

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044426**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.25

(51) Int. Cl. **C12P 13/04** (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(21) Номер заявки
202291571

(22) Дата подачи заявки
2020.08.06

(54) **НОВЫЙ МИКРООРГАНИЗМ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭРГОТИОНЕИНА**

(31) **2020-002301**

(32) **2020.01.09**

(33) **JP**

(43) **2022.09.20**

(86) **PCT/JP2020/030145**

(87) **WO 2021/140693 2021.07.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КУРЕХА КОРПОРЕЙШН; НЭШНЛ
ИНСТИТЬЮТ ОФ ЭДВАНСТ
ИНДАСТРИАЛ САЙЕНС ЭНД
ТЕКНОЛОДЖИ (JP)**

(72) Изобретатель:
**Кошияма Тацуюки, Канеко Муцуми,
Хигашияма Юкиhiro, Сато Шун,
Морита Томокакэ, Сайка Азуса (JP)**

(74) Представитель:
Кузнецова С.А., Носырева Е.Л. (RU)

(56) WO-A1-2019004234
WO-A1-2016104437
FUJITANI, Y. et al., Ergothioneine production
using methylobacterium species, yeast, and fungi,
Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, vol.
126, no. 6, p. 715-722, p. 717, 718
US-A1-20140121156

(57) Микроорганизм по настоящему изобретению представляет собой *Dirkmeia churashimaensis* (NITE BP-03054), *Papiliotrema flavescens* (NITE BP-03051), *Papiliotrema flavescens* (NITE BP-03052) или *Apiotrichum porosum* (NITE BP-03053).

B1

044426

044426

B1

Область применения

Настоящее изобретение относится к новому микроорганизму и способу получения эрготионеина путем культивирования нового микроорганизма для получения эрготионеина.

Уровень техники

Эрготионеин является одной из серосодержащих аминокислот. Эрготионеин обладает более высоким антиоксидантным действием, чем витамин E, и привлек внимание как очень полезное соединение в области здоровья, красоты и т.п.

Например, в патентном документе 1 и непатентном документе 1 описаны трансформированные мицелиальные грибы с повышенной способностью к продукции эрготионеина.

В непатентном документе 2 описан трансформированный микроорганизм рода *Methylobacrium* с повышенной способностью к продукции эрготионеина. В непатентном документе 2 описано, что микроорганизмы родов *Ausgeobasidium* и *Rhodotorula* обладают способностью продуцировать эрготионеин.

В непатентном документе 3 описано, что микроорганизм рода *Pleurotus* обладает способностью продуцировать эрготионеин.

Список библиографических ссылок

Патентный документ.

Патентный документ 1: WO 2016/121285.

Непатентная литература.

Непатентный документ 1: S. Takusagawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 83, 181-184 (2019).

Непатентный документ 2: Y. Fujitani et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 126, 715-722 (2018).

Непатентный документ 3: SY. Lin, *Int. J. Med. Mushrooms*, 17, 749-761 (2015).

Краткое описание изобретения

Техническая задача

Известно, что эрготионеин не синтезируется в организме человека, но синтезируется в некоторых микроорганизмах. Таким образом, исследование и разработка микроорганизмов, продуцирующих эрготионеин, и модификации микроорганизмов для усиления продукции эрготионеина находятся в процессе, как описано в документах предшествующего уровня техники. Однако микроорганизмы, описанные в документах предшествующего уровня техники, имеют низкую продукцию эрготионеина, поэтому желательны поиск и разработка микроорганизмов с высокой продукцией эрготионеина.

Методы рекомбинации генов можно использовать для модификации микроорганизмов с целью повышения продукции эрготионеина. Однако эрготионеин, продуцируемый микроорганизмами, не может быть использован в пищевой промышленности или т.п. Соответственно, существует большая потребность в том, чтобы найти микроорганизмы с высокой продукцией эрготионеина, которые не подвергались рекомбинации генов и являются немодифицированными.

Настоящее изобретение было сделано в свете вышеуказанной проблемы, и его целью является обеспечение нового микроорганизма с высокой продукцией эрготионеина.

Решение проблемы

В результате скрининга авторы настоящего изобретения обнаружили новый микроорганизм с более высокой продукцией эрготионеина, чем у известных микроорганизмов, и реализовали настоящее изобретение.

Микроорганизм по настоящему изобретению представляет собой микроорганизм, принадлежащий *Dirkmeia churashimaensis* (NITE BP-03054), микроорганизм, принадлежащий *Papiliotrema flavescens* (NITE BP-03051), микроорганизм, принадлежащий *Papiliotrema flavescens* (NITE BP-03052), или микроорганизм, принадлежащий *Apiotrichum porosum* (NITE BP-03053).

Полезные эффекты изобретения

Согласно одному аспекту настоящего изобретения может быть получен микроорганизм с высокой продукцией эрготионеина.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлен график, демонстрирующий результаты первого скрининга.

На фиг. 2 представлен график, демонстрирующий результаты второго скрининга.

На фиг. 3 представлен график, демонстрирующий результаты оценки продукции эрготионеина пятью новыми штаммами микроорганизмов.

Описание вариантов осуществления изобретения

Микроорганизм по настоящему варианту осуществления представляет собой микроорганизм, принадлежащий роду *Dirkmeia*, который способен продуцировать эрготионеин, микроорганизм, принадлежащий роду *Papiliotrema*, который способен продуцировать эрготионеин, или микроорганизм, принадлежащий роду *Apiotrichum*, который способен продуцировать эрготионеин.

Микроорганизм по настоящему варианту осуществления характеризуется высокой продукцией эрготионеина. Эрготионеин является одной из серосодержащих аминокислот и обладает превосходным антиоксидантным действием. Кроме того, микроорганизм по настоящему варианту осуществления не был модифицирован методом рекомбинации генов или подобными методами, и поэтому его также можно использовать в пищевой промышленности.

Далее будет подробно описан микроорганизм по настоящему варианту осуществления изобретения.

1. *Dirkmeia churashimaensis* S111.

Dirkmeia churashimaensis S111 (далее в некоторых случаях сокращенно "дрожжи S111") представляет собой микроорганизм, который сначала выделяют с использованием в качестве источника выделения листья (молодые листья), собранные в Цукуба-ши, Ибараки.

Определены последовательности оснований областей D1/D2 и ITS гена рибосомальной РНК 26S рДНК. Поиск гомологии с помощью BLAST проводили в системе идентификации микроорганизмов лаборатории TechnoSuruga (TechnoSuruga Laboratory, Япония), базе данных DB-FU10.0 и в международных базах данных нуклеотидных последовательностей (DDBJ/ENA (EMBL)/GenBank). В результате дрожжи S111 были отнесены к *Dirkmeia churashimaensis*. Кроме того, как показано в примерах, дрожжи S111 проявляют почти такие же физиологические/биохимические свойства, как и у *Dirkmeia churashimaensis*, за исключением того, что наблюдались различия в отношении ассимиляции эритритола и сукцинатов в качестве источников углерода и нитратов в качестве источников азота, а также жизнеспособности при 37°C.

Дрожжи S111 были депонированы в Депозитории патентных микроорганизмов NITE (NPMD) Национального института технологий и оценки (далее сокращенно "NITE") (№ 122, 2-5-8 Kazusakamatarī, Кисарадзу, Тиба, Япония) (дата первоначального депонирования: 25 октября 2019 г., номер доступа: NITE BP-03054).

Способ культивирования дрожжей S111 можно осуществлять в соответствии с общепринятыми методами культивирования микроорганизмов рода *Dirkmeia*. Форма культивирования представляет собой периодическое культивирование с использованием жидкой среды или периодическое культивирование с подпиткой, при котором в систему культивирования непрерывно добавляют источник углерода и/или источник органического азота, и желательно проводить аэрационное перемешивание. В качестве среды можно использовать среду, содержащую источники углерода и азота, усваиваемые микроорганизмами, принадлежащими роду *Dirkmeia*, или необходимый источник питательных веществ, такой как неорганическая соль. pH культуры предпочтительно составляет от 3 до 8, температура культуры предпочтительно составляет от 20 до 37°C, а время инкубации предпочтительно составляет от 2 до 14 дней.

2. *Papiliotrema flavescens* EA071.

Papiliotrema flavescens EA071 (далее в некоторых случаях сокращенно "дрожжи EA071") представляет собой микроорганизм, который впервые был выделен с использованием в качестве источника выделения листьев японской пампасной травы, собранных вокруг озера Мотосу.

Определены последовательности оснований гена рибосомальной РНК 26S рДНК-D1/D2 и областей ITS. Поиск гомологии с помощью BLAST проводили в системе идентификации микроорганизмов лаборатории TechnoSuruga (TechnoSuruga Laboratory, Япония), в базе данных DB-FU10.0 и в международных базах данных нуклеотидных последовательностей (DDBJ/ENA (EMBL)/GenBank). В результате дрожжи EA071 были отнесены к *Papiliotrema flavescens*. Кроме того, как показано в примерах, дрожжи EA071 проявляют почти сходные физиологические/биохимические свойства со свойствами *Papiliotrema flavescens*, за исключением того, что наблюдались различия в отношении инулина и водорастворимого крахмала в качестве источников углерода.

Дрожжи EA071 были депонированы в Депозитории патентных микроорганизмов NITE (NPMD) Национального института технологий и оценки (NITE) (№ 122, 2-5-8 Kazusakamatarī, Кисарадзу, Тиба, Япония) (дата первоначального депонирования: 25 октября 2019 г., номер доступа: NITE BP-03051).

Способ культивирования дрожжей EA071 можно осуществлять в соответствии с общепринятыми методами культивирования микроорганизмов рода *Papiliotrema*. Форма культивирования представляет собой периодическое культивирование с использованием жидкой среды или периодическое культивирование с подпиткой, при котором в систему культивирования непрерывно добавляют источник углерода и/или источник органического азота, и желательно проводить аэрационное перемешивание. В качестве среды можно использовать среду, содержащую источники углерода и азота, усваиваемые микроорганизмами, принадлежащими роду *Papiliotrema*, или необходимый источник питательных веществ, такой как неорганическая соль. pH культуры предпочтительно составляет от 3 до 8, температура культуры предпочтительно составляет от 20 до 30°C, а время инкубации предпочтительно составляет от 2 до 14 дней.

3. *Papiliotrema flavescens* EA361.

Papiliotrema flavescens EA361 (далее в некоторых случаях сокращенно "дрожжи EA361") представляет собой микроорганизм, который сначала выделяют с использованием в качестве источника выделения коры дерева, собранной вокруг озера Сува.

0027 Определены последовательности оснований гена рибосомальной РНК 26S рДНК-D1/D2 и областей ITS. Поиск гомологии с помощью BLAST проводили в системе идентификации микроорганизмов лаборатории TechnoSuruga (TechnoSuruga Laboratory, Япония), в базе данных DB-FU10.0 и в международных базах данных нуклеотидных последовательностей (DDBJ/ENA (EMBL)/GenBank). В результате дрожжи EA361 были отнесены к *Papiliotrema flavescens*. Кроме того, как показано в примерах, дрожжи EA071 проявляют почти сходные физиологические/биохимические свойства со свойствами *Papiliotrema*

flavescens, за исключением того, что наблюдались различия в отношении инулина и водорастворимого крахмала в качестве источников углерода.

Дрожжи EA361 были депонированы в Депозитории патентных микроорганизмов NITE (NPMD) Национального института технологий и оценки (NITE) (№ 122, 2-5-8 Kazusakamatarī, Кисарадзу, Тиба, Япония) (дата первоначального депонирования: 25 октября 2019 г., номер доступа: NITE BP-03052).

Способ культивирования дрожжей EA361 можно осуществлять в соответствии с общепринятыми методами культивирования микроорганизмов рода *Papiliotrema*. Форма культивирования представляет собой периодическое культивирование с использованием жидкой среды или периодическое культивирование с подпиткой, при котором в систему культивирования непрерывно добавляют источник углерода и/или источник органического азота, и желательно проводить аэрационное перемешивание. В качестве среды можно использовать среду, содержащую источники углерода и азота, усваиваемые микроорганизмами, принадлежащими роду *Papiliotrema*, или необходимый источник питательных веществ, такой как неорганическая соль. pH культуры предпочтительно составляет от 3 до 8, температура культуры предпочтительно составляет от 20 до 30°C, а время инкубации предпочтительно составляет от 2 до 14 дней.

4. *Apiotrichum porosum* EA702.

Apiotrichum porosum EA702 (далее в некоторых случаях сокращенно "дрожжи EA702") представляет собой микроорганизм, который сначала выделяют с использованием в качестве источника выделения почвы, собранной в Иваки-ши.

Определены последовательности оснований гена рибосомальной РНК 26S рДНК-D1/D2 и областей ITS. Поиск гомологии с помощью BLAST проводили в системе идентификации микроорганизмов лаборатории TechnoSuruga (TechnoSuruga Laboratory, Япония), в базе данных DB-FU10.0 и в международных базах данных нуклеотидных последовательностей (DDBJ/ENA (EMBL)/GenBank). В результате дрожжи EA702 были отнесены к *Apiotrichum porosum*. Кроме того, как показано в примерах, дрожжи EA702 проявляют почти такие же физиологические/биохимические свойства, как у *Papiliotrema flavescens*, за исключением того, что наблюдались различия в отношении инулина в качестве источника углерода и 50% D-глюкозы в тесте на резистентность.

Дрожжи EA702 были депонированы в Депозитории патентных микроорганизмов NITE (NPMD) Национального института технологий и оценки (NITE) (№ 122, 2-5-8 Kazusakamatarī, Кисарадзу, Тиба, Япония) (дата первоначального депонирования: 25 октября 2019 г., номер доступа: NITE BP-03053).

Способ культивирования дрожжей EA702 можно осуществлять в соответствии с общепринятыми методами культивирования микроорганизмов рода *Apiotrichum*. Форма культивирования представляет собой периодическое культивирование с использованием жидкой среды или периодическое культивирование с подпиткой, при котором в систему культивирования непрерывно добавляют источник углерода и/или источник органического азота, и желательно проводить аэрационное перемешивание. В качестве среды можно использовать среду, содержащую источники углерода и азота, усваиваемые микроорганизмами, принадлежащими роду *Apiotrichum*, или необходимый источник питательных веществ, такой как неорганическая соль. pH культуры предпочтительно составляет от 3 до 8, температура культуры предпочтительно составляет от 20 до 27°C, а время инкубации предпочтительно составляет от 2 до 14 дней.

Способ получения эрготионеина.

Способ получения эрготионеина по настоящему варианту осуществления включает культивирование микроорганизма, описанного выше, для получения культуры, содержащей эрготионеин.

Сбор эрготионеина из культуры, содержащей эрготионеин, может быть осуществлен, например, обычным способом сбора и очистки эрготионеина из культуры микроорганизмов. Культура включает, например, супернатант культуры, культивированные микробные клетки и измельченный продукт культивируемых микробных клеток. Например, культивируемые микробные клетки собирают путем центрифугирования культуры или т.п. Собранные микробные клетки подвергают экстракции горячей водой или т.п. с получением жидкого экстракта, содержащего эрготионеин. Затем эрготионеин можно собрать путем очистки жидкости экстракта. Продуцирование эрготионеина микроорганизмом может быть определено количественно, например, путем измерения полученного жидкого экстракта с использованием прибора для высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометра, например, ЖХМС.

Изложение сущности изобретения.

Микроорганизм по настоящему варианту осуществления представляет собой микроорганизм, принадлежащий *Dirkmeia churashimaensis* (NITE BP-03054), микроорганизм, принадлежащий *Papiliotrema flavescens* (NITE BP-03051), микроорганизм, принадлежащий *Papiliotrema flavescens* (NITE BP-03052), или микроорганизм, принадлежащий *Apiotrichum porosum* (NITE BP-03053).

Также способ получения эрготионеина по настоящему варианту осуществления включает культивирование микроорганизма, описанного выше, для получения культуры, содержащей эрготионеин.

Варианты осуществления настоящего изобретения будут описаны более подробно в настоящем документе с использованием примеров. Конечно, настоящее изобретение не ограничивается приведенными ниже примерами, и, само собой разумеется, возможны различные варианты в отношении его деталей. Более того, настоящее изобретение не ограничивается описанными выше вариантами осуществления, и

возможны различные модификации в пределах объема, указанного в формуле изобретения. Варианты осуществления, полученные соответствующей комбинацией технических средств, описанных в вариантах осуществления, также включены в технический объем настоящего изобретения. Кроме того, все документы, описанные в настоящей спецификации, включены в нее путем ссылки.

Примеры

В следующих примерах символ "%" представляет % по массе, если не указано иное.

(1) Обогащение культуры с использованием источника выделения, собранного из окружающей среды.

Во-первых, отбор проб микроорганизмов из окружающей среды, такой как растения и почва, проводился в два этапа. В результате всего было отобрано 113 проб (30 проб для первого этапа и 83 пробы для второго этапа).

Затем каждый собранный образец погружали в пластиковую пробирку объемом 15 мл, содержащую 2 мл среды для скрининга, и культивировали при 200 об/мин и 25°C в течение 3-5 дней. В качестве среды для скрининга использовали среду YM, содержащую антибиотик. В частности, использовали среду, содержащую 1% глюкозы, 0,5% пептона, 0,3% экстракта дрожжей, 0,3% солодового экстракта, 0,01% стрептомицина сульфата и 0,005% хлорамфеникола.

Затем было отобрано 111 проб (30 проб для первого этапа и 81 проба для второго этапа), в которых визуально наблюдалось помутнение среды (размножение микроорганизмов).

(2) Селекция образцов с нагрузкой в виде окислительного стресса.

Культуральные растворы 111 проб, отобранных в (1) выше, были разбавлены в 100 или 100000 раз в среде YM. Разбавленный культуральный раствор наносили на агаризованную среду YM и агаризованную среду YM с добавлением 3 мМ H₂O₂ (далее обозначаемую как содержащая H₂O₂ агаризованная среда YM) и культивировали при 25°C в течение 2-5 дней.

Подсчитывали количество колоний, выросших на агаризованной среде YM, и количество колоний, выросших на содержащей H₂O₂ агаризованной среде YM. Затем отобрали 83 пробы, в которых колонии выросли как на агаризованной среде YM, так и на содержащей H₂O₂ агаризованной среде YM.

Кроме того, для выросших на агаризованной среде колоний в отобранных 83 пробах визуально наблюдали морфологию и окраску, а также было отобрано 164 дрожжеподобные колонии разного типа (51 колония для первого этапа и 113 колоний для второго этапа).

(3) Культура отобранных колоний в 96 лунках.

164 колонии, отобранные в (2) выше, инокулировали в 96-луночные планшеты, содержащие 1 мл среды YM, и культивировали при 1600 об/мин и 25°C в течение 3-4 дней. После культивирования собранные культуральные растворы центрифугировали при 2000 об/мин и 4°C в течение 10 мин. Осадки клеток, полученные при центрифугировании, промывали чистым раствором в 1 мл и снова центрифугировали.

К осадкам клеток, полученным центрифугированием, добавляли 0,1 мл чистой воды, чтобы суспендировать в ней осадки. Полученные суспензии нагревали при 96°C в течение 10 мин для извлечения внутриклеточных компонентов. Затем экстрагированные внутриклеточные компоненты центрифугировали для удаления остатков микробных клеток, получая таким образом жидкие экстракты.

(4) Количественный анализ эрготионеина в жидком экстракте методом ЖХМС.

Смешанный раствор 0,15 мл каждого из жидких экстрактов, полученных в (3) выше, и 0,35 мл ацетонитрила фильтровали через фильтр 0,45 мкм PVDF. Полученный фильтрат использовали в качестве образца для измерения ЖХМС.

Для анализа ЖХМС использовали LCMS-2020, доступный от Shimadzu Corporation. Кроме того, в качестве колонки для ЖХ использовали защитную колонку Asahipak NH2P-40 2D+, доступную от SHODEX. Смешанный раствор 10 мМ формиата аммония и ацетонитрила (10 мМ формиат аммония/ацетонитрил = 30/70 (об./об.)) использовали в качестве подвижной фазы для ЖХ. Скорость потока устанавливали равной 0,1 мл/мин, анализ проводили при 25°C.

При детектировании методом MS ионизацию проводили в режиме DUIS для одновременного выполнения ионизации ИЭР и ионизации ХИАД. Детекцию также проводили в режиме SIM m/z = 230 (+), при котором можно было обнаружить эрготионеин.

В результате анализа жидких экстрактов 164 колоний, отобранных в (2) выше, было отобрано 14 колоний с высокой продукцией эрготионеина (5 колоний для первого этапа и 9 колоний для второго этапа).

Кроме того, на фиг. 1 и 2 представлены графики, демонстрирующие количества эрготионеина, продуцируемого образцами микроорганизмов, собранными на первом и втором этапах отбора проб микроорганизмов, соответственно. На горизонтальной оси на фиг. 1 и 2 показаны значения, полученные путем измерения культуральных растворов, полученных после культивирования в (3) выше при OD600. На вертикальной оси показано количество эрготионеина (мг/л (культуральный раствор)) в культуральных растворах, полученных после культивирования в (3) выше. Количество эрготионеина представляет собой значение, полученное с помощью анализа методом ЖХМС. На фиг. 1 и 2 кружком обведены 14 отобран-

ных колоний.

(5) Масштабирование культуры микроорганизма, продуцирующего эрготионеин, в колбе.

Каждую из 14 колоний, отобранных в (4) выше, инокулировали в колбу на 300 мл, содержащую 50 мл среды YM, и культивировали при 200 об/мин и 25°C в течение 7 дней (n=1).

Культуральные растворы на 3-7 дни собирали соответствующим образом. Как и в (3) выше, после центрифугирования и промывки микробных клеток жидкие экстракты собирали путем экстракции горячей водой.

Полученные жидкие экстракты анализировали с помощью ЖХМС аналогично тому, как в (4) выше, чтобы выбрать пять штаммов (S111, EA071, EA361, EA701 и EA702) с высокой продукцией эрготионеина.

Каждую из колоний отобранных пяти штаммов инокулировали в колбу объемом 300 мл, содержащую 50 мл среды YM, и культивировали при 200 об/мин и 25°C в течение 5 дней (n=3). Затем с помощью ЖХМС измеряли продукцию эрготионеина на 3- и 5-й дни культивирования. Продукция эрготионеина колониями выбранных пяти штаммов показана на фиг. 3.

На фиг. 3 левая столбчатая диаграмма для каждого из штаммов демонстрирует продукцию эрготионеина на 3-й день культивирования. Правая столбчатая диаграмма для каждого из штаммов демонстрирует продукцию эрготионеина на 5-й день культивирования.

(7) Идентификация отобранных пяти штаммов.

Оценка классификационных групп, к которым были отнесены выделенные пять штаммов, проводилась путем анализа последовательностей оснований гена рибосомальной РНК 26S рДНК-D1/D2 и областей ITS.

В результате анализа последовательностей оснований установлено, что штамм S111 принадлежит *Dirkmeia churashimaensis*; что штаммы EA071 и EA361 принадлежат *Papiliotrema flavescens*, а штаммы EA701 и EA702 принадлежат *Apiotrichum porosum*.

В табл. 1 показаны продукция эрготионеина (ЭГТ) и скорость продукции выбранных пяти штаммов. В табл. 2 показаны продукция и скорость продукции известных микроорганизмов. В табл. 1 и 2, если не указано иное, единицей продукции эрготионеина (ЭГТ) являются мг/л, а единицей скорости продукции ЭГТ являются мг/л/сутки (продукция эрготионеина в сутки). Кроме того, продукция ЭГТ в табл. 1 указывает на продукцию эрготионеина на 5-й день культивирования.

Таблица 1

	Название штамма	Предполагаемый микроорганизм	Продукция ЭГТ	Скорость продукции ЭГТ
Первый отбор проб	S111	<i>Dirkmeia churashimaensis</i>	29,5±3,5	5,9
Второй отбор проб	EA071	<i>Papiliotrema flavescens</i>	29,7±5,7	5,9
	EA361		24,3±2,4	4,9
	EA701	<i>Apiotrichum porosum</i>	24,1±1,6	4,8
	EA702		28,7±1,0	5,7

Таблица 2

Микроорганизм	Продукция ЭГТ	Скорость продукции ЭГТ	Ссылка
<i>Aureobasidium pullulans</i> kz25	14	2	J Biosci Bioeng 126 (2018) 715
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> z41c	24	3,4	J Biosci Bioeng 126 (2018) 715
<i>Aspergillus sojae</i>	15	5	WO2016/121285
<i>Aspergillus oryzae</i> NSAR1	11,5 (мг/кг)	2,3 (мг/кг/сутки)	Biosci Biotechnol Biochem 83 (2019) 181
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	13-98	0,8-6,1	I J Med Mushroom 17 (2015) 749
<i>Methylobacterium aquaticum</i> 22A	12,2	1,7	J Biosci Bioeng 126 (2018) 715

Из табл. 1 и 2 было обнаружено, что продукция эрготионеина выбранными пятью штаммами была равна или превышала продукцию эрготионеина известными микроорганизмами, продуцирующими эрготионеин. Также было обнаружено, что скорость продукции эрготионеина выбранными пятью штаммами также была равна или превышала скорость продукции известных микроорганизмов, продуцирующих эрготионеин.

(8) Молекулярно-филогенетическое положение и физиологические свойства штамма S111.

Для последовательностей оснований гена рибосомальной РНК 26S рДНК-D1/D2 и областей ITS-5.8

в штамме S111 был проведен поиск гомологии с помощью BLAST в международных базах данных нуклеотидных последовательностей. В результате последовательности оснований проявляли гомологию от 98,4 до 100% с множеством последовательностей оснований *Dirkmeia churashimaensis* как одного типа базидиальных дрожжей. В молекулярно-филогенетическом дереве, проанализированном на основе полученных последовательностей оснований, штамм S111 продемонстрировал такое же молекулярно-филогенетическое положение, что и множество последовательностей оснований *Dirkmeia churashimaensis*.

Штамм S111 культивировали на агаризованной среде YM при 27°C в течение 7 дней и наблюдали за образовавшимися колониями. Форма краев колоний была цельной, а в приподнятом состоянии плоской и морщинистой. Форма поверхности колоний была ровной. Кроме того, колонии были тусклыми и маслянистыми, от светло-оранжевого до кремового цвета.

Далее штамм S111 культивировали на агаризованной среде YM при 27°C в течение 7 дней, после чего также наблюдали морфологические свойства его клеток. Было установлено, что питающие клетки имели форму от овальной до яйцевидной и что штамм размножался путем почкования. Формирование половых репродуктивных органов не наблюдалось на планшетах через 4 недели или более после начала культивирования.

Морфологические свойства описанного выше штамма S111 почти соответствовали характеристикам *Dirkmeia churashimaensis*, к которому он был отнесен по результатам анализа последовательности ДНК областей D1/D2 и ITS. Физиологические свойства штаммов S111 представлены в табл. 3.

В табл. 3 символ "+" означает положительный результат. Символ "-" указывает на отрицательный результат. Буква "W" указывает на слабоположительный результат. Буква "D" указывает на постепенное получение положительного результата в течение 1 недели или дольше после начала теста, а буква "L" указывает на быстрое получение положительного результата в течение 2 недель или дольше после начала теста.

Таблица 3

<Тест на ферментацию сахаридов>					
Глюкоза		-			
<Тест на ассимиляцию источника углерода>					
Глюкоза	+	Мальтоза	+	Рибитол (адонитол)	+
Галактоза	+	α -метил-D-глюкозид	+	D-маннит	+
L-сорбоза	+	Целлобиоза	+	Инозитол	L
D-глюкозамин	+	Салицин	D	2-кето-D-глюконат	+
D-рибоза	L	Мелибиоза	+	DL-лактат	+
D-ксилоза	+	Лактоза	+	Сукцинат	W
D-арабиноза	+	Водорастворимый крахмал	+	Этанол	+
L-рамноза	+	Глицерин	+	Сахарат	-
Сахароза	+	Эритритол	+	N-ацетил-D-глюкозамин	+
<Тест на ассимиляцию источника азота>					
Нитрат	+	Нитрит	D	Этиламин	+
<Тест на резистентность>					
Жизнеспособность при 25 °C	+	Жизнеспособность при 30 °C	+	Жизнеспособность при 37 °C	+
0,01% циклогексимида	D	50% (мас./об.) D-глюкозы	+	10% NaCl/5% глюкозы	+
<Тест на потребность в витаминах>					
Безвитаминная среда	+				

Благодаря определению молекулярно-филогенетического положения и физиологических свойств, а также продукции эрготионеина было установлено, что штамм S111 является новым микроорганизмом, относящимся к *Dirkmeia churashimaensis*.

(9) Молекулярно-филогенетическое положение и физиологические свойства штамма EA071.

Для последовательностей оснований гена рибосомальной РНК 26S рДНК-D1/d2 и областей ITS-5.8 в штамме EA071 был проведен поиск гомологии с помощью BLAST в международных базах данных нуклеотидных последовательностей. В результате последовательности оснований продемонстрировали

гомологию от 99,4 до 100% с множеством последовательностей оснований *Cryptococcus flavescens* (текущее название: *Papiliotrema flavescens*) как одного типа базидиальных дрожжей. В молекулярно-филогенетическом дереве, проанализированном на основе полученных последовательностей оснований, штамм EA071 был включен в филогенетическую группу, включающую род *Papiliotrema*. Затем штамм продемонстрировал такое же молекулярно-филогенетическое положение, как и у *Cryptococcus flavescens* (текущее название: *Papiliotrema flavescens*) CBS942^T.

Штамм EA071 культивировали на агаризованной среде YM при 27°C в течение 7 дней и наблюдали за образовавшимися колониями. Форма краев колоний была цельной, а в приподнятом состоянии - подушковидной. Форма поверхности колоний была ровной. Кроме того, колонии были светящимися и вязкими, кремового цвета.

Далее штамм EA071 культивировали на агаризованной среде YM при 27°C в течение 7 дней, после чего также отмечали морфологические свойства его клеток. Было установлено, что питающие клетки имеют форму от шаровидной до овальной, и штамм размножается путем почкования. Формирование половых репродуктивных органов не наблюдалось на планшетах через 4 недели или более после начала культивирования.

Морфологические свойства описанного выше штамма EA071 почти соответствовали характеристикам *Papiliotrema flavescens*, к которому он был отнесен по результатам анализа последовательности ДНК областей D1/D2 и ITS. Физиологические свойства штаммов EA071 представлены в табл. 4.

Таблица 4

<Тест на ферментацию сахаридов>					
Глюкоза	-				
<Тест на ассимиляцию источника углерода>					
Глюкоза	+	Целлобиоза	+	D-маннит	+
Галактоза	+	Салицин	+	Галактитол (дальцит)	+
L-сорбоза	-	Мелибиоза	+	Инозитол	W
D-глюкозамин	-	Лактоза	+	2-кето-D-глюконат	+
D-рибоза	+	Раффиноза	+	D-глюконат	+
D-ксилоза	+	Мелезитоза	+	D-глюкуронат	+
L-арабиноза	+	Инулин	+	DL-лактат	D
D-арабиноза	W	Водорастворимый крахмал	+	Сукцинат	W
L-рамноза	+	Глицерин	D	Метанол	-
Сахароза	+	Эритритол	L	Этанол	+
Мальтоза	+	Рибитол (адонитол)	+	N-ацетил-D-глюкозамин	-
Трегалоза	+	D-глюцитол (сорбит)	+	Гексадекан	-
α-метил-D-глюкозид	+				
<Тест на ассимиляцию источника азота>					
Нитрат	-	Креатинин	-		
<Тест на резистентность>					
Жизнеспособность при 30 °C	+	Жизнеспособность при 37 °C	-		
0,01% циклогексимида	+	50% (мас./об.) D-глюкозы	+	10% NaCl/5% глюкозы	-
<Тест на потребность в витаминах>					
Безвитаминная среда	+				

Благодаря определению молекулярно-филогенетического положения и физиологических свойств, а также продукции эрготионеина было установлено, что штамм EA071 является новым микроорганизмом, относящимся к *Papiliotrema flavescens*.

(10) Молекулярно-филогенетическое положение и физиологические свойства штамма EA361.

Для последовательностей оснований гена рибосомальной РНК 26S рДНК-D1/D2 и областей ITS-5.8 в штамме EA361 был проведен поиск гомологии с помощью BLAST в международных базах данных нуклеотидных последовательностей. В результате последовательности оснований продемонстрировали гомологию от 99,4 до 100% с множеством последовательностей оснований *Cryptococcus flavescens* (текущее название: *Papiliotrema flavescens*) как одного типа базидиальных дрожжей. В молекулярно-

филогенетическом дереве, проанализированном на основе полученных последовательностей оснований, штамм EA361 был включен в филогенетическую группу, включающую род *Pariliotrema*. Затем штамм продемонстрировал такое же молекулярно-филогенетическое положение, как и у *Cryptococcus flavescens* (текущее название: *Pariliotrema flavescens*) CBS942^T.

Штамм EA361 культивировали на агаризованной среде YM при 27°C в течение 7 дней и наблюдали за образовавшимися колониями. Форма краев колоний была цельной, а в приподнятом состоянии - подушковидной. Форма поверхности колоний была ровной. Кроме того, колонии были светящимися и вязкими, кремового цвета.

Далее штамм EA361 культивировали на агаризованной среде YM при 27°C в течение 7 дней, после чего также наблюдали морфологические свойства его клеток. Было установлено, что питающие клетки имеют форму от шаровидной до овальной и штамм размножается путем почкования. Формирование половых репродуктивных органов не наблюдалось на планшетах через 4 недели или более после начала культивирования.

Морфологические свойства описанного выше штамма EA361 почти соответствовали характеристикам *Pariliotrema flavescens*, к которому он был отнесен по результатам анализа последовательности ДНК областей D1/D2 и ITS. Физиологические свойства штаммов EA071 представлены в табл. 5.

Таблица 5

<Тест на ферментацию сахаридов>					
Глюкоза	-				
<Тест на ассимиляцию источника углерода>					
Глюкоза	+	Целлобиоза	+	D-маннит	+
Галактоза	+	Салицин	+	Галактитол (дутьцит)	+
L-сорбоза	-	Мелибиоза	+	Инозитол	W
D-глюкозамин	-	Лактоза	+	2-кето-D-глюконат	+
D-рибоза	+	Раффиноза	+	D-глюконат	+
D-ксилоза	+	Мелезитоза	+	D-глюкуронат	+
L-арабиноза	+	Инулин	+	DL-лактат	L
D-арабиноза	+	Водорастворимый крахмал	+	Сукцинат	W
L-рамноза	+	Глицерин	L	Метанол	-
Сахароза	+	Эритритол	D	Этанол	+
Мальтоза	+	Рибитол (адонитол)	+	N-ацетил-D-глюкозамин	-
Трегалоза	+	D-глюцитол (сорбит)	+	Гексадекан	-
α-метил-D-глюкозид	+				
<Тест на ассимиляцию источника азота>					
Нитрат	-	Креатинин	-		
<Тест на резистентность>					
Жизнеспособность при 30 °C	+	Жизнеспособность при 37 °C	-		
0,01% циклогексимида	+	50% (мас./об.) D-глюкозы	+	10% NaCl/5% глюкозы	-
<Тест на потребность в витаминах>					
Безвитаминная среда	+				

Благодаря определению молекулярно-филогенетического положения и физиологических свойств, а также продукции эрготионеина было установлено, что штамм EA361 является новым микроорганизмом, относящимся к *Pariliotrema flavescens*.

(11) Молекулярно-филогенетическое положение и физиологические свойства штамма EA702

Для последовательностей оснований гена рибосомальной РНК 26S рДНК-D1/D2 и областей ITS-5.8 в штамме EA702 был проведен поиск гомологии с помощью BLAST в международных базах данных нуклеотидных последовательностей. В результате последовательности оснований проявляли гомологию от 99,3 до 100% с множеством последовательностей азотистых оснований *Trichosporon porosum* (текущее название: *Ariotrichum porosum*) как одного типа базидиальных дрожжей. В молекулярно-филогенетическом дереве, проанализированном на основе полученных последовательностей оснований,

штамм EA702 был включен в филогенетическую группу, включающую род *Trichosporon* (*Apiotrichum*). Затем штамм продемонстрировал такое же молекулярно-филогенетическое положение, как и *Trichosporon porosum* (текущее название: *Apiotrichum porosum*) CBS2040^T.

Штамм EA702 культивировали на агаризованной среде YM при 27°C в течение 7 дней и наблюдали за образовавшимися колониями. Форма края колоний была нитевидной. В приподнятом положении колонии были плоскими по краям и приподнятыми в центре. Форма поверхности колоний была морщинистая. Колонии были тусклыми. Кроме того, колонии были от влажных до слегка сухих и имели цвет от белого до бело-кремового.

Далее штамм EA702 культивировали на агаризованной среде YM при 27°C в течение 7 дней, после чего также наблюдали морфологические свойства его клеток. Было установлено, что питающие клетки имели форму от овальной до яйцевидной и что штамм размножался путем почкования. Кроме того, штамм размножался за счет бокового почкования вместе с удлинением гиф. Формирование половых репродуктивных органов не наблюдалось на планшетах через 4 недели или более после начала культивирования.

Морфологические свойства описанного выше штамма EA702 почти соответствовали характеристикам *Apiotrichum porosum*, к которому он был отнесен по результатам анализа последовательности ДНК областей D1/D2 и ITS. Физиологические свойства штаммов EA702 представлены в табл. 6.

Таблица 6

<Тест на ферментацию сахаридов>					
Глюкоза	-				
<Тест на ассимиляцию источника углерода>					
Глюкоза	+	α -метил-D-глюкозид	+	Ксилит	+
Галактоза	+	Целлобиоза	+	D-глюцитол (сорбит)	+
L-сорбоза	+	Салицин	+	D-маннит	+
D-глюкозамин	+	Мелибиоза	+	Галактитол (дульцит)	L
D-рибоза	+	Лактоза	+	Инозитол	+
D-ксилоза	+	Раффиноза	+	D-глюконат	+
L-арабиноза	+	Мелезитоза	+	DL-лактат	+
D-арабиноза	+	Инулин	+	Сукцинат	L
L-рамноза	+	Водорастворимый крахмал	+	Цитрат	L
Сахароза	+	Глицерин	+	Метанол	-
Мальтоза	+	Эритритол	+	Этанол	+
Трегалоза	+	Рибитол (адонитол)	+		
<Тест на ассимиляцию источника азота>					
Нитрат	-	Нитрит	+	Этиламин	+
L-лизин	+	Креатинин			
<Тест на резистентность>					
Жизнеспособность при 25 °C	+	Жизнеспособность при 30 °C			
Жизнеспособность при 40 °C	-	0,01% циклогексимида	-	Жизнеспособность при 37 °C	-
<Тест на потребность в витаминах>			+	50% (мас./об.) D-глюкозы	+
Безвитаминная среда	+				

Благодаря определению молекулярно-филогенетического положения и физиологических свойств, а также продукции эрготионеина было установлено, что штамм EA702 является новым микроорганизмом, относящимся к *Papiliotrema flavescens*.

Промышленное применение

Микроорганизмы по настоящему изобретению обладают высокой продукцией эрготионеина и могут использоваться в областях здоровья, красоты и т.п.

Номер доступа: NITE BP-03051, NITE BP-03052, NITE BP-03053, NITE BP-03054.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

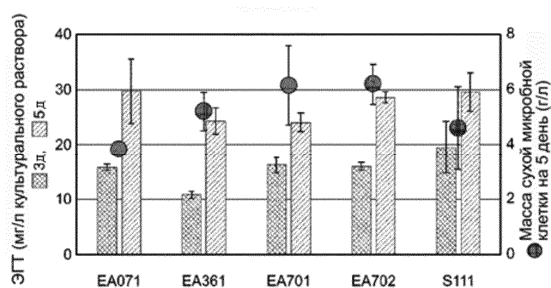
1. Микроорганизм, принадлежащий *Dirkmeia churashimaensis*, депонированный в Национальном институте технологий и оценки под номером доступа NITE BP-03054.
2. Культура, содержащая эрготионеин, полученная путем культивирования микроорганизма по п.1.
3. Способ получения эрготионеина, включающий культивирование микроорганизма по п.1 для получения культуры, содержащей эрготионеин.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

