



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr

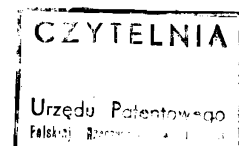
Int. Cl.³ C07C 35/12
//C11B 9/00

Zgłoszono: 05.02.80 (P. 221847)

Pierwszeństwo:

Zgłoszenie ogłoszono: 02.01.81

Opis patentowy opublikowano: 15.08.1983



Twórcy wynalazku: Józef Góra, Helena Oberman, Anna Monkiewicz,
Teresa Florianowicz, Wiesław Szelejewski

Uprawniony z patentu tymczasowego: Politechnika Łódzka, Łódź;
Instytut Chemii Przemysłowej, Warszawa (Polska)

Sposób wydzielania l-mentolu z mieszaniny stereoizomerycznych dl-mentoli

Przedmiotem wynalazku jest sposób wydzielania l-mentolu z mieszaniny stereoizomerycznych dl-mentoli, stosowanego w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i perfumeryjno-kosmetycznym.

Znanych jest 8 optycznie czynnych stereoizomerów mentolu i 4 odmiany racemiczne, spośród których tylko l-mentol obdarzony jest specyficznym miętowym zapachem i charakterystycznym chłodzącym działaniem. dl-Mentol wykazuje zapach podobny do l-mentolu, lecz efekt chłodzący ma obniżony w około 50%. Pozostałe stereoizomery, to jest izomentol, neomentol i neoizomentol charakteryzują się odmiennymi i niekorzystnymi właściwościami organoleptycznymi.

W przemysłowym procesie syntezy mentolu z surowców chemicznych, na przykład meta-krezolu, poprzez stadium tymolu, otrzymuje się mieszaninę wszystkich czterech nieczynnych optycznie stereoizomerycznych mentoli. Z mieszaniny tej wydziela się zwykle metodami fizykochemicznymi dl-mentol. Rozdzielenie dl-mentolu na optycznie czynne izomery przeprowadza się metodami fizykochemicznymi poprzez odpowiednie związki diastereoizomeryczne lub metodami biochemicznymi. Metody fizykochemiczne mają ograniczone zastosowanie praktyczne ze względu na wysoką cenę stosowanych optycznie czynnych substratów i złożony proces technologiczny. Z tego względu w ostatnich latach przedmiotem wielu patentów („Postępy Mikrobiologii”, 18, 149 (1979)) jest zastosowanie mikroorganizmów lub wydzielonych z nich enzymów do rozdzielania racemicznego mentolu na enancjomery.

Według brytyjskiego opisu patentowego 1 187 320, dl-mentol estryfikuje się kwasami karboksylowymi zawierającymi 1-21 atomów węgla. Następnie racemiczne estry mentolu poddaje się selektywnej hydrolizie mikrobiologicznej pod wpływem enzymów wytwarzanych przez różne szczepy drobnoustrojów, w tym: *Abidia hyalospora*, *Trichoderma speues*, *Geotrichum candium*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus nigricans*, *Actinomucor repens*, *Bacillus subtilis*, *Gibberella sanbiinet*. Uzyskiwane wydajności l-mentolu są bardzo zróżnicowane w zależności od rodzaju stosowanego drobnoustroju, stężenia substratu i wielu innych parametrów procesu i wynosi 12-98,4%. Natomiast według opisu patentowego RFN 1 958 587 zdolność selektywnej hydrolizy estrów dl-mentolu wykazuje około 40 różnych szczepów drobnoustrojów, w tym drożdże *Rhodotorula mucilaginosa*, hydrolizujące estry dl-mentolu w stężeniach 3-10% v/v z wydajnością 14,7-27,6%.

Sposób wydzielania l-mentolu z mieszaniny stereoizomerycznych dl-mentoli według wynalazku polega na selektywnej i asymetrycznej, enzymatycznej hydrolizie octanu l-mentylu przy udziale nowego szczepu

drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* R₁₂, a następnie wyodrębnieniu l-mentolu z cieczy pofermentacyjnej przez destylację z parą wodną, estryfikację kwasem borowym i hydrolizę otrzymanego ortoboranu l-mentylu przez destylację z parą wodną. W tym celu wyjściową mieszaninę izomerycznych dl-mentoli estryfikuje się w znany sposób bezwodnikiem kwasu octowego, otrzymując odpowiednie octany z wydajnością 95–98%. Następnie przeprowadza się selektywną i asymetryczną hydrolizę octanów dl-mentoli za pomocą rosnących lub spoczynkowych komórek nowego szczepu drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* R₁₂, używając w przypadku komórek rosnących stacjonarnej fazy hodowli w podłożu standardowym i namnożenia biomasy co najmniej 3×10^9 komórek/cm³, a w przypadku komórek spoczynkowych 0,2 części wagowych w przeliczeniu na suchą masę drożdży izolowanych z fazy stacjonarnej na 18 części wagowych octanów dl-mentoli w 100 częściach wagowych buforu fosforanowego o pH = 7.

Dla obu rodzajów komórek proces hydrolizy przeprowadza się w czasie 48–80 godzin w temperaturze 25–30°C na wytrząsarce o 190–220 obrotach na minutę lub biofermentorach. Po zakończeniu procesu hydrolizy ciecz pofermentacyjną poddaje się destylacji z parą wodną w celu wydzielenia mieszaniny l-mentolu i nie przereagowanych stereoizomerycznych octanów mentolu. Otrzymaną w ten sposób mieszaninę estryfikuje się kwasem borowym, użytym w ilości 1 mol na 3 mole mentolu, po czym oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem nie przereagowane octany mentoli, a pozostałość stanowiącą ortoboran trójmentylu hydrolizuje się przez destylację z parą wodną. Oddestylowany z parą wodną l-mentol oczyszcza się dalej rutynową metodą przez krystalizację z organicznych rozpuszczalników uzyskując produkt o właściwościach zgodnych z wymaganiami normy.

Zastosowana w sposobie według wynalazku odmiana R₁₂ drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* charakteryzuje się 3–4 krotnie większą zdolnością rozszczepiania octanu l-mentylu w odniesieniu do szczepu *Rhodotorula mucilaginosa* stosowanego w znanym sposobie z opisu patentowego RFN nr 1958 587.

Sposób według wynalazku wyjaśniają bliżej poniższe przykłady nie ograniczające zakresu jego stosowania.

Przykład I. Hodowlą drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* R₁₂, pochodzącą ze skosu agarowego, zaszczerpiono podłoże standardowe i hodowano w ciągu 24 godzin w temperaturze 28°C. Otrzymane płynne inokulum przeniesiono do 2,5 dm³ hodowli właściwej w ilości 3% v/v i hodowano w tej samej temperaturze przez 24 godziny. Mikroskopowo sprawdzono czystość mikrobiologiczną populacji oraz ustalono poziom namnożenia biomasy, licząc komórki w komorze Thoma dla kilku prób pobranych z hodowli. Po osiągnięciu przez *Rhodotorula mucilaginosa* fazy stacjonarnej, liczba komórek w 1 cm³ kultury wynosiła 3×10^9 . Do namnożonej populacji dodano 50 cm³ octanu dl-mentylu.

Hydrolizę estru prowadzono przez 72 godziny w temperaturze 28°C. Po zakończeniu reakcji płyn pofermentacyjny poddano destylacji z parą wodną w celu wydzielenia l-mentolu oraz nie rozszczepionych octanów. Otrzymano 50 cm³ destylatu zawierającego (na podstawie analizy GC) 45% l-mentolu oraz 55% nie rozszczepionych estrów. Mentol estryfikowano kwasem borowym. W tym celu w aparaturze, zaopatrzonej w nasadkę azeotropową i chłodnicę zwrotną, ogrzewano do wrzenia 50 cm³ mieszaniny l-mentolu i nie rozszczepionych estrów z 2,5 g (0,04 mola) kwasu borowego w 250 cm³ toluenu. Proces prowadzono do chwili, gdy przestała wydzielać się woda. Następnie odparowano rozpuszczalnik i octany mentylu pod zmniejszonym ciśnieniem (6,6 — 19 hPa). Otrzymano 26 g estrów. Pozostały w kolbie ortoboran trójmentylu rozłożono podczas destylacji z parą wodną na l-mentol i wodny roztwór kwasu borowego. l-Mentol ekstrahowano toluenem.

Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 19,3 g (85% wydajności teoretycznej) krystalicznego związku o charakterystycznym miętowym zapachu i temperaturze topnienia 42–43°C oraz skręcalności właściwej $[\alpha]_D^{20} = -49^\circ$. Otrzymany w ten sposób l-mentol wykazuje właściwości sensometryczne identyczne z l-mentolem naturalnym wydzielonym z olejku miętowego.

Przykład II. Sposób przygotowania inokulum oraz prowadzenia hodowli drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* R₁₂ jest taki sam, jak w przykładzie I.

Komórki spoczynkowe drożdży otrzymano w następujący sposób. Po zakończeniu hodowli właściwej odwirowano (przy 4500 obrotów/minutę) komórki drożdży i przemyto je 1/15 molarnym buforem fosforanowym o pH = 7. Następnie otrzymaną masę komórkową zawieszono w buforze fosforanowym o takich samych parametrach. Do tak przygotowanych komórek spoczynkowych dodano 50 cm³ octanu dl-mentylu i całość uzupełniono buforem fosforanowym do objętości 2,5 dm³. Hydrolizę octanu dl-mentylu prowadzono na wytrząsarce przez 72 godziny, w temperaturze 28°C. Następnie płyn pofermentacyjny poddano destylacji z parą wodną. Otrzymano destylat zawierający 45% l-mentolu i 55% nie rozszczepionych octanów, co ustalono na podstawie analizy chromatograficznej gazowej. Mentol estryfikowano kwasem borowym, użytym w ilości 2,5 g (0,04 mola). Proces estryfikacji prowadzono w środowisku toluenu (150 cm³) jako czynnika usuwającego azeotropowo wodę. Po zakończeniu procesu oddestylowano rozpuszczalnik i octany mentylu pod

zmniejszonym ciśnieniem, a pozostały w kolbie ortoboran trójmentylu rozłożono podczas destylacji z parą wodną na l-mentol wodny roztwór kwasu borowego l-mentol ekstrahowano toluenem.

Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 19,0 (84% wydajności teoretycznej) krystalicznego związku o charakterystycznym miętowym zapachu i temperaturze topnienia 42–43°C oraz skręcalności właściwej $[\alpha]^{20}_D = -49^\circ$. Otrzymany w ten sposób l-mentol wykazuje właściwości organoleptyczne identyczne z l-mentolem wydzielonym z olejku miętowego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wydzielania l-mentolu z mieszaniny stereoizomerycznych dl-mentoli drogą estryfikacji bezwodnikiem kwasu octowego oraz drogą asymetrycznej i selektywnej hydrolizy mikrobiologicznej i destylacji z parą wodną, **znamienny tym**, że racemiczne mentole przeprowadzone w octany dl-mentoli poddaje się selektywnej i asymetrycznej hydrolizie racemicznej za pomocą drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* R₁₂, po czym wydziela się l-mentol z cieczy pofermentacyjnej przez destylację z parą wodną, a następnie azeotropową estryfikację wydzielonej mieszaniny l-mentolu i octanów mentoli kwasem borowym użytym w ilości 1 mola kwasu borowego na 3 mole mentolu.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, proces selektywnej asymetrycznej hydrolizy racemicznej mieszaniny octanów mentoli prowadzi się za pomocą rosnących komórek drożdży *Rhodotorula mucilaginosa* R₁₂ na podłożu zawierającym co najmniej 3×10^5 komórek/cm³ drożdży.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces selektywnej asymetrycznej hydrolizy racemicznej mieszaniny octanów mentoli prowadzi się za pomocą komórek spoczynkowych w ilości 0,2 części wagowych, w przeliczeniu na suchą masę, drożdży izolowanych z fazy stacjonarnej na 18 części wagowych octanów dl-mentoli w 100 częściach wagowych buforu fosforanowego o pH = 7.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że selektywną i asymetryczną hydrolizę octanów racemicznych mentoli prowadzi się w temperaturze 25–30°C w czasie 48–80 godzin.