

아스파탐 전구체의 합성을 위한 Thermolysin의 고정화

한민수 · 김우정*

미원 식품건강 연구소, *세종대학교 식품공학과

Immobilization of Thermolysin for Synthesis of Aspartame Precursor

Min-Su Han and Woo-Jung Kim

Miwon Food R&D Center

*Department of Food Science and Technology, Sejong University

Abstract

Optimum conditions for immobilization of thermolysin, a metalloendopeptidase catalyzing synthesis of aspartame precursors, were investigated with using Amberlite XAD-7 as carrier and glutaraldehyde as cross-linking agent. Adsorption of thermolysin onto the carrier was rapid at the initial stage and 96% of the enzyme was adsorbed after 24 hours at 5°C. There was a linear relationship between amount of thermolysin adsorbed and thermolysin loaded upto 300g per liter of carrier. The effective range of cross-linking time, concentration of glutaraldehyde and pH for immobilization of the enzyme were 3~7 hours, 6~12.5% and pH 6.0~7.0, respectively. Degree of cross-linking and residual enzyme activity were high when cross-linked for 7 hours with 6% glutaraldehyde or for 3 hours with 12.5% glutaraldehyde. The residual enzyme activity was over 30% under these conditions.

Key words: aspartame precursor, thermolysin, immobilization

서 론

Thermolysin은 Endo⁽¹⁾에 의하여 *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko의 배양액 중에서 최초로 분리 정제된 내열성의 metalloendopeptidase이다. 이 효소에 의하여 N-benzyloxycarbonyl-L-aspartic acid와 L-phenylalanine-methyl ester(PheOMe)로부터 펩타이드계 인공 감미료인 아스파탐의 전구체 N-benzyloxycarbonyl-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester(Z-APM)가 합성된다는 것이 밝혀진 이후 고정화 thermolysin에 의한 ZAPM의 연속 합성 등에 관한 연구가 이루어져 왔다^(2,3).

Thermolysin의 고정화 방법으로는 다른 효소의 경우와 같이 일반적으로 사용되고 있는 여러가지 고정화 방법, 즉 물리적 흡착법⁽⁴⁾, 이온 교환수지를 이용한 이온 결합법⁽⁴⁾, 공유결합법^(2,3), 광가교성 수지를 사용한 포괄법⁽⁵⁾, 폴리우레탄 수지 포괄법⁽⁶⁾ 등이 알려져 있다. 이들 중 단순 물리적 흡착법이나 이온 결합법은 효소의 흡착량이 적거나 기질 용액 중의 기질이나 유기용매 및 염류에 의하여 효소가 이탈되기 쉽다는 보고가 있다⁽⁴⁾. 그리고, 겔 여과 크로마토그래피에 사용되는 Toyopearl gel을 고정화 담체로 사용한 공유결합법은 유기용매에

대한 팽윤성, 기계적 강도, 열안정성 및 고정화량 등의 면에서 우수하다는 보고도 있으나⁽²⁾ 가격이 비싸 공업적으로 사용하기 어려운 단점이 있다. 한편, polyacrylic gel계의 비이온성 다공성 수지인 Amberlite XAD-7은 유기물에 대한 흡착 성능이 우수하여 이 수지에 papain⁽⁷⁾, chymotrypsin⁽⁸⁾, trypsin⁽⁹⁾ 등의 단백 분해 효소를 고정화하여 효소 반응을 조사한 보고가 있으며, thermolysin을 흡착시키고 glutaraldehyde로 가교화하면 효소를 다량으로 고정화 할 수 있고 조작도 간편하며 효소 활성도 좋다고 하였다. 그러나, 이 효소의 흡착 및 가교화 조건 등에 대한 상세한 보고는 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 아스파탐 전구체의 하나인 N-benzoyl-L-aspartyl-L-phenyl-alanine methyl ester(Bz-APM)의 연속적 생산을 위한 연구의 일환으로 효율적인 thermolysin의 고정화 방법을 모색하기 위한 것으로서 고정화 담체로는 Amberlite XAD-7을, 가교제로는 glutaraldehyde를 사용하여 thermolysin의 담체로의 흡착량을 조사하고, glutaraldehyde의 농도와 가교화 pH 및 시간 등이 고정화 thermolysin의 역가에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

이 실험에 사용한 thermolysin(9.742 U/mg solid, Lot

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

S 160)은 Daiwa Kasei회사의 제품을 사용하였으며, 고정화 담체인 Amberlite XAD-7은 Rohm & Hass 회사의 제품을, glutaraldehyde(25% 수용액)는 Fluka 회사의 시약을 사용하였다. 그리고, L-phenylalanine methyl ester 염산염(PheOMe·HCl)과 N-benzoyl-L-aspartic acid(Bz-Asp)는 전보의 방법⁽¹⁰⁾대로 제조한 것을, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등의 시약은 일급 시약을, 분석용 시약은 HPLC용 시약을 사용하였다.

Thermolysin의 흡착

Amberlite XAD-7분말(20~40 mesh)에 약 10배량의 methanol을 가하여 실온에서 1시간 동안 서서히 교반하였다. 교반을 중지하여 수지를 가라앉힌 다음 methanol을 따라내고 증류수로 충분히 수세하여 수지에 함유되어 있는 불순물을 제거하였다. 이 조작을 2회 더 반복한 다음 CaCl_2 5 mM이 함유된 25 mM MOPS(3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) 완충액(pH 7.0)으로 세척하여 5°C의 냉장고에 보관하였다.

이 MOPS 완충액 200 ml에 CaCl_2 및 NaBr을 각각 5 mM 및 3 M의 농도로 용해하여 5°C로 냉각한 다음, thermolysin 1g을 넣고 서서히 교반하여 완전히 용해시켰다. 이 용액에 냉장고에 저장된 Amberlite XAD-7 수지 10 ml를 가하여 같은 온도에서 서서히 교반하면서 시간 별로 상징액을 채취하여 상징액 중에 남아 있는 효소의 초기 합성역가를 측정하여 수지에 흡착된 효소의 양을 구하였다. 그리고, Amberlite XAD-7에의 thermolysin 흡착량은 thermolysin을 각각 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 및 5.0g을 상기의 완충액 200 ml에 용해시킨 다음 세척된 Amberlite XAD-7 10 ml씩을 넣어 5°C에서 48시간동안 서서히 교반한 다음 상징액중의 잔여 효소량을 측정하여 구하였다.

Thermolysin의 가교화

위와 같은 방법으로 Amberlite XAD-7에 thermolysin을 흡착시킨 다음 CaCl_2 5 mM이 함유된 MOPS 완충액에 25% glutaraldehyde 용액을 소정의 농도가 되도록 가하고 pH를 조정하여 5°C에서 서서히 교반하였다. 여과하여 glutaraldehyde가 함유된 용액을 버리고 수지를 MOPS 완충액으로 충분히 세척한 다음 효소의 초기합성역가를 측정하였다.

반응용매에 의한 thermolysin의 누출

Amberlite XAD-7에 thermolysin을 흡착 가교화시킨 고정화 효소에 20배량의 반응용매[polyethylene glycol (PEG) 200 20%, DMSO 25%, CaCl_2 및 CoCl_2 각각 5 mM, pH 6.0 수용액]s를 가하여 40°C에서 2시간 교반하였다. 2시간마다 새로운 반응용매로 더 바꾸어 준 다음 MOPS 완충액으로 세척하여 고정화 thermolysin의 합성역가를 측정하였다.

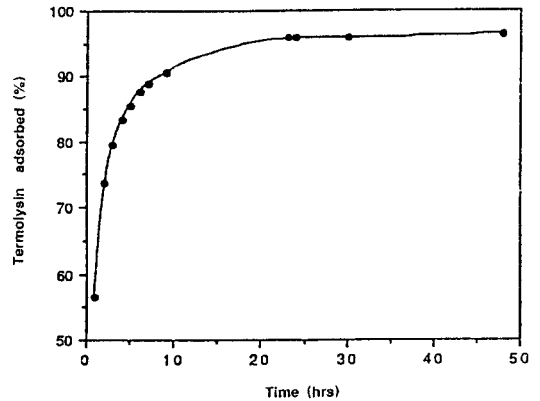


Fig. 1. Time course of adsorption of thermolysin onto Amberlite XAD-7 at 5°C

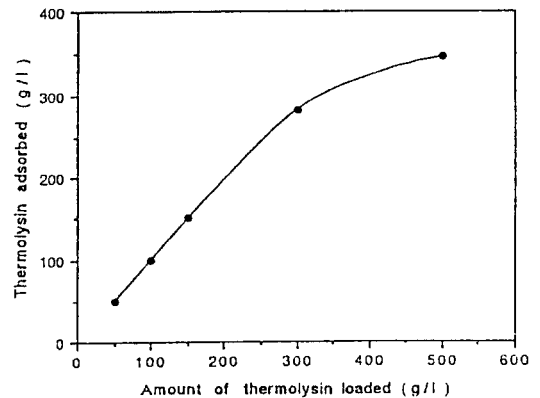


Fig. 2. Relation between thermolysin loaded and adsorbed onto amberlite XAD-7 at 5°C for 48 hours

Thermolysin의 초기 합성역가의 측정

기질용액(Bz-Asp 200 mM, PheOMe 300 mM, PEG 200 20%, DMSO 25%, CaCl_2 5 mM, CoCl_2 5 mM, pH 6.0) 100 ml에 유리 효소용액(상징액)의 경우 1 ml, 고정화 효소의 경우에는 0.2g을 넣어 40°C의 진탕 항온수조에서 2시간 동안 반응시킨 다음 생성된 BzAPM을 전보와 같이 HPLC로 분석⁽¹⁰⁾하였다.

결과 및 고찰

Amberlite XAD-7의 thermolysin 흡착속도와 흡착량

Thermolysin이 고정화 담체로 사용할 Amberlite XAD-7에 흡착되는 정도를 반응시간별로 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. Thermolysin 1g은 Amberlite XAD-7 10 ml에 거의 90%가 9시간 이내에 흡착되었으며, 24시간에는 약 96%가 흡착되었으나 48시간 이후에도 3~4%

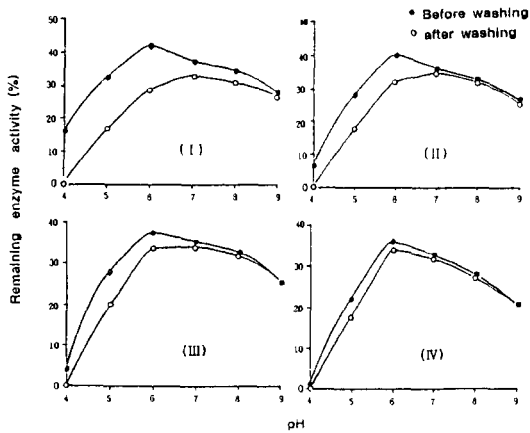


Fig. 3. Effect of cross-linking pH and time on the activity of immobilized thermolysin. Cross-linking was carried out with 12.5% glutaraldehyde at 5°C for 1 hr(I), 3 hrs(II), 5 hrs(III) and 7 hrs(IV), respectively

Cross-linked enzyme was washed with solvent system of 25% DMSO and 20% PEG 200

정도는 흡착되지 않고 상징액 중에 잔류되어 있어 흡착 평형에 도달한 것을 알 수 있었다.

그리고, thermolysin의 첨가량이 Amberlite XAD-7에 흡착되는 양을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 최대흡착량은 Amberlite XAD-7 1/당 thermolysin 340g 이상이였다. 300 g/l까지는 투입한 thermolysin의 양과 흡착된 양 사이에는 직선관계가 있었고 흡착률은 94% 이상이였으나, 그 이상에서는 흡착률이 감소하는 경향을 나타내었고 이 현상은 XAD-7에 thermolysine의 흡착이 포화되었음을 의미하였다. Amberlite XAD-7은 평균 공경 (pore diameter)이 90Å인 비이온성 acrylic ester계의 다공성 수지로서 식품이나 아미노산 용액의 탈색과 발효액으로부터 효소의 회수 정제에 사용되며⁽¹¹⁾, thermolysin을 포함한 여러 종류의 효소 고정화에 사용되어 왔다^(4,2,7-9).

pH의 영향

Amberlite XAD-7에 흡착시킨 thermolysin의 가교화에 미치는 pH의 영향을 조사하고자 12.5% glutaraldehyde 용액을 사용하여 pH 4.0~9.0 범위에서 가교화시키고 반응용매로 세척하였을 때 세척 전후의 고정화 thermolysin의 잔존여가를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 전반적으로 pH 6.0에서 가교화시켰을 때 고정화 thermolysin의 잔존여가가 최고치를 나타내었으며, pH 5.0 이하에서는 잔존여가가 급격히 감소하여 pH 4.0의 경우 7시간 처리한 경우에는 거의 여가가 없는 것으로 나타났다. 그리고, pH 7.0 이상에서는 잔존여가가 pH의 증가에 따라 약간씩 저하되는 것으로 나타났다. 이는 thermolysin이 pH 5~10의 범위에서 안정하다는 특성에 의한 것으로 생각된

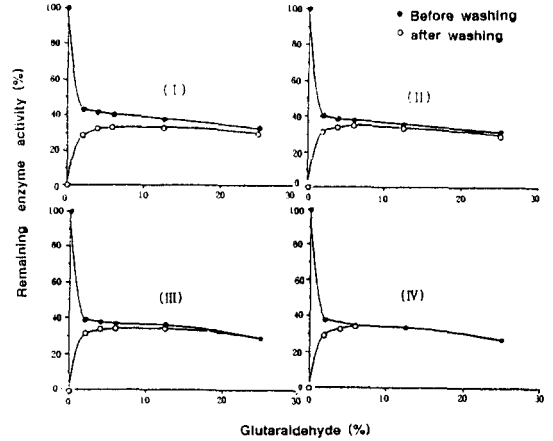


Fig. 4. Effect of glutaraldehyde concentration on the activity of immobilized thermolysin. Cross-linking was carried out at pH 7.0 and 5°C for 1 hr(I), 3hrs(II), 5 hrs(III) and 7 hrs(IV), respectively

Cross-linked enzyme washed with solvent system of 25% DMSO and 20% PEG 200

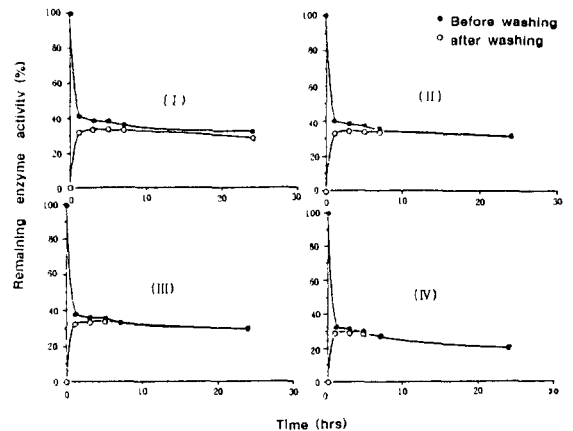


Fig. 5. Effect of cross-linking time on the activity of immobilized thermolysin. Cross-linking was carried out at pH 7.0 and 5°C with 4%(I), 6%(II), 12.5(III) and 25%(IV) glutaraldehyde, respectively

Cross-linked enzyme was washed with solvent system of 25% DMSO and 20% PEG 200

다.

한편, 반응용매로 세척했을 때의 고정화 thermolysin의 잔존여가는 전반적으로 pH 6~8의 범위에서 높게 나타났으며, pH 4.0과 5.0에서 가교화한 것은 잔존여가가 세척전의 것보다 현저히 낮아 가교화 정도가 약함을 의미하며 따라서 pH 4~5의 약산성에서는 반응용매에 의해 누출이 잘 됨을 보여 주었다. 그리고, pH 6.0에서 가교화시킨 경우 3시간까지는 thermolysin의 누출이 많았으나, 5시간 이상에서는 누출량이 감소하여 용매에 의한

세척 전후의 차이는 거의 없었다. pH가 높을수록 세척 전후의 잔존여가의 차이가 거의 없는 것으로 나타났는데, 이는 thermolysin의 유리 아미노기가 glutaraldehyde와 반응하여 Schiff염기를 형성하므로서 가교화되기 때문으로 생각된다.

따라서, glutaraldehyde에 의한 thermolysin의 가교화는 pH 6.0~8.0의 범위가 좋은 것으로 보이나, 가교화 시간과 관련이 있으므로 pH 7.0에서 3시간 또는 pH 6.0에서는 5~7시간 가교화시키는 것이 고정화 thermolysin의 잔존여가를 높이고 용매에 의한 누출을 최소화할 수 있을 것으로 보였다.

glutaraldehyde 농도의 영향

Amberlite XAD-7에 thermolysin을 단순 흡착시키는 것만으로도 고정화는 가능하나, 기질 용액 중에 유기용매를 비롯하여 기질 및 무기염류가 포함되어 있어서 물이 다량 함유되어 있는 용매계에서는 효소의 누출 가능성이 높아 glutaraldehyde 등을 사용하여 가교화시켜야 효소의 누출이 방지되어 고정화 효소의 장기간 사용이 가능하다. thermolysin을 가교화시킬 때 glutaraldehyde의 최적 농도를 구하기 위하여 glutaraldehyde의 농도별로 가교화시킨 다음 반응 용매의 세척 전후 측정된 thermolysin의 잔존 여가는 Fig. 4와 같다. glutaraldehyde 2% 용액으로 1시간 처리하여도 고정화 thermolysin의 잔존 여가는 40%를 약간 상회하는 것으로 나타나, thermolysin의 여가는 낮은 농도의 glutaraldehyde에 의해서도 단시간 내에 크게 저하되는 것을 알 수 있었다. 그러나, glutaraldehyde의 농도를 그 이상 증가시킬 때 thermolysin의 잔존 여가는 약간씩 감소하였지만, glutaraldehyde 농도의 증가에 비하여 잔존 여가감소의 정도가 매우 작은 편이었다.

반응용매로 세척할 때의 thermolysin 누출은 glutaraldehyde 2%에서 가장 심한 것으로 나타났으며, 농도가 증가하고 가교화 시간이 길어질수록 누출이 급격히 감소되어 12.5% glutaraldehyde로 7시간 가교화시킨 경우는 누출이 거의 없는 것으로 나타났다.

그리고 glutaraldehyde의 농도를 4%, 6%, 12.5%, 25%로하여 Amberlite XAD-7에 흡착시킨 thermolysin을 가교화시킬 경우(Fig. 5) 가교화는 glutaraldehyde의 농도는 6~12.5%와 3~7시간 범위 내에서 가교화하는 것이 적당한 것으로 밝혀졌으며, 6% 일 때는 7시간, 12.5%일 때는 3~5시간이 용매에 의한 누출을 최소화하는데 가장 적당한 조건으로 판명되었다.

요 약

아스파탐 전구체의 보다 효율적인 효소적 합성 방법을 개발하기 위하여 thermolysin의 고정화 방법을 확립하고자 고정화 담체로서 다공성 수지인 Amberlite XAD-7

을, 가교화제로서 glutaraldehyde를 사용하여 최적 고정화 조건을 조사하고자 하였다.

Thermolysin이 Amberlite XAD-7에 흡착되는 속도는 초기에 빠른 것으로 나타났으며, 5°C에서 24시간후는 96%가 흡착되었다. Thermolysin에 대한 Amberlite XAD-7의 최대흡착량은 수지 1당 340g 이상이었으며, 투입한 thermolysin 양이 300g일 때까지는 흡착된 양의 증가하는 관계는 직선관계를 보여주었다. thermolysin의 가교화를 위한 효과적인 pH와 glutaraldehyde의 농도, 가교화 시간은 각각 pH 6.0~7.0, 6~12.5% 및 3~7시간이었다. 특히 glutaraldehyde 6%에서는 7시간, 12.5%에서 3시간의 가교화 효소의 잔존여가와 가교화 정도를 현저히 높였다. 이 때의 잔존여가는 30% 이상인 것으로 나타났다.

문 헌

1. Endo, S.: Studies on protease produced by thermophilic bacteria. *J. Ferment. Technol.*, **40**, 346 (1962)
2. Oyama, K.: Enzymatic synthesis of aspartame in organic solvents. *Biocatal. Org. Media*, 209 (1987)
3. 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)
4. 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)
5. 平田 彰, 梅澤昌平, 市村國宏 本田尚士: 固定化酵素によるZ-APM의連續合成, *フラインケミカル*, p.14 (1987)
6. Yang, C. and Su, C.: Synthesis of aspartame precursor: α -L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester in ethyl acetate using thermolysin entrapped in polyurethane. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 595 (1988)
7. Catacuzene, D., Guerreiro, C. and Attal, S.: Influence of hydrophobic amino acid residues on the esterification of dipeptides by papain. *Biotechnol. Lett.*, **11**, 493 (1989)
8. Kimura, Y., Nakanish, K. and Matsuno, R.: Enzymatic synthesis of the precursor of Leu-enkephalin in water-immiscible organic solvent systems. *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 271 (1990)
9. Omar, I.C., Nishio, N. and Nagai, S.: The role of water on the equilibrium of esterification by immobilized lipase packed bed column reactor. *Biotechnol. Lett.*, **10**, 799 (1988)
10. 한민수, 김우정: N-benzoylaspartame의 효소적 합성을 위한 용매계의 선정. *한국식품과학회지*, **24**, 504 (1992)
11. Sidler, W., Kumpf, B., Peterhans, B. and Zuber, H.: A neutral protease produced by *Bacillus cereus* with high sequence homology to thermolysin: Production, isolation and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 18 (1986)