

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Oktober 2007 (04.10.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/110394 A3

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12P 7/42 (2006.01) C12N 9/90 (2006.01)
C12P 7/52 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/052830

(22) Internationales Anmeldedatum:

23. März 2007 (23.03.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2006 014 167.9 24. März 2006 (24.03.2006) DE
10 2006 017 760.6 12. April 2006 (12.04.2006) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR UMWELT-
FORSCHUNG GMBH - UFZ [DE/DE]; Permoserstrasse
15, 04318 Leipzig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Roland, H.
[DE/DE]; Grassdorfer Str. 69a, 04425 Taucha (DE). RO-
HWERDER, Thore [DE/DE]; Zwischen den Gärten 9,
45472 Mülheim an der Ruhr (DE).

(74) Anwälte: ZIEBIG, Marlene, K. usw.; Wallstrasse 58/59,
10179 Berlin (DE).

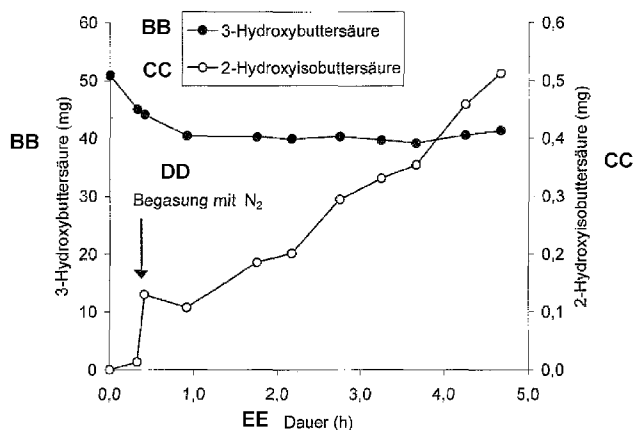
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE ENZYMATIC PRODUCTION OF 2-HYDROXY-2-METHYL CARBOXYLIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ENZYMATISCHEN HERSTELLUNG VON 2-HYDROXY-2-METHYLCARBONSÄU-
REN

AA
Bildung von 2-Hydroxyisobuttersäure aus 3-Hydroxybuttersäure durch intakte
Zellen von Stamm HCM-10 (Beispiel 1).



AA ... Production of 2-hydroxyisobutyric acid from 3-hydroxyisobutyric acid
by intact cells of strain HCM-10 (example 1)

BB ... 3-hydroxyisobutyric acid

CC ... 2-hydroxyisobutyric acid

DD ... gassing with N₂

EE ...duration (h)

(57) Abstract: The present invention relates to a method for the enzymatic production of 2-hydroxy-2-methyl carboxylic acids from 3-hydroxy carboxylic acids, where a 3-hydroxy carboxylic acid is produced in an aqueous reaction solution and/or is added to this reaction solution and is incubated. The aqueous reaction solution comprises a unit having 3-hydroxy-carboxylate-CoA mutase activity which has both 3-hydroxy-carbonyl-CoA ester-producing and 3-hydroxy-carbonyl-CoA ester-isomerizing activity and converts the 3-hydroxy carboxylic acid into the corresponding 2-hydroxy-2-methyl carboxylic acid which is isolated as acid or in the form of its salts. In a preferred embodiment, the unit having 3-hydroxy-carboxylate-CoA mutase activity is a unit which includes an isolated cobalamin-dependent mutase and where appropriate a 3-hydroxy-carbonyl-CoA ester-producing enzyme or enzyme system or a microorganism including them. The invention preferably relates to a biotechnological process for producing 2-hydroxy-2-methyl carboxylic acids, where microorganisms which have the desired activities are cultured

in an aqueous system with the aid of simple natural products and convert intracellularly formed 3-hydroxy-carbonyl-CoA esters into the corresponding 2-hydroxy-2-methyl carboxylic acids. The invention likewise encompasses the production of unsaturated 2-methyl carboxylic acids, where the 2-hydroxy-2-methyl carboxylic acids obtained are converted by dehydration into the corresponding unsaturated 2-methyl carboxylic acids (methacrylic acid and higher homologues).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2007/110394 A3



FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

Recherchenberichts:

6. März 2008

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von 2-Hydroxy-2-methylcarbonsäuren aus 3-Hydroxycarbonsäuren, wobei eine 3-Hydroxycarbonsäure in einer wässrigen Reaktionslösung produziert und/oder zu dieser Reaktionslösung gegeben und inkubiert wird. Die wässrige Reaktionslösung enthält eine 3-Hydroxycarbonsäure-CoA-Mutase-Aktivität aufweisende Einheit, welche sowohl 3-Hydroxycarbonyl-CoA-Ester produzierende als auch 3-Hydroxycarbonyl-CoA-Ester isomerisierende Aktivität besitzt und die Umwandlung der 3-Hydroxycarbonsäure in die entsprechende 2-Hydroxy-2-methylcarbonsäure bewirkt, welche als Säure oder in Form ihrer Salze gewonnen wird. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die 3-Hydroxycarbonsäure-CoA-Mutase-Aktivität aufweisende Einheit eine Einheit, die eine isolierte cobalaminabhängige Mutase umfasst und ggf. ein 3-Hydroxycarbonyl-CoA-Ester produzierendes Enzym oder Enzymsystem oder ein sie umfassender Mikroorganismus. Vorzugsweise betrifft die Erfindung einen biotechnologischen Prozess zur Produktion von 2-Hydroxy-2-methylcarbonsäuren, wobei Mikroorganismen, die die gewünschten Aktivitäten besitzen, in einem wässrigen System mit Hilfe einfacher Naturstoffe kultiviert werden und intrazellulär entstehende 3-Hydroxycarbonyl-CoA-Ester zu den entsprechenden 2-Hydroxy-2-methylcarbonsäuren umwandeln. Die Erfindung umfasst ebenfalls die Produktion von ungesättigten 2-Methylcarbonsäuren, wobei die gewonnenen 2-Hydroxy-2-methylcarbonsäuren durch Dehydratisierung in die korrespondierenden ungesättigten 2-Methylcarbonsäuren (Methacrylsäure und höhere Homologe) umgewandelt werden.