DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 216 734 A1

3(51) C 12 P 7/40

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 251 500 2 (22) 31.05.83 (44) 19.12.84

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Miersch, Otto, Dr. Dipl.-Chem.; Sembdner, Günther, Prof. Dr. habil. Dipl.-Biol.; Schreiber, Klaus, Prof. Dr. habil. Dipl.-Chem.; Richter, Klaus, Dr. Dipl.-Ldw.; Kochmann, Werner, Prof. Dr. Dipl.-Chem.; Fritsche, Wolfgang, Prof. Dr. Dipl.-Biol., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Jasmonsäureanaloga

(57) Um Jasmonsäureanaloga der Formel I als Pflanzenwachstumsregulatoren sowie in Form ihrer niederen Ester als Parfumstoffe zur Verfügung zu stellen, wurde ein fermentatives Verfahren zur Herstellung dieser Substanzen erarbeitet. Dabei kommen die Stämme Botryodiplodia theobromae D 7/2, A 82/168 2 und A 82/260, ihre Mutanten oder Varianten zum Einsatz. In aerober Submers- oder Emerskultur unter Verwendung flüssiger Nährmedien, welche eine assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie Mineralsalze enthalten, werden die Pilze bei 20–35 °C und pH-Werten von 4–6,5 kultiviert. Die Stämme bilden je nach Nährlösung in 4–10 Tagen ein Substanzgemisch von ca. 1 mg/ml Kulturfiltrat.

ISSN 0433-6461

10 Seiten

BAD ORIGINAL

Erfindungsanspruch

98

1. Verfahren zur Herstellung von Jasmonsäureanaloga der allgemeinen Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Stämme Botryodiplodia theobromae D 7/2, A 82/168-2, A 82/260 oder deren Mutanten bzw. Varianten verwendet werden.

2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch aus Verbindungen der allgemeinen Formel I hergestellt wird, das die Verbindungen Ia (R = 2,4-Pentadienyl), Ib (R = 2-Pentenyl) und Ic (R = n-Pentyl) enthält.

3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man einen der Stämme Botryodiplodia theobromae D 7/2, A 82/168-2 oder A 82/260, ZIMET 43713, ZIMET 43711 oder ZIMET 43712 in aerober Fermentation unter Verwendung eines Nährmediums, welches eine assimilierbare C-Quelle, eine assimilierbare N-Quelle und Mineralsalze enthält, in submerser oder emerser Kultur bei einer Temperatur von 20-35°C und einem pH-Wert von 4,0-6,5 während eines Zeitraumes von 4-15 Tagen kultiviert und aus dem Nährmedium die Verbindungen der allgemeinen Formel I isoliert.

4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Nährmedium ein komplexes organisches Medium enthält.

5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation bei 25-30°C und pH 5,0-6,0 durchgeführt wird.

Hierzu 1 Seite Formeln

BAD ORIGINAL

Verfahren zur Herstellung von Jasmonsäureanaloga

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Analoga der Jasmonsäure durch Kultivation von Stämmen der Art Botryodiplodia theobromae.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Nach Applikation von Jasmonsäureanaloga der allgemeinen Formel I sind diese in Pflanzen bei Wachstums-, Entwicklungs- und Stoffwechselprozessen regulatorisch wirksam. Die niederen Ester dieser Verbindungen sind als leichflüchtige, wohlriechende Substanzen für die Parfümindustrie von Interesse.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Säuren der allgemeinen Formel I wurden in der Natur bisher nicht aufgefunden. Lediglich 2-epi-Jasmonsäuremethylester (= 2-iso-Jasmonsäuremethylester), ein Ester der Säure der Formel Ib, wurde als Bestandteil eines Pheromongemisches der orientalischen Fruchtmotte Grapholitha molesta (Nishida, R., et al., J. of Chemical Ecology 8, 947-59 (1982)) nachgewiesen. 2-iso-Jasmonsäure (Verbindung Ib) und 2-iso-Dihydrojasmonsäure (Verbindung Ic) sind jedoch als Zwischenprodukte der Synthesen von Jasmonsäure und Dihydrojasmonsäure bzw. ihrer Methylester (Tanaka, H., Torii, S., J. Org. Chem. 40, 462-65 (1975); Stevens, R.V., Hrib, H., Tetrahedron Lett. 22, 4791-94 (1981)) bekannt, die als Duftstoffe in der Parfümindustrie verwendet werden. Jasmonsäure und Dihydrojasmonsäure sind Stereoisomere der Verbindungen Ib und Ic.
Bereits 1968 ist ein fermentatives Verfahren zur Herstellung von Jasmonsäure vorgeschlagen worden (Broadbent, D., et al.,

BAD ORIGINAL

GB-Patent 1 286 266), dazu wurde ein Stamm der Pilzes Lasiodiplodia theobromae eingesetzt. Es ist jedoch bisher nicht möglich, auf chemischem Wege Jasmonsäure in 2-iso-Jasmonsäure umzuwandeln.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, Verbindungen der allgemeinen Formel I nach einem einfachen Verfahren ökonomisch vorteilhaft zu produzieren und sie der Landwirtschaft als Basis für Wirkstoffe zur Beeinflussung von Wachstum, Entwicklung und Stoffwechsel von Pflanzen und der Parfümindustrie zur Herstellung von Duftstoffen zur Verfügung zu stellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, das es ermöglicht, Substanzen der allgemeinen Formel I durch Kultivation eines Pilzstammes herzustellen.
Erfindungsgemäß werden zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I mit R = 2,4-Pentadienyl, 2-Pentenyl oder n-Pentyl die Stämme Botryodiplodia theobromae D 7/2, A 82/168-2 oder A 82/260 oder deren Varianten bzw. Mutanten verwendet.
Die Stämme Botryodiplodia theobromae D 7/2, A 82/168-2 und A 82/260 sind beim Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR in Jena unter den Bezeichnungen ZIMET , ZIMET und ZIMET hinterlegt. Es handelt sich um sehr widerstandsfähige Stämme, die sich durch gute Fermentationseigenschaften, äußerst vorteilhaftes, schnelles Myzelwachstum und stabile Produktion der oben genannten Verbindungen bei günstiger Zeitausbeute auszeichnen.
Die Kultivation zur Charakterisierung der Stämme Botryodiplodia theobromae D 7/2, A 82/168-2 und A 82/260 erfolgte auf Agarmedium mit nachfolgender emerser oder submerser Kultur in verschiedenen Nährmedien (siehe Tab. 1). Die Stämme besitzen folgendes makroskopisches Aussehen:

BAD ORIGINAL

Stamm D 7/2

Alter der Agarkultur: 4 Wochen

Agarmedium: Nährboden NL 4

Weißes Luftmyzel mit Gutationströpfchen, Kulturen älter als 4 Wochen schwarz werdend.

Hauptkultur: NL 2, 28°C, emerse Kultur

2-4 Tage: Anfangs äußerst schnell wachsendes weißes Myzel, das sich rasenartig verdichtet.

15 Tage: als Myzel rosa-schwarz werdend

Hauptkultur: NL 1, 28°C, submerse Kultur,

2 Tage: feinfaseriges weißes Myzel, schleimbildend

10 Tage: feinfaseriges weißes Myzel mit dunklen Myzelinseln, schleimbildend

Stamm A 82/168-2

Alter der Agarkultur: 4 Wochen

Agarmedium: Nährboden NL 4

Anfangs weißes Myzel, nachfolgend schwarzer Rasen mit grauem Luftmyzel, Agar durchwachsen, hügelige Kolonien.

Hauptkultur: NL 2, 28°C, emerse Kultur

2 Tage: feinfaseriges weißes, schnellwüchsiges Myzel

10 Tage: feinfaseriges schwarzes Myzel, Rasen.

Stamm A 82/260

Alter der Agarkultur: 4 Wochen

Agarmedium: Nährboden NL 4

Anfangs weißes Myzel, nachfolgend schwarzer Rasen mit grauem Luftmyzel, Agar durchwachsen, korallenartige Auswüchse auf der Oberfläche

Hauptkultur: NL 3, 28°C, submerse Kultur

2 Tage: feinfaseriges weißes Myzel, schleimig

10 Tage: feinfaseriges schwarzes Myzel, schleimig

Für alle drei Stämme ist die geringe Sporenbildung nach mehrfachem Überimpfen charakteristisch. Sie lassen sich jedoch sehr leicht mit Hilfe von Myzelbruchstücken vermehren. Die Sporenbildung in Pykniden kann durch Zwischenimpfen auf Apfelsine stimuliert werden.

BAD ORIGINAL

Die aerobe Fermentation des Pilzes zur Produktion der Verbindungen Ia, Ib und Ic erfolgt wahlweise in submerser oder emerser Kultur. Die Nährmedien enthalten eine assimilierbare C-Quelle, wie z.B. Glucose, Saccharose, Mannit, Sorbit, Glyzerin, Zitronensäure, eine assimilierbare N-Quelle, wie beispielsweise Ammoniak, Asparagin, Glyzin, Ammoniumsalze, sowie Mineralsalze. Besonders vorteilhaft sind komplexe organische Medien in wäßriger Mischung, wie z.B. Sojamehl, Zitruspreßrückstände, Maisquellwasser oder Milch. Die Temperatur ist zwischen 20 und 35°C und der pH-Wert von 4,0 bis 6,5 bei einer Kulturdauer von 4-15 Tagen variierbar. Vorzugsweise arbeitet man jedoch bei Temperaturen von 25-30°C, pH-Werten zwischen 5,0 und 6,0 und einer Kulturdauer von 5-10 Tagen.
Das Fermentationsprodukt setzt sich aus den Verbindungen Ia, Ib und Ic zusammen, von denen die 2-iso-Dehydrojasmonsäure (Verbindung Ia) neu ist.
In emerser, aerober Kultur werden um 1 mg Substanzgemisch/ml Kulturmedium erhalten, darunter ca. 90 % 2-iso-Jasmonsäure (Verbindung Ib) und 0,03-0,1 mg 2-iso-Dihydrojasmonsäure (Verbindung Ic) und 2-iso-Dehydrojasmonsäure (Verbindung Ia) in etwa gleichen Anteilen. In submerser Kultur produzieren die Stämme um 0,8 mg Substanzgemisch /ml Kulturlösung, das die gleiche prozentuale Zusammensetzung aufweist.
Die Isolierung des Substanzgemisches erfolgt durch Extraktion mittels organischer Lösungsmittel, wie z.B. Ether, Chloroform, Essigester, und nachfolgende Abtrennung der Säuren z.B. mit schwachen alkalischen Basen. Oft kann das Substanzgemisch ohne Auftrennung in die drei Komponenten verwendet werden, z.B. zur Beeinflussung von Wachstum, Entwicklung und Stoffwechsel von Pflanzen in der Land-, Garten- oder Forstwirtschaft. Für diesen Verwendungszweck brauchen die Substanzen ggf. nicht einmal aus dem Kulturmedium isoliert zu werden. Sollen jedoch die Einzelsubstanzen gewonnen werden, ist das mit den gängigen Methoden der Verteilungschromatographie möglich; besonders geeignet ist die umgekehrte Chromatographie an silylierten Adsorbentien.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist ein einfaches und infolge seiner günstigen Zeitausbeute ökonomisch vorteilhaftes Fermentationsverfahren.

BAD ORIGINAL

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

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

2 ml einer Suspension des Myzels des Stammes Botryodiplodia theobromae D 7/2 in Wasser wird in Stehrundkolben (Fassungsvermögen 500 ml) mit je 100 ml Kulturmedium NL 1 verteilt und bei 30°C auf einer Rundschwingschüttelmaschine (190 U/min) geschüttelt. Nach 5 Tagen enthalten die Kolben ca. 0,8 mg/ml Gemisch aus den Verbindungen der Formeln Ia, Ib und Ic.

Beispiel 2

2 ml einer Suspension des Myzels des Stammes Botryodiplodia theobromae D 7/2 in Wasser wird auf 500-ml-Fernbachkolben, gefüllt mit je 100 ml Kulturmedium NL 2, verteilt und bei 28°C in Oberflächenkultur 10 Tage inkubiert. Pro ml Nährlösung können danach um 1 mg Substanzgemisch aus den Verbindungen der Formeln Ia, Ib und Ic isoliert werden.

Beispiel 3

Je 2 ml einer Suspension des Myzels des Stammes Botryodiplodia theobromae A 82/260 in Wasser werden in Stehrundkolben (Fassungsvermögen 500 ml) in je 100 ml Kulturmedium NL 3 verteilt und bei 30°C auf einer Rundschwingschüttelmaschine (190 U/min) geschüttelt. Nach 4 Tagen enthalten die Kolben ca. 0,8 mg/ml Substanzgemisch aus den Verbindungen der Formeln Ia, Ib und Ic.

Beispiel 4

Je 2 ml einer Suspension des Myzels des Stammes Botryodiplodia theobromae A 82/168-2 in Wasser werden auf 500-ml-Fernbachkolben, gefüllt mit je 100 ml Kulturmedium NL 2, verteilt und die Kolben bei 28°C in Oberflächenkultur 10 Tage inkubiert. Pro ml Nährlösung sind 1 mg Substanzgemisch (Verbindungen der Formeln Ia, Ib und Ic) isolierbar, darunter 0,9 mg Substanz nach Formel Ib (R = 2-Pentenyl).

BAD ORIGINAL

Beispiel 5

Zur Isolierung des Substanzgemisches wird das Myzel durch Filtration oder Zentrifugieren abgetrennt, das Kulturfiltrat mit HCl auf pH 3 angesäuert, mit Chloroform extrahiert und mittels Natriumhydrogencarbonatlösung alle organischen Säuren abgetrennt. Durch Ansäuern mit Salzsäure und Extraktion mit Chloroform wird ein Rohsubstanzgemisch erhalten, das 60 % der hergestellten Verbindungen der Formeln Ia, Ib und Ic enthält. Eine Mengenbestimmung kann durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit dem Laufmittelsystem n-Hexan:Essigester:Eisessig = 60:40:1 gegen Testsubstanz Jasmonsäure im Konzentrationsbereich 0,2-1 µg nach Sichtbarmachung der Verbindungen mittels Anisaldehyd-Schwefelsäurereagens bei 110°C erfolgen.
Zur Isolierung der Einzelsubstanzen kann das Verbindungsgemisch über silyliertes Kieselgel säulenchromatographisch mittels des Laufmittelsystems Methanol:Wasser:Eisessig = 50:50:5 aufgetrennt werden. Die Substanzen werden in folgender Reihenfolge eluiert:

a) [3-Oxo-2-(2,4-pentadienyl)-cyclopentyl]-1-essigsäure
b) [3-Oxo-2-(2-pentenyl)-cyclopentyl]-1-essigsäure und
c) [2-pentyl-cyclopentyl]-1-essigsäure.

Die Identifizierung erfolgt mittels GC-MS als Methylester. $\frac{m}{e}$ =

a) 222 (M^+), 204, 193, 191, 167, 149 (100 %), 130, 107, 83, 79 (100 %)

b) 224 (M^+), 206, 195, 193, 156, 151, 135, 133, 121, 109, 83 (100 %)

c) 226 (M^+), 194, 156, 153, 137, 109, 83 (100 %), 82

BAD ORIGINAL

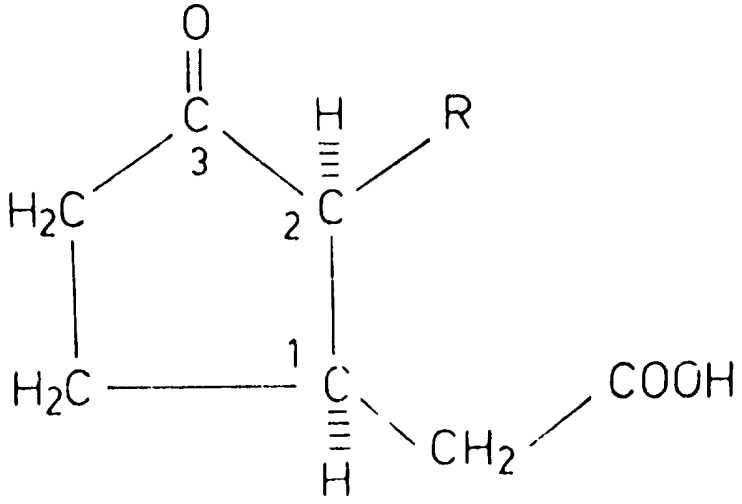
Tabelle 1

Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien je Liter

	NL 1	NL2	NL3	NL4
Saccharose	50g	30g	50g	20g
Sojamehl	5g	5g	5g	-
Maisquellwasser	-	15ml	-	-
Zitrusextrakt[1)]	200ml	-	100ml	500ml
Glyzin	-	-	10g	-
KH_2PO_4	0,005g	0,5g	0,005g	-
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,003g	0,3g	0,003g	-
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,0001g	10mg	0,0001g	-
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,000088g	8,8mg	0,000088g	-
Agar-Agar	-	-	-	10g
Aqua dest ad.	1000	1000	1000	1000
pH vor dem Sterilisieren	5,4	5,4	5,4	6,0
pH-Einstellung mit	NaOH	NaOH	NaOH	NaOH
Autoklavieren	jeweils einheitlich bei 120°C für 20 min.			

1) Zitrusextrakt: Filtrat einer wäßrigen Aufschlämmung von Preßrückständen von geschälten Zitrusfrüchten, besonders vorteilhaft von einer wäßrigen Aufschlämmung von Zitrusalbedo.

BAD ORIGINAL



Formel I

a) R=$CH_2-CH=CH-CH=CH_2$

b) R=$CH_2-CH=CH-CH_2-CH_3$

c) R=$CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$

BAD ORIGINAL