



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I683901 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：103122211 (22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 06 月 27 日

(51)Int. Cl. : C12N1/20 (2006.01) C12P1/04 (2006.01)
 C05F11/08 (2006.01) A62D3/02 (2007.01)
 C12R1/07 (2006.01) A62D101/45 (2007.01)

(30)優先權：2013/06/28 世界智慧財產權組織 PCT/JP2013/067907

(71)申請人：日商日環科學股份有限公司(日本) JAPAN ECO-SCIENCE CO., LTD. (JP)

日本

國立大學法人千葉大學(日本) NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY (JP)

日本

日商三六九股份有限公司(日本) MIROKU CO., LTD. (JP)

日本

日商京葉設備工程股份有限公司(日本) KEIYO PLANT ENGINEERING CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：宮本浩邦 MIYAMOTO, HIROKUNI (JP)；兎玉浩明 KODAMA, HIROAKI (JP)；
 宮本久 MIYAMOTO, HISASHI (JP)；西內巧 NISHIUCHI, TAKUMI (JP)；石川一人
 ISHIKAWA, KAZUTO (JP)；小川和男 OGAWA, KAZUO (JP)；井藤俊行 ITO,
 TOSHIYUKI (JP)；上平拓也 KAMITAI, TAKUYA (JP)；大島健志朗 OSHIMA,
 KENSHIRO (JP)；須田互 SUDA, WATARU (JP)；服部正平 HATTORI,
 MASAHIRA (JP)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

CN 102627514A

CN 102844038A

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：12 共 49 頁

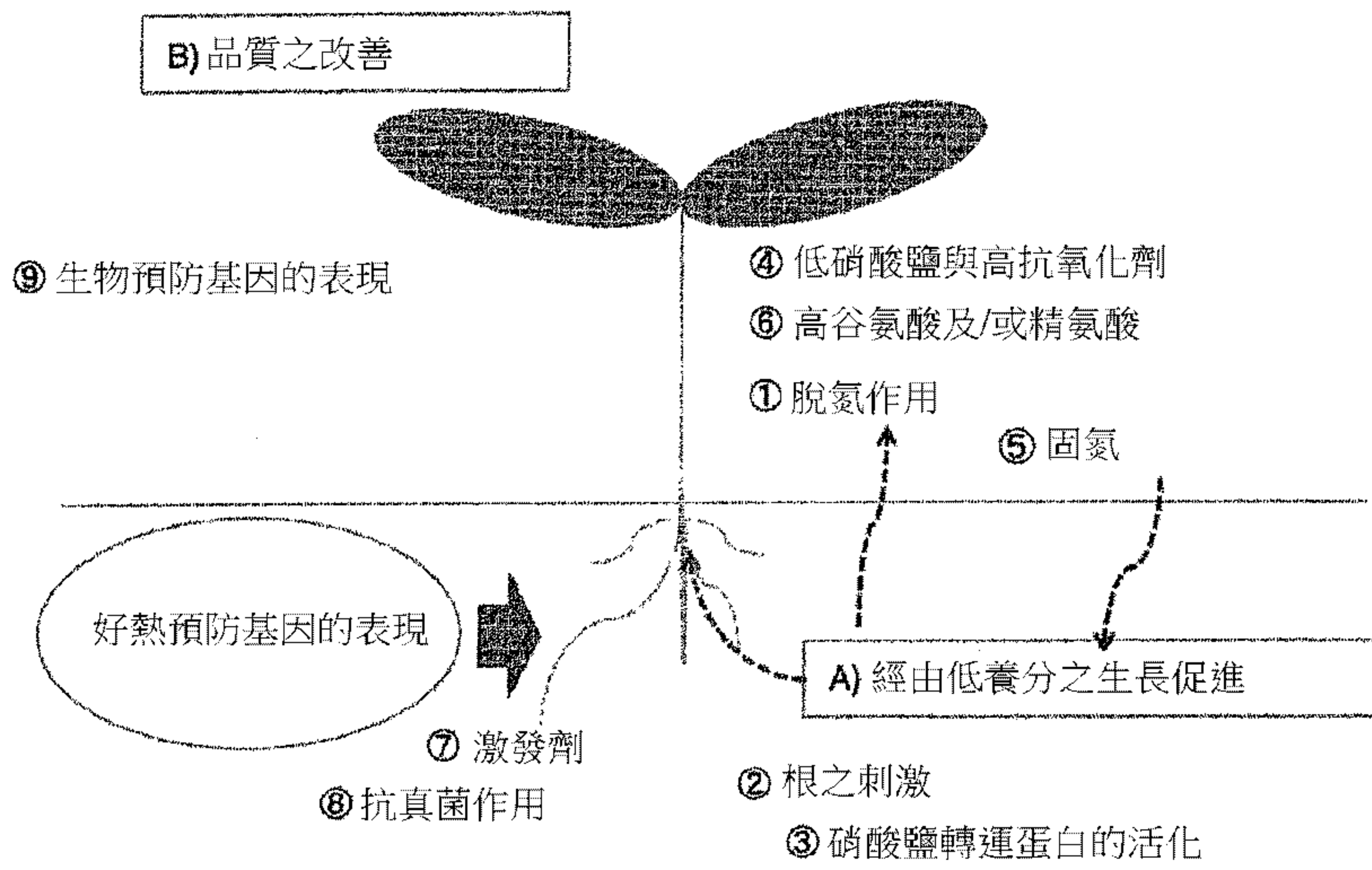
(54)名稱

土壤／水質污染之改善、暖化氣體產生之抑制、使植物機能性向上之微生物材料以及發酵產品之製造方法

(57)摘要

提供對環境友善且提升作物品質的功能性微生物材料，以及發酵產品的製造方法。本發明係關於一種微生物材料和發酵物產的製造方法的發明，所述微生物材料係將含有植物性原料與動物性原料的發酵原料，藉由使用含有複數之生物種之好熱性微生物的微生物群來發酵來獲得，且對土壤、水質污染的改善，與一邊對暖化氣體發生抑制，一邊對植物的功能性提升，特別是生物防禦相關基因和耐高溫障礙基因的表現，抗氧化成分的增加產生貢獻。使用具有環境修復功能和對於植物之激發劑(elicitor)功能的微生物群，以不依賴基因重組的方式，發展植物的品質強化。並且，繼續在通常的生產活動中保全、修復自然環境的負荷。

指定代表圖：



第1圖

I683901

發明摘要

※ 申請案號：103122211

※ 申請日：103年6月27日

※IPC 分類：

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

A62D 3/02 (2007.01)

C12R 1/07 (2006.01)

A62D 101/45 (2007.01)

【發明名稱】(中文/英文)

土壤/水質污染之改善、暖化氣體產生之抑制、使植物機能性向上之微生物材料以及發酵產品之製造方法

【中文】

[課題] 提供對環境友善且提升作物品質的功能性微生物材料，以及發酵產品的製造方法。

[解決手段] 本發明係關於一種微生物材料和發酵物產的製造方法的發明，所述微生物材料係將含有植物性原料與動物性原料的發酵原料，藉由使用含有複數之生物種之好熱性微生物的微生物群來發酵來獲得，且對土壤、水質污染的改善，與一邊對暖化氣體發生抑制，一邊對植物的功能性提升，特別是生物防禦相關基因和耐高溫障礙基因的表現，抗氧化成分的增加產生貢獻。使用具有環境修復功能和對於植物之激發劑(elicitor)功能的微生物群，以不依賴基因重組的方式，發展植物的品質強化。並且，繼續在通常的生產活動中保全、修復自然環境的負荷。

【英文】

無。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

土壤/水質污染之改善、暖化氣體產生之抑制、使植物機能性向上之微生物材料以及發酵產品之製造方法

【技術領域】

【0001】 本發明關於一種微生物材料和發酵產品的製造方法，所述微生物材料係將含有植物性原料與動物性原料的發酵原料，藉由使用含有複數之生物種之好熱性微生物的微生物群來發酵來獲得，且對土壤、水質污染的改善，與一邊對暖化氣體發生抑制，一邊對植物的功能性提升，特別是生物防禦相關基因和耐高溫障礙基因的表現，抗氧化成分的增加產生貢獻。

【先前技術】

【0002】 近幾年，環境問題以世界規模變得嚴重，例如，從環境方面，捉住農業的話化學肥料和未熟堆肥被施用於農地之後，經由滲透到地下水的硝酸離子的污染和為來自土壤之暖化氣體的一氧化二氮的產生被看待為問題。地球暖化的影響，在作物栽培上成為高溫障礙的原因，也成為引起疾病之發生的環境主要原因。此外，把全世界的糧食問題作為背景，雖然在要求有效地生產作物的技術中，使用化學肥料和農藥的有效的運用成為不可缺少的情況，不過，這些材料成為上述的環境破壞的主要原因。另一方面，對環境與健康友善的農業生產技術被要求，且在材料和設施中之手段和淨化技術等的各種各樣的技術開發被發展（參見專利文獻1-3）。專利文獻1為關於經由

糖發酵有機酸水溶液與鎂或鈣的情況使尿素共存而解決了上述課題的葉面散佈劑。此專利文獻1，雖然確認了有關硝酸減輕能力，但，其機制並不明，且也沒有伴隨對其他之環境與植物之功能性給予的影響。專利文獻2為，UV光源為波長區域280~380 nm，且其特徵在於在波長312 nm的附近具有波峰者。此專利文獻2，係關於人工光型之植物工廠中適用可能之最適合電照控制的知識，且沒有伴隨對其他之植物之功能性給予的影響。專利文獻3為關於利用醇類之硝態氮以及揮發性有機化合物的降低方法者。此專利文獻3，為關於來自土壤之硝酸與揮發性有機物的降低技術者，且因為採用醇類等，並非能適用於農業現場者。

【0003】 又，雖然即使在惡劣環境條件下植物也能應對的分子機序也變得清楚（參見非專利文獻1~5），然而，能看見將其機制活用的技術是如基因重組技術之難以被社會所接受的技術（非專利文獻6~8）。非專利文獻1~5為是關於關係到抗病性、耐高溫障礙性的HSP參與的知識，沒有如本發明一般，關於對植物體的總體的影響評價等被認可。又，非專利文獻6~8，為關於基因重組技術的知識，不能說是如本發明一般，沒有伴隨基因重組，且具有硝酸減輕、抗氧化物質的增量、生物防禦功能、耐高溫障礙等的多方面的功能的技術。

【0004】 另一方面，發明人等，進行了使用了含有枯草芽孢桿菌 (*Bacillus brevis*) 和嗜熱脂肪芽孢桿菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、嗜熱放線菌 (*Thermophilic actinomycetes*) 與那些之近緣的種等之複數的生物種的好熱性微生物的微生物

物群的發酵材料的開發（參見專利文獻4-7）。

專利文獻

【0005】 專利文獻1：日本特開2006-036684號公報

專利文獻2：日本特開2008-086272號公報

專利文獻3：日本特開2002-370085號公報

專利文獻4：日本特許第3146305號公報

專利文獻5：日本特許第3314302號公報

專利文獻6：日本特許第3385402號公報

專利文獻7：國際公開WO2011/099514

非專利文獻

【0006】 非專利文獻1：Jarosz1 DF and Susan Lindquist1 S. (2010) Hsp90 and Environmental Stress Transform the Adaptive Value of Natural Genetic Variation. *Science* 330: 1820-1824.

非專利文獻2：Yule Liu et al. (2004) Molecular Chaperone Hsp90 Associates with Resistance Protein N and Its Signaling Proteins SGT1 and Rar1 to Modulate an Innate Immune Response in Plants. *J.Biol.Chem.* 279: 2101-2108 .

非專利文獻3：Jae-Heung K et al. (2000) Upregulation of an Arabidopsis RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *The Plant Journal* 47: 343-355.

非專利文獻4：Snyman M and Cronje MJ. (2008) Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. *Journal of*

Experimental Botany 59: 2125–2132.

非專利文獻5：William B. Gurley (2000) HSP101: A Key Component for the Acquisition of Thermotolerance in Plants. *The Plant Cell*, Vol. 12, 457-460 .

非專利文獻6：Enikeev AG et al. (2010) Tobacco cell cultures transformed by the hsp 101 gene exhibit an increased resistance to potassium fluoride *Dokl Biol Sci* 430: 29-30.

非專利文獻7：Montero-Barrientos M et al. (2010) Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *J Plant Physiol* 167: 659-65.

非專利文獻8：Prieto-Dapena P et al. (2006) Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol* 142: 1102-12.

【發明內容】

發明欲解決的課題

【0007】 到目前為止的農業中，變成化學肥料使用過多，結果產生滲透到地下水的硝酸污染和來自在農地增殖之黴菌之暖化氣體一氧化二氮的發生的問題。又，隨著地球暖化，作物之高溫障礙和疾病的誘發等成爲問題。因此，需要對環境友善且使作物之品質提升的技術。

【0008】 本發明係提供一種解決上述問題之功能性微生物者。由於具有土壤和水環境經常變動的主要原因，因此對這樣的變動主要原因，不是單一的菌種，而是具有經由複合的微生

物群顯示多功能性功效的必要。例如，取使作物生長之土壤作為例子的話，則降雨的時期，土壤的水分多，雨少的時期，土壤乾燥。依照這些變動，為了安定地使植物的功能提升以調節之方式複合地來對應。

為了解決問題的手段

【0009】 I. 好熱菌發酵產品對土壤、地下水污染以及暖化氣體產生給予的影響

1. 使土壤中的硝酸離子濃度減輕。
2. 該反應經由對氯霉素等的抗生素感受性高的微生物（以及其酵素）被抑制。
3. 促進從土壤之脫氮反應。特別是抑制 N_2O 之產生，且促進 N_2 的產生。由於 N_2O 氣體具有 CO_2 之約300倍的溫暖化係數，因此其之產生抑制是重要的。這個反應被認為是經由來自黴菌的P450nor被促進，而本發明之發酵產品（其含有微生物NP-1株）為具有抑制黴菌之增殖的功效，且將 N_2 氣體優先脫氮的基因群起作用。

4. 藉由以上反應，結果使關於經由從土壤滲透到地下水之硝酸的水質污染也減輕。

5. 藉由耐鹽性、耐鹼性的細菌（大洋芽孢桿菌(*Oceanobacillus*)屬、枝芽孢桿菌(*Virgibacillus*)屬），使鹽濃度高（10%左右）之污染水的水質淨化成為可能。

【0010】 II. 好熱菌發酵產品對植物之功能性給予的影響

1. 藉由好熱菌的作用，使根的硝酸鹽轉運蛋白(nitrate transporter)活化，並效率良好地利用土壤中的硝酸。

2. 使根毛發達，並藉由植物激素的活化等，促進成長。
3. 藉由以上的反應，效率良好地利用來自土壤的氮，並使以少的氮量增產成爲可能。
4. 根據來自HSP群的酵素修復功能，培育耐熱性植物。
5. 抗氧化劑根據麩胱甘太轉化酵素 (glutathione transferase)以及維生素A、C、E等的增加成爲豐富的作品。
6. 抑制經由LTP與蛋白酶抑制劑 (protease inhibitor)等之活化的植物病原菌以及植物害蟲的發生。

【0011】 本發明的功能性材料可以是發酵原料爲由約70重量%～約80重量%的植物性原料和約30重量%～約20重量%的動物性原料所構成者。

【0012】 又，本發明之功能性材料能爲藉由使用含有寄存編號：NITE BP-1051之微生物的微生物群來發酵所獲得者。經由寄存編號爲ATCC PTA-1773的微生物等，能圖謀其功能性的穩定化。

【0013】 此外，又，本發明的功能性材料所包含括的微生物群能是 10^8 個/g～ 10^9 個/g。

【0014】 又，於本發明的功能性材料中能使用的植物性原料能是選擇自，由米糠、麥糠、小麥麩、大豆餅、豆腐渣、酒粕、燒酒粕、茶粕、咖啡粕、榨果實的渣滓，以及榨蔬的渣滓所構成的群的1或複數個。另外，於本發明中能使用的動物性原料能是選擇自，由甲殼類、魚類、甲殼類加工殘餘物以及魚類加工殘餘物所構成的群的1或複數個。

【0015】 又，本發明另外的功能性材料，是含有上述的功

能性材料約1重量%~約5重量%的功能性材料。

【0016】 又，本發明為含有攪拌植物材料和動物原料得到發酵原料的攪拌步驟，與將攪拌步驟中獲得的發酵原料，使用寄存編號為ATCC PTA-1773的微生物群發酵的發酵步驟的功能性材料的製造方法。

發明的效果

【0017】 根據本發明，如第1圖所示，本發明材料中之有效微生物群之安定性高的酵素群，不是使土壤中之硝酸離子往地下滲透，而作為氮氣脫氮，並經由利用那刺激等，而誘導生根，與使根中之硝酸鹽轉運蛋白活化。據此，即使是少的營養成分植物也生長，且植物體中的硝酸濃度變少，同時抗氧化活性高的成分增加分量。其次，本材料中的有效微生物本身，和根據那些而活化的土壤中的有效微生物群，以土壤，和與植物共生的形式，固定空氣中的氮氣，且結果植物體內的谷氨酸和精氨酸濃度等增加。此外，由於本材料中的安定性高的微生物的細胞壁成分等的影響，植物本身的生物防禦關聯基因和壓力耐性基因群的發減量增加。同時，由於本材料中的微生物所分泌的環脂肽(cyclic lipopeptide)與耐熱性酵素等的影響，病原性的高的絲狀菌的增加被抑制，而總體上植物的品質以及功能提升。作為這樣的作用機序的結果，1) 作為對土壤、地下水污染、水質污染，和暖化氣體產生給予的影響，在土壤，水質中的硝酸污染與大氣中被放出的暖化 N_2O 氣體的產生抑制變成可能。又，在工業排水，藉由使用耐鹽性、耐鹼性的細菌的性質等，使迄今為止為淨化困難之高鹽濃度、高鹼度環境的排水處

理成爲可能。2) 作爲好熱菌發酵產品對植物的功能性給予的影響，可以增產低硝酸化功能和高濃度的抗氧化物質。同時，藉由增強作物中之酵素修復功能的HSP等來迴避高溫障礙，且藉由LTP和蛋白酶抑制劑等的效果，能使對害蟲提高忌避性等之對於環境壓力的生物防禦系活化。

【圖式簡單說明】

【0018】

[第1圖] 爲顯示經由本發明之功能性微生物材料對土壤、植物與環境給予的影響的模式圖。

[第2圖] 爲顯示使本發明之功能性材料穩定化之時候的複合微生物系的細菌門的圓形圖表。

[第3圖] 爲顯示本發明之功能性材料之添加量依存的植物體內的硝酸降低效果的圖表。顯示作爲模型植物之白犬薺 (*Arabidopsis thaliana*) 體內之硝酸濃度的變化。

[第4圖] 爲顯示本發明之功能性材料的添加量依存的土壤中的硝酸降低效果的圖表，且顯示土壤中的硝酸濃度的變化。

[第5圖] 爲顯示藉由本發明之功能性材料栽培的油菜之根的長度的實驗結果的圖表。

[第6圖] 爲顯示在藉由本發明之功能性材料栽培之白犬薺之根中的硝酸鹽轉運蛋白(nitrate transporter)之表現量的實驗結果的圖表。

[第7圖] 爲顯示藉由本發明之功能性材料，實施乙炔抑制法(acetylene block method)的時候土壤中之硝酸濃度的變化的

實驗結果的圖表。

[第8圖] 為顯示藉由本發明之功能性材料，從實施乙炔抑制法的時候的土壤產生作為 N_2O 積蓄之濃度的實驗結果的圖表。

[第9圖] 為顯示藉由本發明的功能性材料，在白犬薺體內積蓄之銨離子的濃度的實驗結果的圖表。

[第10圖] 為顯示藉由本發明的功能性材料，在白犬薺體內積蓄之谷氨酸和穀氨醯胺的濃度的實驗結果的圖表。

[第11圖] 為顯示藉由本發明的功能性材料，在白犬薺體內積蓄之脯氨酸的濃度的實驗結果的圖表。

[第12圖] 為新的類芽孢桿菌屬(*Paenibacillus*)之16SrRNA的鹼基序列的系統樹。

【實施方式】

為了實施發明的形態

【0019】 接著，說明關於為了實施本發明的形態，但，本發明不被這些實施形態所限定。

【0020】 本發明提供一種功能性微生物材料，其係將含有植物性原料與動物性原料的發酵原料，藉由使用含有複數之生物種的好熱性微生物的微生物群來發酵來獲得，且具有對土壤、水質污染的改善，與一邊暖化氣體發生抑制，一邊對植物的功能性提升產生貢獻的功能。

【0021】 能認為包含於本發明之功能性材料中的微生物群，及其代謝物產，藉由對經該功能性材料施肥的土壤的微生物相起作用，與在調節在土壤的硝酸還原反應的同時調節脫氮

反應，來調節土壤、地下水、植物、朝大氣的氮循環。又，能認為藉由土壤微生物相的變化，植物的基因表現圖形變化，來誘導熱休克蛋白(heat shock protein, HSP)和抗氧化成分等。

【0022】 於本發明中能使用的微生物群為含有複數之生物種的好熱性微生物。作為具體的生物種，能列出枯草芽孢桿菌(*Bacillus brevis*)、嗜熱脂肪桿菌(*Bacillus stearothermophilus*)、熱噬澱粉芽孢桿菌(*Bacillus thermoamylovorans*)、嗜熱放線菌(*Thermophilic actinomycetes*)及其近緣的種等。其中，於本發明中能使用的微生物群，以含有為寄存編號：ATCC PTA-1773的微生物及為BP-1051的微生物者為宜。

【0023】 寄存編號：ATCC PTA-1773的微生物係含有為枯草芽孢桿菌(*Bacillus brevis*)之近緣的種的好熱性細菌C-1，為枯草芽孢桿菌之近緣的種的好熱性細菌C-3，及為嗜熱脂肪桿菌(*Bacillus stearothermophilus*)之近緣的種的好熱性細菌CH-4、好熱性放線菌MH-1、為凝結芽孢桿菌(*Bacillus coagulans*)之近緣的種的好熱性或耐熱性乳酸菌LM-1，及為凝結芽孢桿菌之近緣的種的好熱性或耐熱性乳酸菌LM-2的混合菌。

【0024】 本發明的功能性材料以含有約 10^8 個/g $\sim 10^9$ 個/g的微生物群為宜。又，本發明的功能性材料以含有約 10^8 個/g $\sim 10^9$ 個/g之寄存編號：ATCC PTA-1773的微生物與約 10^6 個/g $\sim 10^7$ 個/g之寄存編號：NITE BP-863的微生物為較佳。

【0025】 於本發明中能使用的功能性材料以10重量% ~ 1 重量%之寄存編號：NITE BP-1051的微生物為宜。作為該細菌群，

能列舉出，好熱性的微生物的芽胞桿菌(Bacillus)屬、賴氨酸芽胞桿菌(Lysinibacillus)屬、枝芽胞桿菌屬(Virgibacillus)屬、厭氧芽胞桿菌屬(Anoxybacillus)屬、類芽胞桿菌(Paenibacillus)屬。此外，藉由與包含異常球菌-棲熱菌(Deinococcus-Thermus)門的亞棲熱菌(Meiothermus)屬、火山棲熱菌(Vulcanithermus)屬、棲熱菌(Thermus)屬、海洋芽胞桿菌(Oceanobacillus)屬等的嗜熱菌接種物(Thermophiles inoculum) MIROKU M2k共存來將微生物材料穩定化。這些微生物群嗜熱菌接種物(Thermophiles inoculum) MIROKU M2k，由於因複合菌且難培養性而被製品評價技術基盤機構(NITE)拒絕寄存，因此在株式會社三六九(大分縣杵築市)被保存。且，作為這樣之可共存的微生物群，也能利用寄存於ATCC之寄存編號PTA-1773。

【0026】 所謂於本發明中能使用的植物性原料，為來自蔬菜和穀物等之植物的原料，可以使用食物殘渣等之廉價的材料。具體而言，可列舉出，米糠、麥糠、小麥麩、大豆餅、豆腐渣、酒粕、燒酒粕、茶粕、咖啡粕、榨果實的渣滓，以及榨蔬的渣滓等。

【0027】 所謂於本發明中能使用的動物性原料，為來自魚類與甲殼類等之動物的原料。具體而言，可列舉出，甲殼類、魚類及其加工殘餘物等。

【0028】 作為甲殼動物，能利用被稱為蝦與螃蟹、寄居蟹等的生物。又，作為魚類，能利用被拖網拉上來的底棲魚類，與由捕漁所獲得但在市場不被銷售之未利用魚等。此外，能也利用作為食品用而被加工之甲殼類以及魚類的殘餘物。

【0029】 於本發明中能使用的發酵原料，以由約50重量%～約90重量%的植物性原料和約50重量%～約10重量%的動物性原料所構成者為宜，以由約70重量%～約80重量%的植物性原料和約30重量%～約20重量%的動物性原料所構成者較佳。

【0030】 本發明的功能性材料，為土壤·水質污染的改善，和一邊抑制暖化氣體產生，一邊能提高植物的功能性。

【0031】 此外，本發明提供製造上述功能性微生物材料的方法。製造該功能性材料的方法，包括(a)攪拌植物性原料和動物性原料得到發酵原料的攪拌步驟，與(b)將攪拌步驟中獲得的發酵原料，使用寄存編號為BP-1051的微生物群發酵的發酵步驟。

【0032】 本發明的(a)攪拌步驟為將上述的植物性原料和上述的動物性原料攪拌並混合，而得到各原料大體上均一地分散之發酵原料的步驟。沒有充分地進行發酵原料之分散的情況，具有在此後之發酵步驟中的發酵變得不完全的可能性。又，以在攪拌前粉碎植物性原料或動物性原料為宜。粉碎原料是因為為了使攪拌變得容易。

【0033】 本發明的(b)發酵步驟為，將(a)攪拌步驟中獲得的發酵原料發酵的步驟。在發酵中，能使用寄存編號：NITE BP-1051的微生物群。發酵溫度，以約20℃～約90℃為宜，以約30℃～約50℃較佳。又，發酵的時間，以約5小時～約24小時為宜，以約10小時～約14小時較佳。

【0034】 又，(b)發酵步驟，可以至少用二個以上之複數的發酵槽進行。在使用多個發酵槽的情況下，以在各階段改變發

酵溫度為宜。在各階段中，因為藉由具有對各溫度喜好性的微生物來進行發酵，所以能得到由複合發酵反應產生的功能性微生物材料。

【0035】 [表 1]

國際寄存微生物群 NITE BP-1051 申請專利範圍第 7 與 8 項

編號	寄存編號	近緣種
IP-95	AB618495	<i>Bacillus ruris</i> LMG 22866 ^T
IP-2	AB618496	<i>Bacillus badius</i> NBRC 15713 ^T
IP-14	AB618497	<i>Bacillus fortis</i> LMG 22079 ^T
N-16	AB618492	<i>Bacillus coagulans</i> ATCC7050 ^T
IP-23	AB618498	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> KCTC 13423 ^T
IP-9	AB618499	<i>Virgibacillus pantothenicus</i> IAM 11061 ^T
IP-3	AB618500	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> DSM 14988 ^T
IP-60	AB618501	<i>Paenibacillus timonensis</i> CIP 108005 ^T
IP-75	AB618502	<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i> IFO 15724 ^T

【0036】 表 1 顯示於 NITE 國際寄存之 BP-1051 的近緣菌種與其序列註冊。

【0037】 [表 2]

嗜熱菌接種物 (Thermophiles inoculum) MIROKU M2K

(基於 16S rDNA 序列的解析結果以下菌屬的近緣種)

屬名清單		
	Desulfurispora	Propionibacterineae
Achromatium	Dietzia	Prosthecomicrobium
Acidimicrobineae	Dorea	Rhodospirillum
Acidimicrobium	Eubacterium	Roseiflexus
Actinomyces	Flavobacterium	Roseomonas
Adhaeribacter	Gemmatimonas	Ruminococcus
Aeriscardovia	Geobacillus	Salibacillus
Aeromicrobium	Georgenia	Salinibacillus
Affella	Gordonia	Salinicoccus
Alicyclobacillus	Gracilibacillus	Schlegelella
Allofustis	Halorhodospira	Solirubrobacteraceae
Amphibacillus	Heliobacterium	Sphaerobacter
Anaerococcus	Hippea	Spirochaeta
Anaerococcus	Hydrogenophilus	Staphylococcus
Anaerovorax	Jeotgalicoccus	Steroidobacter
Anoxybacillus	Lactobacillus	Streptococcus
Atopostipes	Leucobacter	Succinicladium
Atopostipes	low G+C Gram-positive bacterium	Symbiobacterium
Bacillaceae bacterium	Lutispora	Syntrophomonas
Bacillus	Macrococcus	Tepidamorphus
Bacteroides	Mahella	Thermaerobacter
Barnesiella	Marinibacillus	Thermanaeromonas
Bifidobacterium	Mechercharimyces	Thermoanaerobacter
Brachybacterium	Meiothermus	Thermoanaerobacterium
Brevibacterium	Methylocystis	Thermobacillus
Caldanaerobacter	Methylosinus	Thermobifida
Caldicellulosiruptor	Microbacterium	Thermoleophilum
Caldilinea	Micrococcineae	Thermomicrobium
Caloramator	Moorella	Thermus
Cellulosimicrobium	Mycobacterium	Tissierella
Ceresibacillus	Nisaea	unclassified_Incertae Sedis XI
Clostridiales bacterium	Nosocomiicoccus	unclassified_Thermaceae
Clostridium	Oceanobacillus	Ureibacillus
Coprothermobacter	Paenibacillus	Vagococcus
Corynebacterium	Parabacteroides	Virgibacillus
Craurococcus	Pediococcus	Vulcanithermus
Curtobacterium	Peptoniphilus	Weissella
Desulfotomaculum	Phaeospirillum	

【0038】 表2為顯示屬名清單。

實施例

【0039】 此外，根據實施例更加詳細地說明本發明，然，本發明不被這些實施例所限定。

【0040】 1. 功能性微生物材料的生產

將實施例1及實施例2之功能性微生物材料由以下所示之方法來製作。

【0041】 (實施例1)

在發酵原料中，作為植物性原料，含有，約50重量%的大麥糠，約20重量%的、約10重量%的米糠，此外，作為動物性原料，使用，約20重量%的，將含有以拖網網漁所獲得之蝦·螃蟹等的甲殼類和底棲魚類等的海產物發酵所得之海產物發酵物。該海產物發酵物包含約 10^8 個/g~約 10^9 個/g的微生物群，而該微生物群由約70重量%~約90重量%的寄存編號：PTA-1773之微生物及約30重量%~約10重量%的寄存編號：NITE BP-1051之微生物所構成。

【0042】 將上述的植物性原料及動物性原料混合並充分攪拌，以40℃ 14小時的1階段方式來進行發酵、並乾燥，而得到了本發明的功能性養殖飼料。該功能性材料包含約 10^8 個/g~約 10^9 個/g的微生物群，而該微生物群由約90重量%~約99重量%的寄存編號：PTA-1773微生物及約10重量%~約1重量%的寄存編號：NITE BP-1051微生物所構成。

【0043】 (實施例2)

在發酵原料中，作為植物性原料，含有，約20重量%的廢菌床，此外，作為動物性原料，使用，約30重量%的，使用以拖網網漁所獲得之蝦·螃蟹等的甲殼類和底棲魚類等的海產物。該廢菌床包含約 10^8 個/g~約 10^9 個/g的微生物群，而該微生物群由約70重量%~約90重量%的寄存編號：PTA-1773微生

物及約30重量%~約10重量%的寄存編號：NITE BP-1051微生物所構成。

【0044】 將上述的植物性原料及動物性原料混合並充分攪拌，並進行2階段的發酵。第1階段之發酵的條件為，以50℃~60℃，4~5小時，第2階段之發酵的條件為，以30℃~40℃，6~8小時。第二階段之發酵後，將被發酵的發酵原料乾燥，而得到了本發明的功能性微生物材料。該功能性微生物材料包含約 10^8 個/g~約 10^9 個/g的微生物群，而該微生物群由約70重量%~約90重量%的寄存編號：PTA-1773微生物及約30重量%~約10重量%的寄存編號：NITE BP-1051微生物所構成。

【0045】 2. 在高鹽濃度·高鹼性的土壤，和水環境中的有機物分解活性

在10%的鹽度的腦心浸出物培養液(brain heart infusion broth)中培養BP-1051以及嗜熱菌接種物(Thermophiles inoculum) MIROKU M2K，並選出具有有機物分解力的菌種。

【0046】 被BP-1051含有的IP-9是標準菌株泛酸枝芽孢桿菌(*Virgibacillus pantothenicus*)的近緣種，而泛酸枝芽孢桿菌產生具有鹽分抵抗性的成分四氫嘧啶(ectoine)。且，已知四氫嘧啶作為保濕成分。實際上，IP-9在鹽分濃度10%以上也具有有機物分解力。又，可以與複合菌相所含有的深海大洋芽孢桿菌(*Oceanobacillus profundus*)的近緣種共培養。該菌種被知道在高鹽濃度，高鹼濃度也具有有機物分解力，然而，實際上，作為嗜熱菌接種物(Thermophiles inoculum) MIROKU M2K含有的菌之一，深海大洋芽孢桿菌的近緣種被找到了。但，這些菌種

作為單析菌株持續的培養，在目前是無法進行的。總之，這些菌種的功能，可以說是對高鹽濃度，和強鹼濃度的土壤，和水環境的淨化給予貢獻。

【0047】 3. 對土壤、植物體等的硝酸降低化的評價

作為模型植物，使用白犬薺(*Arabidopsis thaliana*)，並於作為肥料培土之吳羽(KUREHA)培土(表土5cm)實施。總之，以4℃將春化處理一晚實施之後，以恆溫室(23℃)，發光強度10,000勒克司(lux)，24小時光照期的條件下21天，每隔1日添加100ml的水分來實施栽培。

【0048】 植物的硝酸減低效果的圖表(第3圖)。土壤的硝酸減低效果的圖表(第4圖)。如第3圖以及第4圖所示，確認了本發明材料的添加濃度依存性地減低植物體中以及土壤中的硝酸濃度。這些硝酸，如第5圖和第6圖所示，可說成是不是滲入地下者，藉由脫氮，不使其污染。關於水圈也能確認這樣的傾向，排水處理時水中的硝酸離子，銨離子，全氮的濃度也減輕的效果被確認了。

【0049】 6. 側根誘導與硝酸鹽轉運蛋白(nitrate transporter)的表現

小松菜(*Brassica rapa* var. *perviridis*)為，黑土和紅土的比例成爲8：2調整到300g，添加200ml的水之後，用鋁箔蓋住上部，在陰涼處靜置了1週。此後，轉移至自然光進入的室內，播種之後，添加了100ml水。之後，每隔2日添加水。且，關於為模型植物之白犬薺(*Arabidopsis thaliana*)，實施於作為肥料培土之吳羽(KUREHA)培土。如前述，以4℃將春化處理一晚

實施之後，以恆溫室(23℃)，發光強度10,000勒克司(lux)，24小時光照期的條件下21天，爲了不用盡水分添加一定量來栽培。

【0050】 如第5圖所示，經由使用油菜的實驗，根的發根提高了20%以上。這樣的傾向，在葉菜類，根菜類，果菜類，果樹類的任一個中也被確認了。

【0051】 然後，作爲模型植物，使用白犬薺，並於作爲肥料培土之吳羽(KUREHA)培土(表土未滿3cm)實施。總之，以4℃將春化處理48小時實施之後，以恆溫室(23℃)，發光強度10,000勒克司(lux)，24小時光照期的條件下21天，一邊保持一定水量一邊實施栽培。

【0052】 [表3]

白犬薺中高表現的基因群其之1 申請專利範圍第6項

Genbank	一般描述	調控
At5g52640/At1g74310	熱休克蛋白家族	向上
At5g02490/At3g09440		
At4g15440	過氧化氫酶1 (hydroperoxide lyase 1, HPL1)	向上
At5g59320/At3g22600	脂質運輸蛋白(LTP, LIPID TRANSFER PROTEIN)相關蛋白質	向上
At1g52770	光反應NPH3家族蛋白 (Phototropic-responsive NPH3 family protein)	向上
At1g73325	胰蛋白酶(trypsin)與蛋白酶(protease)抑制劑 (inhibitor) 家族蛋白/Kunitz家族蛋白	向上
At2g17500	生長激素運輸載體家族蛋白(auxin efflux carrier family protein)	向上
At2g04240/At5g17600	RING-H2基因，XERICO	向上

【0053】 [表 4]

白犬薺中高表現的基因群其之2 申請專利範圍第6項

Genbank	一般描述	調控
AF325030	谷氧還蛋白家族蛋白(Glutaredoxin family protein)	向上
AK176211/BT012184	谷胱甘肽S移換酶(Glutathione S-transferase)	向上
At5g02490/AY128296	熱休克蛋白相關家族	向上
AY054183/At5g02490		
AY087779	氧化還原酶(oxidoreductase)	向上
AF419593	結瘤素家族蛋白(nodulin family protein)	向上
AY078973	衰老相關蛋白(Senescence-associated protein)(SEN1)	向上
AY057661	SOUL血紅素結合家族蛋白(SOUL heme-binding family protein)	向上
AF386952	Ras-相關GTP-結合家族蛋白	向上
AK118884/AF426252	WRKY家族轉錄因子	向上
AY091154/AY088908		
AK117967	細胞色素(Cytochrome) P450 71B15，推定的	向上
AF426253	天冬氨酸蛋白酶家族蛋白(Aspartyl protease family protein)	向上

【0054】 表3顯示，在將白犬薺以深度5cm的土壤栽培的情況，藉由本發明的功能性材料，高表現的基因群。表4顯示，在將白犬薺以深度未滿3cm的土壤栽培的情況，藉由本發明的功能性材料，高表現的基因群。

【0055】 提取根莖部的mRNA，並以RT-PCR分析的結果，確認了為硝酸鹽轉運蛋白(nitrate transporter)群之一的NRT2.1的表現量，2倍以上的增加傾向（第6圖）。又，也確認了關於NRT2.6的增加傾向。此外，如表3所記載，能說與植物激素有

關的基因群的表現量有意義增加。此外，如表4中所記載，也認為類結瘤素蛋白(nodulin like protein)被表現是重要的。近幾年，示意著，結瘤素藉由為菌體外成分之一的鞭毛蛋白(flagellin)，為根的形成給予貢獻(Planta 234: 459-476, 2011)。

【0056】 這樣，與發根促進誘導一起，具有根毛部的硝酸鹽轉運蛋白與植物激素關聯基因群等的表現增強效果。又，如表3所示，從調節所說之光反應NPH3家族蛋白(Phototropic-responsive NPH3 family protein)光向性的基因也強烈表現，估計光響應性增加。因為這樣復合的因子，被認為少的肥料成分也能有效地土壤中的營養成分吸收，與植物的生長促進變成可能。關於植物的生長促進效果，不僅這些基因的功能，且包含在嗜熱菌接種物(Thermophiles inoculum) MIROKU M2K中之細菌群中所含有難培養性*Bacillus graminis*的近緣種。因為*Bacillus graminis*是與植物共生的微生物內生菌(endophyte)，所以假定該菌種也對成長促進給予貢獻的可能性。

【0057】 3. 暖化氣體 - 一氧化二氮之發生抑制能力的評價
作為模型植物，使用白犬薺，並於作為肥料培土之吳羽(KUREHA)培土(表土5cm)實施。總之，以4°C將春化處理一晚實施之後，以恆溫室(23°C)，發光強度10,000勒克司(lux)，24小時光照期的條件下21天，每隔1日添加100ml的水分來實施栽培。

【0058】 如第6圖所示，即使在乙炔氣氛下，在添加了本發明材料的土壤中，土壤中的硝酸離子濃度銳減，但是，在非添

加土壤中，則是難以減少。由於乙炔為阻礙從 N_2O 朝 N_2 的反應，所以利用那個阻礙反應，可以藉由氣相色層分析檢驗出 N_2O 。因此，在使 N_2O 產生的土壤，即使在沒混入乙炔之氣氛下，也檢驗出 N_2O ，而使 N_2 產生的土壤，僅在混入乙炔之氣氛下，有可能檢驗出 N_2O 。如第7圖所示，添加本發明材料的土壤，在乙炔不被阻擋土壤條件下不能檢驗出 N_2O 。又，在乙炔被阻擋的土壤，由可檢驗出 N_2O ，清楚瞭解了具有優先放出 N_2 的特性。從這件事，可以說土壤中的硝酸離子作為 N_2 氣體而脫氮。

【0059】 為了促進這些反應的基因群的尋找，參考作為文獻之 Throbäck IN et al. (2004) Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. FEMS Microbiol. Ecol. 49:401-417記載之引子序列等，進行PCR檢驗。NirK的引子為，使 用 5' -GGCGGCGCGCCGCCCCGCCCCGCCCCGTCGCCCCGCCTCGAT CAGATTGTGGTT-3' 作為順向引子(forward primer)，使用5' -ATCATGGTCCTGCCGCG-3' 作為逆向引子(reverse primer)。又， NirS 的 引 子 為 ， 使 用 5' -GGCGGCGCGCCGCCCCGCCCCGCCCCGTCGCCCCGACTTCGG ATGCGTCTTGA-3' 作為順向引子，使用5' -GTCAACGTCAAGGAAACCGG-3' ，作為逆向引子。此外，NosZ的引子為，使用5' -TGGGGNGAYNTBCAYCA-3' 作為順向引子，使用5' -GARCARAAGTTIGTRCARTA-3' 等作為逆向引子。做為參考文獻，利用了Scala DJ and Kerkhof LJ (1998)

Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiology Letters* 162:61-68, 與 Jones, C.M., Welsh, A., Throbäck, I.N., Dörsch, P., Bakken L.R., Hallin, S. (2011) Phenotypic and genotypic heterogeneity among closely related soil-borne N_2 - and N_2O -producing *Bacillus* isolates harboring the *nosZ* gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76: 541-552。

PCR的結果，具有來自慢生型根瘤菌屬(*Bradyrhizobium*)、草螺菌屬(*Herbaspirillum*)、中慢生根瘤菌屬(*Mesorhizobium*)的脫氮酵素基因序列和近緣的基因群等工作的可能性。

【0060】 [表 5]

來自本發明材料之脫氮基因群之序列相同性的比較

編號	寄存編號	近緣種	相同度(%)
S-1	AB686171	<i>Bradyrhizobium</i> sp. TSA44	84
S-2	AB686172	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSO20-1	96
S-3	AB686170	<i>Mesorhizobium</i> sp. TSA41b	97

【0061】 表 5 顯示包含於本發明的功能性材料中的脫氮系基因群與標準菌株中之脫氮系基因群的相同度。

【0062】 4. 關於氮固定的評價

作為模型植物，使用白犬薺，並於作為肥料培土之吳羽(KUREHA)培土(表土5cm)實施。總之，以4℃將春化處理一晚實施之後，以恆溫室(23℃)，發光強度10,000勒克司(lux)，24小時光照期的條件下21天，每隔1日添加100ml的水分來實施栽培。培土的乾燥化(含水率的降低)，為將水分的添加期間

延長數日而調整。

【0063】 如第8圖所示，在白犬薺體內的銨離子濃度，有增加的傾向。由於植物體的硝酸濃度極低，且硝酸還原酵素的活性低，因此，銨離子之來源是其他因素，被預期源自微生物。又，藉由微生物的氮固定，已知為藉由固氮酶(nitrogenase)複合體做觸媒，而作為那個複合體的因子，包含雙氮酶(dinitrogenase)和雙氮酶還原酶(dinitrogenase reductase)。此外，藉由鐵氧還蛋白(ferredoxin)和黃素氧化還原蛋白(flavodoxin)等的電子供給體，雙氮酶還原酶被還原，銨離子被形成。

【0064】 於此，使用了可放大為雙氮酶還原酶之基因的nifH的引子，來探索原因。作為nifH的引子，將Widmer F, Shaffer BT, Porteous LA and Seidler RJ (1999) Analysis of nifH Gene Pool Complexity in Soil and Litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Appl Environ Microbiol* 65: 374-380，與Poly, F., Monrozier, L.J., Bally, R. (2001) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* 152: 95-103等作為參考，作為順向引子，使用5'-TGCGACCCGAAAGCCGACTC-3'，作為逆向引子，5'-ATGGCCATCATCTCACCGGA-3'來確認檢查。

【0065】 本發明材料中的細菌，在含有成為電子供給體的琥珀酸的無氮培養基，單離出可增生的細菌。其結果包括包含於NITE BP-1051中之IP-23，以及IP-60、75近緣的Lysinibacillus

屬，以及 *Paenibacillus* 屬的菌種。此外，如表 6、7 所示，從將 16SrDNA 的序列進行 BLAST 的分析結果判斷，包括著 *Bacillus pumilus* 與 *Bacillus safensis* 的近緣種的 *Bacillus* sp. 36W 株，及 *Brevibacillus choshinensis* 與 *B. brevis* 的近緣種的 *Brevibacillus* sp. 123 株，關於後者，以上述的引子能檢查，但也包括著，以這個引子不能檢查者。由於對於哪一個鹼基序列都不完全一致，所以能說是新的菌種或者亞種。又，暗示了作為複合菌群的形式發揮了相乘的氮固定能力。且，NP-1051 包括著 *Bacillus badius* 的近緣種，而 *Bacillus badius* 中已知含有氮代謝有關的基因群，所以期待藉由使之共存完成某種作用。且，如表 3 中所記載，在藉由添加本發明材料之土壤生長的植物，衰老相關蛋白 (Senescence-associated protein) (SEN1) 的表現量增加，而，近幾年，SEN1 對於與植物共生的固氮細菌而言為需要的因子之事被報導的點 (Plant Cell Physiol 2011 in press, <http://pcp.oxfordjournals.org/content/early/2011/11/28/pcp.pcr167.long>) 是有趣的。

【0066】此外，為該高溫發酵產品中的功能性微生物之一的 *Paenibacillus* sp. 為，作為對植物之共生菌，具有與植物共生的能力。在國際已經登記 NITE BP-1051 包括 *Paenibacillus* sp.，關於這些好熱性植物共生菌，調查 16S rRNA 的鹼基序列，而製作系統樹的時候，如第 12 圖，*Paenibacillus amylolyticus* 和 *Paenibacillus barcinonensis* 類似著，是即是 50°C 也能增殖的好熱性細菌。在施用該高溫發酵產品的植物中，由於這些菌與植物共生，對於關於植物的生長促進控制和生物防禦的基因群之

表現的促進、藉由爲微小生物之線蟲的植物受害等的效果，假設BP-1051以及發酵產品包括的Paenibacillus sp.也參與著。

【0067】 [表6]

嗜熱菌接種物(Thermophiles inoculum) MIROKU M2K中的
氮固定菌 申請專利範圍第7項

Bacillus sp 36W菌株 (*Bacillus pumilus*與*Bacillus safensis*
的近緣種)

GACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGA
GCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACG
GTTTCGGCTGTCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAA
CTGGGAAACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT
CTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGTGTTAG
GGGTTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT
ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTC
GGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGC
CAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTT
AGCCAATCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT
TGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCGGA
AGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTACAAAGGTAGCCCA

【0068】 [表 7]

嗜熱菌接種物 (Thermophiles inoculum) MIROKU M2K 中的
氮固定菌 申請專利範圍第 7 項

Brevibacillus sp 123 菌株 (*Brevibacillus choshinensis* 與
Brevibacillus brevis 的近緣種)

CTGCCGGCGTGCCCTATACTGCAAGTCGAGCGAGTCTCTTCGGAGGCTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGG
ATAACATAGGGAAACTTATGCTAATACCGGATAGGTTTTTGGATCGCATG
ATCCAAAAAGAAAAGGCGGCTTTAAGCTGTCACTGGGAGATGGGCCTG
CGGCGCATTACCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACAATGC
GTACCCGACCTGAAAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGC
CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCCACAATGGACGA
AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGT
AAAGTTCTGTTGTTAGGGACAAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTAC
CTTGACGGTACCTGACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCACCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAA
GCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGTAAAGCCCGGAGCTCAA
CTCCGGTTCGCATCGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAAAAGAGGAAAG
CGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAA
AGCTGTGGTGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGCTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGTTTCATACCTCAATTGCCGCAG

【0069】 表 6 顯示本發明之功能性材料所包含之氮固定菌
Bacillus sp 36 W 株的 16SrDNA 的序列。表 7 顯示本發明之功能性
材料所包含之氮固定菌 *Brevibacillus* sp 123 菌株的 16SrDNA 的
序列。

【0070】 7. 氨基酸濃度的調節功能的評價

作為模型植物，使用白犬薺，並於作為肥料培土之吳羽
(KUREHA) 培土 (表土 5cm) 實施。總之，以 4℃ 將春化處理
一晚實施之後，以恆溫室 (23℃)，發光強度 10,000 勒克司 (lux)，

24小時光照期的條件下21天，每隔1日添加100ml的水分來實施栽培。培土的乾燥化（含水率的降低），為將水分的添加期間延長數日而調整。

【0071】 如第10圖所記載，白犬薺的體內的谷氨酸以及穀醯胺的濃度，在添加了材料的群中有意義地增加了。確認了被分解成谷氨酸的精氨酸也顯著地增加的傾向。從谷氨酸是由鉍離子生成，也明瞭了第9圖之數據並不矛盾。通常，來自植物之谷氨酸不僅涉及作物的味道，也是所有抗氧化酶的表現極為重要的氨基酸，能說本發明材料對植物的品質和功能性的提升給予貢獻。且，為表4的強烈表現基因中之一個的結瘤素被知道對穀醯胺合成功能給予貢獻(Planta 234: 459-476, 2011)，不與本發明的實施例矛盾。

【0072】 接著，栽培土壤的水分減少10%的話，如第11圖所記載，確認了在材料添加群中脯氨酸顯著地增加的傾向。植物體中的脯氨酸，乾燥時，通過吡咯-5-羧酸還原酶(P5C reductase, pyrroline-5-carboxylate reductase)等的反應，從谷氨酸被生成，通過脯氨酸氧化酶(prolin oxidase)等的反應，被轉換為谷氨酸，而因為在含水率高之條件下，脯氨酸氧化酶的表現成為2倍以上，所以與谷氨酸之濃度的關係沒有矛盾。且，通常，由於已知脯氨酸是涉及乾旱耐受性和保濕的氨基酸，所以能說本發明材料從這樣的點對植物之功能性的提升也提供貢獻。

【0073】 8. 耐高溫障礙基因，與抗病害應答基因的表現

由於自然界植物的生長環境變動，以不同的栽培條件來栽培作為模型植物的白犬薺，並分析了表現基因的圖形。作為模

型植物，使用白犬薺，並於作為肥料培土之吳羽(KUREHA)培土實施。表3為以表土5cm來實施的資料，以4°C將春化處理一晚實施之後，以恆溫室(23°C)，發光強度10,000勒克司(lux)，24小時光照期的條件下21天，每隔1日添加100ml的水分來實施栽培。另一方面，表4為以表土未滿3cm來實施的資料，以4°C將春化處理一晚實施之後，以恆溫室(23°C)，發光強度10,000勒克司(lux)，24小時光照期的條件下21天，為了不用盡水分添加一定量來栽培。在這樣的條件下，實施DNA微陣列(與上次PCT申請同樣的方法)，網羅性地篩選了模型植物中強烈表現的基因群。

【0074】以添加本發明材料之土壤來生長的白犬薺普遍地強烈表現的基因群，為於表3及表4中顯示。尤其為分子伴侶(chaperone)的熱休克蛋白(heat shock protein, HSP)的表現被確認了。作為HSP，HSP70家族，HSP90家族，HSP101家族等的表現量增加了。

【0075】在表現量變化的基因中，關於HSP的是，任何的HSP，對對於高溫壓力以及各種環境壓力的耐受力功能給予貢獻的因子(Trends Plant Sci 9: , 244-252, 2004; Science 330: 1820-1824, 2010; Plant Cell, Vol. 12, 457-460, 2000)。此外，RING-H2基因，XERICO，為對植物的成長和耐旱性，耐鹽性等等的控制起作用之重要的植物生長素、脫落酸(abscisic acid)之生成的控制有關係(Plant Journal 47: 343-355, 2006)。

【0076】且，關於耐旱性，如第11圖所示，以添加本發明材料之土壤來栽培，轉移到使土壤含水率下降10%條件下的

話，脯氨酸濃度的增加程度變化這樣的點很有趣。

【0077】 此外，作為生物防禦有關的因子，已知作為HSP之HSP70和HSP90為，與SGT1和RAR1一起，對抗病性功能給予貢獻(Plant Cell 19: 4061-4076, 2007; J Biol Chem 279: 2101 - 2108, 2004; EMBO J 27:2789-2798, 2008)。又，也已知根瘤素也是關於抗病性的基因(Olivares JE et al. (2011) Nodulin 41, a novel late nodulin of common bean with peptidase activity. BMC Plant Biol 10:134)。此外，老化相關蛋白質(senescence-associated protein) (SEN1)的表現通過水楊酸(salicylic acid)和茉莉酸(jasmonic acid)的訊號傳遞被控制，被假設為有關抗病性的標識基因(marker gene)。且，水楊酸是涉及對病毒以及細菌之等之各種各樣之致病性微生物的抵抗性的因子，而茉莉酸儘管水楊酸和拮抗性地工作，但已知為對環境壓力的抗性誘導因子。

【0078】 作為對病原體的抗性基因，脂質運輸蛋白(LTP, LIPID TRANSFER PROTEIN) (Nature 419: 399-403, 2002)強烈表現。還有，胰蛋白酶(trypsin)與蛋白酶(protease)抑制劑(inhibitor)/Kunitz家族蛋白，已知為作為對各種各樣的病原體顯示抗性的基因(Molecular Plant 1: 482-495, 2008)，是與藉由為黴菌毒之伏馬鐮孢毒素(fumonisin)B1被誘導之細胞死亡拮抗的拮抗劑(antagonist)。此外，過氧化氫酶1 (hydroperoxide lyase 1, HPL1)，是被知為中止蚜蟲之活動(Proc Natl Acad Sci USA 98: 8139-8144, 2001)的因子，已明瞭生物合成植物防禦素(phytoalexins)的細胞色素(Cytochrome) P450 71B15，推定

(putative)(CYP71B15)也強烈表現。P45071B15，為被知道為生成 Camalexin 這個植物防禦素的細胞色素酵素 (Plant Cell 8:2235-2244,1996)。Camalexin，被知為抑制病原性的線狀菌和細菌的增生。這樣的酵素，因為藉由環境壓力和激發劑被誘導 (Plant Cell 10:359-370,1998)，而被假設完成藉由本發明材料的土壤環境的變化與作為激發劑的功能。

【0079】 此外，即使一端，感染病原菌，已知作為控制住植物體之細胞死亡的因子的天冬氨酸蛋白酶 (Aspartyl protease)(EMBO J. 2004 February 25; 23(4): 980-988;EMBO reports 6 282-288)也強烈表現出來。

【0080】 像這樣，許多生物防禦關聯基因群的表現被誘導，而能說已知作為涉及那些轉錄調節之基因群的 WRKY 家族轉錄因子 (Plant Mol Biol 51: 21-37, 2003)，各種強烈表現之事也不自相矛盾。再者，表 4 中記載的谷氧還蛋白家族蛋白質 (Glutaredoxin family protein)、谷胱甘肽 S 移換酶 (Glutathione S-transferase)，為涉及抗氧化活性，從同時有維生素 C 和維生素 E 也增加的傾向，能說植物體中的抗氧化活性改善。

【0081】 且，在為了本發明材料的穩定化使用的 PTA-1773 和 Thermophiles-inoculum M2k (拒絕寄存) 中、由於幾丁質 (chitin) 分解酵素以及抗黴活性的高的脂肽 (lipopeptide) 被含有，所以在試驗場施用的時候能使在土壤以及植物體或者水圈中之絲狀菌的存在比率 1 次性減少。

【0082】 因此，如果在農業領域採用本發明材料，作為植物體外的生長環境把病原性絲狀菌的存在比率下降之後，因為

活化植物體內的生物防禦基因群，所以可以做從生物內外兩面的環境控制。

寄存編號

【0083】 ATCC PTA-1773

【0084】 NITE BP-1051

【符號說明】

無。

【序列表】

<110> 日環科學股份有限公司

國立大學法人千葉大學

三六九股份有限公司

京葉設備工程股份有限公司

<120> 土壤/水質污染之改善、暖化氣體產生之抑制、使植物機能性向上之微生物材料以及發酵產品之製造方法

<130> P12010601

<140> JP 2012-001621

<141> 2012-01-06

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 偵測 NirK mRNA 的順向引子

<400> 1

ggcggcgcgc cgcccgcgcc gcccccgtcg cccgcctcga tcagattgtg gtt

53

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 偵測 NirK mRNA 的逆向引子

<400> 2

atcatggtcc tgccgcg

17

<210> 3

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 偵測 NirS mRNA 的順向引子

<400> 3

ggcggcgcgc cgcccgcccc gccccgctcg cccgacttcg gatgcgtctt ga

52

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 偵測 NirS mRNA 的逆向引子

<400> 4

gtcaacgtca aggaaaccgg

20

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 偵測 NosZ mRNA 的順向引子

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 5

tggggngayn tbcayca

17

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 偵測 NosZ mRNA 的逆向引子

<400> 6

garcaraagt tgtrcarta

19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 偵測 NifH mRNA 的順向引子

<400> 7

tgcgacccga aagccgactc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

4

<213> 人工序列

<220>

<223> 偵測 NifH mRNA 的逆向引子

<400> 8

atggccatca tctcaccgga 20

<210> 9

<211> 1449

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> Bacillus pumilus 或 Bacillus safensis 的相關種

<400> 9

gacagaaggg agcttgctcc cggatgtag cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggtaac 60

ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa accggagcta ataccgata gttccttgaa 120

ccgcatggtt caaggatgaa agacggtttc ggctgtcact tacagatgga cccgcggcgc 180

attagctagt tggtagggta atggctcacc aaggcgacga tgcgtagccg acctgagagg 240

gtgatcggcc aactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg 300

aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg cgtgagtgat gaaggttttc 360

ggatcgtaaa gctctgttgt tagggaagaa caagtgcgag agtaactgct cgcaccttga 420
 cggtacctaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt 480
 ggcaagcggt gtccggaatt attgggcgta aagggtcgc aggcggtttc ttaagtctga 540
 tgtgaaagcc cccggctcaa ccggggaggg tcattggaaa ctgggaaact tgagtgcaga 600
 agaggagagt ggaattccac gtgtagcggg gaaatgcgta gagatgtgga ggaacaccag 660
 tggcgaaggc gactctctgg tctgtaactg acgctgagga gcgaaagcgt ggggagcgaa 720
 caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga gtgctagtgt taggggtttc 780
 cgccccttag tgctgcagct aacgcattaa gcactccgcc tggggagtac ggtcgcaaga 840
 ctgaaactca aaggaattga cgggggcccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg 900
 aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg acatcctctg acaaccctag agatagggtc 960
 ttcccttcgg ggacagagtg acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat 1020
 gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cttgatctta gttgccagca ttcagttggg 1080
 cactctaagg tgactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca 1140
 tgccccttat gacctgggtc acacacgtgc tacaatggac agaacaaagg gctgcaagac 1200

cgcaaggttt agccaatccc ataaatctgt tctcagttcg gatcgcagtc tgcaactcga 1260
 ctgcgtgaag ctggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc 1320
 gggccttgta cacaccgccc gtcacaccac gagagtttgc aacacccgaa gtcggtgagg 1380
 taacctttat ggagccagcc gccgaagggtg gggcagatga ttgggggtgaa gtcgtacaaa 1440
 ggtagccca 1449

<210> 10

<211> 820

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> *Brevibacillus choshinensis* 或 *Brevibacillus*

Brevis 的相關種

<400> 10

ctgccggcgt gcctatactg caagtcgagc gagtctcttc ggaggctagc ggcggacggg 60
 tgagtaacac gtaggcaacc tgcctctcag actgggataa catagggaaa cttatgctaa 120
 taccggatag gtttttggat cgcatgatcc aaaaagaaaa ggcggcttta agctgtcact 180
 gggagatggg cctgcggcgc attacctagt tgggtgggta atggcctacc aaggcgacaa 240

tgcgtacccg acctgaaagg gtgaccggcc aactgggac tgaaacacgg cccaaactcc 300

tacgggaggc agcagtaggg aattttccac aatggacgaa agtctgatgg agcaacgccg 360

cgtgaacgat gaaggtcttc ggattgtaaa gttctgttgt tagggacaaa caagtaccgt 420

tcgaataggg cggtaccttg acggtacctg acgagaaagc cacggctaac tacgtgccac 480

cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgcgcg 540

caggcggcta tgtaagtctg gtgttaaagc ccggagctca actccggttc gcatcggaaa 600

ctgtgtagct tgagtgcaaa agaggaaagc ggtattccac gtgtagcggg gaaatgctga 660

gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc ggctttctgg tctgtaactg acgctgaggc 720

gcgaaagctg tgggtggagca aacaggatta gataccctgc tagtccacgc cgtaaacgat 780

gagtgctagg tgttgggggt tcataacctca attgccgcag 820

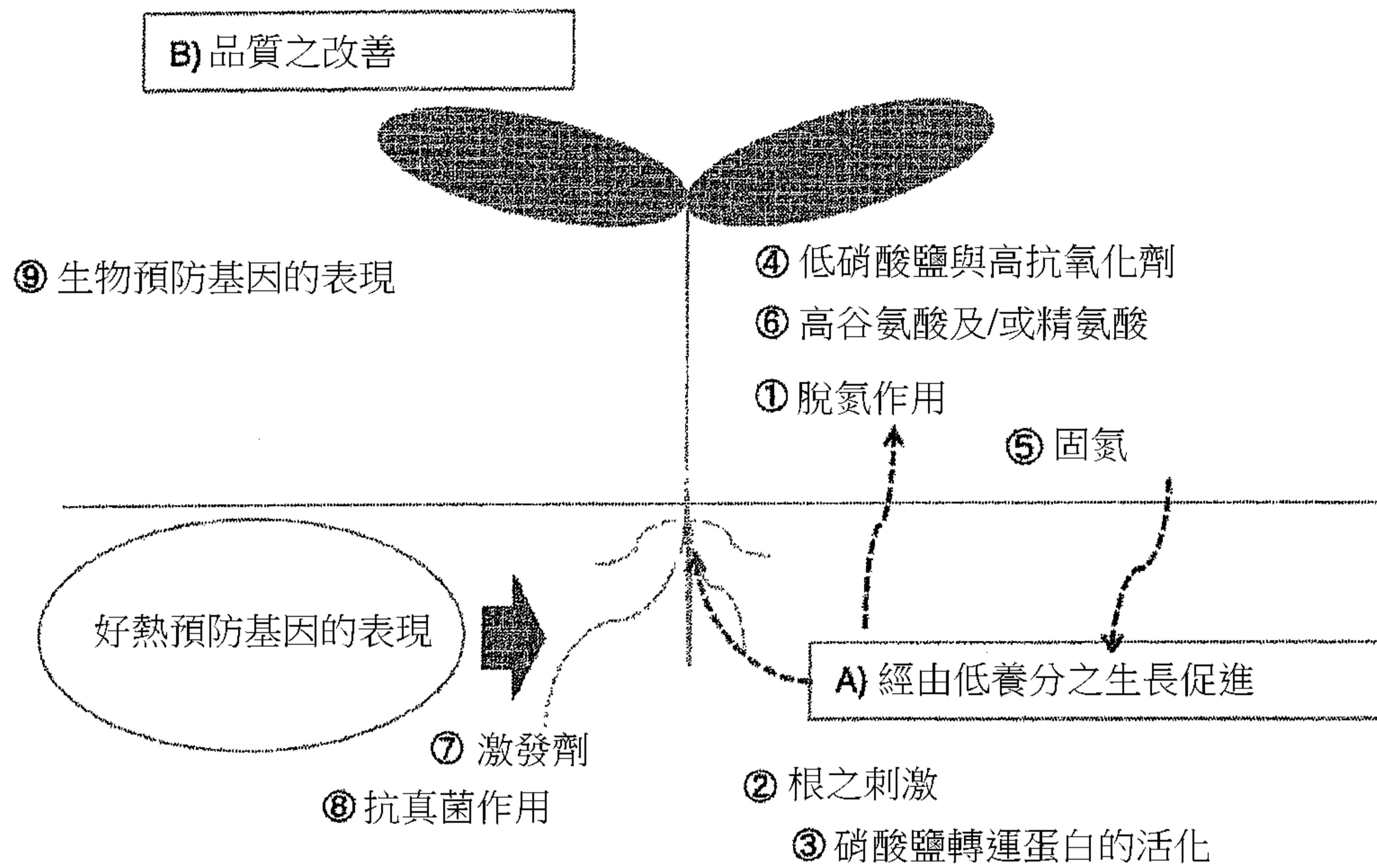
申請專利範圍

1. 一種微生物材料的用途，其係用於在高鹽濃度、高鹼性的土壤與水環境中保持有機物分解活性，其中該微生物材料，係將植物性原料及海產動物性原料攪拌所得的發酵原料，使用由30重量%~10重量%的NITE BP-1051及70重量%~90重量%的PTA-1773所構成的微生物群，於30°C~60°C的發酵溫度使之發酵10~14小時所得。
2. 一種微生物材料的用途，其係用於使土壤或水的環境、植物體中之硝酸鹽濃度減少，且減輕地下水污染或者排水負荷，其中該微生物材料，係將植物性原料及海產動物性原料攪拌所得的發酵原料，使用由30重量%~10重量%的NITE BP-1051及70重量%~90重量%的PTA-1773所構成的微生物群，於30°C~60°C的發酵溫度使之發酵10~14小時所得。
3. 一種微生物材料的用途，其係用於促進植物之側根誘導與硝酸鹽轉運蛋白(nitrate transporter)之表現活性，其中該微生物材料，係將植物性原料及海產動物性原料攪拌所得的發酵原料，使用由30重量%~10重量%的NITE BP-1051及70重量%~90重量%的PTA-1773所構成的微生物群，於30°C~60°C的發酵溫度使之發酵10~14小時所得。
4. 一種微生物材料的用途，其係用於減輕來自土壤之暖化氣體一氧化二氮的產生，並在促進脫氮的同時，藉由使氮固定來對植物的生長產生貢獻，其中該微生物材料，係將植物性原料及海產動物性原料攪拌所得的發酵原料，使用由

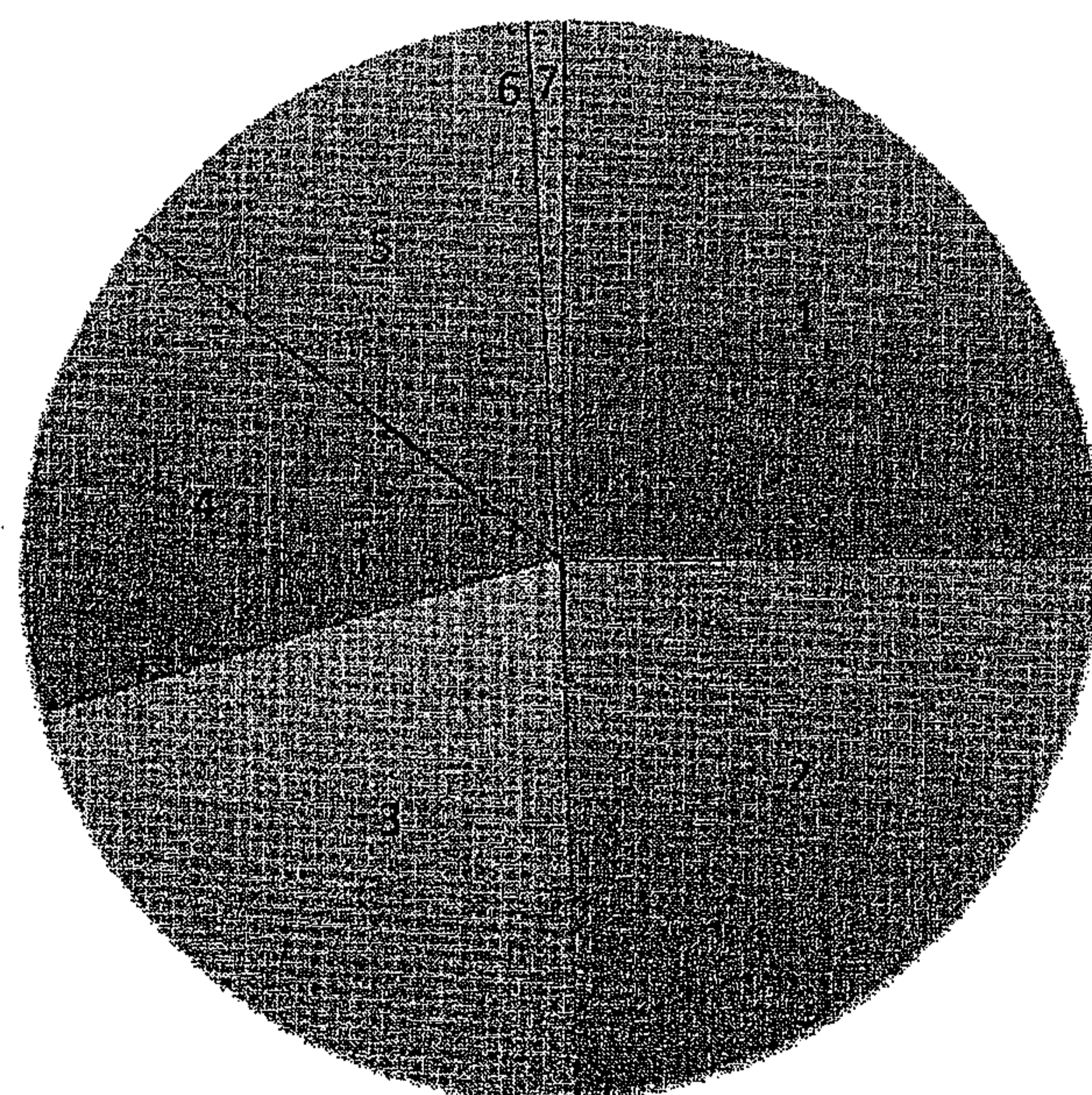
30重量%~10重量%的NITE BP-1051及70重量%~90重量%的PTA-1773所構成的微生物群，於30°C~60°C的發酵溫度使之發酵10~14小時所得。

5. 一種微生物材料的用途，其係用於使植物中的穀氨醯胺、谷氨酸、精氨酸的濃度增加，並乾燥時使脯氨酸的濃度增加，其中該微生物材料，係將植物性原料及海產動物性原料攪拌所得的發酵原料，使用由30重量%~10重量%的NITE BP-1051及70重量%~90重量%的PTA-1773所構成的微生物群，於30°C~60°C的發酵溫度使之發酵10~14小時所得。
6. 一種微生物材料的用途，其係用於在植物中，誘導對高溫障礙、乾燥抗性、抗氧化活性、植物病原性微生物、害蟲之抵抗性功能成分的表現，其中該微生物材料，係將植物性原料及海產動物性原料攪拌所得的發酵原料，使用由30重量%~10重量%的NITE BP-1051及70重量%~90重量%的PTA-1773所構成的微生物群，於30°C~60°C的發酵溫度使之發酵10~14小時所得。

圖式

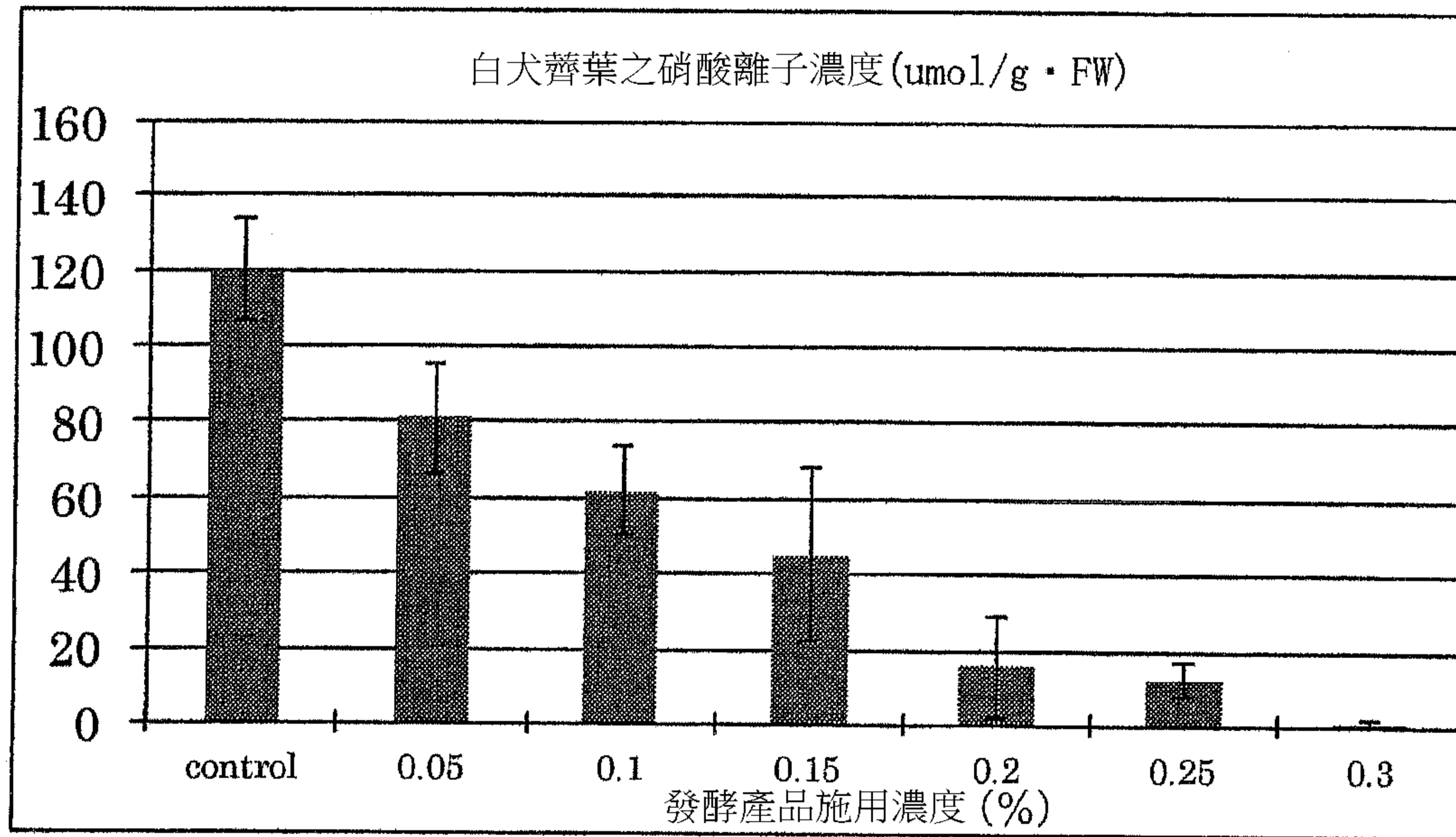


第1圖

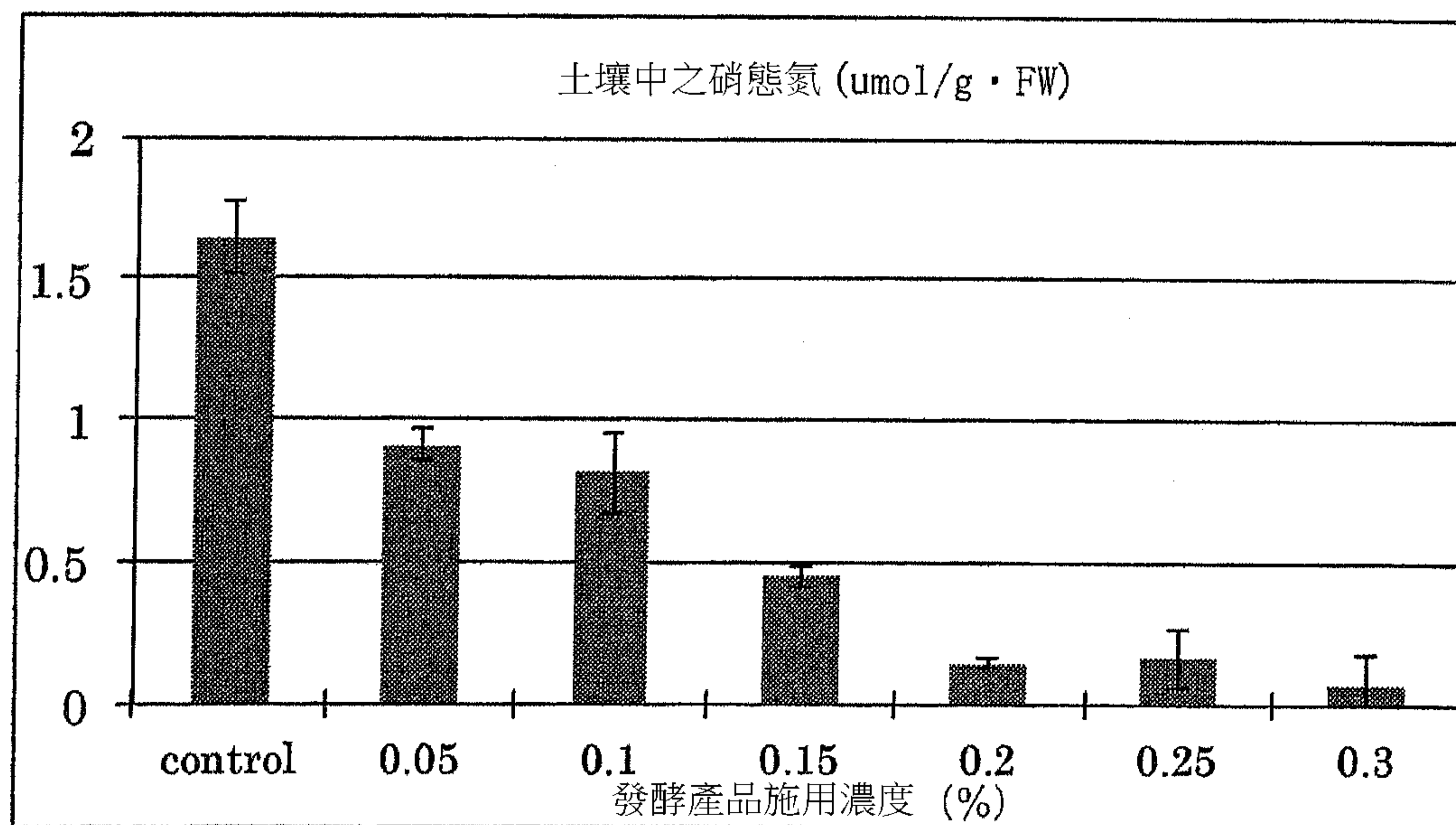


- 1. 變形菌門 (Proteobacteria)
- 2. 異常球菌-棲熱菌 (Deinococcus-Thermus)門
- 3. 放線菌門 (Actinobacteria)
- 4. 綠彎菌門 (Chloroflexi)
- 5. 厚壁菌門 (Firmicutes)
- 6. 擬桿菌門 (Bacteroidetes)
- 7. 其他

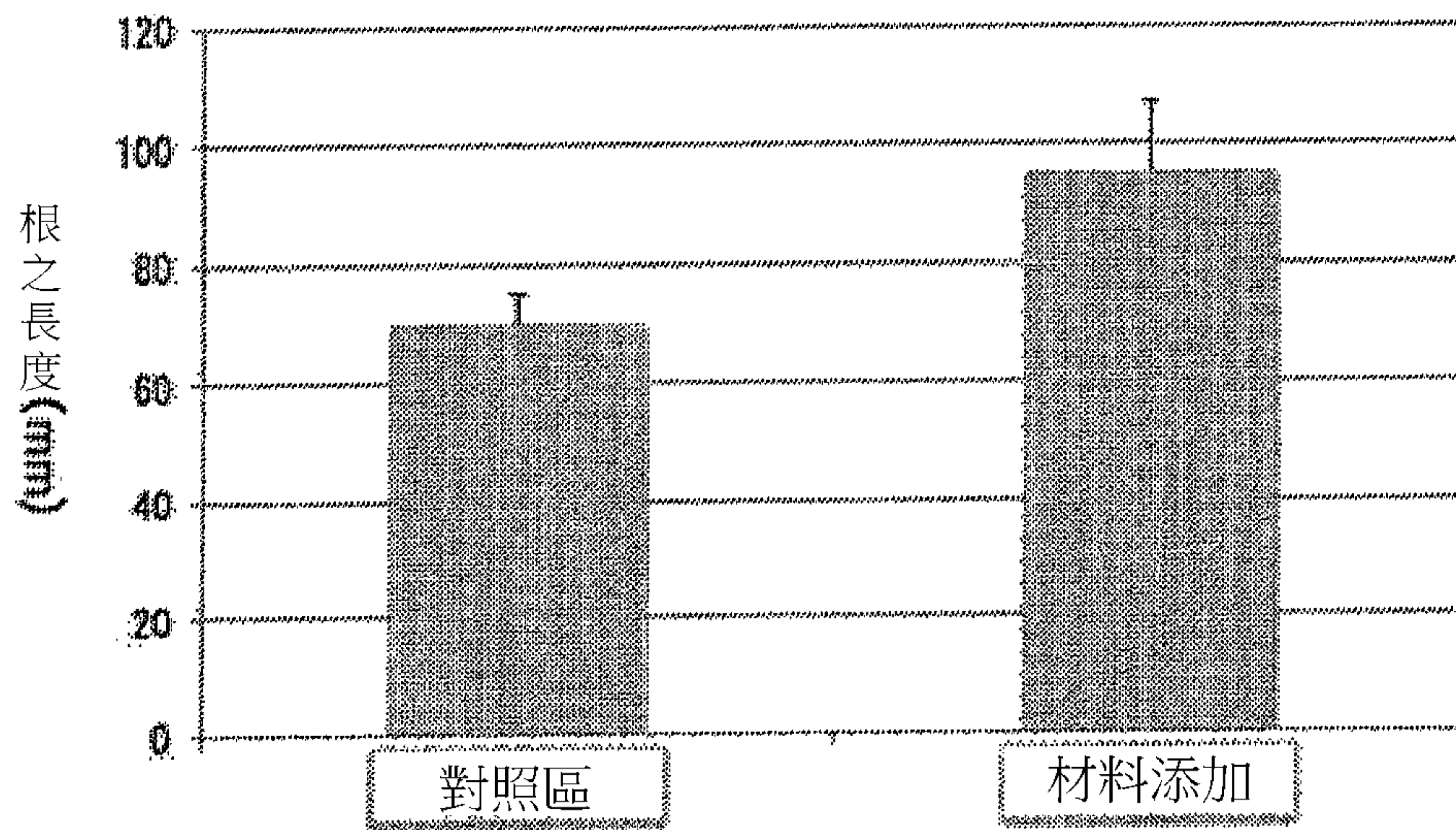
第2圖



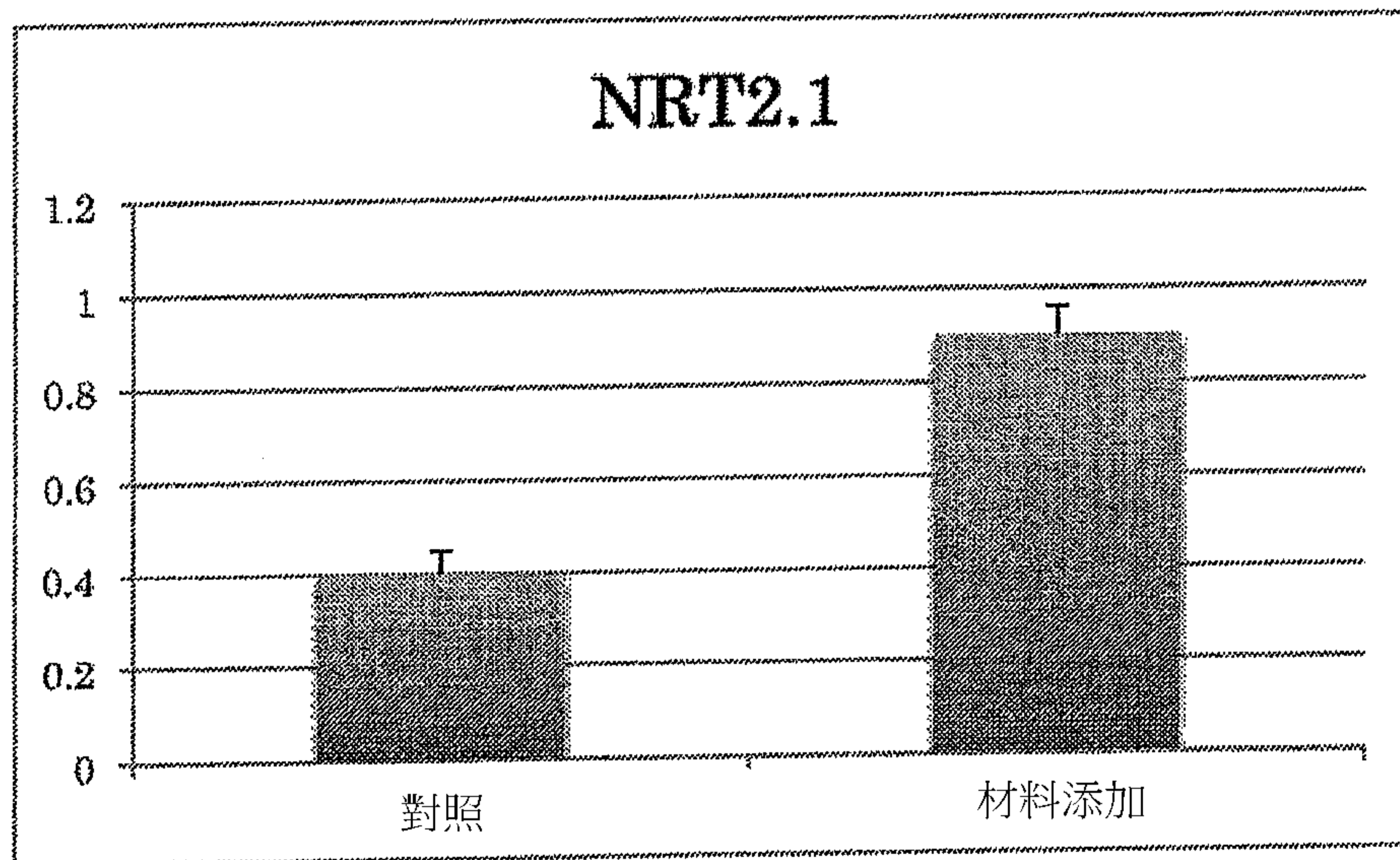
第3圖



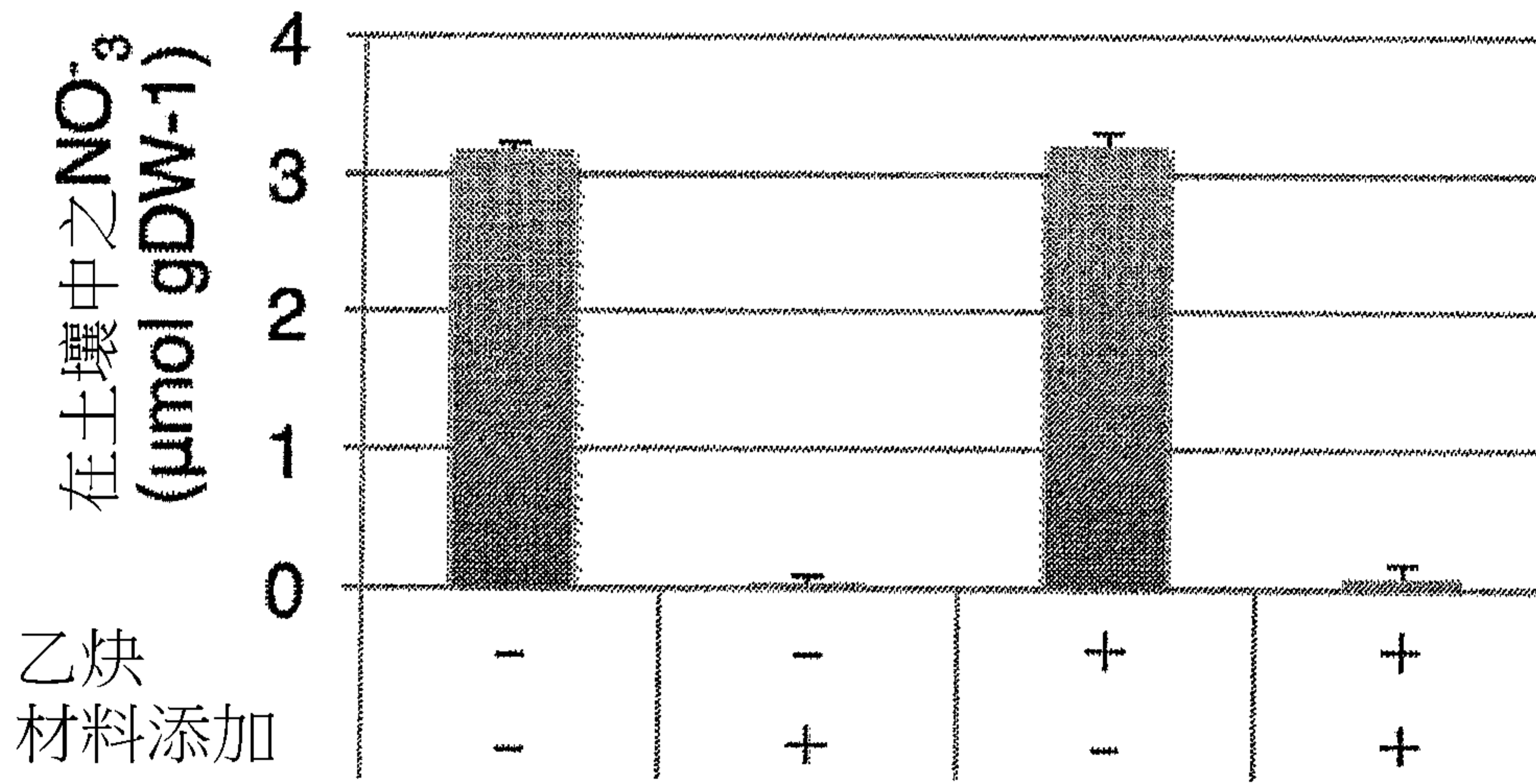
第4圖



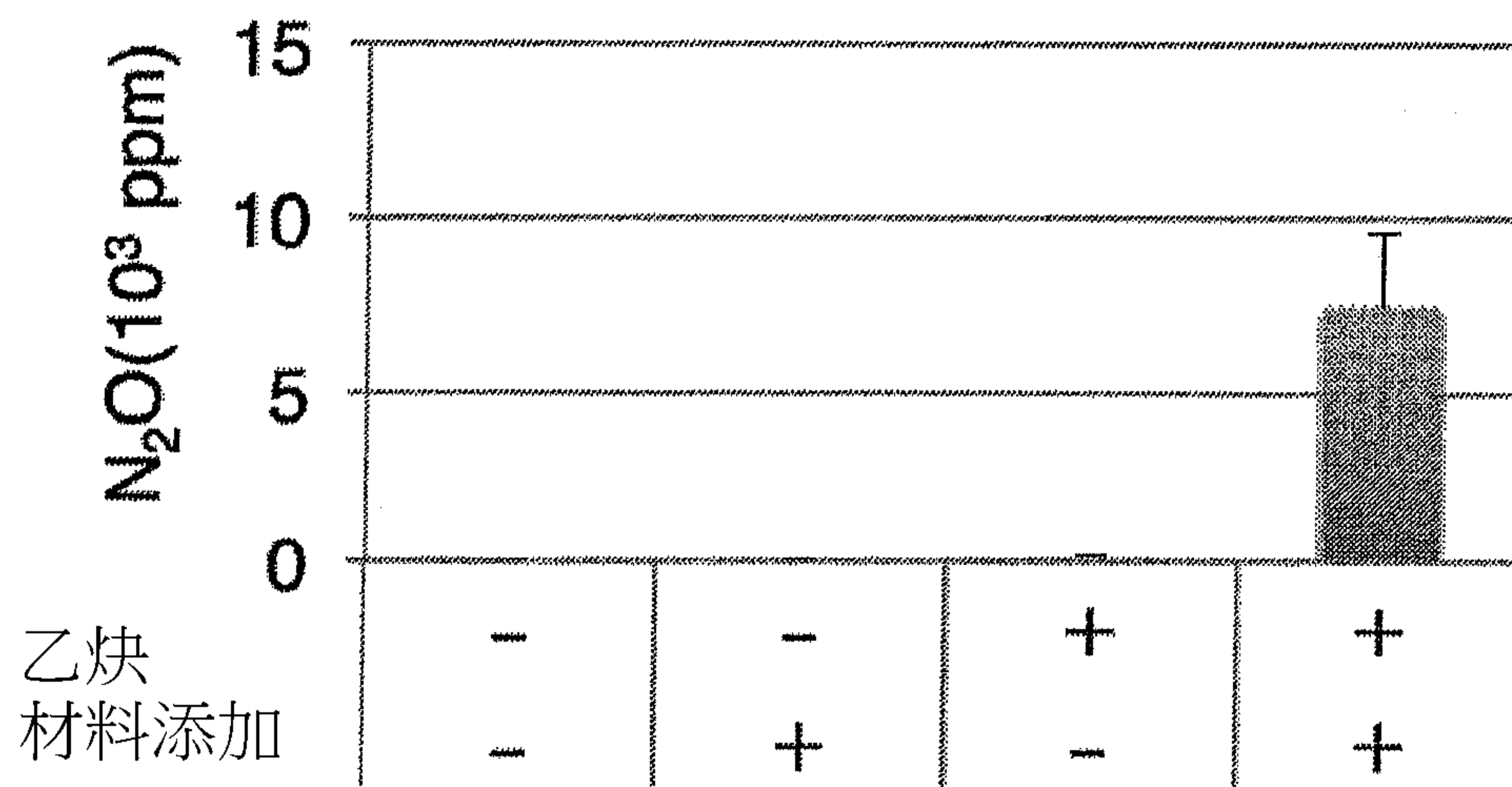
第5圖



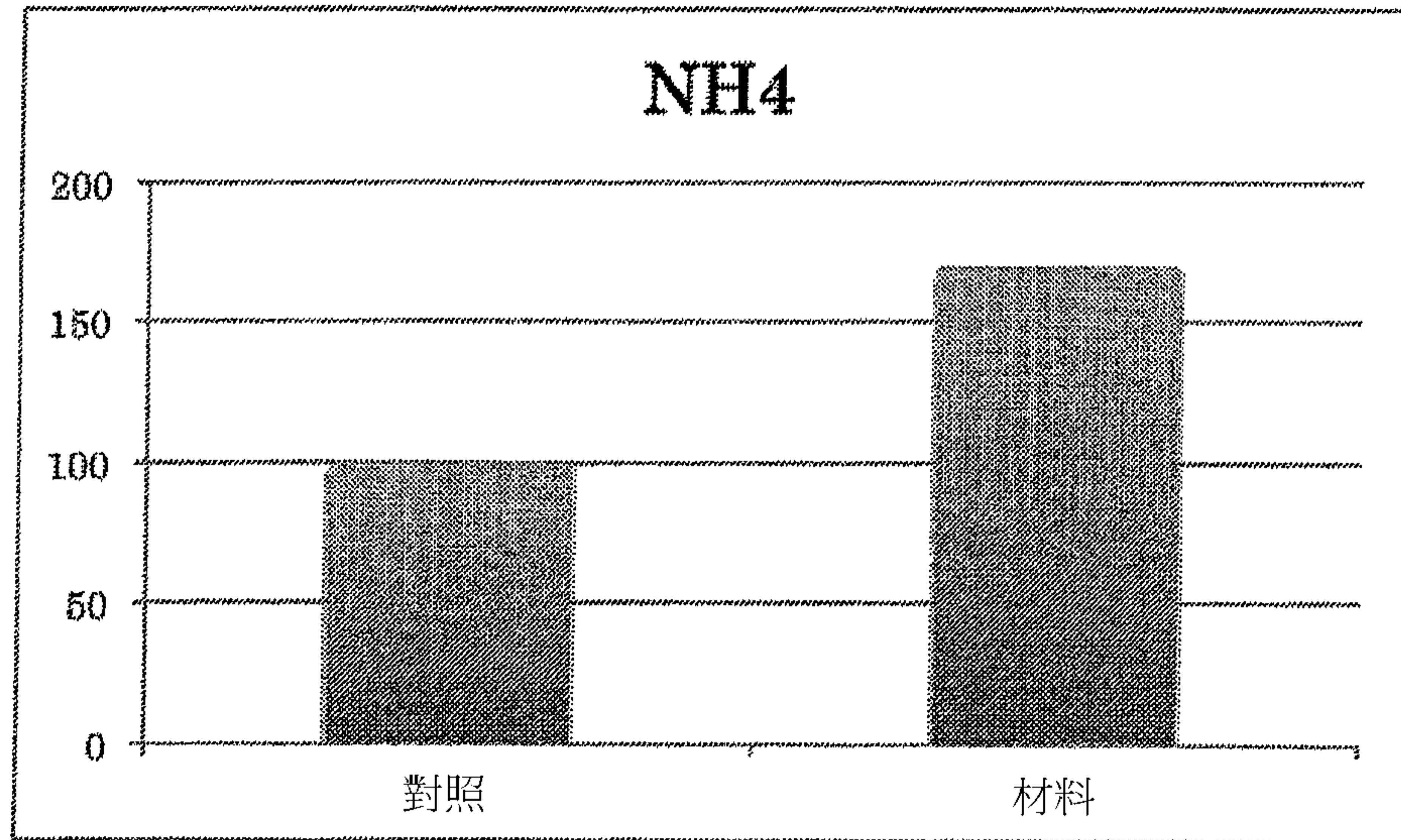
第6圖



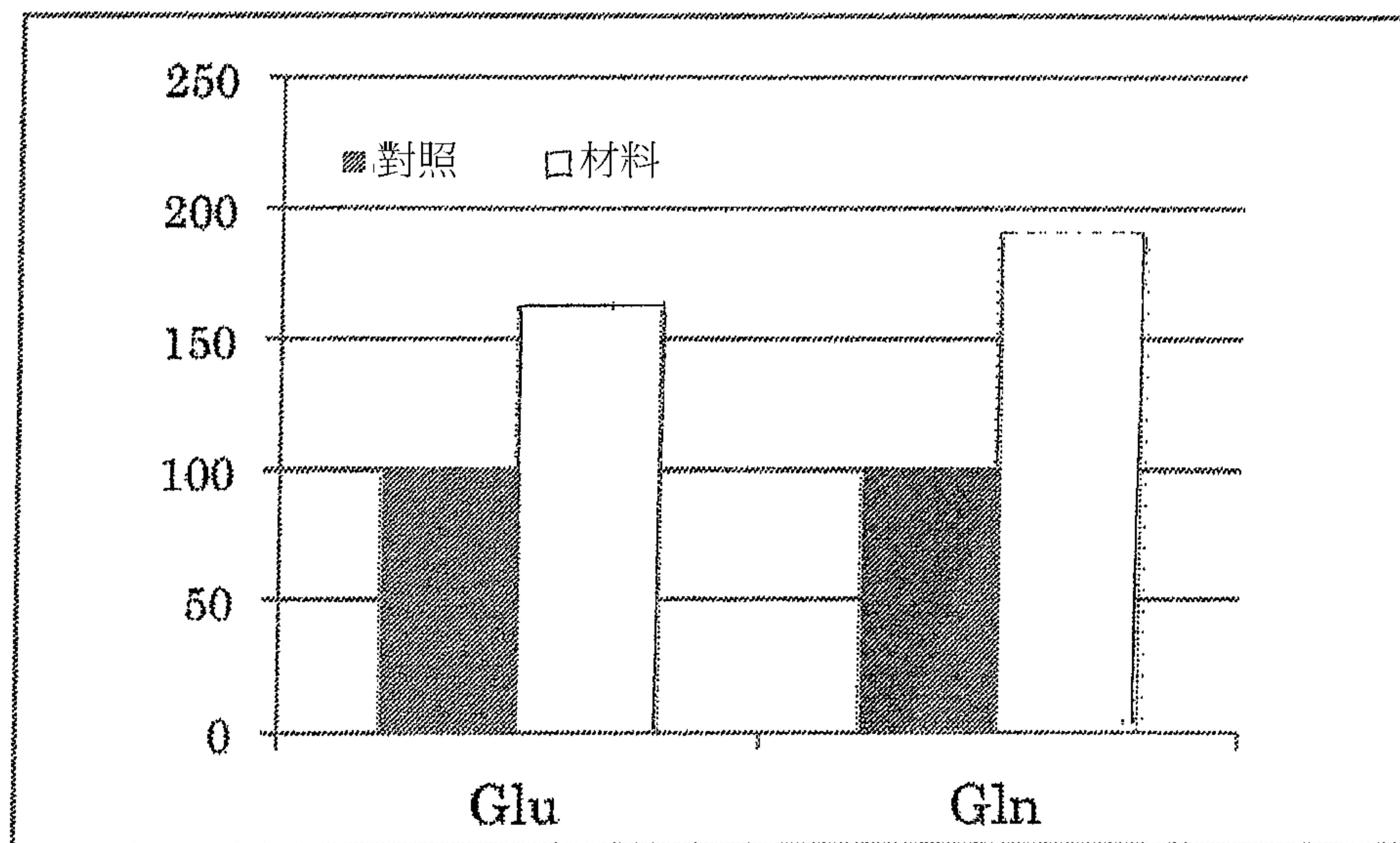
第7圖



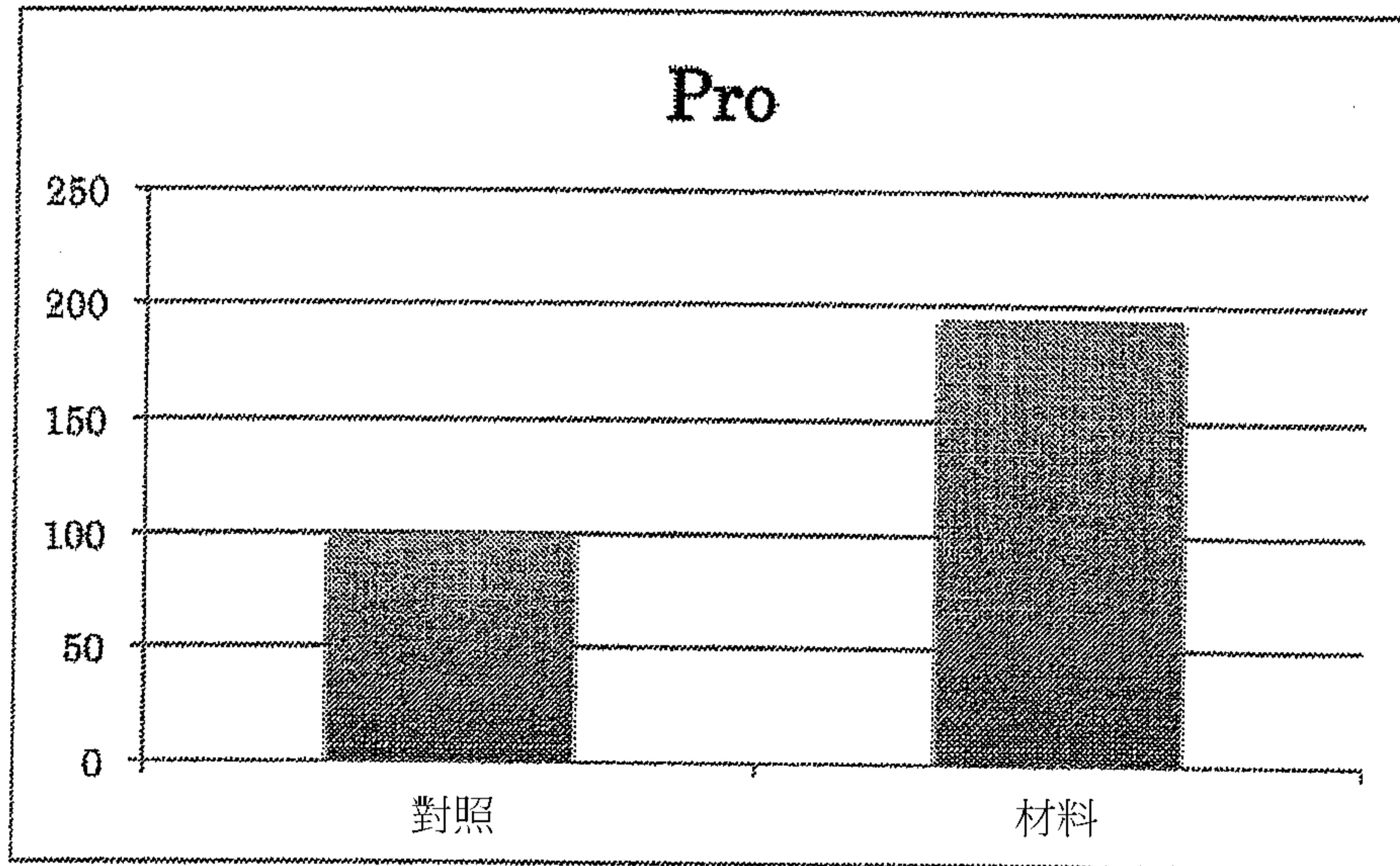
第8圖



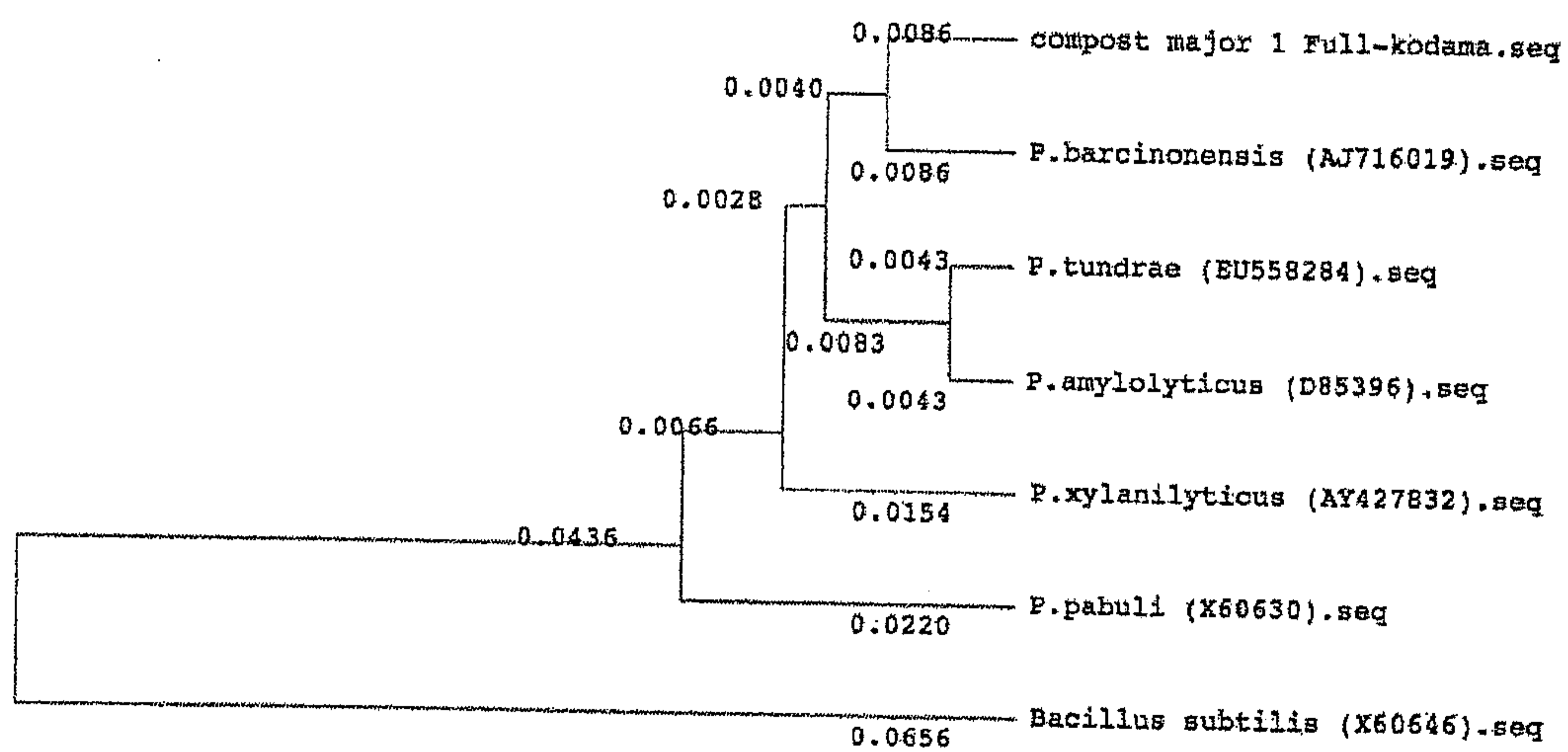
第9圖



第10圖



第11圖



第12圖