(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
1. März 2012 (01.03.2012)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/025629 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12P 7/24 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/064762

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. August 2011 (26.08.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
61/377,237 26. August 2010 (26.08.2010) US
10 2010 039 833.0
26. August 2010 (26.08.2010) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **SYMRISE AG** [DE/DE]; Mühlenfeldstraße 1, 37603 Holzminden (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **KÄHNE, Fenja** [DE/DE]; In der Römerstadt 185, 60439 Frankfurt am Main (DE). **BUCHHAUPT, Markus** [DE/DE]; An der Rosenhelle 2c, 61138 Niederdorfelden (DE). **SCHRADER, Jens** [DE/DE]; Spenerstr. 23, 60320 Frankfurt am Main (DE).

(74) Anwalt: **EISENFÜHR SPEISER & PARTNER**; Postfach 10 60 78, 28060 Bremen (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, 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, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

WO 2012/025629 A1

(54) **Title**: WHOLE-CELL BIOTRANSFORMATION OF FATTY ACIDS TO OBTAIN FATTY ALDEHYDES SHORTENED BY ONE CARBON ATOM

(54) **Bezeichnung** : GANZZELL-BIOTRANSFORMATION VON FETTSÄUREN ZU DEN UM EIN KOHLENSTOFFATOM VERKÜRZTEN FETTALDEHYDEN

(57) **Abstract**: The invention relates to the field of producing aliphatic aldehydes having 5 to 31 carbon atoms, in particular by the microbial conversion of corresponding aliphatic fatty acids having 6 to 32 carbon atoms. The invention also relates to enzymes for catalyzing such a conversion reaction and to nucleic acids coding for same.

(57) **Zusammenfassung**: Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Herstellung aliphatischer Aldehyde mit 5 bis 31 Kohlenstoffatome, insbesondere durch mikrobielle Umsetzung entsprechender aliphatischer Fettsäuren mit 6 bis 32 Kohlenstoffatomen. Die Erfindung betrifft auch Enzyme zum Katalysieren einer solchen Umsetzungsreaktion sowie dafür codierende Nukleinsäuren.

Ganzzell-Biotransformation von Fettsäuren zu den um ein Kohlenstoffatom verkürzten Fettaldehyden

Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Herstellung aliphatischer Aldehyde mit 5 bis 31 Kohlenstoffatome, insbesondere durch mikrobielle Umsetzung entsprechender aliphatischer Fettsäuren mit 6 bis 32 Kohlenstoffatomen. Die Erfindung betrifft auch Enzyme zum Katalysieren einer solchen Umsetzungsreaktion sowie dafür codierende Nukleinsäuren.

Die enzymatische Herstellung von Aldehyden ist dem Grunde nach bereits bekannt. So beschreiben Muller et al. in US 5464761 unter anderem die Herstellung aliphatischer Aldehyde aus Linolsäure. Ebenfalls bekannt ist die Herstellung von C6-C10 Aldehyden aus ungesättigten Triacylglyceriden (EP 1244364 B1) mittels Lipoxygenasen, dabei entstehen jedoch Aldehydgemische.

Binder beschreibt in „Enzymatic method of making aldehydes from fatty acids“. 2009, Archer-Daniels-Midland Company, die Umsetzung von pflanzlichen und tierischen Fette zu den korrespondierenden Aldehyden durch eine Fettsäure-Reduktase. Diese Umsetzung ist jedoch abhängig von Cofaktoren zur Aktivierung der Fettsäure durch die Bildung

von Acyl-AMP, sie lässt sich daher schwerlich im Produktionsmaßstab statt im Labormaßstab durchführen.

Saffert et al. beschreiben in „A dual function alpha-dioxygenase-peroxidase and NAD(+) oxidoreductase active enzyme from germinating pea rationalizing alpha-oxidation of fatty acids in plants“, Plant Physiol, 2000, 1545-52, die Umsetzung von Hexadecansäure zu 2-Hydroperoxyhexadecansäure und 2-Hydroxyhexadecansäure durch eine gereinigte alpha-Dioxygenase, dabei wurden als Nebenprodukte Pentadecansäure und, geringfügig, Pentadecanal beobachtet.

Ferner bekannt ist die Umsetzung von Linolensäure, Linolsäure und Ölsäure zu den entsprechenden Hydroxysäuren sowie den entsprechend um 1 Kohlenstoffatom verkürzten Fettsäuren und Aldehyden (Hamberg et al., „alpha-oxidation of fatty acids in higher plants“. J Biol Chem 1999, 24503-24513), dabei erfolgte die Umsetzung mit einem Protein-Rohextrakt aus Insektenzellen, die eine pathogen-induzierbare Oxygenase („PIOX“) heterolog exprimierten.

Nachteilig an herkömmlichen Verfahren ist jedoch, dass darin aus Zellen isolierte und ggf. aufgereinigte Enzyme verwendet werden müssen. Dies macht die Verfahren aufwendig, indem sie zusätzliche Schritte für das Isolieren und ggf. für das Aufreinigen des jeweiligen Enzyms erfordern, und weitere Maßnahmen erforderlich sind, das isolierte und/oder aufgereinigte Enzym zu stabilisieren. Bei einem großtechnischen Verfahren müsste das isolierte und/oder aufgereinigte Enzym zusätzlich immobilisiert werden, oder es müssten Einrichtungen vorgesehen werden, um nach Durchführen der Umsetzung das Enzym aus dem Reaktionsansatz rückzugewinnen. Nachteilig ist ferner, dass wie oben beschrieben in einigen Fällen Co-Faktoren zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (NAD(P)H) und/oder zur Bereitstellung von Energie (ATP) benötigt werden, so dass die Anforderungen für das Einhalten optimaler oder zumindest großtechnisch brauchbarer Reaktionsbedingungen zusätzlich verkompliziert werden.

Die US 7491854 B2 zeigt ein Ganzzell-Biotransformationsverfahren zum Herstellen von Aldehyden aus Fettsäure. Dabei wird Oleinsäure durch E. coli-Zellen, die heterolog eine Nocardia-Karbonsäurereduktase exprimieren, während eines Wachstumszeitraums von 24 Stunden unter anderem zum entsprechenden Aldehyd umgesetzt. Für eine entsprechende In vitro-Umsetzung wurden als Co-Faktoren ATP und NADPH benötigt. Die Umsetzung in einem Ganzzell-Biotransformationsverfahren kann deshalb ebenfalls nur

mit wachsenden Zellen durchgeführt werden, die entsprechend ATP und NADPH bilden können. Dies hat auch zur Folge, dass ein Teil der eingesetzten Fettsäure von den wachsenden Zellen beispielsweise im Rahmen der Beta-Oxidation verstoffwechselt wird und somit nicht für die Herstellung eines Aldehyds zur Verfügung steht.

Nachteilig ist ferner, dass bei einer Umsetzung mit einer Karbonsäurereduktase wie in der US 7491854 B2 beschrieben die Kettenlänge der Fettsäure auch die Kettenlänge des Aldehyds ist. Viele wirtschaftlich interessante Aldehyde besitzen eine ungerade Anzahl an Kohlenstoffatomen; Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen sind jedoch im Regelfalle deutlich teurer als nächstlängere bzw. nächstkürzere geradzahlige Fettsäuren.

Es war deshalb die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, den oben beschriebenen Nachteilen abzuhelfen und ein Verfahren zum Herstellen von Aldehyden aus Fettsäuren anzugeben. Ferner sollen Nucleinsäuren, Enzyme und Mikroorganismen zum Durchführen eines solchen Verfahrens bereitgestellt werden.

Erfindungsgemäß wird deshalb ein Verfahren zum Herstellen eines Aldeyhds mit 5 bis 31 Kohlenstoffatomen bereitgestellt, umfassend die Schritte:

a) Bereitstellen von Mikroorganismenzellen enthaltend eine Dioxygenase,

b) Beaufschlagen der Mikroorganismenzellen mit einem Umsetzungsmedium enthaltend eine Fettsäure mit 6 bis 32 Kohlenstoffatomen, und

c) Umsetzen der Fettsäure zum Aldehyd durch die Dioxygenase.

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass auch bei Verwendung intakter Mikroorganismenzellen wie beispielsweise E. coli in wirtschaftlich erheblichem Maße Fettsäuren in die Mikroorganismenzellen transportiert werden, ohne unmittelbar der Beta-Oxidation zugeführt zu werden. Bisher war erwartet worden, dass Fettsäuren hauptsächlich durch eine Acyl-CoA-Synthetase durch die innere Zellmembran transportiert werden. Dieses Enzym setzt jedoch die zu transportierende Fettsäure zum entsprechenden CoA-Thioester um, so dass dieser Fettsäuretransport für die Mikroorganismenzelle energieaufwendig ist; zum anderen werden CoA-Fettsäurethioester unmittelbar der Beta-Oxidation zugeführt und in wachsenden Zellen entsprechend abgebaut, so dass kein

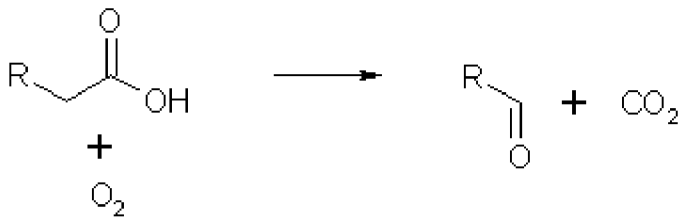
brauchbares Aldehyd gebildet wird. Überraschenderweise hat sich nun herausgestellt, dass beispielsweise in E. coli ein zweiter Fettsäuretransportweg neben dem durch die Acyl-CoA-Synthetase vermittelten Transportweg zur Verfügung stehen muss, mit dem Fettsäuren auch von beispielsweise ruhenden Zellen aufgenommen und der Dioxygenase zugänglich gemacht werden können.

Es ist deshalb nunmehr auch in wirtschaftlich relevanten Verfahren möglich, also jenseits des Labormaßstabs, durch eine Biotransformation Aldehyde aus entsprechenden Fettsäuren herzustellen, ohne dabei auf ein energiereiches CoA-Coenyzm zurückgreifen zu müssen und der jeweiligen Mikroorganismenzelle entsprechend Energie zuzuführen, beispielsweise durch Beta-oxidativen Abbau der Fettsäure.

Das erfindungsgemäße Verfahren vermeidet so auch die Notwendigkeit eines Zellaufschlusses und einer Aufreinigung der Dioxygenase. Nachteilig an einem Zellaufschluss wäre insbesondere, dass dabei ein komplexes Medium entsteht, in dem verschiedenste kaum steuerbare Reaktionen ablaufen und aus dem die Produktgewinnung unnötig kompliziert wird. Bei einer erfindungsgemäßen Ganzzell-Biotransformation lassen sich hingegen die verwendeten Mikroorganismen ohne Weiteres vom umgebenden Medium abtrennen. Zudem können sie nach Abtrennung vom umgebenden Medium einem weiteren Biotransformations-Ansatz zugeführt werden, so dass die Rückgewinnung der Dioxygenase im Vergleich mit einem entsprechenden Verfahren unter Verwendung eines isolierten und/oder aufgereinigten Enzyms deutlich vereinfacht und mit geringeren Kosten versehen ist. Darüber hinaus wird das Produkt, also das entsprechende Aldehyd, bei geeigneter Verfahrensführung in das Medium abgegeben, sodass das Produkt für eine Aufreinigung leichter zugänglich ist.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Mikroorganismenzelle eine Zelle mit intakter Zellmembran; die erfindungsgemäß eingesetzten Mikroorganismenzellen können also mit üblichen Kultivierungsverfahren wachsen gelassen werden und in dieser Form, ohne zusätzliches Perforieren der Zellmembran, eingesetzt werden.

Eine Dioxygenase im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Enzym, das die Umsetzung einer Karboxcylgruppe mit O_2 katalysiert. Besonders bevorzugt und für die Zwecke der vorliegenden Erfindung stets zumindest auch gemeint sind Alpha-Dioxygenasen. Diese katalysieren die Umsetzung einer Karbonsäure gemäß nachfolgendem Schema:



wobei R für den Rest der Fettsäure steht. Alpha-Dioxygenasen katalysieren daher die Umsetzung einer Fettsäure zu einem entsprechenden um 1 C-Atom verkürzten Aldehyd (vgl. Saffert et al., a.a.O.).

Die in einem erfindungsgemäßen Verfahren umgesetzten Fettsäuren sind vorzugsweise aliphatische Fettsäuren. Sie können verzweigt oder unverzweigt sein. Ferner können sie gesättigt oder ungesättigt sein. Sie können ferner ungesättigt oder gesättigt sein und dabei 1-5 Substituenten tragen, wobei die Substituenten jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Hydroxy, C1-C10-Alkyl, C1-C10-Alkoxy, C6-C10-Aryl, Phenyl-C1-C5-Alkyl und Phenyl-C1-C5-Alkenyl, wobei das alpha-C-Atom der Fettsäure keinen solchen Substituenten trägt.

Vorzugsweise ist die Fettsäure zum Bilden des Aldehyds ausgewählt aus:

Fettsäure	zum Bilden von
n-Heptansäure	n-Hexanal
n-Nonansäure	n-Octanal
n-Decansäure	n-Nonanal
n-Undecansäure	n-Decanal
n-Dodecansäure	n-Undecanal
n-Tridecansäure	n-Dodecanal
n-Tetradecansäure	n-Tridecanal
n-Hexadecansäure	n-Pentadecanal
3-Methyl-Undecansäure	2-Methyldecanal
3-Methyl-Dodecansäure	2-Methylundecanal

trans-3-Heptensäure	trans-2-Hexenal
cis-5-Octansäure	cis-4-Heptenal
3,7-Dimethyl-6-Octensäure	2,6-Dimethyl-5-Hepten-1-al
11-Dodecensäure	10-Undecenal
3,7,11-Trimethyl-6,10-Dodecadiensäure	2,6,10-Trimethyl-5,9-undecadienal
4,8-Dimethyl-7-nonen-1-säure	Citronellal
n-Heptadecansäure	n-Hexadecanal
n-Octadecansäure	n-Heptadecanal
n-Nonadecansäure	n-Octadecanal

Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung sind insbesondere folgende Fettsäuren bevorzugt:

Fettsäure	Zugehöriger Aldehyd
n-Hexadecansäure (Palmitinsäure)	n-Pentadecanal
n-Tetradecansäure (Myristinsäure)	n-Tridecanal
n-Dodecansäure (Laurinsäure)	n-Undecanal
n-Decansäure (Caprinsäure)	n-Nonanal

Die Verwendung einer Alpha-Dioxygenase ermöglicht also auf vorteilhaft einfache Weise die Herstellung eines Aldehyds mit einer bezogen auf die eingesetzte Fettsäure um 1 Kohlenstoffatom verringerten Kettenlänge. Damit ist dieses Verfahren besonders geeignet zum Herstellen von Aldehyden mit einem ungeradzahligen Kohlenstoffrückgrat. Dementsprechend lassen sich aus preiswert erhältlichen Fettsäuren mit gerader Anzahl an Kohlenstoffatomen im Fettsäurerückgrat die zugehörigen Aldehyde mit ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen im Kettenrückgrat bilden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch so durchgeführt werden, dass mehrere verschiedene Fettsäuren gleichzeitig zur Umsetzung durch die Dioxygenase vorgelegt werden.

Vorzugsweise wird ein erfindungsgemäßes Verfahren, insbesondere eines mit einer Alpha-Dioxygenase, mit solchen Mikroorganismenzellen durchgeführt, bei denen zumindest in Schritt c) und vorzugsweise auch in Schritt b) die Beta-Oxidation im Vergleich zu einem Wildtyp-Stamm herabgesetzt ist. Dies kann beispielsweise durch Verabreichen eines Beta-Oxidations-Inhibitors an die Mikroorganismen vor Schritt c) oder gleichzeitig mit Schritt b) erfolgen.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist jedoch ein solches Verfahren, bei dem nicht-wachsende, ruhende Mikroorganismenzellen eingesetzt werden. Dementsprechend bevorzugt ist es, wenn das Medium in Schritt b) einen Maximalgehalt von 0,1 ppm an Stickstoff-Verbindungen besitzt, vorzugsweise beträgt der Gehalt des Mediums an stickstoffhaltigen Verbindungen höchstens 0,01 ppm und besonders bevorzugt höchstens 0,001 ppm. Dementsprechend bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem das Medium in Schritt b) keine für die Mikroorganismenzellen verwertbare Stickstoffquelle besitzt.

Ein bevorzugtes Umsetzungsmedium zum Durchführen eines erfindungsgemäßen Verfahrens besteht deshalb aus Wasser, einer oder mehreren umzusetzenden Fettsäure(n), optional einem stickstofffreien Lösungsvermittler für den oder die Fettsäure(n), optional einem stickstofffreien pH-Puffer und optional einem stickstofffreien Nährsubstrat für die Mikroorganismenzellen. Als pH-Puffer bevorzugt sind Natrium- und/oder Kaliumphosphatpuffer; als Nährsubstrat bevorzugt ist Glukose oder eine andere von den Mikroorganismenzellen verstoffwechselbare Substanz, soweit diese Substanz verglichen mit der oder den umzusetzenden Fettsäure(n) bevorzugt verstoffwechselt wird. Dabei bedeutet „bevorzugt verstoffwechseln“, dass durch Zusatz der Substanz zum Umsetzungsmedium bei ansonsten unveränderten Umsetzungsbedingungen der Quotient aus den Konzentrationen von

a) gewünschtem Aldehyd zu umzusetzender Fettsäure, bzw.

b) wenn mehrere Fettsäuren umzusetzen sind, von allen gewünschten Aldehyden zu allen gewünschten Fettsäuren,

zumindest gleich bleibt.

Ein erfindungsgemäß bevorzugter Lösungsvermittler für Fettsäuren ist Dimethylsulfoxid (DMSO) und Triton X 100.

Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bevorzugt ist insbesondere eine Alpha-Dioxygenase mit einer Peroxidase-Aktivität von höchstens 0,4 nkat/mg gemessen mit einem chromatofokussierten, aufgereinigten Enzym mit 2-Hydroperoxypalmitinsäure und spektrofotometrischer Bestimmung des Oxidationsprodukts von Guaiacol bei 470 nm. Dieses Bestimmungsverfahren ist dem Fachmann beispielsweise bekannt aus Maehly, „Plant peroxidases", Methods Enzymol (1955), 801 bis 813. Besonders bevorzugt beträgt die Peroxidase-Aktivität höchstens 0,3 nkat/mg; ganz besonders bevorzugt besitzt die Dioxygenase keine derart nachweisbare Peroxidase-Aktivität.

In einem erfindungsgemäßen Verfahren besitzt die Dioxygenase vorzugsweise eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit „similarity" zur Aminosäuresequenz SEQ ID No. 1 von zumindest 80%, vorzugsweise zumindest 88%, mehr bevorzugt zumindest 93% und besonders bevorzugt zumindest 98%. Im Sinne der vorliegenden Erfindung werden Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten bestimmt anhand des Waterman-Smith-Algorhythmus mit einer Lückeneröffnungs-Strafe („gap open penalty") von 10, einer Lückenvergrößerungs-Strafe („gap extension penalty") von 0,5 und der BLOSUM62-Matrix. Der Waterman-Smith-Algorithmus ist beschrieben in Smith, T. F. and Waterman, M. S., "Identification of common molecular subsequences", Journal of Molecular Biology (1981), 147:195-197 und beispielsweise online implementiert über die entsprechende Werkzeugseite des EMBL, derzeit „EMBOSS::water" erhältlich per www.ebi.ac.uk/tools/emboss/align/. Die diesen Randbedingungen genügenden Dioxygenasen besitzen für die Zwecke des erfindungsgemäßen Verfahrens eine gute Aktivität für die Umsetzung von Fettsäuren zu um 1 Kohlenstoffatom verkürzten entsprechenden Aldehyden. Sie sind in einer Vielzahl von Mikroorganismen für ein Ganzzell-Biotransformationsverfahren der erfindungsgemäßen Art gut exprimierbar. Entsprechende Dioxygenasen sind bereits bekannt. Ihre Verwendbarkeit zum Herstellen von Aldehyden in einem Ganzzell-Biotransformationsverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung war jedoch unbekannt.

Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem die Dioxygenase eine Alpha-Dioxygenase aus einer Pflanze der Gattung Oryza ist, vorzugsweise aus Reis (Oryza sativa). Derartige Alpha-Dioxygenasen sind beispielsweise bekannt aus Koeduka et al., „Catalytic properties of rice alpha-oxigenase", J. Biol. Chem. 2002, 22648 bis 22655. Derartige Alpha-Dioxygenasen insbesondere aus Reis sind in E. coli leicht und mit guter Stabilität und Aktivität heterolog exprimierbar. Besonders vorteilhaft ist, dass sie über keine nennenswerte Peroxidase-Aktivität verfügen. Erfindungsgemäß bevorzugt ist

dementsprechend eine Alpha-Dioxygenase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1.

Ferner besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem die Mikroorganismenzellen ausgewählt sind aus

- der Klasse der Gamma-Proteobakterien, vorzugsweise der Familie der Enterobacteriaceae und besonders bevorzugt aus den Gattungen Escherichia (darin wiederum besonders bevorzugt Escherichia coli),

- der Klasse der Bacilli, darin bevorzugt der Gattung Bacillus oder der Ordnung der Lactobacillales, und

- der Klasse der Saccharomyceten, dabei besonders bevorzugt der Familie der Saccharomycetaceae und der Dipodascaceae, und besonders bevorzugt der Gattung Saccharomyces und Yarrowia.

Besonders bevorzugt sind die Mikroorganismenzellen in einem erfindungsgemäßen Verfahren solche des Genus Escherichia, insbesondere Escherichia coli ist besonders bevorzugt. Derartige Mikroorganismen lassen sich leicht und sicher handhaben; der Umgang mit ihnen ist auch großtechnisch gut etabliert, und mit ihnen lassen sich gute Ausbeuten erzielen.

Dementsprechend bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Herstellen eines Aldehyds mit 5 bis 31 Kohlenstoffatomen, umfassend die Schritte:

a) Bereitstellen von E. coli-Zellen enthaltend eine Dioxygenase mit einer Ähnlichkeit wie oben beschrieben von zumindest 98% zu einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1,

b) Beaufschlagen der Mikroorganismen mit einem Umsetzungsmedium enthaltend eine Fettsäure mit 6 bis 32 Kohlenstoffatomen, wobei das Medium einen Gehalt an Stickstoff-Verbindungen von weniger als 0,1 ppm besitzt, und optional Glucose enthält, und

c) Umsetzen der Fettsäure zum entsprechenden Aldehyd mit einem um 1 Kohlenstoffatom verringerten Kohlenstoffrückgrat.

Der pH-Wert eines Umsetzungsmediums wird erfindungsgemäß – vorzugsweise mit Kaliumphosphat – auf einen Wert von bevorzugt 6,5 bis 9 eingestellt, mehr bevorzugt 7 bis 8 und besonders bevorzugt 7,3 bis 7,7. Diese pH-Werte lassen insbesondere bei Verwendung einer Alpha-Dioxygenase aus Reis wie oben beschrieben in stickstofflimitierten E. coli-Zellen gute Umsätze (mmol Aldehyd pro mmol Fettsäure, Zeit und Kubikmeter Umsetzungsmedium) erzielen.

Ebenfalls bevorzugt ist es, das Umsetzen in Schritt c) bei einer Temperatur von 25 bis 39°C, vorzugsweise von 28 bis 32°C und besonders bevorzugt von 29 bis 31°C durchzuführen. Diese Temperaturen sind insbesondere an übliche E. coli-Produktionsstämme zum Erreichen eines wie vorstehende beschriebenen guten Umsatzes mit einem erfindungsgemäßen Verfahren angepasst.

Erfindungsgemäß wird ferner ein Produktionsstamm angegeben, der eine Dioxygenase wie oben beschrieben heterolog exprimiert. Der Produktionsstamm ist dabei vorzugsweise ausgewählt aus

- der Klasse der Gamma-Proteobakterien, vorzugsweise der Familie der Enterobacteriaceae und besonders bevorzugt aus den Gattungen Escherichia (darin wiederum besonders bevorzugt Escherichia coli),

- der Klasse der Bacilli, darin bevorzugt der Gattung Bacillus oder der Ordnung der Lactobacillales, und

- der Klasse der Saccharomyceten, dabei besonders bevorzugt der Familie der Saccharomycetaceae und der Dipodascaceae, und besonders bevorzugt der Gattung Saccharomycesund Yarrowia.

Die vom Produktionsstamm, vorzugsweise einem Mikroorganismus der Art Escherichia coli, exprimierte Dioxygenase ist vorzugsweise eine Alpha-Dioxygenase mit einer wie oben definierten Ähnlichkeit („similarity“) zur Aminosäuresequenz SEQ ID No. 1 von zumindest 80%, vorzugsweise zumindest 88% und besonders bevorzugt zumindest 93%.

Mit den erfindungsgemäßen Produktionsstämmen lassen sich die oben beschriebenen Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens verwirklichen.

Erfindungsgemäß wird ferner eine Nukleinsäure angegeben zur Transformation eines Mikroorganismenstamms zum Erhalten eines erfindungsgemäßen Produktionsstammes, wobei die Nukleinsäure ein Gen umfasst, das für eine Dioxygenase kodiert mit einer Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit („similarity“) zur Aminosäuresequenz SEQ ID No. 1 von zumindest 80%, vorzugsweise zumindest 88%, mehr bevorzugt zumindest 93% und besonders bevorzugt zumindest 98%, jeweils gemessen wie oben beschrieben, und wobei das Gen heterolog zur übrigen Nukleinsäure ist. Die Nukleinsäure ist vorzugsweise ein DNA-Vektor, insbesondere bevorzugt ein Rekombinations-Vektor zum stabilen Einbau des Gens in das Genom eines Mikroorganismus durch Rekombination, oder ein episomaler Vektor.

Das Gen einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure ist vorzugsweise codonoptimiert für den zugeordneten, zu transformierenden Mikroorganismus. Besonders bevorzugt besitzt eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und ein erfindungsgemäßer Produktionsstamm daher ein Gen mit einer Sequenz gemäß SEQ ID No. 3 und besonders bevorzugt mit einer Sequenz gemäß SEQ ID No. 4. Mit derartigen Genen können insbesondere in Escherichia coli-Produktionsstämmen Dioxygenasen mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 exprimiert und die mit der Verwendung dieser Dioxygenase verbundenen Vorteile verwirklicht werden.

Das Gen zur erfindungsgemäßen Expression der Dioxygenase ist vorzugsweise unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimierbar. Auf diese Weise kann erreicht werden, dass die Dioxgenaseexpression erst kurz vor oder während der Umsetzungsreaktion (Schritt c) erfolgt. Dies vermeidet ein langsameres Zellwachstum während der Anzucht der erfindungsgemäß eingesetzten Mikroorganismen. Vorzugsweise steht das Gen unter der Kontrolle eines mit dem *lac*-Repressor schaltbaren Promotors, so dass durch Verabreichen beispielsweise von Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) die Expression des Dioxygenase-Gens induziert werden kann.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beispiele näher erläutert, ohne dass diese den Schutzbereich der Patentansprüche beschränken sollen.

Beispiel 1

Herstellung von Pentadecanal aus n-Hexadecansäure

Die Anzucht einer Vorkultur des *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) pET-28a αDOX-Reis erfolgte in 5 ml LB-Medium mit 30 µg Kanamycin pro ml Medium bei 37°C für ca. 6 h.

LB-Medium:

5 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g Natriumchlorid
ad 1l Wasser

Erste Phase: Anzucht

Für die Hauptkultur wurde 500 ml LB-Medium mit 30 µg Kanamycin pro ml Medium in einem 2 l- Schüttelkolben mit 1% (v/v) Vorkultur angeimpft. Die Anzucht erfolgte bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6.

Zweite Phase: Induktion und Expression

Nach Erreichen dieser OD erfolgte die Induktion mit 0,5 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und die anschließende Expression bei einer Temperatur von 22°C über Nacht (ca. 14h).

Dritte Phase: Biotransformation

Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde durch Dekantieren entfernt und das verbleibende Zellpellet zum Waschen in sterilem Umsetzungsmedium gelöst. Anschließend wurde erneut bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Umsetzungsmedium ebenfalls durch Dekantieren entfernt. Verbleibende Flüssigkeit wurde mit einer sterilen Pipette entfernt und das Zellpellet gewogen. Daraus ergab sich ca. 2 g Zellnassmasse pro 500 ml Kultur. Um eine Konzentration von 20 g Zellnassmasse pro l zu erhalten, wurde das Pellet in 100 ml sterilem Umsetzungsmedium resupendiert.

Umsetzungsmedium

200 mM Kaliumphosphatpuffer
0,5 % (w/v) Glucose
pH 7,5

Die Biotransformation wurde in einem 300 ml-Schüttelkolben mit Schikane mit einem Volumen von 25 ml durchgeführt. Die Zugabe des Substrates Hexadecansäure erfolgte gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO). Dazu wurde 100 mM Hexadecansäure in DMSO gelöst und 1,25 ml dieser Lösung der Zellsuspension zugesetzt, sodass eine Endkonzentration von 5 mM im Biotransformationsansatz erreicht wurde. Vor Zugabe der Hexadecansäure wurde die Zellsupension im Schüttelkolben im Inkubator unter Schütteln auf 30°C vorgewärmt.

Die Biotransformation fand bei 30°C unter starkem Schütteln statt. Nach ca. 2-3 h wurde eine Pentadecanalkonzentration von 4 mM erreicht. Das heißt der Umsatz betrug 80%.

Beispiel 2

Herrstellung von Nonanal aus n-Decansäure

Anzucht der Vorkultur, sowie erste und zweite Phase wie in Beispiel 1 beschrieben.

Dritte Phase: Biotransformation

Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde durch Dekantieren entfernt und das verbleibende Zellpellet zum Waschen in sterilem Umsetzungsmedium gelöst. Anschließend wurde erneut bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Umsetzungsmedium ebenfalls durch Dekantieren entfernt. Verbleibende Flüssigkeit wurde mit einer sterilen Pipette entfernt und das Zellpellet gewogen. Daraus ergab sich ca. 2 g Zellnassmasse pro 500 ml Kultur. Um eine Konzentration von 20 g Zellnassmasse pro l zu erhalten, wurde das Pellet in 100 ml sterilem Umsetzungsmedium resupendiert.

Umsetzungsmedium:

200 mM Kaliumphosphatpuffer
0,5 % (w/v) Glucose
pH 7,5

Die Biotransformation wurde in einem 300 ml-Schüttelkolben mit Schikane mit einem Volumen von 25 ml durchgeführt. Die Zugabe des Substrates Decansäure erfolgte gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO). Dazu wurde 100 mM Decansäure in DMSO gelöst und 1,25 ml dieser Lösung der Zellsuspension zugesetzt, sodass eine Endkonzentration von 5 mM im Biotransformationsansatz erreicht wurde. Vor Zugabe der Decansäure wurde die Zellsupension im Schüttelkolben im Inkubator unter Schütteln auf 37°C vorgewärmt.

Die Biotransformation fand bei 37°C unter starkem Schütteln statt. Die gebildete Menge an Nonanal wurde nicht quantitativ bestimmt. Die Bildung des Produktes wurde qualitativ mittels GC/MS gezeigt.

Beispiel 3

Herstellung von Tridecanal aus n-Tetradecansäure

Anzucht der Vorkultur, sowie erste und zweite Phase wie in Beispiel 1 beschrieben.

Dritte Phase: Biotransformation

Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde durch Dekantieren entfernt und das verbleibende Zellpellet zum Waschen in sterilem Umsetzungsmedium gelöst. Anschließend wurde erneut bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Umsetzungsmedium ebenfalls durch Dekantieren entfernt. Verbleibende Flüssigkeit wurde mit einer sterilen Pipette entfernt und das Zellpellet gewogen. Daraus ergab sich ca. 2 g Zellnassmasse pro 500 ml Kultur. Um eine Konzentration von 20 g Zellnassmasse pro l zu erhalten, wurde das Pellet in 100 ml sterilem Umsetzungsmedium resupendiert.

Umsetzungsmedium:

200 mM Kaliumphosphatpuffer
0,5 % (w/v) Glucose
pH 7,5

Die Biotransformation wurde in einem 300 ml-Schüttelkolben mit Schikane mit einem Volumen von 25 ml durchgeführt. Die Zugabe des Substrates Tetradecansäure erfolgte gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO). Dazu wurde 100 mM Tetradecansäure in DMSO gelöst und 1,25 ml dieser Lösung der Zellsuspension zugesetzt, sodass eine Endkonzentration von 5 mM im Biotransformationsansatz erreicht wurde. Vor Zugabe der Tetradecansäure wurde die Zellsupension im Schüttelkolben im Inkubator unter Schütteln auf 37°C vorgewärmt.

Die Biotransformation fand bei 37°C unter starkem Schütteln statt. Die gebildete Menge an Tridecanal wurde nicht quantitativ bestimmt. Die Bildung des Produktes wurde qualitativ mittels GC/MS gezeigt.

Beispiel 4

Herrstellung von Undecanal aus n-Dodecansäure

Anzucht der Vorkultur, sowie erste und zweite Phase wie in Beispiel 1 beschrieben.

Dritte Phase: Biotransformation

Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde durch Dekantieren entfernt und das verbleibende Zellpellet zum Waschen in sterilem Umsetzungsmedium gelöst. Anschließend wurde erneut bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Umsetzungsmedium ebenfalls durch Dekantieren entfernt. Verbleibende Flüssigkeit wurde mit einer sterilen Pipette entfernt und das Zellpellet gewogen. Daraus ergab sich ca. 2 g Zellnassmasse pro 500 ml Kultur. Um eine Konzentration von 20 g Zellnassmasse pro l zu erhalten, wurde das Pellet in 100 ml sterilem Umsetzungsmedium resupendiert.

Umsetzungsmedium:

200 mM Kaliumphosphatpuffer
0,5 % (w/v) Glucose
pH 7,5

Die Biotransformation wurde in einem 300 ml-Schüttelkolben mit Schikane mit einem Volumen von 25 ml durchgeführt. Die Zugabe des Substrates Dodecansäure erfolgte gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO). Dazu wurde 100 mM Dodecansäure in DMSO gelöst und 1,25 ml dieser Lösung der Zellsuspension zugesetzt, sodass eine Endkonzentration von 5 mM im Biotransformationsansatz erreicht wurde. Vor Zugabe der Dodecansäure wurde die Zellsupension im Schüttelkolben im Inkubator unter Schütteln auf 37°C vorgewärmt.

Die Biotransformation fand bei 37°C unter starkem Schütteln statt. Die gebildete Menge an Undecanal wurde nicht quantitativ bestimmt. Die Bildung des Produktes wurde qualitativ mittels GC/MS gezeigt.

Beispiel 5

Herrstellung von Heptanal aus n-Octansäure

Anzucht der Vorkultur, sowie erste und zweite Phase wie in Beispiel 1 beschrieben.

Dritte Phase: Biotransformation

Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde durch Dekantieren entfernt und das verbleibende Zellpellet zum Waschen in sterilem Umsetzungsmedium gelöst. Anschließend wurde erneut bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Umsetzungsmedium ebenfalls durch Dekantieren entfernt. Verbleibende Flüssigkeit wurde mit einer sterilen Pipette entfernt und das Zellpellet gewogen. Daraus ergab sich ca. 2 g Zellnassmasse pro 500 ml Kultur. Um eine Konzentration von 20 g Zellnassmasse pro l zu erhalten, wurde das Pellet in 100 ml sterilem Umsetzungsmedium resupendiert.

Umsetzungsmedium:

200 mM Kaliumphosphatpuffer
0,5 % (w/v) Glucose
pH 7,5

Die Biotransformation wurde in einem 300 ml-Schüttelkolben mit Schikane mit einem Volumen von 25 ml durchgeführt. Die Zugabe des Substrates Octansäure erfolgte gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO). Dazu wurde 100 mM Octansäure in DMSO gelöst und 1,25 ml dieser Lösung der Zellsuspension zugesetzt, sodass eine Endkonzentration von 5 mM im Biotransformationsansatz erreicht wurde. Vor Zugabe der Octansäure wurde die Zellsupension im Schüttelkolben im Inkubator unter Schütteln auf 37°C vorgewärmt.

Die Biotransformation fand bei 37°C unter starkem Schütteln statt. Die gebildete Menge an Heptanal wurde nicht quantitativ bestimmt. Die Bildung des Produktes wurde qualitativ mittels GC/MS gezeigt.

Beispiel 6

Herstellung von Pentadecanal aus n-Hexadecansäure mit Rückgewinnung der Zellen

Die Anzucht einer Vorkultur des *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) pET-28a αDOX-Reis erfolgte in 5 ml LB-Medium mit 30 µg Kanamycin pro ml Medium bei 37°C für ca. 6 h.

LB-Medium:

5 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g Natriumchlorid
ad 1l Wasser

Erste Phase: Anzucht

Für die Hauptkultur wurde 500 ml LB-Medium mit 30 µg Kanamycin pro ml Medium in einem 2 l- Schüttelkolben mit Schikanen mit 1% (v/v) Vorkultur angeimpft. Die Anzucht erfolgte bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6.

Zweite Phase: Induktion und Expression

Nach Erreichen dieser OD erfolgte die Induktion mit 0,5 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und die anschließende Expression bei einer Temperatur von 22°C über Nacht (ca. 14h).

Dritte Phase: Biotransformation

Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde durch Dekantieren entfernt und das verbleibende Zellpellet zum Waschen in sterilem Umsetzungsmedium gelöst. Anschließend wurde erneut bei 8.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Umsetzungsmedium ebenfalls durch Dekantieren entfernt. Verbleibende Flüssigkeit wurde mit einer sterilen Pipette entfernt und das Zellpellet gewogen. Daraus ergab sich ca. 2 g Zellnassmasse pro 500 ml Kultur. Um eine Konzentration von 20 g Zellnassmasse pro l zu erhalten, wurde das Pellet in 100 ml sterilem Umsetzungsmedium resupendiert.

Umsetzungsmedium

200 mM Kaliumphosphatpuffer
0,5 % (w/v) Glucose
pH 7,5

Die Biotransformation wurde in einem 300 ml-Schüttelkolben mit Schikane mit einem Volumen von 25 ml durchgeführt. Die Zugabe des Substrates Hexadecansäure erfolgte gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO). Dazu wurde 100 mM Hexadecansäure in DMSO gelöst und 1,25 ml dieser Lösung der Zellsuspension zugesetzt, sodass eine Endkonzentration von 5 mM im Biotransformationsansatz erreicht wurde. Vor Zugabe der Hexadecansäure wurde die Zellsupension im Schüttelkolben im Inkubator unter Schütteln auf 30°C vorgewärmt. Darüber hinaus wurde dem Biotransformationsansatz 1% (w/v) Triton X 100 zugesetzt.

Die Biotransformation fand bei 30°C unter starkem Schütteln statt. Nach ca. 3 h wurde eine Pentadecanalkonzentration von 4 mM erreicht. Das heißt der Umsatz betrug 80%.

Wiederholung dritte Phase: Biotransformation mit zurückgewonnenem Biokatalysator

Dazu wurden die Zellen nach 3h bei Zimmertemperatur für 10 min bei 5000 g geerntet und der Überstand durch Dekantieren entfernt. Das verbleibende Zellpellet wurde zum Waschen in Umsetzungsmedium gelöst und anschließend erneut bei Zimmertemperatur für 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren entfernt und das Zellpellet in 20 ml Umsetzungsmedium resuspendiert. Im Überstand konnte eine Produktkonzentration von 3 mM gemessen werden, das heißt ca. 75% des Produktes verbleibt nach dem Zentrifugieren im Überstand und kann daher vom Biokatalysator getrennt werden.

Für die erneute Biotransformation wurden die 20 ml Zellsuspension in einen frischen 300 ml Schüttelkolben mit Schikanen gegeben und 1 ml der oben beschriebenen Substratlösung (100 mM Hexadecansäure in DMSO) zugesetzt, so dass die Substratkonzentration im zweiten Durchlauf ebenfalls wieder ca. 5 mM betrug. Außerdem wurde auch hier wieder 1% (w/v) Triton X 100 zum Biotransformationsansatz gegeben. Bei diesem zweiten Durchlauf der Biotransformation konnte bereits nach 1 h eine Produktkonzentration von 5,5 mM erreicht werden. Zum Zeitpunkt t0=0 h dieser zweiten Biotransformation wurde eine Pentadecanalkonzentration von 1 mM gemessen (diese Reste sind aus der ersten Biotransformation trotz waschen im Pellet verblieben), das heißt es konnte im zweiten Durchlauf erneut ein Umsatz von 80-90% erzielt werden.

Ansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines Aldehyds mit 5 bis 31 Kohlenstoffatomen, umfassend die Schritte:

a) Bereitstellen von Mikroorganismenzellen enthaltend eine Dioxygenase,

b) Beaufschlagen der Mikroorganismenzellen mit einem Umsetzungsmedium enthaltend eine Fettsäure mit 6 bis 32 Kohlenstoffatomen,

c) Umsetzen der Fettsäure zum Aldehyd durch die Dioxygenase.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Dioxygenase eine alpha-Dioxygenase ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Dioxygenase

a) eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit („Similarity“) zu SEQ ID No. 1 von zumindest 80%, vorzugsweise zumindest 88% und besonders bevorzugt zumindest 93% besitzt, jeweils gemessen mit dem Waterman-Smith-Algorithmus mit einer Lückeneröffnungs-Strafe („Gap open penalty“) von 10, einer Lückenfortsetzungsstrafe („Gap extension penalty“) von 0,5 und der Blosum62-Matrix,

b) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2 besitzt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Dioxygenase eine Peroxidase-Aktivität von höchstens 0,4 nkat/mg Guaiacol/2-Hydroperoxyplamitinsäure besitzt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die in Schritt b eingesetzte Fettsäure ausgewählt ist aus

- linearen oder verzweigten gesättigten Fettsäuren,

- linearen oder verzweigten ungesättigten Fettsäuren,

- ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren mit 1 bis 5 Substituenten, wobei die Substituenten jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Hydroxy, C1-C10-Alkyl, C1-C10-Alkoxy, C6-C10-Aryl, Phenyl-C1-C5-Alkyl und Phenyl-C1-C5-Alkenyl, wobei das alpha-C-Atom der Fettsäure keinen solchen Substituenten trägt,

vorzugsweise

Fettsäure	zum Bilden von
n-Heptansäure	n-Hexanal
n-Nonansäure	n-Octanal
n-Decansäure	n-Nonanal
n-Undecansäure	n-Decanal
n-Dodecansäure	n-Undecanal
n-Tridecansäure	n-Dodecanal
n-Tetradecansäure	n-Tridecanal
n-Hexadecansäure	n-Pentadecanal
3-Methyl-Undecansäure	2-Methyldecanal
3-Methyl-Dodecansäure	2-Methylundecanal
trans-3-Heptensäure	trans-2-Hexenal
cis-5-Octansäure	cis-4-Heptenal
3,7-Dimethyl-6-Octensäure	2,6-Dimethyl-5-Hepten-1-al
11-Dodecensäure	10-Undecenal
3,7,11-Trimethyl-6,10-Dodecadiensäure	2,6,10-Trimethyl-5,9-undecadienal
4,8-Dimethyl-7-nonen-1-säure	Citronellal
n-Heptadecansäure	n-Hexadecanal
n-Octadecansäure	n-Heptadecanal
n-Nonadecansäure	n-Octadecanal

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die in Schritt b eingesetzte Fettsäure und der zugeordnete in Schritt c erhaltene Aldehyd ausgewählt sind aus

n-Hexadecansäure	n-Pentadecanal
n-Tetradecansäure	n-Tridecanal
n-Dodecansäure	n-Undecanal
n-Decansäure	n-Nonanal

und Mischungen zweier oder mehrerer der genannten Fettsäuren zum Erhalten von Mischungen der entsprechenden Aldehyde.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismenzellen ausgewählt sind aus Mikroorganismen

- der Klasse der Gamma-Proteobakterien, vorzugsweise der Familie der Enterobacteriaceae und besonders bevorzugt aus den Gattungen Escherichia (darin wiederum besonders bevorzugt Escherichia coli),

- der Klasse der Bacilli, darin bevorzugt der Gattung Bacillus oder der Ordnung der Lactobacillales, und

- der Klasse der Saccharomyceten, dabei besonders bevorzugt der Familie der Saccharomycetaceae und der Dipodascaceae, und besonders bevorzugt der Gattung Saccharomycesund Yarrowia.

8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b)

- ein pH-Wert des Umsetzungsmediums auf 6,5 bis 9 eingestellt wird, vorzugsweise 7-8 und besonders bevorzugt 7,3-7,7, und vorzugsweise der pH-Wert eingestellt wird durch einen wässrigen Kaliumphosphatpuffer einer Konzentration von 150-400 mM, besonders bevorzugt 180-300 mM und ganz besonders bevorzugt von 190-210 mM, und/oder

- das Umsetzungsmedium einen Gehalt an Stickstoff-Verbindungen von höchstens 0,1 ppm, bevorzugt höchstens 0,01 ppm und besonders bevorzugt höchstens 0,001 ppm besitzt, und/oder

- das Umsetzungsmedium einen Glucosegehalt von 0,25 - 1 % (w/v), bevorzugt 0,4-0,6 % (w/v) besitzt, jeweils bezogen auf das gesamte Umsetzungsmedium.

9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zum Umsetzen in Schritt c) eine Temperatur von 25-39°C, vorzugsweise von 28-32°C und besonders bevorzugt von 29-31°C eingehalten wird.

10. Mikroorganismus, enthaltend ein Gen für eine heterologe Dioxygenase, wobei die Dioxygenase

a) eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit („Similarity“) zu SEQ ID No. 1 von zumindest 80%, vorzugsweise zumindest 88%, mehr bevorzugt zumindest 93% und besonders bevorzugt zumindest 98% besitzt, jeweils gemessen mit dem Waterman-Smith-Algorithmus mit einer Lückeneröffnungs-Strafe („Gap open penalty“) von 10, einer Lückenfortsetzungsstrafe („Gap extension penalty“) von 0,5 und der Blosum62-Matrix,

b) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2 besitzt.

11. Mikroorganismus nach Anspruch 10, wobei der Mikroorganismus Escherichia coli ist.

12. Nukleinsäure, enthaltend ein Gen für eine heterologe Dioxygenase, wobei die Dioxygenase

a) eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit („Similarity“) zu SEQ ID No. 1 von zumindest 80%, vorzugsweise zumindest 88%, mehr bevorzugt zumindest 93% und besonders bevorzugt zumindest 98% besitzt, jeweils gemessen mit dem Waterman-Smith-Algorithmus mit einer Lückeneröffnungs-Strafe („Gap open penalty“) von 10, einer Lückenfortsetzungsstrafe („Gap extension penalty“) von 0,5 und der Blosum62-Matrix,

b) eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2 besitzt.

13. Nukleinsäure nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Gen eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 3 oder SEQ ID No. 4 besitzt.

14. Verfahren zum Herstellen eines Aldehyds mit 5 bis 31 Kohlenstoffatomen, umfassend das Umsetzen einer Fettsäure mit 6 bis 32 Kohlenstoffatomen zum Aldehyd mit einer alpha-Dioxygenase, wobei die Fettsäure vorzugsweise ausgewählt ist aus

- linearen oder verzweigten gesättigten Fettsäuren,

- linearen oder verzweigten ungesättigten Fettsäuren,

- ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren mit 1 bis 5 Substituenten, wobei die Substituenten jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Hydroxy, C1-C10-Alkyl, C1-C10-Alkoxy, C6-C10-Aryl, Phenyl-C1-C5-Alkyl und Phenyl-C1-C5-Alkenyl, wobei das alpha-C-Atom der Fettsäure keinen solchen Substituenten trägt,

vorzugsweise

Fettsäure	zum Bilden von
n-Heptansäure	n-Hexanal
n-Nonansäure	n-Octanal
n-Decansäure	n-Nonanal
n-Undecansäure	n-Decanal
n-Dodecansäure	n-Undecanal
n-Tridecansäure	n-Dodecanal
n-Tetradecansäure	n-Tridecanal
3-Methyl-Undecansäure	2-Methyldecanal
3-Methyl-Dodecansäure	2-Methylundecanal
trans-3-Heptensäure	trans-2-Hexenal
cis-5-Octansäure	cis-4-Heptenal
3,7-Dimethyl-6-Octensäure	2,6-Dimethyl-5-Hepten-1-al

11-Dodecensäure	10-Undecenal
3,7,11-Trimethyl-6,10-Dodecadiensäure	2,6,10-Trimethyl-5,9-undecadienal
4,8-Dimethyl-7-nonen-1-säure	Citronellal
n-Heptadecansäure	n-Hexadecanal
n-Nonadecansäure	n-Octadecanal

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/064762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P7/24 C12N9/02 C07K14/415
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 C12N C07K

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, FSTA, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAMBERG ET AL: "Alpha-Dioxygenases", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 338, 2005, pages 169-174, XP027218277, * Siehe Seite 169 (linke Spalte), Seite 170 (Figur 1), und Seite 172 (Os alpha-DOX : 1-100 + 118-618 sind identisch mit SEQ. ID. NO. 2) * ----- -/--	1-14

[X] 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	Date of mailing of the international search report
23 January 2012	07/02/2012

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Korsner, Sven-Erik

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAMBERG ET AL: "Fatty acid alpha-dioxygenases", PROSTAGLANDINS & OTHER LIPID MEDIATORS, vol. 68-69, 2002, pages 363-374, XP004380634, * Siehe insbesondere Seite 367 ("Rice alpha-dioxygenase" / E.coli; Palmitinsäure (C16) -> Pentadecanal (C15)) und Seite 368 ("Rice") *	1-14
Y	DATABASE PROTEIN [Online] 8 June 2010 (2010-06-08), "Os12g0448900 [Oryza sativa Japonica Group]", XP002667560, retrieved from NCBI Database accession no. NP_001066718 * Siehe Seite 4 (Sequenz = SEQ.ID.NO. 2); Veröffentlichungstag nicht festgestellt *	1-14
A	KOEDUKA ET AL: "Catalytic properties of rice alpha-oxygenase", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, 2002, pages 22648-22655, XP002667636, * Siehe Seite 22648 (Zusammenfassung) und Seite 22653 ("Scheme 1") *	1-14
X,P	KAEHNE ET AL: "A recombinant alpha-dioxygenase from rice to produce fatty aldehydes using E. coli", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 90, 24 February 2011 (2011-02-24), pages 989-995, XP002667333, * Siehe das ganze Dokument *	1-14

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2011/064762

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12P7/24 C12N9/02 C07K14/415
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12P C12N C07K

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, FSTA, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HAMBERG ET AL: "Alpha-Dioxygenases", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 338, 2005, Seiten 169-174, XP027218277, * Siehe Seite 169 (linke Spalte), Seite 170 (Figur 1), und Seite 172 (Os alpha-DOX : 1-100 + 118-618 sind identisch mit SEQ. ID. NO. 2) * ----- -/--	1-14

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [ ] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, 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 anderen 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
23. Januar 2012	07/02/2012

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Korsner, Sven-Erik

2

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HAMBERG ET AL: "Fatty acid alpha-dioxygenases", PROSTAGLANDINS & OTHER LIPID MEDIATORS, Bd. 68-69, 2002, Seiten 363-374, XP004380634, * Siehe insbesondere Seite 367 ("Rice alpha-dioxygenase" / E.coli; Palmitinsäure (C16) -> Pentadecanal (C15)) und Seite 368 ("Rice") *	1-14
Y	DATABASE PROTEIN [Online] 8. Juni 2010 (2010-06-08), "Os12g0448900 [Oryza sativa Japonica Group]", XP002667560, gefunden im NCBI Database accession no. NP_001066718 * Siehe Seite 4 (Sequenz = SEQ.ID.NO. 2); Veröffentlichungstag nicht festgestellt *	1-14
A	KOEDUKA ET AL: "Catalytic properties of rice alpha-oxygenase", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 277, 2002, Seiten 22648-22655, XP002667636, * Siehe Seite 22648 (Zusammenfassung) und Seite 22653 ("Scheme 1") *	1-14
X,P	KAEHNE ET AL: "A recombinant alpha-dioxygenase from rice to produce fatty aldehydes using E. coli", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 90, 24. Februar 2011 (2011-02-24), Seiten 989-995, XP002667333, * Siehe das ganze Dokument *	1-14