



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117157408 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 01

(21) 申请号 202380010874.2	(71) 申请人 株式会社村田制作所
(22) 申请日 2023.02.16	地址 日本京都府
(30) 优先权数据 2022-055718 2022.03.30 JP	(72) 发明人 高田雅亲 砂原博文
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2023.09.26	(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/JP2023/005404 2023.02.16	专利代理师 王洋
(87) PCT国际申请的公布数据 W02023/188945 JA 2023.10.05	(51) Int.Cl. C12P 1/04 (2006.01)
(83) 生物保藏信息 NITE BP-03614 2022.03.01 NITE BP-03615 2022.03.01 NITE BP-03616 2022.03.01 NITE BP-03617 2022.03.01	权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

新型的抗真菌剂

(57) 摘要

本发明提供包含来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质的抗真菌剂和其制造方法等。

1. 一种抗真菌剂,以酵母或丝状菌为靶,包含来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质。
2. 根据权利要求1所述的抗真菌剂,其中,嗜酸菌属细菌为嗜酸菌MT3株、MT4株、MT5株或MT6株,所述MT3株的保藏编号为NITE BP-03614,所述MT4株的保藏编号为NITE BP-03615,所述MT5株的保藏编号为NITE BP-03616,所述MT6株的保藏编号为NITE BP-03617。
3. 根据权利要求1或2所述的抗真菌剂,其中,丝状菌选自曲霉属真菌、毛霉属真菌和毛癣菌属真菌。
4. 一种抗真菌剂的制造方法,包括对嗜酸菌属细菌进行培养,所述抗真菌剂以酵母或丝状菌为靶。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中,嗜酸菌属细菌为嗜酸菌MT3株、MT4株、MT5株或MT6株,所述MT3株的保藏编号为NITE BP-03614,所述MT4株的保藏编号为NITE BP-03615,所述MT5株的保藏编号为NITE BP-03616,所述MT6株的保藏编号为NITE BP-03617。
6. 一种嗜酸菌MT3株、MT4株、MT5株或MT6株,所述MT3株的保藏编号为NITE BP-03614,所述MT4株的保藏编号为NITE BP-03615,所述MT5株的保藏编号为NITE BP-03616,所述MT6株的保藏编号为NITE BP-03617。
7. 一种方法,是抑制真菌生长的方法,该真菌为酵母或丝状菌,该方法包括使来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质与该酵母或丝状菌接触。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中,嗜酸菌属细菌为嗜酸菌MT3株、MT4株、MT5株或MT6株,所述MT3株的保藏编号为NITE BP-03614,所述MT4株的保藏编号为NITE BP-03615,所述MT5株的保藏编号为NITE BP-03616,所述MT6株的保藏编号为NITE BP-03617。
9. 根据权利要求7或8所述的方法,其中,丝状菌选自曲霉属真菌、毛霉属真菌和毛癣菌属真菌。

新型的抗真菌剂

技术领域

[0001] 本发明涉及来自嗜酸菌(Acidipila)属细菌的抗真菌物质。

背景技术

[0002] 从1981年到2019年全世界批准的医药品中,如果将以天然物为基本骨架的衍生物化合物或模拟了天然物的结构的合成化合物包含在内,则一半以上的医药品来自天然物(非专利文献1)。相当数量的来自天然物的医药品实际上是由微生物生产的。这表明探索来自微生物的天然物在医药品开发中非常重要。

[0003] 其中,放线菌是链霉素发现以来作为新药的探索源最受关注的一群微生物。已知放线菌为具有大量与次级代谢产物相关的生物合成基因组且生产富有化学多样性的次级代谢产物的菌群。来自放线菌且已实用化的抗生素达到几百种化合物,正是作为天然物探索源最重要的分类组。

[0004] 但是,在持续研究开发针对微生物、真菌疾病的医药品时,针对投资的回报率与“持续成本”不相称被视为问题,现在几乎不存在积极探索来自天然物的这些医药品的制药公司。特别是抗真菌剂的开发的状况严峻,2006年以后,没有来自天然物的抗真菌剂的新药。另一方面,从患者中发现了新的感染性真菌,期望开发一种新型抗真菌剂。

[0005] 现有技术文献

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献1:J Nat Prod 2020 Mar 27;83(3):770-803,“Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019”

发明内容

[0008] 本发明的目的在于探索生产富有多多样性的次级代谢产物的新的能够培养的微生物组而提供新型的抗真菌化合物。

[0009] 如上所述,作为用于医药品的天然物探索源,放线菌是主流,但本发明人等重新着眼于次级代谢产物生产能力高的酸杆菌门(Acidobacteria)细菌。酸杆菌门科细菌是多存在于土壤中的革兰氏阴性细菌,难以培养,因此大部分是未培养微生物。本发明人等进行深入研究,结果令人吃惊地发现酸杆菌门科细菌中嗜酸菌(Acidipila)属的菌群产出抗真菌物质。进而,本发明人等分离出新型的嗜酸菌属细菌。由此完成了本发明。

[0010] 本发明例如提供以下的方式。

[0011] [1]一种抗真菌剂,以酵母或丝状菌为靶,包含来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质。

[0012] [2]根据[1]所述的抗真菌剂,其中,嗜酸菌属细菌为嗜酸菌(Acidipila sp.)MT3株(保藏编号NITE BP-03614)、MT4株(保藏编号NITE BP-03615)、MT5株(保藏编号NITE BP-03616)或MT6株(保藏编号NITE BP-03617)。

[0013] [3]根据[1]或[2]所述的抗真菌剂,其中,丝状菌选自曲霉属真菌、毛霉属真菌和毛癣菌属真菌。

[0014] [4]根据[1]或[2]所述的抗真菌剂,其中,酵母选自酵母属真菌、念珠菌属真菌、马拉色菌属真菌和红酵母属真菌。

[0015] [5]根据[1]~[4]中任一项所述的抗真菌剂,其中,来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质为嗜酸菌属细菌的培养物或培养上清液或者其浓缩物或萃取物。

[0016] [6]一种抗真菌剂的制造方法,包括对嗜酸菌属细菌进行培养,该抗真菌剂以酵母或丝状菌为靶。

[0017] [7]根据[6]所述的方法,其中,嗜酸菌属细菌为嗜酸菌MT3株(保藏编号NITE BP-03614)、MT4株(保藏编号NITE BP-03615)、MT5株(保藏编号NITE BP-03616)或MT6株(保藏编号NITE BP-03617)。

[0018] [8]根据[6]或[7]所述的方法,其中,丝状菌选自曲霉属真菌、毛霉属真菌和毛癣菌属真菌。

[0019] [9]根据[6]或[7]所述的方法,其中,酵母选自酵母属真菌、念珠菌属真菌、马拉色菌属真菌和红酵母属真菌。

[0020] [10]一种嗜酸菌MT3株(保藏编号NITE BP-03614)、MT4株(保藏编号NITE BP-03615)、MT5株(保藏编号NITE BP-03616)或MT6株(保藏编号NITE BP-03617)。

[0021] [11]一种方法,是抑制真菌生长的方法,该真菌为酵母或丝状菌,该方法包括使来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质与该酵母或丝状菌接触。

[0022] [12]根据[11]所述的方法,其中,嗜酸菌属细菌为嗜酸菌MT3株(保藏编号NITE BP-03614)、MT4株(保藏编号NITE BP-03615)、MT5株(保藏编号NITE BP-03616)或MT6株(保藏编号NITE BP-03617)。

[0023] [13]根据[11]或[12]所述的方法,其中,丝状菌选自曲霉属真菌、毛霉属真菌和毛癣菌属真菌。

[0024] [14]根据[11]或[12]所述的方法,其中,酵母选自酵母属真菌、念珠菌属真菌、马拉色菌属真菌和红酵母属真菌。

[0025] [15]根据[11]~[14]中任一项所述的方法,其中,来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质为嗜酸菌属细菌的培养物或培养上清液或者其浓缩物或萃取物。

[0026] [16]一种嗜酸菌属细菌的培养物或培养上清液或者其浓缩物或萃取物的、作为以酵母或丝状菌为靶的抗真菌剂的应用。

[0027] [17]根据[16]所述的应用,其中,嗜酸菌属细菌为嗜酸菌MT3株(保藏编号NITE BP-03614)、MT4株(保藏编号NITE BP-03615)、MT5株(保藏编号NITE BP-03616)或MT6株(保藏编号NITE BP-03617)。

[0028] [18]根据[16]或[17]所述的应用,其中,丝状菌选自曲霉属真菌、毛霉属真菌和毛癣菌属真菌。

[0029] [19]根据[16]或[17]所述的应用,其中,酵母选自酵母属真菌、念珠菌属真菌、马拉色菌属真菌和红酵母属真菌。

[0030] 根据本发明,可提供一种来自嗜酸菌属细菌的新型的抗真菌物质。该抗真菌物质例如作为用于治疗真菌所引起的疾病的医药品或化妆品、清洗剂、食品添加剂(防腐剂等)、消毒剂等的有效成分是有用的。

附图说明

[0031] 图1示出使用本申请的抗真菌物质的抗真菌活性试验的结果。

具体实施方式

[0032] 本申请的抗真菌物质是嗜酸菌属细菌作为次级代谢物而产生的物质。抗真菌物质是指具有抗真菌活性的物质。本申请说明书中“抗真菌活性”是指抑制或阻碍真菌的增殖的能力。抗真菌活性可以通过该领域已知的方法来确认。已知的方法例如有点样 (Spot-on-lawn) 法、直接 (Direct) 法、纸盘 (Paper Disc) 法、MIC (minimum inhibitory concentration: 最低抑菌浓度) 法等。

[0033] 成为本申请的抗真菌物质的靶的真菌没有特别限定。本申请的抗真菌物质对以各种酵母和丝状菌为代表的各种真菌具有抗真菌活性。优选对酵母和丝状菌具有抗真菌活性。作为酵母的例子,没有限定,可举出酵母 (*Saccharomyces*) 属、接合酵母 (*Zygosaccharomyces*) 属、念珠菌 (*Candida*) 属、隐球酵母 (*Cryptococcus*) 属、马拉色菌 (*Malassezia*) 属、红酵母 (*Rhodotorula*) 属、肺孢子菌 (*Pneumocystis*) 属等微生物,优选可举出酵母属、念珠菌属、马拉色菌属和红酵母属的微生物。进而,作为酵母的具体例,没有限定,可举出酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、光滑念珠菌 (*Candida glabrata*)、热带念珠菌 (*Candida tropicalis*)、耳念珠菌 (*Candida auris*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、糠秕马拉色菌 (*Malassezia furfur*)、粘红酵母 (*Rhodotorula glutini*)、耶氏肺孢子菌 (*Pneumocystis jirovecii*) 等,优选可举出酿酒酵母、白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、糠秕马拉色菌和粘红酵母。作为丝状菌的例子,没有限定,可举出毛癣菌 (*Trichophyton*、白癣菌) 属、曲霉 (*Aspergillus*) 属、毛霉 (*Mucor*) 属、青霉 (*Penicillium*) 属、毛壳菌 (*Chaetomium*) 属、枝孢 (*Cladosporium*) 属、短梗霉 (*Aureobasidium*) 属、粘帚霉 (*Gliocladium*) 属、拟青霉 (*Paecilomyces*) 属等的微生物,优选可举出毛癣菌属、毛霉属和曲霉属的微生物。进而,作为丝状菌的具体例,没有限定,可举出红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、须癣毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、大毛霉 (*Mucor mucedo*)、绳状青霉 (*Penicillium funiculosum*)、毛壳霉 (*Chaetomium globosum*)、枝状枝孢霉 (*Cladosporium cladosporioides*)、黑酵母菌 (*Aureobasidium pullulans*)、绿粘帚霉 (*Gliocladium virens*)、多变拟青霉 (*Paecilomyces variotii*) 等,优选举出红色毛癣菌、须癣毛癣菌、黑曲霉、黄曲霉、烟曲霉、土曲霉和大毛霉。

[0034] 本申请中,嗜酸菌属细菌可以为属于嗜酸菌属的任一种菌种和菌株。例如,可以使用鼎湖山酸球菌 (*Acidipila dinghuensis*)、玫瑰假单胞菌 (*Acidipila rosea*) 等已知的菌种,但没有限定。另外,可以使用新分离出的嗜酸菌属细菌。嗜酸菌属细菌例如可以从土壤中分离,分离方法和挑选方法可以按照已知的方法进行,或者可以由本领域技术人员适当地确定。例如,可以使用DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) GmbH所公开的Medium 1426 (“SSE/HD1:10”培养基) 等已知的固体培养基,例如,在25℃~35℃培养24小时~30天,优选在28℃~30℃下培养7~14天,但没有限定。培养条

件只要根据菌体的出现状况和生长状况等由本领域技术人员适当地确定即可。本申请中,首次发现了嗜酸菌属细菌产生抗真菌物质。因此,本申请中使用的嗜酸菌属细菌具有抗真菌物质产生能力。

[0035] 本申请中进一步分离出嗜酸菌属细菌的4种新型的菌株,被鉴定为新物种。将它们分别命名为嗜酸菌MT3株、MT4株、MT5株和MT6株,在2022年3月1日保藏在独立行政法人制品评价技术基础机构专利微生物保藏中心(日本千叶县木更津市上总镰足2-5-8)(分别为保藏编号NITE BP-03614、保藏编号NITE BP-03615、保藏编号NITE BP-03616和保藏编号NITE BP-03617)。因此,本申请的一个实施方式中使用嗜酸菌MT3株、MT4株、MT5株或MT6株。

[0036] 本申请的抗真菌物质是通过培养嗜酸菌属细菌而产生的次级代谢物。嗜酸菌细菌的培养方法没有特别限定,可以为液体培养或固体培养中的任一种,优选可使用液体培养。培养中使用的培养基只要为细菌培养中使用的一般的培养基即可,例如,可举出DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) GmbH所公开的Medium 1426 (“SSE/HD1:10”培养基)等,但没有限定。培养温度和培养时间只要由本领域技术人员适当地确定即可,没有特别限定,例如,可以在25℃~35℃培养24小时~30天,优选在28℃~30℃培养7~14天。

[0037] 本申请的抗真菌物质可以由嗜酸菌属细菌的培养物或培养上清液得到,另外,可以为嗜酸菌属细菌的培养物或培养上清液本身、或者它们的浓缩物或萃取物。培养上清液可以通过常规方法得到。例如,可以通过离心分离等从菌体培养物中除去菌体而得到。可以对培养上清液进一步实施浓缩、萃取和/或纯化工序。浓缩、萃取和纯化工序可以通过常规方法进行,例如,可以采用真空浓缩、过滤器过滤、超滤等各种过滤,利用甲醇等有机溶剂的萃取、柱色谱、高效液相色谱等各种色谱法、使用氯仿、乙酸乙酯的液液萃取等。纯化可以采用蒸馏、反萃取、柱色谱、重结晶等。

[0038] 本申请进一步提供包含本申请的抗真菌物质作为有效成分的抗真菌剂。抗真菌剂为组合物的形态,例如,可举出医药组合物、化妆品组合物(例如洗发露、护发素、沐浴剂等)、清洗组合物(例如住宅用清洗剂、洗涤用洗剂、肥皂等)、食品添加剂用组合物、消毒剂组合物(例如也可应用于食品、厨具、医院等建筑物的墙壁、地板和桌子等家具)等。抗真菌剂除本申请的抗真菌物质以外,还可以含有在医药上或食品学上可接受的载体、赋形剂、溶剂、稳定剂、增溶剂等附加成分。抗真菌剂可以在本申请的抗真菌物质的基础上进一步含有其它抗真菌物质。抗真菌剂可以为任一剂型,只要根据使用目的适当地选择即可。例如,可举出化妆水、乳膏、泥敷剂、软膏、片剂、散剂、胶囊剂、颗粒剂、糖浆剂、注入剂、注射剂、粒剂、粉末、溶液、悬浮液、糊剂、喷雾剂、块等剂型,但没有限定。抗真菌剂为医药组合物时,可以作为真菌病的治疗药或预防药使用。作为真菌病,例如,可举出皮肤真菌病和深部真菌病,作为具体例,可举出白癣、马拉色菌性皮炎、念珠菌病、隐球菌病、曲霉病、接合菌病、肺孢子菌病等,但没有限定,优选可举出白癣、马拉色菌性皮炎、念珠菌病、曲霉病和接合菌病。医药组合物的给药途径只要根据治疗目的而适当地选择即可,例如,可举出口服给药、经皮给药、经鼻给药、通过注射进行给药等,但没有限定。医药组合物的给药量可以由本领域技术人员适当地确定。本申请的抗真菌剂为化妆品组合物或食品添加剂用组合物时,例如,可以作为防腐剂使用。本申请的抗真菌剂为清洗组合物或消毒剂组合物时,例如,可以用于除去和防止建筑物、住宅设备(例如墙壁、地板、浴室等用水区域等)、厨具、洗涤物等中的真

菌。抗真菌剂的使用量可以根据使用目的和使用状况等适当地确定。

[0039] 本申请的抗真菌物质可以在要求抑制真菌生长的任一场合下使用,通过使该抗真菌剂与真菌接触来抑制该真菌的生长。因此,本申请中提供一种抑制真菌生长的方法,包括使来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质与真菌接触。在此,“抑制”包含抑制真菌生长、阻碍真菌生长和/或杀灭真菌。作为要求抑制真菌生长的场合的例子,可举出治疗或预防真菌病等真菌为病因的疾病、防止食品或化妆品等因真菌所致的污染、劣化或腐败、除去或防止住宅或建筑物的设备、厨具、洗涤物等因真菌所致的污染等,但没有限定。

[0040] 使上述抗真菌物质与真菌接触的方法可以根据抗真菌物质的使用目的(即,要求抑制上述真菌生长的场合)适当地选择,例如,包括将上述抗真菌物质向处置对象进行给予、添加、涂布、喷雾、浸渍等,但没有限定。上述处置对象可根据抗真菌物质的使用目的而适当地选择。例如,在以治疗或预防真菌病等疾病为目的的情况下,可以包括对人等动物对象给予上述抗真菌物质,在以防止食品或化妆品等因真菌所致污染、劣化或腐败为目的的情况下,可以包括对食品或化妆品等添加上述抗真菌物质,在以除去或防止住宅、建筑物的设备等因真菌所致的污染的情况下,可以包括对住宅、建筑物的设备等添加、涂布、喷雾或浸渍抗真菌物质。上述抑制真菌生长的方法中,上述抗真菌物质可以为上述抗真菌剂,也可以为上述组合物的形态。上述抑制真菌的生长的方法中,将有效量的上述抗真菌物质或抗真菌剂对对象进行给予、添加、涂布、喷雾、浸渍等。因此,作为本申请的其它方式,提供一种真菌病的治疗或预防方法,包括对患者给予有效量的来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质或包含该抗真菌物质的抗真菌剂。作为本申请的又一方式,提供一种防止食品或化妆品的污染、劣化或腐败的方法,包括对食品或化妆品添加有效量的来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质或包含该抗真菌物质的抗真菌剂。作为本申请的另一方式,提供一种除去或防止住宅、建筑物的设备、厨具、洗涤物等的真菌污染的方法,包括对住宅、建筑物的设备、厨具、洗涤物等添加、涂布、喷雾或浸渍有效量的来自嗜酸菌属细菌的抗真菌物质或包含该抗真菌物质的抗真菌剂。

[0041] 以下,使用实施例对本发明进一步详细地进行说明,但本发明并不限于这些实施例。

[0042] 实施例1

[0043] 实施例1:新型嗜酸菌属细菌的鉴定

[0044] 利用常规方法确定从土壤分离出的4株嗜酸菌属细菌的基因组序列,并进行了16SrDNA解析、全基因组解析和ANI(Average Nucleotide Identity:平均核苷酸一致性)解析。16SrDNA解析中同源率为98.7%以下,ANI解析中ANI值为95%以下被视为新种。从土壤中分离菌体通过在DSMZ(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) GmbH所公开的Medium 1426“SSE/HD1:10”培养基的1.5wt%琼脂培养基上,在30℃下培养2周来进行。

[0045] <16SrDNA解析>

[0046] 将菌体用无色肽酶(富士胶片和光纯药制)溶菌,利用常规方法提取DNA,使用PrimeSTAR HSDNA聚合酶(Takara Bio制)进行PCR扩增,使用BigDye Terminator v3.1循环测序试剂盒(Applied Biosystems制)进行循环测序,利用ChromasPro1.7(Technelysium制)确定碱基序列。对于16SrDNA的V1~V4区域的约600个碱基,与NCBI国际碱基序列数据库

进行对照而实施同源性解析,制作简易分子系统树,进行种的鉴定。其结果,分离出的4株均与嗜酸菌属的已知物种中的鼎湖山酸球菌显示最高的序列同源性,该16SrDNA同源率表明这4株为嗜酸菌属的新种(表1)。将这4株新种分别命名为MT3、MT4、MT5和MT6。

[0047] <全基因组解析>

[0048] 对MT3、MT4和MT5株实施全基因组解析,使用该碱基序列实施ANI解析。使用DNeasy血液和组织试剂盒(Qiagen)从各菌株中提取DNA,使用Illumina DNAPrep (M) Tagmentation试剂盒制备文库。Index试剂盒使用Nextera DNACD Indexe试剂盒。使用下一代测序仪(MiSeq,Illumina)实施测序(301bp的双端解析)。使用Platanus B实施基因组组装,确定碱基序列。使用QUAST和checkM,实施组装结果的评价。

[0049] <ANI解析>

[0050] 接下来,使用EZbiocloud(<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)算出ANI值,实施菌株间的同源性解析。在ANI解析中,将对象株的基因组序列在计算机上片段化成1020bp,对比较株的基因组序列进行各片段的同源性检索,由这些同源值的平均值求出基因组序列间的ANI值。将NCBI国际碱基序列数据库中登记的鼎湖山酸球菌DHOF10和鼎湖山酸球菌CGMCC 1.13007作为比较株实施ANI解析,结果ANI值均小于95%,可以确认为新种(表1)。另外,由于MT3、MT4、MT5株中同源性不同,因此推测它们为具有不同的基因信息的菌株。进而,将玫瑰假单胞菌(DSM103428)作为比较株实施ANI解析,结果ANI值均小于95%(表1)。

[0051] [表1]

[0052]

菌株名称	16SrDNA解析		全基因组解析	
	同源率高的种名	同源率	比较株	ANI值
MT3	鼎湖山酸球菌	96.5%	鼎湖山酸球菌 DHOF10	71.5%
			鼎湖山酸球菌 CGMCC 1.13007	71.3%
			玫瑰假单胞菌 DSM 103428	71.6%
MT4	鼎湖山酸球菌	97.2%	鼎湖山酸球菌 DHOF10	71.4%
			鼎湖山酸球菌 CGMCC 1.13007	71.5%
			玫瑰假单胞菌 DSM 103428	71.6%
MT5	鼎湖山酸球菌	97.2%	鼎湖山酸球菌 DHOF10	71.2%
			鼎湖山酸球菌 CGMCC 1.13007	71.1%
			玫瑰假单胞菌 DSM 103428	71.5%
MT6	鼎湖山酸球菌	97.2%		

[0053] 实施例2

[0054] 实施例2:生产用培养基中的嗜酸菌属细菌的培养和培养浓缩液的制作

[0055] 准备抗真菌物质生产用培养基,在500mL三角烧瓶中各分注100mL,用高压釜进行121℃/20min灭菌处理。在高压釜处理后,添加预先进行了液体培养的各菌株液1mL。该作业在安全柜内的无菌状态下进行。利用振荡器在27℃以210rpm搅拌培养6天而产生次级代谢产物。其后,在培养液中添加等量(100mL)甲醇,以210rpm搅拌30分钟。搅拌后以3000rpm进行10分钟离心分离处理,除去菌体,将上清液移至1L茄形烧瓶。利用热水浴40℃的蒸发器进行浓缩作业。缓慢提高真空度并抽吸至80hPa,去除甲醇,由此得到培养浓缩液样品。

[0056] 应予说明,作为菌株,使用嗜酸菌MT3株、MT4株、MT5株和MT6株。菌株的液体培养(前培养)使用YD培养基(1%葡萄糖、1%酵母提取物),在30℃培养6天使其增殖至OD600为1~1.5。作为抗真菌物质生产用培养,使用上述Medium 1426培养基,在28℃培养14天。

[0057] [实施例3]

[0058] 实施例3:抗真菌活性试验(点样检测)

[0059] 作为检定菌,使用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (NBRC10505)。接种于MRS (Becton, Dickinson and Company制) 液体培养基,在30℃以150rpm进行1天搅拌培养,制作检定菌液。将MRS软琼脂培养基(琼脂0.5%) 在试验管中分注7mL,进行高压釜灭菌(105℃/10分钟),冷却至55~60℃。将上述液体培养基中培养的检定菌液70μL加入到各软琼脂培养基中,使用搅拌机搅拌。在预先制作的MRS琼脂培养基板(琼脂1.5%) 上流入上述软琼脂培养基,制作抗真菌活性试验用培养基。确定板上的位置,点样10μL的实施例2中得到的培养浓缩液样品。在30℃培养24小时,目视进行观察。该实验中,在具有抗真菌活性的情况下可以确认到抑菌圈。

[0060] 其结果,在4种菌株的任一培养浓缩液中均确认到抑菌圈(图1)。因此,可知嗜酸菌属细菌的培养浓缩液显示抗真菌活性。

[0061] [实施例4]

[0062] 实施例4:针对各种真菌的抗真菌活性试验

[0063] 作为酵母检定菌,使用白色念珠菌 (*Candida albicans*)、糠秕马拉色菌 (*Malassezia furfur*)、粘红酵母 (*Rhodotorula glutini*)。作为丝状菌检定菌,使用红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、大毛霉 (*Mucor mucedo*)。已知白色念珠菌、黑曲霉和大毛霉分别为属于深部真菌病的念珠菌病、曲霉病和接合菌病的病原菌。已知糠秕马拉色菌和红色毛癣菌分别为属于皮肤真菌病的马拉色菌性皮炎和白癣的病原菌。粘红酵母虽然没有病原性,但已知为在浴室等用水区域等中可见的红霉。

[0064] 将各检定菌接种于各液体培养基,在30℃以150rpm进行1天搅拌培养,制作检定菌液。将各检定菌规格的软琼脂培养基(琼脂0.5%) 在试验管中分注7mL,进行高压釜灭菌(105℃/10分钟),冷却至55~60℃。将上述液体培养基中培养的检定菌液70μL加入到各软琼脂培养基中,使用搅拌机进行搅拌。在预先制作的琼脂培养基平板(琼脂1.5%) 上流入上述软琼脂培养基,制作抗真菌活性试验用培养基。各检定菌中使用的液体培养基的组成如表2所示。

[0065] [表2]

红色毛癣菌		
蛋白胨	10	g
葡萄糖	40	g
蒸馏水	1	L

黑曲霉 / 大毛霉		
马铃薯	200	g
蔗糖	20	g
蒸馏水	1	L

白色念珠菌 / 粘红酵母		
葡萄糖	10	g
蛋白胨	5	g
酵母提取物	3	g
麦芽提取物	3	g
蒸馏水	1	L

糠秕马拉色菌		
葡萄糖	10	g
蛋白胨	5	g
酵母提取物	3	g
麦芽提取物	3	g
橄榄油	10	g
蒸馏水	1	L

[0067] 在各抗真菌活性试验用培养基上配置 $\phi 5\text{mm}$ 的纸盘,点样(纸盘法) $50\mu\text{L}$ 的实施例2中得到的培养浓缩液样品。在 30°C 培养24小时,目视进行观察。进一步在各抗真菌活性试验用培养基上开 $\phi 5\text{mm}$ 的孔,点样(琼脂扩散法) $250\mu\text{L}$ 的实施例2中得到的培养浓缩液样品。在 30°C 培养24小时,目视进行观察。无论在哪个实验中,在具有抗真菌活性的情况下菌能够确认到抑菌圈。在通过目视观察到抑菌圈的情况下,测定抑菌圈的尺寸。抑菌圈的尺寸是通过利用尺测定在观察到的抑菌圈的最长半径中从位于抑菌圈的中心的纸盘(纸盘法的情况)或孔(琼脂扩散法的情况)的外周到抑菌圈的外周的距离而求出的。在看到双重抑菌带的情况下,测定内侧的抑菌圈。将结果示于表3。应予说明,表3中,“无活性”表示通过目视没有观察到抑菌圈。

[0068] [表3]

检定菌	抑菌圈的尺寸							
	MT3株		MT4株		MT5株		MT6株	
	$50\mu\text{L}$	$250\mu\text{L}$	$50\mu\text{L}$	$250\mu\text{L}$	$50\mu\text{L}$	$250\mu\text{L}$	$50\mu\text{L}$	$250\mu\text{L}$
红色毛癣菌 NBRC 5467	6.5mm	未试验	6.0mm	未试验	6.0mm	未试验	6.5mm	未试验
黑曲霉 NBRC 33023	无活性	5mm	无活性	4.5mm	无活性	4.5mm	无活性	5mm
大毛霉 NBRC 5776	无活性	1.5mm	无活性	1.5mm	无活性	1.5mm	无活性	1.5mm
白色念珠菌 NBRC 1594	无活性	0.5mm	无活性	0.5mm	无活性	0.5mm	无活性	0.5mm
粘红酵母 NBRC 1241	无活性	5mm	无活性	5mm	无活性	5mm	无活性	5mm
糠秕马拉色菌 NBRC 10988	无活性	2mm	无活性	1.8mm	无活性	1.8mm	无活性	2mm

[0070] 其结果,对任一检定菌均观察到抑菌圈。在红色毛癣菌中观察到特别大的抑菌圈,对白癣菌显示强的抗真菌活性。

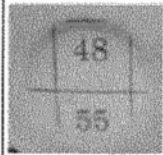
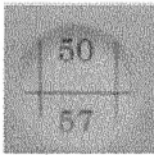
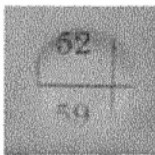
MT3株	MT4株	MT5株	MT6株
			

图1