

명세서

발명의 명칭: 글루타치온을 생산하는 효모 균주 및 이를 이용한 글루타치온 생산방법

기술분야

- [1] 본 출원은 신규한 글루타치온을 생산하는 효모 균주 및 이를 이용한 글루타치온 생산방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 글루타치온(Glutathione, GSH)은 세포 내에서 가장 일반적으로 존재하는 유기 황화합물로 글리신(glycine), 글루탐산 (glutamate), 시스테인(cysteine) 세 아미노산들이 결합한 트리펩타이드(tripeptide) 형태이다.
- [4] 글루타치온은 체내에서는 환원형 글루타치온(GSH)과 산화형 글루타치온(GSSG) 두 가지 형태로 존재한다. 일반적인 상황에서 상대적으로 높은 비율로 존재하는 환원형 글루타치온(GSH)은 인체의 간과 피부 세포에 주로 분포하며 활성산소를 분해·제거하는 항산화 기능, 독성물질과 같은 외인성 화합물의 제거 등 해독 작용, 멜라닌 색소 생성을 억제하는 미백작용 등 중요한 역할을 한다.
- [5] 노화가 진행될수록 글루타치온 생성량은 점점 감소하기 때문에, 항산화, 해독작용에 중요한 역할을 하는 글루타치온 생성량의 감소는 노화의 주범인 활성산소의 축적을 촉진시키므로, 외부에서 글루타치온의 공급이 필요하다(Sipes IG et al, The role of glutathione in the toxicity of xenobiotic compounds: metabolic activation of 1,2-dibromoethane by glutathione, Adv Exp Med Biol. 1986;197:457-67.).
- [6] 이와 같이 다양한 기능을 지닌 글루타치온은 제약, 건강기능식품, 화장품 등 다양한 분야의 소재로 각광받고 있으며 맛소재, 식품 및 사료 첨가제 제조에 이용되기도 한다. 글루타치온은 원물의 맛 상승과 풍부한 맛 지속성 유지효과가 크며, 단독으로 사용하거나 다른 물질과 배합하여 고쿠미(kokumi) 향미증진제로 사용할 수 있음이 알려져 있다. 보통 고쿠미 소재는 기존 핵산, MSG 등의 우마미(umami) 소재보다 농후감을 가지며, 단백질이 분해 숙성되어 생성되는 것으로 알려져 있다.
- [7] 그러나 이와 같이 다양한 분야에 사용할 수 있는 글루타치온에 대한 수요가 증가되고 있음에도 불구하고, 글루타치온의 산업적 생산에 적지 않은 비용이 필요하기 때문에 시장이 크게 활성화되지 못하는 실정이다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 예의 노력한 결과, 글루타치온 생산능이 우수한 새로운 균주를 개발함으로써 본 출원을 완성하였다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 본 출원의 목적은 글루타치온을 생산하는 신규 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균주를 제공하는 것이다.
- [12] 본 출원의 다른 목적은 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 글루타치온 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 출원의 다른 목적은 상기 균주를 배양하는 단계 및 상기 배양된 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 및 이들로부터 회수된 글루타치온 중에서 선택된 하나 이상의 물질과 첨가제를 혼합하는 단계; 를 포함하는, 글루타치온 포함 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [14] 본 출원의 다른 목적은 상기 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는 항산화 기능용, 해독용, 면역 증강용, 화장품용, 식품용, 사료용 조성물을 제공한다.
- [15] 본 출원의 다른 목적은, 상기 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는, 글루타치온 결핍에 기인하는 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 의약품 제조용 조성물 또는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[16]

발명의 효과

- [17] 본 출원의 균주는 기존 글루타치온 생산 균주에 비해 글루타치온을 현저히 다량으로 생산할 수 있다. 따라서 본 출원의 균주를 글루타치온 제조에 유용하게 사용할 수 있다.
- [18] 또한 본 출원의 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는 조성물은 우수한 활성 산소 제거능을 가지므로, 항산화 기능용, 해독용, 면역력 증강용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [19] 따라서, 상기 조성물은 화장품용 조성물, 의약품 조성물 및 이의 제조에도 유용하게 사용될 수 있다.
- [20] 또한, 상기 조성물을 식품에 사용하는 경우 전술한 기능 뿐만 아니라 식품의 정미성을 우수하게 하므로, 식품조성물 및 사료 조성물 제조에도 유용하게 사용될 수 있다.

[21]

도면의 간단한 설명

[22]

도 1은 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1D, CJ-5, CJ-37 균주의 추출물을 포함하는 식품조성물의 관능평가 결과이다.

[23]

도 2는 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1D, CJ-5, CJ-37 균주의 추출물의 라디칼제거능을 확인한 결과이다.

[24]

도 3은 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1D, CJ-5, CJ-37 균주의 활성산소흡수능을 확인한 결과이다.

[25]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26]

이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[27]

또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 출원의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 출원에 포함되는 것으로 의도된다.

[28]

[29]

본 출원의 하나의 양태는 글루타치온을 생산하는 신규 사카로마이세스 세레비지에 균주를 제공할 수 있다.

[30]

본 출원의 글루타치온 생산 균주는 기탁번호 KCCM12568P 인 사카로마이세스 세레비지에 CJ-5 균주일 수 있다.

[31]

[32]

본 출원의 글루타치온 생산 균주는, 다른 동속동종의 사카로마이세스 세레비지에, 구체적으로는 사카로마이세스 세레비지에 또는 사카로마이세스 세레비지에 YJM1592의 18S (ITS, 5.8S) rRNA 서열(서열번호 3)과 90% 이상, 구체적으로는 91%, 92%, 93%, 93.2%, 93.5% 또는 93.7% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 18S (ITS, 5.8S) rRNA 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로는, 본 출원의 글루타치온 생산 균주는 YJM1592의 18S (ITS, 5.8S) rRNA 서열과 90% 이상, 구체적으로는 91%, 92%, 93%, 93.2%, 93.5% 또는 93.7% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖고, 96%, 95.5% 또는 95.2% 미만의 동일성을 갖는 18S (ITS, 5.8S) rRNA 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 18S (ITS, 5.8S) rRNA 서열은, 18S rRNA와 5.8S 사이에 존재하는 ITS(Internal transcribed spacer) 서열로 종 분류에 이용되는 서열이다.

[33]

본 출원의 글루타치온 생산 균주는 서열번호 1의 18S (ITS, 5.8S) rRNA 서열을 갖는 것일 수 있다. 일 실시예에 따르면 상기 균주의 18S (ITS, 5.8S) rRNA 서열은 서열번호 1과 90% 이상, 구체적으로는 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의

- 상동성 또는 동일성을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [34] 본 출원에서 용어 '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [35] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 따라 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.
- [36] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ETA/.] (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [37] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48 : 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의

0.10 페널티 (또는 겹 개방 페널티 10, 겹 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 겹을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.

- [38] 또한, 임의의 두 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법으로 결정될 수 있다.
- [39]
- [40] 본 출원의 "글루타치온(glutathione)"은 "글루타티온", "GSH"와 상호 교환적으로 사용되며, 글루타메이트(glutamate), 시스테인(Cysteine), 글라이신(glycine)의 세가지 아미노산으로 구성된 트리펩타이드를 의미한다. 글루타치온은 제약, 건강기능식품, 맛소재, 식품, 사료 첨가제, 화장품 등의 원료로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [41] 본 출원의 신규한 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주는 글루타치온 생산능이 높은 것을 특징으로 한다.
- [42] 상기 균주는 글루타치온 생산능이 강화된 균주, 글루타치온 생산능이 높은 균주 또는 글루타치온 생산능이 증가된 균주일 수 있다.
- [43] 본 출원의 "글루타치온을 생산하는 균주"는 "글루타치온 생산능을 갖는 균주", "글루타치온 생산 균주" 등의 용어와 교환적으로 사용될 수 있다.
- [44] 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비지애 균주는 건조 균체 중량 대비 0.6 중량% 이상, 구체적으로 0.7 중량% 이상, 0.8 중량% 이상, 0.9 중량% 이상, 1.0 중량% 이상, 1.1 중량% 이상의 글루타치온을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [45]
- [46] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 균주를 포함하는 글루타치온 생산용 조성물을 제공할 수 있다.
- [47] 본 출원에서, "글루타치온 생산"내지 "글루타치온 제조"는 글루타치온을 균체 내에 축적하는 것을 포함할 수 있다.
- [48] 상기 글루타치온 생산용 조성물은 본 출원의 균주에 의해 글루타치온을 생산할 수 있는 조성물로, 일 예로, 상기 조성물은 상기 균주를 포함하고, 추가로 상기 균주를 이용하여 글루타치온을 생산할 수 있는 구성을 제한없이 포함할 수 있다.
- [49] 본 출원의 글루타치온 생산용 조성물은 당해 글루타치온 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 첨가제는 자연 유래 또는 비자연적인(non-naturally occurring) 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [50] 상기 첨가제는 부형제 및/또는 유효제를 포함할 수 있다. 상기 부형제는 목적하는 용도나 형태에 따라 적절히 선택하여 사용할 수 있으며, 예를 들어, 전분, 글루코오스, 셀룰로오스, 락토오스, 글리코젠, D-만니톨, 소르비톨, 락티톨, 말토덱스트린, 탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘,

염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메틸셀룰로오스, 콜로이드성실리카겔, 하이드록시프로필스타치, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤, 아라비아 검 중에서 선택되는 것일 수 있으며, 구체적으로는 전분, 글루코오스, 셀룰로오스, 락토오스, 덱스트린, 글리코젠, D-만니톨, 말토덱스트린 중에서 선택되는 하나 이상의 성분일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 유화제는 글리세롤에스테르, 수솔비탄에스테르, 모노글리세라이드, 다이글리세라이드, 트리글리세라이드, 수크로오스 에스테르, 솔비탄 에스테르, 프로펠렌글리콜에스테르, 글리세린지방산에스테르, 솔비탄지방산에스테르, 프로펠렌글리콜지방산에스테르, 자당지방산에스테르, 레시틴 또는 그 혼합물 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 것을 적절히 사용할 수 있다.

[51] 상기 부형제는, 예를 들어, 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 또는 등장화제 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[52]

[53] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 글루타치온 제조방법을 제공할 수 있다. 상기 균주 배양을 통해 글루타치온이 균체 내에 축적될 수 있다.

[54] 본 출원의 균주의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 사카로마이세스속 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용될 수 있으며, 구체적으로는 본 출원의 균주를 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 또는 혐기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[55] 본 출원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스 등과 같은 탄수화물; 만니톨, 소르비톨 등과 같은 당 알코올, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 유기산; 글루탐산, 메티오닌, 라이신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있고, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있다.

[56] 상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카제인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로

사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [57] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다.
- [58] 그 외에 상기 배지에는 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 균주의 배양 배지에는 L-아미노산 등이 첨가될 수 있다. 구체적으로는 글리신(glycine), 글루탐산(glutamate), 및/또는 시스테인(cysteine) 등이 첨가될 수 있고, 필요에 따라서는 라이신(lysine) 등의 L-아미노산 이 더 첨가될 수 있으나 반드시 이에 제한되지 않는다.
- [59]
- [60] 상기 배지 또는 전구체는 배양물에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [61] 본 출원에서, 균주의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.
- [62] 배양물의 온도는 25°C 내지 40°C일 수 있으며, 보다 구체적으로는 28°C 내지 37°C일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 배양 기간은 원하는 유용 물질의 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 1 시간 내지 100 시간일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [63]
- [64] 상기 글루타치온 제조방법은, 상기 배양 단계 이후, 추가적인 공정을 더 포함할 수 있다. 상기 추가 공정은 글루타치온 용도에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [65] 구체적으로, 상기 글루타치온 제조방법은 상기 배양 단계 이후 상기 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중에서 선택된 하나 이상의 물질로부터 글루타치온을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [66] 본 출원에서 "배양물"은 본 출원의 균주를 배양하여 수득한 결과물일 수 있다. 예를 들어 균주를 배지에 배양하여 영양분을 섭취하고 물질대사를 통해 생겨난 부산물이 포함된 배지 일 수 있으며, 상기 배지의 회석액이나, 농축액, 상기 배지를 건조하여 얻은 건조물, 상기 배지의 조정제물이나 정제물 또는 이들의 혼합물 등, 상기 배지를 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 배양물을 포함한다. 본 출원의 미생물의 배양물은 상기 미생물을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 배양에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [67] 본 출원에서 "파쇄물"은 상기 균주 또는 이의 배양물을 파쇄 또는 용균하여 수득한 결과물, 또는 상기 파쇄물을 원심분리하여 얻어진 상등액일 수 있다.

- [68] 상기 배양물, 파쇄물, 이들의 상등액 및 이들의 분획물 역시 본 출원 범위에 포함된다. 상기 방법은 상기 회수 단계 이전, 혹은 동시에 균주를 용균시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 균주의 용균은 본 출원이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 방법, 예를 들어, 용균용 완충용액, 소니케이터, 열 처리 및 후렌치 프레스 등에 의해 실시할 수 있다. 또한 상기 용균 단계는 세포벽 분해 효소, 핵산 분해 효소, 핵산 전이 효소, 단백질 분해 효소 등 효소반응을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [69] 본 출원의 목적상, 상기 글루타치온 제조방법을 통해 글루타치온이 고함량으로 포함된 건조 효모(Dry yeast), 효모 추출물(yeast extract), 효모추출물 혼합 분말(yeast extract mix powder), 순수 정제된 글루타치온(pure glutathione)을 제조할 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 목적하는 제품에 따라 적절하게 제조될 수 있다.
- [70] 본 출원에서 건조 효모(dry yeast)는 "균주 건조물" 등의 용어와 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 건조 효모는 글루타치온을 축적한 효모 균체를 건조시켜 제조할 수 있으며, 구체적으로 사료용 조성물, 식품용 조성물 등에 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [71] 본 출원에서 효모 추출물(yeast extract)은 "균주 추출물" 등의 용어와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 상기 균주 추출물은, 상기 균주의 균체에서 세포벽을 분리하고 남은 물질을 의미할 수 있다. 구체적으로, 균체를 용균시켜 수득한 성분에서 세포벽을 제외한 나머지 성분을 의미할 수 있다. 상기 균주 추출물은 글루타치온을 포함하며, 글루타치온 외의 성분으로는 단백질, 탄수화물, 핵산, 섬유질 중 하나 이상의 성분이 포함되어 있을 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [72] 상기 회수 단계는 당해 기술 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여, 목적 물질인 글루타치온을 회수할 수 있다.
- [73] 상기 회수 단계는 정제 공정을 포함할 수 있다. 상기 정제 공정은 균주로부터 글루타치온만을 분리하여 순수 정제하는 것일 수 있다. 상기 정제 공정을 통해, 순수 정제된 글루타치온(pure glutathione)이 제조될 수 있다.
- [74] 필요에 따라, 상기 글루타치온 제조방법은, 상기 배양 단계 이후 수득된 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 및 이들로부터 회수된 글루타치온 중에서 선택된 물질과 첨가제를 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 혼합 단계를 통해 효모추출물 혼합 분말(yeast extract mix powder)이 제조될 수 있다.
- [75] 상기 첨가제는 부형제 및/또는 유화제를 포함할 수 있다. 부형제, 유화제는, 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있으며, 이의 예시는 전술한 바와 같다.
- [76]
- [77] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 상기 균주를 배양하는 단계; 및 배양된 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 및 이들로부터 회수된 글루타치온 중에서 선택된 물질과 첨가제를 혼합하는 단계; 를 포함하는, 글루타치온을 포함하는

조성물 제조 방법을 제공할 수 있다.

- [78] 본 출원의 조성물은, 자연적으로 발생한 물질 또는 자연적으로 비발생한(Non-naturally occurring) 물질을 추가로 포함할 수 있다. 상기 물질은 목적하는 조성물의 용도에 따라, 약학적으로 허용가능한 담체, 식품학적으로 허용되는 담체, 화장품학적으로 허용되는 담체 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 담체는 공지된 내용을 토대로 당업자가 적절히 선택할 수 있다.
- [79] 상기 조성물에서, 전체 조성물 대비 본 출원의 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 및 이들로부터 회수된 글루타치온 중에서 선택된 물질의 함량은, 전체 조성물 중량 대비 3 내지 30 중량 %일 수 있다.
- [80] 상기 첨가제는 부형제 및/또는 유화제를 포함할 수 있다. 부형제, 유화제는, 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있으며, 이의 예시는 전술한 바와 같다.
- [81]
- [82] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 상기 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는, 항산화 기능용, 해독용, 면역 증강용, 화장품용, 식품용 또는 사료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [83] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 상기 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는, 항산화 기능용, 해독용, 면역 증강용, 화장품용, 식품용 또는 사료용 조성물의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [84] 본 출원의 목적상 상기 조성물은 균주 자체를 포함할 수도 있으며, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 건조물, 상기 균주의 추출물, 상기 균주의 파쇄물을 포함할 수 있고, 상기 균주의 배양물, 추출물, 건조물, 파쇄물로부터 글루타치온을 회수하여 이를 포함할 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물은 글루타치온을 포함하고 있으므로, 조성물의 구체적인 용도에 따라 글루타치온이 포함되는 형태가 다소 달라질 수는 있으나, 목적하는 글루타치온의 함량을 증가시킬 수 있는 한, 어떠한 형태로든 제한없이 포함될 수 있다.
- [85] 상기 조성물에서, 전체 조성물 대비 본 출원의 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 및 이들로부터 회수된 글루타치온 중에서 선택된 물질의 함량은, 전체 조성물 중량 대비 3 내지 30 중량 %일 수 있다. 또한, 상기 조성물은 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [86] 상기 조성물은 본 출원의 글루타치온을 생산하는 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중 하나 이상의 물질을 포함하여, 증대된

글루타치온 함량을 갖는 것일 수 있다.

[87]

[88] 본 출원의 하나의 양태는, 상기 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는, 항산화 기능용 조성물을 제공할 수 있다.

[89] 본 출원의 "항산화"는, 넓은 범위로는 자연계에서 발생하는 산화반응의 생성을 억제, 감소 또는 제어하는 작용을 의미할 수 있고, 보다 구체적으로는 체내에서 생성되는 자유라디칼, 상기 자유라디칼로부터 생성되는 과산화수소 또는 과산화물, 상기 과산화수소로부터 생성되는 하이드록시 라디칼의 생성 또는 반응을 억제, 감소 또는 제어하는 작용을 의미할 수 있다.

[90]

[91] 본 출원의 하나의 양태는, 상기 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는, 해독용 조성물을 제공할 수 있다.

[92] 본 출원의 "해독"은, 유해물질로 인한 독성을 제거 또는 감소시키는 작용을 모두 포함할 수 있다.

[93] 글루타치온은 세포에 의해 생산된 내인성 산화방지제이며, 자유 라디칼 및 활성 산소 화합물의 중화에 직접적으로 관여할 뿐만 아니라, 비타민 C 및 E와 같은 외인성 산화방지제를 환원형으로 유지시킬 수 있으므로, 상기 해독은 활성산소 내지 자유라디칼, 상기 자유라디칼로부터 생성되는 과산화수소 또는 과산화물, 상기 과산화수소로부터 생성되는 하이드록시 라디칼의 생성 또는 반응을 억제, 감소 또는 제어하는 작용을 포함할 수 있다. 또한, 글루타치온은 세포단백질의 티올기를 보호할 수 있어, 아세트아미노펜 등 약물 과다복용으로 인한 부작용을 방지할 수 있으며, 대사 부산물로 생성되는 메틸글리옥살(methylglyoxal) 해독에도 사용되는바, 화합물의 독성을 완화 또는 감소시키는 것 역시 상기 해독의 범위에 포함될 수 있다.

[94]

[95] 본 출원의 하나의 양태는, 상기 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는, 면역 증강용 조성물을 제공할 수 있다.

[96] 본 출원의 용어 "면역 증강"은 항원에 대한 생체 방어능을 증진시키는 것으로, 구체적으로는 항원에 대한 세포성 및 체액성 면역능을 상승시키는 것을 의미할 수 있고, 구체적으로는 상기 조성물 투여 전에 비해 면역능이 증가한 것을 의미할 수 있다. 상기 면역 증강의 기작은 제한되지 않으나 예를 들어 대식세포 등 항원 제공 세포의 활성을 촉진하거나, 림프구에 대한 특이적인 활성을

촉진하여 이루어지는 것을 포함할 수 있다.

- [97] 전술한 바와 같이, 글루타치온은 강한 항산화력을 가지며 간기능을 향상시키고 체내 독성 물질의 분해를 돕는 역할을 할 수 있으며, 유해한 활성산소를 제거하고 면역체계에 관여할 수 있다. 즉, 글루타치온은 T림프구 및 백혈구의 활성을 증가시킴으로써 체내의 면역력을 증진시키고 각종 만성질환 등으로 쇠약해진 개체의 원기를 회복시킬 수 있는바, 본 출원의 글루타치온을 포함하는 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질은 면역 증강에 유용하게 사용될 수 있다.
- [98]
- [99] 본 출원의 하나의 양태는, 상기 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는 화장품용 조성물을 제공할 수 있다.
- [100] 본 출원의 "화장품용 조성물"은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 액체 세정료, 입욕제, 선크림, 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [101] 상기 화장품용 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 출원의 화장품용 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다.
- [102]
- [103] 본 출원의 하나의 양태는, 상기 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는 식품용 조성물을 제공할 수 있다.
- [104] 일 구현예로, 상기 식품용 조성물은 본 출원의 균주의 균체 또는 추출물을 포함하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 적용되는 식품에 따라 상기 균주 추출물에 첨가제를 포함하여 적절한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 균주 추출물은 전술한 바와 같다.
- [105] 상기 첨가제는 부형제 및/또는 유효제를 포함할 수 있다. 부형제, 유효제는, 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있으며, 이의 예시는 전술한 바와 같다. 또한 식품 보조 첨가제, 식품 안정제, 수분 보존제 등이 포함될 수 있다.

- [106] 본 출원의 "식품용 조성물"은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강 식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives)등의 모든 형태를 포함할 수 있다.
- [107] 상기 유형의 식품용 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [108] 상기 식품용 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 출원의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 쌀, 식용 곡분(식용 곡물가루), 곡물수프, 덮밥, 면류, 국밥, 즉석밥, 조미료, 도시락밥, 건조조리된 밥, 빵, 식용 당(糖)류, 떡, 비빔장, 소스, 향신료, 식용 소금, 양념, 양념용 분말, 가공처리, 냉동, 건조 및 조리된 과일 및 채소, 젤리, 잼, 설탕에 절인 과일, 달걀, 우유 및 그 밖의 유제품, 식용 유지(油脂), 커피, 코코아와 대용커피, 타피오카, 곡분 및 곡물조제품, 라면, 우동, 국수, 칼국수, 냉면, 죽, 수프, 국물요리, 인스턴트 식품(즉석식품), 냉동식품, 레토르트 식품, 기타 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [109] 본 출원의 식품용 조성물에서 포함할 수 있는 성분으로 통상의 식품과 같이 여러가지 생약추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당업계에 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 증진제, 안정화제 등을 포함할 수 있다.
- [110] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로서 천연 향미제(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 또한 맛과 영양을 보충시킬 목적으로 사용되는 통상의 식품 첨가물, 예를 들어 핵산, 아미노산, 유기산 등이 첨가될 수 있다.
- [111] 상기 외에 본 출원의 식품용 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 이의 염, 알긴산 및 이의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [112] 본 출원의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다.

- [113] 또한, 본 출원의 식품 조성물이 건강기능식품으로 이용되는 경우, 본 출원의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 출원의 식품은 보조제로 섭취가 가능하다.
- [114] 한편 본 출원의 식품용 조성물은 식품 첨가제로도 분류할 수 있는 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 및 조미소재 역시 포함할 수 있다.
- [115] 본 출원의 용어 '조미소재(flavor)'는 식품의 풍미를 증진시키기 위하여 첨가되는 소재일 수 있다. 상기 조미소재는 식품이 뛰어난 정미성을 갖도록 하는 소재일 수 있다.
- [116] 상기 조미소재는 맛 성분에서 나눌 수 있다. 즉, 풍미에 따라 뉴트럴(neutral) 조미소재, 소고기(beef) 풍미 조미소재, 닭고기(chicken) 조미소재, 돼지고기(pork) 조미소재, 코쿠미(kokumi) 조미소재 등으로 나눌 수 있다.
- [117] '코쿠미 조미소재(kokumi flavor)'는 코쿠미를 내는 조미소재를 의미하는 것으로서, 상기 '코쿠미'는 일본어에서 유래된 단어로서, 영어권에서는 'mouthfulness', 'continuity', 'thickness', 'heartiness'라고도 표현되고, 우리말로는 '진한 맛', '두터운 맛', '입안에 꽉 차는 맛', '농후한 맛', '진득한 맛' 등으로 표현되는 맛을 의미할 수 있다. '뉴트럴 조미소재(neutral flavor)'는 감칠맛(umami)을 극대화시키고 기타 다른 풍미를 최소화시킴으로써, 순하고 깔끔한 풍미를 내는 조미소재를 의미하는 것으로, 예컨대 오일 중에서 카놀라유나 포도씨유와 같은 오일을 뉴트럴한 풍미를 갖는다고 지칭할 수 있다. '정미성'은 신맛, 단맛, 짠맛, 쓴맛, 감칠맛 등을 가진다는 것을 의미할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [118] 본 출원의 식품용 조성물은, 전체 조성물 중량 대비 본 출원의 효모의 추출물을 3 내지 30 중량 % 포함할 수 있으며, 염화암모늄, 말토덱스트린, 분말결정포도당 및 유화제 중 선택된 1 이상의 성분을 더 포함할 수 있다. 일 구현예로서, 상기 식품 조성물은 전체 조성물 중량 대비 효모의 추출물을 3 내지 25 중량 % 포함하고, 염화암모늄 20 내지 35 중량 %, 말토덱스트린 25 내지 35 중량 %, 분말결정포도당 3 내지 7 중량 %, 유화제 0.1 내지 1 중량 %를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [119]
- [120] 본 출원의 하나의 양태는, 상기 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는 사료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [121] 구체적으로, 상기 사료용 조성물은 본 출원의 균주 자체, 균주 건조물, 균주추출물 중 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있고, 또는 상기 균주의 추출물 제조과정에서 수득한 세포벽 성분을 포함하는 것일 수 있으며, 일 예로 균주 건조물(dry yeast) 및/또는 균주 추출물(yeast extract)을 포함하는 것일 수

있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [122] 본 출원의 "사료용 조성물"은 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분으로, 본 출원에 따른 글루타치온 함량이 증가된 효모를 포함하는 사료는 당업계의 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 구체적으로는 농후사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있다.
- [123] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유류, 전분류, 박 류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [124]
- [125] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 상기 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물, 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온을 포함하는, 글루타치온 결핍에 기인하는 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 의약품 제조용 조성물을 제공할 수 있다.
- [126] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 상기 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물, 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온을 포함하는, 글루타치온 결핍에 기인하는 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [127] 본 출원에서 "약학적 조성물"은, 질병 또는 병리학의 의학적 진단, 치료, 처치 또는 예방에 사용하기 위한 화학적 또는 생물학적 화합물 또는 물질, 또는 둘 이상의 그러한 화합물 또는 물질의 혼합물 또는 조합일 수 있다.
- [128] 본 출원에서, "의약품 제조용 조성물"은 약학적 조성물과 동일한 의미로 사용되거나, 혹은 의약품 제조 및/또는 제형화에 필요한 임의의 추가적인 성분을 더 포함하는 조성물을 의미할 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [129] 전술한 바와 같이 글루타치온은 활성산소를 분해, 제거하는 항산화 기능, 해독 작용 및 면역력 증진에 기여하므로, 상기 균주, 이의 배양물, 건조물, 추출물, 파쇄물은, 글루타치온을 고농도로 포함하여 의약품 제조에 유용하게 사용될 수 있고, 상기 의약품은 글루타치온 결핍에 의한 질환을 치료하는 데 유용하게 사용될 수 있다.
- [130] 또한, 상기 균주, 이의 배양물, 건조물, 추출물, 파쇄물은, 글루타치온을 고농도로 포함하므로 그 자체로도 글루타치온 결핍에 기인하는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 성분에 포함될 수 있다.
- [131]
- [132] 상기 질환은, 글루타치온 결핍에 기인하는 질환이라면 제한되지 않는다. 일

에로, 활성산소의 축적, 및/또는 면역력 저하에 의해 발생하는 질환이라면 제한 없이 포함하고, 구체적으로 동맥경화증, 루게릭병, 파킨슨병, 알츠하이머, 근위축색경화증 및 헌팅톤병을 포함하는 퇴행성 신경질환, 심근경색, 협심증, 관상동맥질환, 허혈성 심장질환을 포함하는 심혈관 질환, 뇌졸중을 포함하는 허혈성 뇌질환, 당뇨병, 위염 및 위암을 포함하는 소화기계 질환, 암, 백혈병, 백내장, 노화, 류마티스 관절염, 간염, 아토피성 피부염 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [133] 상기 의약품 및/또는 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 출원의 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 상기 의약품에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미할 수 있다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기재, 부형제, 율활제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다.
- [134] 또한 상기 의약품 및/또는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화된 것일 수 있다. 나아가, 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태의 피부 외용제의 형태로 사용될 수 있다. 본 출원의 의약품에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [135] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 율활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [136] 상기 의약품 및/또는 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수

있다. 본 출원의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[137] 상기 용어 "개체"란 는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미할 수 있다. 구체적으로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[138] 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[139]

[140] 본 출원의 다른 하나의 양태는, 상기 균주의 글루타치온 생산 용도를 제공할 수 있다.

[141] 상기 균주에 대해서는 전술한 바와 같다.

[142]

발명의 실시를 위한 형태

[143] 이하 본 출원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[144]

[145] 실시예 1: 글루타치온 생산이 우수한 균주 선별 및 글루타치온 생산능 확인

[146] 다양한 균주를 함유하고 있는 누룩으로부터 균주를 수득하고 이를 개량하여 글루타치온 생산능이 높은 균주를 선별하였다.

[147] 구체적으로, 대한민국 경기도 용인 이천 평택 화성 지역 등 총 20개 지역에서 쌀, 보리, 녹두, 귀리 등 곡물시료를 채취하여 누룩을 만들었다. 채취한 곡물시료를 분쇄한 후 반죽하여 형겅에 싸고 단단히 눌러 모양을 만든 다음, 짚으로 싸서 10일간 발효시킨 후, 서서히 건조시켜서 누룩을 제조하였다. 제조된 누룩으로부터 다양한 균주를 분리하고자 하기와 같이 실험을 수행하였다. 5g의 누룩에 45 ml의 식염수를 첨가하여 혼합기로 분쇄하였다. 효모 균주의 순수분리는 serial dilution하여 YPD Agar(Yeast extract 10 g/L, Bacto peptone 20 g/L, Glucose 20 g/L, 증류수 1리터 기준)에 spreading하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 그리고, colony 형태와 현미경 검증을 통해 효모의 colony를 YPD

agar에 streaking 하였다. 250 ml 삼각플라스크에 YPD broth를 25ml 분주하고 순수 분리된 균주를 접종하여 48시간동안 진탕 배양(30°C, 200 rpm)하여 글루타치온 생산량을 확인하여 균주 스크리닝을 수행하였다.

[148] 1차적으로 분리된 균주들의 개량을 위해, 분리된 균주에 돌연변이(random mutation)를 유도하였다. 상기 누룩으로부터 분리한 효모중 글루타치온 생산량이 15mg/L인 균주를 분리하여 CJ-37 균주로 명명하였다. CJ-37 균주를 고체배지에 배양한 후 broth에 접종하여 배양액을 수득하였으며, UV 램프를 이용하여 균체에 UV를 조사하였다. 이후, UV 조사된 배양액을 평판배지에 도말하여 콜로니를 형성한 변이 균주만을 분리 수득하였으며, 이들의 글루타치온 생산량을 확인하였다.

[149] 그 결과, 변이 균주의 글루타치온 생산량이 최대 105 mg/L임을 확인하고, 가장 우수한 글루타치온 생산량(105mg/L)을 나타내는 균주를 글루타치온 생산 균주로 선별하여 CJ-5 균주로 명명하였으며, 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 2019년 7월 31일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM12568P를 부여 받았다.

[150]

[151] 실시예 2: 글루타치온 생산능 비교

[152] 상기 실시예 1에서 선별한 CJ-5균주의 글루타치온 생산능을 확인하기 위하여 기존에 알려진 미생물 3종(표1)과 아래와 같은 방법으로 배양하여 GSH 생산능을 비교하고 분석하였다. 대조군으로 실시예 1에서 수득한 CJ-37 균주도 같이 배양하여 비교 분석하였다.

[153]

[154] [표1]

균주
1. Candida utilis KCCM50667
2. Kluyveromyces lactis ATCC8585
3 Saccharomyces cerevisiae CEN.PK2-1D

[155] 먼저 각 균주를 30°C에서 1일 배양한 후 25 ml의 YPD 배지(Yeast extract 10 g/L, Bacto peptone 20 g/L, Glucose 20 g/L, 증류수 1리터 기준)를 함유하는 250 ml의 코너-바플 플라스크에 균주들을 접종하고, 배양 시작 16시간 시점에 아미노산 (L-Cysteine, L-Glutamic acid, L-Glycine)을 20mM 농도로 첨가하여, 30°C에서 200rpm으로 배양하였다. GSH 농도 측정을 위해 균체를 포함한 배양액 샘플 500ul를 80°C에서 10분간 800rpm으로 lysis한 후 Abcam GSH Ration Detection Assay를 사용하여 GSH 농도를 측정하였다. OD값을 환산하여 건조중량을 산출하였으며, 이를 이용하여 GSH 함량(%)=GSH중량/효모건조중량으로

계산하였다. 결과를 표 2에 나타내었다.

[156]

[157] [표2]

균주 평가

Strain	16hr	24hr		
	OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	GSH(mg/L)	GSH함량(%)
<i>Candida utilis</i> KCCM50667	72.0	65.8	80.3	0.59
<i>Kluyveromyces lactis</i> ATCC8585	81.0	74.2	99.0	0.65
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1D	28.9	39.0	31.3	0.39
CJ-37	35.4	37.2	14.6	0.19
CJ-5	41.0	46.0	105.2	1.11

[158]

[159] 5종 효모에 대하여 GSH 생산능을 평가한 결과 CJ-5 균주가 균체 대비 GSH함량이 가장 우수한 것을 확인하였다. 구체적으로 CJ-5 균주는 기존 GSH를 생산하는 균주인 캔디다 유틸리스(*Candida utilis*) KCCM50667 균주, 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) ATCC8585 균주 및 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) CEN.PK2-1D에 비해서도 균체 대비 GSH 함량이 약 200%-300% 이상으로 글루타치온 생산능이 매우 우수하였으며, 특히 CJ-37에 비해서는 GSH 생산능이 약 584% 향상된 것을 확인하였다.

[160] 이를 통해, CJ-5 균주가 GSH 생산능이 우수한 것을 확인하였는바, 본 출원의 균주가 GSH 생산에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[161]

[162] 실시예 3: 유전자 시퀀싱을 통한 CJ-5 균주의 18S(ITS, 5.8S)rRNA 확인

[163] 실시예 1에서 분리한 글루타치온 생산이 가장 우수한 CJ-5 균주와 글루타치온 생산량이 가장 낮은 CJ-37 균주의 분류를 확인하기 위해, 18S(ITS, 5.8S) rRNA 염기서열을 비교 분석하였다.

[164] 구체적으로, 균주의 18S (ITS, 5.8S) 리보솜 RNA(rRNA) 염기서열은 BLAST database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)를 사용하여 유사성을 비교하였다. CJ-5 균주의 18S(ITS, 5.8S) rRNA서열은 서열번호 1로, CJ-37 균주의 18S (ITS, 5.8S) rRNA 서열은 서열번호 2로, *Saccharomyces cerevisiae* YJM1592 chromosome XII 18S (ITS, 5.8S) rRNA 서열은 서열번호 3으로 나타내었다.

[165] 그 결과, CJ-5 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* YJM1592 chromosome XII 18S

(ITS, 5.8S) rRNA 서열과 93.73% 정도의 유사성을 나타내었다. 한편 CJ-37 균주 역시 *Saccharomyces cerevisiae* YJM1592 chromosome XII 18S (ITS, 5.8S) rRNA 서열과 95.20% 정도의 유사성을 나타내었다.

- [166] 이를 통해 CJ-5 균주와 CJ-37 균주 모두 *Saccharomyces cerevisiae* 균주임을 확인하였는 바, 이를 실시예 2의 실험결과와 연결하면 본 출원의 CJ-5 균주는 다른 속, 종의 균주 뿐 아니라, 동속 동종의 미생물에 비해서도 약 6배 가량 GSH 생산능이 높으며, 다른 동속 동종 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1D 에 비해서도 GSH 생산능이 284%, 약 3배 가량 증가한 것으로 해석할 수 있다.
- [167] 이와 같은 결과들은 본 출원의 균주가 GSH 생산능이 높아, 상기 균주, 이의 건조물, 추출물, 배양물 및/또는 파쇄물이 GSH를 원료로 하는 다양한 화장품, 식품, 사료 등에 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [168]
- [169] **실시예 4: 글루타치온을 포함하는 조성물의 제조**
- [170] 글루타치온을 함유하는 효모 추출물을 제조하기 위해 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1D, CJ-5 및 CJ-37 효모 배양액을 원심 분리기로 1차 원심 분리하였다.
- [171] 원심 분리된 효모를 2회 세척 및 원심분리를 반복하여 효모를 획득하였다. 이후 세포벽 분해 효소, 핵산 분해 효소, 핵산 전이 효소, 단백질 분해 효소를 첨가하여 pH 5.2, 온도 45°C에서 48 시간동안 효소반응시켰다.
- [172] 상기 효소 반응후, 상등액 중의 효소를 85°C에서 30분 동안 열처리하여 불활성화하고 효소가 불활성화된 상등액을 농축하여 효모추출물을 제조하였다.
- [173] 그 결과, *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1D, CJ-5 및 CJ-37 효모추출물은 총 중량 대비 0.8 %, 2.2 %, 0.4 % 수준의 글루타치온을 함유하였다.
- [174]
- [175] **실시예 5: 글루타치온을 포함하는 식품 조성물의 관능평가**
- [176] 실시예 4에서 제조한 효모 추출물을 포함하는, 식품 조성물의 관능평가를 수행하였다. 구체적으로 상기 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1D, CJ-5 및 CJ-37 효모추출물의 관능 평가를 위해 콘소메치킨스프를 베이스로 하여 관능평가를 수행하였다.
- [177] 관능 검사원을 대상으로 상기 효모추출물을 각각 5% 배합한 콘소메치킨스프 혼합물 만들어 관능평가를 진행하였다. 평가는 맛의 지속성(고쿠미), 감칠맛(우마미), 쓴맛(이미), 치킨맛 증가도, 부드럽고 깊은 맛 및 전체기호도에 대해 평가하였다.
- [178] 그 결과, CJ-5 효모추출물은 CEN.PK2-1D 효모추출물과 CJ-37 효모추출물보다 우수한 맛의 지속성(고쿠미)와 부드럽고 깊은 맛을 가짐을 확인할 수 있었으며 전체적인 기호도가 증가함을 확인할 수 있었다(도 1).
- [179] 이를 통해 본 출원의 효모추출물이 정미성이 뛰어난 식품 조성물을 제조에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였는바 상기 효모 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느

하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질 역시 식품조성물 제조에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[180]

[181] 실시예 6: 글루타치온을 포함하는 조성물의 항산화효과 확인

[182] 실시예 6-1: 라디칼 제거능 평가

[183] 글루타치온 함유 효모추출물의 라디칼 제거능을 평가하였다.

[184] 구체적으로, 실시예 4에서 제조한 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1D, CJ-5 및 CJ-37의 효모추출물 현탁액 5 mL에 0.1 mM 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl 5 mL을 첨가하여 어두운 곳에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 2-10 mg/mL의 농도 범위에서 CEN.PK2-1D, CJ-5 및 CJ-37 추출물은 각각 21~61%, 40~83%, 12~49%의 라디칼 제거효과를 보였다(도 2). 10 mg/mL의 농도에서 글루타치온 고함유 CJ-5 효모추출물의 항산화 활성이 CEN.PK2-1D 및 CJ-37 효모추출물 대비 최대 1.7배 활성이 증가함을 확인할 수 있었다.

[185]

[186] 실시예 6-2: 활성산소 흡수능 평가

[187] 글루타치온 함유 효모추출물의 항산화능을 평가하고자 활성산소 흡수능(ORAC; Oxygen Radical Absorbance Capacity)을 분석하였다.

[188] 구체적으로, 실시예 4에서 제조한 *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1D, CJ-5 및 CJ-37의 효모추출물 현탁액 5mL를 Fluorescein 40mL와 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시켰다. 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)-HCl 25mL을 첨가 후 60분 동안 485 nM 및 528 nM에서 흡광도를 측정하였다. 활성산소 흡수능은 흡광도 curve면적(AUC)을 구하여 비교하였다. CJ-5 효모추출물의 활성산소 흡수능은 CEN.PK2-1D 효모추출물 및 CJ-37 효모추출물보다 높았다(도 3). 상기한 바와 같이 본 발명의 CJ-5 효모추출물의 항산화능은 CEN.PK2-1D 및 CJ-37 효모추출물에 비하여 유의적으로 높았다.

[189] 이를 통해, 상기 효모추출물이 우수한 항산화능을 나타내는 것을 확인하였는바, 상기 효모 균주; 상기 균주의 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물; 및 상기 균주, 건조물, 추출물, 배양물, 파쇄물 중 어느 하나 이상으로부터 회수된 글루타치온; 중에서 선택된 하나 이상의 물질은 항산화, 해독 및 면역 증강에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[190]

[191] 제조예 1: 효모추출물을 포함하는 식품조성물의 제조

[192] 전술한 실험예로부터 효모추출물 특유의 감칠맛, 이미 및 이취 제어 효과 등을 확인하였는바, 본 출원의 효모의 추출물을 포함하는 식품 조성물을 제조하였다.

[193] 구체적으로, 효모추출물 3-30%, 염화암모늄 20-40%, 말토덱스트린 20-40%, 분말결정 포도당 1-10%, 유화제 0.1-1% 함량비를 갖는 효모추출물 혼합분말을 제조하였다.

[194]

- [195] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[196]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CJ-5	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12568P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2019년 7월 31일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다. ¹	
IV. 전환 요청의 수령	
상기 항목 I에 표시된 미생물은 에 본 국제기탁기관에 수탁되었고, 원기탁을 부다페스트 조약 하의 기탁으로 전환하기 위한 요청을 에 받았다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제대 2가길 45 유림빌딩 (우) 120-861	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2019. 07. 31.

¹ 규칙 6.4(d)에 따르면, 상기 일자에는 국제 기탁기관이 획득한 상태의 날짜이다.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 10월 29일

번역자 손 민

