

핵산의 安定性에 關한 研究

李在興 金洪執 裴鍾燦

<第一製糖(株)食品研究所>

(第1報) 이노신산의 安定性에 관한 反應速度論的 研究

緒 論

이노신산 나트륨(5'-IMP·Na)은 구아닐산 나트륨(5-GMP·Na)과 더불어 구루타민산 나트륨(MSG)에 소량 첨가하여 복합 조미료로 사용되는 핵산(1)으로 5'-IMP 그 자체로서는 조미효과를 크게 나타내지 못하나 MSG에 소량 첨가하면 맛의 상승작용(2)을 일으켜서 맛의 인상강도(flavor activity)가 상당히 증가된다. 그러나 5'-IMP는 산성 가열하에서 약간 불안정하여 그 일부가 inosine 및 hypoxanthine등으로 분해되고, 특히 온도가 상승하고 pH가 낮아질수록 그 분해속도는 증가하여 조미료의 역할이 저하되는 것으로 보고되었으나 (3, 4, 5), 5'-IMP 분해 반응기작에 대한 상세한 연구는 거의 없었다.

본 연구는 이러한 5'-IMP 분해 반응속도에 있어서 pK값의 중요성을 조사하고, 실험적인 결과를 토대로 하여 그 분해 반응기작을 제시 내지는 합리적으로 규명하여 그 결과를 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

본 실험에 사용한 5'-IMP는 C社에서 생산한 것을 사용했으며, KBrpellet로 얻은 IR 스펙트럼은 표준시료의 스펙트럼(6)과 동일하였다. 또한 고압액체크로마토그래프(WATERS ASSOCIATES MODEL 244, HPLC)를 이용하여 순도를 측정된 결과 Fig.1과 같이 5'-IMP외의 다른 물질은 전혀 나타나지 않았다. 그리고 60% 상대습도가 유지된 dessicator에 시료를 장시간 보관한 후 Karl-Fischer 수분 측정법(7)으로 수분을 측정한 결과 25°C에서 8분자의 결정수를 함유하고 있었다(8).

2. 5'-IMP의 PK_{a2} 측정

5-IMP의 PK_{a2}는 HITACHI-HORIBA pH meter를 사용하여, NaCl로 이온강도를 0.4로 조정한 5'-IMP 0.01mole/l 용액을 60°C에서

0.1N HCl로 적정하여 얻은 적정곡선으로부터 구하였다. 두 차례 실험의 平均値는 5.9($Ka_2 =$

結果 및 考察

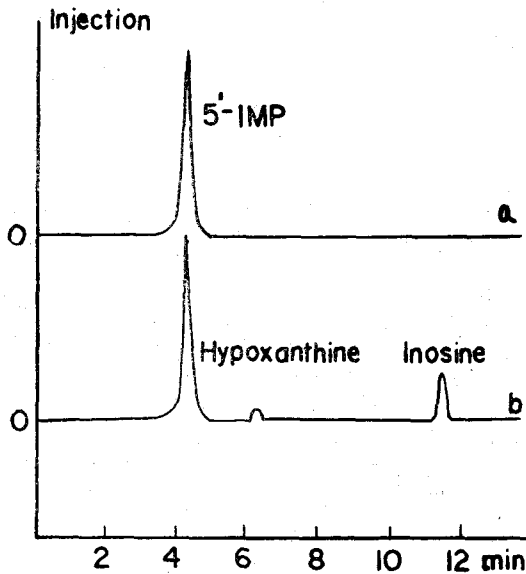


Fig.1. Schematic liquid chromatogram of 5'-IMP and its heat treated product mixture. (a: reactant sample, b: heat treated product mixture, carrier fluid: 0.01 mole/liter of $NH_4H_2PO_4$, flow rate: 2ml/min.)

1.259×10^{-6})로 Dawson(9) 등의 6.0과 약간의 차이가 있었다.

3. 5'-IMP의 熱處理 및 核酸分解物質의 定量

60°C에서, NaCl을 첨가하여 이온강도 0.4로 유지된 초산(pH5.52) 및 인산(pH5.87~6.87) 완충용액에 5'-IMP를 첨가하여 0.01mole/l 용액을 만들고, 이것을 살균된 ampule에 넣은 후 일정온도가 유지된 oil bath($\pm 1^\circ C$)로 일정시간 동안 열처리 한 후 시료를 채취하여 HPLC로 정량 분석하였다. HPLC column은 μ BONDAPAK C18 이었고, carrier fluid는 0.01mole/l의 $NH_4H_2PO_4$, 유속은 2ml/min이었다.

1. 反應次數의 決定

일반적 food system인 증성용액 근처에서 5'-IMP의 열분해 생성물은 용액의 이온강도에 관계없이 (5) Fig. 1과 같이 미량의 hypoxanthine을 제외하고 대부분 inosine이었다. 그러나 Fujita등 (3)에 의하면 pH4 내지 7 범위에서는 inosine만이 생성되는 것으로 보고되어 있다. Fig. 2는 100°C에서 相異なる pH에서 5'-IMP의 시간에 따른 잔존율을 나타낸 것이다.

이로부터 5'-IMP 분해속도는 1차 반응임을 알 수 있다.

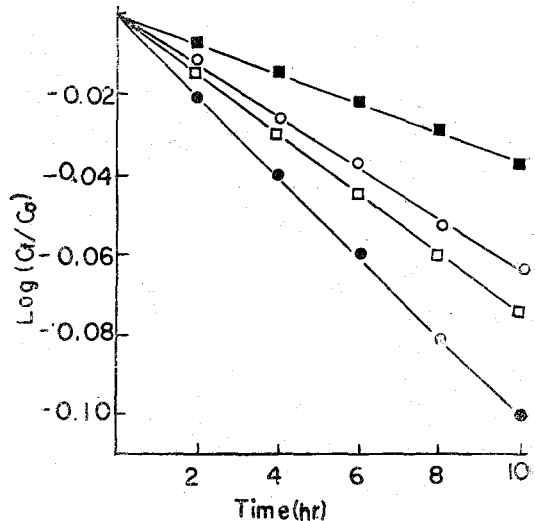
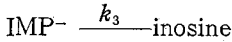
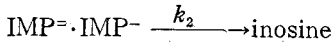
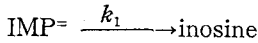


Fig.2. Pseudo first-order plots for 5'-IMP decomposition. (○ : pH5.52, ● : pH5.87, □ : pH6.25, ■ : pH6.87)

실제로 pH6.87에서는 장시간 가열하여도 5'-IMP의 분해는 거의 무시할 정도로 안정함을 나타내고 있으나 pH가 낮아짐에 따라 보다는 많은 분해가 일어나고 있다. 일반적으로 5'-IMP의 분해는 pH가 낮아질수록 분해속도가

커지는 것으로 보고되었으나 (3, 4, 5) Fig. 2를 보면 5'-IMP의 PKa₂ 근처인 5.87에서 낮은 pH 5.52인 때보다도 그 분해속도 상수가 큰 것으로 나타났다. 산-알칼리 용액에서의 반응 Sensitivity를 나타내기 위하여 logK를 pH에 대하여 plot하면 5'-IMP의 PKa₂ 근처에서 최대값을 나타내고 있는 것을 알 수 있다. 이와 같은 결과를 설명하기 위하여 다음과 같은 반응기작을 가정할 수 있다.

2. 5'-IMP의 반응기작



여기서 IMP⁻와 IMP⁼는 각각 mono와 di-dissociated 5'-IMP를 나타내며 IMP⁼·IMP⁻는 그 활성화착물(activated complex)을 나타낸다.

전체 5'-IMP 분해는 식(1)로 표시할 수 있다.

$$-\frac{d(\text{IMPT})}{dt} = k_1(\text{IMP}^=) + k_2(\text{IMP}^= \cdot \text{IMP}^-) + k_3(\text{IMP}^-) \quad \text{식 (1)}$$

$$(\text{IMPT}) = (\text{IMP}^=) + (\text{IMP}^-) \quad \text{식 (2)}$$

여기서 activated complex 생성 상수를 Kc라 하면

$$Kc = \frac{(\text{IMP}^= \cdot \text{IMP}^-)}{(\text{IMP}^=)(\text{IMP}^-)} \quad \text{식 (3)}$$

이 되고 k₂' = k₂·Kc라 놓으면

$$-\frac{d(\text{IMPT})}{dt} = k_1(\text{IMP}^=) + k_2'(\text{IMP}^=) + k_3(\text{IMP}^-) \quad \text{식 (4)}$$

로 된다. 그런데 Fig. 2로부터 5'-IMP가 1차 반응으로 열분해 되므로 다음과 같이 기술할 수 있다.

$$-\frac{d(\text{IMPT})}{dt} = K(\text{IMPT}) \quad \text{식 (5)}$$

따라서 K는

$$K = \frac{k_1 \cdot Ka_2 + k_3(\text{H}^+)}{Ka_2 + (\text{H}^+)} + \frac{k_2' \cdot Ka_2(\text{IMPT})(\text{H}^+)}{[Ka_2 + (\text{H}^+)]^2} \quad \text{식 (6)}$$

으로 표시할 수 있으며

$$\text{또한 } \frac{dK}{d(\text{H}^+)} = 0 \text{으로부터}$$

$$(\text{H}^+) = \frac{Ka_2[k_3 - k_1 + k_2'(\text{IMPT})]}{k_1 - k_3 + k_2'(\text{IMPT})} \quad \text{식 (7)}$$

이 된다. Fig. 3의 결과로부터 중성용액범위에서의 5'-IMP의 분해가 pKa₂ 근처에서 최대가 되므로 다음과 같이 식(8)을 합리적으로 도입할 수 있다.

$$\frac{k_3 - k_1 + k_2'(\text{IMPT})}{k_1 - k_3 + k_2'(\text{IMPT})} = 1 \quad \text{식 (8)}$$

따라서 식(8)을 만족시키기 위해서는 k₁ = k₃가 되며 식(6)은 식(9)로 표시될 수 있다.

$$K = k_1(\text{or } k_3) + \frac{k_2' \cdot Ka_2(\text{IMPT})(\text{H}^+)}{[Ka_2 + (\text{H}^+)]^2} \quad \text{식 (9)}$$

식(9)를 이용하여 (IMPT) 농도 0.01mole/l에 대하여 반응속도 상수 k를 pH의 함수로서 계산할 수 있다. Fig. 3은 이것을 plot한 것으로 실험적인 결과를 근사하게 일치시키고 있다.

그러나 이것이 가정된 반응 기작과 정확하게 부합된다고 보다는 실험의 결과를 어느 정도 합리적으로 설명할 수 있다는 것을 보여 한편 실제로 Henderson-Hasselbach식에 의

준다 하여 pH가 pKa₂와 같을 때 IMP⁻와 IMP⁼의 농도가 같게 된다.

5'-IMP의 분해 반응이 반드시 activated complex를 거쳐야만 inosine이 생성된다고 생각하면 다음 페이지에 나오는 식(10)과 같이 나타낼 수 있다.

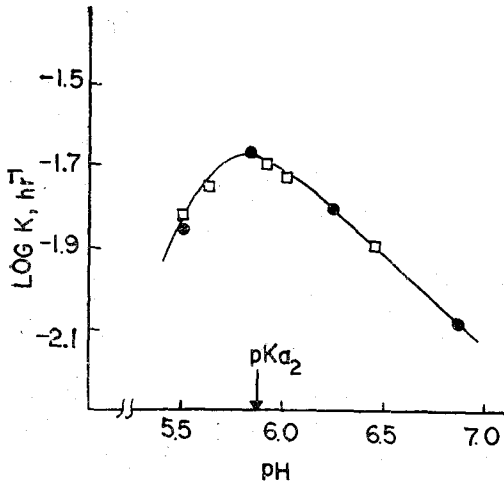
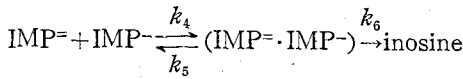


Fig. 3. Logarithmic heat decomposition rate of 5'-IMP (LOG K) on various pH range. (● : experimental rate constant, □ : calculated rate constant)



$$\frac{d(\text{IMP}^= \cdot \text{IMP}^-)}{dt} = k_4(\text{IMP}^=) - (\text{IMP}^-)$$

$$- (k_5 + k_6) (\text{IMP}^= \cdot \text{IMP}^-) \quad \text{식 (10)}$$

steady state에서 $\frac{d(\text{IMP}^= \cdot \text{IMP}^-)}{dt} = 0$ 이므로

$(\text{IMP}^= \cdot \text{IMP}^-) = \frac{k_4 \cdot (\text{IMP}^=) (\text{IMP}^-)}{k_5 + k_6}$ 이며
이로부터 식 (11)이 유도될 수 있다.

$$\frac{d(\text{inosine})}{dt} = k_6 (\text{IMP}^= \cdot \text{IMP}^-) =$$

$$\frac{k_4 \cdot k_6}{k_5 + k_6} (\text{IMP}^=) (\text{IMP}^-) \quad \text{식 (11)}$$

식 (11)로부터 inosine의 생성속도는 (IMP⁼)와 (IMP⁻)의 농도가 같을 때 최대가 됨을 알 수 있다. 결론적으로 볼 때 mono와 di-dissociated 5'-IMP의 complex 존재가 5'IMP 분해의 pH 의존성을 설명하는데 도움을 주는 것으로 생각된다.

3. 온도의 영향

5'-IMP 분해 반응의 온도 영향을 보기 위하여 여러가지 온도에서 시험하였다(100, 110,

120°C). 그 반응 속도에 대한 온도의 영향은 Arrhenius식으로 표시될 수 있었고 Fig. 4는 이것을 나타낸 것으로 온도가 증가할수록 반응속도는 커지고 있다. Table 1은 pH와 활성화 에너지 (Ea)사이의 관계를 나타낸 것으로 pKa₂ 근처에서 활성화에너지가 가장 작게 나타났다.

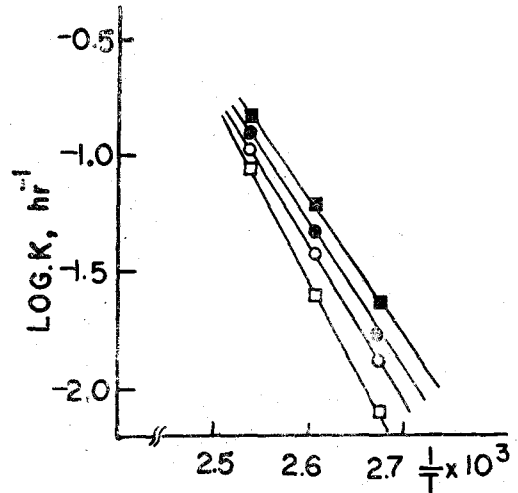


Fig. 4. Arrhenius plots for 5'-IMP decomposition. (○ : pH5. 52, ■ : pH5. 87, ● : pH6. 25, □ : pH6. 87)

Table 1. Activation energies of 5'-IMP decomposition by heat at four different pH values

pH	Slope × 10 ⁻³	Ea (Kcal/mole)
5.52	-6.6	30.3
5.87	-5.68	26.0
6.25	-6.41	29.3
6.87	-7.81	35.7

要 約

이온강도 0.4의 이노신산 용액을 열처리하여 온도와 pH의 함수로서 그 분해 반응을 조사하였다. 그 반응은 이노신산 농도에 대하여 1차로 나타났으며 또한 pH 의존성을 나타냈다. 특히 pH가 5.52에서 6.87 범위에서 용액

의 pH가 이노신산의 pKa₂ 근처일 때 반응속도가 최대로 나타났다. 온도에 의한 영향은 Arrhenius식으로 나타낼 수 있었고, pH 5.87에서 구한 활성화에너지는 26Kcal/mole이었다. 또한 실험적인 결과를 설명할 수 있는 이노신산 분해반응에 대한 이론적인 반응기작을 제시하였고 이로부터 계산한 반응속도 상수가 실험 결과와 잘 부합되었다.

參 考 文 獻

- 1) Ogata, K.: Adv. Appl. Microbiol. vol.19. 209 Academic Press, New York (1975)
- 2) Yamaguchi, S.: *J. Food. Sci.*, 32, 473(1967)
- 3) Fujita, E., Nakatani, H., Kimura, H., Ishii, K., and Satani, E.: *營養と食糧* 18, 98(1965)
- 4) Kuriyama, C., Fujijaki, M. and Murata, K.: *營養と食糧* 17, 337(1965)
- 5) Davidek, J., Velisek, J., and Janicek, G.: *J. Food. Sci.*, 37, 789 (1972)
- 6) Zorbach, W.W. and Tipson, R.S.: *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*, vol.2. Wiley-Interscience (1973)
- 7) Mitchell, J.: *Anal.Chem.*, 23, 1069 (1951)
- 8) Motozaki, S.: *化學調味料* (1968)
- 9) Dawson, R.M.C., Elliott, D.C.W.H. and Jones, K.M.: *Data for Biochemical Research*, Oxford Press (1974)

「食品工業」誌 廣告案内 謹啓

謹啓,
 貴社の 日益隆昌하심을 祝願합니다.
 本會가 發刊하고 있는 「食品工業」誌는 汎食品業界 여러분과 讀者들의 성원에 힘입어 創刊한지 어언 9개 星霜, 誌齡 50號를 눈앞에 두게 되었습니다.
 그동안 「食品工業」誌는 本會 機關誌로서 뿐만 아니라 食品業界의 代辯誌로 政策分析은 물론 業界人士들의 對話의 廣場으로, 業界의 情報誌로서 所任을 다하고자 努力해 왔습니다.
 특히 「食品工業」誌는 심오하고 예리한 理論과 業界가 쌓은 값진 經驗을 상호 調和啓發케 하며, 研究開發 및 技術導入의 架橋로서 知의 源泉을 이룩하는데 이바지하고자 항상 새로운 視角을 가지

고 編輯에 임하고 있습니다.
 나날이 發展하는 우리 食品企業의 이미지를 内外에 浮刻시키고 生産者와 消費者의 權益을 다 같이 伸張시키는데 寄與하도록 非會員 企業體에서 廣告媒體로서의 開放요청이 많았던 것입니다.
 그러기에 이러한 企業體들에 요구에 응기 위해 非會員業體를 위한 廣告欄을 마련키로 하였으나, 本誌의 機能과 役割을 勘案하시와 보다 持續의이며 廣範圍한 廣告效果를 위해 「食品工業」誌의 廣告欄을 많이 活用하여 주시기 바랍니다.

韓國食品工業協會
 「食品工業」編輯室