



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2011-0081202  
 (43) 공개일자 2011년07월13일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.<br/> <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>A61K 35/74</i> (2006.01)<br/> <i>A61P 13/04</i> (2006.01) <i>C12R 1/225</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7008969</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년09월29일<br/>             심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년04월20일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2009/066881</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/038714<br/>             국제공개일자 2010년04월08일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>             JP-P-2008-254975 2008년09월30일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인<br/> <b>메이지 데이리즈 코포레이션</b><br/>             일본국 도쿄도 고토구 신스나 1조메 2반 10코</p> <p>(72) 발명자<br/> <b>오치 다이스케</b><br/>             일본국 가나가와 오다와라시 나루다 540 메이지<br/>             데이리즈 코포레이션 연구본부 내<br/> <b>츠보이 히로시</b><br/>             일본국 가나가와 오다와라시 나루다 540 메이지<br/>             데이리즈 코포레이션 연구본부 내</p> <p>(74) 대리인<br/> <b>서종완</b></p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 13 항

**(54) 높은 옥살산 분해능을 갖는 유산균**

**(57) 요약**

본 발명은 종래 알려져 있는 옥살산 분해활성을 갖는 유산균보다도 수배 높은 옥살산 분해활성을 갖는 유산균 및 그 용도를 제공하는 것을 과제로 한다.

상기 과제를 해결하기 위해 본 발명자들은 예의 연구한 결과, 인간 성인의 분변 및 위액으로부터 독자적으로 분리한 락토바실러스(Lactobacillus)속 유산균 132균주로부터, 옥살산을 대량으로 분해 가능한 유산균을 스크리닝하고, 그 결과, 10 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 6.5, 72시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 50% 이상인 것을 특징으로 하는 유산균을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

락토바실러스(Lactobacillus)속에 속하는 유산균으로서, 10 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 6.5, 72시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 50% 이상인 것을 특징으로 하는 유산균.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

락토바실러스(Lactobacillus)속에 속하는 유산균이, 락토바실러스 가세리(Lactobacillus gasseri)종 또는 락토바실러스 아밀로보러스(Lactobacillus amylovorus)종인 유산균.

### 청구항 3

이하의 (a) 내지 (d)로 이루어진 균으로부터 선택되는 유산균:

(a) 수탁번호: FERM BP-11005로서 기탁되어 있는 유산균 Lactobacillus gasseri OLL203195주;

(b) 수탁번호: FERM BP-11007로서 기탁되어 있는 유산균 Lactobacillus amylovorus OLL2741주;

(c) 수탁번호: FERM BP-11006으로서 기탁되어 있는 유산균 Lactobacillus amylovorus OLL2880주; 및

(d) 수탁번호: FERM BP-11004로서 기탁되어 있는 유산균 Lactobacillus gasseri OLL2727주.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 유산균의 처리물.

### 청구항 5

제1항, 제2항 또는 제3항에 기재된 유산균, 또는 제4항에 기재된 처리물을 포함하는 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

신장·요로결석을 치료 및/또는 예방하기 위한 조성물.

### 청구항 7

제5항에 있어서,

빈혈을 치료 및/또는 예방하기 위한 조성물.

### 청구항 8

제5항에 있어서,

골다공증을 치료 및/또는 예방하기 위한 조성물.

### 청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

의약 조성물인 조성물.

### 청구항 10

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

식품 조성물인 조성물.

### 청구항 11

제1항, 제2항 또는 제3항에 기재된 유산균, 또는 제4항에 기재된 처리물을 포함하는, 옥살산 또는 옥살산 화합물의 분해제.

**청구항 12**

옥살산 또는 옥살산 화합물을, 제1항, 제2항 또는 제3항에 기재된 유산균, 또는 제4항에 기재된 처리물에 접촉시키는 공정을 포함하는, 옥살산 또는 옥살산 화합물을 분해하기 위한 방법.

**청구항 13**

옥살산 또는 옥살산 화합물을 포함하는 조성물을, 제1항, 제2항 또는 제3항에 기재된 유산균, 또는 제4항에 기재된 처리물에 접촉시키는 공정을 포함하는, 옥살산 또는 옥살산 화합물이 저장화된 조성물의 제조방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 높은 옥살산 분해능을 갖는 유산균 및 그 용도에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 요로결석은 복부에 격심한 통증을 수반하는 경우가 많고, 이 통증은, 결석이 요로를 통과할 때의 자극 등에 의해, 갑자기 발생한다. 신장 결석은 무증상인 경우도 많으나, 무증상의 결석을 방치하고 있으면 수신증(水腎症)에 의한 신장 기능 저하나 세균 감염 등을 일으키는 경우도 있다.

[0003] 최근들어, ESWL(체외 충격파 결석 파쇄술)의 개발에 의해, 요로결석의 치료는 눈부시게 발전하고, 치료 성적도 현격히 향상되어 있다. 그러나, 일본에 있어서의 요로결석의 2005년의 인구 10만명에 대한 연간 이환율(罹患率)은 134로 되어 있어, 매년 증가 경향이 있고, 재발율도 높다(비특허문헌 1). 이 때문에, 앞으로는 단순히 결석을 자연적으로 배석(排石)시키거나 파쇄하는 등의 치료 뿐 아니라, 그 예방에도 주력하는 것이 중요해지고 있다고 생각된다(비특허문헌 2).

[0004] 그러나, 수분의 섭취나 식사습관의 개선, 약물요법 이외에 유효한 결석 예방수단은 없는 것으로 되어 있고, 예를 들면, 식사습관의 개선의 경우는, 동물성 단백질의 과잉섭취 제한, 일정량의 칼슘 섭취(600~800 mg/일), 염분, 지방의 과잉섭취의 제한, 구연산의 섭취 등을 들 수 있다. 또한 옥살산의 섭취를 제한함으로써 옥살산 칼슘 결석이 생기는 것을 방지하는 것으로 되어 있다(비특허문헌 3).

[0005] 일본에서는 신장 요로결석증 중에서, 칼슘 함유 결석은 85% 이상을 차지하고 있고, 또한 칼슘 함유 결석의 75%가 옥살산 칼슘 결석이다(비특허문헌 4). 옥살산 칼슘 결석의 원인으로서는 과칼슘뇨증이나 과옥살산뇨증 등을 생각할 수 있다(비특허문헌 5).

[0006] 현재, 주된 요로결석의 치료법으로서는, 저령탕(豬苓湯) 등의 배석을 촉진시키는 것이 많이 사용되고 있으나, 결석 형성을 저지할 목적으로 사용되고 있는 약제로 확립된 것은 없다.

[0007] 미생물을 사용한 예방으로서는 Oxalobacter formigenes로 불리는 장내에 존재하는 세균이, 신장 결석의 재발 위험을 감소시킬 가능성이 있다는(비특허문헌 6) 보고도 있고, 옥살산 분해능을 갖는 장내균을 사용함으로써 신장 결석을 예방하는 것도 충분히 가능하다고 생각된다. 유산균은 정장작용이나 항알레르기작용 등 수많은 생리효과를 갖는 것이 보고되어 있고, 옥살산 분해능에 관해서도 몇 가지의 종에서 보고가 이루어져 있다(특허문헌 1). 또한, 옥살산 분해능을 높인 변이주나 옥살산 분해능을 높이기 위해 사전에 옥살산을 포함하는 배양액으로 계대 배양(subculturing)을 행함으로써 옥살산 분해능을 유도한 상태에서는, 어느 정도 옥살산 분해능을 높일 수 있는 것이 알려져 있다(특허문헌 2, 비특허문헌 7).

[0008] 또한, 본 출원의 발명에 관련된 선행기술문헌정보를 이하에 나타낸다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0009] (특허문헌 0001) 일본국 특허공표 제2003-500451

(특허문헌 0002) 일본국 특허공표 제2008-517628

**비특허문헌**

- [0010] (비특허문헌 0001) Prevalence and epidemiological characteristics of urolithiasis in Japan: national trends between 1965 and 2005. *Urology* 71:209-213, 2008
- (비특허문헌 0002) 일본 비뇨기과학회 잡지 87권 6호 p900~908
- (비특허문헌 0003) 「재발 예방 가이드라인」 『요로결석증 진료 가이드라인 개정판(2004년판)』
- (비특허문헌 0004) 신장과 투석 1987 임시 증간호
- (비특허문헌 0005) 결석에 관한 대사계의 검사법 임상비뇨기과: 오가와 요시히데 45:47, 1991
- (비특허문헌 0006) Duncan, et al, *Appl Environ Microbiol.* 2002 Aug;68(8):3841-7
- (비특허문헌 0007) Transcriptional and Functional Analysis of Oxalyl-Coenzyme A(CoA) Decarboxylase and Formyl-CoA Transferase Genes from *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2006 Mar ;72(3):1891-1899

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0011] 본 발명은, 이와 같은 상황을 감안하여 이루어진 것으로, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 높은 옥살산 분해능을 갖는 유산균, 그 유산균의 처리물, 옥살산 또는 옥살산 화합물을 분해하기 위한 방법, 옥살산 또는 옥살산 화합물이 저감화된 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다. 더 나아가서는, 그 유산균 또는 그 처리물을 포함하는 조성물이나 옥살산 또는 옥살산 화합물의 분해제를 제공하는 것도 과제로 한다.

**과제의 해결 수단**

- [0012] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위해 예의 연구한 결과, 종래 알려져 있는 옥살산 분해활성을 갖는 유산균보다도 수배 높은 옥살산 분해활성을 갖는 유산균을 단리하여, 본 발명을 완성하였다. 구체적으로는, 옥살산을 대량으로 분해 가능한 유산균을 얻는 것을 목적으로 예의 선정작업을 행하였다. 인간 성인의 분변(糞便) 및 위액으로부터 독자적으로 분리한 락토바실러스(*Lactobacillus*)속 유산균 132균주로부터, 옥살산을 대량으로 분해 가능한 유산균을 스크리닝하였다. 그 결과, 10 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 6.5, 72시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 50% 이상인 것을 특징으로 하는 유산균을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0013] 즉, 본 발명은, 보다 구체적으로는 이하의 [1]~[22-2]를 제공하는 것이다.
- [0014] [1] *Lactobacillus*속에 속하는 유산균으로서, 10 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 6.5, 72시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 50% 이상인 것을 특징으로 하는 유산균.
- [0015] [2] 락토바실러스(*Lactobacillus*)속에 속하는 유산균이, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*)종 또는 락토바실러스 아밀로보러스(*Lactobacillus amylovorus*)종인, [1]에 기재된 유산균.
- [0016] [3] 이하의 (a) 내지 (d)로 이루어진 균으로부터 선택되는 유산균:
- [0017] (a) 수탁번호: FERM BP-11005로서 기탁되어 있는 유산균 *Lactobacillus gasseri* OLL203195주;
- [0018] (b) 수탁번호: FERM BP-11007로서 기탁되어 있는 유산균 *Lactobacillus amylovorus* OLL2741주;
- [0019] (c) 수탁번호: FERM BP-11006으로서 기탁되어 있는 유산균 *Lactobacillus amylovorus* OLL2880주; 및
- [0020] (d) 수탁번호: FERM BP-11004로서 기탁되어 있는 유산균 *Lactobacillus gasseri* OLL2727주.
- [0021] [4] [1] 내지 [3] 중 어느 한 항에 기재된 유산균의 처리물.

- [0022] [5] [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물을 포함하는 조성물.
- [0023] [6] 신장·요로결석을 치료 및/또는 예방하기 위한, [5]에 기재된 조성물.
- [0024] [7] 빈혈을 치료 및/또는 예방하기 위한, [5]에 기재된 조성물.
- [0025] [8] 골다공증을 치료 및/또는 예방하기 위한, [5]에 기재된 조성물.
- [0026] [9] 의약 조성물인 [5] 내지 [8] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0027] [10] 식품 조성물인 [5] 내지 [8] 중 어느 한 항에 기재된 조성물.
- [0028] [11] [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물을 포함하는, 옥살산 또는 옥살산 화합물의 분해제.
- [0029] [12] 옥살산 또는 옥살산 화합물을, [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물에 접촉시키는 공정을 포함하는, 옥살산 또는 옥살산 화합물을 분해하기 위한 방법.
- [0030] [13] 옥살산 또는 옥살산 화합물을 포함하는 조성물을, [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물에 접촉시키는 공정을 포함하는, 옥살산 또는 옥살산 화합물이 저감화된 조성물의 제조방법.
- [0031] [14-1] [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는, 신장·요로결석을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법.
- [0032] [14-2] [5]에 기재된 조성물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는, 신장·요로결석을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법.
- [0033] [15-1] [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는, 빈혈을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법.
- [0034] [15-2] [5]에 기재된 조성물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는, 빈혈을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법.
- [0035] [16-1] [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는, 골다공증을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법.
- [0036] [16-2] [5]에 기재된 조성물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는, 골다공증을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법.
- [0037] [17] 신장·요로결석을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약 조성물의 제조에 있어서의, [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물의 사용.
- [0038] [18] 빈혈을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약 조성물의 제조에 있어서의, [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물의 사용.
- [0039] [19] 골다공증을 치료 및/또는 예방하기 위한 의약 조성물의 제조에 있어서의, [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물의 사용.
- [0040] [20-1] 신장·요로결석을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법에 사용하기 위한, [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물.
- [0041] [20-2] 신장·요로결석을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법에 사용하기 위한, [5]에 기재된 조성물.
- [0042] [21-1] 빈혈을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법에 사용하기 위한, [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물.
- [0043] [21-2] 빈혈을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법에 사용하기 위한, [5]에 기재된 조성물.
- [0044] [22-1] 골다공증을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법에 사용하기 위한, [1], [2] 또는 [3]에 기재된 유산균, 또는 [4]에 기재된 처리물.
- [0045] [22-2] 골다공증을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법에 사용하기 위한, [5]에 기재된 조성물.

**도면의 간단한 설명**

- [0046] 도 1은 옥살산 분해능이 높은 유산균(Lactobacillus속)을 식사성 고옥살산뇨증 모델 동물에 경구 투여하고, 뇨

중 옥살산값을 측정된 결과를 나타내는 도면이다. *L. amylovorus* OLL2880주 투여군(제4군)은 투여 개시 후 3일째, 5일째 및 7일째에 있어서, 뇨중 옥살산값 상승의 유의한 억제가 관찰되었다(도면 중의 \*). 또한, *L.gasseri* OLL2727주 투여군(제3군)에 대해서도, 뇨중 옥살산값 상승의 유의한 억제가 관찰되었다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0047] 본 발명은, *Lactobacillus*속에 속하는 유산균으로서, 10 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 6.5, 72시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 50% 이상인 것을 특징으로 하는 유산균(이하, 「본 발명의 유산균」이라 칭한다)에 관한 것이다.
- [0048] *Lactobacillus*속은, 유산균의 대표적인 속의 하나로, 80종 이상의 종을 포함한다. *Lactobacillus*속에 포함되는 종의 예로서, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*(이하, *L. amylovorus*라고도 한다.), *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*(이하, *L. gasseri*라고도 한다.), *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*을 들 수 있다. 본 발명의 *Lactobacillus*속 유산균은, 10 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 6.5, 72시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 50% 이상인 것을 특징으로 하는 유산균인 한 어느 종이어도 되나, 바람직하게는, *Lactobacillus gasseri*종 또는 *Lactobacillus amylovorus*종으로, 예를 들면, 본 발명자에 의해 단리된 *Lactobacillus gasseri* OLL203195주, *Lactobacillus amylovorus* OLL2741주, *Lactobacillus amylovorus* OLL2880주 및 *Lactobacillus gasseri* OLL2727주를 들 수 있다.
- [0049] 본 발명의 유산균은, 10 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 6.5, 72시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 50% 이상이라는 특징을 갖는 유산균이다. 본 발명자는, 다수의 유산균에 대해 옥살산 분해 활성을 측정하여, *Lactobacillus gasseri* OLL203195주, *Lactobacillus amylovorus* OLL2741주, *Lactobacillus amylovorus* OLL2880주, 또는 *Lactobacillus gasseri* OLL2727주라 명명한 유산균이, 10 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 6.5, 72시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 50% 이상인 것을 구체적으로 발견하였다.
- [0050] 옥살산이란, 디카르복실산의 일종으로 분자량 90.03 g/mol, CAS 등록번호 144-62-7이다. 야채(시금치, 죽순) 등의 각종 식품에 포함되어 있고, 아린 맛의 한 요인이기도 하다. 또한, 옥살산은 미네랄과 소금을 형성하기 쉬워 혈중 옥살산 농도가 상승한 경우는, 불용성의 칼슘염이 형성되어, 요로결석 등의 질병으로 이어진다.
- [0051] 「10 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 6.5, 72시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 50% 이상인」은, 「5 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 4, 4시간 배양에 있어서, 생균 수당 옥살산 분해율이  $3.0 \times 10^{-9}$  μmol/cfu 이상인」, 「5 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 4, 4시간 배양에 있어서, *L.amylovorus* JCM1126<sup>T</sup>보다도 17배 이상의 옥살산 분해활성을 갖는」, 또는, 「5 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 4, 4시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 28% 이상인」으로 바꾸어 말할 수 있다. 「옥살산 분해율」은 실시예 1 등에서 후술하는 식에 따라 산출할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 유산균은, 공지 방법에 의해 분리할 수 있다. 예를 들면, 인간 등의 포유류의 분변으로부터 균을 배양하여, 배양한 균의 형상, 생리학적 특징 등으로부터 *Lactobacillus*속 유산균을 분리하고, 옥살산 분해활성을 측정하여, 10 mM 옥살산을 포함하는 배양액 중에서, 37℃, 배양 개시시 pH 6.5, 72시간 배양에 있어서, 옥살산 분해율이 50% 이상인 *Lactobacillus*속 유산균을 선별함으로써 단리 가능하다. 옥살산 분해활성의 측정은 공지 방법에 의해 가능하며, 일례를 나타내자면, 본 실시예의 방법에 의해 가능하다.
- [0053] 본 발명의 유산균을 배양하는 데는, 일반적으로 유산 간균(lactic acid bacilli)의 배양에 적합한 배지면 되고, 글루코오스, 락토오스, 갈락토오스, 프룩토오스, 트레할로오스, 수크로오스, 만노오스, 셀로비오스 등의 탄소원, 고기 추출물, 펩톤, 효모 추출물, 이스트 엑스트랙트, 카제인, 유청단백질 등의 질소원, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 등의 무기영양소를 포함하는 배지를 사용할 수 있다. 적합한 일례로서, *Lactobacilli* MRS Broth(Difco, 이하 MRS 배지라고도 한다.)를 들 수 있다. 배양조건은, 장내 유산균이 생육할 수 있는 조건이라면, 특별히 제한은 없으나, 바람직한 조건으로서는, 예를 들면, pH 5.0-pH 8.0, 온도 20℃-45℃이고, 보다 바람직한 조건으로서는, 혐기성, pH 5.0-pH 7.0, 온도 30℃-40℃이다.

- [0054] 본 발명의 「Lactobacillus gasseri OLL203195주」 및 「Lactobacillus gasseri OLL2727주」는, 본 발명자에 의해, 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터에 기탁되었다. 이하에, 기탁을 특정하는 내용을 기재한다.
- [0055] (1) 기탁기관명: 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터
- [0056] (2) 연락처: 일본국 이바라키켄 츠쿠바시 히가시 1쵸메 1-1 중앙 제6
- [0057] 우편번호 305-8566
- [0058] 전화번호 029-861-6029, 6079
- [0059] (3) 식별을 위한 표시: Lactobacillus gasseri OLL203195(수탁번호: FERM BP-11005, 원기탁일: 2008년 9월 2일)
- [0060] 식별을 위한 표시: Lactobacillus gasseri OLL2727(수탁번호: FERM BP-11004, 원기탁일: 2008년 9월 2일)
- [0061] Lactobacillus gasseri OLL203195주(수탁번호: FERM BP-11005) 및 OLL2727주(수탁번호: FERM BP-11004)는, 그람양성 간균으로, Lactobacilli MRS Agar, Difco 상에서의 콜로니 형태는 원형, 담황색, 편평형상이다. 생리학적 특징으로서는, 호모 유산발효형식, 글루코오스, 만노오스, 프룩토오스, 갈락토오스, 수크로오스, 셀로비오스, 락토오스, 트레할로오스에 대한 발효성, 45℃에서의 발육성을 갖는다. 균체 증식에 있어서는 배양 중의 배지의 pH는 5.0~7.0으로 유지하는 것이 바람직하다.
- [0062] 배지로서는 유산균의 배지에 통상 사용되는 배지가 사용된다. 즉 주 탄소원 외에 질소원, 무기물 기타 영양소를 적당히 함유하는 배지라면 어느 배지도 사용 가능하다. 탄소원으로서는 락토오스, 글루코오스, 수크로오스, 프룩토오스, 전분 가수분해물, 페당밀 등을 사용균의 소화성(assimilation property)에 따라 사용할 수 있다. 질소원으로서는 카제인의 가수분해물, 유청단백질 가수분해물, 대두단백질 가수분해물 등의 유기질소 함유물을 사용할 수 있다. 그 외에 증식 촉진제로서 고기 추출물, 어육 추출물, 효모 추출물 등이 사용된다.
- [0063] 배양은 혐기조건 하에서 행하는 것이 바람직하나, 통상 이용되는 액체 정지배양 등에 의한 미호기조건 하에서도 된다. 혐기 배양에는 탄산가스기층 하에서 배양하는 방법 등의 공지의 수법을 적용할 수 있으나, 다른 방법이어도 된다. 배양온도는 일반적으로 30~40℃가 바람직하나, 균이 생육하는 온도라면 다른 온도조건이어도 된다. 배양 중의 배지의 pH는 5.0~7.0으로 유지하는 것이 바람직하나, 균이 생육하는 pH라면 다른 pH 조건이어도 된다. 또한, 배지배양조건 하에서 배양하는 것도 가능하다. 배양시간은 통상 10~24시간이 바람직하나, 균이 생육할 수 있는 시간이라면, 다른 배양시간이어도 된다.
- [0064] 본 발명의 「Lactobacillus amylovorus OLL2741주」 및 「Lactobacillus amylovorus OLL2880주」는, 본 발명자에 의해, 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터에 기탁되었다. 이하에, 기탁을 특정하는 내용을 기재한다.
- [0065] (1) 기탁기관명: 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터
- [0066] (2) 연락처: 일본국 이바라키켄 츠쿠바시 히가시 1쵸메 1-1 중앙 제6
- [0067] 우편번호 305-8566
- [0068] 전화번호 029-861-6029, 6079
- [0069] (3) 식별을 위한 표시: Lactobacillus amylovorus OLL2741(수탁번호: FERM BP-11007, 원기탁일: 2008년 9월 2일)
- [0070] 식별을 위한 표시: Lactobacillus amylovorus OLL2880(수탁번호: FERM BP-11006, 원기탁일: 2008년 9월 2일)
- [0071] Lactobacillus amylovorus OLL2741주(수탁번호: FERM BP-11007) 및 OLL2880주(수탁번호: FERM BP-11006)는, 그람양성 간균으로, Lactobacilli MRS Agar, Difco 상에서의 콜로니 형태는 원형, 담황색, 편평형상이다. 생리학적 특징으로서는, 호모 유산발효형식, 글루코오스, 만노오스, 프룩토오스, 갈락토오스, 수크로오스, 셀로비오스, 트레할로오스에 대한 발효성, 45℃에서의 발육성을 갖는다. 균체 증식에 있어서는 배양 중의 배지의 pH는 5.0~7.0으로 유지하는 것이 바람직하다.

- [0072] 배지로서는 유산균의 배지에 통상 사용되는 배지가 사용된다. 즉 주 탄소원 외에 질소원, 무기물 기타 영양소를 적당히 함유하는 배지라면 어느 배지도 사용 가능하다. 탄소원으로서는 글루코오스, 수크로오스, 프룩토오스, 전분 가수분해물, 폐당밀 등을 사용균의 자화성에 따라 사용할 수 있다. 질소원으로서는 카제인의 가수분해물, 유청단백질 가수분해물, 대두단백질 가수분해물 등의 유기질소 함유물을 사용할 수 있다. 그 외에 증식 촉진제로서 고기 추출물, 어육 추출물, 효모 추출물 등이 사용된다.
- [0073] 배양은 혐기조건 하에서 행하는 것이 바람직하나, 통상 이용되는 액체 정치배양 등에 의한 미호기조건 하에서도 된다. 혐기 배양에는 탄산가스기층 하에서 배양하는 방법 등의 공지의 수법을 적용할 수 있으나, 다른 방법이어도 상관없다. 배양온도는 일반적으로 30~40℃가 바람직하나, 균이 생육하는 온도라면 다른 온도조건이어도 된다. 배양 중의 배지의 pH는 5.0~7.0으로 유지하는 것이 바람직하나, 균이 생육하는 pH라면 다른 pH 조건이어도 된다. 또한, 배치배양조건 하에서 배양하는 것도 가능하다. 배양시간은 통상 10~24시간이 바람직하나, 균이 생육할 수 있는 시간이라면, 다른 배양시간이어도 된다.
- [0074] 또한, 본 발명은, 본 발명의 유산균의 처리물(이하, 「본 발명의 처리물」이라 칭한다)에 관한 것이다.
- [0075] 처리물로서는, 예를 들면, 배양물, 농축물, 페이스트화물, 분무 건조물, 동결 건조물, 진공 건조물, 드림 건조물, 액상물, 회석물, 파쇄물 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0076] 본 발명의 처리물은, 공지 방법에 의해 얻을 수 있다. 예를 들면, 배양물 또는 농축물의 경우는, 본 발명의 유산균의 배양 종료 후의 배양상청이나 배지성분을 그대로 사용하거나, 또는 배지를 농축하거나 함으로써 얻을 수 있다. 또한, 파쇄물의 경우는, 본 발명의 유산균이나 유산균 함유물을 공지의 적당한 장치를 사용하여 파쇄함으로써 얻을 수 있다.
- [0077] 본 발명의 유산균 및 처리물은, 옥살산 또는 옥살산 화합물을 분해하기 위해, 또는 옥살산이 관여하는 질병, 예를 들면, 신장·요로결석, 빈혈, 골다공증 등의 치료나 예방을 위해 이용할 수 있다.
- [0078] 또한, 본 발명의 유산균 및 처리물의 옥살산 분해활성을 이용하여, 본 발명의 유산균 및 처리물이 투여된 대상의 체내에 있어서, 식품에 포함되는 옥살산의 흡수를 억제할 수 있다.
- [0079] 본 발명에 있어서 「대상」이란, 옥살산이 관여하는 질병을 앓고 있거나, 또는 그러할 우려가 있는 생물체 등을 들 수 있다. 본 발명의 유산균 및 처리물이 투여되는 생물체는, 특별히 한정되는 것은 아니나, 동물(예를 들면, 인간, 가축동물종, 야생동물, 애완동물 등)을 포함한다.
- [0080] 또한, 본 발명은, 본 발명의 유산균 또는 처리물을 포함하는 조성물(이하, 「본 발명의 조성물」이라 칭한다)에 관한 것이다.
- [0081] 본 발명의 조성물은, 예를 들면, 배지성분, 경구·경관 섭취에 적합한 첨가물 및 물 등의 용매 등을 포함하고 있어도 된다. 그 외에, 후술하는 의약상 허용되는 담체나 당질, 단백질, 지질, 비타민류, 생체 필수 미량금속, 향료 등을 포함하고 있어도 된다.
- [0082] 본 발명의 조성물은, 옥살산 또는 옥살산 화합물을 분해하기 위해, 또는 옥살산이 관여하는 질병, 예를 들면, 신장·요로결석, 빈혈, 골다공증 등의 치료나 예방을 위해 이용할 수 있다.
- [0083] 본 발명의 조성물로서는, 예를 들면, 의약 조성물(이하, 「본 발명의 의약 조성물」로 부른다)을 들 수 있다.
- [0084] 본 발명의 의약 조성물은, 본 발명의 유산균 및 처리물 이외에 의약상 허용되는 담체를 포함할 수 있고, 경구, 또는 비경구적으로 투여할 수 있으나, 바람직한 투여방법은, 경구 투여이다. 담체로서는, 계면활성제, 부형제, 착색료, 착향료, 보존료, 안정제, 완충제, 현탁제, 등장화제, 결합제, 붕괴제, 활택제, 유동성 촉진제, 교미제 등을 의약상 허용되는 담체로서 들 수 있으나, 그 외에 상용의 담체를 적절히 사용할 수 있다. 구체적으로는, 경질무수규산, 젓당, 결정 셀룰로오스, 만니톨, 전분, 카르멜로오스갈슈, 카르멜로오스나트륨, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리비닐아세탈디에틸아미노아세테이트, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 중쇄 지방산 트리글리세라이드, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유 60, 백당, 카르복시메틸셀룰로오스, 콘스타치, 무기염류 등을 들 수 있다.
- [0085] 경구 투여제제로서는, 주지의 각종 제형으로 할 수 있고, 예를 들면, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 액제, 시럽제, 유제, 현탁제, 트로키제 등의 제형으로 할 수 있다. 또한, 당업자에게 주지의 방법으로 장용성 제제로 함으로써, 위산의 효과를 받지 않고, 본 발명의 유산균 및 처리물을 보다 효율적으로 장까지 운반하는 것도 가능하다.

- [0086] 본 발명의 유산균 및 처리물을 사용해서 제조된 의약 조성물은, 의약 조성물 중의 동일 균의 작용에 의해, 옥살산 분해활성이나 옥살산이 관여하는 질병의 예방 및/또는 치료효과를 발휘하는 것으로 기대할 수 있다. 또한, 상기 의약 조성물은, 투여되는 대상의 체내에 있어서, 식품에 포함되는 옥살산의 흡수를 억제하는 효과를 발휘하는 것으로 기대할 수 있다.
- [0087] 또한, 본 발명의 조성물로서는, 예를 들면, 식품 조성물(이하, 「본 발명의 식품 조성물」이라 칭한다)을 들 수 있다.
- [0088] 본 발명의 식품 조성물은, 본 발명의 유산균 및 처리물 이외에, 유산균 생육을 방해하지 않는 한, 당질, 단백질, 지질, 비타민류, 생체 필수 미량금속(황산망간, 황산아연, 염화마그네슘, 탄산칼슘 등), 향료나 기타 배합물을 포함할 수 있다.
- [0089] 당질로서는, 당류, 가공 전분(덱스트린 외에, 가용성 전분, 브리티시 스타치, 산화전분, 전분 에스테르, 전분 에테르 등), 식물성유 등을 들 수 있다.
- [0090] 단백질로서는, 예를 들면 전지분유, 탈지분유, 부분 탈지분유, 카제인, 유청분말, 유청단백질, 유청단백질 농축물, 유청단백질 분해물,  $\alpha$ -카제인,  $\beta$ -카제인,  $\kappa$ -카제인,  $\beta$ -락토글로불린,  $\alpha$ -락토알부민, 락토페린, 대두단백질, 계란단백질, 고기단백질 등의 동식물성 단백질, 이들 가수분해물; 버터, 유청 미네랄, 크림, 유청, 비단백질소, 시알산, 인지질, 젓당 등의 각종 젓 유래 성분 등을 들 수 있다.
- [0091] 지질로서는, 예를 들면, 라드, 어유 등, 이들의 분별유, 수소첨가유, 에스테르 교환유 등의 동물성 유지; 팜유, 홍화유, 콘유, 평지씨유, 야자유, 이들의 분별유, 수소첨가유, 에스테르 교환유 등의 식물성 유지 등을 들 수 있다.
- [0092] 비타민류로서는, 예를 들면, 비타민 A, 카로틴류, 비타민 B군, 비타민 C, 비타민 D군, 비타민 E, 비타민 K군, 비타민 P, 비타민 Q, 니아신, 니코틴산, 판토텐산, 비오틴, 이노시톨, 콜린, 엽산 등을 들 수 있고, 미네랄류로서는, 예를 들면, 칼슘, 칼륨, 마그네슘, 나트륨, 구리, 철, 망간, 아연, 셀렌 등을 들 수 있다.
- [0093] 본 발명의 식품 조성물의 카테고리나 종류에 제한은 없고, 기능성 식품, 특정 보건용 식품, 특정 용도 식품, 영양기능식품, 건강식품, 간호용 식품이어도 되고, 또한, 과자, 유산균 음료, 치즈나 요구르트 등의 유제품, 조미료 등이어도 된다. 음식품의 형상에 대해서도 제한은 없고, 고형, 액상, 유동식상, 젤리상, 태블릿상, 과립상, 캡슐상 등, 통상 유통할 수 있는 모든 음식품 형상을 취할 수 있고, 각종 식품(우유, 청량음료, 발효유, 요구르트, 치즈, 빵, 비스킷, 크래커, 피자 크러스트, 조제분유, 유동식, 병자용 식품, 영양식품, 냉동식품, 가공식품, 기타 시판식품 등)에 첨가해도 된다. 상기 음식품의 제조는, 당업자의 통상의 방법으로 행할 수 있다.
- [0094] 본 발명의 유산균 및 처리물은, 상기와 같이 유제품·발효유를 포함하는 일반식품으로 가공할 수 있을 뿐 아니라, 요구르트나 치즈 등의 유제품·발효유의 제조용 스타터로서 이용하는 것도 가능하다. 스타터로 하는 경우는, 본 발명의 유산균의 생식·증식에 지장이 없는 한, 또한, 유제품 제조에 지장이 없는 한, 다른 미생물이 혼합되어 있어도 된다. 예를 들면, 요구르트용 유산균으로서 주요한 균종인 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* 등과 혼합해도 되고, 그 외에, 일반적으로 요구르트용이나 치즈용으로서 사용되는 균종과 혼합하여 스타터로 할 수 있다. 상기 스타터에 의한 유제품, 발효유의 제조는, 통상의 방법에 따라 행할 수 있다. 예를 들면, 가온·혼합·균질화·살균 처리 후에 냉각한 젓(乳) 또는 유제품에, 상기 스타터를 혼합하고, 발효·냉각함으로써, 플레인 요구르트를 제조할 수 있다.
- [0095] 또한, 본 발명은, 본 발명의 유산균 및 처리물의 용도에 관한 것이다.
- [0096] 용도로서는, 예를 들면, 본 발명의 유산균 또는 처리물을 포함하는, 옥살산 또는 옥살산 화합물의 분해제를 들 수 있다. 당해 분해제는, 옥살산이나 옥살산 화합물을 분해한다.
- [0097] 당해 분해제는, 본 발명의 유산균 또는 처리물 이외에 전술한 의약상 허용되는 담체나, 전술한 당질, 단백질, 지질, 비타민류, 생체 필수 미량금속(황산망간, 황산아연, 염화마그네슘, 탄산칼슘 등), 향료나 기타 배합물을 포함할 수 있다. 또한, 당해 옥살산 분해제의 제형으로서는, 예를 들면, 전술한 제형을 들 수 있다.
- [0098] 또한, 당해 분해제는, 「옥살산 또는 옥살산 화합물을, 본 발명의 유산균 또는 본 발명의 처리물에 접촉시키는 공정을 포함하는, 옥살산 또는 옥살산 화합물을 분해하기 위한 방법」으로 바꾸어 말하는 것도 가능하다.

- [0099] 상기 공정에 의해, 옥살산 또는 옥살산 화합물을 효율적으로 분해하는 것이 가능해진다. 상기 공정은, 본 발명의 유산균이 생존 가능, 또는 본 발명의 유산균에 의한 발효가 가능한 조건에서 행해지는 것이 바람직하다.
- [0100] 또한, 용도로서는, 예를 들면, 본 발명의 유산균 또는 처리물을 대상에 투여하는 공정을 포함하는, 신장·요로 결석·빈혈·골다공증을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법을 들 수 있다.
- [0101] 상기 「대상」이란, 본 발명의 유산균 또는 처리물을 투여하는 생물체, 그 생물체의 체내의 일부분, 또는 생물체로부터 적출 또는 배출된 그 일부분을 말한다. 생물체는, 특별히 한정되는 것은 아니나, 동물(예를 들면, 인간, 가축동물중, 야생동물)을 포함한다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 「투여한다」란, 경구적, 또는 비경구적으로 투여하는 것이 포함된다. 예를 들면, 경구 투여, 경관 투여, 경장 투여를 예시할 수 있다.
- [0103] 경구적인 투여로서는, 경구제 형태로의 투여를 들 수 있고, 경구제로서는, 과립제, 산제, 정제, 캡슐제, 용제, 유제, 또는 현탁제 등의 제형을 선택할 수 있다.
- [0104] 비경구적 투여로서는, 주사제 형태로의 투여를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 유산균 또는 처리물을, 처리를 실시하고자 하는 영역에 국소적으로 투여하는 것도 가능하다. 예를 들면, 수술 중의 국소주입, 카테터의 사용에 의해 투여하는 것도 가능하다.
- [0105] 또한, 본 발명의 유산균 및 처리물의 옥살산 분해활성을 이용하여, 옥살산 또는 옥살산 화합물이 저감화된 조성물을 제조하는 것도 가능하다. 본 발명의 옥살산 또는 옥살산 화합물이 저감화된 조성물의 제조방법은, 옥살산 또는 옥살산 화합물을 포함하는 조성물을, 본 발명의 유산균 또는 처리물에 접촉시키는 공정을 포함한다. 이 공정에 의해, 그 조성물에 포함되는 옥살산 또는 옥살산 화합물의 양을 효율적으로 저감시키는 것이 가능해진다. 여기에서, 「옥살산 또는 옥살산 화합물이 저감화된」이란, 상기 옥살산 또는 옥살산 화합물을 포함하는 조성물 중의 옥살산 또는 옥살산 화합물의 양이, 상기 공정을 거치기 전과 비교하여 상기 공정을 거친 후의 쪽이 적은 것을 의미한다. 예를 들면, 상기 공정을 거친 후의 옥살산 또는 옥살산 화합물의 양이, 상기 공정을 거치기 전의 옥살산 또는 옥살산 화합물의 양에 비해, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 적은 경우, 옥살산 또는 옥살산 화합물이 저감되었다고 할 수 있다. 또한, 상기 공정을 거친 후의 조성물 중에 옥살산 또는 옥살산 화합물이 전혀 포함되어 있지 않은 경우도, 옥살산 또는 옥살산 화합물이 저감되었다고 할 수 있다.
- [0106] 상기 「옥살산 화합물」로서는, 예를 들면, 옥살산 금속염, 옥살산 암모늄염 및 옥살산의 아민염 등의 옥살산 화합물, 또는 야채 등의 식물에 포함되는 옥살산염 등을 들 수 있다. 보다 구체적으로는, 예를 들면, 옥살산염의 유기염 또는 무기염(칼슘염, 마그네슘염, 나트륨염, 옥살산 수소나트륨, 칼륨염), 옥살산철 및 옥살산 수화물 등을 들 수 있다. 또한, 「옥살산 화합물」은, 「옥살산원」 또는 「물에 용해되어 옥살산 이온을 발생하는 화합물」로 표현하는 것도 가능하다.
- [0107] 또한 본 명세서에 있어서 인용된 모든 선행기술문헌은, 참조로써 본 명세서에 포함된다.
- [0108] **실시예**
- [0109] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명하나 본 발명은 이들 실시예에 제한되지는 않는다.
- [0110] <기본주>
- [0111] *L.gasseri* JCM1131<sup>T</sup>
- [0112] *L.amylovorus* JCM1126<sup>T</sup>
- [0113] [실시예 1]
- [0114] 이하에서 사용하는 공시 유산균으로서, 메이지 데이터즈 코포레이션 보유의 유산균주, 리카가쿠 겐큐쇼 미생물계통 보존시설(JCM)로부터 입수한 유산균주를 사용하였다. 균주명에 OLL이라고 기재된 균주는 메이지 데이터즈 코포레이션 보유 균주를 나타낸다. 균주명에 JCM이라고 기재된 균주는 리카가쿠 겐큐쇼 미생물계통 보존시설(JCM) 보유 균주를 나타낸다.
- [0115] 각 공시 유산균의 균체를, 멸균한 10%(w/v) 탈지유 배지(메이지 데이터즈 코포레이션) 중에 분산하여, 사용할 때까지 초저온냉동고(deep freezer) 중에서 -80℃하에 보존하였다.

- [0116] 하기 방법에 의해, 옥살산에 대한 분해활성을 갖는 균의 1차 스크리닝을 실시하였다.
- [0117] 당사 보유의 유산균 27균종 중에서 각 종에 대해 수 주, 합계 41균주를 사용하였다.
- [0118] 각 균주는 혐기 배양하기 위해 산소 흡수·탄산가스 발생제(「아네로팩·젠키」(미즈비시가스화학 주식회사 제조))와 함께 밀폐용기에 넣고, MRS 배지(Difco, Detroit, MI, USA)에서 혐기 배양(37℃, 16시간)하였다. 이어서, 얻어진 배양액의 OD600을 측정하여, OD600=1이 되도록 조정하였다. 그 후, OD600을 조정한 배양액 5 μL를 MRS 배지(Difco, Detroit, MI, USA)와 20 mM 옥살산 암모늄용액을 등량 혼합한 배지 5 mL(pH 6.5, 50 μmol의 옥살산을 포함함)에 첨가하여 얻어지는 균체 현탁액을 「아네로팩·젠키」와 함께 밀폐용기에 넣고, 37℃에서 72시간, 정치배양하였다.
- [0119] 얻어진 배양액을 10배 희석하고, 흡광도계를 사용해서 OD600을 측정하였다.
- [0120] 얻어진 배양액 1 mL를, 15000회전/분, 4℃, 1분간 원심분리하고, 상청 500 μL에 내부 표준액으로서 30 mM 크로톤산 용액 50 μL를 첨가한 후, carrez 시약(carrezI 용액(100 mL의 증류수에 53.5 g의 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), carrezII 용액(100 mL의 증류수에 17.2 g의 K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]·3H<sub>2</sub>O))으로 단백질을 제거하고, 10000회전/분, 4℃, 3분간 원심분리하였다. 상청을 0.22 μm 필터를 사용해서 채취하였다. 그 후 그 용액을 HPLC에 제공하였다. 또한, 하기의 용액 중에서의 옥살산 측정에는 모두 상기의 방법을 사용하고 있고, HPLC는 모든 실험에서, 이하의 조건으로 실시하였다.
- [0121] <분석기기>
- [0122] 고속 액체 크로마토그래피: SCL-10A(시마즈제작소 제조)
- [0123] <분석조건>
- [0124] 칼럼: 유기산 분석용 폴리머 칼럼 도쿄화학공업(주)/TRANSGENOMIC사
- [0125] ICsep ICE-ORH-801 6.5 mmI.D×300 mm
- [0126] Guard Kit: 유기산 분석용 가이드 칼럼 카트리지
- [0127] ICsep ICE-ORH-801 4.0 mmI.D×20 mm
- [0128] 검출기: 전기전도도 검출기(시마즈 CDD-10A)
- [0129] 이동상: 5 mM p-톨루엔설폰산 수용액
- [0130] 반응액: 5 mM p-톨루엔설폰산·100 μM EDTA(2Na)/20 mM Bis-Tris 수용액
- [0131] 오븐 온도: 50℃
- [0132] 유량: 0.5 mL/min(이동상·반응액 모두)
- [0133] 샘플량: 10 μL
- [0134] 옥살산 및 크로톤산을 HPLC 유지시간에 따라 결정하였다. 또한 이들 각 화합물의 정량을, HPLC 차트의 피크 면적값을 토대로 행하였다. 추가로 옥살산의 분해율을 아래 식에 따라 산출하였다.
- [0135] 분해율(%)= $\frac{a-X}{a} \times 100$
- [0136] a: 반응 전의 배지 중에 있어서의 옥살산의 농도
- [0137] X: 반응 후의 배양상청에 있어서의 옥살산의 농도

표 1

균종	주	분해율(%)	OD600	
			배양 0시간 후	배양 72시간 후
L.gasseri	OLL203915	67.2	0.03	3.01
L.amylovorus	OLL2741	57.3	0.02	3.77
L.amylovorus	OLL2880	56.1	0.03	4.18
L.gasseri	OLL2727	56.7	0.05	2.78

[0138]

[0139] 본 시험은, 일본국 특허공표 제2003-500451의 실시예 1과 거의 동일한 수법으로 실시하였다. 그 결과, 일본국 특허공표 제2003-500451의 실시예 1에서는, 분해율이 최고값으로 11.79%인 것에 대해, 본 시험에서는 *L.gasseri*, *L.amylovorus* 및 *Bifidobacterium adolescentis* 중 분해율이 매우 높은 균주가 존재하였다. 또한, 상기의 4균주에서는 56% 이상의 분해율이었다. 즉, 본 발명에서 발견한 표 1의 4균주는 일본국 특허공표 제2003-500451에서 발견된 균주와 비교하여 약 5배(4.86배) 이상의 높은 옥살산 분해활성을 갖는 것이 명백해졌다.

[0140] [실시예 2]

[0141] 실시예 1에서 활성이 높았던 *L.gasseri* OLL2727주를 사용하여, 이하의 검토를 행하였다.

[0142] 균주는 혐기 배양하기 위해 산소 흡수·탄산가스 발생제(「아네로팩·젠키」(미즈비시가스화학 주식회사 제조))와 함께 밀폐용기에 넣고, MRS 배지(Difco, Detroit, MI, USA)에서 혐기 배양(37℃, 16시간)하였다. 이어서, 얻어진 배양액의 OD600을 측정하여, OD600=5가 되도록 조정하였다. 그 후, OD600=5로 조정된 배양액 5 mL를 3000회전/분, 실온, 10분간 원심분리하여 집균하였다. 얻어진 균을 0.8% 생리식염수로 세정하고, 재차 3000회전/분, 실온, 10분간 원심분리하여 집균하였다.

[0143] 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(nacalaitesq) 42.65 g, 글루코오스(wako) 5 g, NaCl(wako) 0.9 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(wako) 0.4 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(wako) 0.45 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(wako) 0.09 g, CaCl<sub>2</sub>(간토화학) 0.05 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(wako) 0.4 g 및 L-시스테인 염산염 1 수화물(wako) 0.5 g에 물을 첨가하여 1 L로 한 것을 배지 B로 하였다. 이 배지 B와 10 mM 옥살산 암모늄용액을 등량씩 첨가하고, 미량의 염산 또는 수산화나트륨으로 pH를 4 및 6으로 조정하여, 0.45 μm의 필터로 멸균한 것을 배지 A로 하였다.

[0144] 얻어진 균에, 배지 A(pH=4 및 6)를 5 mL 첨가하여, 얻어지는 균체 현탁액을 「아네로팩·젠키」와 함께 밀폐용기에 넣고, 37℃에서 6시간, 정치배양하였다.

[0145] 얻어진 배양액 중의 옥살산량 및 분해율을 실시예 1 기재의 방법에 따라 측정 및 산출하였다.

표 2

균주	OLL2727	
pH	옥살산 분해량(mM)	분해율(%)
6	0.23	5.1
4	3.01	63.5

[0146]

[0147] 이 결과, pH 6.0에 비해 pH 4.0에서 활성이 높아지는 것을 알 수 있었다. 이 사실로부터, 저pH인 위 내에 있어서도 균주가 생존하고, 또한 옥살산 분해활성을 발휘할 가능성이 나타내어졌다. 즉, 위 내에 있어서 옥살산 분해활성을 갖는 균주라고 할 수 있다. pH 6에서는, pH 4에 비해 활성은 낮으나 균주가 생존하고, 또한 옥살산 분해활성을 가지고 있다. 장내의 pH는 통상 6.5 부근이기 때문에, 장내에 있어서도 균주가 생존하고, 또한 옥살산 분해활성을 발휘할 가능성이 나타내어졌다. 또한, 장내의 유산균이 생산하는 유산에 의해 장내가 국소적으로 저 pH가 되는 것도 생각할 수 있어, 저pH인 위 뿐 아니라, 장내에서의 옥살산 분해도 기대된다.

[0148] [실시예 3]

[0149] 이에 *L.gasseri*, *L.amylovorus*가 속해 있고, 당사가 보유하는 인간 유래의 *L.acidophilus* 그룹 132주로 이하의 실험을 행하였다.

[0150] 하기 방법에 의해, 본 발명 미생물의 옥살산에 대한 분해활성을 측정, 평가하였다.

[0151] 각 균주는 혐기 배양하기 위해 산소 흡착제(「아네로팩·젠키」(미즈비시가스화학 주식회사 제조))와 함께 밀폐용기에 넣고, MRS 배지(Difco, Detroit, MI, USA)에서 혐기 배양(37℃, 16시간)하였다. 이어서, 얻어진 배양액의 OD600을 측정하여, OD600=5가 되도록 조정하였다. 그 후, OD600=5로 조정된 배양액 5 mL를 3000회전/분, 실온, 10분간 원심분리하여 집균하였다. 얻어진 균을 0.8% 생리식염수로 세정하고, 재차 3000회전/분, 실온, 10분간 원심분리하여 집균하였다.

[0152] 얻어진 균에 실시예 2에서 사용한 배지 A 5 mL(pH 4, 25 μmol의 옥살산을 포함함)를 첨가하여, 얻어지는 균체 현탁액을 「아네로팩·젠키」와 함께 밀폐용기에 넣고, 37℃, pH 4에서 4시간, 정치배양하였다. 이어서 얻어진 배양액 중의 옥살산량 및 분해율을 실시예 1 기재의 방법에 따라 측정 및 산출하였다.

표 3

균종	주	옥살산 분해량 (mM)	생균 수 (cfu/ml)	생균 수당 분해량(μ mol/cfu)	당해 균주의 생균 수당 분해량/기준 주의 생균 수당의 분해량	분해율 (%)
<i>L.gasseri</i>	203195	2.19	$4.8 \times 10^8$	$4.6 \times 10^{-9}$	13.1	43.8
<i>L.amylovorus</i>	2741	1.74	$4.4 \times 10^8$	$4.0 \times 10^{-9}$	20.0	34.8
<i>L.amylovorus</i>	2880	1.82	$5.0 \times 10^8$	$3.6 \times 10^{-9}$	18.0	36.6
<i>L.gasseri</i>	2727	1.40	$4.0 \times 10^8$	$3.5 \times 10^{-9}$	10.0	28.1
<i>L.gasseri</i>	JCM1131T	0.31	$8.8 \times 10^8$	$3.5 \times 10^{-10}$		6.2
<i>L.amylovorus</i>	JCM1126T	0.10	$5.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^{-10}$		2.0

[0153]

[0154] 각각의 종의 기본주의 생균 수당 옥살산 분해량에 대해, 생균 수당 옥살산 분해량이 10~20배 이상인 옥살산 분해활성이 높은 주를 얻을 수 있었다.

[0155] 이번에 스크리닝을 실시한 132주 중 옥살산 분해활성이 0이었던 주는 42주, 0.1 mM 이하였던 주는 34주, 1 mM 이하였던 주는 49주, 1 mM 이상이었던 주는 7주로, 옥살산 분해활성이 높은 주는 매우 적었다. 동물의 체내에 있어서의 옥살산 분해효과를 기대하는 경우에는 단시간에서 옥살산 분해활성이 높다는 것은 유리하다고 생각된다.

[0156] 이번에는 인간 유래 주를 사용하고 있는 것으로부터, 당해 인간 유래 주가 살아 인간 소화관 내를 통과할 수 있을 가능성도 충분히 생각되어, 프로바이오틱스로서 사용 가능하다고 생각된다. pH 4에서 4시간이라는 단시간에서의 분해량이 많은 균인 것으로부터, 위 내에서 옥살산을 대량으로 분해할 수 있으면, 소장으로부터 하부로 반입되는 옥살산량이 감소하여, 장에서 옥살산을 분해하는 균보다도 효과적으로 뇨중 옥살산량을 경감시키는 것이 가능하다. 또한 장내의 pH는 통상 6.5 부근이나, 장내의 유산균이 생산하는 유산에 의해, 장내가 국소적으로 저 pH가 되는 것도 생각할 수 있어, 저pH인 위 뿐 아니라, 장내에서의 옥살산 분해도 가능하다고 생각된다.

[0157] 이와 같이 하여, *Lactobacillus gasseri* OLL203195주, *Lactobacillus amylovorus* OLL2741주, *Lactobacillus amylovorus* OLL2880주 및 *Lactobacillus gasseri* OLL2727주의 4균주는 일본국 특허공표 제2003-500451에서 발견된 균주와 비교하여 약 5배(4.86배) 이상의 높은 옥살산 분해활성을 갖는 것이 명백해졌다.

[0158] [실시예 4]

[0159] 유산균의 뇨중 옥살산 저감작용에 관한 인 비보(in vivo)의 실험방법

[0160] 식사성 고옥살산뇨증 모델 동물을 제작하고, 그 동물의 뇨중 옥살산값에 미치는 미생물(유산균)의 영향을 검토하였다. 상기 방법은 구체적으로는, 옥살산 2 수화물을 0.075 중량%로 포함하는 혼합수를 조제하여, 랫트에 섭취시키고, 섭취 후부터의 뇨중 옥살산값을 음성균이나 대조균과 비교하는 방법이다.

[0161] [재료 및 실험순서]

[0162] [미생물]

[0163] 인 비트로(in vitro) 시험에서 옥살산 분해능이 높다고 판단된, *Lactobacillus gasseri* 2727주(이하에 있어서, 경우에 따라 「*Lactobacillus*」를 「L.」로 약칭한다), *L. amylovorus* 2880주의 2주를 사용하였다. 각종 유산균으로부터 인 비트로 시험과 동일하게 하여 균체 현탁액을 조제하였다. 균체 현탁액을  $1 \times 10^{10}$  CFU/10 mL/kg으로 랫트에 경구 투여하였다. 균체 현탁액은 글루코오스(wako) 2.5 g, NaCl(wako) 0.45 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(wako) 0.2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(wako) 0.2 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O(wako) 0.045 g, CaCl<sub>2</sub>(간토화학) 0.025 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(wako) 0.2 g, L-시스테인 염산염 1 수화물(wako) 0.25 g에 물을 첨가하여 1 L로 한 용액을 사용하였다(이하에 있어서, 이 용액을 용액 X

로 한다).

- [0164] [실험동물]
- [0165] 랫트(Wister SPF, 수컷, 7주령)를 사용하였다. 사육(순화와 시험)에는, 랫트용 플라스틱 케이지를 사용하고, 1 케이지당 1마리의 랫트를 수용하였다. 명암 사이클은 명기(明期)를 오전 7시~오후 7시(12시간)로 하였다.
- [0166] [예비 사육(순화)과 군 나누기]
- [0167] 실험동물은 반입한 후에 1주간의 예비 사육(순화)을 행하였다. 순화 중에는, 먹이(사료)로서 칼슘량을 50 mg/100 g으로 조제한 AIN-93G(오리엔탈 효모공업(주))(이하에 있어서, 이 사료를 특수 AIN-93G로 한다), 음용수로서 주사용수(오츠키)를 자유 섭취시켰다. 예비 사육한 랫트(입하 7일 후, 8주령, Day 0)를 대사 케이지에서 24 시간 뇨(입하 6일 오전부터 7일 오전)를 채뇨하였다. 이 뇨를 2 N 염산을 사용하여 pH를 5로 조정하고, 옥살산 칼슘 침전을 피하기 위해 1 L당 0.5 g의 EDTA를 첨가하였다. 얻어진 뇨중의 옥살산값을 실시예 1에 기재한 방법에 따라 HPLC로 측정하였다. 또한, 크레아티닌 측정 키트(라보어세이 크레아티닌(LABOASSAY creatinine)(Jaffe 법)(와코순약))를 사용하여 뇨중 크레아티닌을 측정하였다. 방법은 설명서의 지시에 따라, 마이크로플레이트법으로 실시하였다.
- [0168] 군 나누기는 각 군의 뇨중 옥살산량이 동등해지도록 행하였다. 시험에는, 1군당 7마리의 랫트(음성군만 3마리)를 사용하고, 음성군(제1군), 대조군(제2군), 군체 투여군(제3, 4군)의 합계 4군을 설정하였다. 군명, 먹이, 물, 투여물(투여용량), 마릿수 등을 이하에 나타낸다.
- [0169] · 음성군(제1군): 「특수 AIN-93G」 급이(給餌), 「주사용수」 급수, 투여 없음, 3마리
- [0170] · 대조군(제2군): 「특수 AIN-93G」 급이, 「옥살산 2 수화물을 0.075 중량%로 포함하는 주사용수」 급수, 「용액 X」 투여(10 mL/kg), 7마리
- [0171] · 군체 투여군(제3, 4군): 어느 군도, 「특수 AIN-93G」 급이, 「옥살산 2 수화물을 0.075 중량%로 포함하는 주사용수」 급수, 7마리. 각 군의 투여 군체 및 투여량은,
- [0172] 제3군은, 「L. gasseri 2727주의 용액 X의 현탁액( $1 \times 10^9$  CFU/mL)」 투여(10 mL/kg),
- [0173] 제4군은, 「L. amylovorus 2880주의 용액 X의 현탁액( $1 \times 10^9$  CFU/mL)」 투여(10 mL/kg).
- [0174] [본사육(시험)]
- [0175] 군 나누기 후의 다음날부터 시험기간으로 하고, 「주사용수」 음용수(음성군)와 「옥살산 2 수화물을 0.075 중량%로 포함하는 주사용수」 음용수(대조군, 군체 투여군)을 각각 급수기에 의해 랫트에 7일간 자유 섭취시켰다. 본 음용수의 급수 개시일을 Day 1으로 하고, 이후에서는 날짜와 함께 Day를 기산(起算)하였다. 군체 투여군의 실험동물에는, 상기의 군체 현탁액을  $1 \times 10^{10}$  CFU/10 mL/kg으로 강제 경구 투여하였다. 대조군에는, 군체 현탁액이 아니라 용액 X를 10 mL/kg으로 강제 경구 투여하였다.
- [0176] [측정과 검사 등]
- [0177] · 일반상태의 관찰과 체중의 측정
- [0178] 전 예(전 군)에 있어서 Day 1부터 Day 8의 연일, 투여시에 일반상태를 관찰하고, Day 0, Day 3, Day 5, Day 7의 오전 9~10시에 정시에서 체중을 측정하였다.
- [0179] · 섭이량(攝餌量)과 섭취량(攝水量)의 측정
- [0180] 전 예(전 군)에 있어서 Day 3(세팅값), Day 5(나머지 값, 세팅값), Day 7(나머지 값)의 오전 9~10시에 정시에서 섭이량과 섭취량을 측정하였다.
- [0181] · 채뇨와 생화학적 검사
- [0182] 전 예(전 군)에 있어서 Day 0, Day 3, Day 5, Day 7에 24시간 뇨를 채뇨하였다. 채취한 뇨는, 2 N 염산을 사용하여 pH를 5로 조정하고, 옥살산 칼슘 침전을 피하기 위해 1 L당 0.5 g의 EDTA를 첨가하였다. 얻어진 뇨중의 옥살산값을 실시예 1에 기재한 방법에 따라 HPLC로 측정하였다. 또한, 크레아티닌 측정 키트(라보어세이 크레아티닌(Jaffe법)(와코순약))를 사용하여 뇨중 크레아티닌을 측정하였다. 방법은 설명서의 지시에 따라, 마이크로플

레이트법으로 실시하였다.

[0183]

[통계처리]

[0184]

결과는 평균값±표준편차로 나타내고, 대조군과 균체 투여 각 군을 비교하였다. 수치화한 검사값의 분산비는 F 검정을 행하고, 등분산의 경우에는 Student's t-검정을, 부등분산의 경우에는 Aspin-Welch t-검정을 행하였다. 통계처리에는, 엑셀 통계 2004의 통계해석을 사용하고, 최저 유의수준을 양측 5%로 하였다.

[0185]

[결과]

[0186]

일반상태의 결과를 표 4에, 노중 옥살산값/g·크레아티닌값의 추이를 도 1에 나타낸다.

[0187]

유산균 투여에 따른 노중의 옥살산값의 저하에 대해서, 도 1에 나타내는 바와 같이, 용액 X로 현탁한 L.amylovorus OLL 2880 투여군 및 L.gasseri OLL 2727 투여군에 있어서, 유의차가 확인되었다. 일반상태는, 대조군(제2군)과 균체 투여군(제3군, 제4군) 사이에서 유의차가 확인되었다.

표 4

	제1군	제2군	제3군	제4군
시험기간 중의 체중 증가량(g)	23.6±7.6	14.0±5.4	13.9±5.0	17.3±5.1
시험기간 중의 섭이량(g)	98.6±17.8	92.2±7.0	91.6±7.3	96.1±5.2
시험기간 중의 섭취량(g)	124.3±20.3	96.8±9.3	98.4±11.4	103.3±5.8

[0188]

[0189]

**산업상 이용가능성**

[0190]

본 발명에 의해, 종래 알려져 있는 옥살산 분해활성을 갖는 유산균보다도 수배 높은 옥살산 분해활성을 갖는 유산균이 제공되었다. 그 유산균, 그 유산균의 처리물, 및 그 유산균 또는 그 처리물을 포함하는 조성물은, 옥살산이 관여하는 질병, 예를 들면, 신장·요로결석, 빈혈, 골다공증 등의 치료나 예방, 더 나아가서는 옥살산 또는 옥살산 화합물이 저감된 조성물이나 옥살산 또는 옥살산 화합물의 분해제의 제조, 옥살산 또는 옥살산 화합물을 분해하기 위한 방법에 유용하다. 또한, 유산균은 오랜 식경험이 있는 것으로부터, 장기간 및 다량을 투여한 경우에도 안전하게 섭취가 가능하다.

**수탁번호**

[0191]

기탁기관명 : 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터

수탁번호 : FERMBP-11004

수탁일자 : 20080902

기탁기관명 : 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터

수탁번호 : FERMBP-11005

수탁일자 : 20080902

기탁기관명 : 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터

수탁번호 : FERMBP-11006

수탁일자 : 20080902

기탁기관명 : 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허생물기탁센터

수탁번호 : FERMBP-11007

수탁일자 : 20080902

도면

도면1

