

Diss. ETH No. 13284

**PRODUCTION OF (S)-STYRENE OXIDE WITH
RECOMBINANT BACTERIA**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Panke, Sven

Dipl. Biotechnol., TU Braunschweig

born 26.12.1967

citizen of Germany

Professor Dr. Bernard Witholt, examiner

Professor Dr. Kenneth. N. Timmis, co-examiner

Dr. Víctor de Lorenzo, co-examiner

Dr. Marcel. G. Wubbolts, co-examiner

Prof. Dr. Amrhein, chairman

Zürich, August 1999

SUMMARY

A bioprocess which employed recombinant *Escherichia coli* cells as biocatalyst was developed for the production of enantiopure styrene oxide, a versatile building block for the synthesis of biologically active molecules. The development covered the steps from cloning of the genes of a styrene monooxygenase to a pilot scale production process. The styrene monooxygenase of styrene degrading *Pseudomonas* sp. strain VLB120 converts styrene to the chiral building block (*S*)-styrene oxide with an enantiomeric excess of more than 99 %. Its genes *styAB* were used to construct *E. coli* and *P. putida* recombinants that expressed the genes via the octane-responsive *alk* regulatory system of *P. oleovorans* GPO1. Based on the *E. coli* recombinants, a 2 L two-liquid phase process was developed with bis(2-ethylhexyl)phthalate as the organic phase at a phase ratio of 50 %. Cells reached a maximum volumetric productivity of 2.2 g of (*S*)-styrene oxide per liter liquid volume per hour. The process was styrene mass transfer limited when scaled up to 30 L with power input close to that of commercially operating units. Still, the process maintained an average volumetric productivity of approximately 1.2 g of (*S*)-styrene oxide per liter liquid volume per hour for more than 10 h, which resulted in the production of 388 g of (*S*)-styrene oxide in only one batch.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Produktion von enantiomerenreinem Styroloxid, einem vielseitigen chiralen Synthesebaustein, wurde ein Bioprozess mit rekombinanten *Escherichia coli* Zellen etabliert. Die Entwicklung beinhaltete die Schritte von der Klonierung der Gene einer Styrolmonooxygenase bis zum Prozess im Pilotmaßstab. Die Styrolmonooxygenase aus *Pseudomonas* Stamm VLB120 oxidiert Styrol zu (*S*)-Styroloxid mit einem enantiomeren Überschuss von mehr als 99 %. Mit den Genen der Monooxygenase wurden rekombinante *E. coli* und *P. putida* Stämme hergestellt, die die Gene via das mit Oktan zu induzierende *alk* Regulationssystem aus *P. oleovorans* GPo1 exprimierten. Mit dem rekombinanten *E. coli* Stamm wurde eine Zwei-Flüssigphasenkultur im 2 L Maßstab etabliert. Als zweite Phase diente Bis(2-ethylhexyl)phthalsäure, die zu 50 Volumenprozent hinzugegeben wurde. Die Zellen erreichten eine maximale volumetrische Produktivität von 2.2 g (*S*)-Styroloxid pro Stunde und Liter Flüssigvolumen. Nach einer Vergrößerung des Produktionsmaßstabs auf 30 L erschien der Prozess bei einem Leistungseintrag in den Reaktor ähnlich dem bei industriellen Reaktoren massentransportlimitiert für Styrol. Trotzdem ergab der Prozess noch eine durchschnittliche volumetrische Produktivität von 1.2 g (*S*)-Styroloxid pro Stunde und Liter Flüssigvolumen. Das führte zur Produktion von 388 g (*S*)-Styroloxid in nur einem Ansatz.