

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410049173.9

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年2月20日

[11] 授权公告号 CN 100370017C

[22] 申请日 2004.6.18

[21] 申请号 200410049173.9

[73] 专利权人 崔正植

地址 韩国龙仁市

[72] 发明人 崔正植

审查员 曹克浩

[74] 专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理有限公司

代理人 高占元

权利要求书1页 说明书19页 附图1页

[54] 发明名称

一种耐酸性乳酸菌突变菌株和其合成物及其合成物的用途

[57] 摘要

本发明涉及一种耐酸性乳酸菌突变菌株 (Lactobacillus Fermentum JS) 和其合成物及其合成物的用途。一种耐酸性乳酸菌突变菌株 (Lactobacillus Fermentum JS) 保藏在韩国微生物保存中心 (KCCM), 编号为 No. 10499。一种乳酸菌合成物, 该乳酸菌合成物含有上述耐酸性乳酸菌突变菌株; 上述乳酸菌合成物可用于家畜辅助饲料、各种菇废培养基制造发酵饲料、有机物堆肥、土壤改良或改善水质。本发明耐酸性乳酸菌突变菌株, 其合成物用于制备使血糖降低、抗氧化、抑制过氧化脂质生成以及降低胆固醇的健康辅助饮料或健康辅助食品上的应用。

1、一种耐酸性乳酸菌突变菌株，其特征在于，耐酸性乳酸菌突变菌株 (*Lactobacillus Fermentum JS*) 保藏在韩国微生物保存中心 (KCCM)，编号为No. 10499。

2、一种乳酸菌合成物，其特征在于，该乳酸菌合成物含有权利要求1所述的耐酸性乳酸菌突变菌株。

3、根据权利要求2所述的乳酸菌合成物，其特征在于，所述乳酸菌合成物是在每20公升水里混合蛋白酶胨 (protease peptone No.3) 5~15g，浓缩牛肉汁 (beef extract) 3~10g，葡萄糖 (glucose) 10~30g，乙酸钠 (sodium acetate) 3~15g，以及柠檬酸铵 (ammonia citrate) 1~8g的培养基里培养所述耐酸性乳酸菌突变菌株并制造的。

4、根据权利要求2所述的乳酸菌合成物，其特征在于，所述乳酸菌合成物是在每20公升水里混合蛋白酶胨 (protease peptone No.3) 10~30g，浓缩牛肉汁 (beef extract) 6~20g，葡萄糖 (glucose) 20~50g，乙酸钠 (sodium acetate) 6~20g，以及柠檬酸铵 (ammonia citrate) 2~16g的培养基里培养所述耐酸性乳酸菌突变菌株和酵母 *Pichia kluyveri* 菌株并制造的。

5、权利要求2所述的乳酸菌合成物用于制备使血糖降低、抗氧化、抑制过氧化脂质生成以及降低胆固醇的健康辅助饮料或健康辅助食品上的应用。

6、权利要求3或4所述的乳酸菌合成物用于家畜辅助饲料合成物。

7、权利要求3或4所述的乳酸菌合成物用于各种菇废培养基制造发酵饲料。

8、权利要求3或4所述的乳酸菌合成物用于有机物堆肥的制造。

9、权利要求3或4所述的乳酸菌合成物用于土壤的改良。

10、权利要求3或4所述的乳酸菌合成物用于水质的改善。

一种耐酸性乳酸菌突变菌株和其合成物及其合成物的用途

技术领域

本发明涉及一种耐酸性乳酸菌突变菌株和其合成物及其合成物的用途，

背景技术

乳酸菌是在细菌中很久以前开始被人类很有用的利用的细菌，尤其是在发酵乳制品里普遍被利用。乳酸菌是改善营养素的吸收缓和 (Lactose Intolerance) 改善肠的运动性具有抗癌效果。

Metchnikoff 的长寿理论之后对乳酸菌或者使用乳酸菌的食品生理学的效果广泛的进行研究。

如酸奶发酵牛奶含有的乳酸菌的作用是肠内微生物改良效果以及整肠作用等。最近乳酸菌具有各种功能，比如具有免疫活性作用，抗菌作用以及抗肿瘤作用等。如上述因为期待乳酸菌的各种健康效果销售使用在人体肠里发现的如嗜酸乳酸菌 (*Lactobacillus Acidophilus*)，干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 以及比菲德氏菌 (*Bifidobacterium*) 属菌株的现在卖发酵牛奶以及乳酸菌饮料。

但是如此的乳酸菌在高温或低PH里很难生存而当人摄取时存在被胃分泌的胃酸都灭绝而不能到达肠的问题。

为了解决如此的问题虽然发明了用耐酸性并肠溶性涂层物构成的胶囊里包装之后摄取的方法，但是乳酸菌即使在胶囊内安全通过胃并到达肠里也在肠里上述胶囊被肠的消化酵母或肠的ph没有完全分解至溶解或在口内被咀嚼而内部的乳酸菌向胶囊外面流出。

发明内容

本发明要解决的技术问题之一是，提供一种耐酸性乳酸菌突变菌株，在高温以及低PH可生存；本发明要解决的技术问题之二是，提供上述耐酸性乳酸菌突变菌株的合成物；本发明要解决的技术问题之三是，上述耐酸性乳酸菌突变菌株合成物的用途。

本发明的技术方案之一是，一种耐酸性乳酸菌突变菌株 (*Lactobacillus Fermentum JS*) 保藏在韩国微生物保存中心 (KCCM)，编号为No. 10499。

本发明的技术方案之二是，一种乳酸菌合成物，该乳酸菌合成物含有上述耐酸性乳酸菌突变菌株。

本发明的技术方案之三是，上述乳酸菌合成物用于制备使血糖降低、抗氧化、抑制过氧化脂质生成以及降低胆固醇的健康辅助饮料或健康辅助食品上的应用。

本发明的技术方案之四是，上述乳酸菌合成物可用于家畜辅助饲料、各种菇废培养基制造发酵饲料、有机物堆肥、土壤改良或改善水质。

上述乳酸菌合成物可以是在每20公升水里混合蛋白酶胨 (protease peptone No.3) 5~15g, 浓缩牛肉汁 (beef extract) 3~10g, 葡萄糖 (glucose) 10~30g, 乙酸钠 (sodium acetate) 3~15g, 以及柠檬酸铵 (ammonia citrate) 1~8g的培养基里培养所述耐酸性乳酸菌突变菌株并制造的。上述的乳酸菌合成物，也可以是在每20公升水里混合蛋白酶胨 (protease peptone No.3) 10~30g, 浓缩牛肉汁 (beef extract) 6~20g, 葡萄糖 (glucose) 20~50g, 乙酸钠 (sodium acetate) 6~20g, 以及柠檬酸铵 (ammonia citrate) 2~16g的培养基里培养所述耐酸性乳酸菌突变菌株和酵母 *Pichia kluyveri* 菌株并制造的。

本发明耐酸性乳酸菌突变菌株 (*Lactobacillus Fermentum JS*)，保藏为KCCM 10499，其合成物具有血糖降低，抗氧化，抑制过氧化脂质生成以及胆固醇降低效能，从而使用于健康食品，动物的分辅助饲料，土壤改良，水质改善，或有机堆肥等领域。

附图说明

图1是表示摄取乳酸菌饮料的ob/ob老鼠 (n=5) 血液内的葡萄糖程度图，(^ap<0.01; ^bp<0.001; 与对照群相比较 (compared with control group))

图2是用于实验的水路模式图。

具体实施方式

本发明是有关在高温以及低PH可生存的乳酸菌突变菌株 (*Lactobacillus Fermentum JS*) 的内容。

本发明者进口日本EME环境工业销售的乳酸菌 (*Lactobacillus Fermentum*) 菌株之后成功人工培养并把上述菌株和几种谷物混合制造的含有微生物合成物的过程中进行的耐酸性实验中发现pH2~3可生存的突变菌株把该突变菌株按通常的方法培养的结果确认为和传统的乳酸菌 (*Lactobacillus Fermentum*) 菌株不同的菌株并命名为“*Lactobacillus Fermentum JS*菌”。

根据本发明的乳酸菌突变菌株 (*Lactobacillus Fermentum JS*) 菌是按序

列1表现的16SRNA, 2003年6月9日寄托韩国微生物保存中心, 保藏号码为KCCM-10499。

并且, 本发明是具有血糖降低, 抗氧化, 抑制过氧化脂质生成以及胆固醇降低效能的把乳酸菌(*Lactobacillus Fermentum*)突变菌株 *Lactobacillus Fermentum*JS作为有效成分含有的有关乳酸菌合成物的内容。

上述乳酸菌合成物的制造方法如下。

在 MRS 培养基接种乳酸菌突变菌株(*Lactobacillus Fermentum JS*)菌在 35℃培养 1~7 日。50ℓ 培养箱里放入 50ℓ水并在 121℃杀菌 10~15 分钟之后把水冷却到 30~45℃。

然后, 作为培养基合成物每 20ℓ水蛋白酶胨(protease peptone No. 3) 5~15g, 浓缩牛肉汁(beef extract)3~10g, 葡萄糖 10~30g, 乙酸钠(sodium acetate)3~15g 以及柠檬酸铵(ammonia citrate)1~8g 放入培养箱里并稀释。

在无菌箱内 50ml 试验管里放入 40 ml 灭菌水之后把 MRS 培养基里培养的乳酸菌突变菌株(*Lactobacillus Fermentum JS*)菌放入试验管里稀释之后放入培养箱并在 30~45℃培养 1~3 日时乳酸菌数 1.5×10^8 /g 以上, 塑料瓶或塑料盒子里包装并制造乳酸菌饮料。

或者把完成培养的乳酸菌突变菌株(*Lactobacillus Fermentum JS*)菌使用离心机 1ℓ乳酸菌液体分离成 2~3ml 之后把分离的高浓缩乳酸菌集在一起冻结到-4~-10℃, 然后按通常的方法混合糊精粉末并冻结干燥之后包装在塑料袋子并按粉末形态制造。

以下, 通过实例以及实验例子更详细的说明本发明的构成以及效果。但是这些例子只是为了说明本发明的例子, 本发明的范围并不局限在这些例子是该行业里大家都自明的。

实施例 1 乳酸菌饮料的制造

在 MRS 培养基接种乳酸菌突变菌株(*Lactobacillus Fermentum JS*)菌并在 35℃培养 7 日。上述 MRS 培养基的合成如下表 1。

50ℓ 培养箱里放入 50ℓ水并在 121℃杀菌 15 分钟之后把水冷却到 35℃。然后, 作为培养基合成物每 20ℓ水蛋白酶胨(protease peptone No. 3)No. 3 10g, 浓缩牛肉汁(beef extract) 5g, 葡萄糖 20g, 乙酸钠(sodium acetate) 8g 以及柠檬酸铵(ammonia citrate) 4g 放入培养箱里并稀释。

在无菌箱内 50ml 试验管里放入 40 ml 灭菌水之后把 MRS 培养基里培养的乳酸菌突变菌株(*Lactobacillus Fermentum JS*)菌放入试验管里稀释之后放入培养箱并在 35℃培养 2 日, 然后用塑料瓶或塑料盒子里包装并根据本法明制造乳酸菌饮料。

表 1

材料	成分
胰消化胶 Pancreatic digest of gelatin	10.0g
浓缩牛肉汁 Beef extract	8.0g
葡萄糖 dextrose	20.0g
磷酸钾 Potassium Phosphate Dibasic	2.0g
polysulfate 80	1.0g
乙酸钠 sodium acetate	5.0g
柠檬酸铵 ammonium citric acid	2.0g
硫酸镁 magnesium sulfate	0.2g
硫酸锰 manganese sulfate	0.05g
蒸馏水 distilled water	1l

实施例2

在上述实施例1制造的乳酸菌饮料里放入2倍的灭菌水并稀释制造。

比较例1

作为乳酸菌使用含有 *Lactobacillus acidophilus* 的其他公司销售的乳酸菌饮料。

比较例2

在上述比较例一制造的乳酸菌饮料里放入2倍的灭菌水并稀释制造。

试验例1 耐酸性试验

为了确认根据本发明的乳酸菌突变菌株 (*Lactobacillus Fermentum JS*) 菌在低pH也生存可能性试验耐酸性。这时培养基是使用BCP添加平板测定用培养基，培养条件是在35~37℃d1p培养72±3小时，pH是使用柠檬酸以及HCL分别调整到pH 2以及pH 3。在上述条件培养之后产生的黄色分群用乳酸菌分群测量。其结果表示在表2里。

表 2

	pH	pH调整前	1小时之后	2小时之后
实施例1	PH3.0	$7.0 \times 10^7 / \text{ml}$	$5.0 \times 10^7 / \text{ml}$	$7.4 \times 10^6 / \text{ml}$
	PH2.0	$7.0 \times 10^7 / \text{ml}$	$6.6 \times 10^6 / \text{ml}$	$5.0 \times 10^5 / \text{ml}$
比较例2	PH3.0	$7.0 \times 10^7 / \text{ml}$	$3.2 \times 10^4 / \text{ml}$	$6.5 \times 10^2 / \text{ml}$
	PH2.0	$7.0 \times 10^7 / \text{ml}$	$4.3 \times 10^3 / \text{ml}$	$5.7 \times 10^2 / \text{ml}$

试验例2

实验动物以及饲养条件

C57BL/6J-Lep^{ob} (ob mouse) 是用于肥胖型糖尿研究实验的动物在美国 The Jackson Laboratory (JAX) 购买, 实验动物饲养设施是 SPF 栅栏装置 (barrier system), 饲养条件是自动调整 (23±2℃, 50±10%, 噪音 60 phone 以下, 臭气 20ppm 以下, 照明 150~300 Lux), 明暗自动调整到 12 小时周期 (18:00~06:00)。饲养箱是利用聚碳酸酯笼子 (polycarbonate cage), 规格 180Wx240Dx125H mm, 垫子使用削柳树制造的实验动物专用垫子, 动物饲养箱子更换是每周进行 2 回。动物实验里使用的所有器材以及垫子利用高压蒸汽灭菌器 (121℃, 灭菌 20 分钟, 干燥 30 分钟)。饲料是购买鼠 (mouse, rat) 用实验动物饲料之后使自由摄取并饲养 3 个星期。饲料的组成是水分 12.3 重量%, 粗蛋白 22.4 重量%, 粗脂肪 4.2 重量%, 粗纤维 4.0 重量%, 灰分 6.5 重量%, 钙 0.9 重量%, 对照群的负数把常数 filtering 之后, 供应通过紫外线流水灭菌器 (Dynamics, M600, USA) 的水。

动物选别以及饲料的准备

在本实验使用的试验动物的情况是到 3~4 周龄选别肥胖动物并使用, 试验动物的年龄是 9 周龄并使用雄老鼠。试验之前测定体重和基础血糖 (basal blood glucose) 每各群类似的调整平均数值并使用, 这时的平均血糖值为 380~430mg/dl 左右。为了自由摄取实例 1~2 以及比较例子 1~2 的乳酸菌饮料分别放入水瓶并服用 3 周。并且作为对照群 (Control group) 把水放入水瓶里并使自由摄取。

食物摄取量以及食物效率

实验期间食物是自由摄取 (ad libitum) 水是用水瓶每天按一定时间供应并自由摄取。食物摄取量是每天按一定时间测定, 体重是实验期间每 2, 4, 8, 12, 16, 21 日分别测定。食物效率把全体重增加量除于同一期间的食物摄取量而计算。

对食物摄取量以及食物效率的影响是如下表 3。食物摄取量是在对照群和供应乳酸菌发酵饮料的实验群里摄取的饲料的量 (1 日饲料摄取量), 无统计的类似之差。并且比较摄取饲料 (g) 的饲料效率比时体重变化几乎一致。

[表 3] 食物摄取、体重增加和食物效率比的比较 (Comparison of food intake, body weight gain and food efficiency ratio (FER))。

组群 (Groups)	食物摄取 (Food intake) (g/day)	体重增加 (Body weight gain) (g/21 days)	*食物效率比 (FER)
对照群	5.20±0.70**	7.36±1.40	0.07±0.01
实例1	5.40±0.60	7.12±0.58	0.06±0.01
实例2	5.40±0.60	7.62±0.58	0.07±0.01

*食物效率比=体重增加(g)/食物摄取(g),
**All values are mean±S.E. (n = 5)。

试验例三 血糖浓度的测定

抽血是利用眼眶静脉抽血法14:00开始抽血全体动物没有花30分钟以上。所有个体的血糖浓度使用one touch basic(Lifescan Co., USA)。血糖是经过2, 4, 8, 12, 16, 21日之后按相同的方法测定。

比较观察根据实例1~2以及比较例子1~2的乳酸菌发酵饮料摄取的血糖量的变化。对照群(Control group)使用水, 分别自由摄取实例1~2以及比较例子1~2的乳酸菌发酵饮料并比较三个星期的血糖抑制效果结果表示在图1。如图1所示实例1~2的乳酸菌发酵饮料和对照群比较时4日之后开始显示自动的血糖降低效果, 比较最后第21日的血糖值时比对照群分别显示约47%, 37%明显的血糖降低效果。并且比较例子也是从4日之后开始降低血糖数值, 最后第21日的血糖值比对照群分别显示约17%, 20%的血糖降低效果。

试验例四

血液的抽取以及分离

把实验动物用乙醚麻醉, 从心脏分取血液并在低温放置2个小时周在700xg离心10分钟而得到的上层液体血清放入每1.0ml血液用0.05ml抗凝固剂肝素钠(sodium heparin)(100,000 Units, Sigma)处理的CBC瓶(competete blood cell count; 绿十字)里在-70℃冻结保存并用于分析。

中性脂质和蛋白质的测定

作为血清中的中性脂质甘油三酸脂(triglyceride): TG的含量是用血清中性脂质测定用TG试药(Sigma, USA)处理根据标准检测线定量血清中的中性脂质的含量。血清中的蛋白质含量是把BSA(标准血清一部分)作为标准物质根据Lowry的方法(1951)测定。

胆固醇含量的测定

总胆固醇的含量是根据Rudel等(Rudel LL, 1973)的方法用o-phthalaldehyde法测定。首先把试料分别取0.1ml之后加入33%KOH溶液0.3ml和95%乙醇3.0ml并混合之后, 把血清在60℃水槽里加热15分钟之后冷却。这里加入己烷5.0ml并混合重新加入蒸馏水3.0之后好好混合一分钟并分离层而取1.0ml的己烷。此己烷层用氮浓缩干燥加入混合o-phthalaldehyde试剂2.0ml并10分钟之后作为发色试剂加入混合1.0ml浓的硫酸。添加硫酸之后10~90分钟内使用光电式分光光度计在550nm测定吸光度并根据标准检测线定量血液中的总胆固醇含量。

脂蛋白-胆固醇含量的测定

血清中的低密度脂蛋白 (LDL) -以及高密度脂蛋白 (HDL) -胆固醇含量的测定是使用 HDL-胆固醇 (HDL-C555, Eiken, 日本), LDL-胆固醇 (BLF, Eiken, 日本) 试剂。

① HDL-胆固醇含量的测定

试验管里放入 3.0ml 血清在此加入 0.3ml 沉淀试剂并混合之后在常温放置 10 分钟然后在 700xg 进行 10 分钟离心。其后用上层液 50ml, 标准溶液 (100ml/dl) 50ml, 空白(blank) 蒸馏水 50ml 里分别添加 HDL 发色试剂 3.0ml 并混合之后在 37℃水槽里加热 5 分钟。把空白(blank)作为对照在 555nm 测定吸光度并定量 HDL-胆固醇含量的含量 (mg/dl 血浆 serum)。

② LDL-胆固醇含量的测定

试验管里放入 0.1ml 血清, 0.1ml 标准血清在此分别加入 BLF 试剂 I, II 4.0ml 之后混合 5 秒钟之后在常温 (25±3℃) 放置 25 分钟然后 10 分钟以内对照蒸馏水在 650nm 测定吸光度并定量 LDL-胆固醇含量 (mg/dl 血浆 serum)。

动脉硬化指数 (Atherogenic index) 的计算

作为成人病的初期症状动脉硬化症的发病指数来活用的动脉硬化指数 (AI) 是根据 Haglund 等 (1991) 的方法总胆固醇中减去 HDL-胆固醇的含量, 然后把这些重新用 HDL-胆固醇除掉计算。

为了调查植物性乳酸菌发酵饮料 (Lac. F-100, 50) 以及动物性乳酸菌发酵饮料 (HYW-100, 50) 对成人病原因物质中性脂质和胆固醇以及脂蛋白胆固醇含量的影响使肥胖鼠 (obese mouse) 分别自由摄取实施例 1~2 以及比较例 1~2 的乳酸菌发酵饮料并比较 3 个星期服用影响是如下表 4。服用实例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料的群体的中性脂质和总胆固醇的含量分别比对照群明显抑制到 8.6%~12.8%以及 6.6~15.8%。跟实际与成人病的发病直接有关系的 LDL-胆固醇的降低效果比较时比对照群显示约 18.8~25.3%以上的抑制效果。并且成人病的初期发病指数动脉硬化指数也实施例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料的服用群明显抑制到 38.2~57.2%。如此的动脉硬化指数的减少几乎和 LDL-胆固醇含量的减少一致。这说明 LDL-胆固醇含量和动脉硬化指数的增加和成人病的发病紧密有关系。作为抗胆固醇因素和运动以及长寿有连贯性的 HDL-胆固醇的数值也是植物性乳酸菌发酵饮料服用群增加 16.9%~21.5%并预防成人病上很有效果。

比较例子 1~2 的动物性乳酸菌发酵饮料也是比对照群中性脂质以及 LDL-胆固醇的数值也降低。但是比实例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料其抑制程度差。

根据本发明的实例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料不仅降低血糖,而且降低对脂质代谢起重要作用的血中胆固醇的含量,所以对成人病的预防也很有帮助。

表 4 服用乳酸菌发酵饮料对老鼠脂质成分含量的影响 (Effects of Lac.F beverage administration on lipid composition content in ob/ob mice.)

参数 Parameter	对照 Control	实施例 1	实施例 2	比较例 1	比较例 2
蛋白质 Protein (mg/ml serum)	25.52±0.59 [*] (100.0%)	25.92±0.66 (101.6%)	26.96±0.33 ^b (106.5%)	25.52±0.59 [*] (100.0%)	25.52±0.59 [*] (100.0%)
甘油三酸酯 Triglyceride (mg/dl serum)	137.53±1.38 (100.0%)	119.90±0.41 ^c (87.2%)	125.65±7.16 ^b (91.4%)	124.59±4.82 ^c (90.6%)	129.71±2.34 ^c (94.3%)
总胆固醇 Total cholesterol (mg/dl serum)	123.96±6.93 (100.0%)	104.34±2.24 ^c (84.2%)	115.73±3.24 ^a (93.4%)	112.61±5.46 ^a (90.8%)	121.82±4.56 (98.3%)
LDL-胆固醇 LDL- cholesterol (mg/dl serum)	112.04±5.79 (100.0%)	83.64±0.48 ^c (74.7%)	90.94±1.79 ^c (81.2%)	91.88±2.28 ^c (82.0%)	95.47±3.45 ^c (85.2%)
HDL-胆固醇 HDL- cholesterol (mg/mlserum)	56.03±2.19 (100.0%)	68.08±0.97 ^c (121.5%)	65.48±0.39 ^c (116.9%)	59.18±2.13 ^c (105.6%)	58.22±1.16 (103.9%)
动脉粥样化指数 Atherogenic Index(AI)	1.21±0.13 [*] (100.0%)	0.76±0.08 (62.8%)	0.76±0.08 (62.8%)	0.90±0.16 (74.4%)	1.09±0.17 (90.1%)

* All values are mean±S. E. (n=5)

** ^ap<0.05; ^bp<0.01; ^cp<0.001 与对照群相比较 (compared with control group)

试验例五

活性氧气以及过氧化脂质 (LPO) 的测定

活性氧气中最强力的自由基羟基 (free radicals hydroxyl radical) 的测定是以去氧核糖 (Deoxyribose) 的破坏程度测定羟基 (hydroxyl radical) 生成程度方法根据反应性氧气代谢物去氧核糖被破坏而生成乙醛 (aldehyde), 此乙醛 (aldehyde) 根据在酸性溶液和硫代巴比妥酸 (thiobabituric acid) 反应并发色方法 (Halliwell, B., 1981) 测定。

根据这些活性氧气 (oxygen radicals) 血清中的过氧化脂质 (lipid peroxide: LPO) 的含量根据崔等 (Choi, J.H., 1994) 的实验方法测定。

消除酵母的活性测定

活性氧气中作为消除酵母重要的 superoxide dismutase (SOD) 活性的测定根据 Oyanagui 等 (Oyanagui, Y., 1984) 的方法定量。并且作为活体内的重要消除酵母以在 340nm 测定 NADPH 的减少方法测定谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase) (GSHPx) 的活性。(Lawrence, R. A., 1978)。

分析结果的统计处理

本研究的所有实验结果进行统计处理计算平均值和标准偏差, 各实验群之间的类似性检查是用 Student' s t-test (Steel, R. G. D., 1960) 实施。

实施例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料的服用比较对肥胖鼠 (obese mouse) 血液中的脂质过氧化影响的活性氧气中自由基 (free radical) 中的初期阶段里发生的活性氧气超氧阴离子自由基 (superoxide radical) 和最有力的自由基羟基 (free radical hydroxyl radical) 的生成和这时生成的过氧化脂质 (lipid peroxide: LPO) 的含量时如下表 5。并且活体保护酵母超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSHPx) 等是在体内存在的强力的抗氧化酵母这些的生成量也记载在表 5 里。根据实施例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料的服用羟基 (hydroxyl radical) 的生成抑制到 8.4~13.8%, 超氧阴离子自由基 (superoxide radical) 的活性抑制到 10.1~17.1%。像这样服用实例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料而抑制自由基 (free radical) 的活性, 这时生成的过氧化脂质的含量也抑制 10.6%~14.3%。如此的事实是植物性乳酸菌发酵饮料的服用不仅抑制强力的活性氧气羟基 (hydroxyl radical) 以及超氧阴离子自由基 (superoxide radical) 等自由基 (free radical) 的生成, 还很有效的抑制与成人病的发病或老化紧密有关系的过氧化脂质的生成。

比较对与抗氧化有关联的酵母 SOD 活性的影响时比对照群活性有效果的增加为 15.2%~21.7%。并且 GSHPx 的活性也是对比对照群时 8.7~18.0%, 显示实施例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料的摄取增加活体内的抗氧化酵母的活性。

活体内的作为超氧阴离子自由基 (free radical superoxide anion), 羟基 (hydroxyl radical), 过氧化氢等的活性氧中 (reactive oxygen species: ROS) 的生成不仅诱发各种成人病, 而且促进老化过程。在活体

内根据 自由基(free radical)生成的 超氧阴离子(superoxide anion)或过氧化氢以及消除羟(hydroxyl group)的有害氧的保护体系存在体内的血液或所有内脏内, 这些保护体系是超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSHpx), 过氧化氢酶(catalase)等。降低牛奶和发酵牛奶产品的活性氧种类的活性, 如此的作用与抗氧化酵母有紧密相关。

因此, 根据本发明的实施例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料不仅抑制如此的活性氧种类的生成, 而且使上升抗氧化酵母而不仅影响成人病而且也影响老化过程的抑制。

表 5 服用乳酸菌发酵饮料对老鼠活性氧和脱氧酶活性的影响 (Effects of Lac.F beverage administration on reactive oxygen and scavenger enzyme activity in ob/ob mice.)

参数	对照	实施例 1	实施例 2	比较例 1	比较例 2
过氧化脂质 (LPO) (nmol/ml serum)	5.10±0.23 * (100.0%)	4.37±0.15 c (85.7%)	4.56±0.28 b (89.4%)	4.49±0.39 a (88.0%)	4.52±0.33 . (88.6%)
羟基 (nmol/ml serum)	4.27±0.42 (100.0%)	3.68±0.27 . (86.2%)	3.91±0.13 (91.6%)	3.80±0.13 (89.0%)	3.92±0.10 (91.8%)
超氧阴离子 自由基 (nmol/ml serum)	86.60±3.0 1 (100.0%)	71.75±3.1 1 ^c (82.9%)	77.84±4.8 6 ^b (89.8%)	78.30±4.1 1 ^b (90.4%)	82.24±0.9 0 ^a (95.0%)
超氧化物歧 化酶 (SOD) (nmol/ml serum)	212.83±7.97 (100.0%)	258.98±5.51 ^c (121.7%)	245.28±3.06 ^c (115.2%)	257.30±8.62 ^c (120.9%)	242.44±5.33 ^c (113.9%)
谷胱甘肽过 氧化物酶 (GSHIPx) (IU/g protein)	7.32±0.24 (100.0%)	8.64±0.57 b (118.0%)	7.96±0.11 b (108.7%)	7.91±0.52 (108.1%)	7.54±0.55 (103.0%)

* All values are mean±S.E. (n=5)

^ap<0.05; ^bp<0.01; ^cp<0.001 与对照群相比较 (compared with control group)

在本发明为了科学的检查根据乳酸菌摄取的糖尿病的治疗以及预防作用, 把利用乳酸菌突变菌株 (*Lactobacillus Fermentum JS*) 菌的植物性乳酸菌发酵饮料使用糖尿实验动物 ob. mouse 饲养三个星期并评价对体重变化, 血液中的中性脂质和胆固醇含量的降低效果, LDL-胆固醇以及动脉硬化指数 (atherogenic index) 的减少效果和羟基(hydroxyl radical), 超

氧阴离子自由基(superoxide radical) 以及过氧化脂质(lipid peroxide: LPO) 的生成抑制效果, 还有这些活性氧的消除酵母超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD) 以及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSHpx) 等活性的影响。

血糖量的变化是服用实施例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料的实验群比对照群分别为 37~47%的明显血糖降低作用。实施例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料的长时间口服是在 ob. Mouse 显示类似的血糖降低作用。实施例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料服用群的中性脂质(TG), 总胆固醇以及 LDL-胆固醇的含量也比对照群降低效果好, 而且作为成人病的初期症状发病的动脉硬化指数也减少 50%以上。实施例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料的服用群是活性氧中超氧阴离子自由基(superoxide radical) 以及羟基(hydroxyl radical) 的生成比对照群明显抑制, 而且根据活性氧生成的过氧化脂质(LPO) 的含量也明显减少。并且作为活性氧的消除酵母超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD) 以及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSHpx) 的活性也比对照群增加。从以上结果把含有 *Lactobacillus Fermentum* 的实施例 1~2 的植物性乳酸菌发酵饮料给糖尿实验肥胖鼠(obese mouse)服用三个星期结果, 降低血糖作用以外还有有效的防止或者延迟成人病以及老化。

并且, 本发明是把具有辅助食品, 辅助饲料, 土壤改良, 水质改善效能的 *Lactobacillus Fermentum* 突变菌株 *Lactobacillus Fermentum JS* 和酵母 *Pichia Kluyveri* 作为有效成分含有的有关酵母发酵乳酸菌合成物的内容。

上述酵母发酵乳酸菌合成物的制造方法如下。

在 MRS 培养基接种乳酸菌突变菌株(*Lactobacillus Fermentum JS*)菌和 *Pichia Kluyveri* 菌并在 35°C 培养 1~7 日。50l 培养箱里放入 50l 水并在 121°C 杀菌 10~15 分钟之后把水冷却到 30~45°C。

在培养基噬菌时乳酸菌和酵母的菌数比率是约 1: 10~10: 1 的范围内设定。

然后, 作为培养基合成物每 20l 水蛋白酶胨(protease peptone No. 3) 10~30g, 浓缩牛肉汁(beef extract) 6~20g, 葡萄糖 20~50g, 乙酸钠(sodium acetate) 6~20g 以及柠檬酸铵(ammonia citrate) 2~16g 放入培养箱里并稀释。

在无菌箱(clean bench)内 50ml 试验管里放入 40 ml 灭菌水之后把 MRS 培养基里培养的乳酸菌突变菌株(*Lactobacillus Fermentum JS*)菌以及 *Pichia Kluyveri* 菌放入试验管里稀释之后放入培养箱并在 30~45°C 培养

1~3 日就可培养乳酸菌数 1.5×10^8 /g, 酵母数为 4×10^6 /g 以上的酵母发酵乳酸菌。

并且, 把完成培养的酵母发酵乳酸菌使用离心机 1 分钟酵母发酵乳酸菌液体分离成 2~3ml 之后把分离的高浓缩酵母发酵乳酸菌集在一起冻结到 $-4 \sim -10^\circ\text{C}$, 然后按通常的方法混合葡萄糖 (dextrine) 粉末并冻结干燥之后包装在塑料袋子并按粉末形态制造。

上述酵母发酵乳酸菌的用途大概分为使用于健康辅助食品, 使用于动物的辅助饲料, 利用于土壤改良, 利用于水质改善, 利用于食品改良等。

有关各个用途的详细应用例子记述于发明的实施形态里如下简单说明。

作为健康辅助食品糖尿病患者, 便秘患者等服用时改善效果明显, 服用药品时因对药物的耐性而需要逐渐服用高单位药品, 但是服用酵母发酵乳酸菌就无耐性。

作为动物饲料给家畜 (牛, 猪, 鸡, 鸭子等) 饲养时不仅明显减少粪尿的恶臭, 而且尤其是饲养给奶牛时明显增加牛奶生产量。并且发酵家畜粪得到良好的推肥。并且给宠物狗或猫饲养时明显减少粪尿的恶臭, 还很良好的保持健康状态。

利用于土壤改良时把本发明的含有微生物合成物放入垃圾里发酵就成为推肥。把家畜粪 (尤其服用含有微生物合成物饲养的家畜粪更好) 里混合有机活性推肥 (柳杉或者偏白松的木屑里添加含有微生物合成物培养的推肥) 作为农作物推肥使用为好。尤其是发酵垃圾时消除垃圾的恶臭而得到很好的推肥并且使用家畜粪和有机活性推肥时完全无农药状态下栽培农作物。还有有机合成物混入学校等的沙地等时防止杂菌的繁殖。

利用于水质改善时把有机合成物放入河川, 大海或者水槽中。然后也可使用于大众澡堂或浴缸等。把含有微生物的合成物放入大海中时比如海带或养殖珍珠贝的海域里使用含有微生物合成物时抑制红潮或者水的腐败而对海带或贝壳的成长起良好的作用。并且放入河川时净化工厂的废水而改善河川的水质且保护其河川的鱼类。并且添加水槽中的是分解氯等的有害物质抑制青苔的发生良好的保持水质同时鱼类的发育良好。

然后把含有微生物合成物添加浴缸的水里时抑制水中的杂菌繁殖而经过长时间良好的保持水质同时净化从浴缸里流出的排水并明显的减少过滤槽或者管子内的异物或者水锈。

最后利用于食品改良时掺在饮料里的方法, 使用于盐或酱油食品的方法等。

以下参照本发明的实例说明本发明的技术范围并没有根据如此的实施形态限定，不变更发明要旨可按各种形态实施。然后本发明的技术范围是影响到均等的范围。

实施例 3 乳酸菌木屑的制造

柳杉以及偏白松的木屑里混合酵母发酵乳酸菌之后培养的称为乳酸菌木屑。就是说柳杉木屑 5kg 或者偏白松木屑 5kg 里混合约 3ℓ的酵母发酵乳酸菌在约 10℃培养 15 日并称为乳酸菌木屑。这里每 1g 含有 5×10^6 个的乳酸菌和 3×10^5 个的酵母菌。

试验例 6 含有微生物合成物的效果试验

配合饲料中按约 0.5~5 重量%的比率添加酵母发酵乳酸菌粉末的饲料给牛（奶牛以及肥肉牛）饲养。服用时期是购入 1~3 个月以后开始用混合含有微生物合成物的配合饲料饲养。肥肉牛时预定出荷 4 月之前开始喂适当量稀释酵母发酵乳酸菌粉末的乳酸菌水。

其结果肥肉牛以及奶牛都喜欢吃加强了疾病的适应力。因此种付率比传统大大提高 70~90%。然后毛的发育良好减少了粪的恶臭。并且肥肉牛里得到高级肉可生产 60%以上的效果。然后奶牛的牛奶生产量上升约 20%左右。

实施例 4 发酵饲料的制造

把栽培各种菇之后发生的废培养基 1,000kg，米糠 100kg，芝麻渣 (sesame dregs) 80kg，2ℓ酵母发酵乳酸菌放入发酵机里并在 30~45℃发酵 2~4 日，就可制造每 1g 废培养基含有乳酸菌 2.7×10^7 /g 个以上，酵母 1.2×10^8 /个以上的乳酸菌和酵母的发酵饲料并以家畜饲料利用。

表 6

分析项目	单位	分析结果	备注
水分	%	54.29	
粗蛋白质	%	3.31	
粗脂肪	%	2.07	
粗纤维	%	19.06	
粗灰分	%	3.46	
可溶性无氮物	%	17.81	
碳水化合物	%	36.87	
热量	Kal/kg	2250	
乳酸菌水	Cfu/g	2.7×10^7	
酵母数	Cfu/g	1.2×10^8	

实施例 5 有机堆肥的制造

在上述的有机合成物的效果试验(1)得到的牛粪里混合乳酸菌木屑并培养之后干燥的肥料为有机堆肥 A。或者干燥的豆渣里混合酵母发酵乳酸菌并培养的约每 1 吨牛粪里混合约 0.5~1.0 重量%放在常温培养的肥料为有机堆肥 A。

试验例 6 含有微生物合成物的效果试验(2)

制造对鸡粪质量 1 添加约 1 质量的酵母发酵乳酸菌并混合的堆肥时如表 7 所示大幅度减少从氨水, 甲硫醇流出的味道成分的浓度。

因此减少味道而可生产易于使用的堆肥。

表 7

测定项目名	鸡粪	鸡粪+豆渣菌	臭气强度 2.5
氨水	100	3.6	1.0
甲硫醇	0.0027	0.0071	0.002
硫化氢	<0.006	0.014	0.02
甲硫醚 Sulfide of methyl	0.15	0.13	0.01
甲基二硫醚 disulfide of methyl	0.012	0.0046	0.009
三甲胺 tri-methyl-amine	0.081	0.051	0.005
propionic acid	<0.01	<0.01	0.03
正丁酸 normal butyric acid	<0.0004	<0.0004	0.001
正缬草酸	<0.0005	<0.0005	0.0009
异戊酸	<0.0001	<0.0001	0.001

- 1) 恶物质浓度的范围: ppm(v/v)
- 2) <: 未滿的表示
- 3) 表示相当于臭气强度 2.5 的恶臭物质浓度和恶臭指数范围

表 7 中的恶臭物质的浓度单位是用 ppm (v/v) 表示。记号< 是显示测定值未滿或臭气强度 2.5 例子表示的数值是相当于其臭气强度的恶臭物质浓度以及臭气指数的范围。

试验例 8 含有微生物合成物的效果试验(3)

对宠物狗以及猫每 1kg 体重约喂 1~2g 酵母发酵乳酸菌。而且饮水服用把酵母发酵乳酸按约 1 重量%混合的水。其结果宠物狗以及猫的健康状态良好同时减少了体味以及粪的味道。

试验例 9 含有微生物合成物的效果试验 (4)

使用适当的容器首先容器内放入约 3kg 的土。其土上放入约 1.5kg 的垃圾并重新其上面均匀的洒 5ℓ 的乳酸菌木屑。拿出约 3 日培养的混合物结果几乎没有垃圾的味道。并且把混合物搬到耐热性的烧杯之后放到设定 120℃ 的微波炉里并烧杯内的温度约成为 100℃ 的起点加热干燥 30 分钟。干燥处理经过 10 分钟之后把烧杯内的物质放到报纸上面并冷却。

此物质干燥之后可使用为方便使用的有机堆肥。

并且,此有机堆肥里放入水也无味道。然后混合物干燥之前也约经过 2 个星期就以有机堆肥使用。每 1g 混合物里含有约 1.5×10^7 个的乳酸菌。并且作为对照试验容器里放入 3kg 的土之后其上面放入约 1.5kg 的垃圾并其上面均匀的洒 5ℓ 的木屑(不含有乳酸菌)。但是此容器内存的臭。

试验例 10 含有微生物合成物的效果试验 (5)

三月下旬把山土搬运到实验农场而四月上旬混合约 50ℓ 乳酸菌木屑并放置约一个星期。然后其土上混合约 1000kg 有机堆肥 A 的土以栽培用土使用。每 1g 栽培用土里含有约 4×10^4 个~ 1×10^5 左右的乳酸菌。

实例 6 栽培西红柿

从 5 月上旬开始到下旬栽培用土里种西红柿(品种:桃太郎)到收获为止经过两次施有机堆肥 A。然后并没有撒布植物成长荷尔蒙或药剂等。其结果收获品质,收获量都良好的西红柿。然后作为对照试验并不使用乳酸菌木屑或者有机堆肥 A 而使用传统的化学肥料的情况是推肥两次并为了预防疾病撒布药剂。

实例 7 栽培西瓜

5 月上旬栽培用土里种西瓜(tugiki 西瓜)。到收获为止每约一次施有机堆肥 A。但并没有撒布植物成长荷尔蒙或药剂等。其结果可收获比其他农家的西瓜成长快害虫少的西瓜。然后作为对照试验并不使用乳酸菌木屑或者有机堆肥 A 而使用传统的化学肥料的情况是必须定期堆肥并撒布药剂。

然后对青椒也进行相同的试验并得到如上述西红柿以及西瓜良好的结果。像这样使用有机堆肥 A 以及乳酸菌木屑且并不使用其它植物荷尔蒙或农药以无农药栽培。此外栽培状态在品质,收获量两个方面都很良好害虫很难寄生。有机堆肥 A 以及乳酸菌木屑使植物对自然的能力按良好的状态出现。

试验例 11 含有微生物合成物的效果试验 (6)

把约 700kg 乳酸菌木屑放入到具有小孔的袋子里并把这些吊在珍珠养殖用竹子里且浸在水中养殖珍珠贝壳。从吊乳酸菌木屑开始经过约 2 个月

时在每 1g 珍珠贝壳体内确认约 4×10^3 个的乳酸菌。竹子附近的海水按良好状态被保存珍珠贝壳顺利成长而得到状态良好的珍珠。

试验例 12 含有微生物合成物的效果试验 (7) 参照图 2

在 6 所普通家庭或者工厂把流入排水的水路 1 (幅度约 2m) 制造按约 20cm 长度的铁丝网 2, 3 并作为实验用水路 4 使用。约 5kg 乳酸菌木屑放入网丝袋子 5 里并放入实验用水路 4 的上流铁丝网 2 里使浸水。然后实验用水路 4 的水里放流鲤鱼, 鲫鱼, 鲶鱼以及鲑鱼。图 2 中的箭头是流水方向。

从实验开始约经过 20 日的起点实验用水路的内侧发生水草荸荠。此水草荸荠在污水里无法观察到的种类。然后鲤鱼以及鲫鱼继续以健康的状态活着。尤其烹饪此鱼类并食用结果在内脏无味道而好吃。

然后鲶鱼以及鲑鱼在水质不良的场所是不能生育。从实验开始约经过半年时观察到放流在此实验水路种的鲶鱼以及鲑鱼都以良好的状态生育。从开始实验经过 6 个月时每 1ml 实验用水路的下流侧的水里确认约 1×10^2 个左右的乳酸菌。

表 8 测定石水溪的水以及此石水溪附近的实验用水路的上流或者下流的水质的成绩。根据此成绩因为把乳酸菌木屑浸在水里而实验用水路内的水质被良好的保持尤其氨水以及醋酸盐的数值被减少。

表 8 实验水路的水质测定结果

	最上流	从最上流离 6km 的下流私家, 高尔夫	从最上流离 12km 的下流私家	从实验水路约离 1km 的上流里私家内	从实验水路约离 200m 的上流	实验水路	从实验水路约离 50m 的下流
Ph (paper)	6.5	7.0	7.5	8.0	7.3	7.0	7.0
GH (总硬度)	2°	2°	3°	5°	3°	3°	3°
NH ₃ (氨水浓度)	0.0ppm	0.2ppm	0.2ppm	0.25ppm	0.25ppm	0.0ppm	0.0ppm
NO ₃ (醋酸盐)	6.0mg/ℓ	12.5mg/ℓ	50.0mg/ℓ	50.0mg/ℓ	25.0mg/ℓ	10.0mg/ℓ	25.0mg/ℓ
NO ₂ (亚醋酸)	0.1mg 以上	以上	0.15mg	0.1mg 以下	0.1mg 以下	0.1mg 以下	0.1mg 以下
CO ₂ (二氧化碳)	4mg	4mg	6mg	10mg	6mg	6mg	4mg
O ₂ (氧气)	14mgO ₂ /ℓ	14mgO ₂ /ℓ	8mgO ₂ /ℓ	5mgO ₂ /ℓ	11mgO ₂ /ℓ	11mgO ₂ /ℓ	8mgO ₂ /ℓ
COD (ppm)	2mgO/ℓ	4mgO/ℓ	4mgO/ℓ	6mgO/ℓ	2mgO/ℓ	2mgO/ℓ	2mgO/ℓ

试验例 12 含有微生物合成物的效果试验 (7)

大众澡堂的难处是第一定期使用强力洗涤剂清扫而不能充分的擦净包括通过澡堂的管子中附着的水锈，第二因水锈容易附着在过滤槽而要经常清扫。然后第三每天要打扫浴缸并且瓷砖的连接部位沾着污秽而不能完全消除浴缸内的怪味。第四使用之后排水澡堂的水路里附着异物而容易放出怪味并容易发生青苔或蚊子。最后浴缸里放入香料时此香的材料每日必需供应3~4回而很难保持味道。

在此大众澡堂的浴缸里混入酵母发酵乳酸菌。即对约1吨的澡堂水混入约5kg的酵母发酵乳酸菌。然后把适量的乳酸菌木屑放入网丝袋子里并放入澡堂的浴缸中。

其结果第一通过浴缸水的管子中完全除掉异物而并没有残留其以上的异物。第二无水锈而减少了过滤槽的打扫次数。第三完全感觉不到浴缸里的怪味浴缸里的水锈也少了。第四几乎没有水路的味道抑制生青苔或蚊子的发生。最后放入香料时香味可放出很多长时间持续香味等。

试验例 13 有机合成物的效果试验(8)

饲养热带鱼或者金鱼等的观赏用鱼类的水槽把每45~60cm净化装置放入一个乳酸菌的袋子(正确的说把乳酸菌放入如多孔的海绵物质里)浸在水中。其结果水槽中的观赏鱼鱼类的健康状态良好而容易管理。然后减少水槽内的青苔的发生而良好的保存水质。并且观赏用鱼类以及水槽荸荠的发育良好。

工业应用性

如以上所述,含有根据本发明的乳酸菌突变菌株(Lactobacillus Fermentum JS)菌的乳酸菌发酵饮料和传统的乳酸菌不同耐热和酸并分解学术上认为不可能的氨水成分的具有新的性质,降低血糖也显示卓越的效能。对如此的菌开发和此菌的血糖降低很有效果的实验结果是对糖尿病患者来说不仅消除因药物的副作用和周期性的胰岛素供应的不便,而且用本研究的结果提供新的治疗方法而大大贡献于国民的健康增进。

像这样培养本实施形态的酵母发酵乳酸菌并制造的含有微生物的合成物是可利用于动物,鱼类等的生物,土壤的改良,水质的改善,食品的改良等上并利用这些时得到很良好的结果。

序列表

序列表 1

- <110> 崔 正 植(CHOI, Jung Sik)
- <120> 一种耐酸性乳酸菌突变菌株和其合成物及其合成物的用途
- <160> 1
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 1518
- <212> DNA
- <213> 乳酸菌(*Lactobacillus fermentum*)
- <400> 1

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgcc ggcggtgtgc ctaatacatg caagtcgagc      60
gcgttgccc aattgattga tgggtcttgc acctgattga ttttggtcgc caacgagtgg      120
cggacgggtg agtaacacgt aggtaacctg cccagaagcg ggggacaaca tttggaaaca      180
gatgctaata ccgcataaca acgttgttcg catgaacaac gcttaaaaga tggcttctcg      240
ctatcacttc tggatggacc tgtggtgcat tagcttgttg gtggggtaat ggcctaccaa      300
ggcgatgatg catagccgag ttgagagact gatcggccac aatgggactg agacacggcc      360
catactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttcacaa tgggcgcaag cctgatggag      420
caacaccgcg tgagtgaaga agggtttcgg ctcgtaaagc tctgttgta aagaagaaca      480
cgtatgagat taactgttca tacgttgacg gtatttaacc agaaagtcac ggctaactac      540
gtccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg caacgttat ccggatttat tgggcgtaaa      600
gagagtgcag gcggttttct aagtctgatg tgaaagcctt cggcttaacc ggagaagtgc      660
atcgaaact ggataacttg agtcagaag aggtagtgg aactccatgt gtagcgggtg      720
aatgcgtaga tatatggaag aacaccagtg gcgaaggcgg ctacctggtc tgcaactgac      780

```

gctgagactc gaaagcatgg gtagcgaaca ggattagata ccctggtagt ccatgccgta	840
aacgatgagt gctaggtggt ggagggtttc cgcccttcag tgccggagct aacgcattaa	900
gcactccgcc tggggagtac gaccgcaagg ttgaaactca aaggaattga cgggggccccg	960
cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagctacgcg aagaacctta ccaggtcttg	1020
acatcttgcg ccaaccctag agatagggcg tttccttcgg gaacgcaatg acaggtggtg	1080
catggtcgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc	1140
cttgttacta gttgccagca ttaagttggg cactctagtg agactgccgg tgacaaaccg	1200
gaggaagggt gggacgacgt cagatcatca tgccccttat gacctgggct acacacgtgc	1260
tacaatggac ggtacaacga gtcgcgaact cgcgagggca agcaaatctc ttaaaaccgt	1320
tctcagttcg gactgcaggc tgcaactcgc ctgcacgaag tcggaatcgc tagtaatcgc	1380
ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcacacat	1440
gagagtttgt aacacccaaa gtcggtgggg taacctttta ggagccagcc gcctaagggtg	1500
ggacagatga	ttagggtg
1518	

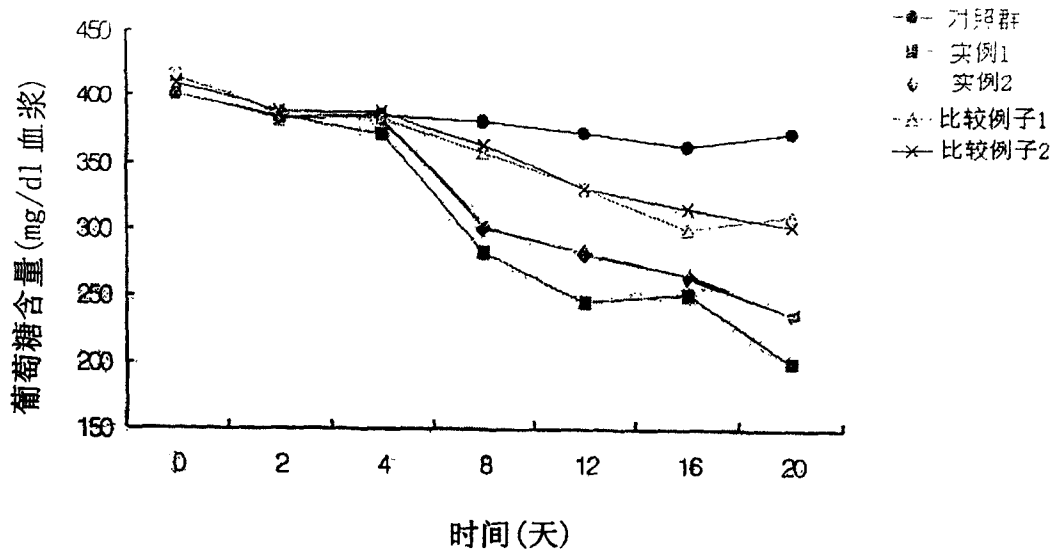


图 1

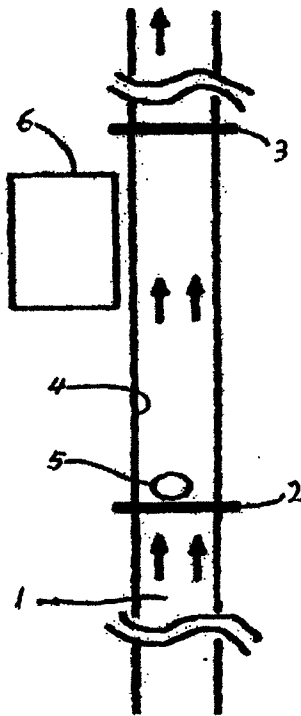


图 2