

(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
22. Mai 2014 (22.05.2014)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2014/076012 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12P 19/14 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)
C12P 7/14 (2006.01) C12P 7/24 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2013/073411

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. November 2013 (08.11.2013)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 50511/2012 14. November 2012 (14.11.2012) AT

(71) Anmelder: ANNIKKI GMBH [AT/AT]; Rankengasse
28a, A-8020 Graz (AT).

(72) Erfinder: WIRTZ, Dörthe Hendrike; Moses-Hess-Str.
74, A-51061 Köln (AT). MAYER, Bernd; Otto-Loewi-
Gasse 2/11, A-8042 Graz (AT).

(74) Anwalt: SCHWARZ, Albin; Schwarz & Partner,
Wipplingerstrasse 30, A-1010 Wien (AT).

(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)



WO 2014/076012 A1

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING SUGAR DERIVATIVES

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON ZUCKERDERIVATEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for converting a sugar into the form of a compound that has at least one ionic binding site, the sugar coming from a material containing hemicellulose, the method being characterized in that the material containing hemicellulose is enzymatically or non-enzymatically hydrolyzed and the obtained hydrolysate is subjected to a reaction containing at least one enzymatic step, wherein sugars are released and released sugars are converted into compounds that have at least one ionic binding site, and the use of such a method.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Überführung eines Zuckers in die Form einer Verbindung, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweist aus hemicellulosehaltigem Material, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das hemicellulosehaltige Material enzymatisch oder nicht-enzymatisch hydrolysiert wird und das erhaltene Hydrolysat einer Umsetzung enthaltend mindestens einen enzymatischen Schritt unterworfen wird, wobei Zucker freigesetzt und freigesetzte Zucker in Verbindungen übergeführt werden, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweisen und die Verwendung eines solchen Verfahrens.

Verfahren zur Gewinnung von Zuckerderivaten

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Zuckerderivaten aus einem Hemicellulose-enthaltenden Material.

In den letzten Jahren findet betreffend nachwachsende Rohstoffe ein Umdenken statt. Es wird versucht anstelle von fossilem Rohstoff auf den nachwachsenden Rohstoff als Quelle für Energie und chemische Produkte umzusteigen. Nachwachsender Rohstoff (Nawaro) schließt einen land- und forstwirtschaftlicher Rohstoff pflanzlichen oder tierischen Ursprungs ein, der nicht als Nahrungs- oder Futtermittel eingesetzt wird. Er kann stofflich, aber auch energetisch genutzt werden. Nawaros haben viele Vorteile wie die Schonung der nur begrenzt vorhandenen fossilen Rohstoffe, eine ausreichende Verfügbarkeit und die Erschließung neuer Märkte für die Überproduktion bei der Landwirtschaft.

Auch Lignocellulose gewinnt als Nawaro an Bedeutung (Kamm and Kamm 2004, *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(2):137-45). Sie besteht aus 3 verschiedenen chemischen Hauptfraktionen: Cellulose, ein C6 Polymer aus Glucoseeinheiten; Hemicellulose, bestehend aus verschiedenen C5 Zuckern, wie z.B. Xylose; und Lignin als ein Phenol-Polymer. Eine Möglichkeit die Lignocellulose zu nutzen ist das Vergasen, sodass die sogenannte "syngas platform" erhalten wird. Der Rohstoff wird unter limitierter Sauerstoffzugabe verbrannt um ein Sythesegas reich an CO₂, CO, H₂, CH₄ und N₂ sowie Teer zu produzieren (Bridgwater, 2003). Das Sythesegas kann dann wiederum genutzt werden, um Kraftstoff und Chemikalien zu produzieren, z.B. mittels Fischer-Tropsch-Synthese (Tijmensen *et al.*, 2002). Eine zweite Möglichkeit ist die sogenannte "sugar platform". Hier wird die Lignocellulose zunächst in die 3 Hauptbestandteile zerlegt und diese werden dann weiter in Produkte umgesetzt. Die Xylose kann z.B. zu Xylitol oder aber Furfural umgesetzt werden. Die Glucose kann zur Fermentation eingesetzt werden oder in Hydroxymethylfurfural (HMF) überführt werden. Häufig wird das Lignin zur Energieerzeugung genutzt und einfach nur verbrannt (Saake and Lehnen, 2007, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co).

Die Zucker liegen in der Lignocellulose in eng vernetzten, polymeren Strukturen in Form teilweise kristalliner Cellulose und amorpher, die Cellulose umhüllender Hemicellulosen vor. Im Zuge der Zellwandsynthese werden die Hohlräume mit Lignin ausgefüllt, wodurch sich ein äußerst dichter Komplex ergibt. Die Dichte der Strukturen macht Enzymen, wie z.B. Cellulasen oder Hemicellulasen eine Zugänglichkeit unmöglich, sie sind durch ihr relativ hohes Molekulargewicht nicht imstande in die Poren zu gelangen (Himmel *et al.*, 2007, *Science*. 315 (5813): 804-7). Daher ist es notwendig, dass vor der enzymatischen Behandlung ein chemischer Schritt erfolgt, der die Porosität der Lignocellulose erhöht. Dieser Schritt wird als Pretreatment (Aufschluss) bezeichnet. Im Aufschluss wird die polymere Lignocellulosematrix aufgebrochen, und die Cellulosefasern werden somit exponiert, sodass sie für Enzyme zugänglich werden. Der Aufschluss ist ein kritischer Schritt, der als einer der kostenaufwendigsten Schritte der Biorefinery beschrieben wird (Mosier *et al.*, 2005, *Bioresour Technol.* 96(6):673-86). Zum anderen hat er auch einen sehr großen Einfluss auf die folgenden Schritte wie Hydrolyse, Fermentation, downstream Prozesse und auch den Abfall der Prozesse (Alvira *et al.*, *Bioresour Technol.* 101 (13): 4851-61).

Die gängigen Verfahren des Aufschluss zielen entweder darauf ab, primär die Hemicellulosen zu verflüssigen (z.B. steam explosion-, dilute acid-pretreatment) oder die Erhöhung der Porosität durch Verflüssigung von Lignin (z.B. lime-, ammonia-pretreatment) zu erreichen. Diese Verfahren haben einen gravierenden Nachteil: Sie sind entweder energieaufwändig und laufen vorwiegend bei Temperaturen knapp unter 200°C ab. Oder aber sie erfordern eine aufwändige Rückgewinnung der Aufschlusschemikalien. Die Art der Vorbehandlung kann einen starken Einfluss auf die Enzymaktivität und die Ausbeute bei anschließenden biokatalytischen Prozessen haben. Bei hohen Reaktionstemperaturen entstehen vielfach toxische Abbauprodukte (z.B. Furfural) welche im Falle einer unmittelbar angeschlossenen Ethanol-Gärung die Hefen hemmen können (Chandra *et al.*, 2007, *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 108: 67-93; Mansfield *et al.*, 1999, *Biotechnol Prog.* 15 (5): 804-816).

Als Hemicellulose ist Xylan ein nicht homogenes Polymer. Hemicellulosen beinhalten hauptsächlich Pentosen (C5), wie D-Xylose und L-Arabinose aber auch Hexosen (C6) wie

D-Glucose, D-Mannose und D-Galactose und auch Zuckersäuren wie Glucuronsäure und 4-O-methyl-D-Glucuronsäure. Hemicellulosen haben üblicherweise einen Polymerisationsgrad kleiner 200 (Jørgensen *et al.*, 2007). Hemicellulosen werden nach den Zuckern benannt, aus denen sie aufgebaut sind, z.B. das im Weizenstroh enthaltene Arabinoglucuronoxylan, das aus dem Xyloserückgrat besteht und Seitenketten aus Arabinose und Glucuronsäure enthält. Die Xyloseeinheiten können noch mit Acetat und Ferula- bzw. Coumarsäure verestert sein (Polizeli *et al.*, 2005, *Appl Microbiol Biotechnol.* 67(5): 577-91). Für den enzymatischen Abbau des Xylans sind Endo-Xylanasen, β -Xylosidasen, α -Glucuronidasen, α -L-Arabinofuranidasen und Esterasen notwendig (Polizeli *et al.*, 2005, *ibidem*). Die Endo-Xylanase spaltet die glycosidische Bindung im Xylan-Rückgrat und reduziert damit den Grad der Polymerisierung des Substrates. Das Hauptprodukt der Hydrolyse sind β -D-Xylopyranosyl-Oligomere, aber auch kleine Mengen an Mono- Di- und Trisacchariden. β -Xylosidasen spalten die Xylooligosaccharide in monomere Xylose. Die restlichen Enzyme weisen Aktivität gegenüber den Seitenketten auf und trennen diese ab. α -Glucuronidasen spalten die Glucuronsäurereste vom Rückgrat ab, α -L-Arabinofuranidasen die Arabinoseseitenketten. Esterasen spalten die Esterbindungen des Xylans zu Seitenketten wie Acetat oder p-Coumarsäure bzw. Ferulasäure (Collins *et al.*, 2005, *FEMS Microbiol Rev.* 29(1): 3-23). Die Abspaltung der Seitenketten ist essentiell dafür, dass Endo-Xylanase und β -Xylosidase das Xylan vollständig zerlegen können.

Stand der Technik

Die Xylanhydrolyse dient der Spaltung des Zuckerpolymers in Zuckeroligomere oder Zuckermonomere. Hier können verschiedene Ziele unterschieden werden. In einigen Anwendungen ist es sinnvoll, beide Zuckerpolymere, Cellulose und Xylose, in Monomere zu spalten. Insbesondere bei der Herstellung von fermentierbaren Zuckern aus Biomassen ist dies der Fall. In anderen Anwendungen soll jedoch die Cellulose als Polymer erhalten bleiben, das Xylan aber zu Oligomeren oder Monomeren gespalten werden. Die Xylanhydrolyse kann chemisch oder enzymatisch erfolgen. Weiterhin kann die Xylanhydrolyse gleichzeitig mit der Abtrennung von lignocellulosischem Material erfolgen, oder in einem separaten Schritt.

In US 3,523,911 wird eine chemische Methode beschrieben, bei der die Biomasse bei Temperaturen von 100-150°C mit säurehaltigen Dampf bearbeitet wird, der dann bei der Kondensation aus dem Material Zucker herauslöst. Bei dieser Methode wird jedoch sehr viel Säure verbraucht und es wird ein Hydrolysat mit einer nur sehr geringen Xylosekonzentration erhalten. Wenn z.B. 15 % Xylan bezogen auf die Trockenmasse aus Bagasse hydrolysiert wird, dann enthält das Hydrolysat nur 3 % Xylose, was auf die hohe Wassermenge, die während des Prozesses absorbiert wird, zurückzuführen ist. Der hohe Säureverbrauch und die Kosten für das Aufkonzentrieren der Zuckerlösung machen den Prozess unrentabel.

In US 7,932,063 wird eine Methode beschrieben, bei der die Biomasse zunächst mit einer wässrigen, Ammoniak-enthaltenden Lösung aufgeschlossen wird. Das erhaltene Produkt wird dann mit einem "saccharification enzyme", einem Zucker-spaltenden Enzym, umgesetzt um fermentierbare Zucker zu erhalten. Das Enzym kann mehrere Aktivitäten wie Glycosidase, Peptidase, Lipase, Ligninase und Esterase enthalten. Dadurch wird gewährleistet, dass möglichst alles an vorhandenem Zuckerpolymer in Monomere zerlegt wird. So wird eine hohe Zuckerausbeute bei hoher Zuckerkonzentration des Hydrolysats erzielt. Der Nachteil ist die Unspezifität der Hydrolyse. Bei dieser Methode besteht nicht die Möglichkeit nur das Xylan in einem lignocellulosischem Material zu spalten und die Cellulose als Polymer zu erhalten.

In AT 509 307 A1 wird eine Methode beschrieben bei der Biomasse, die über eine alkalische Alkohollösung mit Temperaturen unter 100°C aufgeschlossen wurde, mit einem Kohlenhydrat-spaltenden Enzym behandelt wird, um Zuckermonomere zu erhalten. Wird hier eine reine Xylanase als Enzym eingesetzt, so wird nur das Xylan zerlegt, die Cellulose bleibt als Polymer erhalten. Die aus dem Xylan erhaltene Xylose kann dann mit einer Xylosereduktase zu Xylitol umgesetzt werden, ohne dass es einer Abtrennung der Xylose aus dem Hydrolysat bedarf. So werden aus einer vorbehandelten, Hemicellulose-haltigen Biomasse C5 Zucker in hoher Konzentration erhalten. Ein Nachteil des Verfahrens ist jedoch, dass die C5 Zucker aus der Hydrolyse, oder aber die reduzierten Folgeprodukte, nur aufwendig aus der Reaktionslösung abgetrennt werden können. In der Lösung befinden sich noch Reste an löslichen Xylan, Xylooligosaccharide und Enzyme bzw. Proteine. Um Xylose

oder Xylitol aus dieser Lösung zu isolieren, ist eine Kristallisation notwendig.

In der Literatur werden Methoden zur Kristallisation von Xylitol aus Hydrolysaten aufgrund der niedrigen Konzentration als schwierig beschrieben (Wei *et al.*, 2010; *Frontiers of Chemical Engineering in China* 4(1): 57-64 ; Rivas *et al.*, 2006, *Agric Food Chem.* 54(12): 4430-5). Außerdem muss, auf Grund der komplexen Zusammensetzung solcher Hydrolysate auch noch ein Reinigungsschritt vor der Kristallisation erfolgen. Rivas *et al.* (2006) beschreiben eine Methode, bei der ein Reinigungsschritt mit Aktivkohle erfolgt und dann die Konzentration des Xylitols durch Verdampfen des Lösemittels erreicht wird. Wei *et al.* verwenden einen Reinigungsschritt mit Aktivkohle und Ionenaustauscher bevor die Konzentration des Xylitols durch Verdampfen des Lösemittels erhöht wird. In beiden Fällen erfolgt die Kristallisation durch Zugabe von Ethanol in der Kälte. Vor allem die Aufkonzentrierung der Xylitollösung durch Verdampfen des Lösemittels ist sehr kostenintensiv und nicht optimal für einen großtechnischen Prozess.

Von Watanabe *et al.* wird ein Arabinose-Stoffwechselweg in Mikroorganismen beschrieben, bei dem Arabinose Phosphorylierungs-unabhängig in 5 Schritten zu α -Ketoglutarat umgesetzt wird (Watanabe *et al.*, 2005; *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. (49):309-10 ; Watanabe *et al. J Biol Chem.* 281(44):33521-36, 2006). Der Zucker wird zunächst durch eine L-Arabinose-1-Dehydrogenase zum L-Arabino- γ -lacton oxidiert. Das Enzym überträgt bei der Reaktion die Elektronen aus dem Substrat auf NADP^+ bzw. NAD^+ . Das L-Arabino- γ -lacton wird durch die L-Arabinolactonase zum L-Arabanat geöffnet. Das Enzym braucht keinen Kofaktor. Am Arabonat folgen zwei Dehydratisierungsschritte. Der erste wird durch die L-Arabanat-Dehydratase katalysiert, die das L-Arabanat in L-2-Keto-3-deoxyarabanat (L-KDA) überführt. Die L-KDA-Dehydratase setzt dieses dann zu α -Ketoglutaräure-Semialdehyd (α -KGS) um. Auch die beiden Dehydratasen katalysieren die Reaktionen ohne löslichen Kofaktor (Watanabe *et al.*, 2006, *J Biol Chem.* 281(39):28876-88). Zum Schluss wird der Semialdehyd dann durch die α -KGS-Dehydrogenase zum α -Ketoglutarat oxidiert. Dieses Enzym braucht wiederum NAD^+ bzw. NADP^+ zur Katalyse der Oxidation (Watanabe *et al.*, 2006, *ibidem*). Diese Umsetzung eignet sich so jedoch nicht für eine großtechnische Anwendung, da zwei der fünf Schritte die Kofaktoren NAD(P)^+ in stöchiometrischen Mengen benötigen, was sehr hohe Kosten verursachen würde.

In US 2006/0234363 A1 wird der von Watanabe *et al.* (2006) beschriebene Arabinose-Stoffwechselweg zum Teil genutzt, um aus Arabinose und Xylose 1,2,4-Butantriol in Mikroorganismen herzustellen. Hier wird zunächst der Zucker mittels Dehydrogenase und Lactonase zum Lacton oxidiert und zur entsprechenden Säure hydrolysiert. Dann erfolgt in den Zellen eine Dehydratisierung an C3, so dass D- bzw. L-3-Deoxy-glycero-pentulosonic acid entsteht, je nachdem, welcher Zucker eingesetzt wird. Im Anschluss erfolgt dann jedoch eine Decarboxylierung der Säuregruppe, so dass D- bzw. L-Dihydroxybutanal entsteht. Danach wird noch das Aldehyd an C1 reduziert, so dass D- bzw. L-1,2,4-Butantriol entsteht. Da bei dieser Anwendung in ganzen Zellen gearbeitet wird, ist die Zugabe der stöchiometrischen Mengen an Kofaktor für die Redoxschritte nicht notwendig. Der Nachteil ist jedoch, dass in Zellen generell mit geringeren Substratkonzentrationen gearbeitet werden kann als in einem zellfreien System. Hinzu kommt, dass bei Arbeiten in ganzen Zellen das System nicht so effizient ist, da ein Teil der Zucker, die eingesetzt werden den Organismen zum Überleben dienen und so nicht in Produkt umgesetzt werden.

In US 6,284,904 wird eine Methode beschrieben, die der Entfernung organischer Säuren, wie zum Beispiel Succinat, aus industriellen Lösungen wie Fermentationsansätzen oder Hydrolysaten dient. Hierbei wird die Lösung über einen Anionen-Austauscher gegeben und dieser unter Bedingungen gewaschen bei denen die organischen Säuren nicht eluiert werden. Im Anschluss werden die organischen Säuren durch Zugabe stärkerer, anorganischer Anionen eluiert. So können organische Anionen aus einer komplexen Lösung, wie z.B. einem Hydrolysat, isoliert und auch aufkonzentriert werden.

In US 6,187,570 wird eine Methode beschrieben, durch die Derivate der Gluconsäure mittels Elektrodialyse aus einem Fermentationsansatz oder einem zellfreien, biokatalytischen Ansatz isoliert werden können. Zwischen Kathode und Anode werden abwechselnd mehrere Anionen- und Kationen-Membranen angebracht. Der Block aus Kathode, Anode und den Zwischenmembranen ist mit einem Elektrolyten gefüllt. Es gibt "Feed-Kompartimente", in die die Lösung, Fermentationsansatz oder zellfreier, biokatalytischer Ansatz eingebracht werden. Außerdem gibt es "Konzentrations-Kompartimente" in denen die Säuren aufkonzentriert werden. Beide Kompartimente sind mit einer Anionen- und einer Kationen-

Membran voneinander getrennt. Wenn eine Spannung angelegt wird, so wandert die negativ geladene Säure durch die Anionen-Membran in das Konzentrations-Kompartiment, während die ungeladenen Bestandteile der Lösung im Feed-Kompartiment verbleiben. So wird die Gluconsäure bzw. die Derivate dieser Säure von neutralen Bestandteilen abgetrennt und aufkonzentriert.

In US 5,464,514 wird eine Methode beschrieben, bei der Zucker über ihre unterschiedliche Tendenz an eine schwache Säure zu binden, getrennt werden. Die Trennung erfolgt dann über Elektrodialyse. Als schwache Säure wird Borsäure gewählt. Unterschiedliche Zucker weisen eine unterschiedliche Tendenz auf, an Borsäure zu binden. Die Verbindung aus Zucker und Borsäure ist negativ geladen und wandert im elektrischen Feld, während die Zucker, die nicht an die Borsäure binden ungeladen bleiben. Die Elektrodialysezelle besteht aus Kathode und Anode zwischen die zwei Kationen-Austauscher-Membranen angebracht wurden. Zwischen den beiden Kationen-Austauscher-Membranen befindet sich eine Anionen-Austauscher-Membran, die den Zwischenraum in 2 Kompartimente teilt. Kompartiment I befindet sich auf Seiten der Kathode und Kompartiment II auf Seiten der Anode. Wird nun eine Lösung der zu trennenden Zucker in Kompartiment I eingebracht und eine Spannung angelegt, wandern die negativ geladenen Ionen, das heißt die Zucker, die an die Borsäure gebunden haben, durch die Anionen-Austauscher-Membran in Kompartiment II. Die ungeladenen Zucker verweilen in Kompartiment I. Das Verfahren wurde für die Trennung von Lactose und Lactulose sowie für die Trennung von Glucose und Fructose getestet. Diese Methode beruht jedoch darauf, dass zwischen den Zuckern eine unterschiedliche Affinität der Bindung an Borsäure besteht. Aber auch ein Teil der Zucker mit geringerer Affinität für die Borsäure wird die Säure binden und damit ins Kompartiment II übergehen. Somit ist keine Trennung der Zucker möglich, lediglich ändert sich das Verhältnis der Zucker zueinander. Im Falle von Fructose und Glucose war das Verhältnis der Transferraten 1,4 zu 1. Die Separation kann durch mehrere Elektrodialyseschritte erhöht werden. Borsäure und Zucker können anschließend in einem weiteren Elektrodialyse-Schritt voneinander getrennt werden. Der Nachteil der Methode ist, dass eine gute Separation nur durch viele Elektrodialyse-Schritte erzeugt werden kann. Außerdem wird bei dieser Methode nicht zwischen monomeren und dimeren bzw. oligomeren Zuckern unterschieden. Eine gute Trennung kann nur erzeugt werden, wenn die zu trennenden Substanzen sich stark in der

Bindungstendenz an die Borsäure unterscheiden. Weiterhin von Nachteil ist, dass mit Borsäure eine zusätzliche (toxische) Komponente eingesetzt werden muss.

In der US 2003/0172850 ist eine Zusammensetzung beschrieben, die als Zusatz für Zementmischungen dient, und die

(A) eine Lignosulfonsäure oder Salze davon; eine Aldoheptonsäure oder Salze davon; eine Hexuronsäure oder Salze davon, „hexaric acids“ oder Salze davon; oder Mischungen davon; und

(B) zumindest eine Aldopentonsäure oder Salze davon enthält.

Beschreibung der Erfindung

Es wurde nun ein Verfahren gefunden, das eine direkte Nutzung von Zuckern erlaubt, die bei der Hydrolyse von lignocellulosehaltigem (bzw. hemicellulosehaltigem) Materials entstehen.

In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Überführung eines Zuckers in die Form einer Verbindung, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweist aus hemicellulosehaltigem Material, insbesondere gewonnen aus Biomasse, zur Verfügung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das hemicellulosehaltige Material enzymatisch oder nicht-enzymatisch hydrolysiert wird und das erhaltene Hydrolysat einer Umsetzung enthaltend mindestens einen enzymatischen Schritt unterworfen wird, wobei Zucker freigesetzt und freigesetzte Zucker in Verbindungen übergeführt werden, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweisen.

Ein Verfahren, das durch die vorliegende Erfindung zur Verfügung gestellt wird, wird hierin auch als „Verfahren nach (gemäß) vorliegender Erfindung“ bezeichnet.

In einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung können sowohl die Hydrolyse des hemicellulosehaltigen Materials, als auch die Überführung freigesetzter Zucker in Verbindungen, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweisen, in einem Reaktionsansatz stattfinden. Das bedeutet, dass das Hydrolysat vor der Überführung freigesetzter Zucker in Verbindungen, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweisen, nicht isoliert werden muss (Eintopfreaktion).

Hemicellulosehaltiges Material, das in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden kann, ist aus lignocellulosischem Material erhältlich, z.B. durch Vorbehandlung von lignocellulosehaltigem Material.

In einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung schließt „lignocellulosehaltiges Material“ insbesondere lignocellulosehaltige Biomasse ein, z.B. Einjahrespflanzen, wie (trockene) Gräser, oder Teile von Gräsern, vorzugsweise Gräser, Stroh, Energiegräser, wie z.B. Switchgrass, Elefantengras oder Abaca, Sisal, Bagasse, oder untypische Lignocellulosesubstrate, wie Spelzen, z.B. Deckspelzen, wie Reisspelzen, besonders bevorzugt Stroh, Energiegräser, Bagasse oder Spelzen, noch mehr bevorzugt Stroh oder Bagasse.

Lignocellulosehaltige Biomasse zum Einsatz in einem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung wird bevorzugt vorbehandelt, z.B. durch Behandlung mit einer alkalischen, wässrigen Alkohollösung, bevorzugt bei Temperaturen von 50 bis 100°C, z.B. 100 °C und darunter, vorzugsweise 85°C und darunter, besonders bevorzugt 71°C, behandelt. Bevorzugt beträgt dabei der Feststoffgehalt des lignocellulosischen Materials in der wässrigen Lösung 1-40 Gew-%, beispielsweise 3-30 Gew-% Lösung und der Feststoff liegt vorzugsweise in einer Stoffdichte von 1-40 Gew-%, z.B. 3-30 Gew-%, insbesondere 5-20 Gew-% vor. Als Alkohol bei der Vorbehandlung wird bevorzugt ein aliphatischer Alkohol, wie ein C₁₋₆-Alkohol, besonders bevorzugt ein C₁₋₄-Alkohol, wie Ethanol oder Isopropanol eingesetzt. Der pH-Wert der alkoholischen Lösung, der vorzugsweise 10 bis 14 beträgt, kann mit einer Base, bevorzugt einer anorganischen Base, beispielsweise einem Hydroxid, wie Natronlauge, Kalilauge eingestellt werden. Die Basenkonzentration beträgt bei der Reaktion typischerweise von 1 bis 10 mol L⁻¹, vorzugsweise von 2 bis 6 mol L⁻¹, noch mehr bevorzugt von 4,5 bis 5,5 mol L⁻¹. Diese besondere Ausführungsform der Vorbehandlung von lignocellulosehaltigem Material, das in einem Verfahren nach vorliegender Erfindung bevorzugt eingesetzt wird, beruht auf der Erkenntnis, dass sich ein mit einer wässrigen basischen Lösung, welche einen Alkohol, insbesondere einen C₁₋₆-Alkohol und einen pH-Wert von 10,0 bis 14,0 aufweist, behandeltes Material, das mit Cellulose und Hemicellulose angereichert ist, als besser verwertbares Material für einen enzymatischen Abbau zu

Kohlenhydratspaltprodukten eignet, als Material, das gemäß einer anderen Ausführungsform vorbehandelt wird.

Das lignocellulosehaltige, bzw. hemicellulosehaltige Material, das in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung eingesetzt wird, wird einer enzymatischen, oder nicht-enzymatischen, bevorzugt einer enzymatischen Hydrolyse unterworfen. Eine nicht-enzymatische Hydrolyse zum Erhalt eines zuckerhaltigen Hydrolysats kann nach üblichen Methoden durchgeführt werden, z.B. durch eine säurekatalysierte Hydrolyse. Für die enzymatische Hydrolyse, die gemäß bekannten Verfahren erfolgen kann, werden geeignete Enzyme verwendet, beispielsweise Endo-Xylanasen, β -Xylosidasen, α -Arabinofuranosidasen, Glucuronidasen, Cellulasen und Mischungen aus solchen Enzymen.

In einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung wird das Hemicellulose-enthaltende Material, das beispielsweise nach einer wie oben beschriebenen Vorbehandlung erhalten wird, vorzugsweise in einer wässrigen Lösung in einer Stoffdichte von 1-40 Gew-% Trockenmasse eingesetzt.

Verbindungen, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweisen, schließen Verbindungen ein, die zumindestens eine Bindungsstelle aufweisen, die zur Salzbildung geeignet ist, wie z.B. Säuregruppen der Formel $-(\text{COO}^-)_n\text{R}^{n+}$, worin R Wasserstoff oder ein Kation, wie z.B. ein Alkali oder Erdalkaliation, z.B. Na^+ , K^+ , Ca^{++} bedeutet und n die Ladung, die das Kation aufweist und die von dessen Wertigkeit abhängt, bedeutet.

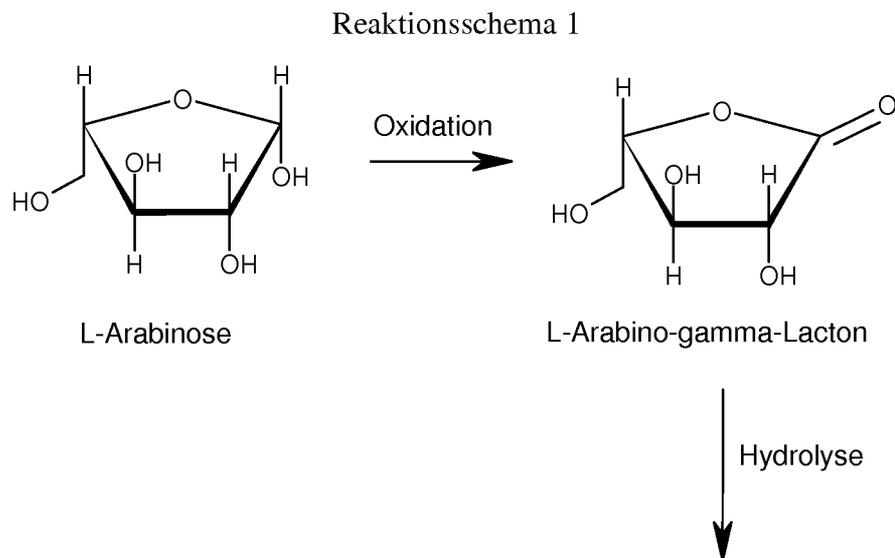
Freigesetzte Zucker in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung, die zu Verbindungen umgesetzt werden, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweisen, sind bevorzugt Arabinose, z.B. L-Arabinose und/oder Xylose, z.B. D-Xylose.

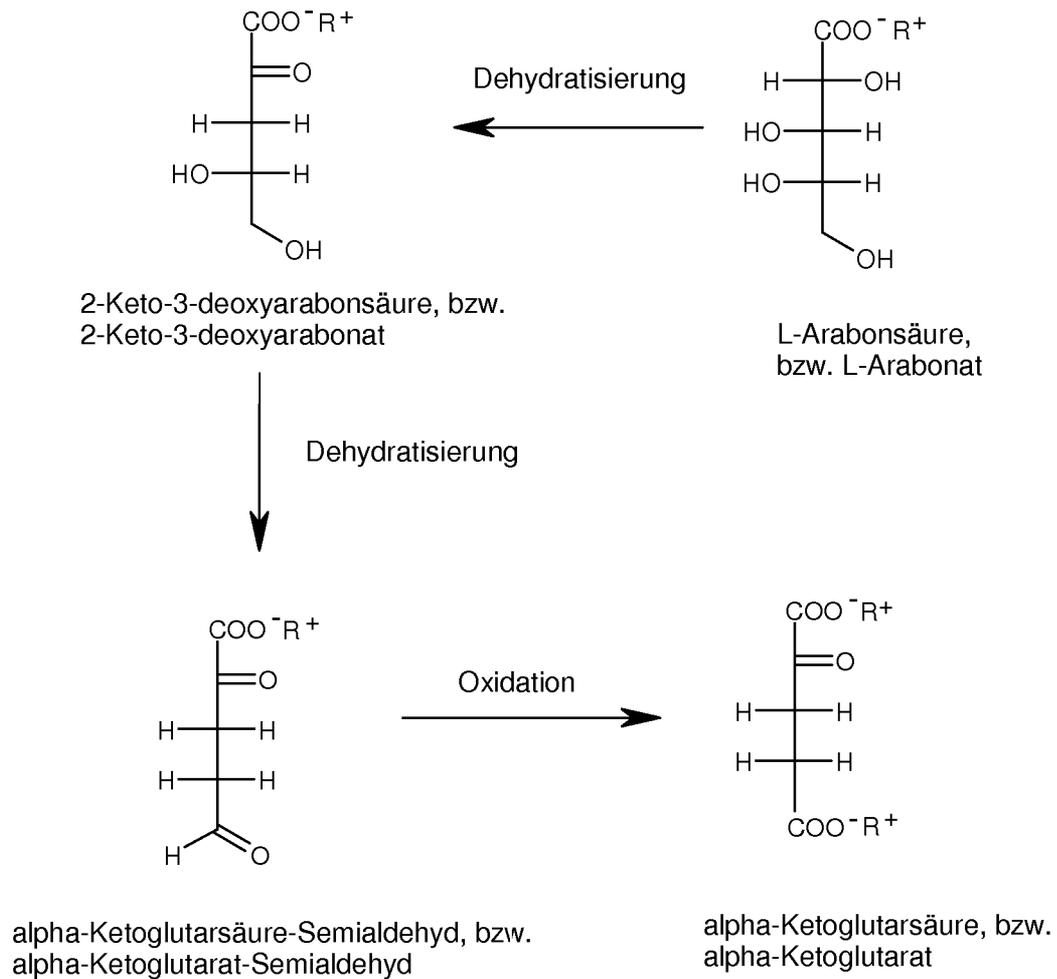
In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren gemäß vorliegender Erfindung zur Verfügung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass freigesetzte Zucker, die zu Verbindungen umgesetzt werden, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweisen entweder

Arabinose, insbesondere L-Arabinose,
Xylose, insbesondere D-Xylose, oder

eine Mischung aus Arabinose, insbesondere L-Arabinose, und Xylose, insbesondere D-Xylose darstellen.

Die Überführung eines Zuckers in die Form einer Verbindung, die zumindestens eine ionische Bindungsstelle aufweist, erfolgt enzymatisch und kann beispielsweise nach dem folgenden Reaktionsschema 1, worin die Überführung von Arabinose in alpha-Ketoglutar säure über enzymatische Oxidation und Hydrolyse zur Arabonsäure gezeigt ist, also die Überführung eines Zuckers in eine Verbindung, die eine Säuregruppe aufweist. Durch Zugabe entsprechender Kationen, beispielsweise in der Form von Hydroxiden, wie NaOH, KOH, Ca(OH)₂ kann die Säuregruppe, falls gewünscht in ein Salz übergeführt werden. R⁺ im Reaktionsschema 1 bedeutet Wasserstoff oder, wie im gezeigten Fall, ein einwertiges Kation, wie Na⁺ oder K⁺.





Es ist ein Vorteil in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung, dass ein durch die Hydrolyse freigesetzter Zucker, der durch die enzymatische Behandlung in der Form einer Verbindung vorliegt, die zumindestens eine ionische Bindungsstelle aufweist, durch Anwendung weiterer spezifischer Enzyme direkt im Hydrolysat zu gewünschten Endprodukten umgewandelt werden kann. Dies ist im oben gezeigten Reaktionsschema am Beispiel der Umwandlung der Arabonsäure in alpha-Ketoglutarate, bzw. im Falle dass es als Salz vorliegt, alpha-Ketoglutarat, das ein wertvolles Produkt in der organischen Chemie darstellt, gezeigt. Dazu können im gezeigten Fall Enzyme, die spezifische Dehydratisierungsreaktionen an der Arabonsäure bzw. deren Folgeprodukten katalysieren, eingesetzt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung wird die enzymatische Überführung der Zucker, bevorzugt der C5-Zucker in eine Verbindung, die

eine ionische Bindungsstelle aufweist mittels einer Oxidoreduktase zu einem entsprechenden Lacton, bevorzugt einem γ -Lacton durchgeführt. Das erhaltene Lacton wird zum Erhalt der entsprechenden Säure hydrolysiert, wobei die Hydrolyse enzymatisch, nicht-enzymatisch und/oder durch spontane Hydrolyse erfolgen kann.

Als Oxidoreduktase zur Oxidation der C5-Zucker eignet sich zum Beispiel eine Pentose-Dehydrogenase in Kombination mit zum Beispiel einer Lactonase und/oder in Kombination mit zum Beispiel einer alkalischen Hydrolyse, bevorzugt mit einem Hydroxid, zum Beispiel Natriumhydroxid, wobei das Lacton zur entsprechenden Säure gespalten wird.

In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren gemäß vorliegender Erfindung zur Verfügung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass freigesetzte Zucker, insbesondere C5-Zucker, z.B. Arabinose, mit Hilfe einer Oxidoreduktase in ein Lacton, bevorzugt ein γ -Lacton, z.B. Arabino- γ -Lacton, und dieses in die entsprechende Carbonsäure, z.B. Arabonsäure, hydrolysiert wird, insbesondere durch enzymatische, nicht-enzymatische und/oder spontane Hydrolyse.

Zum Erhalt spezifischer, gewünschter Verbindung, kann die erhaltene Carbonsäure, z.B. Arabonsäure, anschließend z.B. mittels einer Dehydratase, im Falle von L-Arabonsäure z.B. mit Hilfe von L-Arabanat-Dehydratase an einer gewünschten Position, bei einer C5 Carbonsäure beispielsweise in Position C3, dehydratisiert werden, sodass eine entsprechende Ketocarbonsäure, z.B. im Falle der (L-)Arabonsäure (L-)2-Keto-3-deoxyarabonsäure, entsteht. Die erhaltene Ketocarbonsäure kann, falls gewünscht weiter dehydratisiert werden, beispielsweise unter Verwendung einer Dehydratase, z.B. bei einer C5-Carbonsäure in Position C4, sodass ein Ketocarbonsäure-Semialdehyd, z.B. im Fall der (L-)2-Keto-3-deoxyarabonsäure unter Verwendung der L-2-Keto-3-deoxyarabanat-Dehydratase der α -Ketoglutarsäure-Semialdehyd gebildet wird. Der erhaltene Ketocarbonsäure-Semialdehyd kann, falls gewünscht, beispielsweise mit Hilfe einer Oxidoreduktase, zum Erhalt einer Dicarbonsäure oxidiert werden; im Falle eines α -Ketoglutarsäure-Semialdehyds z.B. mit Hilfe einer α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase zu Erhalt der α -Ketoglutarsäure.

In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren gemäß vorliegender

Erfindung zur Verfügung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Carbonsäure, die gemäß der vorliegenden Erfindung erhalten wurde, z.B. Arabonsäure, zu einer Ketocarbonsäure, z.B. 2-Keto-3-deoxyarabonsäure, dehydratisiert wird, z.B. mittels einer Dehydratase, und, in einem weiteren Aspekt, dass eine Ketocarbonsäure, die gemäß der vorliegenden Erfindung erhalten wurde, z.B. mittels einer Dehydratase, zu einem Ketocarbonsäure-Semialdehyd, z.B. α -Ketoglutar säure-Semialdehyd, weiter dehydratisiert wird, und, in einem weiteren Aspekt, dass der Ketocarbonsäure-Semialdehyd, der gemäß der vorliegenden Erfindung erhalten wurde, z.B. mittels einer Oxidoreduktase, zu einer Dicarbonsäure, z.B. α -Ketoglutar säure, oxidiert wird.

Unter einem „Ketocarbonsäure-Semialdehyd“ ist bei einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung eine aliphatische Verbindung, bei der ein endständiges C-Atom als Carboxylgruppe, ein anderes endständiges C-Atom als Formylgruppe, sowie eines der übrigen C-Atome als Ketogruppe vorliegt, zu verstehen.

Der/Die von einer oder mehreren Oxidoreduktasen reduzierte(n) Redoxkofaktor(en) NADH und/oder NADPH kann/können, bevorzugt im selben Reaktionsansatz mittels mindestens einer weiteren Oxidoreduktaseaktivität in den oxidierten Zustand NAD^+ und/oder NADP^+ überführt wird/werden. Dabei bezeichnen NAD^+ die oxidierte Form und NADH die reduzierte Form von Nicotinamidadenindinucleotid, während NADP^+ die oxidierte Form und NADPH die reduzierte Form von Nicotinamidadenindinucleotidphosphat bezeichnen. Zur Überführung reduzierter Kofaktoren in die oxidierte Form eignet sich als Oxidoreduktaseaktivität zum Beispiel eine Alkoholdehydrogenase, eine Xylose-Reduktase, eine Lactat-Dehydrogenase, eine Oxidase, Redoxenzyme, die an eine Elektrode gekoppelt werden, wie eine Alkoholdehydrogenase, eine Lactat-Dehydrogenase, eine Oxidase, Redoxenzyme, die an eine Elektrode gekoppelt werden.

In einem weiteren Aspekt wird ein Verfahren gemäß vorliegender Erfindung zur Verfügung gestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die von einer oder mehreren Oxidoreduktasen reduzierten Redoxkofaktoren NADH und/oder NADPH im selben Reaktionsansatz mittels mindestens einer weiteren Oxidoreduktaseaktivität, insbesondere einer Alkoholdehydrogenase, einer Lactat-Dehydrogenase, einer Xylose-Reduktase, einer

Oxidase, eines oder mehrerer Redoxenzyme, die an eine Elektrode gekoppelt werden, in den oxidierten Zustand NAD^+ und/oder NADP^+ überführt wird/werden.

Durch den Einsatz von einer oder mehreren Oxidoreduktaseaktivitäten zur Rücküberführung des/der reduzierten Redoxkofaktor(en) NADH und/oder NADPH in den oxidierten Zustand NAD^+ und/oder NADP^+ im selben Reaktionsansatz wird die Verwendung großer Mengen an kostenintensiven Redoxkofaktor(en) vermieden, sodass das Verfahren dadurch wirtschaftlich wird.

Ein weiterer Vorteil eines Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung ist, dass das Hydrolysat aus der Hydrolyse der hemicellulosehaltigen Biomasse direkt zur Umwandlung der monomeren Zucker eingesetzt werden kann, ohne dass es einer Aufreinigung oder Aufkonzentrierung dieser bedarf. Die Konversion der monomeren Zucker kann direkt in einem Gemisch aus Zuckern, z.B. verschiedenen Zuckern, gegebenenfalls nicht hydrolysierten Zuckerpolymeren und weiterhin gegebenenfalls noch vorhandenen Feststoffen erfolgen. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens ist, dass die monomeren Zucker durch die Umwandlung in Verbindungen, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweisen, sehr einfach aus dem Hydrolysat isoliert und aufkonzentriert werden können. So können sie von den anderen Komponenten, die zum Beispiel nicht umgesetztes Xylan oder Xylooligosaccharide sein können, leicht abgetrennt werden. Durch die Wahl des entsprechenden Enzyms können auch spezifisch nur C5 Zucker oder nur C6 Zucker umgesetzt und abgetrennt werden, während alle anderen Zucker in der Lösung verbleiben. In einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung werden bevorzugt C5 Zucker umgesetzt.

In einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung kann die Konzentration entstandener Verbindungen, die eine ionische Bindungsstelle aufweisen, in der Mischung durch ein Trennverfahren gesenkt werden. Beispiele für solche Trennverfahren schließen Ionenaustauscherchromatographie, z.B. Anionenaustauscherchromatographie, und/oder Elektrodialyse ein.

In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren gemäß vorliegender Erfindung zur Verfügung, in dem entstandene Verbindungen, die eine ionische

Bindungsstelle aufweisen, insbesondere mit Hilfe von Ionenaustauscherchromatographie und/oder Elektrodialyse aus der Reaktionsmischung abgetrennt werden.

Dadurch wird die Konzentration entstandener Verbindungen, die eine ionische Bindungsstelle aufweisen, in der Mischung gesenkt.

Eine solche Abtrennung kann an beliebiger Stelle eines Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung erfolgen, sobald Verbindungen, die eine ionische Bindungsstelle aufweisen vorliegen.

Zucker, die in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung nicht umgesetzt werden, können beispielsweise weiteren enzymatischen und/oder nicht enzymatischen Verfahren unterworfen werden.

In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung zur Gewinnung von Arabinose, Xylose, insbesondere Arabinose, Arabino- γ -Lacton, Arabonsäure, 2-Keto-3-deoxyarabonsäure, α -Ketoglutarsäure-Semialdehyd und/oder α -Ketoglutarsäure aus lignocellulosehaltigem Material zur Verfügung.

In den nachfolgenden Beispielen ist die Temperatur in Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) angegeben.

Beispiel 1

Enzymatische Hydrolyse von Hemicellulose enthaltendem Material

Xylan wird in einer Konzentration von 8 % (w/v) in Acetat-Puffer mit pH 4,3 suspendiert und mit der ACCELLERASE[®] TRIO[™] der Firma Genencor in einer Konzentration von 1 g Enzymlösung pro 1 g Xylan versetzt. Der Ansatz wird für 24 h bei 50°C gerührt. Der pH-Wert wird überprüft und im Falle einer Abweichung über 4,5 oder unter 4,1 nachjustiert. Der Ansatz wird über einen Büchner-Trichter filtriert und das Filtrat (Hydrolysat) wird mittels HPLC-LEX-DAD auf seine Zusammensetzung an Monomeren und deren Konzentration hin analysiert. Im Filtrat ist eine Konzentration von ca. 6 % Xylose, 0,43 % Arabinose und 0,27 % Glucose enthalten. Etwa 85 % der im Xylan erhaltenen Xylose wird so in monomerer Form erhalten.

Beispiel 2

Analytik des Hydrolysat mittels HPLC

500 µl des Filtrats der Xylan-Hydrolyse nach Beispiel 1 werden zentrifugiert und der Überstand dann über einen 0,2 µM PVDF (poly-vinyliden-difluorid) Filter gegeben und mittels HPLC-LEX-RID analysiert (Agilent Technologies Inc.). Aufgetrennt werden die Zucker dabei über eine Blei-Säule (Shodex[®] Sugar SP0810) von Shodex Denko K.K. mit einem Fluss von 0,5 ml/min Wasser (VWR: HPLC Grade) bei 80°C. Die Detektion erfolgt mittels Agilent RID. Es wird ein Inlinefilter von Agilent Technologies Inc., sowie als Vorsäulen eine Reversed-Phase Säule (Axpak-WA-G), eine Anionen-Austauscher-Säule (Shodex[®] Asahipak[®] ODP-50 6E) und eine Zucker-Vorsäule (Shodex[®] SP-G) jeweils von Showa Denko K.K. verwendet.

Beispiel 3

Oxidation von L-Arabinose zu Arabonat durch eine Arabinose-Dehydrogenase mit Kofaktorrecycling über eine Alkohol-Dehydrogenase und anschließende Hydrolyse des Lactons durch Natronlauge

Ein 0,5 ml Ansatz enthält 50 mg/ml Arabinose, 5 U/ml der rekombinanten Arabinose-Dehydrogenase aus *Burkholderia vietnamiensis* und eine Mischung aus 0,5 mM NADP⁺ und 0,5 mM NADPH. Zur Regeneration des Kofaktors werden 2,5 % (w/v) Aceton und 5 U/ml der rekombinanten Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* zugefügt. Die Enzyme

werden in Form von Zelllysate eingesetzt. Die Reaktion findet für 24 h bei 40°C und pH 10 unter kontinuierlichem Schütteln (900 rpm) statt. Nach 24 h wird das Reaktionsgefäß bei 60°C für 10 min inkubiert, um die Enzyme zu inaktivieren. Anschließend werden 5 µl 2 M NaOH zugefügt.

So werden über 60 % der L-Arabinose in Natrium-L-Arabinat überführt. Die Analytik erfolgt mit GC-MS.

Beispiel 4

Oxidation von L-Arabinose zu Arabonat durch eine Arabinose-Dehydrogenase mit Kofaktorrecycling über eine Alkohol-Dehydrogenase und anschließende Hydrolyse des Lactons durch eine Lactonase

Ein 0,5 ml Ansatz enthält 50 mg/ml Arabinose, 5 U/ml der rekombinanten Arabinose-Dehydrogenase aus *Burkholderia vietnamiensis* und eine Mischung aus 0,5 mM NADP⁺ und 0,5 mM NADPH. Zur Regeneration des Kofaktors werden 2,5 % (v/v) Aceton und 5 U/ml der rekombinanten Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* zugefügt. Die Enzyme werden in Form von Zelllysate eingesetzt. Die Reaktion findet für 24 h bei 40°C und pH 10 unter kontinuierlichem Schütteln (900 rpm) statt. Nach 24 h wird das Reaktionsgefäß bei 60°C für 10 min inkubiert, um die Enzyme zu inaktivieren. Nach dem Abkühlen werden 50 µl eines *E.coli* Zelllysate mit überexprimierter L-Arabinolactonase aus *Azospirillum brasiliense* zugefügt und die Reaktion für weitere 24 h bei 40°C geschüttelt (900 rpm). Anschließend wird das Reaktionsgefäß bei 60°C für 10 min inkubiert, um das Enzym zu inaktivieren.

So werden über 65 % der L-Arabinose in L-Arabinat überführt. Die Analytik erfolgt mit GC-MS.

Beispiel 5

Analytik der Oxidationsreaktionen mittels GC-MS

Für die Analytik der Oxidationsreaktionen an der GC-MS müssen Substrate und Produkte derivatisiert werden. Die Ansätze werden zentrifugiert, über einen 0,2 µm PVDF-Filter gegeben und 1:30 verdünnt. Von der Verdünnung werden 20 µl in ein 0,5 ml Vial überführt und in der Speedvac getrocknet. Zum Derivatisieren werden dann 150 µl Pyridin und 50 µl einer 99:1-Mischung aus N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid und Trimethylchlorosilan

zugegeben. Im Pyridin ist als interner Standard Sorbitol in einer Konzentration von 0,1 mg/ml enthalten. Die Derivatisierung erfolgt für 16 h bei 60°C. Die Proben werden anschließend über GC-MS analysiert. Die Proben werden dabei über die Trennsäule HP-5ms (5 %-Phenyl)-methylpolysiloxan im Gaschromatograph aufgetrennt und dem Massenspektrometer GCMS QP210 Plus von Shimadzu analysiert.

Beispiel 6

Umwandlung von Arabinose zu Arabonat/Arabinolacton in einer Mischung aus Xylose und Arabinose

180 mg D-Xylose und 20 mg L-Arabinose wurden zusammen mit 2 U L-Arabinose-Dehydrogenase aus *Burkholderia vietnamiensis* sowie 2 U D-Xylose-Reduktase aus *Candida parapsilosis* in 50 mM wässrigem Tris-Puffer (pH = 7.0 bei 25°C) zu einem Gesamtvolumen von 500 µl gelöst. Die Reaktion fand in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei 40°C unter Schütteln (900 rpm, Eppendorf Thermomix®) statt. Nach 30 min wurden die Enzyme durch eine Inkubation bei 65°C für 15 min inaktiviert, denaturierte Proteine durch Zentrifugation (21000 g, 5 min) abgetrennt und die Zucker mittels GC-MS quantifiziert. Es wurde die eingesetzte L-Arabinose vollständig umgesetzt, 92 % davon zu L-Arabonat oder L-Arabinolacton und die restlichen 8 % zu L-Arabitol. Von der eingesetzten D-Xylose verblieben ca. 89,5 % während 10,4 % zu Xylitol umgesetzt wurden. Es wurde < 0,1 % der eingesetzten D-Xylose zu D-Xylonat/D-Xylono-γ-lacton oxidiert.

Der hier erreichte relativ selektive Umsatz von Arabinose zu Arabonat/Arabinolacton resultiert aus der höheren spezifischen Aktivität der Arabinose-Dehydrogenase für Arabinose im Vergleich zu Xylose, aus den relativen Anteilen von Arabinose und Xylose in der Reaktionsmischung sowie der limitierten Enzymaktivität/Reaktionszeit.

Das Beispiel zeigt unter anderem, dass man mit Hilfe eines Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung spezifische Zucker aus einem Zuckergemisch abtrennen kann.

Ansprüche

1. Verfahren zur Überführung eines Zuckers in die Form einer Verbindung, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweist aus hemicellulosehaltigem Material, insbesondere gewonnen aus Biomasse, dadurch gekennzeichnet, dass das hemicellulosehaltige Material enzymatisch oder nicht-enzymatisch hydrolysiert wird und das erhaltene Hydrolysat einer Umsetzung enthaltend mindestens einen enzymatischen Schritt unterworfen wird, wobei Zucker freigesetzt und freigesetzte Zucker in Verbindungen übergeführt werden, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass freigesetzte Zucker, die zu Verbindungen umgesetzt werden, die zumindest eine ionische Bindungsstelle aufweisen entweder Arabinose, insbesondere L-Arabinose, Xylose, insbesondere D-Xylose, oder eine Mischung aus Arabinose, insbesondere L-Arabinose, und Xylose, insbesondere D-Xylose darstellen.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass freigesetzte Zucker, insbesondere C5-Zucker, mit Hilfe einer Oxidoreduktase in ein Lacton, insbesondere ein γ -Lacton, übergeführt und dieses in die entsprechende Carbonsäure hydrolysiert wird, insbesondere durch enzymatische, nicht-enzymatische und/oder spontane Hydrolyse.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Carbonsäure, die erhalten wurde, insbesondere mittels einer Dehydratase zu einer Ketocarbonsäure dehydratisiert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarbonsäure, die erhalten wurde, insbesondere mittels einer Dehydratase, zu einem Ketocarbonsäure-Semialdehyd weiter dehydratisiert wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Ketocarbonsäure-Semialdehyd, der erhalten wurde, insbesondere mittels einer Oxidoreduktase, zu einer Dicarbonsäure oxidiert wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Zucker gemäß der Ansprüche 1 oder 2 Arabinose, das Lacton des Anspruchs 3 Arabino- γ -lacton, die Carbonsäure der Ansprüche 3 und 4 Arabonsäure, die Ketocarbonsäure der Ansprüche 4 und 5 2-Keto-3-deoxyarabonsäure, der Ketocarbonsäure-Semialdehyd der Ansprüche 5 und 6 α -Ketoglutar säure-Semialdehyd, und die Dicarbonsäure des Anspruch 6 α -Ketoglutar säure ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die von einer oder mehreren Oxidoreduktasen reduzierten Redoxkofaktoren NADH und/oder NADPH im selben Reaktionsansatz mittels mindestens einer weiteren Oxidoreduktaseaktivität, insbesondere einer Alkoholdehydrogenase, einer Xylose-Reduktase, einer Lactat-Dehydrogenase, einer Oxidase, eines oder mehrerer Redoxenzyme, die an eine Elektrode gekoppelt werden, in den oxidierten Zustand NAD⁺ und/oder NADP⁺ überführt wird/werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass entstandene Verbindungen, die eine ionische Bindungsstelle aufweisen, insbesondere mit Hilfe von Ionenaustauscherchromatographie und/oder Elektrodialyse aus der Reaktionsmischung abgetrennt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das hemicellulosehaltige Material aus lignocellulosischem Material erhalten wurde.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das hemicellulosehaltige Material durch Behandlung von lignocellulosischem Material mit einer alkalischen,

wässrigen Alkohollösung, bevorzugt bei Temperaturen von 50 bis 100°C erhalten wurde.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass das lignocellulosehaltige Material aus lignocellulosehaltiger Biomasse stammt, insbesondere aus Einjahrespflanzen, Stroh, Energiegräsern, Sisal, Bagasse, oder untypischen Lignocellulosesubstraten, wie Spelzen, insbesondere Stroh oder Bagasse.
13. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Gewinnung von Arabinose, Xylose, insbesondere Arabinose, Arabino- γ -lacton, Arabonsäure, 2-Keto-3-deoxyarabonsäure, α -Ketoglutarsäure-Semialdehyd und/oder α -Ketoglutarsäure aus lignocellulosehaltigem Material.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/073411

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12P19/14 C12P7/14 C12P7/18 C12P7/24
 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)
 C12P
 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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/124312 A2 (ANNIKKI GMBH [AT]; FACKLER KARIN [AT]; MESSNER KURT [AT]; KRONGTAEW CH) 4 November 2010 (2010-11-04)	13
Y	claims; examples	1-13
X	US 2003/172850 A1 (CHUN BYONG-WA [US] ET AL) 18 September 2003 (2003-09-18)	1,2,7,9-13
Y	paragraphs [0016], [0074]; claims; figure 2; example 4	1-13
X	WO 2006/114095 A1 (NOVOZYMES AS [DK]; SOERENSEN HANNE RISBJERG [DK]; PEDERSEN SVEN [DK];) 2 November 2006 (2006-11-02)	1-13
	page 5, lines 34-38; claims page 7, lines 23-31 page 10, lines 23-35; examples	
	-/--	

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	Date of mailing of the international search report
20 February 2014	28/02/2014

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 Boeker, Ruth
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/073411

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/046417 A1 (SHINWA KAKO KK [JP]; UNIV KYOTO [JP]; MAKINO KEISUKE [JP]; KODAKI TSUT) 26 April 2007 (2007-04-26)	1-7,9,13
Y	abstract	1-13
Y	----- NOVICK N J ET AL: "L-arabinose metabolism in Azospirillum brasiliense", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC; US, vol. 149, no. 1, 1 January 1982 (1982-01-01), pages 364-367, XP003012015, ISSN: 0021-9193 the whole document	1-13
Y	----- US 2 463 784 A (LOCKWOOD LEWIS B) 8 March 1949 (1949-03-08) the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/073411

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2010124312	A2	04-11-2010	AU 2010242521 A1	27-10-2011
			CA 2757039 A1	04-11-2010
			CN 102639706 A	15-08-2012
			CO 6450603 A2	31-05-2012
			CU 20110201 A7	21-06-2012
			EA 201171324 A1	30-04-2012
			EP 2425004 A2	07-03-2012
			JP 2012528568 A	15-11-2012
			KR 20120016119 A	22-02-2012
			PE 12632012 A1	13-09-2012
			TW 201114906 A	01-05-2011
			US 2012094331 A1	19-04-2012
			WO 2010124312 A2	04-11-2010

US 2003172850	A1	18-09-2003	AU 2003218027 A1	29-09-2003
			BR 0308400 A	18-01-2005
			CN 1653031 A	10-08-2005
			EP 1494990 A2	12-01-2005
			HK 1080066 A1	24-12-2010
			JP 4332434 B2	16-09-2009
			JP 2006500305 A	05-01-2006
			MX PA04008605 A	06-12-2004
			MY 129685 A	30-04-2007
			SG 143984 A1	29-07-2008
			TW I289545 B	11-11-2007
			US 2003172850 A1	18-09-2003
			US 2005096280 A1	05-05-2005
WO 03078347 A2	25-09-2003			

WO 2006114095	A1	02-11-2006	AU 2006239644 A1	02-11-2006
			BR PI0610253 A2	08-06-2010
			CA 2605258 A1	02-11-2006
			DK 1877568 T3	03-12-2012
			EP 1877568 A1	16-01-2008
			ES 2393090 T3	18-12-2012
			US 2008274527 A1	06-11-2008
			WO 2006114095 A1	02-11-2006

WO 2007046417	A1	26-04-2007	JP 2009011161 A	22-01-2009
			WO 2007046417 A1	26-04-2007

US 2463784	A	08-03-1949	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12P19/14 C12P7/14 C12P7/18 C12P7/24 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12P		
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		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2010/124312 A2 (ANNIKKI GMBH [AT]; FACKLER KARIN [AT]; MESSNER KURT [AT]; KRONGTAEW CH) 4. November 2010 (2010-11-04)	13
Y	Ansprüche; Beispiele -----	1-13
X	US 2003/172850 A1 (CHUN BYONG-WA [US] ET AL) 18. September 2003 (2003-09-18)	1,2,7, 9-13
Y	Absätze [0016], [0074]; Ansprüche; Abbildung 2; Beispiel 4 -----	1-13
X	WO 2006/114095 A1 (NOVOZYMES AS [DK]; SOERENSEN HANNE RISBJERG [DK]; PEDERSEN SVEN [DK];) 2. November 2006 (2006-11-02) Seite 5, Zeilen 34-38; Ansprüche Seite 7, Zeilen 23-31 Seite 10, Zeilen 23-35; Beispiele -----	1-13
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> 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	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
20. Februar 2014	28/02/2014	
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 Boeker, Ruth	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2007/046417 A1 (SHINWA KAKO KK [JP]; UNIV KYOTO [JP]; MAKINO KEISUKE [JP]; KODAKI TSUT) 26. April 2007 (2007-04-26)	1-7,9,13
Y	Zusammenfassung -----	1-13
Y	NOVICK N J ET AL: "L-arabinose metabolism in Azospirillum brasiliense", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC; US, Bd. 149, Nr. 1, 1. Januar 1982 (1982-01-01), Seiten 364-367, XP003012015, ISSN: 0021-9193 das ganze Dokument -----	1-13
Y	US 2 463 784 A (LOCKWOOD LEWIS B) 8. März 1949 (1949-03-08) das ganze Dokument -----	1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/073411

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2010124312 A2	04-11-2010	AU 2010242521 A1	27-10-2011
		CA 2757039 A1	04-11-2010
		CN 102639706 A	15-08-2012
		CO 6450603 A2	31-05-2012
		CU 20110201 A7	21-06-2012
		EA 201171324 A1	30-04-2012
		EP 2425004 A2	07-03-2012
		JP 2012528568 A	15-11-2012
		KR 20120016119 A	22-02-2012
		PE 12632012 A1	13-09-2012
		TW 201114906 A	01-05-2011
		US 2012094331 A1	19-04-2012
		WO 2010124312 A2	04-11-2010
US 2003172850 A1	18-09-2003	AU 2003218027 A1	29-09-2003
		BR 0308400 A	18-01-2005
		CN 1653031 A	10-08-2005
		EP 1494990 A2	12-01-2005
		HK 1080066 A1	24-12-2010
		JP 4332434 B2	16-09-2009
		JP 2006500305 A	05-01-2006
		MX PA04008605 A	06-12-2004
		MY 129685 A	30-04-2007
		SG 143984 A1	29-07-2008
		TW I289545 B	11-11-2007
		US 2003172850 A1	18-09-2003
		US 2005096280 A1	05-05-2005
WO 03078347 A2	25-09-2003		
WO 2006114095 A1	02-11-2006	AU 2006239644 A1	02-11-2006
		BR PI0610253 A2	08-06-2010
		CA 2605258 A1	02-11-2006
		DK 1877568 T3	03-12-2012
		EP 1877568 A1	16-01-2008
		ES 2393090 T3	18-12-2012
		US 2008274527 A1	06-11-2008
		WO 2006114095 A1	02-11-2006
WO 2007046417 A1	26-04-2007	JP 2009011161 A	22-01-2009
		WO 2007046417 A1	26-04-2007
US 2463784 A	08-03-1949	KEINE	