



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월18일
 (11) 등록번호 10-1879971
 (24) 등록일자 2018년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/00* (2017.01)
A61K 8/99 (2017.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
C07K 14/32 (2006.01) *C07K 7/64* (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01) *C12R 1/125* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/00 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2017-0002585
 (22) 출원일자 2017년01월06일
 심사청구일자 2017년01월06일
 (65) 공개번호 10-2018-0081402
 (43) 공개일자 2018년07월16일
 (56) 선행기술조사문헌
 2016 한국미생물학회연합 국제학술대회, B-5,
 pp.211(2016.11.03.-04.)*
 WO2012105894 A1
 WO2009044279 A1
 CN102550607 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 강원대학교산학협력단
 강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
 (72) 발명자
 송홍규
 강원도 춘천시 동면 만천로 69 KCC스위첸아파트
 101동 602호
 이다솔
 경기도 양평군 단월면 보뜰길 18
 (74) 대리인
 특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 8 항

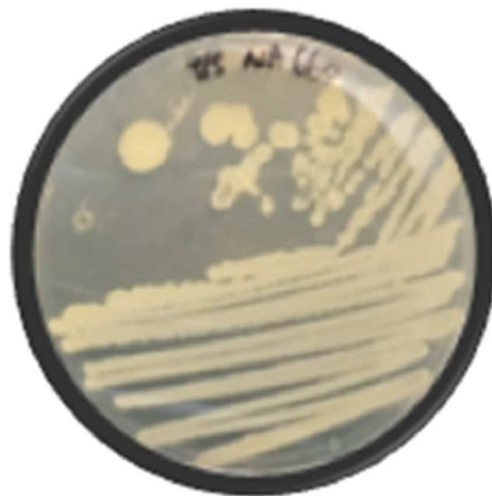
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **항균 활성을 가지는 바실러스 서브틸리스 DS660 균주 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 바실러스 서브틸리스 DS660(기탁번호 KCTC18521P) 균주 또는 상기 균주의 배양물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물에 관한 것으로, 상기 균주는 계면활성제, 시데로포어, 베타-1,3-글루카나제 및 세균 세포벽 용해효소를 생산하여 항균 활성이 우수하고, 온도 및 pH 변화에 안정적이기 때문에 항균 용도로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A61K 8/99 (2013.01)
- A61Q 19/00 (2013.01)
- C07K 14/32 (2013.01)
- C07K 7/64 (2013.01)
- C12N 9/2405 (2013.01)
- C12Y 302/01039 (2013.01)
- C12R 1/125 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	LC5-009
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	산학협력 선도대학 육성사업 강원대학교 LINC 사업단
연구과제명	미생물 유래 항균물질을 이용한 천연 화장품 방부소재 개발
기 여 율	1/1
주관기관	강원대학교 산학협력단
연구기간	2016.03.30 ~ 2016.06.09
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

항균 활성을 가지는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) DS660(기탁번호 KCTC18521P) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 및 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)로 이루어진 군에서 선택되는 미생물에 대하여 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 계면활성제를 생산하는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 시데로포어(siderophore)를 생산하는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 베타-1,3-글루카나제(β -1.3-glucanase)를 생산하는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 세균 세포벽 용해효소를 생산하는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 7

바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) DS660(기탁번호 KCTC18521P) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주 또는 배양액의 농축물 및 이들의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 항균용 조성물.

청구항 8

바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) DS660(기탁번호 KCTC18521P) 균주의 배양물, 배양액의 농축물 및 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 화장료 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 항균 활성을 가지는 바실러스 서브틸리스 DS660(기탁번호 KCTC18521P) 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)는 흔히 '고초균'으로 불리는 비병원성의 호기성 간균으로, 바실러스 속(*Bacillus* sp.)에 속하는 그람 양성(gram positive)균이다. 바실러스 서브틸리스는 마른 풀, 토양 등에 존재하며 주모성 편모를 가지고 있어 활발히 운동을 한다.

[0004] 바실러스 종은 산업적으로 중요한 아밀레이스(amyase), 프로테이스(protease) 등과 같은 효소를 생산하며, 생물 계면활성제(surfactant), 박테리옌(bacteriocin) 등의 항균물질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 항균물질 중에서 생물 계면활성제는 무독성이고, 생분해가 용이하여 환경친화적이기 때문에 환경오염을 감소시킬 수 있다. 또한, 생물 계면활성제는 화장품, 의약품, 식품, 세제, 펄프 및 제지, 원유의 2차 회수, 환경정화 등의 각 분야에서 광범위하게 응용될 수 있다.

[0005] 미생물을 이용한 항균 용도와 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-1594446호는 유해 미생물에 대하여 항균 활성을 가지는 바실러스 서브틸리스 RX7 균주를 개시하고 있다(특허문헌 1). 또한, 등록특허 제10-1190901호는 식품 위해 미생물에 대한 항균력이 우수한 바실러스 서브틸리스 CSY191 균주를 개시하고 있으나 주로 대장균, 살모넬라 등의 식중독균에 항균 활성을 보이는 바실러스 서브틸리스 균주를 개시하고 있다(특허문헌 2).

[0006] 본 발명자는 토양에서 신규한 바실러스 서브틸리스 균주를 분리하였으며, 상기 균주가 피부 상재균에 대하여 항균 활성이 있음을 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-1594446호
- (특허문헌 0002) 2. 대한민국 등록특허 제10-1190901호

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) 1. Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from *Bacillus licheniformis* VPS50.2 isolated from soil sample. *Journal of Applied Microbiology* 2013, 116: 502-510.
- (비특허문헌 0002) 2. Bacteriocin (BAC-IB17): Screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17. *Pakistan Journal Pharmaceutical Science* 2012, 25: 195-201.
- (비특허문헌 0003) 3. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology* 2002, 92: 63-70.
- (비특허문헌 0004) 4. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 2004, 56: 339-347.
- (비특허문헌 0005) 5. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, *Microbiological Research*, 2004, 159: 73-81.
- (비특허문헌 0006) 6. Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. *Food Control* 2012, 23: 338-344.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 일 양상은 항균 활성을 가지는 바실러스 서브틸리스 DS660(기탁번호 KCTC18521P) 균주를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 양상은 상기 균주 또는 균주의 배양물을 포함하는 항균용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 균주의 배양물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양상은 항균 활성을 가지는 바실러스 서브틸리스 DS660(기탁번호 KCTC18521P) 균주를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에 따르면 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 토양에서 분리한 미생물로서 16S rDNA 서열분석 및 API 테스트를 통하여 바실러스 서브틸리스에 속하는 신규한 균주인 것을 확인하였다. 따라서, 상기 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 KCTC18521P의 기탁번호를 부여받았다.
- [0016] 일 구체예에 따르면 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 바실러스 속(genus *Bacillus*), 스태필로코커스 속(genus *Staphylococcus*), 아스퍼질러스 속(genus *Aspergillus*), 슈도모나스 속(genus *Pseudomonas*), 에스케리치아 속(genus *Escherichia*) 및 캔디다 속(genus *Candida*)으로 이루어진 군에서 선택되는 미생물에 대하여 항균 활성을 나타낼 수 있다. 보다 구체적으로는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 및 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)로 이루어진 군에서 선택되는 미생물에 대하여 항균 활성을 가지는 것이 바람직하다.
- [0017] 일 구체예에 따르면 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 계면활성제(surfactant)를 생산하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 당지질(glycolipid) 구조의 계면활성제를 생산하는 균주일 수 있다.
- [0018] 본 명세서의 용어, "계면활성제"는 분자 중에 친수성기 및 친유성기를 모두 포함하는 양친매성 물질을 말하며, 세정력, 분산력, 유화력, 가용화력, 습윤력, 살균력, 기포력 및 침투력이 우수한 물질이다.
- [0019] 일 구체예에 따르면 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 토양 내 미량 존재하는 필수 생리물질인 철 성분을 선택적으로 흡수하여 병원성 미생물의 성장을 억제할 수 있는 시데로포어(siderophore)를 생산하는 것일 수 있다.
- [0020] 일 구체예에 따르면 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 미생물의 세포벽을 분해할 수 있는 베타-1,3-글루카나제(β -1.3-glucanase)를 생산하는 것일 수 있다.
- [0021] 일 구체예에 따르면 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 세균 세포벽 용해효소를 생산하는 것일 수 있다.
- [0022] 일 구체예에 따르면 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DS660 균주는 -22 내지 70℃의 온도 범위에서도 항균 활성을 유지하는 것일 수 있으며, 3 내지 12의 넓은 pH 범위에서 항균 활성을 유지하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 양상은 바실러스 서브틸리스 DS660(기탁번호 KCTC18521P) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주 또는 배양액의 농축물 및 이들의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 항균용 조성물은 항미생물제를 총칭하는 의미인 항생제와 같은 의미일 수 있고, 항균제, 살균제, 방부, 보존제 또는 제균제와 같은 의미일 수 있으며, 바람직하게는 상기에 언급한 미생물의 발육과 생활 기능을 저지 또는 억제할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0026] 본 명세서의 용어, "배양물"은 배지에서 일정 기간 동안 배양하여 수득한 균주, 그의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 배지, 또는 균주를 배양한 후 균주를 제거한 배양액을 포함하는 개념으로 해석된다.
- [0027] 일 구체예에 따르면 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DS660 균주의 배양물은 미생물 배양에 사용되는 배지 중에서 당업자가 목적에 따라 용이하게 선택한 배지를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 바실러스균 배양에 사용되는 배지, 보다 바람직하게는 하기 실시예 1에 기재된 NA 또는 LB 배지를 선택하여 사용할 수 있다.
- [0028] 일 구체예에 따르면 상기 NA 또는 LB 배지는 탄소원으로서 소르비톨(sorbitol), 글리세롤(glycerol), 포도당

(glucose) 또는 수크로오스(sucrose)를 포함할 수 있다. 또한, 질소원으로는 황산 암모늄(ammonium sulfate), 트립톤(tryptone), 펩톤(peptone), 효모 추출물(yeast extract), 인산 암모늄(ammonium phosphate), 맥아 추출물(malt extract) 또는 요소(urea)를 포함할 수 있다.

- [0029] 일 구체예에 따르면 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DS660 균주의 배양물은 상기 미생물 배양 배지에 본 발명의 균주를 접종하고, 당업계에 공지된 미생물 배양 방법(예를 들어, 정치배양, 교반배양)에 따라 제조할 수 있다. 상기 바실러스 서브틸리스 DS660 균주 또는 배양액의 농축물 및 이들의 건조물은 당업계에 공지된 미생물 또는 배양액의 농축 또는 건조 방법에 따라 용이하게 제조될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 항균용 조성물에서 바실러스 서브틸리스 DS660 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 균주 또는 배양액의 농축물 및 이들의 건조물 이외의 성분은 미생물 활성 및 항균 작용을 촉진하는 성분으로써 당업계에 공지된 다양한 성분이 포함될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 양상은 바실러스 서브틸리스 DS660(기탁번호 KCTC18521P) 균주의 배양물, 배양액의 농축물 및 건조물로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 화장료 조성물은 유효성분으로서 바실러스 서브틸리스 DS660 균주의 배양물, 배양액의 농축물 또는 건조물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0034] 한편, 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 반드시 한정되는 것은 아니다. 더욱 상세하게는, 유연 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 크림, 에센스, 스킨토너, 수중유형(oil-in-water) 에멀전, 유중수형(water-in-oil) 에멀전, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 바디오일, 바디로션, 수중유형 메이크업베이스, 유중수형 메이크업베이스 및 파운데이션의 제형으로 제조될 수 있다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명의 바실러스 서브틸리스 DS660(기탁번호 KCTC18521P) 균주는 계면활성제, 시데로포어, 베타-1,3-글루카나제 및 세균 세포벽 용해효소를 생산하여 항균 활성이 우수하고, 온도 및 pH 변화에 안정적이기 때문에 항균 용도로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) DS660 균주의 배양 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 6종의 피부 상재균에 대한 *B. subtilis* DS660 균주의 항균 활성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 배양 시간에 따른 *B. subtilis* DS660 균주의 항균 활성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 오일 스프레딩 테스트를 이용하여 *B. subtilis* DS660 균주의 계면활성제 생산 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 *B. subtilis* DS660 균주가 생산하는 계면활성제의 성분을 박층 크로마토그래피로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 *B. subtilis* DS660 균주의 배양 시간에 따른 표면장력의 변화를 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 *B. subtilis* DS660 균주의 배양 상층액 첨가 농도에 따른 표면장력의 변화를 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 8은 *B. subtilis* DS660 균주의 시데로포어 생산 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 9는 *B. subtilis* DS660 균주가 생산하는 시데로포어 농도를 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 10은 *B. subtilis* DS660 균주의 베타-1,3-글루카나제 생산 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 11은 *B. subtilis* DS660 균주가 생산하는 베타-1,3-글루카나제 농도를 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 12는 *B. subtilis* DS660 균주의 세균 세포벽 용해효소 생산 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 탄소원 또는 질소원 변화에 따른 *B. subtilis* DS660 균주의 항균 활성 변화를 측정된 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] **실시예 1: 항균 활성 균주의 분리 및 동정**

[0043] **1-1: 균주의 분리 및 항균 활성 확인**

[0044] 항균 활성을 나타내는 미생물을 분리하기 위하여 강원도 영월 근처의 식물 근권 토양에서 토양 시료를 채취하였다. 채취한 토양 시료 10 g을 50 ml conical tube에 담은 후 총 부피가 30 ml가 되도록 염화나트륨(NaCl 8.5%) 용액을 첨가하여 30분 동안 진탕(shaking)하였다. 이후 염화나트륨(NaCl 8.5%) 용액을 이용하여 시료를 연속 희석($1/10^3$, $1/10^4$)하고, Nutrient agar(peptone 5, beef extract 1.5, yeast extract 1.5, NaCl 5 및 agar 15 g/L; 이하 NA 배지로 표기함) 플레이트 또는 Luria Bertani agar(trypitone 10, yeast extract 5 및 NaCl 10 g/L; 이하 LB 배지로 표기함) 플레이트에 연속 희석한 토양 시료 100 μ l를 도말하였다. 시료를 도말한 플레이트를 30℃에서 7일 동안 배양하여 성장한 세균 콜로니(colony)를 분리하였고, 분리한 콜로니는 새로운 배지에 계대배양(subculture)하였다.

[0045] 상기 분리한 콜로니의 항균 활성을 확인하기 위하여 피부 상재균 6종-칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 아스페질러스 나이거(*Aspergillus niger*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)-을 각각 도말한 배지에 분리한 콜로니의 균주를 획선(streaking)으로 그어 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 콜로니 주변에 생긴 투명대(clear zone)의 크기를 토대로 우수한 항균 활성을 나타내는 균주를 1차로 선별하였다. 선별한 균주 중에서 DS660의 배양 결과를 도 1에 도시하였다.

[0047] **1-2: 균주의 동정(identification)**

[0048] 상기 실시예 1-1에서 분리한 DS660 균주의 16S rDNA 서열(서열번호 1)을 마크로젠에 분석 의뢰한 결과 바실러스 서브틸리스와 99%의 상동성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 제조사(Biomerieux, 프랑스)의 지시에 따라 API test(API 50CH, 20E)를 실시하여 DS660 균주의 생리생화학적 특성을 확인하였으며 그 결과를 하기 표 1에 기재하였다. 상기 서열분석 및 API test 결과를 종합하여 분리한 DS660 균주를 최종적으로 바실러스 서브틸리스 DS660(이하, DS660으로 표기함)으로 동정하였다. 동정한 바실러스 서브틸리스 DS660 균주를 2016년 12월 2일 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 미생물 기탁번호 KCTC18521P를 부여받았다.

표 1

특 성	결 과	특 성	결 과
Gram stain	+	Melibiose	+
Morphologie	rod	Sucrose	+
Optimum temperature(°C)	30	Trehalose	+
Control	-	Inuline	-
Glycerol	+	Melezitose	-
Ertythritol	-	D-raffinose	+
D-Arabinose	-	Starch	+
L-Arabinose	+	Glycogen	+
Ribose	+	Xylitol	-
D-xylose	+	β-gentiobiose	+
L-xylose	-	D-Turanose	-
Adonitol	-	D-Lyxose	-
β-methyl-xylopyranside	-	D-Tagatose	-
Galactose	-	D-Fucose	-
D-Glucose	+	L-Fucose	-
D-Fructose	+	D-Arabitol	-
D-Mannose	+	L-Arabitol	-
L-Sorbose	-	Gluconate	-
Rhamnose	-	2-keto-gluconate	-
Dulcitol	-	5-keto-cluconate	-
Inositol	+	2-nitrophenyl-β-D-galactopyranside	+
Mannitol	+	L-arginine	-
Sorbitol	+	L-lysine	-
α-methyl-D-mannopyranside	-	L-omithine	+
α-methyl-D-glucoside	+	Trisodium citrate	+
N-acethyl-glucosamine	-	Sodium thoisulfate	-
Amygdaline	+	Urea	-
Arbutine	+	L-tryptophane (TDA)	-
Esculine	+	L-tryptophane (IND)	-
Salicine	+	Sodium pyruvate	-
Cellobiose	+	Gelatin (bovine origin)	+
Maltose	+	D-glucose	-
Lactose	+		

[0049]

[0051] 실시예 2: 분리한 DS660 균주의 항균 활성 확인

[0052] 2-1: 피부 상재균에 대한 성장 억제 효과 확인

[0053] LB 액체배지에서 선배양(30°C, 160 rpm)한 DS660 균주를 새로운 액체배지에 2×10^8 CFU/ml 농도로 개체수를 보정하여 접종하고, 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 4°C, 12000 g에서 20분 동안 원심분리하고, 배양 상층액을 수거하였다. DS660 균주와 별도로 피부 상재균 5종을 2×10^8 CFU/ml 농도로 개체수를 보정하여 NA 배지에 도말하였으며, *A. niger*는 변형시킨 PDA(potato dextrose agar; potato starch 2 g, dextrose 10 g, beef extract 1.5 g, peptone 2.5 g) 배지에 도말하였다. 이후 배지에 10 mm 직경의 웰(well)을 뚫고, 각 웰에 DS660 균주 배양 상층액 100 μl를 첨가한 후 24 내지 48시간 동안 배양하였으며 배양이 끝난 후 생성된 투명대의 직경을 측정하였다.

[0054] 그 결과, 하기 표 2 및 도 2에 나타난 것과 같이 DS660 균주가 6종의 피부 상재균의 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 *S. aureus*, *A. niger* 및 *P. aeruginosa*에 대한 항균 활성이 우수한 것을 알 수 있었다.

표 2

피부 상재균	DS660	
	IZD ^a (mm)	Activity ^b
<i>Candida albicans</i>	17±2.6	++
<i>Bacillus subtilis</i>	15.3±2.5	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	26.8±2.5	++++
<i>Aspergillus niger</i>	23.3±1.5	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25.3±1.1	+++
<i>Escherichia coli</i>	17.6±0.5	++

^a IZD: inhibition zone diameter

^b No inhibition zone: -, 11~15 mm: +, 16~20 mm: ++, 21~25 mm:+++ , 26 mm ~:++++

[0055]

[0057]

상기 실험 결과는 본 발명의 DS660 균주가 비특허문헌 1에 개시된 *Bacillus licheniformis* VPS50.2와 비교하여 넓은 범위의 그람 양성 및 그람 음성 세균과 곰팡이, 효모의 성장을 억제할 수 있음을 의미한다. 또한, 비특허 문헌 2에 개시된 *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17 균주와 비교하면, KIBGE IB-17 균주는 *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* 및 *E. coli*에 대한 성장 억제 직경이 0, 0 및 18 mm이기 때문에 본 발명의 DS660 균주가 항균 활성이 현저히 우수한 것을 알 수 있다.

[0059]

2-2: DS660 균주의 배양시간에 따른 항균 활성 확인

[0060]

LB 액체배지에서 선배양(30℃, 160 rpm)한 DS660 균주를 새로운 액체배지에 2x10⁸ CFU/ml 농도로 개체수를 보정하여 접종하고, 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 4℃, 12000 g에서 20분 동안 원심분리하고, 배양 상층액을 수거하였다. 수거한 배양 상층액은 PBS를 이용하여 2배씩 연속 희석하여 실험에 이용하였다. DS660 균주와 별도로 지시 균주(indicator strain)로 이용할 *S. aureus*를 2x10⁸ CFU/ml 농도로 개체수를 보정하여 NA 배지에 도말한 뒤 배지에 6 mm 직경의 웰을 뚫었다. 상기 웰에 2배씩 연속 희석한 DS660 균주 배양 상층액 20 μl를 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 투명대가 나타난 희석배수를 통해 항균 활성을 평가하였으며 활성 단위 AU/ml는 희석배수x50으로 표현하였다.

[0061]

그 결과, 도 3에 나타난 것과 같이 배양 시간 의존적으로 DS660 균주의 항균 활성은 증가하였으며 배양 1일차에 최대활성인 5333±923 AU/ml을 나타내었다. 도 3의 그래프에서 ▲는 OD₆₀₀에서 측정된 흡광도를 의미하며, □는 항균 활성 측정 결과를 의미한다.

[0062]

본 발명의 DS660 균주와 비특허문헌 3에 개시된 *Brevibacterium linens* 균주의 항균 활성을 비교하면, 상기 *B. linens* 균주는 최대 항균 활성이 400 AU/ml이고, DS660 균주는 5333±923 AU/ml이기 때문에 DS660 균주의 항균 활성이 현저히 우수한 것을 알 수 있다.

[0064]

실시예 3: 생물 계면활성제 확인

[0065]

3-1: 오일 스프레딩 테스트(oil spreading test)를 이용한 계면활성제 생산 여부 확인

[0066]

DS660 균주를 2 내지 3일 동안 배양한 후 원심분리(3,400 rpm, 40분, 4℃)하여 배양 상층액을 회수하였다. 유리 페트리 디쉬(petri dish)에 증류수 50 ml를 담은 후 크루드 오일(crude oil) 20 μl를 떨어뜨리고, DS660 균주의 배양 상층액 10 μl를 가한 뒤 생기는 투명대의 크기를 측정하였다.

[0067]

그 결과, 도 4에 나타난 것과 같이 배양 상층액의 첨가에 의하여 투명대가 형성되는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 DS660 균주가 계면활성제를 생산하는 것을 알 수 있었다.

[0068]

또한, 하기 표 3에 개시한 것과 같이 DS660 균주 배양 상층액은 5.1 cm의 직경으로 크루드 오일을 퍼트렸으며, 이를 토대로 표면장력을 측정된 결과 증류수의 표면장력인 75 mN/m를 32.3 mN/m로 현저하게 낮추는 효과가 있는 것을 확인하였다.

표 3

균 주	Oil spreading (cm)	Surface tension (mN/m)
DS660	5.1±1.6	32.3±0.8

[0069]

[0070]

비특허문헌 4에 개시된 미생물과 DS660 균주를 비교하면, 비특허문헌 4에 개시된 미생물은 최대 3 cm 직경으로 크루드 오일을 퍼뜨렸으나 DS660 균주는 5 cm 이상의 직경으로 오일을 퍼뜨리기 때문에 계면활성제 생산이 현저히 우수한 것을 알 수 있으며, 표면장력을 감소시키는 효능 또한 우수한 것을 알 수 있다.

[0072]

3-2: 생물 계면활성제 추출 및 분석

[0073]

DS660 균주를 2 내지 3일 동안 배양한 후 원심분리(3,400 rpm, 40분, 4℃)하여 배양 상층액을 회수하였다. 회수한 배양 상층액을 2 M 염산(HCl)을 이용하여 pH2로 적정하고, 동량의 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 첨가한 후 30분 동안 진탕(shaking; 300 rpm, 30분)하였다. 진탕이 끝난 후 상층액을 다시 원심분리(3,400 rpm, 1분, 4℃)하여 에틸 아세테이트만 회수하고, 회수한 용액을 감압 및 증발시킨 후, 남은 시료를 소량의 에틸 아세테이트로 용해시켜 계면활성제 시료를 획득하였다.

[0074]

배지 추출물을 대조군으로 하여, 획득한 계면활성제 시료를 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)로 분석하였다. 구체적으로, TLC 플레이트(silicagel 60)에 계면활성제 시료를 점적하고, TLC 플레이트를 이동상 (chloroform/methanol/glacial acetic acid = 65:15:2)에 위치시킨 후 전개하였다. 전개가 끝난 후 UV를 이용하여 밴드를 관찰하였고, 1% 닐하이드린(ninhydrin), 브로모티몰 블루(bromothymol blue) 및 오르시놀(orcinol)로 염색하여 계면활성제의 성분을 조사하였다.

[0075]

그 결과, 도 5에 나타난 것과 같이 DS660 균주가 생산하는 계면활성제는 오르시놀에 의해 염색이 되는 것을 확인하여 당지질(glycolipid) 구조를 가지는 것을 알 수 있었다.

[0077]

3-3: DS660 배양 시간에 따른 배양 상층액의 표면장력 측정

[0078]

DS660 균주를 2 내지 3일 동안 배양한 후 OD₆₀₀을 1로 보정하여 새로운 배지에 10% 농도로 접종하고, 24시간을 주기로 배양액을 회수한 후 원심분리(3,400 rpm, 40분)하여 배양 상층액을 획득하였다. 획득한 배양 상층액의 표면장력은 Du Nouy Ring method를 이용하는 표면장력 측정기(조선 계측기, 대한민국)로 측정하였다.

[0079]

그 결과, 도 6에 나타난 것과 같이 DS660 균주는 배양 시간에 관계없이 거의 일정한 수준의 표면장력을 유지하는 것을 알 수 있었다.

[0081]

3-4: 임계 미셀 농도(Critical Micelle Concentration, CMC) 측정

[0082]

DS660 균주를 2 내지 3일 동안 LB 액체배지에서 배양한 후 원심분리(3,400 rpm, 40분, 4℃)하여 배양 상층액을 회수하였다. 유리 페트리 디쉬에 증류수 50 ml를 담은 후 크루드 오일(crude oil) 20 μl를 떨어뜨리고, 회수한 배양 상층액의 첨가 정도를 변화시키면서 표면장력의 변화를 측정하였다.

[0083]

그 결과, 도 7에 나타난 것과 같이 DS660 균주의 CMC는 1 내지 2%인 것을 확인할 수 있었다.

[0085]

실시예 4: 시데로포어(siderophore) 확인

[0086]

4-1: DS660 균주의 시데로포어 생산 여부 확인

[0087]

CAS 한천 배지(60 mg CAS(Chrome AzuroI S), 1 mM FeCl₃, 10 mM HCl 10 ml, 72.9 mg HDTAB, 16 g agar, 30.2 g pipes 및 pH 6.8) 플레이트를 제작하고, 6 mm 직경의 웰을 뚫었다. 웰에 DS660 균주 배양 상층액 70 μl를 첨가하고, 플레이트를 30℃ 암조건에서 48시간 동안 배양하여 웰 주변에 노란색 환의 형성 유무로 시데로포어 생산 여부를 확인하였다.

[0088]

그 결과, 도 8에 나타난 것과 같이 DS660 균주를 첨가한 웰 주변에 노란색 환이 크게 형성된 것을 확인하여 DS660 균주가 시데로포어를 생산하는 것을 알 수 있었다.

[0090]

4-2: DS660 균주의 시데로포어 생산량 확인

- [0091] DS660 균주를 2 내지 3일 동안 배양한 후 OD₆₀₀을 1로 보정하여 새로운 배지에 10% 농도로 접종하고, 24시간을 주기로 15 ml의 배양액을 회수한 후 원심분리(3,400 rpm, 40분)하여 배양 상층액을 수득하였다. 수득한 배양 상층액의 pH를 1 M 염산을 이용하여 pH 2.9로 보정하고, 배양 상층액과 동량의 에틸 아세테이트를 첨가하여 300 rpm에서 30분 동안 extraction shaker(Recipro shaker RS-1, Jeio Tech)를 이용하여 1회 추출하였다. 추출한 용액을 원심분리(3400xg, 15분, 4℃)하여 상층의 에틸 아세테이트층 5 ml과 Hathway 반응 용액(0.1 M FeCl₃ 1 ml, 0.1 M potassium ferricyanide 1 ml, 0.1 L 증류수) 5 ml을 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 분광광도계를 이용하여 OD₇₀₀에서 흡광도를 측정하였으며, 표준곡선은 디히드록시 벤조익산(dihydroxy benzoic acid)을 이용하여 정량하였다.
- [0092] 그 결과, 도 9에 나타난 것과 같이 DS660 균주는 배양 2일차에 57±8 umol/ml 농도의 시테로포어를 생산하여 시테로포어 생산량이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 도 9에서 X는 OD₆₀₀에서 측정한 흡광도를 나타내고, ◆는 DS660 균주가 생산하는 시테로포어의 생산량을 의미한다.
- [0093] 비특허문헌 5에 개시된 *Pseudomonas fluorescens*와 비교하면 *P. fluorescens*의 시테로포어 최대 생산량은 13 umol/ml로 DS660 균주의 시테로포어 생산량이 약 4.3배 높은 것을 알 수 있다.
- [0095] **실시예 5: 베타-1,3-글루카나제(β-1,3-glucanase) 확인**
- [0096] **5-1: 베타-1,3-글루카나제 생산 여부 확인**
- [0097] Peptone-bouillon-yeast agar(1% peptone, 1% beef extract, 2% baker's yeast, 2% agar 및 pH 7) 플레이트에 DS660 균주를 희석으로 도말하여 배양하고, 투명대(clear zon)의 형성 여부로 효소 생성 여부를 판단하였다.
- [0098] 그 결과, 도 10에 나타난 것과 같이 DS660 균주를 도말한 곳에는 투명대가 형성된 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 DS660 균주가 베타-1,3-글루카나제를 생산하는 것을 알 수 있었다.
- [0100] **5-2: 베타-1,3-글루카나제 활성 확인**
- [0101] DS660 균주를 배지(5 g glucose, 2 g peptone, 2 g laminarin, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ 및 0.5 g NaCl)에 2 내지 3일 동안 배양한 후 OD₆₀₀을 1로 보정하여 새로운 배지에 10% 농도로 접종하였다. 24시간 주기로 배양액 1 ml를 수거하여 원심분리(12000 g, 20분, 4℃)하고, 배양 상층액만 취한 후 상층액 0.25 ml, 0.1 M 인산 버퍼(pH 5.5) 500 μl 및 0.2% 라미나린(laminarin) 500 μl을 각각 혼합하였다. 혼합액을 2시간 동안 40℃ 항온수조에서 반응시키고, 반응액 100 μl를 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid 10 g/L, sodium hydroxide 0.3 M 및 rochelle salt 250 g/L) 용액 200 μl와 90에서 10분 동안 추가로 반응시킨 후 냉각시켜 반응을 종료하였다. 반응이 끝난 후 반응액의 흡광도를 575 nm에서 측정하고, 대조군으로 PBS를 이용하여 흡광도 차이를 조사하고, 포도당(glucose)으로 표준곡선을 작성하여 정량하였다. 1 유닛(unit)은 1분 동안 1 μm의 N-아세틸-D-글루코사민(N-acetyl-D-glucosamine, NAG)을 생성하는 효소량으로 정의하였고, 브래드포드(Bradford) 방법으로 시료의 단백질을 정량하였으며, DNS 결과와 단백질 정량 결과를 조합하여 효소 생성량을 조사하였다. 표준곡선은 소혈청 알부민(bovin serum albumin; BSA)을 이용하였다.
- [0102] 그 결과, 도 11에 나타난 것과 같이 DS660 균주는 배양 24시간에 169.2±9.9 nmol/min/mg protein의 효소를 생산하고, 배양 시간이 증가함에 따라 효소 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0103] 비특허문헌 5에 개시된 *P. fluorescens*와 비교하면, *P. fluorescens*의 베타-1,3-글루카나제 생산량은 150 nmol/min/mg protein로 DS660 균주의 베타-1,3-글루카나제 생산량이 약 20% 정도 높은 것을 알 수 있다.
- [0105] **실시예 6: 세균 세포벽 용해효소 확인**
- [0106] 3종의 피부 상재균-*B. subtilis*, *P. aeruginosa* 및 *E. coli*-의 배양액을 원심분리(3,400 rpm, 15분, 4℃)하여 세균 펠렛(pellet)을 수거하였다. 수거한 세균 펠렛을 121℃에서 15분 동안 멸균하고 건조시킨 후, 0.2% 농도로 첨가하여 NA 배지를 제작하였다. NA 배지에 DS660 균주를 희석으로 도말하여 30에서 배양한 후 콜로니 주변에 생긴 투명대를 토대로 세균 세포벽 용해효소 생산 여부를 판단하였다.
- [0107] 그 결과, 도 12에 나타난 것과 같이 DS660 균주 주변에 투명대가 현저하게 형성된 것을 확인하여 DS660 균주가 세포벽 용해효소를 생산하는 것을 알 수 있었다. 도 12에서 (a)는 *B. subtilis*, (b)는 *P. aeruginosa*이고, (c)는 *E. coli*이다.

[0109] 실시예 7: DS660 균주의 특성 확인

[0110] 7-1: 최적 탄소원 확인

[0111] 효모 추출물(Yeast extract)이 첨가된 배지(10 g/L)에 5종류의 탄소원(sorbitol, D-mannitol, glycerol, sucrose 및 glucose)을 20 g/L로 각각 첨가하여 배지를 제작하고, DS660 균주를 선배양하였다. 선배양한 배양액을 OD₆₀₀에서 1로 보정하여 새로운 배지에 접종하고, 48시간 뒤에 배양액을 원심분리(12000 g, 15분, 4℃)하여 배양 상층액을 수거하였다. 지시 균주인 스타필로코커스 아우레우스를 2x10⁸ CFU/ml로 도달한 NA 배지에 10 mm 직경의 웰을 뚫고, DS660 균주 배양 상층액을 첨가하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후, 형성된 투명대의 크기를 측정하였다.

[0112] 그 결과, 도 13에 나타난 것과 같이 탄소원으로 수크로오스(sucrose)를 이용하였을 때 항균 활성이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0114] 7-2: 최적 질소원 확인

[0115] 상기 실시예 7-1과 동일한 방법을 이용하여 DS660 균주의 최적 질소원을 확인하였다. 다만, 포도당이 첨가된 배지(10 g/L)에 질소원 7가지(ammonium phosphate, tryptone, urea, Peptone, yeast extract, malt extract, ammonium sulfate)를 각각 10 g/L로 첨가한 배지를 이용하였다.

[0116] 그 결과, 도 13에 나타난 것과 같이 질소원으로 효모 추출물을 이용하였을 때 형성된 투명대의 크기가 가장 큰 것을 확인할 수 있었다.

[0118] 7-3: 온도 안정성 확인

[0119] DS660 균주를 48시간 동안 배양한 후 원심분리(3,400 rpm, 40분, 4℃)하여 배양 상층액을 회수하고, 회수한 배양 상층액에서 2 ml씩 취하여 다양한 온도(-22, 4, 25, 50, 60, 70, 80, 90, 100℃에서 30분 및 121℃에서 15분)에서 방치하였다. 이후 스타필로코커스 아우레우스를 2x10⁸ CFU/ml로 도달한 NA 배지에 10 mm 직경의 웰을 뚫고, DS660 균주 배양 상층액을 첨가하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후, 형성된 투명대의 크기를 측정하였다.

[0120] 그 결과, 표 4에 나타난 것과 같이 DS660 균주가 생산하는 항균 물질은 -22 내지 70℃의 온도 범위에서 항균 활성이 남아 있는 것을 확인할 수 있었다.

표 4

온도(℃)	잔여 활성(±SD)%
-22	86.05±0.01
4	76.74±0.1
50	80.23±0.07
60	83.72±0.01
70	73.26±0.02
80	0
90	0
100	0
121	0

[0121]

[0123] 7-4: pH에 대한 안정성 확인

[0124] DS660 균주를 48시간 동안 배양한 후 원심분리(3,400 rpm, 40분, 4℃)하여 배양 상층액을 회수하고, 회수한 배

양 상층액에서 2 ml씩 취하여 2 M 염산 및 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 3 내지 12 범위로 적정한 뒤 30분 동안 방치하였다. 이후 적정한 배양 상층액의 pH를 기존의 배양 상층액이 가지고 있던 pH로 재적정하고, 스타필로코커스 아우레우스(2×10^8 CFU/ml)를 도달한 NA 배지에 10 mm 직경의 웰을 뚫은 후, 상기 재적정한 배양 상층액을 첨가하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후, 형성된 투명대의 크기를 측정하였다.

[0125] 그 결과, 표 5에 나타난 것과 같이 DS660 균주가 생산하는 항균 물질은 pH 3 내지 12의 넓은 범위에서 항균 활성을 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

표 5

pH	잔여 활성 (±SD)%
3	83.82 ± 0.02
4	77.94 ± 0.03
5	97.06 ± 0.03
6	100 ± 0.02
7	94.12 ± 0.02
8	85.29 ± 0.04
9	82.35 ± 0.06
10	76.47 ± 0.02
11	66.18 ± 0.05
12	57.35 ± 0

[0126]

[0127] 비특허문헌 6에 개시된 *Lactobacillus sakei* LSJ618 균주와 DS660 균주의 항균 활성을 비교하면, LSJ618 균주는 pH 10 내지 12 범위에서 항균 활성을 잃어버리지만 DS660 균주는 어느 pH 범위에서도 최소 50% 이상의 항균 활성을 유지하는 것을 알 수 있으며, DS660 균주가 생산하는 항균 물질이 안정한 것을 알 수 있다.

[0129] 7-5: 계면활성제에 대한 안정성 확인

[0130] DS660 균주를 48시간 동안 배양한 후 원심분리(3,400 rpm, 40분, 4℃)하여 배양 상층액을 회수하고, 회수한 배양 상층액에서 2 ml씩 취하여 1% 농도로 계면활성제(urea, tween 20, tween 80 및 triton X-100)를 각각 처리하였다. 계면활성제 처리가 끝난 후 스타필로코커스 아우레우스(2×10^8 CFU/ml)를 도달한 NA 배지에 10 mm 직경의 웰을 뚫은 후, 배양 상층액을 첨가하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후, 형성된 투명대의 크기를 측정하였다.

[0131] 그 결과, 표 6에 나타난 것과 같이 계면활성제의 첨가 유무와 관계없이 DS660 균주가 생산하는 항균 물질은 항균 활성을 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

표 6

계면활성제	잔여 활성 (±SD)%
Urea	96.42 ± 0.86
Tween 20	92.85 ± 1.32
Tween 80	84.52 ± 1.25
TritonX-100	81.18 ± 1

[0132]

[0134] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될

수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0136]

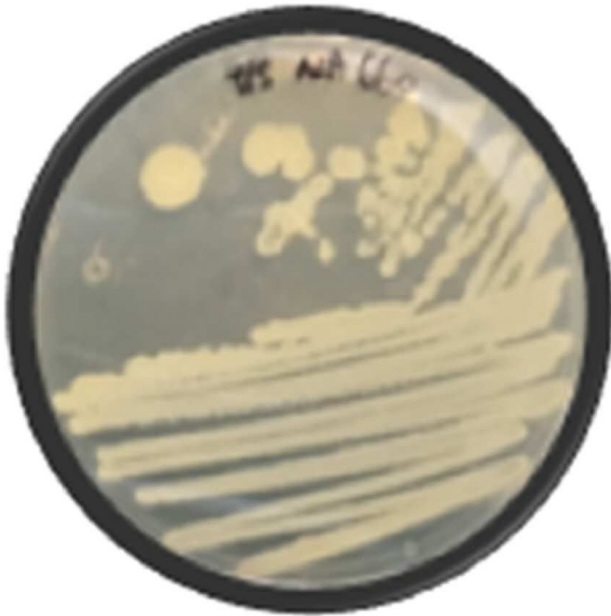
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18521P

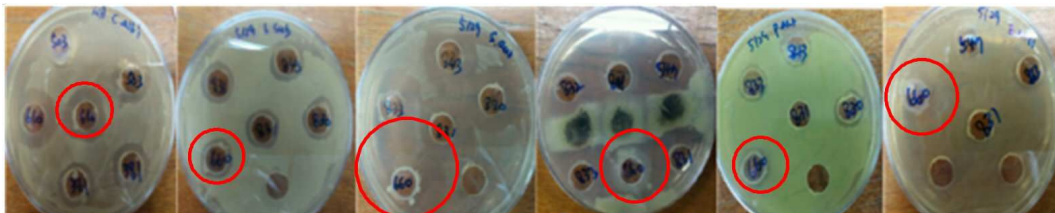
수탁일자 : 20161202

도면

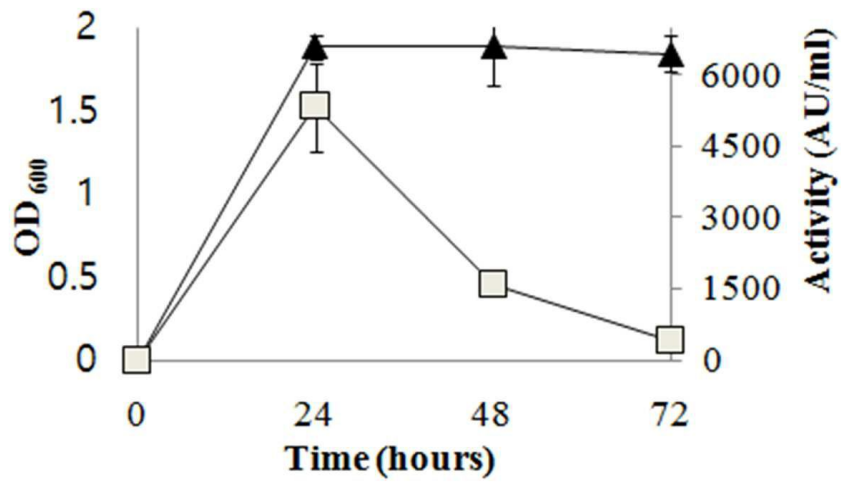
도면1



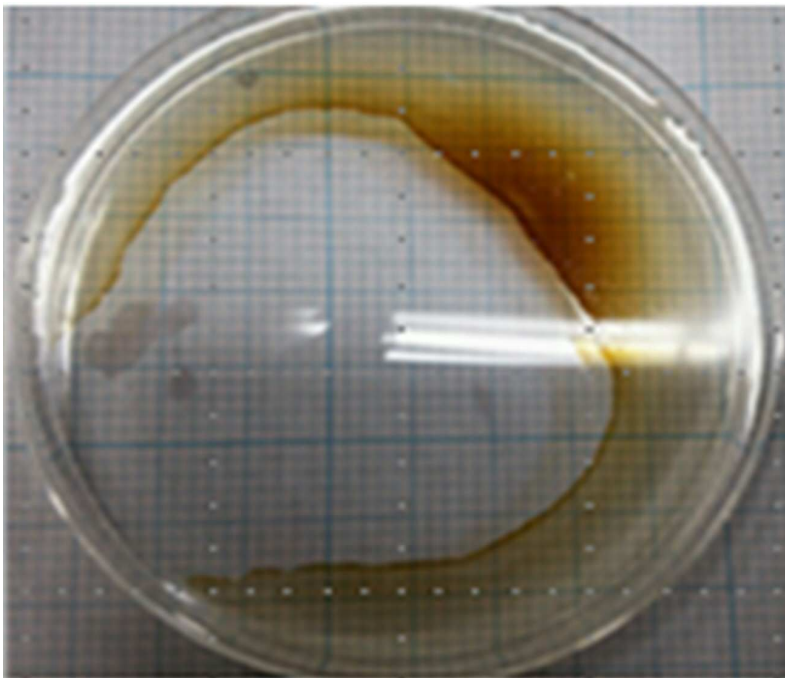
도면2



도면3



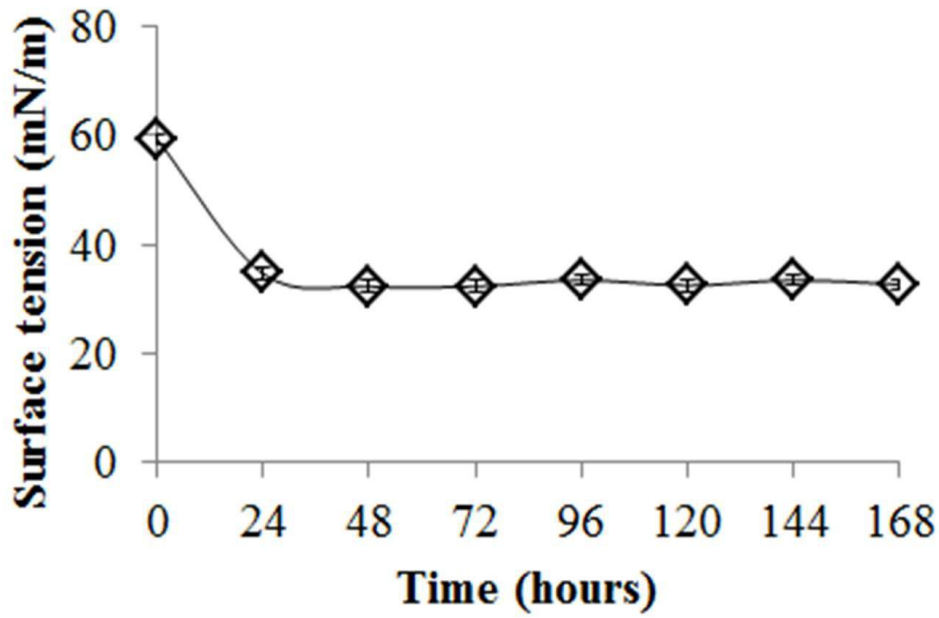
도면4



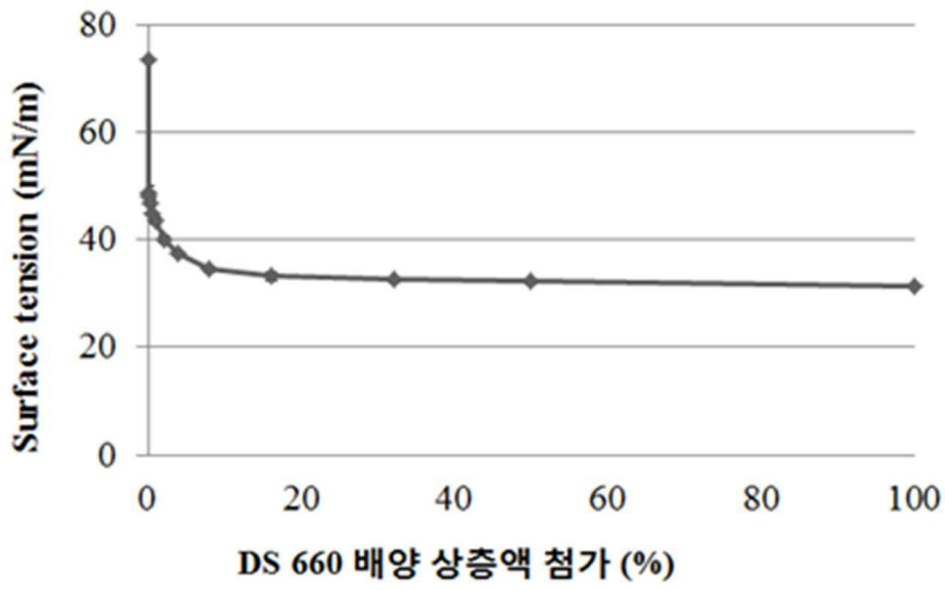
도면5



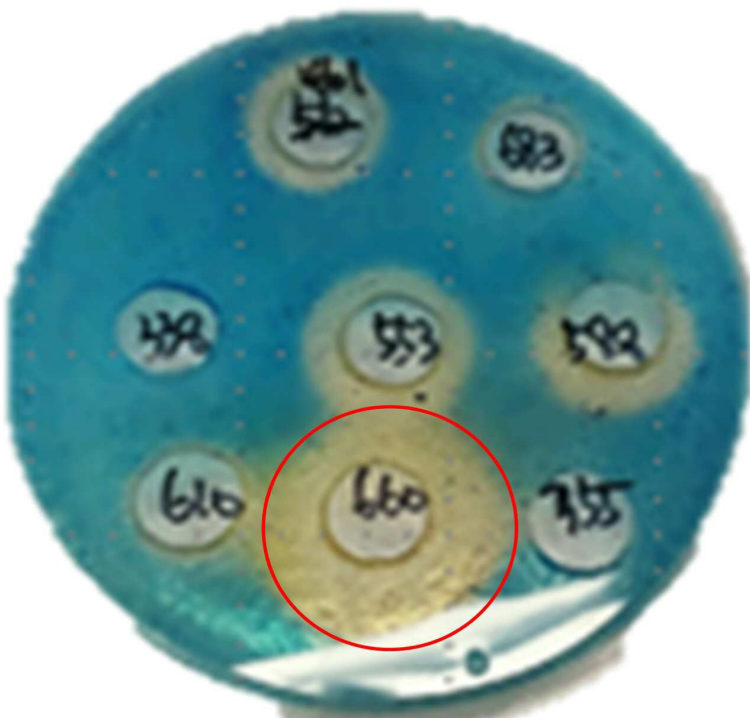
도면6



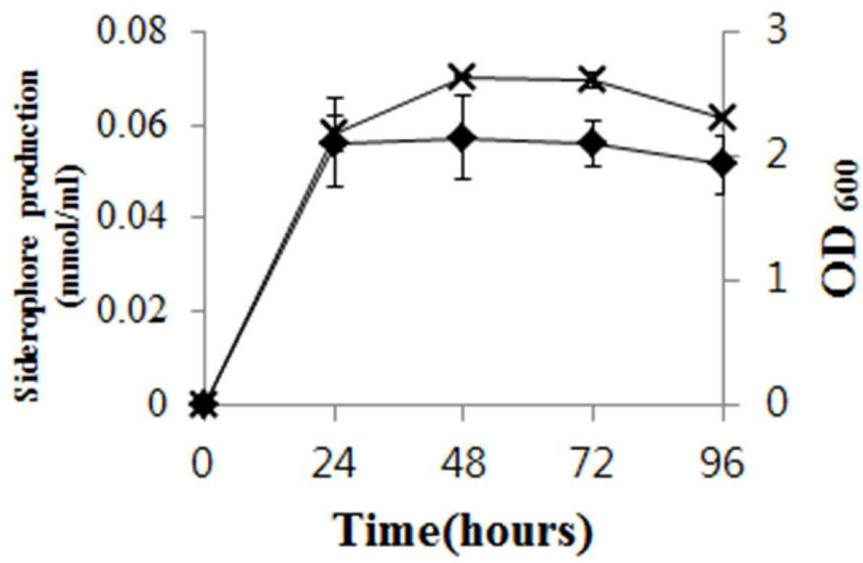
도면7



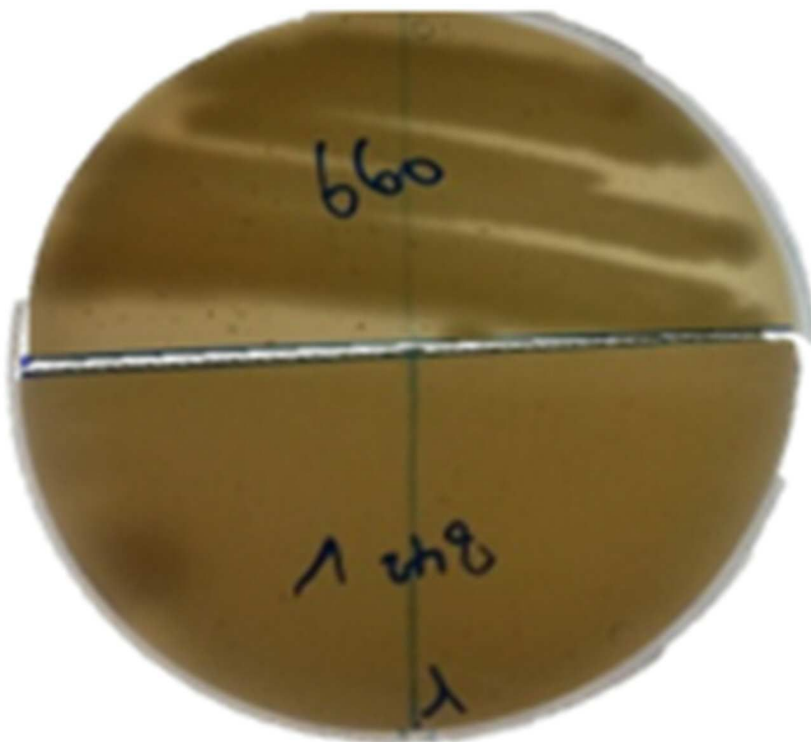
도면8



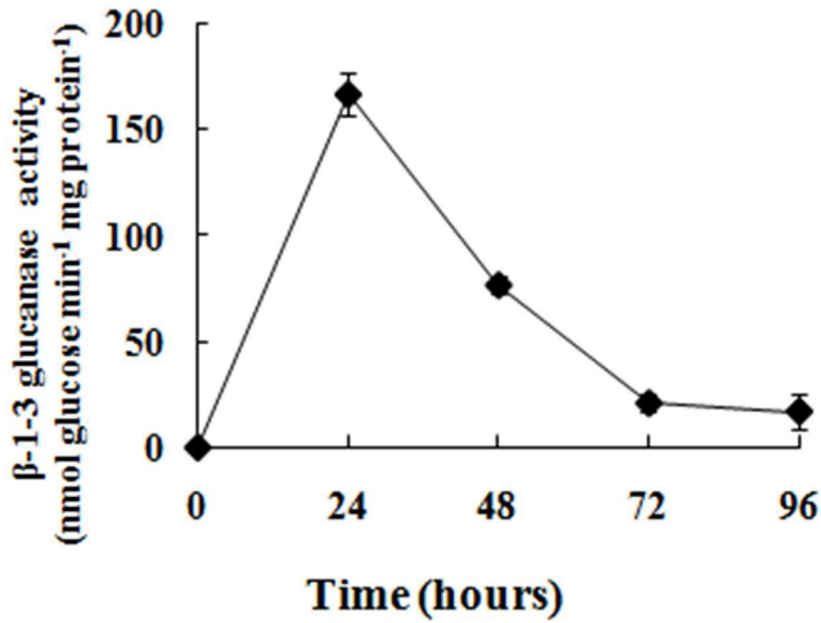
도면9



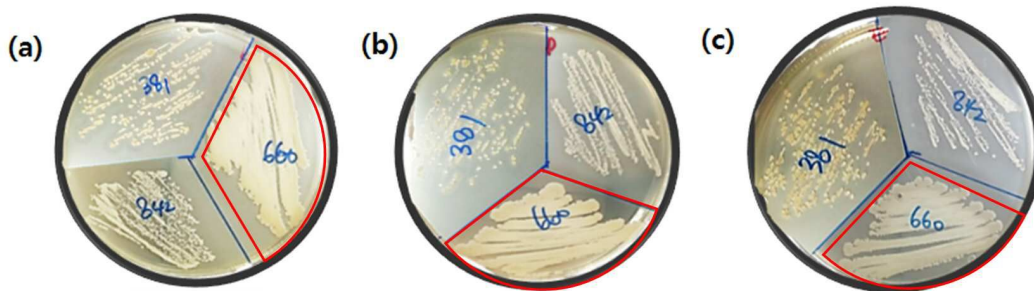
도면10



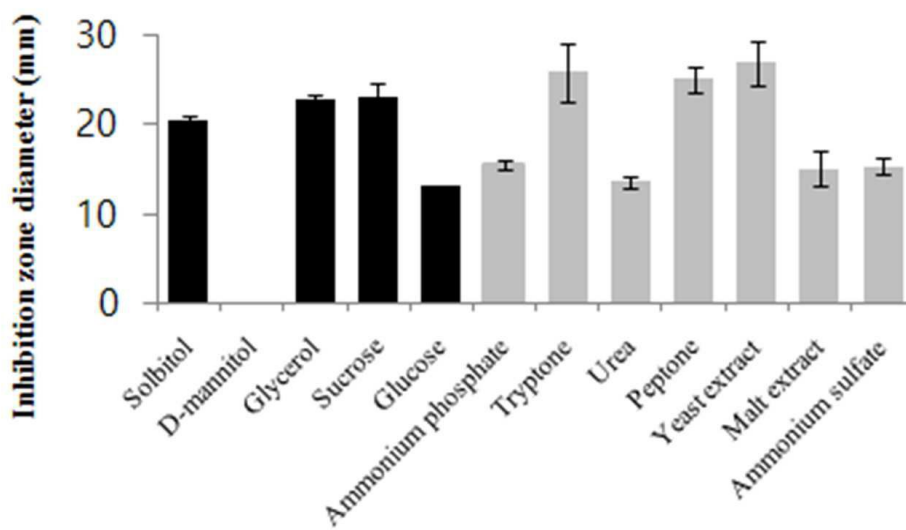
도면11



도면12



도면13



서열 목록

- <110> Kangwon University-Industry Cooperation Foundation
- <120> BACILLUS SUBTILIS DS660 STRAIN HAVING ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND USES THEREOF
- <130> PN160347
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1553
- <212> DNA
- <213> Bacillus subtilis
- <400> 1

```

gtacaaagcc cccgttagag tttgaatcat ggctcaggac gaacgctggc ggcgtgccta      60
atacatgcaa gtcgagcggga cagatgggag cttgctccct gatgttagcg gcggacgggt      120
gagtaacacg tgggtaacct gcctgtaaga ctgggataac tccgggaaac cggggctaata      180

accggatggt tgittgaacc gcatggttca gacataaaag gtggcttcgg ctaccactta      240
cagatggacc cgcggcgcat tagctagttag gtgaggtaac ggctcacca ggcgacgatg      300
cgtagccgac ctgagagggt gatcgccac actgggactg agacacggcc cagactccta      360
cgggaggcag cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag tctgacggag caacgccgcg      420
tgagtgatga aggttttcgg atcgtaaagc tctgttgta gggagaaca agtgccgttc      480
aaatagggcg gcaccttgac ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca      540
gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgttg tccggaatta ttgggcgtaa agggctcgca      600

ggcggtttct taagtctgat gtgaaagccc cggctcaac cggggagggt cattggaaac      660
tggggaactt gagtgcagaa gaggagagtg gaattccacg tgtagcggtg aaatgcgtag      720
agatgtggag gaacaccagt ggcaaggcg actctctggt ctgtaactga cgctgaggag      780
cgaaacgctg gggagcgaac aggattagat accctggttag tccacgccgt aacgatgag      840
tgctaagtgt tagggggttt cgcctcctt agtctgcag ctaacgcatt aagcactccg      900
cctggggagt acggtcgcaa gactgaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg      960
tgggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcctc     1020

tgacaatcct agagatagga cgtccccttc gggggcagag tgacaggtgg tgcattggtg     1080
tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga acgagcgcaa cctttgatct     1140
tagttgccag cattcagttg ggcactctaa ggtgactgcc ggtgacaaac cggaggaagg     1200
tggggatgac gtcaatcat catgccctt atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg     1260

```

acagaacaaa gggcagcgaa accgcgaggt taagccaatc ccacaaatct gttctcagtt	1320
cggatcgag tctgcaactc gactgcgtga agctggaatc gctagtaatc gcggatcagc	1380
atgcccggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc acgagagttt	1440
gtaacaccg aagtcggtga ggtaaccttt taggagccag ccgccgaagg tgggacagat	1500
gattggggtg aagtcgtaac aggtaaaccg taaatttact tcccttctc cat	1553