한 결과(Fig. 2), pH 6.1 부근에서 합성수율이 가장 높은 것으로 나타났으며, pH 5.8 이하에서와 pH 6.4 이상에서는 합성수율이 상당히 감소하였고, 전자보다 후자의 경우에서 합성 수율이 더 빠르게 감소하는 경향을 보였다. 수용액 중에서 유리 thermolysin에 의한 ZAPM 합성시 최적 pH는 7.0이나 유기용매 중에서 고체 thermolysin을 사용하여 반응시킬 때는 최적 pH가 6.0으로서 1.0정도 산쪽으로 내려간다는 보고가 있으며<sup>(5)</sup>, 반응 최적 pH는 고체 thermolysin의 종류나 용매의 종류 및 농도에 따라 다른데, 이는 효소 분자 표면의 구조의 변화나 효소 활성중심부근의 미세 환경 변화에 기인하는 것으로 보인다고 하였다<sup>(23)</sup>. Nakanishi 등<sup>(4)</sup>도 물/ethyl acetate 2상계에서 고정화 thermolysin에 의해 ZAPM을 합성할 때 수상의 최적 pH는 5~6 으로서 이는 기질인 Z-Asp와 PheOMe, 그리고 생성물인 ZAPM의 수상과 유기상에 대한 분배와 관련이 있다고 하였다. 효소를 고정화하면 효소가 존재하는 담체 내부의 환경과 외부 용액의 환경이 다르게 되어 pH 활성 곡선이 산쪽이나 알칼리 쪽으로 기울게 되며, 활성 곡선의 폭이 좁아지는 경우가 있다고 하였다<sup>(24)</sup>. 이 결과에서 볼 때 Amberlite XAD-7에 흡착 가교화시킨 thermolysin의 경우에도 최적 pH가 산쪽으로 1정도 낮아지며 최적 pH의 범위도 좁아지는 것으로 생각된다.

고정화 thermolysin을 이용하여 BzAPM을 합성할 때 최적 반응온도를 조사한 결과 40°C에서 상대 합성 수율이 가장 높은 것으로 나타났으며, 30°C와 50°C에서는 40°C일 때에 비하여 각각 약 55% 및 80% 정도의 합성 수율을 나타내었다. Ooshima 등<sup>(5)</sup>은 98%의 유기용매계(ethyl acetate : benzene : methanol : water = 50 : 29 : 19 : 2)에서 고체 thermolysin에 의하여 ZAPM을 합성할 때 반응온도가 70°C 일 때는 40°C 일 때보다 반응속도가 급격히 저하된다고 하였으며, 이는 효소의 열에 의한 불활성화 또는 고온에서의 유기용매에 의한 영향일 것이라고 하였다. 반응온도가 thermolysin에 의한 ZAPM의

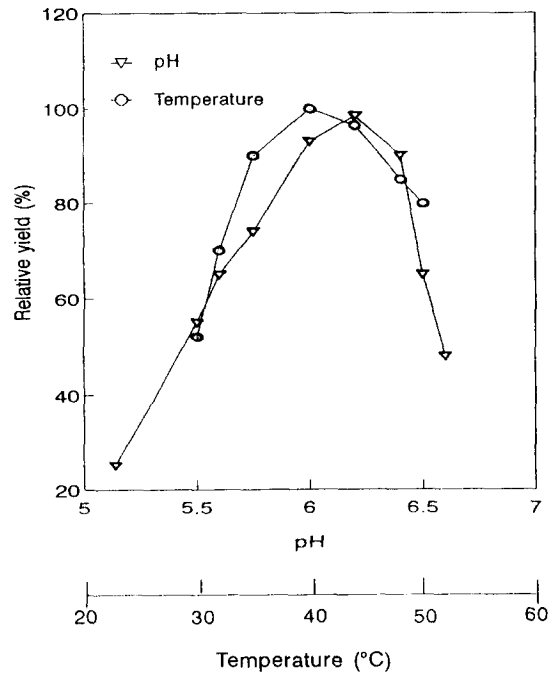


Fig. 2. Effects of pH at 30°C and temperature at pH 6.0 on BzAPM synthesis by immobilized thermolysin in the water-miscible organic solvent system at pH 6.0 and 40°C

합성에 미치는 영향을 조사한 보고는 아직 없으나 반응온도를 37°C 내지 40°C로 하여 유리 또는 고정화 thermolysin에 의한 ZAPM을 합성한 예는 다수 보고되어 있어<sup>(6,7,19)</sup>, DMSO 25% 및 PEG 200 20%가 함유된 용매계에서 고정화 thermolysin을 이용하여 BzAPM을 합성할 때에도 반응온도에는 ZAPM 합성시와 차이가 없는 것으로 보인다.

#### 금속 이온의 영향

Ca<sup>2+</sup>와 Co<sup>2+</sup> 이온이 BzAPM 합성 수율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. BzAPM의 합성 수율은 Ca<sup>2+</sup> 첨가 농도가 높아지면서 3 mM에서는 무첨가구에 비하여 1.8배, 5 mM에서는 2.2배까지 증가하였다. 그러나 그 이상의 농도에서는 증가하지 않아, BzAPM의 효가적 합성을 위하여는 Ca<sup>2+</sup> 최적 첨가 농도는 5 mM임을 알 수 있었다. 또한 Co<sup>2+</sup> 이온의 농도 영향에서도 3 mM까지는 Ca<sup>2+</sup>의 경우와 같이 계속 증가하였으나 5 mM 이상에서는 더 이상 증가하지 않았으며, 합성 수율은 약 2배 증가하였다.

칼슘은 thermolysin의 안정성에 필수적인 요소로 알려져 있다<sup>(25)</sup>. 고정화 thermolysin으로 Z-Asp와 PheOMe로부터 ZAPM을 연속적으로 합성할 때, Ca<sup>2+</sup> 이온을 첨가하면 ZAPM 합성역가가 현저히 향상된다고 한

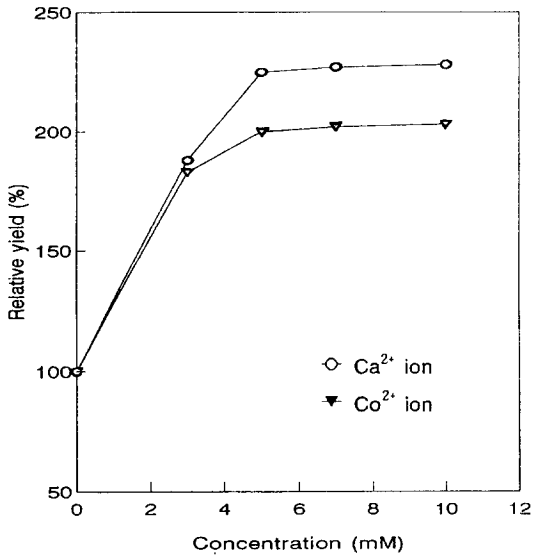


Fig. 3. Effects of calcium and cobalt ion concentration on BzaPM synthesis by immobilized thermolysin in the water-miscible organic solvent system at pH 6.0 and 40°C

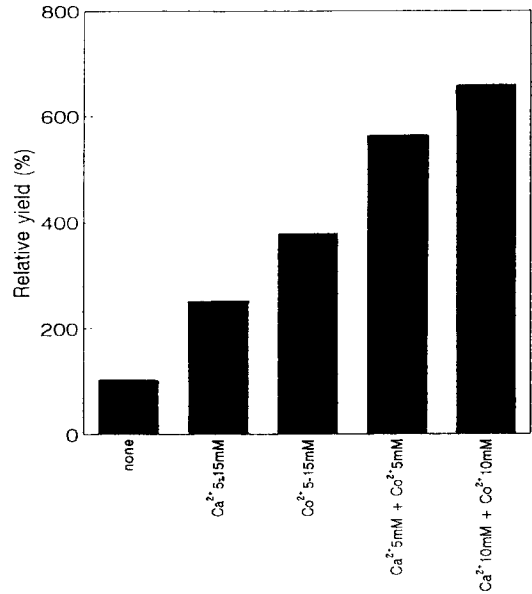


Fig. 5. Effect of calcium and cobalt ion concentrations on BzAPM synthesis by immobilized thermolysin in the water-miscible organic solvent system at pH 6.0 and 40°C

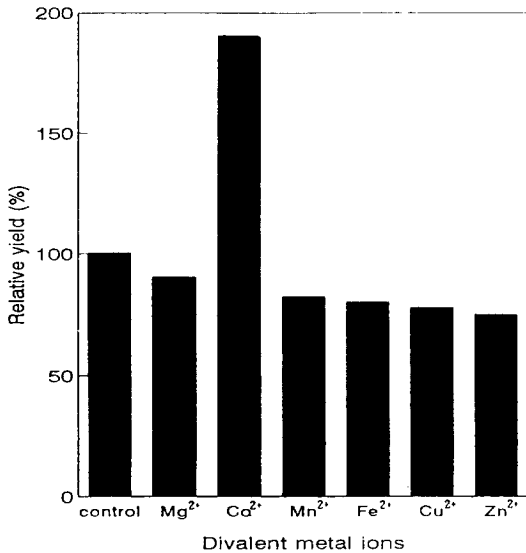


Fig. 4. Effect of divalent metal ions on BzAPM synthesis by immobilized thermolysin in the water-miscible organic solvent system at pH 6.0 and 40°C

Nakanishi의 결과<sup>(19)</sup>와 일치하였다. Holmquist와 Vallee<sup>(18)</sup>는 thermolysin에 의한 FAGLA의 가수분해 실험에서 Zn을 제거한 apothermolysin에 Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> 및 Mn<sup>2+</sup> 이온을 정량 첨가하면 활성이 각각 100, 200 및 10%로 복원되며 Fe<sup>2+</sup> 이온의 경우에는 과량 첨가할 때 60%가

복원된다고 하였다. 그리고, holothermolysin에 Co<sup>2+</sup> 이온을 첨가하여도 Co<sup>2+</sup> 대체 효소와 비슷한 활성을 나타낸다고 하였다.

Fig. 4는 고정화한 thermolysin에 의하여 BzAPM을 합성할 때, thermolysin의 구성 원소인 Zn<sup>2+</sup> 이온과 일반적으로 효소의 cofactor로서 작용하는 Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> 및 Cu<sup>2+</sup> 이온이 이 효소의 합성역가에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 이들 2가 금속 이온 중 Co<sup>2+</sup> 이온 첨가시에만 첨가하지 않은 것에 비하여 BzAPM의 합성 수율이 약 2배로 높았으나, 기타의 이온은 오히려 합성 수율을 저하시키는 것으로 나타났다. Durrant 등<sup>(20)</sup>도 Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> 및 Fe<sup>2+</sup> 이온을 첨가한 다음 ZAPM의 합성역가를 조사한 결과, Co<sup>2+</sup> 이온은 합성역가를 2~3배 증가시키나 기타 이온은 합성역가를 저하시킨다고 하여 본 실험 결과와 비슷함을 알 수 있었다. 그러나, Zn<sup>2+</sup> 이온의 경우 본 실험 결과와 Durrant 등의 결과와 같이 holothermolysin보다 역가가 저하되는 것으로 나타나 영향이 거의 없다고 한 Holmquist와 Vallee<sup>(18)</sup>의 결과와는 약간의 차이를 보였다.

한편 Ca<sup>2+</sup> 및 Co<sup>2+</sup> 이온을 각각 또는 동시에 첨가하였을 때의 합성 수율에 미치는 영향은 Fig. 5와 같이 Co<sup>2+</sup> 이온의 BzAPM 합성 수율 향상은 Ca<sup>2+</sup> 이온이 공존할 때 더욱 증가되는 것으로 나타났다. 즉, Co<sup>2+</sup> 이온만을 5~15 mM까지 첨가하였을 때 무첨가구에 비하여 상대 합성 수율은 3.8배, Ca<sup>2+</sup> 이온만을 첨가한 경우

**Table 1. Effect of ferric acid and lead ions on BzAPM synthesis by immobilized thermolysin the water-miscible organic solvent system at pH 6.0 and 40°C**

Heavy metal	Concentration (ppm)	Relative yield (%)
None	0	100
Fe <sup>3+</sup>	50	92
	100	64
	279 (5 mM)	55
	50	100
Pb <sup>2+</sup>	100	96
	1,035 (5 mM)	86

수율이 약 1.8배 증가되었으나, Co<sup>2+</sup> 및 Ca<sup>2+</sup> 이온을 각각 5 mM씩 혼합 첨가시킨 때에는 수율이 약 5.6배 향상되었다. 또한 Co<sup>2+</sup> 10 mM 및 Ca<sup>2+</sup> 10 mM을 혼합 첨가한 때에는 더욱 향상되어 약 6.5배 증가되었다.

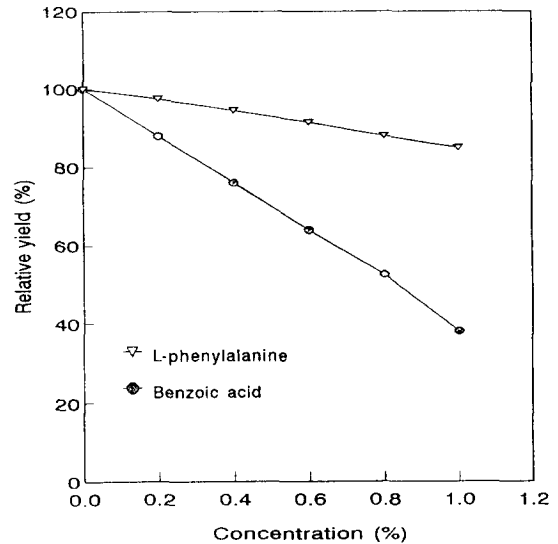
BzAPM의 합성시 원료나 용매중에서 미량이나마 혼입될 가능성이 있는 대표적인 중금속, Fe<sup>3+</sup> 및 Pb<sup>2+</sup> 이온이 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

Fe<sup>3+</sup> 이온의 50 ppm에서는 BzAPM의 합성이 그다지 저해되지 않았으나, 100 ppm과 5 mM에서는 합성 수율이 크게 저하되어 대조구에 비하여 각각 64 및 55%로 나타났으며 Pb<sup>2+</sup> 이온이 50~100 ppm 일때는 영향이 거의 없었으나 5 mM에서는 대조구에 비하여 86%로 나타나 Fe<sup>3+</sup> 이온이 Pb<sup>2+</sup> 보다 thermolysin에 의한 BzAPM의 합성을 더욱 저해하는 것을 알 수 있었다.

Pb<sup>2+</sup> 이온을 포함한 중금속 이온은 가역적 효소 저해제로서 효소의 유리 SH기와 작용하여 효소 단백질의 3차 구조를 변경시킴으로써 저해 작용을 하는 비경쟁적 저해제로서 알려져 있다<sup>(26)</sup>. 그러나 thermolysin의 경우 유리 SH 그룹이 없는 효소<sup>(27)</sup>임에도 불구하고, Fe<sup>3+</sup> 및 Pb<sup>2+</sup> 이온에 의해 효소활성이 저해되는 것은 thermolysin의 Zn과 상호작용을 하기 때문으로 추정되는데 이는 apothermolysin에 Fe<sup>3+</sup> 및 Pb<sup>2+</sup> 이온을 첨가하여도 활성이 부활되지 않는다는 보고<sup>(18)</sup>와 부합되는 것으로 볼 수 있다.

#### Benzoic acid, L-phenylalanine, NaCl의 영향

Benzoic acid는 반응기질의 하나인 Bz-Asp의 제조시에 반응조건이 부적절할 때 원료인 benzoyl chloride의 가수분해로 소량이 생성되는 것으로 Bz-Asp에 결정과정에서 완전히 제거되지 않고 Bz-Asp에 혼입하게 된다. 원료인 Bz-Asp에 혼입된 benzoic acid가 고정화 thermolysin에 의한 BzAPM의 합성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. Benzoic acid를 0.2% 첨가하였을 때는 무첨가구에 비하여 BzAPM의 상대 합성 수율이 12%가 감소하였고, 0.4%, 0.6%, 0.8% 첨가시에는 각각 약 25%, 38%, 50%가 감소하여 benzoic acid의 첨가는 BzAPM의 합성 수율을 거의 직선형으로 감소시켰다. 이러한 결과는 benzoic acid가 기질인 Bz-Asp에 대하여



**Fig. 6. Effects of concentration of benzoic acid and L-phenylalanine on BzAPM synthesis by immobilized the thermolysin in the water-miscible organic solvent system at pH 6.0 and 40°C**

경쟁적 저해제로서 작용하는 것으로 보이나, 저해작용에 대하여는 보다 상세한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다. Feder 등<sup>(13)</sup>도 thermolysin에 의한 FAGLA의 가수분해시에 Gly-Gly, Ala-Gly이나 Gly-NH<sub>2</sub> 등은 저해작용이 거의 없으나, Z-Gly은 저해작용을 나타내는데, 이는 Z기에 의한 작용일 것이라고 추정된 바 있어, benzoic acid의 저해작용도 그 구조와 관련이 있는 것으로 보인다.

Thermolysin에 의한 FAGLA의 가수 분해시에 leucine이나 Phe이 포함된 dipeptide가 저해작용을 하며 유리 leucine, Phe 및 D-phenylalanine도 경쟁적 저해제로서 작용한다고 Feder 등<sup>(13)</sup>이 보고한 바 있다.

Phe이 고정화 thermolysin에 의한 BzAPM의 합성에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 6), Phe 0.25% 첨가시는 무첨가구에 비하여 상대 합성 수율이 약 5% 감소하였으며, 1.0% 첨가시에는 18% 정도 저하되는 직선관계를 보였으며 그 영향은 benzoic acid 보다 적었다. 반응기질용액 중의 Phe은 PheOMe 제조시에 미반응 Phe이 혼입된 것 또는 PheOMe가 비효소적으로 가수분해되어 생성되는 것으로서, Phe에 의한 합성 저해작용을 줄이기 위하여는 PheOMe의 제품 순도 향상과 PheOMe의 가수분해를 최소화할 수 있는 용매 선정 그리고 Phe을 효과적으로 분리할 수 있는 방법이 개발되어야 할 것으로 사료된다.

Fig. 7은 고정화 thermolysin에 의하여 BzAPM을 합성할 때 NaCl이 미치는 영향을 조사한 결과이다. 반응기질 용액 중의 NaCl의 농도를 4~10% 범위로 첨가하였을 때 4%에서는 대조구에 비하여 상대 합성 수율이

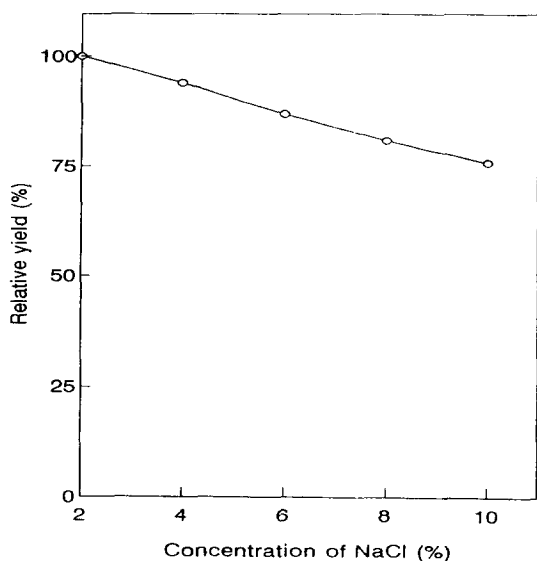


Fig. 7. Effect of NaCl concentrations on BzAPM synthesis by immobilized thermolysin in the water-miscible organic solvent system at pH 6.0 and 40°C

약 7% 감소하였으며, 6, 8, 10%일 때는 각각 15, 20 및 26%가 감소되는 것으로 나타나. NaCl의 첨가 농도를 높일 수록 상대 합성 수율은 거의 직선형으로 감소하는 것으로 보였다. 반응 기질 용액 중의 NaCl은 PheOMe 염산염 상태의 원료를 사용하여 기질용액을 만들기 때문에 NaOH로 중화할 때와 생성된 BzAPM 용액에 HCl을 첨가하여 BzAPM 결정을 회수한 다음 모액의 재사용을 위하여 NaOH로 중화할때 생성된다. NaCl의 농도를 증가시킴에 따라 고정화 thermolysin에 의한 BzAPM의 합성이 저해를 받는 것은 이온강도(ionic strength)의 증가에 기인하는 것으로 생각된다.

## 요 약

Aspartame의 전구체인 BzAPM을 고정화 thermolysin으로 합성할 때 최적 조건을 찾고자 기질의 농도, 반응 pH 및 온도 그리고 금속이온, benzoic acid, Phe, NaCl의 농도가 어떤 영향을 주는지 조사하였다. 반응기질인 PheOMe와 BzAsp를 25% DMSO 및 20% PEG 200이 함유된 유기 용매계에서 반응시켰다. Bz-Asp의 농도를 100 mM로 일정하게 하였을 때 BzAPM의 합성 속도는 PheOMe의 농도가 증가함에 따라 직선형으로 증가하였으며, PheOMe의 농도를 300 mM로 하고 Bz-Asp의 농도를 변경시킨 경우에는 200 mM에서 반응 속도가 최고에 달하였다. BzAPM의 생산을 위한 최적 pH는 6.1 전후로 나타났으며, 최적 반응 온도는 40°C이었다. 2가 금속 이온을 5 mM로 첨가했을 때,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  이온은 고정화 thermolysin의 BzAPM 합성 수율을

저하시켰으나,  $Co^{2+}$  이온은 합성 수율을 2배 정도 증가시키는 것으로 확인되었다.  $Co^{2+}$  이온을  $Ca^{2+}$  이온과 함께 첨가하면  $Co^{2+}$  이온만 첨가할 때보다 합성 수율이 높게 나타났다. Benzoic acid와 Phe이 BzAPM의 합성을 저해하는 것으로 나타났으며, NaCl도 10% 농도로 첨가 시에 합성을 약 25% 저하시켰다.

## 감사의 글

이 논문은 "N-Benzoylaspartame의 효소적 합성을 위한 용매계의 선정"의 일부로 1991년 문교부 지원 한국 학술재단의 자유응모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구된 것으로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. 還藤滋俊: 高温細菌のプロテアーゼに関する研究. 醸工, 40, 346 (1962)
2. Isowa, Y., Ohmori, M., Ichikawa, T., Mori, K., Nonaka, Y., Kihara, K., Oyama, K., Satoh, H. and Nishimura, S.: The thermolysin-catalyzed condensation reactions of N-substituted aspartic and glutamic acids with phenylalanine alkyl ester. *Tetrahedron Lett.*, 20, 2611 (1979)
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 systems. Thermolysin-catalyzed synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenyl-alanine methyl ester. *Eur. J. Biochem.*, 161, 541 (1986)
5. Ooshima, H., Mori, H. and Harano, Y.: Synthesis of aspartame precursor by solid thermolysin in organic solvent. *Biotechnol. Lett.*, 7(11), 789 (1985)
6. Oyama, K., Nishimura, S., Nonaka, Y., Kihara, K. and Hashimoto, T.: Synthesis of an aspartame precursor by immobilized thermolysin in an organic solvent. *J. Org. Chem.*, 46, 5241 (1981)
7. Oyama, K.: Enzymatic synthesis of aspartame in organic solvents. *Biocatal. Org. Media*, 209 (1987)
8. 小山清孝: アスパルテム製造技術開発 動向, *Bio Industry*, 2(9), 633 (1985)
9. Matthews, B.W., Colman, P.M., Jansonius, J.N., Titani, K., Walsh, K.A. and Neurath, H.: Structure of thermolysin. *Nature New Biol.*, 238, 41 (1972)
10. Matthews, B.W., Weaver, L.H. and Kester, W.R.: The conformation of thermolysin. *J. Biol. Chem.*, 249, 8030 (1974)
11. Bigbee, W.L. and Dalquist, F.W.: Magnetic resonance studies of the active-site region of thermolysin. *Biochem.*, 13, 3542 (1974)
12. Ohta, Y.: Thermostable protease from thermophilic bacteria II. Studies on the stability of the protease.

- J. Biol. Chem.*, **242**, 509 (1967)
13. Feder, J. and Schuck, J.M.: Studies on the *Bacillus subtilis* neutral protease and *Bacillus thermoproteolyticus* thermolysin-catalyzed hydrolysis of dipeptide substrates. *Biochem.*, **9**, 2784 (1970)
  14. Ambler, R.P. and Meadway, R.J.: The use of thermolysin in amino acid sequence determination. *Biochem.*, **108**, 893 (1968)
  15. Morihara, K. and Tsuzuki, H.: Proteolytic substrate specificity and some elastolytic properties of a thermostable bacterial proteinase. *Biochem. Biophys. Acta.*, **118**, 215 (1966)
  16. 中島 宏, 鈴木 絃一, 今堀 和友: サ-モライ신의 활성에及ぼす有機溶媒의 影響. *農化.*, **49**, 317 (1975)
  17. Feder, J., Brougham, L.R. and Wildi, B.S.: Inhibition of thermolysin by dipeptides. *Biochem.*, **13**, 1186 (1974)
  18. Holmquist, B. and Vallee, B.L.: Metal substitutions and inhibition of thermolysin: Spectra of the cobalt enzyme. *J. Biol. Chem.*, **249**, 4601 (1974)
  19. Nakanishi, K., Kamikubo, T. and Matsuno, R.: Continuous synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester with immobilized thermolysin in an organic solvent. *Bio/Technol.*, **3**, 459 (1985)
  20. Durrant, I., Beynon, R.J. and Rodgers, P.B.: Effect of glycerol on thermolysin-catalyzed peptide bond synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **250**, 280 (1986)
  21. 한민수, 김우정: N-Benzoylaspartame의 효소적 합성을 위한 용매계의 선정. *한국식품과학회지*, **24**, 504 (1992)
  22. Morihara, K. and Oka, T.:  $\alpha$ -Chymotrypsin as catalyst for peptide synthesis. *Biochem.*, **163**, 531 (1977)
  23. 療納 淑郎, 大嶋 寛: 固體酵素を用いる有機溶媒中でのペプチド合成. *バイオサイエンスとインダストリー*, **46**, 3702 (1988)
  24. 千畑 一郎 (編): "酵素反應の存在性", 固定化酵素, p.91, (株)講談社, 東京 (1975)
  25. Dalquist, F.W., Long, J.W. and Bigbee, W.L.: Role of calcium in the thermal stability of thermolysin. *Biochem.*, **15**, 1103 (1976)
  26. Suttie, J.W.: Enzyme inhibition, In *Introduction to Biochemistry*, 2nd ed., p.166, Holt Rinehart and Winston, NY (1977)
  27. Titani, K., Hermodson, M.A., Ericsson, L.H., Walsh, K.A. and Neurath, H.: Amino-acid sequence of thermolysin. *Nature New Biol.*, **238**, 35 (1972)
- 
- (1995년 4월 14일 접수)