

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291571 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.20

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

(22) Дата подачи заявки
2020.08.06

(54) НОВЫЙ МИКРООРГАНИЗМ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭРГОТИОНЕИНА

(31) 2020-002301

(32) 2020.01.09

(33) JP

(86) PCT/JP2020/030145

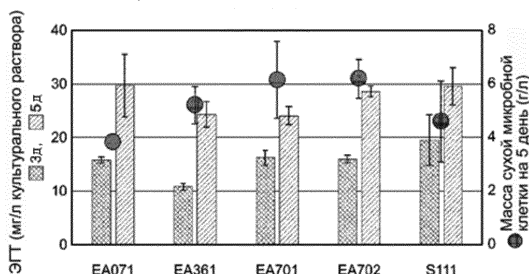
(87) WO 2021/140693 2021.07.15

(71) Заявитель:
КУРЕХА КОРПОРЕЙШН; НЭШНЛ
ИНСТИТЮТ ОФ ЭДВАНСТ
ИНДАСТРИАЛ САЙЕНС ЭНД
ТЕКНОЛОДЖИ (JP)

(72) Изобретатель:
Кошияма Тацуюки, Канеко Муцуми,
Хигашияма Юкихиро, Сато Шун,
Морита Томотакэ, Сайка Азуса (JP)

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

(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).



A1

202291571

202291571

A1

НОВЫЙ МИКРООРГАНИЗМ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭРГОТИОНЕИНА

[ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ]

- 5 [0001] Настоящее изобретение относится к новому микроорганизму и способу получения эрготионеина путем культивирования нового микроорганизма для получения эрготионеина.

[УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ]

- 10 [0002] Эрготионеин является одной из серосодержащих аминокислот. Эрготионеин обладает более высоким антиоксидантным действием, чем витамин Е, и привлек внимание как очень полезное соединение в области здоровья, красоты и т. п.

- [0003] Например, в патентном документе 1 и непатентном документе 1 описаны трансформированные мицелиальные грибы с повышенной способностью к продукции эрготионеина.
- 15

- [0004] В непатентном документе 2 описан трансформированный микроорганизм рода *Methylobacterium* с повышенной способностью к продукции эрготионеина. В непатентном документе 2 описано, что микроорганизмы родов *Aureobasidium* и *Rhodotorula* обладают способностью продуцировать эрготионеин.
- 20

- [0005] В непатентном документе 3 описано, что микроорганизм рода *Pleurotus* обладает способностью продуцировать эрготионеин.
- 25

[СПИСОК БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ССЫЛОК]

[ПАТЕНТНЫЙ ДОКУМЕНТ]

- 30 [0006] Патентный документ 1: WO 2016/121285

НЕПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- [0007] Непатентный документ 1: S. Takusagawa, Biosci. Biotechnol. Biochem., 83, 181-184 (2019)
- 35
- 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]

- 5 [0008] 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
- 10 техники, имеют низкую продукцию эрготионеина, поэтому желательны поиск и разработка микроорганизмов с высокой продукцией эрготионеина.

- [0009] Методы рекомбинации генов можно использовать для модификации микроорганизмов с целью повышения продукции эрготионеина. Однако эрготионеин, продуцируемый
- 15 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.

- 20 [0010] Настоящее изобретение было сделано в свете вышеуказанной проблемы, и его целью является обеспечение нового микроорганизма с высокой продукцией эрготионеина.

[РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ]

- 25 [0011] В результате скрининга авторы настоящего изобретения обнаружили новый микроорганизм с более высокой продукцией эрготионеина, чем у известных микроорганизмов, и реализовали настоящее изобретение.

- [0012] Микроорганизм по настоящему изобретению представляет собой микроорганизм,
- 30 принадлежащий *Dirkmeia churashimaensis* (NITE BP-03054), микроорганизм, принадлежащий *Papiliotrema flavescens* (NITE BP-03051), микроорганизм, принадлежащий *Papiliotrema flavescens* (NITE BP-03052), или принадлежащий *Apiotrichum porosum* (NITE BP-03053).

[ПОЛЕЗНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ]

35

- [0013] Согласно одному аспекту настоящего изобретения может быть получен микроорганизм с высокой продукцией эрготионеина.

[КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ]

[0014] На Фиг. 1 представлен график, демонстрирующий результаты первого скрининга.

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

- 5 На Фиг. 3 представлен график, демонстрирующий результаты оценки продукции эрготионеина пятью новыми штаммами микроорганизмов.

[ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ]

- 10 [0015] 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.

15

[0016] 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

20 подобными методами, и поэтому его также можно использовать в пищевой промышленности.

[0017] Далее будет подробно описан микроорганизм по настоящему варианту осуществления изобретения.

- 25 [0018] [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 листа (молодые листья), собранные в Цукуба-ши, Ибараки.

30

[0019] 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,

35

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.

5 [0020] Дрожжи S111 были депонированы в Депозитарии патентных микроорганизмов NITE (NPMD) Национального института технологий и оценки (далее сокращенно «NITE») (№ 122, 2-5-8 Kazusakamatari, Кисарадзу, Тиба, Япония) (дата первоначального депонирования: 25 октября 2019 г., номер доступа: NITE BP-03054).

10 [0021] 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
15 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 °C до 37 °C, а время инкубации предпочтительно составляет от 2 до 14 дней.

20

[0022] [2. *Papiliotrema flavescens* EA071]

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

[0023] Определены последовательностей оснований гена рибосомальной РНК 26S рДНК-D1/D2 и областей ITS. Поиск гомологии с помощью BLAST проводили в системе
30 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 EA071 были отнесены к *Papiliotrema flavescens*. Кроме того, как показано в примерах, дрожжи EA071 проявляют почти сходные физиологические/биохимические свойства со свойствами
35 *Papiliotrema flavescens*, за исключением того, что наблюдались различия в отношении инулина и водорастворимого крахмала в качестве источников углерода.

[0024] Дрожжи EA071 были депонированы в Депозитарии патентных микроорганизмов NITE (NPMO) Национального института технологий и оценки (NITE) (№ 122, 2-5-8 Kazusakamatari, Кисарадзу, Тиба, Япония) (дата первоначального депонирования: 25 октября 2019 г., номер доступа: NITE BP-03051).

5

[0025] 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 °C до 30 °C, а время инкубации предпочтительно составляет от 2 до 14 дней.

[0026] [3. *Papiliotrema flavescens* EA361]

20 *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 последовательностей 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), 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.

[0028] Дрожжи EA361 были депонированы в Депозитарии патентных микроорганизмов NITE (NPMO) Национального института технологий и оценки (NITE) (№ 122, 2-5-8 Kazusakamatari, Кисарадзу, Тиба, Япония) (дата первоначального депонирования: 25 октября 2019 г., номер доступа: NITE BP-03052).

[0029] 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 желателно 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 °C до 30 °C, а время инкубации предпочтительно составляет от 2 до 14 дней.

[0030] [4. *Apiotrichum porosum* EA702]

15 *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.

[0031] Определены последовательностей 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), 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.

[0032] Дрожжи EA702 были депонированы в Депозитории патентных микроорганизмов NITE (NPMD) Национального института технологий и оценки (NITE) (№ 122, 2-5-8 Kazusakamatari, Кисарадзу, Тиба, Япония) (дата первоначального депонирования: 25 октября 2019 г., номер доступа: NITE BP-03053).

[0033] 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 °C до 27 °C, а время инкубации предпочтительно составляет от 2 до 14 дней.

[0034] [Способ получения эрготионеина]

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

[0035] 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. Производство эрготионеина микроорганизмом может быть определено количественно, например, путем измерения полученного жидкого экстракта с использованием прибора для высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометра, например, ЖХМС.

25 [0036] [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 принадлежащий *Apiotrichum porosum* (NITE BP-03053).

[0037] Также способ получения эрготионеина по настоящему варианту осуществления включает культивирование микроорганизма, описанного выше, для получения культуры, содержащей эрготионеин.

35

[0038] 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, что 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]

10

[0039] В следующих примерах символ «%» представляет % по массе, если не указано иное.

[0040] (1) Обогащение культуры с использованием источника выделения, собранного из окружающей среды

15

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).

20

[0041] 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.

25

[0042] Затем было отобрано 111 проб (30 проб для первого этапа и 81 проба для второго этапа), в которых визуально наблюдалось помутнение среды (размножение микроорганизмов).

30

[0043] (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 mM H₂O₂ (далее обозначаемую как содержащая H₂O₂ агаризованная среда YM) и культивировали при 25 °C в течение 2–5 дней.

35

[0044] 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 H_2O_2 агаризованной среде YM.

5 [0045] 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).

[0046] (3) Культура отобранных колоний в 96 лунках

10 164 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 минут. Осадки клеток, полученные при центрифугировании, промывали чистым раствором в 1 мл и снова центрифугировали.

15 [0047] 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 минут для извлечения внутриклеточных компонентов. Затем экстрагированные внутриклеточные компоненты центрифугировали для удаления остатков микробных клеток, получая таким образом жидкие экстракты.

[0048] (4) Количественный анализ эрготионеина в жидком экстракте методом ЖХМС

25 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.

30 [0049] 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 mM формиата аммония и ацетонитрила (10 mM 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.

35 [0050] При детектировании методом МС 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.

[0051] 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).

5 [0052] 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 ОП600. 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 отобранных колоний.

10 [0053] (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).

20 [0054] 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.

25 [0055] 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.

30 [0056] 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-й и 5-й дни культивирования. Продукция эрготионеина колониями выбранных пяти штаммов показана на Фиг. 3.

35 [0057] 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.

[0058] (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.

[0059] 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*.

[0060] В таблице 1 показаны продукция эрготионеина (ЭГТ) и скорость продукции выбранных пяти штаммов. В таблице 2 показаны продукция и скорость продукции известных микроорганизмов. В таблицах 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 таблице 1 указывает на продукцию эрготионеина на 5-й день культивирования.

[0061] 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

[0062] [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

Methylobacterium aquaticum 22A	12,2	1,7	J Biosci Bioeng 126 (2018) 715
--------------------------------	------	-----	--------------------------------

[0063] Из таблиц 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
5 продукции эрготионеина выбранными пятью штаммами также была равна или превышала скорость продукции известных микроорганизмов, продуцирующих эрготионеин.

[0064] (8) Молекулярно-филогенетическое положение и физиологические свойства штамма S111

10 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
15 дереве, проанализированном на основе полученных последовательностей оснований, штамм S111 продемонстрировал такое же молекулярно-филогенетическое положение, что и множество последовательностей оснований *Dirkmeia churashimaensis*.

[0065] Штамм S111 культивировали на агаризованной среде YM при 27 °C в течение 7 дней и
20 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.

25 [0066] 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.

30 [0067] 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 таблице 3.

35

[0068] В таблице 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.

[0069] [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 °С	+	Жизнеспособность при 30 °С	+	Жизнеспособность при 37 °С	+
0,01% циклогексимида	D	50% (мас./об.) D-глюкозы	+	10% NaCl/5% глюкозы	+
<Тест на потребность в витаминах>					
Безвитаминная среда	+				

[0070] Благодаря определению молекулярно-филогенетического положения и физиологических свойств, а также продукции эрготионеина, было установлено, что штамм S111 является новым микроорганизмом, относящимся к *Dirkmeia churashimaensis*.

[0071] (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

5 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

10 филетическую группу, включающую род *Papiliotrema*. Затем штамм продемонстрировал такое же молекулярно-филогенетическое положение, как и у *Cryptococcus flavescens* (текущее название: *Papiliotrema flavescens*) CBS942^T.

[0072] 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

15 приподнятом состоянии – подушковидной. Форма поверхности колоний была ровной. Кроме того, колонии были светящимися и вязкими, кремового цвета.

[0073] Далее штамм EA071 культивировали на агаризованной среде YM при 27 °C в течение 7 дней, после чего также отмечали морфологические свойства его клеток. Было

20 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.

[0074] Морфологические свойства описанного выше штамма EA071 почти соответствовали характеристикам *Papiliotrema flavescens*, к которому он был отнесен по результатам анализа

25 последовательности ДНК областей D1/D2 и ITS. Физиологические свойства штаммов EA071 представлены в таблице 4.

[0075] [Таблица 4]

<Тест на ферментацию сахаридов>					
Глюкоза		—			
<Тест на ассимиляцию источника углерода>					
Глюкоза	+	Целлобиоза	+	D-маннит	+
Галактоза	+	Салицин	+	Галактитол (дульцит)	+
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	+				

[0076] Благодаря определению молекулярно-филогенетического положения и физиологических свойств, а также продукции эрготионенна, было установлено, что штамм EA071 является новым микроорганизмом, относящимся к *Papiliotrema flavescens*.

5

[0077] (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 филетическую группу, включающую род *Papiliotrema*. Затем штамм продемонстрировал такое же молекулярно-филогенетическое положение, как и у *Cryptococcus flavescens* (текущее название: *Papiliotrema flavescens*) CBS942^T.

[0078] Штамм EA361 культивировали на агаризованной среде УМ при 27 °С 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.

5

[0079] Далее штамм EA361 культивировали на агаризованной среде УМ при 27 °С 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.

10

[0080] Морфологические свойства описанного выше штамма EA361 почти соответствовали характеристикам *Papiliotrema flavescens*, к которому он был отнесен по результатам анализа последовательности ДНК областей D1/D2 и ITS. Физиологические свойства штаммов EA071

15

[0081] [Таблица 5]

<Тест на ферментацию сахаридов>					
Глюкоза	—				
<Тест на ассимиляцию источника углерода>					
Глюкоза	+	Целлобиоза	+	D-маннит	+
Галактоза	+	Салицин	+	Галактитол (дульцит)	+
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 °С	+	Жизнеспособность при 37 °С	–		
0,01% циклогексимида	+	50% (мас./об.) D-глюкозы	+	10% NaCl/5% глюкозы	–
<Тест на потребность в витаминах>					
Безвитаминная среда	+				

[0082] Благодаря определению молекулярно-филогенетического положения и физиологических свойств, а также продукции эрготионеина, было установлено, что штамм EA361 является новым микроорганизмом, относящимся к *Papiliotrema flavescens*.

5

[0083] (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: *Apiotrichum porosum*) как одного типа базидиальных дрожжей. В молекулярно-филогенетическом дереве, проанализированном на основе полученных последовательностей оснований, штамм EA702 был включен в филетическую группу, включающую род *Trichosporon* (*Apiotrichum*). Затем штамм продемонстрировал такое же молекулярно-филогенетическое положение, как и *Trichosporon porosum* (текущее название: *Apiotrichum porosum*) CBS2040^T.

[0084] Штамм EA702 культивировали на агаризованной среде YM при 27 °С 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.

25

[0085] Далее штамм EA702 культивировали на агаризованной среде YM при 27 °С 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.

30

- [0086] Морфологические свойства описанного выше штамма EA702 почти соответствовали характеристикам *Apiotrichum rogosum*, к которому он был отнесен по результатам анализа последовательности ДНК областей D1/D2 и ITS. Физиологические свойства штаммов EA702
- 5 представлены в таблице 6.

[0087] [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 °С	+	Жизнеспособность при 30 °С			
Жизнеспособность при 40 °С	—	0,01% циклогексимида	—	Жизнеспособность при 37 °С	—
<Тест на потребность в витаминах>			+	50% (мас./об.) D-глюкозы	+
Безвитаминная среда	+				

[0088] Благодаря определению молекулярно-филогенетического положения и физиологических свойств, а также продукции эрготионеина, было установлено, что штамм EA 702 является новым микроорганизмом, относящимся к *Papiliotrema flavescens*.

5 **[ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ]**

[0089] Микроорганизмы по настоящему изобретению обладают высокой продукцией эрготионеина и могут использоваться в областях здоровья, красоты и т.п.

10 **[НОМЕР ДОСТУПА]**

[0090] NITE BP-03051

NITE BP-03052

NITE BP-03053

15 NITE BP-03054

Формула изобретения

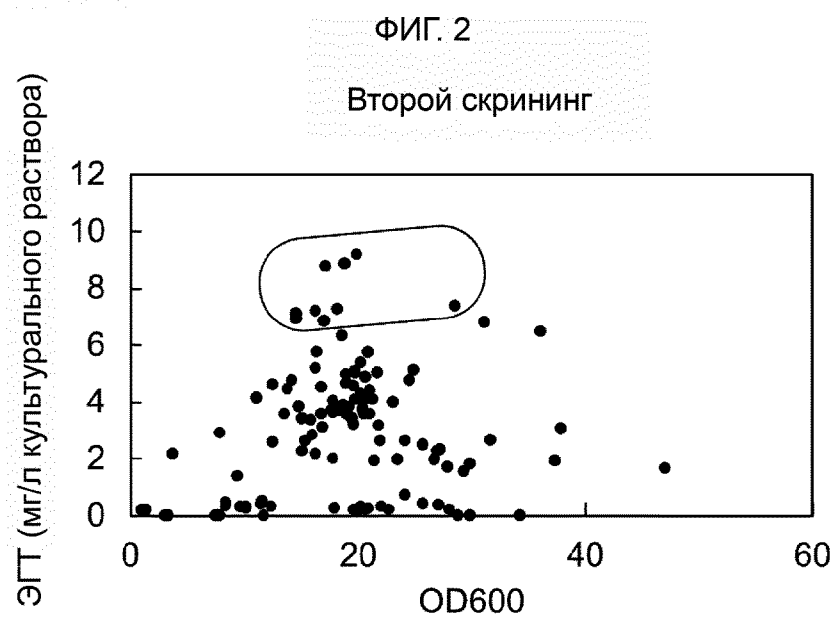
1. Микроорганизм, принадлежащий *Dirkmeia churashimaensis* (NITE BP-03054),
микроорганизм, принадлежащий *Papiliotrema flavescens* (NITE BP-03051), микроорганизм,
5 принадлежащий *Papiliotrema flavescens* (NITE BP-03052), или микроорганизм, принадлежащий
Apiotrichum porosum (NITE BP-03053).
2. Способ получения эрготионеина, включающий культивирование микроорганизма по
п. 1 для получения культуры, содержащей эрготионеин.

10

[ФИГ. 1]



[ФИГ. 2]



[ФИГ. 3]

ФИГ. 3

