

명세서

발명의 명칭: 5'-이노신산이나트륨의 분리 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 미생물 배양물로부터 5'-이노신산이나트륨을 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 이노신산이나트륨(disodium 5'-inosinate, IMP2Na)과 같은 퓨린유도체 뉴클레오티드는 의약부문에서 대사장애의 예방치료제, 생장촉진제, 항암제 등의 원료로 사용되며 식품 분야에서는 조미료 등 식품첨가물로 사용되는 중요한 물질이다. 이노신산이나트륨은 육류, 어류 등에 천연적으로 존재하는 물질인 이노신산(inosinic acid, IMP)의 어육추출법, RNA 효소 분해법, 미생물 발효법, 발효법과 합성법의 조합, RNA 화학분해와 합성의 조합 등을 통해 제조된다.
- [3] 이노신산이나트륨을 제조하기 위한 전물질인 이노신산 제조방법에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔으며, 식품 첨가물로 사용될 수 있는 품질의 5'-이노신산이나트륨을 얻기 위해서는 이노신산을 정제하여 불순물을 제거해야 한다.
- [4] 미생물을 배양하여 그 배양물로부터 5'-이노신산이나트륨을 생산하는 방법 관련하여 결정화 단계에서 유기 용매를 사용할 수 있으나, 유기 용매를 많이 사용하여야 하고 그에 따라 방폭 설비 및 작업자를 위한 설비가 요구된다. 또한, 유기 용매를 제거하기 위하여는 증류 공정이 필요할 수 있고 그에 따른 설비가 요구되는바, 이에 대한 대안이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명은 5'-이노신산 생산 미생물을 배양하는 단계; 상기 미생물 배양액의 pH를 7.4 내지 8.0으로 조정하는 단계; 상기 pH가 조정된 배양액을 농축하여 5'-이노신산이나트륨 결정을 형성하는 단계; 상기 5'-이노신산이나트륨 결정을 포함하는 상기 배양액으로부터 5'-이노신산이나트륨 결정을 분리하는 단계; 및 분리된 5'-이노신산이나트륨 결정을 친수성 유기 용매와 접촉시켜 상기 결정을 세척하는 단계;를 포함하는, 5'-이노신산이나트륨의 분리 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [6] 본 명세서에 있어서, "5'-이노신산(inosinic acid)"은 이노신 모노포스페이트(inosine monophosphate, IMP)라고도 하는 뉴클레오타이드 모노포스페이트이다. "5'-이노신산"과 "그의 염"은 교환가능하게 사용된다. 상기 염은 "5'-이노시네이트" 또는 5'-이노신산이나트륨을 포함한다.
- [7] 본 명세서에 있어서, "배양물(culture)"은 미생물을 배양하여 얻어진 결과물을

나타낸다. 상기 배양물은 상기 미생물 세포, 또는 그 대사 산물을 포함할 수 있다. 상기 대사 산물을 세포 내에서 존재하거나 세포 외에 존재할 수 있다. 상기 대사 산물은 핵산 대사 산물일 수 있다. 상기 핵산 대사 산물은 5'-이노신산 또는 그의 염일 수 있다.

- [8] 본 명세서에 있어서, "배양액(culture broth)"은 배양물로부터 미생물 세포를 제거한 액체 부분을 나타낸다. 상기 배양액은 미생물로부터 배출되거나 유래된 산물을 포함할 수 있다. 상기 배양액은 용해성 산물을 포함할 수 있다. 상기 배양액은 5'-이노신산 또는 그의 염을 포함할 수 있다.
- [9]
- [10] 본 발명의 일 양상은 5'-이노신산 생산 미생물을 배양하는 단계; 상기 미생물 배양액의 pH를 7.4 내지 8.0으로 조정하는 단계; 상기 pH가 조정된 배양액을 농축하여 5'-이노신산이나트륨 결정을 형성하는 단계; 상기 5'-이노신산이나트륨 결정을 포함하는 상기 배양액으로부터 5'-이노신산이나트륨 결정을 분리하는 단계; 및 분리된 5'-이노신산이나트륨 결정을 친수성 유기 용매와 접촉시켜 상기 결정을 세척하는 단계를 포함하는, 5'-이노신산이나트륨의 분리 방법을 제공한다.
- [11] 상기 방법은 5'-이노신산을 포함하는 미생물 배양물로부터 세포체를 제거하여 배양액을 얻는 단계를 포함할 수 있다.
- [12] 상기 배양액을 얻는 단계에서, 상기 미생물은 5'-이노신산을 생산하는 미생물일 수 있다. 상기 미생물은 5'-이노신산 생산능이 증가되도록 유전자 조작된 것일 수 있다. 상기 미생물은 박테리아일 수 있다. 상기 미생물은 그람 양성 또는 그람 음성 박테리아일 수 있다. 상기 박테리아는 *Corynebacterium* 속, 또는 *Escherichia* 속 박테리아일 수 있다. 상기 박테리아는 *C. glutamicum*, *C. ammoniagenes*, 또는 *E. coli*일 수 있다. 상기 미생물은 5'-이노신산을 세포 외로 배출하는 것일 수 있다.
- [13] 상기 미생물 배양물은 배지 중에서 5'-이노신산을 생산하도록 하는 조건에서 상기 미생물을 배양하여 얻어지는 것일 수 있다. 상기 미생물 배양물은 5'-이노신산을 포함하는 것일 수 있다. 상기 배지는 5'-이노신산을 발효하는데 사용되는 알려진 배지일 수 있다. 상기 배지는 탄소원, 질소원, 및 미량원소를 포함할 수 있다. 상기 배지는 당밀 또는 옥수수 침지액을 포함하는 것일 수 있다. 상기 배지는 LB 배지일 수 있다. 상기 배지는 중류수 1L 당 포도당 46g, 과당 30g, 효모 추출물 10g, KH_2PO_4 18g, K_2HPO_4 42g, 요소 6g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g, 비오틴 30ug, 및 티아민 염산염 5mg을 포함하는 것일 수 있다.
- [14]
- [15] 상기 미생물 배양물은 배양물 총 중량 기준으로 0.5 내지 20 중량%, 1.0 내지 20 중량%, 2.5 내지 20 중량%, 5 내지 20 중량%. 또는 5 내지 10 중량%의 5'-이노신산을 포함하는 것일 수 있다. 상기 5'-이노신산은 세포 외의 배지 중에 존재하는 것일 수 있다. 상기 미생물 배양물은 pH 6 내지 9를 갖는 것일 수 있다.

상기 미생물 배양물은 이온 교환 크로마토그래피 또는 유기용매, 예를 들면 메탄올 정석이 수행되지 않은 것일 수 있다.

[16]

[17] 세포체를 제거하는 것은 배양물 중 액체 성분으로부터 세포 또는 세포 분해물(debris)을 제거하는 것일 수 있다. 세포체를 제거하는 것은 알려진 방법에 의하여 수행될 수 있다. 세포체를 제거하는 것은 여과, 원심분리, 또는 그 조합을 수행하는 것일 수 있다.

[18]

[19] 상기 방법은 상기 배양액의 pH를 7.4 내지 8.0으로 조정하는 단계를 포함할 수 있다. pH를 조정하는 것은 상기 배양액에 산 또는 염기를 첨가하여 수행될 수 있다. 상기 산은 염산일 수 있다. 상기 염기는 NaOH일 수 있다. 상기 pH는 pH 7.4 내지 8.0, pH 7.6 내지 8.0, pH 7.8 내지 8.0, pH 7.4 내지 7.8, 또는 pH 7.4 내지 7.6일 수 있다.

[20]

[21] 상기 방법은 상기 pH가 조정된 배양액을 농축하여 5'-이노신산이나트륨 결정을 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 이 단계는 배양액을 농축하여 5'-이노신산이 5'-이노신산이나트륨 결정으로 전환하도록 하는 결정화 과정일 수 있다. 본 결정화 과정은 단순히 상기 배양액을 농축하여 배양액 중 5'-이노신산 농도를 증가시켜 수행되는 것으로서, 유기 용매를 사용하지 않는 것일 수 있다. 사용하지 않는 상기 유기 용매는 친수성 유기 용매일 수 있다. 사용하지 않는 상기 친수성 유기 용매는 C1-C5의 알코올, 또는 물과 C1-C5의 알코올의 혼합물일 수 있다. 상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나 이상일 수 있다. 사용하지 않는 상기 친수성 유기 용매는 에탄올일 수 있다. 상기 에탄올의 농도는 부피 기준으로 물 중 50 내지 70%일 수 있다.

[22]

[23] 상기 pH가 조정된 배양액을 농축하는 단계는 배양액의 수분의 함량을 감소시키는 것일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 상기 배양액에 열을 가하여 수분을 증발시키는 것일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 배양액을 50°C 이상, 60°C 이상, 70°C 이상, 80°C 이상, 90°C 이상, 50 내지 90°C, 50 내지 80°C, 50 내지 70°C, 50 내지 60°C, 60 내지 90°C, 60 내지 80°C, 60 내지 70°C, 또는 60 내지 65°C에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 감압 농축을 수행하는 것일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 배양액 중 5'-이노신산 농도를 증가시켜 5'-이노신산이나트륨 결정이 형성될 때까지 수행하는 것일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 배양액 중 5'-이노신산의 농도가 380 내지 600g/L, 400 내지 550g/L, 400 내지 500g/L, 400 내지 475g/L, 또는 425 내지 475g/L가 될 때까지 수행하는 것일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 5'-이노신산이나트륨 결정이 형성되어 배양액이 결정을 포함하는 슬러리 형상을 가질 때까지 수행하는 것일

수 있다. 이하 결정을 포함하는 슬러리 용액을 "결정 슬러리(crystal slurry)"라고도 한다. 본 명세서에 있어서, "슬러리(slurry)"는 액체 일반적으로 물 중에 현탁된 비중(specific gravity) 1보다 큰 고체, 예를 들면 결정의 혼합물을 나타낸다. 상기 결정의 크기는 20 내지 400 μm 의 입자 크기를 가질 수 있다.

[24]

[25] 상기 방법은 배양액의 pH를 조정하는 단계 전에, 상기 배양액을 농축하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이 농축 단계는 배양액 중의 5'-이노신산이나트륨 결정이 형성되지 않거나 실질적으로 형성되지 않는 것일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 배양액의 수분의 함량을 감소시키는 것일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 상기 배양액에 열을 가하여 수분을 증발시키는 것일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 배양액 중 5'-이노신산의 농도가 150 내지 360g/L가 될 때까지 수행하는 것일 수 있다. 상기 농축 단계에서, 5'-이노신산의 농도는 150 내지 360g/L, 200 내지 300g/L, 220 내지 280g/L, 또는 240 내지 280g/L일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 배양액을 50°C 이상, 60°C 이상, 70°C 이상, 80°C 이상, 90°C 이상, 50 내지 90°C, 50 내지 80°C, 50 내지 70°C, 50 내지 60°C, 60 내지 90°C, 60 내지 80°C, 60 내지 70°C, 또는 60 내지 65°C에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 농축하는 단계는 감압 농축을 수행하는 것일 수 있다.

[26]

[27] 상기 방법은 상기 농축하는 단계 후에 형성된 결정을 포함하는 상기 배양액을 냉각시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 냉각은 25 내지 45°C, 25 내지 40°C, 25 내지 35°C, 또는 25 내지 30°C로 냉각하는 것일 수 있다. 상기 냉각시키는 단계는 결정 슬러리를 일정한 속도 냉각하는 것일 수 있다. 상기 냉각은 1.0 내지 3.0 시간, 예를 들면, 1.5 내지 2.5 시간, 또는 2시간 상기 냉각 온도로 냉각을 수행하는 것일 수 있다. 상기 일정한 냉각 속도는 8.0 내지 17.0°C/hr, 예를 들면, 10.0 내지 15.0°C/hr, 1.0 내지 14.0°C/hr, 2.0 내지 13.0°C/hr, 또는 약 12.5°C/hr일 수 있다. 상기 냉각은 형성된 결정 슬러리를 자켓형 글라스 결정관에 주입하고 교반하면서 수행하는 것일 수 있다. 낮은 온도로 냉각 시 용해도가 낮아져 결정을 더 회수할 수 있다. 또한, 균일한 속도로 냉각 시에 좀 더 단단하고 품질 좋은 결정을 얻을 수 있다.

[28]

상기 방법은 냉각 완료 후 상기 슬러리를 상기 냉각 온도에서 인큐베이션하여 결정을 숙성하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 인큐베이션은 1 내지 5 시간, 1 내지 4 시간, 1 내지 3 시간, 1.5 내지 2.5 시간, 또는 약 2 시간 수행하는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션은 결정 슬러리를 자켓형 글라스 결정관에 넣고 교반하면서 수행하는 것일 수 있다.

[29]

[30] 상기 방법은 형성된 5'-이노신산이나트륨 결정을 포함하는 상기 배양액으로부터 5'-이노신산이나트륨 결정을 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

- [31] 상기 결정을 분리하는 단계는 본 발명의 목적을 벗어나지 않는 범위 내에서 알려진 결정 분리 방법을 수행하는 것일 수 있다. 상기 결정을 분리하는 단계는 예를 들면, 원심분리, 여과, 또는 그 조합을 수행하는 것일 수 있다. 상기 원심분리는 회전 속도 100g 내지 1000g, 100g 내지 800g, 100g 내지 500g, 300g 내지 1000g, 또는 500g 내지 1000g에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 원심분리는 회전 시간 10 내지 30분 동안 수행되는 것일 수 있다.
- [32]
- [33] 상기 방법은 분리된 5'-이노신산이나트륨 결정을 친수성 유기 용매와 접촉시켜 결정을 세척하는 단계를 포함할 수 있다.
- [34] 상기 세척하는 단계에서, 상기 접촉은 상기 결정을 친수성 유기 용매와 혼합하는 것을 포함할 수 있다. 상기 세척은 상기 결정으로부터 불순물을 제거하여 분순물의 함량을 감소시키는 것일 수 있다. 상기 친수성 유기 용매는 C1-C5의 알코올, 또는 물과 C1-C5의 알코올의 혼합물일 수 있다. 상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 펜탄올, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 친수성 유기 용매는 부피 기준으로 물 중 50 내지 70%, 60 내지 70%, 55.0 내지 65.0%, 또는 60%의 농도일 수 있다. 상기 친수성 유기 용매는 에탄올 또는 물과 에탄올의 혼합물일 수 있다. 상기 에탄올은 가격이 저렴하고 유해성 낮은 점에서 유리할 수 있다. 상기 친수성 유기 용매는 부피 기준으로 형성된 결정 함유 시료의 10 내지 50%, 예를 들면, 20 내지 50%, 15 내지 40%, 20 내지 40%, 25 내지 40%, 25 내지 35% 또는 25 내지 50%일 수 있다.
- [35] 상기 방법에 있어서, 결정을 분리하는 단계와 결정을 세척하는 단계는 동시에 수행되는 것일 수 있다. 또한, 결정을 분리하는 단계와 결정을 세척하는 단계는 별개로 수행되는 것일 수 있다.
- [36]
- [37] 상기 본 발명의 방법은 세척된 결정을 수성 용매 중에서 활성탄과 접촉시켜 발색물질을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 접촉은 상기 세척된 결정을 수성 용매 중에서 활성탄과 혼합하고 인큐베이션하는 것일 수 있다. 상기 수성 용매는 물일 수 있다.
- [38] 상기 발색 물질을 제거하는 단계는 상기 세척된 결정을 250 내지 500g/L 농도가 되게 물에 용해시키는 단계, 및 결정 함유 수용액에 5'-이노신산의 중량 기준으로 0.1 내지 10%의 활성탄을 첨가하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 접촉은 40 내지 80°C에서 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [39] 본 발명에 따른 5'-이노신산이나트륨의 분리 방법에 의하면, 5'-이노신산이나트륨 결정을 효율적으로 분리할 수 있다. 특히, 상기 방법에 의하면, 유기 용매는 세척 단계에서만 사용되어 그 사용량이 적다. 상기 방법에 의하면, 분리된 5'-이노신산이나트륨 결정은 그 분리 수율이 높고, 순도가 높다.

- [40] 구체적으로, 상기 배양액의 pH를 조정하는 단계에 의하여, 5'-이노신산이나트륨 결정의 분리 수율을 현저하게 증가시킬 수 있다. 또한, 분리된 5'-이노신산이나트륨 결정을 친수성 유기 용매와 접촉시켜 결정을 세척하는 단계에 의하여, 물로 세척하는 경우에 비하여 수율이 저하되는 것이 방지되고, 형성된 결정의 색이 개선되며 결정 내 유해 유기 용매 함량이 현저히 감소되는바 경제성 확보가 가능하다.

발명의 실시를 위한 형태

- [41] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이 실시예들은 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이 실시예들에 한정되는 것은 아니다.

[42]

- [43] 실시예: IMP 발효 및 배양물로부터 IMP 분리

[44]

- [45] 1. IMP 생산 및 미생물의 배양

- [46] 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)을 배지 18L를 함유한 30L 발효 배양기에 접종하고 31°C에서 140시간 배양하여 배양물에 5'-이노신산(IMP)을 생성하였다. 상기 5'-이노신산은 세포 외로 분비되어 배양액 중에 존재하였다. 상기 배지는 초기 pH는 pH 7.2이며, 증류수 1L 당 포도당 46g, 과당 30g, 효모 추출물 10g, KH_2PO_4 18g, K_2HPO_4 42g, 요소 6g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g, 비오틴 30ug, 및 티아민 염산염 5mg을 포함하였다. 최종 생성된 배양물의 pH는 6.8이었다.

[47]

- [48] 생성된 배양물에 대하여 50w/w% 함량의 NaOH를 첨가하여 pH를 10.5로 조정 후 마이크로필터를 통하여 여과하여 균체를 제거하고 상등액을 얻었다. 상등액 중 5'-IMP는 HPLC를 사용하여 그 농도를 측정하였다. 상기 상등액은 140g/L의 5'-IMP를 포함하였다.

[49]

- [50] 2. 5'-이노신산이나트륨 결정 형성

- [51] 상기 여과액 2L를 로터리 증발기(rotary evaporator N-1110V: EYELA, 일본)에 넣고 여과액 중 수분을 증발시켜 5'-IMP의 농도가 260g/L가 될 때까지 여과액을 농축하였다. 증발은 진공제어기 NVC-2200을 사용하여 증발기 내부 압력 120mmHg, 용기 온도 65°C, 및 증발 속도 1L/hr로 하여 진행하였다. 이때 용기 내부 여과액의 온도는 55°C이었다. 이 농축 과정을 이하 "1차 농축"이라 한다.

[52]

- [53] 그 결과 얻어진 농축된 여과액은 pH 9.0이고 온도는 55°C이었다. 최초 여과액의 pH가 10.5에서 9.0으로 변경된 것은 증발 과정에서 암모니아가 제거되었기 때문인 것으로 보인다.

[54]

[55] 다음으로, 얻어진 농축된 여과액 1077mL에 대하여 1L 당 4.5mL의 35 %(v/v) 염산을 첨가하여 pH를 7.4로 조정하고 온도 55°C가 유지되도록 보온하였다. 이하 이 과정을 "pH 조정 과정"이라 한다.

[56]

[57] pH가 조정된 상기 농축된 여과액 1082mL를 상기 로터리 증발기에 넣고 상기한 바와 동일한 조건에서 여과액 중 5'-IMP의 농도 460g/L의 결정과 액체가 혼합된 과포화 용액 즉, 슬러리 상태가 될 때까지 농축하였다. 여기서 5'-IMP의 농도 "460g/L"는 용해된 5'-IMP 및 5'-IMP 2Na 결정 모두의 양을 의미한다. 그 결과, 상기 과포화 용액 608mL 중 5'-IMP와 2Na⁺ 이온이 5'-이노신산이나트륨(이하 "5'-IMP2Na"라고도 한다) 결정으로 석출되어, 상기 농축된 여과액은 고체상의 결정과 액체상의 여과액이 혼합된 점성의 현탁액이 되었다(이하 "슬러리"라고도 한다). 결정화가 끝난 직후, 얻어진 슬러리의 온도는 55°C이었고 pH는 8.0이었다. 이 과정을 이하 "2차 농축 및 결정화 과정"이라 한다. 즉, 상기 2차 농축 및 결정화 과정에 의하여 5'-IMP2Na 결정이 형성되었는바, 이는 유기 용매를 사용하지 않고서도 농축에 의하여 5'-IMP가 5'-IMP2Na 결정으로 전환될 수 있다는 것을 나타낸다. 이는 통상의 기술자에게 예기치 않은 현저한 효과이다.

[58]

[59] 상기 슬러리 608mL를 자켓형 글라스 결정관에 주입하고, 상부에 오버헤드 스테리를 설치하여(eyela, zz-2121) 200rpm으로 교반하면서 2시간 동안 30°C까지 12.5°C/hr의 냉각 속도로 냉각하였다. 자켓형 글라스 결정관은 일정한 속도로 슬러리를 냉각하기 위하여 사용하였다. 냉각 완료 후 상기 슬러리를 포함한 자켓형 글라스 결정관을 교반하면서 30°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이 과정은 결정 성장이 지속되도록 하기 위한 숙성 과정에 해당한다. 이하 이 과정을 "냉각 및 숙성 과정"이라고 칭한다.

[60]

[61] 3. 5'-이노신산이나트륨 결정의 회수

[62] 얻어진 숙성된 슬러리로부터 5'-IMP2Na 결정을 분리하였다. 구체적으로, 얻어진 숙성된 슬러리 608mL를 바스켓 분리기 H-110F (KOKUSAN Co. Ltd., 일본)에 넣고 340xg에서 20분 동안 원심분리하였다. 상기 H-110F 원심분리기는 그 내부에 구멍이 난 바스켓(perforated basket)이 설치되어 있고 이 바스켓은 외부 회전 구동기(external rotation supply)에 연결되어 있다. 구멍이 난 바스켓은 폴리아미드 멀티필라멘트 섬유 필터 섬유재(polyamide multifilament fiber filter fabric)로 되어 있으며, 필터의 공기 투과도는 2 mbar에서 250 L/m²/s이다. 상기 원심분리 결과, 슬러리로부터 액체가 제거된 IMP2Na 결정을 포함한 케이크(cake) 300g을 얻었다.

[63]

[64] 다음으로, 여기에 60% (v/v) 에탄올 수용액 150 ml를 분사하여 IMP2Na 결정을

세척하였다(이하 "에탄올 세척"이라고도 한다). 세척 결과, 272g의 5'-IMP2Na 결정을 회수하고 상온에서 24시간 건조하여 건조된 주상형의 5'-IMP2Na 결정 265g을 얻었다. 이 5'-IMP2Na 결정은 5'-IMP2Na 결정 7.5 수화물이라고도 한다.

[65]

[66] 얻어진 건조된 5'-IMP2Na 결정에 대하여 순도 및 투과도를 측정하였다. 그 결과, 건조된 5'-IMP2Na 결정은 수율 94.6%, 순도 95.7% 및 투과도 86.10%이었다. 상기 수율 및 순도는 다음 식에 따라 계산하였다.

[67] [수학식 1]

[68]
$$\text{수율} = \frac{\text{수득한 5'-IMP2Na 결정의 무게}}{\text{여과액 2L 내 5'-IMP2Na 결정의 무게}} \times 100$$

[69]

[70] 순도를 결정하기 위하여, 상기 건조된 5'-IMP2Na 결정 및 표준 5'-IMP2Na 결정(Sigma, $\geq 9.0\%$ (HPLC)) 1.0g을 3차 증류수 1L에 녹여 각각 1.0g/L 농도의 실험군 및 표준품 용액을 제조하였다. 실험군 및 표준품 용액 5 μ L를 Agilent 1260 Infinity Quaternary LC (Agilent Technology Inc.) 시스템 중의 칼럼에 로딩하였다. 상기 칼럼은 Shiseido CAPCELL PAK C18 ACR (150mm x 4.6mm, 3 μ m)이었다. 다음으로, 상기 칼럼에 아세트오니트릴 2%(v/v)/포스페이트 버퍼(pH 2.4) 98%(v/v)를 1 ml/min의 유속으로 흘려주면서 흘러나오는 용출액에 대하여 254nm에서의 흡광도를 측정하였다. 상기 포스페이트 버퍼는 암모늄 포스페이트 2g/L, 테트라부틸 암모늄 포스페이트 0.2g/L, 및 인산 0.82g/L을 포함한다. 이때 온도는 35°C이었다. 이 HPLC 조건은 여과액 중의 5'-IMP 농도를 측정할 때도 사용하였다. 그 결과, 순도는 하기 식에 따라 계산하였다.

[71] [수학식 2]

[72]
$$\text{순도} = \frac{\text{5'-IMP 무게}}{\text{고형분의 무게}} \times 100$$

[73]

[74] 또한, 투과도 측정을 위하여 상기 실험군을 5 (w/v)% 농도로 물 중에 용해하여 얻은 용액을 CARY 100 UV-VIS (Agilent Technology Inc.) 기기의 사각형 셀에 넣고 420nm에서 투과도를 측정하였다.

[75]

[76] 또한, 대조군1 실험으로서 상기 "5'-이노신산이나트륨 결정의 회수"에서, 세척과정에서 60%(v/v) 에탄올 수용액을 사용하지 않은 것을 제외하고는(이하 "무 세척"이라고도 한다) 동일한 방법으로 5'-IMP2Na 결정을 회수하였다. 그 결과, 얻어진 5'-IMP2Na의 정제된 결정은 건조 중량이 266g이었고, 수율 95%, 순도 86.40%, 투과도 40.48%이었다.

[77]

[78] 또한, 대조군2 실험으로서, 상기 "5'-이노신산이나트륨 결정의 회수"에서, 세척과정에서 60%(v/v) 에탄올 수용액 대신, 5'-IMP2Na 결정 슬러리 부피 대비 25% 함량의 탈이온수를 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 5'-IMP2Na

결정을 회수하였다(이하 "물 세척"이라고도 한다). 그 결과, 얻어진 5'-IMP2Na의 정제된 결정은 건조 중량이 240g이었고, 수율 85.7%, 순도 94.64%, 투과도 72.72%이었다.

[79] [표1]

	건조 중량(g)	수율(%)	순도(%)	투과도(%)
실험군	265	94.6	95.70	86.10
대조군1	266	95.0	86.40	40.48
대조군2	240	85.7	94.64	72.72

[80] 표 1은 실험군, 대조군1 및 대조군2에서 얻어진 5'-IMP2Na 결정의 건조 중량, 수율, 순도 및 투과도를 나타낸다. 표 1에 나타낸 바와 같이, 결정의 분리 과정에서 60%(v/v) 에탄올 수용액을 사용한 경우, 세척을 하지 않은 경우나 물로 세척한 경우에 비하여 결정의 순도 및 투과도가 동시에 개선되었다. 구체적으로, 실험군은 대조군1 및 대조군2에 비하여, 순도가 10.8% 및 1.1% 증가하였고, 투과도가 112.7% 및 18.4% 증가하였다. 이러한 순도 및 투과도 증가는 종래 기술로부터 예기치 않은 현저한 효과이다. 특히 투과도가 112.7% 및 18.4% 증가하였다는 것은 생성된 5'-IMP2Na 결정이 쉽게 식품용 규격을 만족시킬 수 있는 장점이 있다. 구체적으로, 식품용 규격에 맞기 위해서는 투과도 98% 수준이어야 하는데, 대조군 1, 2는 2회 이상의 재결정화를 수행해야 하는 반면 실험군은 추가 1회 수행으로도 식품용 규격에 달성 가능하다. 또한, 대조군 1과 2를 실험군 수준으로 맞추려면 수세량의 증가가 필요하며, 회수율이 하락하게 된다.

[81]

[82] 4. 결정화 단계에서 pH의 영향

[83] 본 절에서는 결정화 단계에서 용액의 pH가 5'-IMP의 결정화에 미치는 영향을 확인하였다.

[84]

[85] 구체적으로 상기 "2. 5'-이노신산이나트륨 결정 형성"에서 "1차 농축" 후 얻어진 농축된 여과액(pH 9.0) 2000mL에 35 %(v/v) 염산을 첨가하여 pH를 7.2로 조정하고 온도 55°C가 유지되도록 보온하였다.

[86]

[87] 이렇게 pH가 조정된 상기 농축된 여과액 2000mL를 상기 로터리 증발기에 넣고 상기한 바와 동일한 조건에서 여과액 중 5'-IMP의 농도 400g/L의 결정과 액체가 혼합된 과포화 용액 즉, 슬러리 상태가 될 때까지 농축하였다. 여기서 5'-IMP의 농도 "400g/L"는 용해된 5'-IMP 및 5'-IMP 2Na 결정 모두의 양을 의미한다. 그 결과, 상기 과포화 용액 608mL 중 5'-IMP와 2Na⁺ 이온이 5'-IMP2Na 결정으로 석출되어, 상기 농축된 여과액은 고체상의 결정과 액체상의 여과액이 혼합된

점성의 현탁액이 되었다(이하 "슬러리"라고도 한다). 결정화가 끝난 직후, 얻어진 슬러리의 온도는 55°C이었고 pH는 8.0이었다.

[88]

[89] 상기 슬러리 608mL를 자켓형 글라스 결정관에 주입하고, 상부에 오버헤드 스테리를 설치하여(eyela, zz-2121) 200rpm으로 교반하면서 2시간 동안 30°C까지 12.5°C/hr의 냉각 속도로 냉각하였다. 자켓형 글라스 결정관은 일정한 속도로 슬러리를 냉각하기 위하여 사용하였다. 냉각 완료 후 상기 슬러리를 포함한 자켓형 글라스 결정관을 교반하면서 30°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이 과정은 결정 성장이 지속되도록 하기 위한 숙성 과정에 해당한다. 이하 이 과정을 "냉각 및 숙성 과정"이라고 칭한다.

[90]

[91] 냉각된 여과액 608mL에 35%(v/v) 염산 및 50% NaOH 용액을 사용하여 pH가 7.4 내지 9.0이 되게 하였다. 각 pH의 여과액의 상등액을 상기한 바와 같이 HPLC에 로딩하고 용출하여 여과액 중 5'-IMP의 농도를 측정하였다. 표 2는 pH에 따른 여과액 중 5'-IMP 농도를 나타낸다.

[92] [표2]

pH	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2	8.4	8.6	8.8	9.0
IMP 농도(g/L)	60.2	52.7	48.3	49.0	52.4	55.4	60.6	73.7	86.0	113.7

[93] 표 2에 나타낸 바와 같이, 5'-IMP의 농도는 pH 7.4 내지 8.0에서 가장 낮았다. 표 2에서, pH 7.4 내지 8.0에서 용해도가 낮다는 것은 이 pH 범위에서 5'-IMP2Na 결정이 잘 생성된다는 것을 의미한다.

[94]

[95] **5. 5'-이노신산이나트륨 결정의 분리에서 사용된 유기 용매, 농도 및 함량의 영향**

[96] 본 절에서는 상기 "3. 5'-이노신산이나트륨 결정의 회수"에서 60 %(v/v) 에탄올 수용액 대신에 다른 유기 용매, 농도 및 함량을 달리한 경우, 5'-IMP의 용해도, 5'-IMP2Na 결정의 색, 및 5'-IMP2Na 결정의 순도, 수분 함량 및 흡광도에 미치는 영향을 확인하였다.

[97]

[98] **(1) 유기 용매에 따른 5'-IMP의 용해도 및 결정이 용해된 용액의 흡광도**

[99] 상기 "2. 5'-이노신산이나트륨 결정 형성"에서 얻어진 숙성된 슬러리 608ml를 표 3에 나타낸 유기 용매 1000ml에 넣고 25°C에서 1 시간 동안 교반하여 상기 슬러리 중의 5'-IMP가 유기 용매에 용해되도록 하였다. 이 용액을 1500rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었다.

[100]

[101] 그 후에, HPLC를 이용하여 상기 상등액의 5'-IMP의 농도를 측정하였다. 결정은

"3. 5'-이노신산이나트륨 결정의 회수"에 기재된 바에 따라 분리하여 물에 용해하여 5 (w/v)% 수용액을 만들고 420nm에서의 흡광도를 측정하였다. 결정의 주요 불순물은 노란색-갈색을 띄고 있는바, 이들 색상 물질의 함량을 측정하기 위하여 흡광도 420nm를 선택하였다. 흡광도는 CARY 100 UV-VIS (Agilent Technology Inc.) 기기를 사용하여 측정하였다.

[102] 표 3은 유기 용매의 종류 및 농도에 따른 5'-IMP의 용해도를 나타낸다. 표 3 및 4에서 %는 부피/부피 기준이다.

[103] [표3]

구분	10%	30%	50%	60%	70%	90%	100%
물	-	-	-	-	-	-	178.86
메탄올	100.71	29.76	4.91	2.51	1.50	0.80	1.14
에탄올	93.32	12.59	1.97	1.23	0.12	0.00	0.93
이소프로판올	96.02	15.63	2.39	1.76	0.11	0.00	0.00

[104] 표 4는 유기 용매의 종류 및 농도를 달리하여 얻어진 5'-IMP2Na 결정을 물에 용해시켜 얻어진 용액의 흡광도를 나타낸다.

[105]

[106] [표4]

구분	10%	30%	50%	60%	70%	90%	100%
물	-	-	-	-	-	-	0.03
메탄올	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.14	0.23
에탄올	0.04	0.04	0.04	0.08	0.12	0.35	0.44
이소프로판올	0.03	0.03	0.04	0.17	0.22	0.44	0.50

[107] 표 3 및 표 4에 나타낸 바와 같이, 친수성 유기 용매의 농도를 50 내지 70%로 하였을 때 모액 중 5'-IMP의 농도가 낮고 동시에 세척된 결정의 흡광도가 낮음을 확인하였다.

[108]

[109] (2) 유기 용매 함량에 따른 결정의 특성

[110] 상기 "3. 5'-이노신산이나트륨 결정의 회수"에서 사용된 60%(v/v) 에탄올 수용액의 양을 슬러리 부피 대비 0 내지 40%(v/v)로 달리한 것을 제외하고는 동일한 과정에 따라 5'-IMP2Na 결정을 분리하고, 결정 순도, 결정 수분 및 흡광도를 측정하였다. 결정 수분은 오븐에서 125°C에서 3시간 건조 전후의 무게를 측정하는 방법인 드라이오븐법에 의하여 측정하였다. 결정 순도, 및

흡광도는 상기한 바에 따라 측정하였다.

[111] [표5]

구분	0%	5%	15%	25%	35%	40%
결정 순도 (%)	86.4	91.18	92.60	95.7	96.00	96.01
결정 수분 (%)	29.46	30.40	30.89	30.83	30.62	30.56
흡광도	0.42	0.24	0.17	0.12	0.09	0.09

[112] 표 5에 나타낸 바와 같이, 세척 용액인 60%(v/v) 에탄올 수용액은 결정 슬러리 부피 대비 25 % 이상, 예를 들면, 25% 내지 35% 사용하였을 때 결정 순도, 결정 수분 및 흡광도가 동시에 개선되었다.

청구범위

- [청구항 1] 5'-이노신산 생산 미생물을 배양하는 단계;
상기 미생물 배양액의 pH를 7.4 내지 8.0으로 조정하는 단계;
상기 pH가 조정된 배양액을 농축하여 5'-이노신산이나트륨 결정을 형성하는 단계;
상기 5'-이노신산이나트륨 결정을 포함하는 상기 배양액으로부터 5'-이노신산이나트륨 결정을 분리하는 단계; 및
상기 5'-이노신산이나트륨 결정을 친수성 유기 용매와 접촉시켜 상기 결정을 세척하는 단계;를 포함하는, 5'-이노신산이나트륨의 분리 방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 미생물 배양액은 상기 배양액 총 중량 기준으로 5 내지 20 중량%의 5'-이노신산을 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 *Corynebacterium*속 또는 *Escherichia* 속 박테리아인 것인, 방법.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 농축하는 단계는 감압 농축을 수행하는 것인, 방법.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 농축하는 단계는 상기 배양액 중 5'-이노신산의 농도가 400 내지 550g/L가 될 때까지 수행하는 것인, 방법.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 pH를 조정하는 단계 전에 상기 배양액을 농축하는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 pH를 조정하는 단계 전에 상기 배양액을 농축하는 단계는 상기 배양액 중 5'-이노신산의 농도가 150 내지 360g/L가 될 때까지 수행하는 것인, 방법.
- [청구항 8] 청구항 6에 있어서, 상기 pH를 조정하는 단계 전에 상기 배양액을 농축하는 단계는 감압 농축을 수행하는 것인 방법.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 농축하는 단계 후, 형성된 결정을 냉각시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 냉각은 25 내지 30°C로 냉각되는 것인, 방법.
- [청구항 11] 청구항 1에 있어서, 상기 친수성 유기 용매는 C1-C5의 알코올인, 방법.
- [청구항 12] 청구항 11에 있어서, 상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 이소프로판올로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나 이상인, 방법.
- [청구항 13] 청구항 1에 있어서, 상기 친수성 유기 용매는 에탄올인 것인, 방법.
- [청구항 14] 청구항 1에 있어서, 상기 친수성 유기 용매의 농도는 50 내지 70%(v/v)인, 방법.
- [청구항 15] 청구항 1에 있어서, 상기 친수성 유기 용매의 부피는 형성된 결정 함유 시료 총 부피의 20 내지 50%인 것인, 방법.
- [청구항 16] 청구항 1에 있어서, 세척된 결정을 수성 용매 중에서 활성탄과 접촉시켜 탈색물질을 제거하는 단계를 더 포함하는, 방법.