

微生物에 의한 5'-GMP의 生産에 관한 연구

(第3報) 5'-GMP의 결정화에 관한 연구

이계하, 문화식, 이희인, 배종찬, *류주현

제일제당(주) 식품연구소

*연세대학교 식품공학과

Studies on the Production of Guanosine-5'-monophosphate by Microorganism.

(Part III) Studies on the Crystallization of 5'-GMP. 2Na.

Kye Ha Lee, Hwa Shik Moon, Hee In Yi, Chong Chan Bae and Ju Hyun Yu*

Cheil Sugar Co., Ltd, Food R. & D. Center

*Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul

Abstract

Crystallization conditions of disodium guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP. 2Na) were studied.

The solubility of 5'-GMP. 2Na was decreased by addition of methanol and the optimum condition was as follows.

The crystallization was carried out at 45°C with agitation rate of 160-200 rpm., which is Reynold's No. of 25,000-32,000.

When concentration of methanol was 7.5%~10.0%, the 5'-GMP. 2Na was easily crystallized by addition of crystal seed.

서 론

Guanosine 5'-monophosphate disodium salt monohydrate (5'-GMP. 2Na라 약칭)의 발효 및 정제에 관하여는 많은 보문이 있으나¹⁻⁶⁾ 결정화에 관한 연구는 일본 특허공보에 보고되어 있을 뿐이다. 이들 특허 중에는 5'-GMP를 바륨염의 형태로 결정화시킨 다음 나트륨염으로 치환하는 5'-GMP. 2Na의 결정화법⁷⁾과, HCOONa 용액에 5'-GMP. 2Na의 용액을 첨가하여 결정화시키는 방법⁸⁾이 있다. 그리고 농축액에 NaCl를 첨가함으로써 염석 효과에 의한 결정화법⁹⁾이 있다. 또한 Guanylic acid의 형태로 결정화시키는 방법¹⁰⁾ 및 유기용매에 5'-

GMP. 2Na 농축액을 첨가하면서 결정화시키는 방법¹¹⁾ 등이 보고되어 있다.

그러나 이들 방법은 비점이 낮은 유기용매를 다량 사용하며 NaCl을 사용시에는 제품에 NaCl이 잔존하여 제품의 순도가 저하된다. 그러므로 NaCl를 사용하지 않고 소량의 유기용매를 사용하는 결정화법에 관한 연구한 결과를 보고한다.

실험재료 및 방법

1) 정제된 5'-GMP. 2Na와 표준 5'-GMP. 2Na 결정

제일제당 주식회사의 공장에서 얻은 정제된 무정형 분말을 사용하였으며 5'-GMP. 2Na의 표준품

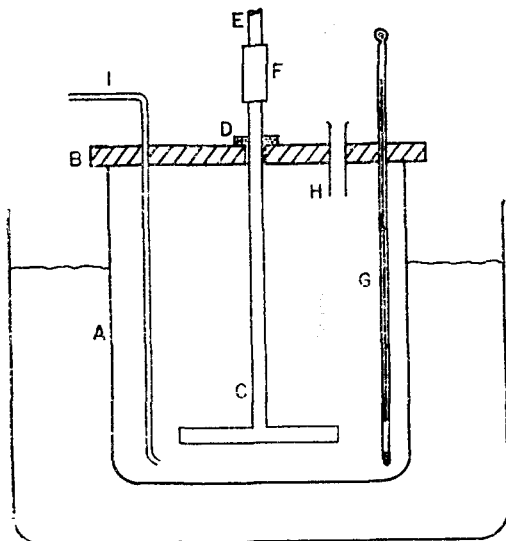


Fig. 1. Apparatus of crystallizer

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| A; Perspex vessel, | F; brass collar, |
| B; Perspex cover plate, | G; thermometer, |
| C; paddle agitator, | H; sampling tube, |
| D; PTFE Bush, | I; solvent addition tube, |
| E; flexible drive, | J; water bath. |

은 일본 아지노모도 회사의 주상형 결정을 사용하였다.

2) 색도의 측정법과 5'-GMP. 2Na의 정량법

색도의 측정은 Hitachi Spectrophotometer 200-20을 사용하며 420nm에서의 흡광도를 측정하였다. 5'-GMP. 2Na의 정량에는 Waters Model 440의 High pressure liquid chromatography를 사용하였으며 Column은 μ Bondapak C18 (4mm \times 30cm), 용매는 methanol, detector는 UV 254nm를 사용하며, 이때 표준 5'-GMP. 2Na와 같은 곳에 나타나는 peak의 높이를 환산하여 5'/GMP. 2Na를 정량하였다.

3) 5'-GMP. 2Na의 결정핵 또는 결정의 수의 측정 방법

결정화를 진행할 때 형성되는 결정핵 또는 결정의 수는 결정 중인 액을 채취하여 Hausser Hy-Lite Neubauer 1/400 Qmm \times 1/10mm deep cell을 사용하여 현미경으로 관찰하여 측정하였다.

4) Crystallizer

실험에 사용한 Crystallizer는 Fig. 1. 과 같은 장치를 사용하였다¹²⁾. Perspex vessel(A)은 0.5cm의 두께이며 폭 150mm, 높이 180mm로 하였으며,

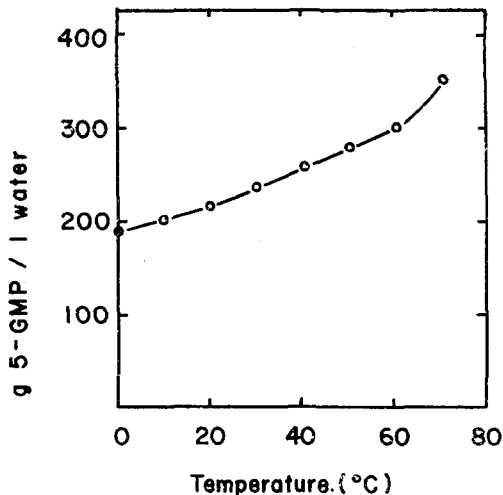


Fig. 2. Effect of temperature on solubility of 5'-GMP. 2Na

vessel 위에는 불순물의 혼입을 방지하기 위하여 perspex cover plate (B)를 설치하였다. 교반기 (C)는 직경 80mm의 paddle type으로 하였으며, cover와 교반기의 축 사이에는 PTFE bush (D)를 설치 하였다. 회전 속도는 25w의 geared motor에 연결된 flexible drive (E)와 brass collar (F)에 의해 교반기가 연결되도록 하여 조절하였다. 그리고 온도계 (G)를 vessel안에 설치하고 water bath (J)의 온도의 감도는 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 가 되도록 하였고 유기용매 첨가구(I)와 seed 첨가 또는 시료채취를 위한 유리 tube (H)를 설치 하였다.

결과 및 고찰

1. 5'-GMP. 2Na의 용해도

1) 온도의 영향

무정형 5'-GMP. 2Na 분말을 물에 용해하여 각 온도에 대한 용해도를 측정된 결과 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 5'-GMP. 2Na의 용해도는 70°C 에서는 350g/l이었으나 온도가 낮아질수록 감소되어 20°C 에서는 220g/l이었다.

일반적으로 결정화할 때는 과포화 상태를 만들어 주어야 한다. 그 방법에는 온도 차이에 의한 용해도의 변화를 이용하는 방법¹³⁾, 화학적인 평형 상태를 만드는 방법, 또 등전점 또는 금속염으로 반응시켜 용해도를 저하시키는 방법과 유기용매를 첨가하여 용해도를 감소시키는 방법 등이 있다.

5'-GMP. 2Na의 용해도는 Fig. 2. 에서 보는 바

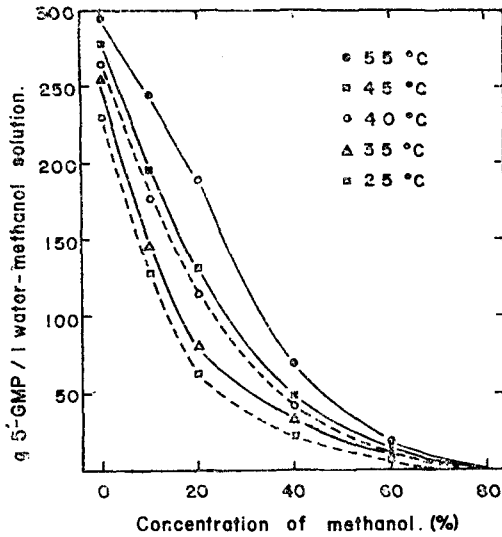


Fig. 3. Effect of methanol concentration on the solubility of 5'-GMP. 2Na

와 같이 온도에 따른 변화가 다르므로 온도의 차이를 利用하는 방법을 응용할 수 있으나, 공업적으로 서서히 냉각시킨다는 것이 용이치 않다.

그리고 고농도의 5'-GMP. 2Na 용액을 냉각할 때 점도가 급격히 증가되어 paste 상태로 되고 결정화가 어려웠다.

따라서 본 실험에서는 paste 상태로 되지 않는 농도인 250g/l의 5'-GMP. 2Na 용액에 유기용매를 첨가하므로써 점도를 증가시키지 않고 과포화에 도달시키는 방법을 사용하였다.

2. 용매의 영향

Dielectric constant가 크고 친수성인 methanol, acetone 등의 용매가 5'-GMP. 2Na의 결정화에 利用가능하다고 생각되나, acetone을 사용할 경우는 용해도와 점도가 너무 급격히 변화되어 결정화되기 전에 무정형이 형성되므로 사용할 수 없었다. 그러나 methanol을 사용하였을 때에는 용해도와 점도가 서서히 변화되므로 결정화에 좋은 용매라고 생각되어 다음 실험 부터는 methanol 첨가법을 사용하여 결정화에 대한 연구를 하였다.

3. 유기 용매의 영향

5'-GMP. 2Na 용액에 methanol을 가하여 각 온도에서 methanol 농도와 5'-GMP. 2Na의 용해도와 관계를 검토한 결과 Fig. 3과 같았다.

5'-GMP. 2Na의 용해도는 methanol의 농도가 같을 때는 온도가 낮을 수록 낮았으나, 온도가 같을 때는 methanol 함량이 많을 수록 적었다. 이 용해

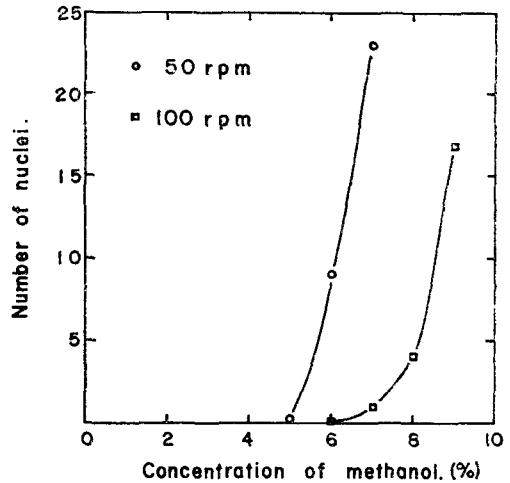


Fig. 4. Effect of agitation on the supersaturation and nucleation of 5'-GMP. 2Na

Sample; 500ml of concentrated 5'-GMP.

2Na solution (pH9.0), conc.; 250g/L. Temp.; 45°C.

Solvent; 99% methanol, addition rate; 8.3ml/min.

도 변화의 차는 온도보다 methanol 농도가 많은 영향을 미치고 있었다. 5'-GMP. 2Na의 용해도가 높은 고온에서는 비점이 낮은 methanol이 증발되기 쉽고, 낮은 온도에서의 수용액은 높은 온도보다 포화농도가 적으므로 결정화할 때 회수율이 적어진다고 생각되어 45°C에서 결정화 하기로 하였다.

2. 결정화

1) 결정핵 형성에 미치는 교반 속도의 영향

온도 45°C에서의 물에 대한 5'-GMP. 2Na의 용해도는 Fig. 1에서 보면 270g/l이었다. 이 농도까지 농축한 후 이액에 methanol을 첨가하게 되면 과포화 상태를 거치지 않고 바로 핵 형성 단계로 변화된 다음 무정형을 형성하였으므로 5'-GMP. 2Na 용액을 60°C에서 250g/l까지 농축하여 45°C의 water bath에서 2N-NaOH 용액을 첨가하여 pH를 9로 조절하였다. 이 용액 500ml를 결정관에 넣은 후 교반하면서 45°C에서 99% methanol을 8.3 ml/min의 유가속도로 첨가하면서 결정화 시험을 하였다. 교반 속도를 50 및 100rpm으로 할 때 결정핵의 형성속도를 검토한 결과는 Fig. 4와 같았다.

50rpm으로 교반시에는 methanol 농도가 5% 이

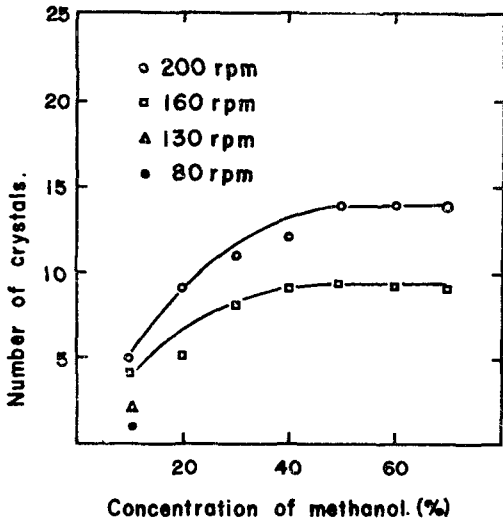


Fig. 5. Effect of agitation on the 5'-GMP. 2Na crystal growth.

Sample; 500ml of concentrated 5'-GMP. 2Na solution (pH9.0), conc. ; 250g/L
Temp; 45°C
Solvent; 99% methanol, addition rate; 8.3ml/min.

상이 될 때부터 결정핵이 형성되기 시작하여 핵의 수가 급격히 증가되었고 methanol을 계속 첨가하면서 교반한 결과 그 액은 무정형으로 완전히 변화하였다. 반면에 100rpm의 경우에는 methanol 농도 6% 이상이 된 때부터 핵의 형성이 시작되었고 50 rpm의 경우 보다 서서히 핵의 수가 증가하였다.

그 후 계속하여 methanol을 첨가하면서 교반한 결과 무정형중에 결정이 일부 형성되어 있었다.

그외에 핵의 형성 속도는 교반 속도와 과포화비에 따라 차이가 있으므로, 교반속도와 과포화비의 관계로 미루어 교반속도가 결정화에 영향을 미칠 수 있었다. 또한 100rpm의 경우에는 methanol을 계속 첨가하면서 교반한 결과 무정형 중에 결정이 일부 형성되었다.

2. 결정화에 미치는 교반 속도의 영향

위의 결과로부터 교반 속도가 핵 형성에 큰 영향을 미친다고 생각되었기 때문에 교반 속도를 80, 130, 160, 또는 200rpm으로 하여 검토하였다.

Fig. 5에서 알 수 있는 바와 같이 methanol을 70%가 될 때까지 계속 첨가하였다. 80 및 130rpm의 경우에는 처음에 결정핵이 형성되었으나 이 입자는 methanol 농도가 점점 증가하면서 무정형

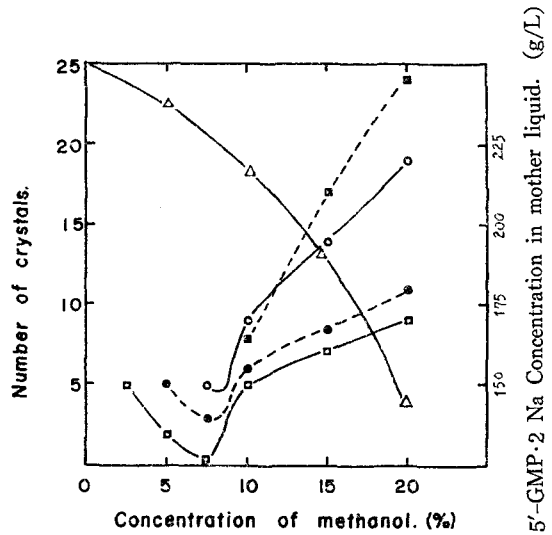


Fig. 6. Effect of seeding on the crystal growth of 5'-GMP. 2Na.

Sample; 500ml of concentrated 5'-GMP. 2Na. Solution (pH 9.0), concentration; 250g/l
Temperature; 45°C
Solvent; 99% methanol, addition rate; 8.3ml/min
Agitation rate; 200rpm
Seed weight; 5.0g

Concentration of methanol; 2.5% : □, 5.0% : ●, 7.5% : ○ 10.0% : ■
5'-GMP. 2Na concentration in mother liquid under condition of seed addition at 7.5% methanol concentration; △.

으로 변화되었다. 그리고 160 및 200rpm의 경우에는 결정이 형성되었고 methanol의 농도를 50%까지 첨가하여도 결정을 볼 수 있었다. 그리고 그 결정의 수는 약간 증가하였고 입자의 크기만이 커졌다. 따라서 160 및 200rpm에서 결정화가 효과적으로 진행됨을 알 수 있었다. 위의 결과를 식(1)에 의하여¹⁴⁾ Reynold수(Re)를 구하였다.

$$Re = \frac{\partial ND^2}{\mu} \dots \dots \dots (1)$$

(D를 교반기의 직경, N는 회전수, ∂ 는 용액의 밀도, μ 는 용액의 점도) 결정의 형성이 시작되는 Methanol 농도 10% 부근에서의 용액의 밀도는 15.6lb/Ft³이었고 점도는 10CP (0.00672 lb/ft. sec에 해당함)이였으므로 80rpm 경우의 Re는 12,600, 130 rpm 경우의 Re는 20,520, 160rpm 경우의 Re는

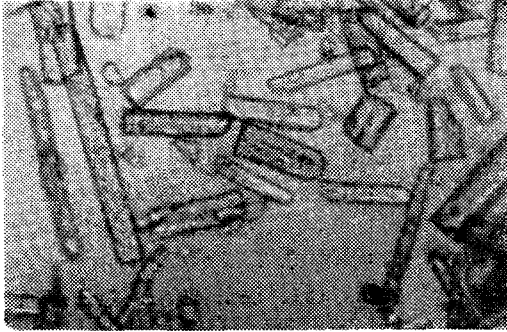


Fig. 7. Photomicrograph of 5'-GMP ($\times 100$)

25,000, 200rpm 경우의 Re는 32,000을 각각 얻었다.

따라서 Re No. 25,000로부터 Re No. 32,000 사이가 결정에 용이한 조건이라 생각되었다.

3. 결정화에 미치는 seed 첨가의 영향

교반하면서 유기 용매를 첨가하는 결정화법을 응용할 때 160rpm부터 200rpm까지의 범위에서는 결정이 형성되었으나 이는 형성된 핵이 적고 결정의 생성 속도가 느리므로 먼저 형성된 무정형에 의해 형성되는 결정이 영향을 받아 무정형으로 변화된 탓이라 생각된다.

이러한 원인을 배제하기 위하여 5'-GMP. 2Na의 용액에 methanol을 첨가하면서 결정의 seed를 첨가하여 실험한 결과 Fig. 6에서 나타난 것과 같이 methanol의 농도가 2.5%부터 7.5% 농도의 범위가 되었을 때는 첨가된 seed는 용해되어 결정의 수가 감소되었으나, methanol의 농도가 7.5%와 10%가 되었을 때 seed를 첨가할 때는 결정이 남아 있었고 seed를 첨가하지 않았을 경우보다 결정이 컸고 결정의 수도 증가함을 알았다.

4. 결정의 물리 화학적 성질

위에서 얻은 결정을 원심분리하여 건조한 다음 현미경으로 결정의 형태를 관찰한 결과 Fig. 7과 같이 6각 주상 결정이었다. 그리고 위에서 얻은 결정의 H. P. L. C Spectrum을 표준 5'-GMP. 2Na와 비교한 결과 Fig. 8과 같이 peak의 retention time이 서로 같은 곳에 나타났고 UV Spectrum에 있어서도 얻어진 결정과 표준품이 λ_{max} 260을 나타내었고 상호 일치 하였다. 또한 kBr법으로 측정된 IR Spectrum은 표준품과 잘 일치하였다. 그러므로 얻어진 결정은 5'-GMP. 2Na라 할 수 있다.

요 약

5'-GMP. 2Na를 결정화하기 위한 조건을 검토한

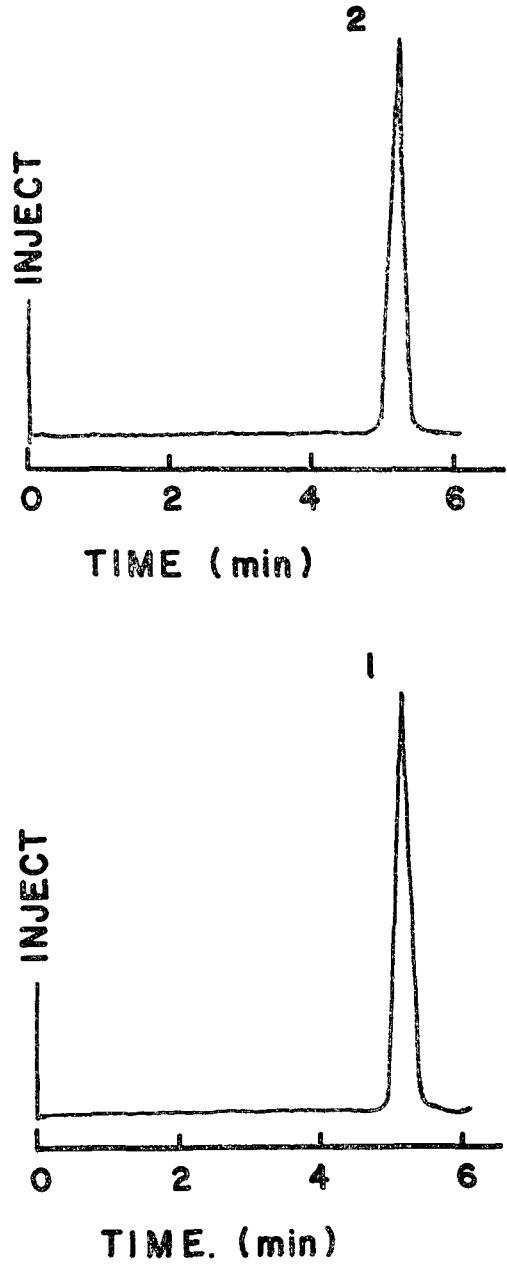


Fig. 8. High-pressure liquid chromatograms of 5'-GMP. 2Na; authentic (1), sample (2) Column; μ BONDAPAK C18, 4mmID \times 30cm. Detector; UV:254nm, 0.5 AUFS.

결과 첨가한 용매는 methanol을 사용하였고, 온도는 45°C, 교반 속도는 160-200rpm으로 하는 것이 좋았다.

이를 Reynold수로 환산한 결과 25,000~32,000 이었다. 그리고 결정 seed의 첨가가 결정화에 영향을 줄 수 있었으며 seed 첨가는 methanol 농도가 7.5%에서 10%의 사이가 좋았고 결정의 최대회수의 methanol 농도는 70%이었다.

참고 문헌

- 1) T. Nara, T. Komuro, M. Misawa and S. Kinoshita; *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 739(1969)
- 2) T. Okabayashi; *J. Bacteriol.*, **84**, 1 (1962)
- 3) M. Misawa, T. Nara and S. Kinoshita; *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 521 (1969)
- 4) A. Kimura, M. Morita and K. Murata; *Amino acid Nucleic acid.*, **33**, 13 (1976)
- 5) T. Nara, M. Misawa and S. Kinoshita; *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1153 (1968)
- 6) C. C. Bae, C. H. Son, U. Y. Kong and J. H. Yu; *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **7**, 127 (1979)
- 7) 妹尾三郎 : 日本 特許公報 昭 42-15739
- 8) 土岐忠雄 : 日本 特許公報 昭 42-2753
- 9) 土岐忠雄 : 日本 特許公報 昭 43-4428
- 10) 鈴木良尙 : 日本 特許公報 昭 45-1067
- 11) 鈴木良尙 : 日本 特許公報 昭 52-45778
- 12) J. W. Mullin, C. L. Leci; *AICHE Symposium series*, No. 121, 68, p. 8
- 13) Khamskii, Evgenii. V, *Crystallization from solutions*, New York, consultants bureau, (1969)
- 14) 유주현, 식품공학 실험 II, p. 674, 탐구당 (1978)