(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5896310号
(P5896310)
(45)発行日　平成28年3月30日(2016.3.30)　(24)登録日　平成28年3月11日(2016.3.11)

(51)Int.Cl.　F I
C12P 19/30 (2006.01)　C12P 19/30

請求項の数 6　(全 12 頁)

(21)出願番号	特願2013-553916 (P2013-553916)
(86)(22)出願日	平成24年2月15日 (2012.2.15)
(65)公表番号	特表2014-505484 (P2014-505484A)
(43)公表日	平成26年3月6日 (2014.3.6)
(86)国際出願番号	PCT/EP2012/052545
(87)国際公開番号	WO2012/110533
(87)国際公開日	平成24年8月23日 (2012.8.23)
審査請求日	平成26年12月12日 (2014.12.12)
(31)優先権主張番号	11154867.3
(32)優先日	平成23年2月17日 (2011.2.17)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号	61/443,900
(32)優先日	平成23年2月17日 (2011.2.17)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(73)特許権者　503220392
ディーエスエム　アイピー　アセッツ　ビー．ブイ．
オランダ国，　６４１１　ティーイー　ヘーレン，　ヘット　オーバールーン　１
(74)代理人　100107456
弁理士　池田　成人
(74)代理人　100148596
弁理士　山口　和弘
(74)代理人　100123995
弁理士　野田　雅一
(74)代理人　100128381
弁理士　清水　義憲

最終頁に続く

(54)【発明の名称】５’－リボヌクレオチド含有組成物の製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）ＲＮＡの実質的な部分が５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を維持する条件下で、微生物を自己融解させる工程、
ｂ）前記自己融解物を固／液分離してＲＮＡ含有細胞壁フラクションを回収する工程、および
ｃ）前記回収したＲＮＡ含有細胞壁フラクション中のＲＮＡを５’－リボヌクレオチドに変換する工程
を含む５’－リボヌクレオチド含有組成物の製造方法であって、
工程ｂ）における前記固／液分離を３．５以下１．０超のｐＨで行う方法。
【請求項２】
前記ｐＨが２．０超である請求項１に記載の方法。
【請求項３】
工程ｂ）における回収が遠心分離によって行われる請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
工程ａ）において、ＲＮＡの少なくとも５０％が５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を維持する請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
工程ｂ）において、ＲＮＡの少なくとも５５％が前記細胞壁フラクションとの関連を維持する請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６】
工程ｃ）の後に、
ｄ）前記５’－リボヌクレオチドを固－液分別して、前記５’－リボヌクレオチドを回収する工程
を含む請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
［発明の技術分野］
本発明は、５’－リボヌクレオチド含有組成物の製造方法に関する。
【０００２】
［発明の背景技術］
５’－リボヌクレオチド含有組成物はその風味増強特性で知られている。それらはある特定の種類の食品で、風味とおいしさを増強することができる。この現象は「食感」または旨味と称される。
【０００３】
５’－リボヌクレオチドは、通常、酵母などの微生物由来のＲＮＡから得られる。国際公開第２００５／０６７７３４号パンフレットは、５’－リボヌクレオチド含有組成物の製造方法を開示しているが、その方法は、ＲＮＡの実質的な部分が５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を維持する条件下で微生物を自己融解させ、次いで、その自己融解物を固／液分離してＲＮＡ含有細胞壁フラクションを回収し、最後に、その回収したＲＮＡ含有細胞壁フラクション中のＲＮＡを５’－リボヌクレオチドに変換することを含む。
【０００４】
酵母の自己消化エキスなどの自己融解抽出物は、細胞の破壊および高分子物質（タンパク質、炭水化物、脂質、核酸）の消化（溶解）後に微生物（例えば、酵母）から得られる可溶性物質の濃縮物である。細胞破壊後に媒体中に放出される活性微生物（例えば、酵母）の酵素は溶解に寄与する。これらの種類の抽出物はアミノ酸に富んでおり、固有のＲＮＡは、自己融解過程で５’－リボヌクレオチドに分解できない形態に分解または改質されるため、一般に５’－リボヌクレオチドを含まない。酵母の自己消化エキスは、特に、基本的な風味料として食品産業で使用されている。酵母エキス中に存在するアミノ酸は、食品にブイヨンタイプの肉汁風味を加える。
【０００５】
他方、微生物の加水分解抽出物は、細胞の破壊、消化（溶解）、そして溶解中の微生物懸濁物へのプロテアーゼおよび／またはペプチダーゼ、および特にヌクレアーゼの添加の後に得られる可溶性物質の濃縮物である。微生物固有の酵素は、溶解前に不活性化される。この過程で、グアニン（５’－グアニンモノホスフェート；５’－ＧＭＰ）、ウラシル（５’－ウラシルモノホスフェート；５’－ＵＭＰ）、シトシン（５’－シトシンモノホスフェート；５’－ＣＭＰ）およびアデニン（５’－アデニンモノホスフェート；５’－ＡＭＰ）の５’－リボヌクレオチドが生成する。アデニル酸デアミナーゼがこの混合物に加えられると、５’－ＡＭＰが５’－イノシンモノホスフェート（５’－ＩＭＰ）に変換される。
【０００６】
この方法で得られる加水分解酵母エキスは、５’－リボヌクレオチドに富み、特に５’－ＧＭＰおよび５’－ＩＭＰに富んでいる。酵母エキスはまた、グルタミン酸ナトリウム（ＭＳＧ）に富むことが多い。５’－ＩＭＰ、５’－ＧＭＰおよびＭＳＧは、それらの風味増強特性で知られている。それらはある特定の種類の食品で、風味とおいしさを増強することができる。この現象は「食感」または旨味と称される。５’－リボヌクレオチドに富み、かつ任意選択によりＭＳＧに富む酵母エキスは、通常、スープ、ソース、マリネードおよび調味料に加えられる。５’－リボヌクレオチドに富む酵母エキスは、ＲＮＡ高含有酵母株の使用、および／または細胞内容物の部分抽出により製造することが好ましい。

【０００７】
国際公開第２００５／０６７７３４号パンフレットに開示された方法の問題点は、組成物中の５’－リボヌクレオチドの量が少なすぎること、またアミノ酸および短ペプチド、ならびに他の酵母成分が存在するために、混じり気のない味が要求される用途にあまり適していないことである。
【０００８】
本発明の目的は、味に混じり気のない、５’－リボヌクレオチドに富む組成物を製造する方法であって、簡素で、かつ安定な、すなわち常に高濃度の５’－リボヌクレオチドが得られる方法を提供することである。さらに他の目的は、濁りの殆どない酵母エキスを製造する方法を提供することである。
【０００９】
［発明の詳細な説明］
第１の態様では、本発明は、ａ）ＲＮＡの実質的な部分が５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を維持する条件下で微生物を自己融解させる工程、ｂ）自己融解物を固／液分離してＲＮＡ含有細胞壁フラクションを回収する工程、およびｃ）回収したＲＮＡ含有細胞壁フラクション中のＲＮＡを５’－リボヌクレオチドに変換する工程を含む５’－リボヌクレオチド含有組成物の製造方法であって、工程ｂ）における固／液分離を５．１未満１．０超のｐＨで行う方法を提供する。
【００１０】
用語「５’－リボヌクレオチド」は、本明細書では、５’－ＧＭＰ、５’－ＣＭＰ、５’－ＵＭＰ、ならびにさらに５’－ＡＭＰおよび／または５’－ＩＭＰの混合物であって、前記５’－ＡＭＰが部分的に、または完全に５’－ＩＭＰに変換されていてもよい混合物を意味する。用語「５’－リボヌクレオチド」は、遊離５’－リボヌクレオチド、およびその塩を包含する。
【００１１】
本発明では、微生物の自己融解は、微生物細胞および微生物高分子物質の分解が、微生物細胞壁の（部分的な）損傷および／または破壊の後に媒体中に放出される微生物固有の活性な酵素によって、少なくとも部分的に行われるプロセスと定義される。
【００１２】
本発明の方法においては、天然のＲＮＡ源として任意の微生物を使用することができる。食品および飼料の用途に適したものなどの、細菌および真菌微生物が好ましい。好ましい微生物は、食品グレードのもの、およびヒトが摂取する食品に安全に使用できるものである。ＲＮＡ高含有細菌株または真菌株（すなわち、ＲＮＡ含有率が、通常、６～１５％）では、５’－リボヌクレオチドを高率で含む組成物の製造が可能である。しかしながら、本発明の方法の利点は、ＲＮＡ含有率が比較的低い細菌株または真菌株も使用できることである。これらの菌株を、出発株のＲＮＡ含有率から予想される値より高い５’－リボヌクレオチド含有率を含む組成物の調製に有利に使用することができる。
【００１３】
好ましい微生物の例としては、トリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）またはアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）などの糸状菌、ならびにサッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、クルイベロミセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）およびカンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）などの酵母が挙げられる。サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属に属する菌株、特にサッカロミセス・セレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）種に属する菌種が最も好ましい。
【００１４】
適切な細菌微生物の例として、乳酸菌、例えばラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）がある。
【００１５】
本発明の方法で使用する微生物は、この技術分野で知られる任意の適切な醗酵方法で調製し得る。微生物バイオマスは、本方法で使用する前に、例えば遠心分離または濾過によ

り濃縮し得る。例えば、クリームイースト（乾燥物質含有率１５～２７重量％まで濃縮されたパン酵母）を使用し得る。任意選択により、醸造用酵母または醸造業者から得られる酵母残渣（使用済み醸造用酵母）を含む醗酵液を使用し得る。

【００１６】

本発明は、５’－リボヌクレオチドを含む組成物の、特に大規模生産に適した方法を提供する。大規模とは、１０ｍ^{3}を超える醗酵槽で醗酵が行われることを意味する。

【００１７】

自己融解プロセスは、微生物細胞壁に損傷および／または部分的破壊を加えることにより開始される。こうして、細胞は部分的に開裂し、少なくともいくらかの細胞内容物が放出される。微生物細胞壁に損傷および／または部分的破壊を加えるには、当業者に知られた方法により、化学的に、機械的に、または酵素により細胞を処理する。

【００１８】

機械的処理法としては、均質化手法が挙げられる。この目的では、高圧ホモジナイザーを使用することができる。他の均質化手法としては、粒子、例えば砂および／もしくはガラスビーズとの混合、または粉砕装置（例えば、ビーズミル）の使用を挙げることができる。

【００１９】

化学的処理としては、塩、アルカリ、および／または１種以上の界面活性剤もしくは洗浄剤の使用が挙げられる。化学的処理は、特にアルカリを使用する場合に、ＲＮＡが部分的に分解して、２’－リボヌクレオチドおよび３’－リボヌクレオチドが生成され得るため、あまり好ましくない。

【００２０】

驚いたことに、本発明者らは、本発明の方法により製造される組成物においては、５’－リボヌクレオチドの量が多くなり得る、例えば、工程ｂ）のｐＨが５．１以上のときよりも多くなり得ることを見出した。それは非常に望ましいことである。対照的に、国際公開第２００５／０６７７３４号パンフレットに記載の方法では、固／液分離工程におけるｐＨは常に５．１である。国際公開第２００５／０６７７３４号パンフレットは、固－液分離および／またはＲＮＡ含有細胞壁の回収によって、５’－リボヌクレオチドの量的増加がもたらされ得ることを示唆していない。

【００２１】

一実施形態では、工程ｂ）における固／液分離中のｐＨは、５．１未満、好ましくは４．５以下、より好ましくは４．２以下、より一層好ましくは４．０以下、最も好ましくは３．５以下で、かつ１．０超の値である。好ましいｐＨの範囲は１．０～５．０、１．０～４．５、１．０～４．２、または１．０～３．５であり、また２．０～５．１、２．０～４．５または２．０～４．２である。最も好ましくは、ｐＨ範囲２．０～３．５である。

【００２２】

工程ｂ）における固－液分離は、一般的な固－液分離法、好ましくは遠心分離または濾過により行うことが好ましい。

【００２３】

好ましい実施形態では、工程ｂ）における固－液分離は遠心分離により行われる。遠心分離の使用は、特に方法が大規模に実施されるとき、経済的に有利である。

【００２４】

本発明の方法において、自己融解プロセスで使用する条件は、ＲＮＡの実質的な部分が５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を維持するというものである。この場合、「ＲＮＡの実質的な部分」とは、全て、工程ｂ）前の全ＲＮＡ量に対して、好ましくは少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも６０％、７０％、７５％、より一層好ましくは少なくとも８０％、最も好ましくは少なくとも８３％を意味する。したがって、ＲＮＡは自己融解プロセス中、完全に損傷を受けていない状態にある必要はないが、ＲＮＡの少なくとも実質的な部分が５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を維持していなければなら

ない。一般に、ＲＮＡは最大１００％まで、５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を維持し得る。５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態にあるとは、ＲＮＡが、適当な酵素により５’－リボヌクレオチドに変換可能な形態にあることを意味する。適切な酵素は５’－ホスフォジエステラーゼ（５’－Ｆｄａｓｅ）であることが好ましい。

【００２５】

５’－リボヌクレオチドに分解可能なＲＮＡの形態は、少なくとも２個のリボヌクレオチド単位を含むオリゴヌクレオチドを含む。したがって、５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態のＲＮＡは、完全なＲＮＡと、長さが異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとを含む混合物からなり得る。本発明では、オリゴヌクレオチドは２～１０個のリボヌクレオチド単位を含み、一方、ポリヌクレオチドは１０個超のリボヌクレオチド単位を含む。

【００２６】

自己融解プロセス中、５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を維持しているＲＮＡのパーセントは、ａ）自己融解およびＲＮＡの５’－リボヌクレオチドへの変換に関与した酵素を不活性化した後の自己融解物中で測定される５’－ＧＭＰの重量パーセント（その二ナトリウム七水和物として、かつ塩化ナトリウムフリーの乾燥物質を基準に計算される）と、ｂ）ＲＮＡを完全にアルカリ加水分解した後に出発物質中で測定されるＧＭＰの重量パーセント（その二ナトリウム七水和物として、かつ塩化ナトリウムフリーの乾燥物質を基準に計算される）との比（×１００）で定義される。アルカリ加水分解後の出発物質中で測定されるＧＭＰの重量パーセント（その二ナトリウム七水和物として、かつ塩化ナトリウムフリーの乾燥物質を基準に計算される）は、対応する遊離ＧＭＰの重量パーセント（塩化ナトリウムフリーの乾燥物質を基準として）から、それに係数１．４７を乗じて求めることができる。自己融解物中の５’－ＧＭＰと、塩基加水分解後のＧＭＰの量を求める方法は、実施例１に記載されている。この５’－ＧＭＰの量の測定に使用する方法は、必要であれば、当業者の知識の範囲内で十分に行うことができるいくつかの修正を加えて、５’－ＩＭＰ、５’－ＡＭＰ、５’－ＣＭＰおよび５’－ＵＭＰの量の測定にも使用することができる。

【００２７】

ＲＮＡの実質的な部分が５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を確実に維持するようにするために自己融解に適用する条件は、一般に、使用する微生物に依るであろう。

【００２８】

微生物細胞壁の損傷および／または部分的破壊は、酵素により行うことが、それによってプロセスをより良好に制御でき、またその方法が大規模生産で使用するのに特に適していることから好ましい。セルラーゼ、グルカナーゼ、ヘミセルラーゼ、キチナーゼ、プロテアーゼおよび／またはペクチナーゼなどの、いくつかの酵素調製物を使用することができる。好ましくはプロテアーゼが使用され、より好ましくはエンドプロテアーゼが使用される。自己融解プロセスを開始する条件は、使用する酵素の種類に依り、当業者であれば容易に決定することができる。一般に、酵素による微生物細胞壁の損傷および／または破壊のために用いる条件は、微生物の自己融解に適用されるものに対応するであろう。

【００２９】

微生物の自己融解は、微生物細胞壁の（部分的）損傷および／または破壊後に溶液中に放出される活性な、その微生物の固有酵素により少なくとも部分的に行われるが、微生物細胞壁の損傷および／または破壊のために添加される薬品、またはより好ましくは酵素が、微生物細胞および微生物高分子物質の分解に寄与し得る。

【００３０】

特に自己融解の初期の段階は、特定の温度と組み合わせた特定のｐＨ範囲で実施される。

【００３１】

例えば、ＲＮＡの実質的な部分が５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を確実に維持するようにするために、サッカロミセス・セレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ

ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）の自己融解に適用される条件は、自己融解の初期段階におけるｐＨが４．５～９で、かつ／または温度が５０～６５℃というものである。自己融解の最初の８時間、より好ましくは自己融解の最初の４時間が、ｐＨ４．５～５．５および温度５７～６５℃、またはｐＨ５．５～９および温度５０～６５℃で実施されることが好ましい。

【００３２】

初期段階後に維持されるべき自己融解条件はあまり重要ではない。初期段階後、ｐＨは一般に４～１０に維持され、温度は一般に４０℃～７０℃に維持される。一般に、自己融解プロセスの持続時間は、初期段階を含め、最長でも２４時間である。

【００３３】

本発明は、工程ａ）において、ＲＮＡの実質的な部分が５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を維持する条件下で微生物を加水分解させる方法もまた、包含し得る。本発明では、「微生物の加水分解」は、微生物固有の酵素が不活性化されており、微生物バイオマスに加えられた外因性の適切な酵素が微生物細胞および微生物高分子物質を分解するプロセスと定義される。

【００３４】

自己融解後、微生物細胞壁フラクション、実質的な部分が５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態にあるＲＮＡ、および可溶性細胞成分（例えば、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、炭水化物など）を含む懸濁物（自己融解物）が得られる。細胞壁フラクションは、不溶性の細胞残渣、特に細胞壁またはその断片を含む。

【００３５】

微生物細胞壁の損傷および／または部分的破壊のために使用した薬品、ならびに／あるいは自己融解プロセスに関与した酵素は、自己融解プロセスの終了時、工程ｂ）の前に、好ましくは、中和および／または不活性化されるべきである。自己融解に関与した酵素は、微生物固有の酵素であり、また任意選択により、自己融解プロセスを開始するために使用した外因性添加酵素である。薬品および／または酵素の中和および／または不活性化は、ＲＮＡの実質的な部分が５’－リボヌクレオチドに分解できる形態を維持する条件下で行われるべきである。自己融解に関与した酵素の不活性化は、ｐＨ処理により、あるいは好ましくは熱処理により行うことができ、これにより酵素は不活性化され、ＲＮＡの実質的な部分は５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態を維持する。酵素は熱処理、例えば、６５℃～９５℃の温度で５分～１時間、混合物を加熱することにより、より好ましくは６５℃～７５℃の温度で３０分～１時間、加熱することにより不活性化させることができ、通常、反応温度が高くなれば、より短い反応時間を使用し得る。例えば、６５℃で１時間、または７５℃で３０分間の混合物に対する加熱は、ＲＮＡの実質的な部分を５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態に維持したまま、酵素を不活性化させるのに十分であり得る。

【００３６】

本発明の方法の工程ｂ）では、自己融解物を固／液分離に供し、ＲＮＡ含有細胞壁フラクションを回収する。この過程のｐＨは５．１未満、好ましくは４．５以下、より好ましくは４．２以下、より一層好ましくは４．０以下、最も好ましくは３．５以下で、かつ１．０超である。好ましいｐＨ範囲は、１．０～５．０、１．０～４．５、または１．０～４．２、または１．０～３．５であり、また２．０～５．１、または２．０～４．５、または２．０～４．２である。最も好ましくは、ｐＨ範囲は２．０～３．５である。

【００３７】

驚いたことに、本発明者らは、全ＲＮＡの実質的な部分が、本発明の方法の工程ｂ）の後に得られる回収細胞壁フラクションとの関連を維持していることを見出した。一実施形態では、工程ｂ）において、全ＲＮＡの少なくとも５５％、より好ましくは少なくとも７５％、最も好ましくは少なくとも９０％が、細胞壁フラクションとの関連を維持する。実施例２は、自己融解物中の全ＲＮＡの９４．７％までが細胞壁フラクションとの関連を維持することを示している。実施例２はまた、酵母の細胞壁に結合しているＲＮＡのパーセ

ントと酵母エキスの濁りが、固／液分離過程のｐＨに依存しており、ｐＨが低いほど、より多くのＲＮＡが細胞壁と結合し、また酵母エキスの濁りが少ないことを示している。

【００３８】

ＲＮＡの全量（すなわち、工程ｂ前）は、工程ａ）で得られた自己融解物の分析により測定することができる。ＲＮＡの分析方法は実施例１に記載する。

【００３９】

細胞壁フラクションとの関連を維持するＲＮＡのパーセントは、ａ）一定量の出発物質由来の自己融解物細胞壁フラクションにおける、グラム表示のＲＮＡ量と、ｂ）同一量の出発物質における、グラム表示のＲＮＡ量との比（×１００）と定義される。細胞壁フラクション中、および出発物質中のＲＮＡの量を測定する方法は、実施例１に記載する。出発物質は、好ましくは、本発明の方法の工程ａ）後に得られる自己融解物であり得る。

【００４０】

５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態の回収ＲＮＡ量を増加させるために、遠心分離または濾過のような一般的な固－液分離法に代えて、自己融解物の限外濾過（ＵＦ）を行ってもよい。この方法では、ＲＮＡ含有細胞壁フラクションと、微生物の可溶性フラクションからのＲＮＡとの混合物が回収される。したがって、細胞壁フラクションに関連するＲＮＡだけでなく、自己融解過程で溶液中に放出されたＲＮＡも、微生物の可溶性フラクションから分離される。ＲＮＡの回収にＵＦを使用する場合、分子量カットオフが１０～５０ｋＤａ、好ましくは２０～５０ｋＤａの膜を使用できることが好ましい。一般に、分子量カットオフを大きくするほど、膜を通過する流量を大きくすることができるが、損失分の増加および／または製品の純度の低下を招き得る。使用する固－液分離の種類および前記固－液分離の効率は、とりわけ本発明の組成物中に得られる５’－リボヌクレオチドの量に影響し得る。

【００４１】

工程ｂ）では、ＲＮＡ含有細胞壁フラクションが回収され、液体フラクションは廃棄されてもよい。しかしながら、本発明の方法では、ＲＮＡ含有細胞壁フラクションと液体フラクションを共に回収することも可能である。前記液体フラクションは、実際には酵母エキスであり得る。これは非常に経済的であるばかりでなく、本発明の方法により、工程ｂ）において液体フラクションを回収することにより得られる前記酵母エキスは、濁りが少ないという特徴を有することもでき、これは、透明なスープおよび飲料などの、透明性が重要となる用途での使用に非常に適している。

【００４２】

工程ｃ）では、回収された細胞壁フラクション中のＲＮＡが５’－リボヌクレオチドへと変換される。これは、限外濾過で得られた微生物可溶性フラクション由来のＲＮＡが任意選択で混合されたＲＮＡ含有細胞壁フラクションを酵素で処理することにより行うことが好ましい。

【００４３】

ＲＮＡを５’－リボヌクレオチドへと変換するために、５’－ホスフォジエステラーゼ（５’－Ｆｄａｓｅ）を使用することが好ましい。５’－ホスフォジエステラーゼは、微生物または植物源（例えば、麦芽根エキス）から得ることができる。商業的に入手可能な微生物５’－Ｆｄａｓｅの例に、天野エンザイム株式会社（日本）製のＥｎｚｙｍｅ　ＲＰ－１がある。

【００４４】

任意選択により、５’－ＡＭＰは、デアミナーゼ、例えばアデニルデアミナーゼにより、５’－ＩＭＰに変換される。商業的に入手可能なデアミナーゼの例に、天野エンザイム株式会社（日本）製のＤｅａｍｉｎａｓｅ　５００がある。

【００４５】

５’－ＦｄａｓｅおよびデアミナーゼによるＲＮＡの処理は、二段または一段プロセスで行うことができる。

【００４６】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、工程ｃ）の後に、
ｄ）５’－リボヌクレオチドを固－液分別し、好ましくは細胞壁フラクションから５’－リボヌクレオチドを、例えば遠心分離もしくは濾過により、または固／液分離に適した他の任意の方法で分離することにより、５’－リボヌクレオチドを回収する工程を含む。これによって、非常に大量の、例えば、乾燥物全量を基準にして、９０重量％、９５重量％、またはさらに９８重量％もしくは９９重量％にも達する５’－リボヌクレオチドを含む組成物を得ることが可能になる。

【００４７】

一実施形態において、５’－リボヌクレオチドは、限外濾過により、前記５’－リボヌクレオチドを、それより大きい分子量を有する成分から分離することにより精製する。精製の程度は、使用する限外濾過膜の分子量カットオフに依存するであろう。例えば、上述したような限外濾過膜を使用することができる。

【００４８】

当然のことながら、本発明では、「ＲＮＡの回収」または「ＲＮＡの変換」のような用語は、全ＲＮＡがそれぞれ回収または変換されることを必ずしも意味しない。回収されるＲＮＡの量が、使用する分離法の種類に依存することは、当業者には明らかであろう。変換されるＲＮＡの量が、いくつかの因子に依存することも明らかであろう。その１つに、細胞壁の不溶性フラクションに関連するＲＮＡの、この工程で使用する酵素に対する接近のしやすさがある。

【００４９】

本発明の方法は、いくつかの利点を有する。それは、非常に高純度の５’－リボヌクレオチド組成物の製造を可能にする。それは僅か２工程を含み得ることから、極めて簡素である。さらに、それはまた、濁りの少ない酵母エキスの製造を可能にし得る。このように、ＲＮＡに富む細胞壁フラクション、および／または５’－リボヌクレオチドに富む細胞壁フラクション、および／または非常に透明な５’－リボヌクレオチドフラクションに加えて、非常に透明な酵母エキスも製造し得る。

【００５０】

ここで、いくつかの実施例により本発明を説明するが、これらの実施例により限定することを意図するものではない。

【００５１】

［実施例］

［実施例１］

［５’－リボヌクレオチドを含む組成物の調製］

サッカロミセス・セレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からのイーストクリーム２リットルを６０℃に加熱した。続いて、０．５ｍｌのＡｌｃａｌａｓｅ（Ｄｅｎｍａｒｋ、Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓから商業的に入手可能なセリンプロテアーゼ）を加え、その混合物をｐＨ６．０、６０℃で４時間インキュベートした。条件をｐＨ５．１、温度５１．５℃に調節し、２ｍｌのＡｌｃａｌａｓｅを反応混合物に追加した。混合物をｐＨ５．１、５１．５℃で２０時間インキュベートした。次に、その混合物または自己融解物を６５℃で１時間加熱して、全酵素活性を不活性化した。

【００５２】

自己融解物のＲＮＡ含有率は、全乾燥物質の８．７重量％であった。自己融解物の一部を５’－ホスフォジエステラーゼで処理したところ、塩化ナトリウムフリーの乾燥物質を基準とし、二ナトリウム七水和物としての表示で、２．６５重量％の量の５’－ＧＭＰを得た。５’－リボヌクレオチドに分解可能なＲＮＡフラクションは８３（重量）％であったということになる。

【００５３】

自己融解物の残りの部分について、ｐＨを５．１（比較実験）、４．２（実験１）または３．５（実験２）として、遠心分離により第１回目の固／液分離を行った。さらなるｐＨの調節を行わずに細胞壁フラクションを回収し、水で２回洗浄し、ＲＮＡ含有率を分析

した。透明な抽出物（上澄み液として）に水を加え、乾燥物質含有量を１３％または２．５％のいずれかに調節した後、濁度を分析した。

【００５４】

細胞壁フラクションを、温度６５℃、ｐＨ５．３で、５’－ホスフォジエステラーゼによりさらに処理した。次いで、温度５５℃、ｐＨ５．１で、酵素デアミナーゼにより５’－ＡＭＰを５’－ＩＭＰへと変換した。５’－ホスフォジエステラーゼおよびデアミナーゼによる処理の後、細胞壁フラクションの第２回目の固／液分離を遠心分離により行い、透明フラクションの５’－リボヌクレオチド含有率を分析した。

【００５５】

試料中に存在するＲＮＡが５’－リボヌクレオチドへと変換され得るか否か（すなわち、ＲＮＡが、例えば５’－Ｆｄａｓｅにより５’－リボヌクレオチドに分解可能な形態にあるか否か）を検証するために、いくつかの試料についてはまた、５’－Ｆｄａｓｅと共にインキュベートし、これらの試料のいくつかはまた、５’－ＡＭＰを５’－ＩＭＰへ変換するためにデアミナーゼでも処理した。その後、ＨＰＬＣにより下記の方法で試料中の５’－ＧＭＰ、５’－ＡＭＰおよび５’－ＩＭＰの量（塩化ナトリウムフリーの乾燥物質を基準とし、その二ナトリウム七水和物の重量パーセント表示で）を測定した。Ｗｈａｔｍａｎ　Ｐａｒｔｉｓｉｌ　１０－ＳＡＸカラム、溶離液としてｐＨ３．３５のリン酸塩緩衝液およびＵＶ検出法を用いたＨＰＬＣにより、酵母エキス中の５’－ＧＭＰ、５’－ＡＭＰおよび５’－ＩＭＰを定量した。５’－ＧＭＰ、５’－ＩＭＰおよび５’－ＡＭＰの標準に基づき濃度を算出した。塩化ナトリウムは、Ｊｅｎｗａｙ製塩素メーターＰＣＬＭ　３（Ｊｅｎｗａｙ、Ｅｓｓｅｘ、Ｅｎｇｌａｎｄ）で試料中の塩素イオンを測定し、対応する塩化ナトリウム量を計算して求めた。

【００５６】

【表１】

表1. 実施例1の結果

	比較例A	実施例1	実施例2
第1回目の固/液分離におけるpH	5.1	4.2	3.5
細胞壁フラクションのRNA含有率(乾燥物質を基準とした重量%)	15.2	16.7	19.9
ホスフォジエステラーゼ処理後、第2回目の固/液分離前の5'-GMP含有率(重量%)	5.3	5.7	6.6
細胞壁フラクション中のRNAの%	55	75	90
第2回目の固/液分離後に得られた透明フラクション中の5'-GMP含有率(重量%) (5'-ホスフォジエステラーゼ処理のみ)	18.6	22.4	25.5
第2回目の固/液分離後に得られた透明フラクション中の5'-GMP含有率(重量%) (5'-ホスフォジエステラーゼ、次いでデアミナーゼによる処理)	19.6	22.7	24.9
第2回目の固/液分離後に得られた透明フラクション中の5'-IMP含有率(重量%) (5'-ホスフォジエステラーゼ、次いでデアミナーゼによる処理)	20.2	23.1	25.3
第1回目の固/液分離後に得られた透明抽出物の濁度 (乾燥物質13%におけるNTU)	298	49	31
第1回目の固/液分離後に得られた透明抽出物の濁度 (乾燥物質2.5%におけるNTU)	57	9.4	6.0

【００５７】
次のようにＲＮＡを分析した。アルカリ処理中にＲＮＡを加水分解させた。標準として５’－ＧＭＰを使用し、Ｗｈａｔｍａｎ　Ｐａｒｔｉｓｉｌ　１０－ＳＡＸカラム、溶離液としてｐＨ３．３５のリン酸塩緩衝液、およびＵＶ検出法を用いたＨＰＬＣにより、ＧＭＰ（すなわち、ＲＮＡの加水分解から得られる２’－ＧＭＰおよび３’－ＧＭＰ）を定量した。塩化ナトリウムフリー乾燥物質基準のＲＮＡ含有量の重量パーセントは、塩化ナトリウムフリー乾燥物質基準の遊離ＧＭＰの重量パーセントの約４倍である。
【００５８】
ＮＴＵ（濁度）は、タングステンランプ（４００～６００ｎｍ）を備えたＨＡＣＨ　２１００　Ｎ濁度計（Ｈａｃｈ－Ｌａｎｇｅ、Ｄｕｅｓｓｅｌｄｏｒｆ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いた比濁分析により、温度２０℃で測定した。
【００５９】
ＮＴＵは、比濁計濁度単位（Ｎｅｐｈｅｌｏｍｅｔｒｉｃ　Ｔｕｒｂｉｄｉｔｙ　Ｕｎｉｔ）を意味し、ＨＡＣＨ　２１００　Ｎ濁度計により測定される。この方法は光散乱に基づくもので、ホルマジン溶液を標準物質として用い、角度９０°で散乱光を測定する。
【００６０】
［実施例２］
［ｐＨに依る細胞壁および上澄み液間のＲＮＡの分配］

２．０～５．０１の範囲のｐＨ値で、実施例１の実験を繰り返した。濁度分析前に水を加え、透明抽出物（上澄み液）の乾燥物質含有率を５％に調節した以外は、全ての条件を同じにした。この場合も、細胞壁フラクション中のＲＮＡは５’－Ｆｄａｓｅにより消化されなかった。

【００６１】

【表２】

表２．実施例２の結果

	実験3	実験4	実験5	実験6	実験7	実験8	実験9	実験10
第1回目の固/液分離におけるpH	2.01	2.49	2.90	3.29	3.49	3.99	4.50	5.01
細胞壁フラクション中のRNAの%*	94.6	94.7	94.1	89.4	79.8	59.5	55.3	53.8
上澄み液中のRNAの%*	5.4	5.3	5.9	10.6	20.2	40.5	44.7	46.2
上澄み液の濁度(乾燥物質5%におけるNTU)	6.0	5.3	6.1	3.8	6.0	19.2	34.8	32.9

* 細胞壁および上澄み液中のRNAの和は、定義により100%である

フロントページの続き

(72)発明者　ノールダム，　ベルタス
オランダ，　エヌエル－６１００　エーシー　エヒト，　ピー．オー．　ボックス　１３０

審査官　森井　文緒

(56)参考文献　特表２００７－５２１８０５（ＪＰ，Ａ）
特表２００６－５２５７９４（ＪＰ，Ａ）
J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (2005) vol.32, issue 9, p.415-423

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｐ　１９／３０
ＰｕｂＭｅｄ
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＷＰＩＤＳ／ＷＰＩＸ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）