



## SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 71167  
**UTLÄGGNINGSSKRIFT**

C (45) Patentti myönnetty  
Patent meddelat 24 11 1986

(51) Kv.lk./Int.Cl.: C 12 P 7/42, 41/00

(21) Patentihakemus — Patentansökning	803116
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	30.09.80
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	30.09.80
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	18.04.81
(44) Nähtäväksi panon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	14.08.86
(86) Kv. hakemus — Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	17.10.79
Italia-Italien(IT)	26547 A/79

(71) E.N.I. Ente Nazionale Idrocarburi, Piazzale E. Mattei 1, Roma, Italia-  
Italien(IT)

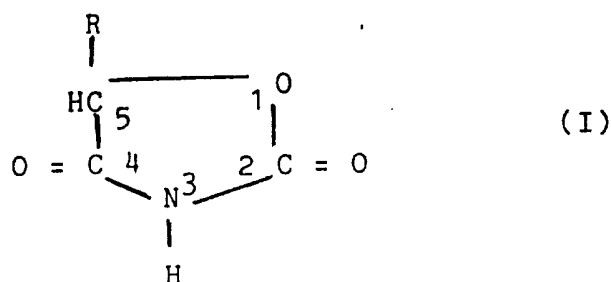
(72) Roberto Olivieri, Roma, Giancarlo Eletti Bianchi, Roma, Eugenio Fascetti,  
Roma, Felice Centini, Roma, Ludwig Degen, Roma, Walter Marconi, Milano,  
Italia-Italien(IT)

(74) Antti Impola

(54) Menetelmä D-mantelihiappokarbamaatin valmistamiseksi - Förfarande för fram-  
ställning av D-mandelsyrakarbamat

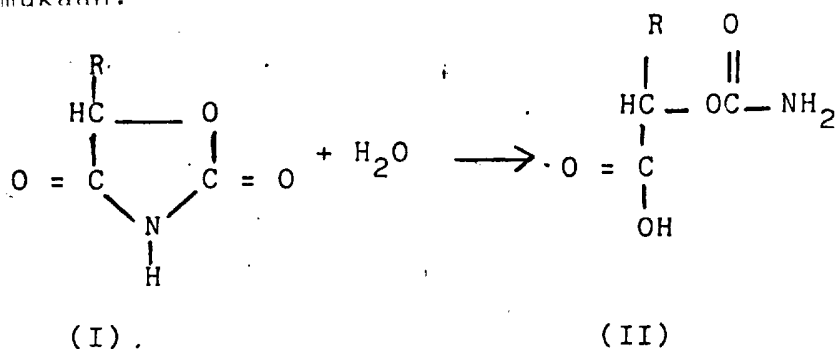
Menetelmä D-mantelihappokarbamaatin valmistamiseksi  
Förfarande för framställning av D-mandelsyrakarbamat

Keksinnön kohteena on menetelmä D-mantelihappokarba-  
maatin valmistamiseksi hydrolysoimalla seuraavan kaavan  
(I) mukaista yhdistettä:

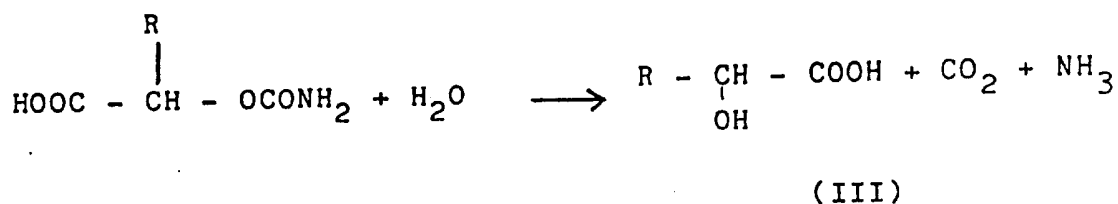


jossa kaavassa R on fenyyliiryhmä.

5 Yleisen kaavan (I) mukaisilla yhdisteillä, toisin sanoen  
5-substituoiduilla 2,4 oksatsolidiinidioneilla, voidaan  
suorittaa hydrolyysireaktio, joka avaa renkaan seuraavan  
kaavan mukaan:



Hydrolysoimalla saatu yleisen kaavan (II) mukainen  
yhdiste on  $\alpha$ -hydroksihapon karbamylijohdannainen, josta  
10  $\alpha$ -hydroksihappo voidaan saada suorittamalla yhdisteellä  
(II) toinen seuraavan kaavan mukainen hydrolyysi:



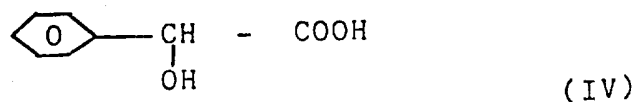
Lopullinen tuote (III) on  $\alpha$ -hydroksihappo.

Keksinnön kohteena on menetelmä D-mantelihappokarba-  
maatin valmistamiseksi suoraan kaavan (I) mukaisen yhdis-  
teen raseemisen seoksen stereoselektiivisen entsymaattisen  
5 hydrolysoimisen avulla.

Tässä yhteydessä on yllätyksellisesti todettu mah-  
dolliseksi entsymaattisesti hydrolysoida 5-substituoituja  
DL-2,4-oksatsolidiinidioneja siten, että tulokseksi saadaan  
ainoastaan D-karbamyyl- $\alpha$ -hydroksihappo, toisin sanoen  
10 ainoastaan toinen mahdollisista optisista isomeereistä.  
D-konfiguraation omaava vapaa  $\alpha$ -hydroksihappo voidaan saa-  
da optisesti aktiivisesta karbamyyljohdannaisesta yksin-  
kertaisesti hydrolysoimalla. Kaavan (I) mukaisia yhdistei-  
tä voidaan helposti valmistaa vastaavista  $\alpha$ -hydroksihapois-  
15 ta saattamalla ne reagoimaan karbamidin kanssa kuten Helge  
Aspelund on selittänyt julkaisussa Acta Acad. Aboensis Math.  
and Phys. 22 (7) 12 (1961).

Raseeminen seos erotetaan stereoselektiivisesti hyd-  
rolysoimalla oksatsolidiinirengas entsyymien avulla, joita  
20 voidaan helposti saada erilaisten mikro-organismien vilje-  
lyistä tai eläinelinten, esim. vasikanmaksan uutteista.

Tämän keksinnön tuloksena on on erittäin mielenkiin-  
töinen, kaavan (IV) mukainen D-(-)-mantelihappo,



25 joka on tärkeä välituote puolisynteettisten antibioottien  
valmistuksessa.

Tätä välituotetta valmistetaan yleensä erottamalla ra-  
seeminen seos osiinsa siten, että muodostetaan diastereoiso-  
meerisuoloja optisesti aktiivisten luonnollisten emästen kuten



Agrobacterium radiobacter NRRL B 11291  
 Bacillus brevis NRRL B 11080  
 Bacillus stearothermophilus NRRL B 11079  
 Pseudomonas sp CBS 145.75  
 5 Pseudomonas sp CBS 146.75  
 Pseudomonas sp ATCC 11299  
 Pseudomonas desmolytica NCIB8859  
 Pseudomonas fluorescens ATCC 11250  
 Pseudomonas putida ATCC 12633

10 Keksinnön mukaista menetelmää sovellettaessa viljel-  
 lään edellä mainittuja tyyppisiä olevia mikro-organismeja  
 aerobisissa olosuhteissa käyttämällä viljelyväliaineita, jot-  
 ka sisältävät typpi-, hiili-, fosfori- ja mineraalisuola-  
 lähteitä, 20...80 °C:ssa 10...72 tuntia ja pH-arvon ollessa  
 15 6,0...8,0.

Hiililähteinä voidaan käyttää glukoosia, laktaattia,  
 asetaattia, maissiuuteliä ja laktoosia.

20 Typpilähteinä voidaan käyttää hydrolysoitua lihaa,  
 kaseiinia tai soijaa, ammoniumsuoloja, karbamideja, hydran-  
 toiinia, jne.

Sopivan viljelyväliaineen koostumus on esim. seuraava:

lihapeptonia	5 kg
lihauutetta	5 kg
glukoosia	5 kg
25 tislattua vettä	1000 ml
pH	7,0...7,2.

30 Mantelihapon D(-)-karbamaatti voidaan valmistaa suo-  
 raan viljelyväliaineessa, joka sisältää vastaavaa DL-2,4-  
 oksatsolidiinidionia, tai voidaan valmistaa suoraan käyttä-  
 mällä mikrobimassaa jäännössoluina tai käyttää tästä tehtyjä  
 uutteita. Keksinnön mukaiset entsymaattiset kompleksit uute-  
 taan bakteerimassasta soveltamalla entsymologiassa tavanomai-  
 sia menetelmiä.

35 Tätä varten solut hajotetaan käyttämällä sopivia lait-  
 teita, esim. "French Pressure Cell Press",-, "Manton Gaulin  
 Homogenizer"- tyyppisiä kojeita, pyöriviä hajoittimia, jne.,

tai käyttämällä ultraäänitekniikkaa.

5 5-substituoitu D L-2,4-oksatsolidiinidioni voidaan hydrolysoida lisäämällä entsyymi reaktioseokseen seuraavina muotoina: tuoreina soluina, lyofiloituina soluina, tolueenilla käsiteltyinä soluina, asetonijauheena tai raakoina tai puhdistettuina uutteina.

10 Eräs toinen tekninen ja taloudellinen parannus voidaan tehdä sitomalla entsyymit siten, että ne yhdistetään makromolekyyliin yhdisteisiin muodostamalla kemiallisia sidoksia matriisin kanssa, tai ionisia sidoksia tai fysikaalisia sidoksia.

Seuraavat esimerkit kuvaavat muita menetelmiä keksinnön toteuttamiseksi.

#### Esimerkki 1

15 Valmistettiin viljelyliemi, jonka koostumus oli seuraava:

lihapeptonia	5 kg
lihauutetta	3 kg
glukoosia	5 kg

20 tislattua vettä 1000 ml.

pH säädettiin arvoon 7,2 soodan avulla, ja väliaine jaettiin 500 ml:n pulloihin 100 ml:n suuruisina erinä. Pullosteriloitiin 30 minuuttia 110 ° C:ssa, minkä jälkeen ne ympättiin *Pseudomonas* CBS 145.75 kannan viljelmällä, joka sisälsi samaa väliainetta, jossa oli 2 % agaria (Difco) ja inkuboitiin 24 tuntia 30 ° C:ssa 220 kierr/min nopeudella sekoittaen.

30 1 ml tätä esiviljelmää (D.O. kohdassa 550 nm = 0,250, laimennus 1:10) pantiin viiteen 500 ml:n pulloon, joissa oli 100 ml samaa väliainetta, ja viljelmää inkuboitiin 30 ° C:ssa sekoittaen 200 kierr/min nopeudella 24 tuntia (D.O. kohdassa 550 nm = 0,450, laimennus 1:10).

35 Tämän jälkeen solut koottiin, pestiin fysiologisessa liuoksessa ja suspendoitiin lopuksi 100 ml:aan 0,1 M pyrofosfaattipuskuria, jonka pH-arvo = 8,7, ja jossa oli 2 g

DL-5-fenyylimu-2,4-oksatsolidiinidionia, 50 °C:ssa.

Inkuboitiin 70 tuntia näissä olosuhteissa, minkä jäl-  
keen hydrolysoituminen D-mantelihappokarbamaatiksi oli suju-  
nut loppuun, kuten todettiin polametrisesti analysoimalla  
5 reaktioseosta.

Karbamaatti eristettiin reaktioseoksesta sen jälkeen,  
kun solumassa oli erotettu sentrifugoimalla, minkä jäl-  
keen jäädytettiin, ja pH säädettiin arvoon 2,5 konsentroi-  
dun suolahapon avulla. Täten saatu sakka suodatettiin, pes-  
10 tiin kylmällä vedellä ja kuivattiin alipaineessa. Saatiin  
1,8 g karbamaattia, jonka identiteetti todistettiin IR- ja  
NMR-spektrien alkuaineanalyysin avulla.

Täten saadun karbamaatin alkoholiliuoksen ominainen  
optinen kiertokyky  $[\alpha]_D^{25}$  oli  $-141^\circ$ . Sulamispiste oli  
15  $169^\circ\text{C}$  (hajosi).

1,4 g karbamaattia suspendoitiin 100 ml:aan vettä,  
minkä jälkeen keitettiin palautustislausta soveltaen 4 tun-  
V tia. Täten saatu vesiliuos tehtiin happameksi ja uutettiin  
sitten etyylietterillä, ja orgaaninen faasi konsentroidiin  
20 alipaineessa kuiviin. Täten saatiin 1,10 g raakaa manteli-  
happoa, jonka  $[\alpha]_D^{25}$  oli  $-120^\circ$  (optinen tuotos 76 %).

Vedestä kiteytettynä oli raakatuotteen sulamispiste  
—  $130^\circ\text{C}$  ja sen optinen kiertämisvoima  $[\alpha]_D^{25}$  oli  $-154,5^\circ$  ve-  
dessä, verrattuna sulamispisteeseen  $113^\circ\text{C}$  ja optiseen kier-  
25 tämistöimaan  $[\alpha]_D^{25}$   $-158^\circ$ , kuten kirjallisuudessa on seli-  
tetty D(-)-mantelihapolle.

#### Esimerkki 2

Lisättiin 1 g homogoidun vasikanmaksan asetonijau-  
hetta liuokseen, jossa oli 500 mg DL-5-fenyylimu-2,4-oksatso-  
30 lidiinidionia 50 ml:ssa 0,1 M pyrofosfaasipuskuria, jonka  
pH-arvo = 8,5.

Täten saatua reaktioseosta inkuboitiin 30 °C:ssa 40  
tuntia, minkä jälkeen D-mantelihappokarbamaatti otettiin  
talteen esimerkissä 1 selitetyllä tavalla. Täten saatiin  
35 380 mg raakaa karbamaattia, jonka ominainen optinen kierto-  
kyky oli  $[\alpha]_D^{25}$   $-136^\circ$  etanolissa.

Tämä raaka karbamaatti hydrolysoitiin hapon avulla ja mantelihappo uutettiin esimerkissä 1 selitetyllä tavalla, jolloin saatiin 300 mg D-mantelihappoa, jonka  $[\alpha]_D^{25}$  oli  $-116^{\circ}$  (optinen tulos 73,5 %).

#### PATENTTIVAATIMUKSET

Menetelmä D-mantelihappokarbamaatin valmistamiseksi, tunnetaan siitä, että DL-5-fenyyli-2,4-oksatsolidiinidioni saatetaan stereoselektiiviseen entsyymaattiseen hydrolyysiin entsyymaattista aktiivisuutta omaavan aineen läsnäollessa, joka on saatu mikro-organismista sp. CBS 145.75:n tai homogenisoidusta vasikanmaksasta, noin  $30^{\circ}\text{C}$ :n lämpötilassa vähintään 40 tunnin ajan aerobisissa olosuhteissa ja pH:n ollessa noin 8,5.

#### PATENTKRAV

Förfarande för framställning av D-mandelsyrakarbamat, k ä n n e t e c k n a t d ä r a v , att DL-5-fenyl-2,4-oxazolidindion bringas till en stereoselektiv enzymatisk hydrolys i närvaro av ett enzymatiskt aktivitet besittande ämne, som har erhållits från mikroorganismen Pseudomonas sp. CBS 145.75 eller homogeniserad kalvlever, vid en temperatur av ca  $30^{\circ}\text{C}$  under en tid av minst 40 timmar under aerobiska betingelser vid ett pH-värde av ca 8,5.

#### Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 4 065 353 (C 12 D 13/06).