



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **279 688 A1**

4(51) C 12 P 7/40

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WPC 12 P / 318 531 8

(22) 08.08.88

(44) 13.08.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Günther, Thomas, Dipl.-Biol.; Miersch, Otto, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Fritsche, Wolfgang, Prof. Dr. sc. Biol.; Sembdner, Günther, Prof. Dr. sc. Dipl.-Biol., DD

(54) **Nährmedium zur Herstellung von 7-Iso-Jasmonsäure**

(55) Nährmedium; 7-Iso-Jasmonsäure; Pilz; Botryodiplodia theobromae; aerobe Kultur; biologische Aktivität; Pflanzenwachstumsregulator; Parfümstoff; Nitrat; Submerskultur; Emerskultur

(57) Die Erfindung betrifft ein Nährmedium zur Herstellung von 7-Iso-Jasmonsäure durch Stämme der Art Botryodiplodia theobromae in aerober Kultur, das für die Kultivierung des Pilzes in Vor- und Hauptkultur genutzt werden kann. 7-Iso-Jasmonsäure kann auf Grund ihrer biologischen Aktivität als Pflanzenwachstumsregulator eingesetzt werden. In Form ihrer niederen Ester dient sie als Parfümstoff. Das erfindungsgemäße synthetische Nährmedium enthält neben Mono- oder Disacchariden Nitrate als Stickstoffquelle sowie weitere Mineralsalze und Spurenelemente, jedoch keine komplexen Bestandteile. Es ist für die aerobe Emers- oder Submerskultur, insbesondere für die Kultivierung in Fermentoren, geeignet und garantiert neben einer hohen Raum-Zeit-Ausbeute der Produktion von 7-Iso-Jasmonsäure eine einfache Produktreinigung.

ISSN 0433-6461

4 SA

DND ORIGINAL

Patentansprüche:

1. Nährmedium zur Herstellung von 7-iso-Jasmonsäure in aeroben Kulturen von Stämmen der Art *Botryodiplodia theobromae* Pat. unter Verwendung einer assimilierbaren C-, N- und P-Quelle sowie von Mineralsalzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß es als N-Quelle Nitrate und als C-Quelle Mono- oder Disaccharide enthält.
2. Nährmedium nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Nitrat in einer Konzentration von 0,2–0,5% enthält.
3. Nährmedium nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Nitrat Calciumnitrat und/oder Kaliumnitrat einsetzt.
4. Nährmedium nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man es für die Produktion von 7-iso-Jasmonsäure durch Stämme von *Botryodiplodia theobromae* einsetzt.
5. Nährmedium nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man es für aerobe Kulturen des Stammes D 7/2 einsetzt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Nährmedium zur Herstellung von 7-iso-Jasmonsäure (synonym mit 2-iso-Jasmonsäure oder 7-Epijasmonsäure) durch Stämme der Art *Botryodiplodia theobromae* Pat. in submerser und emerser Kultur. Die Verbindungen, die aus ihr durch chemische Modifikation hergestellte Analoga besitzen als Wirkstoffe Bedeutung für die biologische Prozeßsteuerung in der Landwirtschaft. Nach Applikation ist sie in Pflanzen bei Wachstums-, Entwicklungs- und Stoffwechselprozessen regulatorisch wirksam. Niedere Ester der 7-iso-Jasmonsäure sind als Duftstoffe für die kosmetische Industrie von Interesse. Aus diesen Gründen benötigt man Verfahren zur stabilen Produktion von 7-iso-Jasmonsäure. Die Erfindung stellt ein ökonomisch günstiges und universell einsetzbares Nährmedium für solche Verfahren zur Verfügung.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Bisher sind verschiedene Verfahren zur fermentativen Gewinnung von Jasmonsäure und Jasmonsäureanaloga bekannt (Broadbent, D., et al., GB-Patent 1286266; Miersch, O., et al., DD-Patent 216734). In allen vorgeschlagenen Verfahren kommen mehr oder minder undefinierte, komplexe Bestandteile zum Einsatz. In einem Herstellungsverfahren von Jasmonsäure unter Verwendung von Stämmen des Pilzes *Lasiodiplodia theobromae* kommen Cerulose als Kohlenstoff- und Energiequelle sowie Hefeeextrakt zum Einsatz (Broadbent, D., et al.). Miersch und Mitarbeiter schlagen ein mikrobielles Verfahren mit Stämmen der Art *Botryodiplodia theobromae* zur Produktion von 7-iso-Jasmonsäure vor.

Das Fermentationsmedium enthält Sojamehl, Maisquellwasser und Zitrusextrakt als komplexe Bestandteile. Die Verfahren beschreiben die Herstellung von 7-iso-Jasmonsäure in Standkultur mit maximal 1 l Kulturlösung. Eine submerser Kultivierung wird im Bereich 100 ml durchgeführt. Der Einsatz dieser Nährmedien zur Produktion von 7-iso-Jasmonsäure in Fermentoren, insbesondere in Rührfermentoren, ist nur bedingt möglich. Unter diesen Bedingungen bildet der Pilz extrazelluläre Polysaccharide in hoher Konzentration, die Fermentation und Ausbeute stark negativ beeinflussen. Die Verwendung von komplexen Nährlösungen macht für einige Anwendungsgebiete eine umfangreiche Reinigung notwendig. Für bestimmte Zwecke, wie z. B. für die Nutzung von 7-iso-Jasmonsäure in der Parfümindustrie, sind die bekannten Isolierungsverfahren nicht ausreichend, um alle durch die komplexen Nährmedien komponenten eingetragenen störenden Geruchsstoffe sowie potentiell allergenen Verbindungen zu entfernen.

Ein Nachteil von Nährmedien auf der Basis komplexer Bestandteile ist ihre oft wechselnde qualitative und quantitative Zusammensetzung, die einen nur schwer reproduzierbaren Fermentationsverlauf bewirkt.

Ein definiertes, vollsynthetisches Medium zur fermentativen Herstellung von 7-iso-Jasmonsäure ist jedoch bisher noch nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, die Raum-Zeit-Ausbeute der Produktion von 7-iso-Jasmonsäure mit Stämmen der Art *Botryodiplodia theobromae* zu erhöhen und reproduzierbar zu gestalten, dadurch eine ökonomisch günstige Prozeßführung zu erreichen sowie die Einsatzmöglichkeiten für mikrobiell hergestellte 7-iso-Jasmonsäure zu erweitern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Nährmedium zu entwickeln, das die durch den Einsatz komplexer Medienbestandteile hervorgerufenen Nachteile nicht aufweist, aber eine hohe und stabile Produktion von 7-iso-Jasmonsäure gewährleistet.

Erfindungsgemäß enthält das Nährmedium als assimilierbare C-Quelle und als Energiequelle Mono- oder Disaccharide, als Stickstoffquelle Nitrate neben weiteren Mineralsalzen und Spurenelementen.

In den Nährmedien finden Zucker u. a. in Form von Glucose, Fructose, Saccharose, Laktose und Maltose Verwendung. Es ist nur eine einzige assimilierbare C-Quelle notwendig.

Als Stickstoffquelle wird Nitrat, vorzugsweise Calcium- und/oder Kaliumnitrat, eingesetzt. Die Nitratkonzentration im Nährmedium soll etwa 0,2–0,5% betragen. Weitere N-haltige Verbindungen, insbesondere organische, müssen dem Medium nicht zugesetzt werden.

Die Stämme der Art *Botryodiplodia theobromae* werden wahlweise unter submersen oder emersen Bedingungen kultiviert. Geeignet ist beispielsweise der Stamm D7/2. Als Impfmateriale zur aeroben Fermentation dienen auf üblichem Wege angezogene Vorkulturen. Das erfindungsgemäße Nährmedium ist für Vor- und Hauptkulturen benutzbar. Die Fermentation zur Produktion von 7-iso-Jasmonsäure erfolgt vorzugsweise in Rührfermentoren oder Schüttelkolben. Die Temperatur ist zwischen 20°C und 35°C, der pH-Wert zwischen 4,0 und 7,5 variierbar. Vorzugsweise arbeitet man jedoch bei Temperaturen von 25–30°C, pH-Werten zwischen 5,0 und 6,0, bei Sauerstoffsättigung des Mediums und einer Kulturdauer von 4–6 Tagen. Nach Beendigung der Fermentation wird die Kulturlösung durch Zentrifugation vom Mikroorganismus abgetrennt. Die Reinigung der 7-iso-Jasmonsäure erfolgt nach bekannten Verfahren.

Das erfindungsgemäße Nährmedium ist ein definiertes, vollsynthetisches Medium. Es ermöglicht einen reproduzierbaren Fermentationsprozeß, eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute der 7-iso-Jasmonsäure-Produktion und eine breitere Nutzung des Produkts.

Die starke Bildung und Ausscheidung von Exopolysacchariden durch den Pilz unter den Bedingungen der Submerskultur wird durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Mediums wesentlich verringert werden. Der Einsatz dieses erfindungsgemäßen Mediums ermöglicht die Kultivierung in Rührfermentoren. Damit kann das Fermentationsvolumen erweitert sowie der Fermentationsprozeß durch die bessere Steuer- und Regelbarkeit optimiert werden. Ein weiterer Vorteil ist die Anwendung in der Zufütterungstechnik, mit der die Konzentration der C-Quelle geregelt werden kann. Die Verwendung des erfindungsgemäßen Nährmediums zur Produktion von 7-iso-Jasmonsäure durch *Botryodiplodia theobromae* an Stelle bekannter Medien ermöglicht die notwendige Produktreinigung, da alle störenden komplexen Nährlösungsbestandteile substituiert wurden. Die so hergestellte 7-iso-Jasmonsäure ökonomisch vorteilhaft auch als Ausgangsstoff für die kosmetische Industrie bereitgestellt werden kann. Die hergestellte 7-iso-Jasmonsäure kann durch einfache Verfahren in Jasmonsäure überführt werden.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern. Die verwendeten Nährmedien sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Submerskultur (Fermentor)

Die Stammhaltung des Pilzes *Botryodiplodia theobromae* Stamm D7/2 erfolgt auf Schrägagarröhrchen mit Maizagar. Nach Bewuchs (28°C) werden die Kulturen bis zur nächsten Beimpfung bei 4°C gelagert. Eine Überimpfung erfolgt im Abstand von acht Wochen. Mit dem Schrägagarröhrchen werden zur Erzeugung von Impfmateriale Petrischalen beimpft (Vorkultur 1; NL 3). Eine weitere Vorkultur wird mit Mycelstanzstücken aus der ersten Vorkultur beimpft und 48 h bei 28°C auf einer Rundschtüttelmaschine (250 U/min) inkubiert. Die Nährlösung entspricht dem Hauptkulturmedium (NL 2). Die Beimpfung der Hauptkultur im Fermentor erfolgt mit 48 h alten Vorkulturen. Es wird mit einer Animpfdichte von 0,3–0,5 g Trockenbiomasse/l gearbeitet. Die Fermentation erfolgt bei einer Temperatur von 30°C und Sauerstoffsättigung. Der pH-Wert wird mittels 1 N NaOH auf 5,5 konstant gehalten. Nach Verbrauch der C- und Energiequelle wird die Fermentation beendet. Die Abtrennung der Biomasse erfolgt durch Zentrifugation. Isolierung und Reinigung von 7-iso-Jasmonsäure werden nach bekannten Verfahren durchgeführt. Es werden Ausbeuten von etwa 800 mg 7-iso-Jasmonsäure pro Liter erzielt.

Beispiel 2

Submerskultur (Schüttelkolben)

Die Stammhaltung und die Ausführung der Vorkultivierung von *Botryodiplodia theobromae* Stamm D7/2 erfolgt, wie in Ausführungsbeispiel 1 dargestellt.

Vor- und Hauptkulturmedien sind identisch und entsprechen NL 1. Die Beimpfung der Hauptkulturen in 500 ml-Stehrundkolben mit je 100 ml Nährlösung erfolgt mit 48 h alten Vorkulturen. Es wird mit einer Animpfdichte von 0,5 g Biomasse/l gearbeitet. Die Fermentation wird auf einer Rundschtüttelmaschine (250 U/min) bei 30°C innerhalb von 3 Tagen durchgeführt. Abtrennung der Biomasse und Isolierung der 7-iso-Jasmonsäure erfolgen wie in Ausführungsbeispiel 1.

Tabelle 1

Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien (Angaben in Gramm pro Liter)

| | NL1 | NL2 | NL3 |
|--|-------|-------|-----|
| Glucose | 50 | - | 20 |
| Saccharose | - | 50 | - |
| Malzextrakt | - | - | 30 |
| Pepton | - | - | 5 |
| Hefeextrakt | - | - | 5 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ | - | 3 | - |
| KNO_3 | 3 | 0,3 | - |
| KH_2PO_4 | 0,2 | 0,2 | - |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,2 | 0,2 | - |
| $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,01 | 0,01 | - |
| KCl | 0,1 | 0,1 | - |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,01 | 0,01 | - |
| $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ | 0,001 | 0,001 | - |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,001 | 0,001 | - |
| $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ | 0,001 | 0,001 | - |
| Agar-Agar | - | - | 20 |