

(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
14. August 2014 (14.08.2014)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2014/122005 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 9/10 (2006.01) C12P 7/62 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/051074

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Januar 2014 (21.01.2014)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2013 202 106.2
8. Februar 2013 (08.02.2013) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **EVONIK INDUSTRIES AG** [DE/DE];
Rellinghauser Straße 1-11, 45128 Essen (DE).

(72) Erfinder; und

(71) Anmelder (nur für US): **HAAS, Thomas** [DE/DE];
Backenkamp 9, 48161 Münster (DE). **PÖTTER, Markus**
[DE/CN]; 658 Gaojing Road, House #85, Shanghai
201702 (CN). **DEMLER, Martin** [DE/DE]; Barkenberger
Allee 102, 46286 Dorsten (DE). **ECKL, Eva-Maria**
[DE/DE]; Uranusweg 22, 45770 Marl (DE).
PRZYBILLA, Simon [DE/DE]; Kerkheideweg 21, 48163
Münster (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: AUTOTROPHIC CULTIVATION

(54) Bezeichnung : AUTOTROPHE KULTIVIERUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method comprising the method steps: A) propagating cells that have been genetically modified in such a manner that they have a reduced polyhydroxyalkanoate synthesis compared to their wild type, in a medium under autotrophic conditions to form a cell density of X cells/litre; B) diluting at least one part of the cells to a cell density of 0.001 X to 0.5 X, preferably 0.01 X to 0.3 X, particularly preferably 0.05 X to 0.2 X in a medium; and C) propagating the at least one part of the cells under autotrophic conditions.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren umfassend die Verfahrensschritte A) Vermehren von Zellen, welche derart gentechnisch verändert wurden, dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp eine verminderte Polyhydroxyalkanoat-Synthese aufweisen, in einem Medium unter autotrophen Bedingungen bis zu einer Zelldichte X Zellen/Liter, B) Verdünnen mindestens eines Teils der Zellen auf eine Zelldichte von 0,001 X bis 0,5 X, bevorzugt 0,01 X bis 0,3 X, besonders bevorzugt 0,05 X bis 0,2 X in einem Medium und C) Vermehren des mindestens einen Teils der Zellen unter autotrophen Bedingungen.



WO 2014/122005 A1

Autotrophe Kultivierung

Gebiet der Erfindung

5 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren umfassend eine autotrophe Kultivierung von Zellen.

Stand der Technik

- 10 Bei der fermentativen Herstellung von Produkten ist man stets bemüht, die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten möglichst zu vermeiden oder auf ein Minimum zu reduzieren. In der Regel kann man so die Produktausbeute erhöhen und auch die Aufreinigung des Endproduktes erleichtern.
- 15 Zellen, die als Kohlenstoffquelle anorganischen Kohlenstoff verwenden, um organische Moleküle zu synthetisieren sind insbesondere in Form von Knallgasbakterien und acetogenen Organismen bekannt.
- Organismen, die Polyhydroxyalkanoat produzieren, benutzen als Vorstufe 3-Hydroxyalkanyl-CoA. Dieses Stoffwechselprodukt kann als hervorragende Ausgangssubstanz dienen, um
- 20 insbesondere auch durch künstlich eingefügte Stoffwechselwege zu weiteren, hochwertigen organischen Substanzen verstoffwechselt zu werden.
- Insbesondere das Knallgasbakterium *Cupriavidus necator* wurde in den letzten Jahren ausführlich charakterisiert und untersucht.
- In Vollbrecht et al., *Excretion of Metabolites by Hydrogen Bacteria I. Autotrophic and*
- 25 *Heterotrophic Fermentations*, European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6,145-155 (1978) wurde die Nebenproduktbildung verschiedener *Cupriavidus necator* Stämme analysiert.

Aufgabe der Erfindung war es, ein Verfahren bereitzustellen, welches die Nebenproduktbildung in Fermentationsverfahren reduziert und somit die Ausbeute an Monomereinheiten der in der

30 Biosynthese verminderten Polyhydroxyalkanoats erhöht.

Beschreibung der Erfindung

Überraschenderweise wurde gefunden, dass das im Folgenden beschriebene Verfahren die

35 gestellte Aufgabe zu lösen vermag.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren, bei dem bereits die Vorkultivierung, welche insbesondere der Generierung von Zellmasse dient, unter autotrophen Bedingungen durchgeführt wird, gefolgt von einer weiteren autotrophen Kultivierung, welche bevorzugt mindestens über einen Teilzeitbereich der Kultivierung hinweg der Produktbildung dient.

Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung liegt darin, dass unerwünschte Nebenprodukte, wie beispielweise Acetat, Lactat, Pyruvat, Succinat, Alanin, Valin, Butanol, Butyrat, Malat, Aceton, 2-Methyl-Propionsäure oder 3-Methyl-Butyrat, insbesondere Acetat, Pyruvat und Aceton, deutlich vermindert gebildet werden.

Somit erhöht die vorliegende Erfindung vorteilhaft die Raum-Zeit-Ausbeute.

Noch ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass das gewünschte Produkt leichter isoliert werden kann.

Noch ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, dass man komplett unabhängig von komplexen Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Zucker agieren kann.

Noch ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, dass Kohlendioxid gebunden wird, welches ansonsten als Klimagas problematisch sein könnte.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst die Verfahrensschritte

A) Vermehren von Zellen, welche derart gentechnisch verändert wurden, dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp eine verminderte Polyhydroxyalkanoat-Synthese aufweisen, in einem Medium unter autotrophen Bedingungen bis zu einer Zelldichte X Zellen/Liter,

B) Verdünnen mindestens eines Teils der Zellen auf eine Zelldichte von 0,001 X bis 0,5 X, bevorzugt 0,01 X bis 0,3 X, besonders bevorzugt 0,1 X bis 0,2 X in einem Medium und

C) Vermehren des mindestens einen Teils der Zellen unter autotrophen Bedingungen.

Unter dem Begriff „unter autotrophen Bedingungen“ im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind Kultivierungsbedingungen zu verstehen, bei denen die den Zellen verfügbare Kohlenstoffquelle zu mindestens 90 Gew.-%, bezogen auf Kohlenstoffatome, anorganischen Kohlenstoff enthält.

Unter einem „Wildtyp“ einer Zelle wird vorzugsweise eine Zelle bezeichnet, deren Genom in einem Zustand vorliegt, wie er natürlicherweise durch die Evolution entstanden ist. Der Begriff wird sowohl für die gesamte Zelle als auch für einzelne Gene verwendet. Unter den Begriff „Wildtyp“ fallen daher insbesondere nicht solche Zellen bzw. solche Gene, deren

Genesequenzen zumindest teilweise durch den Menschen mittels rekombinanter Verfahren verändert worden sind.

Unter dem Begriff „verglichen zum Wildtyp verminderte Polyhydroxyalkanoat-Synthese“ im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist zu verstehen, dass die betrachteten Zellen, wenn unter gleichen Bedingungen kultiviert wie der Wildtyp, weniger Polyhydroxyalkanoat pro Zellen bilden als der Wildtyp.

Angegebene Prozente (%) sind, wenn nicht anders angegeben, Massenprozente.

Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Zellen sind gentechnisch veränderte, daher rekombinante Zellen. Sie können Prokaryonten oder Eukaryonten sein. Dabei kann es sich um Säugetierzellen (wie etwa Zellen aus dem Menschen), um pflanzliche Zellen oder um Mikroorganismen wie Hefen, Pilze oder Bakterien handeln, wobei Mikroorganismen besonders bevorzugt und Bakterien und Hefen am meisten bevorzugt sind. Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass die eingesetzten Zellen aus acetogene Bakterien oder Knallgasbakterien ausgewählt sind.

Unter dem Begriff „Knallgasbakterium“ ist ein Bakterium zu verstehen, das in der Lage ist chemolithoautotroph zu wachsen und aus H_2 und CO_2 in Gegenwart von Sauerstoff Kohlenstoffgerüste mit mehr als einem C-Atom aufzubauen, wobei der Wasserstoff oxidiert und der Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor benutzt wird. Es können erfindungsgemäß sowohl solche Bakterien eingesetzt werden, die von Natur aus Knallgasbakterien darstellen, oder aber auch Bakterien, welche durch gentechnische Modifikation zu Knallgasbakterien wurden, wie beispielsweise eine *E. coli* Zelle, die durch rekombinantes Einfügen der notwendigen Enzyme in die Lage versetzt wurde, aus H_2 und CO_2 in Gegenwart von Sauerstoff Kohlenstoffgerüste mit mehr als einem C-Atom aufzubauen, wobei der Wasserstoff oxidiert und der Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor benutzt wird. Bevorzugt handelt es sich bei den im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Knallgasbakterien um solche, welche bereits als Wildtyp Knallgasbakterien darstellen.

Erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Knallgasbakterien sind ausgewählt aus den Gattungen *Achromobacter*, *Acidithiobacillus*, *Acidovorax*, *Alcaligenes*, *Anabena*, *Ancyclobacter*, *Aquifex*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Cupriavidus*, *Derxia*, *Helicobacter*, *Herbaspirillum*, *Hydrogenobacter*, *Hydrogenobaculum*, *Hydrogenophaga*, *Hydrogenophilus*, *Hydrogenothermus*, *Hydrogenovibrio*, *Ideonella* sp. O1, *Kyrpidia*, *Metallosphaera*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Oligotropha*, *Paracoccus*, *Pelomonas*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Pseudonocardia*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Seliberia*, *Streptomyces*, *Thiocapsa*, *Variovorax*, *Xanthobacter*, *Wautersia*, wobei *Cupriavidus* besonders bevorzugt ist,

- besonders aus den Spezies *Cupriavidus necator* (alias *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Hydrogenomonas eutropha*), *Achromobacter ruhlandii*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidovorax facilis*, *Alcaligenes hydrogenophilus*, *Alcaligenes latus*, *Anabena cylindrica*, *Anabena oscillaroides*, *Anabena* sp., *Anabena spiroides*, *Ancyclobacter vacuolatus*,
5 *Aquifex aeolicus*, *Aquifex pyrophilus*, *Arthrobacter strain 11X*, *Bacillus schlegelii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Derxia gummosa*, *Escherichia coli*, *Heliobacter pylori*, *Herbaspirillum autotrophicum*, *Hydrogenobacter hydrogenophilus*, *Hydrogenobacter thermophilus*, *Hydrogenobaculum acidophilum*, *Hydrogenophaga flava*, *Hydrogenophaga palleronii*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Hydrogenophaga taeniospirales*, *Hydrogeneophilus*
10 *thermoluteolus*, *Hydrogenothermus marinus*, *Hydrogenovibrio marinus*, *Ideonella* sp. O-1, *Kyrpidia tusciae*, *Metallosphaera sedula*, *Myobacterium gordonae*, *Nocardia autotrophica*, *Oligotropha carboxidivorans*, *Paracoccus denitrificans*, *Pelomonas saccharophila*, *Polaromonas hydrogenivorans*, *Pseudomonas hydrogenovora*, *Pseudomonas thermophila*, *Rhizobium japonicum*, *Rhodococcus opacus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Seliberia*
15 *carboxydohydrogena*, *Thiocapsa roseopersicina*, *Variovorax paradoxus*, *Xanthobacter autrophicus*, *Xanthobacter flavus*, wobei *Cupriavidus necator* besonders bevorzugt ist, insbesondere aus den Stämmen *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H1 oder *Cupriavidus necator* Z-1.
- Besonders bevorzugt wird der Stamm *Cupriavidus necator* H 16 PHB-4, DSM 541 eingesetzt.
- 20 Die erfindungsgemäß eingesetzten Zellen weisen aufgrund von mindestens einer gentechnischen Veränderung eine verglichen zu ihrem Wildtyp verminderte Polyhydroxyalkanoat-Synthese auf. In diesem Zusammenhang ist es insbesondere bevorzugt, dass die erfindungsgemäß eingesetzten Zellen keine nachweisbaren Mengen an Polyhydroxyalkanoat synthetisieren. Bevorzugt ist das Polyhydroxyalkanoat, dessen Synthese
25 vermindert ist, Polyhydroxybutyrat.
- Die verglichen zum Wildtyp verminderte Polyhydroxyalkanoat-Synthese lässt sich bevorzugt durch eine gentechnische Veränderung erreichen, so dass die verglichen zum Wildtyp der Zelle verminderte Aktivität mindestens eines Enzyms, welches die Umsetzung von 3-Hydroxyalkanyl-Coenzym A zu Polyhydroxyalkanoat, bevorzugt von 3-Hydroxybutyryl-Coenzym A zu
30 Polyhydroxybutyrat katalysiert.
- Unter der verwendeten Formulierung „verminderte Aktivität eines Enzyms“ wird dementsprechend 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 bevorzugt von mindestens 0,001 und am meisten bevorzugt von mindestens 0,0001
35 verminderte Aktivität verstanden. Die Formulierung „verminderte Aktivität“ beinhaltet auch keine detektierbare Aktivität („Aktivität von null“). Die Verminderung der Aktivität eines bestimmten

Enzyms kann beispielsweise durch gezielte Mutation oder durch andere, dem Fachmann bekannte Maßnahmen zur Verminderung der Aktivität eines bestimmten Enzyms erfolgen. Verfahren zur Verminderung von enzymatischen Aktivitäten in Mikroorganismen sind dem Fachmann bekannt, diese umfassen Insertion von Fremd-DNA in das Gen kodierend für das Zielenzym, Deletion mindestens von Teilen des Gens kodierend für das Zielenzym, Punktmutationen in der Gensequenz kodierend für das Zielenzym, RNA-Interferenz (siRNA), *antisense*-RNA oder Modifikation (Insertion, Deletion oder Punktmutationen) von regulatorischen Sequenzen, wie etwa Promotoren und Terminatoren oder von Ribosomenbindestellen, welche das Gen kodierend für das Zielenzym flankieren. Unter Fremd-DNA ist in diesem Zusammenhang jegliche DNA-Sequenz zu verstehen, die dem Gen (und nicht dem Organismus) „fremd“ ist, d.h. auch endogene DNA-Sequenzen können in diesem Zusammenhang als „Fremd-DNA“ fungieren.

Bei dem Enzym, welches die Umsetzung von 3-Hydroxyalkanyl-Coenzym A zu Polyhydroxyalkanoat handelt es sich vorzugsweise um eine Polyhydroxyalkanoat Synthase, besonders bevorzugt um eine Polyhydroxybutyrat Synthase. Dieses Enzym wird insbesondere vorzugsweise von den Genen *phbC* oder *phaC* kodiert, wobei *phaC* besonders bevorzugt ist.

Das Verfahren wird in Verfahrensschritt A) unter autotrophen Bedingungen, somit unter Bedingungen bei denen die den Zellen verfügbare Kohlenstoffquelle zu mindestens 90 Gew.-%, bevorzugt 95 Gew.-%, insbesondere bevorzugt 99 Gew.-% bezogen auf Kohlenstoffatome, anorganischen Kohlenstoff enthält. Der anorganische Kohlenstoff, der in dem erfindungsgemäßen Verfahrensschritt A) eingesetzt wird, wird insbesondere in der Form von Substanzen zugeführt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend, bevorzugt bestehend aus Carbonaten, Kohlendioxid und Kohlenmonoxid, wobei Kohlendioxid besonders bevorzugt ist. Es können in Verfahrensschritt A) auch Mischungen der Kohlenstoffquellen eingesetzt werden.

Im Fall, dass in dem erfindungsgemäßen Verfahren Knallgasbakterien eingesetzt werden, ist es bevorzugt, das Verfahren in Gegenwart von Wasserstoff durchzuführen. Insbesondere wird in Verfahrensschritt A) und C) das Medium, in dem die Zellen enthalten sind mit einem Gas

enthaltend

H₂, CO₂ und O₂,

bevorzugt in einem Gewichtsverhältnis von 20 bis 95 zu 2 bis 45 zu 1 bis 35, insbesondere von 70 bis 95 zu 4 bis 15 zu 1 bis 10,

in Kontakt gebracht.

In Verfahrensschritt A) werden die Zellen bevorzugt um mindestens das 10-fache, besonders bevorzugt um mindestens das 100-fache, insbesondere um mindestens das 1000-fache bezogen auf die Zellanzahl pro Volumen der Gesamtkultur vermehrt.

- 5 Die Zelldichte X in Verfahrensschritt A beträgt bevorzugt mindestens 1×10^5 , besonders bevorzugt mindestens 1×10^7 , insbesondere mindestens 1×10^8 Zellen/ml Gesamtkultur.

In Verfahrensschritt B) des erfindungsgemäßen Verfahrens findet eine Verdünnung der Zellen mit Medium statt. Das eingesetzte Medium kann das gleiche sein, wie in Verfahrensschritt 1
10 verwendet, es kann aber auch ein davon verschiedenes sein.

In Verfahrensschritt C) des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Zellen unter autotrophen Bedingungen, somit unter Bedingungen bei denen die den Zellen verfügbare Kohlenstoffquelle zu mindestens 90 Gew.-%, bevorzugt 95 Gew.-%, insbesondere bevorzugt 99 Gew.-% bezogen
15 auf Kohlenstoffatome, anorganischen Kohlenstoff enthält, vermehrt. Der anorganische Kohlenstoff, der in dem erfindungsgemäßen Verfahrensschritt C) eingesetzt wird, wird insbesondere in der Form von Substanzen zugeführt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend, bevorzugt bestehend aus Carbonaten, Kohlendioxid und Kohlenmonoxid, wobei Kohlendioxid besonders bevorzugt ist. Es können in Verfahrensschritt C) auch Mischungen der
20 Kohlenstoffquellen eingesetzt werden.

Verfahrensschritt C) wird vorteilhaft und somit bevorzugt mindestens über einen Teilzeitbereich hinweg zur Produktproduktion genutzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in
25 Verfahrensschritt C) durch die Zellen Zielprodukte synthetisiert, dessen Bildung über das Zwischenprodukt 3-Hydroxyalkanyl-CoA, insbesondere 3-Hydroxybutyryl-Coenzym A, erfolgt. Der Begriff „Zwischenprodukt“ definiert in diesem Zusammenhang eine chemische Verbindung, die durch den Einsatz mindestens eines Enzymes auf enzymatischem Weg zu dem gewünschten Produkt umgesetzt werden kann, wobei als „chemische Verbindung“ solche mit
30 oder ohne Coenzym A-Thioester-Funktionalisierung als gleichwertig betrachtet werden sollen und somit die Thioester bildenden bzw. -spaltenden Enzyme nicht mitgezählt werden.

Es kann vorteilhaft sein, wenn die Zellen entsprechend des gewünschten Zielproduktes durch genetische Modifikation derart verändert wurden, dass das Zielprodukt verstärkt durch die
35 Zellen gebildet wird.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist ein bevorzugtes Zielprodukt 2-Hydroxyisobuttersäure. Für dieses Zielprodukt ist es bevorzugt, wenn die im erfindungsgemäße Verfahren eingesetzte Zelle eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp erhöhte Aktivität des Enzyms E₁ aufweist, welches die Umsetzung von 3-Hydroxybutyryl-Coenzym A zu 2-Hydroxyisobutyryl-Coenzym A katalysiert. Bei dem Enzym E₁ handelt es sich vorzugsweise um eine Hydroxyl-Isobutyryl-CoA Mutase, um eine Isobutyryl-CoA Mutase (EC 5.4.99.13) oder um eine Methylmalonyl-CoA Mutase (EC 5.4.99.2), jeweils bevorzugt um eine Coenzym B12-abhängige Mutase.

Bei dem Enzym E₁ handelt es sich bevorzugt um solche Enzyme, die sich aus den Mikroorganismen *Aquicola tertiarycarbonis* L108, DSM18028, DSM18512, *Methylibium petroleiphilum* PM1, *Methylibium* sp. R8, *Xanthobacter autotrophicus* Py2, *Rhodobacter sphaeroides* (ATCC 17029), *Nocardioides* sp. JS614, *Marinobacter algicola* DG893, *Sinorhizobium medicae* WSM419, *Roseovarius* sp. 217, *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 isolieren lassen, besonders bevorzugt um die in PCT/EP2007/052830 beschriebenen Coenzym B12-abhängigen Mutase, sowie Enzyme, die in mindestens einer ihrer Teilsequenz eine Sequenzidentität zu der Aminosäuresequenz der kleinen bzw. großen Untereinheit der in PCT/EP2007/052830 beschriebenen Mutase (accession number DQ436457.1 und DQ436456.1) von mindestens 60%, vorzugsweise von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 95%, ganz besonders bevorzugt mindestens 99% auf Aminosäureebene aufweisen, bestimmt nach dem blastp Algorithmus mit einem expect threshold von 10, einer word size von 3, einer blosum62 Matrix mit gap costs von existence: 11 und extension: 1 und einem conditional compositional score matrix adjustment.

Der Begriff „gesteigerte Aktivität eines Enzyms“, wie er vorstehend im Zusammenhang mit dem Enzym E₁ und in den nachfolgenden Ausführungen im Zusammenhang mit den Enzymen E₂ usw. verwendet wird, ist vorzugsweise als gesteigerte intrazelluläre Aktivität zu verstehen. Die nun folgenden Ausführungen zur Erhöhung der Enzymaktivität in Zellen gelten sowohl für die Erhöhung der Aktivität des Enzyms E₁ als auch für alle nachfolgend genannten Enzyme, deren Aktivität gegebenenfalls erhöht werden kann.

Grundsätzlich lässt sich eine Steigerung der enzymatischen Aktivität dadurch erzielen, dass man die Kopienzahl der Gensequenz bzw. der Gensequenzen erhöht, welche für das Enzym kodieren, einen starken Promotor verwendet, die Kodonnutzung des Gens verändert, auf verschiedene Art und Weise die Halbwertszeit der mRNA oder des Enzyms erhöht, die Regulation der Expression des Gens modifiziert oder ein Gen oder Allel nutzt, das für ein entsprechendes Enzym mit einer gesteigerten Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert. Insbesondere wird somit das für das Enzym E_x kodierende Gen

überexprimiert, was zu einer gesteigerten Aktivität durch Überexpression führt.

Erfindungsgemäß gentechnisch veränderte Zellen werden beispielsweise durch Transformation, Transduktion, Konjugation oder eine Kombination dieser Methoden mit einem Vektor erzeugt, der das gewünschte Gen, ein Allel dieses Gens oder Teile davon und einen die Expression des Gens ermöglichenden Promotor enthält. Die heterologe Expression wird insbesondere durch Integration des Gens oder der Allele in das Chromosom der Zelle oder einem extrachromosomal replizierenden Vektor erzielt.

Einen Überblick über die Möglichkeiten zur Erhöhung der Enzym-Aktivität in Zellen am Beispiel der Pyruvat-Carboxylase gibt DE-A-100 31 999, die hiermit als Referenz eingeführt wird und deren Offenbarungsgehalt hinsichtlich der Möglichkeiten zur Erhöhung der Enzym-Aktivität in Zellen einen Teil der Offenbarung der vorliegenden Erfindung bildet.

Die Expression der vorstehend und aller nachfolgend genannten Enzyme bzw. Gene ist mit Hilfe von 1- und 2-dimensionaler Proteingelauftrennung und anschließender optischer Identifizierung der Proteinkonzentration mit entsprechender Auswertesoftware im Gel

nachweisbar. Wenn die Erhöhung einer Enzymaktivität ausschließlich auf einer Erhöhung der Expression des entsprechenden Gens basiert, so kann die Quantifizierung der Erhöhung der Enzymaktivität in einfacher Weise durch einen Vergleich der 1- oder 2-dimensionalen Proteinauftrennungen zwischen Wildtyp und gentechnisch veränderter Zelle bestimmt werden.

Eine gebräuchliche Methode zur Präparation der Proteingele bei coryneformen Bakterien und zur Identifizierung der Proteine ist die von Hermann et al. (Electrophoresis, 22: 1712.23 (2001)) beschriebene Vorgehensweise. Die Proteinkonzentration kann ebenfalls durch Western-Blot-Hybridisierung mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989) und anschließender optische Auswertung mit entsprechender Software zur Konzentrationsbestimmung (Lohaus und Meyer (1989) Biospektrum, 5: 32-39; Lottspeich (1999), Angewandte Chemie 111: 2630-2647) analysiert werden. Die Aktivität von DNA-bindenden Proteinen kann mittels DNA-Band-Shift-Assays (auch als Gelretardation bezeichnet) gemessen werden (Wilson et al. (2001) Journal of Bacteriology, 183: 2151-2155).

Die Wirkung von DNA-bindenden Proteinen auf die Expression anderer Gene kann durch verschiedene gut beschriebene Methoden des Reporter-Gen-Assays nachgewiesen werden (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989). Die intrazellulären enzymatischen Aktivitäten können nach verschiedenen beschriebenen Methoden (Donahue et al. (2000) Journal of Bacteriology 182 (19): 5624-5627; Ray et al. (2000) Journal of Bacteriology 182 (8): 2277-2284; Freedberg et al. (1973) Journal of Bacteriology 115 (3): 816-823) bestimmt werden.

Sofern in den nachfolgenden Ausführungen keine konkreten Methoden zur Bestimmung der

Aktivität eines bestimmten Enzyms angegeben werden, erfolgt die Bestimmung der Steigerung der Enzymaktivität und auch die Bestimmung der Verminderung einer Enzymaktivität vorzugsweise mittels der in Hermann et al., Electrophoresis, 22: 1712-23 (2001), Lohaus et al., Biospektrum 5 32-39 (1998), Lottspeich, Angewandte Chemie 111: 2630-2647 (1999) und
5 Wilson et al., Journal of Bacteriology 183: 2151-2155 (2001) beschriebenen Methoden.

Wird die Erhöhung der Enzymaktivität durch Mutation des endogenen Gens bewerkstelligt, so können derartige Mutationen entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie etwa durch UV-Bestrahlung oder durch mutationsauslösende Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder

10 Nukleotidaustausch(e). Durch diese Mutationen werden veränderte Zellen erhalten. Besonders bevorzugte Mutanten von Enzymen sind insbesondere auch solche Enzyme, die nicht mehr oder zumindest im Vergleich zum Wildtyp-Enzym vermindert feedback-inhibierbar sind.

Wird die Erhöhung der Enzymaktivität durch Erhöhung der Synthese eines Enzyms bewerkstelligt, so erhöht man beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder

15 mutiert die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression zu jedem beliebigen Zeitpunkt zu steigern. Des Weiteren können dem Enzym-Gen als regulatorische Sequenzen aber auch sogenannte "Enhancer"

20 zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Genexpression bewirken. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte liegen dabei entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vor

25 oder sind im Chromosom integriert und amplifiziert. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)),

Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-
30 98 (1991)), in EP-A-0 472 869, im US 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in WO-A-96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993), in JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) und in bekannten Lehrbüchern der

35 Genetik und Molekularbiologie. Die vorstehend beschriebenen Maßnahmen führen ebenso wie die Mutationen zu gentechnisch veränderten Zellen.

Zur Erhöhung der Expression der jeweiligen Gene werden zum Beispiel episomale Plasmide eingesetzt. Als Plasmide bzw. Vektoren kommen im Prinzip alle dem Fachmann für diesen Zweck zur Verfügung stehenden Ausführungsformen in Frage. Derartige Plasmide und Vektoren können z. B. den Broschüren der Firmen Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech oder Gibco BRL entnommen werden. Weitere bevorzugte Plasmide und Vektoren können gefunden werden in: Glover, D. M. (1985), DNA cloning: a practical approach, Vol. I-III, IRL Press Ltd. , Oxford; Rodriguez, R.L. und Denhardt, D. T (eds) (1988) , Vectors : a survey of molecular cloning vectors and their uses, 179-204, Butterworth, Stoneham; Goeddel, D. V. (1990), Systems for heterologous gene expression, Methods Enzymol. 185, 3-7; Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al., Applied and Environmental Microbiology 60: 756-759 (1994) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al., Applied Microbiology and Biotechnology 29: 356-362 (1988), Dunican und Shivan, Bio/Technology 7: 1067-1070 (1989) und Tauch et al., FEMS Microbiology Letters 123: 343-347 (1994) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines „cross-over“-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Unter der vorstehend und in den nachfolgenden Ausführungen verwendeten Formulierung „eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp gesteigerte Aktivität eines Enzyms E_x “ ist vorzugsweise stets eine um einen Faktor von mindestens 2, besonders bevorzugt von mindestens 10, darüber hinaus bevorzugt von mindestens 100, darüber hinaus noch mehr bevorzugt von mindestens 1.000 und am meisten bevorzugt von mindestens 10.000 gesteigerte Aktivität des jeweiligen Enzyms E_x zu verstehen. Weiterhin umfasst die erfindungsgemäße Zelle, welche „eine gegenüber ihrem Wildtyp gesteigerte Aktivität eines Enzyms E_x “ aufweist, insbesondere auch eine Zelle, deren Wildtyp keine oder zumindest keine nachweisbare Aktivität dieses Enzyms E_x aufweist und die erst nach Erhöhung der Enzymaktivität, beispielsweise durch Überexpression, eine nachweisbare Aktivität dieses Enzyms E_x zeigt. In diesem Zusammenhang umfasst der Begriff „Überexpression“ oder die in den nachfolgenden Ausführungen verwendete Formulierung „Erhöhung der Expression“ auch den Fall, dass eine Ausgangszelle, beispielsweise eine Wildtyp-Zelle, keine oder zumindest keine nachweisbare Expression aufweist und erst durch rekombinante Verfahren eine nachweisbare Synthese des Enzyms E_x induziert wird.

Es kann weiterhin vorteilhaft sein, wenn die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Zellen eine verglichen zu ihrem Wildtyp gesteigerte Aktivität eines Enzyms E_2 , welches die

Umsetzung von Acetoacetyl-Coenzym A zu 3-Hydroxybutyryl-Coenzym A katalysiert, aufweisen.

Bei dem Enzym E₂ handelt es sich vorzugsweise um ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe enthaltend:

- 5 eine 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (EC 1.1.1.35),
- eine Acetoacetyl-Coenzym A Reduktase (EC 1.1.1.36),
- eine Long-Chain-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase ((EC 1.1.1.211) und
- eine 3-Hydroxybutyryl-Coenzym A-Dehydrogenase (EC 1.1.1.157).

- Dieses Enzym wird vorzugsweise von den Genen kodiert ausgewählt aus der Gruppe
- 10 bestehend aus phaB, phbB, fabG, phbN1, phbB2 oder, wobei phaB, phbB besonders bevorzugt sind. Die Nukleotidsequenz dieser Gene können beispielsweise der „Kyoto 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
 - 15 (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) entnommen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist bevorzugt einen Verfahrensschritt D) Aufreinigung des Zielproduktes auf.

- 20 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.

25

Beispiele:

Vergleich heterotrophe/autotrophe Kultivierung versus autotrophe/autotrophe Kultivierung von Cupriavidus necator H 16 PHB-4 DSM 541

30

Es wurden zwei *Cupriavidus necator* H 16 PHB-4 DSM 541 eingesetzt:

Cupriavidus necator H 16 PHB-4 DSM 541 und

Cupriavidus necator H16 PHB-4 pBBR1MCS-2::icmA-icmB(lac) (im Folgenden RITA genannt).

- Der RITA Stamm ist mit einem Expressionvektor für icmA und icmB aus *Aquicola tertiarycarbonis*
- 35 transformiert. Eine detaillierte Generierung des Stammes ist in Beispiel 2 der WO2009156214 beschrieben.

In dem Verfahren wurde das Medium nach Vollbrecht eingesetzt, bestehend aus 2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 2,1 g/l KH_2PO_4 , 0,2 g/l MgSO_4 , 0,01 g/l CaCl_2 , 6 mg/l FeCl_3 , 0,05 mg/l Titriplex III, 0,02 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1 $\mu\text{g/l}$ $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,3 $\mu\text{g/l}$ $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 3 $\mu\text{g/l}$ H_3BO_3 , 2 $\mu\text{g/l}$ $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 $\mu\text{g/l}$ $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,2 $\mu\text{g/l}$ $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ und 0,3 $\mu\text{g/l}$ $\text{Na}_2\text{MO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$.

Bei plasmidtragenden Stämmen wurde 1 ml Kanamycin der Konzentration 300 $\mu\text{g/ml}$ in Verfahrensschritt A) und in Verfahrensschritt C) zusätzlich 120 $\mu\text{g/l}$ Coenzym B12 zugegeben. Der pH wurde mit NaOH (aq) auf 6,8 eingestellt. Zu der heterotrophen Vorkultur wurden 10 g/l Fructose zugegeben.

10

Heterotrophe Vorkultur (Verfahrensschritt A) aber heterotroph, nicht erfindungsgemäß):

Die Vorkultur erfolgte in 500 ml Schüttelkolben mit je 50 ml Medium, pro Stamm im Doppelansatz. Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 150 rpm für 28,5 Stunden.

15 Die Kulturen wurden für 10 min bei 4500 x g zentrifugiert.

Die Pellets wurden in 2 ml Medium resuspendiert und der autotrophen Hauptkultur (siehe dort) zugeführt.

Autotrophe Vorkultur (Verfahrensschritt A):

20 Die Vorkultur erfolgte in 250 ml druckfest beschichteten Schottflaschen mit je 50 ml Medium. Der Flaschenverschluss besaß eine Begasungsfritte, einen Abluftfilter und ein Probenahmerohr.

Die Flaschen wurden vor dem Animpfen 3fach mit N_2 und 3fach mit Knallgas gespült. Der Versuch fand bei 0,8 bar Überdruck, 28 °C und 150 rpm statt. Die Begasung erfolgte mit Knallgas der Zusammensetzung 4 % O_2 , 6 % CO_2 und 90 % H_2 . Die Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Die Kultivierungsdauer betrug 143 Stunden.

25

Die Kulturen wurden für 10 min bei 4500 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in 2 ml Medium resuspendiert und der autotrophen Hauptkultur (siehe dort) zugeführt.

Autotrophe Hauptkultur (Verfahrensschritt C):

30 Die Hauptkultur erfolgte in druckfest beschichteten 250 ml Schottflaschen mit 50 ml Medium. Der Flaschenverschluss besaß eine Begasungsfritte, einen Abluftfilter und ein Probenahmerohr.

Die Flaschen wurden vor dem Animpfen 3fach mit N_2 und 3fach mit Knallgas gespült. Der Versuch fand bei 0,8 bar Überdruck, 28 °C und 150 rpm statt, je Stamm im Doppelansatz. Es wird auf eine StartOD von 0,5 angeimpft. Die Begasung erfolgte mit Knallgas der Zusammensetzung 4% O_2 , 6%

35

CO_2 und 90% H_2 . Die Probenentnahme erfolgte nach 25 Stunden. Hierzu wurden die Kulturen 10 min bei 4500 x g abzentrifugiert und der Überstand wurde mittels NMR analysiert.

Messwerte:

Experiment	3HB [mg/L]	2HIB [mg/L]	Acetat [mg/L]	Aceton [mg/L]
DSM 541 heterotroph/autotroph	0	0	10	0
DSM 541 autotroph/autotroph	29	0	4	1
RITA heterotroph/autotroph	0	5	14	0
RITA autotroph/autotroph	0	18	0	0

- Diese Experimente zeigen, dass durch das erfindungsgemäße Verfahren die Ausbeute an 3-Hydroxybutyrat (3HB) bzw. der davon direkt abgeleiteten Substanz 2-Hydroxyisobuttersäure (2-HIB) zunimmt. Die akkumuliert reduzierte Nebenproduktsbildung geht also zu Gunsten der Zunahme von 3HB und 2-HIB.
- 5

Ansprüche

1. Verfahren umfassend die Verfahrensschritte
 - A) Vermehren von Zellen, welche derart gentechnisch verändert wurden, dass sie
5 verglichen zu ihrem Wildtyp eine verminderte Polyhydroxyalkanoat-Synthese aufweisen, in einem Medium unter autotrophen Bedingungen bis zu einer Zelldichte X Zellen/Liter,
 - B) Verdünnen mindestens eines Teils der Zellen auf eine Zelldichte von 0,001 X bis 0,5 X, bevorzugt 0,01 X bis 0,3 X, besonders bevorzugt 0,05 X bis 0,2 X in einem
10 Medium und
 - C) Vermehren des mindestens einen Teils der Zellen unter autotrophen Bedingungen.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
15 dass die eingesetzten Zellen aus acetogene Bakterien oder Knallgasbakterien ausgewählt sind.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass das Polyhydroxyalkanoat, dessen Synthese vermindert ist, Polyhydroxybutyrat ist.
4. Verfahren gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass die Zelle eine verglichen um Wildtyp verminderte Aktivität Polyhydroxybutyrat Synthase kodiert von den Genen phbC oder phaC aufweist.
5. Verfahren gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
30 dass die den Zellen verfügbare Kohlenstoffquelle zu mindestens 90 Gew.-%, bezogen auf Kohlenstoffatome, Kohlendioxid enthält.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,

dass Knallgasbakterien eingesetzt werden, und in Verfahrensschritt A) und C) das Medium mit einem Gas enthaltend H_2 , CO_2 und O_2 in einem Gewichtsverhältnis von 20 bis 95 zu 2 bis 45 zu 1 bis 35, insbesondere von 70 bis 95 zu 4 bis 15 zu 1 bis 10 n Kontakt gebracht wird.

5

7. Verfahren gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in Verfahrensschritt C) Zielprodukt synthetisieren, dessen Bildung über das Zwischenprodukt 3-Hydroxyalkanyl-CoA, insbesondere 3-Hydroxybutyryl-Coenzym A, erfolgt.

10

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass in Verfahrensschritt C) durch die Zellen 2-Hydroxyisobuttersäure synthetisiert wird und die Zelle eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp erhöhte Aktivität des Enzyms E_1 aufweisen, welches die Umsetzung von 3-Hydroxybutyryl-Coenzym A zu 2-Hydroxyisobutyryl-Coenzym A katalysiert.

15

9. Verfahren gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Zellen eine verglichen zu ihrem Wildtyp gesteigerte Aktivität eines Enzyms E_2 , welches die Umsetzung von Acetoacetyl-Coenzym A zu 3-Hydroxybutyryl-Coenzym A katalysiert, aufweisen.

20

- 25 10. Verfahren gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es den Verfahrensschritt D) Aufreinigung des Zielproduktes umfasst.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/051074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/10 C12P7/42 C12P7/62 C12R1/01 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/116338 A1 (UNIV OHIO STATE RES FOUND [US]; TABITA F ROBERT [US]; LAGUNA RICHARD A) 30 August 2012 (2012-08-30) claims 33-35,58-60; figure 24; example 4 -----	1-10
X	WO 2009/156214 A1 (EVONIK ROEHM GMBH [DE]; REINECKE LIV [DE]; SCHAFER STEFFEN [DE]; MARX) 30 December 2009 (2009-12-30) page 46, paragraph 1; claims 1-5,10 -----	1-10
X	WO 2011/139804 A2 (SEQUESTO [US]; REED JOHN [US]; DYSON LISA [US]) 10 November 2011 (2011-11-10) claim 1; figure 1; example 1 ----- -/-	1-10
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 March 2014		Date of mailing of the international search report 14/03/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Griesinger, Irina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/051074

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NIAMSIRI N ET AL: "Engineering of chimeric class II polyhydroxyalkanoate synthases", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 70, no. 11, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 6789-6799, XP003000945, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.70.11.6789-6799.2004 abstract -----	1-10
X	TORBEN HOEFEL ET AL: "Reaction engineering studies for the production of 2-hydroxyisobutyric acid with recombinant Cupriavidus necator H 16", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 88, no. 2, 13 July 2010 (2010-07-13), pages 477-484, XP019841737, ISSN: 1432-0614 abstract -----	1-10
A	REINECKE FRANK ET AL: "Ralstonia eutropha Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers", JOURNAL OF MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, HORIZON SCIENTIFIC PRESS, WYMONDHAM, GB, vol. 16, no. 1-2, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 91-108, XP009156497, ISSN: 1464-1801, DOI: 10.1159/000142897 figure 1 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/051074

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012116338 A1	30-08-2012	CA 2828301 A1 EP 2678420 A1 WO 2012116338 A1	30-08-2012 01-01-2014 30-08-2012
WO 2009156214 A1	30-12-2009	CA 2729476 A1 CN 102076864 A DE 102008002715 A1 EP 2291530 A1 JP 2011525367 A KR 20110022625 A RU 2011102810 A US 2011171702 A1 WO 2009156214 A1	30-12-2009 25-05-2011 31-12-2009 09-03-2011 22-09-2011 07-03-2011 10-08-2012 14-07-2011 30-12-2009
WO 2011139804 A2	10-11-2011	EP 2582817 A2 JP 2013542710 A US 2013149755 A1 US 2014024091 A1 WO 2011139804 A2	24-04-2013 28-11-2013 13-06-2013 23-01-2014 10-11-2011

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/051074

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12N9/10 C12P7/42 C12P7/62 C12R1/01 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C12P C12R		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2012/116338 A1 (UNIV OHIO STATE RES FOUND [US]; TABITA F ROBERT [US]; LAGUNA RICHARD A) 30. August 2012 (2012-08-30) Ansprüche 33-35,58-60; Abbildung 24; Beispiel 4	1-10
X	WO 2009/156214 A1 (EVONIK ROEHM GMBH [DE]; REINECKE LIV [DE]; SCHAFER STEFFEN [DE]; MARX) 30. Dezember 2009 (2009-12-30) Seite 46, Absatz 1; Ansprüche 1-5,10	1-10
X	WO 2011/139804 A2 (SEQUESTO [US]; REED JOHN [US]; DYSON LISA [US]) 10. November 2011 (2011-11-10) Anspruch 1; Abbildung 1; Beispiel 1	1-10
	-/-	
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 6. März 2014		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 14/03/2014
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Griesinger, Irina

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NIAMSIRI N ET AL: "Engineering of chimeric class II polyhydroxyalkanoate synthases", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 70, Nr. 11, 1. November 2004 (2004-11-01), Seiten 6789-6799, XP003000945, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.70.11.6789-6799.2004 Zusammenfassung -----	1-10
X	TORBEN HOEFEL ET AL: "Reaction engineering studies for the production of 2-hydroxyisobutyric acid with recombinant Cupriavidus necator H 16", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, Bd. 88, Nr. 2, 13. Juli 2010 (2010-07-13), Seiten 477-484, XP019841737, ISSN: 1432-0614 Zusammenfassung -----	1-10
A	REINECKE FRANK ET AL: "Ralstonia eutropha Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers", JOURNAL OF MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, HORIZON SCIENTIFIC PRESS, WYMONDHAM, GB, Bd. 16, Nr. 1-2, 1. Januar 2009 (2009-01-01), Seiten 91-108, XP009156497, ISSN: 1464-1801, DOI: 10.1159/000142897 Abbildung 1 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/051074

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
WO 2012116338	A1	30-08-2012	CA	2828301	A1	30-08-2012
			EP	2678420	A1	01-01-2014
			WO	2012116338	A1	30-08-2012

WO 2009156214	A1	30-12-2009	CA	2729476	A1	30-12-2009
			CN	102076864	A	25-05-2011
			DE	102008002715	A1	31-12-2009
			EP	2291530	A1	09-03-2011
			JP	2011525367	A	22-09-2011
			KR	20110022625	A	07-03-2011
			RU	2011102810	A	10-08-2012
			US	2011171702	A1	14-07-2011
			WO	2009156214	A1	30-12-2009

WO 2011139804	A2	10-11-2011	EP	2582817	A2	24-04-2013
			JP	2013542710	A	28-11-2013
			US	2013149755	A1	13-06-2013
			US	2014024091	A1	23-01-2014
			WO	2011139804	A2	10-11-2011
