(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 295 188 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 1/72

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 P / 341 789 3 (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., DE
(73) Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, O - 7050 Leipzig; Karl-Marx-Universität, O - 7010 Leipzig, DE
(74) Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, Patentbüro, Permoserstraße 15, O - 7050 Leipzig, DE

(54) Verfahren zur Herstellung von Sauerstoffderivaten des Ethylbenzens

(55) Sauerstoffderivate; Oxidation; Synthese; Ethylbenzene; Styren; Aromaten; Biotransformation; Mikroorganismen; Hefen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Sauerstoffderivaten des Ethylbenzens mit einem Gehalt von einem bis zu drei Sauerstoffatomen in der Seitenkette durch Biotransformation. Das Ziel besteht darin, die Oxidation von Ethylbenzen, Styren bzw. niederen Oxidationsprodukten des Ethylbenzens mit solchen Mikroorganismen durchzuführen, die die Synthese von nahezu allen denkbaren Sauerstoffderivaten des eingesetzten Aromaten erlaubt. Die erfinderische Lösung sieht die Verwendung von n-Alkane utilisierenden Hefen der Art Candida maltosa im Transformationsprozeß in Anwesenheit von 0,3 bis 30% n-Paraffinen vor.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Sauerstoffderivaten des Ethylbenzens mit einem Gehalt von einem bis zu drei Sauerstoffatomen in der Seitenkette durch Biotransformation, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Aromatenoxidation mit Hilfe von n-Alkane utilisierenden Hefen der Art Candida maltosa in Anwesenheit von 0,3 bis 30% n-Paraffinen durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Biotransformation an Styren, Ethylbenzen bzw. an niederen Oxidationsprodukten des Ethylbenzens wie z. B. an Phenylethanolen durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Hefestamm Candida maltosa spec. – IMET H 128 verwendet wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

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

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Verfahren zur mikrobiellen Oxidation von Benzenderivaten sind bereits bekannt. Es handelt sich hierbei überwiegend um die Herstellung von Expoxyden aus Styren (Idemitsu Kasan Co. Ltd., 1.6.78, JP 800033; ICI, 29.7.81, DE-OS 3129935), von Hydroxylierungsprodukten wie Phenole, Phenylethanole (Phizer Co. 1983, EP 73134; ICI, 14.4.83, EP 76606) von Ketonen (Idemitsu-Kasan Co., Ltd., 5.1.80, JP 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 98750; Hsieh Jih Han, 10.1.82, US 4603338; I.J. Higgins, 22.4.82, DE-OS 3129935).
Hierbei werden Nocardia spec., Pseudomonaden und insbesondere Methan verwertende Bakterien verwendet aber auch Hefen und Pilze. Kohlenwasserstoffe utilisierende Hefen haben im Gegensatz zu einer Reihe anderer Mikroorganismen den Vorteil, auf einfache, vollsynthetische Medien mit relativ hoher Vermehrungsrate wachsen zu können. Sie besitzen bekanntlich auf Grund ihrer enzymatischen Ausrüstung ein relativ hohes Oxidationspotential, das sie zur Degradation aromatischer Kohlenwasserstoffe befähigt. Sie vermögen sowohl lange Seitenketten aromatischer Kohlenwasserstoffe abzubauen als auch den Benzenring zu spalten. So wird die Bildung von Zimtsäure und Benzoesäure im Ergebnis der Degradation ungeradzahliger Seitenketten (JIGAMI, YOSHIFUMI et al. Agric. Biol. Chem. 1974, 38 [2], 401–408) und die Synthese von aliphatischen Mono- und Dicarbonsäuren wie der Muconsäure aus Brenzcatechin oder von 2-Hydroxy-7-methyl-6-oxooctansäure durch Ringspaltung des Isopropylbenzens beschrieben (HORIGUCHI, S. et al. 18.8.82, JP 61 185 192; JIGAMI, YOSHIFUMI et al., Agric. Biol. Chem. 1975, 39 [9], 1781–8).
Beim Abbau von Styren bzw. Ethylbenzen durch Hefen werden als Oxidationsprodukte Styrenoxid und Phenylethanole bzw. Phenylessigsäure und ihre Hydroxylverbindung genannt. Unter den aufgeführten Verbindungen sind Produkte, die von volkswirtschaftlichem Interesse sind und auf chemischem Wege nur relativ aufwendig und teuer hergestellt werden. Zu diesem Produkten gehören z. B. 2-Phenylethanol, Phenylessigsäure, enantiomerenreine Mandelsäure, die in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie sowie bei der Wirkstoffherstellung Verwendung finden. Die genannten Produkte stellen das Ergebnis spezieller Leistungen der getesteten Mikroorganismen dar, die sich von anderen Arten oder Gattungen unterscheiden. Für die Synthese anderer Zielprodukte müssen daher andere Spezialisten eingesetzt werden, wobei sich die Kultivierungsbedingungen und damit der technische und materielle Aufwand erheblich unterscheiden können, was bei einer Produktionsumstellung von ökonomischem Nachteil ist. Die Regel ist, daß derartige Spezialisten wie auch Defektmutanten vor Wildstämmen bzw. Fremdorganismen geschützt und demzufolge unter sterilen Bedingungen kultiviert werden müssen. Hefen, die in der Lage wären, alle denkbaren Sauerstoffderivate des Ethylbenzens zu bilden und auf Grund von Selektionsvorteilen unter ungeschützten Bedingungen kultiviert werden können, sind bisher nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren auf der Grundlage von Hefen, mit dem es möglich ist, kostengünstig und insbesondere zeitsparend nahezu alle theoretisch ableitbaren Sauerstoffderivate des Ethylbenzens zu synthetisieren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist ein Verfahren, das mittels geeigneter Prozeßführung und den Einsatz geeigneter Hefen unter ungeschützten Bedingungen die Synthese von Sauerstoffderivaten des Ethylbenzens mit einer hohen Oxidationsgeschwindigkeit aus Benzenderivaten erlaubt.
Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß n-Alkane ultisierende Hefen zur Transformation von Styren bzw. Ethylbenzen bevorzugt in Anwesenheit von Wachstumssubstratüberschüssen verwendet werden. Diese Hefen gehören zur Spez. Candida maltosa. Die Styren- bzw. Ethylbenzentransformation wird in Anwesenheit von mindestens 0,3%

Wachstumssubstrat, einem *p*H-Wert von 2,5 bis 5,5 und einer Temperatur von 24 bis 34°C durchgeführt. Diese Parameter sowie die Eigenschaft, n-Alkane als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen, verschaffen der Hefe Candida maltosa spez. z. B. hinreichend Selektionsvorteile, so daß unter unsterilen Bedingungen kultiviert werden kann. Es wurde im Gegensatz zu anderen Autoren und analogen Hefen gefunden, daß diese Hefen in der Lage sind, Styren und Ethylbenzen mit hoher Geschwindigkeit in die verschiedensten Sauerstoffderivate umzuwandeln. Als Oxidationsprodukte entstehen hierbei z. B.: 1- und 2-Phenylethanol, Phenylacetaldehyd, Acetophenon, Phenylessigsäure, Phenylglyoxal, Mandelsäure.
Aus Styren werden darüber hinaus, Styrenoxid und Benzenethylenglycol 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 desaktivierten Enzyme bestimmt.
Die Blockierung von Enzymen durch bekannte Enzyminhibitoren kann zur Maximierung der Ausbeute an einzelnen Hauptprodukten führen. Im einzelnen wird so verfahren, daß in einen laufenden Prozeß der n-Alkanverhefung mit Candida maltosa spec. und bei einer extrazellulären Kohlenwasserstoffkonzentration von 0,3 bis 30% mit einem n-Alkananteil von 100 bis 10% Styren oder Ethylbenzen in Portionen von 0,5 ml/kg Fermenterinhalt eingetragen wird.
Die Hefekonzentration kann zwischen 1 und 50 g HTS/kg betragen, und die Styren- bzw. Ethylenbenzenkonzentration sollte vorteilhaft unter 0,5 g/kg liegen.
Die Erfindung wird an Hand des folgenden Beispiels näher erläutert.

Ausführungsbeispiel

In einem Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 2 l wird die diskontinuierliche Verhefung eines n-Alkangemisches der Kettenlänge $C_9 \ldots C_{20}$ durchgeführt:
Temperatur = 32°C, *p*H = 4,5, pO_2 = 0–5 ppm.
Als n-Alkane utilisierende Hefe wird Candida maltosa – IMET H 1289 verwendet. Ihre Startkonzentration beträgt 3 g HTS/kg, die Vorgabe an n-Alkangemisch 15 g/kg. Das Kulturmedium enthielt bis auf den Stickstoff alle lebensnotwendigen Nährstoffe, ausreichend für einen Zuwachs von 20 g HTS/kg. Die Stickstoffversorgung der Hefe erfolgte autoregulativ über die *p*H-Regelung mit NH_4OH.
Mit der Auszehrung der n-Alkanvorlage wurde eine Biomassekonzentration von ca. 14 g HTS/kg erreicht. Anschließend wurde nochmals eine n-Alkanmenge von 20 g/kg vorgelegt und über einen Zeitraum von 12 h eine Styrenmenge von 20 ml/kg in Portionen von 0,5 ml dosiert.
Die Styrengaben erfolgten in Abhängigkeit von der Erholung der mikrobiellen CO_2-Bildung bzw. der Einpegelung der pO_2-Anzeige auf den ursprünglichen Wert.
Nach der letzten Styrengabe wurde eine weitere halbe Stunde transformiert und darauf der Fermentationsprozeß abgebrochen. Der Fermentorinhalt wurde mit 1–2% der wirksamen oberflächenaktiven Substanz Ferman versetzt und separiert. Die weitere Aufarbeitung der Ölphase und des Ethylacetatextraktes der wäßrigen Phase erfolgte getrennt.
In der aufkonzentrierten Extraktmenge von 3 g wurde mit Hilfe der GC und GC/MS die folgenden Sauerstoffderivate des Ethylbenzens ermittelt: Styrenoxyd, Benzenethylenglycol, 1- und 2-Phenylethanol, Acetophenon, Phenylacetaldehyd, Phenylessigsäure, Phenylglyoxal, Mandelsäure, Phenylglyoxylsäure.