



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0042079
(43) 공개일자 2022년04월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/747 (2014.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/745 (2014.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2022-0034301(분할)
(22) 출원일자 2022년03월18일
심사청구일자 2022년03월18일
- (62) 원출원 특허 10-2021-0057549
원출원일자 2021년05월03일
심사청구일자 2021년05월03일
- (30) 우선권주장
1020170155078 2017년11월20일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- (72) 발명자
김동현
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
한명주
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
- (74) 대리인
김경교, 양용

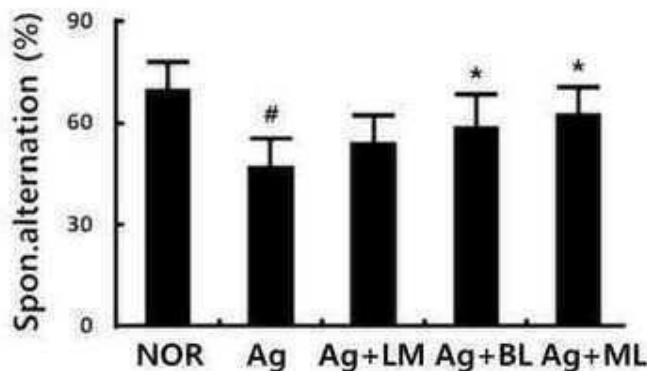
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 신규 유산균 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 유산균인 락토바실러스 류코세 및 비피도박테리움 롱검에 관한 것으로, 구체적으로 노화인자인 p16 단백질 발현 및 염증성 인자를 억제함으로써 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 및 치료, 염증성 질환의 예방 및 치료에 유용한 신규한 유산균을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/745 (2013.01)

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C12N 1/20 (2021.05)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23Y 2220/00 (2013.01)

A23Y 2300/55 (2013.01)

C12R 2001/225 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130284
과제번호	2017R1A5A2014768
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	뉴로바이오타 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P를 포함하는 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 기억 장애, 학습 장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펔트-야콥병, 두부 외상, 건망증, 외상성 뇌손상, 뇌전증, 해마경화증, 두통, 뇌 노쇠증, 치매 및 기억상실을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상이며,

상기 정신 장애는 기분 장애, 불면증, 망상 장애, 강박 장애, 편두통, 스트레스, 인지 장애 및 주의력 장애를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P를 더 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P는 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P는 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 약학 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 노화인자 p16의 발현을 억제하는 것인, 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 기억 장애, 학습 장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펔트-야콥병, 건망증, 뇌전증, 뇌 노쇠증, 치매 및 기억상실을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상이며,

상기 정신 장애는 기분 장애, 불면증, 스트레스, 인지 장애 및 주의력 장애를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 약학 조성물.

청구항 9

락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P를 포함하는 기억력 감소, 불안 또는 우울증의 예방 또는 개선용 건강기능 식품으로서, 상기 기억 장애, 학습 장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증,

파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펔트-야콥병, 두부 외상, 건망증, 외상성 뇌손상, 뇌전증, 해마경화증, 두통, 뇌 노쇠증, 치매 및 기억상실을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상이며,

상기 정신 장애는 기분 장애, 불면증, 망상 장애, 강박 장애, 편두통, 스트레스, 인지 장애 및 주의력 장애를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 건강기능 식품.

청구항 10

제9항에 있어서, 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P를 더 포함하는 것인, 건강기능 식품.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P는 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열을 포함하는, 건강기능 식품.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P는 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열을 포함하는, 건강기능 식품.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 건강기능 식품.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P는 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물인, 건강기능 식품.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 조성물은 노화인자 p16의 발현을 억제하는 것인, 건강기능 식품.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 기억 장애, 학습 장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펔트-야콥병, 건망증, 뇌전증, 뇌 노쇠증, 치매 및 기억상실을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상이며,

상기 정신 장애는 기분 장애, 불면증, 스트레스, 인지 장애 및 주의력 장애를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 건강기능 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 및 비피도박테리움 롱검에 관한 것으로, 구체적으로 노화인자 p16 단백질 발현 및 염증성 인자를 억제함으로써 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 및 치료, 염증성 질환의 예방 및 치료에 유용한 신규한 유산균을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

노령 인구의 증가에 따라 발생하는 질병 중에서 가장 문제가 되는 질병으로 치매를 비롯한 기억 장애가 있다. 보건복지부 중앙치매센터 연차보고서에 따르면, 12분마다 1명씩 치매 환자가 발생하고 있으며, 65만명이 치매를 앓고 있는 것으로 보고된 바 있다. 특히, 70대 이상의 노년층에서 주로 발생하는 것으로 알려진 치매는 최근 질병, 외상, 유전적 요인 및 잘못된 생활습관으로 인해 젊은 층에서도 발병율이 증가하고 있다.

- [0003] 치매를 비롯한 기억 장애는 완치가 어려운 질병으로서, 기억 장애가 발병할 경우 환자 본인뿐만 아니라 환자의 가족들에게도 평생의 고통 및 부담이 되고, 이로 인해 파생되는 문제가 심각한 수준이다.
- [0004] 또한, 시중에 유통되는 치매 치료제의 경우 오심, 구토, 식욕감퇴, 복통 등의 소화기 계통의 부작용을 비롯하여 피부 발적, 가려움증 등의 부작용이 나타날 수 있어 사용이 제한적이다.
- [0005] 한편, 천연물을 이용한 연구의 결과로서, 국내공개특허 제10-2016-0110767호에서는 고욤나무 추출물을 이용한 기억력 개선용 식품 조성물이 개시되어 있으나, 아직까지 치매를 비롯한 기억 장애를 치료할 수 있는 효과적인 유산균에 대한 연구는 전무한 실정이다.
- [0006] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 효과적으로 기억력을 회복할 수 있는 치료제를 연구하던 중, 인간의 분변에서 분리된 신규한 유산균이 기억력 개선 효과를 나타내고, 불안 행동을 개선하는 효과를 나타내어 기억 장애, 학습 장애 및 정신 장애의 예방 및 치료에 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 또한, 염증성 인자를 억제함으로써 염증 질환 및 염증성 인자와 관련된 기억 장애, 학습 장애 및 정신 장애의 예방 및 치료에 사용할 수 있음을 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2016-0110767호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 신규한 락토바실러스 뮤코세 및 비피도박테리움 롱검 유산균을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 신규한 유산균을 포함하는 노화인자인 p16 단백질 발현을 억제하는, 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 유산균을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 수행하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) (기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2017.08.04, 수탁번호: KCCM12091P)을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 락토바실러스 뮤코세 NK41은 인간의 분변으로부터 분리 및 동정된 락토바실러스 뮤코세의 신규한 유산균임을 특징으로 한다.
- [0013] 본 발명의 락토바실러스 뮤코세 NK41의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 1과 같다. 따라서, 본 발명의 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41)은 서열번호 1의 16S rDNA를 포함할 수 있다.
- [0014] 상기 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 락토바실러스 뮤코세 균주들과 99%의 상동성을 나타내어 락토바실러스 뮤코세와 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 락토바실러스 뮤코세 (*Lactobacillus mucosae*)로 동정하고, 락토바실러스 뮤코세 NK41로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2017년 8월 4일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCCM12091P).
- [0015] 본 발명의 락토바실러스 뮤코세 NK41은 그람양성균이고, 세포의 형태는 간균이다. 보다 구체적인 락토바실러스 뮤코세 NK41의 생리학적 특성은 당해 기술분야의 통상의 방법에 따라 분석할 수 있고, 그 결과는 하기 표 2와 같은 것으로 나타났다. 구체적으로, 락토바실러스 뮤코세 NK41은 탄소원으로 L-아라비노오스, D-리보오스, D-자일로오스, D-갈락토오스, D-글루코오스, 아미그달린, 에스쿨린, 말토오스, 락토오스, 펠리비오스, 수크로오스, 라피노오스, 젠티오비오스 및 글루코네이트를 이용할 수 있다.
- [0016] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) (기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2017.08.04, 수탁번호: KCCM12087P)을 제공한다.

- [0017] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK46은 인간의 분변으로부터 분리 및 동정된 비피도박테리움 롱검의 신규한 유산균임을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK46의 동정 및 분류를 위한 16S rDNA 염기서열은 본 명세서에 첨부된 서열번호 2와 같다. 따라서, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46)은 서열번호 2의 16S rDNA를 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 서열번호 2의 16S rDNA 염기서열의 분석 결과, 공지된 비피도박테리움 롱검 균주들과 99%의 상동성을 나타내어 비피도박테리움 롱검과 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보였다. 따라서, 상기 유산균을 비피도박테리움 롱검 (*Bifidobacterium longum*)으로 동정하고, 비피도박테리움 롱검 NK46으로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2017년 8월 4일자로 기탁하였다 (수탁번호 KCCM12087P).
- [0020] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 NK46은 그람양성균이고, 세포의 형태는 간균이다. 보다 구체적인 비피도박테리움 롱검 NK46의 생리학적 특성은 당해 기술분야의 통상의 방법에 따라 분석할 수 있고, 그 결과는 하기 표 3과 같은 것으로 나타났다. 구체적으로, 비피도박테리움 롱검 NK46은 탄소원으로 L-아라비노오스, D-자일로오스, D-갈락토오스, D-글루코오스, D-프럭토오스, D-만노오스, 만니톨, 솔비톨, α -메틸-D-글루코사이드, 에스쿨린, 살리신, 말토오스, 락토오스, 멜리비오스, 수크로오스, 라피노오스 및 D-투라노오스를 이용할 수 있다.
- [0021] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P, 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 "락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41)"은 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0023] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 락토바실러스 뮤코세 NK41은 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물일 수 있으나, 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 락토바실러스 뮤코세 NK41의 형태라면 제한없이 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 "비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46)"은 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0025] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 비피도박테리움 롱검 NK46은 이의 생균체, 이의 사균체, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물일 수 있으나, 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있는 비피도박테리움 롱검 NK46의 형태라면 제한없이 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 용어, "배양물"은 유산균을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 사물을 의미하며, 본 발명에서는 신규한 유산균을 포함하는 개념이다.
- [0027] 본 발명의 기억 장애, 학습 장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펔트-야콥병, 노화, 두부 외상, 건망증, 기억력 감소, 외상성 뇌손상, 뇌전증, 해마경화증, 두통, 뇌 노쇠증, 치매 및 기억상실을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에서는 신경 세포에 스트레스 호르몬인 코르티코스테론과 함께 락토바실러스 뮤코세 NK41 또는 비피도박테리움 롱검 NK46의 처리시 알츠하이머와 같은 기억 장애, 학습 장애를 유발하는 물질로 알려진 NF-kB의 활성이 억제됨과 동시에 노화 및 치매 등에서 발현이 감소하는 것으로 알려진 뇌유래신경영양인자 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현이 증가함을 확인하였다(표 5). 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 노화 동물모델 및 알츠하이머 동물모델에 락토바실러스 뮤코세 NK41, 비피도박테리움 롱검 NK46 또는 이들의 혼합물의 투여시, 기억력 회복 효과가 나타나고, 해마에서 노화인자인 p16의 발현이 억제되고, NF-kB의 활성이 억제되며, 뇌유래신경영양인자의 발현이 증가함을 확인하였다(실시예 4). 특히, 락토바실러스 뮤코세 NK41 및 비피도박테리움 롱검 NK46의 혼합물이 개별 유산균에 비해 보다 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다. 이를 통해, 상기 락토바실러스 뮤코세 NK41, 비피도박테리움 롱검 NK46 또는 이들의 혼합물을 포함하는 약학 조성물이 기억 장애, 학습 장애의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0029] 따라서, 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P, 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 본 발명의 약학 조성물은 노화인자 p16의 발현을 억제할 수 있다.
- [0030] 상기 p16은 인간 CDKN2A 유전자로부터 발현되는 대표적인 노화인자 단백질로서, 상기 p16의 발현이 증가함에 따라 노화가 촉진되는 특성을 나타낸다.

- [0031] 본 발명의 정신 장애는 불안, 우울증, 기분 장애, 불면증, 망상 장애, 강박 장애, 편두통, 스트레스, 인지 장애 및 주의력 장애를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에서는 스트레스가 유도된 동물모델에 락토바실러스 뮤코세 NK41, 비피도박테리움 롱검 NK46 또는 이들의 혼합물의 투여시, 스트레스에 의한 불안 행동이 현저히 개선됨을 확인하였다(표 8). 이를 통해, 상기 락토바실러스 뮤코세 NK41, 비피도박테리움 롱검 NK46 또는 이들의 혼합물을 포함하는 약학 조성물이 정신 장애의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0033] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P, 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 "락토바실러스 뮤코세 NK41" 및 "비피도박테리움 롱검 NK46"은 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0035] 본 발명의 염증 질환은 관절염, 통풍, 간염, 천식, 비만, 각막염, 위염, 장염, 신장염, 대장염, 당뇨, 결핵, 기관지염, 홍막염, 복막염, 척추염, 췌장염, 염증 통증, 요도염, 방광염, 질염, 동맥경화증, 패혈증, 화상, 피부염, 치주염 및 치은염을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에서는 생쥐로부터 분리된 대식세포에 염증 반응 유도물질인 리포폴리사카라이드와 함께 락토바실러스 뮤코세 NK41 또는 비피도박테리움 롱검 NK46의 처리시 염증반응이 현저히 억제됨을 확인하였다(표 4). 이를 통해, 상기 락토바실러스 뮤코세 NK41 및 비피도박테리움 롱검 NK46을 포함하는 약학 조성물이 염증 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0037] 구체적으로, 상기 염증 질환은 대장염일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에서는 스트레스로 인해 대장염이 유도된 동물모델에 락토바실러스 뮤코세 NK41, 비피도박테리움 롱검 NK46 또는 이들의 혼합물의 투여시 대장염의 지표인 대장의 길이가 정상 수준으로 회복되고, 대장염의 지표인자들의 발현 및 활성이 감소함을 확인하였다(표 6). 이를 통해, 상기 락토바실러스 뮤코세 NK41, 비피도박테리움 롱검 NK46 또는 이들의 혼합물을 포함하는 약학 조성물이 염증 질환, 구체적으로 대장염의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0039] 본 발명에 따른 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 약학적 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 신규한 유산균의 활성을 저해하지 않는 범위 내에서 추가적으로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 락토즈, 텍스트로즈, 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 광물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 약제학적으로 유효한 양이어야 한다. "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 기억 장애, 학습 장애, 정신 장애 또는 염증 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 제제화 방법, 환자의 상태 및 체중, 환자의 성별, 연령, 질환의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간, 배설 속도, 반응 감응성 등과 같은 요인들에 따라 당업자에 의해 다양하게 선택될 수 있다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 처리의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)할 수 있

으나 경구 투여가 바람직하다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제 등이 포함될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀전, 점안제, 안연고제, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 안연고제, 점안제, 파스타제 또는 카타폴 라스마제의 약제학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 국소 투여를 위한 제제는 임상적 처방에 따라 무수형 또는 수성형일 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0043] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41), 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) 또는 이들의 혼합물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0044] 본 발명에 "락토바실러스 뮤코세 NK41" 및 "비피도박테리움 롱검 NK46", "투여" 및 "기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0045] 상기 대상체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 신규한 유산균을 이용한 치료로 유의한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 대상체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 대상체들에는 노화인자인 p16 단백질 발현, 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 증상을 갖거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 대상체들이 모두 포함될 수 있다.

[0046] 상기 목적을 수행하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41), 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) 또는 이들의 혼합물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0047] 본 발명에 "락토바실러스 뮤코세 NK41" 및 "비피도박테리움 롱검 NK46", "투여" 및 "염증" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0048] 상기 대상체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 신규한 유산균을 이용한 치료로 유의한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 대상체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 대상체들에는 미엘로퍼옥시다아제 활성이 증가되거나, TNF- α 및 IL-17의 사이토카인의 발현량이 증가되거나, NF- κ B의 활성 또는 COX-2의 활성이 증가된 대상체들이 모두 포함될 수 있다. 나아가, 염증 증상을 가지거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 대상체들이 모두 포함될 수 있으며, 구체적으로 대장염의 증상을 가진 대상체일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P, 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공한다.

[0050] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 락토바실러스 뮤코세 NK41 (*Lactobacillus mucosae* NK41) KCCM12091P, 비피도박테리움 롱검 NK46 (*Bifidobacterium longum* NK46) KCCM12087P 또는 이들의 혼합물을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능 식품을 제공한다.

[0051] 본 발명의 "락토바실러스 뮤코세 NK41" 및 "비피도박테리움 롱검 NK46", "투여" 및 "기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애" 및 "염증 질환" 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.

[0052] 상기 건강기능 식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적인 방법을 이용하여 특정 목적에 작용 및 발현하도록 부가가치를 부여한 식품이다. 이러한 건강기능 식품의 성분은 생체 방어와 신체 리듬의 조절, 질환의 방지 및 회복에 관계하는 신체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하여 가공하게 되며, 식품으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제, 감미료 또는 기능성 원료를 함유할 수 있다.

[0053] 본 발명의 락토바실러스 뮤코세 NK41 또는 비피도박테리움 롱검 NK46을 건강기능 식품(또는 건강기능 음료 첨가물)으로 사용할 경우, 상기 신규한 유산균을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 락토바실러스 뮤코세 NK41 또는 비피도박테리움 롱검 NK46

의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0054] 상기 건강기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능 식품은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0055] 상기 건강기능 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 락토바실러스 뮤코세 NK41 또는 비피도박테리움 롱검 NK46을 첨가할 수 있는 식품은 소세지, 육류, 빵, 초콜릿류, 스낵류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 음료수로 제형화할 경우에 신규한 유산균 이외에 첨가되는 액체 성분으로는 이에 한정되지는 않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올일 수 있다.

[0056] 이상 본 명세서에 기재된 수치값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0057] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0058] 본 발명에 따른 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41 및 비피도박테리움 롱검 NK46은 노화인자인 p16 단백질 발현을 억제하고, 기억력 회복 효과를 나타내고, 불안 행동을 개선하는 효과가 있다. 따라서, 본 발명에 따른 신규한 유산균은 기억 장애, 학습 장애 또는 정신 장애의 예방 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있다.

[0059] 나아가, 본 발명에 따른 신규한 유산균은 염증 반응을 억제하는 효과가 있어 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 이용될 수 있으며, 특히, 대장염의 예방 및 치료에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 노화 동물모델(Ag)에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM), 비피도박테리움 롱검 NK46(BL) 또는 이들의 1:1 혼합물(ML)을 투여한 결과, Y자형 미로 시험에서 자발적인 교차행동량이 정상군(NOR)의 수준으로 회복됨을 확인한 그래프이다.

도 2는 노화 동물모델(Ag)에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM), 비피도박테리움 롱검 NK46(BL) 또는 이들의 1:1 혼합물(ML)을 투여한 결과, 물체 인지 시험에서 새로운 물체를 만지는 횟수가 정상군(NOR)의 수준으로 회복됨을 확인한 그래프이다.

도 3은 알츠하이머 동물모델(Tg)에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM) 또는 비피도박테리움 롱검 NK46(BL)을 투여한 결과, Y자형 미로 시험에서 자발적인 교차행동량이 정상군(NOR)의 수준으로 회복됨을 확인한 그래프이다.

도 4는 알츠하이머 동물모델(Tg)에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM) 또는 비피도박테리움 롱검 NK46(BL)을 투여한 결과, 수동 회피 실험에서 머무름 시간이 정상군(NOR)의 수준으로 회복됨을 확인한 그래프이다.

도 5는 알츠하이머 동물모델(Tg)에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM) 또는 비피도박테리움 롱검 NK46(BL)을 투여한 결과, 수중미로 실험에서 발판이 있었던 곳에서 머무는 시간이 회복됨을 확인한 그래프이다.

도 6은 알츠하이머 동물모델(Tg)에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM) 또는 비피도박테리움 롱검 NK46(BL)을 투여한 결과, 해마에서 NF- κ B의 활성이 억제되고 뇌유래신경영양인자(BDNF)의 발현이 증가함을 확인한 도이다.

(왼쪽부터) 정상균; 알츠하이머 동물모델, LM 투여군; BL 투여군.

도 7은 우울동물모델에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM) 또는 비피도박테리움 롱검 NK46(BL)을 투여한 결과, 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 정상균(NOR)의 수준으로 회복됨을 확인한 그래프이다.

도 8은 우울동물모델에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM) 또는 비피도박테리움 롱검 NK46(BL)을 투여한 결과, 강제수영실험에서 부동상태가 감소함으로써, 불안 행동 및 우울증상이 개선되었음을 확인한 그래프이다.

도 9는 우울동물모델에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM) 또는 비피도박테리움 롱검 NK46(BL)을 투여한 결과, 꼬리매달기실험에서 부동상태가 감소함으로써, 불안 행동 및 우울증상이 개선되었음을 확인한 그래프이다.

도 10은 우울동물모델에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM) 또는 비피도박테리움 롱검 NK46(BL)을 투여한 결과, 해마에서 NF-κB의 활성이 억제되고 뇌유래신경영양인자(BDNF)의 발현이 증가함을 확인한 도이다.

도 11은 우울동물모델에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM) 또는 비피도박테리움 롱검 NK46(BL)을 투여한 결과, 혈액 내의 코르티코스테론이 유의하게 감소됨을 확인한 그래프이다.

도 12는 우울동물모델에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM) 또는 비피도박테리움 롱검 NK46(BL)을 투여한 결과, Iba1 및 미세아교세포의 활성화가 모두 유의적으로 감소한 것을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0062] **실시예 1: 유산균의 분리 및 동정**

[0063] **(1) 사람의 분변으로부터 유산균의 분리**

[0064] 사람의 분변을 GAM 액체 배지(GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 넣고 현탁하였다. 이후, 상등액을 취해 BL 한천 배지(BL agar medium; Nissui Pharmaceutical, Japan)에 이식하고 37℃에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후, 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

[0065] **(2) 김치로부터 유산균의 분리**

[0066] 배추 김치, 무 김치 또는 파김치를 각각 파쇄하고, 파쇄 상등액을 취해 MRS 한천 배지(MRS agar medium; Difco, USA)에 이식하고 37℃에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양하여 콜로니(colony)를 형성한 균주들을 분리하였다.

[0067] **(3) 분리된 유산균의 동정**

[0068] 사람의 분변 또는 김치로부터 분리된 균주들의 생리학적 특성 및 16S rDNA 서열을 분석하여 균주의 종을 확정하고, 균주명을 부여하였다. 부여된 유산균의 균주명은 하기 표 1과 같다. 구체적으로, 김치로부터 분리된 유산균은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 5종(표 1의 관리번호 1 내지 5), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 5종(표 1의 관리번호 6 내지 10), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) 5종(표 1의 관리번호 11 내지 15) 및 락토바실러스 커바투스(*Lactocacillus curvatus*) 5종(표 1의 관리번호 16 내지 20)이었다. 사람의 분변으로부터 분리된 유산균은 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*) 5종(표 1의 관리번호 21 내지 25), 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 5종(표 1의 관리번호 26 내지 30), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*) 5종(표 1의 관리번호 31 내지 35), 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) 4종(표 1의 관리번호 36 내지 39), 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) 3종(표 1의 관리번호 40 내지 42), 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) 3종(표 1의 관리번호 43 내지 45), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 5종(표 1의 관리번호 46 내지 50)이었다.

표 1

관리 번호	균주명	관리 번호	균주명
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK1	26	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK26
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK2	27	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK27
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK3	28	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK28
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK4	29	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK29
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK5	30	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK30
6	<i>Lactobacillus brevis</i> NK6	31	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK31
7	<i>Lactobacillus brevis</i> NK7	32	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK32
8	<i>Lactobacillus brevis</i> NK8	33	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK33
9	<i>Lactobacillus brevis</i> NK9	34	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK34
10	<i>Lactobacillus brevis</i> NK10	35	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK35
11	<i>Lactobacillus sakei</i> NK11	36	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK36
12	<i>Lactobacillus sakei</i> NK12	37	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK37
13	<i>Lactobacillus sakei</i> NK13	38	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK38
14	<i>Lactobacillus sakei</i> NK14	39	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK39
15	<i>Lactobacillus sakei</i> NK15	40	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK40
16	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK16	41	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK41
17	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK17	42	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK42
18	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK18	43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK43
19	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK19	44	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK44
20	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK20	45	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK45
21	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK21	46	<i>Bifidobacterium longum</i> NK46
22	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK22	47	<i>Bifidobacterium longum</i> NK47
23	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK23	48	<i>Bifidobacterium longum</i> NK48
24	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK24	49	<i>Bifidobacterium longum</i> NK49
25	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK25	50	<i>Bifidobacterium longum</i> NK50

[0069]

[0070]

(4) 신규 유산균 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41의 생리학적 특성

[0071]

상기 표 1에 기재된 균주들 중 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41(수탁번호 KCCM12091P)은 그람양성 간균인 것으로 확인되었다. 또한, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41의 16S rDNA는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41의 16S rDNA 염기서열을 BLAST 검색으로 비교한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) 균주는 검색되지 않았고, 공지된 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) 균주의 16S rDNA 서열과 99% 상동성을 보임을 확인하였다.

[0072]

락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41의 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API 50 CHL 키트를 사용하여 당 발효 시험으로 분석하였다. 그 결과는 하기 표 2와 같다. 하기 표 2에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타낸다.

표 2

탄소원	NK41	탄소원	NK41
CONTROL	-	에스쿨린	+
글리세롤	-	살리신	-
에리트리톨	-	셀로비오스	-
D-아라비노오스	-	말토오스	+
L-아라비노오스	+	락토오스	±
D-리보오스	+	멜리비오스	±
D-자일로오스	+	수크로오스	+
L-자일로오스	-	트레할로오스	-
D-아도니톨	-	이눌린	-
메틸-BD-자일로피라노사이드 Methyl-BD-Xylopyranoside	-	멜리지토오스	-
D-갈락토오스	±	라피노오스	+
D-글루코오스	+	전분(Starch)	-
D-프럭토오스	-	글리코젠	-
D-만노오스	-	자일리톨	-
L-소르보오스	-	겐티오비오스	±
람노세스	-	D-투라노오스	-
둘시톨	-	D-릭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	-
만니톨	-	D-푸코오스	-
솔비톨	-	L-푸코오스	-
α-메틸-D-만노사이드	-	D-아라비톨	-
α-메틸-D-글루코사이드	-	L-아라비톨	-
N-아세틸-글루코사민	-	글루코네이트	±
아미그달린	±	2-케토-글루코네이트	-
알부틴	-	5-케토-글루코네이트	-

[0073]

[0074]

(5) 신규 유산균 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46의 생리학적 특성

[0075]

상기 표 1에 기재된 균주들 중 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46 (수탁번호 KCCM12087P)는 그람양성 간균인 것으로 확인되었다. 또한, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46의 16S rDNA는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것으로 나타났다. 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46의 16S rDNA 염기서열을 BLAST 검색으로 비교한 결과, 동일한 16S rDNA 염기서열을 갖는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주는 검색되지 않았고, 공지된 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) 균주의 16S rDNA 서열과 99% 상동성을 보임을 확인하였다.

[0076]

비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46의 생리학적 특성 중 탄소원 이용성을 API 50 CHL 키트를 사용하여 당 발효 시험으로 분석하였다. 그 결과는 하기 표 3과 같다. 하기 표 3에서 "+"는 탄소원 이용성이 양성인 경우를 나타내고, "-"는 탄소원 이용성이 음성인 경우를 나타낸다.

표 3

탄소원	NK46	탄소원	NK46
CONTROL	-	에스플린	+
글리세롤	-	살리실	+
에리쓰리톨	-	셀로비오스	-
D-아라비노오스	-	말토오스	+
L-아라비노오스	+	락토오스	+
D-리보오스	-	멜리비오스	+
D-자일로오스	+	수크로오스	+
L-자일로오스	-	트레할로오스	-
D-아도니톨	-	이눌린	-
메틸-BD-자일로피라노사이드 Methyl-BD-Xylopyranoside	-	멜리차토오스	-
D-갈락토오스	+	라피노오스	+
D-글루코오스	+	전분(Starch)	-
D-프럭토오스	+	글리코겐	-
D-만노오스	+	자일리톨	-
L-소르보오스	-	젠티오비오스	-
람노석스	-	D-투라노오스	+
둘시톨	-	D-릭소오스	-
이노시톨	-	D-타가토오스	-
만니톨	+	D-푸코오스	-
솔비톨	+	L-푸코오스	-
α -메틸-D-만노사이드	-	D-아라비톨	-
α -메틸-D-글루코사이드	±	L-아라비톨	-
N-아세틸-글루코사민	-	글루코네이트	-
아미그달린	-	2-케토-글루코네이트	-
알부민	-	5-케토-글루코네이트	-

[0077]

[0078] 실시예 2: 분리된 유산균들의 활성 비교

[0079] (1) 항산화 활성(in vitro)

[0080] DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 0.2 mM 농도가 되도록 에탄올에 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 상기 DPPH 용액 0.1 ml에 유산균의 현탁액(1×10^6 CFU/ml) 또는 비타민 C 용액(1 g/ml)을 넣고 20분간 37℃에서 배양하였다. 배양액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 517 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하여 분리된 유산균들의 항산화 활성을 계산하였다. 각 유산균 별 항산화 활성은 하기 표 4와 같다.

[0081] (2) 대식세포에서의 염증 지표 측정

[0082] C57BL/6 생쥐(male, 6주령 20-23 g)의 복강에 멸균된 4% 티오글라이콜레이트(thioglycolate) 2 ml를 투여하였다. 96시간이 지난 뒤에 생쥐를 마취시키고, 생쥐의 복강에 RPMI 1640 배지 8 ml를 투여하였다. 5~10분 후에 생쥐의 복강 내의 RPMI 배지(대식세포)를 뽑아, 1000 g에서 10분간 원심분리하고 다시 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 상기 대식세포를 각 웰 당 0.5×10^6 의 수로 24-웰 플레이트에 깔고, 분리된 유산균(최종 처리 농도: 1×10^4 cfu/ml, 이하 동일)과 염증 반응 유도 물질인 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 2시간 또는 24시간 동안 처리한 후 상등액 및 세포를 수득하였다. 수득한 세포를 RIPA 버퍼(Gibco사)에 넣고 균질화하였다. 24시간 처리한 배양 상등액에서 TNF- α , IL-10 등의 사이토카인 발현량을, 2시간 동안 처리하여 수득한 세포로부터 p65(NF-kB), p-p65(phosphor-NF-kB) 및 β 의 발현량을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다. 각 유산균 별 염증 지표의 발현 수준은 하기 표 4와 같다.

[0083] (표 4의 활성 측정시 기준: +++, >90%, 매우 강함; ++, >60-90%, 강함; +, >20-60%, 약함; -, <20%, 효과 미비, 표 5 동일)

표 4

관리 번호	균주명	항산화 활성	TNF- α 억제능	IL-10 발현증가	NF-kB 억제능
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK1	+	+	+	+
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK2	+	++	+	+
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK3	+++	+++	+++	+++
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK4	+	+	+	++
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK5	++	++	++	++
6	<i>Lactobacillus brevis</i> NK6	+	+	+	+
7	<i>Lactobacillus brevis</i> NK7	+	+	+	+
8	<i>Lactobacillus brevis</i> NK8	+	+	+	+
9	<i>Lactobacillus brevis</i> NK9	+	+	+	+
10	<i>Lactobacillus brevis</i> NK10	-	+	+	+
11	<i>Lactobacillus sakei</i> NK11	+	+	+	+
12	<i>Lactobacillus sakei</i> NK12	-	++	+	+
13	<i>Lactobacillus sakei</i> NK13	-	++	++	+
14	<i>Lactobacillus sakei</i> NK14	-	+	+	+
15	<i>Lactobacillus sakei</i> NK15	+	+	+	+
16	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK16	+	+	+	+
17	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK17	+	+	+	+
18	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK18	+	+	+	+
19	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK19	+	+	+	+
20	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK20	+	+	+	+
21	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK21	+	+	+	+
22	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK22	+	+	+	+
23	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK23	+	+	+	+
24	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK24	++	+	+	+
25	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK25	++	++	++	++
26	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK26	+	+	+	+
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK27	+	+	+	+
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK28	+	+	+	+
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK29	+	+	+	+
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK30	+	+	+	+
31	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK31	+	+	+	+
32	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK32	++	++	++	++
33	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK33	+++	++	++	++
34	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK34	+	+	+	+
35	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK35	+	+	+	+
36	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK36	++	++	++	+
37	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK37	++	++	++	++
38	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK38	+	+	+	+
39	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK39	+	+	+	+
40	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK40	++	++	++	++
41	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK41	++	++	+++	+++
42	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK42	+	+	+	+
43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK43	+	+	+	+
44	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK44	++	++	++	++
45	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK45	+	+	+	+
46	<i>Bifidobacterium longum</i> NK46	+++	++	+++	+++
47	<i>Bifidobacterium longum</i> NK47	++	++	++	++
48	<i>Bifidobacterium longum</i> NK48	+	+	+	+
49	<i>Bifidobacterium longum</i> NK49	+++	+++	+++	+++
50	<i>Bifidobacterium longum</i> NK50	+	+	+	+

[0084]

[0085]

(3) Caco2 세포의 ZO-1 단백질 발현 효과

[0086]

대장암 세포인 Caco2 세포를 한국 세포주 은행에서 분양하여 RPMI 1640 배지에서 48시간 동안 배양한 후, Caco2 세포를 웰 당 2×10^6 의 양이 되도록 12-웰 플레이트에 분주하였다. 각 웰에 LPS 1 μ g을 단독으로 처리하거나 LPS 1 μ g과 유산균 1×10^4 CFU를 같이 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 각 웰로부터 배양된 세포들을 모으고, 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 밀착연접단백질(tight junction protein)인 ZO-1의 발현량을 측정하였다. 각 유산균 별 ZO-1의 발현량은 하기 표 5와 같다.

[0087]

(4) SH-SY5Y 세포에 대한 뇌유래신경영양인자(BDNF) 발현 효과 및 NF-kB 활성화 효과

[0088]

신경 세포인 SH-SY5Y 세포를 한국 세포주 은행에서 분양하여 10% FBS 및 1% 항생제가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하고, 12-웰 플레이트에 웰 당 2×10^6 세포수로 분주하였다. 이 후, 각 웰에 유산균 (1×10^4 CFU/ml)과 함께 코르티코스테론(corticosterone)을 300 mg/ml의 농도로 첨가하여 배양한 뒤, NF-kB(p65, p-p65) 및 뇌유래신경

영양인자(brain derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현량을 면역블롯팅(immunoblotting) 방법으로 측정하였다. 각 유산균 별 BDNF 발현 수준 및 NF-kB 활성화 수준은 하기 표 5와 같다.

표 5

관리 번호	균주명	ZO-1 발현증가	BDNF 발현증가	NF-kB 활성화 억제
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK1	+	+	+
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK2	+	+	+
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK3	++	+	++
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK4	+	+	+
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK5	++	+	++
6	<i>Lactobacillus brevis</i> NK6	+	+	+
7	<i>Lactobacillus brevis</i> NK7	+	+	+
8	<i>Lactobacillus brevis</i> NK8	+	+	+
9	<i>Lactobacillus brevis</i> NK9	+	+	+
10	<i>Lactobacillus brevis</i> NK10	-	-	-
11	<i>Lactobacillus sakei</i> NK11	+	+	+
12	<i>Lactobacillus sakei</i> NK12	-	-	-
13	<i>Lactobacillus sakei</i> NK13	+	+	+
14	<i>Lactobacillus sakei</i> NK14	+	+	+
15	<i>Lactobacillus sakei</i> NK15	+	+	+
16	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK16	+	+	+
17	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK17	+	+	+
18	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK18	+	+	+
19	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK19	+	+	+
20	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK20	+	+	+
21	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK21	+	-	+
22	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK22	+	-	+
23	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK23	+	-	+
24	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK24	++	+	++
25	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK25	+	+	++
26	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK26	+	+	+
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK27	+	+	+
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK28	+	+	+
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK29	+	+	+
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK30	+	+	+
31	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK31	+	+	+
32	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK32	++	+	++
33	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK33	++	++	++
34	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK34	+	+	+
35	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK35	+	+	+
36	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK36	+	++	+
37	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK37	++	+	++
38	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK38	+	+	+
39	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK39	+	-	+
40	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK40	++	+	++
41	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK41	++	++	+++
42	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK42	+	+	+
43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK43	+	+	+
44	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK44	++	++	++
45	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK45	+	+	+
46	<i>Bifidobacterium longum</i> NK46	++	++	+++
47	<i>Bifidobacterium longum</i> NK47	+	++	++
48	<i>Bifidobacterium longum</i> NK48	+	+	+
49	<i>Bifidobacterium longum</i> NK49	+	+	++
50	<i>Bifidobacterium longum</i> NK50	+	+	+

(5) 실험 결과

분리된 유산균들의 활성을 평가한 결과, 분리된 유산균들 중에서 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46은 밀착연접단백질인 ZO-1의 발현량을 증가시키면서 항산화 활성 및 염증반응 억제 효과를 우수하게 나타냄을 확인하였다. 특히, 알츠하이머와 같은 노화관련 질환을 유발하는 물질로 알려진 NF-kB의 활성을 억제함과 동시에 노화 및 치매 등에서 감소하는 뇌의 신경을 생산하는 뇌유래신경영양인자의 발현을 증가시킴을 확인하였다(표 4 및 표 5).

실시예 3: 신규한 유산균의 항염 효과 및 대장염 개선 효과

(1) 대장염 동물모델의 제조 및 유산균 투여

[0094] C57BL/6 생쥐(수컷, 21-23g, 6주령)를 한 군당 6마리씩 사용하여 1주간 실험실에 적응시킨 뒤 실험을 진행하였다. 한 군을 정상군으로 하였고, 나머지 군의 생쥐는 2,4,6-트리니트로벤젠설폰산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)으로 대장염을 유발하였다. 구체적으로 실험동물을 에테르로 마취한 후 50% 에탄올에 혼합한 TNBS 용액을 끝이 둥근 1ml 용량의 주사기를 이용하여 항문을 통해 대장 내로 0.1 ml 씩 투여하고 수직으로 들어 30초간 유지하여 염증을 유발하였다. 한편, 정상군에는 생리식염수 0.1 ml를 경구투여하였다. 투여 후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46 또는 이들의 1:1 혼합물을 생리식염수에 현탁하여 1×10^9 CFU의 양으로 경구투여하였다. 유산균 투여가 종료된 다음날 실험동물을 희생시킨 다음 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하여 길이를 측정하였다. 그 후, 이로부터 하기의 각종 지표를 확인하였다. 한편, 정상군의 실험동물에는 신규한 유산균 대신 유산균 현탁액인 1% 텍스트로스 용액을 경구투여하였다. 또한, 양성 대조군의 실험동물에는 신규한 유산균 대신 대장염 치료 약물인 설파살라진(sulfasalazine)을 50 mg/kg의 양으로 경구투여하였다.

[0095] (2) 미엘로퍼옥시다아제 활성 측정

[0096] 대장조직 100mg에 0.5% 헥사데실 트리메틸 암모늄 브롬화물(hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 함유 10 mM 인산칼슘 완충액(potassium phosphate buffer, pH 7.0) 200 μ l를 넣고 균질화(homogenization)하였다. 4℃ 및 10,000 g의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 50 μ l를 0.95 ml의 반응액(1.6mM 테트라메틸 벤지딘(tetramethyl benzidine)과 0.1mM H₂O₂ 함유)에 넣고 37℃에서 반응시키면서 650 nm에서 경시적으로 흡광도를 측정하였다. 상기 미엘로퍼옥시다아제(myeloperoxidase, MPO)의 활성은 반응물로서 생긴 H₂O₂ 1 μ mol/ml을 1 유닛으로 계산하였다.

[0097] (3) 염증 지표의 측정

[0098] 웨스턴블롯팅 방법을 이용하여 p-p65, p65, COX-2 및 IL-17 과 같은 염증 반응 지표 물질을 측정하였다. 구체적으로, 상기 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정 실험과 동일한 방법으로 얻은 상등액 50 μ g를 취해 면역블롯팅을 수행하였다. 또한, 사이토카인의 발현량은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

[0099] (4) 실험 결과

[0100] 상기에서 수행한 실험 결과는 하기 표 6과 같다.

표 6

실험군	체중변화 g	대장길이 cm	MPO 활성 μ U/mg	TNF- α pg/mg	IL-17 pg/mg	NF-kB활성 p-p65/p65	COX-2활성
정상군	0.6	6.5	0.36	22	9	0.11	0.21
유도군	-2.5	4.3	1.79	185	52	0.34	0.56
LN NK41	-0.8	4.6	0.82	85	42	0.24	0.35
BL NK46	-0.3	4.8	0.78	68	38	0.27	0.31
NK41+NK46	-0.5	5.1	0.79	82	39	0.24	0.32
양성 대조군	-0.54	4.7	0.98	75	41	0.29	0.41

[0101] 구체적으로, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46 또는 이들의 혼합물을 투여한 군에서의 체중 변화가 크지 않아 독성이 없음을 확인하였다. 또한, 대장염의 유도시 대장이 길이가 짧아졌으나, 유산균을 투여한 군에서는 대장 길이의 회복 효과를 나타냄을 확인하였다. 나아가, 유산균을 투여한 군에서는 대장염의 유도에 따라 증가된 미엘로퍼옥시다아제 활성이 감소되고, TNF- α 및 IL-17의 사이토카인의 발현량이 억제되며 NF-kB의 활성 및 COX-2의 활성이 억제됨을 확인하였다.

[0103] 이를 통해, 신규한 유산균은 독성을 나타내지 않으면서 대장염의 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0104] 실시예 4: 신규한 유산균의 노화로 인한 기억력 손상에 대한 기억력 개선 효과 확인

[0105] (1) Y자형 미로 실험(Y-maze task)

[0106] 실험에 사용된 Y자형 미로 장치는 뻗어있는 3개의 통로(arm)가 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이

25 cm, 높이 14 cm, 폭 5 cm 이고 동일한 각도로 위치 장치로서, 단기 기억력 실험에 사용된다.

[0107] 구체적으로, Y자형 미로의 한 통로의 끝에 실험동물의 머리 부분이 향하도록 두고 8 분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 하였다. 동물의 움직임을 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것 (arm entry)으로 보았다. 동물의 움직임을 교차횟수 (alternation)로 나타내는데, 상기 교차횟수는 동물이 연속적으로 3 개의 통로를 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의하였다. 자발적인 교차행동량(Spon.alternation)은 실제 교차횟수와 최대 가능한 교차횟수 (즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분비로 표시하였다.

[0108] (2) 수동 회피 실험(Passive avoidance task)

[0109] 장기 기억력을 평가하기 위해 수동 회피 실험을 진행하였다. 구체적으로 마우스를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획(50 W 전구)에 놓고 10초간 탐색시킨 후, 길로틴문(gillotin door, 5x5 cm)을 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다(Gemini Avoidance System; San Diego, USA). 길로틴문이 열린 후 생쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하여 이를 습득 시험(acquisition trial)으로 정의하였다. 일단 생쥐가 어두운 쪽으로 네 발이 다 들어가면 길로틴문이 닫히고, 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 그리드(grid) 바닥을 통해 흐르게 하여 생쥐가 이를 기억하도록 하였다. 습득 시험이 끝난 지 24시간 후에 유산균의 효과를 확인하고자 수동 회피 실험을 시행하였다. 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 마우스의 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time: 머무름 시간)을 300초까지 측정하였다(retention trial : 기억 시험).

[0110] 공지된 시험 결과 해석에 따라, 어두운 쪽으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 기억력이 우수한 것으로 해석하였다.

[0111] (3) 수중미로 실험(Water maze task)

[0112] 장기 기억력 및 공간지각 능력을 시험하기 위해 20 ± 1 °C 약한 조명에서 직경 90 cm, 높이 45 cm인 원형 수조에 30 cm 깊이로 500 ml 우유가 들어 있는 수조에서 수중미로 실험(Morris water maze test)을 수행하였다. 구체적으로, 수조를 4 부분의 가상영역으로 나누고, 그중 한 곳에 직경 6 cm 크기의 발판을 1 cm 정도 잠기도록 29 cm 높이로 설치하였다. 훈련 첫 날은 60초간 발판 없이 수영훈련을 시키고, 나머지 4일 동안은 매일 4회씩 발판을 찾는 훈련을 수행하였다(훈련 시험 : training trial). 발판에는 10초간 머무를 수 있도록 하며 60초 동안 발판을 찾지 못할 경우 10초간 발판 위에서 쉴 수 있도록 하였다. 훈련이 끝난 후 실험 동물은 자외선 램프로 건조시켰다. 훈련은 30초 마다 반복되며, 발판을 찾는때까지 소요되는 시간을 비디오 카메라로 측정하였다. 최종 실험은 수조의 발판을 제거한 후 실험 동물을 수조에 넣고 발판이 있었던 곳에서 머무는 시간(Time spent in target quadrant)을 측정하였다(프로브 시험 : probe trial).

[0113] (4) 물체 인지 실험(Novel object task)

[0114] 물체 인지 실험은 내부에서 외부가 보이지 않도록 제작된 박스(40×40×40 cm)에서 실시하였다. 두 개의 모양과 크기가 같은 물체(A, A')를 상자 안에 고정시키고, 마우스를 상자의 중심에서 출발시켰다. 그리고 10분간 마우스가 두 물체를 만지는 횟수를 기록하였다. 24시간이 지난 다음 두 개의 물체 중 하나를 새로운 물체로 바꾸고 (A, B) 원래 있던 물체와 새로운 물체를 만지는 횟수(Exploration time)를 기록하여 %로 계산하였다.

[0115] (5) 노화 동물모델에 대한 기억력 개선 효과

[0116] 노화동물모델인 C57BL/6 생쥐(Ag, 수컷, 19개월령)를 라온바이오에서 구입하여 신규한 유산균의 노화인자인 p16 단백질 발현 억제 및 기억력 개선 효과를 확인하였다.

[0117] 구체적으로, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46 또는 이들의 1:1 혼합물을 1×10^9 CFU/생쥐/일 농도로 4주 동안 각각 투여하였다. 그 후, 실시예 3의 Y자형 미로 시험, 물체 인지 실험 및 해마에서 기억력 관련 인자 측정 실험을 수행하였다.

[0118] 실험 결과, 유산균을 투여하지 않은 노화 동물모델은 자발적인 교차행동량이 정상군과 비교하여 감소하였으나, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 투여한 군(Ag+LM), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 투여한 군(Ag+BL) 및 이들의 혼합물을 투여한 군(Ag+ML)은 정상군 수준으로 자발적인 교차행동량이 회복됨을 확인하였다(도 1). 또한, 나아가, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 투여한 군(Ag+LM), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 투여한 군(Ag+BL) 및 이들의 혼합물을 투여한 군(Ag+ML)은 정상군 수준으로 새로운 물체를 만지는 횟수가 회복됨을 확인하였다(도 2). 상기 유산균 투여군은 노화동물모델과 비교하여 노화인자인 p16의 발현을 억제하고, 염증 인자인 NF-κB의 활성을 억제하며, 뇌유래

신경영양인자의 발현을 증가시킴을 확인하였다(표 7). 특히, 락토바실러스 뮤코세 NK41 및 비피도박테리움 롱검 NK46의 혼합물이 개별 유산균에 비해 보다 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다.

표 7

	P16/β-actin	BDNF/β-actin	p-p65/p65
정상군	0.21	0.43	0.21
Ag	0.45	0.28	0.33
Ag+LM	0.34	0.34	0.28
Ag+BL	0.30	0.37	0.29
Ag+ML	0.29	0.38	0.27

이를 통해, 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46 및 이들의 혼합물은 노화 동물모델의 기억력 개선 효과가 우수함을 확인하였다.

(6) 알츠하이머 동물모델에 대한 기억력 개선 효과

알츠하이머 동물모델인 Tg 마우스 [B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1dE9) 85Dbo/J strain-AD mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA)] 4개월령을 구입하여 2개월동안 적응시켰다. 정상군으로 건강한 C57BL/6 생쥐(오리엔트, 서울, 한국) 6개월령을 구입하여 2개월간 적응시켰다. Tg 마우스에 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41 또는 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 1×10^9 CFU/생쥐/일 농도로 8주 동안 각각 투여하였다(토요일 및 일요일은 투여하지 않음). 그 후, 실시예 3의 Y자형 미로 실험, 수동 회피 실험, 수중미로 실험 및 해마에서 기억력 관련 인자 측정 실험을 수행하였다.

실험 결과, 유산균을 투여하지 않은 Tg 마우스는 정상군과 비교하여 Y자형 미로 시험에서의 자발적인 교차행동량이 감소하고, 수동 회피 실험에서의 머무름 시간이 감소하며, 수중미로 실험에서의 머무름 시간이 증가하였으나, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 투여한 군(Tg+LM) 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 투여한 군(Tg+BL)은 정상군 수준으로 자발적인 교차행동량 및 머무름 시간이 회복됨을 확인하였다(도 3 내지 도 5). 또한, 상기 유산균 투여군은 Tg 마우스와 비교하여 염증 인자인 NF-κB의 활성을 억제하고, 뇌유래신경영양인자의 발현을 증가시킴을 확인하였다(도 6).

이를 통해, 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46 및 이들의 혼합물은 알츠하이머 동물모델의 기억력 개선 효과가 우수함을 확인하였다.

실시예 5: 신규한 유산균의 정신 장애 개선 효과

(1) 정신 장애 유도 동물모델 제조 - 구속 스트레스(IS)

불안증, 우울증 또는 스트레스 등의 정신 장애를 유도하기 위해 3x10 cm의 원통모양의 구속 스트레스 기구에 생쥐를 움직일 수 없도록 고정하였다. 2일에 한 번씩 머리가 위로 가도록 세워놓는 방법으로 구속 스트레스를 5회 반복하였다. 이후 불안 행동을 측정하였다.

(2) 고가플러스미로(elevated plus maze, EPM) 시험

고가플러스미로(elevated plus maze, EPM)는 스트레스 또는 불안증 등의 정신 장애의 정도를 측정하기 위한 실험 장치이다. 본 실험에 사용된 고가플러스미로 실험 장치는 두 개의 개방 통로(Open arm (30 x 7 cm))와 20 cm 높이의 벽을 가진 두 개의 폐쇄 통로(Enclosed arm (30 x 7 cm))가 바닥으로부터 50 cm만큼 높고, 중앙 플랫폼으로부터 7 cm씩 뻗어 있는 검정색 플렉시 유리 장치이다. 본 시험은 20 룩스의 밝기에 비디오 카메라가 위에 설치되어 있는 방에서 고가플러스미로에 놓인 쥐의 움직임을 기록하였다.

구체적으로, C57BL/6 생쥐(수컷, 19-22 g)를 고가플러스미로의 정중앙에 두고, 머리는 개방 통로를 향하게 두었다. 5분 동안 개방 통로와 폐쇄 통로에서 보낸 시간과 횟수를 측정하였다. 통로의 진입(Arm entry)은 네 발이 모두 들어간 것을 인정하였다.

전체 시험 시간 중 개방 통로에서 보낸 시간(Time spent in open arms, OT)은 [개방 통로에서 보낸 시간/(개방 통로에서 보낸 시간+폐쇄 통로에서 보낸 시간)]x100 으로 계산하였다. 그리고 개방 통로 진입(open arm entries, OE)은 [개방 통로 입장/(개방 통로 입장+폐쇄 통로 입장)]x100으로 계산하였다. 매 행동실험 종료 후

에는 70% 에탄올로 남아있는 냄새를 제거하였다.

[0132] 공지된 시험 결과 해석에 따라, 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소하는 경우 불안증 또는 우울증 등의 정신 장애 증상이 나타난 것으로 해석하였다.

[0133] (3) 실험 결과

[0134] 실험 결과, 구속 스트레스를 가한 후 유산균을 투여하지 않은 생쥐(IS)는 정상군(NOR)과 비교하여 고가플러스미로 시험에서 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소하였으나, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 투여한 군(IS+LM), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 투여한 군(IS+BL) 또는 이들의 1:1 혼합물을 투여한 군(IS+LM+BL)은 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 증가하였음을 확인하였다(표 8).

표 8

	개방통로에서 보낸 시간(OT) s	개방 통로 진입(OE) s
NOR	15.2	36.2
IS	4.5	17.5
IS+LM	16.1	34.6
IS+BL	14.5	32.1
IS+LM+BL	16.5	35.8

[0136] 이를 통해, 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46은 불안증, 우울증 및 스트레스 등의 정신 장애의 개선 효과가 우수함을 확인하였다.

[0137] 실시예 6: 신규한 유산균의 우울증 개선 효과

[0138] (1) 우울생쥐모델 제작

[0139] 우울증을 유도하기 위하여 3x10 cm의 원통모양의 구속 스트레스 기구에 고정하고, 하루에 12 시간씩 2 일 동안 구속하여 우울생쥐모델을 제작하였다. 이후 익일부터 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM), 비피도박테리움 롱검 NK46(BL) 또는 이들의 1:1 혼합물(ML)을 5일 동안 투여하고 최종 투여 익일에 우울행동 지표를 측정하였다.

[0140] (2) 고가플러스미로(elevated plus maze, EPM) 시험

[0141] 두 개의 개방 통로(Open arm (30 x 7 cm))와 20 cm 높이의 벽을 가진 두 개의 폐쇄 통로(Enclosed arm (30 x 7 cm))가 바닥으로부터 50 cm만큼 높고, 중앙 플랫폼으로부터 7 cm씩 뻗어 있는 검정색 플렉시 유리 장치인 고가플러스미로 실험장치를 이용하였다. 본 시험은 20 루스의 밝기에 비디오 카메라가 위에 설치되어 있는 방에서 고가플러스미로에 놓인 쥐의 움직임을 기록하였다.

[0142] 구체적으로, C57BL/6 생쥐(수컷, 19-22 g)를 고가플러스미로의 정중앙에 두고, 머리는 개방 통로를 향하게 두었다. 5분 동안 개방 통로와 폐쇄 통로에서 보낸 시간과 횟수를 측정하였다. 통로의 진입(Arm entry)은 네 발이 모두 들어간 것을 인정하였다.

[0143] 전체 시험 시간 중 개방 통로에서 보낸 시간(Time spent in open arms, OT)은 [개방 통로에서 보낸 시간/(개방 통로에서 보낸 시간+폐쇄 통로에서 보낸 시간)]x100 으로 계산하였다. 매 행동실험 종료 후에는 70% 에탄올로 남아있는 냄새를 제거하였다.

[0144] (3) 강제수영 실험(Forced Swimming Test, FST)

[0145] Porsolts RM, Le Pichon M, Jalfre M, *Nature* 266:730-732 (1977) 「Depression: a new animal model sensitive to antidepressants.」의 방법에 따라 높이 40cm, 직경 20cm인 수조에 온도 25 ± 1° C의 물을 물 30 cm를 채우고, 실험용 마우스를 한 마리씩 수조에 넣었다. 총 6 분 중 최초 2 분은 적응시간으로 측정하지 않고, 마지막 4 분 동안의 실험동물 부동상태 (immobility) 시간을 측정하였다. 부동상태는 머리만을 물 위로 드러내기 위한 최소한의 움직임만 하면서 똑바로 서서 움직이지 않고 떠있는 상태를 말하며, 우울상태가 감소되면 부동상태의 감소가 나타나게 된다.

[0146] (4) 꼬리 매달기 실험(Tail Suspension Test, TST)

[0147] Steru, L. et al., Psychopharmacology, (1985) 85, 367-370, 「The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice.」의 방법에 따라 마우스 꼬리 끝 1cm 정도에 고정 장치를 장착 후 지면에 서 50 cm 떨어진 위치에 매달고, 총 6분 동안 실험동물의 부동상태 (immobility) 시간을 측정하였다.

[0148] (5) 불안 및 우울증상 마커들의 측정

[0149] 상기 (1)에서와 같이 구속 스트레스를 주어 우울생쥐모델을 제작하고, 락토바실러스 뮤코세 NK41(LM), 비피도박테리움 롱검 NK46(BL) 또는 이들의 1:1 혼합물(ML)을 5일 동안 투여하고 최종 투여 익일에 불안 및 우울증상 마커들을 측정하였다.

[0150] 생쥐 혈액 중의 코르티코스테론(corticosterone)을 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(Ebioscience, San Diego, CA)로 측정하였으며, 면역블롯팅(immunoblotting) 방법을 이용하여 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor) 및 NF-kB(p-p65, p65)를 측정하였다.

[0151] 구체적으로, 해마(hippocampus)를 수술로 꺼내서 1% 단백분해효소억제제 콕테일(protease inhibitor cocktail) 및 인산가수분해효소 억제제 콕테일(phosphatase inhibitor cocktail)을 함유한 RIPA lysis buffer를 넣고 균일하게 호모지네이션(homogenization)해서 원심분리(13,200 ×g, 10 min, 4 °C)하고, 상등액을 얻었다. 상등액을 12% SDS(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide) 젤(gel)에 전기영동 한 후, nitrocellulose membrane으로 옮기고, 탈지유단백으로 블로킹(blocking) 후 씻어내었다. 이후, BDNF, p65, p-p65, βctin 항체를 처리하여 결합되도록 한 후 세척하고, horseradish peroxidase를 포함하는 2차 항체를 처리하고, 단백질을 enhanced chemiluminescence detection kit로 확인하였다.

[0152] (6) 형광면역염색

[0153] 뇌절편을 슬라이드글라스에 고정하고, Lee 등의 방법에 따라 anti-Iba1(ionized calcium-binding adapter molecule 1) 항체(1:100, Abcam) 또는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 처리하여 미세아교세포(microglia)를 공초점 현미경(confocal microscope)으로 확인하였다.

[0154] (7) 실험 결과

[0155] 도 7에 나타난 바와 같이 우울증을 유도한 후 유산균을 투여하지 않은 생쥐(DC)는 정상군(NOR)과 비교하여 고가 플러스미로 시험에서 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 감소하였으나, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 투여한 군(DC+LM), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 투여한 군(DC+BL) 또는 이들의 1:1 혼합물을 투여한 군(DC+ML)은 개방 통로에서 보낸 시간(OT) 및 개방 통로 진입(OE)이 증가하였음을 확인하였다.

[0156] 이를 통해, 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41, 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46 및 이들의 혼합물은 우울증 개선 효과가 우수함을 확인하였다.

[0157] 도 8에 나타난 바와 같이 강제수영실험에서 구속 스트레스에 의해 유발된 불안 행동 및 우울증상이 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 투여한 군(DC+LM), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 투여한 군(DC+BL) 또는 이들의 1:1 혼합물을 투여한 군(DC+ML)에서 부동상태가 감소함으로써, 불안 행동 및 우울증상이 개선되었음을 확인하였다.

[0158] 도 9에 나타난 바와 같이 꼬리매달기 실험에서 구속 스트레스에 의해 유발된 불안 행동 및 우울증상이 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 투여한 군(DC+LM), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 투여한 군(DC+BL) 또는 이들의 1:1 혼합물을 투여한 군(DC+ML)에서 부동상태가 감소함으로써, 불안 행동 및 우울증상이 개선되었음을 확인하였다.

[0159] 도 10에 나타난 바와 같이 구속스트레스에 의해 유도된 우울생쥐모델의 해마에서는 뇌유래신경영양인자(BDNF)의 발현이 감소되고, NF-kB의 활성이 유도되는 현상이 나타났다. 반면, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 투여한 군(DC+LM), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 투여한 군(DC+BL) 또는 이들의 1:1 혼합물을 투여한 군(DC+ML)에서 BDNF의 발현이 증가되고 NF-kB의 활성이 억제됨을 확인하였다.

[0160] 또한, 도 11에 나타난 바와 같이 혈액 내의 코르티코스테론을 측정한 결과, 우울생쥐모델에서는 코르티코스테론이 유의적으로 증가하였으나, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 투여한 군(DC+LM), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 투여한 군(DC+BL) 또는 이들의 1:1 혼합물을 투여한 군(DC+ML)에

서는 혈액 내의 코르티코스테론이 유의하게 감소되었음을 확인하였다.

[0161] 아울러, 도 12에 나타난 바와 같이 해마에서 활성화된 Iba1 및 미세아교세포를 관찰한 결과, 우울생쥐모델에서는 해마의 CA1 및 CA3 영역 모두에서 Iba1 및 미세아교세포의 활성화가 나타난 반면, 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 투여한 군(DC+LM), 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 투여한 군(DC+BL) 또는 이들의 1:1 혼합물을 투여한 군(DC+ML)에서는 Iba1 및 미세아교세포의 활성화가 모두 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.

[0162] 상기와 같은 결과로부터 신규한 유산균인 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41 및 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46은 우울증 및 불안 증상에 대한 개선 효과가 우수함을 확인하였다.

[0163] <유산균의 수탁 정보>

[0164] 본 발명의 발명자들은 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*) NK41을 2017년 8월 4일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 KCCM12091P의 수탁번호를 부여받았다.

[0165] 또한, 본 발명의 발명자들은 비피도박테리움 롱검(*Bifidobacterium longum*) NK46을 2017년 8월 4일에 공인기탁기관인 한국미생물보존센터(주소: 대한민국 서울 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩)에 특허기탁하여 KCCM12087P의 수탁번호를 부여받았다.

수탁번호

[0167]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12087P

수탁일자 : 20170804

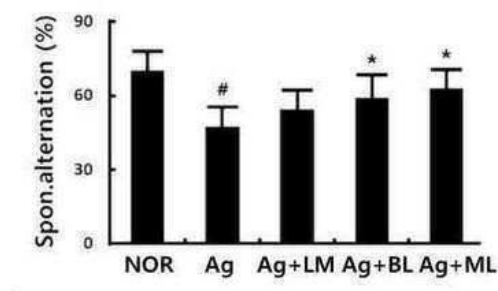
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12091P

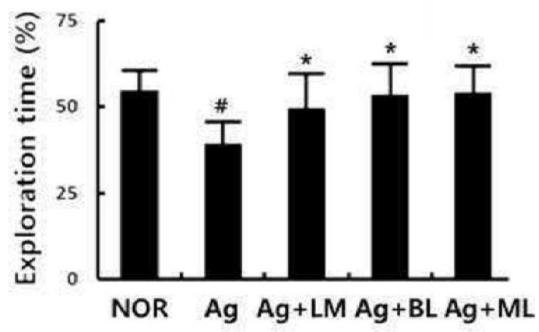
수탁일자 : 20170804

도면

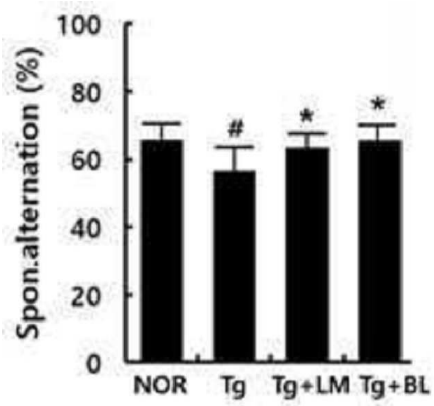
도면1



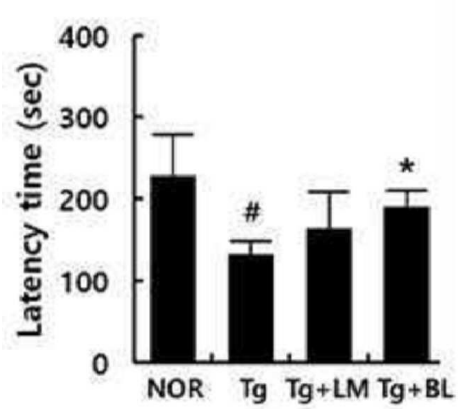
도면2



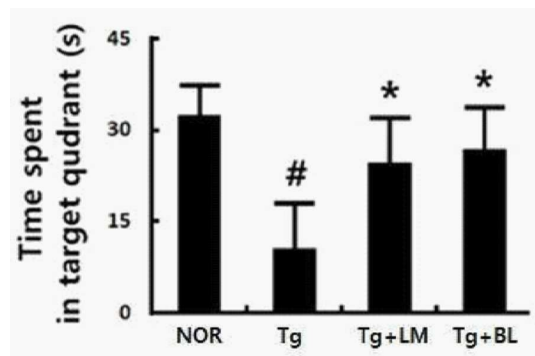
도면3



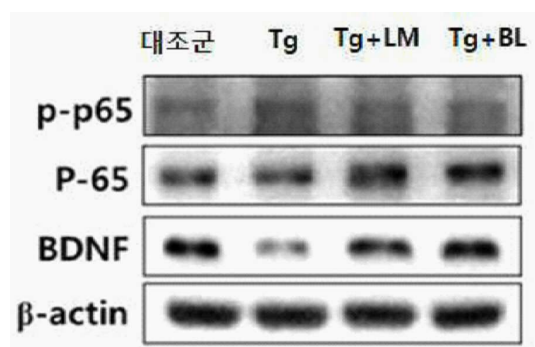
도면4



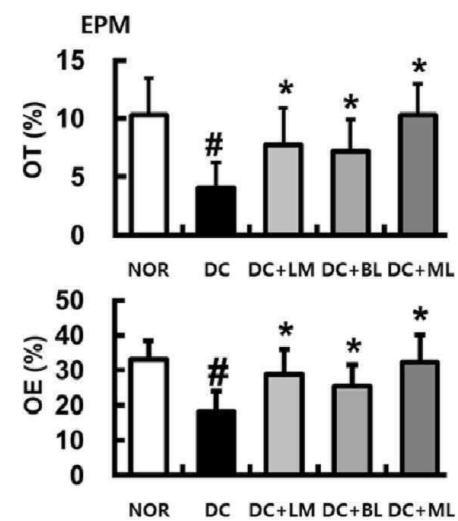
도면5



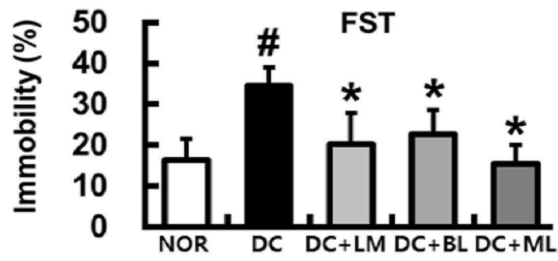
도면6



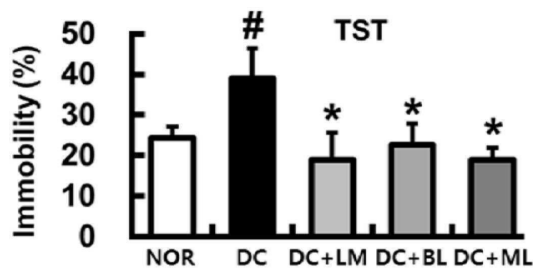
도면7



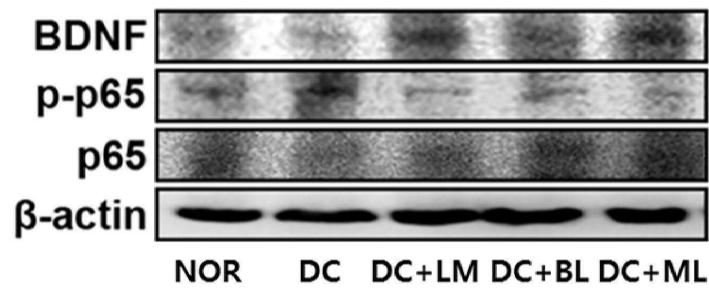
도면8



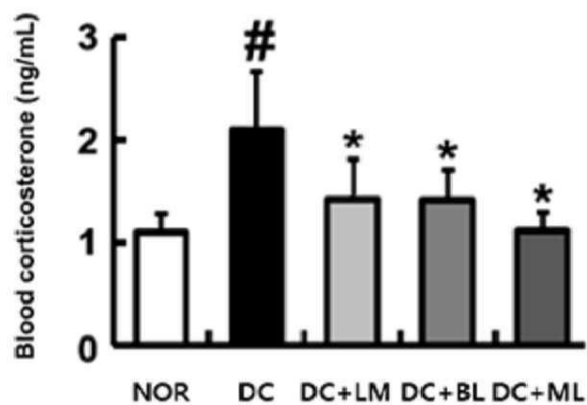
도면9



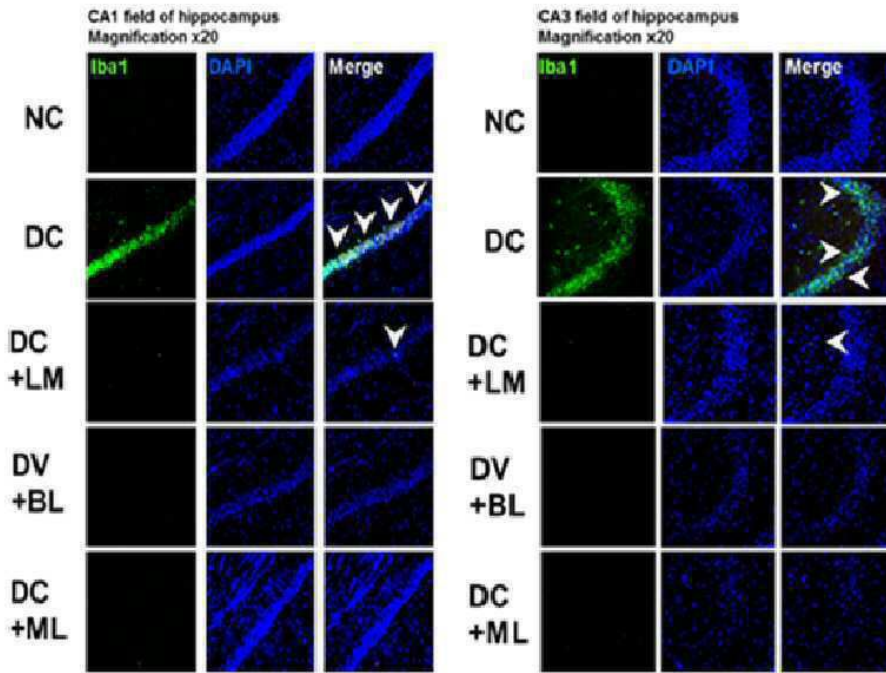
도면10



도면11



도면12



서열 목록

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

NAVIPHARM CO, LTD

<120> Novel lactic acid bacteria and use thereof

<130> 18PP31114

<150> KR 10-2017-0155078

<151> 2017-11-20

<160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1513

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NK41 16s rDNA

<400> 1

agattcaccc taatcatctg cccacacctta ggcggctagc tccccgaagg gttacccac 60

cgactttggg tgttgcaaac tctcatggtg tgacgggcgg tgtgtacaag gccccgggaa 120

cgtatttcca cccgggcatg ctgatccgcg attactagcg attccgactt cgtgcaggcg 180

agttgcagcc tgcagtccga actgagaacg gttttaagag attagcttgc cctcgcgagt 240

tcgcgactcg ttgtaccgtc cattgttagca cgtgtgtagc ccaggtcata aggggcatga	300
tgatctgacg tcgtcccccac ctctctccgg tttgtcaccg gcagttctac tagagtcccc	360
aactgaatgc tggcaactag taacaagggt tgcgctcggt gcgggactta acccaacatc	420
tcacgacacg agctgacgac gaccatgcac cacctgtcat tgcgttcccg aaggaaacgc	480
cctatctcta gggttggcgc aagatgtcaa gacctggtaa ggttcttcgc gtagcttcga	540
attaaaccac atgtccacc gcttgtgcgg gccccgtca attcctttga gtttcaacct	600
tgcggtcgta ctccccaggc ggagtgttta atgcgttagc tgcggcactg aaggcgaggaa	660
acctccaac acctagcact catcgtttac ggcatggact accagggtat ctaatcctgt	720
tcgtaccca tgctttcgag cctcagcgtc agttgcagac cagacagccg ccttcgccac	780
tgggtgtctt ccatatatct acgcattcca ccgtacaca tggagtcca ctgtcctctt	840
ctgcactcaa gtctgacagt ttccgatgca ctcttttggg taagccaaag gctttcacat	900
cagacttatt aaaccgcctg cgctcgcttt acgccaata aatccggata acgcttgcca	960
cctacgtatt accgcggctg ctggcacgta gttagccgtg actttctggt tagataccgt	1020
cactgcgtga acagttgctc tcacgcacgt tcttctctaa caacagagct ttacgagccg	1080
aaacccttct tactcagc ggtgttgctc catcaggctt gcgcccattg tggagattc	1140
cctactgtg cctcccgtag gagtatggac cgtgtctcag ttccattgtg gccgatcagt	1200
ctctcaactc ggctacgat cacagccttg gtaggcggtt acctaccaa caagctaatg	1260
cgccgcaggt ccatcccaa gtgatagccg aagccatctt ttaaatttga atcatgcgat	1320
tcaaattgtt atgcggtatt agcatctgtt tccaaatgtt atccccgct ttggggcagg	1380
ttacctacgt gtiactcacc cgtccgccac tcgttggtta accaacgtca agtccgtgca	1440
agcacgttca atcagttggg ccaacgcgtt cgacttgcgt gtattaggca caccgccggc	1500
gttcactctg agc	1513
<210> 2	
<211> 1469	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NK46 16s rDNA	
<400> 2	
tttaccctg ttacgactta gtcccaatca cgagcctcac cttagacggc tccatccac	60
aaggggttag gccaccggtc tcgggtgctg cccacttca tgacttgacg ggcggtgtgt	120
acaaggcccc ggaacgcatt caccgcgacg ttgctgattc gcgattacta gcgactccgc	180

cttcacgcag tcgagttgca gactgcgatc cgaactgaga ccggttttca gggatccgct	240
ccgcgtcgcc gcgtcgcatc ccgttgtacc ggccattgta gcatgcgtga agccctggac	300
gtaaggggca tgatgatctg acgtcatccc caccttcctc cgagttaacc cggcggtcc	360
cccgtgagtt cccggcataa tccgttggca acacggggcg agggttgcgc tcgttcggg	420
acttaacca acatctcacg acacgagctg acgacacca tgcaccacct gtgaaccgcg	480
cccgaaggga agccgcacct ctacgaccgt cgggaacatg tcaagcccag gtaagttct	540
tcgcgttgca tcgaattaat ccgcatgctc cgccgcttgt gcgggcccc gtcaatttct	600
ttgagtttta gccttgcgcg cgtactcccc aggcgggatg cttaacgcgt tagctccgac	660
acggaaccgc tggaacgggc cccacatcca gcatccaccg tttaacggcg ggactaccag	720
ggtatctaat ccgttcgct cccacgcctt tcgtcctca gcgtcagtaa cggcccagag	780
acctgccttc gccattggtg ttcttccga tatctacaca ttccaccgtt acaccgggaa	840
ttccagtctc cctaccga ctcaagcccg cccgtaccg gcgcggatcc accgttaagc	900
gatggacttt cacaccggac gcgacgaacc gcctacgagc cctttacgc caataattcc	960
ggataacgct tgcacctac gtattaccgc ggtgctggc acgtagttag ccggtgctta	1020
ttcaacgggt aaactcactc tcgcttgctc cccgataaaa gaggtttaca acccgaaggc	1080
ctccatccct cagcggcggt cgctgcatca ggcttgcgc cattgtgcaa tattccccac	1140
tgctgcctcc cgtaggagtc tgggccgtat ctcagtccta atgtggccgg tcgcctctc	1200
aggccggcta cccgtcgaag ccacggtggg ccgttacccc gccgtcaagc tgataggacg	1260
cgaccccatc ccataccgcg aaagctttcc cagaagacca tgcgatcaac tggagcatcc	1320
ggcattacca cccgtttcca ggagctattc cggtgtatgg ggcaggtcgg tcacgcatta	1380
ctcaccggtt cgccactctc accaccaagc aaagcctgat ggatcccgtt cgacttgcac	1440
gtgttaagca cgccgccagc gttcatcct	1469