

(43) 공개일자 2021년03월03일

- 위병갑

- 1 -

(52) CPC특허분류

**A61P 29/00** (2018.01)

**A61P 3/04** (2018.01)

**A61P 3/06** (2018.01)

**A61P 3/10** (2018.01)

**A61P 9/12** (2018.01)

**C12N 15/746** (2013.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/24** (2013.01)

**C12R 1/01** (2013.01)

(72) 발명자

**구혜진**

광주광역시 남구 화산로73번길 3, 101동 606호(진  
월동, 고운하이플러스)

**이주훈**

경기도 수원시 영통구 봉영로 1526, 703동 704호(  
영통동, 살구골 진덕,서광,성지,동아 아파트)

**김유태**

경기도 용인시 기흥구 예현로 15, 103동 402호(서  
천동, 서그내마을에스케이아파트)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

수탁번호 KCTC13859BP로 기탁된 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검(*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*)균주.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1에 기재된 16S rRNA 염기서열을 포함하는 균주.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 균주는 혈중 콜레스테롤 감소 또는 면역조절 활성을 포함하는 것을 특징으로 하는 균주.

#### 청구항 4

제 1항의 상기 균주를 포함하는 생균제 조성물.

#### 청구항 5

수탁번호 KCTC13859BP인, 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 균주, 이의 배양물, 또는 추출물 중에 1이상을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 6

수탁번호 KCTC13859BP인, 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 균주, 이의 배양물, 또는 추출물 중에 1이상을 포함하는 대사성 질환 개선 또는 예방용 건강기능성 식품 조성물.

#### 청구항 7

제 5항 또는 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대사성 질환은 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 또는 비만 중 1이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 8

수탁번호 KCTC13859BP인, 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 균주, 이의 배양물, 또는 추출물 중 1이상을 포함하는 면역기능 조절용 조성물.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 조성물은 항염증성 사이토카인 분비의 증가 또는 전염증성 사이토카인 분비의 감소로 면역 기능을 조절하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 항염증성 사이토카인은 IL-4, 및 IL-10이며, 전염증성 사이토카인은 TNF- $\alpha$ , 및 IL-6인 것을 특징으로하는 조성물.

#### 청구항 11

제 8항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 약학적 조성물, 건강기능식품 또는 일반 식품 중 1이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 조절, 혈중콜레스테롤 감소 등 건강 증진에 도움을 주며, 한국 건강한 성인으로부터 분리한 신규한 비피도 박테리엄 롱검 아종(*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*) 균주의 분리 및 이의 용도에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 프로바이오틱스(Probiotics)란 인간이나 동물 등 숙주의 건강에 유익한 효과를 나타내는 미생물 또는 그 성분으로, 바람직하게는 유산균이다. 프로바이오틱스는 균주 특이적(strain specific)이며 같은 종과 속에 해당하는 균주라도 효능은 매우 상이하다. 프로바이오틱스는 섭취하게 되면 장에 정착하여, 정장작용 등의 일차적인 기능성 외에도 면역증강, 대사증후군, 뇌건강 등 신체 전반에 도움을 주는 기능이 보고되어 있다. 프로바이오틱스 제품으로는 생균제 제품과 사균제 제품, 박테리오신 함유 제품, 유전자 재조합 제품 등이 있다. 생균제의 경우 균체 자체가 인체의 소장 및 대장에 정착하여 생리활성에 도움을 주는 제품이며, 사균제는 균체가 분비한 유용 물질들이 인체에서 유익한 효과를 나타낸다. 프로바이오틱스가 장에 도달하여 유익한 유산균 증식, 유해균 억제, 원활한 배변활동의 기능을 나타내려면 하루에  $10^8 \sim 10^{10}$  colony forming unit (CFU)를 섭취하도록 권고하고 있다.

[0003] 서구화된 식습관으로 인해 고칼로리, 고지방 식품의 섭취가 늘어나면서 비만 및 각종 성인질환 발병률이 높아지고 있으며, 장내의 유익한 유산균의 수가 줄어들고 있다. 유익한 유산균의 수가 줄어들게 되면 유해균의 수가 증가되고, 세균 다양성 불균형이 일어난다. 세균 다양성 불균형으로 인해 최근 국내에서 발병률이 증가하는 질병으로는, 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)중 하나인 크론병(Crohn's disease, CD)이 있다. CD는 미국 및 유럽과 같은 고지방, 저식이섬유 식단위주의 국가에서 흔히 발병하던 질환으로, CD와 같은 궤양성 대장염은 재발과 호전을 반복하는 원인 불명의 만성적 질환이다. 상기와 같은 염증성 장질환은 기존의 치료로는 완치가 어려운 난치성 질환이다. IBD의 발병원인 중 하나는 마우스에서 관찰 되었으며, IBD가 유발된 마우스는 장내 공생세균 중 헬리코박터 헤파티쿠스(*Helicobacter hepaticus*)와 박테로아이데스(*Bacteroides*)가 증가돼 있음이 확인되었다. 이들 세균은 선천 및 획득 면역계를 자극하여 염증 반응을 유도하여, CD와 같은 궤양성 대장염을 유발하는 것으로 확인되었다. 장내 유해균들이 과다 증식하면서, 제한된 에너지를 모두 소비하고, 유익균이 정상적으로 자리 잡지 못하게 되면 세균 다양성 불균형이 초래된다. CD와 같은 질병을 치료하기 위한 기존의 치료방법은 유해균을 사멸시켜 장내 세균 불균형을 개선하기 위해 항생제를 이용하였다. 그러나, 항생제를 이용한 치료방법은 유익균 또한 사멸시키기 때문에, 장내 세균 불균형이 회복되기 어려운 실정이다. IBD와 같은 장내 세균 불균형 질환을 치료하기 위해, 무너진 세균 불균형을 회복하는 방법들이 도입되고 있으며, 그 중 프로바이오틱스 의약품을 경구 및 직접 투여하는 방법이 연구되고 있다.

[0004] 성인성 질환을 유발시키는 요인 중에서도 가장 주된 요인은 동물성 지방의 과다한 섭취로 인한 혈중 고콜레스테롤이다. 고콜레스테롤 혈증은 고지혈증, 동맥경화증, 지질 관련 대사증후군과 같은 질환의 원인이 되고 있다. 유산균은 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 것으로 알려져 있으며, 유산균에 의한 콜레스테롤 흡수의 감소 기작을 세 가지로 설명할 수 있다(대한민국 등록특허 제10-0930251호 참조). 첫 번째는 유산균이 장내에 정착 증식하면서 콜레스테롤을 흡착하여 배설시키는 것이고, 두 번째는 유산균이 담즙산을 흡착하여 배설시키는 것이다. 콜레스테롤은 담즙산의 전구체이므로 유산균에 의해 담즙산이 배출되면, 부족한 담즙산을 보충하기 위해 콜레스테롤을 이용하게 되어, 결과적으로 장내 콜레스테롤 농도를 감소시킬 수 있다. 그리고 세 번째 기작은 유산균이 포합담즙산(conjugated bile acid)을 탈포합시키는 작용이다. 간에서 생성된 프리담즙산(free bile acid)은 소장에서 타우린 또는 글라이신과 결합하여 포합담즙산이 된다. 포합담즙산은 지질 용해도가 높아, 소장에서 콜레스테롤 등의 지질 흡수를 용이하게 한다. 그러므로, 포합담즙산이 많은 경우 흡수되는 콜레스테롤 양이 많아져 혈중 콜레스테롤 농도가 높아진다. 그러나, 탈포합된 담즙산은 지질 용해도가 낮아 콜레스테롤 등 지질의 혈중 이행을 저하시키는 작용을 한다. 따라서, 포합담즙산을 탈포합시키는 담즙산 분해효소(bile salt hydrolase)를 갖는 균주는 지질 용해도를 낮추어 소장에서 콜레스테롤의 흡수를 감소시킬 수 있다.

[0005] 인체의 소화관에는 많은 세균들이 서식하고 있으며, 이러한 세균의 대부분은 장내세균총을 이루고 있으며 장에 존재하는 다양한 면역세포와의 상호작용을 통해 인체의 면역조절에 영향을 미치고 있다. 그리고 이 세균들은 장 건강에 도움을 주는 유익균과 건강에 해로운 유해균으로 나눌 수 있다. 유익균으로 알려진 균속은 락토바실러스(*Lactobacillus*), 비피도박테리엄(*Bifidobacterium*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 스포로락토바실러스(*Sporolactobacillus*) 등이 알려져 있으며, 상기 유익균들이 대장균(*E. coli*), 헬리코박터(*Helicobacter*), 블라우티아(*Blautia*)와 같은 유해균보다 우세균으로 우점하고 있다. 장내 미생물이 균형을 유지할 때 건강을 유지할 수 있으며, 인체의 면역세포들은 외부에 침입하는 항원(미생물 포함)과 내적으로 생기는 이상 세포를 제어하

여 건강을 유지하도록 해준다. 이 면역세포의 70% 이상이 소화관에 위치하고 있고, 소화관에 이미 서식하고 있는 미생물 또는 외부에서 침입하는 미생물들을 제어한다. 인체의 면역조절 작용에 문제가 생기는 경우 면역력 저하나 면역 과민반응이 초래되고, 그로인해 암, IBD, CD, 알러지 질환, 아토피, 비만, 당뇨병 등과 같은 질환이 유발될 수 있다. 따라서 상기 질환들을 예방하고, 치료하기 위해서 소화관의 면역계를 정상적으로 잘 작동하도록 하는 것이 중요하다. 장내 균총과 숙주인 인간의 건강과 밀접한 관련성이 제시되고 있는 만큼, 장내 미생물의 종류와 특성을 확인하고, 군집으로서 장내 미생물을 이해하는 일은 매우 중요하다.

[0006] 프로바이오틱스로서 효과가 있기 위해서는 경구로 섭취될 때, 내산성 및 내담즙성이 우수해야 하며, 장내 정착 능력이 우수하여야 한다. 유산균은 인체의 소화계에 공생하면서 섬유질 및 복합단백질들을 분해하여 중요한 영양 성분으로 전환시키는 역할을 하게 된다. 유산균은 장내에서 정착하면서 유해균의 성장을 억제하고, 유익균 및 장내의 정상균무리(Normal flora)의 수를 유지시켜주며, 항당뇨, 항고지혈증 효과, 발암억제, 대장염 억제 및 숙주 면역체계의 비특이적 활성화 등의 효과를 나타낸다. 이러한 유산균의 다양한 생리활성이 알려지면서, 인체에 안전하고 생리활성 조절이 우수한 유산균 균주를 개발하여, 기능성 식품, 화장품 첨가제 및 의약품으로 적용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0007] 예를 들어, 대한민국 등록특허공보 제10-0472865호에는 면역증가능, 콜레스테롤 감소능, 항돌연변이능이 우수한 비피도박테리움 인판티스 PL9506 (*B. infantis* PL9506) KCCM-10406이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록 특허공보 제10-1239806호에는 면역증강 및 항산화 활성을 가지는 신규한 락토바실러스 플란타룸 HY7712(*L. plantarum* HY7712)이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 특허공보 제10-1868517호에는 리파제 생산능력이 뛰어나고, 항생제 내성 전이의 위험이 없으며, 식중독균 및 혐기성균 성장 억제능이 뛰어나, 배변활동 및 장 건강 상태를 증진시키는 생균제 또는 유산균 제제등으로 이용할 수 있는 락토바실러스 퍼멘텀 PL9119(*L. fermentum* PL9119)이 기재되어 있다.

[0008] 유산균을 이용한 기술은 가장 오래된 바이오관련 기술로서 국내에서도 그동안 많은 연구가 이루어져 왔고, 이를 이용한 산업으로서, 발효유, 기능성식품, 의약품 정장제, 동물용 의약품 및 화장품 등 다양하게 활용되고 있다. 유산균은 중요한 산업용 균주로 알려져 있으며, 그중에서도 비피도박테리움 속 균주는 인체의 장내에 서식하는 정상 미생물 군집의 주요한 균주로서, 건강한 소화기관과 장내 환경을 유지하는 데 있어서 중요한 것으로 알려져 왔다. 미국의 공중건강 가이드라인(U.S. Public Health Service guidelines)에 따르면, 현재 미국 균주 기탁기관(ATCC)에 기탁된 비피도박테리움 균주 모두 인체나 동물에 질병을 유발할 잠재적 위험에 대해서는 알려진 것이 없다고 인정되는 ‘생물 안전 수준(Bio-safety Level) 1’로 분류되어 있다. 상기 설명한 유산균의 기능으로 인해 인체용 의약품 및 동물용 의약품과 사료첨가제로서 그 이용도 늘고 있어, 우수한 특성을 가지는 유산균의 개발이 요구되고 있다.

[0009] 기존의 상업적 유산균 균주는 외국 유래 혹은 동물 유래 유산균제로서 한국인이 섭취할 경우 장내 생존력이나 그 기능성이 떨어질 위험이 있다. 또한 한국에서 분리된 유산균들의 경우 시험관 내(In vitro)에서만 기능성을 검증하여, 그 효능을 확인하였기 때문에 사람이 섭취할 경우 어떠한 기능적인 특성이나 안전성에 대한 문제를 증명할 수 없다. 또한 이러한 균주들은 유전체 수준에서 안전성을 확인하지 않았기 때문에 사람에게서 분리되었음에도 불구하고 플라스미드 등을 통한 유해인자를 보유 혹은 전달할 가능성이 있기 때문에, 유전체 수준에서의 안전성 검사가 필수적이다. 또한 생물체 내(In vivo)에서 기능성 및 장내 균총의 변화를 확인한 경우도 없기 때문에 장내에 존재하는 균주들에 대한 상호 작용 뿐만 아니라 숙주에게 미치는 영향에 대하여 확인할 필요가 있다. 이러한 조건들은 산업적 균주로 사용되기 위해 모두 충족되어야 하며 한 가지만 충족되어 산업적으로 사용되는 일은 매우 위험한 일이다.

[0010] 따라서, 새로운 프로바이오틱스 균주를 한국인으로부터 분리하고 in vitro 상에서의 기능성 확인 및 in vivo 상에서의 기능성 검증을 통해 기능성이 확인되어야 한다. 기능성이 확인된 균주로부터 유전체 수준에서의 안전성 검증까지 수행하여, 산업용 균주로 사용하기 적합한 균주를 발굴하여야 한다. 이에, 본 발명은 건강한 한국 성인들로부터 비피도박테리움 룡검 아종을 분리하였고, in vitro 및 in vivo 수준에서의 프로바이오틱스로서의 기능성 평가와 유전체 수준에서의 안전성을 확인하였다. 따라서 본 발명은 상기 분리된 비피도박테리움 룡검 아종 균주를 다양한 용도로서 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

[0011] (특허문헌 1) KR10-0930251 B

[0012] (특허문헌 2) KR10-0472865 B

[0013] (특허문헌 3) KR10-1239806 B

[0014] (특허문헌 4) KR10-1868517 B

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 한국인에게 잘 정착할 수 있도록 건강한 한국인 성인으로부터 분리한 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검(*Bifodibacterium longum subsp. longum*) 균주를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 균주 또는, 이의 배양액을 유효성분으로 하는 약학적 조성물, 건강기능식품 및 일반 식품을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검(*Bifidobacterium longum subsp. longum*) 균주를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검, 또는 이들의 배양액을 유효성분으로 함유하는 생균제 조성물을 제공한다.

[0019] 따라서, 본 발명은 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검, 또는 이들의 배양액을 유효성분으로 함유하며 면역 조절과, 혈중콜레스테롤 감소 등을 위한 약학적 조성물, 건강기능식품 또는 일반 식품 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0020] 본 발명의 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검(*Bifidobacterium longum subsp. longum*) BCBL-583 균주 또는 이의 배양액은 산소에 대한 내성과, 열안정성, 장내 정착능과 장내 효소에 대한 내성이 우수하여, 섭취 시 장에 효과적으로 정착이 가능하다. 또한, 본 발명의 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 균주는 혈중 콜레스테롤 감소능력과 면역 조절능력을 보유하고 있어, 식품을 통해 섭취할 경우 건강기능 개선을 기대할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주와 표준균주와의 산소내성을 비교한 것이다.

도 2는 본 발명의 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주와 표준균주의 45℃에서의 내열성을 확인한 것이다.

도 3은 본 발명의 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주와 표준균주의 내산성 및 내 담즙성을 확인한 것이다.

도 4는 본 발명의 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주와 표준균주의 장내정착능을 평가한 것이다.

도 5는 본 발명의 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주와 표준균주의 배지 내 콜레스테롤 감소능을 확인한 것이다.

도 6은 본 발명의 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주와 표준균주에 의한 Raw 264.7세포의 사이토카인 반응성을 확인한 것이다.

도 7은 본 발명의 In vivo 실험에서 5개의 마우스 실험군에 따른, 급여 사료 및 투여한 균주를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명에서의 식이 및 섭취 균주에 따른 면역조절능력의 in vivo 결과이다.

도 9는 본 발명에서의 식이 및 섭취 균주에 따른 콜레스테롤 감소의 in vivo 결과이다.

도 10은 본 발명의 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583과 비피도박테리움 19종의 상동성을 분석한 것이다.

도 12은 본 발명의 섭취 균주에 따른, 주차별 균총 조성의 변화를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 섭취 균주에 따른, 주차별 균총의 변화를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 “배양물”이란 미생물을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 산물을 의미하며, 미생물이 포함되는 개념이다.
- [0024] 본 발명에서 “약제학적으로 허용가능한”이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0031] 본 발명은 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검을 제공한다.
- [0032] 상기 본 발명의 균주는 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583으로서, 한국미생물자원센터에 수탁번호 KCTC 13859BP로 기탁된 균주이다.
- [0033] 더욱 구체적으로, 본 발명의 발명자들은 20대의 건강한 14명의 성인으로부터 분변을 수집하였다. 분변 수집에 앞서 3개월간 항생제를 복용하지 않았고, 3주간 프로바이오틱스 제품을 섭취하지 않은 대상으로부터 분변을 수집하였다. 수집된 분변은 희석배수  $10^6$ 이 되도록 펩톤수(Peptide water)로 연속 희석하여, 비피도박테리움 선택 배지인 비피도박테리움 아이오딘아세테이트 배지(BIM-25)에 평판 도말하여 형성된 콜로니를 확보하였다. 확보된 콜로니는 MRS 액체배지에 접종하여 배양시킨 후 비피도박테리움의 특이적 효소인 과당-6-인산 포스포케톨라제(Fructose-6-phosphate phosphoketolase)에 대한 활성을 측정하여, 활성이 나타나는 균주를 분리하였다.
- [0034] 상기 분리된 균주는, MRS 액체배지에 접종하여 배양시킨 후 전장 DNA를 분리하여 16S rRNA universal primer를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 사용하여 16S rRNA의 염기서열을 증폭시켰다. 증폭된 PCR산물은 카필러리 시퀀싱(Capillary sequencing)을 이용하여 염기서열을 획득하였다. 상기 16S rRNA는 서열번호 1의 염기서열을 포함한다. 획득된 염기서열은 NCBI의 BLASTN 프로그램을 이용하여 분자생물학적 동정을 실시하였다. 동정 결과 상기 분리균주는 비피도박테리움 롱검의 아종 균주였고, 본 발명에서는 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583으로 명명하였으며, 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korea Collection of Type Culture, KCTC)에 수탁번호 KCTC13859BP로 기탁하였다.
- [0036] 또한, 본 발명은 수탁번호 KCTC13859BP로 기탁된 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583, 또는 이들의 배양액을 유효성분으로 함유하는 생균제 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 조성물은 통상적인 생균제 조성물의 제조방법에 따라 제조될 수 있으며, 일반적으로, 배양현탁액이나 건조분말 형태일 수 있다. 또한, 주성분인 상기 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주, 또는 이의 배양액의 유효량에 1종 또는 2종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 통상적인 담체 또는 1종 또는 2종 이상의 첨가제를 선택하여 통상적인 제형의 조성물로 제조할 수 있다.
- [0039] 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 방부제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 항산화제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 담체 및 첨가제는 그 종류에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로는 희석제로 유당(lactose)

monohydrate), 트레할로스(Trehalose), 옥수수 전분(corn starch), 콩기름(soybean oil), 미결정 셀룰로오스(microcrystalline cellulose) 또는 만니톨(D-mannitol), 활택제로는 스테아린산 마 그네슘(magnesiumstearate) 또는 탈크(talc), 결합제로는 폴리비닐피롤리돈(PVP:polyvinylpyrrolidone) 또는 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC: hydroxypropylcellulose) 중에서 선택할 수 있다. 또한, 봉해제로는 카르복시메틸셀룰로오스칼슘(Ca-CMC: carboxymethylcellulose calcium), 전분글리콜산나트륨(sodium starchglycolate), 폴라크릴린칼륨(polacrylin potassium) 또는 크로스포비돈(cross-linkedpolyvinylpyrrolidone), 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨(sorbitol) 또는 아스파탐(aspartame), 안정제로는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨(Na-CMC: carboxymethylcellulosesodium), 베타-싸이클로덱스트린( $\beta$ -cyclodextrin), 백납(white bee's wax) 또는 잔탄검(xanthan gum) 중에서 선택할 수 있으며, 방부제로는 파라옥시안식향산메틸(methyl p-hydroxy benzoate, methylparaben), 파라옥시안식향산프로필(propyl p-hydroxybenzoate, propylparaben), 또는 소르빈산칼륨(potassium sorbate) 중에서 선택할 수 있다.

- [0042] 또한, 본 발명은 수탁번호 KCTC13859BP로 기탁된 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583, 또는 이들의 배양액을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물 또는 일반 식품 조성물을 제공한다.
- [0043] 상기 미생물의 배양액에는 미생물이 생산하는 콜레스테롤 감소 물질이 포함되어 있다.
- [0044] 또한, 상기 본 발명에 따른 조성물은 본 발명의 균주와 함께 섭취하기 적합하고, 섭취 시 유해 미생물의 생육을 억제하며, 장내 균총의 균형을 개선시키는 다른 종류의 공지된 미생물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 분리균주는 내산소성, 내열성, 내담즙성, 내산성, 장내 정착능이 우수하며, 혈중콜레스테롤 감소효과 및 면역세포에서 항염증성 사이토카인 IL-4, IL-10의 분비의 증가 또는 전염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ , 및 IL-6의 분비를 감소시켜 면역조절능력을 가지는 균주이다.
- [0046] 상기 균주 또는 이의 배양액은 장내 균총의 균형을 통한 장 건강 활성을 증진시키는 효과를 가진다.
- [0048] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 대사성 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 포함한다. 본 발명의 수탁번호 KCTC13859BP로 기탁된 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주는, 앞서 언급한 바, 혈중 콜레스테롤 감소 효과를 가지므로, 이러한 효과를 통하여, 본 발명의 균주는 대사성 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있다. 상기 대사성 질환은 이에 제한되는 것은 아니나, 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화증, 고콜레스테롤혈증 또는 비만 중에서 선택되는 1 이상의 질환을 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서는 세포 및 동물실험을 통하여 혈중 콜레스테롤 감소 효과를 확인하였다.
- [0050] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은, 면역 조절기능을 포함한다. 본 발명의 균주가 가지는 “면역 조절기능”이란, 면역 증강 뿐 아니라, 면역 과민반응 감소 활성을 가지는 것으로 해석될 수 있다. 면역 과민반응은 특정 항원에 대해 과도한 면역반응이 일어나 조직 손상 등의 부적절한 피해를 주는 면역반응을 말하는 것으로서 면역 과민반응과 관련한 질환으로는 알레르기, 아토피성 피부염, 천식, 건초열, 전신성 아나필락틱 쇼크, 적아세포증, 류마티스성 관절염, 사구체신염, 루프스, 아르투스반응, 접촉성 피부염, 조직이식 거부반응 등이 포함될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주는 상기 열거된 질환과 관련한 면역 과민반응을 조절할 수 있도록, 전염증성 사이토카인의 분비 감소 및 항염증성 사이토카인의 분비를 증가시키는 기능을 가지는 것을 특징으로 한다. 즉, 본 발명의 일 실시예를 통하여, 염증이 유발된 세포에서 상기 BCBL-583 균주가 공지된 다른 균주에 비하여 항염증성 사이토카인인 IL-4 및 IL-10의 분비를 증가시키고, 이에 비하여 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 분비를 크게 감소시킨 것을 바탕으로, 본 발명의 BCBL-583 균주는 면역 조절 기능을 가질 수 있음을 확인하였다.
- [0053] 본 발명의 상기 건강기능식품은 인체에 유용한 기능을 가진 원료의 복합물이나 특정한 기능을 가진 성분을 사용하여 제조한 식품을 말하는 것으로서, 본 발명에서는 상기 검토한 약학적 조성물과 같이, 혈중 콜레스테롤 감소 또는 면역기능 조절 효과를 가지는 것을 특징으로 한다. 상기 혈중 콜레스테롤 감소 효과를 통하여 본 발명의

건강기능식품은 대사성 질환에 대한 예방 또는 개선용도로써 활용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 건강기능식품은 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 하는 차, 젤리, 즙, 엑기스, 음료 등을 포함할 수 있으며, 상기 검토한 기능을 포함하고 있는 것이라면 가공 형태에 제한이 있는 것은 아니다.

[0056] 또한, 본 발명의 상기 식품은 건강기능식품과 구별되는 일반 식품으로서, 아이스크림류, 우유, 두유, 요구르트, 치즈를 포함하는 유제품, 및 두유제품, 음료, 육류, 소세지, 빵, 초콜릿 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 캡슐 또는 스틱 포장의 유산균 제제로 구성된 군으로부터 선택할 수 있다.

[0058] 본 발명의 신규한 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주, 또는 이의 배양액은 내산성 및 내담즙성이 우수하고, 유전체 수준에서의 안전성이 있으며, 장내 정착능, 콜레스테롤 감소능 및 면역조절 활성이 뛰어나므로 상기 균주 및 이의 배양액은 대사성 질환 또는 면역기능 조절을 위한 약학적 조성물, 건강기능 식품 조성물 또는 일반 식품 조성물 등 다양한 형태로 활용될 수 있다. 또한, 상기 기능을 활용할 수 있는 생균제, 유산균 제제, 발효유제품, 사료 첨가제 및 화장품 등의 첨가제로써 제한 없이 활용될 수 있다.

[0059] 상기 식품에 대한 일례로서, 본 발명의 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주, 이의 배양물 또는 추출물을 포함하는 음료 조성물의 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 슈크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0061] 상기 외의 본 발명의 상기 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 균주, 이의 배양물 또는 추출물을 포함하는 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0063] 아울러 상기 본 발명의 균주, 이의 배양물 또는 추출물을 포함하는 조성물은 성분의 함량에 있어 크게 제한되는 것은 아니며, 본 발명에서 목적하는 기능을 나타낼 수 있는 양으로 포함할 수 있다. 즉, 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

[0065] 이하 본 발명을, 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다.

[0066] 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

## [0068] <실시예 1> 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 in vitro 기능성 평가

### [0070] <1-1> 산소내성 평가

[0071] 상기 분리된 균주는 산소내성 평가를 위해, MRS 고체배지에 희선 도말하였고, 대조균으로 표준 균주 비피도박테리움 롱검 ATCC15707 및 비피도박테리움 롱검 ATCC15708을 산소가 존재하는 조건에서 24시간 배양 하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었으며, 고체배지에서는 세 균주 모두 성장하지 못하였다. 상기 분리된 균주 및 표준 균주를 5 ml의 MRS액체배지에 접종하여 진탕 배양하여 성장에 따른 흡광도를 측정한 결과, 24시간 배양하였을 경우, 본 발명의 분리된 균주가 표준 균주보다 높은 성장률을 보였다.

[0073] <1-2> 내열성 평가

[0074] 본 발명의 분리균주의 상업적 활용에 있어 공정상 열처리가 수행될 경우 균주의 사멸 및 균수의 저하가 일어 날 수 있다. 따라서 본 발명의 선발된 균주에 대한 내열성을 평가하고자 37℃, 42℃, 45℃ 및 60℃에서 열 충격을 3시간 수행했으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 열 충격 후 균수 회복을 위해 37℃에서 12시간 배양하였을 때, 본 발명의 분리균주는 45℃까지 99%의 균수 회복을 보여 주었으나 60℃에서의 균수 회복률은 10% 미만이었다.

[0076] <1-3> 위산 및 내담즙성 평가

[0077] 유산균은 섭취하는 도중 다양한 pH에 노출 되며, 특히 장까지 도달하기 위해서는 위산 및 담즙산에 대한 내성능 이 가장 중요하다. 본 발명에서는 분리균주의 위산 및 담즙산에 대한 내성을 평가하였고 그 결과를 도 3에 나타 내었다. 분리균주 및 표준균주를 각각 37℃에서 3시간동안 위산에서 처리한 후, 세척하여 담즙산염에서 동일 온 도, 시간동안 처리하였다. 위산 및 담즙산염을 처리하지 않은 분리균주와 표준균주를 37℃에서 6시간 동안 배양 하여 상기 내성평가의 대조군으로 사용하였다. 상기 분리 균주는 위산 및 담즙산에 대한 내성이 표준 균주와 비 슣한 수준으로 나타났다.

[0079] <1-4> 장내 정착능 평가

[0080] 장에 도달한 분리균주의 장내 정착능은, 장내 환경의 변화 및 프로바이오틱스로서의 기능에 중요하다. 장내 표 피세포의 표면에 존재하는 뮤신(mucin)은 비피도박테리움이 장내 정착을 할 때 결합하는 장소를 제공하므로, 뮤 신 부착(mucin adhesion test)을 이용하여, 상기 분리 균주의 장내 정착능을 평가 하였다. 96-well plate에 뮤 신을 주입하고 40℃에서 12시간 이상 배양한 후, 배양된 뮤신에 분리균주 및 표준균주를 각각 넣고, 37℃에서 3 시간동안 배양하였다. 배양 후 부착되지 않은 여분의 균주를 세척하여 제거한 뒤 부착된 균주는 트리톤 X-100으 로 회수하여 연속 희석 한 후 MRS고체 배지에 평판도말 하여 생균수를 측정하였다. 장내 정착능의 결과는 도 4 에 나타내었다.

[0082] <1-5> 콜레스테롤 감소능 평가

[0083] 비피도박테리움의 콜레스테롤 감소능을 평가하기 위해 콜레스테롤이 포함된 MRS배지에 분리균주 및 표준균주를 배양하여, 콜레스테롤 감소능을 평가하였다. 콜레스테롤이 포함된 MRS액체 배지에 분리균주 및 표준균주를 접종 하고 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양액은 균체를 원심 분리 및 여과지를 이용하여 제거하고, 배지 내의 잔존 콜레스테롤을 직접 측정하였다. 상기 본 발명의 분리균주의 콜레스테롤 감소능이 표준균주 보다 우수하다는 것 을 확인하였다. 콜레스테롤 감소능 평가에 대한 결과는 도 5에 나타내었다.

[0085] <1-6> 면역조절능력 평가

[0086] 대식세포주인 Raw 264.7세포는 비피도박테리움 균주와 접촉 시 이를 항원으로 인식하여 그에 따른 사이토카인을 분비하게 되며, 면역 증진 또는 안정화와 관련된 사이토카인의 반응성을 확인할 수 있다. 따라서, Raw 264.7세 포를 15번 계대배양하여 활성화를 시켜준 후,  $10^8$  CFU/ml의 분리균주 및 표준균주를 접종하고 5%의 이산화탄소 를 공급하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 면역조절능력을 평가하기 위해서 양성 대조군으로 대장균의 외부다당 류(LPS)를 사용하였다. 배양 후 배양액의 상층액을 분리하여, 면역 물질인 3종의 사이토카인을 효소면역침강법 키트(ELISA kit)를 활용하여 측정 하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다. TNF- $\alpha$ 는 수지상세포를 성숙시켜 T세 포의 활성화와 성장 등을 조절하는 염증성 사이토카인으로 양성 대조군인 대장균의 LPS와 유의한 수준으로 반응이 높게 나타나는 것을 확인 하였다. IL-6은 B세포의 분화 촉진, 항체 분비 자극, 면역글로블린(Ig) 생성 유도 및 T세포의 분화 증식에 관여하는 사이토카인으로 분리균주에 대한 반응이 존재함을 확인 할 수 있었다. IL-10의 경우 전형적인 항 염증성 사이토카인으로 알려져 있으며, 항원 제시를 낮추고, 대식세포 활성화를 억제하여 친 염증성 분자 및 케모카인 생성 억제를 통해 면역 활동을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 분리균주에 대한 반응

이 존재하는 것으로 나타났다.

[0088] <실시예 2> 비피도박테리움 롱검 아종 롱검 BCBL-583 in vivo 기능성 평가

[0090] <2-1> 동물실험 계획

[0091] 생후 5주된 마우스(C57BL/6, male) 25마리를 5개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 5주된 마우스를 1주일간 지방함량 10%인 일반사료를 투여하여 적응기간을 가진 후, 2주차부터 1번 그룹은 일반사료를 급여하고 나머지 그룹은 지방함량 60%의 고지방 사료를 8주간 급여하며, 모든 케이지 별로 매일 MRS배지 및 균주를 투여하였다. 상기 실험에 사용한 균주는 본 발명의 분리균주 및 표준균주를 투여 하였다. 매일 마우스 체중 1Kg당  $10^8$  CFU/ml 씩 균주를 투여하였다. 각 개체별 몸무게를 매주 2번씩 측정하여 몸무게 대비 균주투여량을 계산하였고, 분변은 1주차 및 5주차에 수집하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 18시간 공복을 유지한 후에 혈액을 채취하였다. 9주차에 모든 개체를 희생하여 비장을 적출하고 대장으로부터 분변을 수집하였다. 또한, 희생 후 심장으로부터 전혈을 확보하고, 수집된 분변으로부터 총 DNA를 분리하여 메타지노메(metagenome)분석을 수행하였다. 적출된 비장으로부터 세포를 분화시켜 이로부터 분리된 사이토카인을 측정하였다.

[0093] <2-2> 9주차 희생 후 실험

[0094] 적출된 마우스의 비장을 3 ml의 HBSS buffer에 침지시킨 후 조직을 메스를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 비장 조직은 70 mash cell strainer에 통과시켜 세포들을 분리 하였고, 분리된 세포들은 10 ml의 염화암모늄용액과 섞어 분쇄된 얼음에 10분간 반응시켜 혈액을 제거하였다. 300rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 원심분리하여 침전된 펠렛을 1 ml의 글루타민이 첨가된 10% FBS배지에 재부유 시켰다. 분리된 비장세포는 토마 혈구계를 활용하여 계수한 후 배수에 맞춰 배지로 희석한 후 각각 well에 분주하여,  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5%의 이산화탄소를 유지한 채 72시간 배양하였다. 배양된 세포가 생산하는 사이토카인을 측정하기 위하여 상층액을 모두 회수하였고, 상층액을 마우스 ELISA kit을 활용하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4 및 IL-10을 측정하였다. 사이토카인을 측정한 결과 도 8에서 나타난 바와 같이, TNF- $\alpha$  및 IL-6는 음성 대조군인 일반사료를 섭취한 그룹과 유사한 수준으로 수치가 떨어졌으며, IL-4의 경우 음성 대조군에 비하여 높은 양이 검출되었다. IL-10의 경우 음성 대조군에 비하여 높은 양이 검출 되었으나 통계학적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서, 고지방 식이로 인해 증가된 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6에 대하여 본 발명의 분리균주는 그 수치를 낮춰주는 역할을 하며, 이에 따라 항염증성 사이토카인인 IL-4와 IL-10을 증가시키는 역할을 하는 것을 확인 하였다.

[0095] 또한, 희생 후 확보된 혈액으로부터 혈중 콜레스테롤 농도를 키트를 사용하여 측정하였다. In vivo실험에서의 콜레스테롤 감소의 결과는 도 9에 나타내었다. 일반사료를 먹인 군은 고지방사료를 먹인 군에 비하여 콜레스테롤 수치가 낮은 것을 확인하였다. 특히 본 발명의 분리균주를 투여한 군은 다른 균주를 투여한 그룹보다 유의적으로 낮은 콜레스테롤 수치가 검출되었다. 고밀도(HDL) 콜레스테롤을 측정한 결과 고지방 사료만 투여한 군보다, 균주와 같이 투여한 군에서 높은 HDL 콜레스테롤이 확인되었다. HDL 콜레스테롤 측정에 따른 저밀도(LDL)콜레스테롤 계산값은 본 발명의 분리균주를 투여한 군에서 유의적으로 낮은 것을 확인하였다.

[0097] <실시예 3> 안전성 평가

[0099] <3-1> 유전체 수준의 안전성 검증

[0100] 본 발명의 분리균주의 전장유전체 분석 결과 2,393,285 bp의 크로모솜 DNA(chromosomal DNA)를 가지며 플라스미드는 갖지 않는 것으로 확인되었다. 1,999개의 단백질 암호화 유전자를 발견하였으며 68개의 RNA가 확인되었다. 분리균주의 유전체 수준에서 유해인자를 확인한 결과, 인체에 유해한 유전자를 보유하고 있지 않았다. 상기 분리균주의 유전자 지도를 도 10에 나타내었다.

[0101] 전장유전체 분석이 완료된 비피도박테리움 롱검의 유전체를 확보하여 이들의 전장유전체상의 상동성을 확인하였다. 19종의 비피도박테리움의 전장 유전체와 분리 균주의 전장유전체의 상동성의 비교한 결과 다른 균주들과 1%

(ANI value) 차이가 나는 것으로 확인 되었다. 19종의 비피도박테리움과 분리균주의 상동성 비교는 도 11에 나타내었다.

[0103] <3-2> 장내 환경 변화 효과 검증

[0104] 마우스의 주차에 따른 분변 샘플의 균총 조성을 확인하여 그 결과를 도 12 및 도 13에 나타내었다. 0주차의 샘플들에서는 50% 내외가 아커만시아(*Akkermansia*) 균주로 확인 되었으며, 그 비율은 5주와 9주로 넘어 갈수록 점차 줄어드는 것으로 확인되었다. 블라우티아(*Blautia*)의 경우 9주차가 될수록 증가하는 것을 볼 수 있었으나, 이 결과가 균주에 의한 영향인지 확인 할 수 없었다.식이섬유 분해에 도움을 주는 균주들로 알려진 락토노스피라세아(*Lachnospiraceae*)는 9주차에서 현저히 줄어드는 것을 확인 할 수 있었다. 루미노클로스트리디움(*Ruminoclostridium*)의 경우 마우스 장내에서 많이 발견되는 박테리아로써 본 발명에서의 경우 주차가 지날수록 발견되는 양이 증가하였다. 실제 본 발명에서 투여하였던 비피도박테리움의 경우 5주차에서 상대적으로 많은 양이 발견되었다. 9주차에서는 본 발명의 분리 균주의 비율이 낮아지고, 표준균주인 ATCC15708의 비율이 높게 나타났다. 헬리코박터(*Helicobacter*) 비율은 MRS만을 투여한 군에서 가장 높게 나타났으며 비피도박테리움을 섭취한 군에서는 그 비율이 낮아진 것을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0106]

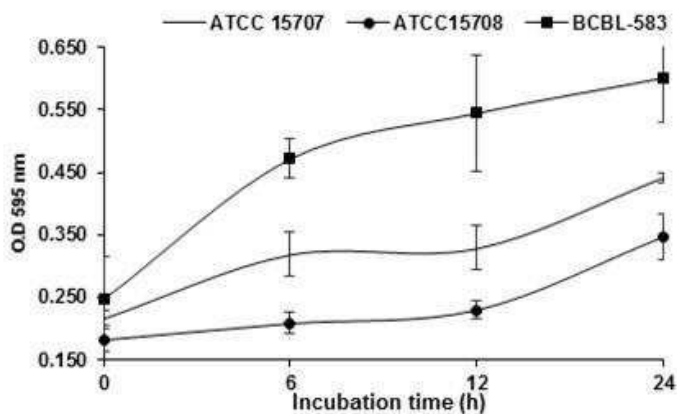
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13859BP

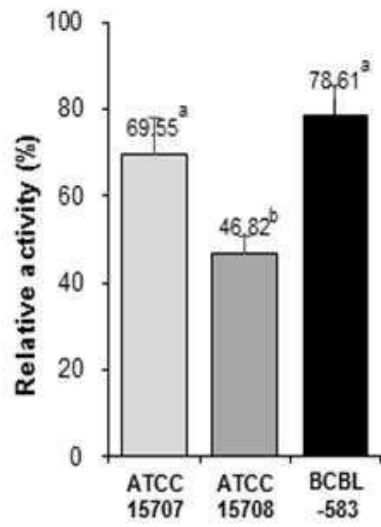
수탁일자 : 20190617

도면

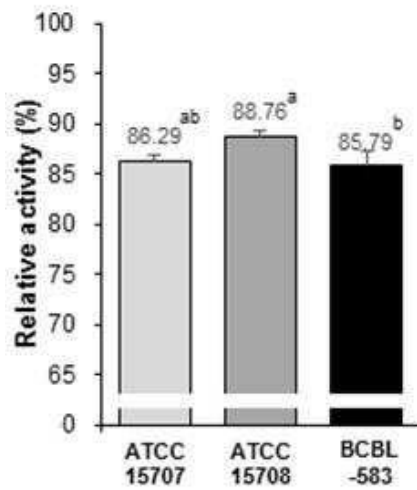
도면1



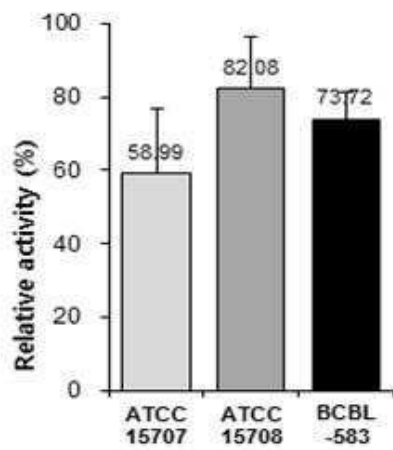
도면2



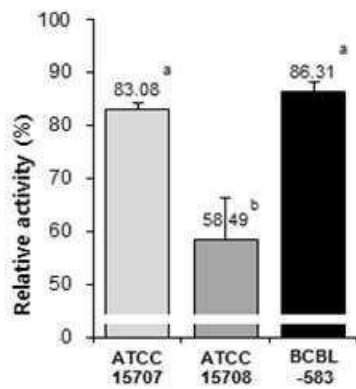
도면3



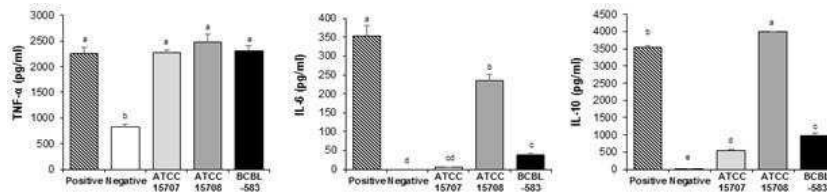
도면4



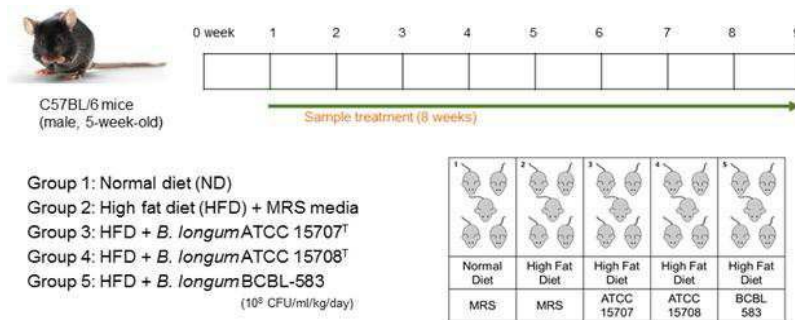
도면5



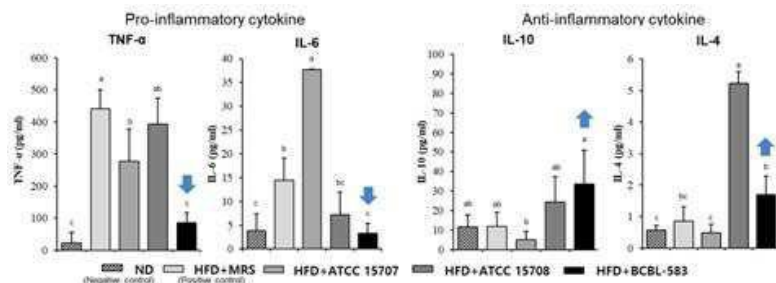
도면6



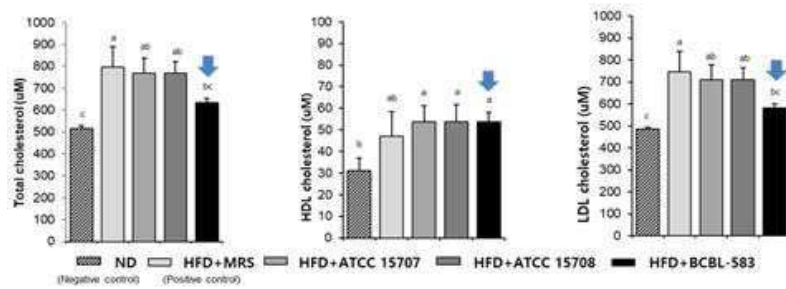
도면7



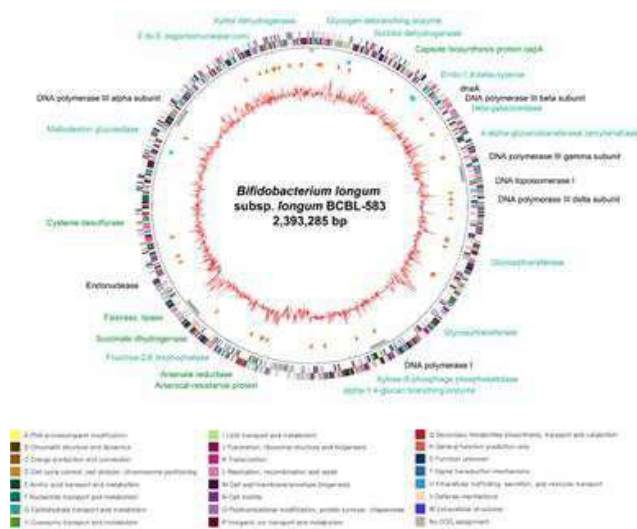
도면8



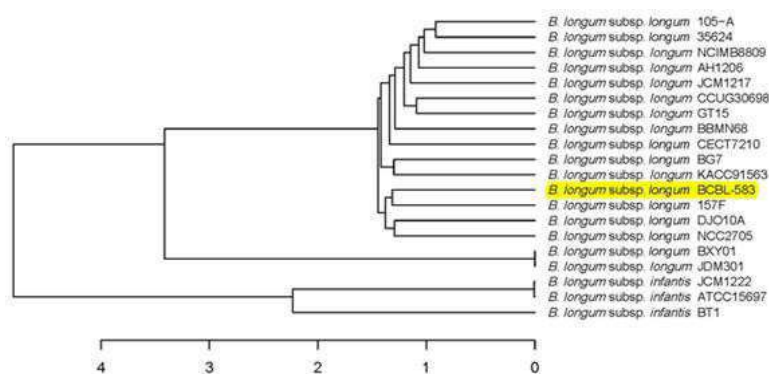
도면9



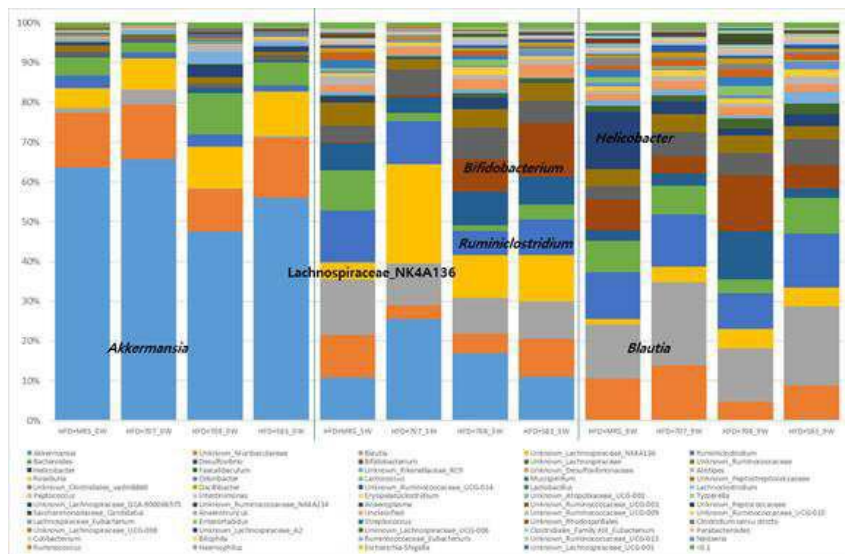
도면 10



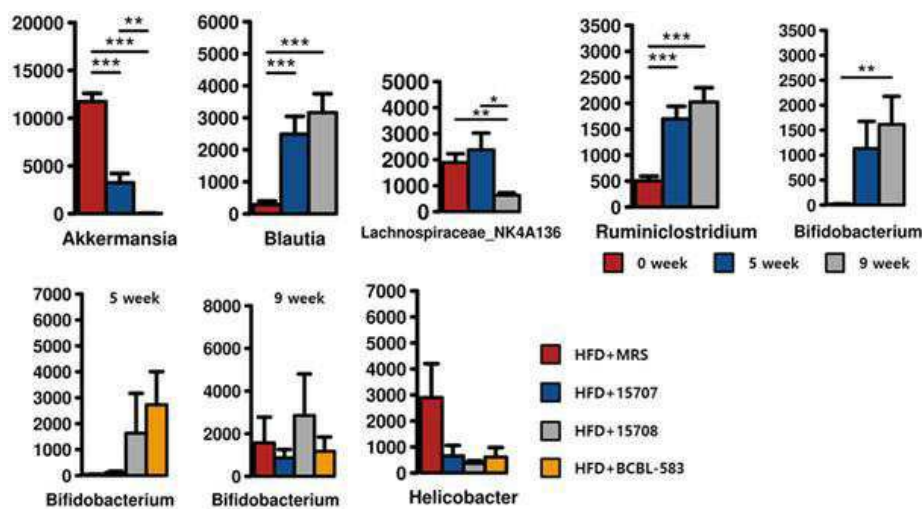
도면11



도면12



도면13



## 서열목록

<110> Bingrae Co., Ltd.

University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Bifidobacterium longum subsp. longum having both abilities of reducing total cholesterol in serum and immune regulation and its application

<130> PN1905-279

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1515

<212> DNA

<213> Bifidobacterium longum

<400> 1

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ttcgattctg gctcaggatg aacgctggcg gcgtgcttaa cacatgcaag tcgaacggga  | 60   |
| tccatcaggc ttigcttggg ggtgagagtg gcgaacgggt gagtaatgcg tgaccgacct  | 120  |
|                                                                    |      |
| gccccataca ccggaatagc tcctggaaac gggtaggtaat gccggatgct ccagttgatc | 180  |
| gcatggtctt ctgggaaagc ttctcgcgta tgggatgggg tcgcgtccta tcagcttgac  | 240  |
| ggcggggtaa cggccccacc tggcttcgac gggtagccgg cctgagaggg cgaccggcca  | 300  |
| cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattgcaca  | 360  |
| atgggcgcaa gcctgatgca gcgacccgc gtgagggatg gaggccttcg ggttgtaaac   | 420  |
| ctcttttata ggggagcaag cgtgagtgag ttaccggtt gaataagcac cggctaacta   | 480  |
| cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgta tccggaatta ttgggcgtaa   | 540  |
|                                                                    |      |
| agggctcgta ggcggttcgt cgcgtccggt gtgaaagtcc atcgcttaac ggtggatccg  | 600  |
| cgccgggtac gggcggttcgt gactgcggta ggggagactg gaattcccgg tgtaacggtg | 660  |
| gaatgtgtag atatcgggaa gaacaccaat ggcaaggca ggtctctggg cgtttactga   | 720  |
| cgctgaggag cgaagcgtg gggagcgaac aggattagat accctggtag tccacgccgt   | 780  |
| aaacggtgga tgctggatgt ggggcccgtt ccacgggttc cgtgtcggag ctaacgcgtt  | 840  |
| aagcatcccg cctggggagt acggccgcaa ggctaaaact caaagaaatt gacggggggcc | 900  |
| cgcacaagcg gcggagcatg cggattaatt cgatgcaacg cgaagaacct tacctgggct  | 960  |
|                                                                    |      |
| tgacatgttc ccgacggtcg tagagatacg gcttcccttc ggggcggggt cacaggtggt  | 1020 |
| gcatggtcgt cgtcagctcg tgctcgtgaga tgttgggtta agtcccgaac cgagcgcaac | 1080 |
| cctcgccccg tgttgccagc ggattatgcc gggaactcac gggggaccgc cggggttaac  | 1140 |
| tcggaggaag gtggggatga cgtcagatca tcatgccctt tacgtccagg gcttcacgca  | 1200 |
| tgctacaatg gccggtacaa cgggatgcga cgcggcgacg cggagcggat ccctgaaaac  | 1260 |
| cggctctcagt tcggatcgca gtctgcaact cgactgcgtg aaggcggagt cgctagtaat | 1320 |
| cgcgaatcag caacgtcgcg gtgaatgcgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtaag   | 1380 |
|                                                                    |      |
| tcatgaaagt gggcagcacc cgaagccggt ggcctaacc cttgtgggat ggagccgtct   | 1440 |
| aaggtgaggc tcgtgattgg gactaagtcg taacaaggta gccgtaccgg aaggtgcggc  | 1500 |
| tggatcacct ccttt                                                   | 1515 |