



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 295 189 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 7/02
C 12 P 7/40
C 12 P 7/26
C 12 R 1/02
C 12 R 1/72

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 P / 341 794 0

(22) 19.06.90

(44) 24.10.91

- (71) Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE
(72) Repp, Hans-Dieter, Dr. rer. nat.; Stottmeister, Ulrich, Dr. sc. nat.; Dörre, Marina, Dr. rer. nat.; Haufe, Günter, Dr. sc.; Weber, Lutz, Dr. rer. nat.; Richter, Hans-Peter, Dr. rer. nat., DE
(73) Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, O - 7050 Leipzig; Karl-Marx-Universität, O - 7010 Leipzig; Chemie AG Bitterfeld-Wolfen, O - 4400 Bitterfeld, DE
(74) Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, Patentbüro, Permoserstraße 15, O - 7050 Leipzig, DE

(54) Verfahren zur Herstellung von Sauerstoffderivaten des Phenylethans

(55) Sauerstoffderivate; Oxidation; Synthese; Hefe; Phenylethan; Styren; Aromaten; Bakterien; Biotransformation; Mikroorganismen; Methanol

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Sauerstoffderivaten des Phenylethans mit einem Gehalt von einem bis zu drei Sauerstoffatomen in der Seitenkette durch Biotransformation. Das Ziel besteht darin, die Oxidation von Phenylethan, Styren bzw. niederen Oxidationsprodukten des Phenylethans mit solchen Mikroorganismen durchzuführen, die die Synthese von nahezu allen denkbaren Sauerstoffderivaten des eingesetzten Aromaten erlaubt. Die erfinderische Lösung sieht die Verwendung von Methanol verwertenden, jedoch keine Methanmonooxygenase enthaltenen, daher kein Methan verwertenden Hefen der Art *Candida boidinii*, von Bakterien der Gattung *Aerobacter* oder *Pseudomonas* in Anwesenheit von 0,2 bis 12 g Methanol/l vor.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Sauerstoffderivaten des Phenylethans mit einem Gehalt von einem bis drei Sauerstoffatomen in der Seitenkette durch Biotransformation, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aromatenoxidation mit Hilfe Methanol verwertender jedoch keine Methanmonooxygenase enthaltenden, daher kein Methan verwertender, Mikroorganismen in Anwesenheit von Methanol durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als methylo trope, kein Methan verwertenden Mikroorganismen Hefen, z. B. der Art *Candida boidini*, oder Bakterien der Gattungen *Aerobacter* oder *Pseudomonas* eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Biotransformation an Styren, Phenylethan bzw. an niederen Oxidationsprodukten des Phenylethans wie z. B. an Phenylethanol durchgeführt wird.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1. bis 3., **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aromatenoxidation in Anwesenheit von 0,2 bis 12 g Methanol/l durchgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Sauerstoffderivaten des Phenylethans mit einem Anteil von einem bis 3 Sauerstoffatomen in der Seitenkette durch mikrobielle Oxidation. Die Erfindung kann in kontinuierlichen oder semikontinuierlichen Fermentationsprozessen realisiert werden.

Charakteristik der bekannten Lösungen

Es sind Verfahren zur mikrobiellen Oxidation der verschiedensten Benzenderivate bekannt. Es handelt sich hierbei überwiegend um die Herstellung von Epoxyden aus Styren (Idemitsu Kasei Co., Ltd., 1. 6. 78, JP-PS 8000033; ICI, 297.81, DE-OS 3129935), von Hydroxylierungsprodukten wie Phenole und Phenylethanol (Phizer Co. 1983, EP-PS 73 134; ICI, 13. 4. 83, EP-PS 76606), von Ketonen (Idemitsu Kasei Co. Ltd., 5. 1. 80, JP-PS 8000012; D. P. Cox, C. D. Goldsmith, 1979, Appl. Environ. Microbiol. 38 [3], 514-526) sowie um die Gewinnung verschiedener Carbonsäuren (Celanese Co. 18. 1. 84, EP-PS 98 750; Hsieh, Jih Han, 10. 1. 82, US-PS 4608338; Horiguchi et. al., 18. 8. 82, JP-PS 61 185 192; Jigami, Yoshifumi et al., Agric. Biol. Chem. 1974, 38 [2], 401-8). In der Regel werden Stämme wie auch Defektmutanten von Bakterien Hefen oder Pilze eingesetzt, die besondere Leistungen hinsichtlich einzelner Zielprodukte oder Produktgemischen aufweisen und die vor Wildstämmen bzw. Fremdorganismen geschützt und demzufolge unter sterilen Bedingungen kultiviert werden müssen. Vor allem mikrobielle Spezialisten erfordern zur Kultivierung zumeist einen großen Aufwand und besondere Verfahrensweisen, die oftmals zeitaufwendig sind. So werden nach einem Verfahren methylo trope Bakterien zur Oxidation von aromatischen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen verwendet (I. J. Higgins, 22. 4. 82, DE-OS 3129935), die über mehrere Stufen präpariert, zunächst auf Methan kultiviert, dann auf Methanoldampf angepaßt, weiterhin gewaschen und anschließend in dem Oxidationsprozeß eingesetzt werden. Die bei diesem Verfahren eingesetzten Mikroorganismen weisen entsprechend der Aktivität der Methanmonooxygenase eine relativ niedere Wachstumsgeschwindigkeit und Oxidationsrate auf. So beträgt nach einer Verfahrensvariante die Adaptionszeit an Methan 1-5 Tage, die Dauer der Kultivierung auf dieser Kohlenstoffquelle allein 7 Tage. Die an Methanol angepaßten, eine Methanmonooxygenase enthaltenden und daher Methan verwertenden Bakterien der Art *Methylosinus*, *Trichosporium* oder *Methylococcus capsulatus* werden bevorzugt zur Hydroxilierung verwendet. Sie sollen aber auch zur Epoxidierung von Styren sowie zur Synthese von Sauerstoffderivaten des Phenylethans im begrenzten Umfange eingesetzt werden können, wie zur Gewinnung von 2-Phenylethanol, p-Hydroxyethylbenzen, Benzoesäure und Phenyllessigsäure aus Ethylbenzen. Für die Synthese anderer Zielprodukte müssen andere Spezialisten eingesetzt werden, wobei sich die Kultivierungsbestimmungen und damit der technische und materielle Aufwand erheblich unterscheiden können, was bei einer Produktionsumstellung von ökonomischen Nachteil ist.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein mikrobielles Verfahren mit dem es möglich ist, kostengünstig und insbesondere zeitsparend nahezu alle theoretisch ableitbaren Sauerstoffderivate des Phenylethans zu synthetisieren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist ein Verfahren, das mittels geeigneter mikrobieller Biomasse und Prozeßführung erlaubt, durch Oxidation von Alkylbenzenen im Vergleich zu bekannten mikrobiellen Verfahren ein breites Spektrum an Sauerstoffderivaten des Phenylethans zu erhalten.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Transformation von Alkylbenzenen, insbesondere die von Styren oder von Phenylethan mittels methylotropher Bakterien oder Hefen durchgeführt wird, die keine Methanmonooxygenase enthalten, also nicht zuvor an Methan angepaßt worden sind bzw. überhaupt kein Methan verwerten können. Das geschieht vorzugsweise in Anwesenheit von Methanol und im Vergleich zu anderen Verfahren unter Einsparung der Vorkultivierung auf Methan.

Als Methanol verwertende, jedoch nicht Methan utilisierende Mikroorganismen sind z. B. Hefen der Art *Candida boidinii*, acidophile Bakterien der Gattung *Acetobacter methanolicus* oder neutrophile Bakterien der Gattung *Pseudomonas* geeignet. Die Alkylbenzentransformation wird in Anwesenheit von Methanol, einem pH-Wert von 2,5–5,5 bei acidophilen Stämmen oder von 5,5–7,5 bei weniger acidophilen bzw. neutrophilen Stämmen und einer Temperatur von 30–50°C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sind die angegebenen Mikroorganismen in der Lage, Styren und Phenylethan in die verschiedensten Sauerstoffderivate und wenig oxidierte Verbindungen in höher oxidierte Verbindungen umzuwandeln. Als Oxidationsprodukte entstehen hierbei z. B. 1- und 2-Phenylethanol, Phenylacetaldehyd, Acetophenon, Phenyllessigsäure, Phenylglyoxal, Mandelsäure, d. h. Verbindungen, die z. T. in der pharmazeutischen, insbesondere kosmetischen Industrie sowie bei der Herstellung von Pflanzenschutzmitteln eine wichtige Rolle spielen.

Aus Styren werden darüber hinaus Styrenoxid und Styrenethylenglycol gebildet.

Der prozentuale Anteil der genannten Produkte wird sowohl von den eingesetzten zu oxidierenden aromatischen Kohlenwasserstoffen als auch von den eingestellten Transformationsbedingungen wie der An- oder Abwesenheit einzelner Nährstoffe und auf diese oder andere bekannte Art aktivierten oder deaktivierten Enzymen bestimmt. Die Blockierung von Enzymen durch bekannte Enzyminhibitoren kann zur Maximierung der Ausbeute von einzelnen Hauptprodukten führen. Im einzelnen wird so verfahren, daß in einen Methanol verbrauchenden Fermentationsprozeß mit einem der genannten Mikroorganismen und einer extracellulären Methanolkonzentration von 0,5 bis 10 g Methanol/l Styren oder Ethylbenzen in Portionen von 0,5 ml/l Fermenterinhalt eingetragen wird. Die Mikroorganismenkonzentration kann zwischen 1 und 50 g BTS/l betragen und die Styren bzw. Ethylbenzenkonzentration sollte vorteilhaft unter 0,5 g/l liegen.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

In einem Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 2 l wird eine diskontinuierliche Verhefung von Methanol durchgeführt:

Temperatur ca. 32°C, pH = 4,5, pO_2 = 0–5 ppm

Als Methanol utilisierende Hefe wird *Candida boidinii* IMET M 131 verwendet.

Ihre Startkonzentration beträgt 3 g HTS/kg, die Vorgabe an Methanol ca. 10 g/l.

Das Kulturmedium enthielt bis auf den Stickstoff alle lebensnotwendigen Nährstoffe sowie Vitamine in Form eines geringen Anteils an Hefeextrakt, ausreichend für einen Zuwachs von 15 g HTS/l. Die N-Versorgung der Hefe erfolgte autoregulatorisch über die pH-Regelung mit NH_4OH . Die Fermentation wurde unter geschützten Bedingungen durchgeführt.

Nach der Auszehrung der Methanolvorlage wurden nochmals, und zwar insgesamt zweimal je 10 g Methanol/l entsprechend dem Verbrauch Wachstumssubstrat in den Fermentor gegeben. Im Ergebnis der Utilisation dieser Methanolmenge durch *Candida boidinii* wurde eine Biomassekonzentration von ca. 11 g HTS/l erhalten. Anschließend wurde erneut eine Methanolmenge von 5 g Methanol/l vorgelegt und über einen Zeitraum von 11 h eine Styrenmenge von 15 ml/l in Portionen von 0,5 ml dosiert. Die Styrenmenge erfolgte in Abhängigkeit von der pO_2 -Anzeige. Nach der letzten Styrengabe wurde eine weitere halbe Stunde transformiert und darauf der Fermentationsprozeß abgebrochen. Der Fermentorinhalt wurde mit 1 bis 2% der wirksamen oberflächenaktiven Substanz Ferman versetzt und separiert. Die Flüssigphase wurde mit Ethylacetat extrahiert, der Extrakt mittels Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. In der aufkonzentrierten Extraktmenge von 2,2 g wurden mit Hilfe der GC und GC/MS die folgenden O-Derivate des Ethylbenzen ermittelt:

Styrenoxid, Styrenethylenglycol, 1- und 2-Phenylethanol, Acetophenon, Phenylacetaldehyd, Phenyllessigsäure, Mandelsäure.

Beispiel 2

Nahezu die gleiche Produktzusammensetzung – die beiden zuerst genannten Verbindungen ausgenommen – wurde in der Transformation von Ethylbenzen mit Hilfe der acidophilen Bakterienkultur *Acetobacter methanolicus* spec. bei analogen Kultivierungs- und Transformationsbedingungen erzielt. Es wurden hierbei in einem Zeitraum von 14 Stunden 15 ml Ethylbenzen umgesetzt und eine Extraktmenge von 1,9 g erhalten.