DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 251 993 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) C 12 N 1/32
C 07 C 35/28

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 293 450 1 (22) 06.08.86 (44) 02.12.87

(71) Karl-Marx-Universität Leipzig, Goethestraße 3–5, Leipzig, 7010, DD
(72) Mühlstädt, Manfred, Prof. Dr. sc. Dipl.-Chem.; Repp, Hans-Dieter, Dr. Dipl.-Chem.; Stottmeister, Ulrich, Dr. sc. Dipl.-Chem.; Vogel, Marina, Dr. Dipl.-Chem.; Weber, Lutz, Dr. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von trans-Verbenol

(55) Verbenol; alpha-Pinen; Insektenlockstoffe; Mikrobiologie; Methanolfermentation.

(57) Die Erfindung hat die Aufgabe, durch Einsatz von Bakterien den Verfahrensablauf zur Synthese von trans-Verbenol, welches als Insektenlockmittel Bedeutung besitzt, technisch einfach zu gestalten und das Arbeiten unter sterilen Bedingungen zu vermeiden, wobei die Reaktion direkt zum Endprodukt führen und unerwünschte Nebenprodukte ausschalten soll. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß man alpha-Pinen in eine laufende Methanolfermentation mit dem acidophilen Stamm Acetobacter methanolicus (IMET B 346), welcher in der Lage ist alpha-Pinen mit einer hohen Geschwindigkeit und Ausbeute in trans-Verbenol umzuwandeln, einträgt.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von trans-Verbenol aus alpha-Pinen auf mikrobiellem Wege, **dadurch gekennzeichnet,** daß mit Hilfe eines Stammes der Art Acetobacter alpha-Pinen durch Oxidation in trans-Verbenol umgewandelt wird, wobei eine Temperatur zwischen 30 und 36 °C eingehalten wird und die Fermentation in einem *p*H-Bereich von 3.8 bis 5.3 durchgeführt wird, anschließend zentrifugiert wird und das Endprodukt in bekannter Weise durch Extraktion, Destillation, Chromatografie oder Verteilungsextraktion gereinigt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Stamm Acetobacter methanolicus (IMET B 346) verwendet wird und unter nichtsterilen Bedingungen kultiviert wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß Methanol als C-Quelle benutzt wird.
4. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Fermentation in kontinuierlicher Weise durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Fermentation in halbkontinuierlicher Weise durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Fermentation in diskontinuierlicher Weise durchgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von trans-Verbenol, welches im Pflanzenschutz als Insektenlockmittel eingesetzt wird.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bereits bekannt, trans-Verbenol herzustellen. Die am weitesten verbreitete Methode dazu ist die Oxidation von alpha-Pinen mit Bleitetraacetat (G. H. Whitham, J. Chem. Soc. **1961**, 2232), an welche sich eine Umlagerung und Hydrolyse zum trans-Verbenol anschließt. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht in der Verwendung des teuren und auch giftigen Bleitetraacetates. – Ein anderes Verfahren verwendet zur Oxidation von alpha-Pinen das ebenfalls sehr teure 2,2'-bipyridyl Kupferiodid (S. Bhaduri, M. M. Mahandru, Brit. UK Pat. Appl. GB 2.078.223 vom 6. 1. 1982). Ein weiterer Nachteil des Verfahrens besteht in der langen Reaktionszeit von 10 Stunden und daß die Reaktion unter Druck durchgeführt werden muß. – Andere Verfahren zur Oxidation von alpha-Pinen verwenden organische Peroxide, so Essigsäureperoxid (A. M. Romanikhin, N. I. Popova, SU 456.806 vom 15. 1. 1975), oder m-Chlorbenzoesäureperoxid (J. P. Sallent, Span. 446.302 vom 16. 6. 1977). Diese Verfahren haben zum Nachteil, daß neben der Explosivität der Oxidationsmittel das zu erwartende trans-Verbenol gar nicht, oder nur in sehr geringen Ausbeuten entsteht. – Es ist ebenfalls bekannt, mit Hilfe von Mikroorganismen aliphatische, bzw. alicyclische Alkene zu oxidieren. Ein Verfahren geht von verschiedenen, substituierten Monoterpenen aus (W.-R. Abraham, B. Stumpf, K. Kieslich, Appl. Microbiol. Biotechnol., **1986**, 24). Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden muß und daß eine Vielzahl von Produkten erhalten wird. – Ein anderes Verfahren oxidiert Propen mit Hilfe eines Bakterienstammes zu Propenoxid (O. Miyawaki, L. B. Wingard, J. S. Brackin, R. S. Siwer, Biotechnology and Bioengineering, **1986**, 343). Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß nur geringe Umsatzraten erreicht werden und ebenfalls steril gearbeitet werden muß. – Ein anderes Verfahren beschreibt die mikrobielle Oxidation von alpha-Pinen mit Hilfe des Bakteriums Serratia marcescens (S. J. Wright, P. Caunt, D. Carter, P. B. Baker, Appl. Microbiol. Biotechnol., **1986**, 224). Das Verfahren führt zwar zu trans-Verbenol, hat aber den Nachteil, daß das Produkt nur in Spuren entsteht. Weitere Nachteile des Verfahrens bestehen darin, daß das alpha-Pinen nur in geringen Mengen der Fermentation zugeführt werden kann, daß steril gearbeitet werden muß, sowie darin, daß die Fermentation sehr lange dauert.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Herstellung von trans-Verbenol, welches als Insektenlockmittel Bedeutung besitzt, anzugeben. Es sollen die Nachteile bekannter Verfahren überwunden und kostengünstig in technisch einfacher Weise hohe Ausbeuten an gewünschten Endprodukt erzielt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat die Aufgabe, durch Einsatz von Bakterien den Verfahrensablauf zur Synthese von trans-Verbenol technisch einfach zu gestalten und das Arbeiten unter sterilen Bedingungen zu vermeiden. Dabei soll die Reaktion direkt zum Endprodukt führen und unerwünschte, durch unkontrollierte Oxidation entstehende Nebenprodukte ausschalten.
Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man alpha-Pinen in eine laufende Methanolfermentation einträgt.
Erfindungsgemäß benutzt man zur Methanolfermentation einen acidophilen Acetobacter methanolicus (hinterlegt im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena unter der Nummer IMET B 346, Datum der Hinterlegung: 5. 4. 1973), welcher überraschenderweise in der Lage ist, alpha-Pinen mit einer hohen Geschwindigkeit und Ausbeute in trans-Verbenol umzuwandeln.
Erfindungsgemäß wird alpha-Pinen nicht als einziges Kohlenstoffsubstrat in den Fermentationsprozeß eingetragen, sondern zusammen mit der Energie- und Kohlenstoffquelle Methanol. Das Pinenangebot kann bis zu 50 % des Substratangebotes betragen.

Die Fermentation wird in einem *p*H-Bereich von 3,8 bis 5,3 durchgeführt, weshalb insteriles Arbeiten möglich ist. Die Fermentation kann in einem Temperaturbereich von 30 °C bis 36 °C durchgeführt werden. Die höchsten Ausbeuten werden erfindungsgemäß dann erzielt, wenn man die aktuelle Pinenkonzentration unter 1 % läßt; die Fermentation kann dabei in kontinuierlicher, halbkontinuierlicher und diskontinuierlicher Weise durchgeführt werden.
Zur Aufarbeitung wird die Fermentationslösung zentrifugiert und der Überstand mit einem beschränkt wasserlöslichem organischen Lösungsmittel extrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels kann das Rohprodukt durch Redestillation, Chromatografie oder Verteilungsextraktion gewonnen werden.
Die Erfindung soll nachstehend an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1
Ein Rührkesselfermentor mit einem Arbeitsvolumen von 5 l wird erfindungsgemäß mit einer acidophilen, Methanol utilisierenden Bakterienkultur MB58 (IMET B346) beimpft. Das zulaufende Nährmedium enthält Methanol als C-Substrat. Es hat folgende Zusammensetzung:

CH_3OH	15,0 g/l
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,4 g/l
K_2SO_4	0,5 g/l
NH_4Cl	1,0 g/l
H_3PO_4 85 %	0,7 g/l
Spurenelementlösung SL	1,5 ml/l

Die Spurenelementlösung SL enthielt in 1 l:

$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	1,6 g/l
$CoSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,4 g/l
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	2,5 g/l
H_3BO_3	0,5 g/l
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	4,1 g/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,4 g/l
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,6 g/l
NaCl	5,0 g/l
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$	4,7 g/l
H_2SO_4 konz.	10,0 g/l

Der mikrobielle N-Bedarf wird zum größten Teil autoregulativ über die *p*H-Regelung in Form von wäßriger NH_4OH-Lösung gedeckt. Die Kultivierungsbedingungen werden so eingestellt, daß Methanol die Wachstumslimitierung darstellt. Die üblichen Kultivierungsbedingungen sind:
Temperatur: 33 °C
*p*H-Wert: 4,4 bis 4,7
Zu der Fermentationslösung werden 35 g alpha-Pinen, welche in 75 g Methanol gelöst sind, gegeben. Nach 20 Minuten wird die Fermentation abgebrochen und die Lösung zentrifugiert. Der Überstand wird mit Natriumchlorid gesättigt und mit Ether extrahiert. Die Etherphase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das verbleibende hellgelbe Öl wird im Vakuum destilliert und so das trans-Verbenol in etwa 30 % Ausbeute (bezogen auf die Menge des Ausgangsstoffes alpha-Pinen) erhalten.

Beispiel 2
Zu einer Methanolfermentation mit Acetobacter methanolicus MB58, welche in analoger Weise wie in Beispiel 1 geführt wird, gibt man in 4 Portionen eine Lösung aus 40 g alpha-Pinen in 80 g Methanol. Die Zugabe erfolgt alle 5 Minuten. 20 Minuten nach der ersten Zugabe bricht man die Fermentation ab, zentrifugiert und extrahiert den Überstand mit Methylenchlorid. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat entfernt man das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Das verbleibende Öl gibt man in eine Mischung aus 100 ml n-Hexan und 100 ml 90 % Ethanol und schüttelt gut durch. Die Ethanolphase wird abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es verbleibt trans-Verbenol als hellgelbes Öl. Die Ausbeute beträgt etwa 30 % bezogen auf alpha-Pinen.