



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑪ **CH 651 316 A5**

⑤① Int. Cl.4: **C 12 P** 7/04
C 12 P 7/26

// (C 12 P 7/04, C 12 R 1:01, 1:26)
(C 12 P 7/26, C 12 R 1:01, 1:26)

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer: 3545/79

㉔ Anmeldungsdatum: 12.04.1979

㉓ Priorität(en): 14.04.1978 US 896475
30.03.1979 US 025711

㉒ Patent erteilt: 13.09.1985

㉑ Patentschrift
veröffentlicht: 13.09.1985

㉑ Inhaber:
Exxon Research and Engineering Company,
Florham Park/NJ (US)

㉒ Erfinder:
Hou, Ching-Tsang, Edison/NJ (US)
Patel, Ramesh N., Edison/NJ (US)
Laskin, Allen I., New York/NY (US)

㉓ Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

⑤④ **Verfahren zur mikrobiologischen Umwandlung von C(3)-C(6)-n-alkanen oder C(3)-C(6)-sec.-Alkoholen in C(3)-C(6)-sek.-Alkohole oder entsprechende Methylketone.**

⑤⑦ C₃-C₆-n-Alkane und C₃-C₆-sec.-Alkohole werden mikrobiologisch in entsprechende C₃-C₆-sec.-Alkohole bzw. C₃-C₆-Methylketone umgewandelt. Das Reaktionsmedium, welches die C₃-C₆-n-Alkane oder C₃-C₆-sec.-Alkohole enthält, bringt man unter aeroben Bedingungen mit mikrobiellen Zellen, die Oxigenase- oder Dehydrogenase-Enzymaktivität aufweisen, in Berührung. Diese Zellen sind von einem methylotrophen Mikroorganismus abgeleitet. Man kann das Substrat anstelle der Zellen auch mit einem von den Zellen abgeleiteten Enzympräparat in Berührung bringen. Während der Umwandlung ist kein Wachstumsmedium für die genannten Zellen vorhanden und man arbeitet unter solchen Bedingungen, dass mindestens ein Teil des Alkan- oder sec.-Alkoholmoleküls in isolierbaren Mengen zu dem entsprechenden sec.-Alkohol oder Methylketon durch die genannten Zellen oder das Enzympräparat oxydiert wird. Der eingesetzte Mikroorganismus war unter aeroben Bedingungen in einem Nährmedium, das eine C₁-Verbindung enthält, gezüchtet worden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur mikrobiologischen Umwandlung eines organischen Substrates der Gruppe der C₃-C₆-n-Alkane oder C₃-C₆-sec.-Alkohole in C₃-C₆-sec.-Alkohole oder C₃-C₆-Methylketone, dadurch gekennzeichnet, dass man das die genannten C₃-C₆-n-Alkane oder C₃-C₆-sec.-Alkohole enthaltendes Reaktionsmedium unter aeroben Bedingungen mit mikrobiellen Zellen mit Oxigenase oder Dehydrogenase-Enzymaktivität, die von einem methylotrophen Mikroorganismus abgeleitet sind, oder mit einem Enzympräparat, das von den genannten Zellen abgeleitet ist, in Berührung bringt, wobei kein Wachstumsmedium für die genannten Zellen vorhanden ist, und man unter solchen Bedingungen arbeitet, dass mindestens ein Teil des Alkan- oder sec.-Alkoholmoleküls in isolierbaren Mengen zu dem entsprechenden sec.-Alkohol oder Methylketon durch die genannten Zellen oder das Enzympräparat oxydiert wird, und wobei der genannte Mikroorganismus unter aeroben Bedingungen in einem Nährmedium, das eine C₁-Verbindung enthält, gezüchtet worden war.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen obligate oder fakultative Methylotrophe sind.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen aus den Gattungen Methylosinus, Methylocystis, Methylomonas, Methylobacter, Methylococcus und Methylobacterium ausgewählt sind.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen Stämme darstellen, die aus der Gruppe Methylosinus trichosporium, Methylosinus sporium, Methylocystis parvus, Methylomonas methanica, Methylomonas albus, Methylomonas streptobacterium, Methylomonas agile, Methylomonas rubrum, Methylomonas rosaceus, Methylobacter chroococcum, Methylobacter bovis, Methylobacter capsulatus, Methylobacter vinelandii, Methylococcus capsulatus, Methylococcus minimus und Methylobacterium organophilum sp. nov. ATCC 27886 ausgewählt sind.

5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen Stämme darstellen, die aus der Gruppe

Methylosinus trichosporium OB3b	NRRL B-11.196
Methylosinus sporium 5	NRRL B-11.197
Methylocystis parvus OBPP	NRRL B-11.198
Methylomonas methanica S ₁	NRRL B-11.199
Methylomonas albus BG8	NRRL B-11.200
Methylobacter capsulatus Y	NRRL B-11.201
Methylococcus capsulatus Texas	ATCC 19069
Methylobacterium organophilum sp. nov.	ATCC 27886
Methylomonas sp.	AJ-3670, Ferm P-2400
Methylococcus 999	NCIB 11083
Methylomonas SM3	NCIB 11084

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzympräparat eine zellfreie Teilchenfraktion der mikrobiellen Zellen ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsmedium reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid enthält.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zusätzlich zu dem genannten Methylketon einen sekundären Alkohol erhält.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man chargenweise arbeitet.

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man kontinuierlich arbeitet.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur mikrobiologischen Umwandlung von C₃-C₆-n-Alkanen oder C₃-C₆-sec.-Alkoholen in C₃-C₆-sec.-Alkohole oder C₃-C₆-Methylketone, wobei das Alkan oder der sekundäre Alkohol oxydiert werden, indem man das Reaktionsmedium, welches das genannte Alkan oder den genannten sec.-Alkohol enthält, unter aeroben Bedingungen mit mikrobiellen Zellen, die Oxigenase- oder Dehydrogenase-Enzymaktivität aufweisen, welche von einem methylotrophen Mikroorganismus abgeleitet sind, oder mit einem Enzympräparat, das von diesen Zellen abgeleitet ist, in Berührung bringt. Bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens züchtet man die Mikroorganismen unter aeroben Bedingungen in einem Nährmedium, das eine C₁-Verbindung enthält.

Methan ist eine der billigsten Kohlenstoffquellen für das Mikrobenwachstum. Bekanntlich gibt es viele Mikroorganismen, die auf einem Kulturmedium in Gegenwart von Methan als Hauptkohlenstoffquelle wachsen können. Nicht alle dieser Mikroorganismen haben jedoch gute Wachstumseigenschaften. Bekannt ist auch, dass mit Methan gezüchtete Mikroorganismen zur Umwandlung von Methan in Methanol unter aeroben Bedingungen verwendet werden können.

Diese Methan-verwertenden Mikroorganismen sind im allgemeinen als «Methylotrophe» bekannt. Das von R. Whittebury et al. [J. of Gen. Microbiology, 61, 205-218 (1970)] vorgeschlagene Klassifikationssystem für Methylotrophe hat die breiteste Anerkennung gefunden. In diesem System sind die morphologischen Eigenschaften Methan oxydierender Bakterien in fünf Gruppen unterteilt: Methylosinus, Methylocystis, Methylomonas, Methylobacter und Methylococcus.

Kürzlich offenbarten Patt, Cole und Hanson [International J. Systematic Bacteriology, 26 (2) 226-229 (1976)], dass methylotrophe Bakterien solche Bakterien sind, die nichtautotroph unter Verwendung von Kohlenstoffverbindungen mit einem oder mehreren Kohlenstoffatomen, aber ohne Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, wachsen können. Patt et al. haben vorgeschlagen, dass Methylotrophe als «obligat oder zwingend» angesehen werden sollten, wenn sie nur Kohlenstoffverbindungen ohne Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (z.B. Methan, Methanol, Dimethyläther, Methylamine usw.) als einzige Quellen für Kohlenstoff und Energie verwerten können, während «fakultative» Methylotrophe solche Organismen sind, die sowohl Verbindungen ohne Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen als auch Verbindungen mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen als Quellen für Kohlenstoff und Energie verwerten können. In ihrer Veröffentlichung offenbarten Patt et al. ein Methan oxydierendes Bakterium, das sie als Methylobacterium organophilum sp. nov. (ATCC 27 886) identifizierten. Dieses Bakterium unterscheidet sich vermutlich von allen zuvor beschriebenen Gattungen und Arten Methan-oxydierender Bakterien aufgrund der Fähigkeit zur Verwertung einer Vielzahl organischer Substrate mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen als Quellen für Kohlenstoff und Energie.

Es ist jetzt anerkannt, dass es zwei Arten methylotropher Mikroorganismen gibt, und zwar auf der Grundlage ihres Wachstumsvermögens auf kohlenstoffhaltigen Substraten. Eine Art wurde als «Methan-Verwerter» und die andere als «Methanol-Verwerter» bezeichnet. Die Methanol-Verwerter sind nicht in der Lage, in Gegenwart von Methan als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen, wachsen aber in Gegenwart von Methanol, Methylamin usw. Die Methan-Verwerter vermögen auf zahlreichen C₁-Verbindungen, einschliesslich Methan, Methanol, Dimethyläther usw. zu wachsen. Innerhalb der Gruppe der Methan-verwertenden Methylotrophe und der Methanol-verwertenden Methylotrophe gibt

es oblige und fakultative Arten methylophiler Mikroorganismen. Die obligaten Methanverwertenden methylophilen Mikroorganismen wachsen nur auf Verbindungen des C₁-Typs, z.B. Methan, Methanol, Dimethyläther, Methylformiat, Methylcarbonat usw. Die fakultativen Methan-verwertenden methylophilen Mikroorganismen wachsen nicht nur auf den vorgenannten Verbindungen des C₁-Typs, sondern auch auf anderen organischen Verbindungen, wie Glucose. Die obligaten Methanol-verwertenden Methylophilen Mikroorganismen wachsen auf C₁-Verbindungen, z.B. Methanol, Methylamin, nicht aber auf Methan oder auf organischen Verbindungen, wie Glucose. Die fakultativen Methanol-verwertenden methylophilen Mikroorganismen wachsen auf den oben erwähnten Verbindungen des C₁-Typs (nicht aber auf Methan) und verschiedenen anderen organischen Verbindungen, wie Glucose.

Leadbetter und Foster [Arch. Microbiology, 30, 81–118 (1959) «Studies on Some Methane-Utilizing Bacteria»] berichteten, dass aus *Pseudomonas methanica* (derzeit als *Methylomonas methanica* bezeichnet) stammende Mikrobenzellen n-Propan und n-Butan zu den entsprechenden Alkoholen, Ketonen und Carbonsäuren oxydieren, wenn sie gleichzeitig in Methan als Wachstumssubstrat enthaltenden Wachstumskulturen vorhanden sind. Leadbetter et al. stellen auf Seite 103 fest «Propan oder n-Butan wurde nicht durch gewaschene Zellen oxydiert. Sie wurden jedoch oxydiert, wenn sie gleichzeitig in Wachstumskulturen mit Methan als Wachstumssubstrat vorlagen». Auf Seite 102 mutmassen Leadbetter et al., dass der sec.-Alkohol ein Zwischenprodukt bei der Umwandlung von Propan in Aceton ist.

Die Art des von Leadbetter et al. beschriebenen Verfahrens wurde als «Cooxydationstechnik» bezeichnet, da nicht dem Wachstum dienende Kohlenwasserstoffe oxydiert werden, wenn sie als Cosubstrate in einem Medium vorliegen, in dem ein oder mehrere verschiedene Kohlenwasserstoffe für das Wachstum vorliegen. Wie oben erörtert, wandten Leadbetter et al. diese Technik an, wonach *Pseudomonas methanica* auf Kosten von Methan gezüchtet wurde, und eine Reihe homologer Oxydationsprodukte wurde aus den Cosubstratgasen erhalten, z.B. entstand aus Äthan Äthanol, Acetaldehyd und Essigsäure; aus Propan n-Propanol, Propionsäure und Aceton; aus n-Butan n-Butanol, n-Buttersäure und 2-Butanon.

Mehrere Veröffentlichungen bezogen sich auf die Veröffentlichung von Leadbetter et al. bezüglich der Produktion von Ketonen aus Alkanen in verschiedenen Versuchen zum Verständnis des Umwandlungsmechanismus (d.h., läuft die Umwandlung über eine sec.-Alkohol-Zwischenstufe?).

Dieser Stand der Technik beschreibt kein Verfahren, bei dem «ruhende» Mikrobenzellen oder aus methylophilen, aerob auf C₁-Verbindungen (z.B. Methan, Methanol, Methylamin usw.) gezüchteten Mikroorganismen stammende Enzympräparate C₃–C₆-Alkane oder C₃–C₆-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone überführen. Bekanntlich sind «ruhende» Mikrobenzellen von «wachsenden» Mikrobenzellen dadurch unterscheidbar, dass erstere nicht in einem Wachstumsmedium gehalten werden, d.h. in einem Medium mit einer Quelle für Kohlenstoff und Stickstoff, während letztere in einem Wachstumsmedium gehalten werden, wo sie aktiv wachsen und sich vermehren können.

Während A.W. Thompson, J.G. O'Neill und J.F. Wilkinson [Arch. Microbiol., 109, 243–246 (1976) «Acetone Production by Methylobacteria»] offenbarten, dass Aceton während des Stoffwechsels von Äthan und Produkten der Äthanoxydation durch gewaschene Suspensionen von methylophilen Mikroorganismen, wie *Methylosinus trichosporium* OB3b und *Methylomonas albus* BG8, beobachtet wurde, offenbaren Thompson et al. nicht die Produktion von Ketonen aus

C₃–C₆-Alkanen oder C₃–C₆-sec.-Alkoholen.

Hutchinson, Whittenbury und Dalton [J. Theor. Biol., 58, 325–335 (1976) «A Possible Role of Free Radicals in the Oxidation of Methane by *Methylococcus capsulatus*»] und Colby und Dalton [J. Biochem., 157, 495–497 (1976) «Some Properties of a Soluble Methane Mono-Oxygenase From *Methylococcus capsulatus*, Stamm Bath»] berichteten, dass Äthylen durch die lösliche Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus*, Stamm Bath, oxydiert wird. Diese letzteren Forscher berichteten, dass die «teilchenförmigen Membranpräparate» von *Methylococcus capsulatus*, Stamm Bath, keine Methan-Oxygenase-Aktivität hatten, bestimmt nach dem Test des Brommethan-Verschwindens.

Cerniglia, Blevins und Perry [Applied and Environmental Microbiology, 32 (6), 764–768 (1976) «Microbial Oxidation and Assimilation of Propylene»] beschrieben die Oxydation von Propylen durch Mikroorganismen zu den entsprechenden Alkoholen und Carbonsäuren.

In jüngster Zeit offenbarten Colby, Stirling und Dalton, [J. Biochem., 165, 395–402 (August 1977) «The Soluble Methane Mono-Oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) Its Ability to Oxygenate n-Alkanes, n-Alkenes, Ethers and Alicyclic, Aromatic and Heterocyclic Compounds»], dass die lösliche Fraktion von *Methylococcus capsulatus*, Stamm Bath, eine sehr unspezifische Oxygenase ist, da sie Alkane zu Alkoholen, Alkene zu 1,2-Epoxiden, Diäthyläther zu Äthanol und Äthanal, Styrol zu Styrolepoxid und Pyridin zu Pyridin-N-oxid oxydiert.

Auf der Grundlage des ¹⁸O-Einbaus aus ¹⁸O₂ in die Zellbestandteile von *Pseudomonas methanica* vermuteten Leadbetter und Foster [Nature, 184, 1428–1429 (1959) «Incorporation of Molecular Oxygen in Bacterial Cells Utilizing Hydrocarbons For Growth»], dass am anfänglichen oxydativen Angriff auf Methan eine Oxygenase beteiligt sei. Higgins und Quayle [J. Biochem., 118, 201–208 (1970) «Oxygenation of Methane by Methane-Grown *Pseudomonas methanica* and *Methanomonas methanooxidans*»] isolierten CH₃ ¹⁸OH als das Produkt der Methanoxydation, wenn Suspensionen von *Pseudomonas methanica* oder *Methanomonas methanooxidans* Methan in an ¹⁸O₂ angereicherten Atmosphären oxydieren konnten. Die Folgebeobachtung einer Methan-stimulierten NADH-Oxydation, katalysiert durch Extrakte von *Methylococcus capsulatus*, durch Ribbons [J. Bacteriol., 122, 1351–1363 (1975) «Oxidation of C₁-Compounds by Particulate Fractions From *Methylococcus capsulatus*: Distribution and Properties of Methane-Dependent Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Oxidase (methane hydroxylase)»] und Ribbons und Michalover, FEBS Lett. 11, 41–44 (1970) «Methane Oxidation by Cell-Free Extracts of *Methylococcus capsulatus*» oder *Methylomonas Methanica* Ferenci (FEBS Lett. 41, 94–98 (1974) «Carbon Monoxide-Stimulated Respiration in Methane-Utilizing Bacteria») vermuteten, dass das für diese Oxydation verantwortliche Enzym eine Monooxygenase ist. Diese Forscher stützten sich auf indirekte Enzymtests, in dem spektrophotometrisch Methan-stimuliertes NADH-Verschwinden oder polarographisch Methan-stimuliertes O₂-Verschwinden gemessen wurde. In jüngerer Zeit wurden Methan-Monooxygenase-Systeme teilweise gereinigt aus *Methylosinus trichosporium* OB3b [Tonge, Harrison und Higgins, J. Biochem., 161, 333–344 (1977) «Purification and Properties of the Methane-Monooxygenase Enzyme System From *Methylosinus trichosporium* OB3b»] und Tonge, Harrison, Knowles und Higgins, FEBS Lett., 58, 293–299 (1975) «Properties and Partial Purification of the Methane-Oxidizing Enzyme System From *Methylosinus trichosporium*»] und aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) [Colby und Dalton, J. Biochem., 171, 461–468 (1978) «Resolution of the Methane Mono-Oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) Into

Three Components» and Colby, Stirling und Dalton, J. Biochem., 165, 395–402 (1977) «The Soluble Methane Mono-Oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath), «Its Ability to Oxygenate n-Alkanes, n-Alkenes, Ethers and Alicyclic, Aromatic and Heterocyclic Compounds»].

Die mikrobiologische Bildung von Methylketonen in Säuregäretieren, Bakterien und Fungi ist gut bekannt. Das Keton bildet sich jedoch durch Decarboxylierung einer β -Ketosäure und hat daher ein Kohlenstoffatom weniger als die Vorstufe. Andererseits stellt die bakterielle Bildung von Methylketonen aus n-Alkanen, zuerst von Leadbetter und Foster [Arch. Mikrobiol., 35, 92–104 (1960)], eine einzigartige α -Oxydation dar, ohne Veränderung des Kohlenstoffskeletts. In diesem letzteren Bericht wurde jedoch festgestellt, dass die Ketonbildung eine Cooxydation in Gegenwart des Wachstumssubstrats war, und gaben an, dass bei den ruhenden Zellen keine Aktivität gefunden wurde.

Phenazinmethosulfat-(PMS)-abhängige Methanol-Dehydrogenase aus vielen methylotrophen Bakterien ist eingehend beschrieben worden. Dieses Enzym oxydiert primäre Alkohole von C_1 – C_{10} , oxydiert aber nicht sekundäre Alkohole. Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD)-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen aus Leber und Hefe sind beschrieben worden. Diese Alkoholdehydrogenasen oxydieren primäre Alkohole und Acetaldehyd, zeigen aber bei Methanol keine Aktivität. Ausserdem oxydieren die Alkoholdehydrogenasen aus Hefe und Leber auch einige sekundäre Alkohole mit sehr geringer Geschwindigkeit ($< 1\%$ der Äthanolaktivität). NAD(P)-abhängige Alkoholdehydrogenasen wurden auch in *Pseudomonas*, *E. coli* und *Leuconostoc* beschrieben. Diese Enzyme waren jedoch nur gegenüber langkettigen primären Alkoholen oder Hydroxyfettsäuren aktiv. In jüngerer Zeit wurde ein NAD-gebundenes, Methyl-oxydierendes Enzym in einem Heferohextrakt beschrieben [R.J. Mehta, J. Bacteriol., 124, 1165–1167 (1975)]. Soweit bekannt, gibt es in der Literatur keinen Bericht über ein sec.-Alkohol-spezifisches Alkoholdehydrogenase-(SADH)-Enzym.

Da Ogata et al. [J. Ferm. Technol., 48, 389–396 (1970)] zuerst von der Assimilierung von Methanol durch eine Hefe berichteten, sind zahlreiche Methanol-verwertende Stämme aus natürlichen Quellen isoliert oder in Ausgangskultursammlungen gefunden worden. Interesse an der Kultivierung von Mikroorganismen auf billigen und reichlich zur Verfügung stehenden Verbindungen, wie Methanol, ist als Folge der möglichen Bedeutung mikrobiellen Proteins als Nahrungsmittel oder Futtermaterial stark gestiegen. Die Produktion von Einzell-Protein (SCP) aus Methanol-gezüchteten Hefen ist in verschiedenen Veröffentlichungen erörtert worden. Es wurde gezeigt, dass die Oxydation von Methanol und anderen primären Alkoholen in Hefen durch eine Alkohol-oxydase katalysiert wird. Alkohol-oxydase enthielt Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) als prosthetische Gruppe. Sekundäre Alkohole wurden durch diese Alkohol-oxydase nicht oxydiert.

Die Erfindung bezieht sich also auf ein Verfahren zur mikrobiologischen Umwandlung eines organischen Substrates der Gruppe der C_3 – C_6 -n-Alkane oder C_3 – C_6 -sec.-Alkohole in C_3 – C_6 -sec.-Alkohole oder C_3 – C_6 -Methylketone, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man das die genannten C_3 – C_6 -n-Alkane oder C_3 – C_6 -sec. Alkohole enthaltendes Reaktionsmedium unter aeroben Bedingungen mit mikrobiellen Zellen mit Oxygenase- oder Dehydroxygenase-Enzymaktivität, die von einem methylotrophen Mikroorganismus abgeleitet sind, oder mit einem Enzympräparat, das von den genannten Zellen abgeleitet ist, in Berührung bringt, wobei kein Wachstumsmedium für die genannten Zellen vorhanden ist, und man unter solchen Bedingungen arbeitet, dass mindestens ein Teil des Alkan- oder sec.-Alkoholmoleküls in isolier-

baren Mengen zu dem entsprechenden sec.-Alkohol oder Methylketon durch die genannten Zellen oder das Enzympräparat oxydiert wird, und wobei der genannte Mikroorganismus unter aeroben Bedingungen in einem Nährmedium, das eine C_1 -Verbindung enthält, gezüchtet worden war.

Erfindungsgemäss kann man z.B. Aceton und 2-Butanon herstellen, indem man ein entsprechendes C_3 – C_6 -Alkan oder eine C_3 – C_6 -sec.-Alkohol unter aeroben Bedingungen mit Mikrobenzellen obligater oder fakultativer methylotropher Mikroorganismen oder aus solchen Zellen stammenden Enzympräparaten in Berührung bringt, wobei die Mikroorganismen zuvor unter aeroben Bedingungen in einem Nährmedium, vorzugsweise einem mineralischen Nährmedium, kultiviert worden sind.

Beispiele für die im Nährmedium enthaltene C_1 -Verbindung sind Methan (im Falle Methan-verwertender methylotropher Mikroorganismen), Methanol, Dimethyläther, Methylamin, Methylformiat, Methylcarbonat usw.; es können aber auch Äthanol, Propanol, Butanol usw. im Nährmedium enthalten sein.

Die Mikrobenzellen oder Enzympräparate, die aus den Zellen stammen, die bei der Umwandlung der C_3 – C_6 -Alkane in die entsprechenden sec.-Alkohole und Ketone verwendet werden sollen, stammen bevorzugt aus obligaten oder fakultativen Methan-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen, nicht aber aus den Methylotrophen Mikroorganismen des Methanol-verwertenden Typs. Die Mikrobenzellen oder Enzympräparate, die aus den bei der Umwandlung von C_3 – C_6 -sec.-Alkoholen in die entsprechenden Ketone zu verwertenden Zellen stammen, können entweder aus den obligaten oder fakultativen Methan- oder Methanol-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen stammen.

Es wurde auch gefunden, dass methylotrophe Hefestämme aerob auf einer Vielzahl von Methylreste liefernden kohlenstoffhaltigen Verbindungen, wie Methanol, Methylamin, Methylformiat, Methylcarbonat, Dimethyläther usw., gezüchtet werden können, um Mikrobenzellen oder daraus stammende Enzympräparate hervorzubringen, und sie vermögen lineare C_3 – C_6 -sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone aerob zu überführen.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens enthält das Reaktionsmedium reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+). Dieses Nucleotid wurde in zellfreien Extrakten verschiedener Kohlenwasserstoff-verwertender Mikroben, einschliesslich Bakterien und Hefen, gefunden. Dieses Enzym findet sich auch in mit Methanol gezüchteten Zellen. Es oxydiert spezifisch und stöchiometrisch sec.- C_3 – C_6 -Alkohole zu ihren entsprechenden Methylketonen. Das genannte Enzym wurde 2600fach gereinigt und zeigt eine einzelne Proteinbande bei der Acrylamidgel-Elektrophorese. Es hat ein Molekulargewicht von $95\,000 \pm 3000$ μ . Dieses bakterielle SADH besteht aus zwei Untereinheiten von 48 000 μ und zwei Zinkatomen pro Molekül des Enzymproteins. Sie kann insbesondere sec.-Alkohole, vor allem 2-Propanol und 2-Butanol, oxydieren, primäre Alkohole werden durch SADH nicht oxydiert.

Wie oben erörtert, vermögen die obligaten Methan-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen auf einem Medium, das hauptsächlich Methan, aber auch Methanol und zahlreichen Methylreste liefernden Verbindungen, z.B. Dimethyläther, Methylformiat, Methylcarbonat usw. enthält, zu wachsen. Die fakultativen Methan-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen wachsen gewöhnlich nicht nur auf Methan, Methanol und verschiedenen Methylreste liefernden Verbindungen, wie oben erwähnt, sondern sie vermögen auch zusätzlich auf verschiedenen anderen organischen Verbindungen, wie Glucose, zu wachsen.

Die obligaten Methanol-verwertenden methylotrophen

Mikroorganismen können mit Methan nicht wachsen, aber mit Methanol und anderen Methylreste liefernden Verbindungen, wie Methylamin, Methylformiat, Methylcarbonat usw. Die fakultativen Methanol-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen, wie die obligaten Methanol-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen, vermögen mit Methan nicht zu wachsen, aber mit Methanol, den oben erwähnten methylhaltigen und anderen organischen Verbindungen, wie C₂-C₆-Alkoholen und Glukose. Für das erfindungsgemässe Verfahren jedoch sollten die obligaten oder fakultativen Methanol verwertenden Mikroorganismen auf dem Alkoholdehydrogenase-induzierenden Substrat gezüchtet werden, d.h. Methanol, Äthanol, Propanol, Butanol, Methylamin und Methylformiat usw.

Der Ausdruck «Mikroorganismus» wird hier in seinem breitesten Sinne verwendet und umfasst nicht nur Bakterien, sondern gewöhnlich auch Hefen, fadenförmige Fungi, Actinomyceten und Protozoen. Vorzugsweise umfassen die Mikroorganismen Bakterien und insbesondere bevorzugt die Bakterien, die Methan- und Methylreste liefernde kohlenstoffhaltige Verbindungen zu oxydieren vermögen.

Der Begriff «Enzympräparat» wird hier als jede stoffliche Masse umfassend verwendet, die die gewünschte Oxygenase- oder Dehydrogenase-Enzymaktivität zeigt. Der Begriff bezieht sich z.B. auf lebende ganze Zellen, getrocknete Zellen, Zellextrakte und raffinierte konzentrierte, aus den Zellen stammende Präparate, insbesondere gereinigte sec.-Alkoholdehydrogenase und deren NAD⁺-Cofaktor und Metallbedarf. Enzympräparate können entweder in trockener oder flüssiger Form vorliegen. Der Begriff umfasst auch die immobilisierte Form des Enzyms, z.B. die ganzen Zellen der mit Methan Methylresten gezüchteten Mikroorganismen oder Enzymextrakte, die an eine unlösliche Matrix durch kovalente chemische Bindungen, Absorption und Einschluss des Enzyms in ein Gelgitter mit genügend grossen Poren für freien Durchgang der Substratmoleküle des Produkts, aber hinreichend kleinen Poren zum Zurückhalten des Enzyms unbeweglich gemacht oder gebunden worden sind. Der Begriff «Enzympräparat» umfasst auch Enzyme, die in Hohlfasermembranen zurückgehalten werden, z.B. wie von Rony, *Biotechnology and Bioengineering* (1971) offenbart.

Der Begriff «Teilchenfraktion» bezieht sich auf die Enzymaktivität in dem ausgefallenen oder sedimentierten Material, wenn die überstehende Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren zerbrochener Zellen bei 10 000 g für 30 min 1 h bei 10 000 g oder mehr zentrifugiert wird.

Das von R. Whittenbury, K.C. Philips und J.F. Wilkinson [*J. Gen. Microbiology*, 61, 205-218 (1970) (nachfolgend Whittenbury et al.)] vorgeschlagene Klassifikationssystem Methanoxydierender Bakterien ist das am breitesten anerkannte, heute verwendete System. In diesem Klassifikationssystem sind Methan-verwertende Bakterien auf der Grundlage morphologischer Eigenschaften in fünf Gruppen unterteilt. Diese sind: *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylomonas*, *Methylobacter* und *Methylococcus*. Bakterien dieser von Whittenbury et al. angegebenen fünf Gruppen verwerten Methan, Dimethyläther und Methanol für die Wachstumsenergie und wurden alle als strikt aerob und gram-negativ geschildert.

Gemäss einer speziellen Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens wurde gefunden, dass C₃-C₆-Methylketone gebildet werden, indem die entsprechenden C₃-C₆-Alkane oder C₃-C₆-sec.-Alkohole unter aeroben Bedingungen mit ruhenden Mikrobenzellen obligater oder fakultativer methylotropher Mikroorganismen oder aus solchen Zellen stammenden Enzympräparaten in Berührung gebracht werden, wobei die Mikroorganismen zuvor unter aeroben Bedingungen in einem methanhaltigen Nährmedium gezüchtet worden sind. Bei diesem Verfahren können zusätz-

lich auch sec.-Alkohole aus den C₃-C₆-Alkanen gebildet werden.

Gemäss einer weiteren speziellen Ausführungsform wurde gefunden, dass C₃-C₆-Methylketone gebildet werden können, indem die entsprechenden C₃-C₆-sec.-Alkohole unter aeroben Bedingungen mit Mikrobenzellen (vorzugsweise ruhenden Mikrobenzellen) aus obligaten oder fakultativen methylotrophen Mikroorganismen oder aus solchen Zellen stammenden Enzympräparaten in Berührung gebracht werden, wobei die Mikroorganismen zuvor unter aeroben Bedingungen in einem methanolhaltigen Nährmedium gezüchtet worden sind.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Mikrobenzellen oder ihre Enzympräparate, worin die Zellen zuvor mit Methanol als hauptsächlichlicher Kohlenstoff- und Energiequelle gezüchtet worden sind, C₃-C₆-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone zu überführen vermögen, nicht aber die C₃-C₆-Alkane in die entsprechenden Methylketone. Die mit Methan gezüchteten Mikrobenzellen oder deren Enzympräparate vermögen hingegen sowohl C₃-C₆-Alkane als auch C₃-C₆-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone zu überführen.

Die beim erfindungsgemässen Verfahren verwendeten n-C₃-C₆-Alkane sind lineare n-Alkane, nämlich Propan, n-Butan, n-Pentan und n-Hexan, am meisten bevorzugt sind als Alkane entweder Propan oder n-Butan. Die C₃-C₆-sec.-Alkohole stammen vorzugsweise von linearen C₃-C₆-Alkanen ab, insbesondere bevorzugt sind 2-Propanol und 2-Butanol.

Zu einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens gehört ein Verfahren zur Umwandlung von linearen C₃-C₆-sec.-Alkoholen in die entsprechenden Methylketone, indem ein linearer C₃-C₆-sec.-Alkohol unter aeroben Bedingungen mit einem Enzympräparat in Berührung gebracht wird, das das neue C₃-C₆-sec.-Alkoholdehydrogenase(SADH)-Enzym (in Form eines Rohextraktes, gereinigter oder immobilisierter Form) in Kombination mit Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) enthält.

Zum erfindungsgemässen Verfahren gehören die folgenden bevorzugten Merkmale:

Suspensionen ruhender Zellen der neuen C₁-verwertenden Mikroben oxydieren (dehydrieren) C₃-C₆-sec.-Alkohole zu ihren entsprechenden Methylketonen. Die erhaltenen Methylketone sammeln sich extrazellulär an. Von den sec.-Alkoholen konnte 2-Butanol mit der höchsten Geschwindigkeit oxydiert werden.

Mit Succinat gezüchtete Zellen der neuen fakultativen methylotrophen Isolate wandeln sec.-Alkohole nicht in Methylketone um.

Ein gewisser enzymatischer Abbau von 2-Butanon konnte beobachtet werden. Das Produkt, nämlich 2-Butanon, hemmte die Umwandlung von 2-Butanol zum entsprechenden 2-Butanon nicht. Die Produktionsgeschwindigkeit für 2-Butanon war für die ersten vier Stunden Inkubation bei den getesteten Kulturen linear.

Eine Hefekultur hatte die höchste Produktionsgeschwindigkeit und ein höheres Temperaturoptimum (40 °C), und bei 45 °C lag eine vernünftig hohe 2-Butanon-Produktionsgeschwindigkeit vor (die Bakterien hatten ein Temperaturoptimum von 35 °C).

Metallchelatisierende Mittel hemmen die Produktion von 2-Butanon, was die Beteiligung von Metall(en) nahelegt.

Die sec.-Alkoholdehydrogenase-Aktivität fand sich in dem zellfreien löslichen Extrakt der durch Schall aufgebrochenen Zellen mit C₁ gezüchteter Isolate. Das zellfreie System braucht insbesondere einen Cofaktor, vorzugsweise NAD⁺, für seine Aktivität. Die neue sec.-Alkoholdehydrogenase oxydiert spezifisch und stöchiometrisch C₃-C₆-sec.-Alkohole zu den entsprechenden Methylketonen. Das Enzym wurde

2600fach gereinigt und zeigt eine einzelne Proteinbande bei der Acrylamidgel-Elektrophorese. Es hat ein Molekulargewicht von 95 000 μ . Die bakterielle SADH besteht aus zwei Untereinheiten von 48 000 μ und zwei Zinkatomen pro Molekül des Enzymproteins. Primäre Alkohole werden durch die SADH nicht in Ketone überführt. Die pH- und Temperatur-optimalwerte für SADH sind 8 bis 9 bzw. 30 bis 35 °C. Die berechnete Aktivierungsenergie beträgt ca. 82909 J. Acrylamidgel-Elektrophorese der gereinigten SADH-Fraktion, mit Coomassie-Brilliantblau und Aktivitätsfarbe verfärbt, sowie die rohen, löslichen, zellfreien Extrakte aus verschiedenen Arten von mit Methanol gezeuhteten Mikroben, mit Aktivitätsfarbe verfärbt, wurden verglichen. Sowohl der Proteinfleck als auch der Enzymaktivitätsfleck der gereinigten SADH zeigte eine einzelne Proteinbande. Die Beweglichkeit bei der Gelelektrophorese der SADH aus den verschiedenen Arten von mit Methanol gezeuhteten Bakterienzellen war identisch. Hefe-SADH hatte eine grössere Mobilität gegenüber der Anode bei der Gelelektrophorese. Der Zusatz von Substraten bei der SADH-Reaktion verlangt keine obligatorische Folge. Die SADH-Aktivität wird durch metallchelatisierende Mittel, durch starke Thioreagentien und durch das Produkt 2-Butanon inhibiert.

Zellsuspensionen von auf Methylreste liefernden Verbindungen (z.B. Methanol, Methylamin, Methylformiat usw.) gezeuhten Hefen katalysieren die Umwandlung von sec.-Alkoholen in die entsprechenden Methylketone.

Im erfindungsgemässen Verfahren einsetzbare zellfreie Extrakte, die aus mit Methylresten (z.B. Methanol) gezeuhteten Hefen stammen, katalysieren vorzugsweise eine NAD⁺-abhängige Oxydation von C₃-C₆-sec.-Alkoholen zu den entsprechenden Methylketonen. Die gereinigte NAD⁺-spezifische sec.-Alkoholdehydrogenase aus mit Methanol gezeuhteter Hefe ist nach der Polyacrylamidgel-Elektrophorese homogen. Das gereinigte Enzym katalysiert bevorzugt die Umwandlung von sekundären Alkoholen in die entsprechenden Methylketone in Gegenwart von NAD⁺ als Elektronenakzeptor. Primäre Alkohole wurden durch das gereinigte Enzym nicht oxydiert. Der optimale pH-Wert für die Umwandlung von sec.-Alkoholen durch das gereinigte, aus Hefe stammende Enzym ist 8. Das Molekulargewicht der gereinigten, aus Hefe stammenden SADH, durch Gelfiltration bestimmt, ist 98 000 $\pm$ 3000, und die Grösse einer Untereinheit, bestimmt nach der Natriumdodecylsulfatgelelektrophorese, ist 48 000. Die Aktivität der gereinigten, aus Hefe stammenden SADH wurde durch Sulfhydrylinhibitoren und Metall-bindende Mittel gehemmt.

C₃-C₆-n-Alkane werden insbesondere in C₃-C₆-sec.-Alkohole durch Zellsuspensionen der mit Methan gezeuhteten Methylophie umgewandelt, und die sec.-Alkohole sammeln sich gewöhnlich extrazellulär an. Andere Mikroorganismen, z.B. Hefen, Actinomyceten und Fungi, mit C₁-Verbindungen gezeuhtet, können die C₃-C₆-n-Alkane zu den entsprechenden sec.-Alkoholen oxydieren.

C₃-C₆-n-Alkane werden in C₃-C₆-sec.-Alkohole bevorzugt durch zellfreie Teilchenfraktionen umgewandelt, die aus den genannten methylophien Mikroorganismen stammen. Die Reaktion erfordert vor allem Sauerstoff und reduziertes Nicotinamid-adenindinucleotid (NADH) als Elektronendonator. Die Umwandlung der n-Alkane in die sec.-Alkohole kann durch schwefelhaltige Verbindungen und metallbindende Mittel, wie α , α -Bipyridyl, Thiosemicarbazid, Thioharnstoff, 1,10-Phenanthrolin und 8-Hydroxychinolin, gehemmt werden (dies lässt die Beteiligung von Metallionen an der Oxydation von C₃-C₆-n-Alkanen zu sec.-Alkoholen vermuten). Die Hydroxylierung von C₃-C₆-n-Alkanen zu den entsprechenden sec.-Alkoholen kann durch die Gegenwart von Propylen gehemmt werden. Dies lässt vermuten, dass das Propylen und

n-Alkane (z.B. Propan) um dasselbe Enzymsystem(e) konkurrieren. Ascorbat und reduziertes nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat (NADPH) könnten auch als Elektronendonoren anstelle von NADH für die Hydroxylierung von n-Alkanen zu den entsprechenden sec.-Alkoholen verwendet werden.

Zu einer bevorzugten Gruppe von Methan-verwertenden methylophien Mikroorganismen gehören solche Mikroorganismen, die aus den Gattungen Methylosinus, Methylocystis, Methylomonas, Methylobacter, Methylococcus und Methylobacterium stammen.

Zu einer bevorzugten Gruppe von Methanol-verwertenden methylophien Mikroorganismen gehören solche Mikroorganismen, die aus Gattungen Methanomonas, Pseudomonas, Bacterium, Hyphomicrobium, Achromobacter, Protaminobacter, Vibrio, Rhodopseudomonas, Bacillus, Brevibacterium, Candida und Hansenula stammen.

Das von R. Whittenbury, K.C. Phillips und J.F. Wilkinson [J. Gen. Microbiology, 61, 205-218 (1970), nachfolgend Whittenbury et al.] vorgeschlagene Klassifikationssystem methan-oxydierender Bakterien ist das am breitesten anerkannte, derzeit verwendete System. Bei diesem Klassifikationssystem werden auf der Grundlage morphologischer Eigenschaften Methan-verwertende Bakterien in fünf Gruppen unterteilt. Diese sind: Methylosinus, Methylocystis, Methylomonas, Methylobacter und Methylococcus. Bakterien dieser fünf von Whittenbury et al. berichteten Gruppen verwerten Methan, Dimethyläther, Methanol, Methylformiat und Methylcarbonat zur Wachstumsenergie, und von allen wurde berichtet, dass sie strikt aerob und gram-negativ seien. Sie zeichnen sich auch dadurch aus, dass sie nicht-endosporen-bildend sind, d.h., die Fähigkeit zur Bildung von Zysten und Exosporen mit komplexer Feinstruktur und komplexer Innenstruktur haben.

Die von Whittenbury et al. (deren Offenbarung hiermit einbezogen wird) geschilderten methylophien Mikroorganismen kommen vor allem für die praktische Durchführung der Erfindung in Betracht. Insbesondere kann man die in Tabelle 4, Seite 214 der Veröffentlichung von Whittenbury et al. aufgeführten Methan-verwertenden methylophien Mikroorganismen verwenden, d.h. Mikroorganismen, die wie folgt identifiziert sind: Methylosinus trichosporium, Methylosinus sporium, Methylocystis parvus, Methylomonas methanica, Methylomonas albus, Methylomonas streptobacterium, Methylomonas agile, Methylomonas rubrum, Methylomonas rosaceus, Methylobacter chroococcum, Methylobacter bovis, Methylobacter capsulatus, Methylobacter vinelandii, Methylococcus capsulatus [einschliesslich Methylococcus capsulatus, Stamm Bath, erwähnt von J. Colby and H. Dalton, J. Biochem., 157, 495-497 (1976)] und Methylococcus capsulatus, Stamm Texas, erwähnt von D.W. Ribbons, J. Bacteriol., 122, 1351-1363 (1975) und Methylococcus minimus. Diese methylophien Mikroorganismen können in Form ihrer ganzen Zellen, ihrer Enzymextrakte oder immobilisierter Präparate solcher ganzer Zellen oder Enzymextrakte, z.B. durch Verwendung von DEAE-Cellulose oder Ionenaustauscherharz oder poröser Aluminiumoxidträger, verwendet werden. In den Fällen, in denen sich das oxydative Enzymsystem ansammelt oder mit der Zellmembran eng assoziiert, wird manchmal das Enzym in einer zellgebundenen Form bevorzugt verwendet.

Subkulturen mancher methylophier Mikroorganismen, von Whittenbury et al. beschrieben, sind bei der amtlichen Hinterlegungsstelle des United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, 61604, hinterlegt worden und haben die nachfolgend angegebenen einzelnen NRRL-Stammbezeichnungen von der Hinterlegungsstelle erhalten. Diese Subkulturen sind nach den Vorschriften des Depart-

ment of Agriculture ohne jede Beschränkung hinterlegt worden, so dass vermehrungsfähiges Material dieser Stämme der Öffentlichkeit zur Verfügung steht. Hinterlegte Stämme methylophiler Mikroorganismen sind nachfolgend angegeben:

Kultur	Bezeichnung des USDA Agricultural Research Service
Methylosinus trichosporium OB3b	NRRL B-11.196
Methylosinus sporium S	NRRL B-11.197
Methylocystis parvus OBBP	NRRL B-11.198
Methylomonas methanica S ₁	NRRL B-11.199
Methylomonas albus BG8	NRRL B-11.200
Methylobacter capsulatus Y	NRRL B-11.201

Vermehrungsfähiges Material dieser Stämme ist jedermann auf Verlangen ohne Beschränkung der Verfügbarkeit zugänglich. Subkulturen der vorgenannten Stämme wurden ursprünglich von R. Whittenbury, Department of Biological Science, University of Warwick, Warwickshire, Coventry, England, erhalten.

Die morphologischen und taxonomischen Merkmale und Eigenschaften der vorerwähnten methylophilen Stämme sind wie folgt:

Methylosinus trichosporium OB3b NRRL B-11.196

Bildet weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von Methan oder Methanol. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ und aerob. Häufig werden Rosetten gebildet. Besitzt eine Membranstruktur des Typs II.

Methylosinus sporium S NRRL B-11.197

Bildet weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von Methan oder Methanol. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ und aerob. Häufig werden Rosetten gebildet. Organismen bilden Exosporen, die wärmebeständig sind; Sporen keimen von den keine Flagellen tragenden Polen der Organismen weg, die Vibrio-Form annehmen. Andere organische Verbindungen als Methan und Methanol unterhalten das Wachstum nicht. Besitzt eine Membranstruktur des Typs II.

Methylocystis parvus OBBP NRRL B-11.198

Bildet schleimige weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von Methan oder Methanol. Die Organismen sind unbeweglich, von der Gestalt eines Cocco-Bacillus, gram-negativ und aerob. Organismen bilden Zysten, die austrocknungsbeständig, aber nicht wärmebeständig sind. Wächst auf Kosten von Methan oder Methanol. Andere organische Verbindungen als Methan und Methanol unterhalten das Wachstum nicht. Hat eine Membranstruktur des Typs II.

Methylomonas methanica S₁ NRRL B-11.199

Bildet rosa-farbene Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von Methan oder Methanol. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ und aerob. Bildet schleimige Kapseln. Sie wachsen auf Kosten von Methan und Methanol. Andere organische Verbindungen als Methan und Methanol unterhalten das Wachstum nicht. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

Methylomonas albus BG8 NRRL B-11.200

Bildet weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von Methan oder Methanol. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ und aerob. Bildet schleimige

Kapseln. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Andere organische Verbindungen als Methan und Methanol unterhalten das Wachstum nicht. Hat eine Membranstruktur des Typs I.

5 Methylobacter capsulatus Y NRRL B-11.201

Bildet weisse bis braune Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von Methan oder Methanol. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ und aerob. Bildet 10 schleimige Kapseln. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Andere organische Verbindungen als Methan und Methanol unterhalten das Wachstum nicht. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

Kürzlich teilten Patt, Cole und Hanson [International J. 15 Systematic Bacteriology, 27 (2), 226–229 (1976)] mit, dass methylophile Bakterien solche Bakterien sind, die nicht-autotroph unter Verwendung von Kohlenstoffverbindungen mit einem oder mehreren Kohlenstoffatomen, aber ohne Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen wachsen können. Patt et 20 al. schlugen vor, dass Methylophile als «obligat» angesehen werden sollten, wenn sie nur Kohlenstoffverbindungen ohne Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (z.B. Methan, Methanol, Dimethyläther, Methylamin usw.) als einzige Quellen für Kohlenstoff und Energie zu verwerten vermögen, während 25 «fakultative» Methylophile solche Organismen sind, die Verbindungen ohne Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen sowie komplexe Verbindungen mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen als einzigen Quellen für Kohlenstoff und Energie zu verwerten vermögen. In ihrer Veröffentlichung offenbarten 30 Patt et al. ein Methan-oxydierendes Bakterium, das sie als Methylobacterium organophilum sp. nov. (ATCC 27.886) identifizierten. Dieses Bakterium unterscheidet sich vermutlich von allen zuvor beschriebenen Gattungen und Arten Methan-verwertender Bakterien aufgrund seiner Fähigkeit, 35 eine Vielzahl organischer Substrate mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen als Quellen für Kohlenstoff und Energie zu verwerten.

Nach einer weiteren Ausführungsform wurde gefunden, dass dieser Mikroorganismus (Methylobacterium organophi- 40 lum sp. nov. ATCC 27.886) und andere mit Methan oder Methanol gezüchtete fakultative methylophile Mikroorganismen auch C₃–C₆-Alkane und C₃–C₆-sec.-Alkohole zu oxydieren vermögen. Mit anderen Worten, sie besitzen oxydative (und Alkoholdehydrogenase-)Enzymaktivität, wenn sie in 45 Gegenwart von Methan oder Methanol (im Falle der Alkoholdehydrierung) kultiviert worden sind. Wie oben, im Hinblick auf die Methan-verwertenden methylophilen Mikroorganismen von Whittenbury et al. erörtert, können die fakultativen Methylophilen in Form ihres löslichen Extrakts verwendet oder immobil gemacht oder in zellgebundener Form 50 verwendet werden, wenn sie beim erfindungsgemässen Verfahren Verwendung finden.

Andere bekannte Methan-verwertende methylophile Stämme können beim erfindungsgemässen Verfahren verwendet werden, z.B. Methylomonas sp. AJ-3670 (FERM P-2400), 55 erwähnt in der US-PS 3 930 947 als vom Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry for Industrial Trade and Industry, Chiba, Japan, frei verfügbar, und Methylococcus 999, in der US-PS 4 042 458 mit der NCIB-Zugangsnummer 11083 erwähnt, sowie Methylomonas SM3 mit der NCIB-Zugangsnummer 11084 (beschrieben in der niederländischen Patentanmeldung 60 74/16644). Gemische methylophiler und nichtmethylophiler Mikroorganismen können verwendet werden, wie die in den US-PSen 3 996 105 und 4 042 458 beschriebenen Systeme. 65

Im Stand der Technik sind verschiedene obligate und fakultative Methanol-verwertende methylophile Mikroorganismen beschreiben (d.h. solche Methylophilen, die mit

Methan nicht zu wachsen vermögen). Von diesen früher beschriebenen Mikroorganismen stammende Mikrobenzellen und deren Enzympräparate, worin die Mikroorganismen mit Methanol gezüchtet worden sind, vermögen C₃-C₆-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone zu überführen. Spezielle Methanol-verwertende methylotrophe Mikroorganismen, die früher beschrieben worden sind und für die praktische Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens sind, sind nachfolgend beschrieben.

An eine einzige Lebensbedingung gebundene (obligate) Methanol-verwertende methylotrophe Mikroorganismen:

Methanomonas methylovora, ATCC 21.852 [K. Kouno et al., J. Gen. and Appl. Microbiol., 19, 11 (1973)]. Die Organismen sind gram-negativ, beweglich, nicht-sporenbildend. Die Organismen wachsen nur mit Methanol und Methylamin. Methan unterhält das Wachstum nicht.

Pseudomonas sp., ATCC 21.439. Die Organismen sind weiss, gram-negativ und frei beweglich. Sie wachsen mit Methanol und Methylamin, nicht aber mit Methan.

Pseudomonas w₁ [J.S. Dahl et al., J. Bacteriol., 109, 916 (1972)]. Die Organismen sind gram-negativ, beweglich, nicht-sporenbildend. Die Organismen wachsen nur mit Methanol und Methylamin. Methan unterstützt das Wachstum nicht.

Bacterium C₂A₁ [J. Colby und L.J. Zatman, J. Biochem., 132, 101 (1973)]. Die Organismen sind gram-negativ. Sie wachsen nur mit Methanol und Methylamin. Methan unterhält das Wachstum nicht.

Bacterium 4B6 [J. Colby und L.J. Zatman, J. Biochem., 132, 101 (1973)]. Die Organismen sind gram-negativ und beweglich. Sie wachsen nur mit Methylamin. Methan, Methanol und andere organische Verbindungen unterstützen das Wachstum nicht.

Hyphomicrobium sp. [N. Takada et al., Proc. Japan Soc. for Ferment. Tech., S. 72 (1973)]. Die Organismen sind farblose, gestielte Bakterien, die wachsen, indem sie von den Enden der Hyphae wegknospen. Sie wachsen mit Methanol und Methylamin. Methan unterhält das Wachstum nicht.

Achromobacter sp. [S. Kubasawa et al., Proc. Japan Soc. for Agricultural Chem., S. 344 (1970)]. Die Organismen sind gram-negativ, nicht-sporenbildend und beweglich. Sie wachsen nur mit Methanol. Methan unterhält das Wachstum nicht.

Fakultativ Methanol-verwertende methylotrophe Mikroorganismen:

Pseudomonas sp. ATCC 21.438. Die Organismen sind rosa, gram-negativ und beweglich. Sie wachsen mit Methanol, Methylamin und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

Pseudomonas AM₁ [Peel und Ouayle, J. Biochem., 81, 465 (1961)]. Die Organismen sind gram-negativ, rosa, beweglich und nicht-sporenbildend. Sie wachsen mit Methanol, Methylamin, Methylformiat und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

Hyphomicrobium sp. [Hirsh und Conti, Arch. Mikrobiol., 62, 289 (1968)]. Die Organismen sind farblose, gestielte Bakterien, die wachsen, indem sie von den Enden der Hyphae herknospen. Sie wachsen mit Methanol, Methylamin, Methylformiat und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

Protaminobacter ruber [Stocks und McCleskey, J. Bacteriol., 88, 1065 (1964)]. Die Organismen sind rot, gram-negativ und beweglich. Sie wachsen mit Methanol, Methylamin, Methylformiat und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

Vibrio extorquens [Bassalik, Jb. Wiss. Bot., 53, 255 (1913)]. Die Organismen sind rot, beweglich, gram-negativ. Sie wachsen mit Methanol, Methylformiat und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

Rhodopseudomonas acidophila [H. Sahm et al., J. Gen.

Microbiol., 94, 313 (1976)]. Die Organismen sind gram-negativ. Sie wachsen anaerob in Gegenwart von Licht mit Methanol und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

5 Pseudomonas MS ATCC 25.262 [H.F. Kung und C. Wagner, Biochem. J., 116, 357 (1970)]. Die Organismen sind gram-negativ, beweglich und nicht-sporenbildend. Sie wachsen mit Methanol, Methylamin und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

10 Achromobacter rufescens [T. Akiba et al., J. Fermentation Technology, 48, 323 (1970)]. Die Organismen sind gram-negativ, beweglich und nicht-sporenbildend. Sie wachsen mit Methanol und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

15 Bacillus soraceus [T. Akiba et al., J. Fermentation Technology, 48, 323 (1970)]. Die Organismen sind gram-positiv und unbeweglich. Sie wachsen mit Methanol und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

20 Brevibacterium sp. [veröffentlichte japanische Patentanmeldung 48-77083, Fukimbara et al. (1973)]. Die Organismen sind gram-negativ und nicht-sporenbildend. Sie wachsen mit Methanol und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

25 Pseudomonas M₂₇ [C. Anthony und L.J. Zatman, Biochem. J., 92, 609 (1964)]. Die Organismen sind gram-negativ, beweglich und nicht-sporenbildend. Sie wachsen mit Methanol, Methylamin, Methylformiat und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

30 Pseudomonas C [Y. Chalfan und R.I. Mateles, Appl. Microbiol., 23, 135 (1972)]. Die Organismen sind gram-negativ, beweglich und nicht-sporenbildend. Sie wachsen mit Methanol, Methylformiat und anderen organischen Verbindungen, nicht aber mit Methan.

In früheren Arbeiten wurden auch verschiedene fakultativ 35 Methanol-verwertende methylotrophe Hefen beschrieben (d.h. Hefen sind nicht in der Lage, mit Methan zu wachsen. Aus diesen früher beschriebenen Hefen stammende Mikrobenzellen und ihre Enzympräparate (insbesondere die zellfreien Extrakte, die SADH-Enzymaktivität und NAD⁺ enthalten), worin die Hefe-Mikroorganismen mit Methanol oder einer ähnlichen C₁-Verbindung (d.h. einer Methylreste liefernden Verbindung) gezüchtet worden sind, vermögen unter 40 aeroben Bedingungen C₃-C₆-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone zu überführen.

45 Spezielle C₁-Verbindungen verwertende methylotrophe Hefen, die früher beschrieben wurden und bei der praktischen Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens brauchbar sind, sind folgende: Candida utilis ATCC 26387; Candida utilis NRRL Y-660; Hansenula polymorpha ATCC 50 26012; Hansenula polymorpha NRRL Y-2214; Hansenula polymorpha NRRL Y-2267; Hansenula anomala NRRL Y 336; Pichia pastoris NRRL Y-55; Pichia pastoris NRRL Y-7556.

55 Ausserdem können die folgenden neu isolierten Hefen bei der praktischen Durchführung des Verfahrens verwendet werden:

Stamm- Bezeichnung	ER&F- Bezeichnung	USDA-Agriculture Research Center-Bezeichnung
60 Pichia sp.	CRL-72	NRRL Y-11.328
Torulopsis sp.	A	NRRL Y-11.415
65 Kloeckera sp.	A ₂	NRRL Y-11.420

Diese neuen Hefe-Isolate haben die folgenden taxonomischen Merkmale:

Pichia sp. CRL-72 (NRRL Y-11.328). Bildet schleimige, weisse Kolonien auf Platten. Zellen sind gross und oval; manche haben Knospen. Reproduzieren sich durch Knospung und wachsen aerob auf C₁-C₆-prim.-Alkoholen, C₁-C₄-prim.-Aminen, Methylformiat, Succinat und Nähr-Agar. Sie wachsen nicht mit Methan.

Torulopsis sp. A₁ (NRRL Y-11.419) kann auf Methanol, Methylformiat, Methylamin, Äthanol, Propylamin und Nähr-Agar wachsen. Wächst nicht mit Methan. Zellen sind gross und oval und zeigen bei mikroskopischer Prüfung vielseitige Knospung.

Kloeckera sp. A₂ (NRRL Y-11.420). Kann mit Methanol, Methylformiat, Methylamin, Äthanol, Propylamin und Nähr-Agar wachsen. Wächst nicht mit Methan. Zellen sind von grossovaler Form und zeigen bipolares Knospen bei mikroskopischer Prüfung.

Ausser den oben beschriebenen neu isolierten Hefen können bei der praktischen Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens die in der USSN 896 476 (vom 14.4.1978, deren Offenbarung hiermit einbezogen wird) offenbarten und beanspruchten neuen Bakterienstämme verwendet werden.

Typische Bakterienstämme, die in dieser Anmeldung offenbart sind, sind folgende:

Methylotrophe Stamm- Bezeichnung	ER&E- Bezeichnung	Bezeichnung des USDA Agriculture Research Center
Methylosinus trichosporium	CRL-15 PM1	NRRL B-11.202
Methylomonas streptobacterium	CRL-17 PM3	NRRL B-11.208
Methylomonas agile	CRL-22 PM9	NRRL B-11.209
Methylococcus capsulatus	CRL M1	NRRL B-11.219
Methylobacterium organophilum	CRL-26 R6	NRRL B-11.222

Die vorstehenden neuen Stämme sind beim United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, Illinois 61604, hinterlegt worden und haben von NRRL die einzelnen NRRL-Bezeichnungen erhalten, wie oben angegeben, gemäss Vertrag zwischen NRRL und der Exxon Research and Engineering Company (ER&E). Der Vertrag mit NRRL gewährleistet ständige Verfügbarkeit vermehrungsfähigen Materials dieser Stämme für die Öffentlichkeit sowie dass vermehrungsfähiges Material dieser Stämme Personen zur Verfügung steht, die vom U.S. Commissioner of Patents and Trademarks als berechtigt gemäss 35 USC 122 und den zugehörigen Commissioner-Regeln (einschliesslich 37 CFR 1.14 unter besonderer Bezugnahme auf 886 OG 638) benannt werden. Der Anmelder des vorliegenden Patents hat zugestimmt, dass, wenn irgendeiner dieser Stämme während der Hinterlegung und der tatsächlichen Laufzeit des Patents absterben oder zerstört werden sollte, er durch einen lebenden Stamm des gleichen Organismus ersetzt werden wird.

Es versteht sich, dass Mutanten dieser Bakterien und Hefen auch für die Produktion von Mikrobenzellen und aus diesen Zellen stammenden Enzympräparaten verwendet werden können. Die Haltung der Kulturen dieser neu entdeckten und isolierten Stämme sollte sorgfältig kontrolliert werden. Die bevorzugten Massnahmen zur Haltung der Kulturen werden nachfolgend beschrieben.

Kulturhaltung

Die Organismen werden vorzugsweise alle zwei Wochen auf mineralischen Salzagarplatten in einer Nebenkultur weitergezüchtet, die das in Beispiel 1 beschriebene Medium enthalten. Im Falle von Hefezellen wird dem obigen Medium Hefe-Stickstoffbase zugesetzt.

Diese Platten sollten in Glas-Exsikkatoren inkubiert werden, die Deckel mit einem luftdichten Verschluss und äusseren Ansätzen mit einer Schlauchverbindung aufweisen. Die Exsikkatoren sind zu evakuieren und mit einem Gasgemisch aus Methan und Luft (1:1 Vol./Vol) zu füllen. Die Inkubation sollte bei 30 °C erfolgen. Kulturen überleben in diesen Exsikkatoren 3 Monate bei 4 °C. Doch ist häufig Überführung von Kulturen bevorzugt.

Bei kommerziellen Vermehrungsprozessen für Mikroorganismen muss im allgemeinen in Stufen vorgegangen werden. Diese Stufen können einige wenige oder zahlreich sein, je nach der Art des Verfahrens und den Eigenschaften der Mikroorganismen. Gewöhnlich beginnt die Vermehrung durch Einimpfen von Zellen einer Schrägkultur in ein vorsterilisiertes Nährmedium, das sich gewöhnlich in einem Kolben befindet. In dem Kolben wird das Wachstum der Mikroorganismen durch verschiedene Massnahmen gefördert, z.B. durch Schütteln zur gründlichen Durchlüftung und Halten bei geeigneter Temperatur. Dieser Schritt oder diese Stoffe wird ein- oder mehrmals in Kolben oder Behältern wiederholt, die das gleiche oder grössere Volumina an Nährmedium enthalten. Diese Stufen können angebrachterweise als Kulturentwicklungsstufen bezeichnet werden. Die Mikroorganismen mit oder ohne begleitendes Kulturmedium aus der letzten Entwicklungsstufe werden in einen Fermentator grossen Masstabs eingeführt oder eingepflegt, um kommerzielle Mengen der Mikroorganismen oder deren Enzyme zu produzieren.

Die Gründe für das Züchten von Mikroorganismen in Stufen sind vielfältig, hängen aber in erster Linie von den Bedingungen ab, die für das Wachstum der Mikroorganismen und/oder die Produktion ihrer Enzyme notwendig sind. Dazu gehören die Stabilität der Mikroorganismen, geeignete Nährmedien, der pH, osmotische Beziehungen, der Grad der Belüftung, die Temperatur und das Einhalten reiner Kulturbedingungen während der Fermentation. Um beispielsweise maximale Ausbeuten an Mikrobenzellen zu erhalten, können die Fermentationsbedingungen in der Endstufe etwas gegenüber denen geändert werden müssen, die zur Erzielung von Wachstum der Mikroorganismen in den Kulturentwicklungsstufen praktiziert werden. Die Erhaltung der Reinheit des Mediums ist auch ein äusserst wichtiger Gesichtspunkt, insbesondere, wo die Fermentation unter aeroben Bedingungen erfolgt, wie im Falle der methylotrophen Mikroorganismen. Wird die Fermentation anfangs in einem grossen Fermentator gestartet, ist eine verhältnismässig lange Zeit erforderlich, um eine erhebliche Ausbeute an Mikroorganismen und/oder deren oxydativen und Dehydrogenase-Enzymen zu erreichen. Dies steigert natürlich die Möglichkeit der Verunreinigung des Mediums und einer Mutation der Mikroorganismen.

Die für das Wachstum der methylotrophen Mikroorganismen und das Induzieren des oxydativen Enzymsystems verwendeten Kulturmedien setzen sich bevorzugt aus anorganischen Phosphatsalzen, Sulfaten und Nitraten sowie aus Sauerstoff und einer Quelle von C₁-Verbindungen zusammen. Die Fermentation erfolgt im allgemeinen bei Temperaturen im Bereich von 5 bis etwa 50 °C, vorzugsweise bei Temperaturen im Bereich von etwa 25 bis 45 °C. Der pH-Wert des Kulturmediums sollte auf einen Wert im Bereich von etwa 4 bis 9 und vorzugsweise etwa 5,5 bis 8,5, insbesondere bevorzugt 6,0 bis 7,5 eingeregelt werden. Die Fermentation kann bei Atmosphärendrücken erfolgen, wenngleich höhere

Drücke bis zu etwa 5 bar (5 at) und darüber angewandt werden können.

Typischerweise werden für das Wachstum der methylotrophen Mikroorganismen und zum Induzieren der Oxygenase- und Dehydrogenase-Enzyme die Mikroorganismen in das Medium eingimpft, das das Substrat für Enzym-induzieren des Wachstum und Energie (z.B. Methan, Methanol, Methylamin usw.) und Sauerstoff enthält. Ist Methan das induzierende Wachstumssubstrat, kann es in Form von Naturgas zugeführt werden. Für kontinuierliche Strömungskultur können die Mikroorganismen in jedem geeigneten, angepassten Fermentationsbehälter wachsen gelassen werden, z.B. in einem gerührten und mit Prallflächen ausgestatteten Fermentator oder einem gespülten Turmfermentator, der entweder mit Innenkühlung oder einer äusseren Rückführkühlschleife ausgestattet ist. Frisches Medium kann kontinuierlich in die Kultur mit Geschwindigkeiten entsprechend 0,02 bis 1 Kulturvolumen pro Stunde gepumpt werden, und die Kultur kann in solchem Umfang entfernt werden, dass das Kulturvolumen konstant bleibt. Das Auslöser-Wachstumssubstrat-Sauerstoff-Gemisch und möglicherweise Kohlendioxid oder andere Gase wird bzw. werden mit dem Medium vorzugsweise durch kontinuierliches Durchblasen durch einen Sprinkler am Boden des Behälters in Berührung gebracht. Die Sauerstoffquelle für die Kultur kann Luft, Sauerstoff oder mit Sauerstoff angereicherte Luft sein. Verbrauchtes Gas kann oben am Behälter entfernt werden. Das verbrauchte Gas kann entweder durch eine Aussenschleife oder intern mit Hilfe eines Gaseinführgebläses rückgeführt werden. Die Gasströme und die Rückführung sollten so gestaltet sein, dass sich maximales Wachstum des Mikroorganismus und maximale Verwertung des induzierenden Wachstumssubstrats ergibt. Ist Methan oder Methanol dieses Substrat, liegt die Menge an Methan oder Methanol im Bereich von 0,2 bis etwa 2% auf Volumenbasis. Im Falle anderer induzierender Wachstumssubstrate, wie Methylamin, liegt die Menge bei etwa 0,4% auf Volumenbasis.

Die Mikrobenzellen können aus dem Wachstumsmedium nach irgendeiner der üblicherweise verwendeten Standard-techniken geerntet werden, z.B. durch Flockung, Sedimentation und/oder Fällung, mit nachfolgendem Zentrifugieren und/oder Filtrieren. Die Biomasse kann auch getrocknet werden, z.B. durch Gefrier- oder Sprühtrocknen, und kann in dieser Form zur weiteren Verwendung bei dem oxydativen und/oder Alkoholdehydrogenase-Umwandlungsprozess verwendet werden. Wird ein oxydatives Enzymsystem erhalten (d.h., Methan-induzierte Zellen), hängt das Enzym im allgemeinen eng an den Zellmembranen, und es kann wünschenswert sein, die Mikrobenzellen als Enzymquelle zu verwenden. Im Falle des Alkoholdehydrogenase-Enzymsystems kann man bequemerweise das Enzym in Form des löslichen Extrakts verwenden (das gegebenenfalls an einem inerten Träger unbeweglich gemacht sein kann). Anders ausgedrückt, kann man im Falle des Erhalts des Oxygenase-Enzymsystems, das aus den Methan-induzierten Zellen (nicht Methanol, Methylamin usw.) zur Verwendung für die aerobe Umwandlung niedriger Alkane in sec.-Alkohole und Methylketone erhältlich ist, die intakten Zellen selbst oder die zellfreie Teilchenfraktion der Zellen verwenden. Die letztere zellfreie Teilchenfraktion ist das Material, das ausfällt, wenn die überstehende Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren zerbrochener Zellen bei 10 000 g für 30 min 1 h lang bei 10 000 g oder darüber zentrifugiert wird. Soll andererseits die sec.-Alkohol-Dehydrogenase (SADH)-Enzymfraktion erhalten werden, bricht man zuerst die Zellen auf, z.B. durch Schallbehandlung usw., entfernt dann die Zellbruchstücke, z.B. zentrifugiert etwa 20 min mit 10 000 g, und das gewonnene rohe SADH-Enzym kann danach weiter durch milde Wärmebehandlung, Säulen-

chromatographie usw. gereinigt werden, wie in den folgenden Beispielen beschrieben. Das SADH-Enzym tritt in der überstehenden Fraktion der zentrifugierten, zerbrochenen Zellen auf, während das Oxygenaseenzym (d.h., die durch Methan induzierten Zellen) in der Teilchenfraktion, wie oben beschrieben, auftritt.

Zur praktischen Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens wird das oxydative und/oder Alkoholdehydrogenase-Enzymsystem beispielsweise wie oben beschrieben erhalten, wobei die Mikrobenzellen aus den methylotrophen Mikroorganismen stammen, die aerob in einem Nährmedium mit dem induzierenden Wachstumssubstrat oder den daraus stammenden Enzympräparaten gezüchtet worden sind. Die Enzymquelle ist nicht kritisch, vorzugsweise wird aber ein solches Präparat aus einem der oben beschriebenen induzierten obligaten oder an eine einzige Lebensbedingung gebundenen oder fakultativen methylotrophen Mikroorganismen erhalten. Das Nährmedium, für das die Mikroorganismen induziert und gezüchtet werden, kann das von Whittenbury et al. oder noch bevorzugter das von Foster und Davis, J. Bacteriol., 91, 1924-1931 (1966) beschriebene Kulturmedium sein. Sind die Mikroorganismen einmal eingeführt und gezüchtet, werden die Mikrobenzellen vorzugsweise geerntet, gewaschen und die erhaltenen ruhenden Mikrobenzellen oder das anfallende Enzympräparat können dann als solches zur Umwandlung von C₃-C₆-Alkanen in die entsprechenden sec.-Alkohole oder Methylketone oder zur Umwandlung von C₃-C₆-sec.-Alkoholen in die entsprechenden Methylketone unter aeroben Bedingungen (in Gegenwart von Sauerstoff) in einer bevorzugt gepufferten Lösung verwendet werden. Das Gemisch aus Substratmaterial und induzierten, ruhenden Mikrobenzellen oder Enzympräparat in der gepufferten Lösung wird in der Regel inkubiert, bis der gewünschte Umwandlungsgrad erreicht ist. Danach kann das Oxydationsprodukt auf herkömmliche Weise, z.B. durch Destillation usw., gewonnen werden. Zur Ermöglichung des notwendigen wirksamen Kontakts von Sauerstoff und Enzymsystem (gleich, ob es ein Enzympräparat als solches oder aus den induzierten methylotrophen Mikroorganismen stammende Mikrobenzellen sind) wird zur Erzielung bester Ergebnisse vorzugsweise ein starker, fein verteilter Luftstrom in eine kräftig gerührte Dispersion des Substrats (C₃-C₆-Alkan oder C₃-C₆-sec.-Alkohol im Oxydationsmedium verwendet, das im allgemeinen Wasser und einen Puffer enthält und in dem das Enzympräparat oder das induzierte Mikrobenzellsystem suspendiert ist. Das Enzympräparat oder das induzierte Mikrobenzellsystem kann dann vom flüssigen Medium abgetrennt werden, vorzugsweise durch Filtration oder Zentrifugieren. Das erhaltene Keton kann dann im allgemeinen erhalten werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann chargenweise, halbkontinuierlich, kontinuierlich, im Gleichstrom oder im Gegenstrom durchgeführt werden. Gegebenenfalls wird die das Enzympräparat oder methylotrophe Mikroorganismen und Pufferlösung enthaltende Suspension nach unten unter kräftigem Durchmischen im Gegenstrom zu einem in einem Rohrreaktor aufsteigenden Luftstrom geführt. Die obere Schicht wird vorzugsweise aus der abwärts fliessenden Suspension entfernt, während Kulturbestandteile und solche der verbliebenen Pufferlösung zumindest teilweise mit weiterem oxydativem Substrat und unter Zusatz von frischem Enzympräparat oder induziertem Mikrobenzellsystem, je nach Bedarf, rückgeführt werden können.

Das Wachstum der methylotrophen Mikroorganismen und das Oxydationsverfahren können bequemerweise durch gleichzeitige, aber getrennte Durchführung und unter Anwendung einer viel höheren Durchlüftung im Oxydationsprozess gekoppelt werden (beispielsweise ein Luftüberschuss von

wenigstens dem Zweifachen dessen, der für das Wachstum erforderlich ist, vorzugsweise wenigstens die fünffache Durchlüftung). Der Wachstumsprozess, der oxydative oder dehydrierende Prozess können im gleichen Reaktor nacheinander oder gleichzeitig durch alternierende Anwendung normaler und starker Durchlüftung durchgeführt werden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht. Alle Teile und Prozentsätze, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben, sind auf das Gewicht bezogen.

Beispiel 1

Ein Nährmedium, wie von Foster und Davis, J. Bacteriol., 91, 1924–1931 (1966) beschrieben, mit folgender Zusammensetzung pro Liter wurde hergestellt:

Na ₂ HPO ₄	0,21 g
NaH ₂ PO ₄	0,09 g
NaNO ₃	2,00 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 g
KCl	0,04 g
CaCl ₂	0,015 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,00 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01 mg
H ₃ BO ₄	0,02 mg
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,02 mg
ZnSO ₄	0,14 mg
MoO ₃	0,02 mg

Der pH-Wert des Nährmediums wurde auf 7,0 durch Zusatz von Säure oder Base eingestellt, und 50-ml-Proben des Nährmediums wurden in eine Reihe von 300-ml-Schüttelkolben gebracht. Die Schüttelkolben wurden mit einer Inokulationsschleife von Zellen von einer Agarplatte mit homogenen Kolonien der Mikroorganismen auf der Platte beimpft (die Reinheit der Isolate wurde durch mikroskopische Prüfung bestätigt). Die Isolate waren auf Methanol (0,4% Vol./Vol.) Agarplatten oder auf Agarplatten unter einer Atmosphäre aus Methan und Luft mit einem 1:1 Vol./Vol.-Gasverhältnis

gehalten, die alle zwei Wochen übertragen worden waren. Zum Wachstum mit Methanol wurde das Medium mit 0,4% Methanol ergänzt. Zum Wachstum mit Methan wurde die Gasphase der beimpften Kolben durch ein Gasgemisch aus Methan und Luft mit einem Verhältnis von 1:1 auf Volumenbasis ersetzt. Die beimpften Kolben wurden luftdicht verschlossen und auf einem Rotationsschüttler mit einem Orbitalradius von 2,5 cm bei 250 UpM und bei 30 °C 2 Tage inkubiert, bis im Medium Trübung entstanden war. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 10 000 g und 4 °C für 30 min geerntet. Der Zellkuchen wurde zweimal mit einem 0,05 m Phosphatpuffer bei einem pH von 7,0 (mit 0,02 m MgCl₂) gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden dann in einem 0,05 m Phosphatpuffer bei pH 7,0 suspendiert.

Eine 0,5-ml-Probe einer jeden gewaschenen Zellsuspension (2 mg Zellen) wurde in 10-ml-Röhrchen bei 4 °C gebracht, die mit einer Gummikappe verschlossen wurden. Die Gasphase der Röhrchen wurde abgesaugt und dann durch ein Gasgemisch des reagierenden Substrats (d.h. Alkanol oder sec.-Alkohol) und Sauerstoff im Volumenverhältnis 1:1 ersetzt (im Falle eines flüssigen Substrats, d.h. eines sec.-Alkohols, wurden 10 µl des Substrats in die 10-ml-Röhrchen gebracht). Die Röhrchen wurden dann bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler bei 300 UpM inkubiert. Produktproben (1 bis 3 µl) wurden mit einer Mikrospritze periodisch entnommen und die Produkte gaschromatographisch (Ionisationsflamendetektorsäule) analysiert.

Tabelle I zeigt die Umwandlungsgeschwindigkeiten für die Umwandlung von n-Propan, n-Butan, n-Pentan und n-Hexan in Aceton, 2-Butanon, 2-Pentanon bzw. 2-Hexanon durch induzierte ruhende (gewaschene) Mikrobenzellsuspensionen verschiedener Mikroorganismen, von denen Stämme mit Methan nach der oben beschriebenen Versuchsweise gezüchtet worden waren. Aus diesen Daten ist zu ersehen, dass die ruhenden (gewaschenen) Zellen der mit Methan gezüchteten Mikroorganismen C₃–C₆-n-Alkane in die entsprechenden Methylketone umzuwandeln vermögen.

Tabelle I

Umwandlungsgeschwindigkeiten für die Oxydation von Kohlenwasserstoffen in Ketone durch Zellsuspensionen von mit Methan gezüchteten Methyloprophen

Methylopropher Mikroorganismus, Stammbezeichnung ^b	Umwandlungsgeschwindigkeiten ^a , µMol/h/mg Protein			
	n-Propan → Aceton	n-Butan → 2-Butanon	n-Pentan → 2-Pentanon	n-Hexan → 2-Hexanon
Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196)	1,5	1,2	0,72	0,05
Methylosinus sporium 5 (NRRL B-11.197)	2,1	0,58	–	–
Methylocystis parvus OBBP (NRRL B-11.198)	1,8	1,0	0,51	0,04
Methylomonas methanica SI (NRRL B-11.199)	2,5	0,30	0,28	0,02
Methylomonas albus BG8 (NRRL B-11.200)	2,7	0,60	–	–
Methylobacter capsulatus Y (NRRL B-11.201)	1,6	1,1	0,68	0,07
Methylococcus capsulatus Texas (ATCC 19069)	1,2	0,52	0,42	0,09
Methylobacterium organophilum XX	2,8	2,0	0,58	0,09

^a Die Produkte wurden gaschromatographisch durch Vergleiche der Retentionszeit mit authentischen Standardproben identifiziert. Die Analyse zeigte auch, dass keine weitere Oxydation der Produkte erfolgte.

^b Das Trockengewicht der Zellen betrug etwa 0,2 g/100 ml Kulturbrühe.

Beispiel 2

Mikrobiologische Umwandlung von sec.-Alkoholen in Ketone

Die Arbeitsweise des Beispiels 1 wurde wiederholt, wobei eine Vielzahl von Methan-verwertenden methyloprophen Mikroorganismen jeweils aerob in einem Nährmedium mit Methan als das Alkoholdehydrogenase-Enzym induzierend und als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle für das Wachs-

tum gezüchtet wurden. Die Zellen wurden geerntet und gewaschen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die ruhenden Mikrobenzellen der induzierten, mit Methan gezüchteten, Methan-verwertenden methyloprophen Mikroorganismen wurden dann mit C₃–C₆-sec.-Alkoholen in einer gepufferten Lösung nach der Arbeitsweise des Beispiels 1 in Berührung gebracht. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Tabelle II wiedergegeben.

Tabelle II

Umwandlungsgeschwindigkeiten für die Oxydation von sec.-Alkoholen in Ketone durch Suspensionen ruhender Zellen von mit Methan gezüchteten Methylotrophen

Methylotropher Mikroorganismus, Stammbezeichnung ^b	Umwandlungsgeschwindigkeiten ^a , $\mu\text{Mol/h/mg Protein}$			
	2-Propanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196)	0,25	3,7	2,7	0,07
Methylosinus sporium 5 (NRRL B-11.197)	0,30	3,0	–	–
Methylocystis parvus OBBP (NRRL B-11.198)	0,32	1,1	0,80	0,076
Methylomonas methanica S1 (NRRL B-11.199)	0,40	0,39	0,25	0,01
Methylomonas albus BG8 (NRRL B-11.20)	1,3	3,5	–	–
Methylobacter capsulatus Y (NRRL B-11.201)	0,15	0,84	0,5	0,1
Methylococcus capsulatus, Texas (ATCC 19069)	0,80	0,60	2,5	1,0
Methylobacterium organophilum XX (ATCC 24886)	0,5	2,5	0,82	0,12

^a Die Produkte wurden gaschromatographisch durch Vergleich der Retentionszeiten mit authentischen Standardproben identifiziert. Die Analyse zeigte auch, dass keine weitere Oxydation der Produkte eintrat.

^b Das Trockengewicht der Zellen betrug etwa 0,2 g/100 ml Kulturbrühe.

Beispiel 3

Mikrobiologische Umwandlung von sec.-Alkoholen in Ketone

In diesem Beispiel wurde die Arbeitsweise des Beispiels 1 wiederholt, mit der Ausnahme, dass eine Vielzahl Methanverwertender methylotropher Mikroorganismen jeweils aerob in einem methanolhaltigen Nährmedium anstelle eines methanolhaltigen Mediums gezüchtet wurden. Die Nährstoffe in dem Medium waren die gleichen, wie in Beispiel 1 angegeben, mit der Ausnahme, dass 0,4 Vol.-% Methanol als Alkohol-

dehydrogenase-Induktor und Hauptquelle für Kohlenstoff und Wachstumsenergie verwendet wurden. Nach dem Wachstum wurden die Zellen geerntet und gewaschen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die ruhenden Zellen der induzierten, mit Methanol gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen wurden dann mit sec.-Alkoholen in einer gepufferten Lösung nach der in Beispiel 1 beschriebenen Arbeitsweise in Berührung gebracht. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Tabelle III wiedergegeben.

Tabelle III

Umwandlungsgeschwindigkeiten für die Umwandlung von sec.-Alkoholen in Ketone durch Zellsuspensionen von mit Methanol gezüchteten Methylotrophen

Methylotropher Mikroorganismus, Stammbezeichnung ^b	Umwandlungsgeschwindigkeiten ^a , $\mu\text{Mol/h/mg Protein}$			
	2-Propanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196)	0,30	4,1	2,9	0,9
Methylosinus sporium 5 (NRRL B-11.197)	0,45	3,5	–	–
Methylocystis parvus OBBP (NRRL B-11.198)	0,25	1,0	0,82	0,05
Methylomonas methanica S1 (NRRL B-11.199)	0,35	0,40	0,45	0,04
Methylomonas albus BG8 (NRRL B-11.200)	1,5	3,0	–	–
Methylobacter capsulatus Y (NRRL B-11.201)	0,52	1,5	0,60	0,12
Methylococcus capsulatus, Texas (ATCC 19069)	0,75	0,70	3,5	1,3
Methylobacterium organophilum XX (ATCC 27886)	0,70	2,8	0,9	1,1

^a Die Produkte wurden gaschromatographisch durch Vergleiche der Retentionszeit mit authentischen Standardproben identifiziert. Die Analyse zeigte auch, dass keine weitere Oxydation der Produkte erfolgte.

^b Das Trockengewicht der Zellen betrug etwa 0,2 g/100 ml Kulturbrühe.

Beispiel 4

Mikrobiologische Umwandlung von sec.-Alkoholen in Ketone

Bei diesem Beispiel wurden Mikrobzellen Methanolverwertender methylotropher Mikroorganismen, mit Methanol gezüchtet, zur Umwandlung von sec.-Alkoholen in Methylketone verwendet.

Die Arbeitsweise des Beispiels 1 wurde wiederholt, mit der Ausnahme, dass eine Vielzahl von Methanol-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen jeweils aerob in einem methanolhaltigen Nährmedium anstelle eines methanolhaltigen Mediums gezüchtet wurden. Die Nährstoffe in dem Medium waren die gleichen, wie in Beispiel 1 angegeben, mit der Aus-

nahme, dass 0,4 Vol.-% Methanol als Alkoholdehydrogenase-Induktor und als Hauptquelle für Kohlenstoff und Energie für das Wachstum verwendet wurden. Die Zellen wurden gewonnen und gewaschen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die ruhenden Mikrobzellen der induzierten, mit Methanol gezüchteten, Methanol-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen wurden dann in einer gepufferten Lösung nach der Arbeitsweise des Beispiels 1 mit C₃-C₆-sec.-Alkoholen in Berührung gebracht. Die Reaktionsprodukte wurden gaschromatographisch analysiert, und es zeigte sich, dass sie 2-Ketone enthielten, wie in Tabelle IV angegeben. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Tabelle IV wiedergegeben.

Tabelle IV

Umwandlungsgeschwindigkeiten für die Umwandlung von sec.-Alkoholen in Ketone durch Zellsuspension von mit Methanol gezüchteten, obligat und fakultativ Methanol-verwertenden Methylotrophen

Methylotropher Mikroorganismus, Stamm-Bezeichnung ^b	Umwandlungsgeschwindigkeiten ^a , $\mu\text{Mol/h/mg Protein}$			
	2-Propanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
<i>Pseudomonas</i> MS ATCC 25262 (fakultativ)	0,80	3,5	2,1	0,80
<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 21438 (fakultativ)	0,45	3,2	2,7	0,7
<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 21439 (obligat)	7,4	4,7	0,05	0,03
<i>Methanomonas methylovora</i> ATCC 21852 (Obligat)	0,28	2,5	2,1	1,0

^a Die Produkte wurden gaschromatographisch durch Vergleiche der Retentionszeit mit authentischen Standardproben identifiziert. Die Analyse zeigte auch, dass keine weitere Oxydation der Produkte erfolgte.

^b Das Trockengewicht der Zellen betrug etwa 0,2 g/100 ml Kulturbrühe.

Beispiel 5

Mikrobiologische Umwandlung von sec.-Alkoholen in Ketone

Bei diesem Beispiel wurden Mikrobenzellen beider Methan- und Methanol-verwertender methylotropher Mikroorganismen (sowohl des nur an eine einzige Lebensbedingung gebundenen oder obligaten und des fakultativen Typs) zur Umwandlung von sec.-Alkoholen in Methylketone verwendet.

Die Arbeitsweise in Beispiel 1 wurde wiederholt, mit der Ausnahme, dass die methylotrophen Mikroorganismen jeweils aerob in einem Alkoholdehydrogenase-induzierenden Wachstumsmedium mit Methylamin oder Methylformiat als Alkoholdehydrogenaseenzym-Induktor und Wachstumssubstrat anstelle von Methan gezüchtet wurden. Die Nährstoffe

in dem Medium waren die gleichen wie in Beispiel 1 angegeben, mit der Ausnahme, dass 0,4 Vol./Vol.-% des Alkoholdehydrogenase-Induktor-Wachstumssubstrats als Hauptquelle für Kohlenstoff und Energie verwendet wurden. Die Zellen wurden geerntet und gewaschen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die ruhenden Mikrobenzellen wurden dann mit C₃-C₆-sec.-Alkoholen in einer gepufferten Lösung nach der Umwandlungsartweise des Beispiels 1 in Berührung gebracht. Tabelle V zeigt die Umwandlungsgeschwindigkeiten der sec.-Alkohole in die Ketone für die mit Methylamin gezüchteten Mikrobenzellsuspensionen und Tabelle VI zeigt die Umwandlungsgeschwindigkeiten für die sec.-Alkohole in Ketone für die mit Methylformiat gezüchteten Mikrobenzell-

Tabelle V

Umwandlungsgeschwindigkeiten für die Umwandlung von sec.-Alkoholen in Ketone durch Zellsuspensionen von mit Methylamin gezüchteten, an eine einzige Lebensbedingung gebundenen (obligaten) und fakultativ Methanol-verwertenden Methylotrophen

Methylotropher Mikroorganismus, Stammbezeichnung ^b	Umwandlungsgeschwindigkeiten ^a , $\mu\text{Mol/h/mg Protein}$			
	2-Propanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
<i>Methanomonas methylovora</i> ATCC 21852 (obligat)	0,82	3,2	1,0	0,09
<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 21438 (fakultativ)	1,0	2,1	0,82	0,07

^a Die Produkte wurden gaschromatographisch durch Vergleiche der Retentionszeit mit authentischen Standardproben identifiziert. Die Analyse zeigte auch, dass keine weitere Oxydation der Produkte erfolgte.

^b Das Trockengewicht der Zellen betrug etwa 0,2 g/100 ml Kulturbrühe.

Tabelle VI

Umwandlungsgeschwindigkeiten für die Umwandlung von sec.-Alkoholen in Ketone durch Zellsuspensionen von mit Methylformiat gezüchteten, obligat und fakultativ Methan- und Methanol-verwertenden Methylotrophen

Methylotropher Mikroorganismus, Stammbezeichnung ^b	Umwandlungsgeschwindigkeiten ^a , $\mu\text{Mol/h/mg Protein}$			
	2-Propanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (obligat Methan-Verwerter)	0,95	4,5	1,5	0,72
<i>Methylobacterium organophilum</i> XX ATCC 27886 (fakultativ Methan-Verwerter)	0,48	3,5	1,0	0,70
<i>Methanomonas methylovora</i> ATCC 21852 (obligat Methanol-Verwerter)	0,62	2,1	1,5	0,60
<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 21438 (fakultativ Methanol-Verwerter)	0,52	3,2	2,0	0,80

^a Die Produkte wurden gaschromatographisch durch Vergleiche der Retentionszeit mit authentischen Standardproben identifiziert. Die Analyse zeigte auch, dass keine weitere Oxydation der Produkte erfolgte.

^b Das Trockengewicht der Zellen betrug etwa 0,2 g/100 ml Kulturbrühe.

Wie oben gezeigt, wurde ein Verfahren gefunden, durch das Methylketone erhalten werden, indem C₃-C₆-n-Alkane oder lineare C₃-C₆-sec.-Alkohole mit ruhenden Mikrobenzellen (oder daraus stammenden Enzympräparaten), die in Gegenwart einer Oxygenase und/oder eines Alkoholdehydrogenaseenzym-Induktors als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle gezüchtet worden sind, in Berührung gebracht werden. Die methylotrophen Mikroorganismen können entweder obligat, d.h. an eine einzige Lebensbedingung gebunden, oder fakultativ sein. In jedem Falle sind, wenn die methylotrophen Mikroorganismen aerob in einem den Enzyminduktor, Methan, enthaltenden Nährmedium aerob gezüchtet werden, die erhaltenen ruhenden Mikrobenzellen oder ihre Enzympräparate in der Lage, entweder die C₃-C₆-Alkane oder die C₃-C₆-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone umzuwandeln. Im Falle entweder der obligaten oder der fakultativen methylotrophen Mikroorganismen, die aerob in einem Nährmedium, das Methanol, Methylamin oder Methylformiat als Alkoholdehydrogenaseenzym-Induktor enthält, gezüchtet worden sind, vermögen die erhaltenen ruhenden Mikrobenzellen oder ihre Enzympräparate nur C₃-C₆-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone umzuwandeln. Diese induzierten Enzyme können nicht die C₃-C₆-Alkane in die entsprechenden Methylketone überführen. In keinem Falle wurde weitere Reaktion des Keton-Produkts beobachtet. In Ansatzversuchen unter Verwendung der ruhenden, mit Methan, Methanol, Methylamin oder Methylformiat gezüchteten Mikrobenzellen verlief die Umwandlungsreaktion wenigstens 4 h linear.

Das oxydative und/oder Alkoholdehydrogenase-Enzymsystem der aerob induzierten methylotrophen Mikroorganismen ist induzierbar, und das Ketonprodukt sammelt sich extrazellulär an (d.h., nach der Reaktion und dem Zentrifugieren des Reaktionsgemischs findet sich das Keton-Produkt in der überstehenden Fraktion und nicht im Zellkuchen).

Es hat sich gezeigt, dass einige der Stämme methylotropher Mikroorganismen Zellen oder Enzympräparate mit höherem Umwandlungsvermögen für sec.-Alkohole in Ketone als andere hervorbringen. Beispielsweise produzierten Mikrobenzellen aus *Methylosinus trichosporium* OB3b die grösste Menge an Methylketonen aus sec.-Alkoholen (z.B. 15 µMol/2 mg Protein nach 2 Stunden).

Wie aus den folgenden Beispielen zu entnehmen ist, besitzen die mit Methan gezüchteten Mikrobenzellen und ihre Enzympräparate (einschliesslich zellfreie Extrakte) sowohl Oxygenase- als auch Alkoholdehydrogenase-Enzym-Aktivität. Vermutlich induziert das Methan selbst die Oxygenase-Enzym-Aktivität und das Methanol aus der Oxydation von Methan durch den methylotrophen Mikroorganismus während des Wachstums das Alkoholdehydrogenase-Enzym. Das induzierte Oxygenase-Enzym ist verantwortlich für die Umwandlung des C₃-C₆-Alkans in ein Oxydationszwischenprodukt den sekundären Alkohol, während das induzierte Alkoholdehydrogenase-Enzym den sekundären Alkohol zum entsprechenden Methylketon dehydriert.

Wie auch in den folgenden Beispielen gezeigt, können zusätzlich zu den methylotrophen Bakterien andere Mikroorganismen zur Durchführung der Umwandlung der C₃-C₆-Alkane oder der Umwandlung der C₃-C₆-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone verwendet werden. Dazu gehören Bakterien, Fungi und Hefen, die mit kurzkettigen Alkanen wachsen, z.B. Methan, oder mit Alkoholen, wie Methanol usw.

Alkohol-Oxydationssysteme

Wie oben (Tabellen II und III) gezeigt und erörtert, oxydierten (dehydrierten) Zellsuspensionen von mit Methan und Methanol gezüchteten Mikrobenzellen C₃-C₆-sec.-Alkohole

zu ihren entsprechenden Methylketonen. Die Produkt-Methylketone sammelten sich extrazellulär an, bestimmt durch Analyse der überstehenden Flüssigkeit des zentrifugierten Reaktionsgemischs. Kontrollversuche mit durch Wärme abgetöteten Zellen zeigten an, dass die Methylketone enzymatisch erzeugt waren. Bei diesen Tests fand sich sec.-Alkoholdehydrogenase (SADH)-Aktivität in allen getesteten C₁-Verwertern. Weitere Tests haben gezeigt, dass die SADH-Aktivität in Zellsuspensionen von mit Methanol oder Methylamin gezüchteten Mikroorganismen zu finden war. Die SADH scheint jedoch kein konstitutives Enzym zu sein, da die SADH-Enzym-Aktivität nicht in mit Succinat gezüchteten fakultativen C₁-Verwertern gefunden wurde.

Zur Herstellung des zellfreien sec.-Alkoholdehydrogenase-(SADH)-Systems wurden die gewaschenen Zellen mit einem Ultraschallwellenoszillator, Modell W201 (Wave Energy System, Inc., Newtown, Pa.) aufgebrochen und 30 min bei 20 000 g zentrifugiert. Die klare überstehende Flüssigkeit enthielt die SADH-Aktivität. Die Enzymaktivität wurde mit einem Fluoreszenz-Spektrophotometer (Perkin Elmer, Modell MPF 44A) durch Verfolgen der Bildung von reduziertem NAD (Ex 340 nm, Em 460 nm) gemessen. Die Bildung von reduziertem NAD wurde auch mit einem Absorptionsspektrophotometer bei 340 nm verfolgt. Das Testsystem (3 ml) enthielt: Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0; 150 µMol; NAD 1 µMol; eine gegebene Menge eines Enzympräparats und sec.-Alkohol, 10 µMol. Die Reaktion wurde durch Zusatz des Substrates gestartet. Eine Einheit Enzymaktivität entspricht der Reduktion von 1 µMol NAD pro Minute. Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Lowry bestimmt [J. Biol. Chem., 193, 255-275 (1951)].

Nachfolgend sind Tests zusammengefasst, die zu den Optimalbedingungen für die Produktion von Methylketonen aus C₃-C₆-sec.-Alkoholen durchgeführt wurden. Es versteht sich, dass dies die gefundenen Optimalbedingungen waren und die Erfindung nicht an sie gebunden sein soll. Umwandlungen können noch durch Abweichen von dem nachfolgend angegebenen Optimum erzielt werden, aber mit geringeren Ausbeuten und Umwandlungen.

Zeitverlauf

Die Produktion von 2-Butanon aus 2-Butanol erreicht nach 14 h Inkubation bei Ansatzversuchen mit allen getesteten Mikroorganismen ein Maximum. Die Menge an 2-Butanon fiel nach 30 h Inkubation nicht ab. Die 2-Butanon-Produktionsgeschwindigkeit war für die ersten 4 h linear. Daher wurde die Produktion von 2-Butanon innerhalb dieses Zeitraums gemessen, wenn der Einfluss einer Variablen untersucht wurde.

pH

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Produktion von 2-Butanon wurde mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl-Puffer (0,05 m) für pH-Werte von 8,0 bis 10,0 und mit 0,05 m Kaliumphosphatpuffer für Werte von 5,0 bis 8,0 untersucht. Ein pH-Wert um 8,0 erwies sich als Optimum für die 2-Butanon-Bildung bei allen untersuchten Mikroorganismen. Von den neuen Stämmen zeigte *Methylobacterium organophilum* CRL 26 (NRRL B-11.222) hohe Aktivität sowohl bei pH 8 als auch 9. Die Hefezellen schienen durch den pH bei der Bildung von 2-Butanon weniger beeinträchtigt zu werden.

Temperatur

Das Temperaturoptimum für die Produktion von 2-Butanon durch Zellsuspensionen war etwa 35 °C, ausgenommen die Hefekultur, die ein Optimum von etwa 40 °C hatte.

Substratkonzentration

2-Butanol wurde in verschiedenen Konzentrationen zu Zellsuspensionen von Hefe und des Stammes *Pseudomonas* sp. ATCC 21.439 gegeben. Nach 35 min Inkubation wurde die 2-Butanon-Produktion getestet. Die gebildete Menge des 2-Butanons hing von der anfangs zugesetzten Substratmenge ab. Eine 2-Butanol-Konzentration von etwa 50 μMol lieferte maximale 2-Butanon-Produktion.

Zellkonzentration

Die Zellkonzentration hat auch einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der 2-Butanon-Produktion. Die nach 2 h Inkubation angesammelte Menge an 2-Butanon stieg linear mit bis auf etwa 12 mg/0,5 ml für Hefe und für *Methylococcus capsulatus* CRL M1 (NRRL B-11.219) und etwa 17 mg/0,5 ml für die Stämme *Methylobacterium organophilum* CRL 26 (NRRL B-11.222), *Methylosinus trichosporium* OB3b (NRRL B-11.196) und *Pseudomonas* sp. ATCC 21.439 erhöhter Zellkonzentration an.

Produkthemmung und weitere Oxydation

Die Untersuchung des Zeitablaufs der Produktion von 2-Butanon zeigte, dass die Geschwindigkeit nach 4 h Inkubation abnahm, was unter anderen Möglichkeiten entweder eine Produkthemmung oder weitere Oxydation von 2-Butanon vermuten lässt. Zur Untersuchung dieser Möglichkeiten wurden 8 μMol 2-Butanon lebensfähigen oder durch Wärme abgetöteten Zellsuspensionen zugesetzt und unter den oben für die Erzeugung von 2-Butanon beschriebenen Bedingungen inkubiert. In allen durch Wärme abgetöteten Zellsuspensionen wurde kein Absinken in der 2-Butanon-Konzentration beobachtet, aber 2-Butanon verschwand langsam in Gegenwart lebensfähiger Zellen aller untersuchter Stämme. Wurde 2-Butanol (5 μl /0,5 ml Reaktionsgemisch) zu lebensfähigen Zellsuspensionen zusammen mit dem von aussen zugeführten 2-Butanon zugesetzt, wurde eine Nettozunahme der 2-Butanon-Produktion festgestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten waren identisch mit denen, bei denen der sekundäre Alkohol anfangs in das Methylketon überführt wurde, und wurden durch die Gegenwart des von aussen zugeführten 2-Butanons nicht beeinflusst. Diese Daten zeigen, dass es bei der Produktion von 2-Butanon keine Produkthemmung gibt. Eine weitere Oxydation von 2-Butanon in geringer Menge durch lebensfähige Zellsuspension wurde beobachtet. Das Absinken der 2-Butanon-Produktionsgeschwindigkeit nach 4 h Inkubation kann auf der Erschöpfung weiterer Erfordernisse, z.B. eines oder mehrerer Cofaktoren, beruhen.

Hemmuntersuchungen

Die Produktion von 2-Butanon aus 2-Butanol durch Zellsuspensionen der getesteten Stämme wurde durch mit Metallen Chelate bildende Mittel, wie 1,10-Phenanthrolin und α,α -Bipyridyl, gehemmt. Die Aktivität wurde jedoch nicht durch Natriumcyanid oder Thioharnstoff gehemmt, was für das Enzym die Beteiligung von Metall vermuten lässt. Die Ergebnisse der Hemmtests sind in Tabelle VII gezeigt.

Tabelle VII

Einfluss von mit Metall Chelate bildenden Mitteln und anderen Inhibitoren auf die Produktion von 2-Butanon durch Zellsuspensionen von mit Methanol gezüchtetem *Methylococcus capsulatus* CRL M1 (NRRL B-11.219)

Metallchelatlöser	Konzentration	Hemmung (%)
Natriumcyanid	1 mMol	0
Natriumazid	1 mMol	10
ÄDTA	1 mMol	70
1,10-Phenanthrolin	1 mMol	95
α,α -Bipyridyl	1 mMol	75
Thioharnstoff	1 mMol	0

Substratspezifität

Die Substratspezifität für die Oxydation von C_3 - C_6 -sec.-Alkoholen durch die Stämme der C_1 -Verwerter wurde untersucht. Unter den sekundären Alkoholen wurden 2-Propanol und 2-Butanol mit höheren Geschwindigkeiten oxidiert; 2-Pentanol, 2-Hexanol und 2-Heptanol wurden mit viel geringerer Geschwindigkeit oxidiert. Die Oxydationsprodukte dieser sekundären Alkohole waren die entsprechenden Methylketone, bestimmt durch Vergleich gaschromatographischer Retentionszeiten mit authentischen Standardproben.

Zellfreies System

Zellfreie lösliche Extrakte aus mit Schall aufgebrochenen Zellen neuer Stämme und bekannter Stämme oxidierten auch 2-Butanol zu 2-Butanon. Diese Ergebnisse sind in Tabelle XVII wiedergegeben. Alle untersuchten zellfreien Systeme brauchten jedoch den Zusatz eines Cofaktors, NAD, für ihre Aktivität. Andere untersuchte Cofaktoren (einschliesslich NAD(P)H, NADP, Phenazinmethosulfat, GSH, FAD, Kaliumferricyanid und Dichlorphenolindophenol) waren nicht wirksam. Die Stöchiometrie für den Verbrauch von 2-Butanol, die Reduktion von NAD und die Bildung von 2-Butanon wurde für *Pseudomonas* sp. ATCC 21.439 erhalten, wie in Tabelle IX gezeigt. Dies ist der erste Bericht über eine NAD-abhängige sec.-Alkohol-Dehydrogenase.

Die experimentelle Arbeitsweise für die in Tabelle VIII angegebenen Tests war wie folgt: 1 mg Protein des Rohextrakts wurde in 10-ml-Röhrchen in 0,5 ml eines 0,05 m Phosphatpuffers (pH 7,0) gegeben. 1 μMol NAD und 10 μMol 2-Butanol wurden zugesetzt und die Röhrchen wurden mit einer Gummikappe verschlossen, um ein Verdampfen minimal zu halten. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30 °C auf einem Wasserbad inkubiert. Nach 15 min Inkubation wurde eine 3- μl -Probe mit einer Spritze entnommen und durch Gas/Flüssigkeits-Chromatographie getestet. Die katalytische Aktivität wurde auch durch Fluoreszenzspektrophotometrie getestet. Die aus diesen beiden Tests erhaltenen Daten stimmten miteinander überein. Vergleichbare Umwandlungen (wie in Tabelle VIII angegeben) für Extrakte, die aus mit CH_3NH_2 und HCOOCH_3 gezüchteten Mikroben stammten, wurden, wie in Tabelle III gezeigt, auch erhalten. Tabelle VIIa zeigt ähnliche Umwandlungen von 2-Propanol, 2-Butanol und 2-Pentanol in die Methylketone mit den zellfreien Extrakten von SADH.

Tabelle VIII
Oxydation von 2-Butanol zu 2-Butanon durch zellfreie lösliche Extrakte von C₁-verwertenden Mikroben ^a

Mikroben	Wachstumssubstrat	Umwandlungsgeschwindigkeit (nMol/min/mg Protein)
obligate Methylotrrophe		
Membranstruktur Typ I		
Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196)	CH ₄	4,5
dito	CH ₃ OH	2,4
dito	CH ₃ NH ₂	2,5
dito	HCOOCH ₃	2,0
Methylosinus sporium 5 (NRRL B-11.197)	CH ₄	1,5
Methylocystis parvus OBBP (NRRL B-11.198)	CH ₄	1,2
Membranstruktur Typ II		
Methylomonas methanica S ₁ (NRRL B-11.199)	CH ₄	0,5
Methylomonas albus BG 8	CH ₄	2,5
Methylomonas streptobacterium CRL 17 (NRRL B-11.208)	CH ₄	1,8
Methylomonas agile CRL 22 (NRRL B-11.209)	CH ₄	1,4
Methylococcus capsulatus CRL M1 (NRRL B-11.219)	CH ₄	3,2
dito	CH ₃ OH	2,0
dito	CH ₃ NH ₂	1,8
dito	HCOOCH ₃	2,0
Methylococcus capsulatus Y (NRRL B-11.201)	CH ₄	0,8
Fakultative Methan-Verwerter		
Methylobacterium organophilum CRL 26 (NRRL B-11.222)	CH ₄	1,8
dito	CH ₃ OH	2,5
dito	CH ₃ NH ₂	2,0
dito	HCOOCH ₃	2,0
Methylobacterium organophilum XX (ATCC 27.886)	CH ₄	2,6
Obligate Methanol-Verwerter		
Pseudomonas sp. CRL 75 (ATCC 21.439)	CH ₃ OH	25,0
Methylomonas methylovora (ATCC 21.852)	CH ₃ OH	2,0
Fakultative Methanol-Verwerter		
Pseudomonas sp. CRL 74 (ATCC 21.438)	CH ₃ OH	3,0
Pseudomonas Ms. (ATCC 25.262)	CH ₃ OH	5,0
Hefen		
Candida utilis (ATCC 26.387)	CH ₃ OH	2,4
Candida utilis (NRRL Y-660)	CH ₃ OH	15,0
Hansenula polymorpha (ATCC 26.012)	CH ₃ OH	23,2
dito	CH ₃ NH ₂	20,0
dito	HCOOCH ₃	16,0
Hansenula polymorpha (NRRL Y-2214)	CH ₃ OH	1,5
Hansenula polymorpha (NRRL Y-2267)	CH ₃ OH	2,0
Hansenula anomala (NRRL Y-336)	CH ₃ OH	1,8
Pichia pastoris (NRRL Y-55)	CH ₃ OH	2,2
Pichia pastoris (NRRL Y-7556)	CH ₃ OH	1,6

^a Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, aufgebrochen, und die beim Zentrifugieren mit 10 000 g überstehende Flüssigkeit wurde für den Enzymtest verwendet.

Tabelle VIIIa
Oxydation von sec.-Alkoholen durch lösliche Rohextrakte von mit Methanol gezüchteten C₁-Verwertern

C ₁ -Verwerter-Mikroorganismen	Oxydationsgeschwindigkeit (nMol/min/mg Protein)			
	2-Propanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196)	2,0	2,4	0,1	0
Methylococcus capsulatus CRL M1 (NRRL B-11.219)	1,7	2,0	0,1	0
Methylobacterium organophilum CRL 26 (NRRL B-11.222)	2,1	2,5	0,1	0
Pseudomonas sp. (ATCC 21.439)	21,2	25,0	1,2	0

Tabelle IX
Stöchiometrie der Produktion von 2-Butanon aus 2-Butanol durch zellfreie Extrakte des Stammes ATCC 21.439

Versuch	2-Butanol verbraucht (nMol)	NAD verbraucht ^b (nMol)	2-Butanon ^a verbraucht (nMol)
1	260	270	250
2	530	540	520

Die Reaktionsgemische, 3 ml (1,0 mg Protein), wurden bei 30 °C 10 min (Versuch 1) und 20 min (Versuch 2) in Gegenwart von 1,0 µMol NAD und 10 µMol 2-Butanol inkubiert.

^a Gaschromatographisch bestimmt.

^b Fluoreszenzspektrophotometrisch bestimmt. Endogener Verbrauch von NAD wurde korrigiert.

Reinigung und Eigenschaften von sec.-Alkohol-Dehydrogenase

sec.-Alkohol-Dehydrogenase (SADH) aus einem obligaten Methanol-Verwerter, *Pseudomonas* sp. ATCC 21.439, wurde wie folgt gereinigt: Die Zellen, die mit Methanol als Kohlenstoffquelle gezüchtet worden waren, wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben, wurden in 300 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, mit 0,5 mMol Dithiothreitol (Puffer A) suspendiert und durch Schallbehandlung (5 × 1 min) aufgebrochen. Der Rohextrakt wurde durch Zentrifugieren abgetrennt. Er wurde 10 min in einem Wasserbad bei 50 °C wärmebehandelt. Der erhaltene Niederschlag wurde abzentrifugiert. Der überstehenden Lösung wurden 25 ml Protaminsulfatlösung (2%ige Lösung in 0,1 M Tris-Base) unter ständigem Rühren zugegeben. Nach 30 min Stehen wurde der Extrakt zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde mit festem Ammoniumsulfat fraktioniert. Das zwischen 30 und 60% Sättigung ausfallende Material wurde gesammelt und über Nacht gegen Puffer A dialysiert. Das dialysierte Mate-

rial wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (3 × 35 cm) aufgebracht, die mit Puffer A ins Gleichgewicht gebracht worden war. Die sec.-Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität wurde im Leervolumen eluiert. Dieses DEAE-Cellulose-Eluat wurde durch Ammoniumsulfatfraktionierung konzentriert. Das sich zwischen 30 und 50% Ammoniumsulfat-Sättigung ausscheidende Material wurde durch Zentrifugieren gesammelt und über Nacht gegen A dialysiert. Diese Fraktion wurde weiter gewaschen und durch eine Amicon-Einheit mit XM-50-Membran filtriert. Die konzentrierte Fraktion (6 ml) in der Amicon-Einheit wurde auf eine Affi-Gel Blue-Säule (0,8 × 18 cm) aufgebracht, die mit Puffer A zur Affinitätschromatographie ins Gleichgewicht gebracht worden war. Die Säule wurde über Nacht mit Puffer A (0,18 ml/min) gewaschen und dann mit Puffer A mit 5 mMol NAD eluiert. Jede 1-ml-Fraktion wurde aufgefangen. Die SADH-Aktivität wurde in den Röhren 8 bis 12 lokalisiert. Eine Zusammenfassung der Reinigungsschritte ist in Tabelle X wiedergegeben.

Tabelle X
Reinigung von sec.-Alkohol-Dehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. ATCC 21.439

Massnahmen	Volumen (ml)	Protein (mg)	Sp. Aktivität (Einheiten/mg Protein)	Einheiten insgesamt	Ausbeute (%)
Rohextrakt	250	2698	25	67450	100
Wärmebehandlung	245	949	67,5	64080	95
Protaminsulfat	260	526	103,8	54640	81
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30–60% Sättigung)	30	232	200	46450	69
DEAE-Cellulose-Säule	150	42,2	875	37160	55
Amicon-Filtration (XM-50)	6	22,0	1500	33050	49
Affi-Gel Blue-Säule	5	0,34	65600	22300	33

Das gereinigte sec.-Alkohol-Dehydrogenase-Enzym (SADH) kann direkt zur Umwandlung von C₃–C₆-sec.-Alkoholen in die entsprechenden Methylketone nach den oben beschriebenen Arbeitsweisen verwendet werden; dem Reaktionsmedium muss jedoch eine Quelle für NAD⁺ zugesetzt werden. Man kann die an NAD gebundene sec.-Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität mit einem Fluoreszenzspektrophotometer (Perkin Elmer, Modell MPF 44A) durch Verfolgen der Bildung von reduziertem NAD (Ex 340 nm, Em 460 nm) bestimmen. Das Probensystem (3 ml) enthält typischerweise Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, 150 µMol; NAD 1,0 µMol; eine gegebene Menge Enzympräparat und 20 µMol sec.-Alkohol. Die Reaktion wird durch Zusatz von sec.-Alkohol gestartet. Eine Einheit der SADH-Enzymaktivität entspricht der Reduktion von 1 nMol NAD pro min.

Die in Tabelle X angeführte Arbeitsweise zur Reinigung kann dadurch abgewandelt werden, dass man die Wärmebehandlung weglässt. Eine höhere spezifische Aktivität kann

durch Weglassen der Wärmebehandlung erreicht werden (eine spezifische Aktivität von 45 Einheiten SADH/mg Protein aus *Pseudomonas* sp. ATCC 21.439 wurde erhalten). Die Gegenwart eines Reduktionsmittels, wie Dithiothreitol, im Dialysepuffer hat sich als während der Dialyse des zwischen 30 und 60% (NH₄)₂SO₄-Sättigung ausgefällten Materials wesentlich erwiesen. Bei einem speziellen Experiment wurde die Affi-Gel-Blue-Säule auf eine Grösse von 2,5 × 25 cm erhöht. Aus 10 l Rohextrakt mit 200 g Protein wurde eine reine 45-mg-SADH-Fraktion mit einer spezifischen Aktivität von 65.600 SADH-Einheiten/mg Protein (33% Rückgewinnung) erhalten.

Eine Metallanalyse der gereinigten SADH-Enzyme wurde nach der Röntgenstrahlenfluoreszenztechnik mit einem halb-automatischen Vakuumspektrographen (Phillips PW 1220C) durchgeführt. Dabei wurde das gereinigte SADH zuerst gründlich mit entionisiertem, destilliertem Wasser gewaschen und dann gleichmässig auf einer Amicon-XM-50-Ultrafiltra-

tionsmembran getrocknet. Diese Membran wurde dann mit der Röntgenstrahlenfluoreszenztechnik geprüft. Kontrollversuche erfolgen mit Ultrafiltrationsmembranen als Blindprobe. Die Mindestmenge an qualitativ und quantitativ nachweisbarem Metall nach dieser Methode sind $>0,02 \mu\text{g}$ bzw. $>0,5/\text{cm}^2$. Metallanalysen an den gereinigten, von Bakterien stammenden SADH-Enzymen nach dieser Technik zeigten $0,7 \mu\text{g}$ Zink/ cm^2 der Ultrafiltrationsmembran. Dies entspricht 2 Mol Zink pro Mol SADH-Enzym oder 1 Zink pro Untereinheit. Kein weiteres Metall wurde festgestellt.

Das Molekulargewicht des gereinigten SADH wurde durch Acrylamidgelelektrophorese unter Verwendung von 7,5% Gel und eingefärbt sowohl mit Coomassie-Brilliantblau als auch mit Nitroblau-tetrazolium-Aktivitätsfarbe bestimmt. Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese in einem 10% Gel-system und die Dissoziation des Enzymproteins erfolgten unter Verwendung von SDS-PAGE-Standards. Sowohl der Proteinfleck als auch der Enzymaktivitätsfleck der getesteten gereinigten SADH-Enzyme zeigte eine einzige Proteinbande. Die Beweglichkeit des SADH aus den verschiedenen Arten mit Methanol gezüchteter Bakterienzellen bei der Gelelektrophorese war identisch. Aus Hefe stammendes SADH hatte eine grössere Beweglichkeit zur Anode bei der Gelelektrophorese. Die Molekulargewichte verschiedener aus Bakterien und Hefen stammender und gereinigter SADH-Enzyme hatten jeweils ein identisches Molekulargewicht von 95.000 Dalton, festgestellt mit einer Biogelagarose A-1,5-Säule. SDS-Gelelektrophorese der gereinigten Enzyme zeigte zwei identische Untereinheiten von 48.000 Dalton.

Die für die Aktivität des gereinigten SADH optimalen Werte von pH und Temperatur waren 8 bis 9 bzw. 30 bis 35°C , wenngleich grössere Bereiche des pH und der Temperatur die Enzymaktivität nicht wesentlich beeinflussten. Die Aktivierungsenergie für SADH, berechnet nach der Arrheniusschen Darstellung der Geschwindigkeit gegen den Reziprokwert der absoluten Temperatur, beträgt 19,8 kcal. Das Absorptionsspektrum der gereinigten SADH-Fraktion zeigte keinen Peak im sichtbaren Bereich.

Die Michaelis-Konstanten (K_m) des SADH, berechnet aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm, war $1,1 \times 10^{-5} \text{ m}$ für NAD. Ähnliche Reaktionsgeschwindigkeiten wurden erhalten, ob nun SADH entweder mit NAD oder mit 2-Butanol 10 min vorinkubiert wurde. Dies zeigt an, dass die Zugabe von Substraten zur SADH-Reaktion nicht eine zwangsläufige Reihenfolge ist, sondern vielmehr ein statistischer oder Zufallsmechanismus. Während der Reaktion wurde kein Verbrauch an gelöstem Sauerstoff beobachtet.

Der Einfluss mit Metallen Chelate bildender Mittel und Thioreagentien auf die Aktivität des gereinigten SADH-Enzyms wurde untersucht. Die SADH-Aktivität wurde wie folgt inhibiert (% Hemmung, Aktivität spektrofluorometrisch gemessen und jeder Inhibitor mit einer Endkonzentration von 1 mMol zugesetzt): Jodessigsäure, 0%; N-Äthylmaleimid, 6%; p-Hydroxymercuribenzoat, 100%; 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), 100%; Natriumcyanid, 0%; Natriumazid, 10%; ÄDTA, 63%; 1,10-Phenanthrolin, 95%; α, α -Bipyridyl, 70%; Thioharnstoff, 0%; Kupfer(II), 25%; Eisen(III), 35%; Eisen(II), 50%; Nickel, 20% und Zn^{++} , Co^{++} , Mn^{++} oder Mg^{++} , 0%. Trotz der Tatsache, dass SADH 2 Mol Zink pro Mol Enzym enthält, regte die Zugabe von von aussen zugeführtem Zink die Aktivität nicht an. Die Möglichkeit der Hemmung durch Äthanol oder n-Propanol wurde untersucht. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit beim Konkurrieren mit 2-Butanol für die Alkylbindungsstelle(n), hemmen beide die SADH-Aktivität nicht.

Die Substratspezifität gereinigter SADH war für 2-Propanol und 2-Butanol am höchsten. Es oxydierte auch mit geringerer Geschwindigkeit 2-Pentanol, 2-Hexanol, Acetal-

dehyd, Propanol, Cyclohexanol, Butan-1,3-diol und Butan-2,3-diol. Primäre Alkohole waren keine Substrate für gereinigtes SADH. Für die Enzymaktivität scheint ein hydrophober Kohlenstoffrest nahe dem sekundären Alkohol erforderlich zu sein.

Das gereinigte SADH-Enzym wurde auf Aminosäuren mit einem Aminosäureanalysator (Beckman Modell 120B) nach Säurehydrolyse des Enzyms analysiert. Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse sind in Tabelle XI zusammengefasst. Die Werte sind als Durchschnittszahl der Reste pro Molekül, erhalten aus 24-, 48- und 72stündiger Säurehydrolyse, ausgedrückt unter der Annahme eines Molekulargewichts von 95.000. Nur zwei Cysteinreste wurden festgestellt.

Tabelle XI
Aminosäurezusammensetzung von gereinigter SADH ^a

Aminosäure	Zahl der Reste/95 000 Dalton
Lysin	52
Histidin	14
Arginin	26
Cysteinsäure	2
Asparaginsäure	78
Threonin	26
Serin	14
Glutamin	76
Prolin	32
Glycin	72
Alanin	92
Valin	68
Methionin	6
Isoleucin	54
Leucin	74
Tyrosin	6
Phenylalanin	28
Tryptophan	28

^a Das sec.-Alkohol-Dehydrogenase-Enzym wurde aus der *Pseudomonas* sp. ATCC 21.439, aerob mit Methanol gezüchtet, stammenden Zellen gereinigt.

Aus Hefe stammende SADH

Wie zuvor angegeben, überführen sowohl Zellsuspensionen als auch zellfreie Extrakte von mit C_1 -Verbindungen gezüchteten Hefen enzymatisch C_3 - C_6 -sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone. Ferner wurde speziell gefunden, dass Zellsuspensionen der Hefen *Candida utilis* ATCC 26.387; *Hansenula polymorpha* ATCC 26.012; *Pichia* sp. NRRL Y-11.328; *Torulopsis* sp. Stamm A; NRRL Y-11.419 und *Kloeckera* sp. Stamm A; NRRL Y-11.420, mit verschiedenen C_1 -Verbindungen (z.B. Methanol, Methylamin, Methylformiat), Äthanol und Propylamin gezüchtet, die Oxydation von C_3 - C_6 -sec.-Alkoholen zu den entsprechenden Methylketonen katalysierten.

Die Zellen wurden während des exponentiellen Wachstums durch 15minütiges Zentrifugieren mit 12 000 g geerntet. Der Zellkuchen wurde zweimal mit 50 mMol Phosphatpuffer, pH 7, gewaschen. Der endgültige Kuchen wurde im gleichen Puffer erneut suspendiert. Zellsuspensionen von mit Äthanol, Methylamin und Methylformiat gezüchteten Hefen wurden, wie oben beschrieben, unter Verwendung von 0,4 Vol./Vol. Äthanol, 10 mMol Methylamin und 10 mMol Methylformiat als einziger Quelle für Kohlenstoff und Energie hergestellt.

Eine 1-ml-Menge jeder gewaschenen Zellsuspension von mit verschiedenen Kohlenstoffquellen gezüchteten Hefen wurde in 10-ml-Röhrchen bei 40°C gebracht. 10 μl sec.-Alko-

hol (2-Propanol, 2-Butanol, 2-Pentanol und 2-Hexanol) wurden in einem unabhängigen Röhrchen den Zellsuspensionen zugesetzt. Die Röhrchen wurden bei 30 °C auf einem rotierenden Wasserbadschüttler bei 200 UpM inkubiert. Das Oxydationsprodukt sekundärer Alkohole wurde durch Vergleich gaschromatographischer Retentionszeiten und gleichzeitige Chromatographie mit authentischen Standardproben nachgewiesen. Wie in Tabelle XII gezeigt, katalysieren die Zellsuspensionen von Hefen die Umwandlung von Isopropanol, 2-Butanol, 2-Pentanol und 2-Hexanol in die entsprechenden Methylketone. Die Oxydationsprodukte der sec.-Alkohole sammelten sich extrazellulär an, und gaschromatographische Analyse zeigte keine weitere Oxydation der Produkte (Methylketone). Ähnliche Umwandlungen von 2-Butanol in 2-Butanon erfolgten mit Zellsuspensionen der Hefen *Candida boidinii* NRRL Y-2332; *Hansenula anomala* NRRL Y-336; und *Pichia pastoris* NRRL Y-55. Die Umwandlungsgeschwindigkeiten ($\mu\text{Mol/h/mg Protein}$) waren 6,0, 5,5 bzw. 5,8.

Zellfreie Extrakte dieser Hefen katalysierten die NAD^+ -abhängige Oxydation der C_3 - C_6 -sec.-Alkohole zu den entsprechenden Methylketonen. Die Gegenwart von NAD^+ als Elektronenakzeptor war wesentlich im Falle des zellfreien Extrakts dieser aus Hefe stammenden Enzyme. Primäre Alkohole wurden durch dieses gereinigte Enzym nicht oxydiert. Das Molekulargewicht des gereinigten, aus Hefe stammenden SADH-Enzyms war 98.000 Dalton, bestimmt durch Gelfiltration, und die Grösse der Untereinheit war nach der Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese 48.000.

Zu bemerken ist, dass das Molekulargewicht des gereinig-

ten SADH etwa $95\,000 \pm 3000$ (nach der Biogel-Säulenchromatographie) ist, ob aus Hefe oder Bakterien stammend, aber aufgrund von Reinigungsarbeiten und Versuchsfehlern variieren kann.

Die Aktivität des gereinigten, aus Hefe stammenden SADH wurde durch Sulphydryl-Inhibitoren und metallbindende Mittel gehemmt. Der optimale pH des gereinigten Enzyms wurde zu etwa 8 bestimmt.

Ein typisches, aus Hefe stammendes SADH-Enzym wurde wie folgt hergestellt:

Die Hefen wurden bei 30 °C in einem 2,8-l-Kolben mit 700 ml Mineralsalzmedium (später beschrieben) mit 0,1% Hefeextrakten und 0,4 Vol./Vol.-% Methanol gezüchtet.

Hefe-Wachstumsmedium ^a

KH_2PO_4	2,50 g
NH_4NO_3	2,50 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,30 g
KCl	0,04 g
CaCl_2	0,015 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,00 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg
H_3BO_3	0,02 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04 mg
ZnSO_4	0,14 mg
MoO_3	0,02 mg
Hefeextrakt	1,00 g
Methanol	4,00 ml

^a Die Zusammensetzung gilt für 1 l.

Tabelle XII
Oxydation von sec.-Alkoholen zu Ketonen durch Zellsuspensionen von Hefen ^a

Organismus	Wachstumssubstrat	Umwandlungsgeschwindigkeit ($\mu\text{Mol/h/mg Protein}$)			
		Isopropanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
<i>Candida utilis</i> ATCC 26387	Methanol	6,2	6,8	1,5	0,80
	Äthanol	5,2	5,2	1,0	0,72
	Methylamin	5,0	5,0	1,2	0,61
	Methylformiat	5,6	6,2	1,3	0,75
	Propylamin	4,2	4,2	0,9	0,52
<i>Hansenula polymorpha</i> ATCC 26012	Methanol	5,9	5,8	1,4	0,72
	Äthanol	5,0	4,8	1,1	0,54
	Methylamin	5,2	4,5	1,2	0,62
	Methylformiat	5,6	5,2	1,3	0,70
	Propylamin	4,1	4,0	0,82	0,48
<i>Pichia sp.</i> NRRL-Y-11328	Methanol	5,2	6,8	1,2	0,50
	Äthanol	4,5	6,2	1,0	0,28
	Methylamin	4,2	5,1	0,72	0,31
	Methylformiat	4,9	6,9	0,98	0,48
	Propylamin	3,2	2,1	0,60	0,21
<i>Torulopsis sp.</i> Stamm A ₁ (NRRL-Y-11.419)	Methanol	4,5	4,9	1,0	0,21
	Äthanol	4,2	4,7	1,2	0,20
	Methylamin	4,3	4,5	0,9	0,12
	Methylformiat	4,5	4,9	1,1	0,25
	Propylamin	3,2	3,8	0,62	0,10
<i>Kloeckera sp.</i> Stamm A ₂ (NRRL-Y-11.420)	Methanol	4,8	5,9	1,2	0,25
	Äthanol	4,5	5,7	1,0	0,12
	Methylamin	4,0	5,4	1,0	0,10
	Methylformiat	4,9	5,9	1,2	0,28
	Propylamin	4,0	4,2	0,92	0,11

^a Die Oxydationsprodukte wurden durch Vergleich der gaschromatographischen Retentionszeit und durch gemeinsame Chromatographie mit authentischen Standardproben identifiziert. Die Analyse zeigte auch, dass keine weitere Oxydation der Produkte (Methylketone) erfolgte.

Zellsuspensionen (2 g Nassgewicht) gepackter Zellen in 10 ml 50 mMol Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, bei 4 °C wurden durch Schallbehandlung mit einer Megason-Ultraschallzerstörung aufgebrochen. Die schallbehandelten Zellsuspensionen wurden 15 min bei 30 000 g zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde als Rohextrakt bezeichnet.

Reinigung von aus Hefe stammender sec.-Alkohol-Dehydrogenase

Grosse Kulturen von *Pichia* sp. NRRL Y-11.328 wurden unter Belüftung bei 30 °C in einem 14-l-New Brunswick f-Fermentator in einem Mineralsalzmedium mit Methanol (0,4 Vol./Vol.-%) als einziger Kohlenstoffquelle gezüchtet. Die Zellen (200 g Nassgewicht) wurden in 50 mMol Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, mit 1 mMol Dithiothreitol (Puffer A) suspendiert, und Rohextrakte wurden hergestellt, wie zuvor beschrieben. Die Rohextrakte wurden mit 18 ml Protaminsulfatlösung (2%ige Lösung in 0,1 m Tris(hydroxymethyl)aminomethan, (Tris)-Base) unter kontinuierlichem Rühren tropfenweise versetzt. Nach 30minütigem Stehen wurden die Extrakte 60 min bei 20 000 g zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde mit festem Ammoniumsulfat fraktioniert. Die Extrakte wurden auf 50% Sättigung Ammoniumsulfat durch Zusatz von 313 g des Salzes pro l Extrakt gebracht. Ausgefällte Proteine wurden abzentrifugiert, und 137 g Ammoniumsulfat wurden pro l der überstehenden Flüssigkeit zugesetzt, um sie auf 70% Sättigung zu bringen. Zwischen 50 und 70% Sättigung ausgefälltes Material wurde durch Zentrifugieren gesammelt und in Puffer A gelöst. Dieses Präparat wurde über Nacht gegen Puffer A dialysiert, und das dialysierte Material wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (5 × 40 cm) aufgebracht, die mit Puffer A ins Gleichgewicht gebracht worden war. Die Probe wurde mit 200 ml Puffer A gewaschen und mit 2 l Puffer A eluiert, die NaCl mit linearem Gradienten von einer Konzentration von 0 bis 0,5 m enthielten. 15-ml-Fractionen wurden aufgefangen. Fractionen mit sec.-Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität wurden gesammelt und als DEAE-Cellulose-Eluat bezeichnet. Das DEAE-Cellulose-Eluat wurde durch Ammoniumsulfatfraktionierung konzentriert. Zwischen 50 und 70% Ammoniumsulfatsättigung ausfallendes Material wurde durch Zentrifugieren gesammelt und in Puffer A gelöst. Dieses Präparat wurde über Nacht gegen Puffer A dialysiert, und 4-ml-Proben wurden durch eine Biogel-Agarose A-1,5-Säule (2,5 × 100 cm) geführt, die mit Puffer A ins Gleichgewicht gebracht worden war. Fractionen mit konstanter spezifischer Aktivität des Enzyms wurden vereinigt und durch Amicon-Ultrafiltration unter Verwendung eines XM-50-Filters konzentriert.

Das Reaktionsgemisch, insgesamt in 3,0 ml, enthielt 50 mMol Phosphatpuffer, pH 7,0, 20 µMol NAD⁺, Zellextrakte (1 ml). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 Mol sec.-Alkohol (Isopropanol, 2-Butanol, 2-Pentanol, 2-Hexanol) gestartet und die Produktionsgeschwindigkeit von Methylketonen (Aceton, 2-Butanon, 2-Pentanon, 2-Hexanon) wurde gaschromatographisch gemessen.

Das aus der Oxydation von sec.-Alkoholen durch Zellextrakte von Organismen erhaltene Ketonprodukt wurde durch 10 Flammenionisations-Gaschromatographie unter Verwendung einer rostfreien Stahlsäule (3,65 m × 3,2 mm bzw. 12 Fuss × 1/8 Zoll), gepackt mit 10% Carbowax 20M auf 80/100 Chromosorb W (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Conn.) ermittelt. Die Säulentemperatur wurde isotherm bei 130 °C gehalten, der Trägergasstrom war 30 ml Helium/min. Die verschiedenen Ketonprodukte (Aceton, 2-Butanon, 2-Pentanon, 2-Hexanon) wurden durch Vergleich der Retentionszeiten und gleichzeitige Chromatographie mit authentischen Standardproben identifiziert. Der Proteingehalt der Zellsuspensionen wurde nach der Methode von Lowry et al. bestimmt.

Die sec.-Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität wurde spektrophotometrisch bei 340 nm mit einem NAD⁺ als Elektronenakzeptor gemessen. Das Reaktionsgemisch in insgesamt 3,0 ml enthielt 50 mMol Phosphatpuffer, pH 8,0, 5 µMol 25 NAD⁺, Rohextrakte, und Substrat. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 100 µl 0,1 m Substrat gestartet und die Geschwindigkeit der NAD⁺-Reduktion wurde gemessen. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry et al. bestimmt.

30 Zellfreie Extrakte, die aus Hefen, *Candida utilis* ATCC 26.387, *Hansenula polymorpha* ATCC 26.012, *Pichia* sp. NRRL Y-11.328, *Torulopsis* sp. Stamm A₁ NRRL Y-11.419 und *Kloeckera* sp. Stamm A₂ NRRL Y-11.420, mit Methanol gezüchtet, stammten, katalysierten eine NAD⁺-abhängige 35 Oxydation von sec.-Alkoholen (Isopropanol, 2-Butanol, 2-Pentanol, 2-Hexanol) zu den entsprechenden Methylketonen (Aceton, 2-Butanon, 2-Pentanon, 2-Hexanon). Die Geschwindigkeit der Produktion von Methylketonen aus sec.-Alkoholen ist in Tabelle XIII wiedergegeben. Oxydation 40 von sec.-Alkoholen wurde auch spektrophotometrisch durch Messen der Reduktion von NAD⁺ abgeschätzt. Die spezifischen Aktivitäten (nMol reduzierten NAD⁺/min/mg Protein) von 78, 85, 105, 62 bzw. 90 wurden mit Extrakten aus *Candida utilis* ATCC 26.387, *Hansenula polymorpha* ATCC 26.012, *Pichia* sp. NRRL Y-11.328, *Torulopsis* sp. NRRL Y-11.419, Stamm A₁ bzw. *Kloeckera* sp., Stamm A₂ NRRL Y-11.420 unter Verwendung von 2-Butanol als Substrat erhalten.

Tabelle XIII
Oxydation von sec.-Alkoholen zu Methylketon durch Zellextrakte von Hefen

Organismus	Umwandlungsgeschwindigkeit ^a , µMol/h/mg Protein			
	Isopropanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
<i>Candida utilis</i> ATCC 26.387	4,5	4,92	0,82	0,45
<i>Hansenula polymorpha</i> ATCC 26.012	4,8	5,2	1,0	0,51
<i>Pichia</i> sp. NRRL-Y-11.328	5,5	6,2	1,2	0,60
<i>Torulopsis</i> sp. Stamm A ₁ NRRL-Y-11.419	4,5	4,9	1,0	0,21
<i>Kloeckera</i> sp. Stamm A ₂ NRRL-Y-11.420	4,8	5,9	1,2	0,25

^a Die Reaktionen wurden durchgeführt, wie oben beschrieben. Die Oxydationsprodukte der sec.-Alkohole wurden gaschromatographisch identifiziert und bestimmt.

Das SADH-Enzym wurde aus einer DEAE-Cellulosesäule bei 0,08 m NaCl-Konzentration eluiert. Die insgesamt 60fache Reinigung wurde aus Rohextrakten erreicht. Die Reinheit des Enzympräparats wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese geprüft. Die gereinigten Enzympräparate wanderten als einzelne Proteinbande bei der Elektrophorese auf Polyacrylamidgel. Tabelle XIV gibt eine Zusammenfassung der Reinigungsschritte und eine Analyse der Produkte am Ende jeder Stufe wieder.

Die Substratspezifität der gereinigten sec.-Alkohol-Dehydrogenase wurde spektrophotometrisch geprüft. Unter verschiedenen getesteten sec.-Alkoholen katalysierte das Enzym die Oxydation von Isopropanol, 2-Butanol, 2-Pentanol und 2-Hexanol.

2-Heptanol, 2-Octanol, Methanol, Äthanol, Propan-1-ol, Butan-1-ol, Pentan-1-ol, 1,2-Propandiol, 1,2-Butandiol und

1,3-Butandiol wurden durch das gereinigte Enzym nicht oxidiert.

Das gereinigte Enzym brauchte NAD⁺ als Elektronenakzeptor. NADP, Phenazinmethosulfat, Kaliumferricyanid, 5 Cytochrom, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Flavin-adenin-dinucleotid konnten nicht als Elektronenträger wirken.

Verschiedene, durch sec.-Alkohol-Dehydrogenase nicht oxidierte primäre Alkohole wurden als potentielle Inhibitoren der Enzymaktivität untersucht. Die Enzymaktivität wurde 10 nicht durch primäre Alkohole bei 10⁻³ m gehemmt. Von verschiedenen untersuchten Sulfhydryl-Inhibitoren und metallbindenden Verbindungen wirkten p-Hydroxymercuribenzoat, Glutathion, Imidazol und 1,10-Phenanthrolin stark hemmend auf die sec.-Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität. Die Enzym- 15 Aktivität wurde auch durch Schwermetalle, wie Silbernitrat, Quecksilber(II)-thiocyanat und Kupfer(II)sulfat, gehemmt.

Tabelle XIV
Reinigung von sec.-Alkohol-Dehydrogenase aus *Pichia* sp. NRRL Y-11.328^a

Stufe	Volumen (ml)	Protein (mg)	Einheiten	Sp. Aktivität (Einheiten/mg Protein)	Ausbeute (%)
1. Rohextrakte	875	21.875	2391375	109	100
2. Protaminsulfat-Behandlung	890	21.360	2370960	111	99
3. Ammoniumsulfat-Fraktionierung (50–70% Sättigung)	117	3.090	1820010	589	76
4. DEAE-Cellulose-Eluat	55	200	706800	3534	29
5. Biogelchromatographie	19	52	312624	6012	13

^a Die sec.-Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität wurde spektrophotometrisch ermittelt, wie oben beschrieben, unter Verwendung von 2-Butanol als Substrat. Die spezifische Aktivität wurde als nMol an reduziertem NAD⁺/min/mg Protein ausgedrückt.

Aceton und 2-Butanon wurden als Produkt der Oxydation von Isopropanol bzw. 2-Butanol durch das gereinigte Enzym nachgewiesen. Die Menge an reduziertem NAD⁺ und gebildetem Produkt steht im Einklang mit der quantitativen Oxydation beider Substrate. Diese Ergebnisse sind in Tabelle XV wiedergegeben.

Tabelle XV
Stöchiometrie der Oxydation von Isopropanol und sec.-Butanol durch die gereinigte sec.-Alkohol-Dehydrogenase

Substrat (μMol)	NAD ⁺ reduziert ^a (μMol)		gebildetes Produkt ^b (μMol)	
Isopropanol	5,7	5,4	Aceton	5,5
2-Butanol	6,0	5,9	2-Butanon	5,7

^a Die Ermittlung des reduzierten NAD⁺ erfolgte durch spektrophotometrische Messung bei 340 nm.

^b Die Ermittlung der Produkte erfolgte gaschromatographisch, wie bei den Verfahren beschrieben.

Das Alkan-Oxydationssystem

45 Sowohl Zellsuspensionen (Teilchenfraktion) als auch zellfreie Teilchenfraktionen von mit Methan gezüchteten methylo- tropen Mikroorganismen vermögen die Umwandlung von C₃–C₆-n-Alkanen in die entsprechenden Alkohole, ein- 50 schliesslich sec.-Alkohole zu katalysieren. Die Bedingungen für die Herstellung der Zellsuspensionen oder die zellfreien Teilchenfraktionen aus mit Methan gezüchteter methylo- tropen Mikroorganismen sind die gleichen wie oben beschrie- ben. Die zellfreie Teilchenfraktion erfordert die Anwesenheit von Sauerstoff und NADH als Elektronendonator. Die 55 Umwandlung des Alkohols wurde durch metallbindende Mit- tel gehemmt, was die Beteiligung von Metallion(en) bei der Umwandlung der Alkane in sekundäre Alkohole vermuten lässt. Propylen erwies sich auch als die Umwandlung hem- mend, was vermuten lässt, dass das Propylen und das n- 60 Alkan (z.B. Propan) um dasselbe bzw. dieselben Enzymsys- teme konkurrieren. Ascorbat und reduziertes Nicotinamid- adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) könnten auch als Elektronendonator anstelle von NADH für die Umwandlung verwendet werden. Die Tabellen XVI und XVII zeigen die 65 Umwandlung von C₃–C₆-n-Alkanen zu den entsprechenden sekundären Alkoholen unter Verwendung von Zellsuspensio- nen bzw. zellfreien Teilchenfraktionen von mit Methan gezüchteten methylo- tropen Mikroorganismen.

Tabelle XVI
Umwandlung von n-Alkanen in sec.-Alkohole durch Mikroorganismen ^a

Mikroorganismus	Wachstumssubstrat	Umwandlungsgeschwindigkeit (μMol/h/5 mg Protein)			
		n-Propan → 2-Propanol	n-Butan → 2-Butanol	n-Pentan → 2-Pentanol	n-Hexan → 2-Hexanol
Methylosinus trichosporium (OB3b, NRRL-B-11.196)	Methan	2,5	1,5	0,06	0,01
Methylococcus capsulatus (Texas, ATCC 19.069)	Methan	1,1	1,0	0,032	0,01
Methylobacter capsulatus (Y, NRRL-B-11.201)	Methan	0,20	0,09	–	–
Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL-B-11.202)	Methan	2,1	1,2	–	–
Methylobacterium sp. (CRL-26, NRRL-B-11.208)	Methan	1,4	0,80	0,01	0,007
Methylomonas sp. (CRL-17, NRRL-B-11.209)	Methan	1,6	1,2	–	–

^a Die Produkt-sec.-Alkohole wurden durch Vergleich der gaschromatographischen Retentionszeit und gleichzeitig Chromatographie mit authentischen Standardproben identifiziert und ermittelt.

Tabelle XVII
Hydroxylierung von n-Alkanen zu sec.-Alkoholen durch die P(40) ^a-Teilchenfraktion von Methylo-trophen

Organismen	Umwandlungsgeschwindigkeit (μMol/h/2,0 mg Protein)	
	n-Propan → 2-Propanol	n-Butan → 2-Butanol
Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL-B-11.202)	1,5	0,89
Methylococcus capsulatus (Texas, ATCC 19.069)	1,2	0,92
Methylosinus trichosporium (OB3b, NRRL-B-11.196)	1,32	0,79
Methylobacterium sp. (CRL-26, NRRL-B-11.222)	1,0	0,61

^a Die P(40)-Teilchenfraktion wurde wie folgt hergestellt: Zellsuspensionen bei 4 °C wurden durch eine Französische Druckzelle zerstört und 15 min bei 4000 g zentrifugiert, um nicht-aufgebrochene Bakterien zu entfernen. Die überstehende Lösung wurde dann 30 min bei 4 °C mit 40 000 g zentrifugiert, was die Teilchenfraktionen P(40) und die lösliche Fraktion S(40) lieferte. Die Produkte wurden gaschromatographisch und durch gleichzeitige Chromatographie mit authentischen Standardproben identifiziert.

Die Tabelle XVIII zeigt, dass die Zellsuspensionen von mit Methan gezüchteten methylo-trophen Mikroorganismen C₁-C₂-Alkane in die entsprechenden Alkohole überführen und Propan und Butan in eine Vielzahl von Oxydationsprodukten überführt werden, darunter primäre und sekundäre Alkohole, Methylketone und Aldehyde.

Tabelle XVIII
Umwandlung von n-Alkanen in Oxydationsprodukte ^a

Substrat	Produkte	Umwandlungsgeschwindigkeit (μMol/h/mg Protein)	
		Methylosinus trichosporium OB3b NRRL B-11.196	Methylococcus capsulatus CRL M1 NRRL B-11.219
Methan	Methanol	1,5	2,5
Äthan	Äthanol	1,3	2,0
Propan	1-Propanol	0,4	0,5
Propan	2-Propanol	0,6	0,7
Propan	Aceton	0,2	0,3
Butan	1-Butanol	0,3	0,4
Butan	2-Butanol	0,4	0,5
Butan	2-Butanon	0,1	0,2
Butan	n-Butanol	0,1	0,2

^a Zellsuspensionen von mit Methan gezüchteten methylo-trophen Mikroorganismen in 0,15 m Phosphatpuffer, pH 7,0, inkubiert in den Alkanen, wie angegeben, bei 3 °C. Die Oxydationsprodukte wurden durch Gas-/Flüssigkeitschromatographie bestimmt.

⁴⁰ Leadbetter und Foster [Archiv für Mikrobiologie, 35, 92–104 (1960)] berichteten, dass mit Methan gezüchtete Pseudomonas methanica Propan und Butan gemeinsam zu ihren entsprechenden Methylketonen oxydierten. Sie stellten fest, dass ruhende Zellsuspensionen von mit Methan gezüchteten Zellen jedoch nicht Propan oder Butan oxydierten. Später berichteten Lukins und Foster [J. Bacteriol. 85, 1074 bis 1086 (1963)], dass mit Propan gezüchtete Mycobacterium smegmatis 422 n-Alkane zu ihren entsprechenden Methylketonen oxydierten. Nun wurde gefunden und gezeigt, dass ruhende Zellsuspensionen von mit Methan gezüchteten Zellen C₃-C₆-Alkane zu ihren entsprechenden sec.-Alkoholen und Methylketonen in Abwesenheit von Wachstumssubstraten oxydieren. Ausserdem wurde erstmals die Umwandlung von C₃-C₆-sec.-Alkoholen in ihre entsprechenden Methylketone durch ruhende Zellsuspensionen (Teilchenfraktion) von mit Alkan oder Alkohol gezüchteten Zellen nachgewiesen. Mit Succinat gezüchtete Zellen haben keine SADH-Aktivität, was nahelegt, dass entweder Alkan oder Alkohol zum Induzieren des Enzyms erforderlich ist.

⁶⁰ Wie oben gezeigt, oxydierten Zellsuspensionen dieser neuen Kulturen sowie bekannte C₁-Verwerter, entweder mit Methan oder mit Methanol gezüchtet, sekundäre Alkohole zu ihren entsprechenden Methylketonen. Die getesteten Kulturen wurden aus verschiedenen Gattungen ausgewählt und hinsichtlich ihrer optimalen Bedingungen bei der Produktion von 2-Butanon verglichen. Diese Kulturen waren Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196) (ein obligater Methan-Verwerter des Typs I); Methylobacterium organophilum CRL 26 (NRRL B-11.222) (ein fakultativer Methan-Ver-

werter); *Hansenula polymorpha* ATCC 26012; und *Pseudomonas* sp. ATCC 21439 (ein obligater Methanol-Verwerter). Die Geschwindigkeit der 2-Butanon-Produktion war für die ersten 4 Stunden Inkubation für alle fünf getesteten Kulturen linear. Die Hefekultur hatte die höchste Produktionsgeschwindigkeit. Die Optimaltemperatur für die Produktion von 2-Butanon war 35 °C für alle getesteten Bakterien. Die Hefekultur hatte ein höheres Temperaturoptimum (40 °C), und eine sinnvoll hohe 2-Butanon-Produktionsgeschwindigkeit wurde für diese Hefe auch bei 45 °C beobachtet. Die Produktion von 2-Butanon wurde durch die Substratkonzentration und die Zellkonzentration beeinflusst. Die Hemmung der Produktion von 2-Butanon durch mit Metall Chelate bildende Mittel lässt die Beteiligung von Metall(en) vermuten. Keine Produkt(2-Butanon)-Hemmung wurde in irgendeiner der Zellsuspensionen aus allen fünf getesteten Kulturen beobachtet.

Nun wurde gefunden, dass zellfreie lösliche Extrakte aus durch Schall aufgebrochenen Zellen auch 2-Butanol zu 2-Butanon oxydieren. Das zellfreie System erfordert den Zusatz eines Cofaktors, insbesondere NAD, für seine Aktivität. Eine der Erklärungen für die Abnahme der Geschwindigkeit der 2-Butanon-Produktion nach 4 h Inkubation mag daher in der Erschöpfung von NAD in den Zellsuspensionen liegen.

Es stellte sich heraus, dass Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) eine Voraussetzung für die Oxydation von C₃-C₆-sec.-Alkoholen in dem zellfreien SADH-System war. Andere getestete Cofaktoren (einschliesslich PMS, GSH, FAD, Kaliumferricyanid, Dichlorphenolindophenol und NADP) waren unwirksam.

Das Molekulargewicht des reinen SADH, ermittelt durch eine Biogelagarose A-1,5-Säule, ist 95 000 Dalton. Acrylamid-gelelektrophorese der gereinigten SADH-Fraktion aus der Affinitätschromatographie zeigte eine einzige Proteinbande. Die Km-Werte für 2-Butanol und NAD sind 0,25 mM bzw. 0,011 mM. Das pH-Optimum für die SADH-Aktivität lag um 8 bis 9 (0,05 m Natriumphosphatpuffer für pH 5-8; 0,05 m Natriumpyrophosphatpuffer für pH 8-11).

SADH oxydiert C₃-C₆-sec.-Alkohole mit den folgenden relativen Prozentsätzen: 2-Propanol (85%), 2-Butanol (100%), 2-Pentanol (5%), 2-Hexanol (2%), Acetaldehyd (4%), Propanal (2%), Cyclohexanol (4%), Butan-1,3-diol (2%) und Butan-2,3-diol (2,5%). Die folgenden untersuchten Verbindungen wurden durch SADH nicht oxydiert: 2-Heptanol bis 2-Decanol, Formaldehyd, Butanol bis Decanal, Benzaldehyd, Methanol bis n-Decanol, Isobutanol, Phenol, Butan-1,2-diol und Bernsteinsäure. Es scheint, dass ein hydrophober Koh-

lenstoffrest nahe dem sekundären Alkohol für die Enzymaktivität notwendig ist.

Die SADH-Aktivität wurde durch mit Metall Chelate bildende Mittel in folgender Folge (% Hemmung) gehemmt: 1,10-Phenanthrolin (95%), α,α -Bipyridyl (70%), EDTA (63%) und Natriumazid (10%). Dies lässt eine mögliche Metallbeteiligung vermuten. Die Aktivität wurde jedoch nicht durch Natriumcyanid oder Thioharnstoff gehemmt. Die Enzymaktivität wurde auch durch starke Thioinhibitoren, wie Hydroxymercuribenzoat (100%) und 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) gehemmt und wurde nicht gehemmt durch weniger starke Thioinhibitoren, wie Jodessigsäure oder N-Äthylmaleimid. Die physiologische Bedeutung dieser SADH in methylo-trophen sowie anderen Verwertern gasförmigen Kohlenwasserstoffs ist unbekannt. Dieses Enzym zu besitzen ist jedoch von grossem Vorteil für den Organismus, da dessen Wachstumsausbeute beim Wachsen mit gasförmigen Alkanen als einziger Quelle für Kohlenstoff und Energie ausschliesslich NAD(P)H-abhängig sein könnte. Sekundäre Alkohole sind Zwischenstufen bei der Oxydation von n-Alkanen durch *Pseudomonas* oder *Mycobacterium*.

Die Methanomonooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) oxydiert auch n-Alkane sowohl zu primären als auch zu sekundären Alkoholen. Die Tatsache, dass SADH auch in mit Methanol gezüchteten Zellen vorliegt, zeigt an, dass das Enzym nicht durch n-Alkane induziert wird.

Der Stoffwechsel der obligaten Methylo-trophe ist in einzigartiger Weise abhängig von einer Verbindung mit einem Kohlenstoff (Formaldehyd) für die Biosynthese bestimmter essentieller Zellbestandteile. Diese Verbindung kann aus Methan und Methanol erhalten werden, ist aber nicht aus den nicht-wachstumsunterhaltenden Verbindungen zu erhalten.

NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase und PMS-abhängige Methanoldehydrogenase sind gut charakterisierte Enzyme. Beide Dehydrogenasen haben eine breite Spezifität gegenüber primären Alkoholen. Kürzlich berichtete Metha [J. Bacteriol., 124, 1165-1167 (1975)] von einer an NAD gebundenen Alkohol-Dehydrogenase aus einer mit Methanol gezüchteten Hefe. Diese prim.-Alkohol-Dehydrogenase oxydiert auch 2-Propanol. Ausserdem stellte der Bericht fest, dass diese Alkohol-Dehydrogenase sehr instabil war, dass sie ihre gesamte Enzymaktivität innerhalb 24 h nach 4facher Reinigung verlor. Ergebnisse eigener vorläufiger Untersuchungen jedoch zeigen an, dass die vorliegend beschriebene sec.-Alkohol-Dehydrogenase ein sec.-Alkohol-spezifisches Enzym mit höchster Aktivität bei 2-Propanol und 2-Butanol ist und keine Aktivität gegenüber primären Alkoholen hat.