

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 418**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/18** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2014 PCT/JP2014/080571**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15076279**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2014 E 14864767 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3072974**

54 Título: **Procedimiento para producir 2,3 butanodiol**

30 Prioridad:

**22.11.2013 JP 2013241869**

**22.10.2014 JP 2014215075**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**14.02.2020**

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)  
1-1, Nihonbashi Muromachi 2-chome, Chuo-ku  
Tokyo 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**ISOBE, KYOHEI;  
SAWAI, KENJI;  
KAWAMURA, KENJI;  
YAMADA, KATSUSHIGE y  
YANASE, HIDESHI**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 742 418 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir 2,3-butanodiol

## 5 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir 2,3-butanodiol mediante fermentación microbiana.

## ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 El 2,3-butanodiol (que en lo sucesivo se puede denominar "2,3-BDO") es un compuesto útil que se utiliza como material intermedio para productos farmacéuticos y cosméticos, y como material para tintas, perfumes, cristales líquidos, insecticidas, agentes suavizantes, explosivos, plastificantes y similares. De manera más específica, por ejemplo, el 2,3-butanodiol se puede utilizar como material para la metil etil cetona (documento no de patente 1) o el 1,3-butadieno (documento no de patente 2). Industrialmente, el 2,3-BDO se produce mediante un procedimiento en el que el óxido de 2-buteno se hidroliza en una solución acuosa de ácido perclórico. En los últimos años, a efectos de resolver los problemas de agotamiento de los recursos petrolíferos y el calentamiento global, se exige conseguir una sociedad sostenible, orientada al reciclaje. También en la industria química, se está estudiando intensamente el cambio de materiales de petróleo a materiales derivados de la biomasa. En tales circunstancias, los procedimientos para la producción de 2,3-butanodiol mediante fermentación microbiana han comenzado a atraer la atención.

Entre los ejemplos conocidos de microorganismos capaces de producir de manera eficaz 2,3-butanodiol mediante fermentación se incluyen enterobacterias, tales como *Klebsiella pneumoniae* (documento no de patente 3) y *Klebsiella oxytoca* (documento no de patente 4). Dado que estos microorganismos no requieren una vitamina, aminoácido o similares, en particular, para la fermentación, su utilización es ventajosa en que se pueden reducir los procesos requeridos para el aislamiento/purificación del 2,3-butanodiol a partir del líquido de fermentación. Sin embargo, estos microorganismos son patógenos y se sabe que causan infecciones respiratorias y similares. Por lo tanto, en los casos en que se lleva a cabo un cultivo a gran escala de estos microorganismos de fermentación con el propósito de producción industrial de 2,3-butanodiol, se requieren instalaciones para un control estricto y, como resultado, aumenta el coste.

Existen procedimientos dados a conocer que utilizan microorganismos de fermentación de 2,3-butanodiol biológicamente seguros que muestran una eficacia de fermentación elevada, tales como bacterias que pertenecen a la familia Bacillaceae, que incluyen *Bacillus licheniformis* (documento no de patente 5) y *Bacillus amyloliquefaciens* (documento no de patente 6). Sin embargo, la fermentación de 2,3-butanodiol mediante *Bacillus licheniformis* requiere la utilización de un extracto animal, que es caro, como fuente de nutrientes para promover la fermentación. La fermentación de 2,3-butanodiol mediante *Bacillus amyloliquefaciens* requiere la utilización de citrato de amonio para la promoción de la fermentación. Dado que el punto de ebullición del ácido cítrico está próximo al del 2,3-butanodiol, el aislamiento/purificación de 2,3-butanodiol es difícil en casos en los que el ácido cítrico permanece en el líquido de cultivo.

Por otro lado, como materia prima de fermentación para fermentación microbiana, no sólo los azúcares convencionales derivados de biomasa comestible, sino también azúcares derivados de biomasa no comestible, están atrayendo la atención. En los casos donde se utiliza un azúcar derivado de biomasa no comestible como materia prima de fermentación, la celulosa, hemicelulosa y similares contenidas en la biomasa no comestible se descomponen en azúcares utilizando una enzima de sacarificación. En este proceso, se obtienen pentosas, tales como xilosa, además de hexosas, tales como glucosa. Por lo tanto, se exige el desarrollo de una técnica de fermentación eficaz para materiales que contienen pentosa.

50 Entre los ejemplos conocidos de microorganismos capaces de producir de manera eficaz 2,3-butanodiol a partir de pentosa mediante fermentación, se incluyen enterobacterias, tales como *Klebsiella oxytoca* (documento no de patente 3). Dado que estos microorganismos no requieren una vitamina, aminoácido o similares, en particular, para la fermentación, su utilización es ventajosa en que se pueden reducir los procesos requeridos para el aislamiento/purificación del 2,3-butanodiol a partir del líquido de fermentación. Sin embargo, estos microorganismos son patógenos y se sabe que causan infecciones respiratorias y similares. Por lo tanto, en los casos en que se lleva a cabo un cultivo a gran escala de estos microorganismos de fermentación con el propósito de producción industrial de 2,3-butanodiol, se requieren instalaciones para un control estricto y, como resultado, aumenta el coste.

60 Por otro lado, existen procedimientos dados a conocer que utilizan microorganismos biológicamente seguros capaces de producir 2,3-butanodiol a partir de pentosa mediante fermentación, tales como bacterias que pertenecen a la familia Bacillaceae, que incluyen *Bacillus licheniformis* (documento no de patente 9) y *Paenibacillus polymyxa* (documento no de patente 10). Sin embargo, en la fermentación de 2,3-butanodiol utilizando estos microorganismos, debe utilizarse un material auxiliar caro, tal como un extracto de levadura o hidrolizado de proteína animal, de manera que el coste es elevado.

65 D1: La Patente WO2008/000809 A1 da a conocer la producción de productos de fermentación, tales como etanol y

ácido láctico, en reactores para biopelículas por microorganismos inmovilizados sobre lodo granular esterilizado.  
 D2: La Patente WO2009/151342 A1 da a conocer los procedimientos para producir 2,3-butanodiol mediante fermentación anaeróbica. Según procedimientos particulares de la presente invención, el 2,3-butanodiol se produce mediante fermentación anaeróbica de sustratos, que incluyen carbohidratos y monóxido de carbono.

Existen microorganismos transformados conocidos que pertenecen al género *Zymobacter* y que tienen capacidad para metabolizar pentosa, microorganismos que se prepararon mediante la introducción de genes exógenos que codifican xilosa isomerasa, xilulocinasa, transaldolasa y transcetolasa en microorganismos que pertenecen al género *Zymobacter* (documento de patente 1, documento de patente 2). Sin embargo, aunque los documentos de patente 1 y 2 describen que estos microorganismos transformados tienen capacidad para producir etanol, no existe una descripción ni sugerencia sobre la capacidad para producir 2,3-butanodiol a partir de pentosa mediante fermentación.

#### DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR

[Documentos de patente]

[Documento de patente 1] JP 2005-261421 A  
 [Documento de patente 2] US 2007/0298476 A  
 [Documento de patente 3] WO 2008/000809 A1  
 [Documento de patente 4] WO 2009/151342 A

[Documentos no de patente]

[Documento no de patente 1] A.N. Bourns, The Catalytic Action of Aluminium Silicates, Canadian J. Res. (1947)  
 [Documento no de patente 2] Nathan Shlechter, Pyrolysis of 2,3-butylene Glycol Diacetate to Butadiene, Indu. Eng. Chem. 905 (1945)  
 [Documento no de patente 3] Ma CQ, Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. Appl Microbiol Biotechnol 2009; 82: 49-57  
 [Documento no de patente 4] Ji XJ, Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 85: 1751-8.  
 [Documento no de patente 5] S. S. Nilegaonkar, Potential of *Bacillus licheniformis* for the production of 2,3-butanediol. Journal of Fermentation and Bioengineering. Volumen 82, fascículo 4, 1996, páginas 408-410  
 [Documento no de patente 6] Yang T, Optimization and scale-up of 2,3-butanediol production by *Bacillus amyloliquefaciens* B10-127. World J Microbiol Biotechnol. Abril de 2012; 28 (4): 1563-74  
 [Documento no de patente 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.  
 [Documento no de patente 8] Jansen NB, Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Biotechnol Bioeng. Abril de 1984; 26 (4): 362-9.  
 [Documento no de patente 9] Wang Q, Metabolic engineering of thermophilic *Bacillus licheniformis* for chiral pure D-2,3-butanediol production. Biotechnol Bioeng. Julio de 2012; 109 (7): 1610-21.  
 [Documento no de patente 10] Marwoto B, Metabolic analysis of acetate accumulation during xylose consumption by *Paenibacillus polymyxa*. Appl Microbiol Biotechnol. Marzo de 2004; 64 (1): 112-9.

#### CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

##### PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCIÓN

Tal como se ha descrito anteriormente, en los casos en los que se utiliza un microorganismo biológicamente seguro en un procedimiento convencional para la producción de 2,3-butanodiol mediante fermentación microbiana, el coste es elevado o la separación de un subproducto es difícil, lo cual es problemático.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es establecer un procedimiento para producir 2,3-butanodiol mediante fermentación microbiana utilizando un microorganismo biológicamente seguro. Otro objetivo de la presente invención es establecer un procedimiento económico para producir 2,3-butanodiol a partir de materia prima de fermentación que contiene pentosa como fuente de carbono, mediante fermentación microbiana utilizando un microorganismo biológicamente seguro.

##### MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

Como resultado de un estudio intensivo para resolver los problemas descritos anteriormente, los inventores de la presente invención descubrieron que las bacterias que pertenecen al género *Zymobacter*, que no se conocían como microorganismos para la fermentación de 2,3-butanodiol, tienen capacidad de fermentación de 2,3-butanodiol, completando de este modo la presente invención. Además, los inventores de la presente invención descubrieron que el 2,3-butanodiol puede producirse a partir de pentosa mediante la utilización de una bacteria de *Zymobacter* que tiene capacidad para metabolizar pentosa.

Es decir, la presente invención es tal como se describe en los puntos (1) a (13), a continuación.

(1) Un procedimiento para producir 2,3-butanodiol, que comprende las etapas de:

cultivar un microorganismo que pertenece al género *Zymobacter* en una materia prima de fermentación que contiene una fuente de carbono a un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa) no inferior a  $9 \text{ h}^{-1}$  y a un pH de 5 a 7 (etapa A); y  
purificar el 2,3-butanodiol a partir del líquido de cultivo obtenido en la etapa anterior (etapa B).

(2) El procedimiento, según el punto (1), en el que el microorganismo es *Zymobacter palmae*.

(3) El procedimiento, según cualquiera de los puntos (1) o (2), en el que la etapa A es cultivar en un medio cuya concentración total de azúcar no es inferior a 20 g/l.

(4) El procedimiento, según cualquiera de los puntos (1) a (3), en el que la fuente de carbono contiene pentosa y el microorganismo que pertenece al género *Zymobacter* tiene capacidad para metabolizar pentosa.

(5) El procedimiento, según cualquiera de los puntos (1) a (4), en el que el microorganismo es un microorganismo transformado que pertenece al género *Zymobacter*, en el que se introducen un gen o genes exógenos que codifican, como mínimo, una enzima seleccionada del grupo que comprende xilosa isomerasa, xilulocinasa, transaldolasa y transcetolasa.

(6) El procedimiento, según el punto (5), en el que el microorganismo es un microorganismo transformado que pertenece al género *Zymobacter*, en que se introducen genes exógenos que codifican xilosa isomerasa, xilulocinasa, transaldolasa y transcetolasa.

(7) El procedimiento, según cualquiera de los puntos (4) a (6), en el que la pentosa contenida en la materia prima de fermentación en la etapa A es xilosa.

(8) El procedimiento, según cualquiera de los puntos (4) a (7), en el que la abundancia de xilosa con respecto al total de azúcar en la materia prima de fermentación es del 5 % al 100 %.

(9) El procedimiento, según cualquiera de los puntos (4) a (8), en el que la materia prima de fermentación contiene un líquido que contiene azúcar derivado de biomasa.

(10) El procedimiento, según cualquiera de los puntos (1) a (9), en el que la materia prima de fermentación en la etapa A contiene licor de maíz fermentado.

(11) El procedimiento, según cualquiera de los puntos (1) a (10), en el que la etapa B comprende un proceso de destilación.

(12) El procedimiento, según el punto (11), que comprende un proceso de desalación antes del proceso de destilación.

(13) El procedimiento, según el punto (12), que comprende un proceso de intercambio iónico como proceso de desalación.

#### EFFECTO DE LA INVENCION

Según la presente invención, en un procedimiento para producir 2,3-butanodiol a partir de una materia prima de fermentación mediante fermentación microbiana, el 2,3-butanodiol puede obtenerse de forma más segura y económica en comparación con las técnicas convencionales. Incluso, en los casos en que la materia prima de fermentación contiene pentosa como fuente de carbono, el 2,3-butanodiol puede obtenerse de forma segura y económica a partir de la pentosa.

#### MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Etapas A: etapa de fermentación del 2,3-butanodiol

La presente invención se caracteriza en que se utiliza una bacteria que pertenece al género *Zymobacter* como microorganismo de fermentación del 2,3-butanodiol (que en lo sucesivo se puede denominar "2,3-BDO"). El microorganismo utilizado puede ser un microorganismo aislado del entorno natural o puede ser un microorganismo, cuyas propiedades son modificadas parcialmente mediante mutación o recombinación genética. Entre los ejemplos específicos de las bacterias que pertenecen al género *Zymobacter* que tienen capacidad de fermentación de 2,3-BDO se incluyen *Zymobacter palmae*, que se utiliza, de manera preferente, desde el punto de vista de la capacidad de fermentación del 2,3-BDO.

La materia prima de fermentación es, de manera preferente, un medio líquido habitual que contiene, según sea apropiado, una o más de fuentes de carbono metabolizables, fuentes de nitrógeno metabolizables, sales inorgánicas y, si es necesario, aminoácidos y micronutrientes orgánicos, tales como vitaminas. La materia prima de fermentación puede contener también un agente antiespumante, según sea apropiado, con el objetivo de una fermentación eficaz.

Entre los ejemplos específicos de las fuentes de carbono metabolizables se incluyen azúcares, tales como glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sacarosa, almidón, melazas residuales y almidón; ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico, ácido succínico y ácido acético; y alcoholes, tales como glicerol y etanol. Son preferentes los azúcares. En los casos en que se utiliza un azúcar, la concentración del azúcar en el medio es normalmente no inferior a 15 g/l, de

manera preferente, no inferior a 20 g/l, desde el punto de vista de llevar a cabo de manera eficaz la etapa posterior de purificación del 2,3-butanodiol. La concentración total de azúcar en la materia prima de fermentación como medio es normalmente de 15 g/l a 500 g/l, de manera preferente, de 20 g/l a 300 g/l. En los casos en que la concentración total de azúcar no es superior a 15 g/l, puede disminuir el efecto de aumentar el rendimiento de la fuente de carbono. En los casos en que la concentración total de azúcar es baja, la eficacia de la producción de 2,3-BDO también disminuye.

Entre los ejemplos específicos de las fuentes de nitrógeno metabolizables se incluyen amoníaco gaseoso, amoníaco acuoso, sales de amonio, urea, nitratos y aminoácidos; y fuentes de nitrógeno orgánico que se pueden utilizar de manera complementaria, tales como tortas de aceite, hidrolizados de soja, hidrolizados de caseína, hidrolizados de tejidos animales, licor de maíz fermentado, levaduras o extractos de levadura, extractos de carne y células de microorganismos de fermentación e hidrolizados de las mismas. Entre éstos, como fuentes de nitrógeno orgánico, son preferentes los hidrolizados de soja y el licor de maíz fermentado. El licor de maíz fermentado es más preferente. La concentración del licor de maíz fermentado contenida en la materia prima de fermentación no está limitada. Por ejemplo, la concentración es normalmente de 2,5 g/l a 35 g/l, de manera preferente, de 5 g/l a 25 g/l, de manera más preferente, de 10 g/l a 20 g/l en términos del contenido en sólidos contenidos en el licor de maíz fermentado. El procedimiento para medir el contenido en sólidos contenido en el licor de maíz fermentado no está limitado. El contenido en sólidos se puede calcular, por ejemplo, mediante la determinación del contenido de agua basándose en la diferencia entre el peso antes del secado por calor y el peso después del secado por calor, y restando el contenido de agua del peso antes del secado. Entre los ejemplos de sales inorgánicas que pueden añadirse, según sea apropiado, se incluyen sales de ácido fosfórico, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro y sales de manganeso.

Además, puede añadirse ácido nicotínico al medio, según sea apropiado, dependiendo del crecimiento del microorganismo. También se puede añadir un agente antiespumante, según sea apropiado.

La temperatura de cultivo no está limitada, siempre que sea una temperatura dentro del intervalo que permite el crecimiento del microorganismo. El cultivo se lleva a cabo a una temperatura normalmente de 20 °C a 50 °C, de manera preferente, de 25 °C a 40 °C. El período de cultivo puede ser un período durante el cual el 2,3-BDO se acumula, en el medio, en una cantidad que permite la purificación del 2,3-BDO. El período de cultivo se puede ajustar de manera apropiada mediante el control de la concentración de la fuente de carbono o la concentración del 2,3-BDO producido en el medio con el tiempo. El período de cultivo no está limitado y normalmente es de 1 hora a 300 horas, de manera preferente, de 4 horas a 150 horas.

El pH del medio durante el cultivo se mantiene dentro del intervalo de 5 a 7 utilizando un ácido inorgánico u orgánico, sustancia alcalina, urea, carbonato de calcio, amoníaco gaseoso y/o similares. El pH no es inferior a 5 y, de manera preferente, no es inferior a 6.

El modo del cultivo del microorganismo no está limitado. El cultivo se lleva a cabo, por ejemplo, mediante cultivo discontinuo, fermentación de alimentación discontinua o cultivo continuo.

En la presente invención, el microorganismo se cultiva en condiciones aireadas. La aireación en la presente invención significa que se permite que un gas que contiene oxígeno fluya en un recipiente de cultivo. Entre los ejemplos del procedimiento de aireación se incluyen, pero sin limitarse a éstos, un procedimiento en el cual se hace pasar un gas que contiene oxígeno a través del medio de cultivo y la aireación de la superficie superior en la que se sustituye la capa de aire en el líquido de cultivo por un gas que contiene oxígeno. Entre los ejemplos de la aireación de la superficie superior se incluyen un procedimiento en el que un gas que contiene oxígeno se pasa por el recipiente de cultivo y un procedimiento en el que se genera un flujo de aire en el líquido de cultivo mediante agitación del líquido de cultivo en un estado en el que el líquido de cultivo se expone a la atmósfera, suministrando de este modo el oxígeno al líquido de cultivo. En la presente invención, la aireación se lleva a cabo, de manera preferente, mediante un procedimiento en el que se hace pasar un gas que contiene oxígeno a través del líquido de cultivo.

En el cultivo de un microorganismo, las condiciones para el suministro de oxígeno en el medio se pueden ajustar de manera apropiada mediante la combinación de aireación y agitación. Las condiciones se expresan mediante el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $kLa$  ( $h^{-1}$ ) (en lo sucesivo denominado simplemente  $kLa$ ) para el agua a presión normal a 30 °C.  $kLa$  representa la capacidad para producir oxígeno disuelto mediante la transferencia de oxígeno desde una fase gaseosa a una fase líquida en una unidad de tiempo con aireación y agitación, y se define según la ecuación (1) a continuación (Laboratory Manual for Bioengineering. The Society for Biotechnology, Japan ed., Baifukan Co., Ltd., pág. 310 (1992)).

$$dC/dt = kLa \times (C^* - C) \dots \text{Ecuación (1)}$$

En esta ecuación,  $C$  representa el nivel de oxígeno disuelto DO (ppm) en el líquido de cultivo;  $C^*$  representa el nivel de oxígeno disuelto DO (ppm) en el estado de equilibrio con la fase gaseosa en ausencia de consumo de oxígeno por el microorganismo; y  $kLa$  representa el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $h^{-1}$ ). Dado que la

siguiente ecuación (2) se deriva de la ecuación anterior (1),  $kLa$  puede determinarse representando el logaritmo de  $C^*-C$  frente al período de aireación.

$$\ln(C^* - C) = -kLa \times t \dots \text{Ecuación (2)}$$

El  $kLa$  en la presente invención es un valor medido mediante el procedimiento de sustitución de gases (procedimiento dinámico). En el procedimiento de sustitución de gases (procedimiento dinámico), se alimenta agua a un aparato de cultivo con aireación/agitación en el que se inserta un electrodo de nivel de oxígeno disuelto, y el oxígeno en el líquido es sustituido por nitrógeno para reducir la concentración de oxígeno en el líquido. Posteriormente, el nitrógeno gaseoso se cambia a aire comprimido y se mide el proceso de aumento en el oxígeno disuelto a una velocidad de aireación, velocidad de agitación y temperatura predeterminadas, calculando de este modo el  $kLa$ .

El  $kLa$  fijado para el cultivo en la presente invención no es inferior a  $9 \text{ h}^{-1}$ . El límite superior del  $kLa$  no está limitado y el  $kLa$  es, de manera preferente, de superior a  $200 \text{ h}^{-1}$ .

En el procedimiento de la presente invención, la materia prima de fermentación contiene pentosa como fuente de carbono metabolizable. Mediante el cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Zymobacter* que tiene capacidad para metabolizar pentosa, puede producirse 2,3-butanodiol utilizando la pentosa como material. En dicho caso, la bacteria que pertenece al género *Zymobacter* puede ser una bacteria aislada del entorno natural o puede ser una bacteria cuyas propiedades fueron parcialmente modificadas mediante mutación o recombinación genética. Entre los ejemplos específicos de la bacteria que pertenece al género *Zymobacter* que tiene capacidad de fermentación de 2,3-butanodiol se incluyen *Zymobacter palmae*, que se utiliza, de manera preferente, desde el punto de vista de la capacidad de fermentación de 2,3-butanodiol. Normalmente, *Zymobacter Palmae* no metaboliza pentosa. Sin embargo, la capacidad para metabolizar pentosa puede ser proporcionada al mismo mediante introducción de un gen o genes implicados en el metabolismo de la pentosa.

Como gen a introducir en la presente invención, se puede utilizar un gen para una enzima que isomeriza aldopentosa a cetopentosa. Entre los ejemplos del gen se incluyen genes para la pentosa isomerasa, pentosa reductasa y/o pentol deshidrogenasa.

La pentosa isomerasa se define como una enzima que cataliza la isomerización de aldopentosa y cetopentosa, que son isómeros estructurales de pentosa. La pentosa isomerasa utilizada en la presente invención no está limitada, siempre que tenga actividad para catalizar la isomerización directa de pentosa. Entre los ejemplos de la pentosa isomerasa se incluyen xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5) y arabinosa isomerasa (EC 5.3.1.3). Entre éstas, la xilosa isomerasa es una enzima que cataliza la isomerización directa de xilosa (aldopentosa) a xilulosa (cetopentosa), y/o la reacción inversa de la misma, y también es conocida como xilosa cetoisomerasa. La isomerización directa significa una isomerización de una sola etapa catalizada por pentosa isomerasa, que es diferente de la conversión en dos etapas a través de un intermedio de alcohol de azúcar catalizada por pentosa reductasa y pentol deshidrogenasa.

La pentosa reductasa es una enzima reductora y significa una enzima que tiene actividad para convertir una aldopentosa en un alcohol de azúcar utilizando NADH o NADPH como coenzima. Por ejemplo, EC 1.1.1.307 y EC 1.1.1.21 corresponden a xilosa reductasa, que es una enzima que convierte xilosa en xilitol. Por ejemplo, EC 1.1.1.21 corresponde a arabinosa reductasa, que es una enzima que convierte arabinosa en arabitol. Las enzimas que no se clasifican en los números EC descritos anteriormente también se incluyen en la pentosa reductasa en la presente invención, siempre que las enzimas tengan las actividades descritas anteriormente.

La pentol deshidrogenasa es una deshidrogenasa y significa una enzima que convierte pentol en cetopentosa utilizando  $\text{NAD}^+$  como coenzima. Por ejemplo, EC 1.1.1.9 y EC 1.1.1.10 corresponden a xilitol deshidrogenasa, que es una enzima que convierte xilitol en xilulosa. Por ejemplo, EC 1.1.1.11 y EC 1.1.1.12 corresponden a arabitol deshidrogenasa, que es una enzima que convierte arabitol en ribosa. Las enzimas que no se clasifican en pentol deshidrogenasa también se incluyen en la pentol deshidrogenasa en la presente invención, siempre que las enzimas tengan las actividades descritas anteriormente.

La reacción catalizada por la pentosa reductasa y pentol deshidrogenasa isomeriza aldopentosa a cetopentosa, de manera similar a la reacción por la pentosa isomerasa.

Entre las enzimas que catalizan la isomerización de aldopentosa y cetopentosa, se puede utilizar, de manera preferente, la pentosa isomerasa de pentosa. De manera más preferente, se utiliza la xilosa isomerasa.

El gen para la xilosa isomerasa utilizado no está limitado y puede estar en forma, por ejemplo, de ADN genómico o ADNc. El gen puede derivar de cualquiera de los organismos, que incluyen animales, plantas, hongos (levaduras, mohos y similares) y bacterias. La información sobre dicho gen puede conocerse fácilmente mediante la búsqueda en una base de datos publicada en un sitio web, por ejemplo, NCBI. Una secuencia de bases del gen de la xilosa isomerasa en *Escherichia coli* que se puede utilizar, de manera preferente, en la presente invención se describe, por

ejemplo, en el No. de acceso de GenBank NC\_007779 REGIÓN: 3909650..3910972.

La actividad de la xilosa isomerasa se puede confirmar mediante la realización de una reacción enzimática en presencia de xilosa y, a continuación, la medición, mediante HPLC o similar, de la xilulosa producida mediante isomerización. La actividad de la xilosa isomerasa se puede medir, por ejemplo, mediante el procedimiento dado a conocer en la Patente JP 2008-79564 A.

Entre los ejemplos de organismos que pueden utilizarse como donante de la xilosa isomerasa se incluyen microorganismos que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, tales como los géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Erwinia* y *Salmonella*; actinomicetos, tales como los géneros *Actinoplanes*, *Arthrobacter* y *Streptomyces*; y los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Bacteroides*. Son preferentes los microorganismos que pertenecen al género *Escherichia*. *Escherichia coli* es más preferente.

Como gen a introducir en la presente invención, se puede utilizar un gen para una enzima que tiene actividad para catalizar la fosforilación de cetopentosa. Entre los ejemplos de la enzima que tiene actividad para catalizar la fosforilación de cetopentosa se incluyen xilulocinasa (EC 2.7.1.17) y ribulocinasa (EC 2.7.1.16). Se puede utilizar, de manera preferente, xilulocinasa.

El gen para la xilulocinasa utilizado no está limitado y puede estar en forma, por ejemplo, de ADN genómico o ADNc. El gen puede derivar de cualquiera de los organismos, que incluyen animales, plantas, hongos (levaduras, mohos y similares) y bacterias. La información sobre dicho gen puede conocerse fácilmente mediante la búsqueda en una base de datos publicada en un sitio web, por ejemplo, NCBI. Una secuencia de bases del gen de la xilulocinasa en *Escherichia coli* que se puede utilizar, de manera preferente, en la presente invención se describe, por ejemplo, en el No. de acceso de GenBank NC\_007779 REGIÓN: 3911044..3912498.

La actividad de la xilulocinasa se puede confirmar mediante la realización de una reacción enzimática en presencia de xilulosa y, a continuación, la medición, mediante HPLC o similar, de xilulosa-5-fosfato producido mediante fosforilación o la medición del aumento en NADPH o similar utilizando una reacción enzimática auxiliar. Por ejemplo, la medición puede llevarse a cabo mediante el procedimiento dado a conocer en Feldmann SD, Sahm H, Sprenger GA. La clonación y expresión de los genes para la xilosa isomerasa y la xilulocinasa de *Klebsiella pneumoniae* 1033 en *Escherichia coli* K12. Mol Gen Genet. Agosto de 1992; 234 (2): 201-10.

Entre los ejemplos de organismos que pueden utilizarse como donante de la xilulocinasa se incluyen microorganismos que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, tales como los géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Erwinia* y *Salmonella*; bacterias del ácido láctico, tales como los géneros *Bacteroides* y *Lactobacillus*; actinomicetos, tales como los géneros *Actinoplanes*, *Arthrobacter* y *Streptomyces*; y los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Clostridium*. Son preferentes los microorganismos que pertenecen al género *Escherichia*. *Escherichia coli* es más preferente.

Como gen a introducir en la presente invención, se puede utilizar un gen para una enzima que tiene actividad de transcetolasa y/o transaldolasa. La transcetolasa se define como una enzima que cataliza una reacción para convertir xilulosa-5-fosfato y eritrosa-4-fosfato en fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, y la reacción inversa de la misma, y/o cataliza una reacción para convertir ribosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato en sedoheptulosa-7-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, y la reacción inversa de la misma. La transcetolasa utilizada en la presente invención no está limitada, siempre que tenga la actividad catalítica descrita anteriormente. Por ejemplo, EC 2.2.1.1 corresponde a la transcetolasa.

El gen de la transcetolasa y/o el gen de la transaldolasa utilizados no están limitados y pueden estar en forma, por ejemplo, de ADN genómico o ADNc. Cada gen puede derivar de cualquiera de los organismos, que incluyen animales, plantas, hongos (levaduras, mohos y similares) y bacterias. La información sobre dichos genes puede conocerse fácilmente mediante la búsqueda en una base de datos publicada en un sitio web, por ejemplo, NCBI. Una secuencia de bases del gen de la transcetolasa en *Escherichia coli* que se puede utilizar, de manera preferente, en la presente invención se describe, por ejemplo, en el No. de acceso de GenBank NC\_007779 REGIÓN: complemento (3078300..3080291). Una secuencia de bases del gen de la transaldolasa en *Escherichia coli* que se puede utilizar, de manera preferente, en la presente invención se describe, por ejemplo, en el No. de acceso de GenBank NC\_007779 REGIÓN: 8238..9191.

La actividad de transcetolasa se puede confirmar mediante la realización de una reacción enzimática en presencia de xilulosa-5-fosfato y eritrosa-4-fosfato y la medición, mediante HPLC o similar, del gliceraldehído-3-fosfato producido, o la medición de la disminución en NADH o similar utilizando una reacción enzimática auxiliar. Por ejemplo, la medición puede llevarse a cabo mediante el procedimiento dado a conocer en 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. 1 junio de 1995; 230 (2): 525-32.

La transaldolasa se define como una enzima que cataliza una reacción para convertir sedoheptulosa-7-fosfato y

gliceraldehído-3-fosfato en eritrosa-4-fosfato y fructosa-6-fosfato, y la reacción inversa de la misma. La transcetolasa utilizada en la presente invención no está limitada, siempre que tenga la actividad catalítica descrita anteriormente. Por ejemplo, EC2.2.1.2 corresponde a la transaldolasa.

5 La actividad de transaldolasa se puede confirmar mediante la realización de una reacción enzimática en presencia de fructosa-6-fosfato y eritrosa-4-fosfato y, a continuación, la medición, mediante HPLC o similar, de gliceraldehído-3-fosfato producido o la medición de la disminución en NADH o similar utilizando una reacción enzimática auxiliar. Por ejemplo, la medición puede llevarse a cabo mediante el procedimiento dado a conocer en  
10 GA. Sprenger, U. Schorken, G. Sprenger y 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).

Entre los ejemplos de organismos que pueden utilizarse como donante de la transaldolasa y/o la transaldolasa se incluyen microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, tales como los géneros *Enterobacter*,  
15 *Escherichia*, *Klebsiella*, *Erwinia* y *Salmonella*; actinomicetos, tales como los géneros *Actinoplanes*, *Arthrobacter* y *Streptomyces*; y los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Bacteroides*. Son preferentes los microorganismos que pertenecen al género *Escherichia*. *Escherichia coli* es más preferente.

20 Siempre que la bacteria que pertenece al género *Zymobacter* tenga la capacidad de metabolizar pentosa, puede tener, como mínimo, uno cualquiera de los genes descritos anteriormente introducidos en la misma. De manera preferente, se introducen genes exógenos que codifican (1) xilosa isomerasa, (2) xilulocinasa y (3) como mínimo, una de transaldolasa y transcetolasa. De manera más preferente, se introducen genes exógenos que codifican (1) xilosa isomerasa, (2) xilulocinasa y (3) tanto transaldolasa como transcetolasa.

25 También se puede utilizar un microorganismo distinto de los descritos anteriormente como donante en los casos en que el microorganismo tiene capacidad para descomponer xilosa o en los casos en que el microorganismo carece de la capacidad de descomponer xilosa debido, por ejemplo, a una anomalía en un sitio del promotor o un sitio de unión a ribosomas, pero tiene el ADN que codifica un gen o genes de xilosa isomerasa, xilulocinasa, transaldolasa y/o transcetolasa.  
30

Se puede introducir una combinación de genes derivados de una pluralidad de donantes. Dichos genes se pueden incorporar en el ADN genómico de la bacteria que pertenece al género *Zymobacter* para utilizarse como el huésped o pueden estar presentes en un vector o vectores.

35 El procedimiento para introducir el gen o genes no está limitado. Por ejemplo, como procedimiento para introducir el gen o genes presentes en el vector o vectores, se puede utilizar el procedimiento dado a conocer en el documento de patente 1 y el documento de patente 2. Es decir, cada gen se inserta en el sitio de multiclonación de un vector de clonación plasmídico disponible en el mercado para *E. coli* (por ejemplo, pUC118) y la *E. coli* es transformada, a continuación, con el plásmido resultante, seguido del crecimiento del transformante que produce el producto de cada  
40 gen. Del transformante desarrollado, se recupera el plásmido y se escinde la región en la que se introduce cada gen, seguido de la inserción del fragmento resultante en el sitio de multiclonación de un vector plasmídico de amplia gama de huéspedes (por ejemplo, pMFY31 (Agric. Biol. Chem., volumen 49 (9), 2.719-2.724, 1985)). Mediante la transformación de una bacteria que pertenece al género *Zymobacter* con el vector plasmídico recombinante resultante, se puede preparar un transformante que pertenece al género *Zymobacter* que tiene capacidad para  
45 metabolizar pentosa. Como vector plasmídico de amplia gama de huéspedes también se puede utilizar un producto disponible en el mercado. Los procedimientos de transformación per se son bien conocidos. Por ejemplo, tal como se describe en el documento de patente 1 y el documento de patente 2, se pueden preparar células competentes mediante cultivo en un medio, tal como medio T complementado con iones de magnesio (2,0 % en peso de glucosa; 1,0 % en peso de extracto de levadura Bacto; 1,0 % en peso de dihidrógenofosfato de potasio; 0,2 % en peso de sulfato de amonio; 0,05 % en peso de sulfato de magnesio heptahidratado, pH 6,0). A continuación, puede llevarse a  
50 cabo la transformación mediante un procedimiento convencional, tal como la electroporación. Se puede obtener un transformante que tiene capacidad para metabolizar xilosa mediante el cultivo, en un medio que contiene xilosa como única fuente de carbono, de las bacterias sometidas al tratamiento de transformación.

55 En los casos en que cada gen a introducir se incorpora en el ADN genómico, se puede utilizar un procedimiento dado a conocer, por ejemplo, en Kirill A. Datsenko y Barry L. Wanner. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA. 6 junio del 2000; 97 (12): 6.640-6.645.

60 Incluso en los casos en que la materia prima de fermentación contiene pentosa, la materia prima de fermentación puede contener hexosa además de la pentosa.

65 La pentosa tiene cinco carbonos que constituyen el azúcar y también se denomina azúcar de cinco carbonos. La pentosa se puede dividir en aldopentosa, que tiene un grupo aldehído en la posición 1, y cetopentosa, que tiene un grupo cetona en la posición 2. Entre los ejemplos de aldopentosa se incluyen xilosa, arabinosa, ribosa y lixosa, y entre los ejemplos de cetopentosa se incluyen ribulosa y xilulosa. La pentosa utilizada en la presente invención puede ser cualquier pentosa, siempre que se pueda metabolizar por un microorganismo, y, en vista de la

abundancia en la naturaleza, la disponibilidad, y similares, son preferentes la xilosa y la arabinosa, y es más preferente la xilosa.

La hexosa tiene seis átomos de carbono que constituyen el azúcar y también se denomina azúcar de seis carbonos. La hexosa se puede dividir en aldosa, que tiene un grupo aldehído en la posición 1, y cetosa, que tiene un grupo cetona en la posición 2. Entre los ejemplos de aldosa se incluyen glucosa, manosa, galactosa, alosa, gulosa y talosa, y entre los ejemplos de cetosa se incluyen fructosa, psicosa y sorbosa. La hexosa utilizada en la presente invención puede ser cualquier hexosa, siempre que se pueda metabolizar por un microorganismo, y, en vista de la abundancia en la naturaleza, la disponibilidad, y similares, son preferentes la glucosa, la manosa y la galactosa, y es más preferente la glucosa.

La materia prima de fermentación que contiene pentosa y hexosa no está limitada y es, de manera preferente, un líquido que contiene azúcar derivado de la biomasa que contiene celulosa que se sabe que contiene tanto hexosa como pentosa. Entre los ejemplos de la biomasa que contiene celulosa se incluyen biomasa herbácea, tales como bagazo, pasto varilla, rastrojo de maíz, paja de arroz y paja de trigo; y biomasa leñosa, tales como árboles y materiales de construcción para desecho. Las biomasa que contienen celulosa contienen celulosa y/o hemicelulosa, que son polisacáridos producidos mediante la condensación por deshidratación de azúcares. Mediante la hidrólisis de dichos polisacáridos, se pueden producir líquidos que contienen azúcar que se pueden utilizar como materias primas de fermentación. El procedimiento per se para la preparación de un líquido que contiene azúcar derivado de la biomasa que contiene celulosa es bien conocido y puede ser cualquier procedimiento. Entre los ejemplos de procedimientos dados a conocer para la producción de dicho azúcar se incluyen un procedimiento en el que se produce un líquido que contiene azúcar mediante hidrólisis ácida de la biomasa utilizando ácido sulfúrico concentrado (solicitud de patente PCT japonesa traducida abierta a inspección pública No. 11-506934, Patente JP 2005-229821 A) y un procedimiento en el que la biomasa se somete a un tratamiento de hidrólisis utilizando ácido sulfúrico diluido y, a continuación, se trata enzimáticamente con celulasa y/o similar para producir un líquido que contiene azúcar (A. Aden et al., "Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover" NREL Technical Report (2002)). Además, entre los ejemplos de procedimientos dados a conocer en los que no se utilizan ácidos se incluyen un procedimiento en el que la biomasa se hidroliza utilizando agua subcrítica a una temperatura de aproximadamente 250 °C a 500 °C para producir un líquido que contiene azúcar (Patente JP 2003-212888 A), un procedimiento en el que la biomasa se somete a un tratamiento con agua subcrítica y, a continuación, se trata enzimáticamente para producir un líquido que contiene azúcar (Patente JP 2001-95597 A) y un procedimiento en el que la biomasa se somete a un tratamiento de hidrólisis con agua caliente a presión a una temperatura de 240 °C a 280 °C y, a continuación, se trata enzimáticamente para producir un líquido que contiene azúcar (Patente JP 3041380 B). Estos tratamientos pueden ir seguidos de la purificación del líquido que contiene azúcar obtenido. Un ejemplo del procedimiento se da a conocer en la Patente WO 2010/067785.

La proporción en peso entre la pentosa y hexosa contenidas en el azúcar mixto no está limitada y, de manera preferente, es de 1:9 a 9:1, tal como se representa por la proporción de (pentosa):(hexosa) en términos de la proporción en peso entre pentosa y hexosa en el azúcar mixto. Se espera dicha proporción de azúcar en los casos en que el azúcar mixto es un líquido que contiene azúcar derivado de biomasa que contiene celulosa.

Siempre que se cumplan los intervalos de la concentración de azúcar total y la proporción entre pentosa y hexosa descrita anteriormente, la concentración de hexosa contenida en la materia prima de fermentación utilizada en la presente invención no está limitada. Mediante la utilización del procedimiento para producir 2,3-BDO de la presente invención, puede obtenerse un rendimiento favorable incluso con un líquido que contiene azúcar mixto que contiene hexosa a una concentración no inferior a 5 g/l.

Incluso en los casos en que la materia prima de fermentación contiene pentosa, la materia prima de fermentación puede contener, tal como se ha descrito anteriormente, además de los azúcares, una o más de fuentes de carbono metabolizables, fuentes de nitrógeno metabolizables, sales inorgánicas y, si es necesario, aminoácidos y micronutrientes orgánicos, tales como vitaminas, que actúan de manera favorable sobre la fermentación por el microorganismo de fermentación de 2,3-butanodiol, según sea apropiado. La materia prima de fermentación también puede contener un agente antiespumante con el objetivo de una fermentación eficaz.

Incluso en los casos en que la materia prima de fermentación contiene pentosa, entre los ejemplos específicos de las fuentes de nitrógeno metabolizables se incluyen, tal como se ha descrito anteriormente, amoníaco gaseoso, amoníaco acuoso, sales de amonio, urea, nitratos y aminoácidos; y fuentes de nitrógeno orgánico que se pueden utilizar de manera complementaria, tales como tortas de aceite, hidrolizados de soja, digestos de caseína, licor de maíz fermentado, levaduras o extractos de levadura, extractos de carne, péptidos, que incluyen peptona y células de microorganismos de fermentación e hidrolizados de las mismas. Entre los ejemplos de sales inorgánicas que pueden añadirse, según sea apropiado, se incluyen sales de ácido fosfórico, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro, sales de manganeso y sales de zinc. Para la producción de 2,3-butanodiol mediante fermentación de pentosa, la materia prima de fermentación contiene, de manera preferente, entre estos componentes, uno o más de licor de maíz fermentado; sales de amonio, tales como sulfato de amonio e hidrógenofosfato de amonio; sales de ácido fosfórico, tales como dihidrógenofosfato de potasio, hidrógenofosfato de potasio e hidrógenofosfato de

amonio; sales de calcio, tales como cloruro de calcio; sales de hierro, tales como sulfato ferroso; sales de manganeso, tales como sulfato de manganeso; sales de zinc, tales como sulfato de zinc; sales de magnesio, tales como sulfato de magnesio; y EDTA y sales del mismo, tales como EDTA disódico.

5 Incluso en los casos en que la materia prima de fermentación contiene pentosa, puede añadirse ácido nicotínico al medio, según sea apropiado, dependiendo del crecimiento del microorganismo, tal como se ha descrito anteriormente. También se puede añadir un agente antiespumante, según sea apropiado.

10 Incluso en los casos en que la materia prima de fermentación contiene pentosa como fuente de carbono metabolizable y se cultiva un microorganismo que pertenece al género *Zymobacter* que tiene capacidad para metabolizar pentosa, la temperatura del cultivo, el pH durante el cultivo, el modo de cultivo del microorganismo, las condiciones de aireación y las condiciones para el suministro de oxígeno en el medio, incluyendo las condiciones preferentes para los mismos, son los mismos que los descritos anteriormente.

15 El líquido de cultivo obtenido mediante la etapa de fermentación de 2,3-butanodiol contiene, no sólo 2,3-butanodiol, sino también impurezas derivadas de la materia prima de fermentación, y etanol como subproducto de la fermentación. Por lo tanto, el 2,3-butanodiol contenido en el líquido del cultivo debe purificarse en un proceso posterior.

20 Etapa de purificación

La etapa de purificación de 2,3-butanodiol a partir del líquido de cultivo de 2,3-butanodiol no está limitada y puede llevarse a cabo mediante un procedimiento conocido para un experto en la materia. La presente invención comprende, de manera preferente, un proceso de destilación del líquido de cultivo con 2,3-butanodiol.

25 En la destilación del líquido de cultivo con 2,3-butanodiol, el 2,3-butanodiol se recupera de la parte de vapor. El procedimiento de destilación no está limitado y puede ser cualquiera entre destilación simple, destilación de precisión, destilación atmosférica y destilación a presión reducida que se aplican habitualmente. El procedimiento puede llevarse a cabo utilizando un aparato seleccionado, por ejemplo, entre un aparato de destilación en película fina, un aparato de destilación de tipo bandeja y un aparato de destilación con relleno. A la presente invención se pueden aplicar un procedimiento discontinuo o un procedimiento continuo. La destilación a presión reducida es especialmente preferente, ya que, en este procedimiento, el punto de ebullición se puede disminuir para suprimir la generación de impurezas. De manera más específica, el procedimiento se lleva a cabo, de manera preferente, a una temperatura de calentamiento de 60 °C a 150 °C. En los casos en que la temperatura de calentamiento es inferior a 30 60 °C, la presión debe disminuirse ampliamente, de manera que el mantenimiento del aparato es muy difícil a nivel industrial. En los casos en que la temperatura de calentamiento es superior a 150 °C, se produce la descomposición de una pequeña cantidad de azúcares y similares restantes en la solución de 2,3-butanodiol, lo que conduce a la producción de sustancias coloreadas como subproductos, lo cual no es preferente. De este modo, el grado de reducción de la presión se controla, de manera preferente, de manera que se produce la destilación de 40 2,3-butanodiol dentro del intervalo de temperaturas de calentamiento descrito anteriormente.

Aunque el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol se puede someter tal cual al proceso de destilación, el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol se somete, de manera preferente, a un proceso de desalación y/o un proceso de concentración antes del proceso de destilación.

45 Entre los ejemplos específicos del proceso de desalación se incluyen un proceso de intercambio iónico. El proceso de intercambio iónico es un procedimiento para eliminar los componentes iónicos en el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol utilizando un intercambiador de iones. Entre los ejemplos de intercambiadores de iones que se pueden utilizar se incluyen resinas de intercambio iónico, membranas de intercambio iónico, fibras de intercambio iónico, papeles de intercambio iónico, intercambiadores iónicos en gel, intercambiadores iónicos líquidos, zeolita, intercambiadores iónicos carbonosos y montmorillonita. En la presente invención, se utiliza, de manera preferente, un procedimiento que utiliza una resina de intercambio iónico.

55 Las resinas de intercambio iónico se pueden dividir en resinas de intercambio aniónico fuertes, resinas de intercambio aniónico débiles, resinas de intercambio catiónico fuertes, resinas de intercambio catiónico débiles, resinas de intercambio de quelatos y similares, dependiendo de sus grupos funcionales. Una resina de intercambio aniónico fuerte se selecciona, por ejemplo, entre "Amberlite" IRA410J, IRA411 y IRA910CT, fabricadas por Organo Corporation; y "DIAION" SA10A, SA12A, SA11A, NSA100, SA20A, SA21A, UBK510L, UBK530, UBK550, UBK535 y UBK555, fabricadas por Mitsubishi Chemical Corporation. Entre los ejemplos de resinas de intercambio aniónico débiles se incluyen "Amberlite" IRA478RF, IRA67, IRA96SB, IRA98 y XE583, fabricadas por Organo Corporation; y "DIAION" WA10, WA20, WA21J y WA30, fabricadas por Mitsubishi Chemical Corporation. Entre los ejemplos de resinas de intercambio catiónico fuertes se incluyen "Amberlite" IR120B, IR124, 200CT y 252, fabricadas por Organo Corporation; y "DIAION" SK104, SK1B, SK110, SK112, PK208, PK212, PK216, PK218, PK220 y PK228, fabricadas por Mitsubishi Chemical Corporation. Una resina de intercambio catiónico débil se puede seleccionar, por ejemplo, 60 entre "Amberlite" FPC3500 e IRC76, fabricadas por Organo Corporation; y "DIAION" WK10, WK11, WK100 y WK40L, fabricadas por Mitsubishi Chemical Corporation.

En la presente invención, se utilizan, de manera preferente, una resina o resinas de intercambio aniónico y una resina o resinas de intercambio catiónico en combinación como resina de intercambio iónico. De manera más preferente, se utiliza una resina o resinas aniónicas fuertes y una resina o resinas catiónicas fuertes, ya que éstas pueden eliminar diversos iones. La resina de intercambio aniónico se regenera, de manera preferente, con una solución acuosa diluida de un álcali, tal como hidróxido de sodio, y se utiliza como el tipo OH. La resina de intercambio catiónico se regenera, de manera preferente, con una solución acuosa diluida de un ácido, tal como ácido clorhídrico, y se utiliza como el tipo H. El procedimiento de desalación utilizando las resinas de intercambio iónico puede ser un procedimiento discontinuo o un procedimiento en columna, y no está limitado, siempre que sea posible una desalación eficaz. En el proceso de producción, se utiliza, de manera preferente, un procedimiento en columna, ya que el procedimiento permite la utilización repetida. El caudal se controla normalmente basándose en la SV (velocidad espacial) y la SV es, de manera preferente, de 2 a 50. La SV es, de manera más preferente, de 2 a 10 con el objetivo de lograr una mayor pureza. Resinas están disponibles en el mercado en forma de tipos de gel, tales como un tipo poroso, un tipo muy poroso y un tipo MR, y las resinas de intercambio iónico pueden estar en cualquiera de estas formas. Se pueden seleccionar resinas de intercambio iónico que tengan formas óptimas dependiendo de la calidad de la solución.

Entre los ejemplos específicos del proceso de desalación también se incluyen el tratamiento con membrana de nanofiltración. Por ejemplo, en el tratamiento con membrana de nanofiltración del líquido de cultivo con 2,3-butanodiol, tal como se ha dado a conocer en la Patente JP 2010-150248 A, la filtración del líquido de cultivo con 2,3-butanodiol a través de una membrana de nanofiltración permite la separación eficaz del 2,3-butanodiol en la parte del permeado, y las sales inorgánicas, azúcares y componentes de colores en la parte de alimentación.

Entre los ejemplos del material de la membrana de nanofiltración se incluyen materiales poliméricos, tales como poliamida de piperazina, poliamida, acetato de celulosa, alcohol de polivinilo, poliimida y poliéster; y materiales inorgánicos, tales como cerámica. Una membrana de nanofiltración se utiliza, en general, como un elemento de membrana enrollado en espiral o como una membrana plana o una membrana de fibra hueca. La membrana de nanofiltración utilizada en la presente invención es, de manera preferente, un elemento de membrana enrollado en espiral.

Entre los ejemplos específicos del elemento de membrana de nanofiltración utilizados, de manera preferente, en la presente invención se incluyen "GEsepa", que es una membrana de nanofiltración de acetato de celulosa fabricada por GE Osmonics; NF99 y NF99HF, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida, fabricadas por Alfa-Laval; NF-45, NF-90, NF-200 y NF-400, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida de piperazina reticulada, fabricadas por Filmtec Corporation; y SU-210, SU-220, SU-600 y SU-610, que son elementos de membrana de nanofiltración fabricados por Toray Industries, Inc., que contienen UTC60 fabricado por el mismo fabricante. Entre éstos, el elemento de membrana de nanofiltración es, de manera más preferente, NF99 o NF99HF, que son membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida, fabricadas por Alfa-Laval; NF-45, NF-90, NF-200 o NF-400, que son las membranas de nanofiltración que tienen una capa funcional compuesta por una poliamida de piperazina reticulada, fabricadas por Filmtec Corporation; o SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610, que son módulos de membrana de nanofiltración fabricados por Toray Industries, Inc., que contienen UTC60 fabricado por el mismo fabricante. El elemento de membrana de nanofiltración es, de manera aún más preferente, SU-210, SU-220, SU-600 o SU-610, que son elementos de membrana de nanofiltración fabricados por Toray Industries, Inc., que contienen UTC60 fabricado por el mismo fabricante, cuyo componente principal es una poliamida de piperazina reticulada.

La filtración a través de una membrana de nanofiltración puede llevarse a cabo bajo presión y la presión de filtración está, de manera preferente, dentro del intervalo de 0,1 MPa a 8 MPa. En los casos en que la presión de filtración es inferior a 0,1 MPa, la velocidad de permeación de la membrana puede ser baja, mientras que en los casos en que la presión de filtración es superior a 8 MPa, la membrana puede resultar dañada. En los casos en los que se utiliza la membrana a una presión de filtración de 0,5 MPa a 7 MPa, el flujo de permeación de la membrana es elevado, de manera que se permite que el líquido de fermentación con 2,3-butanodiol penetre de manera eficaz, y la posibilidad de dañar la membrana es pequeña, lo cual es más preferente. La membrana se utiliza, de manera especialmente preferente, a una presión de filtración de 1 MPa a 6 MPa.

La concentración de 2,3-butanodiol en la solución de 2,3-butanodiol que debe filtrarse a través de la membrana de nanofiltración no está limitada. En los casos en que la concentración de 2,3-butanodiol en la solución de 2,3-butanodiol es elevada, la concentración de 2,3-butanodiol contenida en el permeado es también elevada, de manera que se puede ahorrar la energía necesaria para la concentración del 2,3-butanodiol y, por lo tanto, se puede reducir el coste, lo cual es preferente.

En el proceso de desalación, se pueden llevar a cabo el tratamiento de intercambio iónico o el tratamiento con membrana de nanofiltración, o se pueden utilizar ambos combinados. Es preferente llevar a cabo, como mínimo, el tratamiento de intercambio iónico. En los casos en que se utilizan combinados el tratamiento con membrana de nanofiltración y el tratamiento de intercambio iónico, el orden de estos tratamientos no está limitado. De manera preferente, el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol se somete al tratamiento con membrana de nanofiltración y, a

continuación, el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol que contiene sales inorgánicas reducidas obtenidas de la parte del permeado se somete al tratamiento de intercambio iónico. De este modo, con la resina de intercambio iónico se pueden eliminar las sales inorgánicas y los ácidos orgánicos que pasan parcialmente a través de la membrana de nanofiltración, de manera que se puede aumentar la tasa de eliminación de sales inorgánicas.

El procedimiento de concentración del líquido de cultivo con 2,3-butanodiol puede ser un procedimiento general conocido por un experto en la materia y, entre los ejemplos del procedimiento, se incluyen procedimientos que utilizan una membrana de ósmosis inversa y procedimientos de concentración con calor utilizando un evaporador. De manera preferente, se aplica un procedimiento que utiliza una membrana de ósmosis inversa.

En el procedimiento que utiliza una membrana de ósmosis inversa, se filtra una solución de 2,3-butanodiol a través de una membrana de ósmosis inversa para permitir que el agua penetre en parte del permeado, mientras que el 2,3-butanodiol se retiene y se concentra en la parte de alimentación de la membrana. Entre los ejemplos de membranas de ósmosis inversa utilizadas, de manera preferente, en la presente invención se incluyen membranas de material compuesto que tienen un polímero de acetato de celulosa como capa funcional (en lo sucesivo también denominadas membranas de ósmosis inversa de acetato de celulosa) y membranas de material compuesto que tienen una capa funcional de poliamida (en lo sucesivo también denominadas membranas de ósmosis inversa de poliamida). Aquí, entre los ejemplos del polímero de acetato de celulosa se incluyen polímeros preparados con ésteres de ácidos orgánicos de celulosa, tales como acetato de celulosa, diacetato de celulosa, triacetato de celulosa, propionato de celulosa y butirato de celulosa, que se pueden utilizar de forma individual o como una mezcla o éster mixto de dos o más de estos. Entre los ejemplos de la poliamida se incluyen polímeros lineales y polímeros reticulados constituidos por monómeros de diamina alifáticos y/o aromáticos. Entre los ejemplos de la forma de la membrana que se puede utilizar, según sea apropiado, se incluyen una membrana plana, una membrana enrollada en espiral y una membrana de fibra hueca.

Entre los ejemplos específicos de la membrana de ósmosis inversa utilizada en la presente invención se incluyen módulos de membrana de ósmosis inversa de poliamida fabricados por Toray Industries, Inc., tales como módulos del tipo de baja presión SU-710, SU-720, SU-720F, SU-710L, SU-720L, SU-720LF, SU-720R, SU-710P y SU-720P, así como módulos del tipo de alta presión SU-810, SU-820, SU-820L y SU-820FA; membranas de ósmosis inversa de acetato de celulosa fabricadas por el mismo fabricante, SC-L100R, SC-L200R, SC-1100, SC-1200, SC-2100, SC-2200, SC-3100, SC-3200, SC-8100 y SC-8200; NTR-759HR, NTR-729HF, NTR-70SWC, ES10-D, ES20-D, ES20-U, ES15-D, ES15-U y LF10-D, fabricadas por Nitto Denko Corporation; R098pHt, RO99, HR98PP y CE4040C-30D, fabricadas por Alfa-Laval; "GE Sepa" fabricada por GE; y BW30-4040, TW30-4040, XLE-4040, LP-4040, LE-4040, SW30-4040 y SW30HRLE-4040, fabricadas por FilmTec Corporation.

En la presente invención, la concentración a través de una membrana de ósmosis inversa se lleva a cabo bajo presión. La presión de filtración está, de manera preferente, dentro del intervalo de 1 MPa a 8 MPa, ya que, en los casos en que la presión de filtración es inferior a 1 MPa, la velocidad de permeación de la membrana puede ser baja, mientras que, en los casos en que la presión de filtración es superior a 8 MPa, la membrana puede resultar dañada. En los casos en que la presión de filtración está dentro del intervalo de 1 MPa a 7 MPa, el flujo de permeación de la membrana es elevado, de manera que la solución de 2,3-butanodiol se puede concentrar de manera eficaz. La presión de filtración está, de la manera más preferente, dentro del intervalo de 2 MPa a 6 MPa con el objetivo de reducir la posibilidad de dañar la membrana. En los casos de una solución de 2,3-butanodiol a una concentración baja, a la vista del coste, es preferente un procedimiento que utiliza una membrana de ósmosis inversa.

Antes del proceso anterior, se incluye, de manera preferente, un proceso de separación de células bacterianas contenidas en el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol. Entre los ejemplos de procedimientos que se pueden utilizar para el proceso de separación de células bacterianas se incluyen la separación por centrifugación y filtración. Se puede utilizar uno de estos procedimientos o la combinación de los mismos.

El 2,3-butanodiol producido mediante la presente invención se caracteriza por que tiene una pureza elevada. Entre los ejemplos de procedimientos para medir las impurezas contenidas en el 2,3-butanodiol se incluyen combinaciones de medición de la pureza mediante cromatografía de gases (CG), medición de la pureza mediante detección de UV utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y/o similares. Dado que se basan en la evaluación de la proporción del área de 2,3-butanodiol en el área total de los picos detectados, una proporción más elevada significa una mayor pureza de 2,3-butanodiol.

## EJEMPLOS

La presente invención se describe a continuación de forma concreta mediante ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo de referencia 1 Medición de kLa

Se insertó un electrodo de oxígeno disuelto (fabricado por ABLE Corporation) en un aparato de cultivo (fabricado por ABLE Corporation; capacidad del recipiente, 1,5 litros) para medir el nivel de oxígeno disuelto en diversas

condiciones de aireación/agitación y se determinó el kLa mediante el procedimiento dinámico utilizando nitrógeno gaseoso. En primer lugar, en el recipiente de cultivo, se colocó 1 litro de agua y se burbujeó nitrógeno gaseoso de manera suficiente en el agua, mientras la temperatura del agua se controlaba a 30 °C y el agua se agitaba a una velocidad constante. Cuando el valor del electrodo llegó al mínimo, se llevó a cabo la calibración a cero del electrodo de oxígeno disuelto. A continuación, el gas de aireación se cambió de nitrógeno gaseoso a aire o nitrógeno gaseoso a una velocidad de aireación predeterminada, y se midieron los cambios en el nivel de oxígeno disuelto con el tiempo a partir de entonces para determinar el kLa. La tabla 1 muestra los kLa obtenidos para diversas condiciones de aireación/agitación.

10

[Tabla 1]

Velocidad de aireación (vvm)	Velocidad de agitación (rpm)	kLa(h <sup>-1</sup> )
0,1 (nitrógeno gaseoso)	400	0
0,025	400	9
0,2	400	17
0,6	400	28
0,6	500	57

Ejemplos de referencia 1 y 2 ejemplos 4 a 6:

<Fermentación de 2,3-butanodiol>

15

20

25

Se sometió la cepa ATCCS1623 de *Zymobacter palmae* (*Z. palmae*) a cultivo estático en un tubo de ensayo que contenía 5 ml de medio T (20 g/l de glucosa, 10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 6,0) a 30 °C durante 24 horas, para llevar a cabo el preprecultivo. A continuación, se añadió todo el líquido del preprecultivo a un matraz Erlenmeyer que contenía 50 ml de medio T y se realizó el cultivo estático a 30 °C durante 16 horas, para llevar a cabo el precultivo. Se añadió el líquido de precultivo a 1 litro del medio de fermentación de 2,3-butanodiol que tenía la composición mostrada en la tabla 2 y el cultivo se realizó a una temperatura de 30 °C en cada kLa descrito en la tabla 1, mientras que el pH se mantuvo a 5,5 mediante neutralización con hidróxido de potasio. La recogida del líquido de cultivo se llevó a cabo utilizando un muestreador automático (fabricado por ABLE Corporation) a intervalos de 2 horas después del comienzo del cultivo durante un máximo de 40 horas. Se midieron la concentración de glucosa y la concentración de 2,3-butanodiol en el líquido de cultivo recogido.

[Tabla 2]

Glucosa	40	g
Licor de maíz fermentado (contenido en sólidos, 50 %)	30	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,8	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,75	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,2	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,9	g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8,8	mg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	44	mg
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,28	mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,9	mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	219	mg
EDTA·2Na	44	mg

Unidad (1/litro)

30

Las siguientes son las condiciones para la medición de cada concentración mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, fabricada por Shimadzu Corporation). La concentración de 2,3-butanodiol y la concentración de glucosa después de la fermentación, y el rendimiento de la fermentación, se determinaron mediante los siguientes procedimientos de medición.

35

Medición de concentración de 2,3-butanodiol

Columna: Shodex Sugar SH1011 (fabricada por Showa Denko K.K.)

Temperatura de la columna: 65 °C

Fase móvil: solución acuosa de ácido sulfúrico 0,05 M, 0,6 ml/min.

40

Detección: IR

## Medición de la concentración de glucosa

- 5 Columna: Asahipak NH2P50 4E (fabricada por Showa Denko K.K.)  
 Temperatura de la columna: 30 °C  
 Fase móvil: agua:acetonitrilo = 1:3, 0,6 ml/min.  
 Detección: IR

## Rendimiento de la fermentación

- 10 Basándose en la concentración de 2,3-butanodiol y la concentración de glucosa medidas mediante el análisis de HPLC anterior, se calculó el rendimiento de la fermentación utilizando la siguiente ecuación.

$$15 \text{ Rendimiento de la fermentación (\%)} = 100 \times \left\{ \frac{\text{(concentración de 2,3-butanodiol en el líquido de cultivo)} - \text{(concentración de 2,3-butanodiol en el medio)}}{\text{(concentración de glucosa en el medio)} - \text{(concentración de glucosa en el líquido de cultivo)}} \right\}$$

- 20 En la tabla 3 se muestran las concentraciones de 2,3-butanodiol y de glucosa en el líquido de cultivo y el rendimiento de la fermentación en el momento en que la concentración de glucosa en el líquido de cultivo era más próxima a 0. Se recuperó el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol obtenido y se centrifugó a 4 °C a 8.000 rpm durante 15 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Toray Industries, Inc.) para eliminar las células bacterianas. Este proceso se llevó a cabo dos veces y se obtuvo como resultado un total de 2 l de líquido de cultivo con 2,3-butanodiol.

- 25 <Purificación por intercambio iónico del líquido de cultivo con 2,3-butanodiol>

- 30 El líquido de cultivo obtenido mediante el ensayo de fermentación descrito anteriormente se sometió a eliminación de los iones residuales mediante tratamiento de intercambio iónico. Se utilizaron una resina de intercambio aniónico fuerte IRA120J (fabricada por Organo Corporation) y una resina de intercambio catiónico fuerte IR410 (fabricada por Organo Corporation) que se regeneraron con hidróxido de sodio 1 N o ácido clorhídrico 1 N en el tipo OH o tipo H, respectivamente. La cantidad de resina se calculó, de manera que la cantidad total de sales inorgánicas y ácidos orgánicos fue la misma que la capacidad de intercambio de la resina de intercambio iónico. Las columnas se rellenaron con las resinas de intercambio iónico y el líquido de cultivo se hizo pasar a través de la resina de intercambio aniónico y, a continuación, a través de la resina de intercambio catiónico a un caudal SV de 5.

- 35 <Purificación por destilación de 2,3-butanodiol>

- 40 La solución de 2,3-butanodiol después del tratamiento de intercambio iónico se sometió a la eliminación del agua con un evaporador de película MF-10 (fabricado por Tokyo Rikakikai). En este momento, se dejó evaporar el agua en un grado de reducción de la presión de 30 hPa y una temperatura de calentamiento de 60 °C. La solución de 2,3-butanodiol concentrada se destiló a presión reducida (5 mmHg) para obtener 2,3-butanodiol purificado. La pureza mediante CG y el rendimiento de la destilación del 2,3-butanodiol después de la destilación se determinaron mediante los siguientes procedimientos de medición

- 45 Pureza mediante CG

- 50 El 2,3-butanodiol después de la destilación se analizó mediante cromatografía de gases (CG; fabricado por Shimadzu Corporation) y se calculó la pureza mediante CG según la siguiente ecuación basándose en la proporción del área del pico de 2,3-butanodiol en el área total del pico detectado.

$$\text{Pureza mediante CG (\%)} = 100 \times \frac{\text{área del pico de 2,3-butanodiol}}{\text{área total del pico detectado}}$$

Las condiciones de análisis para la cromatografía de gases fueron las siguientes.

- 55 Columna: RT-BDEXM (0,25 mm x 30 m, fabricada por Restek)  
 Temperatura de la columna: 75 °C  
 Cámara de vaporización, temperatura del detector: 230 °C  
 Gas portador: He  
 Velocidad lineal: 35 cm/s  
 60 Detección: detector de ionización de llama (FID)

## Rendimiento de la destilación

- 65 El rendimiento de la destilación se calculó según la siguiente ecuación basándose en la cantidad de 2,3-butanodiol alimentado antes de la destilación calculada a partir de la concentración de 2,3-butanodiol medida mediante análisis de HPLC y la cantidad de líquido alimentado, y

la recuperación de 2,3-butanodiol calculada a partir de la cantidad de destilado después de la destilación y de la pureza mediante CG descrita anteriormente.

$$5 \quad \text{Rendimiento de la destilación (\%)} = 100 \times \left\{ \frac{\text{cantidad de destilado después de la destilación} \times (\text{pureza mediante CG})}{(\text{concentración de 2,3-butanodiol antes de la destilación}) \times (\text{cantidad de líquido alimentado antes de la destilación})} \right\}$$

Rendimiento total de 2,3-butanodiol

10 El rendimiento total de 2,3-butanodiol se calculó según la siguiente ecuación basándose en el rendimiento de la fermentación calculado a partir de los resultados de la etapa de fermentación y el rendimiento de la destilación calculado a partir de los resultados de la etapa de purificación. Los resultados en el rendimiento total de 2,3-butanodiol se muestran en la tabla 3.

$$15 \quad \text{Rendimiento total de 2,3-butanodiol (g/g de azúcar)} = (\text{rendimiento de la fermentación}) / 100 \times (\text{rendimiento de la destilación}) / 100$$

[Tabla 3]

		Ejemplo de referencia 1	Ejemplo de referencia 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6
kLa (h <sup>-1</sup> )		0	3	9	17	28	57
Antes de cultivo	Concentración de glucosa (g/l)	42,0	42,1	42,0	40,8	39,5	41,1
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Después del cultivo	Concentración de glucosa (g/l)	26,1	11,6	21	0,5	0,2	3,4
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	1,1	7,8	16,0	18,9	18,2	17,5
	Rendimiento de la fermentación (%)	6,8	25,5	40,0	46,8	46,4	46,5
Después de la destilación	Rendimiento de la destilación (%)	78,6	79,3	82,4	82,6	83,2	82,7
	Pureza mediante CG (%)	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
Rendimiento total de 2,3-BDO (g/g de azúcar)		0,053448	0,202215	0,3296	0,386568	0,386048	0,384555

20 Ejemplos de referencia 7 y 8 ejemplos 9 a 11: pH

Se cultivó la cepa ATCC51623 de *Z. palmae* mediante el procedimiento de preprecultivo y el procedimiento de precultivo descritos en los ejemplos 1 a 6. Se añadió el líquido de precultivo a 1 l del medio de fermentación de 2,3-butanodiol que tenía la composición mostrada en la tabla 2 y el cultivo se llevó a cabo a una velocidad de aireación de 0,2 vvm, velocidad de agitación de 400 rpm y temperatura de 30 °C, mientras que el pH se mantuvo a uno de 4,5, 4,8, 5,2, 5,5, 6,1 y 6,5 mediante neutralización con hidróxido de potasio. La recogida del líquido de cultivo se llevó a cabo utilizando un muestreador automático (fabricado por ABLE Corporation) a intervalos de 2 horas después del comienzo del cultivo durante un máximo de 40 horas. La concentración de glucosa y la concentración de 2,3-butanodiol en el líquido de cultivo recogido se midieron mediante los procedimientos descritos en los ejemplos 1 a 6. Las concentraciones de 2,3-butanodiol y glucosa en el líquido de cultivo y el rendimiento de la fermentación en el momento en que la concentración de glucosa en el líquido de cultivo era más próxima a 0 se muestran en la tabla 4. Se recuperó el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol después del ensayo de fermentación y se centrifugó a 4 °C a 8.000 rpm durante 15 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Toray Industries, Inc.) para eliminar las células bacterianas. Este proceso se llevó a cabo dos veces y se obtuvo como resultado un total de 2 l de líquido de cultivo con 2,3-butanodiol. El líquido de cultivo obtenido se sometió a desalación y tratamiento de destilación mediante los procedimientos descritos en los ejemplos 1 a 6 para obtener 2,3-butanodiol purificado. La pureza mediante CG y el rendimiento de la destilación del 2,3-butanodiol después de la destilación se determinaron mediante los procedimientos descritos en los ejemplos 1 a 6. Los resultados se muestran en la tabla 4.

40

[Tabla 4]

		Ejemplo de referencia 7	Ejemplo de referencia 8	Ejemplo 9	Ejemplo 10	Ejemplo 11
pH		4,5	4,8	5,2	6,1	6,5
Antes de cultivo	Concentración de glucosa (g/l)	41,5	41,6	42,0	40,4	38,8
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Después del cultivo	Concentración de glucosa (g/l)	11,5	0,0	2,3	1,6	2,6
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	6,5	12,4	18,1	18,5	13,8
	Rendimiento de la fermentación (%)	21,5	29,8	45,7	47,7	38,0
Después de la destilación	Rendimiento de la destilación (%)	79,1	81,5	82,9	82,6	83,2
	Pureza mediante CG (%)	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
Rendimiento total de 2,3-BDO (g/g de azúcar)		0,170065	0,24287	0,378853	0,394002	0,31616

Ejemplos 12 a 16: concentración de azúcar

- 5 Se cultivó la cepa ATCC51623 de *Z. palmae* mediante el procedimiento de preprecultivo y el procedimiento de precultivo descritos en los ejemplos de referencia 1 y 2 y los ejemplos 4 a 6. Se añadió el líquido de precultivo a 1 litro del medio de fermentación de 2,3-butanodiol que tenía la misma composición que se muestra en la tabla 2, excepto que la concentración de glucosa se ajustó a una de 12, 20, 100, 180 y 250 g/l. A continuación, se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de aireación de 0,2 vvm, velocidad de agitación de 400 rpm y temperatura de 30 °C, mientras que el pH se mantuvo a 5,5 mediante neutralización con hidróxido de potasio. La recogida del líquido de cultivo se llevó a cabo utilizando un muestreador automático (fabricado por ABLE Corporation) a intervalos de 2 horas a 8 horas después del comienzo del cultivo. La concentración de glucosa y la concentración de 2,3-butanodiol en el líquido de cultivo recogido se midieron mediante los procedimientos descritos en los ejemplos de referencia 1 y 2 y los ejemplos 4 a 6. Las concentraciones de 2,3-butanodiol y glucosa en el líquido de cultivo y el rendimiento de la fermentación en el momento en que la concentración de glucosa en el líquido de cultivo era más próxima a 0 se muestran en la tabla 5. Se recuperó el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol después del ensayo de fermentación y se centrifugó a 4°C a 8.000 rpm durante 15 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Toray Industries, Inc.) para eliminar las células bacterianas. Este proceso se llevó a cabo dos veces y se obtuvo como resultado un total de 2 l de líquido de cultivo con 2,3-butanodiol. El líquido de cultivo obtenido se sometió a desalación y tratamiento de destilación mediante los procedimientos descritos en los ejemplos de referencia 1 y 2 los ejemplos 4 a 6 para obtener 2,3-butanodiol purificado. La pureza mediante CG y el rendimiento de la destilación del 2,3-butanodiol después de la destilación se determinaron mediante los procedimientos descritos en los ejemplos 1 a 6. Los resultados se muestran en la tabla 5.

[Tabla 5]

		Ejemplo 12	Ejemplo 13	Ejemplo 14	Ejemplo 15	Ejemplo 16
Antes de cultivo	Concentración de glucosa (g/l)	12,5	20,4	100,8	187,7	253,9
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Después del cultivo	Concentración de glucosa (g/l)	0,0	0,4	3,1	0,3	5,6
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	5,3	8,8	44,2	82,6	115,5
	Rendimiento de la fermentación (%)	42,4	44,2	45,2	44,1	46,5
Después de la destilación	Rendimiento de la destilación (%)	78,8	79,5	84,6	84,3	86,4
	Pureza mediante CG (%)	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
Rendimiento total de 2,3-BDO (g/g de azúcar)		0,334112	0,35139	0,382392	0,371763	0,40176

Ejemplo de referencia 17 y ejemplos 18 a 21

Se confirmó la expresión de cuatro tipos de genes de enzima en las células del transformante descrito en el documento de patente 1 y el documento de patente 2. Este transformante se ha depositado con el depositario internacional de organismos para patentes, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, con el No. de acceso FERM BP-10048 el 30 de junio de 2004, bajo el Tratado de Budapest. Dado que el documento de patente 2 es la Patente US 7,569,379 B, este transformante ya está disponible.

Ejemplo de referencia 17 y ejemplos 18 a 21: kLa

<Fermentación de 2,3-butanodiol>

Como microorganismo que pertenece al género *Zymobacter* con la capacidad para metabolizar xilosa, se utilizó *Zymobacter palmae* [pMFY31-xt] dado a conocer en los documentos de patente 1 y 2. *Zymobacter palmae* [pMFY31-xt] es un transformante conocido preparado mediante transformación de *Zymobacter palmae* con un vector plasmídico de amplia gama de huéspedes recombinante en el que se introducen genes exógenos que codifican xilosa isomerasa, xilulocinasa, transaldolasa y transcetolasa. Tal como se ha descrito anteriormente, *Zymobacter palmae* [pMFY31-xt] ha sido depositado con el No. de acceso FERM BP-10048 bajo el Tratado de Budapest y está disponible. *Z. palmae* [pMFY31-xt] se sometió a cultivo estático en un tubo de ensayo que contenía 5 ml de medio de TX (40 g/l de xilosa, 10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 6,0), complementado con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina, a 30 °C durante 24 horas. A continuación, se añadió todo el líquido de cultivo a un matraz Erlenmeyer que contenía 50 ml de medio TX y se realizó el cultivo estático a 30 °C durante 24 horas. A continuación, se añadió todo el líquido de cultivo a 1 litro del medio de fermentación de 2,3-butanodiol que tenía la composición mostrada en la tabla 6 y el cultivo se realizó a una temperatura de 30 °C en condiciones de aeración/agitación descritas en la tabla 1, mientras que la pH se mantuvo a 5,5 mediante neutralización con hidróxido de potasio. El líquido de cultivo se recogió, según era apropiado, durante el cultivo y se midieron la concentración de xilosa y la concentración de 2,3-butanodiol.

[Tabla 6]

Xilosa	40	g
Licor de maíz fermentado	30	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,8	g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,75	g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	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
Unidad (1/litro)		

Las siguientes son las condiciones para la medición de cada concentración mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, fabricada por Shimadzu Corporation). La concentración de 2,3-butanodiol y la concentración de azúcar después de la fermentación, y el rendimiento de la fermentación, se determinaron mediante los siguientes procedimientos de medición.

Medición de la concentración de 2,3-butanodiol

Columna: Shodex Sugar SH1011 (fabricada por Showa Denko K.K.)

Temperatura de la columna: 65 °C

Fase móvil: solución acuosa de ácido sulfúrico 0,05 M, 0,6 ml/min.

Detección: IR

Medición de la concentración de azúcar

Columna: Asahipak NH2P50 4E (fabricada por Showa Denko K.K.)

Temperatura de la columna: 30 °C

Fase móvil: agua:acetonitrilo = 1:3, 0,6 ml/min.

Detección: IR

## Rendimiento de la fermentación

Basándose en la concentración de 2,3-butanodiol y la concentración de azúcar medidas mediante el análisis de HPLC anterior, se calculó el rendimiento de la fermentación utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Rendimiento de la fermentación (\%)} = 100 \times \left\{ \frac{\text{concentración de 2,3-butanodiol en el líquido de cultivo} - \text{concentración de 2,3-butanodiol en el medio}}{\text{concentración de azúcar en el líquido de cultivo} - \text{concentración de azúcar en el medio}} \right\}$$

En la tabla 7 se muestran las concentraciones de 2,3-butanodiol y de xilosa en el líquido de cultivo y el rendimiento de la fermentación en el momento en que la concentración de xilosa en el líquido de cultivo era más próxima a 0. Se recuperó el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol obtenido y se centrifugó a 4 °C a 8.000 rpm durante 15 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Toray Industries, Inc.) para eliminar las células bacterianas. Este proceso se llevó a cabo dos veces y se obtuvo como resultado un total de 2 l de líquido de cultivo con 2,3-butanodiol.

## &lt;Purificación por intercambio iónico del líquido de cultivo con 2,3-butanodiol&gt;

El líquido de cultivo obtenido mediante el ensayo de fermentación descrito anteriormente se sometió a eliminación de los iones residuales mediante tratamiento de intercambio iónico. Se utilizaron una resina de intercambio aniónico fuerte IRA120J (fabricada por Organo Corporation) y una resina de intercambio catiónico fuerte IR410 (fabricada por Organo Corporation) que se regeneraron con hidróxido de sodio 1 N o ácido clorhídrico 1 N en el tipo OH o tipo H, respectivamente. La cantidad de resina se calculó, de manera que la cantidad total de sales inorgánicas y ácidos orgánicos fue la misma que la capacidad de intercambio de la resina de intercambio iónico. Las columnas se rellenaron con las resinas de intercambio iónico y el líquido de cultivo se hizo pasar a través de la resina de intercambio aniónico y, a continuación, a través de la resina de intercambio catiónico a un caudal SV de 5.

## &lt;Purificación por destilación de 2,3-butanodiol&gt;

La solución de 2,3-butanodiol después del tratamiento de intercambio iónico se sometió a la eliminación del agua con un evaporador de película MF-10 (fabricado por Tokyo Rikakikai). En este momento, se dejó evaporar el agua en un grado de reducción de la presión de 30 hPa y una temperatura de calentamiento de 60 °C. La solución de 2,3-butanodiol concentrada se destiló a presión reducida (5 mmHg) para obtener 2,3-butanodiol purificado. La pureza mediante CG y el rendimiento de la destilación del 2,3-butanodiol después de la destilación se determinaron mediante los siguientes procedimientos de medición

## Pureza mediante CG

El 2,3-butanodiol después de la destilación se analizó mediante cromatografía de gases (CG; fabricado por Shimadzu Corporation) y se calculó la pureza mediante CG según la siguiente ecuación basándose en la proporción del área del pico de 2,3-butanodiol en el área total del pico detectado.

$$\text{Pureza mediante CG (\%)} = 100 \times \left( \frac{\text{área del pico de 2,3-butanodiol}}{\text{área total del pico detectado}} \right)$$

Las condiciones de análisis para la cromatografía de gases fueron las siguientes.

Columna: RT-BDEXM (0,25 mm x 30 m, fabricada por Restek)

Temperatura de la columna: 75 °C

Cámara de vaporización, temperatura del detector: 230 °C

Gas portador: He

Velocidad lineal: 35 cm/s

Detección: detector de ionización de llama (FID)

## Rendimiento de la destilación

El rendimiento de la destilación se calculó según la siguiente ecuación basándose en la cantidad de 2,3-butanodiol alimentado antes de la destilación calculada a partir de la concentración de 2,3-butanodiol medida mediante análisis de HPLC y la cantidad de líquido alimentado, y la recuperación de 2,3-butanodiol calculada a partir de la cantidad de destilado después de la destilación y de la pureza mediante CG descrita anteriormente.

$$\text{Rendimiento de la destilación (\%)} = 100 \times \left\{ \frac{\text{cantidad de destilado después de la destilación} \times \text{pureza mediante CG}}{\text{concentración de 2,3-butanodiol antes de la destilación} \times \text{cantidad de líquido alimentado antes de la destilación}} \right\}$$

Rendimiento total de 2,3-butanodiol

El rendimiento total de 2,3-butanodiol se calculó según la siguiente ecuación basándose en el rendimiento de la fermentación calculado a partir de los resultados de la etapa de fermentación y el rendimiento de la destilación calculado a partir de los resultados de la etapa de purificación. Los resultados en el rendimiento total de 2,3-butanodiol se muestran en la tabla 7.

$$\text{Rendimiento total de 2,3-butanodiol (g/g de azúcar)} = (\text{rendimiento de la fermentación})/100 \times (\text{rendimiento de la destilación})/100$$

[Tabla 7]

		Ejemplo de referencia 17	Ejemplo 18	Ejemplo 19	Ejemplo 20	Ejemplo 21
kLa (h <sup>-1</sup> )		0	9	17	28	57
Antes de cultivo	Concentración de xilosa (g/l)	41,8	41,7	41,2	39,9	41,3
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Después del cultivo	Concentración de xilosa (g/l)	5,8	20,8	0,0	1,1	0,0
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	6,1	4,6	10,3	10,3	11,1
	Rendimiento de la fermentación (%)	17,0	22,0	25,0	26,6	26,8
Después de la destilación	Rendimiento de la destilación (%)	80,3	81,9	82,5	82,4	82,3
	Pureza mediante CG (%)	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
Rendimiento total de 2,3-BDO (g/g de azúcar)		0,13651	0,18018	0,20625	0,219184	0,220564

Ejemplos de referencia 22 y 23 y ejemplos 24 y 25: pH

Se cultivó *Z. palmae* [pMFY31-xt] mediante el procedimiento descrito en los ejemplos 17 a 21. El líquido de cultivo resultante, preparado mediante el cultivo en un matraz, se añadió a 1 l del medio de fermentación de 2,3-butanodiol que tenía la composición mostrada en la tabla 6 y el cultivo se llevó a cabo a una velocidad de aireación de 0,2 vvm, velocidad de agitación de 400 rpm y temperatura de 30 °C, mientras que el pH se mantuvo a uno de 4,5, 4,8, 6,1 y 6,5 mediante neutralización con hidróxido de potasio. El líquido de cultivo se recogió, según era apropiado, durante el cultivo y se midieron la concentración de xilosa y la concentración de 2,3-butanodiol mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21. Las concentraciones de 2,3-butanodiol y xilosa en el líquido de cultivo y el rendimiento de la fermentación en el momento en que la concentración de xilosa en el líquido de cultivo era más próxima a 0 se muestran en la tabla 8. Se recuperó el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol después del ensayo de fermentación y se centrifugó a 4 °C a 8.000 rpm durante 15 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Toray Industries, Inc.) para eliminar las células bacterianas. Este proceso se llevó a cabo dos veces y se obtuvo como resultado un total de 2 l de líquido de cultivo con 2,3-butanodiol. El líquido de cultivo obtenido se sometió a desalación y tratamiento de destilación mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21 para obtener 2,3-butanodiol purificado. La pureza mediante CG y el rendimiento de la destilación del 2,3-butanodiol después de la destilación se determinaron mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21. Los resultados se muestran en la tabla 8.

[Tabla 8]

		Ejemplo de referencia 22	Ejemplo de referencia 23	Ejemplo 24	Ejemplo 25
pH		4,5	4,8	6,1	6,5
Antes de cultivo	Concentración de xilosa (g/l)	41,6	39,8	41,0	40,6
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	0,0	0,0	0,0	0,0
Después del cultivo	Concentración de xilosa (g/l)	13,6	0,8	0,0	0,3
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	3,7	7,7	9,3	6,1
	Rendimiento de la fermentación (%)	13,1	19,7	228	15,2
Después de la destilación	Rendimiento de la destilación (%)	80,7	82,2	83,0	82,8
	Pureza mediante CG (%)	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
Rendimiento total de 2,3-BDO (g/g de azúcar)		0,105717	0,161934	0,18924	0,125856

Ejemplos 26 a 28: concentración de azúcar

- 5 Se cultivó *Z. palmae* [pMFY31-xt] mediante el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21. El líquido de cultivo resultante, preparado mediante el cultivo en un matraz, se añadió a 1 l del medio de fermentación de 2,3-butanodiol que tenía la misma composición que se muestra en la tabla 6, excepto que la concentración de xilosa se ajustó a una de 5,0, 15 y 100 g/l. A continuación, se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de aireación de 0,2 vvm, velocidad de agitación de 400 rpm y temperatura de 30 °C, mientras que el pH se mantuvo a 5,5 mediante neutralización con hidróxido de potasio. El líquido de cultivo se recogió, según era apropiado, durante el cultivo y se midieron la concentración de xilosa y la concentración de 2,3-butanodiol mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21. Las concentraciones de 2,3-butanodiol y de xilosa en el líquido de cultivo y el rendimiento de la fermentación en el momento en que la concentración de xilosa en el líquido de cultivo era más próxima a 0 se muestran en la tabla 9. Se recuperó el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol después del ensayo de fermentación y se centrifugó a 4 °C a 8.000 rpm durante 15 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Toray Industries, Inc.) para eliminar las células bacterianas. Este proceso se llevó a cabo dos veces y se obtuvo como resultado un total de 2 l de líquido de cultivo con 2,3-butanodiol. El líquido de cultivo obtenido se sometió a desalación y tratamiento de destilación mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21 para obtener 2,3-butanodiol purificado. La pureza mediante CG y el rendimiento de la destilación del 2,3-butanodiol después de la destilación se determinaron mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21. Los resultados se muestran en la tabla 9.

[Tabla 9]

		Ejemplo 26	Ejemplo 27	Ejemplo 28
Antes de cultivo	Concentración de xilosa (g/l)	5,3	12,8	95,8
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	0,0	0,0	0,0
Después del cultivo	Concentración de xilosa (g/l)	0,0	0,0	18,6
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	1,5	3,5	17,1
	Rendimiento de la fermentación (%)	28,2	27,4	22,2
Después de la destilación	Rendimiento de la destilación (%)	78,9	79,2	85,9
	Pureza mediante CG (%)	> 99,9	> 99,9	> 99,9
Rendimiento total de 2,3-BDO (g/g de azúcar)		0,222498	0,217008	0,190698

25 Ejemplos 29 a 31: proporción de pentosas

- 30 Se cultivó *Z. palmae* [pMFY31-xt] mediante el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21. El líquido de cultivo resultante, preparado mediante el cultivo en un matraz, se añadió a 1 l del medio de fermentación de 2,3-butanodiol que tenía la misma composición que se muestra en la tabla 6, excepto que las concentraciones de xilosa y glucosa (g/l) se ajustaron a una de (40:20), (20:40) y (2,5:40), respectivamente. A continuación, se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de aireación de 0,2 vvm, velocidad de agitación de 400 rpm y temperatura de 30 °C, mientras que el pH se mantuvo a 5,5 mediante neutralización con hidróxido de potasio. El líquido de cultivo se recogió, según era apropiado, durante el cultivo y se midieron la concentración de azúcar y la concentración de 2,3-butanodiol mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21. La concentración de 2,3-butanodiol y la concentración de azúcar en el líquido de cultivo y el rendimiento de la fermentación en el momento en que la concentración de azúcar en el líquido de cultivo era más próxima a 0 se muestran en la tabla 10. Se recuperó el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol después del ensayo de fermentación y

se centrifugó a 4 °C a 8.000 rpm durante 15 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Toray Industries, Inc.) para eliminar las células bacterianas. Este proceso se llevó a cabo dos veces y se obtuvo como resultado un total de 2 l de líquido de cultivo con 2,3-butanodiol. El líquido de cultivo obtenido se sometió a desalación y tratamiento de destilación mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21 para obtener 2,3-butanodiol purificado. La pureza mediante CG y el rendimiento de la destilación del 2,3-butanodiol después de la destilación se determinaron mediante los procedimientos descritos en el ejemplo de referencia 17 y los ejemplos 18 a 21. Los resultados se muestran en la tabla 10.

10

[Tabla 10]

		Ejemplo 29	Ejemplo 30	Ejemplo 31
Antes de cultivo	Concentración de xilosa (g/l)	2,6	23,9	40,5
	Concentración de glucosa (g/l)	40,3	45,9	19,8
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	0,0	0,0	0,0
Después del cultivo	Concentración de xilosa (g/l)	0,0	2,0	4,3
	Concentración de glucosa (g/l)	0,0	0,0	0,0
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	18,7	21,0	15,3
	Rendimiento de la fermentación (%)	43,6	30,9	27,4
Después de la destilación	Rendimiento de la destilación (%)	83,2	84,3	84,1
	Pureza mediante CG (%)	> 99,9	> 99,9	> 99,9
Rendimiento total de 2,3-BDO (g/g de azúcar)		0,362752	0,260487	0,230434

Ejemplos 32 a 35: fuente de nitrógeno orgánico

Se cultivó la cepa ATCC51623 de *Z. palmae* mediante el procedimiento de preprecultivo y el procedimiento de precultivo descritos en los ejemplos de referencia 1 y 2 y los ejemplos 4 a 6. Se añadió el líquido de precultivo a 1 l del medio de fermentación de 2,3-butanodiol que tenía la misma composición que se muestra en la tabla 2, excepto que el licor de maíz fermentado se reemplazó por diversas fuentes de nitrógeno orgánico mostradas en la tabla 11. A continuación, se llevó a cabo el cultivo a una velocidad de aireación de 0,2 vvm, velocidad de agitación de 400 rpm y temperatura de 30 °C, mientras que el pH se mantuvo a 5,5 mediante neutralización con hidróxido de potasio. La recogida del líquido de cultivo se llevó a cabo utilizando un muestreador automático (fabricado por ABLE Corporation) a intervalos de 2 horas a 4 horas después del comienzo del cultivo. La concentración de glucosa y la concentración de 2,3-butanodiol en el líquido de cultivo recogido se midieron mediante los procedimientos descritos en los ejemplos de referencia 1 y 2 y los ejemplos 4 a 6. Las concentraciones de 2,3-butanodiol y glucosa en el líquido de cultivo y el rendimiento de la fermentación en el momento en que la concentración de glucosa en el líquido de cultivo era más próxima a 0 se muestran en la tabla 12. Se recuperó el líquido de cultivo con 2,3-butanodiol después del ensayo de fermentación y se centrifugó a 4 °C a 8.000 rpm durante 15 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de microfiltración (fabricada por Toray Industries, Inc.) para eliminar las células bacterianas. Este proceso se llevó a cabo dos veces y se obtuvo como resultado un total de 2 l de líquido de cultivo con 2,3-butanodiol. El líquido de cultivo obtenido se sometió a desalación y tratamiento de destilación mediante los procedimientos descritos en los ejemplos de referencia 1 y 2 y los ejemplos 4 a 6 para obtener 2,3-butanodiol purificado. La pureza mediante CG y el rendimiento de la destilación del 2,3-butanodiol después de la destilación se determinaron mediante los procedimientos descritos en los ejemplos de referencia 1 y 2 y los ejemplos 4 a 6. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Se pudo obtener un buen rendimiento de 2,3-BDO con cualquiera de las fuentes de nitrógeno orgánico. El mayor rendimiento de 2,3-BDO se pudo obtener en el caso en que se utilizó licor de maíz fermentado, tal como se muestra en el ejemplo 4.

[Tabla 11]

Fuente de nitrógeno orgánico	Concentración (g/l, en términos del contenido en sólidos)
Hidrolizado de soja	15
Hidrolizado de tejido animal	15
Hidrolizado de caseína	15
Extracto de levadura	15

40

[Tabla 12]

Fuente de nitrógeno orgánico		Ejemplo 32	Ejemplo 33	Ejemplo 34	Ejemplo 35
Fuente de nitrógeno orgánico		Hidrolizado de soja	Hidrolizado de tejido animal	Hidrolizado de caseína	Extracto de levadura
Antes de cultivo	Concentración de glucosa (g/l)	39,8	41,1	40,5	39,7
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	0,0	0,0	0,0	0,0
Después del cultivo	Concentración de glucosa (g/l)	0,3	3,1	1,1	0,0
	Concentración de 2,3-BDO (g/l)	16,3	11,7	10,8	12,3
	Rendimiento de la fermentación (%)	41,2	30,9	27,4	30,9
Después de la destilación	Rendimiento de la destilación (%)	83,1	81,9	82,3	79,6
	Pureza mediante CG (%)	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
Rendimiento total de 2,3-BDO (g/g de azúcar)		0,342372	0,253071	0,225502	0,245964

#### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

- 5 El 2,3-butanodiol (2,3-BDO) obtenido mediante el procedimiento de la presente invención es un compuesto útil como material intermedio para productos farmacéuticos y cosméticos, y como material para tintas, perfumes, cristales líquidos, insecticidas, agentes suavizantes, explosivos, plastificantes y similares.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir 2,3-butanodiol, que comprende las etapas de:
- 5 cultivar un microorganismo que pertenece al género *Zymobacter* en una materia prima de fermentación que contiene una fuente de carbono a un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa) no inferior a  $9 \text{ h}^{-1}$  y a un pH de 5 a 7 (etapa A); y purificar el 2,3-butanodiol a partir del líquido de cultivo obtenido en dicha etapa (etapa B).
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho microorganismo es *Zymobacter palmae*.
3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha etapa A es cultivar en un medio cuya concentración total de azúcar no es inferior a 20 g/l.
- 15 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha fuente de carbono contiene pentosa y dicho microorganismo que pertenece al género *Zymobacter* tiene capacidad para metabolizar dicha pentosa.
- 20 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho microorganismo es un microorganismo transformado que pertenece al género *Zymobacter*, en el que se introducen un gen o genes exógenos que codifican, como mínimo, una enzima seleccionada del grupo que comprende xilosa isomerasa, xilulocinasa, transaldolasa y transcetolasa.
- 25 6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que dicho microorganismo es un microorganismo transformado que pertenece al género *Zymobacter*, en que se introducen genes exógenos que codifican xilosa isomerasa, xilulocinasa, transaldolasa y transcetolasa.
- 30 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que dicha pentosa contenida en dicha materia prima de fermentación en dicha etapa A es xilosa.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la abundancia de xilosa con respecto al total de azúcar en dicha materia prima de fermentación es del 5 % al 100 %.
- 35 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que dicha materia prima de fermentación contiene un líquido que contiene azúcar derivado de biomasa.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha materia prima de fermentación en dicha etapa A contiene licor de maíz fermentado.
- 40 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha etapa B comprende un proceso de destilación.
12. Procedimiento, según la reivindicación 11, que comprende un proceso de desalación antes de dicho proceso de destilación.
- 45 13. Procedimiento, según la reivindicación 12, que comprende un proceso de intercambio iónico como dicho proceso de desalación.

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

### Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2008000809 A1
- WO 2009151342 A1
- JP 2005261421 A
- US 20070298476 A
- JP 2008079564 A
- JP 11506934 W
- JP 2005229821 A
- JP 2003212888 A
- JP 2001095597 A
- JP 3041380 B
- WO 2010067785 A
- JP 2010150248 A
- US 7569379 B

10

### Literatura no patente citada en la descripción

- **A. N. BOURNS.** The Catalytic Action Of Aluminium Silicates. *Canadian J. Res.*, 1947
- **NATHAN SHLECHTER.** Pyrolysis of 2,3-butylene Glycol Diacetate to Butadiene. *Indu. Eng. Chem.*, 1945, 905
- **MA CQ.** Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, vol. 82, 49-57
- **JI XJ.** Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, vol. 85, 1751-8
- **S. S. NILEGAONKAR.** Potential of *Bacillus licheniformis* for the production of 2,3-butanediol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996, vol. 82 (4), 408-410
- **YANG T.** Optimization and scale-up of 2,3-butanediol production by *Bacillus amyloliquefaciens* B10-127. *World J Microbiol Biotechnol.*, April 2012, vol. 28 (4), 1563-74
- **OKAMOTO T.** *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Arch Microbiol.*, 1993, vol. 160 (5), 333-7
- **JANSEN NB.** Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. *Biotechnol Bioeng.*, April 1984, vol. 26 (4), 362-9
- **WANG Q.** Metabolic engineering of thermophilic *Bacillus licheniformis* for chiral pure D-2,3-butanediol production. *Biotechnol Bioeng.*, July 2012, vol. 109 (7), 1610-2'
- **MARWOTO B.** Metabolic analysis of acetate accumulation during xylose consumption by *Paenibacillus polymyxa*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, March 2004, vol. 64 (1), 112-9
- Laboratory Manual for Bioengineering. Baifukan Co., Ltd, 1992, 310
- **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.*, August 1992, vol. 234 (2), 201-10
- **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.*, 01 June 1995, vol. 230 (2), 525-32
- **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, vol. 177 (20), 5930-6
- *Agric. Biol. Chem.*, 1985, vol. 49 (9), 2719-2724
- **KIRILL A. DATSENKO ; BARRY L. WANNER.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 06 June 2000, vol. 97 (12), 6640-6645
- **A. ADEN et al.** Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover. *NREL Technical Report*, 2002