CH 651 315 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 651 315 A5

(51) Int. Cl.[4]: C 12 N 1/00
C 12 N 9/04
C 12 P 7/00

// (C 12 N 1/00, C 12 R 1:26, 1:84, 1:88)

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

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 3544/79

(22) Anmeldungsdatum: 12.04.1979

(30) Priorität(en): 14.04.1978 US 896476
27.03.1979 US 024307

(24) Patent erteilt: 13.09.1985

(45) Patentschrift veröffentlicht: 13.09.1985

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

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

(74) Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

(54) Verfahren zur Herstellung mikrobischer Zellen, die ein Oxygenase- und/oder Alkohol-Dehydrogenase-Enzymsystem enthalten.

(57) Mikrobische Zellen, die ein Oxygenase- und/oder Alkohol-Dehydrogenase-Enzymsystem enthalten werden erhalten, indem man unter aeroben Bedingungen in einem flüssigen Wachstumsmedium mit assimilierbaren Quellen für Stickstoff und essentiellen Mineralsalzen in Gegenwart einer C_1-Verbindung als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle einen isolierten und biologisch reinen C_1-ausnützenden Mikroorganismus-Stamm kultiviert. Die einsetzbaren Mikroorganismus-Stämme sind in Anspruch 1 definiert. Aus den erhaltenen mikrobischen Zellen werden eine Oxygenase-Enzym-Zusammensetzung sowie eine sekundäre Alkohol-Dehydrogenase-Enzym-Zusammensetzung isoliert. Oxidierbare organische Substrate werden mit den erhaltenen mikrobischen Zellen oxidiert und ebenfalls werden mit den genannten mikrobischen Zellen C_3-C_6-Alkohole in ein Methylketon überführt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung mikrobischer Zellen, die ein Oxygenase- und/oder Alkohol-Dehydrogenase-Enzymsystem enthalten, dadurch gekennzeichnet, dass man unter aeroben Bedingungen in einem flüssigen Wachstumsmedium mit assimilierbaren Quellen für Stickstoff und essentiellen Mineralsalzen in Gegenwart einer C_1-Verbindung als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle einen isolierten und biologisch reinen C_1- ausnützenden Mikroorganismus-Stamm, ausgewählt aus der folgenden Gruppe:

Methylosinus trichosporium	NRRL B-11,202
Methylosinus sportium	NRRL B-11,203
Methylocystis parvus	NRRL B-11,204
Methylomonas methanica	NRRL B-11,205
Methylomonas methanica	NRRL B-11,206
Methylomonas albus	NRRL B-11,207
Methylomonas streptobacterium	NRRL B-11,208
Methylomonas agile	NRRL B-11,209
Methylomonas rubrum	NRRL B-11,210
Methylomonas rubrum	NRRL B-11,211
Methylomonas rosaceus	NRRL B-11,212
Methylomonas rosaceus	NRRL B-11,213
Methylobacter chroococcum	NRRL B-11,214
Methylobacter chroococcum	NRRL B-11,215
Methylobacter bovis	NRRL B-11,216
Methylobacter bovis	NRRL B-11,217
Methylobacter vinelandii	NRRL B-11,218
Methylococcus capsulatus	NRRL B-11,219
Methylococcus minimus	NRRL B-11,220
Methylococcus capsulatus	NRRL B-11,221
Methylobacterium organophilum	NRRL B-11,222
Pichia sp.	NRRL Y-11,328
Torulopsis sp.	NRRL Y-11,419
und/oder	
Kloeckera sp.	NRRL Y-11,420

kultiviert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Methan die einzige bedeutsame Quelle für assimilierbaren Kohlenstoff im genannten Medium ist, und dass der verwendete Stamm Bakterien sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man bei einer Temperatur von 5–50 °C und in einem pH-Bereich von 4–9 arbeitet.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–3, dadurch gekennzeichnet, dass man in einem Temperaturbereich von 25–45 °C kultiviert, und dass der pH-Wert in einem Bereich von 5,5–8,5 liegt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–4, dadurch gekennzeichnet, dass man chargenweise arbeitet.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–4, dadurch gekennzeichnet, dass man kontinuierlich arbeitet.

7. Nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 hergestellte mikrobiologische Zellen.

8. Verfahren zur Herstellung einer Oxygenase-Enzym-Zusammensetzung aus Zellen gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man eine zellfreie Oxygenase-Enzym-Zusammensetzung aus der entsprechenden Zellteilchenfraktion isoliert.

9. Nach dem Verfahren gemäss Anspruch 8 hergestellte Oxygenase-Enzym-Zusammensetzung.

10. Verfahren zur Herstellung einer sekundären Alkohol-Dehydrogenase-Enzym-Zusammensetzung aus Zellen gemäss Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man eine zellfreie sekundäre Alkohol-Dehydrogenase-Enzym-Zusammensetzung aus der entsprechenden Zellteilchenfraktion isoliert.

11. Nach dem Verfahren gemäss Anspruch 10 hergestellte sekundäre Alkohol-Dehydrogenase-Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte sekundäre Alkohol-Dehydrogenase-Zusammensetzung ein Molekulargewicht von 95 000 ± 3000 aufweist und die Fähigkeit besitzt, C_3–C_6-sekundäre Alkohole unter aeroben Bedingungen in Gegenwart von NAD in Methylketone umzuwandeln.

12. Verfahren zur Oxidation oxidierbarer organischer Substrate mit Zellen gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man unter aeroben Bedingungen die Zellen und ein organisches Substrat so lange miteinander in Berührung bringt, bis sich der oxidative Zustand von mindestens einem Teil des genannten organischen Substrates erhöht hat.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man in einem Temperaturbereich von 5–50 °C und bei einem pH-Wert von 4–9 arbeitet.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man in einem Temperaturbereich von 25–45 °C und bei einem pH-Bereich von 5,5–7,5 arbeitet.

15. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man chargenweise arbeitet.

16. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man kontinuierlich arbeitet.

17. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Bakterienstamm einsetzt, der auf Methan aerob kultiviert wurde, und dass das genannte Substrat ausgewählt ist aus der Gruppe Ethylen, Propylen, Buten-1, Butadien und Styrol, und dass das erhaltene Produkt ein 1,2-Epoxid ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Alken Propylen ist und dass man Propylenoxid erhält.

19. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Bakterienstamm einsetzt, der auf Methan aerob kultiviert wurde und dass das genannte Substrat ein C_1–C_6-Alkan und dass das entstandene Produkt ein Alkanol darstellt.

20. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Bakterienstamm einsetzt, der auf Methan aerob kultiviert wurde und dass das genannte Substrat ein C_3–C_6-n-Alkan und dass das entstandene Produkt ein Methylketon ist.

21. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte Substrat ein C_3–C_6-sekundärer Alkohol ist, und dass das entstandene Produkt ein Methylketon ist.

22. Verfahren zur Oxidation sekundärer C_3–C_6-Alkohole unter Verwendung von Zellen gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass zunächst ein Enzym-Präparat als roher oder gereinigter Extrakt aus den Zellen gewonnen und anschliessend dieses Enzym-Präparat zur Oxidation des Alkohols zu einem Methyl-keton in Gegenwart von NAD eingesetzt wird.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung mikrobischer Zellen, die ein Oxygenase- und/oder Alkohol-Dehydrogenase-Enzymsystem enthalten. Ebenfalls bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung eines Oxygenase-Enzymsystems, auf ein Verfahren zur Herstellung eines sekundären Alkohol-Dehydrogenase-Enzymsystems, auf ein Verfahren zur Oxidation oxidierbarer organischer Substrate mit den mikrobischen Zellen, die ein Oxygenase- und/oder Alkohol-Dehydrogenase-Enzymsysem enthalten sowie auf ein Verfahren zur Oxidation von C_3–C_6-Alkohol unter Verwendung der genannten mikrobischen Zellen.

Das Verfahren zur Herstellung mikrobischer Zellen, die ein Oxygenase- und/oder Alkohol-Dehydrogenase-Enzymsy-

stem enthalten, ist dadurch gekennzeichnet, dass man unter aeroben Bedingungen in einem flüssigen Wachstumsmedium mit assimilierbaren Quellen für Stickstoff und essentiellen Mineralsalzen in Gegenwart einer C_1-Verbindung als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle einen isolierten und biologisch reinen C_1-ausnützenden Mikroorganismus-Stamm, ausgewählt aus der folgenden Gruppe:

Methylosinus trichosporium NRRL B-11,202	(CRL 15 PM1)
Methylosinus sporium (CRL 16 PM2)	NRRL B-11,203
Methylocystis parvus (CRL 18 PM4)	NRRL B-11,204
Methylomonas methanica (CRL M4P)	NRRL B-11,205
Methylomonas methanica (CRL 21 PM7)	NRRL B-11,206
Methylomonas albus (CRL M8Y)	NRRL B-11,207
Methylomonas streptobacterium (CRL 17 PM3)	NRRL B-11,208
Methylomonas agile (CRL 22 PM9)	NRRL B-11,209
Methylomonas rubrum (CRL M6P)	NRRL B-11,210
Methylomonas rubrum (CRL 20 PM6)	NRRL B-11,211
Methylomonas rosaceus (CRL M10P)	NRRL B-11,212
Methylomonas rosaceus (CRL M7P)	NRRL B-11,213
Methylobacter chroococcum (CRL M6)	NRRL B-11,214
Methylobacter chroococcum (CRL 23 PM8)	NRRL B-11,215
Methylobacter bovis (CRL M1Y)	NRRL B-11,216
Methylobacter bovis (CRL 19 PM5)	NRRL B-11,217
Methylobacter vinelandii (CRL M5Y)	NRRL B-11,218
Methylococcus capsulatus (CRL M1)	NRRL B-11,219
Methylococcus minimus (CRL 24 PM12)	NRRL B-11,220
Methylococcus capsulatus (CRL 25 PM13)	NRRL B-11,221
Methylobacterium organophilum (CRL 26 R6)	NRRL B-11,222
Pichia sp. (CRL-72)	NRRL Y-11,328
Torulopsis sp. (A_1) und/oder	NRRL Y-11,419
Kloeckera sp. (A_2)	NRRL Y-11,420

kultiviert.

Aus den erfindungsgemäss erhaltenen mikrobischen Zellen wird eine Oxygenase-Enzym-Zusammensetzung hergestellt, indem man eine zellfreie Oxygenase-Enzym-Zusammensetzung aus der erhaltenen entsprechenden Zellteilchenfraktion isoliert und eine sekundäre Alkohol-Dehydrogenase-Enzym-Zusammensetzung wird aus den erfindungsgemäss erhaltenen mikrobischen Zellen hergestellt, indem man die sekundäre Alkohol-Dehydrogenase-Enzym-Zusammensetzung aus der entsprechenden Zellteilchenfraktion isoliert. Die erhaltene sekundäre Alkohol-Dehydrogenase-Zusammensetzung weist ein Molekulargewicht von 95 000 ± 3000 auf und sie besitzt die Fähigkeit, C_3–C_6-sekundäre Alkohole unter aeroben Bedingungen in Gegenwart von NAD in Methylketone umzuwandeln.

Beim Verfahren zur Oxidation oxidierbarer organischer Substrate mit den erfindungsgemäss erhaltenen mikrobischen Zellen bringt man unter aeroben Bedingungen die genannten mikrobischen Zellen, die das weiter oben definierte Enzymsystem enthalten, und ein organisches Substrat so lange miteinander in Berührung, bis sich der oxydative Zustand von mindestens einem Teil des genannten organischen Substrates erhöht.

Dabei kann man chargenweise oder kontinuierlich arbeiten. Der Temperaturbereich beträgt bevorzugt 5–50 °C und insbesondere 25–45 °C. Gewöhnlich ist der pH-Bereich 4–9 und vorzugsweise 5,5–7,5. Bei einer bevorzugten Ausführungsform setzt man ein Bakterienstamm ein, der auf Methan aerob kultiviert wurde, und das genannte Substrat ist ein C_2–C_4-Alken, Dien oder Styrol, ausgewählt aus der Gruppe Ethylen, Propylen, Buten-1, Butadien und Styrol, und das erhaltene Produkt ist ein 1,2-Epoxid. Vorzugsweise ist das Alken Propylen und man erhält Propylenoxid. Man kann aber auch C_1–C_6-Alkane als Substrat einsetzen und das entstandene Produkt ist dann ein Alkanol. Aus einem C_3–C_6-n-Alkan kann man auf diese Weise ein Methylketon herstellen und einen C_3–C_6-sekundären Alkohol kann man in ein Methylketon überführen.

Beim Verfahren zur Oxidation sekundärer C_3–C_6-Alkohole unter Verwendung der erfindungsgemäss erhaltenen mikrobischen Zellen gewinnt man zunächst ein Enzym-Präparat als roher oder gereinigter Extrakt aus den Zellen und anschliessend wird dieses Enzym-Präparat zur Oxidation des Alkohols zu einem Methylketon in Gegenwart von NAD eingesetzt.

Die im erfindungsgemässen Verfahren eingesetzten Mikroorganismen sind neu aufgefundene und isolierte methylotrophe Mikroorganismen-Stämme und ihre natürlichen und/oder künstlichen Mutanten, die unter aeroben Bedingungen in einem Kulturmedium in Gegenwart von Methan als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle gut wachsen. Die mit Methan gezüchteten Mikrobenzellen sind proteinreich und als Futtermittel brauchbar. Wie schon weiter oben erwähnt, sind die Mikrobenzellen oder deren Enzympräparate auch brauchbar zur Umwandlung oxydierbarer Substrate in oxydierte Produkte, z.B. C_1–C_6-Alkane in Alkohole, C_3–C_6-Alkane in die entsprechenden C_3–C_6-sec.-Alkohole und Methylketone, C_3–C_6-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone, cyclische Kohlenwasserstoffe in cyclische Hydrocarbylalkohole (z.B. Cyclohexan in Cyclohexanol), C_2–C_4-Alkene der Gruppe Äthylen, Propylen, Buten-1 und Butadien in die entsprechenden 1,2-Epoxide, Styrol in Styroloxid usw.

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. Whittenbury 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 Bakerium, 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.

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 ^{18}O-Einbaus aus $^{18}O_2$ 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 $CH_3{}^{18}OH$ als das Produkt der Methanoxydation, wenn Suspensionen von Pseudomonas methanica oder Methanomonas methanooxidans Methan in an$^{18}O_2$ 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 C_1-Compounds by Particulate Fractions Form 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 O_2-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 Säugetieren, 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 Ausgangskulturensammlungen 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 Futtermittel 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 Alkoholoxydase katalysiert wird. Alkoholoxydase enthielt Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) als prosthetische Gruppe. Sekundäre Alkohole wurden durch diese Alkoholoxydase nicht oxydiert.

Es wurde nun gefunden, dass bestimmte neu aufgefundene und isolierte methylotrophe Mikroorganismen-Stämme und ihre natürlichen und/oder künstlichen Mutanten unter aeroben Bedingungen in einem Kulturmedium in Gegenwart von Methan als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle gut wachsen. Die mit Methan gezüchteten Mikrobenzellen besitzen einen hohen Proteingehalt und können als solche als Futtermittel verwendet werden. Die mit Methan gezüchteten Mikrobenzellen oder deren Enzympräparate sind auch brauchbar zur Umwandlung oxydierbarer Substrate in Oxydationsprodukte, z.B. C_1–C_6-Alkane in Alkohole, insbesondere Methan in Methanol, C_3–C_6-Alkane in die entsprechen-

den sec.-Alkohole und Methylketone, C_3–C_6-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone, cyclische Kohlenwasserstoffe in cyclische Hydrocarbylalkohole (z.B. Cyclohexan in Cyclohexanol), C_2–C_4-Alkene der Gruppe Äthylen, Propylen, Buten-1 und Butadien in 1,2-Epoxide, Styrol in Styroloxid usw.

Es wurde auch gefunden, dass diese neu aufgefundenen und isolierten methylotrophen Mikroorganismen-Stämme einschliesslich neuer Hefestämme mit einer Vielzahl Methylreste liefernder kohlenstoffhaltiger Verbindungen, wie Methanol, Methylamin, Methylformiat, Methylcarbonat, Dimethyläther usw. aerob gezüchtet werden können, um Mikrobenzellen oder Enzympräparate zu produzieren, die lineare C_3–C_6-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone aerob zu überführen vermögen.

Ausserdem wurde eine Nicotinamid-adenin-dinucleotid(NAD)-abhängige sec.-Alkohol-Dehydrogenase in zellfreien Extrakten verschiedener Kohlenwasserstoff-verwertender Mikroben, einschliesslich Bakterien und Hefen, gefunden. Dieses Enzym findet sich auch in mit Methanol gezüchteten Zellen. Es oxydiert vor allem spezifisch und stöchiometrisch C_3–C_6-sec.-Alkohole in ihre entsprechenden Methylketone. Dieses Enzym wurde 2600fach gereinigt und zeigt eine einzige Proteinbande bei der Acrylamidgelelektrophorese. Es besitzt ein Molekulargewicht von 95 000 ± 3000 Dalton. Die bakterielle SADH besteht aus zwei Untereinheiten von 48 000 Dalton und zwei Atomen Zink pro Molekül Enzymprotein. Sie oxydiert sec.-Alkohole, insbesondere 2-Propanol und 2-Butanol. Primäre Alkohole werden durch SADH nicht oxydiert.

Der Ausdruck «Mikroorganismus» wird hier in seinem breitesten Sinne verwendet und umfasst nicht nur Bakterien, sondern 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^+-Kofaktor 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 oder 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 und 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 ausgefällten 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.

Der Begriff «Erhöhung des Oxydationszustandes eines oxydierbaren organischen Substrats» soll den Einbau von Sauerstoff in eine organische Verbindung umfassen, wie beim Epoxydieren von Olefinen und beim Umwandeln von Alkanen in Alkohole oder Ketone oder bei Erhöhung des Oxydationszustandes sauerstoffhaltiger Verbindungen, wie bei der Überführung von Alkoholen in Aldehyde und Ketone (d.h. eine Dehydrierungsreaktion). Besonders bevorzugte Prozesse, bei denen die mit Methan oder Methylresten gezüchteten Mikrobenzellen oder deren Enzympräparate zur Erhöhung des Oxydationszustandes eines oxydierbaren organischen Substrats verwendet werden können, sind die Überführung von C_2–C_4-Alkenen der Gruppe Äthylen, Propylen, Buten-1 und Butadien in 1,2-Epoxide, die Überführung von C_1–C_6-Alkanen in entsprechende Alkanole und die Überführung von C_3–C_6-sec.-Alkoholen in die entsprechenden Methylketone. In dieser Hinsicht überführen z.B. Mikrobenzellen oder Enzympräparate von mit Methan gezüchtetem Methylobacter vinelandii M5Y NRRL B-11.218 und dessen Mutanten Cyclohexan in Cyclohexanol.

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 Bakerien 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 fünf 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.

Es wurden mehrere neue Stämme aufgefunden und isoliert, die auf einem Kulturmedium in Gegenwart von Sauerstoff und Methan und Methylreste liefernden Verbindungen, wie Methanol, Methylamin, Methylformiat, Methylcarbonat, Dimethyläther usw. gut wachsen. Diese neu aufgefundenen und isolierten Stämme methylotropher Mikroorganismen vermögen Mikrobenzellen zu produzieren, die insbesondere als Futtermittel brauchbar sind, wenn sie unter aeroben Bedingungen in einem flüssigen Wachstumsmedium mit assimilierbaren Quellen für Stickstoff und essentiellen Mineralsalzen in Gegenwart von Methangas oder den vorgenannten Methylreste liefernden kohlenstoffhaltigen Verbindungen als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle kultiviert werden.

Es werden biologisch reine Isolate und Mutanten einer Vielzahl neu aufgefundener und isolierter Methan-verwertender Mikroorganismen-Stämme zur Verfügung gestellt. Diese biologisch reinen Isolate (nachfolgend im einzelnen beschrieben) vermögen Mikrobenzellen zu produzieren, wenn sie in einem aeroben Nährmedium mit Methan oder den vorgenannten Methylreste liefernden kohlenstoffhaltigen Verbindungen als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle kultiviert werden.

Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren zur Erhöhung des Oxydationszustands eines oxydierbaren organischen Substrats geboten, wobei unter aeroben Bedingungen in einem Medium mit assimilierbaren Quellen für Stickstoff und essentielle Mineralsalze erfindungsgemäss erhaltene Mikrobenzellen und ein organisches Substrat zusammengebracht werden, bis der Oxydationszustand wenigstens eines Teils des organischen Substrats erhöht ist, wobei die Mikrobenzellen unter aeroben Bedingungen in einem flüssigen Wachstumsmedium mit assimilierbaren Quellen für Stickstoff und essentielle Mineralsalze in Gegenwart von Methangas als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle gezüchtet worden sind und von neu aufgefundenen und isolierten, Methan-verwertenden Stämmen (nachfolgend beschrieben) stammen.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Produktion von Propylenoxid aus Propylen durch Kontakt von Propylen unter aeroben Bedingungen mit erfindungsgemäss hergestellten Mikrobenzellen, wobei die Mikrobenzellen von neu aufgefundenen und

isolierten, Methan-verwertenden Stämmen, wie nachfolgend beschrieben, stammen und zuvor unter aeroben Bedingungen in Gegenwart von Methan gezüchtet worden sind.

Eine weitere besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung besteht in einem Verfahren zur Umwandlung von linearen C_3–C_6-sec.-Alkoholen in die entsprechenden Methylketone durch Kontakt eines linearen C_3–C_6-sec.-Alkohols unter aeroben Bedingungen mit Enzympräparaten aus den Mikrobenzellen (einschliesslich Zellextrakten oder gereinigter SADH und NAD^+), wobei die Mikrobenzellen von den neu aufgefundenen und isolierten, Methan oder Methylreste verwertenden Stämmen, wie nachfolgend beschrieben, stammen und zuvor unter aeroben Bedingungen in Gegenwart von Methan oder einer Methylreste liefernden kohlenstoffhaltigen Verbindung, wie Methanol, Methylamin, Methylformiat, Methylcarbonat, Methyläther usw., insbesondere bevorzugt Methan oder Methanol, gezüchtet worden sind.

Die Erfindung weist folgende bevorzugte Merkmale auf:

Die Isolate Methan-verbrauchender Mikroben umfassen obligate, also an eine einzige Lebensbedingung gebundene (Typ I und Typ II) fakultative Bakterien sowie neue, Methanol-verwertende Hefen.

Neben ihrer Fähigkeit zur Oxydation von Methan zu Methanol oxydieren Ruhezell-Suspensionen mehrerer unterschiedlicher Typen von mit Methan gezüchteten Bakterien (z.B. Typ I, obligat; Typ II, obligat; und fakultativ) C_2–C_4-n-Alken und Butadien zu ihren entsprechenden 1,2-Epoxiden.

Die Produkt-1,2-Epoxide werden im Stoffwechsel nicht weiter umgesetzt und sammeln sich extrazellulär an.

Mit Methanol gezüchtete Zellen zeigen weder Epoxydations- noch Hydroxylierungs-Aktivität. Unter den gasförmigen Substrat-Alkenen wird Propylen mit der höchsten Geschwindigkeit oxydiert. Methan hemmt die Epoxydation von Propylen.

Die Stöchiometrie des Verbrauchs von Propylen und Sauerstoff und die Produktion von Propylenoxid ist 1:1:1.

Ergebnisse aus Hemmstudien zeigen an, dass das gleiche Monooxygenase-System sowohl die Hydroxylierungs- als auch die Epoxydationsreaktionen katalysiert.

Sowohl die Hydroxylierungs- als auch die Epoxydationsaktivität sitzt in der zellfreien (Enzymextrakt) Teilchenfraktion, die zwischen 10 000 und 80 000 g für 1 h ausgefällt oder sedimentiert wurde.

Zellfreie Teilchenfraktionen aus den obligaten und faktultativen methylotrophen Mikroorganismen katalysieren die Hydroxylierung von Methan zu Methanol und die Epoxydation von C_2–C_4-n-Alkenen und Dienen (z.B. Äthylen, Propylen, 1-Buten und Butadien) in Gegenwart von Sauerstoff und reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) und die Hydroxylierung von C_1–C_4-n-Alkanen (z.B. Methan, Äthan, Propan und Butan).

Die Hydroxylierungs- und die Epoxydationsaktiviät von mit Methan gezüchteten Methylotrophen gehen bei Lagerung gleichzeitig verloren und werden durch verschiedene Metall bindende Mittel stark gehemmt.

Die Stöchiometrie für den Verbrauch des Substrats (Propylen oder Methan), von Sauerstoff, NADH, und die Produktbildung erwies sich als annähernd 1:1:1:1.

Ruhezell-Suspensionen der neuen C_1-verwertenden Mikroben oxydieren (dehydrieren) C_3–C_6-sec.-Alkohole zu ihren entsprechenden Methylketonen. Die Produkt-Methylketone sammeln sich extrazellulär an. Von den sec.-Alkoholen wurde 2-Butanol mit der höchsten Geschwindigkeit oxydiert.

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

Ein gewisser enzymatischer Abbau von 2-Butanon wurde beobachtet. Das Produkt, 2-Butanon, hemmte die Umwandlung von 2-Butanol zum entsprechenden 2-Butanon nicht. Die Produktsgeschwindigkeit 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 C_1 gezüchteter Isolate. Das zellfreie System braucht einen Cofaktor, insbesondere NAD, für seine Aktivität. Die neue sec.-Alkoholdehydrogenase oxydiert spezifisch und stöchiometrisch C_3–C_6-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 $95\,000 \pm 3000$ Dalton. Die bakterielle SADH besteht aus zwei Untereinheiten von 48 000 Dalton und zwei Zinkatomen pro Molekül des Enzymproteins. Primäre Alkohole werden durch die SADH nicht in Ketone überführt. Die pH- und Temperaturoptimalwerte für SADH sind 8 bis 9 bzw. 30 bis 35 °C. Die berechnete Aktivierungsenergie beträgt 19,8 kcal. Acrylamidgel-Elektrophorese der gereinigten SADH-Fraktion, mit Coomassie-Brilliantblau und Aktivitätsfarbe verfärbt, sowie die rohen, löslichen, zellfreien Extrakte aus verschiedenen Arten von mit Methanol gezüchteten 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 gezüchteten Bakterienzellen war ähnlich. 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-Aktiviät 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.) gezüchteten Hefen katalysieren die Umwandlung von sec.-Alkoholen in die entsprechenden Methylketone.

Zellfreie Extrakte, die aus mit Methylresten (z.B. Methanol) gezüchteten Hefen stammen, katalysierten eine NAD^+-abhängige Oxydation von C_3–C_6-sec.-Alkoholen zu den entsprechenden Methylketonen. Die gereinigte NAD^+-spezifische sec.-Alkoholdehydrogenase aus mit Methanol gezüchteter Hefe ist nach der Polyacrylamidgel-Elektrophorese homogen. Das gereinigte Enzym katalysiert 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 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.

C_3–C_6-n-Alkane können in C_3–C_6-sec.-Alkohole durch Zellsuspensionen der mit Methan gezüchteten Methylotrophe umgewandelt werden, und die sec.-Alkohole sammeln sich

extrazellulär an. Andere Mikroorganismen, z.B. Hefen, Actinomyceten und Fungi, mit C_1-Verbindungen gezüchtet, oxydieren bevorzugt die C_3–C_6-n-Alkane zu den entsprechenden sec.-Alkoholen.

C_3–C_6-n-Alkane werden insbesondere in C_3–C_6-sec-Alkohole durch zellfreie Teilchenfraktionen umgewandelt, die aus den genannten methylotrophen Mikroorganismen stammen. Die Reaktion erfordert vor allem Sauerstoff und reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) als Elektronendonor. 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 C_3–C_6-n-Alkanen zu sec.-Alkoholen vermuten). Die Hydroxylierung von C_3–C_6-n-Alkanen zu den entsprechenden sec.-Alkoholen wird gewöhnlich durch die Gegenwart von Propylen gehemmt. Dies lässt vermuten, dass das Propylen und n-Alkane (z.B. Propan) um dasselbe Enzymsystem(e) konkurrieren. Ascorbat und reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) könnten auch als Elektronendonoren anstelle von NADH für die Hydroxylierung von n-Alkanen zu den entsprechenden sec.-Alkoholen verwendet werden.

Die neu aufgefundenen und isolierten Methan und Methylreste verwertenden (methylotrophen) Mikroorganismen-Stämme haben die folgenden identifizierenden Merkmale:

Tabelle I

Methylotropher Mikroorganismus, Stamm-Bezeichnung	ER&E-Bezeichnung	Bezeichnung des USDA Agriculture Research Center
1. Methylosinus trichosporium	(CRL 15 PM1)	NRRL B-11.202
2. Methylosinus sporium	(CRL 16 PM2)	NRRL B-11.203
3. Methylocystis parvus	(CRL 18 PM4)	NRRL B-11.204
4. Methylomonas methanica	(CRL M4P)	NRRL B-11.205
5. Methylomonas methanica	(CRL 21 PM7)	NRRL B-11.206
6. Methylomonas albus	(CRL M8Y)	NRRL B-11.207
7. Methylomonas streptobacterium	(CRL 17 PM3)	NRRL B-11.208
8. Methylomonas agile	(CRL 22 PM9)	NRRL B-11.209
9. Methylomonas rubrum	(CRL M6P)	NRRL B-11.210
10. Methylomonas rubrum	(CRL 20 PM6)	NRRL B-11.211
11. Methylomonas rosaceus	(CRL M10P)	NRRL B-11.212
12. Methylomonas rosaceus	(CRL M7P)	NRRL B-11.213
13. Methylobacter chroococcum	(CRL M6)	NRRL B-11.214
14. Methylobacter chroococcum	(CRL 23 PM8)	NRRL B-11.215
15. Methylobacter bovis	(CRL M1Y)	NRRL B-11.216
16. Methylobacter bovis	(CRL 19 PM5)	NRRL B-11.217
17. Methylobacter vinelandii	(CRL M5Y)	NRRL B-11.218
18. Methylococcus capsulatus	(CRL M1)	NRRL B-11.219
19. Methylococcus minimus	(CRL 24 PM12)	NRRL B-11.220
20. Methylococcus capsulatus	(CRL 25 PM13)	NRRL B-11.221
21. Methylobacterium organophilum	(CRL 26 R6)	NRRL B-11.222
22. Pichia sp.	(CRL-72)	NRRL Y-11.328
23. Torulopsis sp.	(A_1)	NRRL Y-11.419
24. Kloeckera sp. und deren Mutanten	(A_2)	NRRL Y-11.420

Ein wichtiges Merkmal der beschriebenen Stämme (wie vorstehend identifiziert) ist ihre Fähigkeit, Mikrobenzellen zu produzieren, wenn sie unter aeroben Bedingungen in einem flüssigen Wachstumsmedium mit assimilierbaren Quellen für Stickstoff und essentielle Mineralsalze in Gegenwart von Methangas oder Methylreste liefernden kohlenstoffhaltigen Verbindungen, wie Methanol, Methylamin, Methylformiat, Methylcarbonat, Dimethyläther usw. als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle kultiviert werden.

Die vorstehenden Stämme sind beim United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Northern Regional Research Laboratory (NRRL), 1815 North University Street, Pretoria, Illinois 61604 hinterlegt worden und haben von NRRL die einzelnen NRRL-Bezeichnungen erhalten, wie oben angegeben, gemäss Vertrag zwischen NRRL und dem Anmelder des vorliegenden Patentes (Exxon Research and Engineering Company [ER&E]).

Die Stämme NRRL B-11.202 bis NRRL B-11.222 wurden am 8. November 1977, der Stamm NRRL Y-11.328 am 26. Juni 1978 und die Stämme NRRL Y-11.419 und NRRL Y-11.420 am 12. Januar 1979 hinterlegt.

Die taxonomischen Merkmale dieser neu isolierten Stämme sind nachfolgend aufgeführt:

Morphologische und taxonomische Merkmale und Eigenschaften methylotropher Mikroorganismen

1. Methylosinus trichosporium, Stamm CRL 15 PM1 (NRRL B-11.202). Produziert weisse runde Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ, aerob. Häufig bilden sich in alten Kulturen Rosetten. Organismen bilden Exosporen. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstruktur des Typs II.

2. Methylosinus sporium, Stamm CRL 16 PM2 (NRRL B-11.203). Produziert weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind beweglich, Vibrio-förmig, gram-negativ, aerob. Häufig bilden sich Rosetten. Organismen bilden Exosporen. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstruktur des Typs II.

3. Methylocystis parvus, Stamm CRL 18 PM4 (NRRL B-11.204). Produziert schleimige weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind unbeweglich, Cocco-Bacillus-förmig, gram-negativ, aerob. Alte Kulturen bilden Zysten, die austrocknungsbeständig sind. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstruktur des Typs II.

4. Methylomonas methanica CRL M4P (NRRL B-11.205). Produziert rosafarbene erhabene Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ, aerob. Produziert schleimige Kapseln. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

5. Methylomonas methanica CRL 21 PM7 (NRRL B-11.206). Produziert rosafarbene Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ, aerob. Produziert schleimige Kapseln. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

6. Methylomonas albus CRL M8Y (NRRL B-11.207). Produziert weisse bis gelbe (mit dem Alter) und flaumigbegrenzte Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind stäbchenförmig, beweglich, gram-negativ, aerob. Produziert schleimige Kapseln. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

7. Methylomonas streptobacterium CRL 17 PM3 (NRRL B-11.208). Produziert weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind unbeweglich, stäbchenförmig, gram-negativ, aerob. Produziert schleimige Kapseln. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

8. Methylomonas agile CRL 22 PM9 (NRRL B-11.209). Produziert weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind unbeweglich, stäbchenförmig, gram-negativ, aerob. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

9. Methylomonas rubrum CRL M6P (NRRL B-11.210). Produziert rosa- bis orangefarbene, runde und erhabene Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind stäbchenförmig, beweglich, gram-negativ, aerob. Produziert schleimige Kapseln. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

10. Methylomonas rubrum CRL 20 PM6 (NRRL B-11.211). Produziert rote Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ, aerob. Produziert schleimige Kapseln. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

11. Methylomonas rosaceus CRL M10P (NRRL B-11.212). Produziert rosafarbene und runde Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind beweglich, lange dünne Stäbchen, gram-negativ, aerob. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

12. Methylomonas rosaceus CRL M7P (NRRL B-11.213). Bildet rosafarbene und flaumig-begrenzte Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind kleine dünne Stäbchen, beweglich, gram-negativ, aerob. Produziert schleimige Kapseln. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

13. Methylobacter chroococcum CRL M6 (NRRL B-11.214). Bildet cremefarbene und flaumig-begrenzte Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind unbeweglich, grosse Stäbchen/Kokken, gram-negativ, aerob. Produziert schleimige Kapseln. Besitzt eine Membranstuktur des Typs I.

14. Methylobacter chroococcum CRL 23 PM8 (NRRL B-11.215). Bildet blassrosafarbene Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind unbeweglich, gram-negativ, aerob. Produziert schleimige Kapseln. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstuktur des Typs I.

15. Methylobacter bovis CRL M1Y (NRRL B-11.216). Bildet gelbe, runde Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind unbewegliche grosse Stäbchen, gram-negativ, aerob. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

16. Methylobacter bovis CRL 19 PM 5 (NRRL B-11.217). Bildet weisse bis braune Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind unbeweglich, gram-negativ, aerob. Bildet schleimige Kapseln. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

17. Methylobacter vinelandii CRL M5Y (NRRL B-11.218). Bildet kleine, einzelne, schwach (mit dem Alter bis gelb) gefärbte Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ, aerob. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

18. Methylococcus capsulatus CRL M1 (NRRL B-11.219). Bildet weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind unbeweglich, Kokken, gram-negativ, aerob. Besitzt ein Membranstruktur des Typs I.

19. Methylococcus minimus CRL 24 PM12 (NRRL B-11.220). Bildet weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind unbewegliche Kokken, gram-negativ, aerob. Gelegentlich treten Organismen in Ketten auf und können bei 37 bis 45 °C wachsen. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

20. Methylococcus capsulatus CRL 25 PM 13 (NRRL B-11.221). Bildet weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von CH_4 oder CH_3OH. Die Organismen sind unbewegliche Kokken, in Paaren auftretend, gram-negativ, aerob. Organismen bilden Kapseln und haben die Fähigkeit, bei 37 und 45 °C zu wachsen. Wächst auf Kosten von Methan und Methanol. Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

21. Methylobacterium organophilum CRL 26 R6 (NRRL B-11.222). Bildet weisse Kolonien auf Salzagarplatten in Gegenwart von Methan oder Methanol. Die Organismen sind beweglich, stäbchenförmig, gram-negativ, aerob. Wächst auf Kosten von Methan, Methanol, Glucose, Succinat und Nähragar. (Daher ist es klassischerweise ein fakultativer Typ.) Besitzt eine Membranstruktur des Typs I.

22. Pichia sp. CRL-72 (NRRL Y-11.328). Bildet schleimige weisse Kolonien auf Platten. Zellen sind gross und oval; einige besitzen Knospen. Vermehrt sich durch Knospung und wächst aerob mit C_1–C_6-prim.-Alkoholen, C_1–C_4-prim.-Aminen, Methylformiat, Succinat und Nähragar. Wächst nicht mit Methan.

23. Torulopsis sp. A_1 (NRRL Y-11.419). Vermag mit Methanol, Methylformiat, Methylamin, Äthanol, Propylamin und Nähragar zu wachsen. Wächst nicht mit Methan. Zellen sind gross oval-förmig und zeigen bei mikroskopischer Prüfung vielseitiges Knospen.

24. Kloeckera sp. A_2 (NRRL Y-11.420). Vermag mit Methanol, Methylformiat, Methylamin, Äthanol, Propylamin und Nähragar zu wachsen. Wächst nicht mit Methan. Zellen sind gross ovalförmig und zeigen bei mikroskopischer Prüfung bipolares Knospen.

Die neu aufgefundenen und isolierten Stämme wurden aus Bodenproben der Bayway Refinery in Linden, New Jersey und aus Seewasserproben aus Warinaco Park, Linden, New Jersey sowie aus Robert's Pond, Ridgefield, Connecticut, erhalten. Die Proben wurden durch Wachstum unter Sau-

erstoff und Methan auf methylotrophe Mikroorganismen hin gesiebt. Die Methylotrophe wurden dann isoliert, gereinigt und nach der nachfolgend beschriebenen Arbeitsweise gehalten.

Die Haltung der Kulturen dieser neu aufgefundenen und isolierten Stämme sollte sorgfältig gesteuert und kontrolliert werden. Die bevorzugten Massnahmen zur Haltung der Kulturen sind nachfolgend in Tabelle II beschrieben.

Tabelle II
Halten der Kulturen

Die Organismen werden vorzugsweise alle zwei Wochen auf Mineralsalz-Agarplatten in einer Nebenkultur weitergezüchtet, die ein Medium folgender Zusammensetzung enthalten:

Na_2HPO_4	0,21 g
NaH_2PO_4	0,09 g
$NaNO_3$	2,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
KCl	0,04 g
$CaCl_2$	0,015 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01 mg
H_3BO_4	0,02 mg
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0,14 mg
$ZnSO_4$	0,02 mg
MoO_3	0,02 mg
Agar	15 g
Wasser	1 l

Im Falle von Hefezellen wird Hefe-Stickstoffbase dem obigen Medium 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 häufige 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 Stufe 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 Massstabs eingeführt oder eingeimpft, 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 aus anorganischen Phosphatsalzen, Sulfaten und Nitraten sowie aus Sauerstoff und einer Quelle für C_1-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 eingeimpft, das mit einem Methan und Sauerstoff enthaltenden Gasgemisch in Kontakt gebracht wird. Methan kann 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. Ein Methan und Sauerstoff und möglicherweise Kohlendioxid oder andere Gase enthaltendes Gasgemisch wird 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 Methan-Verwertung ergibt.

Das Oxygenase-Enzymsystem kann, wie oben beschrieben, als Rohextrakt oder als zellfreie Teilchenfraktion, d.h. das Material, das sich bei einstündigem Zentrifugieren mit 10 000 g oder darüber der überstehenden Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren gebrochener Zellen für 30 min bei 10 000 g abscheidet, erhalten werden. Soll die sec.-Alkohol-Dehydrogenase (SADH)-Enzymfraktion erhalten werden, bricht man gewöhnlich zuerst die Zellen auf, z.B. durch Behandlung mit Schall usw., entfernt dann die Zelltrümmer, z.B. durch Zentrifugieren bei 10 000 g für etwa 20 min, und darauf kann das gewonnene rohe SADH-Enzym weiter durch milde Wärmebehandlung, Säulenchromatographie usw., wie in den folgenden Beispielen beschrieben, gereinigt werden. Die Mikro-

benzellen können aus dem Wachstumsmedium nach irgendeiner der gewöhnlich verwendeten Standardtechniken geerntet werden, z.B. durch Ausflockung, Sedimentation und/oder Fällung mit anschliessendem Zentrifugieren und/oder Filtrieren. Die Biomasse kann getrocknet werden, z.B. durch Gefrier- oder Sprühtrocknen, und kann in dieser Form zur weiteren Verwendung bei den Oxydationsreaktionen verwendet werden.

Zur praktischen Ausführung der Erfindung wird ein oxydatives oder Dehydrogenase-Enzympräparat erhalten, beispielsweise nach der oben beschriebenen Weise, das Methan in Methanol unter oxydierenden Bedingungen umwandelt. Vorzugsweise wird ein solches Präparat aus einem der Mikroorganismen-Stämme (oder einer natürlichen und/oder künstlichen Mutante von diesen), wie oben beschrieben, erhalten und der Mikroorganismus in einem Methan und Sauerstoff enthaltenden Nährmedium, wie oben beschrieben, gezüchtet. Das Nährmedium kann das sein, das von Whittenbury et al. beschrieben wurde, oder noch mehr bevorzugt das Kulturmedium, das von Foster und Davis, J. Bacteriol. 91, 1924–1931 (1966) beschrieben wurde. Im Falle von Hefe kann eine Hefe-Stickstoffbase zugesetzt werden.

Das Enzympräparat wird dann gewöhnlich mit dem gewünschten oxydierbaren Substrat, z.B. einem C_2–C_4-Alken, z.B. Äthylen, Propylen, Buten-1, oder konjugiertem Butadien oder Gemischen, einer cyclischen Verbindung, wie Cyclohexan, einem Alkan, wie Methan, Äthan, Propan oder Butan usw., oder einem sec.-Alkohol, z.B. 2-Propanol oder 2-Butanol in Gegenwart von Sauerstoff und einer Pufferlösung oder Nährmedium in Berührung gebracht (z.B. kann das gleiche Nährmedium wie für die Produktion des Mikroorganismus verwendet werden, mit der Ausnahme, dass das oxydierbare Substratmaterial das Methan ersetzt hat), und das Gemisch kann dann inkubiert werden, bis der gewünschte Umwandlungsgrad erreicht ist. Darauf wird das oxydierte Produkt in der Regel durch herkömmliche Massnahmen, z.B. Destillation usw., gewonnen.

Um den notwendigen, wirksamen Kontakt von Sauerstoff und Enzym zu erleichtern oder zu ermöglichen (ob es nun ein Enzympräparat oder methylotrophe Mikroorganismen sind), wird zur Erzielung bester Ergebnisse vorzugsweise ein starker, fein zerteilter Luftstrom in eine kräftig gerührte Dispersion des Substrats im Oxydationsmedium eingeführt, das im allgemeinen Wasser und einen Puffer enthält und in dem das Enzympräparat oder die Mikroorganismenkultur suspendiert ist. Das Enzympräparat kann dann vom flüssigen Medium abgetrennt werden, vorzugsweise durch Filtrieren oder Zentrifugieren. Das anfallende oxydierte Produkt kann dann im allgemeinen erhalten werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann ansatzweise, 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 kann aus der abwärts fliessenden Suspension entfernt werden, 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.

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, was für das Wachstum erforderlich ist, vorzugsweise wenigstens die fünffache Durchläuftung). Der Wachstumsprozess und der Methan-Hydroxylierungs- oder -Oxydationsprozess 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_2HPO_4	0,21 g
NaH_2PO_4	0,09 g
$NaNO_3$	2,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
KCl	0,04 g
$CaCl_2$	0,015 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01 mg
H_3BO_4	0,02 mg
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	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 Agarplatten unter einer Atmosphäre aus Methan und Luft mit einem 1:1 Vol./Vol.-Gasverhältnis gehalten, die alle zwei Wochen übertragen worden waren. Die Gasphase der beimpften Kolben wurde dann 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 0,15 m Phosphatpuffer bei einem pH von 7,0 (mit 0,002 m $MgCl_2$) gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden dann in einem 0,15 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 zu oxydierenden Substrats (z.B. Methan) und Sauerstoff im Volumenverhältnis 1:1 ersetzt. Die Röhrchen wurden dann bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler bei 300 UpM inkubiert. Produktproben (3 µl) wurden mit einer Mikrospritze periodisch entnommen und die Produkte gaschromatographisch (Ionisationsflammendetektorsäule) analysiert.

Die neu aufgefundenen und isolierten Mikroorganismen wurden jeweils aerob in Gegenwart von Methan in der oben beschriebenen Weise gezüchtet. Die mit Methan gezüchteten Mikrobenzellen wurden dann gewaschen, gewonnen und zum Oxydieren eines oxydierbaren Substrats nach der oben beschriebenen Arbeitsweise verwendet, mit der Ausnahme,

dass im Falle eines flüssigen Substrats 10 µl des Substrats verwendet wurden. Tabelle III zeigt die Ergebnisse dieser Versuche, wobei die oxydierbaren Substrate Methan, Äthylen, Propylen, Buten-1 und Butadien waren. Die mit Methan gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen produzierten kein feststellbares Epoxidprodukt aus Penten-1 oder Hexen-1.

Tabelle III

Geschwindigkeiten der oxydativen Umwandlung für Methan und niedere Alkene mit methylotrophen Mikroorganismen

Methylotropher Mikroorganismus, Stamm-Bezeichnung [a]	Geschwindigkeiten der oxydativen Umwandlung (µMol/h/mg Protein) [b] Methan → Methanol	Äthylen → Äthylenoxid	Propylen → Propylenoxid	Buten-1 → 1,2-Epoxybutan	Butadien → 1,2-Epoxybuten
Methylosinus trichosporium (CRL 15 PM1) NRRL B-11.202	1,2	2,5	4,5	1,8	4,2
Methylosinus sporium (CRL 16 PM2) NRRL B-11.203	1,0	1,3	3,2	1,2	2,5
Methylocystis parvus (CRL 18 PM4) NRRL B-11.204	–	0,9	1,5	–	–
Methylomonas methanica (CRL M4P) NRRL B-11.205	2,3	1,0	3,8	2,8	1,0
Methylomonas methanica (CRL 21 PM7) NRRL B-11.206	–	2,1	2,4	–	–
Methylomonas albus (CRL M8Y) NRRL B-11.207	1,5	1,8	2,5	1,8	3,0
Methylomonas streptobacterium (CRL 17 PM3) NRRL B-11.208	1,1	0,7	1,0	2,5	2,6
Methylomonas agile (CRL 22 PM9) NRRL B-11.209	0,6	2,2	1,6	0,5	2,0
Methylomonas rubrum (CRL M6P) NRRL B-11.210	0,5	0,7	1,0	–	–
Methylomonas rubrum (CRL 20 PM6) NRRL B-11.211	0,42	1,1	1,9	–	–
Methylomonas rosaceus (CRL M10P) NRRL B-11.212	7,3	4,7	1,41	3,1	9,2
Methylomonas rosaceus (CRL M7P) NRRL B-11.213	1,4	2,9	2,0	–	–
Methylobacter chroococcum (CRL M6) NRRL B-11.214	0,8	1,6	1,2	0,7	1,5
Methylobacter chroococcum (CRL 23 PM8) NRRL B-11.215	0,72	1,2	2,5	0,82	1,8
Methylobacter bovis (CRL M1Y) NRRL B-11.216	1,5	0,64	1,5	1,1	1,27
Methylobacter bovis (CRL 19 PM5) NRRL B-11.217	2,0	1,3	2,2	1,3	2,3
Methylobacter vinelandii (CRL M5Y) NRRL B-11.218	0,9	1,2	1,9	0	–
Methylococcus capsulatus (CRL M1) NRRL B-11.219	2,5	5,7	5,5	1,3	4,4
Methylococcus minimus (CRL 24 PM12) NRRL B-11.220	2,3	1,2	1,8	1,5	3,0
Methylococcus capsulatus (CRL 25 PM13) NRRL B-11.221	2,1	0,8	1,2	1,9	2,5
Methylobacterium organophilum (CRL 26 R6) NRRL B-11.222	0,7	0,9	2,5	0,9	2,8

[a] Das Trockengewicht der Zellen betrug etwa 0,2 g/100 ml Kulturbrühe.

[b] Die Produkte der mikrobiellen Oxydation wurden durch Vergleich gaschromatographischer Retentionszeiten mit authentischen Standardproben identifiziert. Die Identifizierung der Produkte wurde ergänzt durch die Feststellung der Gegenwart oder Abwesenheit von Produkt-Peaks vor und nach der Bromierung oder sauren Hydrolyse. Die Analyse zeigte auch, dass keine weitere Oxydation des Epoxidprodukts erfolgte.

In vergleichenden Versuchstests besassen gewaschene Zellsuspensionen der methylotrophen Mikroorganismen-Stämme mit Methanol gezüchtet nicht die Fähigkeit, Methan zu hydroxylieren oder C_2–C_4-Alkene zu epoxydieren.

Beispiel 2

Die Arbeitsweise des Beispiels 1 wurde wiederholt, wozu Methylobacter bovis CRL M1Y NRRL B-11.216 und Methylococcus capsulatus CRL M1 NRRL B-11.219 verwendet

wurde, mit der Ausnahme, dass die Mikroorganismen in dem aeroben Methan-Nährmedium bei 40 °C gezüchtet wurden. Die mit Methan gezüchteten, gewaschenen Zellen wurden dann mit Propylen nach der in Beispiel 1 beschriebenen Arbeitsweise (30 °C Reaktionstemperatur) in Berührung gebracht, und das Reaktionsprodukt (Propylenoxid) wurde mit Hilfe der gaschromatographischen Retentionszeit analysiert. Die mit Methan gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen (Methylobacter bovis CRL M1Y NRRL B-11.216 und Methylococcus capsulatus CRL M1 NRRL B-11.219) überführten Propylen in Propylenoxid mit einer Umwandlungsgeschwindigkeit von 0,27 µMol/2 h/mg Protein bzw. 7,88 µMol/2 h/mg Protein, woei das Trockengewicht der Zellen etwa 0,2 g/100 ml Kulturbrühe betrug.

Beispiel 3 – Mikrobiologische Umwandlung von sec.-Alkoholen in Ketone

Die Arbeitsweise des Beispiels 1 wurde wiederholt, wobei eine Vielzahl der neu aufgefundenen isolierten Stämme jeweils aerob in dem methanhaltigen Nährmedium gezüchtet wurde. Die gewaschenen Zellen der mit Methan gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen wurden dann mit sec.-Alkoholen, d.h. Isopropanol oder 2-Butanol, nach dem Oxydationsverfahren des Beispiels 1 in Berührung gebracht. Die Reaktionsprodukte wurden analysiert und enthielten Aceton bzw. 2-Butanon. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Tabelle IV wiedergegeben.

Tabelle IV

Mikrobiologische Umwandlung von sec.-Alkoholen in Ketone

Methylotropher Mikroorganismus, Stamm-Bezeichnung	Umwandlungsgeschwindigkeit in Keton (µMol/2 mg Protein)		gebildetes Produkt (GC-Nachweis)
mit Methan gezüchtetes Isopropanol-Substrat	2 h	20 h	
1. Methylobacter chroococcum (CRL M6) NRRL B-11.214	1	8	Aceton
2. Methylococcus capsulatus (CRL M1) NRRL B-11.219	3	15	Aceton
3. Methylosinus trichosporium (CRL 15 PM1) NRRL B-11.202	3	–	Aceton
4. Methylomonas rubrum (CRL M6P) NRRL B-11.210	1	–	Aceton
5. Methylobacter bovis (CRL M1Y) NRRL B-11.216	5	–	Aceton
6. Methylobacter organophilum (CRL 26 R6) NRRL B-11.222	3	–	Aceton
mit Methan gezüchtetes 2-Butanol-Substrat			
7. Methylosinus trichosporium (CRL 15 PM1) NRRL B-11.202	20	–	2-Butanon
8. Methylomonas methanica (CRL M4P) NRRL B-11.205	0,06	2	2-Butanon
9. Methylomonas rosaceus (CRL M7P) NRRL B-11.213	0,46	–	2-Butanon
10. Methylobacter chroococcum (CRL M6) NRRL B-11.214	1	3	2-Butanon
11. Methylobacter bovis (CRL M1Y) NRRL B-11.216	20		2-Butanon
12. Methylobacter vinelandii (CRL M5Y) NRRL B-11.218	2	18	2-Butanon
13. Methylococcus capsulatus (CRL M1) NRRL B-11.219	18	50	2-Butanon
14. Methylobacterium organophilum (CRL 26 R6) NRRL B-11.222	10	–	2-Butanon

Beispiel 4 – Mikrobiologische Umwandlung von Alkanen in Ketone

Einige der neu aufgefundenen und isolierten methylotrophen Mikroorganismen wurden aerob in einem Nährmedium mit Methan in der in Beispiel 1 beschriebenen Weise gezüchtet und die gewaschenen Zellen zur Umwandlung von Propan in Aceton und von Butan in 2-Butanon unter Anwendung der gleichen Arbeitsweise für die Substrat-Oxydation, wie in Beispiel 1 beschrieben, verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle V aufgeführt.

Tabelle V

Mikrobiologische Umwandlung von Alkanen in Ketone

Methylotropher Mikroorganismus, Stamm-Bezeichnung	Umwandlungsgeschwindigkeit in Keton (µMol/h/mg Protein)	Substrat	Produkt
Methylobacter chroococcum (CRL M6) NRRL B-11.214	2,0	Propan	Aceton
Methylobacter bovis (CRL M1Y) NRRL B-11.216	5,0	Propan	Aceton
Methylococcus capsulatus (CRL M1) NRRL B-11.219	4,0	Propan	Aceton
Methylobacterium organophilum (CRL R6) NRRL B-11.222	3,0	Propan	Aceton
Methylosinus trichosporium (CRL 15 PM1) NRRL B-11.202	1,6	Propan	Aceton
Methylomonas rubrum (CRL 20 PM6) NRRL B-11.211	3,5	Propan	Aceton
Methylobacter chroococcum (CRL M6) NRRL B-11.214	1	Butan	2-Butanon
Methylobacter bovis (CRL M1Y) NRRL B-11.216	3	Butan	2-Butanon
Methylococcus capsulatus (CRL M1) NRRL B-11.219	2	Butan	2-Butanon
Methylobacterium organophilum (CRL R6) NRRL B-11.222	2,0	Butan	2-Butanon
Methylosinus trichosporium (CRL 15 PM1) NRRL B-11.202	1,0	Butan	2-Butanon
Methylomonas methanica (CRL 21 PM7) NRRL B-11.206	1,5	Butan	2-Butanon
Methylocystis parvus (CRL 18 PM4) NRRL B-11.203	1,0	Butan	2-Butanon

Beispiel 5 – Mikrobiologische Umwandlung von n-Pentan und n-Hexan in Methylketone durch Zellsuspensionen von mit Methan gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen

Bei diesem Beispiel wurde die Arbeitsweise des Beispiels 1 wiederholt, woei eine Anzahl Methan-verwertender methylotropher Mikroorganismen jeweils aerob in methanhaltigem Nährmedium gezüchtet wurde. Die Nährstoffe in dem Medium waren die gleichen wie in Beispiel 1, wobei Methan als Oxygenase-Enzyminduktor und Hauptkohlenstoff- und Energiequelle für das Wachstum verwendet wurde. Nach dem Wachstum wurden die Zellen geerntet und gewaschen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Ruhezellen der induzierten, mit Methan gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen wurden dann mit n-Pentan oder n-Hexan unter aeroben Bedingungen in einer gepufferten Lösung nach der Arbeitsweise des Beispiels 1 in Berührung gebracht. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Tabelle VI wiedergegeben.

Tabelle VI

Mikrobiologische Umwandlung von n-Pentan und n-Hexan in Methylketone durch Zellsuspensionen von mit Methan gezüchteten, Methan-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen

Methylotropher Mikroorganismus, Stamm-Bezeichnung [b]	Umwandlungsgeschwindigkeit (µMol/h/mg Protein) [a] n-Pentan → 2-Pentanon	n-Hexan → 2-Hexanon
Methylosinus trichosporium (CRL 15) NRRL B-11.202	0,08	0,04
Methylomonas methanica (CRL 21) NRRL B-11.206	0,06	0,01
Methylobacter vinelandii (CRL M5Y) NRRL B-11.218	0,04	0,01
Methylococcus capsulatus (CRL M1) NRRL B-11.219	0,15	0,08
Methylobacterium organophilum (CRL 26) NRRL B-11.222	0,18	0,02

[a] Die Produkte wurden durch Vergleich gaschromatographischer Retentionszeiten mit authentischen Standardproben identifiziert. Die Analyse zeigte, dass keine weitere Oxydation der Produkte erfolgte.
[b] Das Trockengewicht der Zellen betrug etwa 0,2 g/100 ml Kulturbrühe.

Beispiel 6 – Mikrobiologische Umwandlung von linearen C_3–C_6-sec.-Alkoholen in Methylketone durch Zellsuspensionen von mit Methanol gezüchteten, Methan-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen

In diesem Beispiel wurde die Arbeitsweise des Beispiels 1 wiederholt, mit der Ausnahme, dass eine Anzahl Methan-verwertender methylotropher Mikroorganismen jeweils aerob in einem methanolhaltigen Nährmedium anstelle eines methanhaltigen Nährmediums gezüchtet wurde. Die Nährstoffe in dem Medium waren die gleichen wie in Beispiel 1, mit der Ausnahme, dass 0,4 Vol./Vol.-% Methanol als Alkohol-Dehydrogenaseenzym-Induktor und Hauptkohlenstoff- und Energiequelle für das Wachstum verwendet wurden. Nach dem Zellenwachstum wurde geerntet und gewaschen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Ruhezellen der induzierten, mit Methanol gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen wurden dann mit einem sec.-Alkohol unter aeroben Bedingungen in einer Pufferlösung nach der in Beispiel 1 beschriebenen Arbeitsweise in Berührung gebracht. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Tabelle VII gezeigt.

Tabelle VII

Mikrobiologische Umwandlung von C_3–C_6-sec.-Alkoholen in Methylketone durch Zellsuspensionen von mit Methanol gezüchteten, Methan-verwertenden methylotrophen Mikroorganismen

Methylotropher Mikroorganismus, Stamm-Bezeichnung [b]	Umwandlungsgeschwindigkeiten [a] (µMol/h/mg Protein) 2-Propanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
Methylosinus trichosporium (CRL 15) NRRL B-11.202	0,50	4,5	0,09	0,06
Methylocystis parvus (CRL 18) NRRL B-11.204	0,25	1,0	0,07	0,05
Methylomonas methanica (CRL M4P) NRRL B-11.205	2,0	2,5	0,05	0,03
Methylomonas streptobacterium (CRL 17 PM3) NRRL B-11.208	0,67	2,0	–	–
Methylobacter chroococcum (CRL M6) NRRL B-11.214	1,0	1,4	0,08	0,02
Methylobacter bovis (CRL 19) NRRL B-11.217	0,40	1,8	–	–
Methylobacter vinelandii (CRL M5Y) NRRL B-11.218	2,0	2,0	0,05	0,02

Methylotropher Mikroorganismus, Stamm-Bezeichnung [b]	Umwandlungsgeschwindigkeiten [a] (µMol/h/mg Protein) 2-Propanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
Methylococcus capsulatus (CRL M1) NRRL B-11.219	5,0	2,0	0,24	0,08
Methylococcus capsulatus (CRL 25) NRRL B-11.221	0,62	0,95	–	–
Methylobacterium organophilum (CRL 26) NRRL B-11.222	0,72	2,5	1,0	0,09

[a] Die Produkte wurden durch Vergleich gaschromatographischer Retentionszeiten 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 7 – Mikrobiologische Oxydation von cyclischen Kohlenwasserstoffen

Methylobacter vinelandii (CRL M5Y NRRL B-11.218) wurde aerob in einem methanhaltigen Nährmedium in der in Beispiel 1 beschriebenen Weise gezüchtet, und die mit Methan gezüchteten, gewaschenen Zellen wurden unter aeroben Bedingungen mit Cyclohexan, Benzol und Toluol in Berührung gebracht. Cyclohexan wurde in Cyclohexanol mit einer Umwandlungsgeschwindigkeit von 1,5 µMol/2 h/mg Protein überführt, während im Falle von Benzol und Toluol keine oxydtive Umwandlung festgestellt wurde. Mehrere der anderen Stämme, die mit Methan gezüchtet worden waren, produzierten kein feststellbares Cyclohexanol, wenn die mit Methan gezüchteten Zellen mit Cyclohexan in Berührung gebracht wurden.

Die neu aufgefundenen und isolierten Mikroorganismen wachsen in einem Nährmedium unter aeroben Bedingungen mit kohlenstoffhaltigen Verbindungen gut. Sind die kohlenstoffhaltigen Verbindungen Oxygenase- -und/oder Alkohol-Dehydrogenase-Enzym-Induktoren, vermögen die erhaltenen ruhenden Mikrobenzellen und/oder deren Enzympräparate die Oxydationsstufe einer Reihe oxydierbarer Verbindungen (Substrate) zu erhöhen. Wird Methan als Oxygenase- und/oder Alkohol-Dehydrogenase-Enzym-Induktor und Hauptkohlenstoff- und Energiequelle verwendet, vermögen die erhaltenen ruhenden Mikrobenzellen und/oder deren Enzympräparate C_1–C_6-n-Alkane in Alkohole und Ketone, C_2–C_4-Alkene in die entsprechenden 1,2-Epoxide, lineare C_3–C_6-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone zu überführen, und Mikrobenzellen aus wenigstens einem Stamm waren in der Lage, Cyclohexan in Cyclohexanol zu überführen.

Diese Fähigkeit zur Durchführung dieser nützlichen oxydativen und/oder Alkohol-dehydrierenden Umwandlungen wurde oben sowohl hinsichtlich der obligaten, also an eine einzige Lebensbedingung gebundenen, als auch der fakultativ methylotrophen Mikroorganismen gezeigt. Im Falle entweder der obligat oder fakultativ methylotrophen Mikroorganismen, die in einem Nährmedium mit einer Methylreste liefernden oder Vorstufen-Verbindung, wie Methanol, Methylamin oder Methylformiat als Alkohol-Dehydrogenaseenzyminduktor aerob gezüchtet worden sind, vermögen die erhaltenen ruhenden Mikrobenzellen oder deren Enzympräparate nur lineare C_3–C_6-sec.-Alkohole in die entsprechenden Methylketone zu überführen. Diese induzierten Enzyme sind nicht in der Lage, C_3–C_6-Alkane in die entsprechenden Methylketone umzuwandeln, und sie sind nicht in der Lage, die C_2–C_4-Alkene in die entsprechenden 1,2-Epoxide zu überführen. In Ansatzversuchen des Epoxydationsprozesses unter Verwendung ruhender, mit Methan gezüchteter Zellen verläuft die Epoxydationsreaktion linear für wenigstens 2 h. Im Falle der Ketonproduktion verläuft die Reaktion für wenigstens 4 h linear. Das oxydierende Enzymsystem bzw. die oxydierenden Enzymsysteme der mit Methan oder Methanol gezüchteten Mikroorganismen ist bzw. sind induzierbar (durch Methan oder Methanol), und die Oxydationsprodukte sammeln sich extrazellulär an (d.h. nach der Reaktion wurden die Reaktionsgemische zentrifugiert und das gewünschte Oxydationsprodukt wurde nur in der überstehenden Fraktion und nicht im Zellkuchen gefunden).

Wie in den folgenden Beispielen gezeigt werden wird, besitzen die mit Methan gezüchteten Mikrobenzellen und deren Enzympräparate (einschliesslich zellfreie Extrakte) sowohl Oxygenase- als auch Alkoholdehydrogenase-Enzymaktivität. Vermutlich induziert das Methan selbst die Oxygenase-Enzymaktivität, und das aus der Oxydation von Methan durch die methylotrophen Mikroorganismen während des Wachstums gebildete Methanol induziert das Alkohol-Dehydrogenase-Enzym. Das induzierte Oxygenase-Enzym ist verantwortlich für die Umwandlung des C_3–C_6-Alkans in ein Oxydationszwischenprodukt, den sec.-Alkohol, während das induzierte Alkohol-Dehydrogenase-Enzym den sec.-Alkohol zu dem entsprechenden Methylketon dehydriert. Ähnlich ist das durch das mit Methan gezüchtete Substrat induzierte Monooxygenase-Enzymsystem zumindest teilweise verantwortlich für die Katalyse der Umwandlung der C_2–C_4-Alkene und von Butadien in die entsprechenden 1,2-Epoxide.

Das Epoxydationssystem – zellfreie Extrakte

Wie zuvor angegeben, können sowohl ganze Zellen als auch zellfreie Extrakte mit der Oxygenase-Enzymaktivität der mit Methan gezüchteten Methylotrophe bei der Hydroxylierungs- und Epoxydationsreaktion in Gegenwart von Luft verwendet werden. NADH und Metall (Eisen oder Kupfer) können zur Verstärkung der Aktivität zugesetzt werden, wenn die zellfreien oder reinen Enzympräparate verwendet werden. Bei Verwendung der zellfreien Enzymsysteme gemäss der Erfindung werden die Enzympräparate wie folgt hergestellt:

Herstellung der Zellfraktionen

Organismen wurden bei 30 °C in 2,8-l-Kolben mit 700 ml Mineralsalzmedium, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit Methan (Methan und Luft, 1:1 Volumenteile) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gezüchtet. Zellen wurden während des exponentiellen Wachstums durch Zentrifugieren bei 12 000 g 15 min bei 4 °C geerntet. Sie wurden zweimal mit 25 mMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, mit 5 mMol $MgCl_2$ gewaschen und im selben Puffer suspendiert. Die Zellsuspensionen bei 4 °C wurden durch einen einzigen Durchgang durch eine Französische Druckzelle (1034 bar bzw. 15 000 lb/in.^{2}) zerstört und 15 min bei 5000 g zentrifugiert, um unzerbrochene Bakterien zu entfernen. Die überstehende Lösung

(Rohextrakt) wurde dann 30 min bei 40 000 g zentrifugiert, was die Teilchenfraktion P(40) und die lösliche Fraktion S(40) lieferte. Die S(40)-Fraktion wurde dann 60 min bei 80 000 g zentrifugiert, was zur Teilchenfraktion P(80) und zur löslichen Fraktion S(80) führte. Die Teilchenfraktionen P(40) und P(80) wurden in 25 mMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, mit 5 mMol $MgCl_2$ suspendiert.

Enzymtest

Die Oxydation von Methan und Propylen durch Teilchenfraktionen P(40) und P(80) und die lösliche Fraktion S(80) wurde bei 30 °C gemessen, indem die Produktion von Methanol bzw. Propylenoxid ermittelt wurde. Die Reaktionsgemische enthielten in 1,0 ml 150 mMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, mit 5 mMol $MgCl_2$, 0,6 ml; 10 µMol NADH und Zellfraktion.

Reaktionsgemische waren in 10-ml-Röhrchen bei 4 °C enthalten. Die Röhrchen wurden mit Gummikappen verschlossen. Die Gasphase in den Röhrchen wurde abgesaugt und dann durch ein Gasgemisch aus Methan oder Propylen und Sauerstoff mit einem Volumenverhältnis von 1:1 ersetzt. Die Oxydation anderer gasförmiger n-Alkane und n-Alkene wurde wie vorstehend beschrieben untersucht. Bei flüssigen Substraten wurden 10 µl Substrat direkt verwendet. Die Röhrchen wurden dann auf einem Rotationsschüttler mit 200 UpM bei 30 °C inkubiert.

Die Produkte der Epoxydation von n-Alkenen und der Hydroxylierung von n-Alkanen wurde durch Flammenionisationsgaschromatographie unter Verwendung einer rostfreien Stahlsäule (3,65 m × 0,32 cm bzw. 12′ × ⅛″), gepackt mit 10% Carbowax 20M auf 80/100 Chromosorb W und Porapak Q-Säule getestet. Die Säulentemperatur wurde bei 120 °C isotherm gehalten. Die Trägergas-Strömungsgeschwindigkeit betrug 30 ml/min Helium. Die verschiedenen Produkte wurden durch Vergleich der Retentionszeiten und gleichzeitige Chromatographie mit authentischen Standardproben identifiziert.

Die spezifischen Aktivitäten wurden als µMol der pro Stunde und mg Protein gebildeten Produkte ausgedrückt. Protein-Konzentrationen in verschiedenen Fraktionen wurden nach der Methode von Lowry et al., J. Biol. Chem., 193, 265–275 (1951) bestimmt.

Verteilung der n-Alkane- und n-Alkene-Oxydationsaktivitäten in Zellfraktionen

Drei verschiedene Gruppen Methan-verwertender Organismen wurden ausgewählt, um die Oxydation von n-Alkanen (C_1–C_4) und n-Alkenen (C_2–C_4) in zellfreien Systemen zu untersuchen. Zellfraktionen wurden aus obligat Methan-verwertenden Organismen des Typs I, Methylomonas sp. (CRL-17, NRRL B-11.208) und Methylococcus capsulatus (Texas, ATCC 19.069); obligat Methan-verwertenden Organismen des Typs II, Methylosinus trichosporium (OB3b, NRRL B-11.196) und Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) und einem fakultativ Methan-verwertenden Bacterium, Methylobacterium sp. (CRL-26, NRRL B-11.222) hergestellt.

Tabelle VIII zeigt die Verteilung der Methan und Propylen oxydierenden Aktivität in verschiedenen, aus diesen Organismen stammenden Fraktionen. Etwa 85 bis 90% der Gesamtaktivität wurde in der P(40)-Fraktion und 10% in der P(80)-Fraktion festgestellt. Die lösliche Fraktion S(80) enthielt keinerlei Aktivität. Die spezifischen Aktivitäten für die Methan- und die Propylenoxydation in den Fraktionen P(40) und P(80) schwankte nicht wesentlich bei den verschiedenen untersuchten Organismen (Tabelle IX). Die Epoxydation von Propylen und die Hydroxylierung von Methan waren beide abhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff und NADH. NADPH oder Ascorbat und andere Elektronenträger könnten auch verwendet werden. Beide Reaktionen waren in den ersten 15 min linear, gemessen durch gaschromatographischen Produktnachweis.

Tabelle VIII

Verteilung der Propylen- und Methan-oxydierenden Aktivitäten in Zellfraktionen von Methylotrophen

Mikroorganismus	% Verteilung in der Zellfraktion Propylen-epoxydierende Aktivität [a] P(40)	P(80)	S(80)	Methan-hydroxylierende Aktivität [a] P(40)	P(80)	S(80)
Obligat Methylotrophe, Typ I						
Methylomonas sp. (CRL-17, NRRL B-11.208)	85	15	0	87	13	0
Methylococcus capsulatus (Texas, ATCC 19.069)	89	11	0	90	10	0
Obligat Methylotrophe, Typ II						
Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202)	87	13	0	88	12	0
Methylosinus trichosporium (OB3b, NRRL B-11.196)	82	18	0	83	13	0
Fakultativ Methylotroph						
Methylobacterium sp. (CRL-26, NRRL B-11.222)	85	15	0	82	18	0

[a] Die Reaktionen wurden durchgeführt wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Reaktionsprodukt wurde gaschromatographisch nach 5, 10 und 15 min Inkubation des Reaktionsgemischs bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler ermittelt.

Tabelle IX
Geschwindigkeit der Methan-Hydroxylierung und Propylen-Epoxydation in den Zellfraktionen von Methylotrophen

Mikroorganismus	Zellfraktion Propylen-oxydierende Aktivität [a] P(40)	P(80)	S(80)	Methan-oxydierende Aktivität [a] P(40)	P(80)	S(80)
Obligat Methylotroph, Typ I						
Methylomonas sp. (CRL-17, NRRL B-11.208)	2,2	2,0	0	2,9	2,7	0
Methylococcus capsulatus (Texas, ATCC 19.069)	2,6	2,0	0	3,8	3,9	0
Obligat Methylotroph, Typ II						
Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202)	3,8	3,7	0	4,8	4,2	0
Methylosinus trichosporium (OB3b, NRRL B-11.196)	2,8	2,5	0	3,1	3,0	0
Fakultativ Methylotroph						
Methylobacterium sp. (CRL-26, NRRL B-11.222)	1,2	1,1	0	2,7	2,8	0

[a] Die Reaktionen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Das Reaktionsprodukt wurde gaschromatographisch nach 5, 10 und 15 min Inkubation der Reaktionsgemische bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler ermittelt. Die Oxydationsgeschwindigkeit ist ausgedrückt als µMol gebildeten Produkts pro h und mg Protein.

Die Teilchenfraktionen P(40) und P(80) verschiedener Organismen katalysierten auch die Oxydation anderer n-Alkene (Äthylen, 1-Buten und 1,3-Butadien) zu den entsprechenden 1,2-Epoxiden und die Hydroxylierung von Methan und Äthan zu den entsprechenden Alkoholen. Tabelle X zeigt die Oxydationsgeschwindigkeit verschiedener n-Alkane und n-Alkene durch die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202). Das Oxydationsprodukt wurde gaschromatographisch nach Inkubieren der P(40)-Fraktion mit verschiedenen Substraten bei 30 °C für 10 min identifiziert.

Tabelle X
Oxydation von n-Alkenen und n-Alkanen durch P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202)

Substrat	Produkt	Produktbildungsgeschwindigkeit [a] (µMol/h/mg Protein)
Äthylen	Äthylenoxid	1,27
Propylen	Propylenoxid	4,1
1-Buten	Epoxybutan	2,18
Butadien	Epoxybuten	0,63
1-Penten	–	0
Methan	Methanol	4,8
Äthan	Äthanol	3,2

[a] Die Reaktionen wurden durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Reaktionsprodukt wurde gaschromatographisch nach 5, 10 und 15 min Inkubation des Reaktionsgemischs bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler ermittelt.

Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) wurde zu weiteren Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Methan- und Propylen-oxydierenden Aktivitäten in zellfreien Systemen ausgewählt.

Einfluss der Konzentration der Teilchenfraktion

Der Einfluss der Konzentration der P(40)-Teilchenfraktion auf die Hydroxylierung von Methan und die Epoxydation von Propylen wurde untersucht. Die Produktion von Methanol und Propylenoxid war direkt abhängig von der Konzentration der Teilchenfraktion im Bereich von 1–6 mg Protein/ml. Die Reaktionsgeschwindigkeit sank bei weiterer Erhöhung der Teilchenprotein-Konzentration auf 8 mg/ml ab.

Zeitverlauf der Reaktionen

Die Geschwindigkeit der Bildung von Methanol und Propylenoxid durch Hydroxylierung von Methan bzw. Epoxydation von Propylen durch die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) war mit der Zeit bis zu 15 min linear.

Einfluss des pH-Werts

Der Einfluss des pH auf die Hydroxylierung von Methan und die Epoxydation von Propylen durch die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) wurde durch Ermitteln der Menge an gebildetem Methanol und Propylenoxid nach 10 min Inkubation der Reaktionsgemische untersucht. Der optimale pH sowohl für die Hydroxylierung von Methan als auch die Epoxydation von Propylen war 7,0. Bei der Durchführung dieser Tests wurden die Reaktionen durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Reaktionsprodukt wurde gaschromatographisch nach 5, 10 und 15 min Inkubation des Reaktionsgemischs bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler ermittelt. 100% Aktivität entspricht 4,8 bzw. 4,1 µMol gebildeten Methanols bzw. Propylenoxids pro h und mg Protein.

Einfluss der Temperatur

Der Einfluss der Temperatur auf die Produktion von Methanol und Propylenoxid durch die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) wurde nach Inkubation der Reaktionsgemische für 10 min bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Die Optimaltemperatur für die Epoxydation von Propylen und die Hydroxylierung von Methan wurde zu 35 °C ermittelt. Bei der Durchführung dieser Tests wurden die Reaktionen durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Reaktionsprodukt wurde gaschroma-

tographisch nach 5, 10 und 15 min Inkubation des Reaktionsgemischs bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler ermittelt. 100% Aktivität entspricht 5,0 bzw. 4,2 µMol gebildeten Methanols bzw. Propylenoxids pro h und mg Protein.

Einfluss der Lagerung

Es wurde festgestellt, dass sowohl die Aktivität zur Hydroxylierung von Methan als auch zur Epoxydation von Propylen durch die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) bei Lagerung bei Kühltemperatur (0 bis 4 °C) gleichzeitig abnahm. Bei der Durchführung dieser Tests wurden die Reaktionen durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Reaktionsprodukt wurde gaschromatographisch nach 5, 10 und 15 min Inkubation des Reaktionsgemischs bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler ermittelt. 100% Aktivität entspricht 4,8 bzw. 4,1 µMol des gebildeten Methanols bzw. Propylenoxids pro h und mg Protein.

Einfluss der Inhibitoren

Es wurde berichtet, dass die Oxydation von Methan durch Zellsuspensionen von Methan-verwertenden Bakterien durch verschiedene Metall-bindende oder Metall-chelatisierende Mittel inhibiert wurde (Patel et al., J. Bacteriol. 126, 1017–1019 [1976]). So wurde der Einfluss von Inhibitoren auf die Methan- und Propylen-oxydierenden Aktivitäten durch die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL-B.11.202) untersucht. Die Produktion von Methanol und Propylenoxid wurde durch verschiedene Metall-bindende Verbindungen mit unterschiedlichen Ligandenkombinationen inhibiert, z.B. Stickstoff-Stickstoff (α,α-Bipyridyl), Sauerstoff-Stickstoff (8-Hydroxychinolin) und Schwefel-Stickstoff (Thioharnstoff, Thiosemicarbazid), wie in Tabelle XI gezeigt. Dies lässt die Beteiligung von Metallion(en) bei der Oxydation sowohl der Hydroxylierung von Methan als auch der Epoxydation von Propylen vermuten. Ähnlich hemmen auch, wie in Tabelle XIa gezeigt, diese Verbindungen die Hydroxylierung von Methan und die Epoxydation von Propylen bei Verwendung zellhaltiger Enzympräparate.

Tabelle XI

Einfluss von Inhibitor auf die Aktivität zur Epoxydation von Propylen und Hydroxylierung von Methan durch Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202)

Inhibitor	Konzentration (m)	% Hemmung [a] Propylen-Epoxydierungsaktivität	Methan-Hydroxylierungsaktivität
Kontrolle	–	0	0
α,α-Bipyridyl	10^{-3}	98	99
1,10-Phenanthrolin	10^{-3}	93	90
Kaliumcyanid	10^{-3}	98	100
Thiosemicarbazid	10^{-3}	97	100
Thioharnstoff	10^{-3}	98	98
8-Hydroxychinolin	10^{-3}	75	80

[a] Die Reaktionen wurden durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Reaktionsprodukt wurde gaschromatographisch nach 5, 10 und 15 min Inkubation des Reaktionsgemischs bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler ermittelt. Die nichtinhibierten Oxydationsgeschwindigkeiten für Methan und Propylen waren 4,5 zw. 4,1 µMol des gebildeten Methanols bzw. Propylenoxids pro h und mg Protein in P(40)-Fraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202).

Einfluss von Metallen

Da die Methan-Monooxygenase aus Methan-verwertenden Bakterien ein kupfer- oder eisenhaltiges Protein ist (Tonge et al., J. Biochem., 161, 333–344 [1977]), wurde nun der Einfluss von Kupfer- und Eisensalzen auf die Oxydation von Methan und Propylen durch die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) untersucht. Die Geschwindigkeit der Hydroxylierung von Methan zu Methanol und der Epoxydation von Propylen zu Propylenoxid wurde in Gegenwart von zugesetzten Kupfersalzen zweifach erhöht (Tabelle XII).

Tabelle XIa

Einfluss von Inhibitoren auf die Epoxydation von Propylen und die Hydroxylierung von Methan

Inhibitor	% Hemmung Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196)		Methylococcus capsulatus (CRL M1, NRRL B-11.219)		Methylobacterium organophilum (CRL 26, NRRL B-11.222)	
	Epoxydation	Hydroxylierung	Epoxydation	Hydroxylierung	Epoxydation	Hydroxylierung
Thioharnstoff	100	100	100	100	100	100
1,10-Phenanthrolin	90	92	95	95	90	90
α,α-Bipyridyl	100	90	100	100	100	100
Imidazol	95	90	95	95	100	100
Kaliumcyanid	100	100	100	100	95	95

Die Reaktionen wurden durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Produkte wurden gaschromatographisch nach 1 h Inkubation bei 30 °C ermittelt. Jeder Inhibitor wurde mit einer Endkonzentration von 1 mMol zugesetzt.

Tabelle XII
Einfluss von Metallen auf die Aktivität zur Epoxydation von Propylen und Hydroxylierung von Methan durch Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202)

Metall	Konzentration (m)	Propylen-oxydierende Aktivität [a] (µMol/h/mg Protein)	Methan-oxydierende Aktivität [a] (µMol/h/mg Protein)
Kontrolle	–	4,5	4,0
Eisen(III)chlorid	10^{-3}	5,8	4,8
Eisen(II)sulfat	10^{-3}	5,9	4,8
Kupfer(I)chlorid	10^{-3}	9,2	7,2
Kupfer(II)sulfat	10^{-3}	9,0	7,1

[a] Die Reaktionen wurden durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Reaktionsprodukt wurde gaschromatographisch nach 5, 10 und 15 min Inkubation des Reaktionsgemischs bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler ermittelt. Die Oxydationsgeschwindigkeiten wurden als µMol des gebildeten Produkts pro h und mg Protein in P(40)-Fraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) ausgedrückt.

Substrat-Konkurrenzversuche

Die Hydroxylierung von Methan und die Epoxydation von Propylen durch Teilchenfraktionen von Methan-verwertenden Bakterien erforderte Sauerstoff und NADH. Die Frage, ob dasselbe oder ein ähnliches Enzym bei der Oxydation beider Substrate beteiligt war, wurde durch Substrat-Konkurrenzversuche untersucht. Der Versuch bestand im Bestimmen des Einflusses von Methan auf die Oxydation von Propylen zu Propylenoxid durch die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202). Wie in Tabelle XIII gezeigt, ergab sich in Gegenwart von Methan eine Herabsetzung der Menge an gebildetem Propylenoxid. Folglich hemmte Methan die Umwandlung von Propylen in Propylenoxid, vermutlich durch Konkurrieren um die verfügbare enzymatische Stelle.

Tabelle XIII
Einfluss von Methan auf Propylen-Epoxydationsaktivität durch P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202)

Substrat	gebildetes Propylenoxid [a] (µMol/h/mg Protein)
Propylen	4,3
Propylen + Methan (1:1, Vol./Vol.)	1,8
Methan	0

[a] Die Reaktionen wurden durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Reaktionsprodukt wurde gaschromatographisch nach 5, 10 und 15 min Inkubation des Reaktionsgemischs bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler ermittelt.

Ebenso beeinträchtigt Methan die Epoxydation von Propylen aus Zellsuspensionen von mit Methan gezüchteten Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196), wie in Tabelle XIIIa gezeigt.

Tabelle XIIIa
Einfluss von Methan auf die Epoxydation von Propylen [a]

Zusammensetzung der Gasphase	gebildetes Propylenoxid (µMol)	% Hemmung
Propylen + Helium + O_2 (25:25:50 Vol./Vol.)	1,6	0
Propylen + Methan + O_2 (25:25:50 Vol./Vol.)	0,8	50

[a] Die Reaktionen wurden durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit der Ausnahme, dass verschiedene gasförmige Zusammensetzungen verwendet wurden, um einen konstanten Propylen-Partialdruck aufrechtzuerhalten. Zellsuspensionen von mit Methan gezüchtetem Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196) (3,6 mg) wurden verwendet. Propylenoxid wurde gaschromatographisch nach 15 min Inkubation ermittelt.

Stöchiometrie der Propylen- und Methanoxydation

Die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) wurde zur Bestimmung der Stöchiometrie der Hydroxylierungs- und Epoxydationsreaktion verwendet. Die Stöchiometrie der Methan- oder Propylen-abhängigen NADH-Oxydation, des Sauerstoffverbrauchs und der Produktbildung war etwa 1:1:1, Tabelle XIV. Dies steht im Einklang mit einer Katalyse der Methan- oder Propylen-Oxydation durch eine Monooxygenase.

Tabelle XIV
Stöchiometrie der Propylen-Epoxydation und Methan-Hydroxylierung durch die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) [a]

Substrat (µMol)	gebildetes Produkt (µMol)	oxydierte NADH (µMol)	verbrauchter O_2 (µMol)
Propylen	Propylenoxid		
0,5	0,45	0,5	0,48
Methan	Methanol		
0,5	0,42	0,48	0,46

[a] Unter identischen Reaktionsbedingungen erfolgte die Ermittlung von oydiertem NADH spektrophotometrisch, die Ermittlung von verbrauchtem Sauerstoff wurde polarographisch gemessen und die Ermittlung gebildeten Produkts erfolgte gaschromatographisch.

Zum Vergleich wurde die Stöchiometrie der Epoxydation von Propylen durch eine Zellsuspension von Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196) wie folgt bestimmt: Das Reaktionsgemisch (3,0 ml) enthielt 0,05 m Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, und 3,6 µMol Propylen. Die Reaktion wurde durch Injektion von 0,1 ml Zellsuspension (3,1 mg Protein) gestartet. Eine Korrektur erfolgte für den endogenen Sauerstoffverbrauch. Die Menge bei der Reaktion (3 min) verbrauchten Sauerstoffs wurde polarographisch mi einer Clark-Sauerstoffelektrode bestimmt. Das verbrauchte Propylen und das gebildete Propylenoxid wurde gaschromatogra-

phisch ermittelt. Der Propylen-Verbrauch betrug 0,29 µMol, der Sauerstoff-Verbrauch 0,30 µMol und das gebildete Propylenoxid machte 0,28 µMol aus.

Um weiter nachzuweisen, dass die Enzymaktivität in der Teilchenfraktion sitzt (nicht in der überstehenden Flüssigkeit), wurden die folgenden Versuche durchgeführt: Zellen von mit Methan gezüchtetem Methylococcus capsulatus (CRL M1, NRRL B-11.219) wurden nach der Methode des Beispiels 1 erhalten. Der Rohextrakt nach Zentrifugieren bei 10 000 g von durch Schall aufgebrochenem Material (3 × 50 s, Ultraschalloszillator, Modell W 201 der Wave Energy Systems Inc.) zeigte keine Aktivität, weder für die Epoxydation noch für die Hydroxylierung. Wurden die Zellen jedoch durch zweifachen Durchgang durch eine Französische Druckzelle (1000 kp Druck) aufgebrochen, fanden sich beide Aktivitäten im Rohextrakt nach Zentrifugieren mit 10 000 g. Die gesamte Aktivität im Rohextrakt wurde als Teilchenfraktion durch weiteres Zentrifugieren des Rohextraks bei 40 000 g für 90 min bei 4 °C gesammelt. NADH stimulierte sowohl die Epoxydations- als auch die Hydroxylierungsreaktion, wie in Tabelle XV gezeigt.

Tabelle XV

Epoxydations- und Hydroxylierungsaktivitäten in zellfreien Fraktionen von Methylococcus capsulatus (CRL M1, NRRL B-11.219) [a]

Zellfreie Fraktionen	Oxydationsgeschwindigkeit (nMol/30 min/Probe) Epoxydation von Propylen	Hydroxylierung von Methan
(1) Teilchenfraktion (10 000–40 000 g)	750	500
(1) + NADH	900	650
(2) überstehende Fraktion von 40 000 g	0	0
(2) + NADH	0	0

[a] Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, durch eine Französische Druckzelle aufgebrochen. NADH (2,5 µMol) wurde, wo angegeben, in das Reaktionsgemisch gegeben. Die Proteinmenge in der Teilchenfraktion und der verwendeten überstehenden Flüssigkeitsfraktion bei 40 000 g war 1 mg bzw. 2,5 mg. Jede Probe enthielt 0,5 ml Reaktionsgemisch.

Zusammenfassung des Epoxydationssystems

Sowohl das System von Pseudomonas aeruginosa, nachgewiesen von Van der Linden, Biochim. Biophys. Acta, 77, 157–159 (1963) als auch das System von Pseudomonas oleovorans, Abbott und Hou, App. Microbiol., 26, 86–91 [1973] epoxydierten flüssige 1-Alkene von C_6–C_{12}, nicht aber gasförmige Alkene.

Das erfindungsgemässe Verfahren führt zur Epoxydation von Äthylen, Propylen, 1-Buten und Butadien durch Zellsuspensionen aller drei verschiedenen Gruppen Methan-verwertender Bakterien. Die Epoxydation von Alkenen und die Hydroxylierung von Methan wurden unter anaeroben Bedingungen oder in mit Methanol gezüchteten Zellen nicht gefunden, was vermuten lässt, dass das Enzymsystem induzierbar ist. Die Produkt-1,2-Epoxide sammelten sich extrazellulär an. Der nicht-enzymatische Abbau von Propylenoxid in dem offenbarten Testsystem war selbst nach verlängerter Inkubationszeit nicht erheblich. Van der Linden, a.a.O., wies die Produktion von 1,2-Epoxyoctan aus 1-Octen durch mit Heptan gezüchteten Zellen von Pseudomonas sp. nach und stellte auch fest, dass das Epoxid enzymatisch nicht weiter oxydiert wurde. May und Abbott, Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1230–1234 (1972) und J. Biol. Chem., 248, 1725–1730 (1973) berichteten jedoch, dass, wenn 1-Octen als Substrat dem ω-Hydroxylierungs-Enzymsystem von P. oleovorans zugeführt wurde, sowohl 8-Hydroxyl-1-octen als auch 1,2-Epoxyoctan entstanden. Ausserdem fanden Abbott und Hou, a.a.O., dass die Methylgruppe der letzteren Verbindung auch für die Hydroxylierung empfänglich war. Die vorliegenden, aus den Untersuchungen lebensfähiger Zellsuspensionen der Methan-verwertenden Bakterien erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch, dass Propylenoxid enzymatisch nicht weiter im Stoffwechsel verarbeitet wurde.

Van der Linden, a.a.O., zeigte, dass die Epoxid-Ansammlung aus 1-Octen durch Pseudomonas aeruginosa vom Stoffwechsel einer grossen Menge 1-Octen über Methylgruppen-Epoxydation begleitet wurde. Bei der Epoxydation von Propylen durch Zellsuspensionen von Methan-verwertenden Bakterien jedoch wurde keine Bildung von 3-Hydroxy-propen-1 festgestellt.

Sowohl die Epoxydation der C_2–C_4-1-Alkene als auch die Hydroxylierung von Methan mit den Zellsuspensionen wurde durch verschiedene Metall-bindende und Metall-chelatisierende Mittel gehemmt, was die Beteiligung von metallhaltigen Enzymsystem(en) belegt. Das ähnliche Ausmass der Hemmung sowohl für Propylen- als auch für Methanoxydation (Tabelle XIa) zeigte an, dass die Epoxydations- und Hydroxylierungsreaktion durch das gleiche oder ein ähnliches Enzymsystem katalysiert sein kann. Die Epoxydation von Propylen zu Propylenoxid durch eine Zellsuspension eines mit Methan gezüchteten Stamms von Methylococcus capsulatus NRRL B-11.219 wurde in Gegenwart des Hydroxylierungssubstrats, Methan (Tabelle XV) inhibiert (50%). Dies lässt klar eine Konkurrenz zwischen dem Hydroxylierungssubstrat und dem Epoxydationssubstrat für ein einzelnes Enzymsystem erkennen. Wahrscheinlich katalysiert das Methan-Monooxygenase-Enzymsystem sowohl die Epoxydation von Alken als auch die Hydroxylierung von Methan. In den Veröffentlichungen von May und Abbott, a.a.O., wird berichtet, dass das ω-Hydroxylierungssystem aus Pseudomonas oleovorans sowohl die Epoxydation von 1-Octen als auch die Hydroxylierung von n-Octan katalysiert.

Die Optimalbedingungen für die In-vivo-Epoxydation von Propylen durch Zellsuspensionen der drei verschiedenen Gruppen Methan-verwertender Bakterien sind recht ähnlich. Die pH-Optima waren etwa 6 bis 7 und die Temperatur-Optima um 35 °C. Die zutage tretende Abnahme der Epoxydation über 40 °C mag sowohl auf der Instabilität des Monooxygenasesystems als auch der Flüchtigkeit des Produkts Propylenoxid (Sdp. 35 °C) beruhen.

Sowohl die Hydroxylierungs- als auch die Epoxydationsaktivitäten sitzen in der zellfreien Teilchenfraktion, die durch Zentrifugieren zwischen 10 000 und 80 000 g ausfällt. Tonge et al., Biochem. J., 161, 333–344 (1977) und FEBS Lett., 58, 293–299 (1975) haben über die Reinigung einer membrangebundenen Methan-Monooxygenase aus der Teilchenfraktion (durch Zentrifugieren zwischen 10 000 und 150 000 g sedimentiert) von Methylosinus trichosporium OB3b berichtet. Kürzlich, aber nach den vorliegenden Erkenntnissen, haben Colby et al., Biochem. J., 165, 395–402 (1977) eine einzigartige lösliche Methan-Monooxygenase aus Methylococcus capsulatus (Stamm Bath) nachgewiesen, die die Oxydation von n-Alkanen, n-Alkenen, Äthern und alicyclischen, aromatischen und heterocyclischen Verbindungen katalysiert. Die Stämme der drei verschiedenen Gruppen Methan-verwertender Bakterien, die vorliegend untersucht wurden, katalysieren alle die Epoxydation von gasförmigen Alkenen (C_2–C_4) und die Hydroxylierung gasförmiger Alkane (C_1–C_4). Auch wurde nun unerwarteterweise gefunden, dass die Enzymaktivität in der Teilchenfraktion liegt (d.h. in dem Material, das sich

absetzt, wenn die überstehende Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren aufgebrochener Zellen bei 10 000 g für 30 min 1 h bei 10 000 g oder darüber zentrifugiert wird), nicht in der löslichen Fraktion (d.h., der überstehenden Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren gebrochener Zellen bei 80 000 g oder darüber für 1 h).

Differentielles Zentrifugieren von Suspensionen aufgebrochener Zellen von Methylomons sp. (CRL-17, NRRL B-11.208) und Methylococcus capsulatus (Texas ATCC 19.069), (Typ I, obligate Methylotrophe); Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202) und Methylosinus trichosporium (OB3b, NRRL B-11.196) (Typ II, obligate Methylotrophe); und Methylobacterium sp. CRL-26, NRRL B-11.222) (ein fakultativer Methylotroph), lieferte zellfreie Teilchenfraktionen, die die Hydroxylierung von n-Alkanen und die Epoxydation von n-Alkenen katalysierten. Beide Aktivitäten lagen hauptsächlich in der P(40)-Fraktion und hingen von der Anwsesenheit von Sauerstoff sowie eines Elektronenträgers, z.B. NADH, ab.

Die Hydroxylierung von Methan zu Methanol und die Epoxydation von Propylen zu Propylenoxid, katalysiert durch die P(40)-Teilchenfraktion von Methylosinus sp. (CRL-15, NRRL B-11.202), haben ähnliche pH- und Temperatur-Optima. Beide Aktivitäten gingen gleichzeitig bei der Lagerung der P(40)-Teilchenfraktion bei Kühlschranktemperatur verloren.

Die Hydroxylierung von Methan und die Epoxydation von Propylen mit den zellfreien Extrakten wurden durch verschiedene Metall-bindende oder Metall-chelatisierende Mittel stark gehemmt (Tabelle XI). Die Geschwindigkeit beider Reaktionen wurde in Gegenwart von Kupfer- oder Eisensalzen zweifach erhöht (Tabelle XII). Dies lässt die Beteiligung eines metallhaltigen Enzymsystems bei der Oxydation beider Substrate vermuten. Diese Ergebnisse und die Stöchiometrie der Hydroxylierungs- und der Epoxydationsreaktion zeigen an, dass beide Reaktionen durch das gleiche metallhaltige Monooxygenasesystem katalysiert sein mögen. Die Tatsache, dass die Umwandlung von Propylen in Propylenoxid durch Methan inhibiert wurde, unterstützt diese Vorstellung.

Es wurde berichtet, dass die zellfreien Teilchenfraktionen, die aus Methylococcus capsulatus (Texas) (Ribbons et al., J. Bacteriol., 122, 1351–1363 [1975]), Methylomonas methanica (Ferenci et al., J. Gen. Microbiol., 91, 79–91 [1975]) und Methylosinus trichosporium (OB3b) (Tonge et al., Biochem. J., 161, 333–344 [1977]) stammten, die Sauerstoff- und NADH-abhängige Oxydation von Methan, Äthan, Propan, Butan und Kohlenmonoxid katalysierten. Die Oxydation von Methan durch Teilchenfraktionen dieser Organismen wurde durch verschiedene Metall-bindende oder Metall-chelatisierende Mittel gehemmt. Die Epoxydation von n-Alkenen wurde jedoch für diese Organismen nicht berichtet.

Die Methan-Monooxygenase aus Methylosinus trichosporium (OB3b, NRRL B-11.196) wurde gereinigt und als aus drei Komponenten bestehend nachgewiesen: einem löslichen CO-bindenden Cytochrom c, einem kupferhaltigen Protein (Methan-Monooxygenase) und einem niedermolakularen Protein (Tonge et al., 1977, a.a.O.).

Im Gegensatz zu den obigen Organismen haben Colby et al., a.a.O., von der einzigartigen löslichen Methan-Monooxygenase-Aktivität aus Methylococcus capsulatus (Bath) berichtet. Die Oxydation von Methan durch die lösliche Fraktion dieses Organismus wurde durch verschiedene Metall-bindende Mittel nicht gehemmt. Kürzlich lösten Colby und Dalton (Biochem. J., 171, 461–468 [1978]) die Methan-Monooxygenase von Methylococcus capsulatus (Bath) in drei Komponenten auf und identifizierten eine der Komponenten als ein eisenhaltiges Flavoprotein.

Die Emthan-oxydierenden Aktivitäten aus den oben beschriebenen methylotrophen Bakterien liegen in der Teilchenfraktion und unterscheiden sich von der löslichen Aktivität von Methylococcus capsulatus (Bath), von Colby et al. offenbart.

Van der Linden (1963, a.a.O.) wies die Produktion von 1,2-Epoxiden aus 1-Octen durch mit Heptan gezüchtete Ruhezellen von Pseudomonas sp. nach. Epoxide wurden nicht als Produkte des Alkan-Stoffwechsels nachgewiesen und wurden nicht durch Pseudomonas sp. oxydiert. So ist die Rolle von Epoxiden beim Alkan-Stoffwechsel ungewiss. Van der Linden postulierte, dass das Enzymsystem, das Epoxide bildet, das gleiche sein kann, wie das System, das die Anfangsoxydation von Alkanen katalysiert. Cardini und Jurtshuk (J. Biol. Chem., 245, 2789–2796 [1970]) fanden, dass ein zellfreier Extrakt von Corynebacterium sp. die Oxydation von 1-Octen zu Epoxyoctan zusätzlich zur Hydroxylierung von Octan zu Octanol bewirkte. McKenna und Coon (J. Biol. Chem., 245, 3883–3889 [1970]) isolierten ein Enzymsystem aus Pseudomonas oleovorans, das die Hydroxylierung von n-Alkanen (C_6–C_{12}) und Fettsäuren katalysierte. Später berichteten Abbott und Hou, a.a.O. und May und Abbott, a.a.O., dass das Enzymsystem aus Pseudomonas oleovorans auch die Epoxydation von 1-Alkenen zusätzlich zu den Hydroxylierungsreaktionen katalysierte. Die Enzymsysteme von Pseudomonas und Corynebacterium sp. katalysierten die Epoxydation von C_6–C_{12}-n-Alkenen. Die Epoxydation von C_2–C_5-n-Alkenen wurde durch die Enzymsysteme von Pseudomonas nicht katalysiert.

Unerwarteterweise konnte nun gezeigt werden, dass die drei verschiedenen Gruppen Methan-oxydierender Bakterien die Hydroxylierung von n-Alkanen (C_1–C_4) sowie die Epoxydation von n-Alkenen (C_2–C_4) katalysieren. Ferner werden die Hydroxylierungs- und die Epoxydationsreaktion durch die gleiche oder eine ähnliche NADH-abhängige Monooxygenase katalysiert.

Ausser den methylotrophen Bakterien können andere Mikroorganismen zur Durchführung der Epoxydation von C_2–C_4-Alkenen verwendet werden. Dazu gehören Bakterien, Fungi und Hefen, die auf kurzkettigen Alkanen wachsen. Die (obligat oder fakultativ) methylotrophen Bakterien oder die anderen Mikroorganismen werden entweder mit Methan als einziger Kohlenstoffquelle oder einer anderen Kohlenstoffverbindung (in Gegenwart von Methan oder einem anderen Induktor) gezüchtet, und die Zellen oder aus ihnen stammenden Enzyme können beim erfindungsgemässen Verfahren verwendet werden.

Alkohol-Oxydationssysteme

Wie oben (Tabelle IX) gezeigt und erörtert, oxydierten (dehydrierten) Zellsuspensionen von mit Methan und Methanol gezüchteten Mikrobenzellen C_3–C_6-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 C_1-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 C_1-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 (a.a.O.).

Nachfolgend sind Tests zusammengefasst, die zu den Optimalbedingungen für die Produktion von Methylketonen aus C_3–C_6-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 in 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(hydroxymthyl)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 R6 (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 XVI gezeigt.

Tabelle XVI

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)

Metallchelatbildner	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 oxydiert; 2-Pentanol, 2-Hexanol und 2-Heptanol wurden mit viel geringerer Geschwindigkeit oxydiert. 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 oxydierten 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 XVIII gezeigt. Dies ist der erste Bericht über eine NAD-abhängige sec.-Alkohol-Dehydrogenase.

Die experimentelle Arbeitsweise für die in Tabelle XVII 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 dMol 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 XVII angegeben) für Extrakte, die aus mit CH_3NH_2 und $HCOOCH_3$ gezüchteten Mikroben stammten, wurden auch erhalten.

Tabelle XVII

Oxydation von 2-Butanol zu 2-Butanon durch zellfreie lösliche Extrakte von C_1-verwertenden Mikroben [a]

Mikroben	Wachstumssubstrat	Umwandlungsgeschwindigkeit (nMol/min/mg Protein)
Obligate Methylotrophe		
Membranstruktur Typ I		
Methylosinus trichosporium OB3b (NRRL B-11.196)	CH_4	4,5
dito	CH_3OH	2,4
Membranstruktur Typ II		
Methylococcus capsulatus CRL M1 (NRRL B-11.219)	CH_4	3,2
dito	CH_3OH	2,0
Fakultativ Methylotroph		
Methylobacterium organophilium CRL 26 (NRRL B-11.222)	CH_4	1,8
dito	CH_3OH	2,5
Obligater Methanol-Verwerter		
Pseudomonas sp. CRL 75 ATCC 21439	CH_3OH	25,0
Hefe		
Hansenula polymorpha ATCC 26012	CH_3OH	23,2

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

Tabelle XVIII

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 Dithiothretol (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 zugetropft. 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 Material 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 elmiert. Dieses DEAE-CelluloseEluat 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 x 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 Röhrchen 8 bis 12 lokalisiert. Eine Zusammenfassung der Reinigungsschritte ist in Tabelle XIX wiedergegeben.

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

Massnahmen	Volumen (ml)	Protein (mg)	Spezif. 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
$(NH_4)_2SO_4$ (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 C_3–C_6-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 XIX angeführte Arbeitsweise zur Reinigung kann dadurch abgewandelt werden, dass man die Wärmebehandlung weglässt. Die Gegenwart eines Reduktionsmittels, wie Dithrothretol, im Dialysepuffer hat sich als während der Dialyse des zwischen 30 und 60% $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung ausgefällten Materials wesentlich erwiesen. Bei einem speziellen Experiment wurde die Affi-Gel-Blue-Säule auf eine Grösse von 2,5 x 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 halbautomatischen 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 Ultrafiltrationsmembran 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 $>0{,}02$ µg bzw. $>0{,}5$ µg/cm². Metallanalysen an den gereinigten, von Bakterien stammenden SADH-Enzymen nach dieser Technik zeigten 0,7 µg Zink/cm² 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% Gelsystem 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 ähnlich. 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 $1{,}1 \times 10^{-5}$ 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 gereingiten 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), hemmten 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, Acetaldehyd, 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 XX 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 XX
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 aus 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_1 NRRL Y-11.419 und Kloeckera sp. Stamm A_2 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.

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 zellfrien 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 gereinigten SADH etwa 95 000 (nach der Biogel-Säulenchromatographie) ist, aber je nach angewandten Reinigungsarbeitsweisen, Stämmen und Versuchsfehlern um ±3000 variieren kann.

Die Aktivität der gereinigten, aus Hefe stammenden SADH wurde durch Sulfhydryl-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	2,5 g
NH_4NO_3	2,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g
KCl	0,04 g
$CaCl_2$	0,015 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1,00 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01 mg
H_3BO_3	0,02 mg
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0,04 mg
$ZnSO_4$	0,14 mg
MoO_3	0,02 mg
Hefeextrakt	1,0 g
Methanol	4 ml

[a] Die Zusammensetzung gilt für 1 l.

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.-Alkohol (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 XXI 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).

Tabelle XXI
Oxydation von sec.-Alkoholen zu Ketonen durch Zellsuspensionen von Hefen [a]

Organismus	Wachstumssubstrat	Umwandlungsgeschwindigkeit (µMol/h/mg Protein) Isopropanol → Aceton	2-Butanol → 2-Butanon	2-Pentanol → 2-Pentanon	2-Hexanol → 2-Hexanon
Candida utilis 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
Hansenula polymorpha 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
Pichia sp. 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
Torulopsis sp. 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
Kloeckera sp. 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 aufeine 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-Fraktionen wurden aufgefangen. Fraktionen 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. Fraktionen 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 µMol 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 Flammenionisations-Gaschromatographie unter Verwendung einer rostfreien Stahlsäule (3,65 m x 3,2 mm bzw. 12 Fuss x ⅛ 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 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.

Zellfreie Extrakte, die aus Hefen, Candida utilis ATCC 26.387, Hansenula polymorpha ATCC 26.012, Pichia sp. NRRL Y-11.328, Torulopsis sp. Stamm A_1 NRRL Y-11.419 und Kloeckera sp. Stamm A_2 NRRL y-11.420, mit Methanol gezüchtet, stammten, katalysierten eine NAD^+-abhängige 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 XXII wiedergegeben. Oxydation 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 A_1 bzw. Kloeckera sp., Stamm A_2 NRRL Y-11.420 unter Verwendung von 2-Butanol als Substrat erhalten.

Tabelle XXII
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
Candida utilis ATCC 26.387	4,5	4,92	0,82	0,45
Hansenula polymorpha ATCC 26.012	4,8	5,2	1,0	0,51
Pichia sp. NRRL-Y-11.328	5,5	6,2	1,2	0,60
Torulopsis sp. Stamm A_1 NRRL-Y-11.419	4,5	4,9	1,0	0,21
Kloeckera 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 XXIII 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 oxydiert.

Das gereinigte Enzym brauchte NAD^+ als Elektronenakzeptor. NADP, Phenazinmethosulfat, Kaliumferricyanid, Cytochrom c, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Flavin-adenindinucleotid konnten nicht als Elektronenträger wirken.

Verschiedene, durch sec.-Alkohol-Dehydrogenase nicht oxydierte primäre Alkohole wurden als potentielle Inhibitoren der Enzymaktivität untersucht. Die Enzymaktivität wurde 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-Aktivität wurde auch durch Schwermetalle, wie Silbernitrat, Quecksilber(II)-thiocyanat und Kupfer(II)sulfat, gehemmt.

Tabelle XXIII
Reinigung von sec.-Alkohol-Dehydrogenase aus Pichia sp. NRRL Y-11.328 [a]

Stufe	Volumen (ml)	Protein (mg)	Einheiten	Spezif. 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 XXIV wiedergegeen.

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

Substrat (µMol)		NAD^+ reduzierte [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

Sowohl Zellsuspensionen (Teilchenfraktion) als auch zellfreie Teilchenfraktionen von mit Methan gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen vermögen die Umwandlung von C_3–C_6-n-Alkanen in die entsprechenden Alkohole, einschliesslich sec.-Alkohole zu katalysieren. Die Bedingungen für die Herstellung der Zellsuspensionen oder die zellfreien Teilchenfraktionen aus mit Methan gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen sind die gleichen wie oben beschrieben. Die zellfreie Teilchenfraktion erfordert die Anwesenheit von Sauerstoff und NADH als Elektronendonor. Die Umwandlung des Alkohols wurde durch metallbindende Mittel gehemmt, was die Beteiligung von Metallion(en) bei der Umwandlung der Alkane in sekundäre Alkohole vermuten lässt. Propylen erwies sich auch als die Umwandlung hemmend, was vermuten lässt, dass das Propylen und das n-Alkan (z.B. Propan) um dasselbe bzw. dieselben Enzymsysteme konkurrieren. Ascorbat und reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) könnten auch als Elektronendonor anstelle von NADH für die Umwandlung verwendet werden. Die Tabellen XXV und XXVI zeigen die Umwandlung von C_3–C_6-n-Alkanen zu den entsprechenden sekundären Alkoholen unter Verwendung von Zellsuspensionen bzw. zellfreien Teilchenfraktionen von mit Methan gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen.

Tabelle XXV
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 gleichzeitige Chromatographie mit authentischen Standardproben identifiziert und ermittelt.

Tabelle XXVI
Hydroxylierung von n-Alkanen zu sec.-Alkoholen durch die P(40)[a]-Teilchenfraktion von Methylotrophen

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 (Téxas, 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 XXVII zeigt, dass die Zellsuspensionen von mit Methan gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen C_1–C_2-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 XXVII
Umwandlung von n-Alkanen in Oxydationsrodukte [a]

Substrat	Produkte	Umwandlungsgeschwindigkeit (µMol/h/mg Protein) Methylosinus trichosporium OB3b NRRL B-11.196	Methylococcus capsualtus 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	Propanal	0,1	0,2
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-Butanal	0,1	0,2

[a] Zellsuspensionen von mit Methan gezüchteten methylotrophen Mikroorganismen in 0,15 m Phosphatpuffer, pH 7,0, inkubiert mit Alkanen bei 30 °C. Die Oxydationsprodukte wurden durch Gas/Flüssigkeitschromatographie bestimmt.

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 C_3–C_6-Alkane zu ihren entsprechenden sec.-Alkoholen und Methylketonen in Abwesenheit von Wachstumssubstraten oxydieren. Ausserdem wurde erstmals die Umwandlung von C_3–C_6-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.

Wie oben gezeigt, oxydierten Zellsuspensionen dieser neuen Kulturen sowie bekannte C_1-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 II); Methylobacterium organophilum CRL 26 (NRRL B-11.222) (ein fakultativer Methan-Verwerter); Hansenula polymorpha ATCC 26012; und Pseudomonas sp. ATCC 21439 (ein obligater Methanol-Verwerter) und Methylococcus capsulatus CRL M1 (NRRL B-11.219).

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, das Nicotinamid-adenin-dinuctleotid (NAD) eine Voraussetzung für die Oxydation von C_3–C_6-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. Acrylamidgelelektrophorese der gereinigten SADH-Fraktion aus der

Affinitätschromatographie zeigte eine einzige Proteinbande. Die Km-Werte für 2-Butanol und NAD sind 0,25 mMol bzw. 0,011 mMol. 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 C_3–C_6-sec.-Alkohole mit den folgenden relativen Prozentsätzen: 2-Propanol (85%), 2-Butanol (100%), 2-Pentanol (5%), 2-Hexanol (2%), Acetaldehyd (4%), Propanol (2%), Cyclohexanol (4%), Butan-1,3-diol (2%) und Butan-2,3-diol (2,5%). Die folgenden untersuchten Erbindungen wurden durch SADH nicht oxydiert: 2-Heptanol bis 2-Decanol, Formaldehyd, Butanal bis Decanal, Benzaldehyd, Methanol bis n-Decanol, Isobutanol, Phenol, Butan-1,2-diol und Bernsteinsäure. Es scheint, dass ein hydrophober Kohlenstoffrest 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%), ÄDTA (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 methylotrophen 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 Methanmonooxygenase 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 Methylotrophe 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 nichtwachstumsunterhaltenden 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 innterhalb 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.