

(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
9. August 2012 (09.08.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/104233 A1

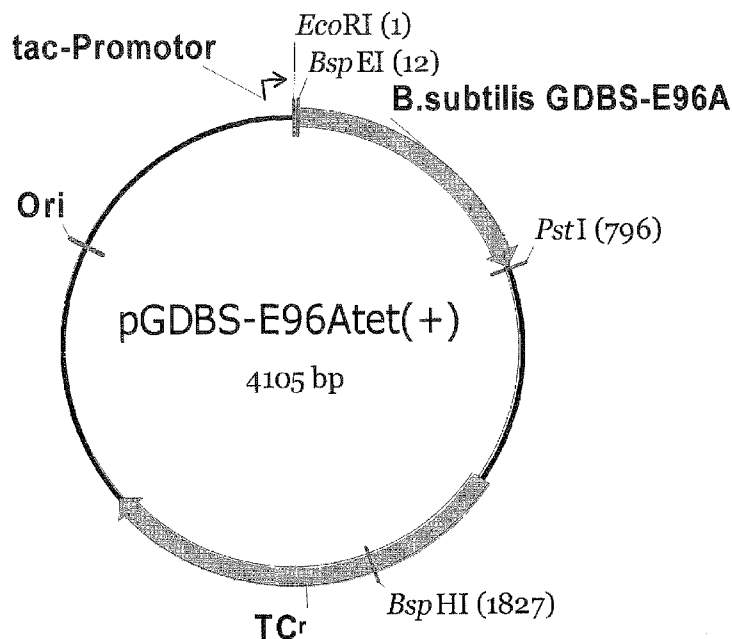
- (51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 1/21 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/051406
- (22) Internationales Anmeldedatum:
30. Januar 2012 (30.01.2012)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2011 003 386.6
31. Januar 2011 (31.01.2011) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **WACKER CHEMIE AG** [DE/DE]; Hanns-Seidel-Platz 4, 81737 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **PFALLER, Rupert** [DE/DE]; Nibelungenstr. 6, 80639 München (DE).
- (74) Anwälte: **POTTEN, Holger** et al.; Wacker Chemie AG, Hanns-Seidel-Platz 4, 81737 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, MD, 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,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING 2, 3-BUTANEDIOL BY FERMENTATION

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG VON 2, 3-BUTANDIOL

Fig. 1



(57) Abstract: The invention relates to a production strain for producing 2, 3-butanediol. Said production strain can be obtained from an original strain and has, under production conditions of 2, 3-butanediol, a glucose dehydrogenase enzyme activity which is not present in the original strain or only present under physiological conditions which are different from the production conditions of 2, 3-butanediol. The invention also relates to a method for producing 2, 3-butanediol (2, 3-BDL) by fermentation by means of said type of production strain.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Produktionsstamm zur Herstellung von 2, 3-Butandiol. Dieser ist herstellbar aus einem Ausgangsstamm und weist unter Bedingungen der 2, 3-Butandiolproduktion eine Glucose Dehydrogenase Enzymaktivität auf, die im Ausgangsstamm nicht oder nur unter physiologischen Bedingungen die verschieden von den Bedingungen der 2, 3-Butandiolproduktion sind, vorhanden ist. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von 2, 3-Butandiol (2, 3-BDL) mittels eines derartigen Produktionsstammes.



RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5
Absatz 2 Buchstabe a)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

Verfahren zur fermentativen Herstellung von 2,3-Butandiol

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von 2,3-Butandiol (2,3-BDL) mittels eines verbesserten Mikroorganismenstammes, der gegenüber dem nicht verbesserten Ausgangsstamm die Enzymaktivität einer Glucose Dehydrogenase (GDH), bzw. eine erhöhte Enzymaktivität einer Glucose Dehydrogenase aufweist.

Bedingt durch steigende Rohölpreise steigen auch die Herstellungskosten der daraus petrochemisch gewonnenen Grundstoffe für die chemische Industrie. Daraus resultiert ein wachsendes Interesse an alternativen Produktionsverfahren für chemische Grundstoffe, speziell auf Basis nachwachsender Rohstoffe.

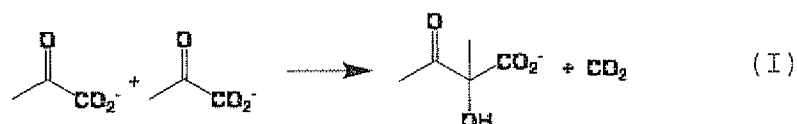
Beispiele für chemische Grundstoffe (sog. chemische Synthesebausteine) aus nachwachsenden Rohstoffen sind Ethanol (C2-Baustein), Glycerin, 1,3-Propandiol, 1,2-Propandiol (C3-Bausteine) oder Bernsteinsäure, 1-Butanol, 2-Butanol 1,4-Butandiol oder auch 2,3-Butandiol (C4-Bausteine). Diese chemischen Bausteine sind die biogenen Ausgangsverbindungen, aus denen dann auf chemischem Wege weitere Grundchemikalien hergestellt werden können. Voraussetzung dafür ist die kostengünstige fermentative Herstellung der jeweiligen Synthesebausteine aus nachwachsenden Rohstoffen. Entscheidende Kostenfaktoren sind einerseits die Verfügbarkeit geeigneter billiger nachwachsender Rohstoffe sowie andererseits effiziente mikrobielle Fermentationsverfahren, welche diese Rohstoffe effizient in den gewünschten chemischen Grundstoff umwandeln. Dabei ist entscheidend, dass die eingesetzten Mikroorganismen das gewünschte Produkt in hoher Konzentration und unter geringer Nebenproduktbildung aus dem biogenen Rohstoff herstellen. Die Optimierung der als Produktionsstämme bezeichneten Mikroorganismen in Bezug auf Produktivität und Wirtschaftlichkeit wird beispielsweise erreicht durch Metabolic Engineering.

Ein auf fermentativem Weg zugänglicher C4-Baustein ist 2,3-Butandiol. Der Stand der Technik zur fermentativen 2,3-

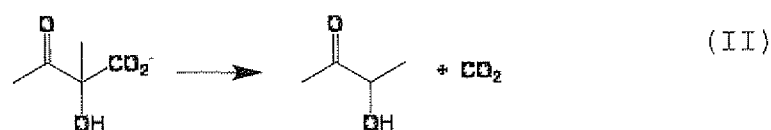
Butandiol Herstellung ist zusammengefasst in Celinska und Grajek (Biotechnol. Advances 27 (2009), 715-725). 2,3-Butandiol ist mögliches Ausgangsprodukt für Produkte der Petrochemie mit vier C-Atomen (C4-Bausteine) wie Acetoin, Diacetyl, 1,3-Butadien, 2-Butanon (Methyl-Ethylketon, MEK). Außerdem sind Produkte mit zwei C-Atomen (C2-Bausteine) wie Essigsäure (DE 102010001399) und davon abgeleitet, Acetaldehyd, Ethanol und auch Ethylen zugänglich. Durch Dimerisierung von 2,3-Butandiol sind auch C8-Verbindungen denkbar, die Verwendung z.B. als Treibstoff im Luftfahrtbereich haben.

Der von verschiedenen Mikroorganismen beschrittene biosynthetische Weg zu 2,3-Butandiol ist bekannt (siehe Review von Celinska und Grajek, Biotechnol. Advances (2009) 27: 715-725) und führt vom zentralen Stoffwechselprodukt Pyruvat über die drei folgenden enzymatischen Schritte zum 2,3-Butandiol:

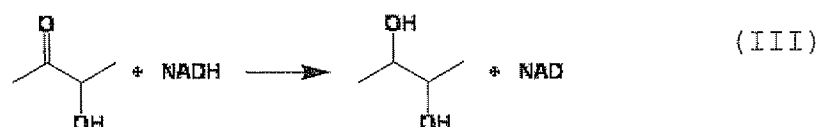
Reaktion der Acetolactatsynthase: Bildung von Acetolactat aus zwei Molekülen Pyruvat unter Abspaltung von CO₂.



Reaktion der Acetolactatdecarboxylase: Decarboxylierung von Acetolactat zu Acetoin.



Reaktion der Acetoinreduktase (2,3-Butandioldehydrogenase): NADH-abhängige Reduktion von Acetoin zu 2,3-Butandiol.



Verschiedene natürliche Produzenten von 2,3-Butandiol sind bekannt, z. B. aus den Gattungen *Klebsiella*, *Raoultella*, *Enterobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* etc. Aber auch Hefen sind als Produzenten bekannt (z.B. Bäckerhefe). Die meisten bakteriellen Produzenten sind Mikroorganismen der biologischen Sicherheitsstufe S2, können also großtechnisch nicht ohne aufwändige und teure technische Sicherheitsmassnahmen eingesetzt werden (dazu und zu weiteren mikrobiellen 2,3-Butandiolproduzenten siehe Review von Celinska und Grajek, *Biotechnol. Advances* (2009) 27: 715-725). Dies würde ebenso für bisher nicht beschriebene gentechnisch optimierte Produktionsstämme basierend auf diesen Stämmen gelten.

Für eine kosteneffiziente großtechnische 2,3-BDL Produktion sind Produktionsstämme der biologischen Sicherheitsstufe S1 bevorzugt. Für diese wurden jedoch bisher keine ausreichend hohen 2,3-BDL Ausbeuten beschrieben. Bekannte 2,3-BDL-Produktionsstämme aus der biologischen Sicherheitsstufe S1 sind Stämme der Arten *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola*, Stämme der Gattung *Bacillus* (bzw. *Paenibacillus*) wie *Bacillus polymyxa* oder *Bacillus licheniformis*. In der Fachliteratur (Drancourt et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2001), 51: 925-932) werden infolge einer taxonomischen Umbenennung die Arten *Klebsiella terrigena* und *Klebsiella planticola* synonym auch als *Raoultella terrigena* und *Raoultella planticola* bezeichnet. Es handelt sich dabei um Mikroorganismenstämme der gleichen Art.

Für diese in der Sicherheitsstufe S1 eingestuften Stämme wurden bisher 2,3-Butandiolausbeuten von nicht mehr als 57 g/l (637 mM, Produktionsdauer 60 h) berichtet (Nakashimada et al., *J. Bioscience and Bioengineering* (2000) 90: 661-664). Diese Ausbeuten sind für eine wirtschaftliche Produktion bei weitem zu gering. Als minimale Fermentationsausbeute für eine wirtschaftliche Produktion werden >80 g/l 2,3-Butandiol (Fermentationsdauer maximal 72 h), bevorzugt >100 g/l 2,3-Butandiol angesehen.

Eine gängige Definition für den Begriff „biologische Sicherheitsstufe“ und die Einteilung in verschiedene Sicherheitsstufen findet sich z.B. in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“, S. 9ff. (Tabelle 1), Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) (Editor), Public Health Service (U.S.) (Editor), National Institutes of Health (Editor), Herausgeber: U.S. Dept. of Health and Human Services; 5, 5th edition, Revised December 2009 edition (March 15, 2010); ISBN-10: 0160850428.

Groleau et al., Biotechnol. Lett. 7 (1985): 53-58 untersuchten die 2,3-Butandiolproduktion aus Glucose in *Bacillus polymyxa*. 2,3-Butandiol wurde nur so lange produziert, wie das Substrat Glucose verfügbar war (Abbildungen in Groleau et al.). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Sporulation in *Bacillus polymyxa* (gleichbedeutend mit der GDH-Expression) erst einsetzte, nachdem das Glucose Substrat verbraucht war (gleichbedeutend mit dem Ausklingen der 2,3-Butandiolproduktion). Zusammen mit der in Fujita et al., J. Bacteriol. 132 (1977): 282-293, offenbarten Charakterisierung der GDH-Aktivität in sporulierenden *Bacillus* Stämmen ergibt sich für den Fachmann, dass in Stämmen der Gattung *Bacillus* die 2,3-Butandiolproduktion unabhängig von GDH-Aktivität erfolgt und daher auch keine Verbesserung der 2,3-Butandiolproduktion in Gegenwart von GDH-Aktivität zu erwarten war.

Aufgabe der Erfindung war es, Produktionsstämme zur Herstellung von 2,3-Butandiol bereitzustellen, die deutlich höhere 2,3-Butandiolausbeuten ermöglichen als der Ausgangsstamm.

Gelöst wurde die Aufgabe durch einen Produktionsstamm der aus einem Ausgangsstamm herstellbar ist, dadurch gekennzeichnet, dass der Produktionsstamm unter Bedingungen der 2,3-Butandiolproduktion eine Glucose Dehydrogenase Enzymaktivität aufweist, die im Ausgangsstamm nicht oder nur unter physiologischen Bedingungen die verschieden von den Bedingungen der 2,3-Butandiolproduktion sind, vorhanden ist.

Bevorzugt handelt es sich bei der Glucose Dehydrogenase Enzymaktivität um die Enzymaktivität einer NAD-, bzw. NADP-abhängigen Glucose Dehydrogenase (GDH) aus der Enzymklasse EC 1.1.1.47.

In der vorliegenden Erfindung wird unterschieden zwischen einem Ausgangsstamm und einem Produktionsstamm. Beim Ausgangsstamm kann es sich um einen nicht weiter optimierten, aber zur 2,3-Butandiolproduktion befähigten Wildtypstamm oder einen bereits weiter optimierten Wildtypstamm handeln. Bei einem bereits weiter optimierten Wildtypstamm (z.B. durch einen gentechnischen Eingriff erfolgt), ist jedoch nicht die Glucose Dehydrogenase Aktivität von der Optimierung betroffen.

Unter einem Produktionsstamm ist im Sinne der vorliegenden Erfindung ein bezüglich der 2,3-Butandiolproduktion optimierter Ausgangsstamm zu verstehen, der eine Enzymaktivität einer NAD-, bzw. NADP-abhängigen Glucose Dehydrogenase (GDH) vorzugsweise aus der Enzymklasse EC 1.1.1.47 aufweist, die im Ausgangsstamm entweder nicht oder nur unter speziellen physiologischen Bedingungen die verschieden von den Bedingungen der 2,3-Butandiolproduktion sind, vorhanden ist. Eine derartige Bedingung ist beispielsweise die die Sporulation.

Der Produktionsstamm wird vorzugsweise aus dem Ausgangsstamm hergestellt. Wenn ein bereits optimierter Ausgangsstamm durch eine Erhöhung der Glucose Dehydrogenase Aktivität nochmals verbessert werden soll, so ist es natürlich ebenso möglich zunächst in einem unverbesserten Stamm die GDH Aktivität zu erhöhen und anschließend weitere Verbesserungen einzubringen.

Die Erhöhung der Glucose Dehydrogenase Aktivität im Produktionsstamm kann hervorgerufen sein durch eine beliebige Mutation im Genom des Ausgangsstammes, z.B. eine Mutation, welche die Expression eines inaktiven GDH-Gens aktiviert oder eine Mutation, die zur konstitutiven Expression eines ansonsten nur unter spezifischen physiologischen Bedingungen wie z.B. der Sporula-

tion exprimierten GDH-Gens führt oder durch Expression eines homologen oder aber auch heterologen GDH-Gens im Ausgangsstamm.

Bevorzugt ist die Expression eines homologen oder eines hetero-
5 logen GDH-Gens im Ausgangsstamm.

Bevorzugt ist unter einer erhöhten Aktivität des GDH Gens eine um den Faktor 1000 bis 10, besonders bevorzugt um den Faktor 100 bis 10 und insbesondere bevorzugt um den Faktor 10 erhöhte
10 GDH-Aktivität gegenüber dem Ausgangsstamm zu verstehen.

Bei dem Ausgangsstamm kann es sich um einen beliebigen 2,3-Butandiol produzierenden Stamm handeln. Bevorzugt handelt es sich um einen Stamm der Gattung *Klebsiella*, *Raoultella*, *Bacillus*,
15 *Paenibacillus* oder *Lactobacillus*.

Besonders bevorzugt handelt es sich um einen Stamm der Art *Klebsiella* (*Raoultella*) *terrigena*, *Klebsiella* (*Raoultella*) *planticola*, *Bacillus* (*Paenibacillus*) *polymyxa* oder *Bacillus*
20 *licheniformis* wobei ein Stamm der Art *Klebsiella* (*Raoultella*) *terrigena* oder *Klebsiella* (*Raoultella*) *planticola* nochmals bevorzugt ist.

Insbesondere bevorzugt handelt es sich um einen Ausgangsstamm und einen Produktionsstamm eingestuft in der Sicherheitsstufe
25 S1 und von diesen, darüber hinaus bevorzugt, Stämme der Art *Klebsiella* (*Raoultella*) *terrigena* oder *Klebsiella* (*Raoultella*) *planticola*.

30 In der Enzymklasse der Glucose Dehydrogenasen (GDHs) unterscheidet man verschiedene Formen. GDHs, welche unter die Enzymklassifizierung EC 1.1.99.17 eingestuft werden, enthalten Pyrrolochinolin als Enzym-gebundenen Cofaktor (Oubrie et al., EMBO J. 18 (1999): 5187-5194) für die enzymatische Oxidation von
35 Glucose. GDHs der Enzymklasse EC 1.1.99.17 sind teilweise Membranproteine und übertragen die aus der Glucoseoxidation gewonnenen Elektronen auf Ubichinon.

GDHs, welche unter die Enzymklassifizierung EC 1.1.1.47 eingestuft werden, oxidieren Glucose zu δ -Gluconolacton und reduzieren NAD, bzw. NADP zu NADH, bzw. NADPH. Sie wurden beispielsweise beschrieben für Stämme der Gattung *Bacillus*, wo sie in
5 Sporen, bzw. sporulierenden Zellen exprimiert werden (Fujita et al., J. Bacteriol. 132 (1977): 282-293). Die Enzymstabilität isolierter GDH-Enzyme wurde als sehr gering beschrieben und Mutanten mit erhöhter Stabilität isoliert. Ein Beispiel für eine GDH aus *B. subtilis* mit erhöhter chemischer Stabilität ist offenbart in DE102004059376.

Wie in den Beispielen der vorliegenden Anmeldung gezeigt, ist eine (Über)Expression der GDH dazu geeignet, die 2,3-Butandiolausbeute (bestimmt als Volumenausbeute 2,3-Butandiol
15 in g/l) in Schüttelkolben um mehr als 25 %, bevorzugt mehr als 50 % und insbesondere um mehr als 100 % (siehe 4. Beispiel) und in der Fermentation um mehr als 35 %, bevorzugt mehr als 45 % und insbesondere bevorzugt um mehr als 60 % zu steigern.

20 Bei der GDH handelt es sich vorzugsweise um ein Enzym der Enzymklasse EC 1.1.1.47. Es kann sich um jedes genkodierte Enzym handeln, das Glucose oxidiert und dabei NAD, bzw. NADP zu NADH, bzw. NADPH reduziert.

25 In einer bevorzugten Ausführung stammt das Gen der GDH aus einem Bakterium der Gattung *Bacillus*. Besonders bevorzugt stammt das Gen der GDH aus einem Bakterium der Art *Bacillus subtilis*.

Insbesondere bevorzugt ist das Gen einer GDH Mutante der Art
30 *Bacillus subtilis* mit verbesserter chemischer Stabilität wie z. B. in DE102004059376 offenbart.

Der erfindungsgemäße Stamm enthält die Enzymaktivität einer GDH, bevorzugt einer durch rekombinante Expression einer NAD-,
35 bzw. NADP-abhängigen GDH (EC 1.1.1.47) erhaltenen GDH, die es in unerwarteter Weise ermöglicht, die Ausbeute an 2,3-Butandiol signifikant zu steigern. GDH oxidiert Glucose zu Gluconsäure und reduziert NAD, bzw. NADP zu NADH, bzw. NADPH. Das GDH Enzym

kann daher prinzipiell den energetischen Haushalt der Zelle verändern, indem sie zu einer verstärkten Regenerierung von NADH und NADPH Cofaktoren beiträgt. Das Ausmaß dieser Reaktion ist jedoch von der intrazellulären Verfügbarkeit an freier Glucose abhängig. Es ist bekannt, dass Bakterien Glucose fast ausschließlich über das sog. PTS-System als Glucose-6-Phosphat importieren, wo es direkt für die Glykolyse zur Verfügung steht. Glucose-6-Phosphat ist jedoch kein Substrat der GDH und es war zu erwarten, dass der intrazelluläre Spiegel an freier Glucose sehr gering ist. Ein positiver Einfluss einer im Produktionsstamm rekombinant hergestellten GDH auf die 2,3-BDL Produktion war somit für den Fachmann nicht zu erwarten.

Der erfindungsgemäße Stamm ermöglicht neben der Steigerung der 2,3-Butandiol Produktion auch die Steigerung der Ausbeute anderer fermentativ hergestellter Produkte, darunter Acetolactat, Acetoin, Diacetyl, Ethanol, Essigsäure, aber auch Pyruvat, Lactat (Milchsäure), 1,2-Propandiol, 1,3-Propandiol sowie 1,4-Butandiol, 1-Butanol und 2-Butanol.

Ein erfindungsgemäßer Produktionsstamm ist in einer bevorzugten Ausführungsform auch dadurch charakterisiert, dass er aus einem Ausgangsstamm, wie in der Anmeldung definiert, hergestellt wurde und eine GDH in rekombinanter Form produziert mit der Folge, dass seine 2,3-BDL Produktion (Volumenproduktion ausgedrückt in g/l 2,3-BDL) gegenüber dem nicht gentechnisch optimierten Ausgangsstamm um mindestens 30 %, bevorzugt 45 %, besonders bevorzugt 60 % und insbesondere bevorzugt um 100 % gesteigert wird, wobei die 2,3-BDL Ausbeute des Ausgangsstammes mindestens 80 g/l beträgt.

Der erfindungsgemäße Produktionsstamm wird vorzugsweise hergestellt durch Einbringen eines Genkonstruktes in einen der genannten Ausgangsstämme.

Das Genkonstrukt in seiner einfachsten Form ist definiert als bestehend aus dem GDH-Strukturgen, dem, operativ verbunden, ein Promotor vorgeschaltet ist. Gegebenenfalls kann das Genkon-

strukt auch einen Terminator umfassen, der dem GDH-Strukturgen nachgeschaltet ist. Dabei ist die Funktion des Promotors definiert als ein genetisches Element, das die Transkription des GDH-Gens im Wirtsorganismus bewirkt. Die Funktion des Terminators ist definiert als ein genetisches Element, das die Transkription des GDH-Gens im Wirtsorganismus stoppt. Bevorzugt ist ein starker Promotor, der zu einer starken Transkription führt. Unter den starken Promotoren bevorzugt ist der sog. dem Fachmann geläufige Tac-Promotor.

Das Genkonstrukt kann in an sich bekannter Weise in Form eines autonom replizierenden Plasmids vorliegen, wobei die Kopienzahl des Plasmids variieren kann. Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Plasmiden bekannt, die abhängig von ihrer genetischen Struktur in einem gegebenen Produktionsstamm in autonomer Form replizieren können.

Das Genkonstrukt kann jedoch auch im Genom des Produktionsstammes integriert sein, wobei jeder Genort entlang des Genoms als Integrationsort geeignet ist.

Das Genkonstrukt, entweder in Plasmidform oder mit dem Ziel der genomischen Integration, wird in an sich bekannter Weise durch genetische Transformation in den Produktionsstamm eingebracht. Verschiedene Methoden der genetischen Transformation sind dem Fachmann bekannt (Aune and Aachmann, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2010) 85: 1301 - 1313), darunter beispielsweise die Elektroporation.

Zur Selektion transformierter Produktionsstämme enthält das Genkonstrukt, ebenfalls in bekannter Weise, einen sog. Selektionsmarker zur Auswahl von Transformanten mit dem gewünschten Genkonstrukt. Bekannte Selektionsmarker sind ausgewählt aus sog. Antibiotika-Resistenzmarkern oder aus den eine Auxotrophie komplementierenden Selektionsmarkern.

Bevorzugt sind Antibiotika-Resistenzmarker, besonders bevorzugt solche, die Resistenz gegen Antibiotika ausgewählt aus Ampicil-

lin, Tetracyclin, Kanamycin, Chloramphenicol oder Zeocin verleihen.

Ein erfindungsgemäßer Produktionsstamm enthält somit in einer bevorzugten Ausführungsform das Genkonstrukt, entweder in Plasmidform oder in das Genom integriert und produziert ein GDH-Enzym, vorzugsweise eine GDH aus der Enzymklasse EC 1.1.1.47, in rekombinanter Form. Das rekombinante GDH-Enzym ist in der Lage, Glucose zu oxidieren und NAD, bzw. NADP zu NADH, bzw. NADPH zu reduzieren. Nun wurde überraschend gefunden, dass infolge der rekombinanten Expression des GDH-Enzyms im Produktionsstamm die 2,3-Butandiol Ausbeute gegenüber dem Ausgangsstamm, der das GDH-Enzym nicht exprimiert, in signifikanter Weise gesteigert werden kann.

Beim Ausgangsstamm kann es sich um einen nicht weiter optimierten Wildtypstamm handeln. Der Ausgangsstamm kann jedoch bereits vorher optimiert worden sein, bzw. als erfindungsgemäßer GDH-produzierender Produktionsstamm weiter optimiert werden. Die von der Erfindung umfasste Optimierung des Produktionsstammes kann einerseits durch Mutagenese und Selektion von Mutanten mit verbesserten Produktionseigenschaften erfolgen. Die Optimierung kann jedoch auch gentechnisch erfolgen durch zusätzliche Expression eines oder mehrerer Gene, die zur Verbesserung der Produktionseigenschaften geeignet sind. Beispiele solcher Gene sind die bereits genannten 2,3-Butandiol Biosynthesegene Acetolactatsynthase, Acetolactatdecarboxylase und Acetoinreduktase. Diese Gene können in an sich bekannter Weise als jeweils eigene Genkonstrukte oder aber auch kombiniert als eine Expressionseinheit (als sog. Operon) im Produktionsstamm exprimiert werden. So ist beispielsweise bekannt, dass in *Klebsiella terrigena* alle drei Biosynthesegene des 2,3-Butandiols (sog. BUD-Operon, Blomqvist et al., J. Bacteriol. (1993) 175: 1392 - 1404), bzw. in Stämmen der Gattung *Bacillus* die Gene der Acetolactatsynthase und der Acetolactatdecarboxylase in einem Operon organisiert sind (Renna et al., J. Bacteriol (1993) 175: 3863 - 3875).

Weiterhin kann der Produktionsstamm dadurch optimiert werden, dass ein oder mehrere Gene inaktiviert werden, deren Genprodukte sich negativ auf die 2,3-Butandiol Produktion auswirken. Beispiele dafür sind Gene, deren Genprodukte für die Nebenproduktbildung verantwortlich sind. Dazu zählen z. B. die Lactatdehydrogenase (Milchsäurebildung), die Acetaldehyddehydrogenase (Ethanolbildung) oder aber auch die Phosphotransacetylase, bzw. die Acetatkinase (Acetatbildung).

- 10 Weiterhin umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Produktion von 2,3-Butandiol mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Produktionsstammes.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass Zellen eines erfindungsgemäßen, GDH-produzierenden Produktionsstammes in einem Anzuchtmedium kultiviert werden. Dabei wird einerseits Biomasse des Produktionsstammes und andererseits das Produkt 2,3-BDL gebildet. Die Bildung von Biomasse und 2,3-BDL kann dabei zeitlich korrelieren oder aber zeitlich voneinander entkoppelt erfolgen. Die Anzucht erfolgt in einer dem Fachmann geläufigen Weise. Dazu kann die Anzucht in Schüttelkolben (Labormaßstab) erfolgen oder aber auch durch Fermentation (Produktionsmaßstab).

- 25 Bevorzugt ist ein Verfahren im Produktionsmaßstab durch Fermentation, wobei als Produktionsmaßstab ein Fermentationsvolumen größer 10 l besonders bevorzugt und ein Fermentationsvolumen größer 300 l insbesondere bevorzugt ist.

- 30 Anzuchtmedien sind dem Fachmann aus der Praxis der mikrobiellen Kultivierung geläufig. Sie bestehen typischerweise aus einer Kohlenstoffquelle (C-Quelle), einer Stickstoffquelle (N-Quelle) sowie Zusätzen wie Vitaminen, Salzen und Spurenelementen, durch die das Zellwachstum und die 2,3-BDL Produktbildung optimiert werden. C-Quellen sind solche, die vom Produktionsstamm zur 2,3-BDL Produktbildung genützt werden können. Dazu gehören alle Formen von Monosacchariden, umfassend C6-Zucker wie z. B. Glu-

cose, Mannose oder Fructose sowie C5-Zucker wie z.B. Xylose, Arabinose, Ribose oder Galactose.

Das erfindungsgemäße Produktionsverfahren umfasst jedoch auch
5 alle C-Quellen in Form von Disacchariden, insbesondere Saccharose, Lactose, Maltose oder Cellobiose.

Das erfindungsgemäße Produktionsverfahren umfasst weiterhin
auch alle C-Quellen in Form höherer Saccharide, Glycoside oder
10 Kohlehydrate mit mehr als zwei Zuckereinheiten wie z. B. Malto-
dextrin, Stärke, Cellulose, Hemicellulose, Pektin bzw. daraus
durch Hydrolyse (enzymatisch oder chemisch) freigesetzte Mono-
mere oder Oligomere. Dabei kann die Hydrolyse der höheren C-
Quellen dem erfindungsgemäßen Produktionsverfahren vorgeschal-
15 tet sein oder aber in situ während des erfindungsgemäßen Pro-
duktionsverfahrens erfolgen.

Andere verwertbare, von Zuckern oder Kohlehydraten verschiedene
C-Quellen sind Essigsäure (bzw. davon abgeleitete Acetatsalze),
20 Ethanol, Glycerin, Zitronensäure (sowie deren Salze), Milchsäu-
re (sowie deren Salze) oder Pyruvat (und dessen Salze). Es sind
aber auch gasförmige C-Quellen wie Kohlendioxid oder Kohlenmo-
noxid denkbar.

25 Die vom erfindungsgemäßen Produktionsverfahren betroffenen C-
Quellen umfassen sowohl die isolierten Reinsubstanzen oder aber
auch, zur Erhöhung der Wirtschaftlichkeit, nicht weiter aufge-
reinigte Gemische der einzelnen C-Quellen, wie sie als Hydroly-
sate durch chemischen oder enzymatischen Aufschluss der pflanz-
30 lichen Rohstoffe gewonnen werden können. Dazu gehören z. B.
Hydrolysate der Stärke (Monosaccharid Glucose), der Zuckerrübe
(Monosaccharide Glucose, Fructose und Arabinose), des Zucker-
rohrs (Disaccharid Saccharose), des Pektins (Monosaccharid Ga-
lacturonsäure) oder auch der Lignozellulose (Monosaccharid Glu-
35 cose aus Cellulose, Monosaccharide Xylose, Arabinose, Mannose,
Galactose aus Hemicellulose sowie das nicht zu den Kohlehydra-
ten gehörende Lignin). Weiterhin können als C-Quellen auch Ab-

fallprodukte aus dem Aufschluss pflanzlicher Rohstoffe dienen, so z. B. Melasse (Zuckerrübe) oder Bagasse (Zuckerrohr).

Bevorzugte C-Quellen zur Anzucht der Produktionsstämme sind
5 Glucose, Fructose, Saccharose, Mannose, Xylose, Arabinose sowie pflanzliche Hydrolysate, die aus Stärke, Lignozellulose, Zuckerrohr oder Zuckerrübe gewonnen werden können.

Besonders bevorzugte C-Quelle ist Glucose, entweder in isolierter Form oder als Bestandteil eines pflanzlichen Hydrolysats.
10

N-Quellen sind solche, die vom Produktionsstamm zur Biomassebildung genützt werden können. Dazu gehören Ammoniak, gasförmig oder in wässriger Lösung als NH_4OH oder aber auch dessen Salze
15 wie z. B. Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumacetat oder Ammoniumnitrat. Des Weiteren sind als N-Quelle geeignet die bekannten Nitratsalze wie z. B. KNO_3 , NaNO_3 , Ammoniumnitrat, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ sowie andere N-Quellen wie z.B. Harnstoff. Zu den N-Quellen gehören auch komplexe Aminosäuregemische wie z.B. Hefeextrakt, Proteose Pepton, Malzextrakt, Sojapepton, Casaminosäuren, Maisquellwasser (Corn Steep
20 Liquor, flüssig oder aber auch getrocknet als sog. CSD) sowie auch NZ-Amine und Yeast Nitrogen Base.

25 Die Anzucht kann erfolgen im sog. Batch Modus, wobei das Anzuchtmedium mit einer Starterkultur des Produktionsstammes inokuliert wird und dann das Zellwachstum ohne weitere Fütterung von Nährstoffquellen erfolgt.

30 Die Anzucht kann auch erfolgen im sog. Fed-Batch Modus, wobei nach einer anfänglichen Phase des Wachstums im Batch Modus zusätzlich Nährstoffquellen zugefüttert werden (Feed), um deren Verbrauch auszugleichen. Der Feed kann bestehen aus der C-Quelle, der N-Quelle, einem oder mehreren für die Produktion
35 wichtigen Vitaminen, bzw. Spurenelementen oder aus einer Kombination der vorgenannten. Dabei können die Feedkomponenten zusammen als Gemisch oder aber auch getrennt in einzelnen Feedstrecken zudosiert werden. Zusätzlich können auch andere

Medienbestandteile sowie spezifisch die 2,3-BDL Produktion steigernde Zusätze dem Feed zugesetzt sein. Der Feed kann dabei kontinuierlich oder in Portionen (diskontinuierlich) zugeführt werden oder aber auch in Kombination aus kontinuierlichem und
5 diskontinuierlichem Feed. Bevorzugt ist die Anzucht nach dem Fed-Batch Modus.

Bevorzugte C-Quellen im Feed sind Glucose, Saccharose, Melasse, oder pflanzliche Hydrolysate, die aus Stärke, Lignozellulose,
10 Zuckerrohr oder Zuckerrübe gewonnen werden können.

Bevorzugte N-Quellen im Feed sind Ammoniak, gasförmig oder in wässriger Lösung als NH_4OH und dessen Salze Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumacetat und Ammoniumchlorid, weiterhin
15 Harnstoff, KNO_3 , NaNO_3 und Ammoniumnitrat, Hefeextrakt, Proteose Pepton, Malzextrakt, Sojapepton, Casamino-säuren, Maisquellwasser (Corn Steep Liquor) sowie auch NZ-Amine und Yeast Nitrogen Base.

Besonders bevorzugte N-Quellen im Feed sind Ammoniak, bzw. Ammoniumsalze, Harnstoff, Hefeextrakt, Sojapepton, Malzextrakt oder Corn Steep liquor (flüssig oder in getrockneter Form).

Die Anzucht erfolgt unter pH- und Temperaturbedingungen, welche
25 das Wachstum und die 2,3-BDL Produktion des Produktionsstammes begünstigen. Der nützliche pH-Bereich reicht von pH 5 bis pH 8. Bevorzugt ist ein pH-Bereich von pH 5,5 bis pH 7,5. Besonders bevorzugt ist ein pH-Bereich von pH 6,0 bis pH 7.

Der bevorzugte Temperaturbereich für das Wachstum des Produktionsstammes beträgt 20°C bis 40°C . Besonders bevorzugt ist der Temperaturbereich von 25°C bis 35°C .

Das Wachstum des Produktionsstammes kann fakultativ ohne Sauerstoffzufuhr erfolgen (anaerobe Kultivierung) oder aber auch mit Sauerstoffzufuhr (aerobe Kultivierung). Bevorzugt ist die aerobe Kultivierung mit Sauerstoff, wobei die Sauerstoffversorgung durch Eintrag von Pressluft oder reinem Sauerstoff gewährleis-

tet wird. Besonders bevorzugt ist die aerobe Kultivierung durch Eintrag von Pressluft.

Die Kultivierungsdauer zur 2,3-BDL Produktion beträgt zwischen 10 h und 200 h. Bevorzugt ist eine Kultivierungsdauer von 20 h bis 120 h. Besonders bevorzugt ist eine Kultivierungsdauer von 30 h bis 100 h.

Kultivierungsansätze, die durch das oben beschriebene Verfahren gewonnen werden, enthalten das 2,3-BDL Produkt, vorzugsweise im Kulturüberstand. Das in den Kultivierungsansätzen enthaltene 2,3-BDL Produkt kann entweder ohne weitere Aufarbeitung direkt weiterverwendet werden oder aber aus dem Kultivierungsansatz isoliert werden. Zur Isolierung des 2,3-BDL Produkts stehen an sich bekannte Verfahrensschritte zur Verfügung, darunter Zentrifugation, Dekantierung, Filtration, Extraktion, Destillation oder Kristallisation, bzw. Fällung. Diese Verfahrensschritte können dabei in jeder beliebiger Form kombiniert werden, um das 2,3-BDL Produkt in der gewünschten Reinheit zu isolieren. Der dabei zu erzielende Reinheitsgrad ist abhängig von der weiteren Verwendung des 2,3-BDL Produkts.

Verschiedene analytische Methoden zur Identifizierung, Quantifizierung und Bestimmung des Reinheitsgrades des 2,3-BDL Produktes sind verfügbar, darunter NMR, Gaschromatographie, HPLC, Massenspektroskopie oder auch eine Kombination aus diesen Analysemethoden.

Die Figuren zeigen die in den Beispielen genannten Plasmide.

Fig. 1 zeigt den in Beispiel 1 hergestellten 4,1 kb großen GDH Expressionsvektor pGDBS-E96Atet(+).

Fig. 2 zeigt den in Beispiel 1 verwendeten 2,9 kb großen Expressionsvektor pKKj.

Fig. 3 zeigt den in Beispiel 1 hergestellten 3,3 kb großen Expressionsvektor pKKj-tet.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert:

1. Beispiel:

Herstellung des GDH-Expressionsvektors pGDBS-E96Atet(+)

- 5 Verwendet wurde das mutierte GDH-Gen aus *B. subtilis* mit der Bezeichnung GDBS-E96A, wie in DE102004059376 offenbart. GDBS-E96A wurde in einer PCR-Reaktion (Taq DNS-Polymerase, Qiagen) aus dem in DE102004059376 offenbarten Plasmid pGDBS-E96Ayex1 mit den Primern gdbslf und gdbsr als DNS-Fragment von 0,8 kb
10 Größe isoliert.

Primer gdbslf (SEQ ID NO: 1) und gdbsr (SEQ ID NO: 2) hatten folgende DNS-Sequenzen:

- 15 SEQ ID NO: 1:

5'-GCA GAA TTC ATG TAT CCG GAT TTA AAA GG-3'

SEQ ID NO: 2:

5'-CAC CTG CAG TTA ACC GCG GCC TGC CTG GAA TG-3'

20

Das PCR-Produkt wurde mit Eco RI (in Primer gdbsl enthalten) und Pst I (in Primer gdbsr enthalten) nachverdaut und in den Expressionsvektor pKKj-tet kloniert. Dabei entstand der 4,1 kb große GDH-Expressionsvektor pGDBS-E96Atet(+) (Abb. 1).

25

Expressionsvektor pKKj-tet:

pKKj-tet ist ein Derivat des Expressionsvektors pKKj (Abb. 2). Der Expressionsvektor pKKj ist ein Derivat des Expressionsvektors pKK223-3. Die DNS-Sequenz von pKK223-3 ist offenbart in
30 der „GenBank“ Gendatenbank unter der Zugriffsnummer M77749.1. Aus dem 4,6 kb Plasmid wurden ca. 1,7 kb entfernt (bp 262 - 1947 der in M77749.1 offenbarten DNS-Sequenz), wodurch der 2,9 kb Expressionsvektor pKKj entstand.

- 35 Aus pKKj wurde das Ampicillin Resistenzgen als 1 kb Fragment durch Verdau mit Bsp HI entfernt. In das verbliebene 1,9 kb Vektorfragment wurde das Tetracyclin Resistenzgen als 1,45 kb Fragment kloniert.

Das Tetracyclin Resistenzgen war vorher aus dem Plasmid pACYC184 durch PCR (Taq DNS Polymerase, Qiagen) mit den Primern tet3f und tet4r und anschließendem Verdau mit Nco I (Schnittstellen enthalten in den Primern tet3f und tet4r) isoliert worden. Die DNS-Sequenz von pACYC184 ist zugänglich in der „Genbank“ Gendatenbank unter der Zugangsnummer X06403.1. Es entstand der 3,3 kb große Expressionsvektor pKKj-tet (Abb. 3).

Primer tet3f (SEQ ID NO: 3) und tet4r (SEQ ID NO: 4) hatten folgende DNS-Sequenzen:

SEQ ID NO: 3:

5'-CCA TGG CAG TGC AAT TTA TCT CTT C-3'

SEQ ID NO: 4:

5'-CCA TGG GCC AAG GGT TGG TTT GCG CAT TC-3'

2. Beispiel:

Expressionsanalyse in *E. coli*

Plasmid-DNS des Expressionsvektors pGDBS-E96Atet(+) wurde nach an sich bekannten Methoden in den *E. coli* Stamm JM105 transformiert. Als Kontrolle diente *E. coli* JM105, mit dem pKKj-tet Leervektor transformiert. Jeweils ein Klon wurde ausgewählt und in einer Schüttelkolbenanzucht kultiviert. Von den *E. coli*-Stämmen wurde in LBtet-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 µg/ml Tetracyclin) eine Vorkultur hergestellt (Anzucht bei 37°C und 120 rpm über Nacht). Je 2 ml Vorkultur wurden als Inokulum einer Hauptkultur von 100 ml LBtet Medium (300 ml Erlenmeyerkolben) verwendet. Die Hauptkulturen wurden bei 30°C und 180 rpm geschüttelt, bis eine Zelldichte OD₆₀₀ von 2,0 erreicht wurde. Dann wurde der Induktor IPTG (Isopropyl-β-thiogalactosid, 0,4 mM Endkonzentration) zugegeben und über Nacht bei 30°C und 180 rpm geschüttelt.

Zur Analyse der GDH-Produktion wurden 50 ml der E. coli Zellen zentrifugiert (10 min 15000 rpm, Sorvall SS34 Rotor), das Zellpellet in 2 ml KPi-Puffer (0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,0, 0,1 M NaCl) aufgenommen, in an sich bekannter Weise mit einem sog.

5 „French®Press“ Hochdruckhomogenisator (SLM-AMINCO) aufgeschlossen und ein Zellextrakt durch Zentrifugation (15 min 15000 rpm, Sorvall SS34 Rotor) isoliert. Aliquots der Zellextrakte wurden zur spektralphotometrischen Bestimmung der GDH-Aktivität verwendet. Während im Kontrollstamm keine GDH-Aktivität gemessen
10 werden konnte, betrug die spezifische GDH-Aktivität in Zellextrakten 4,9 U/mg Protein.

Spektralphotometrische Bestimmung der GDH-Aktivität:

Der Messansatz von 1 ml Volumen zur photometrischen Bestimmung
15 der GDH-Aktivität war zusammengesetzt aus Messpuffer (0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,0, 0,1 M NaCl), 10 mg/ml Glucose, 2 mM NAD und GDH-haltigem Zellextrakt. Messtemperatur war 25°C. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe der Glucose (aus einer 40-fach konzentrierten Stammlösung) und die Extinktionszunahme in-
20 folge der Bildung von NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen (Extinktionskoeffizient von NADH: $\epsilon = 0,63 \times 10^4 \text{ l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Ein Unit GDH-Aktivität ist definiert als die Bildung von 1 μmol NADH/min unter Testbedingungen.

25 Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde die Proteinkonzentration der Zellextrakte in an sich bekannter Weise mit dem sog. „BioRad Proteinassay“ der Fa. BioRad bestimmt.

3. Beispiel:

30 Expression von GDH in Klebsiella terrigena

Ausgangsstamm war Klebsiella terrigena DSM 2687 (synonyme Stammbezeichnung Raoultella terrigena DSM 2697). Der Stamm Klebsiella (Raoultella) terrigena DSM 2687 ist käuflich erhält-
35 lich bei der DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Die Transformation mit dem Plasmid pGDBS-E96Atet(+) erfolgte in an sich bekannter Weise analog der dem Fachmann geläufigen Methoden zur Transformation von E. coli.

Als Kontrollstamm wurde *Klebsiella terrigena*, mit dem pKKj-tet Vektor transformiert, verwendet.

Transformanten wurden isoliert und durch Schüttelkolbenanzucht auf GDH-Aktivität getestet. Dazu wurden jeweils 50 ml FM2tet-Medium mit einer Transformante beimpft und 24 h bei 30°C und 140 rpm (Infors Schüttler) inkubiert.

FM2tet Medium enthielt Glucose 60 g/l; 10 g/l; Hefeextrakt (Oxoid) 2,5 g/l; Ammoniumsulfat 5 g/l; NaCl 0,5 g/l; $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 75 mg/l; $\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 1 g/l; $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 14,7 mg/l; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,3 g/l; KH_2PO_4 1,5 g/l; Spurenelementemix 10 ml/l und Tetracyclin 15 mg/l. Der pH des FM2tet Mediums wurde vor Beginn der Anzucht auf 6,0 eingestellt.

Der Spurenelementemix hatte die Zusammensetzung H_3BO_3 2,5 g/l; $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,7 g/l; $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ 0,25 g/l; $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ 1,6 g/l; $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,3 g/l und $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 0,15 g/l.

Die Zellen wurden, wie im 2. Beispiel für *E. coli* beschrieben, analysiert. *Klebsiella* Zellen wurden mit der „French@Press“ aufgeschlossen und die Zellextrakte auf GDH-Aktivität untersucht. Die spezifische GDH-Aktivität in Rohextrakten (bestimmt wie im 2. Beispiel beschrieben) betrug zwischen 0,9 und 1,6 U/mg Protein. Im *Klebsiella terrigena* Kontrollstamm konnte keine GDH-Aktivität gemessen werden.

4. Beispiel:

2,3-BDL-Produktion durch Schüttelkolbenanzucht rekombinanter *K. terrigena* Stämme

Die Kultivierung der mit dem Plasmid pGDBS-E96Atet transformierten *K. terrigena* Stämme erfolgte wie im 3. Beispiel beschrieben. Als Kontrollstamm wurde *Klebsiella terrigena*, mit dem pKKj-tet Vektor transformiert (Kontrollstamm aus dem 3. Beispiel), verwendet. Die Kultivierungsdauer betrug jedoch 96 h. Dabei wurde die Glucosekonzentration in Abständen von 24 h bestimmt (Glucoseanalysator 7100MBS der Fa. YSI) und Glucose

bei Bedarf aus einer 40 % (w/v) Stocklösung nachgefüttert. In Abständen von 48 h wurden Proben auf ihren 2,3-BDL Gehalt untersucht. Das Ergebnis der 2,3-BDL Produktion ist in Tabelle 1 dargestellt.

5

Tabelle 1: BDL-Produktion in *Klebsiella terrigena* Transformanten

	K. t. WT- pKKj- tet	K. t. GDBS- E96A #1	K. t. GDBS- E96A #2	K. t. GDBS- E96A #3	K. t. GDBS- E96A #4
Zeit (h)	2,3 BDL (g/l)	2,3 BDL (g/l)	2,3 BDL (g/l)	2,3 BDL (g/l)	2,3 BDL (g/l)
48	27,3	35,8	36,5	34,9	34,8
96	24,4	56,1	57,3	57,0	57,6

- 10 Wie in Tabelle 1 dargestellt, resultierte die Expression des GDH-Gens in *Klebsiella terrigena* in einer unerwartet hohen Steigerung der 2,3-BDL Produktion in der Schüttelkolbenanzucht um ca. 100 %.
- 15 Die Bestimmung des 2,3-Butandiolgehalts in Kulturüberständen erfolgte in an sich bekannter Weise durch ^1H -NMR. Dazu wurde ein Aliquot der Anzucht zentrifugiert (10 min 5000 rpm, Eppendorf Labofuge) und 0,1 ml des Kulturüberstandes mit 0,6 ml TSP (3-(Trimethylsilyl)propionsäure-2,2,3,3- d_4 Natriumsalz) Standardlösung definierten Gehalts (interner Standard, typischerweise 5 g/l) in D_2O gemischt. Die ^1H -NMR Analyse incl. Peak Integration erfolgte entsprechend dem Stand der Technik mit einem Avance 500 NMR-Gerät der Fa. Bruker. Zur quantitativen Analyse wurden die NMR-Signale der Analyten in folgenden Bereichen integriert:
- 25

TSP:	0,140 - 0,145 ppm (9H)
2,3-Butandiol:	1,155 - 1,110 ppm (6H)
Ethanol:	1,205 - 1,157 ppm (3H)
30 Essigsäure:	2,000 - 1,965 ppm (3H)

Acetoin: 2,238 - 2,200 ppm (3H)

5. Beispiel:

2,3-BDL Produktion mit GDH-exprimierenden *K. terrigena* Stämmen
5 durch Fed-Batch Fermentation

Verwendet wurden „Labfors II“ Fermenter der Fa. Infors. Das Arbeitsvolumen betrug 1,5 l (3 l Fermentervolumen). Die Fermenter waren entsprechend dem Stand der Technik mit Elektroden zur
10 Messung des pO₂ und des pH sowie mit einer Schaumsonde ausgerüstet, welche bei Bedarf die Zudosierung einer Antischaumlösung regulierte. Die Werte der Messsonden wurden über ein Computerprogramm aufgezeichnet und graphisch dargestellt. Die Fermentationsparameter Rührerdrehzahl (rpm), Belüftung (Versorgung
15 mit Pressluft in vvm, Volumen Pressluft pro Volumen Fermentationsmedium pro Minute), pO₂ (Sauerstoffpartialdruck, auf einen Anfangswert von 100 % kalibrierter relativer Sauerstoffgehalt), pH und Fermentationstemperatur wurden über ein vom Fermenterhersteller bereitgestelltes Computerprogramm gesteuert und aufgezeichnet. Feed Medium (74 % Glucose, w/v) wurde entsprechend
20 dem Glucoseverbrauch über eine peristaltische Pumpe zudosiert. Zur Kontrolle der Schaumbildung wurde ein alkoxylierter Fettsäureester auf vegetabilischer Basis, käuflich erhältlich unter der Bezeichnung Struktol® J673 bei Schill & Seilacher (20-25 %
25 v/v in Wasser verdünnt), verwendet.

In der Fermentation eingesetzte Stämme waren der *Klebsiella* Wildtyp Stamm, transformiert mit dem Vektor pKKj-tet (Kontrollstamm aus dem 3. Beispiel) und der GDH-produzierende Stamm
30 *K. t.* GDBS-E96A#3 (siehe 4. Beispiel). Batch-Fermentationsmedium war FM2tet Medium (siehe 3. Beispiel).

1,35 l des Mediums wurden mit 150 ml Vorkultur beimpft. Die Vorkultur der zu fermentierenden Stämme wurde durch 24 h Schüttelkolbenanzucht in Batch-Fermentationsmedium hergestellt. Die
35 Fermentationsbedingungen waren: Temperatur 30°C, Rührerdrehzahl 1000 rpm, Belüftung mit 1 vvm, pH 6,0.

In regelmäßigen Abständen wurden dem Fermenter Proben entnommen zur Analyse folgender Parameter:

Die Zelldichte OD_{600} als Maß der gebildeten Biomasse wurde photometrisch bei 600 nm bestimmt (BioRad Photometer SmartSpecTM 3000).

Zur Bestimmung der Trockenbiomasse wurden je Messpunkt in einer Dreifachbestimmung je 1 ml Fermentationsansatz zentrifugiert, das Zellpellet mit Wasser gewaschen und bei 80°C zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Der Glucosegehalt wurde bestimmt wie im 4. Beispiel beschrieben.

Der 2,3-BDL-Gehalt wurde durch NMR bestimmt wie im 4. Beispiel beschrieben.

Nachdem die im Batchmedium vorgelegte Glucose verbraucht war, wurde über eine Pumpe (peristaltische Pumpe 101 U/R der Fa. Watson Marlow) eine 74 % (w/v) Glucoselösung zugefüttert. Die Fütterungsgeschwindigkeit wurde dabei von der aktuellen Glucose Verbrauchsrate bestimmt.

Tabelle 2 zeigt die zeitabhängige 2,3-BDL-Bildung im *K. terrigena* Kontrollstamm und in dem GDH-produzierenden Stamm *Klebsiella terrigena* K. t. GDBS-E96A#3.

Wie bereits in den Schüttelkolbenexperimenten beobachtet (Beispiel 4), führt die Expression des GDH-Enzyms zu einer signifikanten Steigerung der 2,3-Butandiolproduktion um ca. 48 %, bezogen auf die Maximalausbeute bei 72 h Fermentationsdauer.

Tabelle 2

Produktion von 2,3-BDL in *K. terrigena* Stämmen durch Fed-Batch Fermentation

	K. terrigena WT	K. t. GDBS-E96A#3
Zeit	2,3 BDL	2,3 BDL
(h)	(g/l)	(g/l)
23	47,0	68,9
27	61,8	85,3
31	71,3	93,5
47	83,8	106,6
51	86,6	121,4
55	85,3	126,8
71	87,7	129,9

5

6. Beispiel:

2,3-BDL Fermentation im 330 l Maßstab

Fermentiert wurde der Stamm *Klebsiella terrigena* pGDBS-E96A#3
(siehe 4. und 5. Beispiel).

10

Herstellung eines Inokulums für den Vorfermenter: Ein Inokulum von *Klebsiella terrigena* pGDBS-E96A#3 in LBtet Medium (siehe 2. Beispiel) wurde hergestellt, indem 2 x 100 ml LBtet Medium, jeweils in einem 1 l Erlenmeyerkolben, mit jeweils 0,25 ml einer Glycerinkultur (Über-Nacht Kultur des Stammes in LBtet Medium, mit Glycerin in einer Endkonzentration von 20 % v/v versetzt und bei -20°C aufbewahrt) beimpft wurden. Die Anzucht erfolgte für 7 h bei 30°C und 120 rpm auf einem Infors Orbitalschüttler (Zelldichte OD₆₀₀/ml von 0,5 - 2,5). 100 ml der Vorkultur wurden zum Beimpfen von 8 l Fermentermedium verwendet. Beimpft wurden zwei Vorfermenter mit je 8 l Fermentermedium.

15

20

Vorfermenter: Die Fermentation wurde in zwei Biostat® C-DCU 3 Fermentern der Firma Sartorius BBI Systems GmbH durchgeführt. Fermentationsmedium war FM2tet (siehe 3. Beispiel). Die Fermentation erfolgte im sog. Batch Modus.

25

2 x 8 l FM2tet wurden mit je 100 ml Inokulum beimpft. Fermentationstemperatur war 30°C. pH der Fermentation war 6,0 und wurde mit den Korrekturmitteln 25 % NH₄OH, bzw. 6 N H₃PO₄ konstant gehalten. Die Belüftung erfolgte mit Pressluft bei einem konstanten Durchfluss von 1 vvm. Der Sauerstoffpartialdruck pO₂ wurde auf 50% Sättigung eingestellt. Die Regulierung des Sauerstoffpartialdruckes erfolgte über die Rührgeschwindigkeit (Rührerdrehzahl 450 - 1.000 rpm). Zur Kontrolle der Schaumbildung wurde Struktol® J673 (20-25 % v/v in Wasser) verwendet. Nach 18 h Fermentationsdauer (Zelldichte OD₆₀₀/ml von 30 - 40) wurden die beiden Vorfermenter als Inokulum für den Hauptfermenter verwendet.

Hauptfermenter: Die Fermentation wurde in einem Biostat® D 500 Fermenter (Arbeitsvolumen 330 l, Kesselvolumen 500 l) der Firma Sartorius BBI Systems GmbH durchgeführt. Fermentationsmedium war FM2tet (siehe 3. Beispiel). Die Fermentation erfolgte im sog. Fed-Batch Modus.

180 l FM2tet wurden mit 16 l Inokulum beimpft. Fermentationstemperatur war 30°C. pH der Fermentation war 6,0 und wurde mit den Korrekturmitteln 25 % NH₄OH, bzw. 6 N H₃PO₄ konstant gehalten. Die Belüftung erfolgte mit Pressluft bei einem konstanten Durchfluss von 1 vvm (siehe 4. Beispiel, bezogen auf das Anfangsvolumen). Der Sauerstoffpartialdruck pO₂ wurde auf 50% Sättigung eingestellt. Die Regulierung des Sauerstoffpartialdruckes erfolgte über die Rührgeschwindigkeit (Rührerdrehzahl 200 - 500 rpm). Zur Kontrolle der Schaumbildung wurde Struktol® J673 (20-25 % v/v in Wasser) verwendet. Im Verlauf der Fermentation wurde der Glucoseverbrauch durch off-line Glucose-Messung mit einem Glucose-Analysator der Fa. YSI bestimmt (siehe 4. Beispiel). Sobald die Glukosekonzentration der Fermentationsansätze ca. 20 g/l betrug (8 - 10 h nach Inokulation), wurde die Zudosierung einer 60% w/w Glucose Feedlösung gestartet. Die Flußrate des Feeds wurde so gewählt, dass während der Produktionsphase eine Glukosekonzentration von 10 - 20 g/l eingehalten werden konnte. Nach Beendigung der Fermentation betrug das Volumen im Fermenter 330 l.

Die Analyse der Fermentationsparameter erfolgte wie im 5. Beispiel beschrieben. Der Produktionsverlauf ist in Tabelle 4 dargestellt. Die erzielte Ausbeute an 2,3-Butandiol wurde gegenüber dem Kontrollstamm aus Beispiel 5 um 60 % gesteigert.

Tabelle 4

Produktion von 2,3-BDL durch Fed-Batch Fermentation im 330 l Maßstab

10

Zeit (h)	K. t. GDBS-E96A#3
	2,3 BDL (g/l)
24	65,1
27	73,7
31	85,4
48	108,3
51	112,8
55	119,4
72	141,0

Patentansprüche:

1. Produktionsstamm zur Herstellung von 2,3-Butandiol herstellbar aus einem Ausgangsstamm, dadurch gekennzeichnet,
5 dass der Produktionsstamm unter Bedingungen der 2,3-Butandiolproduktion eine Glucose Dehydrogenase Enzymaktivität aufweist, die im Ausgangsstamm nicht oder nur unter physiologischen Bedingungen die verschieden von den Bedingungen der 2,3-Butandiolproduktion sind, vorhanden ist.
- 10 2. Produktionsstamm gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Glucose Dehydrogenase um ein Enzym der Enzymklasse EC 1.1.1.47 handelt.
- 15 3. Produktionsstamm gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Glucose Dehydrogenase Aktivität im Produktionsstamm durch Expression eines für das Glucose Dehydrogenaseenzym kodierenden Gens erreicht wird.
- 20 4. Produktionsstamm gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Stamm der Gattung Klebsiella, Raoultella, Bacillus, Paenibacillus oder Lactobacillus handelt, wobei ein Stamm der Art Klebsiella (Raoultella) terrigena, Klebsiella (Raoultella)
25 planticola, Bacillus (Paenibacillus) polymyxa oder Bacillus licheniformis bevorzugt ist und ein Stamm der Art Klebsiella (Raoultella) terrigena oder Klebsiella (Raoultella) planticola besonders bevorzugt ist und es sich insbesondere bevorzugt um einen Stamm der Sicherheitsstufe S1
30 handelt.
5. Produktionsstamm gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Gen der Glucose Dehydrogenase aus einem Bakterium der Gattung Bacillus, bevorzugt
35 aus einem Bakterium der Art Bacillus subtilis stammt.
6. Produktionsstamm gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass er aus einem nicht gentech-

nisch optimierten Ausgangsstamm hergestellt wurde und eine Glucose Dehydrogenase in rekombinanter Form produziert mit der Folge, dass seine 2,3-BDL Produktion gegenüber dem nicht gentechnisch optimierten Ausgangsstamm um mindestens 30 %, bevorzugt 45 %, besonders bevorzugt 60 % und insbesondere bevorzugt um 100 % gesteigert wird, wobei die 2,3-Butandiol Ausbeute des Ausgangsstammes mindestens 80 g/l beträgt.

7. Verfahren zur Herstellung von 2,3-Butandiol, dadurch gekennzeichnet, dass ein Produktionsstamm gemäß Anspruch 1 bis 6 in einem Anzuchtmedium kultiviert wird.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kultivierung in einem pH-Bereich von pH 5 bis pH 8 und einem Temperaturbereich von 20°C bis 40°C und anaerob oder aerob mit einer Sauerstoffversorgung durch Eintrag von Pressluft oder reinem Sauerstoff erfolgt und eine Kultivierungsdauer zur 2,3-BDL Produktion zwischen 10 h und 200 h vorliegt.

9. Verfahren gemäß Anspruch 7, oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kultivierung in einem Fermentationsvolumen größer als 300 l erfolgt.

Fig. 1

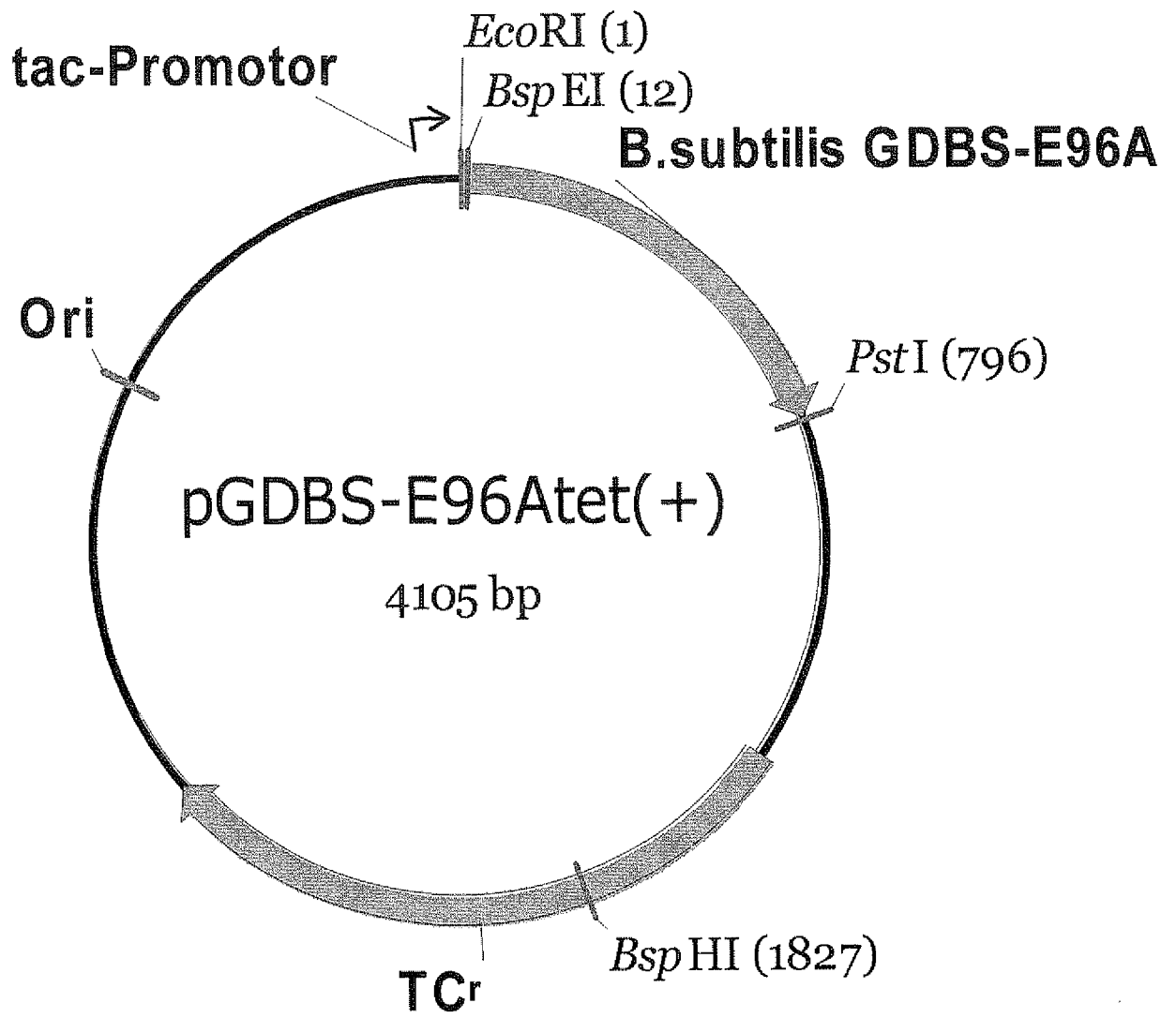


Fig. 2

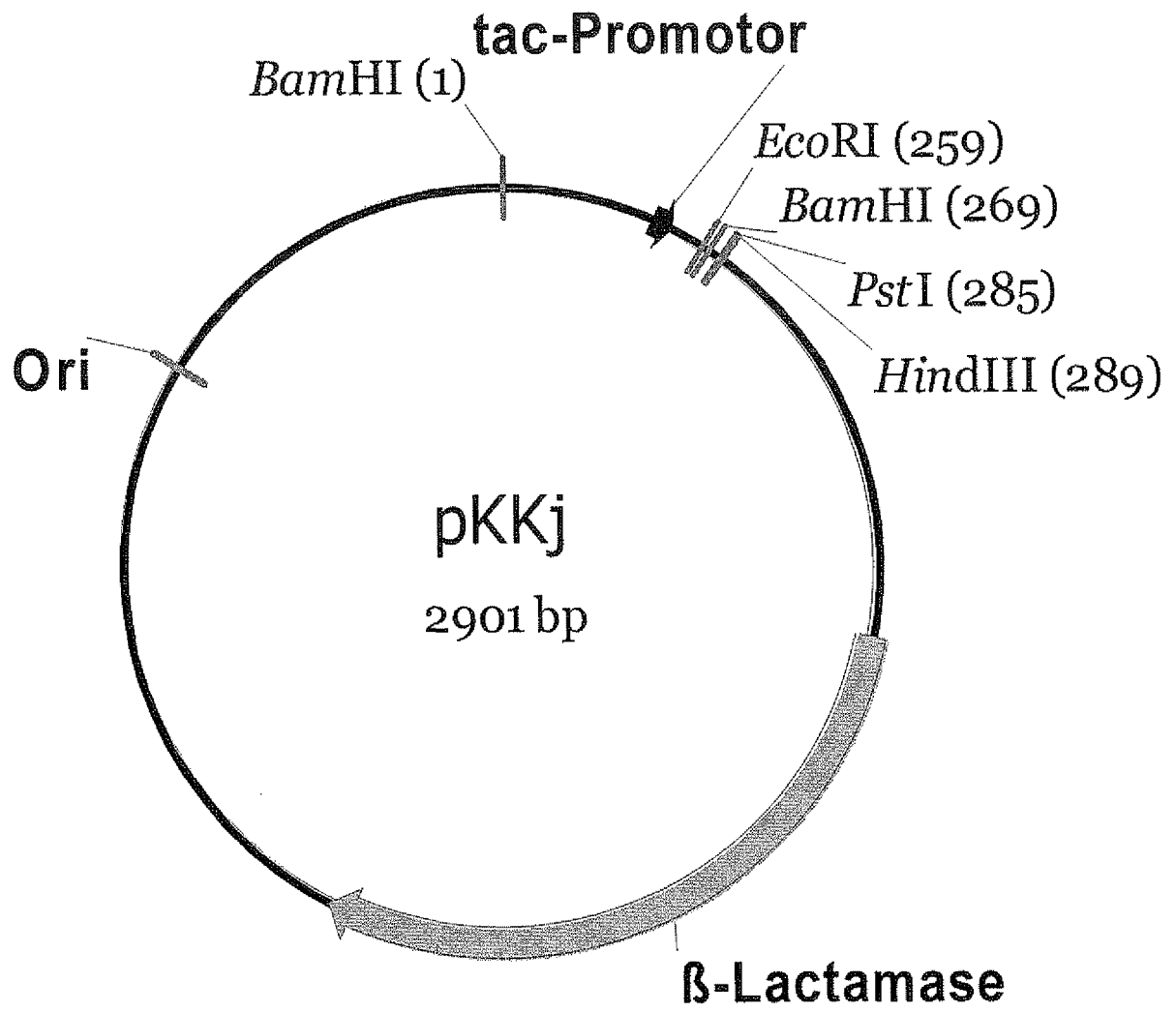
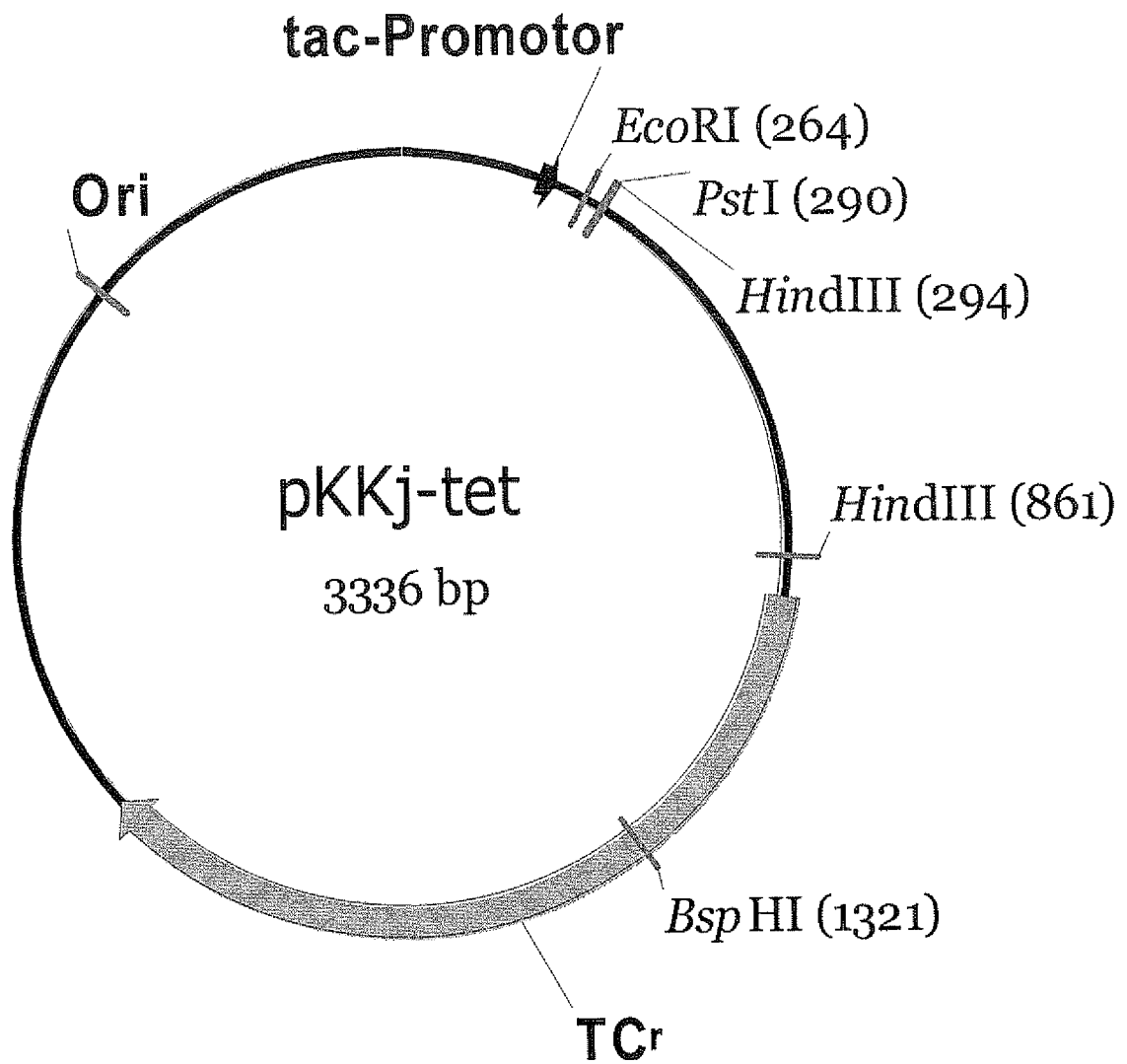


Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/051406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N1/21 C12N9/04 C12P7/18
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 C12Y

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, FSTA, 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 2006/061137 A1 (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND [DE]; PFALLER RUPERT [DE]) 15 June 2006 (2006-06-15) cited in the application	1-3,5,6
Y	the whole document	1-9
Y	----- CELINSKA E ET AL: "Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, vol. 27, no. 6, 1 November 2009 (2009-11-01), pages 715-725, XP027205958, ISSN: 0734-9750 [retrieved on 2009-05-12] cited in the application the whole document Absätze 4, 7 ----- -/-	1-9



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 document 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

19 April 2012

Date of mailing of the international search report

26/04/2012

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

van de Kamp, Mart

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/051406

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/014544 A2 (JULICH CHIRAL SOLUTIONS GMBH [DE]; DAUSSMANN THOMAS [DE]) 8 February 2007 (2007-02-08) page 7, lines 1-14 examples 1,5 claims 2,10	1-9
Y	----- EP 1 262 550 A2 (DAICEL CHEM [JP]) 4 December 2002 (2002-12-04) the whole document paragraphs [0087], [0088], [0090] examples 16,17	1-9
Y	----- WECKBECKER ANDREA ET AL: "Glucose dehydrogenase for the regeneration of NADPH and NADH", 1 January 2005 (2005-01-01), MICROBIAL ENZYMES AND BIOTRANSFORMATIONS, HUMANA PRESS, US, PAGE(S) 225 - 237, XP009139098, ISBN: 978-1-58829-253-7 the whole document	1-9
A	----- BLOMQUIST K ET AL: "CHARACTERIZATION OF THE GENES OF THE 2,3-BUTANEDIOL OPERONS FROM KLEBSIELLA TERRIGENA AND ENTEROBACTER AEROGENES", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 175, no. 5, 1 March 1993 (1993-03-01) , pages 1392-1404, XP000577596, ISSN: 0021-9193 the whole document	4
A	----- QIN J ET AL: "Production of 2,3-Butanediol by Klebsiella Pneumoniae Using Glucose and Ammonium Phosphate", CHINESE JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING, vol. 14, no. 1, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 132-136, XP022856384, ISSN: 1004-9541 [retrieved on 2006-02-01] the whole document table 2	6
A	----- JI X J ET AL: "Enhanced 2,3-butanediol production by Klebsiella oxytoca using a two-stage agitation speed control strategy", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 100, no. 13, 1 July 2009 (2009-07-01) , pages 3410-3414, XP026063298, ISSN: 0960-8524 [retrieved on 2009-03-17] the whole document ----- -/--	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/051406

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOHANSEN ET AL: "Physiological and biochemical role of the butanediol pathway in Aerobacter (Enterobacter) aerogenes.", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 123, no. 3, 1 September 1975 (1975-09-01), pages 1124-1130, XP55024667, ISSN: 0021-9193 the whole document page 1129 - page 1130 -----	1-9
T	ZHI-KUI NIE ET AL: "An Effective and Simplified Fed-Batch Strategy for Improved 2,3-Butanediol Production by Klebsiella oxytoca", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 163, no. 8, 1 April 2011 (2011-04-01), pages 946-953, XP55024045, ISSN: 0273-2289 the whole document -----	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/051406

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006061137 A1	15-06-2006	DE 102004059376 A1	22-06-2006
		WO 2006061137 A1	15-06-2006
WO 2007014544 A2	08-02-2007	DE 102005036880 A1	08-02-2007
		WO 2007014544 A2	08-02-2007
EP 1262550 A2	04-12-2002	EP 1262550 A2	04-12-2002
		JP 4630486 B2	09-02-2011
		JP 2002345479 A	03-12-2002
		US 2003032153 A1	13-02-2003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12N1/21 C12N9/04 C12P7/18 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C12P C12Y		
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, BIOSIS, Sequence Search, FSTA, 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 2006/061137 A1 (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND [DE]; PFALLER RUPERT [DE]) 15. Juni 2006 (2006-06-15) in der Anmeldung erwähnt	1-3,5,6
Y	das ganze Dokument	1-9
Y	----- CELINSKA E ET AL: "Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, Bd. 27, Nr. 6, 1. November 2009 (2009-11-01), Seiten 715-725, XP027205958, ISSN: 0734-9750 [gefunden am 2009-05-12] in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument Absätze 4, 7 ----- -/-	1-9
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"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)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"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</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 19. April 2012		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 26/04/2012
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 van de Kamp, Mart

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 2007/014544 A2 (JULICH CHIRAL SOLUTIONS GMBH [DE]; DAUSSMANN THOMAS [DE]) 8. Februar 2007 (2007-02-08) Seite 7, Zeilen 1-14 Beispiele 1,5 Ansprüche 2,10	1-9
Y	----- EP 1 262 550 A2 (DAICEL CHEM [JP]) 4. Dezember 2002 (2002-12-04) das ganze Dokument Absätze [0087], [0088], [0090] Beispiele 16,17	1-9
Y	----- WECKBECKER ANDREA ET AL: "Glucose dehydrogenase for the regeneration of NADPH and NADH", 1. Januar 2005 (2005-01-01), MICROBIAL ENZYMES AND BIOTRANSFORMATIONS, HUMANA PRESS, US, PAGE(S) 225 - 237, XP009139098, ISBN: 978-1-58829-253-7 das ganze Dokument	1-9
A	----- BLOMQUIST K ET AL: "CHARACTERIZATION OF THE GENES OF THE 2,3-BUTANEDIOL OPERONS FROM KLEBSIELLA TERRIGENA AND ENTEROBACTER AEROGENES", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 175, Nr. 5, 1. März 1993 (1993-03-01), Seiten 1392-1404, XP000577596, ISSN: 0021-9193 das ganze Dokument	4
A	----- QIN J ET AL: "Production of 2,3-Butanediol by Klebsiella Pneumoniae Using Glucose and Ammonium Phosphate", CHINESE JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING, Bd. 14, Nr. 1, 1. Februar 2006 (2006-02-01), Seiten 132-136, XP022856384, ISSN: 1004-9541 [gefunden am 2006-02-01] das ganze Dokument Tabelle 2	6
A	----- JI X J ET AL: "Enhanced 2,3-butanediol production by Klebsiella oxytoca using a two-stage agitation speed control strategy", BIORESOURCE TECHNOLOGY, Bd. 100, Nr. 13, 1. Juli 2009 (2009-07-01), Seiten 3410-3414, XP026063298, ISSN: 0960-8524 [gefunden am 2009-03-17] das ganze Dokument	6
	----- -/--	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JOHANSEN ET AL: "Physiological and biochemical role of the butanediol pathway in Aerobacter (Enterobacter) aerogenes.", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 123, Nr. 3, 1. September 1975 (1975-09-01), Seiten 1124-1130, XP55024667, ISSN: 0021-9193 das ganze Dokument Seite 1129 - Seite 1130	1-9
T	----- ZHI-KUI NIE ET AL: "An Effective and Simplified Fed-Batch Strategy for Improved 2,3-Butanediol Production by Klebsiella oxytoca", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 163, Nr. 8, 1. April 2011 (2011-04-01), Seiten 946-953, XP55024045, ISSN: 0273-2289 das ganze Dokument -----	6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/051406

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2006061137 A1	15-06-2006	DE 102004059376 A1	22-06-2006
		WO 2006061137 A1	15-06-2006
WO 2007014544 A2	08-02-2007	DE 102005036880 A1	08-02-2007
		WO 2007014544 A2	08-02-2007
EP 1262550 A2	04-12-2002	EP 1262550 A2	04-12-2002
		JP 4630486 B2	09-02-2011
		JP 2002345479 A	03-12-2002
		US 2003032153 A1	13-02-2003