



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 262 875 A1

4(51) C 12 P 7/02
C 07 C 35/28
C 12 N 1/26

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 305 564 2	(22)	31.07.87	(44)	14.12.88
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Repp, Hans-Dieter, Dr. rer. nat.; Stottmeister, Ulrich, Dr. rer. nat.; Düresch, Rolf, Dr. rer. nat.; Richter, Hans-Peter, Dr. rer. nat.; Schmidt, Jörg, Dipl.-Chem.; Dörre, Marina, Dr. rer. nat.; Haufe, Günter, Dr. sc.; Weber, Lutz, Dr. rer. nat.; Pritzkow, Torsten, DD

(54)	Verfahren zur Herstellung eines Verbenol-Verbenon-Gemisches
------	---

(55) Verfahren, Herstellung, Verbenol, Verbenone, Oxidation, mikrobiell, Pinone, Hefe, Methanol, insteril

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Verbenol-Verbenon-Gemisches durch mikrobielle Oxidation von α -Pinenen. Das Verfahren betrifft die Herstellung eines Verbenol-Verbenon-Gemisches, das als Ausgangsstoff für Insektenlockstoffe des biologischen Pflanzenschutzes verwendet werden kann. Es wird mittels einer thermotoleranten methylotrophen Hefe Hansenula polymorpha (ZIMET H 43667) in Anwesenheit von Methanol unter N-, P- oder K-Limitations- oder -Mangelbedingungen durchgeführt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Verbenol-Verbenon-Gemisches durch mikrobielle Oxidation von α -Pinenen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Pinenoxidation mittels der thermotoleranten methylotrophen Hefe *Hansenula polymorpha* (ZIMET H 43667) in Anwesenheit von Methanol unter N-, P- oder K-Limitations- oder -Mangelbedingungen bei einem pH-Wert von 2,5 bis 5,5 und einer Temperatur von 30 bis 50°C unter insterilen Bedingungen durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Pinenoxidation in Anwesenheit von 1 bis 12 g Methanol/l bei einer extrazellulären Pinenkonzentration von 0,2 bis 12 g α -Pinen/l durchgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Verbenol-Verbenon-Gemisches durch mikrobielle Oxidation von α -Pinenen. Die Erfindung kann auf kontinuierliche oder semi-kontinuierliche Fermentationsprozesse angewendet werden. Das Verbenol-Verbenon-Gemisch kann als Ausgangsstoff für die Produktion von Insektenlockstoffen Verwendung finden.

Charakteristik der bekannten Lösungen

Verfahren zur Herstellung von Oxidationsprodukten von α -Pinenen sind bereits bekannt. Es handelt sich hierbei überwiegend um die Herstellung von Verbenolen, den Hauptbestandteilen bestimmter Insektenlockstoffe. Trans- wie auch cis-Verbenol können sowohl auf rein chemischem als auch auf mikrobiellem Wege durch Oxidation von α -Pinenen hergestellt werden. Die Nachteile chemischer Verfahren bestehen in deren Vielstufigkeit sowie in der Verwendung teurer und giftiger (G. H. Witham, J. Chem. Soc. **1961**, 2232; M. A. Cooper et al., J. Chem. Soc. B **1967**, 1259) bzw. explosiver Oxidationsmittel (SU 456,806), der langen Reaktionszeiten (GB 2,078,223) und den geringen Ausbeuten an Verbenol (Span. 446,302).

Demgegenüber besitzen mikrobielle Verfahren den Vorzug der Verwendung billiger, ungiftiger und nicht explosiver Biokatalysatoren. Der Nachteil der bekannten Verfahren besteht darin, daß überwiegend unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden muß, was apparatetechnisch aufwendig und kostspielig ist, daß eine Vielzahl von Oxidationsprodukten neben den gewünschten Verbenolen erhalten werden und die Produktkonzentration gering ist. Das ist der Fall bei Verfahren, bei denen das *Enterobacterium Serratia marcescens* (S. J. Wright et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. **1986**, 224) der Schimmelpilz *Aspergillus niger* NCIM 612 (B. R. Prama und P. K. Bhattacharyya, Appl. Microbiol. **10**, 524 [1962] et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. **1986**, 24; J. M. Brand et al., Nature [London] **254**, [5469], 136 [1975]).

Darüber hinaus ist zu bemängeln, daß die vorgeschlagenen mikrobiellen Oxidationsprozesse sehr lange dauern.

Nach einem weiteren Verfahren werden dem gegenüber mit Hilfe acidophiler Mikroorganismen unter insterilen Bedingungen im Verlaufe kurzer Reaktionszeiten wesentlich höhere Ausbeuten an Oxidationsprodukten erzielt. Hierbei handelt es sich um vorzugsweise trans-Verbenol, eine Nebenkomponeute von Insektenlockstoffen. Von größerer Bedeutung ist jedoch die epimere Verbindung cis-Verbenol, was bei diesem Verfahren überhaupt nicht und bei anderen bekannten Verfahren nur als Nebenprodukt anfällt. Ein Nachteil (des genannten Verfahrens) ist der Einsatz von Bakterien, die im Gegensatz zu den Hefen stets von Bakteriophagen gefährdet sind.

Ein weiteres interessantes Produkt bekannter mikrobieller Verfahren zur Pinen-Transformation ist das Verbenon. Aus Verbenon kann durch unkompliziert verlaufende chemische Reduktion ökonomisch das gewünschte cis-Verbenol hergestellt werden.

Deshalb sind Prozesse, bei denen größere Mengen an Verbenon neben dem cis-Verbenol anfallen, von großer Bedeutung, da es bislang noch kein ökonomisches Verfahren zur Synthese von reinem cis-Verbenol gibt. Verbenon fällt bei den bekannten Verfahren zur Pinen-Transformation stets als Nebenprodukt, und zwar in geringer Konzentration an.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein mikrobielles Verfahren, mit dem es möglich ist, ein Gemisch an Verbenolen und Verbenon kostengünstig in vergleichsweise hohen Ausbeuten und mit einem geringen Anteil an Nebenprodukten herzustellen.

Wesen der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist ein Verfahren, das mittels geeigneter Prozeßführung und Mikroorganismen mit hoher Selektivität bezüglich des Oxidationsvorganges α -Pinene in ein Gemisch von cis- und trans-Verbenol und Verbenon umzuwandeln.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine thermotolerante, Methanol verbrauchende Hefe zur Transformation von α -Pinenen verwendet wird.

Diese Hefe ist eine *Hansenula polymorpha* (ZIMET H 43667).

Die Pinen-Transformation wird unter Anwesenheit von Methanol und bei N-, P- oder K-Limitations- oder -Mangelbedingungen und einem pH-Wert von 2,5 bis 5,5 und einer Temperatur von 30 bis 50°C durchgeführt.

Diese Parameter sowie die Eigenschaft, Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen, verschaffen der Hefe *H. polymorpha* H 43667 hinreichend Selektionsvorteile, so daß sie unter insterilen Bedingungen kultiviert werden kann. Es wurde gefunden, daß diese Hefe in der Lage ist, α -Pinene mit hoher Geschwindigkeit und hoher Ausbeute zu oxidieren. Als Oxidationsprodukte entstehen hierbei zu einem Anteil von über 90% trans-Verbenol, Verbenon und cis-Verbenol. Die Verwendung einer methylotrophen Hefe für die Pinen-Transformation ist ein Novum.

Im einzelnen wird so verfahren, daß in eine laufende Methanolfermentation mit dieser Hefe, vorzugsweise unter den Bedingungen der N-, P- oder K-Limitation oder des N-, P- oder K-Mangels und bei einer extrazellulären Methanolkonzentration von 1 bis 12 g/l der Terpenkohlenwasserstoff ($\pm$)- α -Pinen eingetragen wird. Die Hefekonzentration kann zwischen 1 und 50 g HTS/l liegen und die extrazelluläre Pinenkonzentration bis zu 12 g/l betragen. Im Ergebnis der Pinen-Transformation werden Umsetzungsrate bis etwa 6 g Pinen/kg $\cdot$ h und Produktausbeuten bis 50 % erhalten. Die Produktausbeute kann schwanken zwischen

35 bis 70 % trans-Verbenol
5 bis 16 % cis-Verbenol
10 bis 50 % Verbenon
4 bis 10 % andere Oxidationsprodukte.

Die Erfindung wird anhand des folgenden Beispiels näher erläutert:

Ausführungsbeispiel

In einem Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1,2 l wurde ein Methanol-fed-batch mit der Hefe *Hansenula polymorpha* H 43667 bei folgenden Parametern durchgeführt:

Temperatur etwa 40°C; pH = 3,5; pO_2 = 0–5 ppm.

Startkonzentration an Biomasse: 3 g (HTS)/l extrazelluläre Methanolkonzentration: 0,5 bis 3 g/l.

Das Kulturmedium enthielt bis auf den Stickstoff alle lebensnotwendigen Nährstoffe, ausreichend für einen Zuwachs von 10 g HTS/l. Die vorgelegte N-Menge war nur für einen Zuwachs von 3 g HTS/l kalkuliert. Nach Erreichen einer Konzentration von 6 g HTS/l lag die extrazelluläre N-Konzentration unter 10 mg/l.

Diese N-Konzentration wurde als Kriterium eines N-limitierten Hefewachstums gewertet. Die Methanolkonzentration wurde nun auf 8 g/l erhöht. Anschließend wurden im Verlaufe von 25 min 12 g α -Pinen in Portionen zu 2 g in den Reaktor gegeben.

Die Gelöst- O_2 -Konzentration wurde hierbei ausschließlich über die Rührintensität bei pO_2 = 0–3 ppm aufrechterhalten. Eine Belüftung des Reaktors erfolgte aufgrund der Flüchtigkeit des Pinen während der Transformation nicht.

Danach wurde die Fermentation abgebrochen, der Fermentorinhalt zentrifugiert und die biomassearme wäßrige Phase mittels Methylchlorid extrahiert. Nach dem Trocknen der Extrakte über Natriumsulfat wurde das Extraktionsmittel und unumgesetztes α -Pinen abdestilliert. Die Produktmenge betrug 3 g. Ihre Zusammensetzung war: 35 % trans-Verbenol, 12 % cis-Verbenol, 47 % Verbenon, 6 % nicht identifizierte Oxidationsprodukte.

Danach beträgt die auf umgesetztes α -Pinen bezogene Produktausbeute 40 %, das ist das 1,3fache im Vergleich zu bekannten Verfahren (DD-WP C 12 P/293450). Der Anteil an cis-Verbenol und an in cis-Verbenol überführbares Verbenon beläuft sich vorteilhaft auf insgesamt 59 % der Gesamtmenge.