

- 1 -

Enzymatisches Verfahren zur Herstellung von AldehydenGebiet der Erfindung

5 Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Herstellung von Aldehyden sowie deren Oxidations- und Reduktionsprodukten.

Stand der Technik

.0 Enzymatische Verfahren zur Herstellung von Aldehyden sind vielfach in der Literatur beschrieben.

So beschreibt zum Beispiel WO2009001304 ein Verfahren zur Herstellung von Aldehyden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren unter Mitwirkung von 13-Hydroperoxid-Lyasen.

.5 Biochemische Routen zur Gewinnung von 3-Methylbutanal werden in Smit et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009, 81, 987-999, beschrieben.

Die Herstellung von Aldehyden aus Alkoholen mithilfe von Methanol-Oxidasen und Katalasen aus *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, oder *Torulopsis* ist in US5783429 dargelegt.

20 Unter Anwendung von Xylol- oder Alkanmonooxygenasen lassen sich gemäß WO2001031047 aromatische Aldehyd-Derivate gewinnen.

3-Hydroxypropionaldehyd (3HPA) lässt sich zu Acrylsäure, einem wichtigen Monomer zur industriellen Herstellung von Polymeren
25 und Kunststoffen, sowie zu ebenso bedeutsamen Acrylsäureestern umsetzen. Weitere bedeutende Produkte, die aus 3-Hydroxypropionaldehyd ableitbar sind, sind 1,3 Propandiol (durch Reduktion), 3-Hydroxypropionsäure (durch Oxidation) und Acrolein (durch Dehydratisierung). Da bisher keine kommerziellen
30 Quellen für 3-Hydroxypropionaldehyd zur Verfügung stehen, wird die Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd, insbesondere in Form des Reuterins, aus Glycerin intensiv untersucht.

- 2 -

So beschreiben bereits Ende der Achtziger Jahre Talarico und Dobrogosz, Antimicrob. Agents Chemother., 1989, 33, 674-679, die fermentative Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd aus Glycerin mit *Lactobacillus reuteri*.

5

Ein analoges Verfahren unter Einsatz von O₂-Limitierung wird in der US5413960 beschrieben.

DK180099 offenbart ein Verfahren mit kontinuierlicher Zufuhr von Glycerin und Einsatz von *Lactobacillus reuteri* DSM12246.

.0

Doleyres et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2005 Sep ;68 (4):467-74, beschreiben ein Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd in *L. reuteri* ATCC 53608 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und zeigen, dass wiederholter Einsatz des Biokatalysators aufgrund stark fallender Aktivität nicht möglich ist.

.5

CN1778935 beschreibt die Ein-Schritt-Fermentation einer Glycerinlösung mit *Klebsiella pneumoniae* DSM2026 in Anwesenheit von Semicarbazid.

20

US4962027 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd in einer aeroben Zwei-Schritt-Fermentation von *Klebsiella pneumoniae* NRRL B-4011, wobei im ersten Schritt zunächst Zellmasse und Glycerin-Dehydratase generiert wird und im zweiten Schritt in Anwesenheit von Semicarbazid Glycerin zu 3-Hydroxypropionaldehyd umgesetzt wird.

25

EP1669457 beschreibt die biotechnologische Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd mit (u.a.) *K. pneumoniae* unter Zugabe

30

- 3 -

von Coenzym B₁₂ in nahezu quantitativer Ausbeute durch Erhöhung des Zell/Substrat-Verhältnisses.

Allen beschriebenen Verfahren ist gemein, dass die Ausbeuten und Umsatzraten niedrig sind. Außerdem ist in den beschriebenen Verfahren immer ein hoher Aufwand zur Bereitstellung des Biokatalysators von Nöten, der dann nur eine kurze Standzeit aufweist, das heißt, der anschließend nur kurzzeitig eingesetzt werden kann.

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein Verfahren bereitzustellen, welches die beschriebenen Nachteile des Stands der Technik überwindet.

Beschreibung der Erfindung

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die im Folgenden beschriebenen Verfahren die der Erfindung gestellte Aufgabe zu lösen vermögen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung von Aldehyden umfassend die Verfahrensschritte A) in Kontakt Bringen bevorzugt einer wässrigen Lösung eines vicinalen Diols mit einer Hydro-Lyase, B) Trennung des in Verfahrensschritt A) gebildeten Aldehyds und der Hydro-Lyase, C) mindestens eine Wiederholung der Verfahrensschritte A) und B) mit der Hydro-Lyase erhalten aus Verfahrensschritt B) und gegebenenfalls D) Isolierung des gebildeten Aldehyds, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren in Gegenwart einer mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildenden Verbindung durchgeführt wird.

- 4 -

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Oxidations- und Reduktionsprodukten des Aldehyds, erhalten durch das vorgenannte Verfahren.

- 5 Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die fast quantitative Ausbeute an Aldehyd bezogen auf den eingesetzten Alkohol, die lange Standzeit der als Biokatalysator eingesetzten Hydro-Lyase und deren Wiederverwendbarkeit. Hierdurch wird eine kontinuierliche Verfahrensweise ermöglicht.
- .0 Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es, dass keine Notwendigkeit zur Unterdrückung von Nebenaktivitäten der als Biokatalysator eingesetzten Hydro-Lyase, wie beispielsweise weitere Reduzierung des Aldehyds zu Alkohol, auf das gebildete Aldehyd besteht.
- .5 Noch ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, dass das erfindungsgemäße Verfahren die Möglichkeit bietet, zum Großteil unter Ausschluss beziehungsweise Reduzierung von Sauerstoff zu arbeiten, wodurch Korrosion und unerwünschte Oxidation beispielsweise des Produktes vermindert werden kann, ein
- 20 einfacher apparativer Aufbau ermöglicht wird und Energie eingespart werden kann sowie andere bekannte Probleme der Begasung eines biotechnologischen Reaktors wie beispielsweise Schaumbildung verhindert werden.
- 25 Unter dem Begriff „Aldehyd“ werden im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ebenfalls Hydrate und Dimere des Aldehyds sowie Mischungen dieser Verbindungen verstanden, sowie beispielsweise Reuterin im Fall des 3-Hydroxypropionaldehyds. Alle angegebenen Prozent (%) sind, wenn nicht anders angegeben,
- 30 Massenprozent.

- 5 -

Als Hydro-Lyasen können in dem erfindungsgemäßen Verfahren Enzyme eingesetzt werden, die in der EC-Klasse 4.2.1.X gelistet sind.

Hier sind insbesondere solche Hydro-Lyasen für das
5 erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft, die unabhängig von Coenzym B₁₂ aktiv sind, das heißt, die auch ohne Anwesenheit von Coenzym B₁₂ oder Ersatzstoffen / Analoga für diese Substanz wie beispielsweise Corrinoide, Cobalamine, eine Hydro-Lyase-Aktivität aufweisen. Beispielhafte Vertreter solcher Hydro-
.0 Lyasen sind der WO200814864 zu entnehmen.

Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt eingesetzten Hydro-Lyasen sind Glycerin-Dehydratasen bzw. Diol-Dehydratasen sowie Propandiol-Dehydratasen (EC 4.2.1.30, EC 4.2.1.28).

In diesem Zusammenhang werden insbesondere die Glycerin-
.5 Dehydratasen isolierbar aus Mikroorganismen ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Caloramator*, *Salmonella* und *Listeria*, besonders bevorzugt die Glycerin-Dehydratase

ausgewählt aus der Gruppe der Spezies *Klebsiella pneumoniae*,
20 *Citrobacter pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Lactobacillus leichmannii*, *Citrobacter intermedium*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Enterobacter agglomerans*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium kluyveri*, *Caloramator viterbensis*, *Lactobacillus*
25 *collinoides*, *Lactobacillus hilgardii*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

Die eingesetzte Glycerin-Dehydratase wird vorzugsweise von den Genen kodiert ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *pduC*,
30 *pduD*, *pduE*, *pddA*, *pddB*, *pddC*, *dhaB*, *dhaC*, *dhaE* und den *gldABC*-Genen aus *Lactobacillus reuteri* ATCC55730. Vorteilhaft ist weiterhin der Einsatz der in WO-A-2004/056963 beschriebenen

- 6 -

Glycerin-Dehydratase-Variante SHGDH22, welche die in WO2004056963 offenbarte SEQ.-ID-Nr. 322 aufweist. Die Nukleotidsequenz dieser und weiterer geeigneter Gene für eine Glycerin-Dehydratase können beispielsweise der „Kyoto

5 Encyclopedia of Genes and Genomes“ (KEGG-Datenbank), den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA) oder der Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories entnommen werden.

10 Im Zusammenhang mit der Diol-Dehydratase kann es vorteilhaft sein, in dem Verfahren insbesondere die Diol-Dehydratase isolierbar aus Mikroorganismen ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen *Klebsiella*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Flavobacterium*,
15 *Acetobacterium*, *Brucella* und *Fusobacterium*, besonders bevorzugt isolierbar aus Mikroorganismen ausgewählt aus der Gruppe der Spezies *Klebsiella pneumoniae*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Clostridium glycolicum*, *Lactobacillus brevis*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Lactobacillus buchneri*,
20 *Brucella melitensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* einzusetzen.

Im Zusammenhang mit der Propandiol-Dehydratase kann es vorteilhaft sein, in dem Verfahren insbesondere die Propandiol -
25 Dehydratase isolierbar aus Mikroorganismen ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* und *Salmonella*, besonders bevorzugt isolierbar aus Mikroorganismen ausgewählt aus der Gruppe der Spezies *Citrobacter freundii*, *Clostridium glycolicum*,
30 *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus collinoides*, *Propionibacterium freudenreichii* und *Salmonella typhimurium*.

- 7 -

Im Fall, dass die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Hydro-Lyase ein Vitamin B₁₂ abhängiges Enzym ist, kann es vorteilhaft sein, Verfahrensschritt A) in Anwesenheit eines Glycerol-Dehydratase-Reaktivase-Aktivität bzw. Diol-Dehydratase-Reaktivase-Aktivität aufweisendes Enzyms bzw. Enzymkomplexes durchzuführen, da die Hydro-Lyase eventuell durch Bindung des Vitamins inaktiviert werden kann. Solch eine Reaktivase ist beispielsweise in Mori et al., J. Biol. Chem. 272:32034 (1997) beschreiben. Bevorzugt werden Reaktivasen eingesetzt, die sich aus dem Organismus isolieren lassen, aus denen sich die korrespondierende Hydro-Lyase isolieren lässt. Geeignete Diol-Dehydratase-Reaktivasen sind bekannt aus *Klebsiella oxytoca* (GenBank Nos: AAC15871, AF017781; GenBank Nos: AAC15872, AF017781) *Salmonella typhimurium* (GenBank Nos: AAB84105, AF026270; GenBank Nos: AAD39008, AF026270) und *Lactobacillus collinoides* (GenBank Nos: CAD01092, AJ297723; GenBank Nos: CAD01093, AJ297723), geeignete Glycerol-Dehydratase-Reaktivase aus *Klebsiella pneumoniae* (vgl. WO2008137403).

Die erfindungsgemäß in dem Verfahren eingesetzten Hydro-Lyasen können in alle dem Fachmann bekannten Formen der Zugänglichkeit eingesetzt werden. So können die eingesetzten Hydro-Lyasen als isolierte Enzyme, beispielsweise aus einem rekombinanten Expressionssystem isoliert, oder als Bestandteil von Enzymkomplexen eingesetzt werden. Bevorzugt eingesetzt werden die Hydro-Lyasen in Form eines Ganzzellreaktors, das heißt, die Hydro-Lyasen liegen in einer biologischen Zelle, bevorzugt in der Zelle, die die Hydro-Lyase expremiert, vor.

Die Hydro-Lyase aufweisenden Zellen können die Hydro-Lyase bereits als Wildtyp exprimieren oder der Art gentechnisch

- 8 -

verändert worden sein, dass sie eine Aktivität der Hydro-Lyase erst durch die gentechnische Veränderung aufweisen.

Als Wildtyp Hydro-Lyase enthaltende Zellen können in dem erfindungsgemäßen Verfahren die Zellen eingesetzt werden, die
5 oben beschrieben sind als Mikroorganismen, aus denen die Hydro-Lyasen isolierbar sind.

Gentechnisch veränderte Zellen, die geeignete Hydro-Lyase enthalten und in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, sind beispielsweise in der WO2008148640

.0 beschrieben, auf dessen Offenbarung hier explizit Bezug genommen wird.

Weiterhin kann es von Vorteil sein, die Neigung der Zellen zur reduktiven Bildung von Nebenprodukten aus den Aldehyden, insbesondere die Neigung zur Reduktion der entstehenden Aldehyde
.5 zu den korrespondierenden Alkoholen, durch entsprechende gentechnische Modifizierung der Zellen zu vermindern.

Beispielsweise können im Falle, dass der mit erfindungsgemäßem Verfahren herzustellende Aldehyd 3-Hydroxypropionaldehyd ist, Zellen mit einer im Vergleich zu ihrem Wildtyp verminderten

20 Aktivität eines Enzyms E_1 , welches in der Lage ist,

3-Hydroxypropionaldehyd zu 1,3-Propandiol zu reduzieren, eingesetzt werden. Enzym E_1 (1,3-Propandiol-Dehydrogenase, 3-Hydroxypropionaldehyd-Reduktase, 1,3-Propandiol: NAD^+ -

Oxidoreduktase oder Propan-1,3-Diol: NAD^+ -1-Oxidoreduktase;

25 EC 1.1.1.202) katalysiert die Reaktion 3-Hydroxypropionaldehyd + $NAD(P)H \rightarrow 1,3\text{-Propandiol} + NAD(P)^+$. Solche Enzyme sind z.B. die Proteine mit den GenBank-Eintragsnummern AP007281.1, EDX43365.1, BAG24545.1, ABQ82306.1, ABO43839.1, EEI08979.1, EEI66346.1, EEI73647.1, EEJ92522.1, EEI09194.1, EEI73500.1, ABQ83973.1 oder
30 BAG26138.1.

- 9 -

Aus diesen Angaben lassen sich für die jeweilige Hydrolyase enthaltende Zelle, die in erfindungsgemäßem Verfahren eingesetzt wird, entsprechende Oxidoreduktase identifizieren und dessen Aktivität im Vergleich zu ihrem Wildtyp vermindern.

- 5 Unter der verwendeten Formulierung „verminderte Aktivität eines Enzyms“ wird vorzugsweise eine um einen Faktor von mindestens 0,5, besonders bevorzugt von mindestens 0,1, darüber hinaus bevorzugt von mindestens 0,01, darüber hinaus noch mehr
.0 bevorzugt von mindestens 0,001 und am meisten bevorzugt von mindestens 0,0001 verminderte Aktivität verstanden. Die Verminderung der Aktivität eines bestimmten Enzyms kann beispielsweise durch gezielte oder ungerichtete Mutation, durch Zugabe von kompetitiven oder nicht kompetitiven Inhibitoren oder durch andere, dem Fachmann bekannte Maßnahmen zur Verminderung
.5 der Synthese eines bestimmten Enzyms erfolgen.
- Zur Verminderung der Aktivität eines Enzyms E_1 durch gezielte Mutation kommen beispielsweise gerichtete *knockouts* in Frage, bei denen beispielsweise Promotor aktive Sequenzen des Zielgens, aktive (zur katalytischen Funktion des Enzyms notwendige)
20 Bereiche des Zielgens oder das gesamte Zielgen deletiert, mit Fremd-DNA substituiert oder mit Fremd-DNA unterbrochen werden. Des Weiteren sind dem Fachmann verschiedene Techniken des gene-silencing bekannt, die über antisense-Nukleinsäuren oder small-interfering RNA (siRNA) spezifisch die Transkription bzw. die
25 Translation einzelner Gene vermindern oder gar ganz verhindern. Diese Unterdrückung kann je nach gewähltem System transient erfolgen, induzierbar sein oder konstitutiv vorliegen.
- Ebenso sind dem Fachmann Methoden bekannt, mit denen man gezielt einzelne Punktmutationen im Zielgen setzen kann. Weiterhin sind
30 dem Fachmann Methoden, mit dem man ungerichtet Mutationen im Zielgen setzen kann, um im Anschluss Zellen zu selektionieren, die eine verminderte Aktivität eines Enzyms E_1 aufweisen. So

- 10 -

können solche Mutationen z.B. durch die natürliche Fehlerrate bei der Replikation des genetischen Materials oder durch Exposition der Zellen gegenüber physikalischen oder chemischen Noxen, wie etwa UV-Licht, N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin, 5 Ethylmethansulfonat, Nitrose Säure, Hydroxyamin oder 4-Nitroquinolin-1-Oxid, ausgelöst werden.

Die erfindungsgemäß in dem Verfahren eingesetzten Hydro-Lyase enthaltenden Zellen können lebende oder tote Zellen sein, wobei 10 lebende Zellen bevorzugt sind.

Es kann vorteilhaft sein, dass die als Hydro-Lyasen eingesetzten, lebenden, Hydro-Lyase enthaltenden Zellen während des Verfahrens in geeignetem Medium gehalten werden, das sie mit den zum Wachstum benötigten Substanzen versorgt. Es hat sich 15 allerdings herausgestellt, dass es hinsichtlich der Versorgung mit Sauerstoff vorteilhaft sein kann, diese zu limitieren. Daher ist es bevorzugt, dass die als Hydro-Lyasen eingesetzten, lebenden, Hydro-Lyase enthaltenden Zellen in Verfahrensschritt A) unter mikroanaeroben oder anaeroben Bedingungen eingesetzt 20 werden. Mikroanaerobe oder anaerobe Bedingungen sind bevorzugt dadurch gekennzeichnet, dass das die als Hydro-Lyasen eingesetzten, lebenden, Hydro-Lyase enthaltenden Zellen umgebende Medium einen Gehalt an gelöstem Sauerstoff von kleiner 1 mg/L, bevorzugt von kleiner 0,5 mg/L, insbesondere von kleiner 25 0,1 mg/L bezogen auf das Gesamtmedium aufweist. Diese Bedingungen können beispielsweise dadurch erreicht werden, dass das die Zellen umgebende Medium nicht zusätzlich durch Luft oder Sauerstoff begast, d.h. durchströmt, wird und gegebenenfalls zusätzlich das den Reaktionsansatz umgebende Behältnis 30 weitestgehend luftdicht abgeschlossen wird.

- 11 -

Um die in Verfahrensschritt B) vorzunehmende Trennung von Aldehyd und Hydro-Lyase vereinfacht durchführen zu können, ist es bevorzugt, dass die Hydro-Lyase auf einem Träger immobilisiert ist. Im Fall, dass die Hydro-Lyase als freies, isoliertes Enzym eingesetzt wird, stehen dem Fachmann viele Methoden der Enzymimmobilisierung zur Verfügung, wie beispielsweise die Kopplung an epoxid-aktivierte Trägermaterialien und in der Literatur beschriebene Verfahren wie zum Beispiel: Mateo et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization, Biochem Soc Trans. 2007 Dec;35(Pt 6):1593-601 und Balcão et al., Bioreactors with immobilized lipases: state of the art, Enzyme Microb Technol. 1996 May 1;18(6):392-416.

Im Fall, dass als Hydro-Lyasen Hydro-Lyase-Aktivität aufweisende Zellen eingesetzt werden, können zur Immobilisierung der Zellen dem Fachmann bekannte Verfahren angewendet werden, wie beispielsweise Calciumalginat-Methoden. Insbesondere die in der DE102007031689 beschriebene, auf Siloxanen basierende Methode sowie die Immobilisierung der Zellen mit dem kommerziell erhältliche Lentikat-Liquid ist in diesem Zusammenhang besonders geeignet.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren können in Verfahrensschritt A) substituierte und unsubstituierte vicinale Diole eingesetzt werden; bevorzugt sind die Substituenten ausgewählt aus der Gruppe umfassend Carboxyl-, Amino-, Ester-, Isocyanat und Hydroxyl-Gruppen, wobei OH besonders bevorzugt ist.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden bevorzugt vicinalen Diole mit einer Kohlenstoff-Kettenlänge von 2 bis 20,

insbesondere von 2 bis 12 und ganz besonders von 2 bis 6 Kohlenstoffatomen eingesetzt. Zu den bevorzugten, in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten vicinalen Diolen zählen

- 12 -

insbesondere Zucker und Zuckeralkohole mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise Sorbitol; besonders bevorzugt sind in diesem Zusammenhang 1,2-Propandiol, Ethylenglycol und Glycerin.

5 Insbesondere wird Glycerin in dem erfindungsgemäßen Verfahren als vicinales Diol eingesetzt, so dass der erhaltene Aldehyd 3-Hydroxypropionaldehyd ist. Neben Glycerin wird insbesondere auch 1,2-Propandiol eingesetzt, wobei Propanal als Aldehyd erhalten wird. Dieser Aldehyd kann durch eine sich bereitwillig
.0 anschließende Disproportionierung zu n-Propanol und Propionsäure umgewandelt werden.

Das vicinale Diol wird in Verfahrensschritt A) in einem Konzentrationsbereich von 0,01 Gew.-% bis 50 Gew.-%, bevorzugt von 0,2 Gew.-% bis 20 Gew.-%, bezogen auf die gesamte
.5 Reaktionsmischung eingesetzt.

In Verfahrensschritt B) werden der in Verfahrensschritt A) gebildete Aldehyd und die Hydro-Lyase getrennt.

Die Trennung der insbesondere auf einem Träger immobilisierten
20 Hydro-Lyase erfolgt dabei mittels dem Fachmann bekannter Abtrennverfahren, wie beispielsweise Zentrifugation. Denkbar ist in dem Fall, dass in Verfahrensschritt A) als Hydro-Lyase Hydro-Lyase enthaltende Zellen eingesetzt wurden, eine Trennung der Zellen von dem Aldehyd beispielsweise mittels eines geeigneten
25 Filters, etwa mittels eines Filters mit einer Ausschlussgröße in einem Bereich von 20 bis 200 kDa. Denkbar ist auch der Einsatz einer Zentrifuge, einer geeigneten Sedimentationsvorrichtung oder einer Kombination dieser Vorrichtungen, wobei es besonders bevorzugt ist, zumindest einen Teil der Zellen zunächst durch
30 Sedimentation abzutrennen und anschließend den von den Zellen teilweise befreiten Aldehyd einer Ultrafiltration oder Zentrifugationsvorrichtung zuzuführen.

- 13 -

Die auf diese Weise abgetrennten Zellen werden, wenn sie in mehreren nacheinander durchgeführten Trennstufen erhalten wurden, gegebenenfalls vereinigt und können direkt dem Verfahrensschritt A) wieder zugeführt werden. Es kann sich jedoch als vorteilhaft erweisen, die Hydro-Lyase enthaltenden Zellen vor der erneuten Durchführung des Verfahrensschrittes A) noch zu waschen, wobei dieses Waschen vorzugsweise bereits mit demjenigen Medium erfolgt, welches im Verfahrensschritt A) eingesetzt wird.

Besonders bevorzugt erfolgt das Waschen mit dem in Verfahrensschritt A) eingesetzten Medium unter zusätzlicher Zugabe von Glucose; hierdurch kann vorteilhafter Weise während der eigentlichen Biotransformation die Bildung von aus dem Aldehyd abgeleiteten Nebenprodukten unterdrückt werden.

Zum Waschen der Zellen können diese beispielsweise in einem geeigneten Volumen des im Verfahrensschritt A) eingesetzten Mediums resuspendiert und anschließend durch die vorstehend beschriebenen Abtrennverfahren, insbesondere durch Filtration, Sedimentation oder Zentrifugation, oder aber durch eine Kombination dieser Maßnahmen, von dem Medium befreit werden. Analoge Waschvorgänge sind ebenfalls für auf einem Träger immobilisierte Hydro-Lyasen einsetzbar.

Ebenso kann die in Verfahrensschritt B) vorzunehmende Trennung von Aldehyd und Hydro-Lyase dadurch erleichtert werden, dass die mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildenden Verbindung auf einem Träger immobilisiert ist. Beispielsweise kommen hier mit Hydrogensulfit beladene Ionenaustauscherharze wie Amberlite® CG400 oder Amberlite® IRA400 (Rohm and Haas) in Frage.

Es ist erfindungswesentlich, dass Verfahrensschritt A) und B) mit der abgetrennten Hydro-Lyase mindestens einmal wiederholt

- 14 -

wird, um den Biokatalysator erneut mit frischem vicinalen Diol zur Herstellung des Aldehyds zu nutzen.

In einer bevorzugten, alternativen Ausführungsform des
5 erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Verfahrensschritte A), B) und C) kontinuierlich durchgeführt.

Dies ist auf verschiedenen Wegen realisierbar:

Die Hydro-Lyase liegt immobilisiert als stationäre Phase vor,
und ein das vicinale Polyol und die mit dem Aldehyd eine Bindung
.0 ausbildende Verbindung enthaltende Medium umströmt die immobilisierte Hydro-Lyase und wird gemäß Verfahrensschritt A) mit dieser in Kontakt gebracht. Der entstandene Aldehyd wird als mobile Phase von der stationären Phase abgetrennt, was der Trennung von Aldehyd und Hydro-Lyase in Verfahrensschritt B)
.5 entspricht. Das kontinuierlich auf die Hydro-Lyase frisch aufgegebene vicinale Diol entspricht einer Wiederholung der Verfahrensschritte A) und B) mit der Hydro-Lyase erhalten aus Verfahrensschritt B).

Alternativ kann die mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildende
?0 Verbindung immobilisiert als stationäre Phase vorliegen. Das vicinale Polyol und die Hydro-Lyase sind in einem Medium enthalten und somit gemäß Verfahrensschritt A) in Kontakt gebracht und umströmen die immobilisierte, mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildende Verbindung, wobei der gebildete Aldehyd an
?5 der stationären Phase verbleibt. Die Hydro-Lyase verlässt die stationäre Phase, was der Trennung von Aldehyd und Hydro-Lyase in Verfahrensschritt B) entspricht, und wird beispielsweise in Form eines Schlaufenreaktors erneut zusammen mit frischem vicinalen Polyol auf die stationäre Phase aufgegeben.

30 Eine weitere Ausgestaltung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, welches kontinuierlich betrieben wird, ist der Art gestaltet, dass sowohl die mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildende

- 15 -

Verbindung als auch die Hydro-Lyase immobilisiert als stationäre Phasen vorliegen. Ein das vicinale Polyol enthaltende Medium umströmt die stationäre Phase und wird somit mit der Hydro-Lyase gemäß Verfahrensschritt A) in Kontakt gebracht. Der gebildete Aldehyd wird von der mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildende Verbindung an die stationäre Phase gebunden und ist somit von der Hydro-Lyase gemäß Verfahrensschritt B) getrennt worden. Das kontinuierlich auf die stationäre Phasen frisch aufgegebene vicinale Diol entspricht einer Wiederholung der Verfahrensschritte A) und B) mit der Hydro-Lyase erhalten aus Verfahrensschritt B).

Um die gestellte Aufgabe zu lösen, muss während des erfindungsgemäßen Verfahrens eine mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildenden Verbindung gegenwärtig sein.

Die mit dem Aldehyd ausgebildete Bindung kann jegliche bekannte Form der chemischen Bindung darstellen, wie beispielsweise kovalente oder ionische Bindungen, aber auch die sogenannten schwachen Bindungen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufene Bindungen. Bevorzugt bildet die mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildende Verbindung eine kovalente Bindung mit dem Aldehyd aus.

Die mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildende Verbindung kann polyfunktionell sein, d.h., dass pro Molekül der Verbindung mehr als eine Bindung zu dem Aldehyd ausgebildet werden kann.

Geeignete, mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildende Verbindungen sind beispielsweise Hydrazide, Amine, Hydrazine, Harnstoffverbindungen, Hydroxylamine, Alkohole, Mercaptane, Hydrogen-Sulfite, Sulfite, Metabisulfite und Pyrosulfite, wobei in dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt Semicarbazid [CAS 57-56-7], Carbohydrazid [CAS 497-18-7] und Natriumsulfit [CAS 7757-83-7] eingesetzt werden.

- 16 -

Diese können frei in Lösung aber auch immobilisiert auf Trägern eingesetzt werden, bevorzugt sind in diesem Zusammenhang nicht immobilisierte, gelöste Verbindungen, da diese effektiver und schneller mit dem Aldehyd eine Bindung eingehen können und somit unerwünschte Nebenreaktionen verhindern können.

Im dem Fall, dass das erfindungsgemäße Verfahren mit Zellen durchgeführt wird, ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenn die mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildenden Verbindung in das die Zelle umgebende Medium gegeben wird.

Auch Mischungen der mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildenden Verbindungen können eingesetzt werden.

Es ist bevorzugt, wenn in dem erfindungsgemäßen Verfahren das vicinale Diol und die funktionelle Gruppe der mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildenden Verbindung in einem molaren Verhältnis von mindestens 1:1, bevorzugt von mindestens 1:1,2, insbesondere von mindestens 1:1,5 eingesetzt werden.

Im Verfahrensschritt D) des erfindungsgemäßen Verfahrens können die gebildeten Aldehyde isoliert werden, wobei zur Isolierung alle dem Fachmann bekannten Methoden zur Isolierung von niedermolekularen Substanzen aus komplexen Zusammensetzungen in Betracht kommen. Beispielhaft seien an dieser Stelle die Fällung mittels geeigneter Lösungsmittel, die Extraktion mittels geeigneter Lösungsmittel, die Komplexierung, beispielsweise mittels Cyclodextrinen oder Cyclodextrin-Derivaten, die Kristallisation, die Aufreinigung bzw. Isolierung mittels chromatographischer Methoden oder die Überführung der Aldehyde in leicht abtrennbare Derivate genannt.

Teil der Isolierung in Verfahrensschritt D) kann auch sein, die mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildende Verbindung wieder vom Aldehyd zu trennen.

- 17 -

Dies lässt sich durch dem Fachmann an sich bekannte Methoden in Abhängigkeit der vorliegenden Bindung erreichen. So können beispielsweise Bindungen zwischen Aldehyden und Semicarbazid oder Carbohydrazid durch Säure gespalten werden; Bindungen
5 zwischen dem Komplex aus Aldehyd und der mit dem Aldehyd eine Bindung eingehenden Verbindung sowie Amberlite® CG400 oder Amberlite® IRA400 können beispielsweise durch Erhöhen der Salzkonzentrationen, etwa von 1M NaCl oder einem System aus $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0,15 M/0,075 M) getrennt werden. Des Weiteren kann
.0 eine Bindung zwischen dem Aldehyd und der mit dem Aldehyd eine Bindung eingehenden Verbindung durch eine thermische Behandlung gelöst werden.

Einen weiteren Beitrag zur Lösung der eingangs genannten
.5 Aufgaben leistet auch ein Verfahren zur Herstellung von Oxidations- oder Reduktionsprodukten eines Aldehyds, umfassend die Verfahrensschritte:

I) Bereitstellung eines Aldehyds mittels des vorstehend
20 beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Aldehyden aus vicinalen Diolen,

II) chemische oder biokatalytische Umsetzung des Aldehyds durch Reduktion, Oxidation, Disproportionierung oder Dehydratisierung unter Erhalt von gegebenenfalls ungesättigten Reduktions- oder
25 Oxidationszwischenprodukten und gegebenenfalls

III) die weitere chemische oder biokatalytische Umsetzung der im Verfahrensschritt II) erhaltenen Reduktions- oder Oxidationszwischenprodukte durch Reduktion, Oxidation oder Addition.

30 Oxidations- oder Reduktionsprodukte des Aldehyds umfassen Verbindungen wie beispielsweise gegebenenfalls ungesättigten

- 18 -

Carbonsäuren, Carbonsäurederivate, Amine, Isocyanate, Acetale, Nitrile und Oxime.

Die Reduktions- oder Oxidationszwischenprodukte des
5 Verfahrensschrittes II) können daher bereits die gewünschten Reduktions- oder Oxidationsprodukte des Aldehyds darstellen.

Zunächst wird im Verfahrensschritt I) ein Aldehyd mittels des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von
.0 Aldehyden bereitgestellt, wobei dieses gegebenenfalls, wie vorstehend im Zusammenhang mit diesen Verfahren beschrieben, aufgereinigt worden sein kann.

Im Verfahrensschritt II) kann der Aldehyd dann chemisch oder biokatalytisch durch Reduktion, Oxidation, Disproportionierung
.5 oder Dehydratisierung unter Erhalt von Reduktions- oder Oxidationszwischenprodukten, insbesondere im Fall, dass der in Verfahrensschritt I) erhaltene Aldehyd 3-Hydroxypropionaldehyd ist, unter Erhalt von 1, 3-Propandiol (1,3-PDO) (Reduktion), Acrolein (Dehydratisierung) oder 3-Hydroxypropionsäure
20 (Oxidation) , umgesetzt werden. Dabei sind Einzelheiten zur Umsetzung von 3-Hydroxypropionaldehyd zu Acrolein unter anderem durch Hall und Stern in Journal of the Chemical Society, 1950, Seiten 490-498 beschrieben, während Einzelheiten zur Herstellung von 1, 3-Propandiol aus 3-Hydroxypropionaldehyd unter anderem
25 der US 5,334,778 entnommen werden können. Die Herstellung von 3-Hydroxypropionsäure aus 3-Hydroxypropionaldehyd wiederum ist unter anderem in US 6,852,517 beschrieben. Im Fall, dass der in Verfahrensschritt I) erhaltene Aldehyd Propanal aus 1,2-Propandiol darstellt, dann können 1-Propanol und Propionsäure
30 durch bereitwillige Disproportionierung des Propanals im Biotransformationsmedium entstehen (Sriramulu, D. D.; Liang, M.; Hernandez-Romero, D.; Raux-Deery, E.; Lunsdorf, H.; Parsons, J.

- 19 -

B.; Warren, M. J. & Prentice, M. B. *J. Bacteriol.*, 2008, 190, 4559-4567).

Gegebenenfalls können die im Verfahrensschritt II) erhaltenen
5 Reduktions- oder Oxidationszwischenprodukte in einem weiteren
Verfahrensschritt III) chemisch oder mikrobiologisch durch
Reduktion, Oxidation oder Addition noch weiter umgesetzt werden.
In Betracht kommt hier insbesondere die Umsetzung von im
Verfahrensschritt II) erhaltenem Acrolein durch Oxidation zur
.0 Acrylsäure, die dann gegebenenfalls in einem noch weiteren
Verfahrensschritt IV) radikalisch unter Bildung von auf
Acrylsäure basierenden Polymeren umgesetzt werden kann. In
Betracht kommt hier insbesondere die radikalische Polymerisation
von gegebenenfalls teilneutralisierter Acrylsäure in Gegenwart
.5 geeigneter Vernetzer unter Bildung wasserabsorbierender
Polyacrylate, die auch als „Superabsorber“ bezeichnet werden.
Die chemische Oxidation von Acrolein zu Acrylsäure und die
anschließende radikalische Polymerisation der so erhaltenen
Acrylsäure ist unter anderem in der WO-A-2006/136336
20 beschrieben.

Weiterhin kommt es ebenfalls in Betracht, dass die Umsetzung von
im Verfahrensschritt II) erhaltenem Acrolein durch oxidative
Veresterung zu Acrylsäureestern, die dann gegebenenfalls in
einem noch weiteren Verfahrensschritt IV) radikalisch unter
25 Bildung von auf Acrylsäureestern basierenden Polymeren umgesetzt
werden können.

Bevorzugte Reduktions- oder Oxidationsprodukte des Aldehyds
erhältlich aus dem erfindungsgemäßen Verfahren über oben
30 dargelegte Schritte stellen somit die Substanzen 1,3-Propandiol,
1-Propanol, Acrolein, 3-Hydroxypropionsäure, Propionsäure,
Acrylsäure, Acrylsäureester und Polymere basierend auf

- 20 -

Acrylsäure oder Acrylsäureestern dar, wobei der in
Verfahrensschritt I) erhaltene Aldehyd 3-Hydroxypropionaldehyd
ist.

5 In den nachfolgend aufgeführten Beispielen wird die vorliegende
Erfindung beispielhaft beschrieben, ohne dass die Erfindung,
deren Anwendungsbreite sich aus der gesamten Beschreibung und
den Ansprüchen ergibt, auf die in den Beispielen genannten
Ausführungsformen beschränkt sein soll.

10 Folgende Figuren sind Bestandteil der Beispiele:

Figur 1: Konzentrationsverlauf von Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO
bei Umsetzung von Glycerin mit immobilisierten *L. reuteri*-Zellen
im Verlauf eines Biotransformations-Zyklus.

15 Figur 2: Konzentrationsverlauf von Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO
bei Umsetzung von Glycerin mit immobilisierten *L. reuteri*-Zellen
im Verlauf von 7 Biotransformations-Zyklen und i. Ggw. von
Semicarbazid als Fängerstoff.

20 Figur 3: Akkumulierte Ausbeute von 3HPA bei Umsetzung von
Glycerin mit immobilisierten *L. reuteri*-Zellen im Verlauf von 7
Biotransformations-Zyklen und i. Ggw. von Semicarbazid als
Fängerstoff.

25 Figur 4: Konzentrationsverlauf von Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO
bei Umsetzung von Glycerin mit immobilisierten *L. reuteri*-Zellen
im Verlauf von 10 Biotransformations-Zyklen und i. Ggw. von
Carbohydrazid als Fängerstoff.

30 Figur 5: Akkumulierte Ausbeute von 3HPA bei Umsetzung von
Glycerin mit immobilisierten *L. reuteri*-Zellen im Verlauf von 10

- 21 -

Biotransformations-Zyklen und i. Ggw. von Carbohydrazid als Fängerstoff.

Figur 6: zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Glycerin und
5 1,2-Propandiol bei Biotransformation von Glycerin bzw. von 1,2-Propandiol mit *L.reuteri*-Zellen

Figur 7: Verlauf der Konzentrationen von 3HPA, Glycerin und 1,3-PDO bei sieben aufeinanderfolgenden Biotransformationen von
.0 Glycerol mit immobilisierten *L. reuteri*-Zellen ohne Zusatz von Sulfit (Vergleichsbeispiel)

Figur 8: Verlauf der Konzentrationen von 3HPA, Glycerin und 1,3-PDO bei sieben aufeinanderfolgenden Biotransformationen von
.5 Glycerol mit immobilisierten *L. reuteri*-Zellen mit Zusatz von Natriumhydrogensulfit (erfindungsgemäß).

Figur 9: zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von 3HPA, Glycerin und 1,3-PDO bei Biotransformation von Glycerin mit
20 Wildtyp *L.reuteri*-Zellen

Figur 10: zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von 3HPA, Glycerin und 1,3-PDO bei Biotransformation von Glycerin mit gentechnisch modifizierten *L. reuteri*-Zellen.

Beispiele:

Beispiel 1: Kultivierung von Lactobacillus reuteri

5

Die Kultivierung von *Lactobacillus reuteri* erfolgte in anaerobisiertem MRS Medium (Medium für *Lactobacillus* nach DeMan, Rogosa und Sharpe) mit 20 mM Glycerin-Zusatz (MRSG20) in verschlossen geeigneten Gebinden bei 80 rpm. Das Medium MRSG20
.0 (Zusammensetzung [Angaben pro Liter]: 10 g Proteose Pepton Nr. 3 (Roth), 8 g Rinderextrakt (Roth), 4 g Hefeextrakt (VWR), 1.5 mL Glycerin (Roth), 1 mL Tween80 (Roth), 40 mL Salzlösung [10 g/L Dikaliumhydrogenphosphat {Roth}, 250 g/L Natriumacetat-Trihydrat {Roth}, 100 g/L Diammoniumhydrogencitrat {Roth}, 10 g/L
.5 Magnesiumsulfat-Heptahydrat {Roth}, 2.5 g/L Mangansulfat-Tetrahydrat {Roth}] wurde nach Anaerobisieren und Autoklavieren (20 min bei 121 °C) mit 25 mL einer Glucose-Lösung (4 mol/L) versetzt.

Für die Vorkultur 1 (50 mL) wurde eine Kryo-Kultur verwendet.

20

Hierfür wurde *L. reuteri* SD2112 in MRS-Medium, welches zusätzlich 6 % (w/v) Magermilchpulver und 10 % (v/v) Glycerin enthält, bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung der stock culture wird eine Übernachtskultur (10 ml MRS-Medium) 1:1 mit der stock Lösung gemischt. Die Vorkultur diente als 1%iges Inokulum und
25 wurde bei 33°C inkubiert. Nach 15 Stunden wurde aus diesem Ansatz eine zweite Vorkultur (50 mL) 1%ig angeimpft und 9 Stunden bei 37°C inkubiert. Diese diente wiederum als 1%iges Inokulum für die Hauptkultur (2-mal 1L). Nach 15 Stunden bei 33°C wurden die Zellen geerntet.

30

Hierfür wurden 2 Liter abzentrifugiert (4000 g; 20°C; 10 min), der Überstand verworfen und beide resultierenden Pellets in 1 Liter 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer (KPP; K_2HPO_4 + KH_2PO_4 [Roth])

- 23 -

bei pH 7 resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Zell-Pellet in 0.1 M KPP bei pH 7 im Verhältnis 1 g zu 1 mL resuspendiert und unter N₂ gelagert. Diese Suspension wurde für die anschließende Immobilisierung genutzt.

Beispiel 2: Immobilisierung von Lactobacillus reuteri

Zur Immobilisierung wurden 20 mL der in Beispiel 1 beschriebenen Zellsuspension mit auf ~35°C temperierter Lentikat-Liquid® (GeniaLab) vermischt, die Lentikats mit dem LentiKat®-Printer (GeniaLab) hergestellt und auf eine Restfeuchte von 28% getrocknet. Nach der Rückquellung in LentiKat-Stabilizer® (GeniaLab) wurden die Immobilisate für mind. 2 Stunden in anoxischer Atmosphäre bei 300 rpm zur Stabilisierung der Lentikats in LentiKat-Stabilizer® gerührt. Die abgetrennten und zweimal mit 0.1 M KPP bei pH 7 gewaschenen Immobilisate wurden 3%ig für 15 Stunden bei 33°C stehend in MRSG20 in einer voll gefüllten 1-L-Flasche mit Möglichkeit zum Gasaustausch regeneriert. Nach Trennung der Immobilisate vom Medium (aerobe Bedingungen) wurden diese zweimal mit 0.1 M KPP (pH 7) gewaschen.

Beispiel 3: HPLC-basierte Quantifizierung von Glycerin und 1,3-Propandiol

Zur Quantifizierung von Glycerin und 1,3-Propandiol (1,3-PDO) wurde in je 1 ml Zellsuspension die Biomasse durch Zentrifugation (10 min, 16.100 g, 4°C) abgetrennt und 40 µl des Kulturüberstands unter Verwendung eines Shimadzu-HPLC-Systems

- 24 -

(Autosampler SIL-10AT, Pumpe LC-10AT, Degasser DGU-3A, Brechungsindex-Detektor RID-10A, UV-Detektor SPD-10A, Ofen CTO-10A, Controller SCA-10A-VP) mit einer Aminex HPX-87H 300 x 7.8 mm Trennsäule (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit 9 µm

Partikelgröße und unter Verwendung einer Vorsäule (HPX-87H, 30 x 4.6 mm) analysiert. Die zu analysierenden Substanzen wurden isokratisch mit einer mobilen Phase aus 5 mM Schwefelsäure mit einer Flussrate von 0,6 ml/min 20 min bei 40°C eluiert. Die Identifizierung erfolgte durch einen Vergleich mit der Verweilzeit von Referenzsubstanzen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Die Konzentration der Verbindungen in den Kulturüberständen wurde über einen Vergleich der Peakflächen mit einer zuvor mit externen Standards erstellten Kalibriergerade berechnet.

Beispiel 4: Umsetzung von Glycerin zu 3HPA mit immobilisierten Lactobacillus reuteri (Vergleichsbeispiel)

Die gemäß Beispiel 2 hergestellten, mit *L. reuteri* beladenen Immobilisate wurden 10%ig (20 g, entsprechend einer Konzentration von 2 g Trockenzellen pro Liter) in einer Biotransformation in einem Glasfermenter (Gesamtvolumen 500 mL) mit 200 mL Reaktionspuffer eingesetzt. Letzterer bestand aus anaerobisiertem und auf 35°C vortemperiertem 0.1 M KPP (pH 7). Nach der Einstellung eines konstanten pH-Wertes von 7 und einer konstanten Temperatur von 35 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 mL 98%igem Glycerin (Roth, entsprechend einer Konzentration von 500 mM in der Reaktionsmischung) gestartet.

Die Beprobung erfolgte für eine Stunde alle 10 Minuten und nachfolgend für 2 Stunden alle 30 Minuten. Die Konzentrationen

- 25 -

von Glycerin und der Nebenprodukte wurden mittels HPLC gemäß Beispiel 3 bestimmt.

Eine Quantifizierung von 3-Hydroxypropionaldehyd erfolgte mittels eines colorimetrischen Tests gemäß Doleyres *et al.*

5 („Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 68, 2005, Seiten 467-474).

Nach einer Reaktionszeit von ~100 Minuten konnte sowohl im Falle der freien wie auch im Falle der immobilisierten Zellen kein

.0 Umsatz von Glycerin mehr beobachtet werden.

Konzentrationsverläufe für Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO sind in Figur 1 wiedergegeben; während der Biotransformation wurden 1.29 g 3HPA erzeugt. Das Reaktionsmedium wurde von den Zellen bzw. Immobilisaten abgetrennt und separat bei 4°C gelagert.

.5 Die Umsetzung von Glycerin zu 3HPA und den Nebenprodukten erfolgte gemäß der vorstehend beschriebenen Analytik zu ~25%. Bei Wiederverwendung der Zellen bzw. Immobilisate konnte kein Umsatz von Glycerin zu 3HPA festgestellt werden.

20

Beispiel 5: Umsetzung von Glycerin zu 3HPA mit immobilisierten Lactobacillus reuteri und in Gegenwart von Semicarbazid, erfindungsgemäß

25 Die gemäß Beispiel 2 hergestellten, mit *L. reuteri* beladenen Immobilisate wurden 10%ig (20 g, entsprechend einer Konzentration von 2 g Trockenzellen pro Liter) in einer Biotransformation in einem Glasfermenter (Gesamtvolumen 500 mL) mit 200 mL Reaktionspuffer eingesetzt. Dieser besteht aus 0.1 M
30 KPP (pH 7) sowie 500 mM Semicarbazid und wurde anaerobisiert sowie auf 35°C Reaktionstemperatur vortemperiert. Nach Einstellung eines konstanten pH-Wertes von 7 und einer

- 26 -

konstanten Temperatur von 35 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 mL 98%igem Glycerin (Roth; entsprechend einer Konzentration von 500 mM in der Reaktionsmischung) gestartet. Die Entnahme und Analyse von Proben aus der Reaktionsmischung erfolgte wie in Beispiel 4 beschrieben.

Nach einer Reaktionszeit von 150 Minuten wurde das Reaktionsmedium von den Immobilisaten abgetrennt und neues anaerobisiertes, vortemperiertes Reaktionsmedium (0,1 M KPP pH 7 mit 500 mM Semicarbazid) zugegeben. Wie zuvor beschrieben wurde ein weiterer Biotransformationszyklus durchgeführt. Insgesamt wurden 7 aufeinanderfolgende Zyklen ohne zwischenzeitliche Lagerung der Immobilisate durchgeführt. Konzentrationsverläufe für Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO sind in Figur 2 wiedergegeben; Figur 3 zeigt die akkumulierten Ausbeuten an 3HPA.

Die Umsetzung von Glycerin zu 3HPA erfolgte mit Semicarbazid als Fängerstoff gemäß der vorstehend beschriebenen Analytik in den ersten 5 Zyklen nur zu ~55%; in den weiteren 2 Zyklen verringerte sich die Ausbeute kontinuierlich.

Beispiel 6: Umsetzung von Glycerin zu 3HPA mit immobilisierten Lactobacillus reuteri in Gegenwart von Carbohydrazid, erfindungsgemäß

Die gemäß Beispiel 2 hergestellten, mit *L. reuteri* beladenen Immobilisate wurden 10%ig (20 g, entsprechend einer Konzentration von 2 g Trockenzellen pro Liter) in einer Biotransformation in einem Glasfermenter (Gesamtvolumen 500 mL) mit 200 mL Reaktionspuffer eingesetzt. Dieser besteht aus 0.1 M KPP (pH 7) sowie 520 mM Carbohydrazid und wurde anaerobisiert sowie auf 35°C Reaktionstemperatur vortemperiert. Nach Einstellung eines konstanten pH-Wertes von 7 und einer

- 27 -

konstanten Temperatur von 35 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 mL 98%igem Glycerin (Roth; entsprechend einer Konzentration von 500 mM in der Reaktionsmischung) gestartet. Die Entnahme und Analyse von Proben aus der Reaktionsmischung erfolgte wie in Beispiel 4 beschrieben.

Nach einer Reaktionszeit von 180 Minuten wurde das Reaktionsmedium von den Immobilisaten abgetrennt und neues anaerobisiertes, vortemperiertes Reaktionsmedium (0,1 M KPP pH 7 mit 520 mM Carbohydrazid) zugegeben. Wie zuvor beschrieben wurde ein weiterer Biotransformationszyklus durchgeführt. Insgesamt wurden 10 aufeinander folgende Zyklen ohne zwischenzeitliche Lagerung der Immobilisate durchgeführt; Konzentrationsverläufe für Glycerin, 3HPA und 1,3-PDO sind in Figur 4 wiedergegeben; Figur 5 zeigt die akkumulierten Ausbeuten an 3HPA.

Die Umsetzung von Glycerin zu 3HPA und Nebenprodukten erfolgte mit Carbohydrazid als Fängerstoff gemäß der vorstehend beschriebenen Analytik in allen 10 Zyklen zu ~95%.

Beispiel 7: Umsetzung von Glycerin zu 3HPA mit freien Lactobacillus reuteri in Gegenwart von schwefelhaltigen Verbindungen, erfindungsgemäß

Die gemäß Beispiel 1 hergestellten Zellen wurden in einer 1000 millimolaren Glycerinlösung suspendiert, so daß eine Gesamt-Zellkonzentration von 2.2×10^{10} CFU/ml resultiert. Nach Zugabe einer schwefelhaltigen Verbindung (Natriumsulfit, Natriumhydrogensulfit oder Natriumpyrosulfit; jeweils mit einer Endkonzentration von 100 mmol/L in der Reaktionslösung) wurde die Suspension für 120 min inkubiert, wobei die Mischung durch Einleiten eines kontinuierlichen Stickstoffstroms sauerstofffrei gehalten wurde. Die in Tabelle 1 aufgelisteten, nach Ablauf von

- 28 -

120 min resultierenden Konzentrationen von 3HPA und 1,3-PDO sowie die Zell-Viabilitäten verdeutlichen die Erhöhung der erzielbaren 3-HPA-Konzentration sowie die Reduktion der Abnahme der Zell-Viabilitäten durch Zugabe der schwefelhaltigen Verbindungen.

Tabelle 1

Schwefelhaltige Verbindung	c (3-HPA) [mmol/L]	c (1,3-PDO) [mmol/L]	Zell-Viabilität [CFU/mL]
ohne	504	32	$5.1 \cdot 10^4$
Na ₂ S ₂ O ₅	524	31	$> 6.0 \cdot 10^9$
NaHSO ₃	546	30	$3.2 \cdot 10^9$
Na ₂ SO ₃	607	31	$2.6 \cdot 10^9$

Beispiel 8: Umsetzung von 1,2-Propandiol bzw. Glycerin zu Propanal bzw. 3-Hydroxypropionaldehyd mit immobilisierten Lactobacillus reuteri in Gegenwart von Carbohydrazid, erfindungsgemäß

Die gemäß Beispiel 1 hergestellten Zellen wurden je in einer 500 millimolaren Glycerinlösung bzw. einer 500 millimolaren 1,2-Propandiollösung suspendiert, so daß eine Gesamt-Zellkonzentration von $2.2 \cdot 10^{10}$ CFU/ml resultiert. Nach Zugabe von Carbohydrazid mit einer Endkonzentration von 100 mmol/L in der Reaktionslösung wurde die Suspension für 120 min inkubiert, wobei die Mischung durch Einleiten eines kontinuierlichen Stickstoffstroms sauerstofffrei gehalten wurde. Die in Figur 6 dargestellten Konzentrationsverläufe von Glycerin und 1,2-Propandiol verdeutlichen die gleichwertige Transformation der beiden Substrate.

- 29 -

Beispiel 9: Umsetzung von Glycerin zu 3HPA mit immobilisierten Lactobacillus reuteri Zellen in Gegenwart von schwefelhaltigen Verbindungen und unter Zufügung von Glucose zur Waschlösung, erfindungsgemäß

Die gemäß Beispiel 2 hergestellten, mit *L. reuteri* beladenen Immobilisate wurden 20%ig (4 mL) in einer Biotransformation in einem Glasfermenter mit 20 mL Reaktionslösung eingesetzt. Diese enthält 80 mmol/L Glycerin und wurde nach Temperieren auf 30°C auf einen konstanten pH-Wert von 5 eingestellt (Vergleichs- und erfindungsgemäßes Beispiel). Im erfindungsgemäßen Ansatz wurde der Reaktionslösung zusätzlich Natriumhydrogensulfit (gemäß einer Endkonzentration von 50 mmol/L) zugesetzt. Nach Ablauf eines Biotransformationszyklus (30 min) werden die Immobilisate abfiltriert, für die Dauer von 30 min. in MRSG20 (s. Beispiel 1) regeneriert und erneut wie beschrieben in einer Reaktionslösung eingesetzt. Auf die beschriebene Weise werden insgesamt 7 Umsetzungen von Glycerin durchgeführt. Während ohne Zusatz von Hydrogensulfit in jedem Transformationsschritt 10 mmol/L 1,3-PDO gebildet werden (Figur 7), kann bei Zusatz von Natriumhydrogensulfit eine Reduzierung der 1,3-PDO-Konzentration beobachtet werden (Figur 8).

Beispiel 10: Umsetzung von Glycerin zu 3HPA mit freien, gentechnisch unmodifizierten bzw. modifizierten Lactobacillus reuteri, erfindungsgemäß

Die Wildtyp-Zellen bzw. die durch Deletion des Oxidoreduktase-Gens generierten Zellen wurden in einer 250 millimolaren

- 30 -

Glycerinlösung suspendiert, so daß jeweils eine Gesamt-Zellkonzentration von 1.2×10^{10} CFU/ml resultiert. Wie die Konzentrationsverläufe im Zuge einer 120-minütigen Biotransformation zeigen, wird bei Einsatz des *L. reuteri*-Wildtyps das nach 20 minütiger Biotransformation gebildete 3HPA zugunsten der Bildung von 1,3-PDO abgebaut (Figur 9), während die Umwandlung von 3HPA zu 1,3-PDO bei Verwendung der durch Deletion des Oxidoreduktase-Gens generierten Zellen verhindert wird (Figur 10).

.0

Beispiel 11: Herstellung von Acrolein aus einem 3HPA enthaltenden Fermentationsaustrag, erfindungsgemäß

.5 Aus den gemäß Beispiel 4 - 6 erhaltenen Fermentations-Austrägen konnte Acrolein durch saure Hydrolyse bei erhöhten Temperaturen gewonnen werden. Hierzu wurde ein Teil des Fermentationsaustrages im Verhältnis 1:100 mit Wasser verdünnt, mit 3 Teilen 37%iger Salzsäure vermischt und 0,5 h bei 37 °C
20 inkubiert. Das hierbei gebildete Acrolein bildete nach Zugabe einer DL-Tryptophan-Lösung (Fluka, 0.01 mol/L Tryptophan in 0.05 mol/L Salzsäure) und erneuter Inkubation bei 37 °C (0,5 h) ein farbiges Addukt, dass colorimetrisch durch seine Absorption bei 560 nm quantifiziert werden konnte.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Aldehyden umfassend die
Verfahrensschritte
5 A) in Kontakt Bringen eines vicinalen Diols mit einer
Hydro-Lyase,
B) Trennung des in Verfahrensschritt A) gebildeten
Aldehyds und der Hydro-Lyase,
C) mindestens eine Wiederholung der Verfahrensschritte A)
.0 und B) mit der Hydro-Lyase erhalten aus
Verfahrensschritt B) und gegebenenfalls
D) Isolierung des gebildeten Aldehyds,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Verfahren in Gegenwart einer mit dem Aldehyd eine
.5 Bindung ausbildenden Verbindung durchgeführt wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Hydro-Lyase in Verfahrensschritt A) eine Glycerin-
20 Dehydratase ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass die in Verfahrensschritt A) eingesetzte Hydro-Lyase auf
25 einem Träger immobilisiert ist.
4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass in Verfahrensschritt A) als Hydro-Lyase Hydro-Lyase-
30 Aktivität aufweisende Zellen eingesetzt werden.

- 32 -

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,
dass die Zellen eine gegenüber ihrem Wildtyp verminderte
Aktivität einer Oxidoreduktase aufweisen, welche den Aldehyd
zu reduzieren vermag.

5

6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass das vicinale Diol in Verfahrensschritt A) Glycerin oder
1,2-Propandiol ist.

.0

7. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass das vicinale Diol in Verfahrensschritt A) in einem
Konzentrationsbereich von 0,01 Gew.-% bis 50 Gew.-%,
bevorzugt von 0,2 Gew.-% bis 20 Gew.-%, bezogen auf die
gesamte Reaktionsmischung eingesetzt wird.

.5

8. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Verfahrensschritte A), B) und C) kontinuierlich
durchgeführt werden.

20

9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass als eine mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildenden
Verbindung Semicarbazid [CAS 57-56-7], Carbohydrazid [CAS
497-18-7] oder Natriumsulfit [CAS 7757-83-7] eingesetzt
werden.

25

30 10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,

- 33 -

dass in dem erfindungsgemäßen Verfahren das vicinale Diol und die funktionelle Gruppe der mit dem Aldehyd eine Bindung ausbildenden Verbindung in einem molaren Verhältnis von mindestens 1:1, bevorzugt von mindestens 1:1,2, insbesondere von mindestens 1:1,5 eingesetzt werden.

11. Verfahren zur Herstellung von Oxidations- oder Reduktionsprodukten eines Aldehydes, umfassend die Verfahrensschritte:

- I) Bereitstellung eines Aldehyds durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10,
- II) chemische oder biokatalytische Umsetzung des Aldehyds durch Reduktion, Oxidation, Disproportionierung oder Dehydratisierung unter Erhalt von gegebenenfalls ungesättigten Reduktions- oder Oxidationszwischenprodukten und gegebenenfalls
- III) die weitere chemische oder biokatalytische Umsetzung der im Verfahrensschritt II) erhaltenen Reduktions- oder Oxidationszwischenprodukte durch Reduktion, Oxidation oder Addition.