



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118574922 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 30

(21) 申请号 202280086564.4

(22) 申请日 2022.10.31

(30) 优先权数据

2022-000318 2022.01.05 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/040698 2022.10.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/132122 JA 2023.07.13

(83) 生物保藏信息

NITE BP-03572 2021.12.15

NITE BP-03573 2021.12.15

(71) 申请人 株式会社吴羽

地址 日本东京

申请人 国立研究开发法人产业技术综合研究所

(72) 发明人 越山龙行 东山幸弘 佐藤俊
森田友岳 杂贺梓 牛丸和乘

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

专利代理师 徐舒

(51) Int. Cl.

G12N 1/16 (2006.01)

G12P 13/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

PCT/RO/134表2页

(54) 发明名称

新型微生物、新型微生物的培养物或提取物
以及麦角硫因的生产方法

(57) 摘要

本公开涉及一种微生物,该微生物是属于红冬孢锁掷孢酵母的微生物(NITE BP-03572)或属于Vanrija属的微生物(NITE BP-03573)。

1. 一种微生物,所述微生物是保藏编号为NITE BP-03572的、属于红冬孢锁掷孢酵母的微生物或保藏编号为NITE BP-03573的、属于与*Vanrija humicola*相关的物种*Vanrija sp.*的微生物。
2. 一种微生物的培养物,所述培养物是如权利要求1所述的微生物的培养物。
3. 一种微生物的提取物,所述提取物是如权利要求1所述的微生物的提取物。
4. 一种麦角硫因的生产方法,所述生产方法包括如下工序:
培养属于红冬孢酵母属或*Vanrija*属的微生物,得到包含麦角硫因的培养物。
5. 根据权利要求4所述的麦角硫因的生产方法,其中,
所述属于红冬孢酵母属的微生物为红冬孢锁掷孢酵母。
6. 根据权利要求4所述的麦角硫因的生产方法,其中,
所述属于*Vanrija*属的微生物为与*Vanrija humicola*相关的物种*Vanrija sp.*。
7. 根据权利要求4所述的麦角硫因的生产方法,其中,
所述属于红冬孢酵母属的微生物为保藏编号为NITE BP-03572的、属于红冬孢锁掷孢酵母的微生物。
8. 根据权利要求4所述的麦角硫因的生产方法,其中,
所述属于*Vanrija*属的微生物为保藏编号为NITE BP-03573的、属于与*Vanrija humicola*相关的物种的微生物。

新型微生物、新型微生物的培养物或提取物以及麦角硫因的生产方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型微生物、新型微生物的培养物或提取物以及麦角硫因的生产方法。

背景技术

[0002] 麦角硫因是含硫氨基酸的一种。麦角硫因具有比维生素E的抗氧化作用优异的抗氧化作用,在健康和美容等领域中,作为利用价值高的化合物受到关注。

[0003] 例如,在专利文献1和非专利文献1中,记载有麦角硫因生产能力增强的转化丝状菌。

[0004] 此外,在非专利文献2中记载有麦角硫因生产能力增强的、经转化的甲基杆菌(Methylobacterium)属的微生物。在非专利文献2中记载有短梗霉(Aureobasidium)属和红酵母(Rhodotorula)属的微生物具有麦角硫因生产能力。

[0005] 此外,在非专利文献3中记载有侧耳(Pleurotus)属的微生物具有麦角硫因生产能力。

[0006] 在专利文献2中记载有甲基杆菌(Methylobacterium)属和红酵母(Rhodotorula)属的微生物具有麦角硫因生产能力。在专利文献3中记载有丛梗孢酵母(Moniliella)属的微生物具有麦角硫因生产能力。在专利文献4中记载有Dirkmeia属、Papiliotrema属以及Apiotrichum属的微生物具有麦角硫因生产能力。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2016/121285号

[0010] 专利文献2:国际公开第2016/121285号

[0011] 专利文献3:国际公开第2019/004234号

[0012] 专利文献4:国际公开第2021/140693号

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献1:S.Takusagawa,Biosci.Biotechnol.Biochem.,83,181-184(2019)

[0015] 非专利文献2:Y.Fujitani et al.,J.Biosci.Bioeng.,126,715-722(2018)

[0016] 非专利文献3:SY.Lin,Int.J.Med.Mushrooms,17,749-761(2015)

发明内容

[0017] 发明要解决的问题

[0018] 已知麦角硫因不在人体内生物合成,而在一部分微生物中生物合成。因此,如上述现有技术文献所述,正在进行产生麦角硫因的微生物的探索、以及用于增强麦角硫因的生产的微生物的改造等的研究开发。

[0019] 通过基因重组技术,可以改变微生物以增强麦角硫因的生产。然而,通过该微生物

生产的麦角硫因无法在食品产业等中利用。因此,迫切需要寻找未进行基因重组的未改造的、麦角硫因生产量高的微生物。

[0020] 本发明是鉴于上述技术问题而完成的,其目的在于,提供一种麦角硫因的生产量高的新型微生物。

[0021] 技术方案

[0022] 本发明人等进行了筛选,结果发现麦角硫因的生产量高的新型微生物,从而完成了本发明。

[0023] 本发明的一个方案的微生物是属于红冬孢锁掷孢酵母的微生物(NITE BP-03572)或属于*Vanrija sp.*的微生物(NITE BP-03573),所述*Vanrija sp.*属于与*Vanrija humicola*相关的物种。

[0024] 此外,本发明的一个方案的麦角硫因的生产方法是包括如下工序的麦角硫因的生产方法:培养属于红冬孢酵母属或*Vanrija*属的微生物,得到包含麦角硫因的培养物。

[0025] 有益效果

[0026] 根据本发明的一个方案,能提供一种麦角硫因的生产量高的微生物。

具体实施方式

[0027] 在本说明书中,除非另有说明,表示数值范围的“A~B”是指“A以上(大于等于A)且B以下(小于等于B)”。

[0028] (新型微生物)

[0029] 本发明的一个方案的微生物是具有生产麦角硫因的能力的属于红冬孢酵母(*Rhodospordiobolus*)属的微生物、或具有生产麦角硫因的能力的属于*Vanrija*属的微生物。

[0030] 本发明的一个方案的微生物的麦角硫因的生产量高。麦角硫因是含硫氨基酸的一种,具有优异的抗氧化作用。此外,由于本发明的一个方案的微生物未进行利用基因重组技术等的改造,因此也可以在食品产业中使用。

[0031] (1.红冬孢锁掷孢酵母EB152)

[0032] 红冬孢锁掷孢酵母(*Rhodospordiobolus azoricus*)EB152(以下有时简称为“酵母EB152”)是以植物体的叶为分离源而首次分离出的微生物。

[0033] 对核糖体RNA基因的26SrDNA的D1/D2区域和ITS区域的碱基序列进行了确定。然后,进行了在TechnoSuruga实验室微生物鉴定系统(TechnoSuruga Laboratory, Japan)数据库DB-FU13.0和国际碱基序列数据库(DDBJ/ENA(EMBL)/GenBank)中的BLAST相同检索。其结果是,EB152归属于红冬孢锁掷孢酵母。此外,除了作为碳源的麦芽糖以及水溶性淀粉的同化性和维生素需求性以外,显示出与红冬孢锁掷孢酵母大致类似的生理/生物化学性状。

[0034] 酵母EB152在千叶县木更津市上总镰足2-5-8 122号室,独立行政法人制品评价技术基盘机构(National Institute of Technology and Evaluation;以下,简称为“NITE”)的专利微生物保藏中心(NPMD)中保藏(原保藏日:2021年12月15日,保藏编号:NITE BP-03572)。

[0035] 酵母EB152的培养方法只要依据对红冬孢酵母属的微生物进行的通常培养方法进行即可。培养方式是使用了液体培养基的批次培养、或向培养体系中连续添加碳源和/或

有机氮源的分批补料培养,优选通气搅拌。作为培养基,可以使用含有如下物质的培养基:属于红冬孢酵母属的微生物能同化的碳源、氮源或无机盐等必需营养源。培养pH优选为3~8,培养温度优选为20°C~30°C,培养时间优选为2~14天。

[0036] (2. *Vanrija* sp. EB891)

[0037] *Vanrija* sp. EB891 (以下有时简称为“酵母EB891”)是以担子菌子实体为分离源首次分离出的微生物。

[0038] 对核糖体RNA基因的26SrDNA的D1/D2区域和ITS区域的碱基序列进行了确定。然后,进行了在TechnoSuruga实验室微生物鉴定系统(TechnoSuruga Laboratory, Japan)数据库DB-FU13.0和国际碱基序列数据库(DDBJ/ENA(EMBL)/GenBank)中的BLAST相同检索。其结果是,显示出EB891与*Vanrija humicola*相关。此外,除了在关于碳源菊粉和水溶性淀粉的同化性、氮源硝酸盐的同化性、维生素需求性、在50%D-葡萄糖和10%NaCl/5%葡萄糖中的生长性方面确认到差异以外,显示出与*Vanrija humicola*大致类似的生理/生物化学性状。

[0039] 酵母EB891在千叶县木更津市上总镰足2-5-8 122号室,独立行政法人制品评价技术基盘机构(Natural Institute of Technology and Evaluation;以下,简称为“NITE”)的专利微生物保藏中心(NPMD)中保藏(原保藏日:2021年12月15日,保藏编号:NITE BP-03573)。

[0040] 酵母EB891的培养方法只要依据对*Vanrija*属的微生物进行的通常培养方法进行即可。培养方式是使用了液体培养基的批次培养、或向培养体系中连续添加碳源和/或有机氮源的分批补料培养,优选通气搅拌。作为培养基,可以使用含有如下物质的培养基:属于*Vanrija*属的微生物能同化的碳源、氮源或无机盐等必需营养源。培养pH优选为3~8,培养温度优选为20°C~30°C,培养时间优选为2~14天。

[0041] (培养物)

[0042] 本发明的一个方案的培养物是酵母EB152或酵母EB891的培养物。在本发明的一个方案的培养物中包含:培养上清液、培养沉淀物、培养基、培养菌体、培养菌体破碎物、培养菌体的冷冻干燥物等培养菌体处理物等。在本发明的一个方案的培养物中包含麦角硫因。

[0043] (提取物)

[0044] 本发明的一个方案的提取物是酵母EB152或酵母EB891的提取物。在本说明书中,“微生物的提取物”是指通过对微生物进行提取处理而得到的物质、以及通过对微生物的培养物进行提取处理而得到的物质。因此,本发明的一个方案的提取物例如可以通过对酵母EB152或酵母EB891进行提取处理、或对酵母EB152或酵母EB891的培养物进行提取处理而得到。在本发明的一个方案的提取物中包含麦角硫因。

[0045] 作为提取处理,可列举出:热水提取;利用有机溶剂等的溶剂提取;加压提取;利用酶和表面活性剂等化学提取;超声波提取;碱提取;酸提取;利用渗透压的提取;通过粉碎的提取;通过磨碎的提取;通过冻融的提取;利用液氮的提取;通过高速搅拌的提取等。从发挥优异的植物生长效果的方面等考虑,提取处理优选为热水提取。提取处理可以为一种,也可以进行两种以上的提取处理。

[0046] 热水提取是使提取对象物与热水接触一定时间或使其浸渍于热水中的提取。热水提取中使用的水的温度优选为40°C以上,更优选为60°C以上。

[0047] 本发明的一个方案的提取物可以是作为酵母EB152或酵母EB891的微生物的热水提取物、利用有机溶剂等的溶剂提取物;加压提取物;利用酶和表面活性剂等的化学提取物;超声波提取物;碱提取物;酸提取物;利用渗透压的提取物;通过粉碎的提取物;通过磨碎的提取物;通过冻融的提取物;利用液氮的提取物;或通过高速搅拌的提取物。

[0048] 作为本发明的一个方案的培养物或提取物的用途,可列举出包含该培养物或提取物作为有效成分的植物生长调节剂等。

[0049] (麦角硫因的生产方法)

[0050] 本发明的一个方案的麦角硫因的生产方法包括如下工序:培养属于红冬孢酵母属或*Vanrija*属的微生物,得到包含麦角硫因的培养物。

[0051] 在本发明的一个方案的麦角硫因的生产方法中,从麦角硫因的生产量高的方面考虑,属于红冬孢酵母属的微生物优选为属于红冬孢锁掷孢酵母的微生物,更优选为酵母EB152。此外,从麦角硫因的生产量高的观点考虑,属于*Vanrija*属的微生物优选为属于*Vanrija sp.*属的微生物,更优选为酵母EB891,所述*Vanrija sp.*属于与*Vanrija humicola*相关的物种。

[0052] 从包含麦角硫因的培养物中回收麦角硫因例如只要以从通常的微生物培养物中回收麦角硫因并提纯的方法来进行即可。例如,将培养物离心分离等而回收菌体。接着,通过将回收的菌体供于热水提取等,得到包含麦角硫因的提取液。然后,通过对该提取液进行提纯,能回收麦角硫因。微生物的麦角硫因的生产量例如可以通过高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用(LCMS:liquid chromatography-mass spectroscopy)等质量分析装置测定所得到的提取液,由此进行定量。

[0053] (总结)

[0054] 本发明的方案1的微生物是属于红冬孢锁掷孢酵母属的微生物(NITE BP-03572)或属于*Vanrija sp.*的微生物(NITE BP-03573),所述*Vanrija sp.*属于与*Vanrija humicola*相关的物种。

[0055] 本发明的方案2的培养物是所述微生物的培养物。

[0056] 本发明的方案3的提取物是所述微生物的提取物。

[0057] 本发明的方案4的麦角硫因的生产方法包括如下工序:培养属于红冬孢酵母属或*Vanrija*属的微生物,得到包含麦角硫因的培养物。

[0058] 就本发明的方案5的麦角硫因的生产方法而言,可以是,在上述方案4中,所述属于红冬孢酵母属的微生物为红冬孢锁掷孢酵母。

[0059] 就本发明的方案6的麦角硫因的生产方法而言,可以是,在上述方案4或5中,所述属于*Vanrija*属的微生物为属于与*Vanrija humicola*相关的物种的*Vanrija sp.*。

[0060] 就本发明的方案7的麦角硫因的生产方法而言,可以是,在上述方案4~6中的任一项中,所述属于红冬孢酵母属的微生物为属于红冬孢锁掷孢酵母的微生物(NITE BP-03572)。

[0061] 就本发明的方案8的麦角硫因的生产方法而言,可以是,在上述方案4~7中的任一项中,所述属于*Vanrija*属的微生物为属于*Vanrija sp.*的微生物(NITE BP-03572),所述*Vanrija sp.*属于与*Vanrija humicola*相关的物种。

[0062] 以下示出实施例,对本发明的实施方式进一步详细地进行说明。当然,不言而喻的

是,并不限于本发明的以下的实施例,细节部分可以采用各种形态。而且,本发明不限于上述的实施方式,可以在权利要求书所示的范围内进行各种变更,并且通过适当组合分别公开的技术手段而得到的实施方式也包含在本发明的技术范围内。此外,本说明书中记载的文献全部作为参考来援引。

[0063] 实施例

[0064] 以下的实施例中,只要没有特别记载,%表示质量%。

[0065] (1) 在从环境中采集的分离源中的富集培养

[0066] 首先,分两次进行了从植物和土壤等环境中的微生物样品采集。其结果是,采集了合计150个样品(第一次90个,第二次60个)。

[0067] 接着,将采集到的样品分别浸渍于包含筛选培养基(screening medium) 2mL的15mL的塑料管中,在200rpm下、25°C下培养了3~5天。筛选培养基使用了包含抗生素的YM培养基。具体而言,使用包含如下物质的培养基:1%葡萄糖、0.5%蛋白胨、0.3%酵母提取物、0.3%麦芽提取物、0.01%硫酸链霉素、0.005%氯霉素。

[0068] 然后,通过目视选拔出培养基浑浊(微生物增殖了)的126个样品(第一次70个,第二次56个)。

[0069] (2) 基于氧化应激负荷的样品的选拔

[0070] 用YM培养基将在上述(1)中选拔出的126个样品的培养液稀释为100倍或100000倍。然后,将经稀释的培养液涂布于YM琼脂培养基和添加了3mM的 H_2O_2 的YM琼脂培养基(以下简称含 H_2O_2 的YM琼脂培养基),在25°C下培养了2~5天。

[0071] 对在YM琼脂培养基上生长的菌落数和含 H_2O_2 的YM琼脂培养基上生长的菌落数进行了计数。然后,从YM琼脂培养基和含 H_2O_2 的YM琼脂培养基的两者中,选拔出生长有菌落的112个样品。

[0072] 而且,对于选拔出的112个样品在琼脂培养基上生长的菌落,通过目视观察形态和颜色,选拔出种类不同的181个酵母样的菌落(第一次106个,第二次75个)。

[0073] (3) 选拔菌落的96孔中的培养

[0074] 将在上述(2)中选拔出的181个菌落接菌至包含1mL的YM培养基的96孔板(96well plate)中,在1600rpm下、25°C下培养了3~4天。培养后,将回收的培养液在2000rpm下、4°C下进行了10分钟离心分离。用纯粹1mL对通过离心分离得到的菌体颗粒进行清洗,供于再次离心分离。

[0075] 向通过离心分离得到的菌体颗粒加入0.1mL的纯水并悬浮。将所得到的悬浊液在96°C下加热10分钟,提取出菌体内成分。然后,将提取出的菌体内成分供于离心分离而去除菌体残渣,得到了提取液。

[0076] (4) 利用LCMS的提取液中的麦角硫因的定量分析

[0077] 用0.45 μ m的PVD过滤器对上述(3)中得到的提取液0.15mL与乙腈0.35mL混合而成的溶液进行过滤。将所得到的滤液用作LCMS测定的样品。

[0078] 在LCMS分析中使用了岛津制作所公司制LCMS-2020。此外,LC的色谱柱使用了SHODEX公司制的Asahipak NH2P-40 2D+保护柱。作为LC的移动相,使用了10mM甲酸铵与乙腈的混合液(10mM甲酸铵/乙腈=30/70(v/v))。此外,将流速设为0.1mL/min,在25°C下进行了分析。

[0079] 在MS检测中,以同时进行ESI (Electron Spray Ionization:电喷雾离子) 离子化和APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization:大气压化学电离) 离子化的DUIS (Dual Ion Source:双离子源) 模式进行了离子化。此外,以能检测麦角硫因的 $m/z=230(+)$ 的SIM (Selected Ion Monitoring:选择离子监测) 模式进行了检测。

[0080] 对在上述 (2) 中选拔出的181个菌落的提取液进行了分析,其结果是,选拔出麦角硫因的生产量高的22个菌落 (第一次7个,第二次15个)。

[0081] (5) 在生产麦角硫因的微生物的烧瓶中的放大培养 (scale-up culture)

[0082] 将在上述 (4) 中选拔出的22个菌落接菌至包含50mL的YM培养基的300mL烧瓶中,在200rpm下、25°C下培养了7天 (n=1)。

[0083] 适当采集了第3~7天的培养液。与上述 (3) 同样地,对菌体进行离心分离和清洗后,通过热水提取回收了提取液。

[0084] 与上述 (4) 同样地,通过LCMS对所得到的提取液进行分析,选拔出麦角硫因的生产量高的两株 (EB152、EB891)。

[0085] 将选拔出的两株菌落接菌至包含50mL的YM培养基的300mL烧瓶中,在200rpm下、25°C下培养了5天 (n=3)。然后,通过LCMS测定出第5天的麦角硫因的生产量。

[0086] 将选拔出的两株菌落的麦角硫因的生产量和生产速度示于表1。表2表示公知的微生物的生产量和生产速度。在表1和表2中,只要没有特别记载,麦角硫因 (EGT) 的生产量的单位就为mg/L,EGT的生产速度就为mg/L/d (麦角硫因每天的生产量)。此外,表1的EGT的生产量表示培养第5天的麦角硫因的生产量。

[0087] 关于表1的“提取物中的EGT量”,提取物是使用加入了YM培养基2L的5L发酵罐,将该微生物在25°C下需氧培养5天,从培养后的干燥菌体中进行热水提取而得到的。然后,通过LCMS测定出提取物中的EGT量。

[0088] [表1]

株名	EGT 生产量 (mg/L)	EGT 生产速度 (mg/L/天)	提取物中的 EGT 量 (mg/L)
EB152	22.6±1.4	4.5	192
EB891	26.3±1.3	5.3	269

[0090] [表2]

微生物	EGT 生产量	EGT 生产速度	参考文献
黑酵母菌 kz25	14	2	J Biosci Bioeng 126 (2018) 715
[0091] 米曲霉菌 NSAR1	11.5 (mg/kg)	2.3 (mg/kg/d)	Biosci Biotechnol Biochem 83 (2019) 181
金顶侧耳	13-98	0.8-6.1	I J Med Mushroom 17 (2015) 749
水生甲基杆菌 22A	12.2	1.7	J Biosci Bioeng 126 (2018) 715

[0092] 由表1和表2可知,选拔出的两株麦角硫因的生产量为已知的生产麦角硫因的微生物的麦角硫因的生产量的同等以上。此外,选拔出的两株麦角硫因的生产速度也为已知的生产麦角硫因的微生物的生产速度的同等以上。此外,对于选拔出的两株提取物,确认了富含麦角硫因。

[0093] (6) 选拔出的两株的鉴定

[0094] 选拔出的两株的归属分类群的推定根据核糖体RNA基因的26SrDNA的D1/D2区域和ITS区域的碱基序列的解析来进行。

[0095] (7) EB152株的分子系统学的位置和生理学的性质

[0096] 对于EB152株的26S rDNA的D1/D2区域碱基序列和ITS-5.8rDNA碱基序列,进行了在国际碱基序列数据库中的BLAST相同检索。其结果是,对于作为担子菌类酵母菌的一种的红冬孢锁掷孢酵母的多个碱基序列显示出98.4%~100%的相同性。此外,在基于所得到的碱基序列解析出的分子系统树中,EB152株包含于由红冬孢酵母属所构成的系统群中。并且,显示出与红冬孢锁掷孢酵母JCM11251^T相同的分子系统学位置。

[0097] 将EB152株在YM琼脂平板培养基上、25℃下培养3天,对所形成的菌落进行观察。菌落的周缘的形状为完整,隆起状态为靠垫形。此外,菌落的表面的形状为平滑。而且,菌落具有黄油样和湿性,为粉色~淡橙色。

[0098] 此外,将EB152株在YM琼脂平板培养基上、25℃下培养3天后,对细胞形态性状也进行了观察。营养细胞为椭圆形~卵形,增殖被确认是由于出芽。在培养开始经过了六周以上的平板上未确认到形成有性生殖器官。

[0099] 上述EB152株的形态学性质与在D1/D2区域和ITS区域的DNA序列解析中所归属的红冬孢锁掷孢酵母的特征大致一致。将EB152株的生理学性质示于表3。

[0100] 表3中,“+”表示阳性。“-”表示阴性。“W”表示弱阳性。“D”表示试验开始后历时一周以上的时间缓慢变为阳性,“L”表示试验开始后在两周以后急速变为阳性。

[0101] [表3]

[0102]	<糖类发酵性试验>			
	葡萄糖	-		
	<碳源同化性试验>			
	葡萄糖	+	水杨苷	+ D-甘露糖醇 +
	半乳糖	+	熊果苷	+ 半乳糖醇 +
	L-山梨糖	+	蜜二糖	- 肌醇 -
	D-葡萄糖胺	-	乳糖	- 2-酮-D-葡萄糖酸盐 -
	D-核糖	+	棉子糖	+ 5-酮-D-葡萄糖酸盐 -
	D-木糖	+	松三糖	- D-葡萄糖酸盐 +
	L-阿拉伯糖	+	菊粉	+ D-葡萄糖醛酸盐 -
D-阿拉伯糖	+	水溶性淀粉	W DL-乳酸盐 -	
[0103]	L-鼠李糖	-	甘油	+ 琥珀酸盐 W
	蔗糖	+	赤藓糖醇	- 柠檬酸盐 D
	麦芽糖	-	核糖醇	+ 甲醇 -
	海藻糖	+	木糖醇	+ 乙醇 +
	α -甲基-D-葡萄糖苷	-	L-阿拉伯糖醇	D L-酒石酸 -
	纤维二糖	+	D-山梨糖醇	+
	<氮源同化性试验>			
	硝酸盐	+	亚硝酸盐	+
	<耐性试验>			
	25°C下的生长性	+	30°C下的生长性	+ 35°C下的生长性 -
0.1%放线菌酮	D	50% (w/v) D-葡萄糖	+ 10%NaCl/5%葡萄糖 W	
<维生素需求性试验>				
无维生素培养基	+			

[0104] 通过分子系统学位置和生理学性质以及麦角硫因的生产量的测定,判断EB152株为归属于红冬孢锁掷孢酵母的新型微生物。

[0105] (8)EB891株的分子系统学的位置和生理学的性质

[0106] 对于EB891株的26S rDNA的D1/D2区域碱基序列,进行了在国际碱基序列数据库中的BLAST相同检索。其结果是,对于作为担子菌类酵母菌的一种的*Vanrija humicola*的多个碱基序列显示出99.0~99.8%的相同性。此外,在基于所得到的碱基序列解析出的分子系统树中,EB891株包含于由*Vanrija*属所构成的系统群中,与*Vanrija humicola* CBS571^T形成簇,显示出为相关。另一方面,对于EB891株的ITS-5.8rDNA碱基序列,进行了在国际碱基序列数据库中的BLAST相同检索。其结果是,对于作为担子菌类酵母菌的一种的*Vanrija humicola*的多个碱基序列显示出98.5~100%的相同性。此外,在基于所得到的碱基序列解析出的分子系统树中,EB891株包含于由*Vanrija*属所构成的系统群中,与*Vanrija humicola*的多个碱基序列形成以99%的高自展(bootstrap)值支持的簇,显示出归属于

Vanrija humicola的可能性。

[0107] 将EB891株在YM琼脂平板培养基上、25℃下培养3天,对所形成的菌落进行观察。菌落的周缘的形状为完整,隆起状态为平坦~靠垫状。此外,菌落的表面的形状为平滑~略微粗面。而且,菌落具有黄油样并且湿性,为白色~奶油色。

[0108] 此外,将EB891株在YM琼脂平板培养基上、25℃下培养3天后,对细胞形态性状也进行了观察。营养细胞为椭圆形~棍棒形,增殖被确认是由于出芽。在培养开始经过了六周以上的平板上未确认到形成有性生殖器官。

[0109] 上述EB891株的形态学性质与在D1/D2区域和ITS区域的DNA序列解析中所归属的Vanrija humicola的特征大致一致。将EB891株的生理学性质示于表3。

[0110] 表4中,“+”表示阳性。“-”表示阴性。“W”表示弱阳性。“D”表示试验开始后历时一周以上的时间缓慢变为阳性,“L”表示试验开始后在两周以后急速变为阳性。

[0111] [表4]

<糖类发酵性试验>						
葡萄糖	-					
<碳源同化性试验>						
葡萄糖	+	纤维二糖	+	D-甘露糖醇	+	
半乳糖	+	水杨苷	+	半乳糖醇	+	
L-山梨糖	+	蜜二糖	+	肌醇	+	
D-葡糖胺	+	乳糖	+	D-葡萄糖酸盐	+	
D-核糖	+	棉子糖	D	D-葡萄糖醛酸盐	+	
D-木糖	+	松三糖	+	DL-乳酸盐	+	
L-阿拉伯糖	+	菊粉	+	琥珀酸盐	+	
D-阿拉伯糖	+	水溶性淀粉	+	柠檬酸盐	+	
L-鼠李糖	+	甘油	+	甲醇	-	
蔗糖	+	赤藓糖醇	+	乙醇	+	
麦芽糖	+	核糖醇	+	蔗糖盐	+	
海藻糖	+	木糖醇	+			
α-甲基-D-葡萄糖苷	+	D-山梨糖醇	+			
<氮源同化性试验>						
硝酸盐	W					
<耐性试验>						
30℃下的生长性						
	+	35℃下的生长性		+	37℃下的生长性	-
0.01%放线菌酮						
	+	50% (w/v) D-葡萄糖		+	10%NaCl/5%葡萄糖	+
<维生素需求性试验>						
无维生素培养基	+					

[0114] 通过分子系统学位置和生理学性质以及麦角硫因的生产量的测定,判断EB891株为归属于*Vanrija humicola*或与其相关的物种的新型微生物。

[0115] 进行了碱基序列的分析,其结果是,推定EB152株属于红冬孢锁掷孢酵母,EB891株属于*Vanrija humicola*或与其相关的物种。

[0116] 工业上的可利用性

[0117] 本发明的微生物的麦角硫因的生产量高,能在健康和美容等领域中利用。

[0118] 保藏编号

[0119] NITE BP-03572

[0120] NITE BP-03573。

关于微生物保藏の説明

[0001]

申请人或代理人档案号	国际申请号 PCT/JP2022/040698
------------	-------------------------

关于微生物保藏の説明

关于微生物保藏の説明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

[0002]

微生物保藏の説明(1)	
A.对说明书第 <u>3</u> 页, 第 <u>24</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>	
保藏单位名称 <u>国家技术评估学会, 专利微生物保藏中心-NPMD</u>	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) <u>日本 292-0818 千叶县木更津市上总镰足 2-5-8 122 号室</u>	
保藏日期 <u>2021-12-15</u>	保藏号 <u>NITE BP-03572</u>
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中	
<input type="checkbox"/>	
无	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	
无	
微生物保藏の説明(2)	
A.对说明书第 <u>4</u> 页, 第 <u>15</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>	
保藏单位名称 <u>国家技术评估学会, 专利微生物保藏中心-NPMD</u>	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) <u>日本 292-0818 千叶县木更津市上总镰足 2-5-8 122 号室</u>	
保藏日期 <u>2021-12-15</u>	保藏号 <u>NITE BP-03573</u>
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中	
<input type="checkbox"/>	
无	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	

关于微生物保藏的说明

E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

[0003]

由受理局填写
本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
国际局收到本页日期
授权官员