

## 5' - Ribonucleotide의 分離 精製에 關한 研究

양용 · 최성관\* · 정갑택\*

연세 대학교 식품공학과 · \*미원(주) 개발관리실

## Study on the Purification of 5'-Ribonucleotide

Young Ryung, Sung Kwan Choi\* and Kab Teack Chung\*

Department of Food Engineering, Yensei University, Seoul

\*Miwon Co., R & D Center, Seoul

### Abstract

The purification of 5'-ribonucleotide using ion exchange resins has been studied and the optimum conditions were determined. The amount used of Amberlite IR120 ion exchange resin in 2nd resin tower could be reduced up to 20% by pretreating the hydrolyzed RNA solution in 1st resin tower. The amount used of regenerant could be also reduced up to 20% by desalting the hydrolyzed RNA solution in the 1st tower, because the desalted solution eluted easily by the water in the 2nd tower. The crystal obtained in this experiment was the mixed-crystals of 5'-IMP.Na<sub>2</sub> and 5'-GMP.Na<sub>2</sub>. The crystallization of the complexes formed from 5'-IMP.Na<sub>2</sub> and 5'-GMP.Na<sub>2</sub> gave the best result at pH 7.6. The yield of crystal complexes formed from 5'-IMP.Na<sub>2</sub> and 5'-GMP.Na<sub>2</sub> was obtained higher in high MeOH concentration. However, in higher than 60% MeOH concentration the products was amorphous. The higher content of MeOH for the crystallization of the product gave the smaller value of 5'-IMP.Na<sub>2</sub>/5'-GMP.Na<sub>2</sub>.

### 서 론

최근에 이르러 유전자공학에 대한 관심이 고조되면서 핵산관련물질에 대한 연구는 더욱 중요하게 되어 생물체의 핵산,蛋白質代謝의 해명과 함께 遺傳學的 寄與는 물론 癌의 究明에 대해서도 큰 공헌을 해오고 있다.<sup>(1)</sup>

이중 핵酸成分의 代謝系에 있어서 中門體로 있는 5'-ribonucleotide類는 調味料,<sup>(2)</sup> 醫藥品<sup>(3,4)</sup>으로 용도가 개발되어 있으며 특히 5'-Inosinic acid와 5'-Guanylic acid는 조미료로 대량 사용되고 있다.

일반적으로 RNA를 효소분해하여 얻은 5'-nucleotide 함유액은 다량의 불순물을 함유하고 있어 이들을 분리 정제하는 것은 매우 어렵고 그중에서도 purine nucleotide류와 pyrimidine nucleotide류의 상호분리는 더욱 어렵다.<sup>(5)</sup>

지금까지 이들 nucleotide류를 정제하는 방법으로는 주로 강산성양이온교환수지, 강염기성음이온교환수지,

활성탄처리법, 탈색수지처리법등이 있지만, 이들의 단일처리로서 분리 정제하는 것은 곤란하였다. 즉 少量의 시료를 多量의 수지등에 처리하는 것은 分析的 手段으로는 성립되지만, 多量의 混合液을 비교적 少量의 樹脂等으로써 처리해야만 하는 工業적 方法으로는 만족한 결과를 얻을 수 없었다. 그리하여 본 연구는 工業적으로 핵酸調味料의 生産性을 높이기 위한 연구의 일환으로써 ribonuclease 酵素를 이용하여 RNA를 가수분해시키고, 얻어진 가수분해액으로부터 5'-nucleotide의 분리 정제 방법을 개선하여 5'-IMP·Na<sub>2</sub>와 5'-GMP·Na<sub>2</sub>의 混晶을 만들기 위한 晶析方法의 최적 조건을 선정하는데 그 목적을 두고 있다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

본 실험에서 사용한 RNA는 日本興人에서 제조한 粗

RNA를 사용하였다. RNA分解酵素는 AMANO 製藥会社에서 제조한 phosphodiesterase와 deaminase를 사용하였다. 5' - IMP, 5' - GMP, 5' - CMP, 5' - UMP는 日本興人会社로부터 구입하여 표준 물질로 사용하였다.

**RNA의 분석**

가. RNA의 함량 분석

Schmidt-Thannhausser-Schneider法<sup>(9)</sup>(STS法)에 따라 측정하였다.

나. 수분분석

105℃에서 4hr 加熱하여 乾燥減量法에 따라 계산하였다.<sup>(10)</sup>

다. pH

10% RNA水溶液을 만들어 pH meter로써 측정하였다.

**RNA의 분해**

5' - ribonucleotide를 얻기 위하여 4% RNA 농도로 하여 *Penicillium citrium* 효소<sup>(11)</sup> 100mg을 사용하여 2시간동안 분해한 후 다시 온도를 50℃로 내린 후 deaminase 효소로 4시간동안 분해시켰다.

**5' - ribonucleotide의 結晶化**

강산성양이온교환수지 chromatograph로부터 얻어진 5' - ribonucleotide 중에서 insinic acid와 guanylic acid를 分割하여 40% NaOH로써 pH 7.0, 7.5, 8.0으로 調整하여 나트륨형으로 만든 후 減壓濃縮하여 메칠알콜 농도 30%, 40%, 50%, 60%에서 結晶을 60℃, 50℃, 40℃, 30℃의 조건하에서 실험하여 disodium 5' - ribonucleotide의 結晶인 5' - IMP·Na,와 5' - GMP·Na,의 混晶을 만들었다.

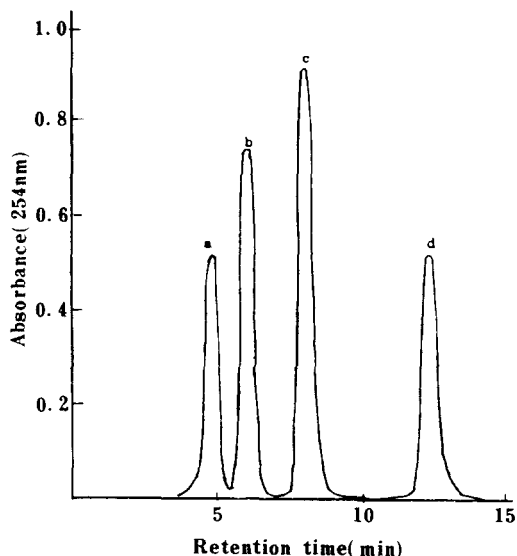
**결과 및 고찰**

**RNA의 성분 분석**

酵母에서 抽出하여 얻은 調味料用 RNA는 보통 純度 70-90%로 알려져 있으나,<sup>(12)</sup> 본 연구에서 사용한 원료는 Table 1에서와 같이 RNA함량은 82.39%(dry base)였으며 수분함량은 6.05%를 나타냈고 10%수용액

**Table 1. Composition of RNA**

Component	Content (%)
RNA	82.39% (dry base)
Water	6.05%
pH	6.8 (10% solution)



**Fig. 1. High pressure liquid chromatogram of hydrolyzed RNA**

a: 5' - CMP      b: 5' - UMP  
c: 5' - GMP      d: 5' - AMP

의 pH는 6.8%를 나타냈다.

본 연구에서는 핵산물질을 고속액체 크로마토그래피로 분석할 때에  $\mu$  Bondapak C 18 Column을 사용하여 Fig. 1과 같이 각각의 nucleotide를 명확히 분리시킬 수 있는 chromatogram을 얻었을뿐만 아니라 15분의 조작으로 분석할 수 있었다.

원료 RNA중의 염기조성 비율은 Table 2에서와 같이 조미료로써 값어치가 큰 AMP와 GMP의 重量比가 CMP와 UMP보다 많았다.

이상의 결과는 5' - nucleotide를 생산하는데 있어서 원료로써 적합한 RNA임을 나타내는 결과라고 풀이되었다.

**RNA의 分解**

國中<sup>(13)</sup>는 *Penicillium citrium* 배양액으로부터 얻어진 효소 추출액을 사용하여 온도 65℃에서 pH 5.0으로 조절하여 1% RNA水溶液을 분쇄하였으나 본 실험에서는 동일 조건하에서 4% RNA水溶液으로부터 30분간격으로 2시간동안 RNA를 分解한 결과, Fig. 2와 같

**Table 2. Base composition of RNA**

Nucleotide	Molar ratio (mol)	Weight ratio (%)
AMP	1.00	26.3
GMP	1.10	30.3
GMP	0.75	18.4
UMP	1.02	25.0

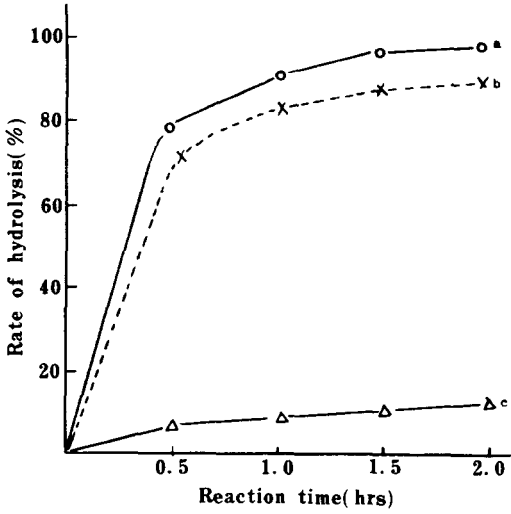


Fig. 2. Hydrolysis pattern of RNA vs. reaction time in pH 5.0 at 65C  
 a: RNA hydrolysis (%)  
 b: inorganic formation (%)  
 c: nucleotide formation (%)

이 분해하여 30분 후에는 80%, 1시간 후에는 90%, 1.5시간 후에 98%의 분해율을 나타내었다. 따라서 가수분해 시간은 1.5시간으로 결정하였다.

5'-ribonucleotide의 분리 정제

본 연구에서는 RNA를 효소 분해하여 얻은 5'-ribonucleotide 함유액을 공업적으로 분리 정제하기 위한最適條件을 선정하기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

1) 混床樹脂塔 (Mixed Bed Tower)에 의한 5'-ribonucleotide 함유액의 脱鹽

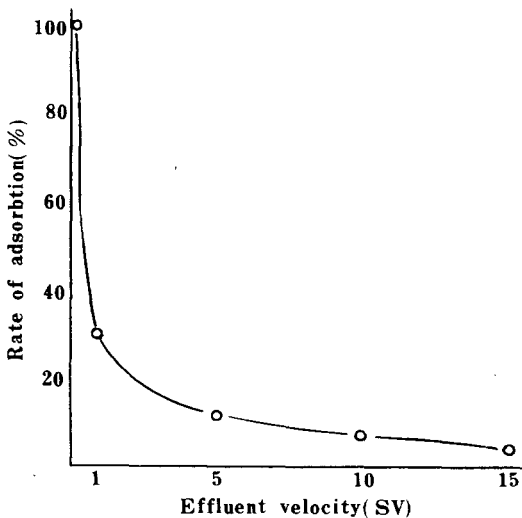


Fig. 3. Effect of adsorption of 5'-nucleotide on mixed bed tower vs. effluent velocity

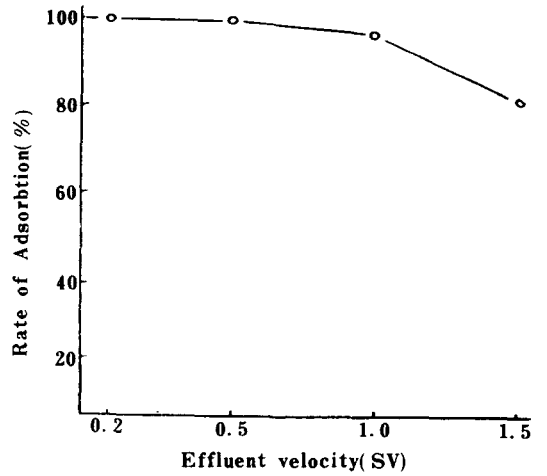


Fig. 4. Effect of adsorption of 5'-IMP and 5'-GMP on cation exchange resin tower vs. effluent velocity

5'-ribonucleotide 함유액 11ℓ 를 강산성양이온 교환수지인 Amberlite IR-45수지 600ml의 混床塔에 通液하였을 때의 5'-ribonucleotide의 흡착율은 Fig. 3과 같이 SV(Space Velocity) 1일때 28%, SV 5일때 8%, SV10일때 2%, SV 15일때 2%를 나타내어 SV15로 通液하는 것이 바람직함을 알았다. 이때 각각의 5'-ribonucleotide는 分離할 수 없었으나 다른 이온성 물질은 검출되지 않았다.

2) 강산성양이온교환수지탑에 의한 5'-ribonucleotide 함유액의 분리 정제

5'-ribonucleotide 함유액 11ℓ 를 Amberlite IR-120

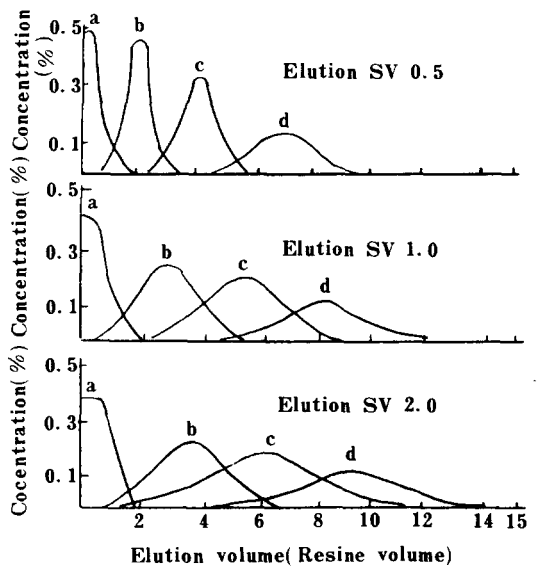


Fig. 5. Column chromatogram of 5'-ribonucleotide on cation exchange resin at SV 0.5, 1.0 and 2.0

수지 15 l에 SV 0.2, 0.5, 1.0, 1.5로 通液한 결과 5'-inosinic acid와 5'-guanylic acid의 흡착율은 Fig. 4와 같이 SV 0.2와 SV 0.5일때 100% 흡착하였으나 SV 1.0일때 95%, SV 1.5일때 86%를 흡착하여 通液速度는 SV 0.5가 선정되었다.

흡착된 5' ribonucleotide를 脱塩水로써 SV 0.5, 1.0, 2.0으로 溶離하여 Fig. 5와 같은 chromatogram을 얻어 溶離速度는 SV 0.5가 바람직하다는 것을 알았다. 그러나 이때 다량의 이온교환수지가 필요하기 때문에 좋은 방법이 아님을 알았다.

3) 5' - ribonucleotide 의 분리 정제 조건의 선정

單一樹脂法에서 강산성양이온교환수지탑(Amberlite IR 120수지 15l) 하나를 사용하여 처리할 수 있는 5' - ribonucleotide의 량을 復合樹脂法으로 混床塔(Amberlite IR 120수지 600ml+IR 45수지 600ml)에 처리한 후 다시 강산성양이온교환수지탑(3l사용)에 처리하여 Fig. 6과 같은 크로마토그램을 얻어 이온교환수지 사용량을 절감할 수 있고, 溶離液의 농도를 높일수 있는 효과가 있어 Fig. 7과 같은 5' - ribonucleotide의 분리 정제 공정을 완성하였다.

여기에서 제 1수지탑은 강산성양이온교환수지와 약염기성음이온교환수지의 混床塔(MB탑이라함)으로 미리 5' - ribonucleotide를 脱塩, 精製하는 공정이고, 제2수지탑은 강산성양이온교환수지로서 5' - IMP와 5' - GMP만을 분리하여 回收 精製하는 공정이다.

4) 제 2수지탑의 無再生, 再使用檢討

제 1수지탑에서 미리 脱塩된 5' - ribonucleotide 함유액을 제 2수지탑인 강산성이온교환수지 Diaion SK

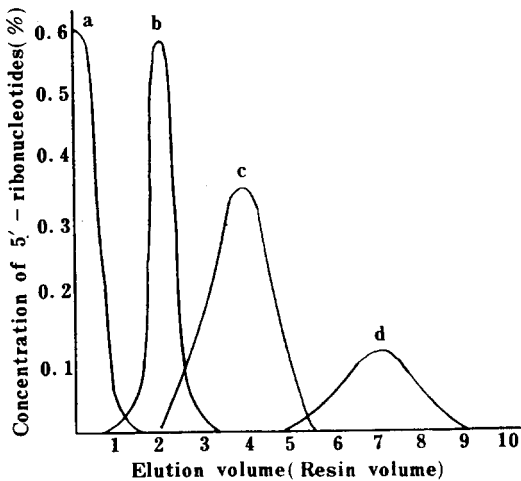


Fig. 6. Column chromatogram of 5' - ribonucleotide on cation exchange resin after flowing through mixed bed tower  
a:5' - UMP b:5' - IMP c:5' - GMP d:5' - CMP

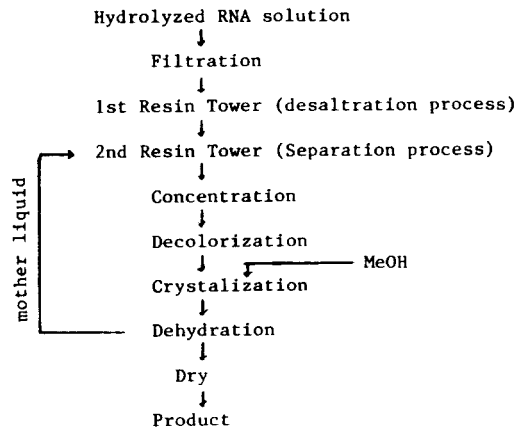


Fig. 7. Process for purification of 5' - ribonucleotide

1B 수지를 재생레벨 NaOH 100mg/gR로써 1회 재생하여 사용한 후 반복하여 재생하지 않고 사용한 결과, Fig. 8에서와 같이 5회 반복 사용으로 5' - IMP와 5' - GMP의 흡착량은 감소하지 않았으나 6회 사용할 때에 비로소 흡착량이 10% 줄어들었다.

5' - IMP · Na<sub>2</sub> 과 5' - GMP · Na<sub>2</sub> 混晶

晶析은 용액중에서 원하는 물질을 結晶狀態로 析出시키는 것으로 晶析과정에 의해 제품의 純度를 높일 수 있으므로 소비자가 원하는 제품상태를 조절할 수 있기 때문에 공업적으로는 대단히 중요하다.

일반적으로 5' - IMP · Na<sub>2</sub>는 수용액중에서 비교적 용이하게 결정이 형성되나 5' - GMP · Na<sub>2</sub>는 수용액중에서 晶析이 溶易하지 않은 것으로 발표되고 있다.<sup>14,15</sup> 따라서 본 연구에서는 晶析 조건을 선정하기 위하여 다

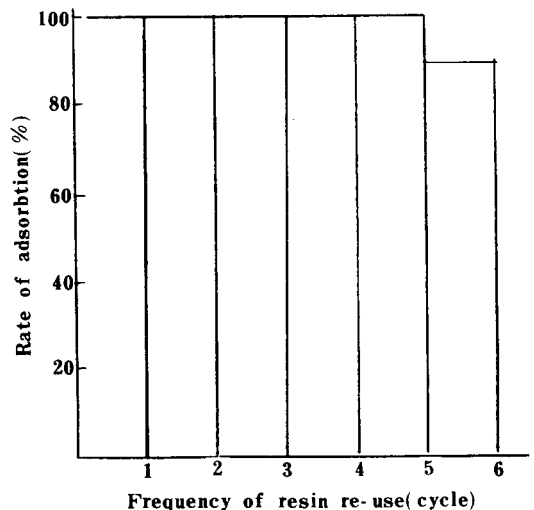


Fig. 8. Effect of adsorption of recycled resine without regeneration

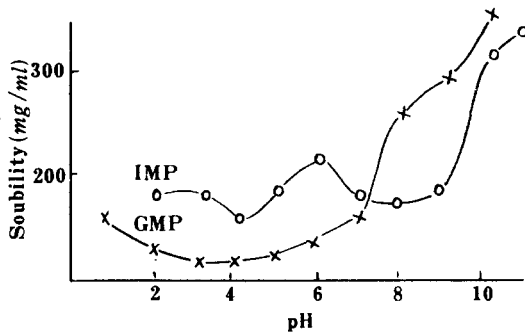


Fig. 9. Effect of pH on solubility of 5'-IMP and 5'-GMP crystals(Temperature; 20°C)

음과 같이 실험하였다.

1) Sodium 5'-ribonucleotide 결정의 pH에 따른 영향  
강산성 양이온교환수지에 의하여 分割하여 얻은 5'-inosinic acid와 5'-guanylic acid를 NaOH로써 중화하여 나트륨형으로 만들었을때의 pH에 따른 5'-inosinic acid와 5'-guanylic acid溶解의 변화는 Fig. 9와 같았으며 5'-inosinic acid와 5'-guanylic acid混晶은 pH 7.6에서 가장 많은 결정을 생성하였다.

2) Sodium 5'-ribonucleotide 결정의 MeOH함량에 따른 영향

함량 6.6%의 5'-IMP·Na<sub>2</sub>과 6.3%의 5'-GMP·Na<sub>2</sub>混合溶液 1l를 pH 7.6에서 MeOH농도를 변화시키기에 따른 결정의 析出量은 Table 3에서 알 수 있는 바와 같이 MeOH농도가 높을 수록 結晶 析出量은 많았으나 결정중에 5'-GMP·Na<sub>2</sub>의 함량이 많았으며 MeOH 60% 농도에서는 無晶型을 형성하였다. 제품의 색도를 보기위한 파장 420mM에서의 OD値는 MeOH의 농도가 낮을수록 결정중의 OD値는 적은 값을 나타내었다.

3) Sodium 5'-ribonucleotide 결정의 溫度변화에 따

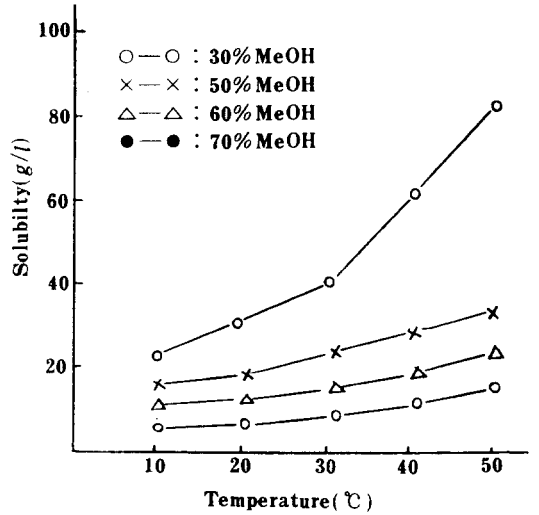


Fig. 10. Effect of temperature on solubility of 5'-ribonucleotide vs. methanol concentration

른 영향

Sodium 5'-ribonucleotide 결정의 MeOH 용액중에서 온도 변화에 따른 溶解度를 조사한 결과 Fig. 10과 같았다. 실제로 Sodium 5'-ribonucleotide 晶析 溫度는 높은 온도일수록 결정의 生成量은 적지만 결정모양은 아주 양호한 현상을 나타냈다.

Sodium 5'-ribonucleotide 결정의 분석

결정製品の 分析結果 51.5%의 5'-IMP·Na<sub>2</sub>와 48.5%의 5'-GMP·Na<sub>2</sub>로 나타났으며, 카일칼사법에 의한 수분은 25%를 나타냈으며 이 제품 10%水溶液의 pH는 8.2를 나타냈다.

Fig. 11은 본 실험에서 얻어진 5'-IMP·Na<sub>2</sub>의 자외선흡수스펙트럼과 5'-GMP·Na<sub>2</sub>의 자외선흡수스펙트

Table 3. Effect of MeOH concentration on the crystal of sodium 5'-ribonucleotide

MeOH Conc.	crystal			Mother liquid content	liquid amount	OD		State of	
	weight	content	net weight			crystal	mother liquid	crystal	
30%	51.4	a) I 38.9	20.9	I 0.7		0.098	1.217		good
		b) G 29.8							
40%	59.6	I 37.4	22.3	I 0.4		0.169	1.248		good
		G 30.9							
50%	71.2	I 36.2	25.8	I 0.2		0.174	0.945		good
		G 31.1							
60%	87.4	I 35.6	31.1	I 0.1		0.180	0.886		amorphous
		G 32.2							

a) 5'-IMP·Na<sub>2</sub>

b) 5'-GMP·Na<sub>2</sub>

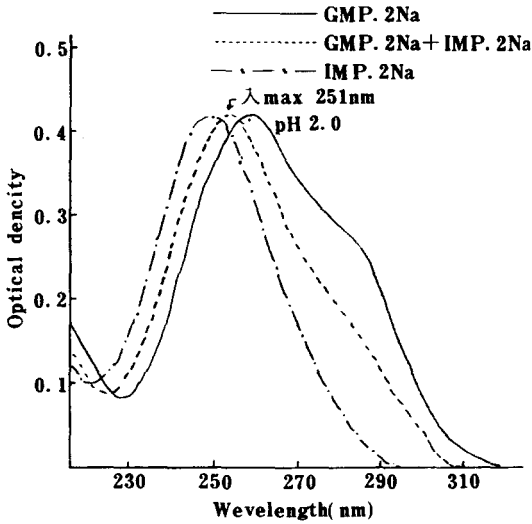


Fig. 11. UV spectrum of crystal complexes formed from 5' - IMP · Na<sub>2</sub> and 5' - GMP · Na<sub>2</sub>.

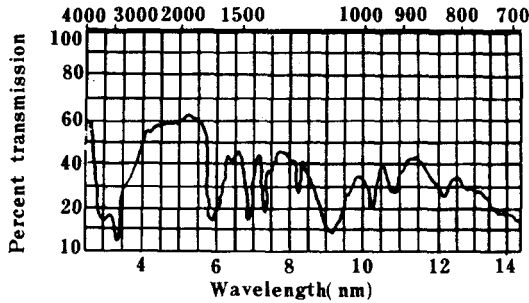


Fig. 12. IR Spectrum of crystal complexes formed from 5' - IMP · Na<sub>2</sub> and 5' - GMP · Na<sub>2</sub>.



Fig. 13. Photomicrograph of crystal complexes formed from 5' - IMP · Na<sub>2</sub> and 5' - GMP · Na<sub>2</sub>.

럼과는 각각 다른 스펙트럼을 나타냈다.

5' - IMP · Na<sub>2</sub>와 5' - GMP · Na<sub>2</sub> 混晶의 적외선흡수 스펙트럼은 Fig. 12와 같이 나타났으며 이것은 5' - IMP Na<sub>2</sub> 적외선흡수스펙트럼과 5' - GMP · Na<sub>2</sub> 적외선흡수 스펙트럼과는 서로 다른 스펙트럼을 나타냈다.

이상의 결과로부터 본 연구에서 얻어진 結晶은 자외선흡수스펙트럼과 적외선흡수스펙트럼으로 5' - IMP

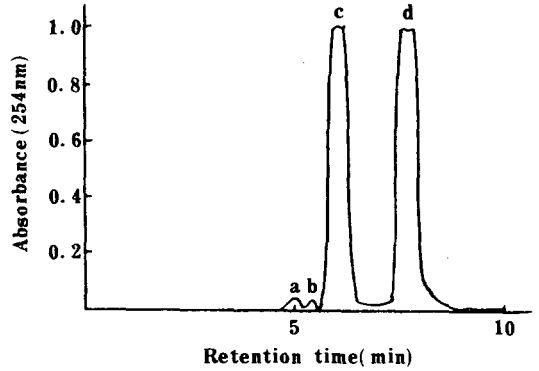


Fig. 14. High pressure liquid chromatogram of ribonucleotide before crystallization a:5' -CMP b:5' -UMP c:5' -GMP d:5' -IMP

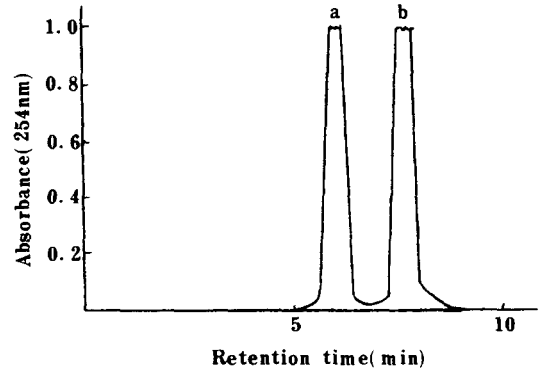


Fig. 15. High pressure liquid chromatogram of ribonucleotide after crystallization a:5' -GMP b:5' -IMP

·Na<sub>2</sub>와 5' - GMP · Na<sub>2</sub>의 단순히 混合한 상태가 아닌 混晶임을 알 수 있었으며 현미경 사진은 Fig. 13과 같다.

Fig. 14는 結晶前 5' - IMP · Na<sub>2</sub>와 5' - GMP · Na<sub>2</sub> 함유액을 50배 희석한 용액의 chromatogram을 나타내고 있는데 여기에서 5' - CMP와 5' - UMP가 각각 0.8%, 0.6% 함유되어 있었지만, 결정후에는 晶析과정에서 Fig. 15에서 나타난 바와 같이 5' - CMP와 5' - UMP가 완전히 제거되었음을 알 수 있었다.

### 요 약

RNA를 효소분해하여 얻은 5' - ribonucleotide를 공업적으로 분리 정제하기 위한 最適 條件을 검토한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다. 제 1수지탑에서 미리 前處理를 한 후 제 2수지탑에서 5' - nucleotide를 分離 정제함으로써 강산성양이온교환수지 사용량을 줄일 수 있었다. 제 2수지탑은 脱鹽된 5' - nucleotide를 通液하

고 물로 쉽게 용離되기 때문에 再生劑 사용량을 줄일 수 있었다.

본 실험에서 얻어진 결정은 5'-IMP·Na<sub>2</sub>과 5'-GMP·Na<sub>2</sub>의 混晶임을 알 수 있었다. 5'-IMP·Na<sub>2</sub>과 5'-GMP·Na<sub>2</sub>混晶을 얻기 위한 晶析 pH는 7.6이 가장 좋았다. 5'-IMP·Na<sub>2</sub>와 5'-GMP·Na<sub>2</sub>混晶의 수율은 메칠알콜 함량이 높을 수록 좋았으나 60% 이상에서는 無晶型을 형성하였다. 晶析 작업시 메칠알콜 함량이 높아짐에 따라서 결정중의 5'-IMP·Na<sub>2</sub>/5'-GMP·Na<sub>2</sub>의 비율은 적어졌다.

### 문 헌

1. 国中 明：日本農芸化学会誌, 34, 489 (1960)
2. 江田 亨：日本細菌雜誌, 19, 201 (1964)
3. 国中 明：Food Technol., 18, 29 (1964)
4. 木下 祝郎：醱酵協會誌, 22, 101 (1964)
5. 緒方 浩：醱酵と代謝, 8, 1 (1963)
6. 藤本 康夫：有機合成化協誌, 23, 412 (19 6)
7. 정갑택：특허공보, 제445호 (1979)
8. 황종인, 홍영기, 문화식：특허공보, 제33호 (1978)
9. Schneider, W. C. J. Biol. Chem., 55, 747 (1946)
10. 한국식품공업협회：食品等の規格 및 基準, 서울, 145 (1983)
11. Kuninaka, A., Yobino, H. and Kibi, M. : Agr. Biol. Chem., 25, 804 (1961)
12. 島健 太郎, 武田 邦男, 天花寺 英雄, 和多 田史郎：フライン チミカル, 12(8), 48 (1983)
13. 国中 明：日本農芸化学会誌, 28, 282 (1980)
14. 石橋 襄一, 伊藤 喜久夫：日本特許, 昭40-17594
15. 島津 進, 元木 五郎, 内田 一生, 吉野 宏：日本公開特許, 昭 48-22662

(1984년 7월 10일 접수)