

(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
2015 年 1 月 8 日(08.01.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/002255 A1

- (51) 国際特許分類:
C13B 20/08 (2011.01) *C12P 7/04* (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01) *C12P 7/42* (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01) *C12P 7/46* (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/067719
- (22) 国際出願日: 2014 年 7 月 2 日(02.07.2014)
- (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 2013-139141 2013 年 7 月 2 日(02.07.2013) JP
- (71) 出願人: 三菱化学株式会社(MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 川上 公德(KAWAKAMI, Kiminori); 〒2278502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 〇 〇 〇 番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内 Kanagawa (JP). 松本 隆直(MATSUMOTO, Takanao); 〒2278502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 〇 〇 〇 番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内 Kanagawa (JP). 新田 茂輝(NITTA, Shigeki); 〒2278502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 〇 〇 〇 番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内 Kanagawa (JP). 湯村 秀一(YUNOMURA, Syuuichi); 〒2278502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 〇 〇 〇 番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内 Kanagawa (JP). 宇都宮 賢(UTSUNOMIYA, Masaru); 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目 1 番 1 号 三菱化学株式会社内 Tokyo (JP). 井澤 雄輔(IZAWA, Yuusuke); 〒5108530 三重県四日市市東邦町 1 番地 三菱化学株式会社内 Mie (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 津国, 外(TSUKUNI & ASSOCIATES et al.); 〒1020083 東京都千代田区麹町 5-3-1 麹町ビジネスセンター 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (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))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR TREATING SUGAR SOLUTION, HYDROGENATED SUGAR SOLUTION, METHOD FOR PRODUCING ORGANIC COMPOUND, AND METHOD FOR CULTURING MICROORGANISMS

(54) 発明の名称: 糖液の処理方法、水素化処理糖液、有機化合物の製造方法および微生物の培養方法

(57) Abstract: Provided are: a method for treating a sugar solution, the method for treating a sugar solution comprising feeding a sugar solution containing at least one compound selected from the group consisting of carbonyl compounds and unsaturated alcohols other than sugars to a hydrogenation reaction, and hydrogenating the carbonyl compounds and/or unsaturated alcohols contained in the sugar solution; a hydrogenated sugar solution obtained by treatment according to said treatment method; and a method for producing an organic compound, having a step for obtaining an organic compound by causing microorganisms having the ability to produce a useful substance to act on an organic raw material containing said hydrogenated sugar solution.

(57) 要約: 糖液の処理方法であって、糖類以外のカルボニル化合物及び不飽和アルコールからなる群より選ばれる少なくとも 1 つを含む糖液を水素化反応に供し、前記糖液中に含まれる前記カルボニル化合物および/または不飽和アルコールを水素化する糖液の処理方法、前記処理方法で処理することにより得られる水素化処理糖液、および前記水素化処理糖液を含有する有機原料に有用物質生産能力を有する微生物を作用させて有機化合物を得る工程を有する有機化合物の製造方法が提供される。



WO 2015/002255 A1

明 細 書

発明の名称：

糖液の処理方法、水素化処理糖液、有機化合物の製造方法および微生物の培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、糖液の処理方法、および該処理により得られる水素化処理糖液に関する。また前記水素化処理糖液を用いた有機化合物の製造方法および微生物の培養方法に関する。

背景技術

[0002] 糖類を原料とした有機化合物の発酵生産プロセスおよび化学変換プロセスは、広く利用されており、また前記各プロセスを経て得られた生産物は、種々の工業原料として利用されている。

現在、これら発酵生産プロセスおよび化学変換プロセスの原料として使用される糖として、サトウキビ、デンプン、テンサイ、とうもろこし、いも、キャッサバ、サトウカエデなどの可食原料に由来するものが挙げられる。

[0003] しかしこれらの可食原料由来の糖類を上記プロセスの原料として使用する場合は、今後の世界人口増加による可食原料価格の高騰、および天候不順や気候変動による可食原料の供給不足といった懸念がある。また食料不足の際に、可食原料を食用用途と競合して工業原料に利用することに対する倫理上の批判等の懸念もある。そこで、非可食原料や、不純物を含有する、より低純度の糖類などから、効率的に糖類を含有する液（糖液）を製造するプロセス、あるいは得られた糖液を発酵生産原料や化学変換原料として、効率的に工業原料に変換するプロセスの構築が今後の課題となっている。

[0004] 非可食原料から糖液を得る方法としては、非可食原料中のセルロースやヘミセルロースを、濃硫酸を用いてグルコースに代表されるヘキソースや、キシロースに代表されるペントースといった単糖まで加水分解する方法（特許文献1）や、非可食原料の反応性を向上させる前処理を施した後に、酵素反

応により加水分解する方法（特許文献2）、または亜臨界や超臨界水による加水分解方法等が挙げられる。

[0005] しかし、これらの手法を用いた場合、非可食原料中のセルロース、ヘミセルロースが加水分解され、グルコースやキシロースといった糖が得られると共に、これらの糖の分解反応も進行する。糖の分解反応により、副生成物として、カルボニル化合物が生成し、具体的には例えば、フルフラール、ヒドロキシメチルフルフラール、グリコールアルデヒド、蟻酸等のアルデヒド類や、ジヒドロキシアセトンやベンゾキノン等のケトン類などが生成する。

[0006] このうち、フルフラール等を除去、変換する方法として、木質系炭化物や、活性炭を用いた除去方法（特許文献3、非特許文献1）、合成樹脂を用いた除去方法（特許文献4）、還元剤を用いたアルデヒド変換方法（非特許文献2）等が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特表平11-506934号公報

特許文献2：特開2001-95594号公報

特許文献3：特開2005-270056号公報

特許文献4：特開2011-78327号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Maddox IS and Murray AE, Biotechnology Letters vol.5 No. 3, P175, 1983

非特許文献2：Cavka A et al., Biotechnology and Bioengineering, vol.108, No11, P2592, 2011

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] カルボニル化合物のうち、フルフラールやヒドロキシメチルフルフラール等は、微生物を利用した発酵生産プロセスでは、反応を阻害する性質を有し

、具体的には微生物の増殖阻害や発酵生産阻害を引き起こし、発酵生産の収率を低下させる。そのためこれらの化合物は、発酵阻害物質と呼ばれ、非可食原料の糖液を発酵原料として利用する際の大きな課題となる。

[0010] また、化学変換プロセスを経て有機化合物を生産する場合、カルボニル化合物や不飽和アルコールが糖液中に含有されていると、生成物が着色するといった課題もある。

しかし、上記特許文献3や非特許文献1に記載の木質系炭化物や活性炭を用いた除去方法では、選択的に発酵阻害物質だけを除去することは困難であり、また糖類の吸着による糖濃度の低下や、木質系炭化物や活性炭の生産や再生にコストがかかるといった問題もある。また、上記特許文献4に記載の合成樹脂を用いた除去方法では、クロマトグラフ方式での除去となるため、プロセス設計に制約が生じる問題がある。

また、上記非特許文献2に記載の還元剤を用いた還元除去方法は、還元剤の反応性の低さに加え、発酵阻害物質と同時に糖類も還元され、さらに還元体と等モルで副生する金属塩の除去が必要である等の問題がある。

[0011] 本発明は、上記の課題に鑑みてなされたものであり、糖類を含む液（糖液）を原料として各種の有機化合物を製造する際に、化学品の発酵生産プロセス及び化学変換プロセスに供される糖液を、生産効率に優れ、プロセス設計を容易にすることができる糖液の処理方法、および該方法により得られる糖液を用いた有機化合物の製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、糖液を水素化反応に供し、該糖液中に含まれる糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールから選ばれる少なくとも1つを水素化する処理を行うことで、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成させた。

[0013] すなわち本発明の要旨は、

〔1〕糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群より選ばれる少なくとも1つを含む糖液を水素化反応に供し、該糖液中に含まれ

る前記カルボニル化合物および／または不飽和アルコールを水素化することを特徴とする糖液の処理方法、

〔２〕前記糖類が、炭素数３以上７以下の単糖を構成成分として含む糖を１つ以上含む上記〔１〕に記載の処理方法、

〔３〕前記糖液が、非可食原料に由来する上記〔１〕または〔２〕に記載の処理方法、

〔４〕前記水素化反応を、金属触媒の存在下で行なう上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の処理方法、

〔５〕前記糖類以外のカルボニル化合物が、アルデヒド化合物およびケトン化合物から選ばれる少なくとも１つである上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の処理方法、

〔６〕前記不飽和アルコールが、脂肪族共役アルコールである、上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の処理方法、

〔７〕上記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の処理方法により得られることを特徴とする水素化処理糖液、

〔８〕前記水素化処理糖液中のフルフラールの含有率が、水素化処理糖液全量に対して０．０１質量％以下である上記〔７〕に記載の水素化処理糖液、

〔９〕前記水素化処理糖液中のグリコールアルデヒドの含有率が、水素化処理糖液全量に対して０．０３質量％以下である上記〔７〕または〔８〕に記載の水素化処理糖液、

〔１０〕糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群より選ばれる少なくとも１つを含む糖液を水素化反応に供する水素化処理工程、および

水性媒体中で、前記水素化処理工程後の糖液を含有する有機原料に有機物生産能を有する微生物を作用させて有機化合物を得る、有機物生産工程、を含むことを特徴とする有機化合物の製造方法、

〔１１〕水性媒体中で、前記〔７〕～〔９〕のいずれかに記載の水素化処理糖液を含有する有機原料に有機物生産能を有する微生物を作用させて有機化

合物を得る、有機物生産工程を有することを特徴とする有機化合物の製造方法、

〔12〕前記有機物生産工程を、嫌氣的雰囲気下で行う上記〔10〕または〔11〕に記載の有機化合物の製造方法、

〔13〕前記有機物生産工程で得られた有機化合物を精製する工程を、さらに有する上記〔10〕～〔12〕のいずれかに記載の有機化合物の製造方法、

〔14〕前記水性媒体が、炭酸イオン、重炭酸イオン、および二酸化炭素ガスから選ばれる少なくとも1つを含有する上記〔10〕～〔13〕のいずれかに記載の有機化合物の製造方法、

〔15〕前記有機化合物がアルコール類、アミン類、カルボン酸類、およびフェノール類から選ばれる少なくとも1つである上記〔10〕～〔14〕のいずれかに記載の有機化合物の製造方法、

〔16〕前記アルコール類が、炭素数2～10の脂肪族アルコールである上記〔15〕に記載の有機化合物の製造方法、

〔17〕前記カルボン酸類が、炭素数2～10の脂肪族カルボン酸である上記〔15〕に記載の有機化合物の製造方法、

〔18〕有用物質生産能力を有する微生物の培養方法であって、上記〔7〕～〔9〕のいずれかに記載の水素化処理糖液を炭素源として用いることを特徴とする微生物の培養方法、

〔19〕前記微生物が、コリネ型細菌、大腸菌、アナエロビオスピリラム（*Anaerobiospirillum*）属細菌、アクチノバチルス（*Actinobacillus*）属細菌、マンヘミア（*Mannheimia*）属細菌、バスフィア（*Basfia*）属細菌、ザイモモナス（*Zymomonas*）属細菌、ザイモバクター（*Zymobacter*）属細菌、糸状菌、および酵母菌からなる群より選ばれる少なくとも1つである上記〔10〕～〔18〕のいずれかに記載の方法、

〔20〕前記微生物がペントース利用能を有する上記〔10〕～〔19〕の

いずれかに記載の方法、

〔２１〕前記ペントースがキシロースである上記〔２０〕に記載の方法、

〔２２〕前記微生物がキシロースイソメラーゼ活性を付与または増強された微生物である上記〔２１〕に記載の方法、

〔２３〕前記微生物がキシロキナーゼ活性を付与または増強された微生物である上記〔２２〕に記載の方法、に存する。

発明の効果

[0014] 本発明の糖液の処理方法によれば、糖液中のカルボニル化合物および不飽和アルコールの含有量を減少させることができるため、得られる糖液を、微生物を利用した発酵生産プロセスで用いれば、目的とする有機化合物の収率を向上させることができる。

また本発明の水素化処理糖液を含む有機原料を用いれば、発酵生産プロセスによる有機化合物の製造の生産効率を向上させることができる。

また化学変換プロセスに利用した際に生成物である有機化合物の着色を抑制することができる。

[0015] また、本発明の有機化合物の製造方法であれば、比較的簡単な処理により、高い生産効率で所望の有機化合物を製造することができる。

また、本発明の培養方法であれば、発酵生産プロセスにおける発酵阻害物質量を減少させることができるため、微生物の増殖量と増殖速度を向上させ、もって発酵生産性を向上させることができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図１]製造例９の糖液及び実施例４１、４２の水素化処理糖液の吸収スペクトルである。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明について具体的に説明するが、本発明は以下の実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨の範囲内であれば種々に変更して実施することができる。

[0018] <第１の発明：糖液の処理方法>

本発明の第1の発明は、糖類を含む液（以下、「糖液」という。）を水素化反応に供し、該糖液中に含まれる、糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群より選ばれる少なくとも1つを水素化することを特徴とする。

第1の発明における糖液、並びに後述する第2の発明、第3の発明、および第4の発明（第1ないし第4の発明をまとめて「本発明」ということがある。）で用いられる「糖液」とは、上述の通り糖類を含有する液を意味し、好ましくは糖類を含有する水溶液である。以下、糖液中に含まれる糖類から順に説明する。

[0019] （糖類）

本発明で用いる糖液に含まれる糖類は、特に限定はされず、いわゆる糖類一般を用いることができるが、微生物が炭素源として活用することができる糖が好ましい。具体的にはグリセルアルデヒド等の炭素数3の単糖（トリオース）；エリトロース、トレオース、エリトルロース等の炭素数4の単糖（テトロース）；、リボース、リキソース、キシロース、アラビノース、デオキシリボース、キシルロース、リブロース等の炭素数5の単糖（ペントース）；アロース、タロース、グロース、グルコース、アルトロース、マンノース、ガラクトース、イドース、フコース、フクロース、ラムノース、プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース等の炭素数6の単糖（ヘキソース）；、セドヘプツロース等の炭素数7の単糖（ヘプトース）；スクロース、ラクトース、マルトース、トレハノース、ツラノース、セロビオース等の二糖類；ラフィノース、メレジトース、マルトトリオース等の三糖類；フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、マンナオリゴ糖などのオリゴ糖類；デンプン、デキストリン、セルロース、ヘミセルロース、グルカン、ペントサン等の多糖類；等が挙げられる。

[0020] 本発明で用いる糖液は、上記の糖類1種類を単独で含有していてもよいし、2種類以上を含有していてもよい。

本発明で用いる糖類としては、炭素数3以上、7以下の単糖を構成成分と

して含む糖を1つ以上含むことが好ましい。これらの糖は微生物の炭素源として活用しやすいためである。より好ましくは、糖類がこのような糖を主成分として含む。主成分とは、糖類の合計質量に対し、通常50質量%以上を占める成分をいい、より好ましくは70質量%以上100質量%以下を占める成分をいう。

なお、「炭素数3以上、7以下の単糖を構成成分として含む糖」とは、炭素数3以上、7以下の単糖、炭素数3以上、7以下の単糖を構成成分として含む多糖類、またはこれらの混合物をいう。中でも、ヘキソース、ペントース、およびこれらを構成成分とする二糖類がより好ましい。これらは自然界、植物の構成成分となっていることから豊富に存在し、原料の入手が容易であるためである。

[0021] 上記ヘキソースとしては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトースが好ましく、グルコースがより好ましい。ペントースとしてはキシロース、アラビノースが好ましく、キシロースがより好ましい。二糖類としてはスクロースが好ましい。グルコース、キシロース、スクロースは、自然界、植物の主な構成成分となっているため、原料の入手が容易である点が挙げられる。

[0022] (糖液の由来、製法)

本発明で用いる糖液の製法は、特に限定はされないが、例えば上記の糖類の1種類以上を水に溶解して製造する方法や、上記の糖類を構成成分として含む原料（以下、「糖原料」ということがある。）を、その構成単位である糖類まで分解して製造する方法が挙げられる。糖原料は、特に限定されないが、具体的には、セルロース、ヘミセルロース、デンプン等の多糖類や、多糖類を構成成分とする植物等が挙げられる。また澱粉糖化液または糖蜜なども使用され、具体的にはサトウキビ、甜菜またはサトウカエデ等の植物から搾取した糖液が挙げられる。

[0023] 前記糖原料は、食用にできるか否かの観点で、「可食原料」と「非可食原料」に分類することができる。

可食原料としては、サトウキビ、デンプン、テンサイ、とうもろこし、いも、キャッサバ、サトウカエデ等が挙げられる。

非可食原料としては、具体的には、バガス、スイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサス、コーンストーバー、稲わら、麦わら、米ぬか、樹木、木材、植物油カス、ササ、タケ、パルプ類、古紙、食品廃棄物、水産物残渣、家畜廃棄物等が挙げられる。

このうち、非可食原料は、可食原料と異なり、食用用途と競合せず、また通常であれば廃棄、焼却処理をされるものが多いため、安定的な供給、資源の有効利用が図れる点で好ましい。

[0024] 前記糖原料から糖類を得る方法は、特に限定されないが、例えばデンプン水溶液に希硫酸を加えて加水分解する方法、デンプン水溶液に種々の酵素を用いて、酵素分解して製造する方法、セルロースやヘミセルロースを、濃硫酸を用いてグルコースに代表されるヘキソースや、キシロースに代表されるペントースといった単糖まで加水分解する方法、糖原料の反応性を向上させる前処理を施した後に、酵素反応、亜臨界水、超臨界水等により加水分解する方法等が挙げられる。また、砂糖の製造工程で発生する糖蜜から砂糖を回収した後に残る廃糖蜜も糖液として使用可能である。

[0025] 本発明における糖液中に含まれる糖類の濃度は、糖液の由来や、含有する糖の種類等によって大きく変動し、特に限定されないが、発酵生産プロセスおよび化学変換プロセスの生産性を考慮すると、糖類の合計濃度で、通常0.1質量%以上、好ましくは2質量%以上、通常60質量%以下が好ましく、好ましくは50質量%以下である。

本発明で用いる糖液は、上記糖類を含有する液であり、水と糖類以外に他の成分を含んでいてもよい。他の成分は、特に限定されないが、例えば糖原料から糖類を得た際に生じる、糖類以外の副生成物や不純物を含んでいてもよい。具体的には、後述する糖類以外のカルボニル化合物、不飽和アルコール等のアルコール化合物；リグニン由来のフェノール化合物；や、アルカリ金属化合物、アルカリ土類金属化合物、窒素化合物、硫黄化合物、ハロゲン

化合物、硫酸イオン等の無機化合物；が挙げられる。

[0026] なお、本発明で用いる糖液は、上述した糖類を含有する液であれば特に制限はないが、リグニン由来等の固形分に関しては、濾過や吸着等を用いて除去することが好ましい。また、本発明で用いられる糖液は、使用する目的に応じて水で希釈して糖濃度を下げて用いたり、糖類の追添加や濃縮により糖濃度を高めて用いることができる。

[0027] (糖類以外のカルボニル化合物)

本発明で用いる糖液には、糖液を製造する工程および保管した際に生成する、糖類以外のカルボニル化合物が通常含まれている。カルボニル化合物としては、構造内にカルボニル基を有するものであれば特に限定はされず、脂肪族カルボニル化合物でも、芳香族基を有するものであってもよい。好ましくは炭素数 1 以上、20 以下、より好ましくは炭素数 16 以下、さらに好ましくは炭素数 12 以下のカルボニル化合物である。上記範囲のカルボニル化合物は水溶性が比較的高く、糖液、特に糖を含む水溶液中に含まれることが多いためである。このようなカルボニル化合物の具体例としては、例えばフルフラール、ヒドロキシメチルフルフラール、グリコールアルデヒド、蟻酸、ヒドロキシベンズアルデヒド、シリングアルデヒド、バニリン、イソバニリン、オルトバニリン、コニフェニルアルデヒド等のアルデヒド化合物；1, 4-ベンゾキノン等のケトン化合物；アクリル酸メチル、アクリル酸エチル等の不飽和エステル化合物、好ましくは不飽和共役エステル化合物；等が挙げられ、アルデヒド化合物、ケトン化合物が好ましく、より好ましくはアルデヒド化合物である。

[0028] (不飽和アルコール)

本発明で用いる糖液には、糖液を製造する工程および保管した際に生成する、不飽和アルコールが通常含まれている。不飽和アルコールとしては、構造内に脂肪族の炭素-炭素二重結合（オレフィン）を有するものであれば特に限定はされず、脂肪族不飽和アルコールであっても、芳香族基を有するものであってもよい。好ましくは炭素数 1 以上、20 以下、より好ましくは炭

素数 16 以下、さらに好ましくは炭素数 12 以下の不飽和アルコールである。上記範囲のアルコールは水溶性が比較的高く、糖液、特に糖を含む水溶液中に含まれることが多いためである。また不飽和アルコールはその構造内で共役構造を有していてもよい。典型的には脂肪族共役アルコールが挙げられる。不飽和アルコールの具体例としては、2-アルケニルアルコールであり、具体的にはアリルアルコール、クロチルアルコール、2-ペンテン-1-オール、2-ヘキセン-1-オール、2-ヘプテン-1-オール等が挙げられ、好ましくはアリルアルコールやクロチルアルコールである。

[0029] 本発明者らは、前記カルボニル化合物および不飽和アルコールから選ばれる少なくとも 1 つが、糖液を原料とした有機化合物を発酵生産する工程（有機物生産工程）において、有用化合物の生産量、蓄積量、および生産速度の低下減少を引き起こすことを見出した。なお以下で、前記有機物生産工程において前記のような作用を及ぼす物質を総称し、「発酵阻害物質」という。また前記発酵阻害物質を含有した糖液は、微生物の培養工程において、増殖量や増殖速度の低下が起こる。

また化学変換プロセスを経て有機化合物を生産する工程において、カルボニル化合物や不飽和アルコールは、その反応性の高さから生成物の着色を起こすことを見出した。着色についてはカルボニル化合物、典型的にはフルフラール等のアルデヒド化合物による着色が著しいため、これらのカルボニル化合物、好ましくはアルデヒド化合物、より好ましくはフルフラールを除去することで生成物の着色が抑制できる。

[0030] （水素化反応）

第 1 の発明では、上記の糖液中に含まれる前記カルボニル化合物および不飽和アルコールから選ばれる少なくとも 1 つを水素化反応に供して還元する。これにより前記カルボニル化合物および不飽和アルコールは、それぞれが水素化された物質に変換されることで、その含有量を低減させることができる。なお、第 1 の発明における「水素化反応」とは、上記の糖液中に含まれる糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群から選ば

れる少なくとも1つを、水素雰囲気下に供し、水素化された物質に変換する化学反応をいう。

[0031] 上記水素化反応において、糖液中の糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群から選ばれる少なくとも1つは、水素により還元され、対応する水素化物に変換される。これらの化合物は、後述する第3の発明および第4の発明において、微生物に対し、高い発酵阻害性を有することが多いためである。

なおここでいう「対応する水素化物」とは、前記カルボニル化合物、および／または不飽和アルコールが水素化により変換され、好ましくは水素化前に比べて発酵阻害性が低減されたものの総称である。

本発明の処理方法では、前記カルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群から選ばれる少なくとも1つが水素化されて対応する水素化物に変換されていればよく、糖液を、前記発酵生産に用いる際の発酵阻害性が低減されていることが好ましい。好ましくは、糖液中に含まれる前記カルボニル化合物および不飽和アルコール、またはその水素化物の含有量を指標として、糖液の発酵阻害性の程度を評価することができ、これについては後述する。

[0032] 具体的な「水素化物」としては以下の通りである。水素化反応により上記アルデヒド化合物は、対応する1級アルコールに変換され、ケトン化合物は、対応する2級アルコールに変換される。これらの水素化物（アルコール）は、更なる水素化により、それぞれのアルコールから脱水した化合物に変換されてもよい。また不飽和エステル化合物は、通常、水素化反応により、炭素－炭素二重結合が水素化されたエステル化合物に変換される。また更なる水素化により、対応するアルコールまで変換されていてもよい。不飽和エステル化合物に対応する水素化物はこれらのいずれでもよい。

また水素化反応により、不飽和アルコール類は、炭素－炭素二重結合が水素化されたアルコール類に変換され、好ましくは飽和アルコールに変換される。

[0033] 上記の水素化反応に糖液を供することで、有機化合物の発酵生産における阻害効果が低減され、また微生物の培養工程でも増殖速度や増殖量を低減させることなく、糖液の発酵プロセスを実施することができる。また、化学変換プロセスにおいても反応性が高いカルボニル化合物や不飽和アルコールが変換されることで、生成物の着色等を抑えることができる。

[0034] (金属触媒)

第1の発明における水素化反応は、触媒の存在下で行なうことが好ましい。触媒の種類は、特に限定されないが、上記の糖類以外のカルボニル化合物のカルボニル基や、不飽和アルコール及び不飽和エステル化合物等が有する炭素-炭素二重結合を水素化する能力を持つものであればよく、例えば金属触媒、有機分子触媒等が挙げられる。

[0035] 前記水素化処理は、好ましくは金属触媒の存在下で行なうことが好ましい。金属触媒とは、金属が触媒活性種となるものをいう。前記金属が担体に担持された触媒である金属担持触媒がより好ましい。

前記金属触媒の金属の形態は、本発明における水素化反応を行なう際に、金属状態であれば特に限定されない。

[0036] 前記金属触媒の金属の種類については、上述した糖類以外のカルボニル化合物のカルボニル基及び不飽和アルコールや不飽和エステル化合物等が有する炭素-炭素二重結合を水素化できるものであれば特に限定されないが、例えば周期表8族～11族の金属元素が含まれていることが望ましい。

具体的にはルテニウム、パラジウム、ロジウム、白金、ニッケル、銅、イリジウム、金などであり、好ましくはルテニウム、パラジウム、ロジウム、白金、ニッケル、銅であり、より好ましくはルテニウム、パラジウムである。

[0037] ルテニウムを使用した触媒は、アルデヒド化合物、ケトン化合物等のカルボニル化合物に対して水素化能が高く、パラジウムを使用した触媒は、カルボニル化合物の水素化能の高さに加え、カルボニル化合物の還元により得られたアルコールや不飽和アルコールを水素化分解できるほど水素化能が高い

金属である点で好ましい。

上記の金属は、本発明の効果を妨げない限り、1種類を用いても、2種類以上の金属を用いてもよく、使用する比率も制限されない。

[0038] 前記金属触媒は、金属担持触媒として用いるのが、触媒回収が容易であるうえ、安定性が高く触媒寿命の面で好ましい。前記金属担持触媒に用いられる担体は、特に限定されないが、例えば、活性炭やカーボンブラック、SiC等の炭素質担体；アルミナ、シリカ、ケイソウ土、ジルコニア、チタニア等の金属酸化物；等を用いることができ、中でも炭素質担体またはアルミナ、シリカを用いるのが、金属担持触媒の安定性の面で好ましい。

[0039] 金属担持触媒における金属の含有量は特に限定されないが、通常、金属に換算した質量百分率で、担体と金属の合計質量（触媒の全質量）に対して、各金属原子として担体に対する質量百分率で、通常0.1質量%以上、好ましくは0.5質量%以上、より好ましくは1質量%以上、通常50質量%以下、好ましくは20質量%以下、より好ましくは10質量%以下である。なお、2種類以上の金属が含有される場合も、2種類以上の金属の含有量は上記範囲内であることが好ましい。

[0040] 金属担持触媒の製造方法は、金属が担体に担持されれば特に制限はないが、通常は、金属塩の溶液に担体を浸漬する等の操作によって担体に金属塩を導入し、液相または気相の還元処理によって金属に変換し、触媒を製造する。

本発明において用いられる触媒の形状は、特に限定されるものではなく、固定床方式、流動床方式、液相反応、気相反応に従って、適宜選択されるものであり、具体的には粉末状、破碎状、ペレット状などの状態で使用される。

[0041] （水素化反応条件）

第1の発明における水素化反応の条件は、糖液中の発酵阻害物質である、糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールのカルボニル基や炭素-炭素二重結合が水素化されれば特に限定されない。

糖液中に含まれる糖類もアルデヒド基等を有しており、これらが同様に水

素化されると糖アルコールが生成する。具体的にグルコースからはソルビトールに、キシロースからキシリトールが生成する。すなわち前記の糖アルコールが生成しても、後述する有用化合物を発酵生産する工程や、微生物の培養工程において問題がない限りは、水素化反応条件は限定されない。そのため糖類以外のカルボニル化合物のカルボニル基及び、不飽和アルコールや不飽和エステル化合物が有する炭素－炭素二重結合は水素化でき、グルコースやキシロースなどの糖類は水素化されにくい、選択的な水素化条件を選択することが好ましい。

[0042] 第1の発明における水素化反応の反応温度は特に限定されないが、通常20℃以上、好ましくは40℃以上、より好ましくは50℃以上であり、通常120℃以下、好ましくは100℃以下、より好ましくは90℃以下である。水素化反応を前記温度範囲内で行うことにより、糖類を水素化することなく、発酵阻害成分である糖類以外のカルボニル成分および脂肪族共役アルコール等のカルボニル基、炭素－炭素二重結合の水素化が可能となる。

[0043] 第1の発明における水素化反応は、通常、水素ガス存在下、加圧条件下で行われる。水素化反応の圧力は特に限定されないが、通常0.1MPa以上、好ましくは0.3MPa以上、より好ましくは0.4MPa以上、通常10MPa以下、好ましくは5MPa以下であり、より好ましくは3MPa以下である。一般的には、反応圧力を上昇させると水素化の反応速度が上昇し、発酵阻害物質の水素化は促進されるが、糖アルコールの生成も促進されるため、糖アルコールの生成を抑える場合はより低圧条件で水素化を行うことが望ましい。

[0044] 第1の発明における水素化反応で使用する触媒の量は、糖液中の発酵阻害成分濃度、糖液中の触媒被毒成分濃度、使用する触媒の金属種、触媒の金属担持量、反応温度、反応圧力、反応様式、糖液の処理量といった諸条件と発酵阻害成分の除去効率、糖アルコールの生成抑制など所望する反応成績で決定されるものであり、特に限定されるものではない。

[0045] 第1の発明における水素化反応の反応時間は、糖液中の発酵阻害成分濃度

、糖液中の触媒被毒成分濃度、使用する触媒の金属種、触媒の金属担持量、反応温度、反応圧力、反応様式、糖液の処理量といった諸条件と発酵阻害成分の除去効率、糖アルコールの生成抑制など所望する反応成績で決定されるものであり、特に限定されるものではない。但し、反応時間が短いと発酵阻害物質の転化が十分に進行しない可能性があり、反応時間が長いと糖アルコールの生成量が増大する可能性がある。

[0046] 第1の発明における水素化反応には、溶媒を使用することができ、その種類は特に限定されるものではないが、通常は水が使用される。有機溶媒を共溶媒として使用してもよいが、水相に有機溶媒が混入することで発酵阻害を引き起こす可能性があるため、発酵生産や微生物の培養工程に供する際に有機溶媒を分離する工程が必要となるため、糖液は水溶液のまま水素化処理することが望ましい。

[0047] 第1の発明における水素化反応において、糖液中に含まれるN成分、S成分、酸等の触媒被毒成分が含まれる場合、水素化反応時に触媒を用いる場合、触媒に吸着することで水素化活性を低下させる可能性がある。このような触媒被毒成分を水素化処理前に除去してもよい。除去方法は特に限定されるものではないが、イオン交換樹脂、活性炭、合成樹脂による吸着除去処理等を行うことができる。

[0048] <第2の発明：水素化処理糖液>

前記第1の発明における水素化反応において、糖液に含有される糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群より選ばれる少なくとも1つが水素化反応によって還元されるため、得られる糖液中の前記カルボニル化合物および／または不飽和アルコールの濃度は、最初の糖液中の濃度より低い。なお、上記の水素化反応に供した後の糖液を、以下「水素化処理糖液」ということがある。

[0049] 第2の発明の水素化処理糖液に含まれる糖類以外のカルボニル化合物および／または不飽和アルコールの中でも、微生物に対し、発酵阻害能が高い物質としてフルフラールを挙げることができる。水素化反応後の糖液（水素化

処理糖液)中のフルフラールの含有率は、少ない方が好ましく、水素化処理糖液全量に対して0.01質量%以下が好ましく、0.001質量%以下がより好ましい。またフルフラールの含有率が少ないことで、糖液の着色も抑制でき、化学変換プロセスを経て有機化合物を生産する場合、生成する有機化合物の着色を抑制することができる。

また、第2の発明の水素化処理糖液に含まれる糖類以外のカルボニル化合物および／または不飽和アルコールの中でも、微生物に対し、発酵阻害能が高い他の物質として、グリコールアルデヒドが挙げられる。グリコールアルデヒドとしては、モノマー体でもダイマー体でもよく、また水溶液の場合は水和された化合物でもよい。通常、これら化合物の平衡混合物となる。水素化処理糖液中のグリコールアルデヒドの含有率は、水素化処理糖液全量に対して、0.03質量%以下が好ましく、好ましくは0.01質量%以下であることがより好ましい。

上記の糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールを上記範囲まで除去することにより、後述する発酵プロセスにおいて、微生物の増殖や有用化合物の発酵生産の効率を向上させることができる。

[0050] 第2の発明の水素化処理糖液は、前記糖類以外のカルボニル化合物および／または不飽和アルコールの水素化物を糖液に含んでいてもよく、具体的には、アルデヒド化合物およびケトン化合物である場合、対応するアルコール類、水素化分解によってさらにアルコールから脱水した化合物等を含んでいてもよい。具体的には、フルフラールの水素化生成物としては、フルフリルアルコールやテトラヒドロフルフリルアルコールが挙げられ、それらアルコールの脱水した化合物としてはメチルフランやジメチルフランが挙げられる。グリコールアルデヒドの水素化生成物としては、エチレングルコールが挙げられる。同様にケトン類であれば対応するアルコール類が含有され、不飽和エステル化合物であれば、エステル中の炭素-炭素二重結合が水素化されたエステル化合物や、それらエステルがさらに還元されたアルコール等を含んでいてもよい。また、不飽和アルコール類であれば不飽和炭素二重結合が

水素化されたアルコール類や、水素化分解によりさらにアルコールが脱水された化合物等を含有していてもよい。

[0051] 第2の発明の水素化処理糖液は、糖液を水素化反応に供することにより得られるが、水素化反応時に触媒を用いた場合、使用した触媒を分離回収する工程を含む。触媒の分離方法としては、回分式反応の場合、通常、得られた水素化処理糖液を濾過することによって触媒を回収する。また、流通式反応の場合には、固定床反応器等に糖液を展開し、触媒と水素化処理糖液とに分離回収することができる。また、第2の発明の水素化処理糖液は、必要に応じて、適宜、イオン交換樹脂、活性炭、合成樹脂等の手法で処理しても構わない。

[0052] 水素化反応後に回収された触媒は、糖類以外のカルボニル化合物、不飽和アルコールや不飽和エステルの、炭素－炭素二重結合を水素化または水素化分解できる活性を維持する限りは、回分反応器での繰り返し使用や、連続反応器での連続的使用が可能である。

他方、活性が低下した触媒は、水素圧力を上げる、反応温度を上げる等の操作条件により活性を維持することも可能である。ただし、糖アルコールの生成を抑制しつつ、発酵阻害成分を水素化する活性に制御される必要がある。

[0053] 本発明の第2の発明の水素化処理糖液は、後述の第3の発明に用いて有機化合物を製造する際に用いることができる。また同様に化学変換プロセスに用いることで各種有機化合物を製造することができる。

ここでいう化学変換プロセスとは、水素化処理糖液中に含まれる糖を原料として、各種有機化合物に変換することができる化学反応一般をいう。化学反応の種類は特に限定はされないが、具体的には、糖が有するカルボニル基が酸化されたアルドン酸や、更にヒドロキシメチル基がカルボキシル基に変換されるアルダル酸等を得る酸化反応、糖が有するカルボニル基が還元された糖アルコールを得る還元反応、酸、アルカリ、各種触媒を作用させ各種の有機化合物に変換する反応等が挙げられる。

[0054] <第3の発明：有機化合物の製造方法>

本発明の第3の発明は、糖液を含有する有機原料に有用物質生産能力を有する微生物を作用させて有機化合物を製造する方法である。

[0055] (水素化処理工程)

第3の発明において、糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群より選ばれる少なくとも1つを含む糖液を使用する場合、第3の発明は、先ず該糖液を水素化反応に供し、該糖液中に含まれる糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群より選ばれる少なくとも1つを水素化する工程（水素化処理工程）を有する。

上記水素化処理工程における糖類、糖類以外のカルボニル化合物、および不飽和アルコール、並びに水素化処理工程で用いる金属触媒、水素化処理の条件等は、上記第1の発明（糖類の処理方法）で説明したものおよび条件をそのまま用いることができる。

[0056] 他方、第3の発明において、糖液として第2の発明の水素化処理糖液を使用することもできる。この場合には、上記水素化処理工程を省略することができる。

[0057] (有機物生産工程)

第3の発明は、前記水素化処理後の糖液または第2の発明の水素化処理糖液を含有する有機原料に有機物生産能を有する微生物を作用させて有機化合物を得る、有機物生産工程を含む。有機物生産工程で使用する有機原料は、水素化処理された糖液を含有し、有機化合物を生成する際に、水素化処理された糖液に、糖液の性質、生産する有機化合物または作用させる微生物の種類に応じ、必要に応じ適宜各種成分を添加することができる。第3の発明において水素化処理された糖液にさらに添加することができるものとしては、後述する有用物質生産能力を有する微生物が資化して有機化合物を生成させる炭素源が挙げられ、その種類は特に限定されないが、通常、ガラクトース、ラクトース、グルコース、フルクトース、スクロース、デンプンまたはセルロース等の炭水化物；グリセロール、マンニトール、キシリトールまた

はリビトール等のポリアルコール類等の発酵性糖質が用いられ、このうちグルコース、スクロースまたはフルクトースが好ましく、特にグルコースまたはスクロースが好ましい。

これらは、単独で添加してもよいし、組み合わせて添加してもよい。

[0058] 有機物生産工程における前記有機原料の使用濃度は特に限定されないが、有機化合物の生成を阻害しない範囲で可能な限り高くすることが好ましい。具体的には糖液を含有する有機原料の濃度は、水性媒体の全体積に対して、通常50g/L以上、好ましくは100g/L以上であり、一方、通常300g/L以下、好ましくは200g/L以下である。また、培養液全量に対しては、通常1～100g/L、好ましくは5～50g/Lの範囲内で用いることができる。前記有機原料は、反応の進行に伴う前記有機原料の減少にあわせ、水性媒体中に前記有機原料をさらに添加してもよい。

[0059] (有用物質生産能力を有する微生物)

第3の発明で用いる微生物は、有用物質生産能力を有する微生物であれば、特に限定はされない。

なお第3の発明における「有用物質生産能力を有する微生物」とは、該微生物を培地中で培養したときに、該培地中に有用物質を生成蓄積することができる微生物をいう。

[0060] (有用物質)

微生物が生産する有用物質としては、微生物が培地中に生成蓄積することができる有機化合物であれば限定されないが、具体的には、エタノール、プロパノール、ブタノール、1,2-プロパンジオール、1,3-プロパンジオール、1,3-ブタンジオール、2,3-ブタンジオール、1,4-ブタンジオール、1,5-ペンタンジオール、1,6-ヘキサンジオール、グリセロール、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール等のアルコール類；1,5-ペンタメチレンジアミン、1,6-ヘキサメチレンジアミン等のアミン類；酢酸、酪酸、グリコール酸、乳酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、ピルビン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸、シスーアコ

ニット酸、クエン酸、イソクエン酸、2-オキソグルタル酸、2-オキソイソ吉草酸、グルタル酸、イタコン酸、アジピン酸、レブリン酸、キナ酸、シキミ酸、アクリル酸、メタクリル等のカルボン酸類；アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、リジン、アルギニン、メチオニン、ヒスチジン、システイン、セリン、トレオニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、プロリン、トリプトファン等のアミノ酸類；フェノール、カテコール、ハイドロキノン等のフェノール類；安息香酸、4-ヒドロキシ安息香酸、プロトカテク酸、フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸等の芳香族カルボン酸類；イノシン、グアノシン等のヌクレオシド類、イノシン酸、グアニル酸等のヌクレオチド；イソブチレン、イソプレン、ブタジエン等の不飽和炭化水素化合物等が挙げられる。

[0061] これらの中でも、発酵生産として公知の方法を採用でき、かつ、樹脂原料として使用可能であることから、アルコール類、アミン類、カルボン酸類、フェノール類が好ましく、炭素数2～10の脂肪族アルコール類と炭素数2～10の脂肪族カルボン酸類がより好ましい。中でも、発酵生産性が良好であることから、エタノール、ブタンジオール、またはコハク酸がさらに好ましい。

[0062] (微生物)

第3の発明で用いる微生物は、有用物質生産能力を有する微生物であれば特に限定されないが、コリネ型細菌、大腸菌、バチルス (*Bacillus*) 属細菌、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属細菌、セラチア (*Serratia*) 属細菌、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌、ラルストニア (*Ralstonia*) 属細菌、アナエロビオスピリラム (*Anaerobiospirillum*) 属細菌、アクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属細菌、マンヘミア (*Mannheimia*) 属細菌、バスフィア (*Basfia*) 属細菌、ザイモモナス (*Zymomonas*) 属細菌、ザイモバクター (*Zymobacter*) 属細菌、糸状菌、および酵母菌からなる群より選ばれる少なくとも1つの微生物であることが好ましい。

[0063] その中でも、コリネ型細菌、大腸菌、バチルス (*Bacillus*) 属細菌、アナエロビオスピリラム (*Anaerobiospirillum*) 属細菌、アクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属細菌、マンヘミア (*Mannheimia*) 属細菌、バスフィア (*Basfia*) 属細菌、ザイモバクター (*Zymobacter*) 属細菌、糸状菌、および酵母菌からなる群より選ばれる少なくとも1つが好ましく、より好ましくはコリネ型細菌、大腸菌、酵母菌であり、さらに好ましくはコリネ型細菌である。

[0064] 上記コリネ型細菌は、これに分類されるものであれば特に制限されないが、コリネバクテリウム属に属する細菌、ブレビバクテリウム属に属する細菌、アースロバクター属に属する細菌などが挙げられ、このうち好ましくは、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属に属するものが挙げられ、更に好ましくは、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) またはブレビバクテリウム・ラクトファーメントム (*Brevibacterium lactofermentum*) に分類される細菌である。

[0065] 第3の発明で使用可能なコリネ型細菌の特に好ましい具体例としては、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497)、同 MJ-233 AB-41 (FERM BP-1498)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 31831、およびブレビバクテリウム・ラクトファーメントム ATCC 13869 等が挙げられる。なお、ブレビバクテリウム・フラバムは、現在、コリネバクテリウム・グルタミカムに分類される場合もあることから (Lielbl W, Ehrmann M, Ludwig W, Schleifer KH, Int J Syst Bacteriol., 1991, Vol.41, p255-260)、本発明においては、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株、およびその変異株 MJ-233 AB-41 株はそれぞれ、コリネバクテリウム・グルタミカム MJ-233 株および MJ-233 AB-41 株と同一の株とする。

[0066] 上記ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 は、1975年4月28

日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所（現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に受託番号FERM P-3068として寄託され、1981年5月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-1497の受託番号で寄託されている。

[0067] 第3の発明で使用可能な大腸菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等が挙げられる。また、第3の発明で使用可能なアナエロビオスピリラム (*Anaerobiospirillum*) 属細菌としては、アナエロビオスピリラム・サクシニシプロデュセン (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*) 等が挙げられる

[0068] また、第3の発明で使用可能なバチルス (*Bacillus*) 属細菌としては、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) 等が挙げられる。

[0069] また、第3の発明で使用可能なクレブシエラ (*Klebsiella*) 属細菌としては、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) 等が挙げられる。

また、第3の発明で使用可能なセラチア (*Serratia*) 属細菌としては、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) 等が挙げられる。

[0070] また、第3の発明で使用可能なクロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌としては、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、クロストリジウム・オートエタノゲナム (*Clostridium autoethanogenum*)、クロストリジウム・リュングダーリー (*Clostridium ljungdahlii*)、クロストリジウム・ラグスダレイ (*Clostridium ragsdalei*) 等が挙げられる。

[0071] また、第3の発明で使用可能なエンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌としては、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) 等が挙げられる。

また、第3の発明で使用可能なラルストニア (*Ralstonia*) 属細菌としては、ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) 等が挙げられる。

[0072] また、第3の発明に使用可能なアクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属細菌としては、アクチノバチルス・サクシノジェネス (*Actinobacillus succinogenes*) 等が挙げられる。

また第3の発明に使用可能なマンヘミア (*Mannheimia*) 属細菌としては、バスフィア・サクシニシプロデュセン (*Mannheimia succiniciproducens*) 等が挙げられる。

[0073] また第3の発明で使用可能なバスフィア (*Basfia*) 属細菌としては、バスフィア・サクシニシプロデュセン (*Basfia succiniciproducens*) 等が挙げられる。また、第3の発明で使用可能なザイモモナス (*Zymomonas*) 属細菌としては、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 等が挙げられる。また、第3の発明で使用可能なザイモバクター (*Zymobacter*) 属細菌としては、ザイモバクター・パルメ (*Zymobacter palmae*) 等が挙げられる。

[0074] また第3の発明で使用可能な糸状菌としては、*Aspergillus*属、*Penicillium*属、*Rhizopus*属等が挙げられる。このうち、*Aspergillus*属では、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 等が挙げられ、*Penicillium*属では、ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*)、ペニシリウム・シンプリシシмум (*Penicillium simplicissimum*) 等が挙げられる。また、*Rhizopus*属では、リゾパス・オリゼー (*Rhizopus oryzae*) 等が挙げられる。

[0075] また、第3の発明で使用可能な酵母菌としては、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス属 (*Shizosaccharomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ピキア属 (*Pichia*)、クルイウェロマイセス属 (*Kluyveromyces*)、ヤロウィア属 (*Yarrowia*)、チゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*) が挙げられる。

[0076] 上記サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) としては、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ウバラム (*Sacchar*

omyces uvarum)、サッカロミセス・バイアヌス (*Saccharomyces bayanus*) 等が挙げられる。

また、上記シゾサッカロミセス属 (*Shizosaccharomyces*) としては、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等が挙げられる。

また、上記カンジダ属 (*Candida*) としては、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・ソノレンシス (*Candida sonorensis*)、カンジダ・グラブラタ (*Candida glabrata*) 等が挙げられる。また、上記ピキア属 (*Pichia*) としては、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピキア・スティピティス (*Pichia stipitis*) 等が挙げられる。

[0077] また上記クルイウエロマイセス属 (*Kluyveromyces*) としては、クルイウエロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、クルイウエロマイセス・マルキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、クルイウエロマイセス・サーモトレランス (*Kluyveromyces thermotolerans*) 等が挙げられる。また上記ヤロウィア属 (*Yarrowia*) としては、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 等が挙げられる。また上記チゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*) としては、チゴサッカロミセス・バイリイ (*Zygosaccharomyces bailii*)、チゴサッカロミセス・ロウキシ (*Zygosaccharomyces rouxii*) 等が挙げられる。

[0078] このうち、前記有用物質としてコハク酸を製造する場合は、上記微生物のうち、コリネ型細菌、大腸菌、バチルス (*Bacillus*) 属細菌、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属細菌、セラチア (*Serratia*) 属細菌、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌、ラルストニア (*Ralstonia*) 属細菌、アナエロビオスピリラム (*Anaerobiospirillum*) 属細菌、アクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属細菌、マンヘミア (*Mannheimia*) 属細菌、バスフィア (*Basfia*) 属細菌、ザイモバクター (*Zymobacter*) 属細菌、糸状菌、および酵母菌からなる群より選ばれる少なくとも1つが好ましく、より好ましくはコリネ型細菌、大腸菌、酵母菌であり、さらに好ましくはコリネ型細菌である。

[0079] また前記有用物質としてエタノールを製造する場合には、上記微生物のうち、コリネ型細菌、大腸菌、バチルス (*Bacillus*) 属細菌、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属細菌、セラチア (*Serratia*) 属細菌、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌、ラルストニア (*Ralstonia*) 属細菌、アナエロビオスピリラム (*Anaerobiospirillum*) 属細菌、アクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属細菌、マンヘミア (*Mannheimia*) 属細菌、バスフィア (*Basfia*) 属細菌、ザイモモナス (*Zymomonas*) 属細菌、ザイモバクター (*Zymobacter*) 属細菌、糸状菌、および酵母菌からなる群より選ばれる少なくとも1つが好ましく、より好ましくはコリネ型細菌、大腸菌、酵母菌であり、さらに好ましくは酵母菌である。

[0080] また、前記有用物質としてブタンジオール、好ましくは2, 3-ブタンジオールを製造する場合には、コリネ型細菌、大腸菌、バチルス (*Bacillus*) 属細菌、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属細菌、セラチア (*Serratia*) 属細菌、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌、ラルストニア (*Ralstonia*) 属細菌、アナエロビオスピリラム (*Anaerobiospirillum*) 属細菌、アクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属細菌、マンヘミア (*Mannheimia*) 属細菌、バスフィア (*Basfia*) 属細菌、ザイモモナス (*Zymomonas*) 属細菌、ザイモバクター (*Zymobacter*) 属細菌、糸状菌、および酵母菌からなる群より選ばれる少なくとも1つが好ましく、より好ましくはコリネ型細菌、大腸菌、酵母菌であり、さらに好ましくはコリネ型細菌である。

[0081] 上記微生物は、野生株だけでなく、UV照射やNTG処理等の通常の変異処理により得られる変異株、細胞融合若しくは遺伝子組換え法などの遺伝学的手法により誘導される組換え株などのいずれの株であってもよい。

また上記微生物は、本来的に有用物質生産能力を有する微生物であるが、育種により有用物質生産能を付与したものであってもよい。

[0082] 育種により有用物質生産能力を付与する手段としては、変異処理や遺伝子組換え処理などが挙げられ、有用物質生合成経路における酵素遺伝子の発現

強化や副生物生合成経路における酵素遺伝子の発現低減など、公知の方法を採用することができる。例えば、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸等のカルボン酸生産能を付与する場合は、後述するようなラクテートデヒドロゲナーゼ活性を低減するような改変やピルビン酸カルボキシラーゼ活性を増強するような手段などが挙げられる。エタノール、ブタノール、ブタンジオール等のアルコール生産能を付与する場合は、後述するようなラクテートデヒドロゲナーゼ活性を低減するような改変やアルコールデヒドロゲナーゼ活性を増強するような手段などが挙げられる。

[0083] 上記ラクテートデヒドロゲナーゼ（以下、LDHという）活性を低減させるような改変方法としては、特に限定はされないが、上述した微生物を親株として用い、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）や亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、LDH活性が低減した株を選択することによってそれぞれ得ることができる。また、LDHをコードする遺伝子を用いて改変してもよい。具体的には、染色体上のldh遺伝子を破壊する方法や、プロモーターやシャインダルガルノ（SD）配列等の発現調節配列を改変する方法などによって達成される。

[0084] LDH活性が低減した株の具体的な作製方法としては、染色体への相同組換えによる方法（特開平11-206385号公報等参照）や、sacB遺伝子を用いる方法（Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Puhler A, Gene 1994 Vol.145(1), p69-73）等が挙げられる。

[0085] 上記ピルビン酸カルボキシラーゼ（以下、PCとも呼ぶ）活性が増強するような改変方法としては、特に限定されないが、上述した微生物を親株として用い、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）や亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、PC活性が増強した株を選択することによってそれぞれ得ることができる。また、PCをコードする遺伝子を用いて改変してもよい。具体的には、pc遺伝子のコピー数を高めることによって達成でき、コピー数を高めることは、プラスミドを用いたり、公知の相同組換え法によって染色体上で多コピー化させた

りすることなどによって達成できる。なお、P C 活性の増強は、染色体上またはプラスミド上で p c 遺伝子のプロモーターへの変異導入、より強力なプロモーターへの置換などによって高発現化させることによって達成できる。

[0086] P C 活性の増強に用いる p c 遺伝子としては、P C 活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 由来の遺伝子を挙げることができる。さらに、コリネ型細菌以外の細菌、または他の微生物または動植物由来の p c 遺伝子を使用することもできる。微生物または動植物由来の p c 遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、ホモロジー等に基づいて P C 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものなどを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列に従って合成した遺伝子を使用することもできる。これらはハイブリダイゼーション法や P C R 法により、そのプロモーターおよび O R F 部分を含む領域を増幅することによって取得することができる。

[0087] 上記のようにして単離された P C をコードする遺伝子を公知の発現ベクターに発現可能に挿入することにより、P C 発現ベクターが提供される。この発現ベクターで形質転換することにより、P C 活性増強株を得ることができる。または、相同組換えなどによって、宿主微生物の染色体 D N A に P C をコードする D N A を発現可能に組み込むことによっても P C 活性増強株を得ることができる。なお、形質転換、相同組換えは当業者に知られた通常の方法に従って行うことができる。

[0088] 染色体上またはプラスミド上に P C 遺伝子を導入する場合には、適当なプロモーターを該遺伝子の 5' 一側上流に、より好ましくはターミネーターを 3' 一側下流にそれぞれ組み込む。このプロモーターおよびターミネーターとしては、宿主として利用する微生物中において機能することが知られているプロモーターおよびターミネーターであれば特に限定されず、p c 遺伝子

自身のプロモーターおよびターミネーターであってもよいし、他のプロモーターおよびターミネーターに置換してもよい。これら各種微生物において利用可能なベクター、プロモーターおよびターミネーターなどに関しては、例えば「微生物学基礎講座 8 遺伝子工学・共立出版」などに詳細に記述されている。

[0089] 本発明において用いられる微生物に、育種によりアルコール生産能を付与する場合としては、カルボン酸生産能を付与する場合と同様の方法で、LDH活性を低減するよう改変された微生物を利用することができる。

上記アルコールデヒドロゲナーゼ（以下、ADHとも呼ぶ）活性が増強するように改変された微生物は、上述のPC活性を増強する方法と同様にして作製することができる。

[0090] ADH活性の増強に用いるadh遺伝子としては、ADH活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、ザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 由来のadhB遺伝子、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) 由来のadhE2遺伝子を挙げることができる。さらに、上記以外の細菌、または他の微生物、動植物由来のadh遺伝子を使用することもできる。微生物または動植物由来のadh遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、ホモロジー等に基づいてADH活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものなどを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列に従って合成した遺伝子を使用することもできる。これらはハイブリダイゼーション法やPCR法により、そのプロモーターおよびORF部分を含む領域を増幅することによって取得することができる。

[0091] なお、本発明に用いる微生物は、有用物質生産能を付与するための改変のうちの2種類以上の改変を組み合わせ得られる微生物であってもよい。複数の改変を行う場合、その順番は問わない。

第3の発明で用いる微生物は、有用物質生産能を有し、且つペントース利

用能を有する微生物であってもよく、ペントース利用能を有する微生物が好ましい。

本発明において、「ペントース利用能」とは、該微生物がペントースを炭素源として利用し、増殖または有用物質生産することができることをいう。

[0092] 微生物が炭素源として利用するペントースとしては、炭素源として利用可能であれば特に限定されない。具体例としては、キシロース、アラビノース、リボース、リキソース等のアルドペントース類、リブロース、キシルロース等のケトペントース等が挙げられる。

これらの中でも、アルドペントース類が好ましく、非可食原料として利用されるヘミセルロース系バイオマスに含まれるキシロース、アラビノースがより好ましい。中でも、ヘミセルロース系バイオマス中の含有量が多いキシロースが特に好ましい。

[0093] ここで、ペントース利用能を有する微生物は、本来的にペントース利用能を有する微生物であってもよいし、育種によりペントース利用能を付与したものでよい。

育種によりペントース利用能を付与する手段としては、遺伝子組換え処理などが挙げられ、ペントース代謝経路の酵素遺伝子を導入など公知の方法を採用することができる。例えば、キシロース利用能を付与する場合は、後述するようなキシロースイソメラーゼ遺伝子を導入する方法、またはキシロースリダクターゼ遺伝子およびキシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を導入する方法などが挙げられる。アラビノース利用能を付与する場合は、後述するようなアラビノースイソメラーゼ遺伝子およびリブロキナーゼ遺伝子およびリブロース5リン酸エピメラーゼ遺伝子を導入する方法などが挙げられる。

[0094] 以下、育種によりペントース利用能を付与する具体例として、キシロース利用能の付与に関する改変例とアラビノース利用能の付与に関する改変例について説明する。

キシロース利用能を付与された微生物は、上述した微生物を親株として用い、該親株にキシロースイソメラーゼ（以下、XylAとも呼ぶ）活性を有

するタンパク質をコードする遺伝子を導入することによって得ることができる。

[0095] ここで、「X y I A 活性」とは、キシロースを異性化してキシルロースを生成する反応を触媒する活性（E C : 5 . 3 . 1 . 5）をいう。X y I A 活性が付与または増強されたことは、公知の方法、例えば G a o らの方法（Gao Q, Zhang M, McMillan JD, Kompala DS, Appl. Biochem. Biotechnol., 2002, Vol.98(100), p341-55）により、X y I A 活性を測定することによって確認することができる。

[0096] X y I A 活性が付与または増強された株の具体的な作製方法としては、x y I A 遺伝子をプラスミドによって導入する方法や、公知の相同組換え法によって染色体上に導入したりする方法などによって達成できる。

X y I A 活性の付与または増強に用いる x y I A 遺伝子としては、X y I A 活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）由来の遺伝子を挙げることができる。

[0097] さらに、大腸菌以外の細菌または他の微生物、動植物由来の x y I A 遺伝子を使用することもできる。微生物または動植物由来の x y I A 遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、ホモロジー等に基づいて X y I A 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものなどを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列に従って合成した遺伝子を使用することもできる。これらはハイブリダイゼーション法や P C R 法により、そのプロモーターおよび O R F 部分を含む領域を増幅することによって取得することができる。

[0098] 上記のようにして単離された X y I A をコードする遺伝子を公知の発現ベクターに発現可能に挿入することにより、X y I A 発現ベクターが提供される。この発現ベクターで形質転換することにより、X y I A 活性が付与または増強された株を得ることができる。あるいは、相同組換えなどによって、

宿主微生物の染色体DNAにXyIAをコードするDNAを発現可能に組み込むことによってXyIA活性が付与または増強された株を得ることができる。なお、形質転換、相同組換えは当業者に知られた通常の方法に従って行うことができる。

[0099] 染色体上またはプラスミド上にXyIA遺伝子を導入する場合には、適当なプロモーターを該遺伝子の5'側上流に、より好ましくはターミネーターを3'側下流にそれぞれ組み込む。このプロモーターおよびターミネーターとしては、宿主として利用する微生物中において機能することが知られているプロモーターおよびターミネーターであれば特に限定されず、XyIA遺伝子自身のプロモーターおよびターミネーターであってもよいし、他のプロモーターおよびターミネーターに置換してもよい。これら各種微生物において利用可能なベクター、プロモーターおよびターミネーターなどに関しては、例えば「微生物学基礎講座8 遺伝子工学・共立出版」などに詳細に記述されている。

[0100] また、キシロース利用能の付与においては、XyIA活性の付与または増強に加えて、キシロキナーゼ（以下、XyIBとも呼ぶ）活性を付与または増強するように改変された微生物であってもよい。

ここで、「XyIB活性」とは、キシロースをリン酸化してキシロース5リン酸を生成する反応を触媒する活性（EC：2. 7. 1. 17）をいう。XyIB活性が付与または増強されたことは、公知の方法、例えばEliassonらの方法（Eliasson A, Boles E, Johansson B, Otensterberg M, Thevelein JM, Spencer-Martins I, Juhnke H, Hahn-Hatengerdal B, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, Vol.53, p376-82）により、XyIB活性を測定することによって確認することができる。

[0101] XyIB活性が付与または増強された株は、上述のXyIA活性を付与または増強する方法と同様にして作製することができる。

XyIB活性の付与または増強に用いるXyIB遺伝子としては、XyIB活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えばエ

シェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 由来の遺伝子を挙げることができる。

[0102] さらに、上記以外の細菌、または他の微生物、動植物由来の $x y \mid B$ 遺伝子を使用することもできる。微生物または動植物由来の $x y \mid B$ 遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、ホモロジー等に基づいて $X y \mid B$ 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものなどを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列に従って合成した遺伝子を使用することもできる。これらはハイブリダイゼーション法やPCR法により、そのプロモーターおよびORF部分を含む領域を増幅することによって取得することができる。

[0103] $X y \mid A$ 活性および $X y \mid B$ 活性を付与または増強する場合、導入する $x y \mid A$ 遺伝子と $x y \mid B$ 遺伝子は同じ遺伝子座上に存在していてもよく、それぞれ別の遺伝子座上に存在していてもよい。2つの遺伝子が同じ遺伝子座上に存在している例としては、例えば、それぞれの遺伝子が連結して形成されたオペロンなどが挙げられる。

キシロース利用能を付与された微生物は、上述した微生物を親株として用い、該親株にキシロースリダクターゼ（以下、XRとも呼ぶ）活性を有するタンパク質をコードする遺伝子およびキシリトールデヒドロゲナーゼ（以下、XDHとも呼ぶ）活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入することによって得ることもできる。

[0104] ここで、「XR活性」とは、キシロースを還元してキシリトールを生成する反応を触媒する活性（EC: 1. 1. 1. 21）をいう。XR活性が付与または増強されたことは、公知の方法、例えばSasakiらの方法（Sasaki M, Jojima T, Inui M, Yukawa H, Appl Microbiol Biotechnol., 2010, Vol. 86(4), p1057-66）により、XR活性を測定することによって確認することができる。

[0105] XR活性が付与または増強された株は、上述の $X y \mid A$ 活性を付与または

増強する方法と同様にして作製することができる。X R 活性の付与または増強に用いる x r 遺伝子としては、X R 活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、ピキア・スティピティス (*Pichia stipitis*) 由来の X Y L 1 遺伝子を挙げることができる。

さらに、上記以外の微生物または動植物由来の x r 遺伝子を使用することもできる。微生物または動植物由来の x r 遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、ホモロジー等に基づいて X R 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものなどを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列に従って合成した遺伝子を使用することもできる。これらはハイブリダイゼーション法や P C R 法により、そのプロモーターおよび O R F 部分を含む領域を増幅することによって取得することができる。

[0106] 次に、「X D H 活性」とは、キシリトールを脱水素化してキシロースを生成する反応を触媒する活性 (E C : 1 . 1 . 1 . 9) をいう。X D H 活性が付与または増強されたことは、公知の方法、例えば R i z z i らの方法 (R i z z i M, Harwart K, Erlemann P, Bui-Thahn NA, Dellweg H, J Ferment Bio eng., 1989, Vol.67, p20-24) により、X D H 活性を測定することによって確認することができる。

[0107] X D H 活性が付与または増強された株は、上述の X y l A 活性を付与または増強する方法と同様にして作製することができる。X D H 活性の付与または増強に用いる x d h 遺伝子としては、X D H 活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、ピキア・スティピティス (*Pichia stipitis*) 由来の X Y L 2 遺伝子を挙げることができる。

[0108] さらに、上記以外の微生物または動植物由来の x d h 遺伝子を使用することもできる。微生物または動植物由来の x d h 遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、ホモロジー等に基づいて X D H 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものなどを使用することができる。また、塩基配列が決定され

た後には、その配列に従って合成した遺伝子を使用することもできる。これらはハイブリダイゼーション法やPCR法により、そのプロモーターおよびORF部分を含む領域を増幅することによって取得することができる。

[0109] また、キシロース利用能の付与においては、XDH活性およびXR活性の付与または増強に加えて、XylB活性を付与または増強するように改変された微生物であってもよい。XylB活性の付与または増強に関しては上述の通りである。

アラビノース利用能を付与された微生物は、上述した微生物を親株として用い、該親株にアラビノースイソメラーゼ（以下、AraAとも呼ぶ）活性を有するタンパク質をコードする遺伝子およびリブロキナーゼ（以下、AraBとも呼ぶ）活性を有するタンパク質をコードする遺伝子およびリブローズ5リン酸エピメラーゼ（以下、AraDとも呼ぶ）活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入することによって得ることができる。

[0110] ここで、「AraA活性」とは、アラビノースを異性化してリブローズを生成する反応を触媒する活性（EC：5. 3. 1. 4）をいう。AraA活性が付与または増強されたことは、公知の方法、例えばPatrickらの方法（Patrick JW, Lee N, J. Biol. Chem., 1968, Vol.243, p4312-19）により、AraA活性を測定することによって確認することができる。

[0111] AraA活性が付与または増強された株は、上述のXylA活性を付与または増強する方法と同様にして作製することができる。AraA活性の付与または増強に用いるaraA遺伝子としては、AraA活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）、コリネバクテリウム・グルタミカム（*Corynebacterium glutamicum*）由来の遺伝子を挙げることができる。

[0112] さらに、上記以外の細菌、または他の微生物、動植物由来のaraA遺伝子を使用することもできる。微生物または動植物由来のaraA遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、ホモロジー等に基づいてAraA活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体

より単離し、塩基配列を決定したものなどを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列に従って合成した遺伝子を使用することもできる。これらはハイブリダイゼーション法やPCR法により、そのプロモーターおよびORF部分を含む領域を増幅することによって取得することができる。

[0113] 次に、「AraB活性」とは、リブロースをリン酸化してリブロース5リン酸を生成する反応を触媒する活性（EC：2. 7. 1. 16）をいう。AraB活性が付与または増強されたことは、公知の方法、例えばLeeらの方法（Lee N, Englesberg E, Proc. Natl. Acad. Sci., 1962, Vol.48, p335-48）により、AraB活性を測定することによって確認することができる。

[0114] AraB活性が付与または増強された株は、上述のXylA活性が付与または増強する方法と同様にして作製することができる。AraB活性の付与または増強に用いるaraB遺伝子としては、AraB活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）、コリネバクテリウム・グルタミカム（*Corynebacterium glutamicum*）由来の遺伝子を挙げることができる。

[0115] さらに、上記以外の細菌、または他の微生物、動植物由来のaraB遺伝子を使用することもできる。微生物または動植物由来のaraB遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、ホモロジー等に基づいてAraB活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものなどを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列に従って合成した遺伝子を使用することもできる。これらはハイブリダイゼーション法やPCR法により、そのプロモーターおよびORF部分を含む領域を増幅することによって取得することができる。

[0116] さらに、「AraD活性」とは、リブロース5リン酸を異性化してキシロース5リン酸を生成する反応を触媒する活性（EC：5. 1. 3. 4）をいう。AraD活性が付与または増強されたことは、公知の方法、例えばD

e a n d a らの方法 (Deanda K, Zhang M, Eddy C, Picataggio S, Appl Environ Microbiol., 1996, Vol.62(12), p4465-70) により、A r a D 活性を測定することによって確認することができる。

[0117] A r a D 活性が付与または増強された株は、上述の X y l A 活性を付与または増強する方法と同様にして作製することができる。A r a D 活性の付与または増強に用いる a r a D 遺伝子としては、A r a D 活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 由来の遺伝子を挙げることができる。

[0118] さらに、上記以外の細菌、または他の微生物、動植物由来の A r a D 遺伝子を使用することもできる。微生物または動植物由来の a r a D 遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、ホモロジー等に基づいて A r a D 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものなどを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列に従って合成した遺伝子を使用することもできる。これらはハイブリダイゼーション法や P C R 法により、そのプロモーターおよび O R F 部分を含む領域を増幅することによって取得することができる。

[0119] A r a A 活性および A r a B 活性および A r a D 活性を付与または増強する場合、導入する a r a A 遺伝子、a r a B 遺伝子、および a r a D 遺伝子は同じ遺伝子座上に存在していてもよく、それぞれ別の遺伝子座上に存在していてもよい。2つまたは3つの遺伝子が同じ遺伝子座上に存在している例としては、例えば、それぞれの遺伝子が連結して形成されたオペロンなどが挙げられる。

[0120] なお、第3の発明に用いる微生物は、ペントース利用能を付与するための改変のうちの2種類以上の改変を組み合わせ得られる細菌であってもよい。複数の改変を行う場合、その順番は問わない。

また、第3の発明に用いる微生物は、有用物質生産能を付与するための改

変とペントース利用能を付与するための改変を組み合わせ得られる微生物であってもよい。複数の改変を行う場合、その順番は問わない。

[0121] 第3の発明で用いる微生物の菌体量は、特に限定されないが、湿菌体質量として、発酵生産液全量に対し、通常1 g/L以上、好ましくは10 g/L以上、より好ましくは20 g/L以上であり、一方、通常700 g/L以下、好ましくは500 g/L以下、さらに好ましくは400 g/L以下である。

[0122] (水性媒体)

第3の発明で使用する水性媒体とは、水、水を主成分とする水溶液、およびゲル(寒天)等と、糖液を含有する有機原料と、有用物質生産能を有する微生物、並びに有機原料中に含まれる糖類以外のカルボニル化合物および/または不飽和アルコールを水素化して得られるアルコールのほか、微生物の培養に必要な成分を含む液体を意味し、溶解していない液体・固体が分散したのも含まれる。

[0123] 第3の発明で用いる水性媒体で用いられる水溶液としては、例えばリン酸緩衝液等の緩衝液が挙げられ、ゲルとしては例えば微生物を培養するための培地を挙げることができるが、水性媒体は窒素源や無機塩などを含む水溶液であることが好ましい。ここで、窒素源としては、第3の発明で用いる微生物が資化して有機化合物を生成させうる窒素源であれば特に限定されないが、具体的には、アンモニウム塩、硝酸塩、尿素、大豆加水分解物、カゼイン分解物、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカーなどの各種の有機、無機の窒素化合物が挙げられる。無機塩としては各種リン酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カリウム、マンガン、鉄、亜鉛等の金属塩が用いられる。また、ビオチン、チアミン、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等のビタミン類、ヌクレオチド、アミノ酸などの生育を促進する因子を必要に応じて添加する。また、反応時の発泡を抑えるために、水性媒体には市販の消泡剤を適量添加しておくことが好ましい。

[0124] また、水性媒体は、例えば上述した有機原料、窒素源、無機塩などのほか

に、炭酸イオン、重炭酸イオンおよび二酸化炭素ガス（炭酸ガス）から選ばれる少なくとも1つを含有していてもよい。炭酸イオンまたは重炭酸イオンは、中和剤としても用いることのできる炭酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウムなどから供給されるが、必要に応じて、炭酸若しくは重炭酸またはこれらの塩或いは二酸化炭素ガスから供給することもできる。炭酸または重炭酸の塩の具体例としては、例えば炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム等が挙げられる。

[0125] 水性媒体中における炭酸イオンまたは重炭酸イオンを含有させる場合の濃度は、特に限定はされないが、通常1 mM以上、好ましくは2 mM以上、さらに好ましくは3 mM以上であり、また、通常500 mM以下、好ましくは300 mM以下、さらに好ましくは200 mM以下である。二酸化炭素ガスを含む場合は、水性媒体1 L当たり通常50 mg以上、好ましくは100 mg以上、さらに好ましくは150 mg以上の二酸化炭素ガスを含むことが好ましく、一方、水性媒体1 L当たり通常25 g以下、好ましくは15 g以下、さらに好ましくは10 g以下の二酸化炭素ガスを含むことが好ましい。

[0126] 水性媒体のpHは、用いる微生物の種類に応じて、その活性が最も有効に発揮される範囲に調整されることが好ましい。具体的には、コリネ型細菌を用いる場合には、水性媒体のpHを、通常5.5以上、好ましくは6以上、より好ましくは6.6以上、さらに好ましくは7.1以上であり、通常10以下、好ましくは9.5以下、より好ましくは9.0以下である。

[0127] 水性媒体のpHは、生産される有機化合物が酸性物質である場合には、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウム、重炭酸アンモニウム、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、アンモニア（水酸化アンモニウム）、またはそれらの混合物等を添加することによって調整することができる。

。生産される有機化合物が塩基性物質である場合には、塩酸、硫酸、リン酸等の無機酸、酢酸等の有機酸、それらの混合物等を添加すること、または二酸化炭素ガスを供給することによって調整することができる。

[0128] (有機物生産工程の条件)

第3の発明における有機物生産工程の反応時間は、特に限定はされないが、通常1時間以上、好ましくは3時間以上であり、通常168時間以下、好ましくは72時間以下である。

[0129] 第3の発明における有機物生産工程の反応温度は、用いる前記微生物の生育至適温度と同じ温度で行ってもよいが、生育至適温度より高い温度で行うことが有利であり、通常生育至適温度より2℃以上、好ましくは7℃以上、より好ましくは15℃以上、さらに好ましくは20℃以上高い温度で行う。具体的には、コリネ型細菌の場合には、通常35℃以上、好ましくは37℃以上、さらに好ましくは39℃以上であり、一方、通常45℃以下、好ましくは43℃以下、さらに好ましくは41℃以下である。有機化合物生産反応の間、常に35℃～45℃の範囲とする必要はないが、全反応時間の50%以上、好ましくは80%以上の時間において、上記温度範囲にすることが望ましい。

[0130] 第3の発明における有機物生産工程は、通気、攪拌して行ってもよく、製造する有機物や菌体の性質に合わせて適宜選択することができ、好氣的雰囲気でおこなっても、通気せず、酸素を供給しない嫌氣的雰囲気下で行なってもよい。なおここでいう嫌氣的雰囲気下は、例えば容器を密閉して無通気で反応させる、窒素ガス等の不活性ガスを供給して反応させる、二酸化炭素ガス含有の不活性ガスを通気する等の方法によって得ることができる。

第3の発明における有機物生産工程は、特段の制限はないが、回分反応、半回分反応もしくは連続反応のいずれにも適用することができる。

[0131] 第3の発明は、水素化処理糖液を含有する有機原料に前記微生物を作用させることにより有機化合物を生成させ、これを回収する工程を有することが好ましい。製造し得る有機化合物の種類および好ましい有機化合物の例は上

述した通りである。

[0132] (有機化合物の回収工程、精製工程)

第3の発明は、上記の有機物生産工程により有機化合物が生成し、水性媒体中に蓄積させることができる。前記有機物生産工程で蓄積させた有機化合物は、常法に従って、水性媒体より回収する工程をさらに含んでもよい。具体的には、例えば、蓄積させた有機化合物がコハク酸、フマル酸、リンゴ酸等のカルボン酸である場合には、遠心分離、ろ過等により菌体等の固形物を除去した後、イオン交換樹脂等で脱塩し、回収することができる。

[0133] また第3の発明においては、前記の回収する工程で得られたものを精製する工程をさらに含んでもよい。具体的には水性媒体反応液から回収した溶液を結晶化（晶析）またはカラムクロマトグラフィーにより精製して、カルボン酸を得ることができる。

蓄積させた有機化合物がエタノール、ブタノール、ブタンジオール等のアルコールである場合には、遠心分離、ろ過等により菌体等の固形物を除去した後、蒸留等で濃縮し、その溶液を膜脱水するなどして、アルコールを精製することができる。

[0134] 第3の発明で前記微生物を用いるに当たっては、寒天培地等の固体培地で斜面培養したものを直接用いても良いが、必要に応じて上記微生物を予め液体培地で培養したものをを用いてもよい。すなわち、前記微生物を予め増殖させておいた上で、前記微生物に有機化合物を生産させてもよい。上述のように種培養や本培養を行なうことで、前記微生物を予め増殖させることができるが、このときに使用する有機原料としては、水素化処理糖液を用いてもよいし、その他の有機原料を用いてもよい。

[0135] なお、種培養または本培養した微生物を水性媒体中で増殖させながら、水素化処理糖液を含有する有機原料と反応させることによって有機化合物を製造してもよいし、予め種培養または本培養を行なうことで増殖させた菌体を、水素化処理糖液を含有する有機原料を含む水性媒体中で有機原料と反応させることによって有機化合物を製造してもよい。

また、第3の発明において用いられる微生物としては、上記微生物のほか、微生物の処理物を使用することもできる。微生物の処理物としては、例えば、微生物の菌体をアクリルアミド、カラギーナン等で固定化した固定化菌体、菌体を破碎した破碎物、その遠心分離上清、またはその上清を硫酸処理等で部分精製した画分等が挙げられる。

[0136] <第4の発明：微生物の培養方法>

第4の発明の培養方法は、本発明の水素化処理糖液を含有する有機原料を炭素源として用いて、有用物質生産能力を有する微生物を培養させる。本発明の培養方法によって得られた微生物は、その後、有機原料に作用させることによって有機化合物を生成させ、これを回収することができる。このときの有機原料としては、前記水素化処理糖液を用いてもよいし、水素化処理糖液中にその他の有機原料を含んでいてもよい。製造し得る有機化合物の種類および好ましい有機化合物の例は上述した通りである。

[0137] 第4の発明の培養方法では、水素化処理糖液を含む寒天培地等の固体培地で培養してもよいし、水素化処理糖液を含む液体培地で培養してもよい。後述する種培養や本培養を行なうことで、有機化合物生産反応に供する前記微生物を増殖させることができる。

種培養は、本培養に供する前記微生物の菌体を調製するために行なうものである。種培養に用いる培地は、微生物の培養に用いられる通常の培地を用いることができるが、窒素源や無機塩などを含む培地であることが好ましい。ここで、窒素源としては、本微生物が資化して増殖できる窒素源であれば特に限定されないが、具体的には、アンモニウム塩、硝酸塩、尿素、大豆加水分解物、カゼイン分解物、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステイープリカーなどの各種の有機、無機の窒素化合物が挙げられる。無機塩としては各種リン酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カリウム、マンガン、鉄、亜鉛等の金属塩が用いられる。また、ビオチン、チアミン、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等のビタミン類、ヌクレオチド、アミノ酸などの生育を促進する因子を必要に応じて添加する。

さらに、必要に応じて、前記培地に炭素源として水素化処理糖液を添加してもよいし、グルコース等の有機原料を添加してもよい。

[0138] 種培養は、一般的な生育至適温度で行なうことが好ましい。一般的な生育至適温度とは、有機化合物の生産に用いられる条件において最も生育速度が速い温度のことを言う。具体的な培養温度としては、通常25℃～40℃であり、30℃～37℃が好ましい。コリネ型細菌の場合は、通常25℃～35℃であり、28℃～33℃がより好ましく、約30℃が特に好ましい。

[0139] 種培養は、一般的な生育至適pHで行なうことが好ましい。一般的な生育至適pHとは、有機化合物の生産に用いられる条件において最も生育速度が速いpHのことを言う。具体的な培養pHとしては、通常pH4～10であり、pH6～8が好ましい。コリネ型細菌の場合は、通常pH6～9であり、pH6.5～8.5が好ましい。

また、種培養の培養時間は、一定量の菌体を得られる時間であれば特段の制限はないが、通常6時間以上96時間以下である。また、好気性微生物の種培養においては、通気や攪拌等の方法により、酸素を供給することが好ましい。

[0140] 種培養後の菌体は、後述する本培養に用いることができるが、種培養については省略してもよく、寒天培地等の固体培地で斜面培養したものを直接本培養に用いてもよい。また、必要に応じて、種培養を何度か繰り返し行ってもよい。

本培養は、後述する有機化合物生産反応に供する前記微生物菌体を調製するために行なうものであり、主として菌体量を増やすことを目的とする。上述の種培養を行う場合は、種培養により得られた菌体を用いて本培養を行う。

[0141] 本培養に用いる培地は、微生物の培養に用いられる通常の培地を用いることができるが、窒素源や無機塩などを含む培地であることが好ましい。ここで、窒素源としては、本微生物が資化して増殖できる窒素源であれば特に限定されないが、具体的には、アンモニウム塩、硝酸塩、尿素、大豆加水分解

物、カゼイン分解物、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカーなどの各種の有機、無機の窒素化合物が挙げられる。無機塩としては各種リン酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カリウム、マンガン、鉄、亜鉛等の金属塩が用いられる。また、ビオチン、チアミン、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等のビタミン類、ヌクレオチド、アミノ酸などの生育を促進する因子を必要に応じて添加する。また、培養時の発泡を抑えるために、培地には市販の消泡剤を適量添加しておくことが好ましい。

[0142] また、本培養においては、炭素源として水素化処理糖液を含有する有機原料を使用する。必要に応じて、その他の有機原料を添加してもよい。本培養において使用する水素化処理糖液以外の有機原料としては、前記微生物が資化して増殖し得るものであれば特に限定されないが、通常、ガラクトース、ラクトース、グルコース、フルクトース、スクロース、サッカロース、デンプン、セルロース等の炭水化物；グリセロール、マンニトール、キシリトール、リビトール等のポリアルコール類等の発酵性糖質が用いられ、このうちグルコース、スクロース、またはフルクトースが好ましく、特にグルコースまたはスクロースが好ましい。

[0143] また、本培養は、一般的な生育至適温度で行なうことが好ましい。具体的な培養温度としては、通常25℃～40℃であり、30℃～37℃が好ましい。コリネ型細菌の場合は、通常25℃～35℃であり、28℃～33℃がより好ましく、約30℃が特に好ましい。

また、本培養は、一般的な生育至適pHで行なうことが好ましい。具体的な培養pHとしては、通常pH4～10であり、pH6～8が好ましい。コリネ型細菌の場合は、通常pH6～9であり、pH6.5～8.5が好ましい。

[0144] また、本培養の培養時間は、一定量の菌体を得られる時間であれば特段の制限はないが、通常6時間以上96時間以下である。また、好気性微生物の本培養においては、通気や攪拌等の方法により、酸素を供給することが好ましい。

また、本培養においては、より有機化合物の製造に適した菌体の調製方法として、特開2008-259451号公報に記載の炭素源の枯渇と充足を短時間で交互に繰り返すように培養を行う方法も用いることができる。

[0145] 本培養後の菌体は、有機物生産反応に用いることができるが、培養液を直接用いてもよいし、遠心分離、膜分離等によって菌体を回収した後に用いてもよい。

また、前記発酵性糖質を含有する澱粉糖化液、糖蜜なども使用され、前記発酵性糖質がサトウキビ、甜菜、サトウカエデ等の植物から搾取した糖液であるものが好ましい。

[0146] また、本培養は、一般的な生育至適温度で行なうことが好ましい。具体的な培養温度としては、通常25℃～40℃であり、30℃～37℃が好ましい。コリネ型細菌の場合は、通常25℃～35℃であり、28℃～33℃がより好ましく、約30℃が特に好ましい。

[0147] また、本培養は、一般的な生育至適pHで行なうことが好ましい。具体的な培養pHとしては、通常pH4～10であり、pH6～8が好ましい。コリネ型細菌の場合は、通常pH6～9であり、pH6.5～8.5が好ましい。

また、本培養の培養時間は、一定量の菌体を得られる時間であれば特段の制限はないが、通常6時間以上96時間以下である。また、本培養においては、通気や攪拌等の方法により、酸素を供給することが好ましい。

[0148] また、本培養においては、より有機化合物の製造に適した菌体の調製方法として、特開2008-259451号公報に記載の炭素源の枯渇と充足を短時間で交互に繰り返すように培養を行う方法も用いることができる。

本培養後の菌体は、後述する有機化合物生産反応に用いることができるが、培養液を直接用いてもよいし、遠心分離、膜分離等によって菌体を回収した後に用いてもよい。

実施例

[0149] 以下に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら

の実施例により制限されるものではない。

GCおよびLCの分析方法を以下に示す。

[0150] (ガスクロマトグラフ (GC) 分析)

装置 : 島津製作所社製 GC-2014

カラム : アジレントテクノロジー社製 J & W DB-1 60 m ×
0.25 mm、膜圧 0.25 μm

インジェクション温度 : 230 °C

検出温度 : 220 °C

スプリット比 : 1 / 25

ガス流量 : 1.5 mL / 分

昇温 : 50 °C、10 分間保持の後、220 °C まで、15 °C / 分で
昇温し、220 °C で 8 分間保持

[0151] (液相クロマトグラフ (LC) 分析)

ポンプ : 島津製作所社製 LC-20AD

カラムオーブン : 島津製作所社製 CTO-10A

UV 検出器 : 島津製作所社製 SPD-10A

RI 検出器 : 島津製作所社製 RID-10A

カラム : 信和化工社製 ULTRON PS-80H 8.0 ID
× 300 mm

装置 : 溶離液 : 0.11 質量% 過塩素酸溶液 1.0 mL / 分

検出方法 : UV (210 nm), RI

注入量 : 10 μL

[0152] (糖液の吸収スペクトル測定)

測定装置 : 島津製作所社製 UV-1650PC

測定温度 : 25 °C

測定セル : 石英管 10 mm

希釈倍率 : 測定対象をイオン交換水で希釈

[0153] (糖液の作製)

(製造例 1)

超純水 90.7 mL にグルコース 8.0 g、キシロース 1.0 g、フルフラール 0.1 g、ギ酸 0.04 g、グリコールアルデヒドダイマー 0.3 g を溶解させ糖液を作製した。以下、糖液-1 とする。

糖液-1 の LC 分析を行ったところ、グルコース 8.0 質量%、キシロース 1.0 質量%、ギ酸 0.04 質量%、グリコールアルデヒドダイマー 0.3 質量%であった。

同様に糖液-1 の GC 分析を行ったところ、フルフラール 0.1 質量%であった。

[0154] (製造例 2)

超純水 452 mL にグルコース 40.1 g、キシロース 5.1 g、フルフラール 0.5 g、ギ酸 0.2 g、グリコールアルデヒドダイマー 1.5 g を溶解させ糖液を作製した。

陰イオン交換樹脂（三菱化学社製、ポーラス型ダイヤイオン PA312L OH）3.6 mL をガラスカラムにつめ、上記作製の糖液 99 g を通過させた糖液のうち、初めの 5 mL は廃棄し、その後樹脂を通過した糖液を回収した。樹脂に残存している糖液は脱イオン水 5 mL で洗い出し、回収した糖液（97.1 g）に含めた。以下、糖液-2 とする。

[0155] (製造例 3)

超純水 91.1 mL にグルコース 8.0 g、キシロース 1.0 g を溶解させた糖液（以下、糖液-0）を作成した。製造例 1 で作製した糖液-1 を 12.0 g と上記糖液-0 を 3.0 g 混和させ、フルフラール 0.1 質量%、ギ酸 0.03 質量%、グリコールアルデヒドダイマー 0.2 質量%となるような糖液-3 を作製した。糖液-3 中のアルデヒド類含有量は、糖液-1 の 0.8 等量に相当する。

[0156] (製造例 4)

同様に製造例 1 で作成した糖液-1 を 9.0 g と上記糖液-0 を 6.0 g を混和させ、フルフラール 0.06 質量%、ギ酸 0.02 質量%、グリコー

ルアルデヒドダイマー 0.18 質量%となるような糖液-4 を作製した。糖液-4 中のアルデヒド類含有量は、糖液-1 の 0.6 等量に相当する。

[0157] (製造例 5)

同様に製造例 1 で作成した糖液-1 を 6.0 g と上記糖液-0 を 9.0 g 混和させ、フルフラール 0.04 質量%、ギ酸 0.02 質量%、グリコールアルデヒドダイマー 0.1 質量%となるような糖液-5 を作成した。糖液-5 中のアルデヒド類含有量は、糖液-1 の 0.4 等量に相当する。

[0158] (実施例 1)

(糖液の水素化処理)

70 mL ミクロオートクレーブに 5 質量% Ru/C (エヌイーケムキャット社製) を 0.1 g 仕込んだ。これに製造例 1 で調製した糖液-1 を 20 g 加えた。アルゴンを反応器にフローさせた後、オートクレーブを閉じた。水素 1 MPa で 4 回系内を水素置換した後、想定 of 最大反応圧力以上で気密試験を行った。気密試験後は圧力が 0.9 MPa になるまで水素をパージした。温度を 60℃ に設定した反応炉にオートクレーブを設置し、1 時間水素化反応を行なった後、オートクレーブを反応炉から取り出し、空冷した。23℃ まで冷却されたらオートクレーブから内容物を取り出した。前記水素化反応液から触媒をディスポーザブルのシリンジとフィルター (0.45 μm) でろ過して、水素化処理糖液-1 を得た。

[0159] (水素化処理糖液-1 の分析)

水素化処理糖液-1 を上記同様に、LC 分析を行ったところ、グルコース 8.1 質量%、キシロース 1.1 質量%、ギ酸 0.04 質量%、グリコールアルデヒドダイマー 0.02 質量%であった。同様に水素化処理糖液 1 の GC 分析を行ったところ、フルフラールは検出限界以下 (0.001 質量%未満)、フルフリルアルコール 0.01 質量%、テトラヒドロフルフリルアルコール 0.06 質量%であった。

水素化反応によって、発酵阻害成分であるフルフラールが除去されたほか、グリコールアルデヒドに関しても大幅に濃度が減少した。

[0160] (実施例2)

(糖液の水素化処理)

上記糖液－2を使用すること以外は実施例1と同様の方法で水素化処理を行った。この水素化処理を行った糖液（以下、水素化処理糖液－2とする）のLC分析を行ったところ、グルコース7.8質量%、キシロース1.0質量%、ソルビトール0.05質量%、キシリトール0.04質量%であった。グリコールアルデヒドダイマーは検出されなかった。同様に水素化処理した糖液のGC分析を行ったところ、フルフラールは検出限界以下（0.001質量%未満）、テトラヒドロフルフリルアルコール0.09質量%であった。

水素化処理によって、発酵阻害成分であるフルフラールが除去されたほか、グリコールアルデヒドに関しても大幅に濃度が減少した。

[0161] (実施例3)

水素化反応時の反応圧力を0.4MPaで実施したこと以外は、実施例2と同様の方法で水素化反応を行った。この水素化処理を行った糖液（以下、水素化処理糖液－3とする）のLC分析を行ったところ、グルコース7.8質量%、キシロース1.0質量%、キシリトール0.009質量%、グリコールアルデヒドダイマー0.005質量%であった。同様に水素化処理した糖液のGC分析を行ったところ、フルフラールは検出限界以下（0.001質量%未満）、フルフリルアルコール0.006質量%、テトラヒドロフルフリルアルコール0.05質量%であった。

水素化反応によって、発酵阻害成分であるフルフラールが除去されたほか、グリコールアルデヒドに関しても大幅に濃度が減少した。

[0162] (製造例6)

<キシロースイソメラーゼ遺伝子およびキシロキナーゼ遺伝子導入株の作製>

特願2013-161477明細書、実施例に記載の方法により、ブレビバクテリウム・フラバムMJ233株より、ブレビバクテリウム・フラバム

MJ233/xyIAB/PC-4/ Δ L₁DH株を作製した。なお、以下にその概要を説明するが、上記出願明細書の内容は、参照により本願に組み込まれるものとする。

(A) 大腸菌ゲノムDNAの抽出

大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109株をTB培地 [Terrific Broth 47 g/L、Glycerol 5 g/L] 10 mLで対数増殖期後期まで培養し、集菌した。得られた菌体を10 mg/mLの濃度のリゾチームを含む緩衝液 [20 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM NaCl、1 mM EDTA・2Na] 0.15 mLに懸濁した。次に、上記懸濁液にプロテナーゼKを、最終濃度が100 μ g/mLになるように添加し、37°Cで1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50°Cで6時間保温して溶菌した。

この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 $\times$ g、20分間、10~12°C) し、上清画分を分取した。酢酸ナトリウムを0.3 Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールを加え混合し、遠心分離 (15,000 $\times$ g、2分間) により回収した沈殿物を70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAにTE緩衝液 [10 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA・2Na] 5 mLを加え、4°Cで一晩静置し、以後のPCRの鋳型DNAに使用した。

[0163] (B) キシロースイソメラーゼ-キシロキナーゼ遺伝子オペロンのクローニング

大腸菌 JM109株のxyIABオペロンの取得は、上記(A)で調製したDNAを鋳型とし、全ゲノム配列が報告されている大腸菌 K12-MG1655株の該オペロン周辺の配列 (GenBank Accession No. U00096) を基に設計した合成DNA : 5'-AAAGGATCCATCACCCGCGG CATTACCTG-3' (配列番号1) および 5'-TTTGGGCCCGTCGACTGAGATATATAGATGTGAA TTATCC-3' (配列番号2) を用いたPCRによって行った。

[0164] 鋳型DNA 1 μ L、Pfx DNAポリメラーゼ (Invitrogen) 0.5 μ L、1倍濃度添付バッファー、0.4 μ M 各々プライマー、1 mM MgSO₄、0.25 μ M dNTPsを混合し、全量を50 μ Lとした。反応温度条件は、DNAサーマルサイクラーPTC-200 (MJ Research) を用い、94℃で15秒、55℃で30秒、68℃で3分からなるサイクルを35回繰り返した。但し、1サイクル目の94℃での保温は2分、最終サイクルの68℃での保温は5分とした。

[0165] 増幅産物の確認は、0.9%アガロースゲル電気泳動により分離後、臭化エチジウム染色により可視化することにより行い、約3.0 kbの断片を検出した。得られたxyIABオペロンのDNA断片はCharge Switch PCR Clean-Up Kit (Invitrogen) を用いて精製後、制限酵素BamHIおよびApaIで切断した。これによって生じた約2.9 kbのDNA断片は0.9%アガロースゲル電気泳動により分離後、臭化エチジウム染色により可視化することで検出し、Zymo Clean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) を用いてゲルから回収した。このDNA断片を、pTZ4を制限酵素BamHIおよびApaIで切断して調製したDNAと混合し、DNA Ligation Kit ver. 2 (タカラバイオ) を用いて連結した。得られたプラスミドDNAで大腸菌 (DH5 α 株) を形質転換し、50 μ g/mLカナマイシンを含むLB寒天培地に塗抹した。この培地上で生育したクローンをTB培地 [Terrific Broth 47 g/L、Glycerol 5 g/L] (50 μ g/mLカナマイシンを含む) により液体培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。こうして得られたプラスミドDNAを制限酵素BamHIおよびApaIにより切断した結果、約2.9 kbの挿入断片が確認され、これをpXyIAB1と命名した。

[0166] (C) ブレビバクテリウム・フラバムMJ233株ゲノムDNAの抽出
ブレビバクテリウム・フラバムMJ233株を、2質量%グルコースと、

以下の組成の培地〔尿素：4 g、硫酸アンモニウム：14 g、リン酸1カリウム：0.5 g、リン酸2カリウム0.5 g、硫酸マグネシウム・7水和物：0.5 g、硫酸第一鉄・7水和物：20 mg、硫酸マンガン・5水和物：20 mg、D-ビオチン：200 μ g、塩酸チアミン：200 μ g、酵母エキス：1 g、カザミノ酸：1 g、蒸留水1,000 mLに溶解〕（以下、培地（A）という）10 mLで対数増殖期後期まで培養し、集菌した。得られた菌体を10 mg/mLの濃度のリゾチームを含む緩衝液〔20 mM Tris-HCl pH=8.0、10 mM NaCl、1 mM EDTA・2 Na〕0.15 mLに懸濁した。得られた前記懸濁液にプロテナーゼKを、最終濃度が100 μ g/mLになるように添加し、37℃で1時間保温後、さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5質量%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌し、溶菌液とした。前記溶菌液に、等量のフェノール／クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離（5000×g、20分間、10～12℃）し、上清画分を分取した。

前記上清画分に酢酸ナトリウムを0.3 Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールを加え混合し、遠心分離（15000×g、2分間）により回収した沈殿物を70体積%エタノールで洗浄した後、風乾し、DNAを得た。得られたDNAにTE緩衝液〔10 mM Tris-HCl pH7.5、1 mM EDTA・2 Na〕5 mLを加え、4℃で一晩静置し、以後のPCRの鋳型DNAに使用した。

[0167] （D）キシロースイソメラーゼーキシロキナーゼ遺伝子オペロン導入用プラスミドの構築

大腸菌由来XylABオペロンをブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233/PC-4/ Δ LdH株（特願2013-161477明細書）の染色体上ldh遺伝子欠損部位に導入するため、ldh遺伝子のクローニングを行った。ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233株のldh遺伝子の取得は、上記（C）で調製したDNAを鋳型とし、全ゲノム配列が報告されている

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032 株の該遺伝子周辺の配列 (GenBank Accession No. BA000036) を基に設計した合成 DNA : 5'-CGAGGGGTCGAGGATTCTGGGGAGGATCG AGTGGATTC-3' (配列番号 3) および 5'-TCTAGAGTCGAGGATGGTGA CCATGATGCAGGATGGAG-3' (配列番号 4) を用いた PCR によって行った。

[0168] 鋳型 DNA 1 μ L、Pfx DNAポリメラーゼ (Invitrogen) 0.5 μ L、1 倍濃度添付バッファー、0.4 μ M 各々プライマー、1 mM MgSO₄、0.25 μ M dNTPs を混合し、全量を 50 μ L とした。反応温度条件は、DNA サーマルサイクラー PTC-200 (MJ Research) を用い、94℃で 15 秒、55℃で 30 秒、68℃で 2 分からなるサイクルを 35 回繰り返した。但し、1 サイクル目の 94℃での保温は 2 分、最終サイクルの 68℃での保温は 5 分とした。

[0169] 増幅産物の確認は、0.9% アガロースゲル電気泳動により分離後、臭化エチジウム染色により可視化することにより行い、約 2.1 kb の断片を検出した。得られた ldh 遺伝子の DNA 断片は Charge Switch PCR Clean-Up Kit (Invitrogen) を用いて精製し、In-Fusion Cloning Kit (タカラバイオ) を用いて pKMB1 (特開 2005-95169) の XbaI 部位に結合し、得られたプラスミド DNA で大腸菌 DH5 α 株を形質転換した。このようにして得られた組換え大腸菌を 25 μ g/mL カナマイシンおよび 25 μ g/mL X-Gal を含む LB 寒天培地に塗抹した。

[0170] この培地上で白色のコロニーを形成したクローンを TB 培地 [Terrific Broth 47 g/L、Glycerol 5 g/L] (25 μ g/mL カナマイシンを含む) により液体培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。こうして得られたプラスミド DNA を制限酵素 XhoI および BglI により切断した結果、約 2.2 kb の挿入断片が確認され、これを pKB-LDH2 と命名した。

[0171] ブレヴィバクテリウム・フラバム MJ 233 株由来で構成的に高発現する T Z 4 プロモーターと連結された X y I A B オペロンの取得は、プラスミド p X y I A B 1 を鋳型とし、合成 DNA : 5'-GTACCTGCAGGATGAGCGGGCT-3' (配列番号 5) および 5'-CACCCGGTCAGGCAGGGGATAAC-3' (配列番号 6) を用いた PCR によって行った。

鋳型 DNA 1 μ L、PrimeSTAR Max DNA ポリメラーゼ (Invitrogen) 0.5 μ L、1 倍濃度添付バッファー、0.4 μ M 各々プライマーを混合し、全量を 50 μ L とした。反応温度条件は、DNA サーマルサイクラー PTC-200 (MJ Research) を用い、94℃で 15 秒、55℃で 20 秒、72℃で 45 秒からなるサイクルを 30 回繰り返した。但し、1 サイクル目の 94℃での保温は 2 分とした。

[0172] 増幅産物の確認は、0.7% アガロースゲル電気泳動により分離後、臭化エチジウム染色により可視化することにより行い、約 3.2 kb の断片を検出した。得られた T Z 4 プロモーターと連結された X y I A B オペロンの DNA 断片は T4 Polynucleotide Kinase (タカラバイオ) により 5' 末端をリン酸化した後、DNA Ligation Kit ver. 2 (タカラバイオ) を用いて pKB-LDH2 の EcoRV 部位に結合し、得られたプラスミド DNA で大腸菌 DH5 α 株を形質転換した。このようにして得られた組換え大腸菌を 25 μ g/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地に塗抹した。

[0173] この培地上で生育したクローンを TB 培地 [Terrific Broth 47 g/L、Glycerol 5 g/L] (25 μ g/mL カナマイシンを含む) により液体培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。こうして得られたプラスミド DNA の挿入断片の塩基配列は BigDye Terminator v3 Cycle Sequencing Kit および塩基配列解読装置 377XL (Applied Biosystems) を用いて決定した。その結果得られた塩基配列 (X y I A B オペロン) は

、大腸菌K12-MG1655株のゲノム配列と完全に一致し、XyIABオペロンに変異が入っていないことを確認し、これをpXyIAB3と命名した。

[0174] (E) キシロースイソメラーゼ-キシロキナーゼ遺伝子オペロン導入株の作製

ブレバクテリウム・フラバムMJ233/PC-4/ Δ LDH株の形質転換に用いるプラスミドDNAは、pXyIAB3を用いて塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 1970, 53, 159)により形質転換した大腸菌JM110株から再調製した。

[0175] ブレバクテリウム・フラバムMJ233/PC-4/ Δ LDH株の形質転換は電気パルス法(Res. Microbiol., 1993, 144, p181-5)によって行い、得られた形質転換体を25 μ g/mLカナマイシンを含むLBG寒天培地[トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl5g、グルコース20g、および寒天15gを蒸留水1Lに溶解]に塗抹した。

[0176] この培地上に生育した株は、pXyIAB3がブレバクテリウム・フラバムMJ233株菌体内で複製不可能なプラスミドであるため、該プラスミドのldh遺伝子とブレバクテリウム・フラバムMJ233株ゲノム上の同遺伝子との間で相同組換えを起こした結果、ゲノム上に該プラスミドに由来するカナマイシン耐性遺伝子およびsacB遺伝子が挿入されているはずである。

[0177] 次に、上記相同組換え株を25 μ g/mLカナマイシンを含むLBG培地にて液体培養した。この培養液の菌体数約100万相当分を10%ショ糖含有LBG培地に塗抹にした。結果、2回目の相同組換えによりsacB遺伝子が脱落しショ糖非感受性となったと考えられる株を数十個得た。

[0178] この様にして得られた株の中には、そのldh遺伝子欠損部位にpXyIAB3に由来するTZ4プロモーターと連結されたXyIABオペロンが挿

入されたものと親株と同じ配列に戻ったものが含まれる。TZ4プロモーターと連結されたXyIABオペロンが挿入されたか否かの確認は、LBG培地にて培養して得られた菌体を直接PCR反応に供し、TZ4プロモーターと連結されたXyIABオペロンの検出を行うことによって容易に確認できる。TZ4プロモーターおよびXyIABオペロンをPCR増幅するためのプライマー：5'-AATCAGGAAGTGGGATCGAAAATG-3'（配列番号7）および5'-CCGCCAACTAGACACCAAAGATTC-3'（配列番号8）を用いて分析すると、TZ4プロモーターと連結されたXyIABオペロンが挿入されたクローンでは4,196bpのDNA断片を認めるはずである。上記方法にてショ糖非感受性となった菌株を分析した結果、TZ4プロモーターと連結されたXyIABオペロンが挿入された株を選抜し、該株をブレビバクテリウム・フラバムMJ233/XyIAB/PC-4/ Δ L DHと命名した。

[0179] (F) キシロース資化試験

上記(E)で作製したブレビバクテリウム・フラバムMJ233/XyIAB/PC-4/ Δ L DH株を20g/Lキシロースを含むMM寒天培地〔尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 KH_2PO_4 0.5g、 K_2HPO_4 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4-5\text{H}_2\text{O}$ 6mg、ビオチン200 μ g、チアミン200 μ g、寒天15g、蒸留水1Lに溶解〕に植菌し、30℃で3日間静置培養した。対照として、ブレビバクテリウム・フラバムMJ233/PC-4/ Δ L DH株も同様に培養した。その結果、ブレビバクテリウム・フラバムMJ233/XyIAB/PC-4/ Δ L DH株はキシロースを単一炭素源とした培地において生育できることが確認された。一方、親株であるブレビバクテリウム・フラバムMJ233/PC-4/ Δ L DH株は生育することはできなかった。

[0180] (実施例4)

<水素化処理糖液の発酵生産評価>

(A) 種培養

前記培地（A）1,000 mLを、121℃、20分間で加熱滅菌し、室温まで冷やした後、200 mLの三角フラスコに15 mL入れ、あらかじめ滅菌した50%グルコース水溶液を600 μ l添加した。製造例6の（E）で作製したブレビバクテリウム・フラバムMJ233/XyIAB/PC-4/ Δ L D H株を接種して30℃で5.1時間振とう培養した。

[0181] （B）本培養

500 mLの三角フラスコに100 mLの前記培地（A）を入れ、あらかじめ滅菌した50%グルコース水溶液を4 mL添加した後、上記（A）の種培養で得られた培養液を、O.D.（660 nm）が0.05となるように接種し、30℃で、19.4時間振とう培養した。

[0182] （C）コハク酸生産反応

上記（B）の本培養で得られた培養液を5,000 $\times$ g、7分の遠心分離により集菌し、菌体懸濁液〔硫酸マグネシウム・7水和物：1 g、硫酸第一鉄・7水和物：40 mg、硫酸マンガン・5水和物：40 mg、D-ビオチン：400 μ g、塩酸チアミン：400 μ g、リン酸一アンモニウム：0.8 g、リン酸二アンモニウム：0.8 g、塩化カリウム：1 g、蒸留水1000 mLに溶解〕にO.D.（660 nm）が2.0になるように懸濁した。続いて、実施例1で作製した水素化処理糖液-1を3 mL、炭酸水素アンモニウムを0.4 g、および蒸留水3 mLを混合して、基質溶液を調製した。5 mL反応器に前記菌体懸濁液0.5 mLと、基質溶液0.5 mLを混合し、嫌気条件下において40℃で反応させた。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は13.4 g/L、グルコース濃度は0.1 g/L、キシロース濃度は2.1 g/Lであった。

[0183] （実施例5）

コハク酸生産反応において、実施例2で作製した水素化処理糖液-2を使用したこと以外は、実施例4と同様に行った。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は12.6 g/L、グルコース濃度は0.0 g/L、キシロース濃度は1.7 g/Lであった。

[0184] (実施例6)

コハク酸生産反応において、実施例3で作製した水素化処理糖液-3を使用したこと以外は、実施例4と同様に行った。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は13.0 g/L、グルコース濃度は0.1 g/L、キシロース濃度は2.0 g/Lであった。

[0185] (比較例1)

コハク酸生産反応において、製造例1で作製した糖液-1を使用したこと以外は、実施例4と同様に行った。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は7.7 g/L、グルコース濃度は8.3 g/L、キシロース濃度は2.5 g/Lであった。

[0186] (比較例2)

コハク酸生産反応において、製造例3で作製した糖液-3を使用したこと以外は、実施例4と同様に行った。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は8.5 g/L、グルコース濃度は6.7 g/L、キシロース濃度は2.5 g/Lであった。

[0187] (比較例3)

コハク酸生産反応において、製造例4で作製した糖液-4を使用したこと以外は、実施例4と同様に行った。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は10.4 g/L、グルコース濃度は3.4 g/L、キシロース濃度は2.5 g/Lであった。

[0188] (比較例4)

コハク酸生産反応において、製造例5で作製した糖液-5を使用したこと以外は、実施例4と同様に行った。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は11.9 g/L、グルコース濃度は1.3 g/L、キシロース濃度は2.4 g/Lであった。

[0189] (比較例5)

コハク酸生産反応において、製造例3で作製した糖液-0を使用したこと以外は、実施例4と同様に行った。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度

は 11.7 g/L、グルコース濃度は 2.2 g/L、キシロース濃度は 2.4 g/L であった。

実施例 4～6、比較例 1～5 の結果を表 1 に示す。数値は、6 時間後の各成分の濃度を表わす。

[0190] [表1]

表1

	糖液の種類	コハク酸濃度 [g/L]	グルコース濃度 [g/L]	キシロース濃度 [g/L]
実施例4	水素化処理糖液-1 (実施例1)	13.4	0.1	2.1
実施例5	水素化処理糖液-2 (実施例2)	12.6	0	1.7
実施例6	水素化処理糖液-3 (実施例3)	13	0.1	2
比較例1	糖液-1 (製造例1)	7.7	8.3	2.5
比較例2	糖液-3 (製造例3)	8.5	6.7	2.5
比較例3	糖液-4 (製造例4)	10.4	3.4	2.5
比較例4	糖液-5 (製造例5)	11.9	1.3	2.4
比較例5	糖液-0	11.7	2.2	2.4

[0191] 表 1 より、実施例 1 の水素化処理糖液-1 を使用した実施例 4 では、比較例 1 に対してコハク酸濃度が 74% 向上、比較例 2 に対しては 58% 向上、比較例 3 に対しては 29% 向上、比較例 4 に対しては 13%、比較例 5 に対しては 15% 向上した。

以上の結果より、水素化処理を実施してフルフラール、グリコールアルデヒド等が大幅に除去された糖液を使用することで、コハク酸生産速度が向上することが明らかとなった。

[0192] 表 1 より、実施例 2 の水素化処理糖液-2 を使用した実施例 5 では、比較例 1 に対してコハク酸濃度が 64% 向上、比較例 2 に対しては 48% 向上、比較例 3 に対しては 21% 向上、比較例 4 に対しては 6%、比較例 5 に対しては 8% 向上した。

以上の結果より、水素化処理を実施してフルフラール、グリコールアルデ

ヒド等が大幅に除去された糖液を使用することで、コハク酸生産速度が向上することが明らかとなった。

[0193] 表 1 より、実施例 3 の水素化処理糖液－3 を使用した実施例 6 では、比較例 1 に対してコハク酸濃度が 6.9 % 向上、比較例 2 に対しては 5.3 % 向上、比較例 3 に対しては 2.5 % 向上、比較例 4 に対しては 9 %、比較例 5 に対しては 1.1 % 向上した。

以上の結果より、水素化処理を実施してフルフラール、グリコールアルデヒド等が大幅に除去された糖液を使用することで、コハク酸生産速度が向上することが明らかとなった。

以上の結果から、糖類以外のカルボニル化合物および／または不飽和アルコールを含む糖液を水素化反応に供することで、当該物質を水素化し、除去または大幅に低減させることができることがわかる。更に、得られた水素化処理糖液を含む有機原料に微生物を作用させて有機化合物を生産させることで、有機化合物の生産速度が向上することがわかる。

[0194] (実施例 7)

上記糖液－1 を使用し、実施例 1 と同様の方法で水素化処理を行った。この水素化処理を行った糖液（以下、水素化処理糖液－4 とする）の各成分濃度は、上記条件による LC 分析から、グルコース 7.9 質量%、キシロース 1.0 質量%、キシリトール 0.01 質量%、ソルビトールは検出限界以下（0.001 質量%未満）であった。グリコールアルデヒドダイマー及びフルフラールは検出されなかった。

[0195] (実施例 8)

上記糖液－1 を使用し、触媒として 5 質量% Pd/C（NE ケムキャット社製）を用いる以外は、実施例 1 と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液（以下、水素化処理糖液－5 とする）を得た。水素化処理糖液－5 の各成分濃度は、LC 分析からグルコース 7.9 質量%、キシロース 1.0 質量%、キシリトール 0.002 質量%、ソルビトールは検出限界以下（0.001 質量%未満）であった。また、グリコールアルデヒドダイマーは

1390 ppmであり、フルフラールは検出されなかった。

[0196] (実施例9)

実施例4における(A)種培養、(B)本培養を経て、(C)コハク酸生産反応において、水素化処理糖液-1を用いる代わりに、実施例7で作製した水素化処理糖液-4を2.1 mL、炭酸水素アンモニウムを0.3 g、および蒸留水2.9 mLを混合して、基質溶液を調製した以外は、同様にコハク酸生産反応を行なった結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は8.5 g/L、グルコース濃度は3.2 g/L、キシロース濃度は2.2 g/Lであった。

[0197] (実施例10)

コハク酸生産反応において、実施例8で作製した水素化処理糖液-5を使用したこと以外は、実施例9と同様に行った。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は7.7 g/L、グルコース濃度は4.3 g/L、キシロース濃度は2.4 g/Lであった。

[0198] (比較例6)

コハク酸生産反応において、製造例1で作製した糖液-1を使用したこと以外は、実施例9と同様に行った。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は6.4 g/L、グルコース濃度は6.6 g/L、キシロース濃度は2.0 g/Lであった。

[0199] (比較例7)

コハク酸生産反応において、製造例3で作製した糖液-0を使用したこと以外は、実施例9と同様に行った。その結果、6時間後のコハク酸蓄積濃度は8.5 g/L、グルコース濃度は3.4 g/L、キシロース濃度は2.4 g/Lであった。

実施例9、10、比較例6、7の結果を表2に示す。数値は6時間後の各成分の濃度を表わす。

[0200]

[表2]

表2

	糖液の種類	コハク酸濃度 [g/L]	グルコース濃度 [g/L]	キシロース濃度 [g/L]
実施例9	水素化処理糖液-4 (実施例7)	8.5	3.2	2.2
実施例10	水素化処理糖液-5 (実施例8)	7.7	4.3	2.4
比較例6	糖液-1 (製造例1)	6.4	6.6	2.0
比較例7	糖液-0 (製造例3)	8.5	3.4	2.4

[0201] 表2より、水素化処理糖液-4および5を使用した実施例9、10では、比較例6に対してコハク酸濃度がそれぞれ33%、20%向上し、比較例7に対しても同等となった。

以上の結果より、異なる水素化処理条件でもカルボニル化合物や不飽和アルコールを水素化反応に供することで、当該物質を除去または大幅に低減させることができることがわかる。また、得られた水素化処理糖液を含む有機原料に微生物を作用させて有機化合物を生産させることで、有機化合物の生産速度が向上することが分かる

[0202] (実施例11)

上記糖液-1を使用し、反応温度を90℃に変更した以外は、実施例1と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-6を得た。水素化処理糖液-6中の各成分濃度は、グルコース7.7質量%、キシロース0.8質量%、ソルビトール0.2質量%、キシリトール0.2質量%であり、グリコールアルデヒドダイマー及びフルフラールは検出されなかった。

[0203] (実施例12)

上記糖液-1を使用し、反応温度を120℃に変更した以外は、実施例1と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-7を得た。水素化処理糖液-7中の各成分濃度は、グルコース6.3質量%、キシロース0.5質量%、ソルビトール1.3質量%、キシリトール0.6質量%であり、グリコールアルデヒドダイマー及びフルフラールは検出されなかった。

[0204] (実施例 13)

上記糖液-1を使用し、反応温度を150℃に変更した以外は、実施例1と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-8を得た。水素化処理糖液-8中の各成分濃度は、グルコース5.5質量%、キシロース0.1質量%、ソルビトール2.5質量%、キシリトール0.9質量%であり、グリコールアルデヒドダイマー及びフルフラールは検出されなかった。

[0205] (実施例 14)

上記糖液-1を使用し、反応温度を90℃に変更した以外は、実施例8と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-9を得た。水素化処理糖液-9中の各成分濃度は、グルコース8.0質量%、キシロース1.0質量%、ソルビトール検出限界以下(0.001質量%未満)、キシリトール0.004質量%、グリコールアルデヒドダイマーは2580ppmであり、フルフラールは検出されなかった。

[0206] (実施例 15)

上記糖液-1を使用し、反応温度を120℃に変更した以外は、実施例8と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-10を得た。水素化処理糖液-10中の各成分濃度は、グルコース7.9質量%、キシロース1.0質量%、ソルビトール検出限界以下(0.001質量%未満)、キシリトール0.014質量%、グリコールアルデヒドダイマーは1820ppmであり、フルフラールは検出されなかった。

[0207] (実施例 16)

上記糖液-1を使用し、反応温度を150℃に変更した以外は、実施例8と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-11を得た。水素化処理糖液-11中の各成分濃度は、グルコース7.5質量%、キシロース1.0質量%、ソルビトール0.03質量%、キシリトール0.07質量%、グリコールアルデヒドダイマーは2310ppmであり、フルフラールは検出されなかった。

[0208] (実施例 17)

上記糖液－１を使用し、反応圧力を３ＭＰaに変更した以外は、実施例１と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液－１２を得た。水素化処理糖液－１２中の各成分濃度は、グルコース７．８質量％、キシロース１．０質量％、キシリトール０．０１質量％、ソルビトールは検出限界以下（０．００１質量％未満）であった。グリコールアルデヒドダイマー及びフルフラールは検出されなかった。

[0209] （実施例１８）

上記糖液－１を使用し、反応圧力を８ＭＰaに変更した以外は、実施例１と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液－１３を得た。水素化処理糖液－１３中の各成分濃度は、グルコース７．８質量％、キシロース０．９質量％、ソルビトール０．１質量％、キシリトール０．１質量％であった。グリコールアルデヒドダイマー及びフルフラールは検出されなかった。

[0210] （実施例１９）

コハク酸生産反応において、実施例１１で作製した水素化処理糖液－６を使用したこと以外は、実施例９と同様に行った。その結果、６時間後のコハク酸蓄積濃度は１１．０ｇ／Ｌ、グルコース濃度は０．４２ｇ／Ｌ、キシロース濃度は２．１ｇ／Ｌであった。

[0211] （実施例２０）

コハク酸生産反応において、実施例１２で作製した水素化処理糖液－７を使用したこと以外は、実施例９と同様に行った。その結果、６時間後のコハク酸蓄積濃度は８．５ｇ／Ｌ、グルコース濃度は０．３ｇ／Ｌ、キシロース濃度は０．３ｇ／Ｌであった。

[0212] （実施例２１）

コハク酸生産反応において、実施例１３で作製した水素化処理糖液－８を使用したこと以外は、実施例９と同様に行った。その結果、６時間後のコハク酸蓄積濃度は９．８ｇ／Ｌ、グルコース濃度は０．３ｇ／Ｌ、キシロース濃度は１．０ｇ／Ｌであった。

[0213] （実施例２２）

コハク酸生産反応において、実施例 14 で作製した水素化処理糖液－9 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 8.6 g/L、グルコース濃度は 4.2 g/L、キシロース濃度は 1.8 g/L であった。

[0214] (実施例 23)

コハク酸生産反応において、実施例 15 で作製した水素化処理糖液－10 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 9.6 g/L、グルコース濃度は 2.5 g/L、キシロース濃度は 2.6 g/L であった。

[0215] (実施例 24)

コハク酸生産反応において、実施例 16 で作製した水素化処理糖液－11 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 9.4 g/L、グルコース濃度は 2.1 g/L、キシロース濃度は 2.6 g/L であった。

[0216] (実施例 25)

コハク酸生産反応において、実施例 17 で作製した水素化処理糖液－12 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 10.6 g/L、グルコース濃度は 1.6 g/L、キシロース濃度は 2.3 g/L であった。

[0217] (実施例 26)

コハク酸生産反応において、実施例 18 で作製した水素化処理糖液－13 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 10.9 g/L、グルコース濃度は 0.6 g/L、キシロース濃度は 2.4 g/L であった。

[0218] (比較例 8)

コハク酸生産反応において、製造例 1 で作製した糖液－1 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 7.5 g/L、グルコース濃度は 5.7 g/L、キシロース濃度は 2.5

g/Lであった。

[0219] (比較例 9)

コハク酸生産反応において、製造例 3 で作製した糖液-0 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 10.7 g/L、グルコース濃度は 1.4 g/L、キシロース濃度は 2.5 g/L であった。

実施例 19～26、比較例 8, 9 の結果を表 3 に示す。数値は、6 時間後の各成分の濃度を表わす。

[0220] [表3]

表3

	糖液の種類	コハク酸濃度 [g/L]	グルコース濃度 [g/L]	キシロース濃度 [g/L]
実施例19	水素化処理糖液-6 (実施例11)	11.0	0.4	2.1
実施例20	水素化処理糖液-7 (実施例12)	8.5	0.3	0.3
実施例21	水素化処理糖液-8 (実施例13)	9.8	0.3	1.0
実施例22	水素化処理糖液-9 (実施例14)	8.6	4.2	1.8
実施例23	水素化処理糖液-10 (実施例15)	9.6	2.5	2.6
実施例24	水素化処理糖液-11 (実施例16)	9.4	2.1	2.6
実施例25	水素化処理糖液-12 (実施例17)	10.6	1.6	2.3
実施例26	水素化処理糖液-13 (実施例18)	10.9	0.6	2.4
比較例8	糖液-1 (製造例1)	7.5	5.7	2.5
比較例9	糖液-0 (製造例3)	10.7	1.4	2.5

[0221] 表 3 より、水素化処理糖液-6～13 を使用した実施例 19～26 では、比較例 8 に対していずれもコハク酸濃度が向上した。

以上の結果より、温度や反応圧力等が異なる水素化処理条件でもカルボニル化合物や不飽和アルコールを水素化し、除去または大幅に低減させることができることがわかる。さらにこれらの異なる水素化処理条件で得られた水素化処理糖液を使用することで、有機化合物の生産速度が向上することがわ

かる

[0222] (製造例 7)

超純水 181 mL にグルコース 16.0 g、キシロース 2.0 g、アクリル酸メチル 1.0 g、ギ酸 0.08 g を溶解させ糖液を作成した。以下、糖液-6 とする。

糖液-6 中の各成分濃度は、グルコース 8.0 質量%、キシロース 1.0 質量%、ギ酸 0.04 質量%、アクリル酸メチル 0.5 質量%であった。

[0223] (実施例 27)

上記糖液-6 を使用した以外は、実施例 1 と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-14 を得た。水素化処理糖液-14 中の各成分濃度は、グルコース 7.9 質量%、キシロース 1.0 質量%、ソルビトール検出限界以下 (0.001 質量%未満)、キシリトール 0.03 質量%であった。アクリル酸メチルは検出されなかった。

[0224] (実施例 28)

コハク酸生産反応において、実施例 27 で作製した水素化処理糖液-14 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 8.3 g/L、グルコース濃度は 3.7 g/L、キシロース濃度は 2.4 g/L であった。

[0225] (比較例 10)

コハク酸生産反応において、製造例 7 で作製した糖液-6 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 5.8 g/L、グルコース濃度は 8.0 g/L、キシロース濃度は 2.6 g/L であった。

[0226] (比較例 11)

コハク酸生産反応において、製造例 3 で作製した糖液-0 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 8.5 g/L、グルコース濃度は 3.4 g/L、キシロース濃度は 2.4 g/L であった。

実施例 28、比較例 10、11 の結果を表 4 に示す。数値は、6 時間後の各成分の濃度を表わす。

[0227] [表4]

表4

	糖液の種類	コハク酸濃度 [g/L]	グルコース濃度 [g/L]	キシロース濃度 [g/L]
実施例28	水素化処理糖液－14 (実施例27)	8.3	3.7	2.4
比較例10	糖液－6 (製造例7)	5.8	8.0	2.6
比較例11	糖液－0 (製造例3)	8.5	3.4	2.4

[0228] 表4より、実施例27の水素化処理糖液－14を使用した実施例28では、比較例10に対してコハク酸濃度が45%向上した。

以上の結果より、水素化処理を実施し、不飽和エステル化合物であるアクリル酸メチル濃度が軽減された糖液を使用することで、コハク酸生産速度が向上することが明らかとなった。

これより糖類以外のカルボニル化合物および／または不飽和アルコールを含む糖液を水素化反応に供することで、当該物質を水素化し、除去または大幅に低減させることができることがわかる。更に、得られた水素化処理糖液を含む有機原料に微生物を作用させて有機化合物を生産させることで、有機化合物の生産速度が向上することがわかる。

[0229] (製造例8)

超純水181mLにグルコース16.0g、キシロース2.0g、クロチルアルコール1.0g、ギ酸0.08gを溶解させ糖液を作成した。以下、糖液－7とする。

前記糖液－7中の各成分濃度は、グルコース7.9質量%、キシロース1.0質量%、ギ酸0.04質量%、クロチルアルコール0.5質量%であった。

[0230] (実施例29)

上記糖液－7を使用した以外は、実施例1と同様の方法で水素化処理を行

ない、水素化処理糖液－１５を得た。水素化処理糖液－１５中の各成分濃度は、グルコース７．９質量％、キシロース１．０質量％、ソルビトール検出限界以下（０．００１質量％未満）、キシリトール０．０１３質量％であった。クロチルアルコールは検出されなかった。

[0231] （実施例３０）

コハク酸生産反応において、実施例２９で作製した水素化処理糖液－１５を使用したこと以外は、実施例９と同様に行った。その結果、６時間後のコハク酸蓄積濃度は８．６ｇ／Ｌ、グルコース濃度は３．０ｇ／Ｌ、キシロース濃度は２．３ｇ／Ｌであった。

[0232] （比較例１２）

コハク酸生産反応において、製造例８で作製した糖液－７を使用したこと以外は、実施例９と同様に行った。その結果、６時間後のコハク酸蓄積濃度は５．７ｇ／Ｌ、グルコース濃度は７．３ｇ／Ｌ、キシロース濃度は２．２ｇ／Ｌであった。

[0233] （比較例１３）

コハク酸生産反応において、製造例３で作製した糖液－０を使用したこと以外は、実施例９と同様に行った。その結果、６時間後のコハク酸蓄積濃度は８．５ｇ／Ｌ、グルコース濃度は３．４ｇ／Ｌ、キシロース濃度は２．４ｇ／Ｌであった。

実施例３０、比較例１２，１３の結果を表５に示す。数値は、６時間後の各成分の濃度を表わす。

[0234] [表５]

表５

	糖液の種類	コハク酸濃度 [g/L]	グルコース濃度 [g/L]	キシロース濃度 [g/L]
実施例３０	水素化処理糖液－１５ (実施例２９)	８．６	３．０	２．３
比較例１２	糖液－７ (製造例８)	５．７	７．３	２．２
比較例１３	糖液－０ (製造例３)	８．５	３．４	２．４

[0235] 表5より、実施例29の水素化処理糖液－15を使用した実施例30では、比較例12に対してコハク酸濃度が50%向上した。

以上の結果より、水素化処理を実施し、不飽和アルコールであるクロチルアルコールの濃度が軽減された糖液を使用することで、コハク酸生産速度が向上することが明らかとなった。

これより糖類以外のカルボニル化合物および／または不飽和アルコールを含む糖液を水素化反応に供することで、当該物質を水素化し、除去または大幅に低減させることができることが分かる。更に、得られた水素化処理糖液を含む有機原料に微生物を作用させて有機化合物を生産させることで、有機化合物の生産速度が向上することがわかる。

[0236] (比較例14)

上記糖液－1を使用し、グルコース、キシロースの糖合計質量に対して、1質量%の活性炭マックスソープ（株式会社MCエバテック製 MSP－20）を添加し、25℃で2時間攪拌した。上記反応液をディスポーザブルのシリンジとフィルター（0.45 μm）でろ過して、活性炭処理糖液（以下「活性炭処理糖液－1」）を得た。活性炭処理糖液－1中の各成分濃度は、グルコース8.0質量%、キシロース1.0質量%、ソルビトール0.0質量%、キシリトール0.0質量%であった。また、グリコールアルデヒドダイマーは3200 ppmであり、フルフラールは120 ppmであった。

[0237] (比較例15)

上記糖液－1を使用し、活性炭の種類をダイヤソープ（カルゴンカーボンジャパン株式会社製 W10－30）に変更した以外は、比較例14と同様の方法で活性炭処理を実施し活性炭処理糖液－2を得た。活性炭処理糖液－2中の各成分濃度は、グルコース8.00質量%、キシロース1.0質量%、ソルビトール0.0質量%、キシリトール0.0質量%であった。また、グリコールアルデヒドダイマーは3200 ppmであり、フルフラールは120 ppmであった。

[0238] (比較例16)

コハク酸生産反応において、比較例 14 で作製した活性炭処理糖液－1 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 8.0 g/L、グルコース濃度は 8.0 g/L、キシロース濃度は 2.4 g/L であった。

[0239] (比較例 17)

コハク酸生産反応において、比較例 15 で作製した活性炭処理糖液－2 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 7.5 g/L、グルコース濃度は 8.0 g/L、キシロース濃度は 2.3 g/L であった。

[0240] (比較例 18)

コハク酸生産反応において、製造例 1 で作製した糖液－1 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 7.3 g/L、グルコース濃度は 9.6 g/L、キシロース濃度は 2.3 g/L であった。

[0241] (比較例 19)

コハク酸生産反応において、製造例 3 で作製した糖液－0 を使用したこと以外は、実施例 9 と同様に行った。その結果、6 時間後のコハク酸蓄積濃度は 12.0 g/L、グルコース濃度は 1.2 g/L、キシロース濃度は 1.9 g/L であった。

[0242] [表6]

表6

	糖液の種類	コハク酸濃度 [g/L]	グルコース濃度 [g/L]	キシロース濃度 [g/L]
比較例16	活性炭処理糖液－1 (比較例14)	8.0	8.0	2.4
比較例17	活性炭処理糖液－2 (比較例15)	7.5	8.0	2.3
比較例18	糖液－1 (製造例1)	7.3	9.6	2.3
比較例19	糖液－0 (製造例3)	12.0	1.2	1.9

[0243] 表 6 より、活性炭処理糖液－1 を使用した比較例 16 では、比較例 18 に

対してコハク酸濃度が10%向上した。また、活性炭処理糖液-2を使用した比較例17では、比較例18に対してコハク酸濃度が3%向上したが、水素化処理に比較すると回復効果は少なかった。

以上の結果から、カルボニル化合物および／または不飽和アルコールを含む糖液を活性炭処理した場合は、当該糖液を水素化反応に供した場合に比べ当該物質を低減させる効果が小さいことがわかる。更に、得られた活性炭処理糖液に微生物を作用させて有機化合物を生産させた場合、有機化合物の生産速度の向上が小さいことがわかる。

[0244] (製造例9)

非可食原料として、バガスを使用した。まずバガスに硫酸及び水を加えて混合し、バガス混合物を得た。硫酸の添加量は、バガスの乾燥質量に対し2質量%であり、水の添加量は、前記バガス混合物の合計質量に対する含水率が60質量%となるように調製した。次にドラムミキサー（杉山重工株式会社製）にて前記バガス混合物を20分間混合、攪拌の後に取り出し、希硫酸処理混合物を得た。前記希硫酸処理混合物を加水分解装置（株式会社ヤスジマ製）にて、蒸気を投入し、180℃で15分間蒸煮処理した。得られた蒸煮処理物の含水率は64.6質量%であった。前記蒸煮処理物を乾燥質量200g/Lとなるように糖化装置に仕込み、10N-NaOH水溶液を添加し、pHを6.0に調整した。そこに糖化酵素として15FPU分のC Tec 2（novozyme社製）を添加し、温度50℃、攪拌速度200rpmにて72時間攪拌しながら、加水分解を行った。その後、遠心分離（10000g、10分間）を行い、未分解セルロース及びリグニンを分離除去した。固形分を除去した糖液に対して、48質量%NaOH水溶液を用いてpHを8に調整し、さらに121℃で20分間加熱してバガス糖化液（以下、糖液-8）を作成した。上記HPLC分析により、前記バガス糖化液を測定したところ、各成分の濃度は、グルコース9.0質量%、キシロースとフルクトースの合計が3.0質量%、フルフラールが816ppm、ヒドロキシメチルフルフラールが534ppmであった。

[0245] (実施例 3 1)

上記糖液－８を使用した以外は、実施例 1 と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液－１６を得た。水素化処理糖液－１６中の各成分濃度は、グルコース 9. 1 質量%、キシロースとフルクトースの合計が 3. 0 質量%、ソルビトール及びキシリトールは検出限界以下（0. 001 質量%未満）であった。また、フルフラールが 74 p p m、ヒドロキシメチルフルフラールが 126 p p m であった。

[0246] (実施例 3 2)

上記糖液－８を使用した以外は、実施例 8 と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液－１７を得た。水素化処理糖液－１７中の各成分濃度は、グルコース 9. 1 質量%、キシロースとフルクトースの合計が 3. 0 質量%、ソルビトール 0. 001 質量%、キシリトールは検出限界以下（0. 001 質量%未満）であった。また、フルフラールが 82 p p m、ヒドロキシメチルフルフラールが 130 p p m であった。

[0247] (実施例 3 3)

上記糖液－８を使用した以外は、実施例 15 と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液－１８を得た。水素化処理糖液－１８中の各成分濃度は、グルコース 8. 3 質量%、キシロースとフルクトースの合計が 3. 3 質量%、ソルビトール 0. 1 質量%、キシリトールは検出限界以下（0. 001 質量%未満）であった。また、フルフラールが 225 p p m、ヒドロキシメチルフルフラールが 228 p p m であった。

[0248] (実施例 3 4)

実施例 4 における（Ａ）種培養、（Ｂ）本培養と同様の工程を経て得られる培養液を、実施例 4 と同様に集菌し、菌体懸濁液〔硫酸マグネシウム・ 7 水和物： 320 m g、硫酸第一鉄・ 7 水和物： 13 m g、硫酸マンガン・ 5 水和物： 13 m g、リン酸（ 85 %）： 480 m g、水酸化カリウム（ 48 %）： 640 m g、蒸留水 1000 m L に溶解〕に O. D. （ 660 n m ）が 60 になるように懸濁して菌体溶液を調製した。続いて実施例 3 1 で作製

した水素化処理糖液－１６を５４．５ｇ、蒸留水：１１ｇ、培地濃縮液〔硫酸マグネシウム・７水和物：２５．６ｇ、硫酸第一鉄・７水和物：１ｇ、硫酸マンガン・５水和物：１ｇ、リン酸（８５％）：３８．５ｇ、水酸化カリウム（４８％）：５０．９ｇ、蒸留水１０００ｍＬに溶解〕：１ｍＬ、Ｄ－ビオチン水溶液（１００ｍｇ／Ｌ）：１３３ｍｇ、塩酸チアミン（１００ｍｇ／Ｌ）：１３３ｍｇを混合して、基質溶液を作成した。基質溶液に炭酸水素アンモニウム：９６０ｍｇ、菌体溶液２０ｍＬを加え、嫌氣的雰囲気下において４０℃で反応させた。中和剤〔アンモニア水（２８％）：１１７ｇ、炭酸水素アンモニウム：３８ｇ、蒸留水３００ｍＬに溶解〕を加えることでｐＨは７．３に維持した。その結果、３時間後のコハク酸蓄積濃度は１１．３ｇ／Ｌであった。

[0249] （実施例３５）

コハク酸生産反応において、実施例３２で作製した水素化処理糖液－１７を使用したこと以外は、実施例３４と同様に行った。その結果、３時間後のコハク酸蓄積濃度は１１．７ｇ／Ｌであった。

[0250] （実施例３６）

コハク酸生産反応において、実施例３３で作製した水素化処理糖液－１８を使用したこと以外は、実施例３４と同様に行った。その結果、３時間後のコハク酸蓄積濃度は１１．５ｇ／Ｌであった。

[0251] （比較例２０）

コハク酸生産反応において、製造例９で作製した糖液－８を使用したこと以外は、実施例３４と同様に行った。その結果、３時間後のコハク酸蓄積濃度は９．２ｇ／Ｌであった。

実施例３４～３６、比較例２０の結果を表７に示す。数値は、３時間後のコハク酸濃度を表わす。

また糖液－８をイオン交換水で７５倍（質量）に希釈し、ＵＶ－ｖｉｓ測定器にて前記の方法で吸収スペクトルを測定し、測定結果を図１に示した。

[0252]

[表7]

表7

	糖液の種類	コハク酸濃度 [g/L]
実施例34	水素化処理糖液－16 (実施例31)	11.3
実施例35	水素化処理糖液－17 (実施例32)	11.7
実施例36	水素化処理糖液－18 (実施例33)	11.5
比較例20	糖液－8 (製造例9)	9.2

[0253] 表7より、水素化処理糖液－16～18を使用した実施例34～36では、比較例20に対していずれもコハク酸濃度が向上した。

以上の結果より、非可食原料であるバガスから得られたバガス糖化液に対し水素化処理を実施することで、糖液中に含まれる糖類以外のカルボニル化合物および／又は不飽和アルコールの濃度を大幅に低減させることができる。更に非可食原料由来の水素化処理糖液に微生物を作用させて有機化合物を生産させることで、有機化合物の生産速度が向上することがわかる。

[0254] (製造例10)

超純水300mLにグルコース98.6g、キシロース12.3g、フルフラール0.3g、ギ酸0.1g、グリコールアルデヒドダイマー0.3gを溶解させ糖液を作成した。以下、糖液－9とする。

前記糖液－9中の各成分濃度は、グルコース23.9質量%、キシロース3.0質量%、フルフラール0.09質量%、ギ酸0.03質量%、グリコールアルデヒドダイマー0.08質量%であった。

[0255] (製造例11)

超純水300mLにグルコース98.6g、キシロース12.3g、フルフラール0.4g、ギ酸0.16g、グリコールアルデヒドダイマー0.41gを溶解させ糖液を作成した。以下、糖液－10とする。

糖液－10中の各成分濃度は、グルコース23.9質量%、キシロース3.0質量%、フルフラール0.12質量%、ギ酸0.04質量%、グリコー

ルアルデヒドダイマー 0.1 質量%であった。

[0256] (実施例 37)

上記糖液-9 を使用したこと以外は、実施例 1 と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-19 を得た。水素化処理糖液-19 中の各成分濃度は、グルコース 23.8 質量%、キシロース 3.0 質量%、ソルビトール及びキシリトールは検出限界以下 (0.001 質量%未満) であった。またグリコールアルデヒド 0.05 質量%、フルフラール 0.0003 質量%であった。

[0257] (実施例 38)

上記糖液-10 を使用したこと以外は、実施例 1 と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-20 を得た。水素化処理糖液-20 中の各成分濃度は、グルコース 23.7 質量%、キシロース 3.0 質量%、ソルビトール及びキシリトールは検出限界以下 (0.001 質量%未満) であり、グリコールアルデヒドダイマー及びフルフラールは検出されなかった。

[0258] (製造例 12)

ブレビバクテリウム・フラバム MJ233 株について、以下のようにして、ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子 (ldh 遺伝子)、ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子 (pta 遺伝子)、アセテートキナーゼ遺伝子 (ack 遺伝子)、CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (ctf 遺伝子遺伝子)、およびピルベートオキシダーゼ遺伝子 (poxB 遺伝子) の破壊、さらに、キシロースイソメラーゼ遺伝子 (xyIA 遺伝子)、キシロキナーゼ遺伝子 (xyIB 遺伝子)、アセトラクテートシンターゼ遺伝子 (alsS 遺伝子)、アセトラクテートデカルボキシラーゼ遺伝子 (alsD)、および 2,3-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (bdhA 遺伝子) の導入を行ない、ブレビバクテリウム・フラバム MJ233/BdhA/AIsSD/XyIA/B/ΔPoxB/ΔCTF/ΔPTA-ACK/ΔLDH 株を作製した。

[0259] <XyIA B 増強株の作製>

XyIAB増強株作製の供試菌株は、ブレビバクテリウム・フラバムMJ233/ Δ PoxB/ Δ CTF/ Δ PTA-ACK/ Δ LDH株（特願2014-114971）を用いた。該菌株の形質転換に用いるプラスミドDNAは、（製造例6）の（C）で構築したpXyIAB3を用いて塩化カルシウム法（Journal of Molecular Biology, 1970, 53, 159）により形質転換した大腸菌JM110株から調製した。

ブレビバクテリウム・フラバムMJ233/ Δ PoxB/ Δ CTF/ Δ PTA-ACK/ Δ LDH株の形質転換は電気パルス法（Res. Microbiol., 1993, 144, p181-5）によって行い、得られた形質転換体を25 μ g/mLカナマイシンを含むLBG寒天培地〔トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g、グルコース20g、および寒天15gを蒸留水1Lに溶解〕に塗抹した。

この培地上に生育した株は、pXyIAB3がブレビバクテリウム・フラバムMJ233株菌体内で複製不可能なプラスミドであるため、該プラスミドのldh遺伝子とブレビバクテリウム・フラバムMJ233株ゲノム上の同遺伝子との間で相同組換えを起こした結果、ゲノム上に該プラスミドに由来するカナマイシン耐性遺伝子およびsacB遺伝子が挿入されているはずである。

[0260] 次に、上記相同組換え株を25 μ g/mLカナマイシンを含むLBG培地にて液体培養した。この培養液の菌体数約100万相当分を10%ショ糖含有LBG培地に塗抹にした結果、2回目の相同組換えによりsacB遺伝子が脱落しショ糖非感受性となったと考えられる株を数十個得た。

この様にして得られた株の中には、そのldh遺伝子欠損部位にpXyIAB3に由来するTZ4プロモーターと連結されたXyIABオペロンが挿入されたものと親株と同じ配列に戻ったものが含まれる。TZ4プロモーターと連結されたXyIABオペロンが挿入されたか否かの確認は、LBG培地にて培養して得られた菌体を直接PCR反応に供し、TZ4プロモーター

と連結されたXyIABオペロンの検出を行うことによって容易に確認できる。TZ4プロモーターおよびXyIABオペロンをPCR増幅するためのプライマー（配列番号9：AATCAGGAAG TGGGATCGAA AATGおよび配列番号10：CCGCCAACTA GACACCAAAG ATTG）を用いて分析すると、TZ4プロモーターと連結されたXyIABオペロンが挿入されたクローンでは4,196bpのDNA断片を認めるはずである。上記方法にてショ糖非感受性となった菌株を分析した結果、TZ4プロモーターと連結されたXyIABオペロンが挿入された株を選抜し、該株をブレバクテリウム・フラバムMJ233/XyIAB/ΔPoxB/ΔCTF/ΔPTA-ACK/ΔLDHと命名した。

[0261] <ALS、ALDC、BDH増強株の作製>

alsSDおよびBdhA増強株作製の供試菌株は、上記にて作製したブレバクテリウム・フラバムMJ233/XyIAB/ΔPoxB/ΔCTF/ΔPTA-ACK/ΔLDH株を用いた。該菌株の形質転換に用いるプラスミドDNAは、pC3.14F-alsSDおよびpTZ4F-BdhA（特願2014-114971）を用いて塩化カルシウム法（Journal of Molecular Biology, 1970, 53, 159）により形質転換した大腸菌JM110株から調製した。ブレバクテリウム・フラバムMJ233/XyIAB/ΔPoxB/ΔCTF/ΔPTA-ACK/ΔLDH株の形質転換は、電気パルス法（Res. Microbiol., 1993, 144, p181-5）によって行い、得られた形質転換体を50μg/mLカナマイシンおよび10μg/mLストレプトマイシンを含むLBG寒天培地〔トリプトン 10g、イーストエキストラクト 5g、NaCl 5g、グルコース 20g、および寒天 15gを蒸留水1Lに溶解〕に塗抹した。この培地上に生育した株は、pC3.14F-alsSDおよびpTZ4F-BdhAの双方がブレバクテリウム・フラバムMJ233株菌体内で保持されており、この菌株をブレバクテリウム・フラバムMJ233/BdhA/alsSD/XyIAB/ΔPoxB

／ Δ CTF／ Δ PTA-ACK／ Δ LDH（以下、MBD07とも呼ぶ）と命名した。

[0262] （実施例39）

（A）種培養

以下の成分を含む溶液〔硫酸アンモニウム：20 g、尿素：5 g、リン酸1カリウム：1 g、リン酸2カリウム：1 g、硫酸マンガン・七水和物：0.25 g、3-モルホリノプロパンスルホン酸：42 g、純水：600 mLに溶解〕に対して、塩化カルシウム溶液〔塩化カルシウム・2水和物：1.32 g、純水：100 mLに溶解〕1 mLを加え、続いて1 N水酸化ナトリウム溶液でpH7に調整し、純水を加えて液量864 mLとした後、121℃、20分間で加熱滅菌した。次に、濾過滅菌したトレースエレメント〔硫酸第一鉄・7水和物：1 g、硫酸マンガン・5水和物：1.42 g、硫酸亜鉛・七水和物：0.1 g、硫酸銅・5水和物：0.031 g、塩化ニッケル・6水和物：0.002 g、純水：90 mLに対して濃塩酸を加えpH=1に調整〕1 mL、濾過滅菌したプロトカテクサン溶液〔プロトカテクサン：300 mg、純水：8 mLに対して10 N水酸化ナトリウム溶液を1 mL添加〕1 mL、濾過滅菌したビオチン溶液〔D-ビオチン：10 mg、純水50 mLに溶解〕1 mLを加え、培地を作製した。

200 mLの三角フラスコに上記培地17.3 mL、加熱滅菌した純水1.1 mL、加熱滅菌した500 g/Lグルコース溶液1.6 mLを加えてCGXII培地を作製した。更に50 g/Lカナマイシン溶液20 μ L、25 g/Lストレプトマイシン溶液20 μ Lを加えた後、製造例12で作製したMBD07株を接種し、30℃で24.0時間培養した。

[0263] （B）2, 3-ブタンジオール生産

200 mLの三角フラスコに滅菌培地に対して、上記培地43.3 mL、濾過滅菌した実施例37に記載の水素化反応を実施した水素化処理糖液-19を6.7 mL加えてCGXII培地を作製した。更に50 g/Lカナマイシン溶液50 μ L、25 g/Lストレプトマイシン溶液50 μ Lを加えた後、

種培養液をO. D. (660nm)が0.15となるように接種し、30℃で24.0時間培養した。19.5時間後のO. D. (660nm)、グルコース、キシロース、(meso)-2,3-ブタンジオール、(R,R)もしくは(S,S)-2,3-ブタンジオール、2,3-ブタンジオールの合計濃度((meso)、(R,R)、(S,S)の合計)を表8に示す。

[0264] (比較例21)

2,3-ブタンジオール生産において、糖液-9を使用したこと以外は、実施例39と同様に行った。19.5時間後のO. D. (660nm)、グルコース、キシロース、(meso)-2,3-ブタンジオール、(R,R)もしくは(S,S)-2,3-ブタンジオール、2,3-ブタンジオールの合計濃度((meso)、(R,R)、(S,S)の合計)を表8に示す。

[0265] (実施例40)

2,3-ブタンジオール生産において、実施例38の水素化処理糖液-20を使用したこと以外は、実施例39と同様に行った。19.5時間後のグルコース、キシロース、(meso)-2,3-ブタンジオール、(R,R)もしくは(S,S)-2,3-ブタンジオール、2,3-ブタンジオールの合計濃度((meso)、(R,R)、(S,S)の合計)を表8に示す。

[0266] (比較例22)

2,3-ブタンジオール生産において、糖液-10を使用したこと以外は、実施例39と同様に行った。19.5時間後のグルコース、キシロース、(meso)-2,3-ブタンジオール、(R,R)もしくは(S,S)-2,3-ブタンジオール、2,3-ブタンジオールの合計濃度((meso)、(R,R)、(S,S)の合計)を表8に示す。

[0267] (実施例41)

上記糖液-8を使用した以外は、実施例1と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-21を得た。水素化処理糖液-21中の各成分濃度は、グルコース9.2質量%、キシロースとフルクトースの合計が2.9質

量%、ソルビトール0.02質量%、キシリトールは検出限界以下(0.001質量%未満)であった。また、フルフラールが172ppm、ヒドロキシメチルフルフラールが204ppmであった。水素化処理糖液-21は、目視による視認で、糖液-8に比べ着色の度合いが低下した。また水素化処理糖液-21をイオン交換水で75倍(質量)に希釈し、UV-vis測定器にて吸収スペクトルを測定し、測定結果を図1に示した。

[0268] (実施例42)

上記糖液-8を使用した以外は、実施例8と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液-22を得た。水素化処理糖液-22中の各成分濃度は、グルコース9.1質量%、キシロースとフルクトースの合計が2.9質量%、ソルビトール0.003質量%、キシリトールは検出限界以下(0.001質量%未満)であった。また、フルフラールが183ppm、ヒドロキシメチルフルフラールが219ppmであった。水素化処理糖液-22は、目視による視認で、糖液-8に比べ着色の度合いが低下した。また水素化処理糖液-22をイオン交換水で75倍(質量)に希釈し、UV-vis測定器にて吸収スペクトルを測定し、測定結果を図1に示した。

[0269] 図1から水素化処理糖液-21及び22は、水素化処理前の糖液-8(比較例20)に比べて、250~300nm付近の吸収が顕著に低下したことがわかる。当該吸収領域は主としてフルフラール等のカルボニル化合物の吸収領域であることから、水素化処理によりカルボニル化合物が除去され、着色が低下したものと考えられる。これより、本発明の水素化処理糖液は、その処理前に比べて着色が抑制されるため、これを用いた反応、特に化学変換プロセスに適用した場合、その生成物の着色が抑制できるものと考えられる。

[0270] (実施例43)

(A) 種培養

実施例39の(A)種培養において、溶解させる純水量を330mL、pH=7に調整後の液量を492mLとした以外は同様の方法により、種培養

をおこなった。

[0271] (B) 2, 3-ブタンジオール生産

200 mLの三角フラスコに滅菌培地に対して、上記培地24.8 mL、加熱滅菌した純水8.4 mL、実施例41で得た水素化処理糖液-21を16.8 mL加えてCGXII培地を作製した。更に50 g/Lカナマイシン溶液50 μ L、25 g/Lストレプトマイシン溶液50 μ Lを加えた後、種培養液をO. D. (660 nm)が0.20となるように接種し、30°Cで24.0時間培養した。19.0時間後のO. D. (660 nm)、グルコース、キシロース、(meso)-2, 3-ブタンジオール、(R, R)もしくは(S, S)-2, 3-ブタンジオール、2, 3-ブタンジオールの合計濃度((meso)、(R, R)、(S, S)の合計)を表8に示す。

[0272] (実施例44)

2, 3-ブタンジオール生産において、実施例42で得た水素化処理糖液-22を使用したこと以外は、実施例43と同様に行った。19.0時間後のO. D. (660 nm)、グルコース、キシロース、(meso)-2, 3-ブタンジオール、(R, R)もしくは(S, S)-2, 3-ブタンジオール、2, 3-ブタンジオールの合計濃度((meso)、(R, R)、(S, S)の合計)を表8に示す。

[0273] (比較例23)

2, 3-ブタンジオール生産において、糖液-8を使用したこと以外は、実施例43と同様に行った。19.0時間後のO. D. (660 nm)、グルコース、キシロース、(meso)-2, 3-ブタンジオール、(R, R)もしくは(S, S)-2, 3-ブタンジオール、2, 3-ブタンジオールの合計濃度((meso)、(R, R)、(S, S)の合計)を表8に示す。

[0274] (実施例45)

前記水素化処理糖液-21の使用量を25.2 mLに変更した以外は、実施例43と同様に2, 3-ブタンジオールを生産した。結果を表8に示す。

[0275] (実施例 4 6)

2, 3-ブタンジオール生産において、前記水素化処理糖液-22を使用したこと以外は、実施例 4 5 と同様に行った。結果を表 8 に示す。

[0276] (比較例 2 4)

2, 3-ブタンジオール生産において、糖液-8を使用したこと以外は、実施例 4 5 と同様に行った。結果を表 8 に示す。

[0277] [表8]

表8

	糖液の種類	O. D. (660nm)	グルコース 濃度 [g/L]	キシロース 濃度 [g/L]	アセトイン 濃度 [g/L]	2, 3-ブタン ジオール濃度* ¹ [g/L]
実施例 39	水素化 処理糖液 -19	18. 0	10. 3	4. 2	0. 9	0. 1(メソ体) 4. 6(光学活性体) 4. 7(合計)
実施例 40	水素化 処理糖液 -20	19. 1	10. 4	4. 2	1. 0	0. 1 4. 6 4. 7
実施例 43	水素化 処理糖液 -21	15. 9	13. 2	6. 8	0. 6	0. 1 5. 9 6. 0
実施例 44	水素化 処理糖液 -22	14. 9	14. 2	6. 7	0. 5	0. 1 5. 3 5. 4
実施例 45	水素化 処理糖液 -21	11. 4	35. 7	10. 5	0. 5	0. 1 4. 2 4. 3
実施例 46	水素化 処理糖液 -22	10. 9	36. 6	11. 1	0. 5	0. 0 3. 8 3. 8
比較例 21	糖液-9	13. 9	16. 4	4. 2	0. 8	0. 0 4. 1 4. 1
比較例 22	糖液-10	11. 3	21. 0	4. 3	0. 7	0. 0 3. 5 3. 6
比較例 23	糖液-8	9. 9	21. 2	6. 9	0. 6	0. 0 3. 5 3. 5
比較例 24	糖液-8	3. 3	45. 3	14. 4	1. 0	0. 0 0. 4 0. 4

*¹: 2, 3-ブタンジオール濃度は、メソ体、光学活性体((R, R)-または(S, S)-体)及びこれらの合計量を順に示す。

[0278] 表 8 より、実施例 3 9 の水素化処理糖液-19を使用した場合は、比較例

21の水素化処理していない糖液－9に対してO. D. (660nm)が1.3倍、2,3-ブタンジオール濃度((meso)、(R,R)、(S,S)の合計)が1.1倍に向上した。

また、実施例40の水素化処理糖液－20を使用した場合は、比較例22の水素化処理していない糖液－10に対してO. D. (660nm)が1.7倍、2,3-ブタンジオール濃度((meso)、(R,R)、(S,S)の合計)が1.3倍に向上した。

以上の結果より、水素化処理を実施してフルフラール、グリコールアルデヒド等が大幅に低減した糖液を使用することで、菌体増殖速度、2,3-ブタンジオール生産速度が向上することが明らかとなった。

[0279] さらに、実施例43の水素化処理糖液－21を使用した場合は、比較例23の水素化処理をしていない糖液－8に対してO. D. (660nm)が1.6倍、2,3-ブタンジオール濃度((meso)、(R,R)、(S,S)の合計)が1.7倍に向上し、同様に実施例44の水素化処理糖液－22を使用した場合は、比較例23の水素化処理をしていない糖液－8に対してO. D. (660nm)が1.5倍、2,3-ブタンジオール濃度((meso)、(R,R)、(S,S)の合計)が1.5倍に向上した。

また、実施例45の水素化処理糖液－21を使用した場合は、比較例24の水素化処理を実施していない糖液－8に対してO. D. (660nm)が3.5倍、2,3-ブタンジオール濃度((meso)、(R,R)、(S,S)の合計)が10.8倍に向上し、同様に実施例46の水素化処理糖液－22を使用した場合は、比較例24の水素化処理を実施していない糖液－8に対してO. D. (660nm)が3.3倍、2,3-ブタンジオール濃度((meso)、(R,R)、(S,S)の合計)が9.5倍に向上した。

以上の結果より、糖類以外のカルボニル化合物および／または不飽和アルコールを含む糖液を水素化処理し、得られた水素化処理糖液に微生物を作用させて2,3-ブタンジオール生産速度が向上することが明らかとなった。

更に当該水素化処理糖液は、菌体増殖の速度を向上させることが明らかになった。

これより当該糖液を水素化反応に供することで、当該物質が水素化により除去または大幅に低減した水素化処理糖液に微生物を作用させ有機化合物を生産させることで、有機化合物の生産速度を向上させることが分かる。更に当該水素化処理糖液は、微生物の培養速度を向上させることが分かる。またこの効果は、非可食原料由来のバガス糖化液を水素化処理し、得られた水素化処理糖液に微生物を作用させた場合も同じであることがわかる。

[0280] (実施例 47)

上記糖液－1を使用し、実施例1と同様の方法で水素化処理を行ない、水素化処理糖液－23を得た。水素化処理糖液－23中の各成分濃度は、グルコース8.0質量%、キシロース1.0質量%、キシリトール0.01質量%、ソルビトールは検出限界以下(0.001質量%未満)であった。また、グリコールアルデヒドダイマーは50ppmであり、フルフラールは検出されなかった。

[0281] (実施例 48)

(A) 種培養

培地[ポリペプトン:20g、酵母エキス:10g、純水:500mLに溶解]500mLを試薬ビンに入れ、121℃で20分間、加熱滅菌した。これを室温まで冷やした後、200mLの三角フラスコに10mL入れ、続いて加熱滅菌した500g/Lグルコース水溶液0.8mLと加熱滅菌した純水9.2mLを入れてYPD培地を作製した。次に、*Saccharomyces cerevisiae* S288C株を接種して16.5時間30℃で培養した。

[0282] (B) エタノール生産

200mLの三角フラスコに加熱滅菌した培地10mL、孔径0.22μmのフィルターで濾過滅菌した実施例47(糖液の水素化処理)に記載の水素化処理糖液－23を6.7mL、加熱滅菌した脱塩水3.3mLを加え、

濾過滅菌したNaOH溶液でpHを6.3に調整した。次に種培養液をO.D. (660nm)が0.4となるように接種し、30℃で24.0時間で培養した。9時間後のエタノール濃度、グルコース濃度、キシロース濃度を表9に示す。

[0283] (比較例25)

エタノール生産において、水素化処理を実施していない糖液-1を使用したこと以外は、実施例48と同様に行った。9時間後のO.D. (660nm)、グルコース、キシロース、エタノール濃度を表9に示す。

[0284] [表9]

表9

	糖液の種類	O. D. (660nm)	グルコース 濃度 [g/L]	キシロース 濃度 [g/L]	エタノール 濃度 [g/L]
実施例48	水素化処理糖液-23	13.3	5.4	3.6	8.7
比較例25	糖液-1	2.8	21.4	3.8	2.5

[0285] 表9より、実施例47の水素化処理糖液-23を使用した場合は、比較例25の水素化処理していない糖液-1に対してO.D. (660nm)が4.8倍、エタノール濃度が3.5倍に向上した。

以上の結果より、糖類以外のカルボニル化合物および／または不飽和アルコールを含む糖液を水素化処理し、得られた水素化処理糖液に微生物を作用させることでエタノールの生産速度が向上することが明らかとなった。更に当該水素化処理糖液は、菌体増殖の速度を向上させることが明らかになった。

これより当該糖液を水素化反応に供することで、当該物質が水素化により除去または大幅に低減した水素化処理糖液に微生物を作用させ有機化合物を生産させることで、有機化合物の生産速度を向上させることが分かる。更に当該水素化処理糖液は、微生物の培養速度を向上させることが分かる。

[0286] (実施例49)

(A) 種培養

培地 [リン酸 1 カリウム : 3.0 g、リン酸 2 カリウム 7.0 g、硫酸アンモニウム : 2.0 g、硫酸マグネシウム・7水和物 : 0.2 g、塩化ナトリウム : 10.0 g、酵母エキス : 5.0 g、トリプトン : 10.0 g、純水 500 mL に溶解] 500 mL を試薬ビンに入れ、121℃で20分間、加熱滅菌した。これを室温まで冷やした後、200 mL の三角フラスコに 10 mL 入れ、続いて加熱滅菌した 500 g/L グルコース水溶液 0.8 mL と加熱滅菌した純水 9.2 mL を入れた。次に、*Escherichia coli* K12 株を接種して 30℃で 16.5 時間振とう培養した。

[0287] (B) 本培養

200 mL の三角フラスコに加熱滅菌した上記培地 10 mL、濾過滅菌した実施例 47 に記載の水素化処理糖液-23 を 2.2 mL、加熱滅菌した 500 g/L グルコース溶液 0.36 mL、加熱滅菌した 100 g/L キシロース溶液 0.22 mL、加熱滅菌した純水 7.2 mL、濾過滅菌した 1 N 水酸化ナトリウム溶液 25 μ L を入れた。次に、上記 (A) の種培養で得られた培養液を、O.D. (660 nm) が 0.1 となるように接種し、30℃で、24.0 時間振とう培養した。3.0 時間後の O.D. (660 nm)、グルコース、キシロース濃度を表 10 に示す。

[0288] (比較例 26)

微生物培養において、糖液-1 を使用したこと以外は、実施例 49 と同様に行った。3.0 時間後の O.D. (660 nm)、グルコース、キシロース濃度を表 10 に示す。

[0289] (実施例 50)

200 mL の三角フラスコに加熱滅菌した上記培地 10 mL、実施例 47 に記載の水素化処理糖液-23 を 4.5 mL、加熱滅菌した純水 5.5 mL、濾過滅菌した 1 N 水酸化ナトリウム溶液 50 μ L を入れた。次に、上記 (A) の種培養で得られた培養液を、O.D. (660 nm) が 0.1 となるように接種し、30℃で、24.0 時間振とう培養した。3.0 時間後の O.D. (660 nm)、グルコース、キシロース濃度を表 10 に示す。

[0290] (比較例 27)

微生物培養において、糖液-1を使用したこと以外は、実施例50と同様に行った。3.0時間後のO. D. (660nm)、グルコース、キシロース濃度を表10に示す。

[0291] [表10]

表10

	糖液の種類	O. D. (660nm)	グルコース濃度 [g/L]	キシロース濃度 [g/L]
実施例49	水素化処理糖液-23	4.8	14.4	1.3
実施例50	水素化処理糖液-23	4.5	13.5	2.3
比較例26	糖液-1	0.5	14.4	2.3
比較例27	糖液-1	0.1	22.1	2.5

[0292] 表10より、実施例49において実施例47の水素化処理糖液-23を使用した場合は、比較例26の水素化処理を実施していない糖液-1を使用した場合に対してO. D. (660nm)が9.6倍に向上した。

また、実施例50において水素化処理糖液-23を使用した場合は、比較例27の水素化処理していない糖液-1を使用した場合に対してO. D. (660nm)が45.0倍に向上した。

以上の結果より、糖類以外のカルボニル化合物および／または不飽和アルコールを含む糖液を水素化処理し、得られた水素化処理糖液を用いて微生物を培養した場合、菌体増殖速度を向上させることが明らかになった。

これより当該糖液を水素化反応に供することで、当該物質が水素化により除去または大幅に低減した水素化処理糖液は、微生物の培養速度を向上させることが裏付けられた。

[0293] (実施例 51)

上記の糖液-1を用いて、実施例1と同様の手法で水素化処理を行った。この水素化処理を行った糖液に対して、48%NaOH水溶液でpHを8に調整し、121℃で20分間加熱し滅菌処理を行った。本糖液に関してLC

分析を行ったところ、グルコース濃度は7.78質量%であった。

[0294] (比較例28)

上記の糖液-1を105.2g用いて、亜硫酸ナトリウム0.9g（アルデヒド総量に対して1当量）を加えて、40℃で1時間攪拌した。この還元剤で処理した糖液に対して、48%NaOH水溶液でpHを8に調整し、121℃で20分間加熱し滅菌処理を行った。本糖液に関してLC分析を行ったところ、グルコース濃度は4.7質量%であった。

[0295] 還元剤で処理した糖液は熱安定性が悪く、グルコース濃度が大きく低下する一方、水素化処理した糖液は熱安定性が高く、グルコース濃度を一定に保てることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0296] 本発明の糖類の処理方法によれば、糖液中の発酵阻害物質の含有量を減少させることができるため、得られる糖液を、微生物を利用した発酵生産プロセスで用いれば、高い収率で目的とする有機化合物の収率を得ることができる。

また本発明の水素化処理糖液は、発酵生産による有機化合物の製造における微生物の生産効率を向上させ、また化学変換プロセスに利用した際に生成物である有機化合物の着色を抑制することができる。

[0297] また、本発明の有機化合物の製造方法は、比較的簡単な処理により、高い生産効率で所望の有機化合物を製造することができる。

また、本発明の培養方法であれば、発酵生産プロセスにおける発酵阻害物質を減少させることができるため、微生物の増殖量と増殖速度を向上させ、もって発酵生産性を向上させることができる。

請求の範囲

- [請求項1] 糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群より選ばれる少なくとも1つを含む糖液を水素化反応に供し、前記糖液中に含まれる前記カルボニル化合物および／または不飽和アルコールを水素化することを特徴とする、糖液の処理方法。
- [請求項2] 前記糖類が、炭素数3以上7以下の単糖を構成成分として含む糖を1つ以上含む請求項1に記載の処理方法。
- [請求項3] 前記糖液が、非可食原料に由来する請求項1または2に記載の処理方法。
- [請求項4] 前記水素化反応を、金属触媒の存在下で行なう請求項1～3のいずれか1項に記載の処理方法。
- [請求項5] 前記糖類以外のカルボニル化合物が、アルデヒド化合物およびケトン化合物から選ばれる少なくとも1つである請求項1～4のいずれか1項に記載の処理方法。
- [請求項6] 前記不飽和アルコールが、脂肪族共役アルコールである請求項1～5のいずれか1項に記載の処理方法。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか1項に記載の処理方法により得られることを特徴とする水素化処理糖液。
- [請求項8] 前記水素化処理糖液中のフルフラールの含有率が、水素化処理糖液全量に対して0.01質量%以下である請求項7に記載の水素化処理糖液。
- [請求項9] 前記水素化処理糖液中のグリコールアルデヒドの含有率が、水素化処理糖液全量に対して0.03質量%以下である請求項7または8に記載の水素化処理糖液。
- [請求項10] 糖類以外のカルボニル化合物および不飽和アルコールからなる群より選ばれる少なくとも1つを含む糖液を水素化反応に供する、水素化処理工程、および
水性媒体中で、前記水素化処理工程後の糖液を含有する有機原料に

有機物生産能を有する微生物を作用させて有機化合物を得る、有機物生産工程、

を含むことを特徴とする有機化合物の製造方法。

[請求項11] 水性媒体中で、請求項7～9のいずれか1項に記載の水素化処理糖液を含有する有機原料に、有機物生産能を有する微生物を作用させて有機化合物を得る、有機物生産工程、

を有することを特徴とする有機化合物の製造方法。

[請求項12] 前記有機物生産工程を、嫌氣的雰囲気下で行う請求項10または11に記載の有機化合物の製造方法。

[請求項13] 前記有機物生産工程で得られた有機化合物を精製する工程を、さらに有する請求項10～12のいずれか1項に記載の有機化合物の製造方法。

[請求項14] 前記水性媒体が、炭酸イオン、重炭酸イオン、および二酸化炭素ガスから選ばれる少なくとも1つを含有する請求項10～13のいずれか1項に記載の有機化合物の製造方法。

[請求項15] 前記有機化合物がアルコール類、アミン類、カルボン酸類、およびフェノール類から選ばれる少なくとも1つである請求項10～14のいずれか1項に記載の有機化合物の製造方法。

[請求項16] 前記アルコール類が、炭素数2～10の脂肪族アルコールである請求項15に記載の有機化合物の製造方法。

[請求項17] 前記カルボン酸類が、炭素数2～10の脂肪族カルボン酸である請求項15に記載の有機化合物の製造方法。

[請求項18] 有用物質生産能力を有する微生物の培養方法であって、請求項7～9のいずれか1項に記載の水素化処理糖液を炭素源として用いることを特徴とする微生物の培養方法。

[請求項19] 前記微生物が、コリネ型細菌、大腸菌、アナエロビオスピリラム (*Anaerobiospirillum*) 属細菌、アクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属細菌、マンヘミア (*Mannh*

e i m i a) 属細菌、バスフィア (B a s f i a) 属細菌、ザイモモナス (Z y m o m o n a s) 属細菌、ザイモバクター (Z y m o b a c t e r) 属細菌、糸状菌、および酵母菌からなる群より選ばれる少なくとも1つである請求項10～18のいずれか1項に記載の方法。

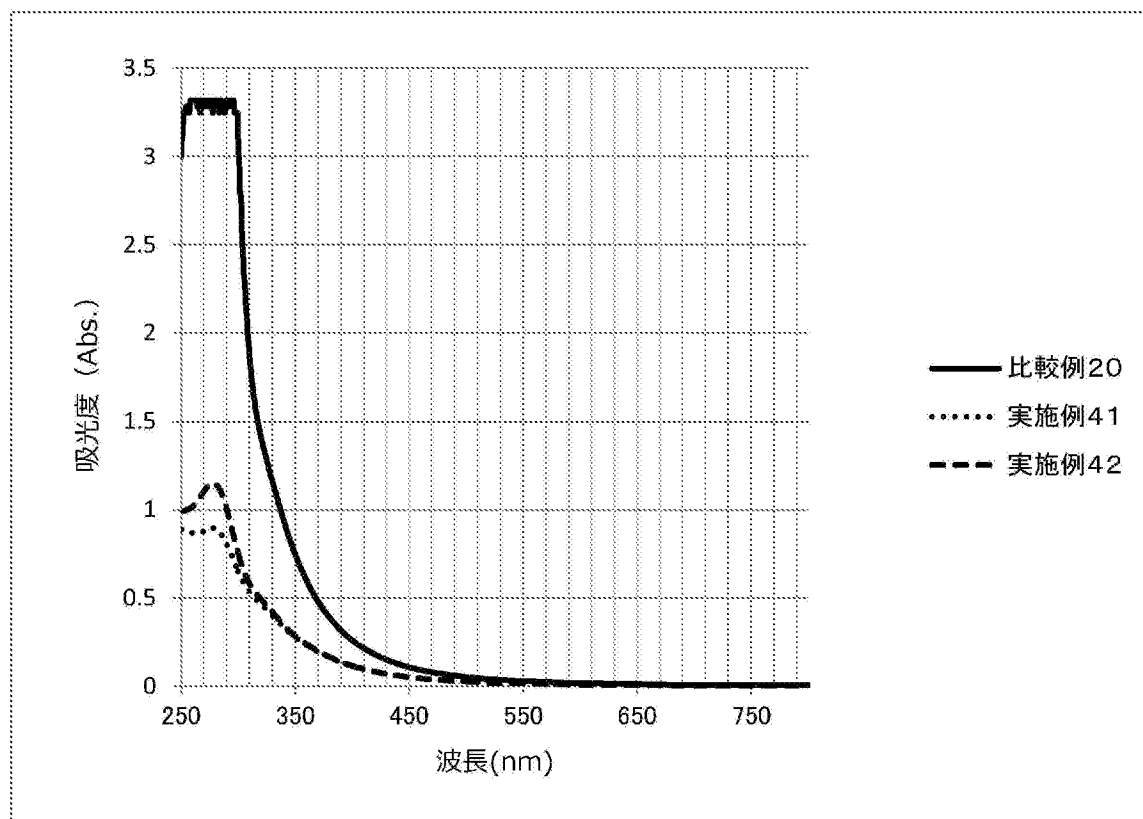
[請求項20] 前記微生物がペントース利用能を有する請求項10～19のいずれか1項に記載の方法。

[請求項21] 前記ペントースがキシロースである請求項20に記載の方法。

[請求項22] 前記微生物がキシロースイソメラーゼ活性を付与または増強された微生物である請求項21に記載の方法。

[請求項23] 前記微生物がキシロキナーゼ活性を付与または増強された微生物である請求項22に記載の方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/067719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C13B20/08(2011.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N1/14(2006.01)i, C12N1/16(2006.01)i, C12P1/00(2006.01)i, C12P7/04(2006.01)i, C12P7/42(2006.01)i, C12P7/46(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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)

C13B20/08, C12N1/00, C12N1/14, C12N1/16, C12P1/00, C12P7/04, C12P7/42, C12P7/46, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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 03-195491 A (Roquette Freres S.A.), 27 August 1991 (27.08.1991), claims; examples & US 5096820 A & EP 421882 A2	1-9
X	JP 06-014741 A (Roquette Freres), 25 January 1994 (25.01.1994), claims; paragraph [0051]; examples & US 5436329 A & EP 561089 A2	1-9
A	WO 2010/067785 A1 (Toray Industries, Inc.), 17 June 2010 (17.06.2010), claims; examples & US 2011/0250637 A1 & EP 2371973 A1 & WO 2010/067785 A1	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier 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
11 September, 2014 (11.09.14)

Date of mailing of the international search report
22 September, 2014 (22.09.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/067719

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/110374 A1 (Toray Industries, Inc.), 11 September 2009 (11.09.2009), claims; examples & US 2013/0273608 A1 & EP 2251427 A1 & WO 2009/110374 A1	1-23
A	Zautsen R.R.M. et al., Liquid-Liquid Extraction of Fermentation Inhibiting Compounds in Lignocellulose Hydrolysate, Biotechnology and Bioengineering, 2009.04.01, Vol.102, No.5, pp.1354-1360	1-23
A	Cavka A. et al., Effect of Sulfur Oxyanions on Lignocellulose-Derived Fermentation Inhibitors, Biotechnology and Bioengineering, 2011.11, Vol.108, No.11, pp.2592-2599	1-23
A	JP 2010-284120 A (IHI Corp.), 24 December 2010 (24.12.2010), claims; examples (Family: none)	1-23
A	WO 2002/083701 A1 (Towa Chemical Industry Co., Ltd.), 24 October 2002 (24.10.2002), claims; examples & US 2005/0192436 A1 & EP 1384724 A1 & WO 2002/083701 A1	1-23

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C13B20/08(2011.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N1/14(2006.01)i, C12N1/16(2006.01)i,
C12P1/00(2006.01)i, C12P7/04(2006.01)i, C12P7/42(2006.01)i, C12P7/46(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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（I P C））

Int.Cl. C13B20/08, C12N1/00, C12N1/14, C12N1/16, C12P1/00, C12P7/04, C12P7/42, C12P7/46, C12N15/09

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 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）

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 03-195491 A（ロケット フレール エス.アー.）1991.08.27, 特許請求の範囲、実施例等 & US 5096820 A & EP 421882 A2	1-9
X	JP 06-014741 A（ロクッテ・フルーレ）1994.01.25, 特許請求の範 囲、【0051】、実施例等 & US 5436329 A & EP 561089 A2	1-9
A	WO 2010/067785 A1（東レ株式会社）2010.06.17, 請求の範囲、実施 例等 & US 2011/0250637 A1 & EP 2371973 A1 & WO 2010/067785 A1	1-9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 1 . 0 9 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 9 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

菅原 洋平

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 1 3 3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2009/110374 A1 (東レ株式会社) 2009.09.11, 請求の範囲、実施例等 & US 2013/0273608 A1 & EP 2251427 A1 & WO 2009/110374 A1	1-23
A	Zautsen R.R.M. et al., Liquid-Liquid Extraction of Fermentation Inhibiting Compounds in Lignocellulose Hydrolysate, Biotechnology and Bioengineering, 2009.04.01, Vol.102, No.5, pp.1354-1360	1-23
A	Cavka A. et al., Effect of Sulfur Oxyanions on Lignocellulose-Derived Fermentation Inhibitors, Biotechnology and Bioengineering, 2011.11, Vol.108, No.11, pp.2592-2599	1-23
A	JP 2010-284120 A (株式会社 I H I) 2010.12.24, 特許請求の範囲、実施例等 (ファミリーなし)	1-23
A	WO 2002/083701 A1 (東和化成工業株式会社) 2002.10.24, 特許請求の範囲、実施例等 & US 2005/0192436 A1 & EP 1384724 A1 & WO 2002/083701 A1	1-23