

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年9月1日(01.09.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/181610 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 19/02 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/007239

(22) 国際出願日: 2022年2月22日(22.02.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

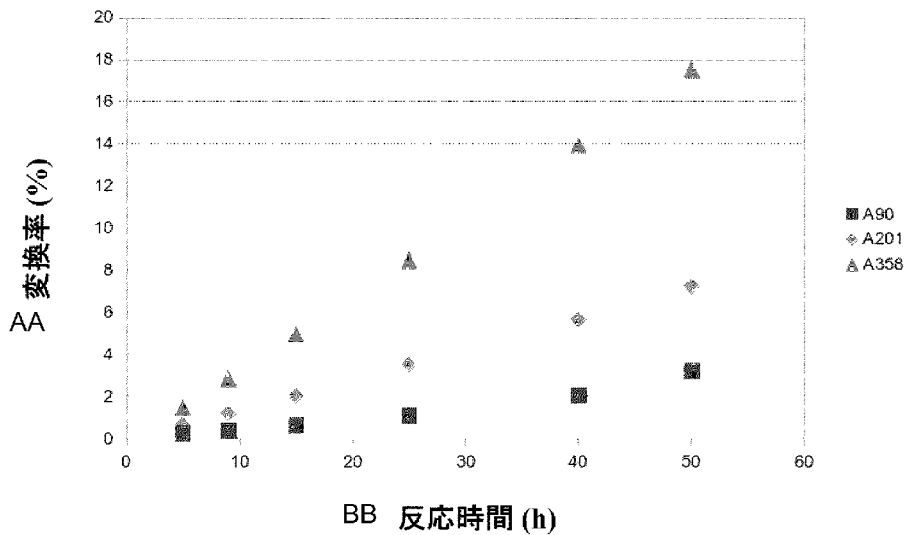
(30) 優先権データ:
特願 2021-030793 2021年2月26日(26.02.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人香川大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KAGAWA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7608521 香川県高松市幸町1-1 Kagawa (JP).

(72) 発明者: 加藤 志郎(KATO, Shiro); 〒7608521 香川県高松市幸町1番1号 国立大学法人香川大学国際希少糖研究教育機構内 Kagawa (JP). 何森 健(IZUMORI, Ken); 〒7608521 香川県高松市幸町1番1号 国立大学法人香川大学国際希少糖研究教育機構内 Kagawa (JP). 吉原 明秀(YOSHIHARA, Akihide); 〒7608521 香川県高松市幸町1番1号 国立大学法人香川大学国際希少糖研究教育機構内 Kagawa (JP). 望月 進(MOCHIZUKI, Susumu); 〒7608521 香川県高松市幸町1番1号 国立大学法人香川大学国際希少糖研究教育機構内 Kagawa (JP). 秋光和也(AKIMITSU, Kazuya); 〒7608521 香川県高松市幸町1番1号 国立大学法人香川大学国際希少糖研究教育機構内 Kagawa (JP).

(54) Title: MICROORGANISMS PRODUCING D-ALLULOSE FROM ALLITOL AND METHOD FOR PRODUCING D-ALLULOSE USING SAME

(54) 発明の名称: アリトールからD-アルロースを製造する微生物およびそれを用いるD-アルロースの製造方法



AA Conversion ratio (%)
BB Reaction time (h)

(57) Abstract: [Problem] To provide a novel microorganism capable of producing D-allulose from allitol. Also, to provide a method for oxidizing/converting allitol into D-allulose using the microorganism. [Solution] Bacteria belonging to the genera Burkholderia, Enterobacter, Agrobacterium, Buttiauxella and Lelliottia and capable of producing D-allulose from allitol employed as the starting material were identified. By using these bacteria, D-allulose is produced at a high yield



WO 2022/181610 A1

(74) 代理人: 須藤 晃伸, 外 (SUDO, Akinobu et al.);
〒1800004 東京都武蔵野市吉祥寺本町 1 - 2 0
- 1 3 ウェルビーズ吉祥寺 5階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))

from allitol.

(57) 要約: 課題: アリトールからD-アルロースを製造することのできる新規微生物を提供することを課題とする。また、アリトールからD-アルロースへの酸化・変換を、該微生物を用いて行う方法を提供する。 解決手段: バークホルデリア属 (Burkholderia)、エンテロバクター属 (Enterobacter)、アグロバクテリウム属 (Agrobacterium)、ブティアウクセラ属 (Buttiauxella)、またはレリオテイア属 (Lelliottia) に属し、原料のアリトールからD-アルロースを産生する能力を有する細菌が同定され、これら細菌を用いることにより、アリトールからD-アルロースが高収率で製造される。

明 細 書

発明の名称：

アリトールからD-アルロースを製造する微生物およびそれを用いるD-アルロースの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、アリトールからD-アルロース産生能を有する微生物、および該微生物を用いてアリトールからD-アルロースを製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 糖アルコールに分類される糖質系甘味料として例えば還元水飴、還元パラチノースが知られている。還元パラチノースは虫歯の原因とならず、しかも低カロリー甘味料である。糖アルコールは各種の用途がありソルビトール、マンニトール等の炭素数が6の糖アルコールは、種々の用途に用いられている。例えば、D-グルコースから水添で作られるD-ソルビトールは化粧品をはじめ甘味料など多くの用途に使用されている。また、タリトール、アリトール、イディトール等は、自然界にはほとんど存在しない糖アルコール（希少糖アルコール）であるが、食品、化粧品、医薬品、化学品、農薬、植物成長調整剤等に用いられることが期待される糖質である。これらの例をみても炭素6の糖アルコールは多くの用途への展開が期待され研究が開始されている。

[0003] しかしながら、様々な機能性が報告されているD-アルロースに比べ、アリトールは未だその有用な機能が明らかでなく、希少糖生産工程において副産物として生じるアリトールは、産業廃棄物とされているのが現状である。こうした糖質ロスの問題は、環境負荷の低減のみならず、食料等の持続可能な生産消費形態を確保する観点から、国内外を問わず解決すべき重要課題となっている。昨今は不要になったものの再利用のリサイクルのみならず、資源の有効循環使用のリユース活動を推進することが要請されている。

アリトールは、糖アルコールに分類される単糖類で、自然界には殆ど存在

しない希少糖アルコールである。その製造方法として原理的には、有機化学的手法によりD-アルロース、L-アルロース等の単糖類を、金属触媒の下、高温高圧下で水素を用いて還元して製造することが可能である。また、特許文献1～4に記載のケトース3-エピメラーゼ等を用いる酵素反応により、アリトール等のポリオールを製造することができる。様々な機能性が報告されているD-アルロースに比べ、アリトールは未だその有用な機能が明らかでなく、希少糖生産工程において生じるアリトールは、産業廃棄物とされているのが現状であることは前述のとおりである。

[0004] そのため、アリトールを有効活用し資源として利用する方法として、アリトールからD-アルロースへの酸化・変換を、微生物を用いて行う生物学的方法が報告されている（非特許文献1、2）が、アリトールからD-アルロース産生能を有する微生物として、2つの菌株が報告されているだけである。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特開平6-125776号公報
特許文献2：特開平8-154696号公報
特許文献3：特開平11-056383号公報
特許文献4：国際公開2014/109254号

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：J. Biosci. Bioeng. (2007) Vol.103, No.3, p.282-285
非特許文献2：Biosci. Biotechnol. Biochem. (2007) Vol.71, No.12, p.3048-3054

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、アリトールからD-アルロースを製造する新規微生物を提供することを課題とする。

また、本発明は、アリトールを有効活用し資源として利用する方法として

、アリトールから、有用な機能が種々報告されているD-アルロースへの酸化・変換を、該微生物を用いて行う生物学的方法を提供することを課題とする

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者等は、上記課題を解決するために、土壌ライブラリーからアリトールに対する高い酸化活性を有する微生物の探索を行うことにより、アリトールからのD-アルロース産生能を有する微生物を広範囲にスクリーニングした。その中からD-アルロースを高収率で製造する微生物を見出し、同定することにより、本発明を完成するに至った。

[0009] 具体的には、アリトールを含有する水溶液に接触させて、アリトールからD-アルロースを生産することができる微生物を選択した。その結果、バークホルデリア属 (*Burkholderia*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、ブティアウクセラ属 (*Buttiauxella*)、およびレリオテア属 (*Lelliottia*) に属し、アリトールからのD-アルロース産生能を有する細菌が探索され、この細菌により、D-アルロースが高収率で製造されることを確認した。

[0010] 本発明は、アリトールからD-アルロース産生能を有する新規微生物に関するものであり、また、該微生物を用いてアリトールからD-アルロースを製造する方法に関するものであり、詳細には、バークホルデリア属 (*Burkholderia*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、ブティアウクセラ属 (*Buttiauxella*)、およびレリオテア属 (*Lelliottia*) に属し、アリトールからD-アルロース産生能を有する細菌を用いる方法に関するものである。

また、該微生物は、D-アルロースを金属触媒の下、高温高圧下で水素を用いて還元してアリトールを製造する過程で、混入する可能性のあるD-タリトールについては、変換する能力を有さないものが好ましい。

[0011] 本発明は、以下の（１）～（６）のアリトールからD-アルロースを製造する方法に係る。

（１）バークホルデリア属（*Burkholderia*）、エンテロバクター属（*Enterobacter*）、アグロバクテリウム属（*Agrobacterium*）、ブティアウクセラ属（*Buttiauxella*）、およびレリオテシア属（*Lelliottia*）に属する細菌からなる群より選択される微生物であって、アリトールからD-アルロースを製造する能力を有する微生物を用いて、原料であるアリトールからD-アルロースを製造する方法。

（２）前記微生物の菌体培養系に、原料であるアリトールを添加して培養することにより行なう、上記（１）に記載の方法。

（３）前記原料であるアリトールが、アリトールを含有する水溶液である、上記（１）または（２）に記載の方法。

（４）前記微生物がD-タリトールを変換する能力を有さない、上記（１）ないし（３）のいずれかに記載の方法。

（５）前記微生物が、バークホルデリア ラタ（*Burkholderia lata*）、バークホルデリア マルティボランス（*Burkholderia multivorans*）、バークホルデリア ディフュサ（*Burkholderia diffusa*）、エンテロバクター ホルマエケイ（*Enterobacter hormaechei*）、エンテロバクター ソリ（*Enterobacter soli*）、アグロバクテリウム プセンス（*Agrobacterium pusense*）、ブティアウクセラ ブレネラエ（*Buttiauxella brennerae*）、ブティアウクセラ sp.（*Buttiauxella sp.*）およびレリオテシア ジェオガリ（*Lelliottia jeotgali*）の細菌種からなる群より選択される、上記（１）ないし（４）のいずれかに記載の方法。

（６）前記微生物が、バークホルデリア ラタ（*Burkholderia*

lata) Y534-1=3株、バークホルデリア ラタ (*Burkholderia lata*) U459-1-1=1株、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*) Y488-4=4株、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*) S332-4=1株、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*) Y555-2d=2株、バークホルデリア ディフュサ (*Burkholderia diffusa*) Y452-1=3株、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*) BCr11-1株、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*) BCr11-2株、エンテロバクター ソリ (*Enterobacter soli*) BDr27-1株、アグロバクテリウム プセンス (*Agrobacterium pusense*) BCr15-1株、ブティアウクセラ ブレネラエ (*Buttiauxella brennerae*) BCr16-1-3株、ブティアウクセラ sp. (*Buttiauxella* sp.) BCr16-1-1株、レリオテイア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) NH309-4株、レリオテイア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) Ou92-1-1株、およびレリオテイア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) T33-1株の細菌からなる群より微生物が選択される、上記(1)ないし(5)のいずれかに記載の方法。

[0012] また、本発明は、以下(7)、(8)のアリトールからD-アルロースを製造する能力を有する微生物、および(9)のアリトールからD-アルロースを製造することのできる培養物に係る。

(7) バークホルデリア ラタ (*Burkholderia lata*)、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*)、バークホルデリア ディフュサ (*Burkholderia diffusa*)、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enter*

obacter hormaechei)、エンテロバクター ソリ (Enterobacter soli)、アグロバクテリウム プセンス (Agrobacterium pusense)、ブティアウクセラ ブレネラエ (Buttiauxella brennerae)、ブティアウクセラ sp. (Buttiauxella sp.) およびレリオテイア ジェオガリ (Lelliottia jeotgali) の細菌種からなる群より選択される、アリトールからD-アルロースを製造する能力を有する微生物。

(8) 前記微生物が、バークホルデリア ラタ (Burkholderia lata) Y534-1=3株、バークホルデリア ラタ (Burkholderia lata) U459-1-1=1株、バークホルデリア マルテイボランス (Burkholderia multivorans) Y488-4=4株、バークホルデリア マルテイボランス (Burkholderia multivorans) S332-4=1株、バークホルデリア マルテイボランス (Burkholderia multivorans) Y555-2d=2株、バークホルデリア ディフュサ (Burkholderia diffusa) Y452-1=3株、エンテロバクター ホルマエケイ (Enterobacter hormaechei) BCr11-1株、エンテロバクター ホルマエケイ (Enterobacter hormaechei) BCr11-2株、エンテロバクター ソリ (Enterobacter soli) BDr27-1株、アグロバクテリウム プセンス (Agrobacterium pusense) BCr15-1株、ブティアウクセラ ブレネラエ (Buttiauxella brennerae) BCr16-1-3株、ブティアウクセラ sp. (Buttiauxella sp.) BCr16-1-1株、レリオテイア ジェオガリ (Lelliottia jeotgali) NH309-4株、レリオテイア ジェオガリ (Lelliottia jeotgali) Ou92-1-1株、およびレリオテイア ジェオガリ (Lelliott

i a j e o t g a l i) T 3 3 - 1 株からなる群より選択される、上記 (7) に記載の微生物。

(9) 上記 (7) または (8) に記載された微生物と培地とを含み、アリトールからD-アルロースを製造することのできる培養物。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、アリトールからD-アルロースを製造することのできる新規微生物を提供でき、不要になったアリトールの再利用のリサイクルのみならず、資源の有効循環使用のリユース活動を推進することができる。

また、有用な機能が未だ明らかにされていないアリトールを原料として、有用な機能が種々報告されているD-アルロースを、生物学的方法によって容易に安価に製造することができる。

細菌の酸化反応を用いてD-アルロースを製造する本発明の方法は、環境に優しい方法であるとともに、高価なNAD(P)⁺等の反応補因子を添加することなく、細菌の持つ補因子を用いた酸化反応で製造できるため、酵素反応法よりも経済的な方法であり、有機化学的手法で実現できなかった、アリトールからD-アルロースを効率的に生産できる方法である。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] 2次スクリーニング条件A~Dにおける、各微生物によるアリトールからD-アルロースの変換量の相対値を示す図。

[図2] 3つの高活性株によるアリトールからD-アルロースの変換率を示す図。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明者等は、土壌ライブラリーを用いて、アリトールを含有する水溶液に接触させて、アリトールからD-アルロースを生産することができる微生物を探索した。

本発明のアリトールからD-アルロースの生産能を有する微生物は、アリトールを含有する水溶液に接触して、D-アルロースを生産し得る微生物であればよく、具体的には、バークホルデリア属 (*Burkholderia*

)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、ブティアウクセラ属 (*Buttiauxella*)、およびレリオテア属 (*Lelliottia*) に属する細菌またはその変異株からなる群より選ばれる、アリトールからD-アルロースを製造する微生物が好適である。

[0016] より具体的には、アリトールからD-アルロース生産能を有するバークホルデリア属 (*Burkholderia*) の細菌は、その能力を有するバークホルデリア属の細菌であれば使用することができる。その能力を有するバークホルデリア属の細菌種には、たとえば、バークホルデリア ラタ (*Burkholderia lata*) バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*)、バークホルデリア ディフュサ (*Burkholderia diffusa*) 等がある。

[0017] アリトールからのD-アルロース産生能が確認されたバークホルデリア ラタ Y534-1=3株、バークホルデリア ラタ U459-1-1=1株、バークホルデリア マルテイボランス Y488-4=4株、バークホルデリア マルテイボランス S332-4=1株、バークホルデリア マルテイボランス Y555-2d=2株、およびバークホルデリア ディフュサ Y452-1=3株は、それぞれ2021年2月16日に千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8所在の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託し、それぞれ、受領番号NITE AP-03413、NITE AP-03410、NITE AP-03412、NITE AP-03408、NITE AP-03414、NITE AP-03411として受領された。その後各菌株は2021年4月30日付けで、それぞれ受託番号NITE P-03413、NITE P-03410、NITE P-03412、NITE P-03408、NITE P-03414、NITE P-03411として寄託された。さらに各菌株は2022年2月1日付けで、それぞれ受託番号NITE BP-03413、NITE BP-03410、NITE BP-03412、NITE

BP-03408、NITE BP-03414、NITE BP-03411として国際寄託された。

[0018] また、アリトールからD-アルロース産生能を有するエンテロバクター属 (*Enterobacter*) の細菌は、その能力を有するエンテロバクター属の細菌であれば使用することができる。その能力を有するエンテロバクター属の細菌種には、たとえば、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*)、エンテロバクター ソリ (*Enterobacter soli*) 等がある。

アリトールからのD-アルロース産生能が確認されたエンテロバクターホルマエケイ BC r 11-1株、エンテロバクター ホルマエケイ BC r 11-2株、およびエンテロバクター ソリ BD r 27-1株は、それぞれ2021年2月16日に千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8所在の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託し、それぞれ、受領番号NITE AP-03400、NITE AP-03401、NITE AP-03405として受領された。その後各菌株は2021年4月30日付けで、それぞれ受託番号NITE P-03400、NITE P-03401、NITE P-03405として寄託された。さらに各菌株は2022年2月1日付けで、それぞれ受託番号NITE BP-03400、NITE BP-03401、NITE BP-03405として国際寄託された。

[0019] また、アリトールからD-アルロース産生能を有するアグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、ブティアウクセラ属 (*Buttiauxella*)、およびレリオテシア属 (*Lelliottia*) に属する細菌は、そのアグロバクテリウム属、ブティアウクセラ属、およびレリオテシア属の細菌であれば使用することができる。その能力を有するアグロバクテリウム属、ブティアウクセラ属、およびレリオテシア属の細菌種には、たとえば、アグロバクテリウム プセンス (*Agrobacterium puense*)、ブティアウクセラ ブレネラエ (*Buttiauxella*

brennerae)、ブティアウクセラ sp. (Buttiauxella sp.) およびレリオテア ジェオガリ (Lelliottia jeotgali) 等がある。

[0020] アリトールからのD-アルロース産生能が確認されたブティアウクセラブレネラエ BC r 1 6 - 1 - 3株、ブティアウクセラ sp. BC r 1 6 - 1 - 1株、レリオテア ジェオガリ NH 3 0 9 - 4株、レリオテア ジェオガリ Ou 9 2 - 1 - 1株、およびレリオテア ジェオガリ T 3 3 - 1株は、それぞれ2021年2月16日に千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8所在の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託し、それぞれ、受領番号NITE AP-03404、NITE AP-03403、NITE AP-03406、NITE AP-03407、NITE AP-03409として受領された。その後各菌株は2021年4月30日付けで、それぞれ受託番号NITE P-03404、NITE P-03403、NITE P-03406、NITE P-03407、NITE P-03409として寄託された。さらに各菌株は2022年2月1日付けで、それぞれ受託番号NITE BP-03404、NITE BP-03403、NITE BP-03406、NITE BP-03407、NITE BP-03409として国際寄託された。

[0021] 本発明の製造方法では、まず、これら細菌を通常栄養培地で培養し、望ましくは、振とう、通気攪拌などの好氣的条件下で培養し増殖させる。培養中に、または得られた生菌体を用いて、水溶液中のアリトールをD-アルロースに変換させ、生成したD-アルロースを採取する。このように、D-アルロースの酸化に用いる細菌は、培養液中のそれを利用することができる。具体的には、バークホルデリア ラタ (Burkholderia lata) Y 5 3 4 - 1 = 3株、バークホルデリア ラタ (Burkholderia lata) U 4 5 9 - 1 - 1 = 1株、バークホルデリア マルテイボランス (Burkholderia multivorans) Y 4 8 8 - 4 = 4株、バークホルデリア マルテイボランス (Burkholderia

multivorans) S332-4=1株、バークホルデリア マルティボランス (*Burkholderia multivorans*) Y555-2d=2株、バークホルデリア ディフュサ (*Burkholderia diffusa*) Y452-1=3株、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*) BCr11-1株、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*) BCr11-2株、エンテロバクター ソリ (*Enterobacter soli*) BDr27-1株、アグロバクテリウム プセンス (*Agrobacterium pusense*) BCr15-1株、ブティアウクセラ ブレネラエ (*Buttiauxella brennerae*) BCr16-1-3株、ブティアウクセラ sp. (*Buttiauxella* sp.) BCr16-1-1株、レリオティア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) NH309-4株、レリオティア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) Ou92-1-1株、およびレリオティア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) T33-1株から選ばれる、アリトールからD-アルロースを選択的に製造する微生物と培地とを含む、アリトールからD-アルロースを製造することのできる培養物を利用することができる。また、培養液から分離された生菌体およびこれを乾燥した菌体を利用することもできる。

[0022] 培養方法としては、これらの細菌が必要とする栄養源、例えば、炭素源、窒素源、無機塩、酵母エキスなどを含有する栄養培地、望ましくは液体培地に、アリトールからD-アルロース産生能を有する細菌を植菌し、温度20～40℃で、1～10日間好氣的条件下で培養する。

[0023] このような培養方法によって得られた生菌体を、アリトールを含有する水溶液と接触、望ましくは、振盪、通気攪拌、酸素の圧入などの所定の条件下で接触させ、アリトールをD-アルロースに変換させる。振盪下にて30℃で反応を行うと、2日後にアリトールの最大20w/w%がD-アルロースに変換する。

また、これらの細菌は、固定化しての利用が可能であり、種々の固定化方法、たとえば担体結合法、架橋法、ゲル包括法、マイクロカプセル化法等によって活性の高い固定化細菌を得ることができる。

[0024] 以上述べた各種の方法により生成され蓄積したD-アルロースを含有する水溶液は、適当な分離方法、例えば、遠心分離、ろ過などの方法によって菌体などの不溶物と分離され、採取される。得られたD-アルロース水溶液は、必要により、例えば、活性炭処理、イオン交換樹脂を用いた処理などの方法で精製し、濃縮してシラップ状あるいは結晶状のD-アルロース製品を採取することができる。

[0025] 本発明方法によると、D-アルロースは原料のアリトールに対し、最大20w/w%の収率で得られるので、工業的製造法として好適であり、これにより医薬品工業あるいは食品工業をはじめとする各種産業における原料もしくは中間体として、D-アルロースを大量かつ安価に供給することができる。

それによって、不要になったアリトールの再利用のリサイクルのみならず、資源の有効循環使用のリユース活動を推進することが可能となった。ケトースは対応する二種類の糖アルコールへ変換することから、ケトースに分類される単糖であるD-アルロースは、水添によりアリトールとD-タリトールへ変換される。混入する可能性のあるD-タリトールについて、本発明の微生物のD-タリトールへの反応性を調べた結果、D-タリトールは基質としないことが分かったので、当該微生物のさらなる利用方法の研究が待たれる。

以下に、本発明を実施例に基づいて詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例 1

[0026] [D-アルロース産生菌のスクリーニング]

土壌ライブラリーからの一次スクリーニングとして、5%の各種ポリオール（アリトール、D-タリトール、D-ソルビトール）を含有する無機塩培地を用いて培養し、培養上清中に生産されたケトースをシステインカルバゾ

ール法により検出した。

一次スクリーニングにおいてアリトールに対してのみ酸化活性を示した微生物群の中から、アリトールに対する高い酸化活性を有する微生物選抜のため、4種の条件による微生物2次スクリーニングを行った。

[0027] 条件AおよびC：

T S B寒天培地により30℃にて培養した菌体を用いて、条件Aは0.5%のアリトール溶液に、条件Cは10%のアリトール溶液にそれぞれ懸濁して、30℃で24時間振盪した後、アリトールからD-アルロースへの変換について、H P L Cを用いて評価した。

条件BおよびD：

条件Bは10%のアリトール、条件Dは5%のアリトールを、それぞれ含有する酵母エキス液体培地に各微生物を植え、30℃で24時間振盪培養した後、その生育に伴うアリトールからプシコースへの変換について、H P L Cを用いて評価した。

[0028] [結果]

2次スクリーニングとして、土壌から単離した微生物群のアリトールからD-アルロースへの変換活性を、条件A~Dの4パターンのスクリーニング方法にて定性評価した。その結果、15種の細菌が高活性株として取得された(表1)。日本食品分析センターによる微生物同定の結果、バークホルデリア属(*Burkholderia*)、エンテロバクター属(*Enterobacter*)、アグロバクテリウム属(*Agrobacterium*)、ブティアウクセラ属(*Buttiauxella*)、およびレリオティア属(*Lelliottia*)に分類された。

15個の高活性株の整理番号は、A06、A12、A17、A29、A39、A54、A90、A173、A201、A324、A325、A335、A354、A355、A358であり、対照の低活性株の整理番号は、A44、A119、A162、A219、A322、A363、A419である。

[0029] [表1]

整理番号	菌株番号	高活性株	対照株	微生物種	スクリーニングA	スクリーニングB	スクリーニングC	スクリーニングD
A06	Y534-1=3	●		<i>Burkholderia lata</i>	*	*		
A12	U459-1-1=1	●		<i>Burkholderia lata</i>	*	*		
A29	Y498-4=4	●		<i>Burkholderia multivorans</i>	*	*		
A39	S332-4=1	●		<i>Burkholderia multivorans</i>	*	*		
A54	Y555-2d=2	●		<i>Burkholderia multivorans</i>	*	*		
A44	U422-1=3		●	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	*			
A119	AAa12-2		●	<i>Paenibacillus alvei / Paenibacillus sp.</i>	*			
A17	Y452-1=3	●		<i>Burkholderia diffusa</i>		*		
A173	NH309-4	●		<i>Leliotia jeotgali</i>		*	*	
A324	BCr11-1	●		<i>Enterobacter hormaechei</i>		*	*	
A325	BCr11-2	●		<i>Enterobacter hormaechei</i>		*	*	
A335	BCr15-1	●		<i>Agrobacterium pusense</i>		*	*	
A354	BCr18-1-1	●		<i>Bulliauxella sp.</i>		*	*	
A355	BCr18-1-3	●		<i>Bulliauxella brennerae</i>		*	*	
A322	BCu10-2		●	<i>Pantoea vagans / Pantoea rodasii</i>		*		
A162	Y1192B-2		●	<i>Flavobacterium sp. / Sphingobacterium mizutai</i>			*	
A219	UA144		●	<i>Aeromonas veronii / Aeromonas enteropelogenes</i>			*	
A90	T33-1	●		<i>Leliotia jeotgali</i>				*
A201	Ou92-1-1	●		<i>Leliotia jeotgali</i>				*
A358	BDr27-1	●		<i>Enterobacter soli</i>				*
A363	BDa82-2		●	<i>Arthrobacter woluwensis</i>				*
A418	BEu2-2		●	<i>Chryseobacterium cucumeris</i>				*

[0030] また、図1に、これら高活性株として取得された菌株と、対照とした低活性株の定性評価結果を、条件A～Dのそれぞれの評価方法において最も高い活性を示した菌株の活性を100%とした相対値の活性を示す。

条件Aのスクリーニングでは、A12のバークホルデリア ラタ (*Burkholderia lata*) U459-1-1=1株が、条件Bおよび条件Cのスクリーニングでは、A335のアグロバクテリウム プセンス (*Agrobacterium pusense*) BCr15-1株が、条件Dのスクリーニングでは、A201のレリオテイア ジェオガリ (*Leliotia jeotgali*) Ou92-1-1株が、最も高い活性を示す菌株であった。

実施例 2

[0031] [条件Dで選抜した高活性株のアリトールからD-アルロースへの変換の経時評価]

2次スクリーニングの条件Dで選抜した高活性株A90 (レリオテイア ジェオガリ T33-1株、A201 (レリオテイア ジェオガリ Ou92-1-1株)、A358 (エンテロバクター ソリ BDr27-1株)を用いて、アリトールからD-アルロースへの変換の経時評価を次のように実施した。

[0032] それぞれの菌株を酵母エキス液体培地にて30℃で培養した菌体を、リン酸緩衝液を用いて洗浄し、10%アリトールおよびリン酸緩衝液 (pH7、

0) からなる溶液に濁度 20 となるように懸濁して、30℃にて振盪し、5、9、15、25、40、および50時間の各点において反応液の一部を採取した。各反応液を遠心分離して菌体を除去し、脱塩およびフィルターろ過後、HPLCで生産物を確認して、アリトールからD-アルロースへの変換を評価した。

いずれのアッセイにおいても、アリトールおよびD-アルロースのHPLCによる分離・定量は、GL-C611カラムを用いて行った。

[0033] 結果を図2に示す。

A358 (エンテロバクター ソリ BDr27-1 株) が最も変換効率が高く、50時間で18%のアリトールをD-アルロースに変換できた。

レリオテア属またはエンテロバクター属に属する3株を対象として、洗浄菌体反応によるアリトールからD-アルロースへの変換の経時評価を実施した結果、いずれの菌株においても経時的なアリトールからD-アルロースへの変換が認められた。

産業上の利用可能性

[0034] 本発明は、従来の有機化学的手法では所定の割合で得ることの困難であった、アリトールからD-アルロースの製造を、本発明の新規微生物を用いた生物学的方法によって、容易に製造する方法を確立するものである。

したがって、本発明の方法はD-アルロースの生物学的製造法として好適であり、本発明の新規微生物は、その方法に用いる微生物として有用である。

。

請求の範囲

- [請求項1] バークホルデリア属 (*Burkholderia*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、ブティアウクセラ属 (*Buttiauxella*)、およびレリオテシア属 (*Lelliottia*) に属する細菌からなる群より選択される微生物であって、アリトールからD-アルロースを製造する能力を有する微生物を用いて、原料であるアリトールからD-アルロースを製造する方法。
- [請求項2] 前記微生物の菌体培養系に、原料であるアリトールを添加して培養することにより行なう、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記原料であるアリトールが、アリトールを含有する水溶液である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記微生物がD-タリトールを変換する能力を有さない、請求項1ないし3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] 前記微生物が、バークホルデリア ラタ (*Burkholderia lata*)、バークホルデリア マルティボランス (*Burkholderia multivorans*)、バークホルデリア ディフュサ (*Burkholderia diffusa*)、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*)、エンテロバクター ソリ (*Enterobacter soli*)、アグロバクテリウム プセンス (*Agrobacterium pusense*)、ブティアウクセラ ブレネラエ (*Buttiauxella brennerae*)、ブティアウクセラ sp. (*Buttiauxella sp.*) およびレリオテシア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) の細菌種からなる群より選択される、請求項1ないし4のいずれかに記載の方法。
- [請求項6] 前記微生物が、バークホルデリア ラタ (*Burkholderia lata*) Y534-1=3株、バークホルデリア ラタ (Bu

Burkholderia lata) U459-1-1=1株、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*) Y488-4=4株、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*) S332-4=1株、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*) Y555-2d=2株、バークホルデリア ディフュサ (*Burkholderia diffusa*) Y452-1=3株、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*) BCr11-1株、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*) BCr11-2株、エンテロバクター ソリ (*Enterobacter soli*) BDr27-1株、アグロバクテリウム プセンス (*Agrobacterium pusense*) BCr15-1株、ブティアウクセラ ブレネラエ (*Buttiauxella brennerae*) BCr16-1-3株、ブティアウクセラ sp. (*Buttiauxella* sp.) BCr16-1-1株、レリオテア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) NH309-4株、レリオテア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) Ou92-1-1株、およびレリオテア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) T33-1株からなる群より選択される、請求項1ないし5のいずれかに記載の方法。

[請求項7]

バークホルデリア ラタ (*Burkholderia lata*)、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*)、バークホルデリア ディフュサ (*Burkholderia diffusa*)、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*)、エンテロバクター ソリ (*Enterobacter soli*)、ア

グロバクテリウム プセンス (*Agrobacterium pusense*)、ブティアウクセラ ブレネラエ (*Buttiauxella brennerae*)、ブティアウクセラ sp. (*Buttiauxella* sp.) およびレリオテア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) の細菌種からなる群より選択される、アリトールからD-アルロースを製造する能力を有する微生物。

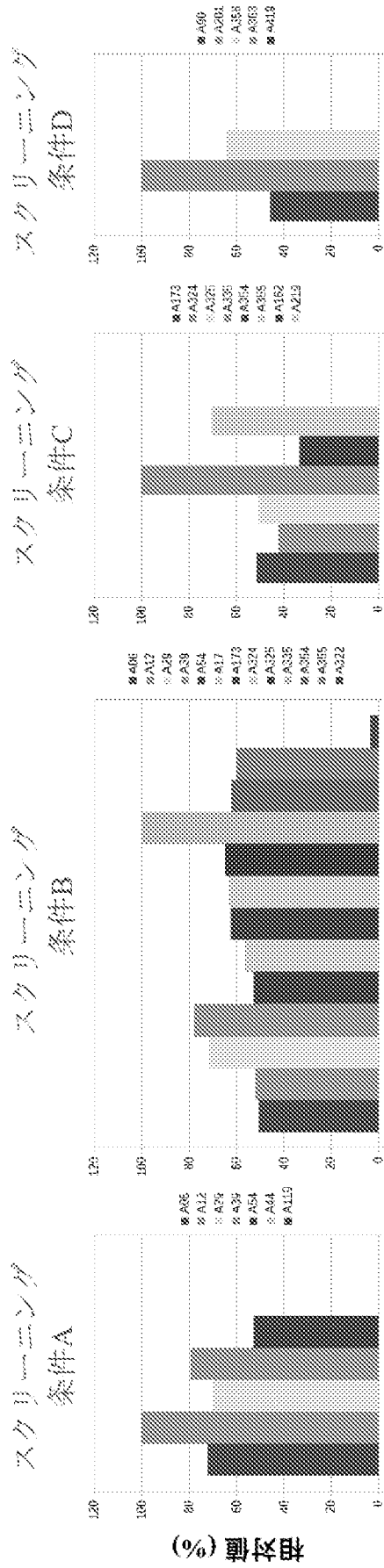
[請求項8]

前記微生物が、バークホルデリア ラタ (*Burkholderia lata*) Y534-1=3株、バークホルデリア ラタ (*Burkholderia lata*) U459-1-1=1株、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*) Y488-4=4株、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*) S332-4=1株、バークホルデリア マルテイボランス (*Burkholderia multivorans*) Y555-2d-2株、バークホルデリア ディフュサ (*Burkholderia diffusa*) Y452-1=3株、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*) BCr11-1株、エンテロバクター ホルマエケイ (*Enterobacter hormaechei*) BCr11-2株、エンテロバクター ソリ (*Enterobacter soli*) BDr27-1株、アグロバクテリウム プセンス (*Agrobacterium pusense*) BCr15-1株、ブティアウクセラ ブレネラエ (*Buttiauxella brennerae*) BCr16-1-3株、ブティアウクセラ sp. (*Buttiauxella* sp.) BCr16-1-1株、レリオテア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) NH309-4株、レリオテア ジェオガリ (*Lelliottia jeotgali*) Ou92-1-

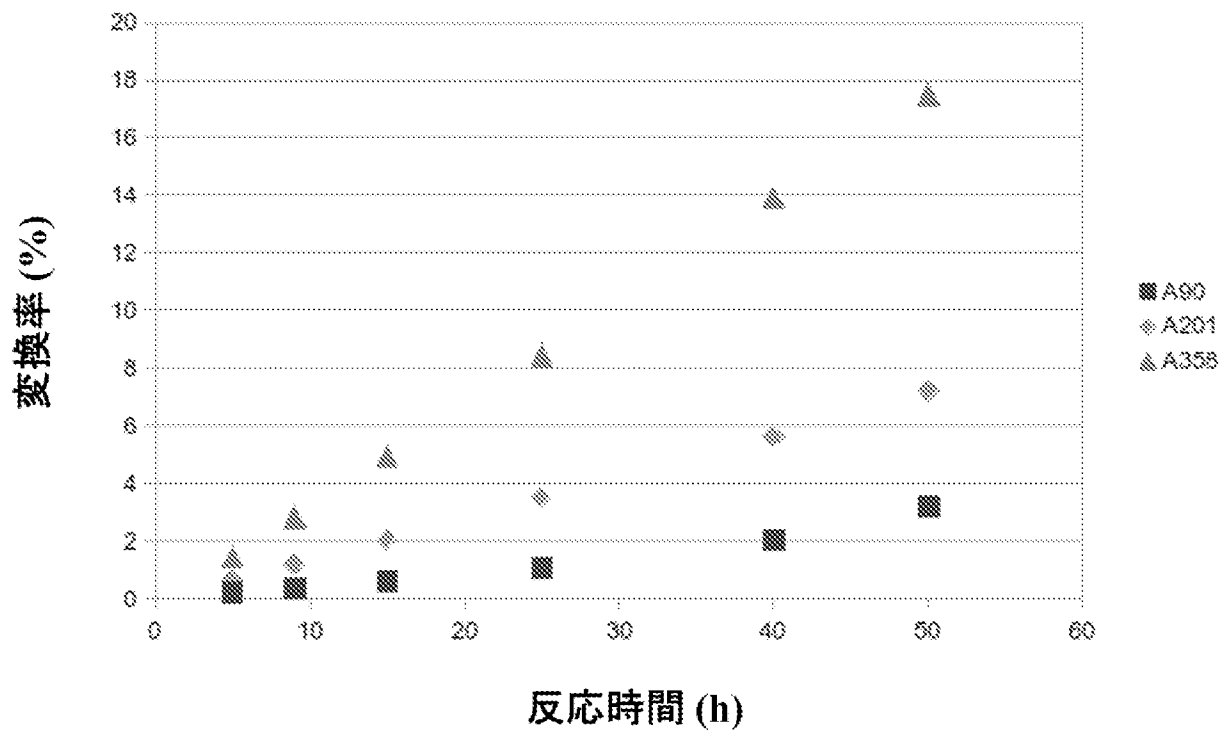
1株、およびレリオテア ジェオガリ (*L e l l i o t t i a j e o t g a l i*) T33-1株からなる群より選択される、請求項7に記載の微生物。

[請求項9] 請求項7または8に記載された微生物と培地とを含み、アリトールからD-アルロースを製造することのできる培養物。

【図1】



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/007239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12P 19/02</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/20</i> (2006.01)i FI: C12P19/02; C12N1/20		
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) C12P19/02; C12N1/20		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 8-56659 A (HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC) 05 March 1996 (1996-03-05) claims, paragraphs [0023]-[0041], experiment 3, example 5	1-4
Y	claims, paragraphs [0023]-[0041], experiment 3, example 5	1-9
X	WO 2008/062570 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KAGAWA UNIVERSITY) 29 May 2008 (2008-05-29) examples 1, 2	1-4
Y	examples 1, 2	1-9
X	GULLAPALLI, P. et al. Bioproduction of D-psicose from allitol with <i>Enterobacter aerogenes</i> IK7: a new frontier in rare ketose production. <i>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry</i> . 2007, vol. 71, no. 12, pp. 3048-3054 abstract, p. 3049, right column, lines 4-11, Results and Discussion, table 2, fig. 5	1-4
Y	abstract, p. 3049, right column, lines 4-11, Results and Discussion, table 2, fig. 5	1-9
Y	POONPERM, W. et al. Efficient Conversion of Allitol to D-Psicose by <i>Bacillus pallidus</i> Y25. <i>JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING</i> . 2007, vol. 103, no. 3, pp. 282-285 abstract, p. 282, left column, line 19 to p. 283, left column, line 1 from the bottom	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 application or patent 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 25 April 2022		Date of mailing of the international search report 17 May 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/007239

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LU, F. et al. Polyol dehydrogenases: intermediate role in the bioconversion of rare sugars and alcohols. Applied Microbiology and Biotechnology. 2019, vol. 103, pp. 6473-6481 abstract, p. 6477, section "Transformation between D-allulose and allitol by RDH", table 1	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/007239

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	8-56659	A	05 March 1996	(Family: none)	
WO	2008/062570	A1	29 May 2008	US 2010/0167350 A1 examples 1, 2 EP 2096164 A1 KR 10-2009-0083939 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12P 19/02(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i FI: C12P19/02; C12N1/20		
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）） C12P19/02; C12N1/20 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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
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） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)		
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 請求項の番号
X	JP 8-56659 A (株式会社林原生物化学研究所) 05.03.1996 (1996-03-05) 特許請求の範囲、段落0023-0041の実験3、実施例5	1-4
Y	特許請求の範囲、段落0023-0041の実験3、実施例5	1-9
X	WO 2008/062570 A1 (国立大学法人香川大学) 29.05.2008 (2008-05-29) 実施例1、2	1-4
Y	実施例1、2	1-9
X	GULLAPALLI, P. et al., Bioproduction of D-psicose from allitol with Enterobacter aerogenes IK7: a new frontier in rare ketose production, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, Vol. 71, No. 12, P. 3048-3054 要約、第3049頁右欄第4-11行、Results and Discussion、表2、図5	1-4
Y	要約、第3049頁右欄第4-11行、Results and Discussion、表2、図5	1-9
Y	POONPERM, W. et al., Efficient Conversion of Allitol to D-Psicose by Bacillus pallidus Y25, JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 2007, Vol. 103, No. 3, P. 282-285 要約、第282頁左欄第19行-第283頁左欄下から第1行	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な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 “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 “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） “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 “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “&” 同一パテントファミリー文献 “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	
国際調査を完了した日	25.04.2022	国際調査報告の発送日 17.05.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 斉藤 貴子 4N 4509 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

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 請求項の番号
Y	LU, F. et al., Polyol dehydrogenases: intermediate role in the bioconversion of rare sugars and alcohols, Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, Vol. 103, P. 6473-6481 要約、第6477頁Transformation between D-allulose and allitol by RDHの項、表1	1-9

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/007239

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 8-56659 A	05.03.1996	(ファミリーなし)	
WO 2008/062570 A1	29.05.2008	US 2010/0167350 A1 実施例 1、2	
		EP 2096164 A1	
		KR 10-2009-0083939 A	