(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0023241
(43) 공개일자 2014년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A61K 35/74* (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01) *C12R 1/25* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0097445
(22) 출원일자 2013년08월16일
심사청구일자 2013년08월16일
(30) 우선권주장
1020120089714 2012년08월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
김동현
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
한명주
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유수미

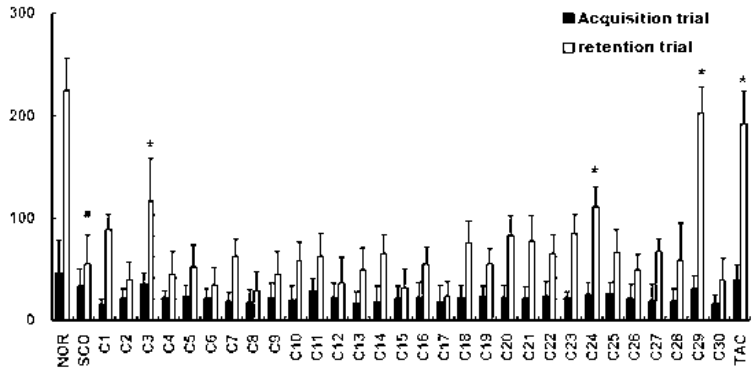
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **노화 및 치매의 예방 및/또는 치료 활성을 갖는 유산균**

(57) 요 약

본 발명은 항산화 및 항노화 기능 및 치매 개선 효과를 갖는 신규의 유산균을 제공하며, 보다 구체적으로 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸(*Lactobacillus pentosus var. plantarum*) C29 KCCM11291P 및 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) C3 KCCM430009를 제공한다. 또한 본 발명은 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3를 유효성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 약학 조성물 및 건강기능식품, 및 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3를 유효성분으로 포함하는 치매 예방 또는 치료용 조성물 및 치매 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주로 발효한 발효 조성물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

정일훈

경기도 안양시 동안구 관악대로 135, 131동 1007호 (비산동, 삼성래미안아파트)

정명아

경기도 의정부시 신곡로 13, 207동 903호 (신곡동, 현대2차아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨(*Lactobacillus pentosus var. plantarum*) C29 KCCM11291P.

청구항 2

락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 KCCM11291P 균주를 유효 성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 약학 조성물.

청구항 3

락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 KCCM11291P 균주를 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 KCCM11291P 균주를 유효 성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 효과를 가진 건강기능식품.

청구항 5

락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 KCCM11291P 균주를 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제3항에 있어서, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 건강기능식품.

청구항 8

락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) C3 KCCM43009 균주를 유효 성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 약학 조성물.

청구항 9

락토바실러스 쿠르바투스 C3 KCCM43009 균주를 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

락토바실러스 쿠르바투스 C3 KCCM43009 균주를 유효 성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 효과를 가진 건강기능식품.

청구항 11

락토바실러스 쿠르바투스 C3 KCCM43009 균주를 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 12

제9항에 있어서, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병

치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 건강기능식품.

청구항 14

락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 KCCM11291P 균주 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 KCCM43009 균주로 발효된 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 발효 조성물은 콩 또는 탈지콩 발효 조성물, 해동피 발효 조성물, 인삼 발효 조성물, 및 더덕 발효 조성물로 이루어진 군으로부터 선택되는 치매의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 16

제14항 또는 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 및 물질로 유발된 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 치매의 예방 또는 치료용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 김치에서 분리된 신규의 유산균에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 노화 및 치매의 예방 및/또는 치료 활성을 가진 신규의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸(*Lactobacillus pentosus var. plantarum*) C29 및 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) C3에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 고령화 사회로 빠르게 진행되고 있는 현대 사회에서 노화 과정을 지연시키는 것은 중요한 보건 과제 중 하나이다. 우리나라의 경우 2010년에 65세 이상의 인구가 11.3%를 차지하였으며, 2050년에는 37.3%로 급증할 것으로 예상되고 있다. 이와 같은 고령화 사회에서는 질병 이환율의 상승 및 막대한 의료비 지출이 예상되며 치매 등의 노인성 질환의 급증이 사회적으로 문제가 될 것으로 예상된다.

[0003] 노화가 진행되는 과정은 유전, 환경, 그리고 생활 방식의 복합적인 작용에 의해 영향을 받으며, 다양한 형태적, 생화학적 변화가 수반되는데, 특히, 산화스트레스의 증가와 염증 반응의 증가는 노화 촉진에 관여하는 주요 원인으로 여겨지고 있다. 산화스트레스는 반응성이 강한 산소 라디칼 (ROS, reactive oxygen species)의 생성 증가나 체내 항산화 방어 메커니즘의 감소로 일어나게 되는데, 그 결과 DNA 등의 생체 고분자가 파괴되고 세포 손상을 유발하여 노화를 촉진시키고, 치매를 비롯한 신경퇴행성 질환, 암, 심혈관계 질환 등의 노화 질병의 위험도를 높이게 된다.

[0004] Adler등 (Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, Zhang JY, Segal E, Chang HY. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. Genes Dev. 2007;21:3244-57)은 다수의 인체 조직과 실험 동물 조직에서 NF-κB 활성화 모티프(motif)와 노화과정을 조절하는 단위의 관련성을 입증하여 NF-κB로 매개되는 염증 반응과 노화 과정이 매우 밀접하게 연관되어 있음을 입증하였다. 또한, 노화는 PI3K/AKT를 활성화시키고, 이는 FOXO3를 인산화하여 ROS 생성을 억제하지 못하여 유전자 변이 등이 일어나게 됨이 알려져 있다.

[0005] 노화 질병 중 하나인 치매는 뇌의 만성적인 혹은 진행성 질환으로 인해 발생하며, 뇌조직의 퇴행, 변성 및 노화 중추신경계 감염(신경매독, 결핵성 뇌막염, 바이러스성 뇌염 등), 뇌경색, 뇌손상, 독성대사장애, 신경계질환(파킨슨병) 등이 치매를 일으키는 주요 원인으로 알려져 있다. 치매에는 알츠하이머형 치매(Alzheimer's

disease), 혈관성 치매, 및 기타 혼합형이 있으며, 우리나라 65세 이상의 노인 치매 환자중 50~60%가 알츠하이머형 치매이고 15~30%가 혈관성 치매이며 나머지 10~15%가 이 두 가지 질환의 혼합형이다. 뇌속 노폐물인 베타아밀로이드(Aß)가 알츠하이머형 치매의 주요 발병 원인으로 알려져 있으며, 알츠하이머형 치매의 치료를 위해 많은 약물들이 치료제로 시도되었으나 아직까지 뚜렷한 효과가 입증된 약물은 없다. 알츠하이머형 치매 환자들에게 부족한 뇌속 중요 신경전달물질 중 하나인 아세틸콜린(acetylcholine)에 작용하는 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterease) 제해제가 치료제로서 유일하게 사용되고 있으나, 이 약물은 부분적으로 인지기능의 호전은 보이지만 알츠하이머병의 진행에는 전혀 작용을 하지 못하는 것으로 알려져 있으며, 효과적인 치매 예방 또는 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 한편, 유산균은 오랫동안 이용되어 왔으며 유산균의 정장 작용, 항암 효과, 면역증강 효과 등의 유익한 효과가 보고되어 왔다. 이에 본 발명자들은 노화와 치매에 유익한 효과를 갖는 유산균을 찾기 위하여 연구한 결과, 김치로부터 분리된 신규의 유산균이 노화와 치매에 대해 예방 또는 치료 효과를 가짐을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 노화와 치매에 대해 예방 또는 치료 효과를 갖는 유산균의 제공을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 유산균을 포함하는, 항산화 및 항노화 조성물 및 치매의 예방 또는 치료용 조성물의 제공을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 유산균으로 발효시킨, 항산화 및 항노화 발효 조성물 및 치매의 예방 또는 치료용 발효 조성물의 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 김치에서 분리된 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨(*Lactobacillus pentosus var. plantarum*) C29 KCCM11291P를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29를 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29를 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29를 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 효과를 가진 건강기능식품을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29를 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29로 발효된 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29로 발효된 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 김치에서 분리된 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus* curvatus) C3 KCCM43009를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3을 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3을 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3을 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 효과를 가진 건강기

능식품을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3을 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3으로 발효된 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 조성물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 락토바실러스 쿠르바투스 C3으로 발효된 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는, 치매의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0024] 이하에서 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 및 락토바실러스 쿠르바투스 C3는 배추 김치로부터 분리된 신규의 미생물이다.

[0026] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29는 16s rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 및 생화학적 특성 분석에서 락토바실러스에 속하는 균주로서 락토바실러스 펜토서스와 락토바실러스 플란타륨 모두에 높은 분자계통학적 유연관계를 나타내는 균주로 동정되었으나 생화학적 특성이 락토바실러스 펜토서스에 좀더 유사하여 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29로 명명하였으며, 국제기탁기관인 한국미생물보존센터에 2012년 7월 9일에 기탁 번호 KCCM11291P로 기탁되었다.

[0027] 또한, 본 발명의 락토바실러스 쿠르바투스 C3는 16s rDNA 염기서열에 기초한 분자계통분류학적 분석에서 락토바실러스에 속하는 균주로서 락토바실러스 쿠르바투스에 속하는 균주로 동정되어 락토바실러스 쿠르바투스 C3으로 명명되었으며, 국제기탁기관인 한국미생물보존센터에 2012년 7월 9일에 기탁 번호 KCCM43009로 기탁되었다.

[0028] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29(이하에서는 "C29"라고도 함) 및 락토바실러스 쿠르바투스 C3(이하에서는 “C3"라고도 함)는 알츠하이머병 동물 모델인 마우스를 이용한 수동회피반응 시험에서 C29 균주 또는 C3 균주의 투여에 의해 마우스의 기억이 개선되는 효과가 확인되었으며, C29 균주는 Y자형 미로 시험과 수중미로 시험에서도 기억개선 효과가 확인되어, 치매의 예방 및 치료 효과가 입증되었다(실시예 2 참조).

[0029] 본 발명에 있어서, 치매란 다양한 원인에 의해 뇌기능이 손상되면서 이전에 비해 기억력, 언어 능력, 판단력 등의 인지 기능이 지속적이고 전반적으로 저하되어 일상생활에 지장이 나타나고 있는 상태를 말하며, 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매, 물질로 유발된 치매 등을 포함한다.

[0030] 또한, 16개월령 마우스에 C29 균주 또는 C3 균주를 3개월간 투여한 후 지질 과산화물, 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(Superoxide dismutase) 활성, 카탈라아제(Catalase) 활성, 및 글루타치온 농도를 측정한 결과, 생리식염수를 3개월간 투여한 16개월령 마우스에 비하여 현저하게 우수한 항산화 효과를 나타내었으며 노화관련 유전자들의 발현 감소를 나타내어, 항산화 및 항노화 효과가 입증되었다(표 6 및 실시예 3 참조).

[0031] 이로써 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29와 락토바실러스 쿠르바투스 C3는 치매와 노화의 예방 및 치료에 우수한 효과를 갖는 균주임이 확인되었다.

[0032] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29의 형태적 특징과 생리학적 특징, 수크로스 발효 분석 결과, 및 세포 지방산 조성이 각각 하기 표 1, 표 2 및 표 3에서 공지의 엘. 플란타륨(*L.plantarum*) ATCC 14917 및 엘.펜토서스(*L.pentosus*) DSM20314의 특성과 함께 나타난다.

표 1

[0033] 균주 C29, 엘. 플란타륨 ATCC 14917 및 엘.펜토서스 DSM20314의 형태적 특징 및 생리학적 특징

특징	균주 C29	엘.플란타륨 ATCC 14917™	엘. 펜토서스 DSM20314™
형태적 특징			
세포 모양	막대형(Rod)	막대형	막대형
그람 염색	양성	양성	양성

세포 크기(㎛)	1-1.2 x 2.2-2.6	0.4-0.6 x 0.8-2	0.8-1 x 2-6
생리학적 특징			
인돌 생성	-	-	-
글루코스의 가스 생성	-	-	-
카탈라아제	-	-	-
옥시다아제	-	-	-
MRS 배지에서의 성장			
10 °C	+	+	+
15 °C	+	+	+
45 °C	+	-	-
다양한 pH에서의 성장			
pH 3	+	-	-
pH 5	+	+	+
pH 7	+	+	+
NaCl의 존재하에서의 성장			
5%	+	+	+
8%	+	+	+
10%	-	-	-
위액에서의 안정성	안정함	불안정함	불안정함
장액에서의 안정성	안정함	불안정함	불안정함
G+C (mol%)	50.7	44.1[a]	46.1[a]

[0034] + : 양성 반응; - : 음성 반응

[0035] a : Zanoni, P., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Collins, M.D. (1987) Lactobacillus pentosus(fred, peterson, and anderson) sp. Nov., norn, rev. Int J Syst Bacteriol 37, 339-341으로부터 입수

표 2

[0036] API 20E 및 API 50CHL을 이용한 유산균의 수크로스 발효의 분석

	균주 C29	엘. 플란타륨[a] ATCC 14917™	엘.펜토서스[b] DSM 20314™
API 20E			
ONPG	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	-	-	-
ADH	-	-	-
LDC	-	-	-
ODC	-	-	-
URE	-	-	-
H_2S	-	-	-
VP	+	+	+
API 50CHL			
글리세롤	-	-	+
L-아라비노스	+	+	+
D-리보오스	+	+	+
D-자일로스	-	-	+
아도니톨	-	-	-
D-갈락토스	+	+	+
D-글루코스	+	+	+

D-프럭토스	+	+	+
D-만노스	+	+	+
L-람노스	+	-	D
둘시톨	-	-	D
마니톨	+	+	+
소르비톨	+	+	+
α-메틸-D-만노시드	+	+	-
α-메틸-D-글루코시드	-	-	D
N-아세틸-글루코사민	+	+	+
아미그달린	+	+	+
알부틴	+	+	+
에스쿨린	+	+	+
살리신	+	+	+
셀로비오스	+	+	+
말토스	+	+	+
락토스	+	+	+
멜리비오스	+	+	+
수크로스	+	+	+
트레할로스	+	+	+
이눌린	+	-	-
멜레지토스	+	+	D
라피노스	+	+	+
젠티오비오스	+	+	+
D-투라노스	+	+	D
D-아라비톨	-	+	D
글루코네이트	+	-	+

[0037] + : 양성 반응; - : 음성 반응; D : 가변적 반응

[0038] 상기 세 가지 유산균 중 어느 것도 2-케토-글루코네이트, 5-케토-글루코네이트, 에리트리톨, D-아라비노스, L-자일로스, β-메틸-D-자일로시드, L-솔보스, 이노시톨, 글리코겐, 자일리톨, D-라이소스, D-타가토스, D-퓨코스, L-퓨코스, L-아라비톨을 발효하지 않았음.

[0039] a : Van Reenen, C.A., Dicks, L.M. (1996) Evaluation of numerical analysis of random amplified polymorphic DNA (rapd)-pcr as a method to differentiate lactobacillus plantarum and lactobacillus pentosus. Curr Microbiol 32, 183-187로부터 입수.

[0040] b : Zanoni, P., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Collins, M.D. (1987) Lactobacillus pentosus(fred, peterson, and anderson) sp. Nov., norn, rev. Int J Syst Bacteriol 37, 339-341로부터 입수.

표 3

[0041] 균주 C29, 엘. 플란타룸 ATCC 14917 및 엘.펜토서스 DSM20314의 세포 지방산 조성

지방산	균주 C29	엘.플란타룸[a] ATCC 14917™	엘.펜토서스[a] DSM20314™
포화 지방산			
$C_{12:0}$	1.1	T	T
$C_{14:0}$	3.9	4.1	3.9
$C_{16:0}$	45.5	34.1	20.8
$C_{18:0}$	5.0	3.3	4.3
불포화 지방산			

$C_{16:1}$ ω7c	8.7	3.9	5.6
$C_{18:1}$ ω7c	25.5	27.2	45.1
분지쇄 지방산			
$C_{19:0}$ cyclo ω8c	10.1	8.7	5.7

[0042] T : 1% 미만의 미량의 산

[0043] a : 엘.플란타륨 :Van Reenen, C.A., Dicks, L.M. (1996) Evaluation of numerical analysis of random amplified polymorphic DNA (rapd)-pcr as a method to differentiate lactobacillus plantarum and lactobacillus pentosus. Curr Microbiol 32, 183-187로부터 입수.

[0044] 엘.펜토서스: Zanoni, P., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Collins, M.D. (1987) Lactobacillus pentosus(fred, peterson, and anderson) sp. Nov., norn, rev. Int J Syst Bacteriol 37, 339-341로부터 입수.

[0045] 또한, 본 발명의 락토바실러스 쿠르바투스 C3의 형태적 특징과 생리학적 특징, 및 수크로스 발효 분석 결과가 각각 하기 표 4 및 표 5에서 공지의 엘. 쿠르바투스 ATCC25601의 특성과 함께 나타난다.

표 4

[0046] 균주 C3, 엘. 쿠르바투스 ATCC25601의 형태적 특징 및 생리학적 특징

특징	균주 C3	엘.쿠르바투스 ATCC25601
형태적 특징		
세포 모양	막대형(Rod)	막대형
그람 염색	양성	양성
세포 크기(㎛)	1-1.2 x 2.2-2.6	0.4-0.6 x 0.8-2
생리학적 특징		
인돌 생성	-	-
글루코스의 가스 생성	-	-
카탈라아제	-	-
옥시다아제	-	-
MRS 배지에서의 성장		
10 °C	+	+
15 °C	+	+
45 °C	-	-
다양한 pH에서의 성장		
pH 3	-	-

pH 5	+	+
pH 7	+	+
G+C (mol%)	41.9	

[0047] + : 양성 반응; - : 음성 반응

표 5

[0048] API 20E 및 API 50CHL을 이용한 유산균의 수크로스 발효의 분석

	균주 C3	엘. 쿠르바투스 ATCC25601
API 20E		
H_2S	-	-
VP	+	+
API 50CHL		
L-아라비노스	-	-
D-리보오스	+	+
D-자일로스	-	-
D-갈락토스	+	+
D-글루코스	+	+
D-프럭토스	+	+
D-만노스	+	+
L-람노스	+	+
소르비톨	-	-
아미그달린	-	-
에스쿨린	+	+
살리신	+	+
셀로비오스	+	+
말토스	+	+
락토스	+	+
멜리비오스	-	-

수크로스	-	-
트레할로스	-	-
멜레지토스	-	-
라피노스	-	-

[0049] + : 양성 반응; - : 음성 반응;

[0050] 상기 유산균 중 어느 것도 2-케토-글루코네이트, 5-케토-글루코네이트, 에리트리톨, D-아라비노스, L-자일로스, β-메틸-D-자일로시드, L-솔보스, 이노시톨, 글리코겐, 자일리톨, D-라이소스, D-타가토스, D-퓨코스, L-퓨코스, L-아라비톨을 발효하지 않았음.

[0051] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 균주와 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주는 노화와 치매의 예방 및 치료를 위해 이용될 수 있으며, 따라서, 본 발명은 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 균주 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주를 유효 성분으로 포함하는 항산화 및 항노화 약학 조성물, 및 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0052] 본 발명의 약학 조성물은 경구적으로 (예를 들면, 복용 또는 흡입) 또는 비경구적으로 (예를 들면, 주사, 경피 흡수, 직장투여) 투여될 수 있으며, 주사는 예를 들면, 정맥주사, 피하주사, 근육내주사 또는 복강내주사일 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 투여 경로에 따라, 정제, 캡슐제, 과립제, 파인 서브틸래(fine subtilae), 분제, 설하 정제, 좌약, 연고, 주사제, 유탁액제, 현탁액제, 시럽제, 분무제 등으로 제형화될 수 있다. 상기 여러 가지 형태의 본 발명에 따른 약학 조성물은 각 제형에 통상적으로 사용되는 약학적으로 허용되는 담체(carrier)를 사용하여 공지기술에 의해 제조될 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체의 예는 부형제, 결합제, 붕해제(disintegrating agent), 윤활제, 방부제, 항산화제, 등장제(isotonic agent), 완충제, 피막제, 감미제, 용해제, 기제(base), 분산제, 습윤제, 현탁화제, 안정제, 착색제 등을 포함한다.

[0053] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제의 형태에 따라 다르지만, 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29 균주 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주를 약 0.01 내지 100 중량%로 포함한다.

[0054] 본 발명의 약학 조성물의 구체적인 투여량은 치료되는 사람을 포함한 포유동물의 종류, 체중, 성별, 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 다를 수 있으며, 본 기술분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 특정한 용도에 따른 적절한 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 바람직하게는, 경구투여의 경우에는 하루에 체중 1kg당 활성성분 0.001 내지 500 ㎎이 투여되고, 비경구투여의 경우에는 하루에 체중 1kg당 활성성분 0.01 내지 200 ㎎이 투여된다. 보다 바람직하게는, 하루에 체중 1 kg 당 활성성분 100 ㎎이 투여된다. 상기 총 일일 투여량은 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 한번에 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[0055] 본 발명은 또한 C29 균주 또는 C3 균주를 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 효과를 가진 건강기능식품과 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0056] 본 발명의 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액제, 에멀젼, 시럽제 등의 경구형 제제 형태이거나, 캔디, 과자, 껌, 아이스크림, 면류, 빵, 음료 등 일반적인 식품에 첨가될 수 있다.

[0057] 본 발명의 건강기능식품은 형태에 따라 통상적인 방법으로 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 감미제, 방향제, 보존제, 계면활성제, 윤활제, 부형제 등을 적절히 사용하여 제조될 수 있다.

[0058] 상기 건강기능식품의 제조에 있어서 C29 균주 또는 C3 균주의 함량은 건강기능식품의 형태에 따라 다르지만, 대략 0.01 내지 100 중량%의 농도이다.

[0059] 또한, 본 발명은 C29 균주 또는 C3 균주로 발효한 발효 조성물을 유효 성분으로 포함하는, 항산화 및 항노화 효과를 가진 조성물과 치매의 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명에 있어서, 상기 발효 조성물은 콩 또는 탈지콩 발효 조성물, 해동피 발효 조성물, 인삼 발효 조성물, 및 더덕 발효 조성물을 포함한다.

[0061] 본 발명에 있어서, 콩 또는 탈지콩 분말의 물 현탁물은 건조한 콩 또는 탈지콩 분말에 중량대비 5 내지 15배의 물을 첨가하여 현탁하여 사용하는 것을 의미하나, 이에 한정되는 것은 아니며 본 발명의 목적에 부합하는 한 물에 불린 콩을 갈아서 두유 형태로 제조하여 사용할 수도 있다.

[0062] 본 발명에 있어서, 상기 해동피, 인삼, 및 더덕은 추출물 또는 엑기스 형태일 수 있으며 바람직하게는 열수추출법, 주정(酒精)추출법 또는 혼합추출법에 의해 제조된 추출물 형태인 것을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출물의 추출효율을 높이기 위하여 분쇄 또는 분말화할 수 있으며, 당업계에 공지된 통상적인 추출법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들면 물 추출법, 알코올 추출법, 유기용매 추출법 및 초임계 추출법 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 물 추출법을 이용하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 상기 알코올 추출법에 있어 사용되는 추출용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올,이소프로판올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 6의 저급 알코올 등을 사용할 수 있으며. 상기 유기용매 추출법의 추출용매로는 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 염산, 초산, 포름산, 구연산, 시클로헥산 및 석유에테르 등의 유기용매; 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다.

[0064] 이때, 추출시 첨가되는 추출용매의 비율은 특별히 한정되지 않으나, 해동피, 인삼 또는 더덕 건조 중량에 대하여 추출용매를 2배 내지 20배(중량기준)로 사용할 수 있다. 추출효율을 증가시키기 위해서는 바람직하게는, 해동피, 인삼 또는 더덕에 대하여 추출용매 5배 내지 15배(중량기준)를 사용하여 2회 이상 수회 반복할 수 있다.

[0065] 이때, 추출온도는 50 내지 110℃가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 70 내지 100℃이다. 추출시간은 추출온도에 따라 다르지만, 1시간 내지 48시간, 바람직하게는 2시간 내지 8시간 추출한다. 또한, 추출시 교반기(shaker)로 교반할 경우에 더욱 추출효율을 증대시킬 수 있다.

[0066] 상기 엑기스는 감압증류법이나 박막증류법으로 제조할 수 있다.

[0067] 본 발명에 있어서, C29 균주 또는 C3 균주를 접종하여 발효시킨 콩 또는 탈지콩 발효 조성물, 해동피 발효 조성물, 인삼 발효 조성물, 및 더덕 발효 조성물은 알츠하이머병 동물 모델인 마우스를 이용한 수동회피반응 시험에서 상기 발효 조성물의 투여에 의해 마우스의 기억이 개선되는 효과가 확인되어, 치매의 예방 및 치료 효과가 입증되었다(실시예 5 참조).

[0068] 본 발명에 있어서, 상기 추출물에 C29 균주 또는 C3 균주 접종시 잡균의 생장을 억제하기 위해 100℃ 이상에서 15분 내지 1시간 동안 가열하여 멸균하여 사용한다.

[0069] 상기 C29 균주 또는 C3 균주의 접종량은 발효에 이용되는 추출물의 종류에 따라 다르지만 1×10^{8} CFU/ml 이상이 되게 하고 발효온도는 20 내지 40℃가 바람직하다. 본 발명의 목적에 부합되는 것이라면 발효 시간은 특별한 제한은 없으나, C29 균주 또는 C3 균주를 접종하여 10 내지 30시간 동안 발효할 수 있다. 여기서, 10시간 이하로 발효하면 발효 조성물이 충분히 만들어지지 않고, 30시간 이상으로 발효하면 유기산이 많이 만들어져 신맛이 강하여 식감이 떨어지기 때문에 상술한 발효 시간 범위 내에서 발효하는 것이 바람직하다.

[0070] 또한, 본 발명에 있어서, 발효에 사용되는 재료에 따라 다양한 발효 식품을 제조할 수 있으며, 일례로 분유 또는 우유에 C29 균주 또는 C3 균주를 접종하고 상기와 같은 방법으로 발효시킴으로써 요쿠르트 등의 유산균 발효 음료를 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0071] 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주는 노화와 치매에 대해 우수한 예방 및 개선 효과를 가짐이 확인되어 노화와 치매의 예방 또는 치료를 위해 유용하게 이용될 수 있다. 따라서 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 균주 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주를 포함하는 약학 조성물과 건강기능식품은 노화와 치매를 예방하거나 치료하기 위하여 효과적으로 이용될 수 있으며, 일상적으로 섭취하는 김치에 존재하는 균주가 유효 성분이므로 부작용이나 독성 등의 염려없이 이용될

수 있을 것이다. 또한, 본 발명의 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29 또는 락토바실러스 쿠르바투스 C3 균주를 접종하여 발효 조성물을 제조함으로써 노화와 치매를 예방하거나 치료하기 위한 조성물로 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1은 C29 유산균의 16S rDNA 서열(서열 번호 1)을 보여준다.

도 2는 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29의 위치를 보여주는 계통수이다.

도 3은 수동회피반응 시험 결과를 보여주는 그래프이다.

도 4는 C29 균주의 기억 개선 효과가 농도의존적으로 커짐을 보여주는 그래프이다.

도 5는 C29 균주의 기억 개선 효과를 보여주는 젤 사진이다.

도 6은 실시예 2의 Y자형 미로 시험의 결과를 보여주는 그래프이다.

도 7은 실시예 2의 수중미로 시험의 결과를 보여주는 그래프로서, 검은 사각형은 스코폴아민 + (1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스 C29)이고, 흰색 사각형은 스코폴아민 + (1×10^{10} CFU/마우스 C29)이고, 검은 삼각형은 스코폴아민 + (10 mg/kg 타크린 양성대조약물)이고, 흰색 원은 스코폴아민 단독이고, 검은 원은 정상 대조 마우스이다. 값은 평균 ± SEM (n=6)이다.

$^{\#}p<0.05$ vs. 정상 대조군이며, $^{*}p<0.05$ vs. 스코폴아민 단독처리 대조군이다.

도 8은 C29 균주의 투여에 따른 노화관련 유전자 인산체의 발현량 변화를 보여주는 젤 사진이다.

도 9는 실시예 3의 Y자형 미로 시험의 결과를 보여주는 그래프로서, Y는 어린 마우스이고, O는 노화 마우스이고, O/C29는 C29 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이고, O/C3은 C3 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이고, O/C24는 C24 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이다.

도 10은 실시예 3의 수중미로 시험의 결과를 보여주는 그래프로서, Y는 어린 마우스이고, O는 노화 마우스이고, O/C29는 C29 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이고, O/C3은 C3 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이고, O/C24는 C24 유산균(1×10^9 콜로니 형성 유닛 (CFU)/마우스)을 투여한 노화 마우스이다. 값은 평균 ± SEM (n=6)이다.

도 11은 C3 유산균의 16S rDNA 서열(서열 번호 2)을 보여준다.

도 12는 C29 또는 C3 균주로 발효된 발효 조성물의 인지 기능 개선효과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0074] 실시예 1. 유산균 분리

[0075] 배추김치를 MRS 브로쓰(broth)에 현탁하고, 상등액을 MRS 한천(agar) 배지에 이식한 다음, 24시간 동안 37℃에서 혐기적으로 배양하여 자라나온 콜로니를 선별하여 그람 염색과 16S rDNA를 분석하여 락토바실러스 균주를 분리하였다.

[0076] 또한, 사람의 분변을 GAM 브로쓰(Nissui Pharmaceutical Company, Ltd., 일본)에 현탁하고, 상등액을 BL 한천 배지(Nissui 제약)에 이식한 다음, 48시간 동안 37℃에서 혐기적으로 배양하여 자라나온 콜로니를 선별하여 그람 염색과 16S rDNA를 분석하여 락토바실러스와 비피도박테리움 균주를 분리하였다.

[0077] 분리된 균주는 다음과 같다.

[0078] 1) 김치에서 분리하여 사용한 유산균

[0079] 류코노스톡 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) C1

[0080] 류코노스톡 김치(*Leuconostoc kimchii*) C2

[0081] 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*) C3

[0082] 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) C4

[0083] 락토바실러스 브레비스 C5

[0084] 락토코커스 플란타륨(*Lactococcus plantarum*) C6

[0085] 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) C7

[0086] 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*) C8

[0087] 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) C9

[0088] 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*) C10

[0089] 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*) C11

[0090] 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*) C12

[0091] 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*) C13

[0092] 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) C14

[0093] 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*) C15

[0094] 락토바실러스 사케이 C21

[0095] 락토바실러스 사케이 C22

[0096] 락토바실러스 사케이 C23

[0097] 락토바실러스 플란타륨 C24

[0098] 락토바실러스 플란타륨 C25

[0099] 락토바실러스 플란타륨 C26

[0100] 락토바실러스 펜토서스 C27

[0101] 락토바실러스 펜토서스 C28

[0102] 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타륨 C29

[0103] 락토바실러스 사케이 C30

[0104] 2) 사람소화관에서 분리하여 사용한 유산균

[0105] 비피도박테리움 브레비(*Bifidobacterium breve*) C16

[0106] 비피도박테리움 론검(*Bifidobacterium longum*) C17

[0107] 비피도박테리움 애돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) C18

[0108] 비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*) C19

[0109] 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) C20

[0110] 실시예 2. 항치매 효과의 확인

[0111] 김치와 분변에서 분리된 30가지 유산균 중에서 항치매 효과를 갖는 유산균을 확인하기 위하여 상기한 C1 내지

C30 균주와 실험 동물을 이용하여 실험을 실시하였다.

[0112] 실험에 사용된 모든 동물은 28~30 g의 수컷 ICR계 마우스로 실험동물 사용 및 관리에 관한 지침 (NIH publication No. 85-23)에 의거하여 실험을 수행하였다. 실험동물들을 우리(cage) 당 5~6 마리 유치하고 먹이 섭취는 자유롭게 방치하였다. 사육장내 온도는 23 ± 1 ℃, 습도는 60 ± 10 %이고, 12 시간 (07:30 ~ 19:30) 일장을 항상 유지하였다.

[0113] 2-1. 수동회피반응 시험(Passive avoidance task test)

[0114] 실험기구로 실험상자(50 x 15 x 40cm, electrofiable frid floor)는 칸막이를 이용하여 두 구획으로 구분하는데 작은 입구를 통해 한쪽에서 건너편 구획으로 들어가면 자동적으로 입구가 닫히도록 되어있다. 칸막이로 나누어진 구획의 한쪽에 조명을 켜고 동물을 넣으면 주변을 살피다가 조명이 없는 어두운 구획으로 들어가게 되면, 자동적으로 입구가 닫히고, 즉시 0.25 mA의 전류를 바닥의 스테인레스 그리드를 통해 1초 동안 흘려 전기충격(foot shock)을 준다. 익일 조명이 켜진 구획에 실험동물을 넣은 후부터 이 동물이 어두운 구획으로 넘어가 입구가 닫힐 때까지의 시간(latency)을 측정한다. 대조군과 시험군에게 이와 같이 어두운 구획으로 들어가기까지의 시간을 측정, 비교한다. 최대 제한시간은 300초로 하는데, 300초가 넘도록 어두운 구획으로 들어가지 않으면 수동회피반응 시간을 300초로 결정한다. 동물이 어두운 구획으로 넘어가 입구가 닫힐 때까지의 시간이 클수록 학습을 통한 수동 회피에 대한 기억이 잘 유지되는 것으로 판단하였다.

[0115] 실험에 사용한 C1 내지 C30의 유산균 30종을 각각 $1x10^{10}$ CFU(개)를 1일 1회씩 2일간 치매 동물 모델인 마우스에 투여하였다. 스코폴아민(Scopolamine) (0.9 mg/kg)은 유산균 마지막 투여 1시간 후에 투여하였다. 그 결과, 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 실험에 사용한 유산균중 C29가 수동 회피에 대한 기억이 가장 잘 유지되며 치매 치료제인 타크린(Tacrin, TAC, 10 mg/kg)보다 효과가 우수한 것으로 나타났으며, 다음으로 C3, C24 순이었다.

[0116] 가장 효과가 우수한 것으로 확인된 C29 유산균을 $1 X 10^{9}$ 및 $1 X 10^{10}$ CFU(개)를 1일 1회씩 2일간 마우스에 투여하였다. 스코폴아민 (0.9 mg/kg)은 유산균 마지막 투여 1시간 후에 투여하였다. 그 결과, 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, C29는 농도의존적으로 효과를 나타냈다.

[0117] 또한, 이 동물에서 치매개선 효과를 확인하기 위해 뇌의 히포캠퍼스를 분리하여 프로테아제 억제제 칵테일(protease inhibitor cocktail)이 함유된 100 ㎕의 RIPA buffer (Gibco사)를 첨가하여 균질화시켰다. 4℃, 13000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 -80℃에서 보관하면서 p-CREB, CREB, BDNF 및 β-액틴을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다.

[0118] 먼저, 상등액을 취해 SDS 10%(w/v) 폴리아크릴아미드 젤에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다 (샘플, 50 ㎍). 전기영동한 것을 니트로셀룰로스지에 100V, 400mA에서 1시간 10분간 트랜스퍼하고, 이 트랜스퍼된 니트로셀룰로스지를 30분간 5% 탈지유로 블로킹한 후 5분씩 3회 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100으로 밤새 반응시켰다. 그 후 10분씩 3회 세척한 후, 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000으로 1시간 20분간 반응시켰다. 그 후 15분씩 3회 세척하고, 형광발색시켜 현상하였다. 그 결과, 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 스코폴아민 만을 투여한 치매모델 동물군에 비해 C29를 스코폴아민과 동시에 투여한 군에서 스코폴아민 투여에 의해 감소한 p-CREB 및 BDNF가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 C29 유산균이 기억 개선 효과를 가짐을 보여주는 것이다.

[0119] 상기와 같은 실험 결과는 C29와 C3 유산균이 기억력 개선을 통해 치매 개선 효과를 나타냄을 잘 보여준다.

[0120] 2-2. Y자형 미로 실험 (Y-maze task)

[0121] Y자형 미로 측정장치는 3개의 통로 (arm)를 뻗어 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이 25 cm, 높이 14 cm, 폭 5 cm 이고 동일한 각도로 위치한다. Y자형 미로의 한 통로의 끝에 실험동물의 머리 부분이 향하도록 두고 8 분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 한다. 동물의 움직임을 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것 (arm entry)으로 본다. 동물의 움직임을 교차횟수 (alternation)로 나타내는데, 교차횟수란 동물이 연속적으로 3개의 통로를 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의된다. 자발적인 교차행동량은 실제 교차횟수와 최대 가능한 교차횟수 (즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분비로 표시한다.

[0122] 실험에 사용한 유산균 중 가장 우수했던 유산균인 C29를 $1x10^{9}$ 및 $1x10^{10}$ CFU(개)를 1일 1회씩 2일간 투여하였다. 스코폴아민 (0.9 mg/kg)은 유산균 마지막 투여 1시간 후에 투여하였다.

[0123] 그 결과, 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 스코폴아민만을 투여한 시험군에 비하여 C29를 투여한 시험군은 농도의존적으로 기억 개선 효과를 나타냈다.

[0124] 2-3. 수중미로 시험(Water maze task)

[0125] 원형의 물탱크(지름 100cm, 높이 35cm)에 온도 23℃의 물 속에 장치한 플랫폼이 보이지 않도록 분유를 넣어 부옇게 만든 물을 15cm 깊이로 채웠다. 마우스를 이용하는 경우, 플랫폼(platform, 지름 4.5cm, 높이 14.5cm)을 전체 물 탱크를 4등분한 중 하나의 부채꼴 중앙에 놓아 플랫폼 상단이 수면 0.5cm 밑에 위치하도록 하였다. 이 장치를 위치를 확인할 만한 표식이 있는 실험실에 설치하였다. 훈련 시험(Training trial)은 1일 3회씩 5일간 연속적으로 실시하였다. 일단 마우스가 플랫폼을 찾으면 약 10초간 플랫폼에 머무르도록 두었다가 원래의 우리로 돌아가 있도록 한 5분 후에 다음 시험을 실시하였다. 만일 마우스가 120초 이내에 플랫폼을 찾지 못하면 이를 플랫폼에 10초간 두었다가 시험을 끝냈다. 훈련이 끝난 동물을 대상으로 마지막 훈련 시험 24시간 후에 프로브 시험(probe test)을 실시하였다. 이때는 풀에서 플랫폼을 제거하고 90초 동안에 플랫폼이 놓여 있던 4분원에 머무는 시간을 측정하여 백분율로 나타냈다.

[0126] 실험에 사용한 유산균 중 가장 우수했던 C29 유산균을 $1x10^{9}$ 및 $1x10^{10}$ CFU(개)를 1일 1회씩 4일간 투여하면서 매일 수영 시간을 측정하였다. 스코폴아민 (0.9 mg/kg)은 유산균 첫 투여 1시간 후에 투여하였다.

[0127] 그 결과, 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, C29 유산균은 농도의존적으로 기억 개선 효과를 나타냈다.

[0128] 실시예 3. 항산화, 항노화, 및 항치매 효과의 확인

[0129] 항산화, 항노화 및 항치매 효과의 확인을 위하여, 16개월령 마우스에 3가지 유산균 C29, C3, C24(각각 $1x10^{9}$ CFU)를 주 5일씩 12주간 투여하고 산화반응의 진행이 빠른 대장에서 유산균의 항산화 효과와 노화관련 유전자 AKT, FOXO3, NF-kB(p65), mTor 인산화체를 측정하였다. 비교 유전자로 베타-액틴을 측정하였다. 또한, 기억력 개선 효과를 측정하였다.

[0130] 1) 지질 과산화물 분석

[0131] 실험동물의 대장조직 100 mg에 프로테아제 억제제 칵테일이 함유된 250 ㎕의 RIPA buffer를 첨가하여 균질화시켰다. 그 후 4℃, 13000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 -80℃에서 보관하면서 지질 과산화 분석에 사용하였다.

[0132] 대장조직 내 지질 과산화 정도는 TBARS 분석 키트(Cayman chem., USA)를 사용하여 분석하였다. 대장조직의 균질액 100 ㎕를 5 ㎖의 폴리프로필렌 스크류캡 원심분리 튜브에 넣은 다음, 100 ㎕의 SDS 용액을 첨가하고 가볍게 흔들었다. 4 ㎖의 컬러 시약을 튜브에 첨가한 다음, 1시간 동안 끓는 물에 넣어 반응을 중지시켰다. 그 후, 4℃, 13000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 실온에서 30분간 정치하고 ELISA 판독기를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 말론알데히드(MDA)를 사용하여 표준곡선을 작성하고 이것으로부터 생성된 MDA의 양을 측정하였다.

[0133] 2) 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(Superoxide dismutase)(SOD) 활성

[0134] Cu, Zn-SOD 활성은 잔틴 옥시다아제-사이토크롬(xanthine oxidase-cytochrome) C 시스템을 사용하여 측정하였다. 50 mM 인산칼륨 버퍼(pH 7.8, 0.1 mM EDTA 함유) 2.4 ㎖, 0.1 mM 페리사이토크롬 C 0.3 ㎖, 1% 데옥시콜레이트 0.2 ㎖, 1.5 mM 시안화칼륨 0.1 ㎖, 0.5 mM 잔틴 0.3 ㎖ 및 희석 잔틴 옥시다아제 20 ㎖를 잘 혼합하여, 페리사이토크롬 C의 감소율을 25 ℃, 550 nm에서 측정하였다. SOD의 1 unit는 사이토크롬 C의 50% 감소를 저해하기 위한 SOD의 양으로 정의하였다.

[0135] 3) 카탈라아제(Catalase) 활성

[0136] 50 mM 인산염 버퍼(pH 7.0) 2 ㎖에 효소원 100 ㎕를 가하고 10 mM H_2O_2 용액을 1 ㎖ 가하여 240 nm에서 2분간 흡광도 감소를 측정하였다. 1 unit는 1분 동안 H_2O_2 1 mol을 분해하는 효소의 양으로 정의하였다.

[0137] 4) 글루타치온(GSH)

[0138] GSH 농도는 샘플을 인산염 버퍼로 희석하여 o-프탈알데히드를 가하고, 15분 진탕 후, 여기 파장 345 nm, 방사 파장 425 nm에서 형광을 측정하였다.

[0139] 상기한 바와 같은 4가지의 실험 결과, 하기 표 6에 나타난 바와 같이, 실험에 사용한 3가지의 균주 모두 우수한 항산화 및 항노화 결과를 나타냈다. 가장 우수한 균주는 C29였고, 이어서 C24, C3 순이었다.

표 6

[0140]

군	효소활성 (mol/min/mg)			
	수퍼옥사이드 디스뮤타아제 (mol/min/mg)	카탈라아제 (mol/min/mg)	말론알데히드 (μmol/mg 단백질)	글루타치온 (㎍/mg 단백질)
2개월령 마우스에 생리식염수 (3개월) 투여	2.8±0.6	6.0±0.6	2.5±0.9	3.9±0.2
16개월령 마우스에생리식염수 (3개월) 투여	0.9±0.2	0.8±0.5	9.4±0.2	1.9±1.3
16개월령 마우스에C29 (3개월) 투여	1.6±0.4	4.5±1.0	5.2±1.9	3.9±0.5
16개월령 마우스에 C3 (3개월) 투여	1.8±0.3	4.2±1.2	5.3±1.2	2.8±0.9
16개월령 마우스에C24 (3개월) 투여	1.9±0.6	4.1±1.6	4.2±2.1	4.0±1.4

[0141] 또한, 실험동물의 대장조직 100 ㎎에 프로테아제 억제제 칵테일이 함유된 250 ㎕의 RIPA buffer (Gibco사)를 첨가하여 균질화시켰다. 4℃, 13000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 -80℃에서 보관하면서 포스포르-FOXO3, 포스포르-p65, p65, 포스포르-mTor, 포스포르-AKT 및 β-액틴을 면역블롯팅 방법으로 측정하였다.

[0142] 상등액을 취해 SDS 10%(w/v) 폴리아크릴아미드 젤에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다 (샘플, 50 ㎍). 전기영동한 것을 니트로셀룰로스지에 100V, 400mA에서 1시간 10분간 트랜스퍼하고, 이 트랜스퍼된 니트로셀룰로스지를 30분간 5% 탈지유로 블로킹한 후 5분씩 3회 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100으로 밤새 반응시켰다. 그 후 10분씩 3회 세척한 후, 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000으로 1시간 20분간 반응시켰다. 그 후 15분씩 3회 세척하고, 형광발색시켜 현상하였다.

[0143] 유효성분과 LPS 처리하지 않은 것을 제외하고, 동일하게 처리한 세포를 대조군으로 하였다. 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, C29 또는 C3로 처리한 시험군의 경우, 비처리군에 비하여 p-p65, p-FOXO3, p-mTor, p-AKT 등이 현저하게 줄어드는 것을 볼 수 있으며, 이는 C29 또는 C3에 의한 항산화 및 항노화 효과를 잘 보여주는 것이다.

[0144] 5) Y자형 미로 실험 (Y-maze task)

[0145] Y자형 미로 측정장치는 3개의 통로 (arm)를 뻗어 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이 25 cm, 높이 14 cm, 폭 5 cm 이고 동일한 각도로 위치한다. Y자형 미로의 한 통로의 끝에 실험동물의 머리 부분이 향하도록 두고 8 분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 한다. 동물의 움직임을 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것 (arm entry)으로 본다. 동물의 움직임을 교차횟수 (alternation)로 나타내는데, 교차횟수

란 동물이 연속적으로 3개의 통로를 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의된다. 자발적인 교차행동량은 실제 교차횟수와 최대 가능한 교차횟수 (즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분비로 표시한다.

[0146] 실험에서 C29 유산균, C3 유산균 및 C24 유산균을 16개월령 마우스에 각각 $1x10^9$ CFU(개)를 1일 1회씩 2일간 투여하였다. 본 시험에서는 어린 마우스에 비하여 노화 마우스는 기억력이 떨어지기 때문에 스코폴아민은 투여하지 않았다.

[0147] 그 결과, 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 노화된 마우스의 기억력 개선효과는 C29 유산균이 가장 우수했으며 그 다음으로 C3 유산균, C24 유산균 순이었다.

[0148] 6) 수중미로 시험(Morris water maze test)

[0149] 원형의 물탱크(지름 100cm, 높이 35cm)에 온도 23℃의 물 속에 장치한 플랫폼이 보이지 않도록 분유를 넣어 부옇게 만든 물을 15cm 깊이로 채웠다. 마우스를 이용하는 경우, 플랫폼(platform, 지름 4.5cm, 높이 14.5cm)을 전체 물 탱크를 4등분한 중 하나의 부채꼴 중앙에 놓아 플랫폼 상단이 수면 0.5cm 밑에 위치하도록 하였다. 이 장치를 위치를 확인할 만한 표식이 있는 실험실에 설치하였다. 훈련 시험(Training trial)은 1일 3회씩 5일간 연속적으로 실시하였다. 일단 마우스가 플랫폼을 찾으면 약 10초간 플랫폼에 머무르도록 두었다가 원래의 우리로 돌아가 있도록 한 5분 후에 다음 시험을 실시하였다. 만일 마우스가 120초 이내에 플랫폼을 찾지 못하면 이를 플랫폼에 10초간 두었다가 시험을 끝냈다. 훈련이 끝난 동물을 대상으로 마지막 훈련 시험 24시간 후에 프로브 시험(probe test)을 실시하였다. 이때는 풀에서 플랫폼을 제거하고 90초 동안에 플랫폼이 놓여 있던 4분원에 머무는 시간을 측정하여 백분율로 나타냈다.

[0150] 실험에서 C29 유산균, C3 유산균 및 C24 유산균을 16개월령 마우스에 각각 $1x10^9$ CFU(개)를 1일 1회씩 4일간 투여하면서 매일 수영 시간을 측정하였다. 본 시험에서는 어린 마우스에 비하여 노화 마우스는 기억력이 떨어지기 때문에 스코폴아민은 투여하지 않았다.

[0151] 그 결과, 도 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, 노화된 마우스의 기억력 개선효과는 C29 유산균이 가장 우수했으며 그 다음으로 C3 유산균, C24 유산균 순이었다.

[0152] 실시예 4. C29 및 C3 유산균의 동정

[0153] 상기 실험들에서 우수한 항산화 및 항노화 효과 및 치매 개선 효과를 가진 것으로 확인된 C29 균주와 C3 균주를 동정하기 위하여, 16S rDNA 유전자 서열 비교를 통한 계통유전학적 분석을 실시하였다.

[0154] 블라스트 유사성 조사 프로그램을 이용하여 rDNA의 염기 서열을 비교하고, 다양한 락토바실러스 종 균주들의 16S rDNA 유전자 서열과 함께 다중 서열 정렬을 진행한 후 계통수에서의 위치를 판별한 결과, C29 유산균은 락토바실러스 플란타룸 균주 BIM B-536과 락토바실러스 펜토서스 균주 LS3과 99.9% 이상의 상동성을 나타내어 락토바실러스 펜토서스 변종 플란타룸 C29로 명명하고, 기탁 기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 2012년 7월 9일자로 기탁 번호 KCCM11291P로 기탁하였다. 또한, C3 유산균은 락토바실러스 쿠르바투스와 99.9% 이상의 상동성을 나타내어 락토바실러스 쿠르바투스 C3으로 명명하고, 기탁 기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 2012년 7월 9일자로 기탁 번호 KCCM43009로 기탁하였다.

[0155] 실시예 5. C29 또는 C3 균주 발효 조성물의 항치매 효과 확인

[0156] C29 또는 C3 균주로 발효된 콩 또는 탈지콩 발효 조성물, 해동피 발효 조성물, 인삼 발효 조성물, 및 더덕 발효 조성물의 항치매 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 실험 동물을 이용하여 수동회피반응 시험(Passive avoidance task test)을 실시하였다.

[0157] 5-1. 발효 조성물 제조

[0158] 콩 또는 탈지콩 분말 10g을 물 90ml에 현탁하고 멸균하여 $1x10^8$CFU(개)/0.1ml의 C29 또는 C3 균주 10ml를 넣어

24시간 동안 배양하였다.

[0159] 해동피 물 추출물, 인삼 물 추출물 및 더덕 물 추출물 각각 10g을 물 90ml에 현탁하고 멸균하여 $1x10^8$/0.1ml의 C29 또는 C3 균주 10ml를 넣어 24시간 동안 배양하였다.

[0160] 5-2. 수동회피반응 시험(Passive avoidance task test)

[0161] 상기 방법에 의해 제조된 콩 또는 탈지콩 발효 조성물, 해동피 발효 조성물, 인삼 발효 조성물, 및 더덕 발효 조성물 각각 0.1ml를 1일 1회씩 2일간 치매 동물 모델인 마우스에 투여하였다. 스코폴아민(Scopolamine) (0.9 mg/kg)은 유산균 마지막 투여 1시간 후에 투여하였다. 그 결과, 도 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, C29로 발효시킨 콩 발효 조성물이 수동 회피에 대한 기억이 가장 잘 유지되며 치매 치료제인 타크린(Tacrin, TAC, 10 mg/kg)보다 효과가 우수한 것으로 나타났으며, 다음으로 C29로 발효시킨 인삼 발효 조성물, C3으로 발효시킨 콩 발효 조성물, C29로 발효시킨 더덕 발효 조성물 순이었다. 이는 C29 또는 C3 균주로 발효시킨 발효 조성물이 기억 개선 효과를 가짐을 보여주는 것이다.

[0162] 상기와 같은 실험 결과는 C29 또는 C3 균주로 발효시킨 발효 조성물이 기억력 개선을 통해 치매 개선 효과를 나타냄을 잘 보여준다.

수탁번호

[0163]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11291P

수탁일자 : 20120709

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM43009

수탁일자 : 20120709

도면

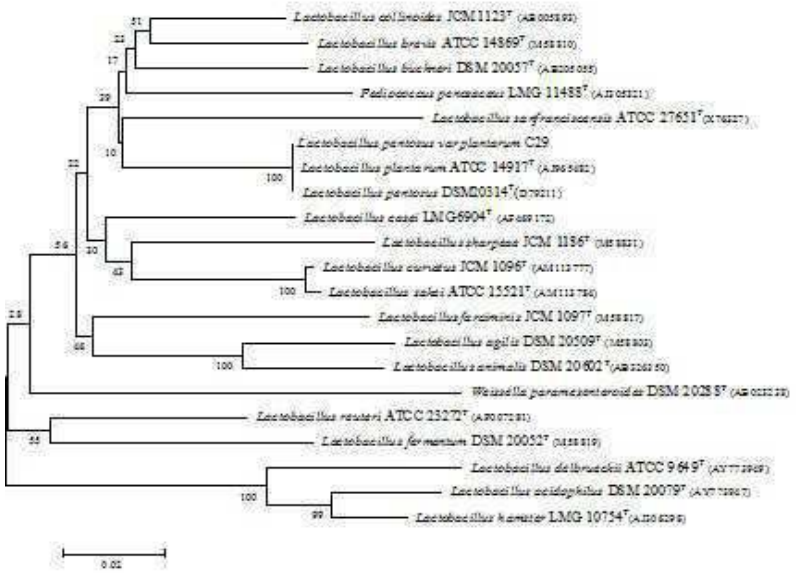
도면1

[C-29 16S rDNA sequence (1428bp)]

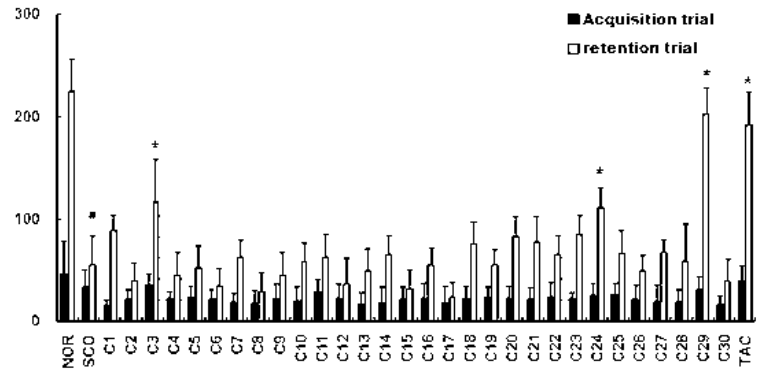
Lactobacillus pentosus strain LS3 16S ribosomal RNA gene 1427/1428와의 homology (99.9%)
Lactobacillus plantarum strain BIM B-536 16S ribosomal RNA gene 1427/1428 homology (99.9%)

ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACA
CGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGG
ACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGA
TGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGAC
TGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG
GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA
GAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACA
GTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCT
GGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATAC
CGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTA
GACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTC
GGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGG
GTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCT

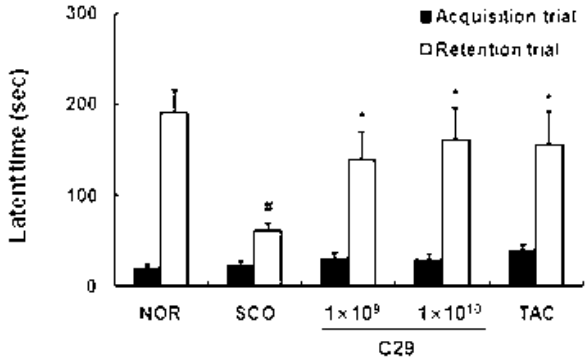
도면2



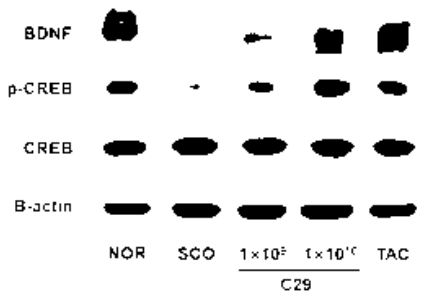
도면3


Acquisition trial
retention trial
300
200
100
0
NOR
SCO
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
C10
C11
C12
C13
C14
C15
C16
C17
C18
C19
C20
C21
C22
C23
C24
C25
C26
C27
C28
C29
C30
TAC

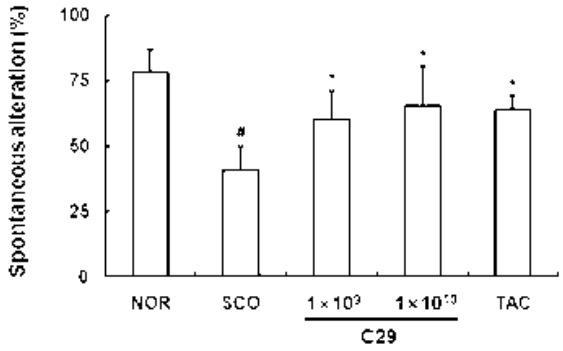
도면4


Acquisition trial
Retention trial
Latent time (sec)
300
200
100
0
NOR
SCO
1×10⁹
1×10¹⁰
TAC
C29

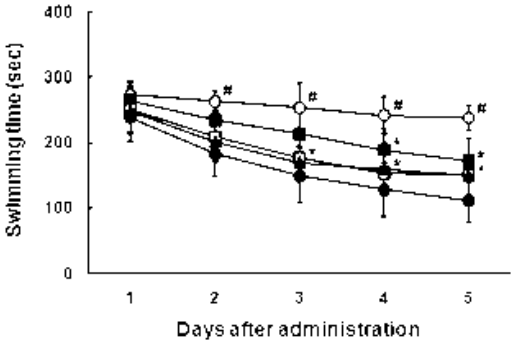
도면5


BDNF
p-CREB
CREB
B-actin
NOR
SCO
TAC
C29

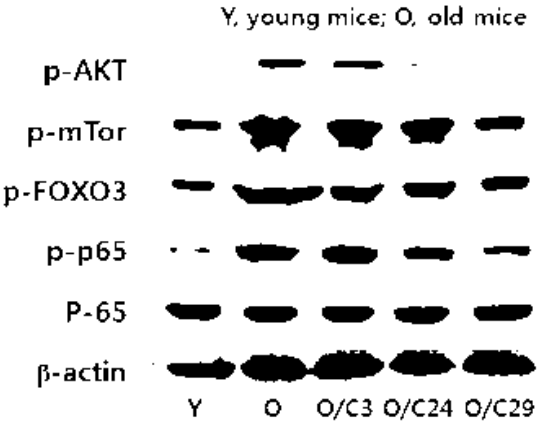
도면6


Spontaneous alteration (%)
100
75
50
25
0
NOR
SCO
1×10³
1×10¹³
TAC
C29

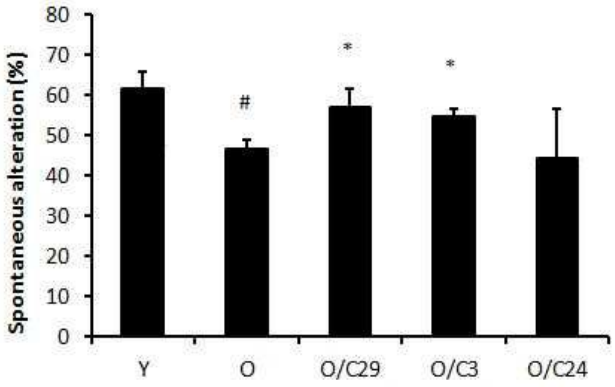
도면7


Swimming time (sec)
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
Days after administration

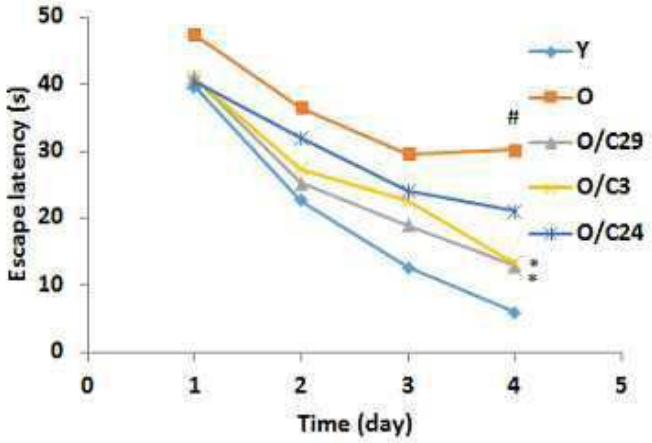
도면8


Y, young mice; O, old mice
p-AKT
p-mTor
p-FOXO3
p-p65
P-65
β-actin
Y
O
O/C3
O/C24
O/C29

도면9



도면10



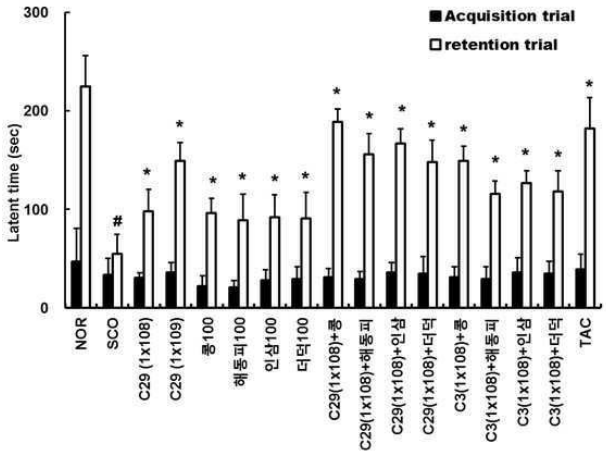
도면11

[C3 sequence (893bp)]

Lactobacillus curvatus gene for 16S rRNA 864/866[] homology (99%)

AGTCGTAACAAGGTAACCGTAGAAGTCTTGATTCGATAACATTTGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACG
TGGGTAACCTGCCCTAAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACCTAGCACCGCA
TGGTGCAAGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGG
TAAAGGCTCACCAAGACCGTGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTATTTGATAGTAACTGATCAG
GTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTC
AACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTC
GAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGA
GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC

도면12



서 열 목 록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

<120> Lactobacillus having activity of preventing and/or treating aging and dementia

<130> SDP50486

<150> 10-2012-0089714

<151> 2012-08-16

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1428

<212> DNA

<213> Lactobacillus pentosus var. plantarum

<400> 1

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcat catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60

ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120

aataccgcat aacaacttgg accgcatggt ccgagtttga aagatggctt cggctatcac 180

ttttggatgg tcccgcggcg tattagctag atggtggggt aacggctcac catggcaatg 240

atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc 300

ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360

gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420

gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 480

cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtcccggat ttattgggcg taaagcgagc 540

gcaggcggtt ttttaagtct gatgtgaaag ccttcggctc aaccgaagaa gtgcatcgga 600

aactgggaaa cttgagtgca gaagaggaca gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcg 660

tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag gcggctgtct ggtctgtaac tgacgctgag 720

gctcgaaagt atgggtagca aacaggatta gataccctgg tagtccatac cgtaaacgat 780

gaatgctaag tgttggaggg tttccgccct tcagtgctgc agctaacgca ttaagcattc 840

cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag 900

cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcta cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatac 960

tatgcaaatc taagagatta gacgttccct tcggggacat ggatacaggt ggtgcatggt 1020

tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt 1080

atcagttgcc agcattaagt tgggcactct ggtgagactg ccggtgacaa accggaggaa 1140

ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat 1200

ggatggtaca acgagttgcg aactcgcgag agtaagctaa tctcttaaag ccattctcag 1260

ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcggatca 1320

gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccatgagagt 1380

ttgtaacacc caaagtcggt ggggtaacct tttaggaacc agccgcct 1428

<210> 2

<211> 893

<212> DNA

<213> Lactobacillus curvatus

<400> 2

agtcgtaaca aggtaaccgt agaagtcttg attcgataac atttgagtga gtggcggacg 60

ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctaa agtgggggat aacatttgga aacagatgct 120

ataccgcata aaacctagca ccgcatggtg caaggttgaa agatggtttc ggctatcact 180

ttaggatgga cccgcggtgc attagttagt tggtgaggta aaggctcacc aagaccgtga 240

tgcatagccg acctgagagg gtaatcggcc acactgggac tgagacacgg cccagactcc 300

tacgggaggc agcagtaggg aatcttccac aatggacgaa agtctgatgg agcaacgccg 360

cgtgagtgaa gaaggttttc ggatcgtaaa actctgttgt tggagaagaa cgtatttgat 420

agtaactgat caggtagtga cggtatccaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc 480

agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt attgggcgta aagcgagcgc 540

aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc ttcggctcaa ccgaagaagt gcatcggaaa 600

ctgggaaact tgagtgcaga agaggacagt ggaactccat gtgtagcggt gaaatgcgta 660

gatatatgga agaacaccag tggcgaaggc ggctgtctgg tctgtaactg acgctgaggc 720

tcgaaagcat gggtagcaaa caggattaga taccctggta gtccatgccg taaacgatga 780

gtgctaggtg ttggagggtt tccgcccttc agtgccgcag ctaacgcatt aagcactccg 840

cctggggagt acgaccgcaa ggttgaaact caaaggaatt gacgggggcc cgc 893