

明 細 書

発明の名称： 2，3－ブタンジオールの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、微生物発酵による2，3－ブタンジオールの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 2，3－ブタンジオールは（以下、「2，3－BDO」と呼ぶことがある）は、医薬品や化粧品の中間体原料、インク、香水、液晶、殺虫剤、軟化試薬、爆薬、可塑剤などの原料として用いられる有用な化合物であり、具体例として、メチルエチルケトン（非特許文献1）や1，3－ブタジエン（非特許文献2）の原料となりうる。2，3－BDOは工業的には2－ブテンオキシドを過塩素酸水溶液中で加水分解する方法で製造されている。また、近年では石油資源の枯渇や温暖化問題への対応として持続可能な循環型社会への転換が迫られており、化学産業においても、石油原料からバイオマス由来原料へのシフトが盛んに研究されている中で、微生物発酵法による2，3－ブタンジオールの製造方法が注目されつつある。

[0003] 2，3－ブタンジオールを効率よく発酵生産する微生物には*Klebsiella pneumoniae*（非特許文献3）、*Klebsiella oxytoca*（非特許文献4）などの腸内細菌が知られている。これらの微生物は発酵に特定のビタミンやアミノ酸等を必要としないため、発酵液から2，3－ブタンジオールを単離・精製する際に必要となる工程が少なくすむという利点がある。しかしながら、これらの微生物には病原性があり、呼吸器感染症などを引き起こすことが知られている。そのため産業的な2，3－ブタンジオール製造を目的としてこれらの発酵菌を大量培養しようとした場合には厳重な管理のための設備が必要であり、コストの増大に繋がる。

[0004] 生物的に安全であり、かつ発酵効率のよい2，3－ブタンジオール発酵微生物としては、例えば*Bacillus licheniformis*（非

特許文献5)、*Bacillus amyloliquefaciens* (非特許文献6)などのバチルス科細菌を用いる方法が開示されている。しかしながら、*Bacillus licheniformis*による2, 3-ブタンジオール発酵では発酵を促進するための栄養源として高価な動物性エキスを使用する必要がある。また、*Bacillus amyloliquefaciens*による2, 3-ブタンジオール発酵では発酵を促進するためにクエン酸アンモニウムが使用されるが、クエン酸は2, 3-ブタンジオールと沸点が近いため、培養液中に残存した場合には2, 3-ブタンジオールの単離・精製が困難である。

[0005] 一方、微生物発酵の発酵原料としては、従来の可食バイオマス由来の糖の他、非可食バイオマス由来の糖が注目されている。発酵原料として非可食バイオマス由来の糖を使用する際には、非可食バイオマスに含まれるセルロース、ヘミセルロースなどを糖化酵素によって糖に分解するが、この際にグルコースなどの六炭糖だけではなく、キシロースなどの五炭糖も同時に得られる。そのため、五炭糖を含む原料の効率的な発酵技術の開発が求められている。

[0006] 五炭糖から2, 3-ブタンジオールを効率よく発酵生産する微生物には*Klebsiella oxytoca* (非特許文献3)などの腸内細菌が知られている。これらの微生物は発酵に特定のビタミンやアミノ酸等を必要としないため、発酵液から2, 3-ブタンジオールを精製する際に必要となる工程が少なくすむという利点がある。しかしながら、これらの微生物には病原性があり、呼吸器感染症などを引き起こすことが知られている。そのため産業的な2, 3-ブタンジオール製造を目的としてこれらの発酵菌を大量培養しようとした場合には厳重な管理のための設備が必要であり、コストの増大に繋がる。

[0007] 一方、生物的に安全であり、かつ五炭糖を2, 3-ブタンジオールへと発酵する微生物としては、例えば*Bacillus licheniformis* (非特許文献9)や*Paenibacillus polymyxa*な

どのバチルス科細菌（非特許文献10）を用いる方法が開示されている。しかしながら、これらの微生物を用いる2, 3-ブタンジオール発酵では酵母エキスや動物性タンパク加水分解物などの高価な副原料を使用するため、コストが増大する。

[0008] また、ザイモバクター（*Zymobacter*）属微生物にキシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼをコードする外来遺伝子が導入され、五炭糖を資化する能力を有するザイモバクター属の形質転換微生物が知られている（特許文献1、特許文献2）。しかしながら、この形質転換微生物が、エタノール生産性を有することは、特許文献1及び2に記載されているが、五炭糖を2, 3-ブタンジオールへと発酵する能力については記載も示唆もない。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開2005-261421号公報

特許文献2：米国特許出願公開2007/0298476号

非特許文献

[0010] 非特許文献1：A. N. Bourns, The Catalytic Action Of Aluminium Silicates, Canadian J. Res. (1947年)

非特許文献2：Nathan Schlechter, Pyrolysis of 2, 3-butylene Glycol Diacetate to Butadiene, Indu. Eng. Chem. 905 (1945年)

非特許文献3：Ma CQ, Enhanced 2, 3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. Appl Microbiol Biotechnol 2009; 82: 49-57

非特許文献4：Ji XJ, Engineering *Klebsiella*

a oxytoca for efficient 2, 3-butane diol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 85: 1751-8.

非特許文献5: S. S. Nilegaonkar, Potential of *Bacillus licheniformis* for the production of 2, 3-butanediol. Journal of Fermentation and Bioengineering Volume 82, Issue 4, 1996, Pages 408-410

非特許文献6: Yang T, Optimization and scale-up of 2, 3-butanediol production by *Bacillus amyloliquefaciens* B10-127. World J Microbiol Biotechnol. 2012 Apr; 28 (4) : 1563-74

非特許文献7: Okamoto T, *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. Arch Microbiol. 1993; 160 (5) : 333-7.

非特許文献8: Jansen NB, Production of 2, 3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Biotechnol Bioeng. 1984 Apr; 26 (4) : 362-9.

非特許文献9: Wang Q, Metabolic engineering of thermophilic *Bacillus licheniformis* for chiral pure D-2, 3-butan

ediol production. Biotechnol Bioeng. 2012 Jul; 109 (7) : 1610-21.

非特許文献10: Marwoto B, Metabolic analysis of acetate accumulation during xylose consumption by *Paenibacillus polymyxa*. Appl Microbiol Biotechnol. 2004 Mar; 64 (1) : 112-9.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 前述のとおり、従来の微生物発酵による2, 3-ブタンジオールの製造方法において生物的に安全な微生物を用いる場合、高コストになる、あるいは副生物との分離が困難であることが課題であった。

[0012] そこで本発明は、生物的に安全な微生物を利用した微生物発酵による2, 3-ブタンジオールの製造方法を確立することを目的とする。さらに、炭素源として五炭糖を含む発酵原料から、生物的に安全な微生物を利用した微生物発酵による経済的な2, 3-ブタンジオールの製造方法を確立することをも目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、これまで2, 3-ブタンジオール発酵微生物としては知られていなかったザイモバクター (*Zymobacter*) 属細菌が2, 3-ブタンジオール発酵能を有することを見出し、本発明を完成するに至った。また、該ザイモバクター属細菌として、五炭糖を資化する能力を有するものを用いることにより、五炭糖から2, 3-ブタンジオールを製造することが可能であることを見出した。

[0014] すなわち、本発明は以下の(1)～(15)の通りである。

(1) 炭素源を含む発酵原料中で、ザイモバクター (*Zymobacter*) 属微生物を培養する工程 (工程A)、および

該工程で得られた培養液から2, 3-ブタンジオールを精製する工程 (工

程B)を含む、2, 3-ブタンジオールの製造方法。

(2) 前記微生物がザイモバクター・パルメ (*Zymobacter palmae*) である、(1)に記載の方法。

(3) 前記工程Aが通気条件下での培養である、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 前記工程Aが酸素移動容量係数 (kLa) 9 h^{-1} 以上の条件での培養である、(1)から(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 前記工程AがpH 5~7の条件での培養である、(1)から(4)のいずれかに記載の2, 3-ブタンジオールの製造方法。

(6) 前記工程Aが総糖濃度 20 g/L 以上の培地での培養である、(1)から(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 前記炭素源が、五炭糖を含み、前記ザイモバクター属微生物が、五炭糖を資化する能力を有する(1)から(6)のいずれかに記載の方法。

(8) 前記微生物が、キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼから選ばれる少なくとも1つの酵素をコードする外来遺伝子が導入されたザイモバクター属の形質転換微生物である、(1)から(7)に記載の方法。

(9) 前記微生物が、キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼをコードする外来遺伝子が導入されたザイモバクター属の形質転換微生物である、(8)に記載の方法。

(10) 前記工程Aの発酵原料に含まれる五炭糖がキシロースである、(7)から(9)のいずれかに記載の方法。

(11) 前記発酵原料中の総糖に対するキシロースの存在比率が5~100%である、(7)から(10)のいずれかに記載の方法。

(12) 前記発酵原料がバイオマス由来の糖液を含む、(7)から(11)のいずれかに記載の方法。

(13) 前記工程Aの発酵原料がコーンステープリカーを含む、(1)から(12)のいずれかに記載の方法。

(14) 前記工程Bが蒸留工程を含む、(1)から(13)のいずれかに記載の方法。

(15) 前記蒸留工程前に脱塩処理工程を含む、(14)に記載の方法。

(16) 前記脱塩処理工程としてイオン交換処理工程を含む、(15)に記載の方法。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、微生物発酵にて発酵原料から2, 3-ブタンジオールを製造する方法において、従来技術に比べて安全かつ経済的に2, 3-ブタンジオールを得ることができる。また、発酵原料が炭素源として五炭糖を含む場合でも、安全かつ経済的に五炭糖から2, 3-ブタンジオールを得ることができる。

発明を実施するための形態

[0016] 工程A：2, 3-ブタンジオール発酵工程

本発明では2, 3-ブタンジオール（以下、「2, 3-BDO」と呼ぶことがある）発酵微生物としてザイモバクター（*Zymobacter*）属細菌を使用することを特徴とする。使用する微生物は自然環境から単離されたものでもよく、突然変異や遺伝子組換えによって一部性質が改変されたものでもよい。2, 3-BDOの発酵能を有するザイモバクター属細菌の具体例としては、2, 3-BDO発酵能の観点からザイモバクター・パルメ（*Zymobacter palmae*）が好ましく利用される。

[0017] 発酵原料は、同化可能な炭素源、同化可能な窒素源、無機塩類、および必要に応じてアミノ酸、およびビタミンなどの有機微量栄養素を適宜含有する通常の液体培地が良い。また、発酵を効率よく行うことを目的に適宜消泡剤を含有させてもよい。

[0018] 同化可能な炭素源の具体例としては、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、シュクロース、スターチ、廃糖蜜、澱粉などの糖類、クエン酸、コハク酸、酢酸などの有機酸、グリセロール、エタノールなどのアルコールが用いられるが、好ましくは糖類が用いられる。糖類が用いられ

る場合の培地中の糖類の濃度は、後段の 2, 3-ブタンジオール精製工程を効率よく行うために通常、15 g/L 以上、好ましくは 20 g/L 以上である。培地である発酵原料中の総糖濃度は、通常、15~500 g/L であり、20~300 g/L が好ましい。総糖濃度が 15 g/L 以下であると、炭素源からの収率向上の効果が低下してしまうことがある。また、総糖濃度が低いと 2, 3-BDO の生産効率も低下してしまう。

[0019] 同化可能な窒素源の具体例としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、アミノ酸、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば、油粕類、大豆加水分解物、カゼイン加水分解物、動物組織加水分解物、コーンステープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用される。このうち有機窒素源としては大豆加水分解物またはコーンステープリカーが好ましく、コーンステープリカーがより好ましい。発酵原料に含まれるコーンステープリカーの濃度は特に限定されないが、例えばコーンステープリカーに含まれる固形分として、通常、2.5 g/L~35 g/L、好ましくは 5 g/L~25 g/L、より好ましくは 10 g/L~20 g/L である。コーンステープリカーに含まれる固形分の測定方法としては特に限定されないが、例えば、加熱乾燥における乾燥前後の重量差を水分含量とし、乾燥前の重量より水分含量を引いた残りを固形分として求めることができる。

無機塩類としては、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩およびマンガン塩等を適宜添加使用することができる。

[0020] その他、微生物の生育に応じてニコチン酸を培地に適宜添加使用してもよく、また、消泡剤を適宜添加使用してもよい。

[0021] 培養温度は、微生物が生育する範囲であれば特に限定されないが、通常、温度が 20~50℃、好ましくは 25~40℃ の範囲で行われる。また、培養時間は、精製可能な量の 2, 3-BDO が培地に蓄積される時間であればよく、培地中の炭素源濃度又は生成した 2, 3-BDO 濃度を経時的にモニターすることにより適宜設定することが可能であり、特に限定されないが、

通常、1時間～300時間、好ましくは4時間～150時間である。

[0022] 培養時の培地pHは、無機あるいは有機の酸、アルカリ性物質、さらには尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガスなどによって、通常、pH4～8の範囲内に維持されるが、pH5～7に調節して培養を行うことが好ましく、pH5以上6未満がより好ましい。

[0023] 微生物の培養形態には特に制限はなく、バッチ培養、流加発酵、連続培養などで行う。

[0024] 本発明では通気条件下で微生物を培養することが好ましい。本発明における通気とは、培養槽の内部に酸素を含む気体を流入させることを意味する。通気方法としては特に制限はないが、例えば、培養液中に酸素を含んだ気体を通過させる方法のほかに、培養液上の空気層を、酸素を含む気体で置換する上面通気も含まれる。また、上面通気には培養槽に酸素を含む気体を吹き込む方法のほかに、大気開放された状態で培養液を攪拌することで培養液上に空気の流れを生じさせ、培養液中に酸素を供給する方法も含まれる。本発明では、培養液中に酸素を含んだ気体を通過させる方法によって通気することが好ましい。

[0025] 微生物の培養における培地への酸素供給条件は、通気と攪拌とを組み合わせることで適宜設定でき、常圧で30℃の水を対象とした場合の酸素移動容量係数 kLa (h^{-1}) (以下、単に kLa と略す。) で表される。 kLa とは、通気攪拌時において、単位時間に気相から液相へ酸素を移動させ溶存酸素を生成させる能力を示すものであり、以下の式(1)で定義される。(生物工学実験書、日本生物工学会編、培風館、p. 310 (1992))。

$$dC/dt = kLa \times (C^* - C) \cdots \text{式(1)}。$$

ここで、 C ：培養液中の溶存酸素濃度DO (ppm)、 C^* ：微生物による酸素の消費がない場合の気相と平衡の溶存酸素濃度DO (ppm)、 kLa ：酸素移動容量係数 (h^{-1}) である。上記式(1)より、下記式(2)が導かれるため、通気した時間に対して、 $C^* - C$ の対数をプロットすることで、 kLa を求めることができる。

$$\ln(C^* - C) = -k_L a \times t \cdots \text{式(2)}。$$

[0026] 本発明での $k_L a$ は気体置換法（ダイナミック法）により測定される数値である。気体置換法（ダイナミック法）とは、溶存酸素濃度電極を差し込んだ通気攪拌培養装置に水を入れ、これらの液体中の酸素を窒素ガスにより置換して該液体の酸素濃度を低下させ、次に窒素ガスを圧縮空気に切り替え、所定の通気速度、攪拌速度および温度下での溶存酸素の上昇過程を測定することにより $k_L a$ を計算する方法である。

[0027] 本発明での培養時に設定する $k_L a$ は特に制限されないが、好ましくは 9 h^{-1} 以上である。 $k_L a$ の上限は、特に限定されないが、好ましくは 200 h^{-1} 以下である。

[0028] 本発明の方法において、発酵原料が、同化可能な炭素源として五炭糖を含み、五炭糖を資化する能力を有するザイモバクター（*Zymobacter*）属微生物を培養することにより、該五炭糖を原料として2，3－ブタンジオールを製造することができる。この場合、使用するザイモバクター属細菌は自然環境から単離されたものでもよく、突然変異や遺伝子組換えによって一部性質が改変されたものでもよい。2，3－ブタンジオールの発酵能を有するザイモバクター属細菌の具体例としては、2，3－ブタンジオール発酵能の観点からザイモバクター・パルメ（*Zymobacter palmae*）が好ましく利用される。ザイモバクター・パルメは通常五炭糖を資化しないが、五炭糖の資化に関わる遺伝子を導入することで付与することができる。

[0029] 本発明で導入する遺伝子としては、アルドペントースをケトペントースに異性化する酵素遺伝子を用いることができる。用いる遺伝子としては、例えばペントースイソメラーゼ、ペントースレダクターゼおよび／またはペントールデヒドロゲナーゼなどが挙げられる。

[0030] ペントースイソメラーゼは、五炭糖（ペントース）のうち構造異性体であるアルドペントースとケトペントースの異性化を触媒する酵素として定義される。本発明に用いられるペントースイソメラーゼは五炭糖の直接的な異性

化を触媒する活性を持っていれば特に限定されないが、例えば、キシロースイソメラーゼ（EC 5. 3. 1. 5）やアラビノースイソメラーゼ（EC 5. 3. 1. 3）が挙げられる。この中で、例えばキシロースイソメラーゼはキシロース（アルドペントース）のキシロース（ケトペントース）への、かつ／またはその逆の直接的な異性化を触媒する酵素であり、キシロースケトイソメラーゼとしても知られる。直接的な異性化とは、ペントースレダクターゼおよびペントールデヒドロゲナーゼにより触媒される、糖アルコール中間体を経た２段階転化とは異なり、ペントースイソメラーゼにより触媒される１段階での異性化のことを指す。

[0031] ペントースレダクターゼとは、還元酵素のひとつであり、NADHまたはNADPHを補酵素としてアルドペントースを糖アルコールに変換する活性を有する酵素を意味する。例えば、キシロースレダクターゼは例えばEC 1. 1. 1. 307やEC 1. 1. 1. 21が該当し、はキシロースをキシリトールに変換する酵素である。アラビノースレダクターゼは例えばEC 1. 1. 1. 21が該当し、アラビノースをアラビトールに変換する酵素である。また、前記EC番号で分類される酵素でなくとも、上記活性を有する酵素であれば、本発明中におけるペントースレダクターゼに含まれる。

[0032] ペントールデヒドロゲナーゼとは、脱水素酵素のひとつであり、NAD⁺を補酵素としてペントールをケトペントースに変換する酵素である。例えば、キシリトールデヒドロゲナーゼは例えばEC 1. 1. 1. 9やEC 1. 1. 1. 10が該当し、キシリトールをキシロースに変換する酵素である。アラビトールデヒドロゲナーゼは例えばEC 1. 1. 1. 11やEC 1. 1. 1. 12が該当し、アラビトールをリボースに変換する酵素である。分類上ペントールデヒドロゲナーゼと異なる酵素であっても、上記活性を有する酵素であれば、本発明中におけるペントールデヒドロゲナーゼに含まれるとする。

[0033] ペントースレダクターゼとペントールデヒドロゲナーゼが触媒する反応は、ペントースイソメラーゼと同様に、アルドペントースをケトペントースに

異性化する。

[0034] 上記のアルドペントースとケトペントースの異性化を触媒する酵素のうち、好ましくはペントースのペントースイソメラーゼを用いることができ、より好ましくはキシロースイソメラーゼを用いることができる。

[0035] 用いるキシロースイソメラーゼ遺伝子は特に限定されることはなく、ゲノムDNAのほか、cDNA等であってもよい。また、動物、植物、真菌（酵母、カビ等）、細菌などいずれの生物に由来するものであってもよい。こうした遺伝子に関する情報は、NCBI等のウェブにて公開されているデータベースにて検索を行うことで簡単に知ることができる。例えば、本発明において好ましく用いることができる、エシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) のキシロースイソメラーゼ遺伝子の塩基配列は、例えば、GenBank Accession No. NC_007779 REGION: 3909650..3910972に記載されている。

[0036] キシロースイソメラーゼの活性は、キシロース存在下で酵素反応を行い、異性化されたキシロースをHPLCなどを用いて測定することで確認することができる。キシロースイソメラーゼ活性は、例えば特開2008-79564に開示される方法で測定できる。

[0037] キシロースイソメラーゼの供与体となる生物としては、例えば、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、エシェリシア (*Escherichia*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属などの腸内細菌科類、アクチノプラネス (*Actinoplanes*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属などの放線菌類、あるいはバチルス (*Bacillus*) 属、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、サーモアナエロバクター (*Thermoanaerobacter*) 属、サーマス (*Thermus*) 属、キサントモナス (*Xant*

homonas) 属、リゾビウム (Rhizobium) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、クロストリジウム (Clostridium) 属、バクテロイデス (Bacteroides) 属に属する微生物を用いることができ、好ましくはエシェリシア属に属する微生物であり、さらに好ましくは、エシェリシア・コリ (Escherichia coli) である。

[0038] また本発明で導入する遺伝子としては、ケトペントースのリン酸化を触媒する活性を有する酵素遺伝子を用いることもできる。ケトペントースのリン酸化を触媒する活性を有する酵素としては、例えば、キシロキナーゼ (EC 2. 7. 1. 17) やリブロキナーゼ (EC 2. 7. 1. 16) が挙げられるが、キシロキナーゼを好ましく用いることができる。

[0039] 用いるキシロキナーゼ遺伝子は特に限定されることはなく、ゲノムDNAのほか、cDNA等であってもよい。また、動物、植物、真菌（酵母、カビ等）、細菌などいずれの生物に由来するものであってもよい。こうした遺伝子に関する情報は、NCBI等のウェブにて公開されているデータベースにて検索を行うことで簡単に知ることができる。例えば、本発明において好ましく用いることができる、エシェリシア・コリのキシロキナーゼ遺伝子の塩基配列は、例えば、GenBank Accession No. NC_007779 REGION: 3911044, .3912498に記載されている。

[0040] キシロキナーゼの活性は、キシロース存在下で酵素反応を行い、リン酸化されたキシロースー5ーリン酸をHPLCなどを用いて測定するか、補助的な酵素反応を用いてNADPHの増加などを測定することで確認でき、例えば、Feldmann SD, Sahm H, Sprenger GA. Cloning and expression of the genes for xylose isomerase and xylulokinase from Klebsiella pneumoniae 1033 in Escherichia coli K12. Mol Gen Genet. 1992 Aug; 234 (2) : 201-10. に

開示される方法により測定できる。

[0041] キシルロキナーゼの供与体となる生物としては、例えば、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、エシェリシア (*Escherichia*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属などの腸内細菌科細菌、バクテロイデス (*Bacteroides*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属などの乳酸菌類、またアクチノプラネス (*Actinoplanes*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属などの放線菌類、あるいはバチルス (*Bacillus*) 属、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、サーモアナエロバクター (*Thermoanaerobacter*) 属、キサントモナス (*Xanthomonas*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、に属する微生物を用いることができ、好ましくは、エシェリシア属に属する微生物であり、さらに好ましくはエシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) である。

[0042] さらに、本発明で導入する遺伝子としてはトランスケトララーゼおよび／またはトランスアルドラーゼ活性を有する酵素遺伝子を用いることもできる。トランスケトララーゼは、キシロース5-リン酸およびエリスロース4-リン酸をフルクトース6-リン酸およびグリセルアルデヒド3-リン酸へと変換する反応及びその逆反応、および／またはリボース5-リン酸およびキシロース5-リン酸をセドヘプツロース7-リン酸およびグリセルアルデヒド3-リン酸へと変換する反応及びその逆反応を触媒する酵素と定義される。本発明に用いられるトランスケトララーゼは上記の触媒活性を持っていれば特に限定されないが、例えばEC 2. 2. 1. 1 が該当する。

[0043] 用いるトランスケトララーゼおよび／あるいはトランスアルドラーゼ遺伝子は特に限定されることはなく、ゲノムDNAのほか、cDNA等であっても

よい。また、動物、植物、真菌（酵母、カビ等）、細菌などいずれの生物に由来するものであってもよい。こうした遺伝子に関する情報は、NCBI等のウェブにて公開されているデータベースにて検索を行うことで簡単に知ることができる。例えば、本発明において好ましく用いることができる、エシェリシア・コリのトランスケトララーゼ遺伝子の塩基配列は、例えば、GenBank Accession No. NC_007779 REGION: complement(3078300..3080291)に記載されている。また、例えば、本発明において好ましく用いることができる、エシェリシア・コリのトランスアルドラーゼ遺伝子の塩基配列は、例えば、GenBank Accession No. NC_007779 REGION: 8238..9191に記載されている。

[0044] トランスケトララーゼの活性は、キシロースー5ーリン酸およびエリスロースー4ーリン酸存在下で酵素反応を行い、生成したグリセルアルデヒドー3ーリン酸をHPLCなどを用いて測定するか、補助的な酵素反応を用いてNADHの減少などを測定することで確認でき、例えば、Sprenger GA, Schorken U, Sprenger G, Sahm H. Transketolase A of Escherichia coli K12. Purification and properties of the enzyme from recombinant strains. Eur J Biochem. 1995 Jun 1; 230 (2) : 525-32. に開示される方法で測定できる。

[0045] トランスアルドラーゼはセドヘプツロース7ーリン酸およびグリセルアルデヒド3ーリン酸をエリスロースー4ーリン酸およびフルクトースー6ーリン酸へと変換する反応及びその逆反応を触媒する酵素と定義される。本発明に用いられるトランスケトララーゼは上記の触媒活性を持っていれば特に限定されないが、例えばEC 2. 2. 1. 2が該当する。

[0046] トランスアルドラーゼの活性は、フルクトースー6ーリン酸およびエリスロースー4ーリン酸存在下で酵素反応を行い、生成したグリセルアルデヒドー3ーリン酸をHPLCなどを用いて測定するか、補助的な酵素反応を用いてNADHの減少などを測定することで確認でき、例えば、GA. Sprenger,

U. Schorken, G. Sprenger & H. Sahm Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: cloning of its gene, talB, and characterization of the enzyme from recombinant strains). *J. Bacteriol.*, 1995, 177:20:5930-6) により記載される方法により測定され得る。

[0047] トランスアルドラーゼおよび／またはトランスアルドラーゼの供与体となる生物としては、例えば、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、エシェリシア (*Escherichia*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属などの腸内細菌科類、アクチノプラネス (*Actinoplanes*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属などの放線菌類、あるいはバチルス (*Bacillus*) 属、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、サーモアナエロバクター (*Thermoanaerobacter*) 属、サーマス (*Thermus*) 属、キサントモナス (*Xanthomonas*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、バクテロイデス (*Bacteroides*) 属に属する微生物を用いることができ、好ましくはエシェリシア属に属する微生物であり、さらに好ましくは、エシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) である。

[0048] ザイモバクター属微生物が、五炭糖を資化する能力を有する限り、上記した各遺伝子の少なくともいずれかを導入したものであってよいが、(1) キシロースイソメラーゼ、(2) キシルロキナーゼ並びに(3) トランスアルドラーゼおよびトランスケトララーゼの少なくともいずれか一方をコードする

外来遺伝子が導入されたものが好ましく、さらには、（１）キシロースイソメラーゼ遺伝子、（２）キシロキナーゼ並びに（３）トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼの両者をコードする外来遺伝子が導入されたものが好ましい。

[0049] 上記以外の微生物であって、キシロース分解能を有するもの、さらにはプロモーター部位やリボソーム結合部位の異常などによりキシロース分解能は有しないが、そのDNA上にキシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼまたはトランスケトラーゼ遺伝子をコードする微生物も供与体として用いることができる。

[0050] 導入する遺伝子は異なる複数の供与体の遺伝子を組み合わせてもよい。またそれらの遺伝子は宿主となるザイモバクター属細菌内のゲノムDNAに取り込まれてもよいし、ベクター上に存在していてもよい。

[0051] 遺伝子の導入方法としては特に制限されないが、ベクター上に存在する遺伝子の導入方法としては、例えば特許文献１および特許文献２に開示される方法を用いることができる。すなわち、市販の大腸菌用のクローニングプラスミドベクター（例えば、pUC118等）のマルチクローニングサイトに各遺伝子を挿入し、これで大腸菌を形質転換して各遺伝子の産物を産生する形質転換体を増殖させる。増殖させた形質転換体から、プラスミドを回収し、導入された各遺伝子を含む領域を切り出し、広宿主域ベクタープラスミド（例えば、pMFY31 (Agric. Biol. Chem., Vol.49(9), 2719-2724, 1985等) のマルチクローニングサイトに挿入した組換えプラスミドベクターでザイモバクター属細菌を形質転換することにより、五炭糖を資化する能力を有するザイモバクター属形質転換体を作出することができる。なお、広宿主域ベクタープラスミドとしては、市販のものを用いることもできる。形質転換方法自体は周知であり、例えば、特許文献１及び特許文献２に記載されている通り、マグネシウムイオンを含むT培地（2.0重量%グルコース、1.0重量%バクトー酵母エキス、1.0重量%リン酸二水素カリウム、0.2重量%硫酸アンモニウム、0.05重量%硫酸マグネシウム七水塩、pH6.0）等の培地中で培養してコンピ

テントセルとした後、エレクトロポレーション法のような常法により形質転換を行うことができる。キシロースの資化能を有する形質転換体は、キシロースを唯一の炭素源とする培地中で形質転換処理後の細菌を培養して選択することにより得ることができる。

[0052] 導入遺伝子をゲノムDNAに取り込ませる場合には、例えばKiril A. Datsenko and Barry L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jun 6, 2000; 97(12): 6640-6645. に開示される方法を用いることができる。

[0053] 発酵原料が五炭糖を含む場合であっても、五炭糖の他に六炭糖を含んでいてもよい。

[0054] 五炭糖とは、糖を構成する炭素の数が5つのものであり、ペントース (Pentose) とも呼ばれる。1位にアルデヒド基をもつアルドペントースと2位にケトン基をもつケトペントースがある。アルドペントースとしては、キシロース、アラビノース、リボース、リキソースが挙げられ、ケトペントースとしては、リブロース、キシルロースが挙げられる。本発明で用いる五炭糖としては、微生物が資化できるものであればいずれでも良いが、自然界での存在割合や入手のしやすさなどの観点から、好ましくはキシロース、アラビノースであり、より好ましくはキシロースである。

[0055] 六炭糖とは、糖を構成する炭素の数が6つのものであり、ヘキソース (Hexose) とも呼ばれる。1位にアルデヒド基をもつアルドースと2位にケトン基をもつケトースがある。アルドースとしては、グルコース、マンノース、ガラクトース、アロース、グロース、タロースなどが挙げられ、ケトースとしては、フルクトース、プシコース、ソルボースなどが挙げられる。本発明で用いる六炭糖としては、微生物が資化できるものであればいずれでも良いが、自然界での存在割合や入手のしやすさなどの観点から、好ましく

はグルコース、マンノース、ガラクトースであり、より好ましくはグルコースである。

[0056] 五炭糖と六炭糖を含む発酵原料に関しては特に限定されないが、六炭糖と五炭糖を両方含むことが知られているセルロース含有バイオマス由来糖液が好ましく使用される。セルロース含有バイオマスには、バガス、スイッチグラス、コーンストバー、稲わら、麦わらなど草本系バイオマスと、樹木、廃建材などの木質系バイオマスなどを例として挙げることができる。セルロース含有バイオマスは、糖が脱水縮合した多糖であるセルロースあるいはヘミセルロースを含有しており、こうした多糖を加水分解することで発酵原料として利用可能な糖液が製造される。セルロース含有バイオマス由来糖液の調製方法自体は周知であり、どのような方法であってもよく、こうした糖の製造方法としては、濃硫酸を使用してバイオマスを酸加水分解して糖液を製造する方法（特表平11-506934号公報、特開2005-229821号公報）、バイオマスを希硫酸で加水分解処理した後に、さらにセルラーゼなどの酵素処理することより糖液を製造する方法が開示されている（A. Adenら、“Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover” NREL Technical Report（2002））。また酸を使用しない方法として、250～500℃程度の亜臨界水を使用しバイオマスを加水分解して糖液を製造する方法（特開2003-212888号公報）、またバイオマスを亜臨界水処理した後に、さらに酵素処理することにより糖液を製造する方法（特開2001-95597号公報）、バイオマスを240～280℃の加圧熱水で加水分解処理した後に、さらに酵素処理することにより糖液を製造する方法（特許3041380号公報）が開示されている。以上のような処理の後、得られた糖液を精製してもよい。その方法は、例えばWO2010/06

7785に開示されている。

[0057] 混合糖に含まれる五炭糖と六炭糖の重量比率は特に制限はないが、混合糖中の五炭糖と六炭糖の重量比率として（五炭糖）：（六炭糖）と表すと、1：9～9：1が好ましい。これは、混合糖としてセルロース含有バイオマス由来糖液を想定した場合の糖比率である。

[0058] 本発明に使用する発酵原料に含まれる六炭糖濃度は、上記の総糖濃度、五炭糖と六炭糖の割合の範囲において特に限定されないが、本発明の2，3-BDOの製造方法を用いれば、六炭糖を濃度5 g/L以上含む混合糖液においても良好な収率を得ることができる。

[0059] 発酵原料が五炭糖を含む場合であっても、上記と同様、発酵原料には、前記糖の他、2，3-ブタンジオール発酵微生物の発酵に好ましく作用するような同化可能な炭素源、同化可能な窒素源、無機塩類、並びに必要に応じてアミノ酸およびビタミンなどの有機微量栄養素を適宜含有させてもよい。また、発酵を効率よく行うことを目的に適宜消泡剤を含有させてもよい。

[0060] 発酵原料が五炭糖を含む場合であっても、同化可能な窒素源の具体例としては、上記と同様、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、アミノ酸、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば、油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、コーンステープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用される。無機塩類としては、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩、亜鉛塩等を適宜添加使用することができる。五炭糖の発酵により2，3-ブタンジオールを製造するためには、これらのうち、コーンステープリカー、硫酸アンモニウムやリン酸一水素アンモニウムのようなアンモニウム塩、リン酸二水素カリウム、リン酸一水素カリウム、リン酸一水素アンモニウムのようなリン酸塩、塩化カルシウムのようなカルシウム塩、硫酸第一鉄のような鉄塩、硫酸マンガンのようなマンガン塩、硫酸亜鉛のような亜鉛塩、硫酸マグネシウムのようなマグネシウム塩、EDTA 2ナトリウムのようなEDTA又はその塩を含むこと

が好ましい。

[0061] 発酵原料が五炭糖を含む場合であっても、上記と同様、微生物の生育に応じてニコチン酸を培地に適宜添加使用してもよく、また、消泡剤を適宜添加使用してもよい。

[0062] 発酵原料が、同化可能な炭素源として五炭糖を含み、五炭糖を資化する能力を有するザイモバクター属微生物を培養する場合であっても、培養温度、培養時のpH、微生物の培養形態、通気条件及び培地への酸素供給条件は、それぞれの好ましい条件も含めて上記と同様である。

[0063] 2, 3-ブタンジオール発酵工程で得られる培養液には、2, 3-ブタンジオールの他、発酵原料由来の不純物や発酵副産物であるエタノールなどが含まれるため、後段のプロセスにおいて培養液に含まれる2, 3-ブタンジオールを精製する必要がある。

[0064] 精製工程

2, 3-ブタンジオール培養液からの2, 3-ブタンジオールの精製工程は特に制限はなく、当業者に公知の手法によって実施すればよいが、本発明では2, 3-ブタンジオール培養液を蒸留する工程を含むことが好ましい。

[0065] 2, 3-ブタンジオール培養液の蒸留では、2, 3-ブタンジオールは蒸気側から回収される。蒸留法は特に限定されないが、一般的に適応される単蒸留や精密蒸留、常圧蒸留や減圧蒸留のいずれでもよく、薄膜蒸留装置や棚段式蒸留装置、充填式蒸留装置などから選択することができる。また、回分式であっても連続式であっても本発明に適用できる。中でも好ましくは、減圧蒸留であり、沸点を下げることができるため、不純物の発生を抑制することができる。具体的には、加熱温度が60℃以上150℃以下で行うのが好ましい。60℃未満の場合は減圧度を著しく下げる必要があるため、工業レベルでは装置の維持が非常に困難となる。また、150℃より高くなる場合には、2, 3-ブタンジオール溶液中に残存する微量の糖などが分解し、着色性物質の副生が起こるため好ましくない。そのため、上記加熱温度範囲で2, 3-ブタンジオールが留出するよう、減圧度を調節するのがよい。

[0066] なお、2，3－ブタンジオール培養液をそのまま蒸留工程に供してもよいが、蒸留工程に先立ち、脱塩工程や濃縮工程に供することが好ましい。

[0067] 脱塩工程の具体例としては、イオン交換処理が挙げられる。イオン交換処理は、イオン交換体を用いて2，3－ブタンジオール培養液中のイオン成分を除去する方法である。イオン交換体としては、イオン交換樹脂、イオン交換膜、イオン交換繊維、イオン交換紙、ゲルイオン交換体、液状イオン交換体、ゼオライト、炭質イオン交換体、モンモリロン石を用いることができるが、本発明ではイオン交換樹脂を用いた処理が好ましく採用される。

[0068] イオン交換樹脂にはその官能基の違いにより、強アニオン交換樹脂、弱アニオン交換樹脂、強カチオン交換樹脂、弱カチオン交換樹脂、キレート交換樹脂などがある。例えば、強アニオン交換樹脂は、オルガノ株式会社製の“アンバーライト”IRA410J、IRA411、IRA910CTや三菱化学株式会社製の“ダイヤイオン”SA10A、SA12A、SA11A、NSA100、SA20A、SA21A、UBK510L、UBK530、UBK550、UBK535、UBK555などから選定される。また、弱アニオン交換樹脂は、オルガノ株式会社製の“アンバーライト”IRA478RF、IRA67、IRA96SB、IRA98、XE583や三菱化学株式会社製の“ダイヤイオン”WA10、WA20、WA21J、WA30などがある。一方、強カチオン交換樹脂は、オルガノ株式会社製の“アンバーライト”IR120B、IR124、200CT、252の他、三菱化学株式会社製の“ダイヤイオン”SK104、SK1B、SK110、SK112、PK208、PK212、PK216、PK218、PK220、PK228などがあり、弱カチオン交換樹脂としては、オルガノ株式会社製の“アンバーライト”FPC3500、IRC76や三菱化学株式会社製の“ダイヤイオン”WK10、WK11、WK100、WK40Lなどから選定することができる。

[0069] 本発明では、イオン交換樹脂としてアニオン交換樹脂およびカチオン交換樹脂を併用することが好ましく、中でも、多様なイオンを除去することがで

きる強アニオン樹脂および強カチオン樹脂を用いる方がよい。また、アニオン交換樹脂は水酸化ナトリウムなどの希アルカリ性水溶液により再生し、OH型として用いることが好ましく、カチオン交換樹脂の場合は、塩酸などの希酸性水溶液により再生し、H型として用いることが好ましい。イオン交換樹脂による脱塩方法はバッチ法でもカラム法でもよく、効率的に脱塩出来る方法であれば特に制限はない。しかしながら、製造プロセスにおいては、繰り返し利用が容易なカラム法が好ましく採用される。通液速度は通常、SV（空間速度）で制御され、SV = 2 ~ 50 が好ましく、より高度に精製できるSV = 2 ~ 10 で通液することが好ましい。樹脂はゲル型でもポーラス型、ハイポーラス型、MR型などの種類が市販されており、これらイオン交換樹脂の形状はいずれでもよく、溶液の品質に合わせて最適な形状を選択すればよい。

[0070] また、ナノ濾過膜処理も脱塩工程の具体例として挙げられる。2, 3-ブタンジオール培養液のナノ濾過膜処理は、例えば特開2010-150248号公報にも開示されているように、2, 3-ブタンジオール培養液をナノ濾過膜に通じて濾過することによって透過液側に2, 3-ブタンジオール、非透過液側に無機塩、糖類および着色成分を効率的に分離することができる。

[0071] ナノ濾過膜の素材としては、ピペラジンポリアミドやポリアミド、酢酸セルロース、ポリビニルアルコール、ポリイミド、ポリエステルなどのポリマー系素材のほか、セラミックスなどの無機材料が用いられている。また、ナノ濾過膜は一般にスパイラル型の膜エレメントの他、平膜や中空糸膜として使用されるが、本発明で用いるナノ濾過膜は、スパイラル型の膜エレメントが好ましく使用される。

[0072] 本発明で用いられるナノ濾過膜エレメントの好ましい具体例としては、例えば、酢酸セルロース系のナノろ過膜であるGE Osmonics社製ナノ濾過膜の“GE Sepa”、ポリアミドを機能層とするアルファラバル社製ナノ濾過膜のNF99またはNF99HF、架橋ピペラジンポリアミドを

機能層とするフィルムテック社製ナノ濾過膜のNF-45、NF-90、NF-200またはNF-400、あるいは東レ株式会社製のUTC60を含む同社製ナノ濾過膜エレメントSU-210、SU-220、SU-600またはSU-610が挙げられ、中でも好ましくはポリアミドを機能層とするアルファラバル社製ナノ濾過膜のNF99またはNF99HF、架橋ピペラジンポリアミドを機能層とするフィルムテック社製ナノ濾過膜のNF-45、NF-90、NF-200またはNF-400、東レ株式会社製のUTC60を含む同社製ナノ濾過膜モジュールSU-210、SU-220、SU-600またはSU-610であり、さらに好ましくは架橋ピペラジンポリアミドを主成分とする、東レ株式会社製のUTC60を含む同社製ナノ濾過膜エレメントSU-210、SU-220、SU-600またはSU-610である。

[0073] ナノ濾過膜による濾過は、圧力をかけてもよく、その濾過圧は、0.1 MPa以上8 MPa以下の範囲で好ましく用いられる。濾過圧が0.1 MPaより低ければ膜透過速度が低下し、8 MPaより高ければ膜の損傷に影響を与えるおそれがある。また、濾過圧が0.5 MPa以上7 MPa以下で用いられれば、膜透過流束が高いことから、2, 3-ブタンジオール発酵液を効率的に透過させることができ、膜の損傷に影響を与える可能性が少ないことからより好ましく、1 MPa以上6 MPa以下で用いることが特に好ましい。

[0074] ナノ濾過膜に通じて濾過する2, 3-ブタンジオール溶液の2, 3-ブタンジオールの濃度は特に限定されないが、高濃度であれば透過液中に含まれる2, 3-ブタンジオール濃度も高いため、濃縮する際のエネルギー削減ができ、コスト削減にも好適である。

[0075] 脱塩工程においては、イオン交換処理またはナノ濾過膜処理のいずれかであってもよく、それらを併用してもよいが、少なくともイオン交換処理をすることが好ましい。また、イオン交換処理とナノ濾過膜処理を併用する場合の順序は特に制限はないが、2, 3-ブタンジオール培養液をナノ濾過膜処理して透過液側から得られる無機塩が低減した2, 3-ブタンジオール培養

液をイオン交換処理することが好ましい。これにより、ナノ濾過膜を一部通過する無機塩や有機酸をイオン交換樹脂で除去することで、無機塩類の除去率を上げることができる。

[0076] 2, 3-ブタンジオール培養液の濃縮方法としては当業者が公知の一般的な方法でよく、例えば、逆浸透膜を用いる方法や、エバポレーターによる加熱濃縮などが挙げられるが、逆浸透膜を用いる方法が好ましく適用される。

[0077] 逆浸透膜を用いる方法は、2, 3-ブタンジオール溶液を逆浸透膜に通じて濾過することで透過液側に水を透過させ、2, 3-ブタンジオールを膜の非透過液側に保持することで濃縮する方法である。本発明で好ましく使用される逆浸透膜としては、酢酸セルロース系のポリマーを機能層とした複合膜（以下、酢酸セルロース系の逆浸透膜ともいう）またはポリアミドを機能層とした複合膜（以下、ポリアミド系の逆浸透膜ともいう）が挙げられる。ここで、酢酸セルロース系のポリマーとしては、酢酸セルロース、二酢酸セルロース、三酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酪酸セルロース等のセルロースの有機酸エステルの単独もしくはこれらの混合物並びに混合エステルを用いたものが挙げられる。ポリアミドとしては、脂肪族および／または芳香族のジアミンをモノマーとする線状ポリマーまたは架橋ポリマーが挙げられる。膜形態としては、平膜型、スパイラル型、中空糸型など適宜の形態のものが使用できる。

[0078] 本発明で使用される逆浸透膜の具体例としては、例えば、東レ株式会社製ポリアミド系逆浸透膜モジュールである低圧タイプのSU-710、SU-720、SU-720F、SU-710L、SU-720L、SU-720LF、SU-720R、SU-710P、SU-720Pの他、高圧タイプのSU-810、SU-820、SU-820L、SU-820FA、同社酢酸セルロース系逆浸透膜SC-L100R、SC-L200R、SC-1100、SC-1200、SC-2100、SC-2200、SC-3100、SC-3200、SC-8100、SC-8200、日東電工株式会社製NTR-759HR、NTR-729HF、NTR-70SWC、ES1

O-D、ES20-D、ES20-U、ES15-D、ES15-U、LF10-D、アルファラバル製RO98pHt、RO99、HR98PP、CE4040C-30D、GE製“GESepa”、Filmtec製BW30-4040、TW30-4040、XLE-4040、LP-4040、LE-4040、SW30-4040、SW30HRL-4040などが挙げられる。

[0079] 逆浸透膜による濃縮は、圧力をかけて行うが、その濾過圧は、1MPaより低ければ膜透過速度が低下し、8MPaより高ければ膜の損傷に影響を与えるため、1MPa以上8MPa以下の範囲であることが好ましい。また、濾過圧が1MPa以上7MPa以下の範囲であれば、膜透過流束が高いことから、2，3-ブタンジオール溶液を効率的に濃縮することができる。膜の損傷に影響を与える可能性が少ないことから最も好ましくは、2MPa以上6MPa以下の範囲である。低濃度の2，3-ブタンジオール溶液においては、逆浸透膜を用いる方法が低コストであるため好ましい。

[0080] その他、上記工程に先立ち、2，3-ブタンジオール培養液に含まれる菌体を分離する工程を含むことが好ましい。菌体の分離工程としては、例えば遠心分離、ろ過分離などの方法を用いることができる。これらの方法はどちらか一方のみでもよいし、組み合わせてもよい。

[0081] 本発明によって製造される2，3-ブタンジオールは高純度であることを特徴とする。2，3-ブタンジオールに含まれる不純物を測定する方法としては、ガスクロマトグラフィー（GC）による純度測定や高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いたUV検出による純度測定などを併用して評価することができ、これらは全検出ピーク面積中の2，3-ブタンジオール面積の比率で評価するため、比率が高いほど2，3-ブタンジオールが高純度であることを意味する。

実施例

[0082] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0083] 参考例 1 $k_L a$ 測定

培養装置（エイブル株式会社製、ジャー容量 1.5 L）に溶存酸素電極（エイブル株式会社製）を挿入して各通気攪拌条件に対する溶存酸素濃度を測定し、窒素ガスを用いるダイナミック法により $k_L a$ を求めた。まず、培養槽に水 1 L を投入し、水温を 30℃ に調整しながら一定の速度で攪拌して窒素ガスを十分に水中に吹き込み、電極値が最低値となった時点で溶存酸素電極のゼロ校正を行った。そののち通気ガスを窒素ガスから所定の通気速度の空気あるいは窒素ガスに切り替えてからの溶存酸素濃度の経時変化を測定して $k_L a$ を求めた。得られた各通気攪拌条件に対する $k_L a$ を表 1 に示す。

[0084] [表1]

通気速度 (vvm)	攪拌速度 (rpm)	$k_L a$ (h^{-1})
0.1 (窒素ガス)	400	0
0.025	400	9
0.2	400	17
0.6	400	28
0.6	500	57

[0085] 実施例 1～6 : $k_L a$

<2, 3-ブタンジオール発酵>

ザイモバクター・パルメ (*Z. palmarum*) ATCC 51623 株を、T 培地 (20 g/L Glucose, 10 g/L Yeast extract, 10 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 6.0) を 5 mL 入れた試験管にて 30℃ で 24 時間静置培養を行い、前々培養とした。この前々培養液を、T 培地を 50 mL 入れた三角フラスコに全量添加したのち、30℃ で 16 時間静置培養を行い、前培養とした。前培養液を表 2 に示す組成の 2, 3-ブタンジオール発酵培地 1 L に添加し、pH 5.5 となるように水酸化カリウムで中和しながら温度 30℃ で表 1 に記載の $k_L a$ にて培養を行った。培養液の採取はオートサンプラー（エイブル株式会社製）を用いて培養開始後から 2 時間おきに最大 40 時間まで行い、採取した培養液中のグルコース濃

度および2, 3-ブタンジオール濃度を測定した。

[0086] [表2]

グルコース	40	g
コーンステイプリカー (固形分50%)	30	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.8	g
KH ₂ PO ₄	1.75	g
K ₂ HPO ₄	9.2	g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.9	g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	8.8	mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	44	mg
MnSO ₄ · 5H ₂ O	1.28	mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.9	mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	219	mg
EDTA · 2Na	44	mg
単位 (1/Liter)		

[0087] 以下に高速液体クロマトグラフィー (HPLC、株式会社島津製作所製) によるそれぞれの濃度測定条件を示す。発酵後の2, 3-ブタンジオール濃度、グルコース濃度、発酵収率は以下の測定方法によって求めた。

[0088] 2, 3-ブタンジオール濃度測定

カラム: Shodex Sugar SH1011 (昭和電工株式会社製)

カラム温度: 65℃

移動相: 0.05M 硫酸水溶液、0.6mL/min

検出: RI。

[0089] グルコース濃度測定

カラム: Asahipak NH2P50 4E (昭和電工株式会社製)

カラム温度: 30℃

移動相: 水: アセトニトリル=1:3、0.6mL/min

検出: RI。

[0090] 発酵収率

上述のHPLC分析により測定した2, 3-ブタンジオール濃度およびグ

ルコース濃度より、下式を用いて算出した。

$$\text{発酵収率 (\%)} = 100 \times \{ (\text{培養液中 2, 3-ブタンジオール濃度}) - (\text{培地中 2, 3-ブタンジオール濃度}) \} / \{ (\text{培地中グルコース濃度}) - (\text{培養液中グルコース濃度}) \}。$$

[0091] 培養液中のグルコース濃度が最も 0 に近くなった時点での、培養液中の 2, 3-ブタンジオールおよびグルコース濃度、発酵収率を表 3 に示す。得られた 2, 3-ブタンジオール培養液を回収し、4℃、8000 rpm で 15 分間遠心したのち上清を精密ろ過膜（東レ株式会社製）にてろ過し、菌体を除去した。上記工程を 2 回行い、計 2 L の 2, 3-ブタンジオール培養液を得た。

[0092] <2, 3-ブタンジオール培養液のイオン交換精製>

上述の発酵試験により得られた培養液について、イオン交換処理による残留イオンの除去を行った。強アニオン交換樹脂 I R A 1 2 0 J（株式会社オルガノ製）および強カチオン交換樹脂 I R 4 1 0（株式会社オルガノ製）を用い、それぞれ 1 N 水酸化ナトリウムおよび 1 N 塩酸によって OH 型および H 型に再生して使用した。樹脂量は各種無機塩と有機酸との総量とイオン交換樹脂の交換容量が等量になるように算出した。前述のイオン交換樹脂をカラムに充填し、アニオン交換、カチオン交換の順に通液速度 $SV = 5$ で通液した。

[0093] <2, 3-ブタンジオールの蒸留精製>

イオン交換処理した 2, 3-ブタンジオール溶液は、薄膜濃縮装置 MF-10（東京理化器械株式会社製）によって水を除去した。この時、減圧度は 30 hPa、加熱温度は 60℃ で水を蒸発させた。濃縮した 2, 3-ブタンジオール溶液を減圧蒸留（5 mmHg）し、精製 2, 3-ブタンジオールを得た。蒸留後の 2, 3-ブタンジオールの GC 純度、蒸留収率は以下の測定方法によって求めた。

[0094] GC 純度

蒸留後の 2, 3-ブタンジオールをガスクロマトグラフィー（GC、株式

会社島津製作所製)を用いて分析し、全検出ピーク面積中の2, 3-ブタンジオールピーク面積の比率から、下式によって算出した。

GC純度 (%) = $100 \times (2, 3\text{-ブタンジオールピーク面積}) / (\text{全検出ピーク面積})$ 。

[0095] ガスクロマトグラフィーの分析条件を以下に示す。

カラム: RT-BDEXM (0.25 mm × 30 m, Restek社製)

カラム温度: 75 °C

気化室、検出器温度: 230 °C

キャリアガス: He

線速度: 35 cm/sec

検出: 水素炎イオン化検出器 (FID)。

[0096] 蒸留収率

HPLC分析で測定した2, 3-ブタンジオール濃度と仕込み液量から算出した蒸留前の2, 3-ブタンジオール仕込み量と、蒸留後の留出液量と上述のGC純度から算出した2, 3-ブタンジオール回収量から、下式により計算した。

蒸留収率 (%) = $100 \times \{ (\text{蒸留後の留出液量}) \times (\text{GC純度}) \} / \{ (\text{蒸留前2, 3-ブタンジオール濃度}) \times (\text{蒸留前の仕込み液量}) \}$ 。

[0097] 2, 3-ブタンジオール総収率

発酵工程の結果より算出した発酵収率および精製工程の結果より算出した蒸留収率から、下式により計算した。結果を表3に示す。

2, 3-ブタンジオール総収率 (g/g糖) = $(\text{発酵収率}) / 100 \times (\text{蒸留収率}) / 100$ 。

[0098]

[表3]

		実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6
	kLa (h ⁻¹)	0	3	9	17	28	57
培養前	グルコース濃度(g/L)	42.0	42.1	42.0	40.8	39.5	41.1
	2,3-BDO濃度 (g/L)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
培養後	グルコース濃度(g/L)	26.1	11.6	2.1	0.5	0.2	3.4
	2,3-BDO濃度 (g/L)	1.1	7.8	16.0	18.9	18.2	17.5
	発酵収率 (%)	6.8	25.5	40.0	46.8	46.4	46.5
蒸留後	蒸留収率 (%)	78.6	79.3	82.4	82.6	83.2	82.7
	GC純度 (%)	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
2,3-BDO総収率(g/g糖)		0.05344 8	0.20221 5	0.3296	0.38656 8	0.38604 8	0.38455 5

[0099] 実施例7～11 : pH

Z. palmae ATCC 51623株を、実施例1～6記載の前々培養方法および前培養方法にて培養した。前培養液を表2に示す組成の2, 3-ブタンジオール発酵培地1Lに添加し、pHがそれぞれ4.5、4.8、5.2、5.5、6.1、6.5のいずれかとなるように水酸化カリウムで中和しながら通気速度0.2vvm、攪拌速度400rpm、温度30℃で培養を行った。培養液の採取はオートサンプラー（エイブル株式会社製）を用いて培養開始後から2時間おきに最大40時間まで行い、採取した培養液中のグルコース濃度および2, 3-ブタンジオール濃度を実施例1～6記載の方法にて測定した。培養液中のグルコース濃度が最も0に近くなった時点での、培養液中の2, 3-ブタンジオールおよびグルコース濃度、発酵収率を表4に示す。発酵試験後の2, 3-ブタンジオール培養液を回収し、4℃、8000rpmで15分間遠心したのち上清を精密ろ過膜（東レ株式会社製）にてろ過し、菌体を除去した。上記工程を2回行い、計2Lの2, 3-ブタンジオール培養液を得た。得られた培養液について、実施例1～6記載の方法にて脱塩および蒸留処理を行い、精製2, 3-ブタンジオールを得た。蒸留後の2, 3-ブタンジオールのGC純度、蒸留収率を実施例1～6記載の方法によって求めた結果を表4に示す。

[0100]

[表4]

		実施例7	実施例8	実施例9	実施例10	実施例11
pH		4.5	4.8	5.2	6.1	6.5
培養前	グルコース濃度 (g/L)	41.5	41.6	42.0	40.4	38.8
	2,3-BDO濃度 (g/L)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
培養後	グルコース濃度 (g/L)	11.5	0.0	2.3	1.6	2.6
	2,3-BDO濃度 (g/L)	6.5	12.4	18.1	18.5	13.8
	発酵収率 (%)	21.5	29.8	45.7	47.7	38.0
蒸留後	蒸留収率 (%)	79.1	81.5	82.9	82.6	83.2
	GC純度 (%)	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
2,3-BDO総収率(g/g糖)		0.170065	0.24287	0.378853	0.394002	0.31616

[0101] 実施例12～16：糖濃度

Z. palmarum ATCC 51623株を、実施例1～6記載の前々培養方法および前培養方法にて培養した。前培養液をグルコース濃度がそれぞれ12、20、100、180、250 g/Lのいずれかとなるように調整した表2に示す組成の2,3-ブタンジオール発酵培地1 Lに添加し、pHが5.5となるように水酸化カリウムで中和しながら通気速度0.2 vvm、攪拌速度400 rpm、温度30℃で培養を行った。培養液の採取はオートサンプラー（エイブル株式会社製）を用いて培養開始後から2～8時間おきに行い、採取した培養液中のグルコース濃度および2,3-ブタンジオール濃度を実施例1～6記載の方法にて測定した。培養液中のグルコース濃度が最も0に近くなった時点での、培養液中の2,3-ブタンジオールおよびグルコース濃度、発酵収率を表5に示す。発酵試験後の2,3-ブタンジオール培養液を回収し、4℃、8000 rpmで15分間遠心したのち上清を精密ろ過膜（東レ株式会社製）にてろ過し、菌体を除去した。上記工程を2回行い、計2 Lの2,3-ブタンジオール培養液を得た。得られた培養液について、実施例1～6記載の方法にて脱塩および蒸留処理を行い、精製2,3-ブタンジオールを得た。蒸留後の2,3-ブタンジオールのGC純度、蒸留収率を実施例1～6記載の方法によって求めた結果を表5に示す。

[0102]

[表5]

		実施例12	実施例13	実施例14	実施例15	実施例16
培養前	グルコース濃度(g/L)	12.5	20.4	100.8	187.7	253.9
	2,3-BDO濃度(g/L)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
培養後	グルコース濃度(g/L)	0.0	0.4	3.1	0.3	5.6
	2,3-BDO濃度(g/L)	5.3	8.8	44.2	82.6	115.5
	発酵収率(%)	42.4	44.2	45.2	44.1	46.5
蒸留後	蒸留収率(%)	78.8	79.5	84.6	84.3	86.4
	GC純度(%)	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
2,3-BDO総収率(g/g糖)		0.334112	0.35139	0.382392	0.371763	0.40176

[0103] 実施例17～31

特許文献1及び特許文献2に記載された形質転換株細胞内での4種の酵素遺伝子の発現を確認した。なお、この形質転換株は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにブダペスト条約に基づき2004年6月30日から寄託されており、その受託番号はFERM BP-10048である。この形質転換株は、特許文献2が米国特許第7,569,379号となっているため、既に分譲可能となっている。

[0104] 実施例17～21: kLa

<2,3-ブタンジオール発酵>

キシロース資化を付与したザイモバクター属微生物としては、特許文献1及び2に開示されている *Zymobacter palmae* [pMFY31-x t] を用いた。*Zymobacter palmae* [pMFY31-x t] は、キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトララーゼをコードする外来遺伝子が導入された広宿主域組換えプラスミドベクターで *Zymobacter palmae* を形質転換することにより作出された公知の形質転換体であり、上記の通り、ブダペスト条約に基づきFERM BP-10048の受託番号で寄託されており、分譲可能となっているものである。*Z. palmae* [pMFY31-x t] を、100 µg/mLのアンプシリンを含むTX培地(40 g/L Xylose, 10 g/L Yeast extract, 10 g/L KH₂PO₄, 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L MgSO₄

・ $7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{pH} 6.0$) を 5mL 入れた試験管にて 30°C で 24 時間静置培養を行った。その培養液を、 TX 培地を 50mL 入れた三角フラスコに全量添加したのち、 30°C で 24 時間静置培養を行った。その培養液を表 6 に示す組成の 2, 3-ブタンジオール発酵培地 1L に全量添加し、 $\text{pH} 5.5$ となるように水酸化カリウムで中和しながら温度 30°C で表 1 に記載の通気・攪拌条件にて培養を行った。培養中に適宜培養液を採取し、キシロース濃度および 2, 3-ブタンジオール濃度を測定した。

[0105] [表6]

キシロース	40	g
コーンステープリカー	30	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.8	g
KH_2PO_4	1.75	g
K_2HPO_4	9.2	g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2.9	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8	mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44	mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.28	mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.9	mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	219	mg
$\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$	44	mg
単位 (1/Liter)		

[0106] 以下に高速液体クロマトグラフィー (HPLC、株式会社島津製作所製) によるそれぞれの濃度測定条件を示す。発酵後の 2, 3-ブタンジオール濃度、糖濃度、発酵収率は以下の測定方法によって求めた。

[0107] 2, 3-ブタンジオール濃度測定

カラム: Shodex Sugar SH1011 (昭和電工株式会社製)

カラム温度: 65°C

移動相: 0.05M 硫酸水溶液、 $0.6\text{mL}/\text{min}$

検出: RI。

[0108] 糖濃度測定

カラム: Asahipak NH2P50 4E (昭和電工株式会社製)

カラム温度: 30°C

移動相：水：アセトニトリル＝１：３、０．６ｍＬ／ｍｉｎ

検出：ＲＩ。

[0109] 発酵収率

上述のＨＰＬＣ分析により測定した２，３－ブタンジオール濃度および糖濃度より、下式を用いて算出した。

発酵収率（％）＝１００×{(培養液中２，３－ブタンジオール濃度)－(培地中２，３－ブタンジオール濃度)}／{(培地中糖濃度)－(培養液中糖濃度)}。

[0110] 培養液中のキシロース濃度が最も０に近くなった時点での、培養液中の２，３－ブタンジオールおよびキシロース濃度、発酵収率を表７に示す。得られた２，３－ブタンジオール培養液を回収し、４℃、８０００ｒｐｍで１５分間遠心したのち上清を精密ろ過膜（東レ株式会社製）にてろ過し、菌体を除去した。上記工程を２回行い、計２Ｌの２，３－ブタンジオール培養液を得た。

[0111] <２，３－ブタンジオール培養液のイオン交換精製>

上述の発酵試験により得られた培養液について、イオン交換処理による残留イオンの除去を行った。強アニオン交換樹脂ＩＲＡ１２０Ｊ（株式会社オルガノ製）および強カチオン交換樹脂ＩＲ４１０（株式会社オルガノ製）を用い、それぞれ１Ｎ水酸化ナトリウムおよび１Ｎ塩酸によってＯＨ型およびＨ型に再生して使用した。樹脂量は各種無機塩と有機酸との総量とイオン交換樹脂の交換容量が等量になるように算出した。前述のイオン交換樹脂をカラムに充填し、アニオン交換、カチオン交換の順に通液速度ＳＶ＝５で通液した。

[0112] <２，３－ブタンジオールの蒸留精製>

イオン交換処理した２，３－ブタンジオール溶液は、薄膜濃縮装置 ＭＦ－１０（東京理化器械株式会社製）によって水を除去した。この時、減圧度は３０ｈＰａ、加熱温度は６０℃で水を蒸発させた。濃縮した２，３－ブタンジオール溶液を減圧蒸留（５ｍｍＨｇ）し、精製２，３－ブタンジオール

を得た。蒸留後の2, 3-ブタンジオールのGC純度、蒸留収率は以下の測定方法によって求めた。

[0113] GC純度

蒸留後の2, 3-ブタンジオールをガスクロマトグラフィー（GC、株式会社島津製作所製）を用いて分析し、全検出ピーク面積中の2, 3-ブタンジオールピーク面積の比率から、下式によって算出した。

GC純度（％）＝100×（2, 3-ブタンジオールピーク面積）／（全検出ピーク面積）。

ガスクロマトグラフィーの分析条件を以下に示す。

カラム：RT-BDEXM（0.25mm×30m、Restek社製）

カラム温度：75℃

気化室、検出器温度：230℃

キャリアガス：He

線速度：35cm/sec

検出：水素炎イオン化検出器（FID）。

[0114] 蒸留収率

HPLC分析で測定した2, 3-ブタンジオール濃度と仕込み液量から算出した蒸留前の2, 3-ブタンジオール仕込み量と、蒸留後の留出液量と上述のGC純度から算出した2, 3-ブタンジオール回収量から、下式により計算した。

蒸留収率（％）＝100×{（蒸留後の留出液量）×（GC純度）}／{（蒸留前2, 3-ブタンジオール濃度）×（蒸留前の仕込み液量）}。

[0115] 2, 3-ブタンジオール総収率

発酵工程の結果より算出した発酵収率および精製工程の結果より算出した蒸留収率から、下式により計算した。結果を表7に示す。

2, 3-ブタンジオール総収率（g/g糖）＝（発酵収率）／100×（蒸留収率）／100。

[0116]

[表7]

		実施例17	実施例18	実施例19	実施例20	実施例21
kLa (h ⁻¹)		0	9	17	28	57
培養前	キシロース濃度(g/L)	41.8	41.7	41.2	39.9	41.3
	2,3-BDO濃度 (g/L)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
培養後	キシロース濃度(g/L)	5.8	20.8	0.0	1.1	0.0
	2,3-BDO濃度 (g/L)	6.1	4.6	10.3	10.3	11.1
	発酵収率 (%)	17.0	22.0	25.0	26.6	26.8
蒸留後	蒸留収率 (%)	80.3	81.9	82.5	82.4	82.3
	GC純度 (%)	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
2,3-BDO総収率 (g / g 糖)		0.13651	0.18018	0.20625	0.219184	0.220564

[0117] 実施例22～25 : pH

Z. palmae [pMFY31-xt] を、実施例17～21記載の方法にて培養した。フラスコ培養した培養液を表6に示す組成の2, 3-ブタンジオール発酵培地1Lに添加し、pHがそれぞれ4.5、4.8、6.1、6.5のいずれかとなるように水酸化カリウムで中和しながら通気速度0.2vvm、攪拌速度400rpm、温度30℃で培養を行った。培養中に適宜培養液を採取し、キシロース濃度および2, 3-ブタンジオール濃度を実施例17～21記載の方法にて測定した。培養液中のキシロース濃度が最も0に近くなった時点での、培養液中の2, 3-ブタンジオールおよびキシロース濃度、発酵収率を表8に示す。発酵試験後の2, 3-ブタンジオール培養液を回収し、4℃、8000rpmで15分間遠心したのち上清を精密ろ過膜（東レ株式会社製）にてろ過し、菌体を除去した。上記工程を2回行い、計2Lの2, 3-ブタンジオール培養液を得た。得られた培養液について、実施例17～21記載の方法にて脱塩および蒸留処理を行い、精製2, 3-ブタンジオールを得た。蒸留後の2, 3-ブタンジオールのGC純度、蒸留収率を実施例17～21記載の方法によって求めた結果を表8に示す。

[0118]

[表8]

		実施例22	実施例23	実施例24	実施例25
pH		4.5	4.8	6.1	6.5
培養前	キシロース濃度 (g/L)	41.6	39.8	41.0	40.6
	2,3-BDO濃度 (g/L)	0.0	0.0	0.0	0.0
培養後	キシロース濃度 (g/L)	13.6	0.8	0.0	0.3
	2,3-BDO濃度 (g/L)	3.7	7.7	9.3	6.1
	発酵収率 (%)	13.1	19.7	22.8	15.2
蒸留後	蒸留収率 (%)	80.7	82.2	83.0	82.8
	GC純度 (%)	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
2, 3-BDO総収率 (g / g 糖)		0.105717	0.161934	0.18924	0.125856

[0119] 実施例26～28：糖濃度

Z. *palmae* [pMFY31-x t] を、実施例17～21記載の方法にて培養した。フラスコ培養した培養液をキシロース濃度がそれぞれ5.0、15、100 g/Lのいずれかとなるように調整した表6に示す組成の2, 3-ブタンジオール発酵培地1 Lに添加し、pHが5.5となるように水酸化カリウムで中和しながら通気速度0.2 vvm、攪拌速度400 rpm、温度30℃で培養を行った。培養中に適宜培養液を採取し、キシロース濃度および2, 3-ブタンジオール濃度を実施例17～21記載の方法にて測定した。培養液中のキシロース濃度が最も0に近くなった時点での、培養液中の2, 3-ブタンジオールおよびキシロース濃度、発酵収率を表9に示す。発酵試験後の2, 3-ブタンジオール培養液を回収し、4℃、8000 rpmで15分間遠心したのち上清を精密ろ過膜（東レ株式会社製）にてろ過し、菌体を除去した。上記工程を2回行い、計2 Lの2, 3-ブタンジオール培養液を得た。得られた培養液について、実施例17～21記載の方法にて脱塩および蒸留処理を行い、精製2, 3-ブタンジオールを得た。蒸留後の2, 3-ブタンジオールのGC純度、蒸留収率を実施例17～21記載の方法によって求めた結果を表9に示す。

[0120]

[表9]

		実施例26	実施例27	実施例28
培養前	キシロース濃度 (g/L)	5.3	12.8	95.8
	2,3-BDO濃度 (g/L)	0.0	0.0	0.0
培養後	キシロース濃度 (g/L)	0.0	0.0	18.6
	2,3-BDO濃度 (g/L)	1.5	3.5	17.1
	発酵収率 (%)	28.2	27.4	22.2
蒸留後	蒸留収率 (%)	78.9	79.2	85.9
	GC純度 (%)	>99.9	>99.9	>99.9
2, 3-BDO総収率 (g / g 糖)		0.222498	0.217008	0.190698

[0121] 実施例29～31：五炭糖比率

Z. palmae [pMFY31-x t] を、実施例17～21記載の方法にて培養した。フラスコ培養した培養液をキシロースおよびグルコースの濃度 (g / L) がそれぞれ (40 : 20)、(20 : 40)、(2.5 : 40) のいずれかとなるように調整した表6に示す組成の2, 3-ブタンジオール発酵培地1 Lに添加し、pHが5.5となるように水酸化カリウムで中和しながら通気速度0.2 vvm、攪拌速度400 rpm、温度30℃で培養を行った。培養中に適宜培養液を採取し、糖濃度および2, 3-ブタンジオール濃度を実施例17～21記載の方法にて測定した。培養液中の糖濃度が最も0に近くなった時点での、培養液中の2, 3-ブタンジオールおよび糖濃度、発酵収率を表10に示す。発酵試験後の2, 3-ブタンジオール培養液を回収し、4℃、8000 rpmで15分間遠心したのち上清を精密ろ過膜（東レ株式会社製）にてろ過し、菌体を除去した。上記工程を2回行い、計2 Lの2, 3-ブタンジオール培養液を得た。得られた培養液について、実施例17～21記載の方法にて脱塩および蒸留処理を行い、精製2, 3-ブタンジオールを得た。蒸留後の2, 3-ブタンジオールのGC純度、蒸留収率を実施例17～21記載の方法によって求めた結果を表10に示す。

[0122]

[表10]

		実施例29	実施例30	実施例31
培養前	キシロース濃度 (g/L)	2.6	23.9	40.5
	グルコース濃度 (g/L)	40.3	45.9	19.8
	2,3-BDO濃度 (g/L)	0.0	0.0	0.0
培養後	キシロース濃度 (g/L)	0.0	2.0	4.3
	グルコース濃度 (g/L)	0.0	0.0	0.0
	2,3-BDO濃度 (g/L)	18.7	21.0	15.3
	発酵収率 (%)	43.6	30.9	27.4
蒸留後	蒸留収率 (%)	83.2	84.3	84.1
	GC純度 (%)	>99.9	>99.9	>99.9
2, 3-BDO総収率 (g / g 糖)		0.362752	0.260487	0.230434

[0123] 実施例32～35：有機窒素源

Z. palmae ATCC 51623株を、実施例1～6記載の前々培養方法および前培養方法にて培養した。表2に示す組成の2, 3-ブタンジオール発酵培地におけるコンスティープリカーを表11に示す種々の有機窒素源で置き換えた培地1Lに前培養液を添加し、pHが5.5となるように水酸化カリウムで中和しながら通気速度0.2vvm、攪拌速度400rpm、温度30℃で培養を行った。培養液の採取はオートサンプラー（エイブル株式会社製）を用いて培養開始後から2～4時間おきに行い、採取した培養液中のグルコース濃度および2, 3-ブタンジオール濃度を実施例1～6記載の方法にて測定した。培養液中のグルコース濃度が最も0に近くなった時点での、培養液中の2, 3-ブタンジオールおよびグルコース濃度、発酵収率を表12に示す。発酵試験後の2, 3-ブタンジオール培養液を回収し、4℃、8000rpmで15分間遠心したのち上清を精密ろ過膜（東レ株式会社製）にてろ過し、菌体を除去した。上記工程を2回行い、計2Lの2, 3-ブタンジオール培養液を得た。得られた培養液について、実施例1～6記載の方法にて脱塩および蒸留処理を行い、精製2, 3-ブタンジオールを得た。蒸留後の2, 3-ブタンジオールのGC純度、蒸留収率を実施例1～6記載の方法によって求めた結果を表12に示す。

[0124] いずれの有機窒素源においても良好な2, 3-BDO収率が得られたが、

実施例4に示すコーンステープリカーを用いた場合に2, 3-BDO収率が最も高くなった。

[0125] [表11]

有機窒素源	濃度(g/L 固形分として)
大豆加水分解物	15
動物組織加水分解物	15
カゼイン加水分解物	15
酵母エキス	15

[0126] [表12]

		実施例32	実施例33	実施例34	実施例35
有機窒素源		大豆加水分解物	動物組織加水分解物	カゼイン加水分解物	酵母エキス
培養前	グルコース濃度(g/L)	39.8	41.1	40.5	39.7
	2,3-BDO濃度(g/L)	0.0	0.0	0.0	0.0
培養後	グルコース濃度(g/L)	0.3	3.1	1.1	0.0
	2,3-BDO濃度(g/L)	16.3	11.7	10.8	12.3
	発酵収率(%)	41.2	30.9	27.4	30.9
蒸留後	蒸留収率(%)	83.1	81.9	82.3	79.6
	GC純度(%)	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
2, 3-BDO総収率(g/g糖)		0.342372	0.253071	0.225502	0.245964

産業上の利用可能性

[0127] 本発明の方法により得られる2, 3-ブタンジオールは(2, 3-BDO)は、医薬品や化粧品の中間体原料、インク、香水、液晶、殺虫剤、軟化試薬、爆薬、可塑剤などの原料として有用な化合物である。

請求の範囲

- [請求項1] 炭素源を含む発酵原料中で、ザイモバクター (*Zymobacter*) 属微生物を培養する工程 (工程 A)、および
該工程で得られた培養液から 2, 3-ブタンジオールを精製する工程 (工程 B) を含む、2, 3-ブタンジオールの製造方法。
- [請求項2] 前記微生物がザイモバクター・パルメ (*Zymobacter palmae*) である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 前記工程 A が通気条件下での培養である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。
- [請求項4] 前記工程 A が酸素移動容量係数 (kLa) 9 h^{-1} 以上の条件での培養である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項5] 前記工程 A が pH 5 ~ 7 の条件での培養である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の 2, 3-ブタンジオールの製造方法。
- [請求項6] 前記工程 A が総糖濃度 20 g/L 以上の培地での培養である、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項7] 前記炭素源が、五炭糖を含み、前記ザイモバクター属微生物が、五炭糖を資化する能力を有する請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。
- [請求項8] 前記微生物が、キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼから選ばれる少なくとも 1 つの酵素をコードする外来遺伝子が導入されたザイモバクター属の形質転換微生物である、請求項 1 から 7 に記載の方法。
- [請求項9] 前記微生物が、キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼをコードする外来遺伝子が導入されたザイモバクター属の形質転換微生物である、請求項 8 に記載の方法。
- [請求項10] 前記工程 A の発酵原料に含まれる五炭糖がキシロースである、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

- [請求項11] 前記発酵原料中の総糖に対するキシロースの存在比率が5～100%である、請求項7から10のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項12] 前記発酵原料がバイオマス由来の糖液を含む、請求項7から11のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項13] 前記工程Aの発酵原料がコーンステープリカーを含む、請求項1から12のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項14] 前記工程Bが蒸留工程を含む、請求項1から13のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項15] 前記蒸留工程前に脱塩処理工程を含む、請求項14に記載の方法。
- [請求項16] 前記脱塩処理工程としてイオン交換処理工程を含む、請求項15に記載の方法。