

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 966**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/24** (2006.01)

**C07C 29/14** (2006.01)

**C07C 45/66** (2006.01)

**C07C 51/235** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2010 E 10716537 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2427563**

54 Título: **Procedimiento para la preparación por fermentación de propanal o 3-hidroxi-propanal en la presencia de hidrazidas, hidrazinas o sulfitos**

30 Prioridad:

**05.05.2009 DE 102009002811**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**27.05.2014**

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)  
Rellinghauser Strasse 1-11  
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**HAAS, THOMAS;  
KLASOVSKY, FLORIAN;  
KRAUTER, HENDRIK;  
SCHAFFER, STEFFEN;  
SCHÖBEL, RENE;  
TACKE, THOMAS;  
VORLOP, KLAUS-DIETER;  
WILLKE, THOMAS y  
WESSEL, MIRJA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 462 966 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación por fermentación de propanal o 3-hidroxi-propanal en la presencia de hidrazidas, hidrazinas o sulfitos

**Sector del invento**

- 5 Son objeto del invento unos procedimientos para la preparación de los aldehídos 3-hidroxi-propionaldehído y propanal, así como de sus productos de oxidación y de reducción.

**Estado de la técnica**

Unos procedimientos enzimáticos para la preparación de aldehídos se han descrito en muchos casos en la bibliografía.

- 10 Así, por ejemplo, el documento de solicitud de patente internacional WO2009001304 describe un procedimiento para la preparación de aldehídos a partir de ácidos grasos insaturados múltiples veces con la cooperación de 13-hidroperóxido-liasas.

Unas rutas bioquímicas para la obtención del 3-metil-butanal se describen en la cita de Smit y colaboradores, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009, 81, 987-999.

- 15 La preparación de aldehídos a partir de alcoholes, con ayuda de metanol-oxidasas y de catalasas obtenidas a partir de *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* o *Torulopsis*, se expone en el documento de patente de los EE.UU. US5783429. Mediando el uso de xileno- o alcano-monooxigenasas se pueden obtener, de acuerdo con el documento WO2001031047, ciertos derivados de aldehídos aromáticos.

- 20 El 3-hidroxi-propionaldehído (3HPA) se puede convertir químicamente en el ácido acrílico, que es un importante monómero para la preparación a escala industrial de polímeros y materiales sintéticos, así como en unos ésteres de ácido acrílico asimismo importantes. Otros importantes productos, que se pueden derivar del 3-hidroxi-propionaldehído, son el 1,3 propanodiol (por reducción), el ácido 3-hidroxi-propiónico (por oxidación) y la acroleína (por deshidratación). Puesto que hasta ahora no están a disposición ningunas fuentes comerciales para el 3-hidroxi-propionaldehído, se está investigando intensamente la preparación del 3-hidroxi-propionaldehído, en particular en  
25 forma de la reuterina, a partir del glicerol.

Así, ya al final de los años ochenta, Talarico y Dobrogosz, en Antimicrob. Agents Chemother., 1989, 33, 674-679, describieron la preparación por fermentación del 3-hidroxi-propionaldehído a partir del glicerol con *Lactobacillus reuteri*.

Un procedimiento análogo con empleo de una limitación del O<sub>2</sub> se describe en el documento US5413960.

- 30 El documento de patente danesa DK180099 divulga un procedimiento con aportación continua de glicerol y con empleo de *Lactobacillus reuteri* DSM12246.

- Doleyres y colaboradores, Appl Microbiol Biotechnol. 2005 Sep ;68 (4):467-74, describieron un procedimiento para la preparación del 3-hidroxi-propionaldehído en el seno de *L. reuteri* ATCC 53608 mediando diferentes condiciones de crecimiento, y mostraron que no era posible un empleo repetido del biocatalizador a causa de una actividad fuertemente descendente.  
35

El documento de patente china CN1778935 describe una fermentación en una sola etapa de una solución de glicerol con *Klebsiella pneumoniae* DSM2026 en presencia de una semicarbazida.

- 40 El documento US4962027 describe un procedimiento para la preparación de 3-hidroxi-propionaldehído en una fermentación aerobia en dos etapas de *Klebsiella pneumoniae* NRRL B-4011, generándose en la primera etapa en primer lugar una masa celular y una glicerol-deshidratasa, y siendo convertido químicamente el glicerol en la segunda etapa, en presencia de una semicarbazida, en el el 3-hidroxi-propionaldehído.

El documento de patente europea EP1669457 describe la preparación biotecnológica del 3-hidroxi-propionaldehído con (entre otras enzimas) *K. Pneumoniae* mediando una adición de la coenzima B<sub>12</sub> en un rendimiento casi cuantitativo, mediante aumento de la relación entre las células y el substrato.

- 45 Es común para todos los procedimientos descritos, el hecho de que los rendimientos y los grados de conversión son bajos. Además de ello, en los procedimientos descritos siempre es necesario un alto gasto para la puesta a disposición del biocatalizador, que entonces tiene solamente una corta durabilidad, es decir que a continuación se puede emplear solamente durante breve tiempo.

- 50 Fue misión del presente invento, por lo tanto, poner a disposición un procedimiento que supere las desventajas descritas del estado de la técnica.

**Descripción del invento**

De modo sorprendente se encontró que los procedimientos que se describen a continuación son capaces de resolver el problema planteado por el invento.

5 Por lo tanto, es objeto del presente invento un procedimiento para la preparación del 3-hidroxi-propionaldehído o propanal, que comprende las etapas del procedimiento A) de poner en contacto el glicerol o 1,2-propanodiol con una hidro-liasa escogida entre el conjunto de las glicerol-deshidratatas, diol-deshidratatas y propanodiol-deshidratatas, B) de efectuar una separación del aldehído 3-hidroxi-propionaldehído o propanal, que se había formado en la etapa A) del procedimiento, C) de efectuar por lo menos una repetición de las etapas A) y B) del procedimiento con la hidro-liasa que se había obtenido a partir de la etapa B) del procedimiento, y eventualmente D) de realizar un aislamiento del aldehído formado, estando caracterizado el procedimiento por que se lleva a cabo en presencia de un compuesto escogido entre el conjunto de las hidrazidas, las hidrazinas, los hidrógeno-sulfitos, los sulfitos, los metabisulfitos y los piro-sulfitos, que forma un enlace de unión con el aldehído 3-hidroxi-propionaldehído o propanal.

15 Otro objeto del invento es un procedimiento para la preparación de productos de oxidación y reducción del aldehído 3-hidroxi-propionaldehído o propanal por medio del procedimiento antes mencionado.

20 Unas ventajas del procedimiento conforme al invento son el rendimiento casi cuantitativo del aldehído referido al alcohol empleado, la larga durabilidad de la hidro-liasa empleada como biocatalizador y la posibilidad de su utilización renovada. De esta manera se hace posible un modo del procedimiento continuo. Otra ventaja del procedimiento del procedimiento conforme al invento consiste en que no existe ninguna necesidad de reprimir unas actividades secundarias de la hidro-liasa empleada como biocatalizador, tales como por ejemplo una reducción ulterior del aldehído para dar el alcohol, a base del que se compone el aldehído formado.

25 Todavía una ventaja del presente invento consiste en que el procedimiento conforme al invento ofrece la posibilidad de trabajar en la mayor parte de los casos mediando exclusión o respectivamente reducción de la cantidad de oxígeno, con lo que se pueden disminuir una corrosión y una indeseada oxidación, por ejemplo, del producto, se hace posible una sencilla constitución de los aparatos y se puede ahorrar energía, así como se pueden evitar otros problemas conocidos del gaseo de un reactor biotecnológico, tales como por ejemplo una formación de espuma.

30 Dentro del concepto de "aldehído, 3-hidroxi-propionaldehído o propanal" se entienden en conexión con el presente invento asimismo los hidratos y dímeros del aldehído así como unas mezclas de estos compuestos, así como por ejemplo la reuterina en el caso del 3-hidroxi-propionaldehído. Todos los porcentajes indicados (en %) son tantos por ciento en masa, cuando no se indica otra cosa distinta.

Como hidro-liasas se pueden emplear en el procedimiento conforme al invento unas enzimas escogidas entre el conjunto de las glicerol-deshidratatas, diol-deshidratatas y propanodiol-deshidratatas.

35 En el presente caso son ventajosas para el procedimiento conforme al invento en particular aquellas hidro-liasas que son activas de una manera independiente de la coenzima B<sub>12</sub>, es decir que ellas tienen una actividad de hidro-liasas también sin la presencia de la coenzima B<sub>12</sub> o de sustancias sustitutivas de, o de compuestos análogos a, esta sustancia, tales como por ejemplo corrinoides y cobalaminas. Unos representantes dados a modo de ejemplo de tales hidro-liasas se pueden tomar del documento WO2008148640.

40 Las hidro-liasas empleadas en el procedimiento conforme al invento son glicerol-deshidratatas o respectivamente diol-deshidratatas así como propanodiol-deshidratatas (EC 4.2.1.30, EC 4.2.1.28). En este contexto se emplean en el procedimiento conforme al invento, en particular, las glicerol-deshidratatas que son aislables a partir de unos microorganismos escogidos entre el conjunto de los géneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Caloramator*, *Salmonella* y *Listeria*, de modo especialmente preferido las glicerol-deshidratatas escogidas entre el conjunto de las especies *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Lactobacillus leichmannii*, *Citrobacter intermedium*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Enterobacter agglomerans*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium kluyveri*, *Caloramator viterbensis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus hilgardii*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*.

45 La glicerol-deshidratasa empleada es codificada de manera preferida por los genes, que están escogidos entre el conjunto que se compone de *pduC*, *pduD*, *pduE*, *pddA*, *pddB*, *pddC*, *dhaB*, *dhaC*, *dhaE* y *gldABC*, procedentes de *Lactobacillus reuteri* ATCC55730. Es ventajoso además el empleo de la variante de la glicerol-deshidratasa SHGDH22 descrita en el documento WO-A-2004/056963, que tiene la secuencia SEQ.-ID-nº 322 divulgada en el documento WO2004/056963. La secuencia de nucleótidos de estos y otros apropiados genes para una glicerol-deshidratasa se pueden tomar por ejemplo de la "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" [enciclopedia Kyoto de genes y genomas] (banco de datos de KEGG), de los bancos de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Centro nacional de información sobre biotecnología] de la National Library of Medicine [Biblioteca nacional de medicina] (Bethesda, MD, EE.UU.) o del banco de datos de secuencias de nucleótidos de los European Molecular Biology Laboratories [Laboratorios europeos de biología molecular].

50 En conexión con la diol-deshidratasa, puede ser ventajoso emplear en el procedimiento en particular la diol-deshidratasa que es aislable a partir de unos microorganismos escogidos entre el conjunto de los géneros *Klebsiella*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Flavobacterium*, *Acetobacterium*, *Brucella* y

*Fusobacterium*, de manera especialmente preferida aislable a partir de unos microorganismos escogidos entre el conjunto de las especies *Klebsiella pneumoniae*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Clostridium glycolicum*, *Lactobacillus brevis*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Lactobacillus buchneri*, *Brucella melitensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*.

5 En conexión con la propanodiol-deshidratasa, puede ser ventajoso emplear en el procedimiento en particular la propanodiol-deshidratasa que es aislable a partir de unos microorganismos escogidos entre el conjunto de los géneros *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y *Salmonella*, de manera especialmente preferida aislable a partir de unos microorganismos escogidos entre el conjunto de las especies *Citrobacter freundii*, *Clostridium glycolicum*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus brevis*,  
10 *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus collinoides*, *Propionibacterium freudenreichii* y *Salmonella typhimurium*.

En el caso de que la hidro-liasa empleada en el procedimiento conforme al invento sea una enzima dependiente de la vitamina B<sub>12</sub>, puede ser ventajoso llevar a cabo la etapa A) del procedimiento en presencia de una enzima o respectivamente de un complejo enzimático que tenga una actividad de glicerol-deshidratasa-reactivasa o respectivamente una actividad de diol-deshidratasa-reactivasa, puesto que la hidro-liasa puede ser desactivada eventualmente por fijación de la vitamina. Una tal reactivasa ha sido descrita por ejemplo en el cita de Mori y colaboradores, J. Biol. Chem. 272:32034 (1997). De manera preferida, se emplean unas reactivasas, que se pueden aislar desde el organismo, a partir de las cuales se puede aislar la correspondiente hidro-liasa. Unas apropiadas diol-deshidratasa-reactivasas son conocidas a partir de *Klebsiella oxytoca* (N<sup>o</sup>s del GenBank: AAC15871, AF017781; N<sup>o</sup>s del GenBank: AAC15872, AF017781) *Salmonella typhimurium* (N<sup>o</sup>s del GenBank: AAB84105, AF026270; N<sup>o</sup>s del GenBank: AAD39008, AF026270) y *Lactobacillus collinoides* (N<sup>o</sup>s del GenBank: CAD01092, AJ297723; N<sup>o</sup>s del GenBank: CAD01093, AJ297723), y unas apropiadas glicerol-deshidratasa-reactivasas son conocidas a partir de *Klebsiella pneumoniae* (compárese el documento WO2008137403).

Las hidro-liasas empleadas conforme al invento en el procedimiento se pueden en todas las formas de accesibilidad que son conocidas por un experto en la especialidad. Así, las hidro-liasas empleadas se pueden emplear en forma de enzimas aisladas, por ejemplo que han sido aisladas a partir de un sistema de expresión recombinante, o como una parte componente de complejos enzimáticos. De manera preferida las hidro-liasas se emplean en la forma de un reactor de células completas, es decir que las hidro-liasas se presentan en una célula biológica, de manera preferida en la célula que expresa a la hidro-liasa. Las células que contienen la hidro-liasa pueden expresar a la hidro-liasa ya como un tipo salvaje o han sido modificadas al modo de la tecnología genética, de tal manera que ellas presenten una actividad de hidro-liasa tan sólo mediante la modificación por tecnología genética.

Como hidro-liasa de tipo salvaje se pueden emplear en el procedimiento conforme al invento las células que se han descrito más arriba como unos microorganismos, a partir de los cuales se pueden aislar las hidro-liasas.

Unas células modificadas por tecnología genética, que contienen unas apropiadas hidro-liasas y que se pueden emplear en el procedimiento conforme al invento, se describen por ejemplo en el documento WO2008148640.

35 Por lo demás, puede ser ventajoso disminuir la tendencia de las células a la formación por reducción de productos secundarios a partir de los aldehídos, en particular la tendencia a la reducción de los resultantes aldehídos para dar los correspondientes alcoholes, mediante una correspondiente modificación por tecnología genética de las células.

Por ejemplo, en el caso de que el aldehído que se ha de preparar con el procedimiento conforme al invento sea el 3-hidroxi-propionaldehído, se emplean unas células con una actividad, disminuida en comparación con su tipo salvaje, de una enzima E<sub>1</sub>, que está en situación de reducir al 3-hidroxi-propionaldehído para dar el 1,3-propanodiol, La enzima E<sub>1</sub> (1,3-propanodiol-deshidrogenasa, 3-hidroxi-propionaldehído-reductasa, 1,3-propanodiol:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductasa o propano-1,3-diol:NAD<sup>+</sup>-1-oxidoreductasa; EC 1.1.1.202) cataliza la siguiente reacción

40 3-hidroxi-propionaldehído + NAD(P)H → 1,3-propanodiol + NAD(P)<sup>+</sup>. Tales enzimas son p.ej. las proteínas que tienen los números de entrada en el GenBank AP007281.1, EDX43365.1, BAG24545.1, ABQ82306.1, ABO43839.1, EEI08979.1, EEI66346.1, EEI73647.1, EEJ92522.1, EEI09194.1, EEI73500.1, ABQ83973.1 o BAG26138.1.

A partir de estos datos se pueden identificar unas oxidoreductasas correspondientes para la célula que contiene la respectiva hidrolasa, que se emplea en un procedimiento conforme al invento, y que disminuyen la actividad de la misma en comparación con la de su tipo salvaje. Bajo la formulación utilizada de "actividad disminuida de una enzima" se entiende de manera preferida una actividad disminuida por un factor de por lo menos 0,5, de manera especialmente preferida de por lo menos 0,1, de manera aún más preferida de por lo menos 0,01, de manera todavía aún más preferida de por lo menos 0,001 y de manera sumamente preferida de por lo menos 0,0001. La disminución de la actividad de una determinada enzima se puede efectuar por ejemplo por medio de una mutación deliberada o no dirigida, por medio de una adición de agentes inhibidores competitivos o no competitivos, o por medio de otras medidas técnicas, conocidas por un experto en la especialidad, destinadas a disminuir la síntesis de una determinada enzima.

55 Con el fin de disminuir la actividad de una enzima E<sub>1</sub> mediante una mutación deliberada, entran en cuestión, por ejemplo, unas desactivaciones génicas (en inglés knockouts) dirigidas, en las que por ejemplo se suprimen unas secuencias activas como promotores del gen diana, unas zonas activas del gen diana (que son necesarias para la función catalítica de la enzima) o todo el gen diana, se sustituyen por un ADN ajeno o se interrumpen con un ADN ajeno. Por lo demás son conocidas por un experto en la especialidad diferentes técnicas del silenciamiento de genes (del inglés gene silencing, que, a través de unos ácidos nucleicos antisentido o de un ARN interferente pequeño (cel inglés small-interfering RNA (siRNA), disminuyen de una manera específica o incluso impiden la transcripción o

respectivamente la traducción de unos genes individuales. Esta represión puede efectuarse transitoriamente, ser inducible o presentarse constitutivamente, según sea el sistema escogido. Asimismo son conocidos por un experto en la especialidad unos métodos, con los cuales se pueden establecer deliberadamente unas mutaciones puntuales individuales en el gen diana. Por lo demás son conocidos por un experto en la especialidad unos métodos con los que se pueden establecer en el gen diana de modo no dirigido unas mutaciones, con el fin de seleccionar a continuación de ello unas células, que tienen una actividad disminuida de una enzima E<sub>1</sub>. De esta manera, se pueden provocar tales mutaciones p.ej. mediante la tasa natural de errores al realizar la replicación del material genético o mediante una exposición de las células a unos agentes nocivos (noxos) físicos o químicos, tales como, por ejemplo, la luz UV (ultravioleta), la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, el metanosulfonato de etilo, el ácido nitroso, una hidroxiamina o el 1-óxido de 4-nitro-quinolina.

Las células que contienen hidro-liasas, empleadas en el procedimiento conforme al invento, pueden ser células vivas o muertas, siendo preferidas las células vivas. Puede ser ventajoso que las células que contienen hidro-liasas, vivas, que se emplean como hidro-liasas, sean mantenidas en un medio apropiado durante el proceso, de tal manera que ellas sean abastecidas con las sustancias necesarias para el crecimiento. No obstante, se ha comprobado que, en lo que se refiere al abastecimiento con oxígeno, puede ser ventajoso limitar a éste. Por lo tanto, se prefiere que las células que contienen hidro-liasas, vivas, empleadas como hidro-liasas, se empleen en la etapa A) del procedimiento en unas condiciones microanaerobias o anaerobias. Unas condiciones microanaerobias o anaerobias están caracterizadas de manera preferida por el hecho de que el medio que rodea a las células que contienen hidro-liasas, vivas, empleadas como hidro-liasas, tiene un contenido de oxígeno disuelto más pequeño que 1 mg/l, de manera preferida más pequeño que 0,5 mg/l, particularmente más pequeño que 0,1 mg/l, referido al medio total. Estas condiciones se pueden conseguir por ejemplo mediante el recurso de que el medio que rodea a las células no es gaseado, es decir atravesado adicionalmente por la corriente de aire o de oxígeno, y eventualmente de modo adicional el receptáculo que rodea a la tanda de reacción es cerrado de modo amplísimamente estanco al aire.

Con el fin de poder llevar a cabo de una manera simplificada la separación del aldehído y de la hidro-liasa, que se ha de llevar a cabo en la etapa B) del procedimiento, se prefiere que la hidro-liasa esté inmovilizada sobre un soporte. En el caso de que la hidro-liasa se emplee como una enzima aislada libre, están a disposición de un experto en la especialidad muchos métodos destinados a la inmovilización de enzimas, tales como por ejemplo el acoplamiento con unos materiales de soporte activados por epóxidos y unos procedimientos descritos en la bibliografía, tales como, por ejemplo: los de Mateo y colaboradores, *Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization* [Avances en el diseño de nuevos soportes epoxídicos para la inmovilización y estabilización de enzimas], *Biochem Soc Trans.* Diciembre de 2007; 35(Pt 6):1593-601 y de Balcão y colaboradores, *Bioreactors with immobilized lipases: state of the art* [biorreactores con lipasas inmovilizadas: estado de la técnica], *Enzyme Microb Technol.* Mayo de 1996, 1;18(6):392-416.

En el caso de que como hidro-liasas se empleen unas células que tienen una actividad de hidro-liasas, para la inmovilización de las células se pueden usar unos procedimientos conocidos por un experto en la especialidad. En particular, son especialmente apropiados en este contexto el método que está basado en siloxanos, que se ha descrito en el documento de patente alemana DE102007031689, así como el de la inmovilización de las células con el líquido Lentikat-Liquid obtenible comercialmente.

En el procedimiento conforme al invento se pueden emplear en la etapa A) del procedimiento glicerol y 1,2-propanodiol.

Se emplea el glicerol en el procedimiento conforme al invento como un diol vecinal, de manera tal que el aldehído obtenido es el 3-hidroxi-propionaldehído. Junto al glicerol se emplea también el 1,2-propanodiol, obteniéndose el propanal como un aldehído. Este aldehído se puede transformar mediante un desproporcionamiento para dar n-propanol y ácido propiónico, que sigue complacientemente.

El glicerol o 1,2-propanodiol se emplea en la etapa A) del procedimiento en un intervalo de concentraciones de desde 0,01 % en peso hasta 50 % en peso, de manera preferida de desde 0,2 % en peso hasta 20 % en peso, referidas a toda la mezcla de reacción.

En la etapa B) del procedimiento, se separan el aldehído formado en la etapa A) del procedimiento y la hidro-liasa. La separación de la hidro-liasa, en particular inmovilizada sobre un soporte, se efectúa en tal caso mediante unos procedimientos de separación conocidos por un experto en la especialidad, tales como por ejemplo una centrifugación. Se puede concebir, en el caso de que en la etapa A) del procedimiento se empleen como hidro-liasas unas células que contienen hidro-liasas, una separación de las células con respecto del aldehído por ejemplo mediante un filtro apropiado, por ejemplo mediante un filtro que tiene un tamaño de exclusión situado dentro del intervalo de 20 a 200 kDa. Se puede concebir también el empleo de una centrifugadora, de un apropiado dispositivo de sedimentación o de una combinación de estos dispositivos, siendo preferido en particular separar por lo menos una parte de las células en primer lugar mediante una sedimentación y a continuación aportar el aldehído, parcialmente liberado de las células, a una ultrafiltración o a un dispositivo de centrifugación.

Las células separadas de esta manera, cuando ellas se habían obtenido en varias etapas de separación llevadas a cabo consecutivamente, eventualmente son reunidas y pueden ser aportadas de nuevo directamente a la etapa A) del procedimiento. Sin embargo, se puede manifestar como ventajoso lavar todavía las células que contienen hidro-  
5 liasas antes de la renovada realización de la etapa A) del procedimiento, efectuándose este lavado de manera preferida ya con aquel medio que se había empleado en la etapa A) del procedimiento.

De manera especialmente preferida, el lavado se efectúa con el medio empleado en la etapa A) del procedimiento mediando una adición adicional de glucosa; de esta manera, la formación de productos secundarios que se derivan del aldehído se puede reprimir de un modo ventajoso durante la biotransformación propiamente dicha. Para el  
10 lavado de las células, éstas se pueden resuspender por ejemplo en un volumen apropiado del medio empleado en la etapa A) del procedimiento y a continuación se pueden liberar del medio, mediante los procedimientos de separación precedentemente descritos, en particular por filtración, sedimentación o centrifugación, o sino mediante una combinación de estas medidas técnicas. Unos procesos análogos de lavado se pueden emplear asimismo para unas hidro-  
15 liasas inmovilizadas sobre un soporte.

Asimismo la separación de un aldehído y de una hidro-liasa, que se ha de llevar a cabo en la etapa B) del procedimiento, se puede facilitar mediante el recurso de que el compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído esté inmovilizado sobre un soporte. Por ejemplo, entran en cuestión aquí unas resinas intercambiadoras de  
20 iones cargadas con un hidrógeno-sulfito, tales como Amberlite® CG400 o Amberlite® IRA400 (de Rohm and Haas).

Es esencial para el invento que las etapas A) y B) del procedimiento se repitan por lo menos una vez con la hidro-  
25 liasa separada, con el fin de aprovechar de nuevo el biocatalizador junto con glicerol o 1,2-propanodiol de nueva aportación para la preparación del aldehído.

En una forma de realización alternativa y preferida del procedimiento conforme al invento, las etapas A), B) y C) del procedimiento se llevan a cabo de una manera continua.

Esto se puede realizar por diferentes vías:

La hidro-liasa se presenta inmovilizada como una fase estacionaria, y un medio, que contiene el glicerol o 1,2-  
30 propanodiol, y el compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído, circula en torno a la hidro-liasa inmovilizada y se pone en contacto con ésta según la etapa A) del procedimiento. El aldehído resultante es separado como una fase móvil de la fase estacionaria, lo cual corresponde a la separación de un aldehído y una hidro-liasa en la etapa B) del procedimiento. El glicerol o 1,2-propanodiol alimentado de manera fresca (de nueva aportación) de un modo continuo a la hidro-liasa, corresponde a una repetición de las etapas A) y B) del procedimiento con la hidro-  
35 liasa obtenida a partir de la etapa B) del procedimiento.

Alternativamente, el compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído puede presentarse inmovilizado como una fase estacionaria. El glicerol o 1,2-propanodiol y la hidro-liasa están contenidos/as en un medio y por consiguiente se ponen en contacto según la etapa A) y circulan en torno al compuesto inmovilizado, que forma un  
40 enlace de unión con el aldehído, permaneciendo el aldehído que se ha formado junto a la fase estacionaria. La hidro-liasa abandona a la fase estacionaria, lo cual corresponde a la separación del aldehído y de la hidro-liasa en la etapa B) del procedimiento, y es alimentada de manera fresca, por ejemplo en forma de un reactor de bucle, renovadamente, en común con el glicerol o 1,2-propanodiol, a la fase estacionaria. Otra forma de realización de un procedimiento conforme al invento, que es realizada de un modo continuo, se ejecuta de tal manera que, tanto el compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído, como también la hidro-liasa, se presentan en estado  
45 inmovilizado como fases estacionarias. Un medio que contiene el glicerol o 1,2-propanodiol circula en torno a la fase estacionaria y por consiguiente se pone en contacto según la etapa A) del procedimiento con la hidro-liasa. El aldehído formado es unido con el compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído junto a la fase estacionaria y por consiguiente ha sido separado con respecto de la hidro-liasa según la etapa B) del procedimiento. El glicerol o 1,2-propanodiol alimentado de manera fresca (de nueva aportación) de un modo continuo a las fases estacionarias corresponde a una repetición de las etapas A) y B) del procedimiento con la hidro-liasa obtenida a partir de la etapa B) del procedimiento.

Con el fin de resolver el problema planteado, durante el proceso conforme al invento debe de estar presente un compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído, que escoge entre las hidrazidas, las hidrazinas, los hidrógeno-sulfitos, los sulfitos, los metabisulfitos y los piro-sulfitos.

El compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído, forma un enlace covalente con este aldehído. El compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído puede ser polifuncional, es decir que por cada molécula del compuesto se puede formar más de un enlace de unión con el aldehído. Unos apropiados compuestos que forman un enlace de unión con el aldehído son hidrazidas, hidrazinas, hidrógeno-sulfitos, sulfitos, metabisulfitos y piro-sulfitos, empleándose en el procedimiento conforme al invento, de manera preferida una semicarbazida [CAS 57-  
55 56-7], una carbohidrazida [CAS 497-18-7] y sulfito de sodio [CAS 7757-83-7].

Éstos se pueden emplear libremente en solución pero también inmovilizados sobre unos soportes, son preferidos en este contexto unos compuestos disueltos no inmovilizados, puesto que éstos pueden pasar a formar un enlace de unión con el aldehído de manera más efectiva y con mayor rapidez y por consiguiente pueden impedir unas reacciones secundarias indeseadas.

En el caso de que el procedimiento conforme al invento se lleve a cabo con células, es preferido conforme al invento que el compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído sea añadido al medio que rodea a las células.

También se pueden emplear unas mezclas de los compuestos que forman un enlace de unión con el aldehído.

Es preferido, que en el procedimiento conforme al invento, el glicerol y 1,2-propanodiol y el grupo funcional del compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído, se empleen en una relación molar de por lo menos 1:1, de manera preferida de por lo menos 1:1,2, y en particular de por lo menos 1:1,5.

5 En la etapa D) del procedimiento conforme al invento se pueden aislar los aldehídos formados, entrando en consideración para el aislamiento todos los métodos conocidos por un experto en la especialidad para realizar el aislamiento de sustancias de bajo peso molecular a partir de unas composiciones complejas. A modo de ejemplo se han de mencionar en este lugar la precipitación mediante unos apropiados disolventes, la extracción mediante unos apropiados disolventes, la formación de compuestos complejos, por ejemplo mediante ciclodextrinas o derivados de  
10 ciclodextrinas, la cristalización, la purificación o respectivamente el aislamiento mediante unos métodos de cromatografía o la transformación de los aldehídos en unos derivados fácilmente separables. Puede ser una parte del aislamiento en la etapa D) del procedimiento también el recurso de separar nuevamente del aldehído el compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído.

15 Esto se puede conseguir mediante unos métodos de por sí conocidos por un experto en la especialidad, en dependencia del enlace presente. Así, por ejemplo se pueden disociar enlaces entre aldehídos y una semicarbazida mediante un ácido unos enlaces entre el complejo del aldehído y el compuesto que pasa a formar un enlace de unión con el aldehído así como el Amberlite® CG400 o Amberlite® IRA400 se pueden separar por ejemplo por elevación de la concentración de sales, por ejemplo de NaCl 1 M o de un sistema de NaHCO<sub>3</sub> y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,15 M/0,075 M). Por lo demás, el compuesto que pasa a formar un enlace de unión con el aldehído se puede disolver  
20 mediante un tratamiento térmico.

Otra contribución a la resolución de los problemas mencionados al comienzo la presta también un procedimiento para la preparación de productos de oxidación o de reducción de un aldehído, que comprende las etapas del procedimiento siguientes:

25 I) la puesta a disposición de un aldehído mediante el procedimiento descrito precedentemente para la preparación de 3-hidroxi-propionaldehído o propanal a partir de glicerol o 1,2-propanodiol,  
II) la conversión química o biocatalítica del aldehído por reducción, oxidación, desproporcionamiento o deshidratación mediando obtención de unos productos intermedios de reducción u oxidación eventualmente insaturados, y eventualmente  
30 III) la ulterior conversión química o biocatalítica de los productos intermedios de reducción u oxidación que se han obtenido en la etapa II) del procedimiento, mediante reducción, oxidación o reacción por adición. Los productos de oxidación o reducción del aldehído comprenden unos compuestos tales como por ejemplo ácidos carboxílicos, derivados de ácidos carboxílicos, aminas, isocianatos, acetales, nitrilos y oximas eventualmente insaturados/as.

35 Los productos intermedios de reducción o de oxidación de la etapa II) del procedimiento pueden por lo tanto constituir ya los deseados productos de reducción u oxidación del aldehído.

En primer lugar, en la etapa I) del procedimiento se pone a disposición un aldehído mediante el procedimiento precedentemente descrito para la preparación de aldehídos, pudiendo este aldehído eventualmente haber sido purificado, tal como se ha descrito precedentemente en conexión con estos procedimientos.  
40 En la etapa II) del procedimiento, el aldehído se puede convertir luego de manera química o biocatalítica por reducción, oxidación, desproporcionamiento o deshidratación mediando obtención de unos productos intermedios de reducción o de oxidación, en particular en el caso de que el aldehído obtenido en la etapa I) del procedimiento sea el 3-hidroxi-propionaldehído, mediando obtención de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) (por reducción), acroleína (por deshidratación) o ácido 3-hidroxi-propiónico (por oxidación). En este caso han sido descritas algunas particularidades acerca de la conversión química del 3-hidroxi-propionaldehído en la acroleína, entre otros autores, por Hall y Stern in Journal of the Chemical Society [Revista de la sociedad química], 1950, páginas 490 - 498, mientras que algunas particularidades acerca de la preparación de 1,3-propanodiol a partir de 3-hidroxi-propionaldehído se pueden tomar, entre otros, del documento de patente de los EE.UU. US 5.334.778. La preparación del ácido 3-hidroxi-propiónico a partir del 3-hidroxi-propionaldehído, a su vez, ha sido descrita, entre otras citas, en el documento US 6.852.517. En el caso de que el aldehído obtenido en la etapa I) del procedimiento represente el propanal a partir del 1,2-propanodiol, entonces el 1-propanol y el ácido propiónico pueden formarse por desproporcionamiento complaciente del propanal en el medio de biotransformación (Sriramulu, D. D.; Liang, M.; Hernández-Romero, D.; Raux-Deery, E.; Lunsdorf, H.; Parsons, J. B.; Warren, M. J. & Prentice, M. B. *J. Bacteriol.*, 2008, 190, 4559-4567).  
45  
50

Eventualmente, los productos intermedios de reducción o de oxidación, obtenidos en la etapa II) del procedimiento, pueden ser convertidos todavía más por medios químicos o microbiológicos mediante reducción, oxidación o reacción por adición en otra etapa III) del procedimiento. Aquí entra en consideración en particular la conversión de la acroleína obtenida en la etapa II) del procedimiento, por oxidación, para dar el ácido acrílico, que luego se puede  
55

convertir eventualmente en otra etapa IV) del procedimiento de un modo catalizado por radicales mediando formación de unos polímeros que se basan en ácido acrílico. Entra en consideración aquí en particular la polimerización catalizada por radicales de ácido acrílico eventualmente neutralizado parcialmente, en presencia de agentes reticulantes apropiados mediando formación de unos poliacrilatos absorbentes de agua, que también se designan como "súperabsorbentes". La oxidación química de acroleína para dar ácido acrílico y la subsiguiente polimerización catalizada por radicales del ácido acrílico, obtenido de esta manera, se describen, entre otras citas, en el documento de solicitud de patente internacional WO-A-2006/136336.

Por lo demás, entra en consideración asimismo el hecho de que la conversión química de la acroleína obtenida en la etapa II) del procedimiento se realiza mediante una esterificación con oxidación para dar ésteres de ácido acrílico, que luego se pueden convertir eventualmente en todavía otra etapa IV) del procedimiento de un modo catalizado por radicales mediando formación de unos polímeros que se basan en ésteres de ácido acrílico.

Unos preferidos productos de reducción o de oxidación del aldehído, obtenibles a partir del procedimiento conforme al invento pasando por las etapas que más arriba se han expuesto, los constituyen por consiguiente las sustancias 1,3-propanodiol, 1-propanol, acroleína, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido propiónico, ésteres de ácido acrílico y polímeros que se basan en el ácido acrílico o en ésteres de ácido acrílico, siendo 3-hidroxi-propionaldehído el aldehído que se ha obtenido en la etapa I) del procedimiento.

En los Ejemplos que seguidamente se exponen se describe a modo de ejemplo el presente invento. Las siguientes Figuras son una parte componente de los Ejemplos:

La Figura 1: representa la evolución de las concentraciones de glicerol, 3HPA y 1,3-PDO en el caso de la conversión química de glicerol con células de *L. reuteri* inmovilizadas en el transcurso de un ciclo de biotransformación.

La Figura 2: representa la evolución de las concentraciones de glicerol, 3HPA y 1,3-PDO en el caso de la conversión química de glicerol con células de *L. reuteri* inmovilizadas en el transcurso de 7 ciclos de biotransformación y en la presencia de una semicarbazida como sustancia captadora.

La Figura 3: representa el rendimiento acumulado de 3HPA en el caso de la conversión química de glicerol con células de *L. reuteri* inmovilizadas en el transcurso de 7 ciclos de biotransformación y en presencia de una semicarbazida como sustancia captadora.

La Figura 4: representa la evolución de las concentraciones de glicerol, 3HPA y 1,3-PDO en el caso de la conversión química de glicerol con células de *L. reuteri* inmovilizadas en el transcurso de 10 ciclos de biotransformación y en la presencia de una semicarbazida como sustancia captadora.

La Figura 5: representa el rendimiento acumulado de 3HPA en el caso de la conversión química de glicerol con células de *L. reuteri* inmovilizadas en el transcurso de 10 ciclos de biotransformación y en presencia de una carbohidrazida como sustancia captadora.

La Figura 6: representa la evolución cronológica de las concentraciones de glicerol y de 1,2-propanodiol en el caso de una biotransformación de glicerol o respectivamente de 1,2-propanodiol con células de *L. reuteri*

La Figura 7: representa la evolución de las concentraciones de 3HPA, glicerol y 1,3-PDO en el caso de siete biotransformaciones consecutivas de glicerol con células de *L. reuteri* inmovilizadas sin la adición de un sulfito (ejemplo comparativo)

La Figura 8: representa la evolución de las concentraciones de 3HPA, glicerol y 1,3-PDO en el caso de siete biotransformaciones consecutivas de glicerol con células de *L. reuteri* inmovilizadas con la adición de hidrógeno-sulfito de sodio (conforme al invento).

La Figura 9: representa la evolución cronológica de las concentraciones de 3HPA, glicerol y 1,3-PDO en el caso de una biotransformación de glicerol con células de *L. reuteri* de tipo salvaje.

Figura 10: representa la evolución cronológica de las concentraciones de 3HPA, glicerol y 1,3-PDO en el caso de una biotransformación de glicerol con células de *L. reuteri* modificadas por tecnología genética.

Ejemplos:

#### *Ejemplo 1: Cultivación de Lactobacillus reuteri*

La cultivación de *Lactobacillus reuteri* se efectuó en un medio MRS anaerobizado (medio para *Lactobacillus* según DeMan, Rogosa y Sharpe) con adición de glicerol 20 mM (MRSG20) en apropiadas cubas cerradas a 80 rpm



(revoluciones por minuto). El medio MRSG20 (con la siguiente composición [los datos se expresan por litro]: 10 g de la proteosa peptona nº 3 (de Roth), 8 g de un extracto de bovino (de Roth), 4 g de un extracto de levadura (de VWR), 1,5 ml de glicerol (de Roth), 1 ml de Tween80 (de Roth), 40 ml de una solución de sal [10 g/l de hidrógeno-fosfato de dipotasio (de Roth), 250 g/l de acetato de sodio trihidrato (de Roth), 100 g/l de hidrógeno-citrato de diamonio (de Roth), 10 g/l de sulfato de magnesio heptahidrato (de Roth), 2,5 g/l de sulfato de manganeso tetrahidrato (de Roth)] se reunió, después de haber anaerobizado y autoclavado (durante 20 min a 121 °C), con 25 ml de una solución de glucosa (4 mol/l).

Para el cultivo preliminar 1 (50 ml) se utilizó un cultivo criogénico. Para esto, se almacenó *L. reuteri* SD2112 a -80 °C en un medio MRS, que adicionalmente contenía 6 % (p/v = peso/volumen) de un polvo de leche desnatada y 10 % (v/v = volumen/volumen) de glicerol. Para la preparación del cultivo original (en inglés stock cultura), un cultivo mantenido durante una noche (10 ml de un medio de MRS) se mezcló a razón de 1:1 con la solución original. El cultivo preliminar sirvió como un inóculo al 1 % y se incubó a 33 °C. Después de 15 horas, a partir de esta tanda se inoculó al 1 % un segundo cultivo preliminar (50 ml) y se incubó durante 9 horas a 37 °C. Éste sirvió a su vez como un inóculo al 1 % para el cultivo principal (2 veces 1 l). Después de 15 horas a 33 °C, las células se cosecharon.

Para esto se separaron por centrifugación 2 litros (4.000 g; 20 °C; 10 min), el material sobrenadante se desechó y ambos sedimentos resultantes se resuspendieron a un pH 7 en 1 litro de un tampón de fosfato de potasio 0,1 M (KPP; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [de Roth]). Se efectuó una centrifugación renovada en las mismas condiciones. El material sobrenadante se desechó de nuevo, el sedimento de células se resuspendió hasta 1 ml en KPP 0,1 M a un pH de 7 en la relación de 1 g por 1 ml y se almacenó bajo N<sub>2</sub>. Esta suspensión se usó para la subsiguiente inmovilización.

#### 20 *Ejemplo 2: Inmovilización de Lactobacillus reuteri*

Para la inmovilización, 20 ml de la suspensión de células que se ha descrito en el Ejemplo 1 se mezclaron con un líquido Lentikat-Liquid® atemperado a ~35 °C (de GeniaLab), los Lentikats se produjeron con la impresora LentiKat® (de GeniaLab) y se secaron hasta dejar una humedad residual de 28 %. Después del hinchamiento de retorno en un estabilizador LentiKat-Stabilizer® (de GeniaLab) los materiales inmovilizados se agitaron durante por lo menos 2 horas en una atmósfera anóxica a 300 rpm para la estabilización de los Lentikats en el LentiKat-Stabilizer®. Los materiales inmovilizados separados y lavados dos veces con KPP 0,1 M a un pH 7 fueron regenerados al 3 % permaneciendo durante 15 horas a 33 °C en el MRSG20 en un frasco de 1 l de capacidad totalmente llenado con posibilidad de efectuar el intercambio de gases. Después de una separación de los materiales inmovilizados con respecto del medio (en condiciones aerobias) éstos fueron lavados dos veces con KPP 0,1 M (de pH 7).

#### 30 *Ejemplo 3: Cuantificación de glicerol y 1,3-propanodiol, basada en una HPLC*

Para la cuantificación de glicerol y de 1,3-propanodiol (1,3-PDO), en cada caso en 1 ml de una suspensión de células, la biomasa fue separada por centrifugación (10 min, 16.100 g, 4 °C) y se analizaron 40 µl del material sobrenadante de cultivo mediante utilización de un sistema de HPLC (cromatografía de líquido de alto rendimiento) de Shimadzu (Autosampler SIL-10AT, una bomba LC-10AT, un desgasificador DGU-3A, un detector del índice de refracción RID-10A, un detector de UV SPD-10A, un horno CTO-10A, un controlador SCA-10A-VP) con una columna de separación Aminex HPX-87H 300 x 7,8 mm (de Bio-Rad Laboratories GmbH, de München) con un tamaño de partículas de 9 µm y mediante utilización de una columna preliminar (HPX-87H, 30 x 4,6 mm). Las sustancias que se habían de analizar se eluyeron isocráticamente con una fase móvil a base de ácido sulfúrico 5 mM con un caudal de 0,6 ml/min durante 20 min a 40 °C. La identificación se efectuó por medio de una comparación con el período de tiempo de permanencia de unas sustancias de referencia (de Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). La concentración de los compuestos en los materiales sobrenadantes de cultivo se calculó por medio de una comparación de las superficies de pico con una recta de calibración construida previamente con patrones externos.

#### *Ejemplo 4: Conversión química de glicerol en 3HPA con Lactobacillus reuteri inmovilizado (Ejemplo comparativo)*

Los materiales inmovilizados cargados con *L. reuteri*, que se habían producido según el Ejemplo 2, se emplearon concentrados al 10 % (20 g, correspondiendo a una concentración de 2 g de células secas por litro) en una biotransformación dentro de un fermentador de vidrio (que tenía un volumen total de 500 ml) con 200 ml de un tampón de reacción. Éste último se componía de KPP 0,1 M (a un pH de 7), anaerobizado y previamente atemperado a 35 °C. Después del ajuste de un valor constante del pH, de 7 y de una temperatura constante, de 35 °C, la reacción se inició por adición de 8 ml de glicerol al 98 % (de Roth, correspondiendo a una concentración de 500 mM en la mezcla de reacción). El experimento se efectuó durante una hora cada 10 minutos y seguidamente durante 2 horas cada 30 minutos. Las concentraciones de glicerol y de los productos secundarios se determinaron mediante una HPLC conforme al Ejemplo 3.

Una cuantificación del 3-hidroxi-propionaldehído se efectuó mediante un ensayo colorimétrico según Doleyres y colaboradores ("Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*, [Producción de 3-hidroxi-propionaldehído usando un procedimiento de dos etapas con *Lactobacillus reuteri*], *Applied Microbiology and Biotechnology* [Microbiología y biotecnología aplicadas], volumen 68, 2005, páginas 467-474).

Después de un período de tiempo de reacción de ~100 minutos ya no se pudo observar, ni en el caso de las células libres ni tampoco en el caso de las células inmovilizadas, ninguna conversión química de glicerol.

Las evoluciones de las concentraciones para glicerol, 3HPA y 1,3-PDO se reproducen en la Figura 1; durante la biotransformación se produjeron 1,29 g de 3HPA. El medio de reacción se separó con respecto de las células o respectivamente de los materiales inmovilizados y se almacenó por separado a 4 °C. La conversión química de glicerol en 3HPA y en los productos secundarios se efectuó de acuerdo con la analítica precedentemente descrita en ~25 %. En el caso de una utilización renovada de las células o respectivamente de los materiales inmovilizados no se pudo comprobar ninguna conversión química de glicerol en 3HPA.

*Ejemplo 5: Conversión química de glicerol en 3HPA con Lactobacillus reuteri inmovilizado y en presencia de una semicarbazida, conforme al invento*

Los materiales inmovilizados cargados con *L. reuteri*, que se habían preparado de acuerdo con el Ejemplo 2, se emplearon concentrados al 10 % (20 g, correspondiendo a una concentración de 2 g de células secas por litro) en una biotransformación dentro de un fermentador de vidrio que tenía un volumen total de 500 ml) con 200 ml de un tampón de reacción. Éste se compone de KPP 0,1 M (pH 7) así como de semicarbazida 500 mM y se anaerobizó así como se atemperó previamente a una temperatura de reacción de 35 °C. Después del ajuste de un valor constante del pH, de 7, y de una temperatura constante, de 35 °C, la reacción se inició por medio de la adición de 8 ml de glicerol al 98 % (de Roth; correspondiendo a una concentración de 500 mM en la mezcla de reacción). La extracción y el análisis de las muestras a partir de la mezcla de reacción se efectuaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. Después de un período de tiempo de reacción de 150 minutos, el medio de reacción se separó con respecto de los materiales inmovilizados y se añadió una nueva cantidad de un medio de reacción anaerobizado, previamente atemperado (KPP 0,1 M de pH 7 con semicarbazida 500 mM). Tal como precedentemente se ha descrito, se lleva a cabo otro ciclo de biotransformación. En total se llevaron a cabo 7 ciclos consecutivos sin almacenamiento intermedio de los materiales inmovilizados. Las evoluciones de las concentraciones para glicerol, 3HPA y 1,3-PDO se reproducen en la Figura 2; la Figura 3 muestra los rendimientos acumulados de 3HPA. La conversión química de glicerol en 3HPA se efectuó con una semicarbazida como sustancia captadora, de acuerdo con la analítica precedentemente descrita, en los primeros 5 ciclos solo hasta ~55 %; en los otros 2 ciclos, el rendimiento se disminuía de una manera continua.

*Ejemplo 6: Conversión química de glicerol en 3HPA con Lactobacillus reuteri inmovilizado en presencia de una carbohidrazida, conforme al invento*

Los materiales inmovilizados cargados con *L. reuteri*, producidos de acuerdo con el Ejemplo 2, se emplearon concentrados al 10 % (20 g, correspondiendo a una concentración de 2 g de células secas por litro) en una biotransformación dentro de un fermentador de vidrio (que tenía un volumen total de 500 ml) con 200 ml de un tampón de reacción. Éste se compone de KPP 0,1 M (de pH 7) así como de carbohidrazida 520 mM y a continuación se anaerobizó así como se atemperó previamente a una temperatura de reacción de 35 °C. Después de haber ajustado un valor constante del pH, de 7, y una temperatura constante, de 35 °C, la reacción se inició por medio de la adición de 8 ml de glicerol al 98 % (de Roth; correspondiendo a una concentración de 500 mM en la mezcla de reacción). La extracción y el análisis de las muestras a partir de la mezcla de reacción se efectuaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. Después de un período de tiempo de reacción de 180 minutos, el medio de reacción se separó con respecto del material inmovilizado y se añadió una nueva cantidad de un medio de reacción anaerobizado, previamente atemperado (KPP 0,1 M de pH 7 con carbohidrazida 520 mM). Tal como precedentemente se ha descrito, se llevó a cabo otro ciclo de biotransformación. En total, se llevaron a cabo 10 ciclos consecutivos sin ningún almacenamiento intermedio de los materiales inmovilizados; las evoluciones de las concentraciones para glicerol; 3HPA y 1,3-PDO se reproducen en la Figura 4; la Figura 5 muestra los rendimientos acumulados de 3HPA. La conversión química de glicerol en 3HPA y en productos secundarios se efectuó con una carbohidrazida como sustancia captadora de acuerdo con la analítica precedentemente descrita en todos los 10 ciclos en ~95 %.

*Ejemplo 7: Conversión química de glicerol en 3HPA con Lactobacillus reuteri libre en presencia de unos compuestos que contienen azufre, conformes al invento*

Las células producidas según el Ejemplo 1 se suspendieron en una solución 1.000 milimolar de glicerol, de manera tal que resultó una concentración total de células de  $2,2 \times 10^{10}$  CFU (unidades formadoras de colonias)/ml. Después de la adición de un compuesto que contiene azufre (sulfito de sodio, hidrógeno-sulfito de sodio o piro-sulfito de sodio; en cada caso con una concentración final de 100 mmol/l en la solución de reacción) la suspensión se incubó durante 120 min, habiendo sido mantenida exenta de oxígeno la mezcla por introducción de una corriente constante de nitrógeno. Las concentraciones de 3HPA y 1,3-PDO resultantes después de haber transcurrido 120 min, que se enumeran en la Tabla 1 así como las viabilidades de las células, explican la elevación de la concentración conseguible de 3-HPA así como la reducción de la disminución de las viabilidades de células por medio de una adición de los compuestos que contienen azufre.

**Tabla 1**

Compuesto que contiene azufre	c (3-HPA) [mmol/l]	c (1,3-PDO) [mmol/l]	Viabilidad de las células (CFU/ml)
ninguno	504	32	$5,1 \cdot 10^4$
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	524	31	$> 6,0 \cdot 10^9$
NaHSO <sub>3</sub>	546	30	$3,2 \cdot 10^9$
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	607	31	$2,6 \cdot 10^9$

*Ejemplo 8: Conversión química de 1,2-propanodiol o respectivamente glicerol en propanal o respectivamente 3-hidroxi-propionaldehído con Lactobacillus reuteri inmovilizado en presencia de una carbohidrazida, conforme al invento*

Las células producidas de acuerdo con el Ejemplo 1 se suspendieron en cada caso en una solución 500 milimolar de glicerol o respectivamente en una solución 500 milimolar de 1,2-propanodiol de manera tal que resultó una concentración total de células de  $2,2 \times 10^{10}$  CFU/ml. Después de la adición de una carbohidrazida con una concentración final de 100 mmol/l en la solución de reacción, la suspensión se incubó durante 120 min, siendo la mezcla mantenida exenta de oxígeno por introducción de una corriente constante de nitrógeno. Las evoluciones de las concentraciones de glicerol y 1,2-propanodiol, representadas en la Figura 6, explican la transformación equivalente de los dos substratos.

*Ejemplo 9: Conversión química de glicerol en 3HPA con células de Lactobacillus reuteri inmovilizadas en presencia de unos compuestos que contienen azufre y mediando una adición de glucosa a la solución de lavado, conforme al invento*

Los materiales inmovilizados cargados con *L. reuteri*, producidos de acuerdo con el Ejemplo 2, se emplearon concentrados al 20 % (4 ml) en una biotransformación dentro de un fermentador de vidrio con 20 ml de una solución de reacción. Ésta contenía 80 mmol/l de glicerol y se ajustó, después de haber atemperado a 30 °C, a un valor constante de pH de 5 (Ejemplos de comparación y conforme al invento). En la tanda conforme al invento a la solución de reacción se añadió adicionalmente hidrógeno-sulfito de sodio (de acuerdo con una concentración final de 50 mmol/l). Después de haber transcurrido un ciclo de biotransformación (de 30 min) los materiales inmovilizados se separaron por filtración, se regeneraron durante un período de tiempo de 30 min. en un MRSG20 (véase el Ejemplo 1) y se emplearon de nuevo, tal como se ha descrito, en una solución de reacción. Del modo descrito se llevaron a cabo en total 7 conversiones de glicerol. Mientras que con una adición de un hidrógeno-sulfito en cada etapa de transformación se forman 10 mmol/l de 1,3-PDO (Figura 7), en el caso de la adición de hidrógeno-sulfito de sodio se puede observar una reducción de la concentración de 1,3-PDO (Figura 8).

*Ejemplo 10: Conversión química de glicerol en 3HPA con Lactobacillus reuteri libre no modificado o respectivamente modificado por tecnología genética*

Las células del tipo salvaje o respectivamente las células generadas por delección (supresión) del gen de oxidorreductasa se suspendieron en una solución 250 milimolar de glicerol, de manera tal que en cada caso resultó una concentración total de células de  $1,2 \times 10^{10}$  CFU/ml. Tal como lo muestran las evoluciones de las concentraciones en el transcurso de una biotransformación durante 120 minutos, en el caso del empleo del tipo salvaje de *L. reuteri*, el 3HPA formado después de una biotransformación durante 20 minutos se descompone en favor de la formación de 1,3-PDO (Figura 9), mientras que la transformación de 3HPA en 1,3-PDO se evita en el caso de la utilización de las células generadas por delección (supresión) del gen de oxidorreductasa (Figura 10).

*Ejemplo 11: Preparación de acroleína a partir de un material descargado de la fermentación que contiene 3HPA, conforme al invento*

A partir de los materiales descargados de las fermentaciones, que se obtuvieron de acuerdo con los Ejemplos 4 - 6 se pudo recuperar acroleína mediante una hidrólisis en condiciones ácidas a temperaturas elevadas. Para esto, una parte del material descargado de la fermentación se diluyó con agua en la relación de 1:100, se mezcló con 3 partes de ácido clorhídrico al 37 % y se incubó durante 0,5 h a 37 °C. La acroleína formada en este caso, después de la adición de una solución de DL-triptófano (de Fluka, 0,01 mol/l de triptófano en 0,05 mol/l de ácido clorhídrico) y de una incubación renovada a 37 °C (0,5 h), formaba un aducto coloreado que se podía cuantificar colorimétricamente por medio de su absorción a 560 nm.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la preparación de aldehídos, que comprende las etapas del procedimiento:
- 5 A) de poner en contacto un diol vecinal con una hidro-liasa,  
 B) de separar el aldehído formado en la etapa A) del procedimiento y la hidro-liasa,  
 C) de por lo menos una repetición de las etapas A) y B) del procedimiento con la hidro-liasa obtenida a partir de la etapa B) del procedimiento, y eventualmente  
 D) de aislamiento del aldehído formado,  
 10 siendo el diol vecinal en la etapa A) del procedimiento glicerol o 1,2-propanodiol, escogiéndose la hidro-liasa en la etapa A) del procedimiento entre glicerol-deshidratasas, diol-deshidratasas y propanodiol-deshidratasas, caracterizado por que el procedimiento se lleva a cabo en presencia de un compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído, que se escoge entre el conjunto de las hidrazidas, las hidrazinas, los hidrógeno-sulfitos, los sulfitos, los metabisulfitos y los piro-sulfitos.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la hidro-liasa empleada en la etapa A) del procedimiento está inmovilizada sobre un soporte.
- 20 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que en la etapa A) del procedimiento se emplean como hidro-liasa unas células que tienen actividad de hidro-liasas.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que las células tienen una actividad, disminuida en comparación con su tipo salvaje, de una oxidorreductasa que es capaz de reducir al aldehído.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 hasta 4, caracterizado por que el diol vecinal en la etapa A) del procedimiento se emplea en un intervalo de concentraciones de desde 0,01 % en peso hasta 50 % en peso, referidas a la mezcla de reacción total.
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizado por que las etapas A, B) y C) del procedimiento se llevan a cabo de una manera continua.
- 40 7. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 hasta 6, caracterizado por que, como un compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído se emplea una semicarbazida [CAS 57-56-7], una carbohidrazida [CAS 497-18-7] o sulfito de sodio [CAS 7757-83-7].
- 45 8. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 hasta 7, caracterizado por que en el procedimiento conforme al invento, el diol vecinal y el grupo funcional del compuesto que forma un enlace de unión con el aldehído se emplean en una relación molar de por lo menos 1:1.
- 50 9. Procedimiento para la preparación de productos de oxidación o de reducción de un aldehído, que comprende las etapas del procedimiento:  
 I) de la puesta a disposición de un aldehído mediante el procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 8,  
 II) de una conversión química o biocatalítica del aldehído por reducción, oxidación, desproporcionamiento o deshidratación mediando obtención de un producto intermedio de reducción o de oxidación eventualmente insaturado, y eventualmente  
 III) de una ulterior conversión química o biocatalítica de los productos de reducción o oxidación obtenidos en la etapa II) del procedimiento, por reducción, oxidación o reacción por adición.

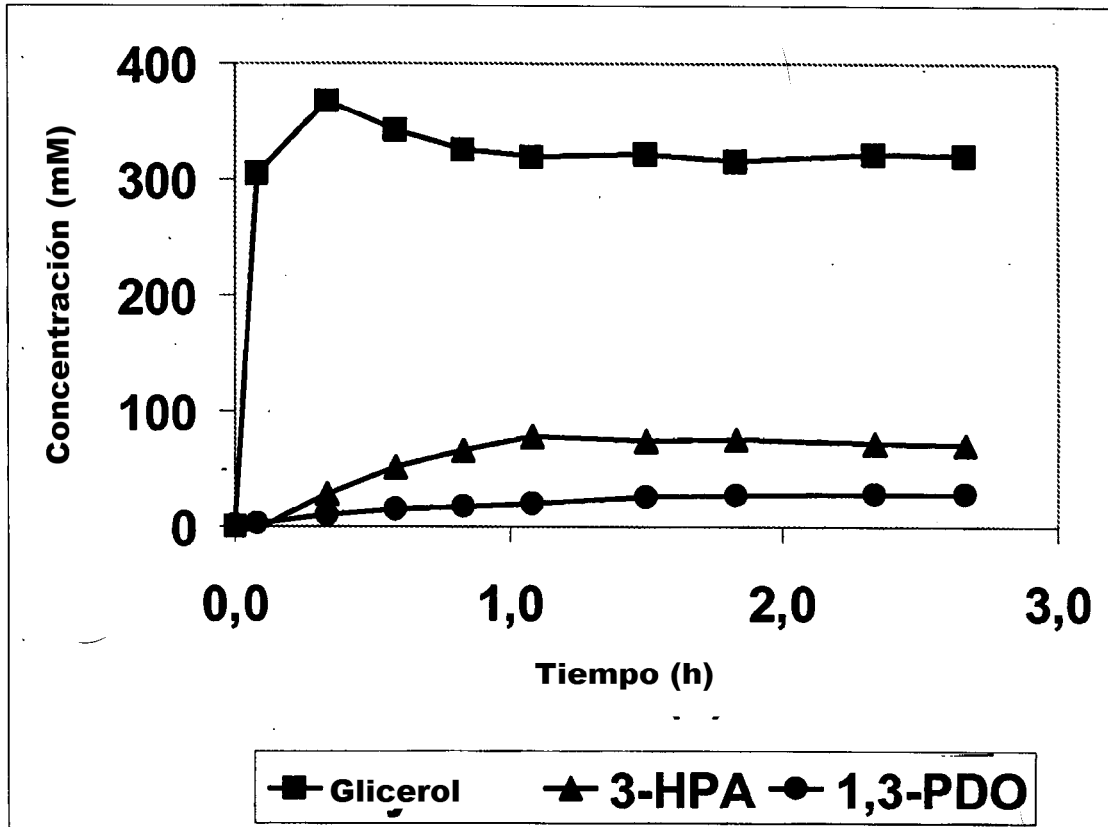


Figura 1

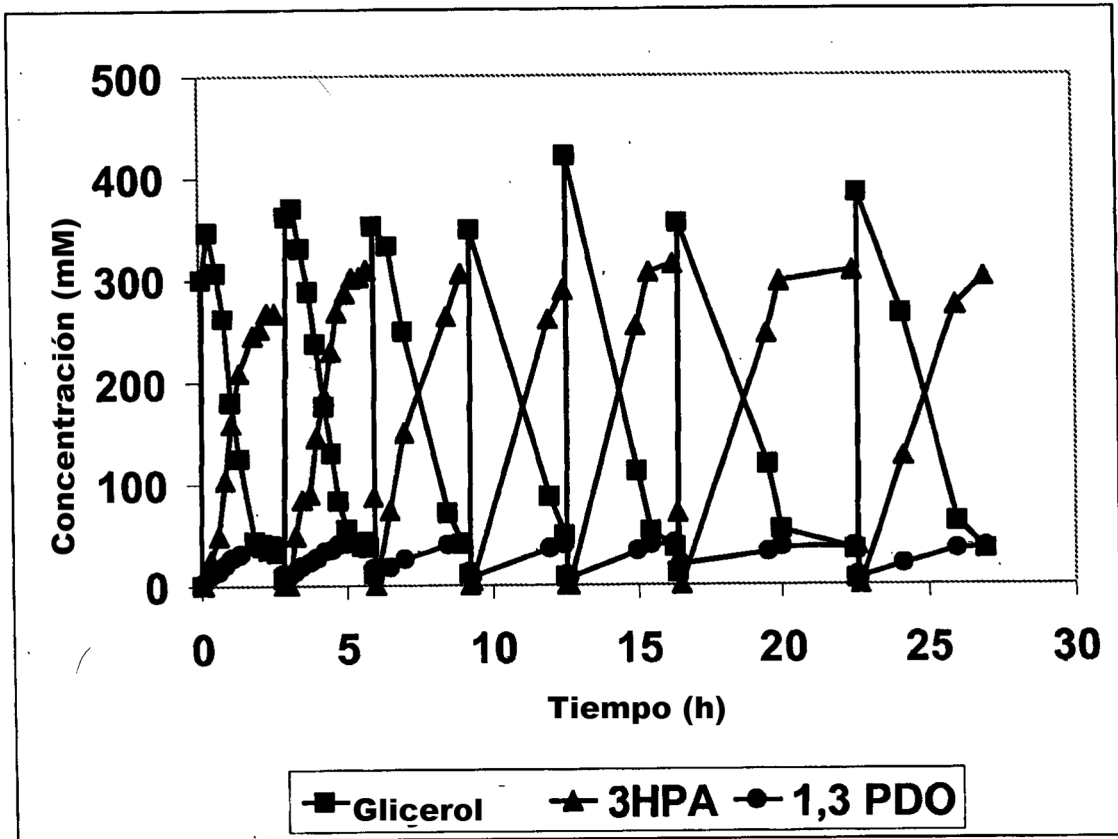


Figura 2

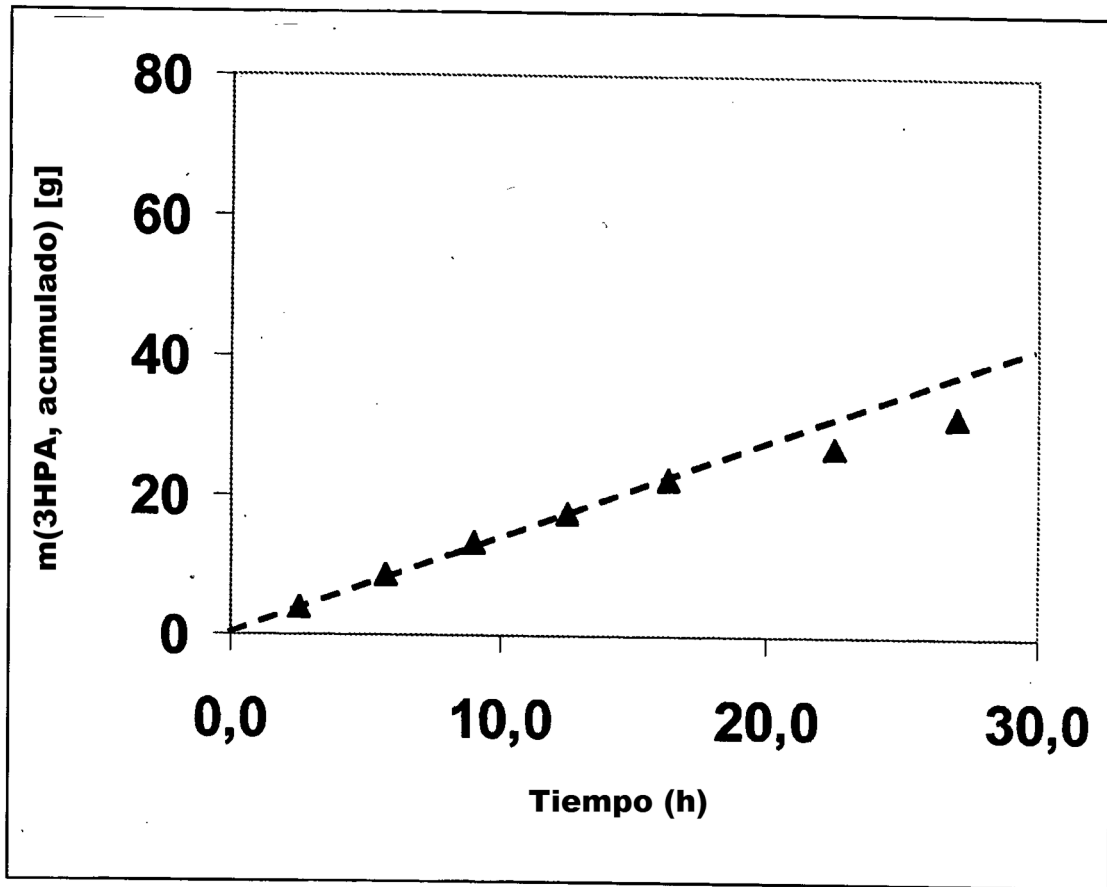


Figura 3

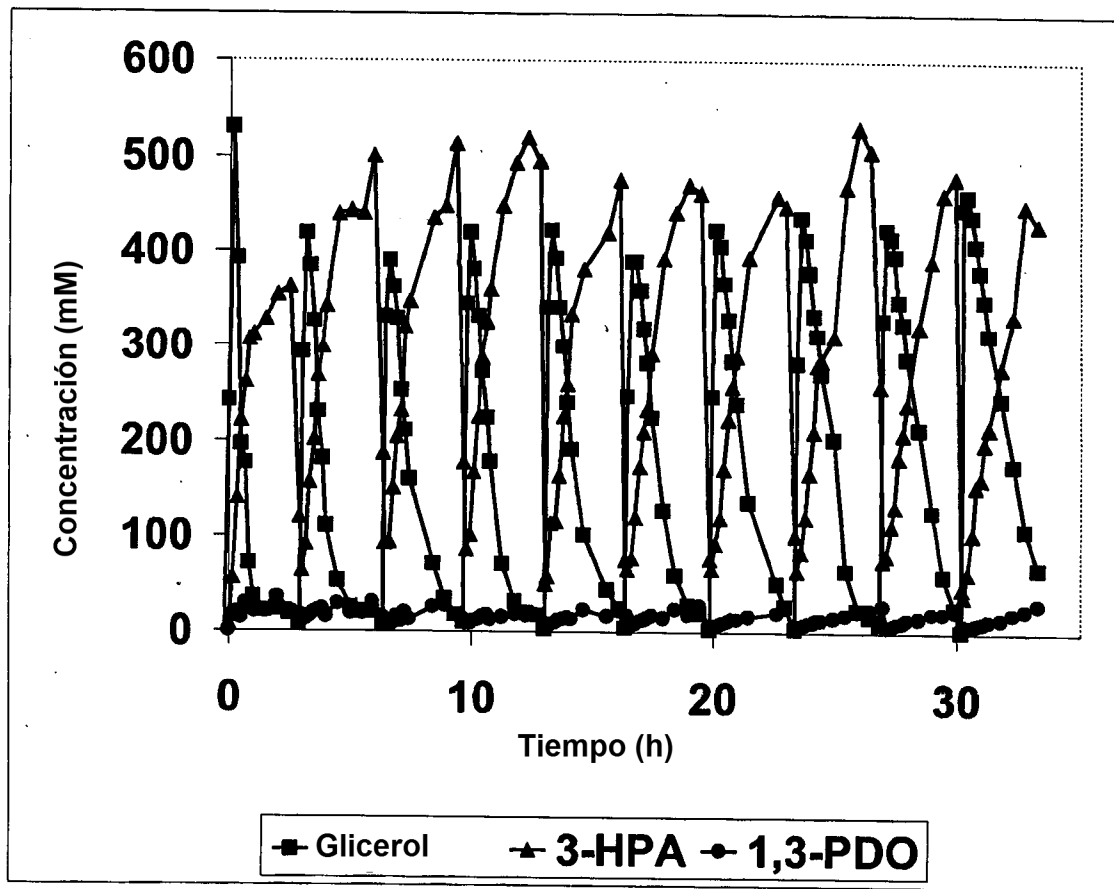


Figura 4



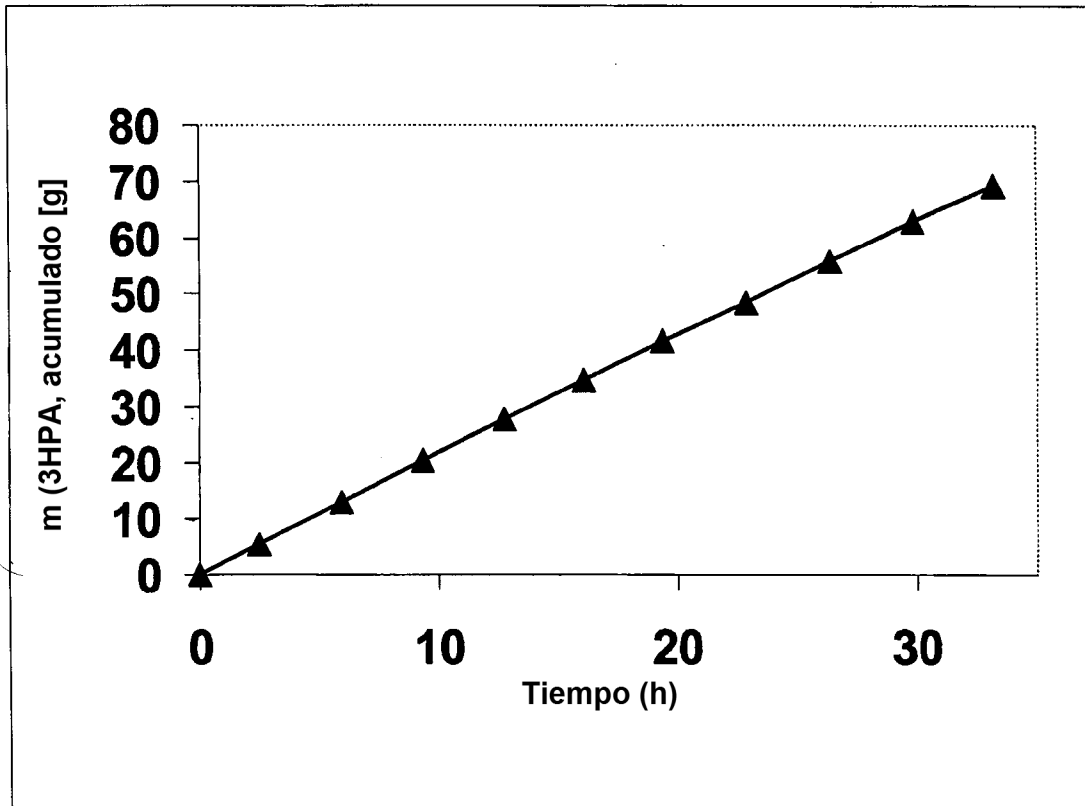


Figura 5

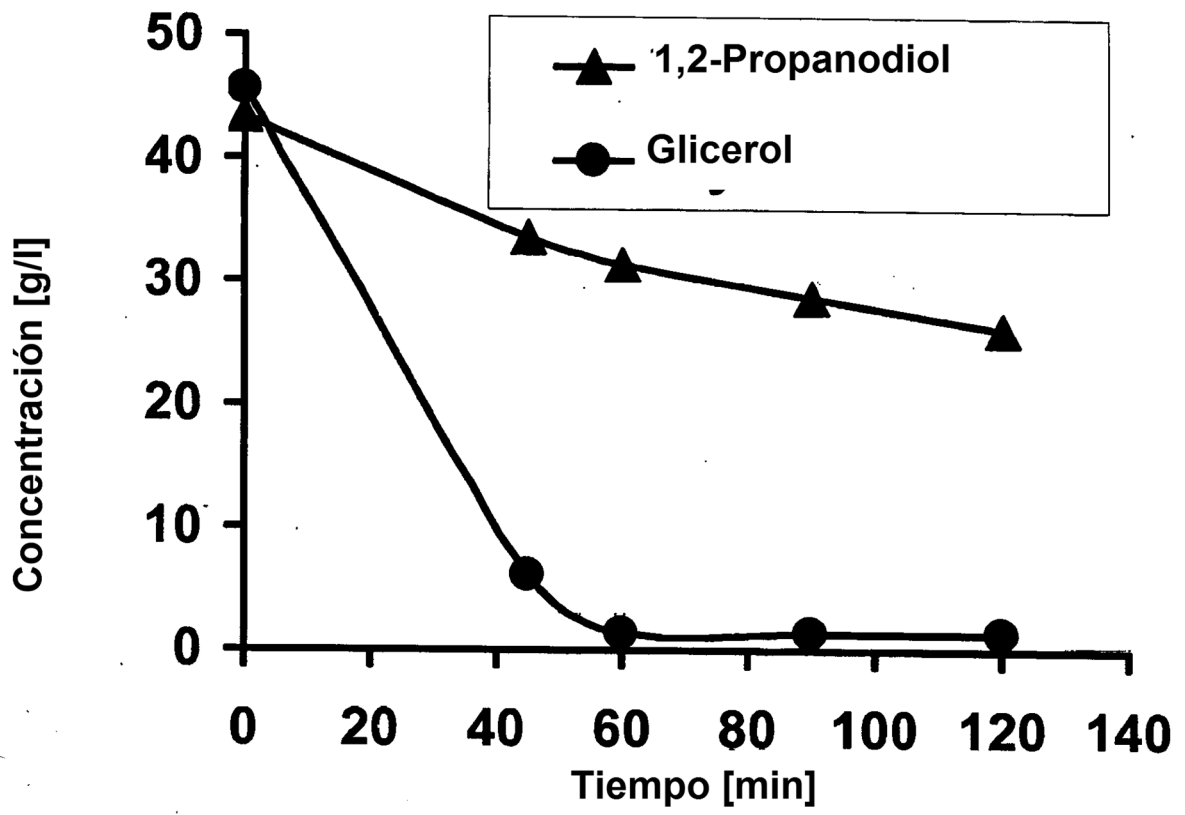


Figura 6

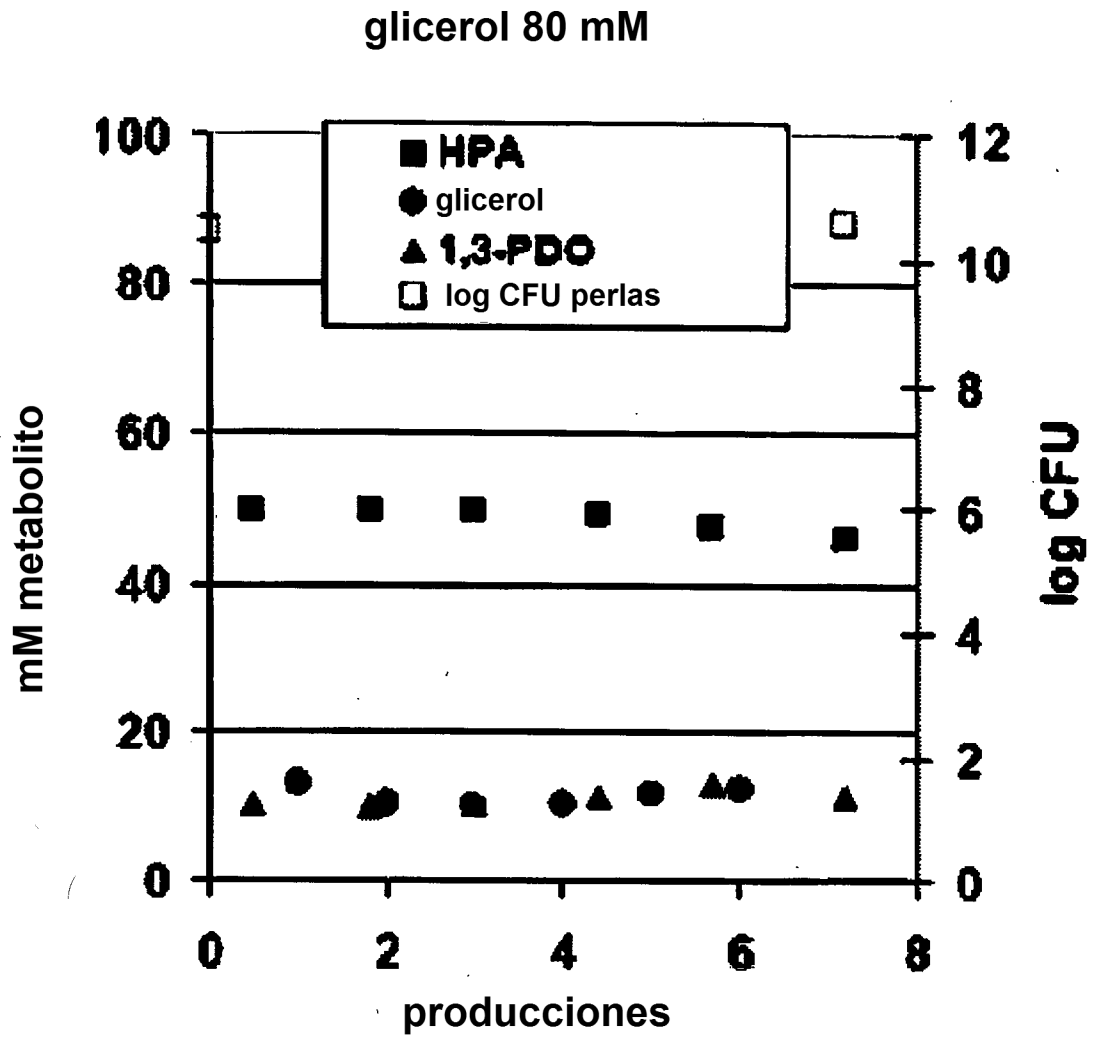


Figura 7

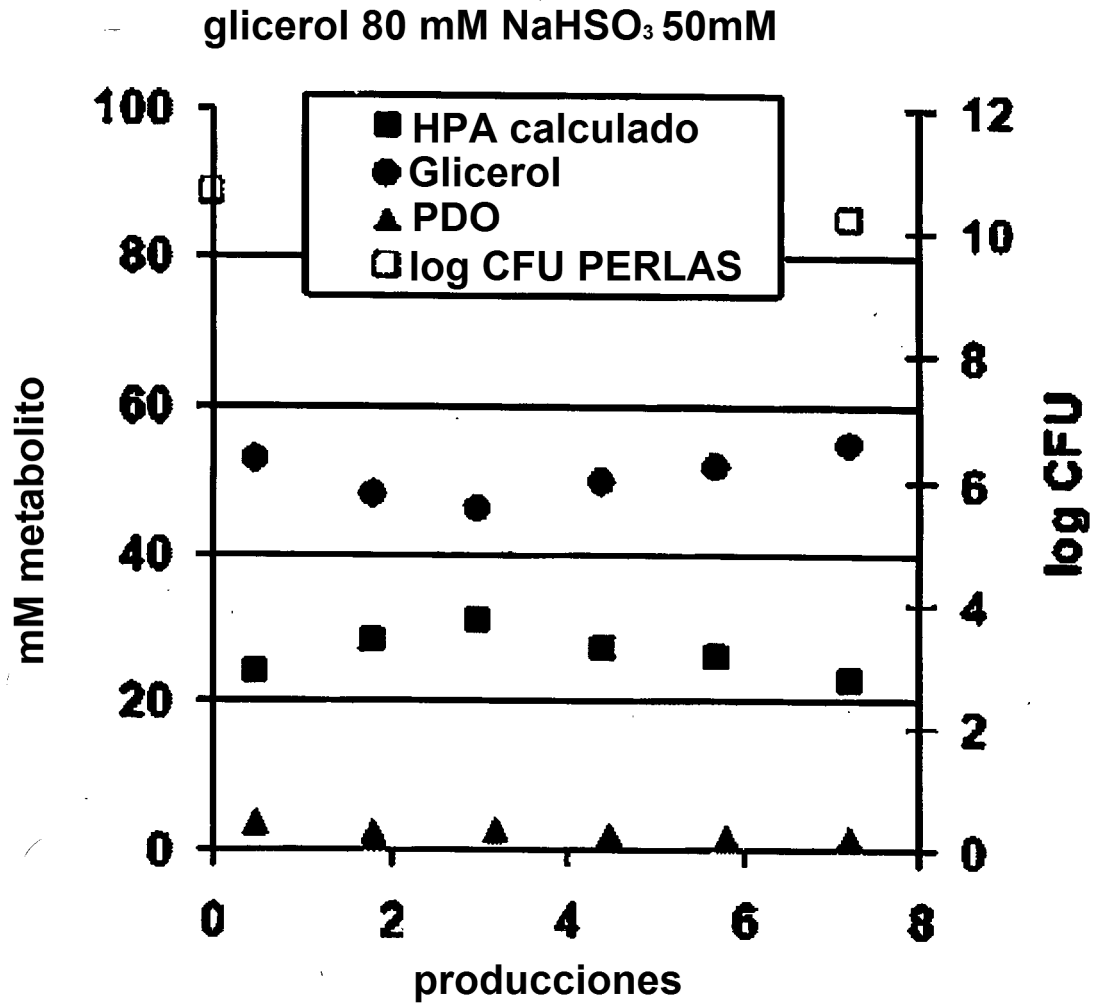


Figura 8

Tipo salvaje

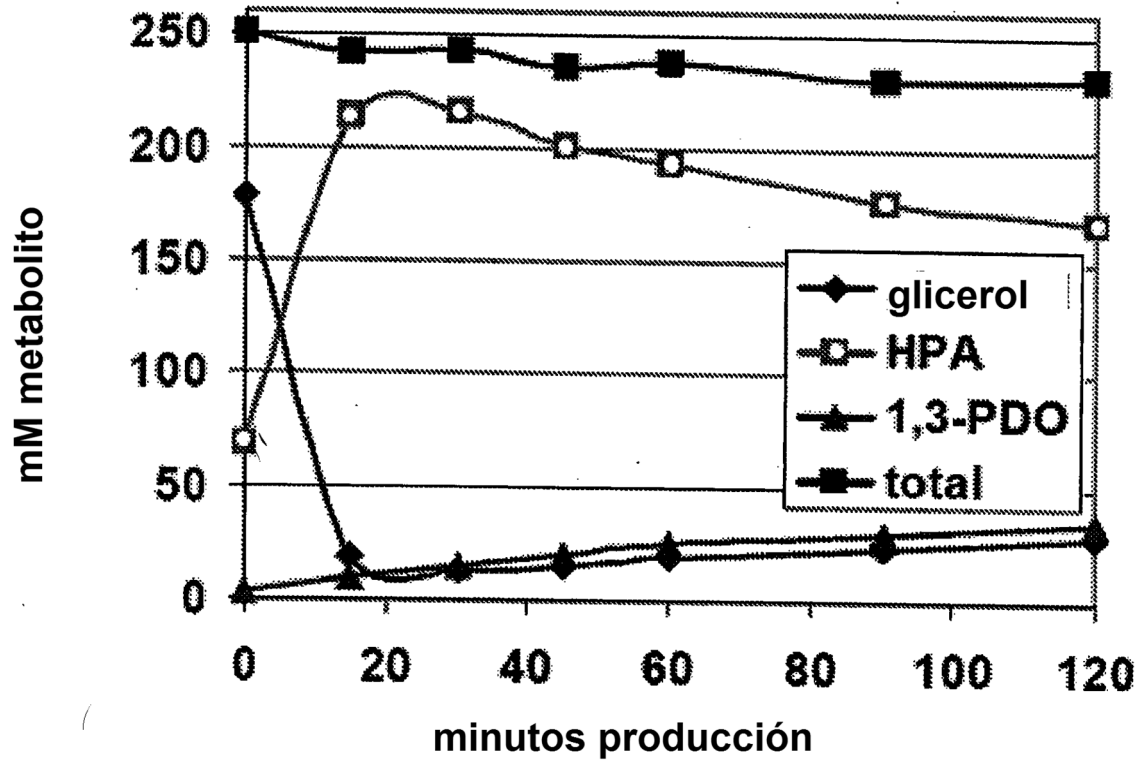


Figura 9

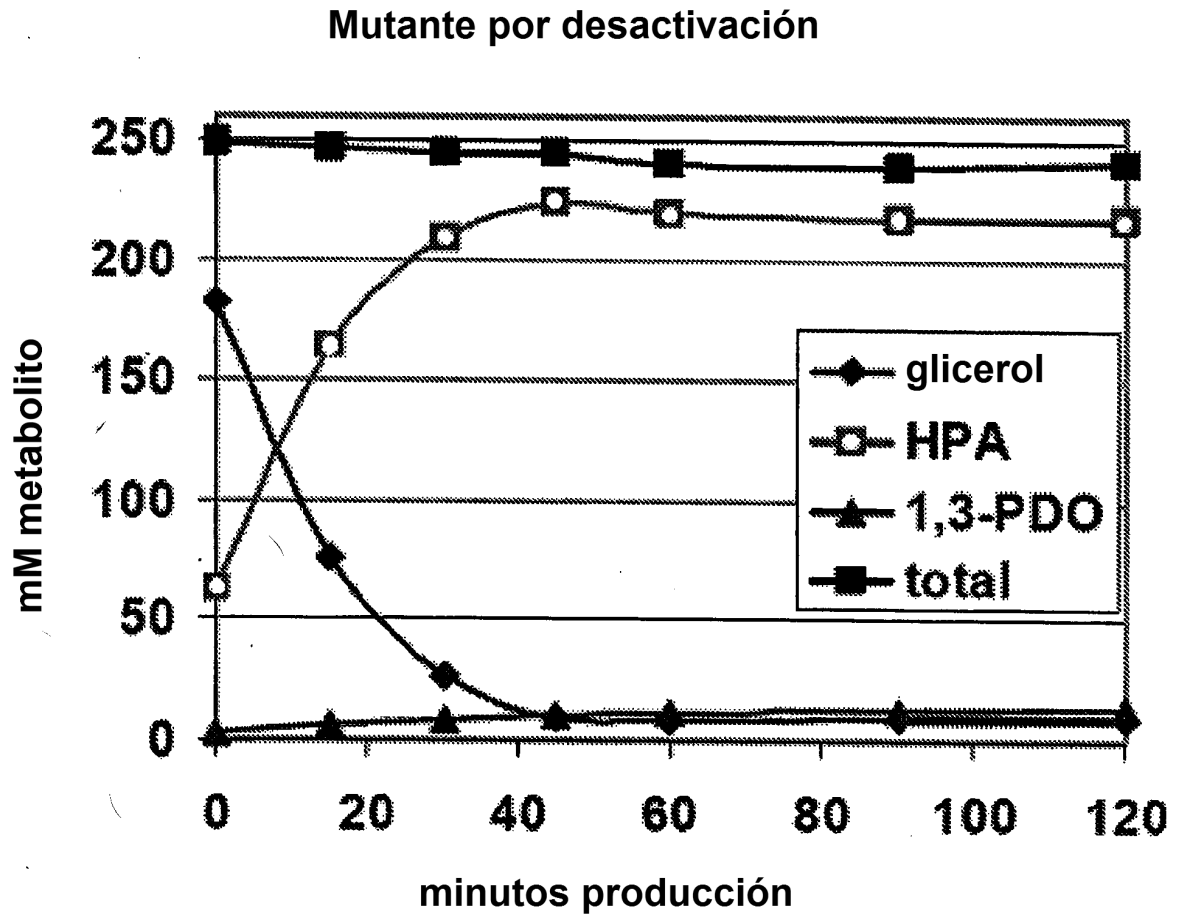


Figura 10