

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 11.04.97.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 16.10.98 Bulletin 98/42.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : ROQUETTE FRERES SOCIETE
ANONYME — FR.

⑦② Inventeur(s) : DEFRETIN SOPHIE, HEYSEN
ARNAUD et GAILLARDIN CLAUDE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑤④ PROCEDE DE PREPARATION DE RIBITOL PAR VOIE FERMENTAIRE ET SOUCHE DE MICROORGANISMES
MISE EN OEUVRE DANS CE PROCEDE.

⑤⑦ La présente invention concerne un procédé de prépa-
ration de ribitol dans lequel on cultive sur un milieu de fer-
mentation contenant une source carbonée directement
assimilable, une souche de microorganismes capable de
générer du ribulose et possédant une ribulose- réductase
NADH-spécifique, dans laquelle l'activité enzymatique de la
ribulose réductase NADPH-spécifique a été éliminée ou
sensiblement réduite, et que l'on récupère le ribitol ainsi ob-
tenu.

Elle concerne également une souche de microorganismes
capable de produire du ribitol pour culture sur un milieu
contenant une source carbonée directement assimilable, la-
dite souche étant capable de générer du ribulose et possé-
dant une ribulose réductase NADH-spécifique, dans
laquelle l'activité enzymatique de la ribulose réductase NA-
DPH-spécifique a été éliminée ou sensiblement réduite.

FR 2 762 011 - A1



PROCEDE DE PREPARATION DE RIBITOL PAR VOIE FERMENTAIRE
ET SOUCHE DE MICROORGANISMES MISE EN ŒUVRE DANS CE PROCEDE

5

La présente invention concerne un procédé de préparation de ribitol par voie fermentaire. L'invention concerne également une souche de microorganisme dont la mise en culture sur un milieu contenant une source carbonée directement assimilable permet la préparation de
10 ribitol.

Dans la présente description, on entend par "source carbonée directement assimilable", une source carbonée qui une fois assimilée par le microorganisme conduira à la production d'arabitol. Des exemples de
15 telles sources sont au moins un élément choisi dans le groupe constitué par le glucose, le D-galactose, le L-sorbose, le D-ribose, le D-xylose, le D-arabinose, le L-arabinose, le D-ribulose, le D-xylulose, le saccharose, le
20 glycérol, le xylitol, le D-arabitol, le L-arabitol, le D-sorbitol, le D-mannitol, le galactitol, le myo-inositol, l'éthanol, l'amidon, le D-gluconate, le lactate, le succinate, le citrate et le fructose.

De préférence, de telles sources sont au moins un
25 élément choisi dans le groupe constitué par le glucose, le D-galactose, le L-sorbose, le saccharose, le glycérol, l'amidon et le fructose.

Le ribitol fait partie du groupe des alcools polyhydriques communément appelés "polyols". Le ribitol
30 est un pentitol. C'est un isomère de position de l'arabitol.

Les polyols peuvent être préparés par voie chimique. Ainsi, peut-on procéder à la synthèse des polyols à partir de leurs sucres correspondants par hydrogénation, en utilisant des catalyseurs métalliques
5 comme le Nickel de Raney. Cependant, les voies chimiques présentent l'inconvénient d'être complexes et onéreuses.

On a donc exploré les méthodes de production des polyols par voie de fermentation, par les levures notamment. Les méthodes fermentaires présentent le grand
10 avantage d'être relativement simples. De plus, la matière première utilisée en tant que substrat carboné est souvent très accessible et bon marché.

De nombreuses levures sont déjà connues comme ayant une capacité productrice de polyols. Ainsi, l'art
15 antérieur fait état de microorganismes dont la mise en culture, dans des conditions spécifiques, permet la production de divers polyols tels que le glycérol, l'arabitol, le sorbitol, l'érythritol, le xylitol ou encore le mannitol.

20 La formation de ces polyols est souvent associée aux voies métaboliques normales des levures, mais elle peut être influencée par les conditions de croissance. C'est ainsi qu'une large variété de microorganismes produisent des polyols en réponse à de hautes pressions
25 osmotiques, ou lorsqu'elles sont cultivées sur des sources carbonées particulières.

On peut à ce titre citer *Candida lipolytica* qui produit du mannitol à partir de n-alcanes, et *Candida boïdinii* qui produit du sorbitol à partir de fructose. Les
30 microorganismes du genre *Moniliella*, *Trigonopsis* ou *Torulopsis* permettent l'obtention de l'érythritol à partir du sucrose ou du glucose. Les microorganismes tels que

Yamadazyma (*Pichia* *miso*, *Pichia* *ohmeri*), *Debaromyces*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces* ou *Saccharomyces cerevisiae* produisent de l'arabitol à partir de glucose.

Les domaines d'application des polyols sont
5 extrêmement nombreux. Ils sont utilisés notamment pour la
stabilisation des enzymes, en améliorant leur
thermostabilité et leur stabilité dans les solvants aqueux
ou organiques, pour la conservation par lyophilisation ou
la cryoprotection, et pour l'encapsulation. Les polyols
10 trouvent également des applications dans le domaine agro-
alimentaire compte tenu de leurs propriétés acariogènes et
de leur moindre caloricité. Ils sont aussi utilisés en
cosmétologie ou en pharmacie, notamment en ce qui concerne
les soins cutanés, compte tenu de leur haut pouvoir
15 émollient et grâce à leurs propriétés inhibitrices de
croissance dues au fait qu'ils constituent des sources
carbonées difficilement assimilables.

L'utilisation du ribitol a déjà été décrite dans
certaines de ces applications, telles la stabilisation des
20 enzymes comme l' α -amylase et la pullulanase. Son
pouvoir acariogène a également été mentionné dans le
brevet JP 4370095 au nom de KAO CORP.

Le procédé le plus couramment utilisé pour la
production de ribitol est la biotransformation du ribose
25 en ribitol par *Candida polymorpha* (Onishi et Suzuki,
1966, Agr. Biol. Chem., 30, 11, 1139-1144). Cependant,
l'approvisionnement en ribose est difficile et son coût
est élevé. Il serait donc souhaitable de disposer d'un
procédé de production de ribitol à partir d'une matière
30 première quantitativement et économiquement plus
accessible.

Or, la Société Demanderesse a eu le mérite de mettre au point un procédé original de préparation de ribitol par voie directe, à partir d'une source carbonée facilement assimilable, par culture d'une souche de
5 microorganismes génétiquement modifiée. Ce procédé permet l'obtention de ribitol à partir d'une source carbonée facilement assimilable avec un bon rendement.

Conformément au procédé selon l'invention, on utilise une voie de synthèse conduisant au ribulose, qui
10 est lui-même transformé en ribitol. Or, dans un grand nombre de microorganismes, le ribulose est converti presque exclusivement en arabitol, le ribitol n'étant obtenu qu'en quantités minimales.

La Société Demanderesse a néanmoins réussi à
15 mettre au point un procédé de préparation de ribitol dans lequel la voie métabolique de conversion du ribulose est essentiellement dirigée vers le ribitol. Ceci est obtenu, conformément à l'invention, en éliminant l'activité enzymatique de la ribulose réductase NADPH-spécifique. En
20 conséquence, la conversion du ribulose en ribitol peut être favorisée, soit par l'activité ribulose réductase NADH-spécifique homologue à la souche considérée, soit par transfert de l'activité ribulose réductase NADH-spécifique d'une souche la possédant, telles les levures du genre
25 *Yamadazyma*. Dans ce dernier cas, la ribulose-réductase NADH-spécifique est donc de nature exogène.

Le procédé de préparation du ribitol selon l'invention est donc caractérisé par le fait que l'on cultive sur un milieu de fermentation contenant une source
30 carbonée directement assimilable, une souche de microorganismes capable de générer du ribulose et possédant une ribulose réductase NADH-spécifique, soit

homologue, soit de nature exogène, dans laquelle l'activité enzymatique de la ribulose réductase NADPH-spécifique a été éliminée ou sensiblement réduite, et que l'on récupère le ribitol ainsi obtenu.

5 On entend par "sensiblement réduite", une expression d'une activité enzymatique non totalement réprimée, ce qui peut être effectué dans le cadre de la stratégie ARN antisens, par le contrôle de l'expression de ces antimessagers, par exemple, par l'utilisation d'un
10 promoteur inductible.

Conformément au procédé de préparation de ribitol selon l'invention, la souche cultivée est capable de générer le ribulose à partir du ribulose-5-phosphate.

Ceci est notamment le cas pour la souche
15 *Yamadazyma ohmeri* (auparavant appelée *Pichia ohmeri*). Les voies métaboliques qui conduisent à la production du ribitol dans cette souche ont été élaborées par la Société Demanderesse et sont présentées à la Figure 1.

La Société Demanderesse a montré qu'il existe deux
20 autres voies qui consomment le ribulose-5-phosphate : celle qui conduit à la production du ribose-5-phosphate, précurseur des acides nucléiques par la D-ribose-5-phosphate isomérase (n° 4, Fig. 1), et celle qui génère le D-xylulose-5-phosphate par la D-ribulose-5-phosphate-3-
25 épimérase (n° 5, Fig. 1).

Conformément au procédé selon l'invention, ces autres voies d'assimilation du ribulose-5-phosphate sont sensiblement réduites, favorisant ainsi la conversion du ribulose-5-phosphate essentiellement en ribulose qui est
30 lui-même transformé en ribitol. Cela peut être réalisé, par exemple en réduisant sensiblement l'activité de la D-ribose-5-phosphate-isomérase (n° 4, Fig. 1), la D-

ribulose-5-phosphate-3-épimérase (n° 5, Fig. 1), la transcétolase (n° 10, fig. 1) et/ou la kinase (n° 9, Fig. 1).

Selon un mode de réalisation du procédé selon l'invention, donc, ces autres voies d'assimilation du ribulose-5-phosphate sont sensiblement réduites.

Conformément au procédé selon l'invention, la souche cultivée est choisie parmi les souches de levures osmotolérantes. De préférence, elle est choisie parmi les souches de microorganismes du genre *Yamadazyma*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces* et *Saccharomyces*. Plus préférentiellement encore, on utilise une souche de *Yamadazyma ohmeri*.

Le procédé selon l'invention est mis en œuvre à une température comprise entre environ 25 et environ 40°C, et de préférence entre environ 30 et environ 38°C.

Le pH utilisé dans le procédé selon l'invention est compris entre environ 3 et environ 7, et de préférence entre environ 5 et environ 6.

La teneur en source carbonée directement assimilable dans le milieu de fermentation est généralement comprise entre environ 100 et environ 600 g/l, et de préférence entre environ 150 et environ 400 g/l.

Bien entendu, la température, le pH et le milieu de fermentation sont choisis en fonction de la souche mise en œuvre.

D'une manière quasi-générale, la souche mise en oeuvre dans le procédé conforme à l'invention produit du ribulose, dont de petites quantités ne seront pas converties en ribitol. Ce ribulose résiduel peut être facilement hydrogéné catalytiquement en un mélange

équimoléculaire de ribitol et d'arabitol, ce qui permet d'augmenter le rendement en ribitol obtenu directement par fermentation.

L'hydrogénation d'un tel sucre s'effectue
5 conformément aux règles de l'art qui conduisent par exemple à la production de sorbitol à partir du glucose.

On peut utiliser pour cette étape aussi bien des catalyseurs à base de ruthénium que des catalyseurs au Nickel de Raney.

10 On préfère cependant utiliser des catalyseurs au Nickel de Raney qui sont moins onéreux.

Dans la pratique, on utilise de 1 à 10 % en poids de catalyseur par rapport à la matière sèche de sucre soumis à l'hydrogénation. L'hydrogénation s'effectue de
15 préférence sur des sirops dont la matière sèche est comprise entre 15 et 50 %, dans la pratique voisine de 30 à 45 %, sous une pression d'hydrogène comprise entre 20 et 200 bars. Elle peut être effectuée de manière continue ou discontinue.

20 Lorsque l'on opère de manière discontinue, la pression d'hydrogène utilisée est généralement comprise entre 30 et 60 bars et la température à laquelle se déroule l'hydrogénation est comprise entre 100 et 150°C. On veille aussi à maintenir le pH du milieu
25 d'hydrogénation par l'addition de soude ou de carbonate de soude par exemple, mais sans dépasser un pH de 9,0. Cette manière de faire permet d'éviter l'apparition de produits de cracking ou d'isomérisation.

On arrête la réaction lorsque la teneur du milieu
30 réactionnel en sucres réducteurs est devenue inférieure à 1 %, de préférence encore inférieure à 0,5 % et plus particulièrement inférieure à 0,1 %.

Après refroidissement du milieu réactionnel, on élimine le catalyseur par filtration et on déminéralise le sirop ainsi obtenu sur des résines cationiques et anioniques.

5 La récupération du ribitol à partir de ce mélange ribitol/arabitol est effectuée de manière connue en soi, soit par cristallisation fractionnée, soit par fractionnement chromatographique.

Conformément à un mode préférentiel du procédé selon l'invention, on procède à une hydrogénation catalytique du milieu de fermentation.

L'invention a également pour objet une souche de microorganismes capable de produire du ribitol par culture sur un milieu contenant une source carbonée directement assimilable. Cette souche est caractérisée par le fait qu'elle est capable de générer du ribulose, qu'elle possède une activité ribulose réductase NADH-spécifique, et que l'activité enzymatique de la ribulose réductase NADPH-spécifique a été éliminée, ou sensiblement réduite, dans cette souche.

La ribulose réductase NADH-spécifique dans la souche est soit homologue, soit de nature exogène.

Selon une variante de la souche selon l'invention, la souche est capable de générer le ribulose à partir du ribulose-5-phosphate.

De préférence, les voies d'assimilation du ribulose-5-phosphate autres que celle qui conduit au ribulose sont sensiblement réduites dans cette souche.

La souche de microorganismes productrice de ribitol conforme à l'invention est choisie parmi les souches de levures osmotolérantes. De préférence, cette souche peut être choisie parmi les souches de

microorganismes du genre *Yamadazyma*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces* et *Saccharomyces*.

Plus préférentiellement encore, la souche conforme à l'invention est *Yamadazyma ohmeri*. *Yamadazyma ohmeri* (auparavant appelée *Pichia ohmeri*, déposée auprès de l'American Type Culture Collection sous le numéro ATCC 20209) est une levure osmotolérante dont le seuil de tolérance au glucose se situe à 500 g/l. En présence notamment de glucose, et quelle que soit la concentration, *Y. ohmeri* produit du D-arabitol. La voie de biosynthèse du D-arabitol chez *Y. ohmeri* (décrite à la Figure 1) est similaire à celle de *Zygosaccharomyces mellis* et *Zygosaccharomyces rouxii*. Le D-arabitol est produit par la réduction du D-ribulose par une ribulose réductase NADPH-spécifique. Le D-ribulose provient de la déphosphorylation du ribulose-5-phosphate dont la richesse intracellulaire conditionne la production d'arabitol.

Pour la mise en œuvre du procédé de préparation de ribitol selon l'invention on prépare une souche modifiée.

Les modifications peuvent être réalisées par toute méthode connue en soi. Ainsi, on peut procéder à une modification génétique telle que la mutagenèse à l'aide d'ondes UV, ou à des ciblage génétiques par clonage des gènes directement impliqués dans les voies métaboliques.

Dans les exemples qui suivent, on procède tout d'abord au clonage de la ribulose réductase NADPH-spécifique, puis à l'élimination de cette ribulose réductase du génome de *Yamadazyma ohmeri* et enfin à la mise en culture de la souche modifiée ainsi obtenue.

Les souches selon l'invention peuvent être mises en culture notamment dans des milieux contenant en plus

d'une source carbonée directement assimilable, des facteurs nutritifs tels que l'extrait de levure, la liqueur de Corn Steep et des apports minéraux tels que le phosphate de potassium acide et le sulfate de magnésium.

5 L'invention pourra être mieux comprise à l'aide des exemples non-limitatifs décrits ci-dessous.

Exemple 1: Clonage de la ribulose réductase NADPH-spécifique

10 Une banque d'expression de *Y. ohmeri* a été réalisée dans le phage λ gt 11. Les plages de lyses obtenues ont été testées avec des anticorps contre la ribulose réductase NADPH-spécifique. Les inserts des clones positifs ont été isolés puis clonés dans des
15 vecteurs Bluescript-SK[®] de la société Stratagene, afin de permettre leur séquençage.

Des amorces ont été générées à partir des séquences nucléotidiques des ADN complémentaires obtenues, et ont été utilisées en réaction de PCR (réaction de
20 polymérisation en chaîne) sur l'ADN de la banque génomique obtenue, par la méthode décrite dans Current Protocols in Molecular Biology, première édition, 1987, Wiley Interscience.

Deux clones positifs ont été isolés. Le séquençage
25 des inserts a permis de définir une phase ouverte de lecture de 277 acides aminés dont les 20 premiers déduits de la séquence nucléotidique sont identiques à ceux déterminés par séquençage protéique de l'extrémité NH₂-terminale de l'enzyme purifiée. Ceci confirme que le gène
30 isolé code bien pour la ribulose réductase NADPH-spécifique.

Exemple 2: Elimination de la ribulose réductase NADPH-spécifique

La méthode suivie pour l'élimination du gène
5 codant pour l'activité ribulose réductase NADPH-spécifique
est inspirée de Piredda et Gaillardin, 1994 Yeast 10: 1601
- 1612 et consiste en la méthode de "remplacement
d'allèle" qui s'effectue en deux temps :

- 10 - dans la souche de *Yamadazyma ohmeri* auxotrophe
pour la leucine (souche obtenue par mutagénèse
UV), intégration au locus chromosomique par
recombinaison homologue d'un plasmide portant le
gène de la ribulose réductase NADPH-spécifique
délété (par insertion dans la partie codante du
15 gène *leu2*) et le gène *ura3*,
- excision de ce plasmide par étalement des
transformants sur un milieu de culture
renfermant de l'acide 5-fluoro-orotique (crible
de sélection mis au point par Boeke et al.
20 1984).

Les transformants obtenus ont été analysés par la
technique de Southern en utilisant des sondes ADN
spécifiques. L'ADN génomique des clones transformants,
extrait et digéré par des enzymes de restriction
25 adéquates, a été analysé avec une sonde ADN spécifique du
gène de la ribulose réductase NADPH-spécifique. Neuf des
dix clones testés ont montré le profil attendu,
caractéristique de l'intégration du plasmide au site
chromosomique. Sur les clones résultant du passage en
30 acide 5-fluoro-orotique, ceux présentant en hybridation
moléculaire une bande caractéristique de la présence du

gène leu 2 dans la copie tronquée du gène de la ribulose réductase NADPH-spécifique, ont été isolés et analysés.

Les conditions de révélation par la technique de Southern sont décrites ci-dessous.

5 Le transfert d'ADN sur membrane Hybond N+ à partir d'un gel d'agarose est effectué sous vide en utilisant un appareil Vacugène.

La dépurination de l'ADN est réalisée en plaçant le gel pendant 20 minutes dans une solution d'acide chlorhydrique (250mM). Le gel est ensuite immergé dans une solution de 1M NaOH, 1.5M NaCl pendant 15 minutes afin de dénaturer l'ADN. La neutralisation est ensuite effectuée par immersion du gel pendant 15 minutes dans une solution 1M Tris-HCl pH 7.2, 1.5M NaCl.

15 Le transfert est effectué sous vide pendant 45 minutes en présence de tampon 20xSSC (3M NaCl, 0.3M trisodium citrate).

L'ADN est fixé sur la membrane par une irradiation aux rayons ultraviolets pendant 10 minutes suivie d'une cuisson sous vide de 2 heures à 80°C.

20 Les membranes sont ensuite préhybridées pendant 3 heures à 42°C dans une solution de 25 % formamide, 5xSSC, 5xDenhardt (une solution 100xDenhardt est 2 % (p/v) BSA, 2 % (p/v) Ficoll, 2 % (p/v) polyvinylpyrrolidone, 0.5 % (p/v) SDS), 50mM tampon phosphate pH6, 150 µg/ml d'ADN de sperme de hareng soniqué et 0.3 % SDS.

25 L'hybridation avec la sonde ADN préalablement marquée (technique de marquage "random labelling" avec de l'ATP- α P³²) est effectuée pendant une nuit à 42°C dans la solution de préhybridation.

30

Les membranes sont ensuite rincées pendant 10 minutes à 42°C dans une solution 2xSSC, 0.1 % SDS, puis pendant 10 minutes à 52°C dans la même solution, et enfin pendant 30 minutes à 62°C dans une solution 0.1xSSC, 0.1 % SDS. Elles sont ensuite mises en autoradiographie à -80°C.

Une des souches recombinées, dont le profil était conforme, a été appelée RR⁻. Aucune activité ribulose-réductase NADPH-dépendante n'a été détectée dans les extraits acellulaires de la souche RR⁻.

Le dosage des activités enzymatiques est réalisé par incubation des extraits bruts acellulaires en présence de ribulose et de cofacteur NADPH. Le suivi de la consommation du cofacteur réduit (variation de l'absorbance à 340 nm) donne une preuve indirecte de la présence ou de l'absence de ladite activité. En complément d'analyse, la nature des métabolites produits dans le surnageant de culture en cours et à la fin de la fermentation est déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

Exemple 3: Production de ribitol par la mise en culture de la souche RR⁻

La souche recombinée obtenue à l'exemple 2 a été mise en culture sur un milieu contenant du glucose (100 g/l), de l'extrait de levure (3 g/l), KH₂PO₄ (2 g/l) et MgSO₄ (1 g/l).

Les productions ont été réalisées en erlenmeyers et fermenteurs de 2 litres.

La production de ribitol s'est élevée à 30 g/l, soit un rendement de 30 % en poids par rapport à la quantité de glucose consommée.

Le seul coproduit est le ribulose, dans une
5 proportion de 8 %.

En fin de fermentation le moût a été filtré, déminéralisé, concentré à 40 % de matière sèche, puis hydrogéné en présence de 5 % de Nickel de Raney à une pression de 50 bars et à une température de 50°C durant 3
10 heures.

Le sirop hydrogéné obtenu contenait 89 % de ribitol et 10 % d'arabitol.

Exemple 4 : Production de ribitol par la mise en culture
15 de la souche RR⁻

La souche obtenue dans l'exemple 2 a été mise en culture sur un milieu contenant du glucose (200 g/l), de la liqueur de Corn Steep (40 g/l) et MgSO₄ (2 g/l).

Le ribitol a été obtenu avec un rendement de 28%
20 en poids par rapport à la quantité de glucose consommée.

Le seul coproduit est le ribulose dans une proportion de 4 à 5 %.

Exemple 5: Modification génétique de la souche RR⁻ pour
25 obtenir la souche RR⁻lig3.5

La méthode de déletion de l'activité ribulose réductase NADPH-spécifique par remplacement d'allèles conduit obligatoirement à une souche auxotrophe pour
30 l'uracile, condition *sine qua non* de la survie sur milieu enrichi en acide 5-fluoro-orotique.

Dans le cas le plus préférentiel, la souche *Yamadazyma ohmeri* délétée pour ces deux activités (ribulose réductase NADPH-spécifique et URA 3) peut présenter un avantage en croissance et stabilité si on lui réattribue le gène *ura 3* qu'elle a perdu.

Il a été montré que l'apport dudit gène par un vecteur plasmidique réplcatif (*lig3.5*) peut suffire.

Toute autre méthode de complémentation génique telle que décrite dans l'art peut également être utilisée.

10 La souche résultante RR-*lig3.5* portera donc le gène URA 3 mais non pas celui codant pour la ribulose réductase NADPH-spécifique.

Dans ce cas, la fermentation de la souche RR-*lig3.5* conduit à une productivité en ribitol meilleure que

15 celle décrite dans les exemples 3 et 4.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de ribitol, caractérisé
5 par le fait que l'on cultive sur un milieu de fermentation
contenant une source de carbone directement assimilable,
une souche de microorganismes capable de générer du
ribulose et possédant une ribulose réductase NADH-
spécifique, dans laquelle l'activité enzymatique de la
10 ribulose réductase NADPH-spécifique a été éliminée ou
sensiblement réduite, et que l'on récupère le ribitol
ainsi obtenu.

2. Procédé de préparation de ribitol selon la
revendication 1, caractérisé par le fait que la ribulose
15 réductase NADH-spécifique est de nature exogène.

3. Procédé de préparation de ribitol selon
l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé
par le fait que la souche génère le ribulose à partir du
ribulose-5-phosphate.

20 4. Procédé de préparation de ribitol selon
l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par
le fait que dans la souche les voies d'assimilation du
ribulose-5-phosphate sont sensiblement réduites.

5. Procédé de préparation de ribitol selon l'une
25 quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le
fait que la souche est choisie parmi les souches de
levures osmotolérantes.

6. Procédé de préparation de ribitol selon l'une
quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé par le
30 fait que la souche est choisie parmi les souches de
microorganismes du genre *Yamadazyma*, *Debaromyces*,
Hansenula, *Zygosaccharomyces* et *Saccharomyces*.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que la souche est une souche de *Yamadazyma ohmeri*.

8. Procédé selon l'une quelconque des
5 revendications 1 à 7, caractérisé par le fait que l'on met en œuvre le procédé à une température comprise entre environ 25 et environ 40°C, et de préférence entre environ 30 et environ 38°C, à un pH compris entre environ 3 et environ 7, et de préférence entre environ 5 et environ 6,
10 et à une teneur en source carbonée directement assimilable dans le milieu de fermentation comprise entre environ 100 et environ 600 g/l, et de préférence entre environ 150 et environ 400 g/l.

9. Procédé de préparation de ribitol selon
15 l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé par le fait que le milieu de fermentation est soumis à une hydrogénation catalytique.

10. Souche de microorganismes capable de produire du ribitol par culture sur un milieu contenant
20 une source carbonée directement assimilable, caractérisée par le fait qu'elle est constituée d'une souche capable de générer du ribulose et possédant une activité ribulose réductase NADH-spécifique, dans laquelle l'activité enzymatique de la ribulose réductase NADPH-spécifique a
25 été éliminée ou sensiblement réduite.

11. Souche de microorganismes capable de produire du ribitol par culture sur un milieu contenant une source carbonée directement assimilable selon la revendication 10, caractérisée par le fait que dans la
30 souche la ribulose réductase NADH-spécifique est de nature exogène.

12. Souche de microorganismes capable de produire du ribitol par culture sur un milieu contenant une source carbonée directement assimilable, selon l'une ou l'autre des revendications 10 et 11, caractérisée par le fait qu'elle génère le ribulose à partir du ribulose-5-phosphate.

13. Souche de microorganismes capable de produire du ribitol par culture sur un milieu contenant une source carbonée directement assimilable selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisée par le fait que dans la souche les voies d'assimilation du ribulose-5-phosphate sont sensiblement réduites.

14. Souche de microorganismes capable de produire du ribitol par culture sur un milieu contenant une source carbonée directement assimilable, selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisée par le fait que ladite souche est choisie parmi les souches de levures osmotolérantes.

15. Souche de microorganismes capable de produire du ribitol par culture sur un milieu contenant une source carbonée directement assimilable selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, caractérisée par le fait que ladite souche est choisie parmi les souches de microorganismes du genre *Yamadazyma*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces* et *Saccharomyces*.

16. Souche de microorganismes capable de produire du ribitol par culture sur un milieu contenant une source carbonée directement assimilable selon l'une quelconque des revendications 10 à 15, caractérisée par le fait que ladite souche est une souche de *Yamadazyma ohmeri*.

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 542606
FR 9704506

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP 0 754 758 A (CERESTAR HOLDING BV) * revendications; exemples * ---	1
A	WO 94 10325 A (XYROFIN OY ;HARKKI ANU MARJUKKA (FI); MYASNIKOV ANDREY N (FI); APA) * revendications * ---	1
A	FR 2 034 627 A (GODO SHUSEI KK) * revendications * ---	1
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9619 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 96-182292 XP002051500 & JP 08 056 659 A (HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU) , 5 mars 1996 * abrégé * ---	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 117, no. 13, 28 septembre 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 127007, KAHLE, CORINNA ET AL: "Pentitol metabolism of Rhodobacter sphaeroides Si4: purification and characterization of a ribitol dehydrogenase" XP002051496 * abrégé * & J. GEN. MICROBIOL. (1992), 138(6), 1277-81 CODEN: JGMIAN;ISSN: 0022-1287, 1992, --- -/--	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12P C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
8 janvier 1998		Delanghe, L
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 542606
FR 9704506

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 102, no. 7, 18 février 1985 Columbus, Ohio, US; abstract no. 58618, FROMM, HERBERT J.: "D- Ribulose" XP002051497 * abrégé * & METHODS ENZYM. ANAL. (3RD ED.) (1984), VOLUME 6, 432-7. EDITOR(S): BERGMAYER, HANS ULRICH. PUBLISHER: VERLAG CHEMIE, WEINHEIM, FED. REP. GER. CODEN: 50HMA2, 1984, ---	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 66, no. 11, 13 mars 1967 Columbus, Ohio, US; abstract no. 45470, ONISHI, HIROSHI ET AL: "Production of xylitol, L-arabinitol, and ribitol by yeasts" XP002051498 * abrégé * & D AGRIC. BIOL. CHEM. (1966), 30(11), 1139-44 CODEN: ABCHA6, ---	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 72, no. 19, 11 mai 1970 Columbus, Ohio, US; abstract no. 99141t, page 230; XP002051499 * abrégé * & JP 07 002 071 A (NODA) 23 janvier 1970 -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
8 janvier 1998		Delanghe, L
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)