世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12P 19/02 // (C12P 19/02, C12R 1:01)	A1	(11) 国際公開番号	WO99/61648
		(43) 国際公開日	1999年12月2日(02.12.99)

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02793

(22) 国際出願日 1999年5月27日(27.05.99)

(30) 優先権データ
特願平10/145548 1998年5月27日(27.05.98) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
三菱化学株式会社
(MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION)[JP/JP]
〒100-0005 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
川口智子(KAWAGUCHI, Tomoko)[JP/JP]
原 磨理(HARA, Mari)[JP/JP]
上田 誠(UEDA, Makoto)[JP/JP]
〒227-8502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
三菱化学株式会社 横浜総合研究所内 Kanagawa, (JP)
(74) 代理人
遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.)
〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号
ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: **PROCESS FOR PRODUCING L-RIBOSE**

(54)発明の名称 Lーリボースの製造方法

(57) **Abstract**

A process for producing L-ribose staring with glucose, which contains the step of forming ribitol form glucose by using a microorganism capable of producing ribitol from glucose; the step of forming L-ribulose from ribitol by using a microorganism capable of producing L-ribulose from ribitol; and the step of forming L-ribose from L-ribulose by using a microorganism capable of producing L-ribose from L-ribulose.

(57)要約

グルコースからリビトールを生産する能力を有する微生物を用いてグルコースからリビトールを生成する工程と、リビトールからＬ－リブロースを生産する能力を有する微生物を用いてリビトールからＬ－リブロースを生成する工程と、Ｌ－リブロースからＬ－リボースを生産する能力を有する微生物を用いてＬ－リブロースからＬ－リボースを生成する工程により、グルコースを出発原料としてＬ－リボースを製造する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TZ タンザニア
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィェトナム
YU ユーゴースラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明細書

Ｌ－リボースの製造方法

技術分野

本発明は、安価な糖を出発原料とした多段階の生物反応によるＬ－リボースの製造方法に関する。

従来の技術

近年、非天然型の糖類は医薬及び農薬の中間原料として注目されている。リボースに関しては天然型のＤ体はＤＮＡの構成糖としては勿論、種々のビタミンや補酵素の構成糖として全生物界に豊富に分布しているにもかかわらず、非天然型のＬ体はほとんど供給の目処が立っていないのが現状である。現在知られているＬ－リボースの主な生産方法としては、Ｌ－アラビノースを原料としたコバルト触媒による合成法が挙げられる。一方、微生物を用いてＬ－リボースを生産する方法としてはアシネトバクター・カルコアセティカス（Acinetobacter calcoaceticus）ＤＬ－２８株の産出する酵素がＬ－リブロースを異性化し、Ｌ－リボースを生産することが唯一報告されている（Journal of Fermentation and Bioengineering Vol.81,No.6,493-497.1996）。

上記の酵素反応の原料であるＬ－リブロースの製造方法としては、Ｌ－アラビノースイソメラーゼによるＬ－アラビノースの異性化による方法（Methods Enzym. Anal.(3rd Ed.)(1984)vol.6 442-449）と、精製されたリビトールを原料とした微生物反応により製造する方法（Biochem. J. vol. 64:385,1956）が知られているが、両方法とも原料であるＬ－アラビノースとリビトールは安価とは言い難く、工業的規模で安定的にＬ－リブロースを供給するプロセスまでは報告されていない。

上記２通りのＬ－リブロース生産方法の一方の原料であるリビトールの微生物による製造方法としてＤ－リボースを原料として酵素反応により製造する方法

（特公昭４５－２０７１号公報、特公昭４９－１２７１８号公報）、グルコースなどの発酵により製造する方法（特公平６－３０５９１号公報、特公平６－３０５９２号公報、特公平６－３０５９３号公報、特公平６－３０５９４号公報）、及び藻類の炭酸固定による方法（特公昭４４－１６３５０号公報）が報告されている。

しかしながら、上記のいずれの技術を組み合わせても、工業的規模でＬ－リボースを生産するに至ってはおらず、従って、工業的規模でＬ－リボースを製造し、かつ生産されたＬ－リボース含有液からＬ－リボースを高純度、高収率で単離精製する技術は全く知られていなかった。

実際に従来の方法を用いて工業的規模でＬ－リボースを生物学的に生産しようとした場合、種々の問題点が生じる。つまり第１段階である、リビトールを製造するに当たって、従来法の中では安価な原料であるグルコースなどの発酵による方法が望ましいが、この従来法でもエリスリトールなどの他の糖アルコールは効率的に製造できても、リビトールに関しては必ずしも満足のいく生産性を得られてはいない。

第２段階である、リビトールをＬ－リブロースに変換する技術に関して、従来法では原料のリビトールは精製されたものでなければならなかった。結晶リビトールは原料としては極めて高価である。また上述の発酵リビトールを利用する場合には、エリスリトールやグリセロールといったポリアルコールが多く含まれ、この中から収率よくリビトールのみを分離精製することは極めて困難であった。そこで、工業的に安価にＬ－リブロースを生産するために、リビトールを含有する発酵液または粗精製リビトールからリビトールを精製することなく直接Ｌ－リブロースに変換させる方法が望まれていた。

また、リビトールの代わりにＬ－アラビノースを原料とする場合であっても、Ｌ－アラビノースは安価とはいえず、Ｌ－リブロースの収率も低い。

第３段階である、Ｌ－リブロースをＬ－リボースに変換する反応においても、従来の技術では原料のＬ－リブロースは精製されたものである必要があった。精製Ｌ－リブロースは極めて高価な原料であり、上述のＬ－リブロース含有液から単離精製することは極めて困難であった。そこで目的物質であるＬ－リボースを

工業的規模で安価に生産するために、リビトールを含有する発酵液または粗精製リビトールからリビトールを精製することなく直接Ｌ－リブロースに変換させ、さらにそのＬ－リブロース含有反応液からＬ－リブロースを精製することなく直接Ｌ－リボースに変換する方法が望まれていた。

一方、多段階生物反応による夾雑物の極めて多いＬ－リボース含有液からのＬ－リボースの単離精製法は全く知られていないため、有効な方法を開発する必要があった。

発明の開示

本発明者らは、上述の問題を解決すべく鋭意検討した結果、安価な原料であるグルコース等を出発物質として用い、数段階の微生物反応と精製を組み合わせることにより、重要な医農薬中間体である非天然型のＬ－リボースを安価に効率よく製造できる方法を見出し、本発明を完成するに至った。

即ち本発明の要旨は、グルコース等の糖質原料を出発原料とし、数段階の生物学的手法を用いてＬ－リボースを生産することを特徴とするＬ－リボースの製造方法に存する。具体的には、本発明は、グルコース等の糖質原料からリビトールを生産する能力を有する微生物を用いてグルコースからリビトールを生成する工程（以下、「第１工程」と称することもある）と、リビトールからＬ－リブロースを生産する能力を有する微生物を用いてリビトールからＬ－リブロースを生成する工程（以下、「第２工程」と称することもある）と、Ｌ－リブロースからＬ－リボースを生産する能力を有する微生物を用いてＬ－リブロースからＬ－リボースを生成する工程（以下、「第３工程」と称することもある）を含む、Ｌ－リボースの製造方法である。

さらに、本発明の好ましい態様として、上記の生物学的手法を用いて生産したＬ－リボース含有液をゲル型濾過材に接触させること、及び、該Ｌ－リボース含有液に有機溶媒を添加し、反応液中に残存する未反応のＬ－リブロースを析出させずにＬ－リボースを単独で析出させることを含む方法が挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、グルコース等の糖質原料を出発原料とし、数段階の生物学的手法を用いてＬ－リボースを生産することを特徴とするが、上記で延べた第１工程、第２工程及び第３工程を経る方法がその一例として挙げられる。以下はその方法を例として説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

本発明の製造方法における第１工程は、グルコース等の糖質原料からリビトールを製造する工程である。第１工程で使用する微生物としては、グルコース等の糖質原料からリビトールを生産する能力を有する微生物であれば、特に限定されないが、好ましくはトリコスポロノイデス(Trichosporonoides) 属に属する微生物が挙げられ、さらに好ましくは、トリコスポロノイデス・マディダ (Trichosporonoides.madida) 、トリコスポロノイデス・ニグレスセンス (Trichosporonoides.nigrescens) 、トリコスポロノイデス・エドセファリス (Trichosporonoides.oedocephalis) 、トリコスポロノイデス・メガチリエンシス (Trichosporonoides.megachillensis) 、トリコスポロノイデス・スパチュラータ (Trichosporonoides.spathulata) の種に属する微生物が挙げられ、さらに好ましくは、トリコスポロノイデス・エドセファリスとトリコスポロノイデス・メガチリエンシスの種に属する微生物が挙げられる。例えばトリコスポロノイデス・マディダに属する微生物としてＣＢＳ２４０．７９が、トリコスポロノイデス・ニグレスセンスに属する微生物としてＣＢＳ２６８．８１、ＣＢＳ２６９．８１が、トリコスポロノイデス・エドセファリスに属する微生物としてＣＢＳ５６８．８５、ＣＢＳ６４９．６６が、トリコスポロノイデス・メガチリエンシスに属する微生物としてＣＢＳ５６７．８５が、トリコスポロノイデス・スパチュラータに属する微生物としてＣＢＳ２４１．７９、ＣＢＳ２４２．７９Ａ、ＣＢＳ２４２．７９Ｂが挙げられる。これらの菌株は、Cenatraalbureau voor Schimmelculturesから入手することができる。なお、上記微生物は、野生株の他、ＵＶ照射、Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロソグアニジン（ＮＴＧ）処理、エチルメタンスルホネート（ＥＭＳ）処理、亜硝酸処理、アクリジン処理等による変異株、あるいは細胞融合もしくは遺伝子組換え法などの遺伝学的手法により誘導される組換え株などのいずれの株であってもよい。変異株の具体例としてはトリコスポロノイデス・メガチリ

エンシスＭＣＩ３４４２株が挙げられる。同株は、平成９年６月２日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東1-1-3）にＦＥＲＭ　Ｐ－１６２５４の受託番号で寄託され、平成９年１１月１９日にブダペスト条約にもとづく国際寄託に移管され、ＦＥＲＭ　ＢＰ－６１７６の受託番号が付与されている。

第１工程においては、上記微生物は１種あるいは２種以上が用いられる。

次に、本発明の第１工程について具体的に説明する。

第１工程において、微生物は糖質原料を炭素源として定法通り培養される。つまり、微生物は６０％（W/V）以下、好ましくは２０～４５％の糖質原料を含む培地に植菌される。糖質原料としては、グルコース、フルクトース、シュークロース、マルトース、グリセロール等、及びそれらの混合物が挙げられる。これらの中ではグルコースが好ましい。用いる糖質原料の形態は特に制限されず、粉体、糖蜜、廃糖蜜等を用いることができる。また、炭素源としては微生物が資化しうるフルクトースなどの炭水化物、グリセロールなどのアルコール類、有機酸などを適宜加えることができる。さらにこの培地には微生物が資化しうる窒素源が含まれる。窒素源としては、酵母エキス、コーンスティープリカー、ＮＺアミン、トリプトース、ペプトン、ポリペプトン、魚肉エキス、肉エキスその他の有機窒素源、あるいは硝酸ナトリウム、その他の無機窒素源、好ましくは、酵母エキスやコーンスティープリカー、が適宜使用される。培地中に含まれる窒素源の初発濃度は好ましくは、酵母エキスの場合０．５～４．０％、コーンスティープリカーの場合、１．０～８．０％である。好ましい窒素源の濃度はグルコース等の糖質原料の濃度に影響される。上述の炭素源、窒素源のほかに、無機イオンやビタミン類を必要に応じ添加することは有効である。無機イオンとしては、リン酸イオン、マグネシウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、モリブデンイオンその他が用いられる。ビタミン類としては、チアミン、イノシトール、パントテン酸、ニコチン酸アミドなどが挙げられる。また、上述のグルコースその他の炭素源、窒素源、無機イオン、ビタミン類は、必要に応じて培養中の適当な時点で追補添加してもよい。

培養は好気的条件下で行う。本発明において、微生物はリビトール以外にエリ

スリトールとグリセロールを副生する場合があるが、リビトールの生成比率を効率よくするためには十分な通気を行うことが重要である。

培養温度は通常２０～３７℃、好ましくは２７～３２℃で、通常２４時間から２週間行う。

本発明の製造方法における第２工程は、リビトールからＬ－リブロースを製造する工程である。第２工程で使用する微生物としては好気的反応条件下、リビトールをＬ－リブロースに変換する能力を有する微生物であれば特に限定はされないが、リビトールからＬ－リブロースを製造し、かつリビトール以外の副生産されたポリアルコールを資化する能力を有する微生物が好ましく、より好ましくは、アセトバクター(Acetobacter) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、アグロバクテリウム(Agrobacterium) 属、アルスロバクター(Arthrobacter)属、アエロモナス(Aeromonas) 属、オーレオバクテリウム(Aureobacterium)属、バチルス(Bacillus)属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、クレブシエラ(Klebsiella)属、オクロバクトラム(Ochrobactrum)属、リゾビウム(Rhizobium) 属、セラチア(Serratia)属、ロドバクター(Rhodobacter) 属、コリネバクテリウム(Corynebacterium) 属、エンテロバクター(Enterobacter)属、グルコノバクター(Gluconobacter) 属、ミクロコッカス(Micrococcus) 属、パラコッカス(Paracoccus)属、シュードモナス (Pseudomonas) 属に属する微生物である。特にグルコノバクター属に属する微生物が、Ｌ－リブロースの生成効率の点からも、ポリアルコールの資化性の点からも好ましい。

本発明において使用するグルコノバクター (Gluconobacter) 属に属する微生物は、例えばGluconobacter frateurii、Gluconobacter oxydans等が挙げられる。さらに具体的な代表株としてGluconobacter frateurii IFO 2508 、Gluconobacter oxydans IFO 3293 が挙げられる。

本発明において使用するアセトバクター属に属する微生物は、例えば、Acetobactor acinus等が挙げられ、具体的な菌株としては、Acetobactor acinus FERM P-2507が挙げられる。

本発明において使用するアルカリゲネス属に属する微生物は、例えばAlcalige

nes aquamarinus, Alcaligenes epoxylyticus, Alcaligenes margaritae, Alcaligenes paradoxus, Alcaligenes xylosoxidans subsp. xylosoxidansが挙げられligenes epoxylyticus FERM P-2511, Alcaligenes margaritae FERM P-2512, Alcaligenes xylosoxidans subsp. xylosoxidans IAM 12684, Alcaligenes paradoxus Biotype I DSM66, Alcaligenes paradoxus Biotype II DSM30162が挙げられる。

本発明において使用するアシネトバクター属に属する微生物は、例えばAcinetobacter tartarogenesが挙げられる。さらに具体的には、Acinetobacter tartarogenesIF013644が挙げられる。

本発明において使用するアルスロバクター属に属する微生物は、例えばArthrobacter atrocyaneus, Arthrobacter pascens, Arthrobacter ramousus等が挙げられる。さらに具体的には Arthrobacter pascens IF012139, Arthrobacter atrocyaneus JCM 1329, Arthrobacter ramousus JCM1334等が挙げられる。

本発明において使用するアグロバクテリウム属に属する微生物は、例えばAgrobacterium radiobacter, Agrobacterium tumefaciens, Agrobacterium viscosumが挙げられる。さらに具体的な代表株としてAgrobacterium radiobacter NRRL B-11291, Agrobacterium tumefaciens IAM13129, Agrobacterium viscosum IF013652 が挙げられる。

本発明において使用するオーレオバクテリウム属に属する微生物は、Aureobacterium testaceumが挙げられる。さらに具体的な代表株として Aureobacterium testaceum JCM1353 が挙げられる。

本発明において使用するバチルス属に属する微生物は、例えばBacillus alvei, Bacillus coagulansが挙げられる。さらに具体的な代表株としてBacillus alvei IF03343, Bacillus coagulans AHU 1631 が挙げられる。

本発明において使用するブレビバクテリウム属に属する微生物は、Brevibacterium busillum が挙げられる。さらに具体的な代表株としてBrevibacterium busillum IAM1489 が挙げられる。

本発明において使用するコリネバクテリウム属に属する微生物は、 Corynebacterium flaccumfaciens が挙げられる。さらに具体的な代表株として Corynebac

terium flaccumfaciens ATCC12813 が挙げられる。

本発明において使用するエンテロバクター属に属する微生物は、Enterobacter aerogenesが挙げられる。さらに具体的な代表株としてEnterobacter aerogenes IFO13534 が挙げられる。

本発明において使用するクレブシエラ属に属する微生物は、例えばKlebsiella planticola, Klebsiella oxytoca , Klebsiella terrigenaが挙げられる。さらに具体的な代表株としてKlebsiella planticola NCIB11885, Klebsiella oxytoca JCM1665, Klebsiella terrigena JCM1687 が挙げられる。

本発明において使用するミクロコッカス属に属する微生物は、例えばMicrococcus roseusが挙げられる。さらに具体的な代表株としてMicrococcus roseus IFO 3764 が挙げられる。

本発明において使用するオクロバクトラム属に属する微生物は、Ochrobactrums anthropiが挙げられる。

さらに具体的な代表株としてOchrobactrums anthropi IAM 13993が挙げられる。

本発明において使用するパラコッカス属に属する微生物は、例えばParacoccus denitrificansが挙げられる。さらに具体的な代表株としてParacoccus denitrificans IFO13301 が挙げられる。

本発明において使用するシュードモナス属に属する微生物は、例えばPseudomonas fluorecens, Pseudomonas synxantha が挙げられる。さらに具体的な代表株としてPseudomonas fluorecens IFO 3903, Pseudomonas fluorecens ATCC13525, Pseudomonas synxantha IAM13256 挙げられる。

本発明において使用するアエロモナス属に属する微生物は、例えばAeromonas panctata、具体的には、Aeromonas panctata IFO13288 が挙げられる。

本発明において使用するリゾビウム属に属する微生物は、例えばRhizobium validum IFO13648が挙げられる。

本発明において使用するセラチア属に属する微生物は、例えばSerratia marcescens が挙げられ、例えばSerratia marcescens IFO3054 、Serratia marcescens ATCC13880 が挙げられる。

本発明において使用するロドバクター属に属する微生物は、例えばRhodobacte

r sphaeroides が、例えばRhodobacter sphaeroides IF012003が挙げられる。

上記微生物は、Institute for Fermentation（ＩＦＯ）、Institute of Applied Microbiology（ＩＡＭ）、Deutsche Sammlung fon MIkroorganismen und Zellkulturen GmbH（ＤＳＭ）、Japan Collection of Microorganisms（ＪＣＭ）、Laboratory of Culture Collection of Microorganisms（ＡＨＵ）、American Type Culture Collection（ＡＴＣＣ）、The National Collections of Industrial and Marin Bacteria（ＮＣＩＭＢ）から入手することができる。

なお、上記微生物は、野生株の他、ＵＶ照射、Ｎ－メチルーＮ’－ニトロソグアニジン（ＮＴＧ）処理、エチルメタンスルホネート（ＥＭＳ）処理、亜硝酸処理、アクリジン処理などによる変異株、あるいは細胞融合もしくは遺伝子組み換え法などの遺伝的手法により誘導される組み換え株などいずれの株であってもよい。上記微生物はリビトール以外の副生されたポリアルコールを資化し、リビトールを効率的にＬ－リブロースに変換できるので、その後のＬ－リブロースの分離・精製工程における負荷を著しく軽減することが出来る。

本工程においては、上記微生物は１種あるいは２種以上が用いられる。

次に、本発明の第２工程について具体的に説明する。

本工程で用いるリビトールは、精製されたものであってもよく、リビトール以外の物質を含有する未精製の発酵液または該発酵液を部分精製したものであってもよい。具体的には、リビトール含有液は、菌体を含んでいても良いし、遠心分離などにより菌体を除去したものでもよい。またリビトールの発酵に用いた微生物を蒸気滅菌などにより殺菌したものでも良いし、殺菌を行っていない発酵液でも良い。またこの発酵液を簡便な方法を用いて精製させたものでもよい。例えば発酵液を除菌後、濃縮し晶析させたものでも良いし、また、カラムクロマトグラフィーなどで部分精製させたものでも良い。また発酵液を適当な緩衝液、例えば、酢酸バッファー、リン酸バッファー、トリスバッファー、等、あるいは水を用いて希釈しても良い。あるいは濃縮させても良い。これらの発酵液に微生物を好気的条件で作用させ、Ｌ－リブロースを生成させる。

本発明の第２工程での微生物培養に用いる培地は微生物が生育でき、Ｌ－リブロース生産能を誘導し、かつ、好ましくはポリアルコールの資化性を誘導する培

地であれば、いずれでもよい。さらに培地は液体状でも良いし固体培地でも良い。炭素源としては上記微生物が資化しうるグルコースなどの炭水化物、グリセロールなどのアルコール類、有機酸などが挙げられ、適宜一種あるいは２種以上が選ばれる。好ましくはポリアルコールの資化性を誘導するグリセロールなどのアルコール類が挙げられる。窒素源としては本微生物が資化しうる窒素源であればいずれでも良いが、好ましくは、酵母エキス、コーンスティープリカー、ＮＺアミン、トリプトース、ペプトン、ポリペプトン、肉エキス、魚肉エキス、その他の有機窒素源、あるいは硝酸ナトリウム、その他の無機窒素源が適宜１種あるいは２種使用される。培地中に含まれる炭素源及び窒素源の濃度は０．０１％～２０％の間で用いられる。炭素源、窒素源のほかに、無機イオンやビタミン類を必要に応じ添加することは有効である。無機イオンとしては、リン酸イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、モリブデンイオン、カルシウムイオン、コバルトイオン、その他金属イオン類等が適宜数種類用いられる。ビタミン類としては、チアミン、イノシトール、パントテン酸、ニコチン酸アミドなどが挙げられ、適宜用いられる。また、上述のグルコースその他の炭素源、窒素源、無機イオン、ビタミン類は、必要に応じて培養中の適当な時点で追補添加してもよい。

培養は好気的条件下で行う。培養温度は４℃から５０℃の範囲で行われるが、好ましくは２０から４０℃の範囲である。通気量は0.001vvm～2vvm好ましくは0.5～1.5vvmの範囲で行われる。ｐＨは２～１０、好ましくは３～９の間である。

培養は、通常１０時間から２日間行う。

次に、第２工程に供する菌体は、培養液そのままを用いてもよいし、遠心分離等により集菌したものであってもよい。培養して得られた菌体をそのまま、あるいは培養して得られた菌体を公知の手法で処理したもの、即ち、アセトン処理、凍結乾燥処理、界面活性剤処理あるいはトルエン処理など菌体を物理的または酵素的に破砕したもの等の菌体処理物を用いることができる。また、これらの菌体または菌体処理物から、リビトールに作用し、Ｌ－リブロースを生産する能力を有する酵素画分を粗精製物あるいは精製物として取り出して用いることも可能である。さらには、このようにして得られた菌体、菌体処理物、酵素画分等をポリ

アクリルアミドゲル、カラギーナンゲル等の担体に固定化したもの等を用いることも可能である。そこで本発明において、「微生物」の用語は、上述の菌体、菌体処理物、酵素画分、およびそれらの固定化物全てを含有する概念として用いられる。

反応は好気的条件下で行う。反応温度は４℃から５０℃の範囲で行われるが好ましくは２０から４０℃の範囲である。ｐＨは２～１０、好ましくは３～８の間である。撹拌が十分に行われていれば特に通気の必要は無いが、好ましくは０．０１ｖｖｍ～１ｖｖｍの間で通気する。反応に用いる菌体量は湿潤菌体量換算でリビトール含有発酵液に対し０．００１％～５０％（重量／体積）の間で用いられる。リビトールの濃度は特に限定されないが、好ましくは０．１から１５％の間である。含有されるポリアルコールの濃度は特に限定されない。反応は、通常１時間から２週間行う。

反応により得られたＬ－リブロースは、上記で得られた培養液を精製せずにそのまま用いても良いし、培養液から公知の方法により分離精製した後に第３段階の反応に供することもできる。即ち、培養終了後、まず微生物菌体を遠心分離等の既存の方法で除去する。除菌に先立ち、培養液に熱を加え、殺菌を行ってもよい。除菌された液は通常の分離方法、即ちクロマトグラフィーなどを用いることで容易に精製できる。工業的には、イオン交換樹脂を用いた疑似移動相型クロマトグラフィーにより分離することも可能である。分離精製の工程においては、必要に応じて脱塩、脱色など、通常の糖の精製における操作を加えることもできる。

本発明の製造方法における第３工程は、Ｌ－リブロースからＬ－リボースを製造する工程である。第３段階で使用する微生物としては、Ｌ－リブロースを異性化してＬ－リボースを生産する能力を有する微生物であれば、特に限定されないが、好ましくはアシネトバクター属またはセルロモナス属に属する微生物であり、更に好ましくは、アシネトバクター・カルコアセティカス（Acinetobacter calcoaceticus）もしくはセルロモナス・ゲリダ（Cellulomonas gerida）、セルロモナス　ビアゾテア（Cellulomonas biazotea）またはセルロモナス・フラビゲナ（Cellulomonas flavigena）の種に属する微生物が挙げられる。アシネトバクター属に属する微生物としてアシネトバクター・カルコアセティカス（Acinetob

acter calcoaceticus ）ＤＬ－２８株、セルロモナス・ゲリダ（Cellulomonas gerida ）に属する微生物としてＪＣＭ１４９０が、セルロモナス・ビアゾテア（Cellulomonas biazotea ）に属する微生物としてＡＴＣＣ４８６が、セルロモナス　フラビゲナ（Cellulomonas flavigena）に属する微生物としてＡＴＣＣ４８２等が挙げられる。これらの微生物は、Japan Collection of Microorganisms（ＪＣＭ）及びAmerican Type Culture Collection（ＡＴＣＣ）から入手することができる。

また上記微生物は、野生株の他、紫外線照射やN- メチル- N'-ニトロ- N-ニトロソグアニジン（ＮＴＧ）処理、エチルメタンスルホネート（ＥＭＳ）処理、亜硝酸処理、アクリジン処理等通常知られた方法による変異株、あるいは細胞融合もしくは遺伝子組換え法などの遺伝学的手法により誘導される組換え株などのいずれの株であってもよい。また、上記微生物の代わりに、欧州公開第８０７６８２号公報に記載のような酵素（Ｌ－リブロース異性化酵素）を用いてもよい。

本工程においては、上記微生物を１種あるいは２種以上が用いられる。

次に、本発明の第３工程について具体的に説明する。

本工程で用いるＬ－リブロースは、精製されたものであってもよく、Ｌ－リブロース以外の物質を含有する未精製の発酵液または該発酵液を部分精製したものであってもよい。具体的には、Ｌ－リブロース含有液は、第１および第２工程で用いた菌体を含んでいても良いし、遠心分離などにより菌体を除去したものでもよい。また、第１及び第２工程で用いた微生物を蒸気滅菌などにより殺菌したものでも良いし、殺菌を行っていない発酵液でも良い。またこの発酵液を簡便な方法を用いて精製させたものでもよい。例えばＬ－リブロース発酵液を除菌後、濃縮し晶析させたものでも良いし、また、カラムクロマトグラフィーなどで部分精製させたものでも良い。また発酵液を適当な緩衝液、例えば、酢酸バッファー、リン酸バッファー、トリスバッファー、等、あるいは水を用いて希釈しても良い。あるいは濃縮させても良い。これらの発酵液に微生物を好気的条件で作用させ、Ｌ－リボースを生成させる。

本発明の第３工程において微生物は定法通り培養される。つまり、炭素源とし

ては上記微生物が資化しうるグルコースなどの炭水化物、グリセロールなどのアルコール類、有機酸など、好ましくはグルコース、グリセロール、スクロース等が、更に好ましくはスクロースが用いられる。またこれらの炭素源は培養中に必要に応じて１種類あるいは複数種類適宜加えることができる。さらにこの培地には上記微生物が資化しうる窒素源が含まれる。窒素源としては、アミノ酸類、酵母エキス、大豆ペプチド、大豆粉末、コーンスティープリカー、ＮＺアミン、トリプトース、ペプトン、ポリペプトン、肉エキス、魚肉エキスその他の有機窒素源、あるいは硝酸ナトリウム、その他の無機窒素源、好ましくは、酵母エキスや大豆ペプチド、ポリペプトンが適宜使用される。上述の炭素源、窒素源のほかに、無機イオンやビタミン類を必要に応じ添加することは有効である。無機イオンとしては、リン酸イオン、マグネシウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、モリブデンイオンその他が用いられる。ビタミン類としては、チアミン、イノシトール、パントテン酸、ニコチン酸アミドなどが挙げられる。また、上述のスクロースその他の炭素源、窒素源、無機イオン、ビタミン類は、必要に応じて培養中の適当な時点で追補添加してもよい。

培養は好気的条件下で行う。本発明において、Ｌ－リブロースからＬ－リボースを生産するイソメラーゼを高活性に発現させるために通常０．１～２．０ｖｖｍ、好ましくは０．５～２．０ｖｖｍで通気を行う。

培養温度は、通常２０～３７℃、好ましくは２７～３２℃で、通常１２時間から４８時間行う。

次に、異性化反応に供する菌体は、培養液そのままを用いてもよいし、遠心分離等により集菌したものであってもよい。培養して得られた菌体をそのまま、あるいは培養して得られた菌体を公知の手法で処理したもの、即ち、アセトン処理、凍結乾燥処理、界面活性剤処理あるいはトルエン処理など菌体を物理的または酵素的に破砕したもの等の菌体処理物を用いることができる。また、これらの菌体または菌体処理物から、Ｌ－リブロースに作用し、Ｌ－リボースを生産する能力を有する酵素画分を粗精製物あるいは精製物として取り出して用いることも可能である。さらには、このようにして得られた菌体、菌体処理物、酵素画分等をポリアクリルアミドゲル、カラギーナンゲル等の担体に固定化したもの等を用いる

ことも可能である。そこで本発明において、「微生物」の用語は、上述の菌体、菌体処理物、酵素画分、およびそれらの固定化物全てを含有する概念として用いられる。特に好ましい実施形態としては菌体をトルエン処理することが挙げられる。Ｌ－リブロース液に菌体とトルエンを加えてもよい。好ましくは、培養終了液から菌体を濃縮分離しトルエン処理を行った後、異性化反応に供する。

異性化反応は、ｐＨ４～９．５、好ましくはｐＨ８．５～９．０に調整したＬ－リブロース水溶液に上記菌体あるいは菌体処理物をリブロース１ｇ当たり、２ユニット以上、好ましくは6ユニット以上になるように添加し、温度１０℃～５０℃、好ましくは、２０℃～４０℃で行う。反応が進行するにつれ、反応液のｐＨが低下するため、水酸化ナトリウム等のアルカリ溶液にてｐＨを９．０付近に制御することが好ましい。用いた菌体の量により、反応は数秒から数日でＬ－リボースとＬ－リブロースが平衡に達して終了する。

以上３工程により生成したＬ－リボースを精製する。本発明者らは鋭意検討の結果、通常の種々の精製技術をある順序、条件に従って組み合わせることにより、反応液からＬ－リボースを分離精製するに至った。本発明の製造方法において、Ｌ－リボースはグルコース等の糖質原料を出発原料として、例えば３段階の生物反応により得られるが、この様に多段階の生物反応を行った場合、得られたＬ－リボース含有液は、未反応のＬ－リブロース以外にも微生物由来のタンパク質等の高分子物質、塩類、副反応で生成したと思われる有機酸類や、ジヒドロキシアセトン、その他少量の糖類、着色成分等の夾雑物を含む。これらの夾雑物は精製の早い時期に出来るだけ取り除いておくことが、その後の精製にとって望ましい。

反応終了後、まず微生物菌体を遠心分離等の既存の方法で除去する。除菌に先立ち、培養終了液に熱を加え、酵素失活および澱下げを行ってもよい。さらに除菌前または除菌後に炭酸飽充を行うことはその後の精製に大変有効である。除菌された液はＬ－リボース以外に未だ上述の夾雑物が多く含まれる。これらは通常の方法、即ちクロマトグラフィーや晶析技術を用いることで除去できる。夾雑物が多い場合は特に晶析に先立ってゲル型濾過材に接触させ、夾雑物の多くを除去することが好ましい。本発明で用いるゲル型濾過材としては、Ｌ－リボースと他

の成分とを効率よく分離することが出来るものであれば特に限定されないが、好ましくはカチオン系イオン交換体が挙げられ、更に好ましくは架橋度４～８％のアルカリ金属またはアルカリ土類金属型のカチオン系イオン交換体が挙げられる。かかるイオン交換体の具体例としては、ＵＢＫ－５３０、ＵＢＫ－５３５、ＵＢＫ－５５０、ＵＢＫ－５５５（いずれも三菱化学製）等が挙げられる。これらを用いてクロマト分離を行うことが好ましい。

具体的な精製手段としては、例えば上述したゲル型濾過材を脱塩水にてスラリー化し、十分に気泡を除去した後分離カラムに充填する。該カラムに、充填した濾過材容量の１／２～１／１００、好ましくは１／５～１／２０量の粗Ｌ－リボース含有液を送入し、次いで水で溶出させてＬ－リボース画分とその他の画分とに分画する。このＬ－リボース画分を、通常知られた方法により脱塩脱色後、晶析を行うことにより高純度のＬ－リボースを得ることができる。

また工業的には分離効率を上げ、溶離水の使用量を減らす目的で、公知の種々のクロマト分離手法や疑似移動床法を用いることにより、さらに効果的な分画を行うこともできる。

分離精製の工程においては、必要に応じて脱塩、脱色など、通常の糖の精製における操作を加えることもできる。

最終的に精製されたＬ－リボース液には未反応のＬ－リブロースが残存するが、この混合液よりＬ－リボース結晶を得るには、Ｌ－リボース含有液に有機溶媒を添加し、反応液中に残存する未反応のＬ－リブロースを析出させずにＬ－リボースを単独で析出させる方法が好ましい。Ｌ－リボース含有液は十分に濃縮され、好ましくはブリックス６０以上、さらに好ましくはブリックス８５以上、さらに好ましくはブリックス９０以上に濃縮される。この濃縮シロップを４℃に放置するとＬ－リボースのみが析出する。しかしこのような低温晶析では析出するまでの時間が長く、また析出率も満足のいくものではない場合が多く、好ましくは有機溶媒添加による方法が挙げられる。つまり、上述の十分に濃縮されたＬ－リボース含有シロップに、シロップの１／２～１０倍量好ましくは１～３倍量の有機溶媒を加え、十分に撹拌後、微量のＬ－リボース結晶を加え、４℃で２４時間放置する。添加する有機溶媒としては、メタノール、エタノール等の低級アルコー

ル類、アセトン、ヘキサン、アセトニトリル、トルエンなどが挙げられ、好ましくはエタノール、１－プロパノール、２－プロパノール、更に好ましくはエタノールが挙げられる。晶析に先立って再度クロマト分離を行い、Ｌ－リボース含有液中からＬ－リブロースを除いておけば、さらに晶析率は上昇する。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、その要旨を越えない限り本発明の技術分野における通常の変更をすることができる。

実施例１

１）リビトール発酵上清の製造

３０Ｌ容量のジャーにグルコース３０％、魚肉エキス２％からなる培地１８Ｌを入れ、トリコスポロノイデス　メガチリエンシス（ＭＣＩ３４４２）の種培養１８０ｍＬを接種した。種培養液は、予めバッフル付きフラスコを用いてグルコース３０％、酵母エキス１％からなる培地中で３０℃、２日間、１６０ｒｐｍの振とう培養により得られた。ジャーは３３０ｒｐｍ、１ｖｖｍ、３０℃の条件で制御され、５日間培養を行った。得られた培養液から遠心分離により清澄な培養上清１２Ｌを得た。この発酵を５回行い、リビトール発酵上清６０Ｌを得た。各成分の濃度はリビトール８０ｇ／Ｌ、エリスリトール４ｇ／Ｌ、グリセロール４０ｇ／Ｌであった。

２）粗Ｌ－リブロース液の製造

グルコノバクター・フラテウリ（Gluconobacter frateurii)(IFO2508）を１％グリセロール、０．５％酵母エキス、０．５％ポリペプトンよりなる培地１００ｍｌを入れた５００ｍｌバッフル付きフラスコ２本に接種した。１６０ｒｐｍで回転する振とう培養機にセットし、３０℃で１日間培養を行った。３０Ｌジャーファーメンターに３％グリセロール、０．５％酵母エキス、０．５％ポリペプトンよりなる培地を２０ｌ仕込み、１２０度２０分殺菌した。これに先の培養液を２００ｍｌ植菌し、３０度で、ｐＨを５以下にならないように５Ｎ水酸化ナトリ

ウムでコントロールしながら１日培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して、培養上清除き、グルコノバクター・フラテウリの菌体を得た。

上記１）で製造したリビトール発酵上清液を１５Ｌ仕込んだ３０Ｌジャーファーメンターに入れ、得られたグルコノバクターの菌体を入れ、３０℃、通気１ｖｖｍ、撹拌３３０ｒｐｍの条件で反応した。反応１日後、反応液１ｍｌを遠心分離にかけて菌体を除き、反応上清を下記表１に示す条件で高速液体クロマトグラフィー分析した。リビトールは完全に変換され、エリスリトール及びグリセロールは検出されなかった。生成したＬ－リブロースは７８．２ｇ／Ｌであった。グリセロールはジヒドロキシアセトンに変換されており、生成量は２３．３ｇ／Ｌであった。エリスリトールはエリスルロースに変換されていたが、生成量の測定はスタンダードの試薬が、純度不明瞭のため、正確な測定ができなかった。

表１

高速液体クロマトグラフィー分析条件

カ　ラ　ム：	ＭＣＩ　ＧＥＬ　ＣＫ０８Ｅ ８ｍｍＩ.Ｄ.×３００ｍｍ　（三菱化学株式会社製）
溶　離　液：	蒸留水
流　　速：	１．０ｍｌ／分
カラム温度：	６０℃
検　出　器：	ＲＩ

３）粗Ｌ－リボース液の製造

上記２）で得られたＬ－リブロース含有発酵液に、異性化反応に供する菌体のトルエン処理物が加えられた。即ち、２）で得られたＬ－リブロース液は、除菌その他の処理を施すことなく、同一ジャー内で連続して異性化反応が行われた。具体的には２）の反応終了時点でＬ－リブロース含有発酵液を水酸化ナトリウム水溶液によりｐＨ９．０に調整し、続いて下記４）で得られたトルエン処理菌体１Ｌを加えて、異性化反応を開始した。ジャーは反応温度２８℃、１１２ｒｐｍに制御され、ｐＨは１０Ｎ水酸化ナトリウム水溶液にて８～８．５の間で緩やかに制御された。２４時間後Ｌ－リボースと Ｌ－リブロースの混合比が約７：３に

達し、反応は終了した。

遠心分離により反応終了液から菌体を除き清澄な粗Ｌ－リボース液１５．１Ｌを得た。含有するＬ－リボースは３９．１ｇ／Ｌ、Ｌ－リブロースは１６．０ｇ／Ｌ、ジヒドロキシアセトンは７ｇ／Ｌであった。

４）異性化反応用トルエン処理菌体の製造

アシネトバクター・カルコアセティカス（Acinetobacter calcoaceticus）ＤＬ－２８株の種培養液をスクロース　２．０ｇ／Ｌ、酵母エキス　５．０ｇ／Ｌ、大豆ペプチド　５．０ｇ／Ｌ、ＮａＣｌ　５ｇ／Ｌ、K_2HPO_4 ３ｇ／Ｌ、KH_2PO_4 １ｇ／Ｌ、リジン一塩酸塩５ｇ／Ｌ（ｐＨ７．０）よりなる培地２０Ｌを入れた３０Ｌジャーに１％接種した。種培養は予め同一培地を用いてバッフル付きフラスコで１６０ｒｐｍ、３０℃で１２時間振とう培養して得られた。ジャーは３００ｒｐｍ、１ｖｖｍ、３０℃の条件で制御され、１６時間培養を行った。得られた培養終了液を遠心分離して上清を除き、１０倍濃縮菌体液を１．７Ｌを得た。この濃縮菌体１．７Ｌにトルエンを２７ｍＬ加え、１５分間激しく混合した。

アシネトバクター・カルコアセティカスＤＬ－２８株に代えて、セルロモナス・ゲリダＪＣＭ１４９０、セルロモナス・ビアゾテアＡＴＣＣ４８６、セルロモナス　フラビゲナＡＴＣＣ４８２等も同様に用いることができる。

５）粗Ｌ－リボース液の精製

３）で得られた粗リボース液をエバポレーターにてブリックス４０まで濃縮した後、カラムクロマトグラフィーの原料に供した。

特開昭６３－１５８１０５号公報に記載された疑似移動床型のクロマト分離系（充填された充填床の前端と後端とが流体通路で連結され、流体の循環を可能にしたもの）において、充填材としてＮａ型の強カチオン交換樹脂（ダイヤイオンＵＢＫ－５３０，三菱化学社製）を使用し、脱着剤として水を使用した。内径２８ｍｍ、充填層高５００ｍｍの直列に連結した４本のカラムに前記充填材を合計で１２４０ｍＬ充填した充填床を６５℃に保ち、床内を容積流速６００ｍＬ／ｈｒで通液し、供給はすべて第１カラム、抜き出しはすべて第４カラムとし、下記

表２に示すタイムスケジュールで定常となるまで分離操作を行った。定常状態に達した後の各画分の組成を、下記表３に示す。Ｌ－リボースの回収率は８１．８％であった。また、原料に含まれていた着色成分も多くはＬ－リボース以外のその他の画分に分離されており、Ｌ－リボース画分の着色はクロマト分離前に比べて大幅に軽減されていた。

表２

供給・抜出工程　　１０．８分
　　原料流量　　：　１００ｍｌ／ｈ
　　製品画分流量：　１２０ｍｌ／ｈ
　　溶離水流量　：　６００ｍｌ／ｈ
　　副製品流量　：　５８０ｍｌ／ｈ
循環工程　　１３．０分
　　循環流量　　：　６００ｍｌ／ｈ

表３

	原料	Ｌ－リボース画分	その他
塩類・高分子	４０．０	１．２	６７．１
Ｌ－リブロース	１７．７	１３．８	１９．８
Ｌ－リボース	４２．３	８５．０	１３．１

得られたＬ－リボース含有画分を分子量分画１００００の中空糸型限外濾過膜にて濾過した後、カチオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、続いてアニオン交換樹脂を充填したカラムに通液した。以上の脱塩脱色工程を経たＬ－リボース含有液は無色透明であるが、場合により若干の着色成分の残ることがあった。その場合は少量の活性炭を加え６０℃で１時間撹拌後、ケイソウ土濾過により活性炭を除くことで残る着色成分を除いた。このようにして得られた無色透明のＬ－リボース含有液をエバポレーターにてブリックス８７まで濃縮後、シロップの２

倍容量のエタノールを添加し、微量のＬ－リボース結晶を種晶として加え、４℃で２４時間静置したところ、Ｌ－リボース結晶が析出した。この結晶を冷エタノールで数回洗浄した後乾固し、純度９９．９％の結晶を得た。晶析率は７０％であった。

尚、晶析後の母液からエタノールを留去し、再度濃縮してエタノールおよび種晶を加え、低温で放置することで２番晶、３番晶を得ることができた。

実施例２

１）リビトール発酵上清の製造

実施例１の１）と同様に培養を行い、培養上清１２Ｌを得た。培養上清中の成分の濃度はリビトール８０ｇ／Ｌ、エリスリトール５ｇ／Ｌ、グリセロール５０ｇ／Ｌであった。

２）粗Ｌ－リブロース液の製造

グルコノバクター・フラテウリ（ＩＦＯ２５０８）を実施例１と同様に培養して、培養液１８Ｌを得た。培養終了後、培養液を遠心分離して培養上清を除き、菌体を１００ｍＭのリン酸緩衝液バッファー（ｐＨ７．０）１．８Ｌに懸濁した。

３０Ｌジャーに、１）で得られたリビトール発酵上清１２Ｌを入れ、グルコノバクター懸濁液を１．８Ｌを加えて、３０℃にて３００ｒｐｍで撹拌し、通気１ｖｖｍで１日間反応を行った。反応終了液を遠心分離して菌体を除き清澄な粗Ｌ－リブロース液１２．５Ｌを得た。生成したＬ－リブロース濃度は７５ｇ／Ｌ、ジヒドロキシアセトン２９ｇ／Ｌであった。

３）粗Ｌ－リボース液の製造

セルロモナス・ゲリダ（ＪＣＭ１４９０）をスクロース　２．０ｇ／Ｌ、酵母エキス　５．０ｇ／Ｌ、大豆ペプチド　５．０ｇ／Ｌ、ＮａＣｌ　５ｇ／Ｌ、K_2HPO_4 ３ｇ／Ｌ、KH_2PO_4 １ｇ／Ｌ、Ｌ－リボース１５ｇ／Ｌ（ｐＨ７．０）よりなる培地１８Ｌを入れた３０Ｌジャーに１％接種した。種培養は予め同一培地を用いてバッフル付きフラスコで１６０ｒｐｍ、３０℃で１８時間振とう

培養して得られた。ジャーは３００ｒｐｍ、１ｖｖｍ、３０℃の条件で制御され、１８時間培養を行った。得られた培養終了液を遠心分離し、集菌した。菌体ペレットにグリシン－塩酸緩衝液（５０ｍＭ、ｐＨ８．５）１．８Ｌを加え均一に懸濁した後、トルエンを６０ｍＬ加え、１５分間激しく混合した。このように調製したトルエン処理菌体１．２Ｌを、２）で得られた粗Ｌ－リブロース液１２．５Ｌに加え、均一になるよう緩やかに撹拌しつつ３０℃で２４時間反応を行った。途中、１Ｎ　ＮａＯＨによってｐＨ８．５に制御した。得られた反応終了液を遠心分離して菌体を除き、さらに０．２２μｍ孔径の精密濾過膜を通して清澄な粗Ｌ－リボース液１２Ｌを得た。Ｌ－リボース濃度は３０ｇ／Ｌ、Ｌ－リブロース濃度は１３ｇ／Ｌであった。

４）粗Ｌ－リボース液の精製

３）で得られた粗リボース液をエバポレーターにて濃縮し、２．７Ｌの粗リボースシロップを得た。このシロップの濃度はブリックス６３、Ｌ－リボースの対固形分比率はＨＰＬＣのピーク面積換算で約３８％、Ｌ－リブロースの比率は１５％であった。このシロップをカラムクロマトグラフィーの原料に供した。即ちイオン交換樹脂ＵＢＫ－５５０（三菱化学社製）３２０ｍＬを充填したカラム４本を直列に接続し、カラム温度を６５℃に保った状態でその一方の端から流速６００ｍＬ／ｈｒで粗リボースシロップ６４ｍＬを供給した。次いで水を流速６００ｍＬ／ｈｒで送入し、シロップをカラム内で展開、分離させながらカラム末端に移動させた。水を送入して７８分後から目的とするＬ－リボースが流出し始めた。さらに１２分してから流出液をＬ－リボース含有画分として採取を開始した。水の送入開始から１２４分後Ｌ－リボースの流出がほぼ終わったので、サンプル回収を停止した。このＬ－リボース含有画分中のＬ－リボースの対固形分比率はＨＰＬＣのピーク面積換算で８０％、Ｌ－リブロースの比率は１４％であり、Ｌ－リボースの回収率は８０．１％であった。このＬ－リボース画分をさらに実施例１記載と同様の脱塩脱色処理をした後、ブリックス９０まで濃縮し４℃で１ヶ月静置したところ、Ｌ－リボース結晶が析出した。この結晶を冷アルコール等で洗浄し、乾固したところ純度９９％のＬ－リボース結晶が得られた。

実施例３

実施例１の疑似移動床法にて得られたＬ－リボース含有画分をさらにカラムクロマトグラフィーにより精製した。

実施例１と同様のクロマト分離系を用い、充填材としてＣａ型の強カチオン交換樹脂（ダイヤイオンＵＢＫ－５５５，三菱化学社製）を使用した。下記表４に示すタイムスケジュールで定常となるまで分離操作を行った。定常状態に達した後の各画分の組成を、下記表５に示す。Ｌ－リボースの回収率は７２．４％であった。

表４

供給・抜出工程		９．６分
	原料流量	：　７５ｍｌ／ｈ
	製品画分流量	：　２４４ｍｌ／ｈ
	溶離水流量	：　６００ｍｌ／ｈ
	副製品流量	：　４３１ｍｌ／ｈ
循環工程		２３．０分
	循環流量	：　６００ｍｌ／ｈ

表５

	原料	Ｌ－リボース画分	その他
塩類・高分子	１．２	０．０	３．２
Ｌ－リブロース	１３．８	２．０	３３．５
Ｌ－リボース	８５．０	９８．０	６３．２

得られたＬ－リボース画分を実施例１と同様に脱塩脱色処理した後、ブリックス８７まで濃縮し、２－プロパノールを２倍量と微量のＬ－リボース結晶を加え、４℃で１２時間撹拌したところ純度９９．５％のＬ－リボース結晶が得られた。

なお、各実施例において得られた培養上清に含まれるリビトールなどの糖類含量は高速液体クロマトグラフィーにより各々下記表６に示す条件で測定した。各糖質の保持時間は下記分析条件Ａにおいて、グルコース１０．５７分、リビトール１２．２２分、エリスリトール１３．３６分、グリセロール１５．０９分である。また、下記分析条件Ｂにおいて、Ｌ－リブロース２２．８分、Ｌ－リボース２４．０分である。

表６

・高速液体クロマトグラフィー分析条件Ａ
カ　ラ　ム：　ＭＣＩ　ＧＥＬ　ＣＫ０８ＥＨ
８ｍｍＩ.Ｄ.×３００ｍｍ　（三菱化学株式会社製）
溶　離　液：　１Ｎ　リン酸水溶液
流　　速：　０．６ｍｌ／分
カラム温度：　５０℃
検　出　器：　ＲＩ

・高速液体クロマトグラフィー分析条件Ｂ
カ　ラ　ム：　ＭＣＩ　ＧＥＬ　ＣＫ０８ＥＣ
８ｍｍＩ.Ｄ.×３００ｍｍ　（三菱化学株式会社製）
溶　離　液：　水
流　　速：　０．６ｍｌ／分
カラム温度：　７５℃
検　出　器：　ＲＩ

産業上の利用可能性

本発明によれば、数段階の生物学的反応により、安価なグルコース等の糖質原料を出発原料としてＬ－リボースを効率よく生産することができる。

請求の範囲

1．　糖質原料からリビトールを生産する能力を有する微生物を用いて糖質原料からリビトールを生成する工程と、リビトールからＬ－リブロースを生産する能力を有する微生物を用いてリビトールからＬ－リブロースを生成する工程と、Ｌ－リブロースからＬ－リボースを生産する能力を有する微生物を用いてＬ－リブロースからＬ－リボースを生成する工程を含むＬ－リボースの製造方法。

2．　前記糖質原料がグルコースである請求項１記載の方法。

3．　グルコースからリビトールを生産する能力を有する微生物がトリコスポロノイデス属に属することを特徴とする請求項１記載の方法。

4．　微生物がトリコスポロノイデス・マディダ、トリコスポロノイデス・ニグレスセンス、トリコスポロノイデス・エドセファリス、トリコスポロノイデス・メガチリエンシスおよびトリコスポロノイデス・スパチュラータから選ばれるとを特徴とする請求項３記載の方法。

5．　微生物がトリコスポロノイデス・エドセファリスおよびトリコスポロノイデス・メガチリエンシスから選ばれることを特徴とする請求項３に記載の方法。

6．　トリコスポロノイデス属に属する微生物が、トリコスポロノイデス・マディダ ＣＢＳ２４０．７９、トリコスポロノイデス・ニグレスセンス ＣＢＳ２６８．８１及びＣＢＳ２６９．８１、トリコスポロノイデス・エドセファリス ＣＢＳ５６８．８５およびＣＢＳ６４９．６６、トリコスポロノイデス・メガチリエンシス ＣＢＳ５６７．８５、トリコスポロノイデス・スパチュラータ ＣＢＳ２４１．７９、ＣＢＳ２４２．７９Ａ及びＣＢＳ２４２．７９Ｂから選ばれることを特徴とする請求項４に記載の方法。

7．　トリコスポロノイデス属に属する微生物がトリコスポロノイデス・エドセファリス ＣＢＳ５６８．８５およびトリコスポロノイデス・メガチリエンシス ＣＢＳ５６７．８５から選ばれることを特徴とする請求項５に記載の方法。

8．　リビトールからＬ－リブロースを生産する能力を有する微生物が、リビトール以外の副生産されたポリアルコールを資化する能力を有する微生物であることを特徴とする請求項１又は３記載の方法。

９．　リビトールからＬ－リブロースを生産する能力を有する微生物が、アセトバクター属、アルカリゲネス属、アシネトバクター属、アグロバクテリウム属、アルスロバクター属、アエロモナス属、オーレオバクテリウム属、バチルス属、ブレビバクテリウム属、クレブシエラ属、オクロバクトラム属、リゾビウム属、セラチア属、ロドバクター属、コリネバクテリウム属、エンテロバクター属、グルコノバクター属、ミクロコッカス属、パラコッカス属およびシュードモナス属に属する微生物から選ばれることを特徴とする請求項１又は３記載の方法。

１０．　微生物がグルコノバクター属に属することを特徴とする請求項８に記載の方法。

１１．　微生物がグルコノバクター・フラテウリおよびグルコノバクター・オキシダンスに属する微生物から選ばれることを特徴とする請求項１０記載の方法。

１２．　微生物がグルコノバクター・フラテウリ　ＩＦＯ２５０８およびグルコノバクター・オキシダンスＩＦＯ３２９３から選ばれることを特徴とする請求項１１記載の方法。

１３．　リビトールが、リビトール以外の物質を含有する未精製の発酵液または該発酵液を部分精製したものであることを特徴とする請求項１又８記載の方法。

１４．　Ｌ－リブロースからＬ－リボースを生産する能力を有する微生物が、セルロモナス属およびアシネトバクター属に属する微生物から選ばれることを特徴とする請求項１、３、８又は９のいずれか一項に記載の方法。

１５．　微生物が、セルロモナス・ゲリダ、セルロモナス・ビアゾテアおよびセルロモナス・フラビゲナから選ばれることを特徴とする請求項１４記載の方法。

１６．　微生物がセルロモナス・ゲリダ　ＪＣＭ１４９０、セルロモナス・ビアゾテア　ＡＴＣＣ４８６およびセルロモナス　フラビゲナ　ＡＴＣＣ４８２から選ばれることを特徴とする請求項１５記載の方法。

１７．　Ｌ－リブロースが、Ｌ－リブロース以外の物質を含有する未精製の発酵液または該発酵液を部分精製したものであることを特徴とする請求項１４に記載の方法。

１８．　生成したＬ－リボースを含む反応液をゲル型濾過材に接触させることを特徴とする請求項１記載の方法。

１９．　ゲル型濾過材との接触によりＬ－リボースをクロマト分離することを特徴とする請求項１８記載の方法。

２０．　ゲル型濾過材がカチオン系のイオン交換体であることを特徴とする請求項１９記載の方法。

２１．　生成したＬ－リボースを含む反応液に有機溶媒を添加し、反応液中に残存する未反応のＬ－リブロースを析出させずにＬ－リボースを単独で析出させることを特徴とする請求項１記載の方法。

２２．　有機溶媒が、低級アルコール類、アセトン、ヘキサン、アセトニトリルまたはトルエンであることを特徴とする請求項２１記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/02793

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[6] C12P19/02 // (C12P19/02, C12R1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[6] C12P19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY/CA (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP, 45-2071, B1 (Noda Institute for Scientific Research), 23 January, 1970 (23. 01. 70) (Family: none)	1, 9, 14, 18-22 2-8, 10-13, 15-17
Y A	JP, 49-12718, B1 (Godo Shusei Co., Ltd.), 26 March, 1974 (26. 03. 74) & US, 3669845, A	1, 9, 14, 18-22 2-8, 10-13, 15-17
Y A	CS, 197528, B 30 May, 1980 (30. 05. 80) (Family: none)	1, 9, 14, 18-22 2-8, 10-13, 15-17
Y A	EP, 807682, A2 (K.K.Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo), 19 November, 1997 (19. 11. 97) & JP, 10-155480, A & US, 5846804, A	1, 9, 14, 18-22 2-8, 10-13, 15-17

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 August, 1999 (25. 08. 99)	7 September, 1999 (07. 09. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/02793

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	J. Ferment. Bioeng. 81 [6] (1996) Shimonishi T. et al., "A new enzyme, L-ribose isomerase from acinetobacter sp. strain DL-28" p.493-497	1, 9, 14, 18-22 2-8, 10-13, 15-17
E, Y E, A	WO, 99/33953, A1 (Nikken Chemicals Co., Ltd.), 8 July, 1999 (08. 07. 99) (Family: none)	1-3, 9, 14, 18-22 4-8, 10-13, 15-17
P, Y P, A	WO, 98/23766, A1 (Mitsubishi Chemical Corp.), 11 August, 1998 (11. 08. 98) & JP, 10-210994, A & JP, 11-4699	1-9, 14, 18-22 10-13, 15-17
P, Y P, A	JP, 11-137285, A (Towa Chemical Industry Co., Ltd.), 25 May, 1999 (25. 05. 99) (Family: none)	1-5, 9, 14 18-22 6-8, 10-13, 15-17
P, Y P, A	JP, 11-18792, A (Mitsubishi Chemical Corp.), 26 January, 1999 (26. 01. 99) (Family: none)	1, 8-14, 18-22 2-7, 15-17
P, Y P, A	J. Ferment. Bioeng. 86 [5] (1998 Nov) Bhuiyan H.S. et al., "A new method for the production of L-lyxose from ribitol using microbial and enzymatic reactions" p.513-516	1, 9, 14, 18-22 2-8, 10-13, 15-17

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９９／０２７９３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[6] C12P19/02 //(C12P19/02,C12R1:01)

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[6] C12P19/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

REGISTRY/CA(STN)
WPI/BIOSIS(DIALOG)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y A	JP,45-2071,B1（財団法人野田産業科学研究所）23.1月.1970（23.01.70）（ファミリーなし）	1,9,14,18-22 2-8,10-13,15-17
Y A	JP,49-12718,B1（合同酒精株式会社）26.3月.1974（26.03.74）& US,3669845,A	1,9,14,18-22 2-8,10-13,15-17
Y A	CS,197528,B 30.5月.1980(30.05.80)（ファミリーなし）	1,9,14,18-22 2-8,10-13,15-17
Y A	EP,807682,A2（株式会社林原生物化学研究所）19.11月.1997(19.11.97) & JP,10-155480,A & US,5846804,A	1,9,14,18-22 2-8,10-13,15-17

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２５．０８．９９	07.09.99

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	９５４８
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	深草　亜子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP99／02793

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y A	J. Ferment. Bioeng. 81 [6] (1996) Shimonishi T. et al. "A new enzyme, L-ribose isomerase from acinetobacter sp. strain DL-28" p. 493-497	1, 9, 14, 18-22 2-8, 10-13, 15-17
E, Y E, A	WO, 99/33953, A1 (日研化学株式会社) 8.7月.1999 (08.07.99) (ファミリーなし)	1-3, 9, 14, 18-22 4-8, 10-13, 15-17
P, Y P, A	WO, 98/23766, A1 (三菱化学株式会社) 11.8月.1998 (11.08.98) & JP, 10-210994, A & JP, 11-4699	1-9, 14, 18-22 10-13, 15-17
P, Y P, A	JP, 11-137285, A (東和化成工業株式会社) 25.5月.1999 (25.05.99) (ファミリーなし)	1-5, 9, 14, 18-22 6-8, 10-13, 15-17
P, Y P, A	JP, 11-18792, A (三菱化学株式会社) 26.1月.1999 (26.01.99) (ファミリーなし)	1, 8-14, 18-22 2-7, 15-17
P, Y P, A	J. Ferment. Bioeng. 86 [5] (1998 Nov) Bhuiyan H. S. et al. "A new method for the production of L-lyxose from ribitol using microbial and enzymatic reactions" p. 513-516	1, 9, 14, 18-22 2-8, 10-13, 15-17