



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월23일

(11) 등록번호 10-1800773

(24) 등록일자 2017년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/16 (2006.01) C12N 1/04 (2017.01)

C12P 19/40 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7026180

(22) 출원일자(국제) 2011년04월05일

심사청구일자 2016년02월17일

(85) 번역문제출일자 2012년10월05일

(65) 공개번호 10-2013-0079997

(43) 공개일자 2013년07월11일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2011/058652

(87) 국제공개번호 WO 2011/126030

국제공개일자 2011년10월13일

(30) 우선권주장

JP-P-2010-088726 2010년04월07일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문현

JP2003250488 A*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 보존안정성이 우수한 S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물 및 그 제조 방법

(57) 요 약

본 발명의 S-아데노실-L-메티오닌과, 증점제를 함유하는 보존안정성이 우수한 건조 효모 조성물을 제공한다. SAME 생산능을 가지는 효모를 배양 집균한 효모 균체 농축물에 증점제를 첨가한 후에 건조함으로써, 보존안정성, 나아가, 생체흡수성이 우수한 S-아데노실-L-메티오닌을 고농도로 포함하는 건조 효모를 간편하면서 경제적으로 제조할 수 있으므로, 수용성 생리활성 물질로서 유용한 S-아데노실-L-메티오닌을 고농도로 포함하는, 보존안정성, 나아가, 생체흡수성이 우수한 건조 효모 조성물을 시장에 제공할 수 있다.

심사관 : 문동현

(56) 선행기술조사문현

WO2009081833 A1*

US20110052623 A1

JP2008541773 A

JP평성07039370 A

KR1020090112654 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

명세서

청구범위

청구항 1

S-아데노실-L-메티오닌과, 증점제를 함유하는 S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물로서,

상기 증점제가 (1) 잔탄검, 젤란검, 커드란, 알긴잔탄검, 풀루란 및 낫토균검으로부터 선택되는 미생물 유래 증점제, 및 (2) 구아검, 타라검, 로커스트빈검, 타마린드검 및 사일리움씨드검으로부터 선택되는 종자 유래 증점제 중에서 선택되는 적어도 1종이며,

상기 증점제가 상기 건조 효모 조성물에 대하여 4.5~70질량% 포함되어 이루어지며,

상기 건조 효모가 S-아데노실-L-메티오닌 생산능을 가진 효모인, S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 S-아데노실-L-메티오닌이 상기 건조 효모 조성물에 대하여 5.1~14.6질량% 포함되어 이루어지는, S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

건조 효모가, 사카로미세스속에 속하는 효모인, S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 사카로미세스속에 속하는 효모가 사카로미세스·세레비시아인, S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 증점제가 잔탄검, 젤란검, 커드란, 구아검 및 타마린드검 중에서 선택되는 적어도 1종인, S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물.

청구항 6

S-아데노실-L-메티오닌 생산능을 가지는 효모를 이용하여, 효모를 배양함으로써 효모 균체 중에 S-아데노실-L-메티오닌을 축적시킨 효모의 균체 배양액으로부터 얻어지는 효모 균체 농축물에 증점제를 첨가한 후, 건조하는 것을 특징으로 하는 S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물의 제조 방법으로서, 상기 증점제가 (1) 잔탄검, 젤란검, 커드란, 알긴잔탄검, 풀루란 및 낫토균검으로부터 선택되는 미생물 유래 증점제, 및 (2) 구아검, 타라검, 로커스트빈검, 타마린드검 및 사일리움씨드검으로부터 선택되는 종자 유래 증점제 중에서 선택되는 적어도 1종이며,

증점제의 첨가량이 상기 건조 효모 조성물에 대하여 4.5~70질량%인, S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물의 제조 방법.

청구항 7

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 수용성 생리활성 물질로서 유용한 S-아데노실-L-메티오닌(이하, SAMe라고 함)을 고농도로 포함하는 보존안정성이 우수한 건조 효모 조성물 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] SAMe는, 생체 내에 널리 존재하며, 혈관, 신경전달 물질, 인지질, 호르몬, 단백질 등의 합성·대사에서 각종 트랜스메틸라제에 의한 메틸화 반응의 메틸기 공여체로서 중요한 역할을 하고 있는 수용성 생리활성 물질이다. SAMe는, 인체의 거의 모든 세포에서 관찰되는데, 여러 가지 생화학 반응에서의 공동 인자로 작용하며, 메틸기 전이, 황기 전이, 및 아미노프로필기 전이의 3가지 대사 경로에 의해 대사된다. 예를 들면, 연골의 유지나 뇌 내 물질의 생합성에 반드시 필요한 물질이다. 최근 SAMe의 기능 연구를 통해 지방간, 고지혈증, 동맥경화증, 불면증, 알코올성 간염, 노인성 치매증 등에 대한 치료 효과에 대해서도 보고되고 있다. 이처럼 SAMe는, 중요한 생리활성 물질로서, 구미 제국에서 울병, 간장질환 및 관절염 등의 치료약, 혹은 건강식품으로서 널리 이용되고 있다.

[0003] 이에 따라, SAMe를 저비용으로, 간편하게 제조 공급하는 것이 크게 요구되고 있다. 종래, SAMe의 제조 방법으로는, 전구 물질인 L-메티오닌을 함유시킨 배지를 이용하여 발효 생산하는 방법, 효모 등의 미생물로부터 단리 정제된 SAMe 합성효소(메티오닌아데노실트란스페라제)를 이용하여, 아데노신 5'-삼인산(ATP)과 L-메티오닌을 기질로 하여 SAMe를 효소적으로 합성하는 방법 및 합성법에 의한 방법 등이 알려져 있다.

[0004] 효소적 합성법은, 효모 등의 미생물로부터 단리 정제된 SAMe 합성효소(메티오닌아데노실트란스페라제)를 이용하여, 아데노신 5'-삼인산(ATP)과 L-메티오닌을 기질로 하여 SAMe를 효소적으로 합성하는 방법인데, 이 방법은, 발효법과 비교할 때, SAMe의 촉적량이 많아, 균체로부터의 SAMe 추출 조작이 필요 없는 등의 이점은 있지만, 효소의 조제가 번잡하다는 점, 얻어지는 효소의 활성이 미약하다는 점, ATP 분해효소 등의 방해 물질을 제거할 필요가 있다는 점, 나아가, 기질인 ATP가 매우 고가라는 점 등의 여러 가지 문제를 가져서, 반드시 실용적인 방법이라고는 할 수 없었다. 또한, 최근 유전자 공학의 발전에 따라, 클론화된 SAMe 합성효소 유전자를 이용함으로써 상기 효소의 조제가 보다 간편해져, 효소 조제의 문제는 해결되고는 있지만, 여전히 고가의 ATP를 기질로 사용할 필요가 있는 등 다른 실용상의 문제는 해결되지 않은 상태이다.

[0005] 또한, SAMe는 열적으로 불안정하고 상온에서도 용이하게 분해되는 성질을 갖는다는 점에서, 의약품, 건강식품으로 사용하는데 있어서 커다란 장애가 되고 있다. 그 대책으로서, 보존안정성의 향상을 목적으로 한 시도가 많이 이루어져 왔다. 예를 들면, 상술한 제조 방법으로 얻어진 SAMe의 조성물을 크로마토그래피 등에 의해 정제한 후, 황산이나 p-톨루엔설폰산과의 염, 또는 부탄디설폰산과의 염 등으로 함으로써 SAMe의 안정화를 도모하는 방법(예를 들면, 특허문현 1 참조), 또는, 정제된 SAMe에 첨가물 처리를 하여, SAMe 조성물로서 안정화를 도모하는 방법(예를 들면, 특허문현 1 참조)이 일반적으로 많은 노력과 비용이 필요하기 때문에, 치료약이나 건강식품으로서 중요한 SAMe를 저비용으로 제조해서 제공하는 것은 매우 어려웠었다. 그리고, 최근 SAMe를 보다 저비용으로, 정제 공정이 적고, 간편하게 제조할 수 있는 SAMe 생산능을 가지면서 경구 섭취가 가능한 미생물을 이용한, SAMe 함유 건조 미생물에 대한 연구가 이루어지고 있다(예를 들면, 특허문현 2, 비특허문현 1 참조). 그

러나, 현 상황에서는, SAMe 함유 건조 미생물은, 정제된 SAMe, SAMe 조성물에 비해 보존안정성이 낮다는 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 일본특허공개 S59-51213호 공보
(특허문헌 0002) 국제공개 제2008/090905호

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Biochimica et Biophysica Acta, 1573, 105-108, (2002)
(비특허문헌 0002) J of Chromatography B, 863, 94-100 (2008)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은, SAMe를 고농도로 포함하는 보존안정성이 우수한 건조 효모 조성물을, 저비용으로 간편하게 제조할 수 있는 프로세스를 확립하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위하여, SAMe를 고농도로 함유하면서, 안정적인 상태로 장기간 보존할 수 있는 성능적으로 우수한 조성물을 경제적으로 생산할 수 있는 방법에 대하여 예의 검토한 결과, SAMe 생산능을 가지면서, 경구 섭취가 가능한 효모를 이용하여 균체 내에 SAMe를 고농도로 생산 축적시킨 후, 배양액으로부터 원심분리 등의 분리 수단으로 효모 균체를 분리하고, 얻어진 효모 균체 농축물에 중점제를 첨가한 후, 건조시킴으로써, 목적으로 하는 SAMe를 고농도로 함유하면서, 보존안정성이 우수한 조성물인 건조 효모를 간편하게 수용 좋게 제조할 수 있다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다. 또한, 본 발명의 SAMe 함유 건조 효모 조성물은, 보존안정성에 더하여, 생체흡수성도 우수한 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

- [0010] 본 발명은,

- [0011] (1) S-아데노실-L-메티오닌과, 중점제를 함유하는 S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물, 및
[0012] (2) S-아데노실-L-메티오닌 생산능을 가지는 효모를 이용하여, 효모의 균체 배양액으로부터 얻어지는 효모 균체 농축물에 중점제를 첨가한 후, 건조하는 S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명의 S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모 조성물은, 보존안정성이 우수할 뿐만 아니라, 생체흡수성도 우수하므로, 파쇄하여 분말상으로 하거나, 필요에 따라 다른 생리활성 성분이나 부형제 등의 첨가제를 첨가하여, 압축 타정하여 정제상의 조성물로 하거나, 분체를 과립상으로 조립(造粒: granulation)하거나, 조립한 과립을 채워 캡슐화하거나 하여, 의약이나 건강식품용의 수용성 생리활성 물질로서 유용한 조성물을 제공할 수 있다.

[0014] 또한, S-아데노실-L-메티오닌을 고농도로 포함하고 보존안정성이 우수한 조성물을, 나아가 생체흡수성도 우수한 SAMe 함유 건조 효모 조성물을 저비용으로 간편하게 제조하는 방법을 제공할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명에 사용되는 효모의 종류는, SAMe 생산능을 가지면서 경구 섭취 가능한 것이라면 되는데, 예를 들면, 사카로미세스속에 속하는 효모를 들 수 있다. 이 중, 사카로미세스 · 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)가 보다 적합하다. 한편, 건조 효모에는, 5' -뉴클레오티드, 유리 아미노산, 항산화 작용을 가지고 간기능 개선에 도움이 되는 글루타티온, 면역력의 증진 작용이나 정장(整腸; regulating the function of intestine) 작용을 가지는 β -글루칸이나 식물섬유 등의 유용 성분이 많이 함유되어 있어, 건강식품 등으로 널리 이용되고 있다.

[0016] 상기 효모를 배양할 때에 사용하는 탄소원은, 효모가 자화(資化: anabolic)될 수 있는 것이라면 특별한 제한 없이, 예를 들면, 글루코오스, 자당, 전분, 폐당밀 등의 탄수화물, 에탄올 등의 알코올, 또는 아세트산 등의 유기산을 들 수 있다. 질소원 역시, 사용하는 효모가 자화될 수 있는 것이라면 특별한 제한 없이, 예를 들면, 암모니아, 질산, 요소 등의 무기체 질소 화합물, 또는 효모 엑기스, 맥아 엑기스 등의 유기체 질소 화합물을 포함하는 것을 들 수 있다. 또한, 무기염류로는, 인산, 칼륨, 나트륨, 마그네슘, 칼슘, 철, 아연, 망간, 코발트, 구리, 몰리브덴 등의 염이 이용된다. 나아가, SAMe의 골격 구성에 관여하는 메티오닌, 아데닌, 아데노실리보뉴클레오시드를 첨가하여 배양할 수도 있다.

[0017] 배지로서, L-메티오닌 함유 배지(Shiozaki S., et al, J. Biotechnology, 4, 345-354(1986))를 이용하였다.

[0018] 배지 성분으로는, 수크로오스, 효모 엑기스, L-메티오닌, 요소, 글리신, 인산이수소칼륨, 항산마그네슘 7수화물, 비오틴, 염화칼슘 2수화물, 및 미량 금속염을 포함하는 배지에 식균(植菌; inoculation), 수크로오스 또는/및 에탄올 등의 탄소원을 유가(流加; feeding)하면서, 호기적으로(好氣: aerobically) 배양함으로써 SAM 함유 균체를 얻을 수 있다.

[0019] 배양 온도 및 배양액의 pH는 사용하는 효모의 종류에 따라 다르지만, 배양 온도로는 20~35°C의 범위를, 배양액의 pH로는 pH 4~7의 범위를 들 수 있다.

[0020] 또한, 균체 내의 SAMe 함량을 높이려면, 호기적으로 배양하는 것이 바람직하다. 배양조는, 통기 가능하며 필요에 따라 교반할 수 있는 것이라면 되는데, 예를 들면, 기계적 교반 배양조, 에어리프트식(air-lift) 배양조 및 기포탑형 배양조 등을 이용할 수 있다.

[0021] 배지의 공급 방법은, 탄소원, 질소원, 각종 무기염류, 각종 첨가제 등을, 일괄 혹은 개별적으로 연속적 또는 간헐적으로 공급한다. 예를 들면, 자당, 에탄올 등의 기질은 다른 배지 성분과의 혼합물로서 배양조에 공급할 수도 있고, 또한, 다른 배지 성분과는 별도로 독립적으로 배양조에 공급할 수도 있다. 배양액의 pH 제어는, 산, 알칼리 용액에 의해 이루어진다. 알칼리로는 질소원으로 사용되는 암모니아, 요소, 또는 비질소계 염기, 예를 들면, 가성소다, 가성가리 등을 이용하여 pH 제어하는 것이 바람직하다. 산으로는 무기산, 예를 들면, 인산, 항산, 질산, 또는 유기산이 이용된다. 한편, 무기염류인 인산염, 칼륨염, 나트륨염, 질산염 등을 이용하여 pH 제어할 수도 있다.

[0022] 이와 같은 조건으로 배양하여, 목표량의 SAMe가 효모 균체 중에 축적된 단계에서 배양액을 배출하여 효모 균체를 분리한다. 분리 방법으로는, 균체의 분리와 세정을 효율적으로 행할 수 있는 방법이라면 특별한 제한은 없지만, 항류형 이스트 세퍼레이터(yeast separator)나 분리막을 이용한 한외 여과 장치(限外濾過裝置; ultrafiltration system)를 적합한 예로 들 수 있다.

[0023] 이어서, 분리한 효모 균체의 분리 농축물에 중점제를 첨가한다. 이에 따라, 건조 효모 중의 SAMe의 보존안정성, 나아가, 생체흡수성이 증가하고, 또한 효모의 건조 공정에서의 수율도 향상되며, 또한 건조 효모의 독특한 악취(臭氣; odor)도 마스킹된다. 첨가하는 중점제의 양으로는, S-아데노실-L-메티오닌 함유 건조 효모

조성물에 대한 질량비로서 0.1~70질량%의 범위가 되도록 하는 것이 바람직하고, 0.4~70질량% 범위가 되도록 하는 것이 보다 바람직하고, 0.7~70질량% 범위가 되도록 하는 것이 더욱 바람직하다. 또한, 4.5~70질량% 범위가 되도록 하는 것이 특히 바람직하다. 0.1질량%를 밀돌면 건조 효모 중의 SAMe의 보존안정성이 불충분해지고, 70질량%를 넘으면 더 이상의 효과가 없을 뿐 아니라, 건조 효모 중의 SAMe의 보존안정성이 용량의존적으로 저하되는 경향을 보인다.

- [0024] 본 발명에서 증점제란, 증점 작용을 가지면서, 이른바 젤화제라 불리는 식품에 첨가할 수 있는 각종 증점제 등을 말한다.
- [0025] 구체적으로 사용할 수 있는 증점제로는, (1) 잔탄검, 젤란검, 커드란, 알긴잔탄검, 풀루란 및 낫토균(*Bacillus natto*)검으로부터 선택되는 미생물 유래 증점제,
- [0026] (2) 구아검, 타라검, 로커스트빈검, 타마린드검 및 사일리움씨드검으로부터 선택되는 종자 유래 증점제,
- [0027] (3) 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 전분 및 카르복시메틸산나트륨으로부터 선택되는 식물 유래 증점제,
- [0028] (4) 카라기난, 알긴산나트륨, 알긴산 및 알긴산프로필렌글리콜에스테르로부터 선택되는 해조 유래 증점제,
- [0029] (5) 아라비아검, 트래거캔스검, 셀락 및 아라비노갈락тан으로부터 선택되는 수지 유래 증점제,
- [0030] (6) 키토산 및 키틴으로부터 선택되는 갑각 유래 증점제, 및
- [0031] (7) 페틴, 만난, 히알루론산, 콘드로이틴, 한천, 콜라겐, 알부민, 제인, 카제인 및 카제인나트륨 등으로부터 선택되는 증점제를 들 수 있으며, 이들 중에서 1종 이상을 선택하여 이용할 수 있다.
- [0032] 이들 중, (1) 잔탄검, 젤란검, 커드란, 알긴잔탄검, 풀루란 및 낫토균검으로부터 선택되는 미생물 유래 증점제,
- [0033] (2) 구아검, 타라검, 로커스트빈검, 타마린드검 및 사일리움씨드검으로부터 선택되는 종자 유래 증점제,
- [0034] (5) 아라비아검, 트래거캔스검, 셀락 및 아라비노갈락тан으로부터 선택되는 수지 유래 증점제,
- [0035] (6) 키토산 및 키틴으로부터 선택되는 갑각 유래 증점제, 및
- [0036] (7) 페틴, 만난, 히알루론산, 콘드로이틴, 한천, 콜라겐, 알부민, 제인, 카제인 및 카제인나트륨으로부터 선택되는 증점제가 보다 바람직하다.
- [0037] 또한, (1) 잔탄검, 젤란검, 커드란, 알긴잔탄검, 풀루란 및 낫토균검 등의 미생물 유래 증점제, 및 (2) 구아검, 타라검, 로커스트빈검, 타마린드검 및 사일리움씨드검 등의 종자 유래 증점제가 특히 바람직하다.
- [0038] 본 발명에서 사용하는 증점제는 식품, 화장품, 의약품 용도에서 범용되고 있으므로, 안전하게 사용할 수 있다.
- [0039] 이렇게 하여 증점제의 첨가 처리를 행한 후에, 효모 균체의 농축물을 스프레이 드라이어에 의한 분무건조법이나 동결건조법 등의 건조 방법에 의해 수분을 증발시켜 SAMe 함유 건조 효모 조성물을 만들어낸다.
- [0040] 건조 조건으로는, 분무건조법에서는, 입구 온도 210°C 이하, 출구 온도 110°C 이하에서 건조시키는 것이 바람직하다. 동결건조법에서는, 최종 선반 온도(final shelf temperature) 30°C 이하에서 건조시키는 것이 바람직하다. 본 발명의 SAMe 함유 조성물은 보존안정성의 관점으로부터, 그 수분 함량이 5.0질량% 이하가 되도록 하는 것이 바람직하다.
- [0041] 나아가서는, 이 건조 효모 조성물을 파쇄하여 분말상으로 하거나, 분말상의 건조 효모에 필요에 따라 다른 생리활성 성분이나 부형제 등의 첨가제를 첨가한 후에 압축 타정하여 정제상의 조성물이 되고, 다시, 그 표면을 피복하거나 할 수도 있다.
- [0042] 또한, 분체를 과립상으로 조립하거나, 분체나 조립한 과립을 채워 캡슐화할 수도 있다.

[0043] 실시예

[0044] 이하, 본 발명을 실시예 및 비교예를 들어 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이를 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0045] 실시예 1~4

[0046] (a) 효모 균체의 배양

[0047] 상술한 공지의 배양법에 따라, L-메티오닌 함유 배지(Shiozaki S., et al, J. Biotechnology, 4, 345-354(1986))에 사카로미세스속에 속하는 효모 사카로미세스·세레비시아 IFO 2346을 접종하여, 배양 온도 27~29°C에서 호기적으로 통기 교반하면서 6일간 배양하였다. 그 결과, 균체 농도 3.5wt%, SAMe 함량 205mg/g - 건조 효모의 효모 균체 배양액 18L를 얻었다.

[0048] (b) 효모 균체의 집균

[0049] 상기 효모 균체 배양액 18L를 연속 로터리형 원심분리기(Hitachi Himac Centrifuge CR10B2)로 처리하여, 균농도가 건조물 환산으로 18질량%에 상당하는 액상의 효모 균체 농축물 3.4kg을 얻었다.

[0050] (c) 효모 균체 농축물에 대한 중점제의 첨가

[0051] 상기 효모 균체 농축물 3.4kg에 잔탄검을 상기 농축물 중의 SAMe에 대한 질량비로서 0.02, 0.2, 2.2, 11.1 배량 첨가하고, 실온에서 30분간 교반 혼합하여, 잔탄검을 첨가한 효모 균체 농축물을 얻었다.

[0052] (d) 건조 효모의 제조

[0053] 상기 잔탄검을 첨가한 효모 균체 농축물을 동결건조기(Japan Vacuum Technology Co., Ltd.제)의 동결건조용 스테인리스 트레이에 부어 넣고 -50°C에서 동결한 후, 최종 선반(棚段; shelf board) 온도 25°C의 조건으로 36시간 동결건조하였다. 얻어진 동결건조 효모를 추가로 분쇄함으로써 분말 건조 효모를 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 분말 건조 효모를 밀폐 유리용기 안에 채워, 40°C, RH 75%의 가속도 시험 조건 하에서 보존안정성 시험을 수행하였다. 표 1에 40°C, RH 75%에서의 가속 보존안정성 시험 결과를 나타내었다. 한편, SAMe 잔존율은, SAMe 함유 건조 효모로부터 과염소산을 이용한 공지의 방법으로 SAMe를 추출하고, 액체 크로마토그래피를 이용한 비교 정량법으로 실시하였다. 보준 후 악취의 유무에 대해서는 5명의 패널리스트에 의한 관능 검사로 구하였다. 관능 검사의 평가 방법은, 5명의 패널리스트 전원이 이취(異臭) 없음이라고 한 경우를 「○」, 5명 중 1~2명이 이취가 있다고 한 경우를 「△」, 5명 중 3명 이상이 이취 있음이라고 한 경우를 「×」로 나타내었다.

[0054] 본 발명에서의 SAMe 측정법은, 이하 조건의 액체 크로마토그래피를 사용하였다.

[0055] 이용된 분석 조건

[0056] 젤럼: 나칼라이(nacalai tesque) COSMOSIL 4.6φ × 100mm

[0057] 용리액: 0.2M KH₂PO₄ 수용액/메탄올=95/5

[0058] 유속: 0.7mL/min, 검출기: UV(260nm)

[0059] SAMe 유지 시간: 약 150초

[0060] 실시예 5~8

[0061] 효모 균체 농축물에 커드란을 이용하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 처리하여, 분말 건조 효모를 얻었다. 얻어진 분말 건조 효모 중의 SAMe 함량, 질량, 및 얻어진 SAMe 함유 건조 효모의 밀폐 유리용기 내, 40°C, RH 75%의 가속 조건 하에서의 보존안정성 시험 결과, 관능 검사 결과를 표 1에 나타낸다.

[0062] 실시예 9

[0063] 효모 균체 농축물에 구아검을 상기 농축물 중의 SAMe에 대한 질량비로서 0.2배량 첨가한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 처리하여, 분말 건조 효모를 얻었다. 얻어진 분말 건조 효모 중의 SAMe 함량, 질

량, 및 얻어진 SAMe 함유 건조 효모의 밀폐 유리용기 내, 40°C, RH 75%의 가속 조건 하에서의 보존안정성 시험 결과, 관능 검사 결과를 표 1에 나타낸다.

[0064] 실시예 10

효모 균체 농축물에 타마린드검을 상기 효모 농축물 중의 SAMe에 대한 질량비로서 0.2배량 첨가한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 처리하여, 분말 건조 효모를 얻었다. 얻어진 분말 건조 효모 중의 SAMe 함량, 질량, 및 얻어진 SAMe 함유 건조 효모의 밀폐 유리용기 내, 40°C, RH 75%의 가속 조건 하에서의 보존안정성 시험 결과, 관능 검사 결과를 표 1에 나타낸다.

[0066] 실시예 11

효모 균체 농축물에 젤란검을 상기 효모 농축물 중의 SAMe에 대한 질량비로서 0.2배량 첨가한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 처리하여, 분말 건조 효모를 얻었다. 얻어진 분말 건조 효모 중의 SAMe 함량, 질량, 및 얻어진 SAMe 함유 건조 효모의 밀폐 유리용기 내, 40°C, RH 75%의 가속 조건 하에서의 보존안정성 시험 결과, 관능 검사 결과를 표 1에 나타낸다.

[0068] 비)교예 1

효모 균체 농축물에 잔탄검을 첨가하지 않은 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 처리하여, 분말 건조 효모를 얻었다. 얻어진 분말 건조 효모 중의 SAMe 함량, 질량, 얻어진 SAMe 함유 건조 효모의 밀폐 유리용기 내, 40°C, RH 75%의 가속 조건 하에서의 보존안정성 시험 결과, 관능 검사 결과를 표 1에 나타낸다.

[0070] 비)교예 2

효모 균체 농축물에 트레할로오스를 상기 효모 농축물 중의 SAMe에 대한 질량비로서 2.2배량 첨가한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 처리하여, 분말 건조 효모를 얻었다. 얻어진 분말 건조 효모 중의 SAMe 함량, 질량, 얻어진 SAMe 함유 건조 효모의 밀폐 유리용기 내, 40°C, RH 75%의 가속 조건 하에서의 보존안정성 시험 결과, 관능 검사 결과를 표 1에 나타낸다.

[0072]

[표 1]

예 비교 예 1	첨가물 무	건조효모 조성물에 대한 첨가물의 질량(%)			건조 전 액에 대한 첨가량 질량(%)			시험개시시 건조효모 증의 SAMS 함량 (질량%)			보존안정성 시험 SAMS 잔존율(%)			60일 후의 이후 0주 규모*			
		30일 후			45일 후			60일 후			30일 후			45일 후			
		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
실시예 1	잔탄검	0.48	0.1	16.1%	60.1%	46.4%	28.1%	△									
실시예 2	잔탄검	4.6	1.0	12.3%	99.6%	99.6%	99.5%	○									
실시예 3	잔탄검	32.0	10.0	11.9%	99.7%	99.7%	99.7%	○									
실시예 4	잔탄검	68.6	50.0	5.2%	99.8%	99.8%	99.7%	○									
실시예 5	커드란	0.48	0.1	15.9%	58.8%	44.5%	25.1%	△									
실시예 6	커드란	4.6	1.0	13.3%	94.9%	94.7%	94.4%	○									
실시예 7	커드란	32.0	10.0	11.6%	99.8%	99.8%	99.7%	○									
실시예 8	커드란	68.6	50.0	5.1%	99.8%	99.8%	99.8%	○									
실시예 9	구아검	4.6	1.0	9.1%	99.7%	99.7%	99.6%	○									
실시예 10	타마린드검	4.6	1.0	14.6%	92.8%	92.5%	92.3%	○									
실시예 11	젤란검	4.6	1.0	12.2%	99.7%	99.6%	99.5%	○									
비교 예 2	트레할로오스	32.0	10.0	12.5%	10.4%	0.0%	0.0%	×									

* 관능 검사: ×:이취 있음, △:이취가 조금 있음, ○:이취 없음

[0073]

실시예 12~19

200L 배양조를 이용하여, 고형분 농도가 18.2질량%인 SAMe 함유 효모 농축액(SAMe 함량 3.7질량%)에 대한 첨가물의 양을 1질량%로 하고, 첨가물로서 κ -카라기난(실시예 12), 잔탄검(실시예 13), 구아검(실시예 14), 타마린드검(실시예 15), 커드란(실시예 16), 젤란검(실시예 17), 알긴산(실시예 18), Ceolus ST-02(결정 셀룰로오스)(실시예 19)를 첨가하여, 동결건조 후의 회수율, SAMe 함유량(질량%) 40°C에서 30일, 60일 후의 SAMe 잔존율을 측정하였다.

[0076]

실시예 12~19의 상세한 실시예의 조건은 이하와 같다.

[0077]

(a) 효모 균체의 배양

[0078]

실시예 1과 동일한 조건으로 배양하여, 균체 농도 3.5질량%, SAMe 함량 201.5mg/g - 건조 효모의 효모 균체 배양액 120L를 얻었다.

[0079]

(b) 효모 균체의 집균

- [0080] 상기 효모 균체 배양액 120L를 연속 로터리형 원심분리기(Hitachi Himac Centrifuge CR10B2)로 처리하여, 균농도가 건조물 환산으로 18질량%에 상당하는 액상의 효모 균체 농축물을 23.4kg을 얻었다.
- [0081] (c) 효모 균체 농축물에 대한 증점제의 첨가
- [0082] 상기 효모 균체 농축물 23.4kg에 상기한 실시예 12~19의 증점제를 상기 효모 농축물 중의 SAMe에 대한 질량비로서 1.0배량 첨가하고, 실온에서 30분간 교반 혼합하여, 실시예 12~19의 증점제를 첨가한 효모 균체 농축물을 얻었다.
- [0083] (d) 건조 효모의 제조
- [0084] 상기한 실시예 12~19의 증점제를 첨가한 효모 균체 농축물을 동결건조기(Japan Vacuum Technology Co., Ltd. 제)의 동결건조용 스테인리스 트레이에 부어 넣고 -50°C에서 동결한 후, 최종 선반 온도 25°C의 조건으로 36시간 동결건조하였다. 얻어진 동결건조 효모를 추가로 분쇄함으로써 분말 건조 효모를 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 분말 건조 효모를 밀폐 유리용기 안에 채워, 40°C, RH 75%의 가속도 시험 조건 하에서 보존안정성 시험을 수행하였다. 표 2에 40°C, RH 75%에서의 가속 보존안정성 시험 결과를 나타내었다. 한편, SAMe 잔존율은, 상기 방법으로 측정하였다. 또한, SAMe 함유 효모 농축액에 대한 첨가물의 혼합 정도에 대해서는, 육안으로 분산 상황을 관찰하여 평가하였다. 첨가물의 혼합 정도, 동결건조 후의 회수율, 형상, 건조 후 SAMe 함유량(질량%), 40°C에서 30일, 60일 후의 SAMe 잔존율의 결과를 정리하여 표 2에 나타낸다.

[표 2]

비교예 1	첨가물	건조 전 농축액에 대한 첨가량 (질량%)	첨가물의 혼합 정도*	건조 후의 회수율	건조 후 양상	보존안정성 시험		
						건조 후의 SAMS 함유량 (질량%)	30일 후 SAMS 잔존율(%)	60일 후 SAMS 잔존율(%)
실시예 12	κ -카라기난	1%	○	97%	분말상	14.0%	70.1%	58.5%
실시예 13	잔탄검	1%	△	98%	분말상	12.3%	99.5%	99.3%
실시예 14	구아검	1%	○	98%	분말상	9.1%	99.6%	99.5%
실시예 15	티마린드검	1%	○	97%	분말상	14.6%	93.1%	92.2%
실시예 16	카드란	1%	△	96%	고무상	13.3%	95.0%	94.1%
실시예 17	젤린검	1%	△	96%	고무상	12.2%	99.6%	99.4%
실시예 18	알긴산	1%	△	98%	분말상	16.1%	69.5%	54.0%
실시예 19	Ceolus ST-02 (결정셀룰로오스)	1%	○	98%	분말상	16.8%	76.8%	64.0%

*: 관찰 검사: ○: 균일하게 분산, △: 거의 균일하게 분산

[0086]

[0087] 비교예 3

[0088] L-메티오닌을 포함하지 않는 배지에서 배양하는 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 처리하여, 분말 건조 효모를 얻었다. 얻어진 분말 건조 효모 중에는 SAMe는 함유되지 않았다. 이것을 이용하여 이하와 같이 실험하였다.

[0089] 성능 평가의 시험예 1~5, 비교 성능시험의 평가예 1, 2

[0090] 실시예 2, 6, 9, 10, 11, 비교예 1, 및 비교예 3에서 얻은 건조 효모에 대하여, 문헌에 기재된 방법(비특허문헌 2)과 마찬가지로 SD계 랫트(수컷 8주령, 동물수: 각 군 n=3)를 이용하여, 생체흡수성 시험을 성능평가의 시험예 1~5, 비교 성능시험의 평가예 1, 2로 행하였다.

[0091] 흡수성 시험은, 비특허문헌 2(J of Chromatography B, 863, 94-100(2008))의 방법을 이용하여 행하였다. 랫트에 대한 건조 효모의 투여량은, SAMe로 300mg/kg - 랫트의 투여량이 되도록 건조 효모를 증류수에 분산시킨 상태에서 랫트에 경구투여하고, 경구투여 후 0.5, 2, 3, 5시간 후의 랫트의 혈액을 채취하고, 혈액은 재빨리 원심 분리에 의해 혈장 성분을 분리하고, 과염소산을 이용한 SAMe 성분의 추출물을, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)로, LC-MS-MS법(Liquid chromatography coupled with mass spectrometry)에 의해 이하의 조건으로 분석하였다. 그 결과, 각 건조 효모 모두 경구투여 2시간 후에 혈장 중 SAMe 농도가 가장 높았다. 각 건조 효모의 경구투여 2시간 후 생체흡수성 시험 결과를 표 3에 나타낸다. 표 3으로부터, 모든 시험예에서, 증점제를 첨가한 건조 효모의 생체흡수성이, 평가예 1로서 나타내는 첨가 처리를 행하지 않은 비교예 1의 건조 효모에 의한 경우 보다도 향상되는 것이 확인되었다.

[0092] 한편, 생체흡수성 시험에 이용된 분석기기, 조건은 이하와 같다.

[0093] LC-MS-MS법

[0094] LC-MS-MS 장치: Thermo Corp제, Accela, LTQ orbitrap Discovery

[0095] HPLC 조건

[0096] 컬럼: GL Sciences, Inc.제, Intersil ODS-3(4.6mm×150mm)

[0097] 유속: 0.5mL/min, 컬럼 오븐: 40°C, 검출기: UV(260nm), SAMe 유지 시간: 약 145초, 주입량: 10 μL

[0098] 용리액: 2 mmol/L 헵타플루오로부티르산 수용액:아세토니트릴=30:70

[0099] MS 조건

[0100] Ion Source: ESI

[0101] Ion Polarity Mode: Positive

[0102] Scan Mode Type: FT full mass

[0103] Resolution: 30000

[0104] Mass Range: m/z 360-410

[0105]

[표 3]

표 3

건조효모의 유래하는 실시예 등	첨가물	건조 전 효모 조성물에 대한 첨가물 (질량%)	건조 전 용액에 대한 첨가물 (질량%)	시험개시시의 건조효모 중의 SAMe 함량 (질량%)	경구투여 2시간 후 혈장 중 SAMe 농도(µg/ml)
평가예 1 (비교예 1)	무	0.0	0.0	14.5%	0.96
평가예 2 (비교예 3)	무	0.0	0.0	0.0%	0.13
시험예 1 (실시예 2)	잔탄검	4.6	1.0	12.3%	1.33
시험예 2 (실시예 6)	커드란	4.6	1.0	13.3%	1.21
시험예 3 (실시예 9)	구아검	4.6	1.0	9.1%	1.83
시험예 4 (실시예 10)	타마린드검	4.6	1.0	14.6%	1.18
시험예 5 (실시예 11)	젤란검	4.6	1.0	12.2%	1.19

[0106]

[0107]

[산업상 이용가능성]

[0108]

본 발명의 조성물을 이용함으로써, S-아데노실-L-메티오닌을 함유하는 보존안정성이 우수한 조성물, 나아가, 생체흡수성이 우수한 조성물로서, 의약이나 건강식품용 생리활성 물질로서 유효하게 이용할 수 있다.

[0109]

본 발명의 제조 방법은, S-아데노실-L-메티오닌을 고농도로 포함하고, 보존안정성이 우수한 조성물을, 저비용으로 간편하게 제조하는 방법으로서 이용할 수 있다.