



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102031237 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201010545493. 9

C12R 1/01 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 11. 12

(56) 对比文件

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 4254 2010. 10. 22

李云霞 等. 薄荷醇手性拆分的研究进展. 《香料香精化妆品》. 2009, (第 1 期), 40-44.

(73) 专利权人 浙江大学

审查员 黄利

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

(72) 发明人 李牧 杨立荣 吴坚平

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公
司 33200

代理人 陈昱彤

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006. 01)

C12P 41/00 (2006. 01)

C12P 7/02 (2006. 01)

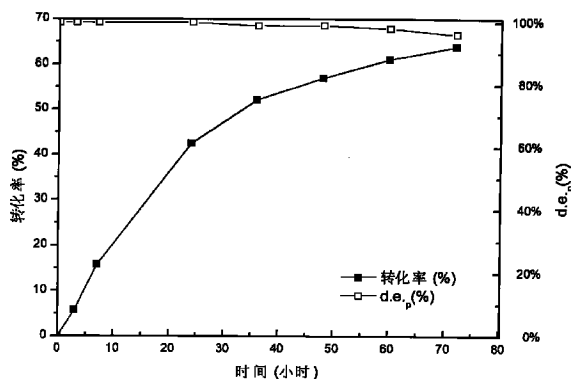
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种寡养单胞菌及其制备 1- 薄荷醇的方法和
应用

(57) 摘要

本发明公开一种寡养单胞菌及其制备 1- 薄荷醇的方法和
应用。其寡养单胞菌可用于作为通过分离薄荷醇异构体混合物来制备 1- 薄荷醇的催化剂。制备 1- 薄荷醇的方法包括如下步骤：
(1) 将寡养单胞菌加到培养基中发酵培养；(2) 将发酵液处理，制备得到固体催化剂；(3) 将固体催化剂和底物加到有机溶剂中进行转化反应，得到转化液，底物包括薄荷醇异构体混合物和酰化剂；薄荷醇异构体混合物含有 1- 薄荷醇，且含有 1- 异薄荷醇、1- 新异薄荷醇、1- 新薄荷醇、d- 薄荷醇、d- 异薄荷醇、d- 新异薄荷醇、d- 新薄荷醇中的任一种或任几种；(4) 将转化液处理以除去有机溶剂和未反应的底物，得到 1- 薄荷醇的酯化物；(5) 将 1- 薄荷醇的酯化物水解，收集得到 1- 薄荷醇。



1. 一种寡养单胞菌(*Stenotrophomonas sp.*), 其特征是: 其保藏号为 CGMCC No. 4254。
2. 一种权利要求 1 的寡养单胞菌的应用, 其特征是: 用于作为通过分离薄荷醇异构体混合物来制备 *L*-薄荷醇的催化剂。
3. 一种利用权利要求 1 的寡养单胞菌制备 *L*-薄荷醇的方法, 其特征是, 包括如下步骤:
 - (1) 将保藏号为 CGMCC No. 4254 的寡养单胞菌加入到培养基中进行发酵培养;
 - (2) 将步骤(1)得到的发酵液进行处理, 制备得到固体催化剂;
 - (3) 将所述固体催化剂和底物加入到有机溶剂中进行转化反应, 得到转化液, 所述底物包括薄荷醇异构体混合物和酰化剂; 所述薄荷醇异构体混合物含有 *L*-薄荷醇, 且含有 *L*-异薄荷醇、*L*-新异薄荷醇、*L*-新薄荷醇、*d*-薄荷醇、*d*-异薄荷醇、*d*-新异薄荷醇、*d*-新薄荷醇中的任一种或任几种;
 - (4) 将所述转化液进行处理以除去有机溶剂和未反应的底物, 得到 *L*-薄荷醇的酯化物;
 - (5) 将所述 *L*-薄荷醇的酯化物水解, 收集得到 *L*-薄荷醇。
4. 根据权利要求 3 所述的制备 *L*-薄荷醇的方法, 其特征在于: 所述酰化剂为乙酸乙烯酯、乙酸丁酯、乙酸异丙烯酯、乙酸酐、乙酸乙酯、乙酸对氯苯酯、丙酸对氯苯酯、戊酸对氯苯酯、正辛酸对氯苯酯、乙酸-2-氯苯酯、乙酸-2, 3-二氯苯酯、乙酸-2, 4-二氯苯酯、乙酸苯酯、乙酸间苯二酯、乙酸苯甲酯中的任一种或任几种的组合。
5. 根据权利要求 3 所述的制备 *L*-薄荷醇的方法, 其特征在于: 所述薄荷醇异构体混合物相对于所述有机溶剂的加入量为 1~156g/L。
6. 根据权利要求 3 所述的制备 *L*-薄荷醇的方法, 其特征在于: 在步骤(3)中, 所述固体催化剂相对于所述有机溶剂的加入量为 1~100g/L。
7. 根据权利要求 3 所述的制备 *L*-薄荷醇的方法, 其特征在于: 在步骤(3)中, 所述转化反应的温度为 15~60℃, 转化反应时间为 1~100h。
8. 根据权利要求 3 所述的制备 *L*-薄荷醇的方法, 其特征在于: 在步骤(3)中, 所述有机溶剂为异辛烷、正庚烷、甲基环己烷、叔丁基甲基醚、二甲苯、煤油、戊烷、环己烷、己烷、苯、丁醇、甲苯、四氢呋喃、三氯甲烷、异丙醇、乳酸乙酯和丙酮中的任一种或任几种的组合。
9. 根据权利要求 3 所述的制备 *L*-薄荷醇的方法, 其特征在于: 步骤(1)中, 所述培养基的成分为: 蛋白胨 1~25g/L、乳糖 1~15g/L、酵母膏 1~8g/L、硫酸铵 0~10g/L、磷酸氢二钾 1~6g/L、氯化钠 0~2g/L 和无水硫酸镁 0~1g/L, 所述培养基的 pH 值为 5.0~10.0。
10. 根据权利要求 3 至 9 中任一项所述的制备 *L*-薄荷醇的方法, 其特征在于: 所述酰化剂与薄荷醇异构体混合物的摩尔比为 0.5~20:1。

一种寡养单胞菌及其制备 1-薄荷醇的方法和应用

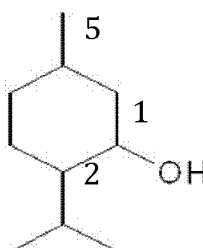
技术领域

[0001] 本发明涉及一种寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas* sp.) 以及制备 1-薄荷醇 (即 (-)-薄荷醇, 化学名为 (1R, 2S, 5R)-2-异丙基-5-甲基环己醇) 的方法。

背景技术

[0002] 薄荷醇又名六氢化百里酚, 化学名为 2-异丙基-5-甲基环己醇, 俗名薄荷脑。薄荷醇分子具有 3 个手性中心, 即 8 种对映异构体, 分别为 1-薄荷醇 ((1R, 2S, 5R)-2-异丙基-5-甲基-环己醇)、1-异薄荷醇 ((1R, 2S, 5S)-2-异丙基-5-甲基-环己醇)、1-新异薄荷醇 ((1S, 2S, 5S)-2-异丙基-5-甲基-环己醇)、1-新薄荷醇 ((1R, 2R, 5S)-2-异丙基-5-甲基-环己醇)、d-薄荷醇 ((1S, 2R, 5S)-2-异丙基-5-甲基-环己醇)、d-异薄荷醇 ((1S, 2R, 5R)-2-异丙基-5-甲基-环己醇)、d-新异薄荷醇 ((1R, 2R, 5R)-2-异丙基-5-甲基-环己醇)、d-新薄荷醇 ((1S, 2S, 5R)-2-异丙基-5-甲基-环己醇)。1-薄荷醇与其他构型的薄荷醇相比, 具有特征的薄荷香气和强烈的清凉作用, 气味更加新鲜轻快, 另外, 1-薄荷醇具有更强的生理活性, 它具有杀菌止痒、兴奋镇痛、镇静、防腐杀菌、治疗疼痛等功效, 因此具有更大的医疗价值。1-薄荷醇的这些性质, 使它比其他构型的薄荷醇具有更高的工业价值。

[0003]



[0004] 随着社会的进步, 人们对于物质生活的要求不断提高, 对 1-薄荷醇的需求量也日益增长。但是, 由于天然提取的 1-薄荷醇依赖种植的薄荷原料, 故受限于地域、气候以及市场供需的影响, 愈加难以满足生产与生活的需要。人们通过合成的手段制备 1-薄荷醇来满足需求, 由于化学法制备的产品是由薄荷醇的 8 种异构体组成的, 1-薄荷醇的含量较低, 直接降低了产品的使用功效, 从 8 种异构体混合物中分离出的 1-薄荷醇产品, 质量与天然产品相当, 但价格低廉, 因此 1-薄荷醇的分离技术成为制约工业化过程的一个主要环节。

[0005] 目前对 1-薄荷醇的合成与提取研究主要分为 3 个方面, 即天然提取研究、化学合成研究、生物合成研究。传统的提取工艺是将薄荷草经蒸气蒸馏制得薄荷原油。经反复结晶得到 1-薄荷醇, 提取过程比较复杂, 能耗高且生产率低。化学合成按照起始原料划分可将其分为两大类: 以具有旋光性的化合物为起始原料; 以大宗石油化学产品 (如间甲酚、百里酚、异戊二烯等) 为起始原料。其中日本高砂公司利用发明的手性催化剂 (S)-BINAP-Rh 催化烯丙胺不对称异构化合成得到 1-薄荷醇, 该技术目前年产 1000 吨 1-薄荷醇。有关生物催化法制备 1-薄荷醇的研究中, 主要涉及到两种拆分反应, 一种是利用微生物或酶催化的酯化或转酯化反应, 另一种是利用微生物或酶催化的水解反应。南非一家研究机构 (CSIR)

公开了一种利用脂肪酶转化拆分薄荷醇制备 1-薄荷醇的工艺过程：利用间甲酚作为原料，合成制得百里酚，然后催化加氢得到薄荷醇的八种异构体的混合物，即 1-薄荷醇、1-异薄荷醇、1-新异薄荷醇、1-新薄荷醇、d-薄荷醇、d-异薄荷醇、d-新异薄荷醇、d-新薄荷醇。使用固定化的脂肪酶 Amano lipase AK 对这八种异构体进行立体选择性酯化，酰化剂为醋酸乙烯酯，可以得到 > 95% ee 的 1-薄荷醇。通过蒸馏将 1-薄荷酯从其他异构体中分离出来，在碱性溶液中水解得到 1-薄荷醇，再通过重结晶的方法制备所需纯度的 1-薄荷醇。

[0006] 尽管生物方法分离 1-薄荷醇的研究取得了很大进展，但仍然普遍存在产物的光学纯度不高，转化率低、生物催化剂种类少和生物催化剂成本高等缺点，制约了工业化的应用。如果利用高选择性的微生物脂肪酶作为拆分剂，则可大大降低原料成本，提高产品纯度，目前尚未见有关于利用寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas* sp.) 对薄荷醇异构体混合物进行转化的方法。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种寡养单胞菌及其制备 1-薄荷醇的方法和应用。

[0008] 为实现上述目的，发明人首次分离纯化到一株能够产选择性转酯化 1-薄荷醇的新菌株。经过 16S rDNA 和生理生化鉴定，该菌株为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)，命名为寡养单胞菌 GS11 (*Stenotrophomonas* sp. GS11)。该菌株保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏日期为 2010 年 10 月 22 日，保藏号为 CGMCC No. 4254。

[0009] 寡养单胞菌 CGMCC No. 4254 可用于作为通过分离薄荷醇异构体混合物来制备 1-薄荷醇的催化剂。

[0010] 本发明利用寡养单胞菌 CGMCC No. 4254 制备 1-薄荷醇的方法包括如下步骤：

[0011] (1) 将保藏号为 CGMCC No. 4254 的寡养单胞菌加入到培养基中进行发酵培养；

[0012] (2) 将步骤 (1) 得到的发酵液进行处理，制备得到固体催化剂；

[0013] (3) 将所述固体催化剂和底物加入到有机溶剂中进行转化反应，得到转化液，所述底物包括薄荷醇异构体混合物和酰化剂；所述薄荷醇异构体混合物含有 1-薄荷醇，且含有 1-异薄荷醇、1-新异薄荷醇、1-新薄荷醇、d-薄荷醇、d-异薄荷醇、d-新异薄荷醇、d-新薄荷醇中的任一种或任几种；

[0014] (4) 将所述转化液进行处理以除去有机溶剂和未反应的底物，得到 1-薄荷醇的酯化物；

[0015] (5) 将所述 1-薄荷醇的酯化物水解，收集得到 1-薄荷醇。

[0016] 进一步地，本发明所述酰化剂为乙酸乙烯酯、乙酸丁酯、乙酸异丙烯酯、乙酸酐、乙酸乙酯、乙酸对氯苯酯、丙酸对氯苯酯、戊酸对氯苯酯、正辛酸对氯苯酯、乙酸-2-氯苯酯、乙酸-2,3-二氯苯酯、乙酸-2,4-二氯苯酯、乙酸苯酯、乙酸间苯二酯、乙酸苯甲酯中的任一种或任几种的组合。

[0017] 进一步地，本发明所述薄荷醇异构体混合物相对于所述有机溶剂的加入量为 1 ~ 156g/L。

[0018] 进一步地，本发明在步骤 (3) 中，所述固体催化剂相对于所述有机溶剂的加入量为 1 ~ 100g/L。

[0019] 进一步地，本发明在步骤 (3) 中，所述转化反应的温度为 15 ~ 60℃，转化反应时间

为 1 ~ 100h。

[0020] 进一步地,本发明在步骤(3)中,所述有机溶剂选自异辛烷、正庚烷、甲基环己烷、叔丁基甲基醚、二甲苯、煤油、戊烷、环己烷、己烷、苯、丁醇、甲苯、四氢呋喃、三氯甲烷、异丙醇、乳酸乙酯和丙酮。

[0021] 进一步地,本发明在步骤(1)中,所述培养基的成分为:蛋白胨 1 ~ 25g/L、乳糖 1 ~ 15g/L、酵母膏 1 ~ 8g/L、硫酸铵 0 ~ 10g/L、磷酸氢二钾 1 ~ 6g/L、氯化钠 0 ~ 2g/L 和无水硫酸镁 0 ~ 1g/L,所述培养基的 pH 值为 5.0 ~ 10.0。

[0022] 进一步地,本发明所述酰化剂与薄荷醇异构体混合物的摩尔比为 0.5 ~ 20 : 1。

[0023] 本发明方法相对于传统的天然提取、化学拆分方法和不对称合成法具有以下优点:

[0024] (1) 由于传统的 1-薄荷醇提取工艺能耗大产率低,而化学拆分法和不对称合成法具有反应条件苛刻、难度大、需要使用大量有机溶剂、对环境造成污染的缺点,而相比之下,本发明采用寡养单胞菌 GS11 (*Stenotrophomonas* sp. GS11) 催化转酯化薄荷醇异构体混合物中的 1-薄荷醇,不仅具有高效选择性和反应条件温和的优点,而且可以从工艺上大量减少有机溶剂的使用,对环境友好。

[0025] (2) 本发明的转化法是利用微生物作为催化剂,可以自行发酵制备,质量稳定,存储稳定,运输方便,能大大降低原料成本,极具广泛应用前景;

[0026] (3) 目前同类制备 1-薄荷醇的方法,是采用化学合成的薄荷醇异构体混合物为起始原料,首先将 1-薄荷醇和 d-薄荷醇这一对对映体分离出来,但 1-薄荷醇和 d-薄荷醇与另外其他 6 种薄荷醇异构体分离存在困难,能耗较大。而本发明直接采用化学法合成得到的薄荷醇异构体混合物作为底物,不需要预先分离过程,方法简单,在设备投资与能耗方面优势明显。

[0027] (4) 采用本发明的寡养单胞菌 *Stenotrophomonas* sp. GS11 进行催化反应,生成 1-薄荷醇的酯化物纯度在 99% 以上;且未反应的底物可以直接回收,重新外消旋化成为底物薄荷醇异构体混合物,提高了底物利用率。

[0028] 生物材料样品的保藏信息:

[0029] 保藏的生物材料样品:寡养单胞菌 GS11 (*Stenotrophomonas* sp. GS11);

[0030] 保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称:CGMCC);

[0031] 保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院中国科学院微生物研究所(邮编:100101);

[0032] 保藏日期:2010 年 10 月 22 日;

[0033] 保藏登记号:CGMCC No. 4254。

附图说明

[0034] 图 1 是寡养单胞菌 GS11 催化反应的转化液的气相色谱图,图中共有 10 个峰信号,由左向右依次为:十二烷,d-异薄荷醇,1-异薄荷醇,d-薄荷醇,1-薄荷醇,d-新异薄荷醇,1-新异薄荷醇,d-新薄荷醇,1-新薄荷醇,1-薄荷醇的乙酸酯;10 个信号峰的出峰时间依次为 6.440 分钟、8.890 分钟、8.957 分钟、9.365 分钟、9.423 分钟、9.557 分钟、9.715 分钟、9.807 分钟、9.915 分钟、10.323 分钟。

[0035] 图 2 是不同反应时间下转化率和产物非对映体过量值的变化曲线。

具体实施方式

[0036] 以下实施例中,在对薄荷醇异构体混合物进行转化反应过程中,对反应液进行底物转化率、产物非对映体过量值(de_p)的测定方法具体如下(其中,所述底物为薄荷醇异构体混合物):

[0037] 在转化反应过程中,5mL 反应液离心(4℃,10000×g,5min) 出去固态物得到液态有机相,进行手性气相色谱分析。该手性气相色谱分析的体系如下:

[0038] 检测仪器:GC-950 气相色谱仪;

[0039] 手性气相柱:CP-CYCLODEXTRIN β -2,3,6-M-19

[0040] (50m×0.25mm×0.25 μ m);

[0041] 检测条件:柱温 150℃,检测器和进样器温度分别为 260℃与 250℃,载气(N₂)30mL/min,空气 5mL/min,氢气 10mL/min。

[0042] 计算公式:

[0043] 底物转化率(%)=(初始底物浓度-剩余底物浓度)/初始底物浓度×100%;

[0044] $de_p(\%) = [(A_R - A_S) / (A_S + A_R)] \times 100\%$

[0045] $de_s = c \times de_p / (1 - c) \times 100\%$

[0046] $E = \ln[1 - c(1 + de_p\%)] / \ln[1 - c(1 - de_p\%)]$

[0047] 其中,c 为转化率, de_p 为产物非对映体过量值,其中 A_S 、 A_R 分别为气相色谱所测样品中(1)-构型产物和非(1)-构型产物的峰面积之和,E 为对映体选择率。

[0048] 实施例 1:菌种的筛选及鉴定

[0049] 本实施例在浙江地区的化工厂、试剂厂等处采集土壤,经过富集、初筛、复筛三个步骤,进行寡养单胞菌 GS11(*Stenotrophomonas* sp. GS11) 的筛选。方法如下:

[0050] 富集培养:培养基成分为(g/L):橄榄油 10.0,酵母膏 5.0,蛋白胨 5.0,硫酸铵 2.0,磷酸氢二钾 2.0,硫酸镁 0.5, pH 为 7.0。121℃灭菌 20min。称取新鲜土样 1g 加入到装有 50ml 富集培养基的 250mL 摇瓶中,置于 30℃、200r/min 摇床中培养。按 2%的接种量,每隔一天进行一次转接,重复三次。

[0051] 平板初筛:培养基成分为(g/L):三油酸甘油酯 50.0,酵母膏 1.0,硫酸铵 2.0,磷酸氢二钾 2.0,氯化钠 2.0,硫酸镁 0.5,琼脂 20.0, pH 为 7.0。120℃灭菌 20min。采用稀释涂布分离法,将已保存的富集菌液适度稀释,各取 200 μ L 涂布在平板培养基上,30℃培养 2~3 天。挑取平板上单菌落接种于新鲜平板培养基上,30℃培养至出现丰满的菌体细胞后置于 4℃冰箱保存。

[0052] 摇瓶复筛:培养基成分为(g/L):橄榄油 100.0,蛋白胨 5.0,甘油 3.0,酵母膏 5.0,硫酸铵 5.0,磷酸氢二钾 2.0,氯化钠 1.0,硫酸镁 0.2, pH 为 7.0。120 灭菌 20min。将初筛获得的单菌落接入 20mL 复筛培养基中,30℃,200rpm 下生长 1 天后,取新鲜发酵液制得固体催化剂。将制得的固体催化剂和薄荷醇异构体混合物、乙酸乙烯酯加入有正己烷进行反应,固体催化剂浓度为 20g/L,薄荷醇异构体混合物浓度为 15.6g/L,乙酸乙烯酯浓度为 18.5g/L。离心出去固体物质得到液体相,用于手性气相色谱进行分析,将底物选择性较高的和产物非对映体过量值均较高的菌株保藏备用。

[0053] 菌种鉴定 :油镜观察、16S rDNA 鉴定和生理生化鉴定。

[0054] 经过筛选,编号为 GS11 的菌株,其非对映体对量值最高,且具有相对较好的转化率,气相谱图见图 1。从图 1 可知,产物 1-薄荷醇乙酸酯出峰位置在 10.323min。对菌株 GS11 作 16S rDNA PCR 测序分析和生理生化实验(见表 1),测序结果如 SEQ No.1 所示,由测序分析和生理生化实验的结果可确定所筛选出的菌株为寡养单胞菌属,该菌株命名为寡养单胞菌 GS11(*Stenotrophomonas* sp. GS11)。

[0055] 表 1 寡养单胞菌 GS11(*Stenotrophomonas* sp. GS11) 生理生化实验结果

[0056]

特征	GS11	特征	GS11	特征	GS11
明胶液化	+	D-甘露糖	-	D-山梨醇	-
V-P 试验	-	D-甘露醇	-	葡萄糖	+
D-果糖	-	脓青素	-	接触酶	+
硝酸盐还原	+	葡萄糖产气	+	运动性	+
革兰氏染色	-	葡萄糖	+	蔗糖	+

[0057] 实施例 2 :

[0058] 选择发酵培养基成分为 :蛋白胨 10g/L,酵母膏 3g/L,乳糖 5g/L,硫酸铵 10g/L,磷酸氢二钾 2g/L,调节 pH 至 7.0。将寡养单胞菌 GS11(*Stenotrophomonas* sp. GS11) 的种子液以 1% (v/v) 接种量接种于 50mL 的上述发酵培养基中,置于 50℃、200r/min 恒温摇床中发酵 3 天后,取出 5mL 发酵液冷冻干燥制得固体催化剂,将固体催化剂以 1g/L 的浓度、薄荷醇异构体混合物(各异构体的含量为 :d- 异薄荷醇 12.3%,l- 异薄荷醇 12.3%,d- 薄荷醇 24.4%,l- 薄荷醇 24.4%,d- 新异薄荷醇 13.3%,l- 新异薄荷醇 13.3%) 以 1g/L 的浓度、乙酸乙烯酯以 0.5g/L(酰化剂乙酸乙烯酯与薄荷醇异构体混合物的摩尔比为 0.9 : 1) 的浓度加入有 5ml 正己烷中,置于 30℃、200r/min 恒温摇床中振荡反应 1h,离心(10000rpm, 5mins) 去除固体后,再进行气相色谱分析,得到最终底物的转化率为 13.3%,产物非对映体过量值 99.7%。

[0059] 实施例 3 :

[0060] 选择发酵培养基成分为 :蛋白胨 30,乳糖 3,酵母膏 1,硫酸铵 7,磷酸氢二钾 4,氯化钠 0.5,硫酸镁 0.5,调节 pH 至 8.0。将菌株 GS11(*Stenotrophomonas* sp. GS11) 的种子液以 3% (v/v) 接种量接种于 50mL 的上述发酵培养基中,置于 18℃、200r/min 恒温摇床中发酵 2 天后,取出 5mL 发酵液通过冷冻干燥制得固体催化剂,将固体催化剂以 40g/L 的浓度、薄荷醇异构体混合物(d- 薄荷醇 20.1%,l- 薄荷醇 20.1%,d- 新异薄荷醇 17.4%,l- 新异薄荷醇 17.4%,d- 新薄荷醇 12.5%,l- 新薄荷醇 12.5%) 以 45g/L 的浓度、乙酸异丙烯酯以 60g/L 的浓度(酰化剂乙酸异丙烯酯与薄荷醇异构体混合物的摩尔比为 2.08 : 1) 加入 5ml 环己烷中,置于 45℃、200r/min 恒温摇床中振荡反应 70h,离心(10000rpm, 5mins) 去除固体后,再进行气相色谱分析,如图 2 所示 :得到最终底物的转化率为 90.7%,产物非对映体过量值 99.5%。

[0061] 实施例 4：

[0062] 选择发酵培养基成分为：蛋白胨 25，乳糖 15，酵母膏 10，硫酸铵 12，磷酸二氢钾 6，氯化钠 1，硫酸镁 1，调节 pH 至 6.0。将寡养单胞菌 GS11 (*Stenotrophomonas* sp. GS11) 的种子液以 2% (v/v) 接种量接种于 70mL 的上述发酵培养基中，置于 30℃、150r/min 恒温摇床中发酵 1 天后，取出 5mL 发酵液冷冻干燥制得固体催化剂，将固体催化剂以 60g/L 的浓度、薄荷醇异构体混合物 (d- 异薄荷醇 5.3%，1- 异薄荷醇 5.3%，d- 薄荷醇 16.9%，1- 薄荷醇 16.9%，d- 新异薄荷醇 18.1%，1- 新异薄荷醇 18.1%，d- 新薄荷醇 9.7%，1- 新薄荷醇 9.7%) 以 156g/L 的浓度、乙酸酐以 51g/L 的浓度 (酰化剂乙酸酐与薄荷醇异构体混合物的摩尔比为 0.5 : 1) 加入 5ml 苯中，置于 15℃、200r/min 恒温摇床中振荡反应 30h，离心 (10000rpm, 5mins) 去除固体得到液态有机相，再进行气相色谱分析，得到最终底物的转化率为 38.72%，产物非对映体过量值为 99.8%。

[0063] 实施例 5：

[0064] 选择发酵培养基成分为：蛋白胨 15，乳糖 20，酵母膏 8，硫酸铵 2，磷酸二氢钾 1，氯化钠 2，硫酸镁 1.5，调节 pH 至 10.0。将寡养单胞菌 GS11 (*Stenotrophomonas* sp. GS11) 的种子液以 5% (v/v) 接种量接种于 50mL 的上述发酵培养基中，置于 40℃、200r/min 恒温摇床中发酵，3 天后，取出 5mL 发酵液冷冻干燥制得固体催化剂，将固体催化剂以 120g/L 的浓度、薄荷醇异构体混合物 (d- 异薄荷醇 5.3%，1- 异薄荷醇 5.3%，d- 薄荷醇 17.6%，1- 薄荷醇 45%，d- 新薄荷醇 13.4%，1- 新薄荷醇 13.4%) 以 14g/L 的浓度、乙酸乙酯以 100g/L 的浓度 (酰化剂乙酸乙酯与薄荷醇异构体混合物的摩尔比为 12.6 : 1) 加入 5ml 甲苯中，置于 60℃、200r/min 恒温摇床中振荡反应 110h，离心 (10000rpm, 5mins) 去除固体后，再进行气相色谱分析：

[0065]

反应时间	1h	5h	20h	50h	75h	90h	110h
转化率 (%)	0.621	2.77	7.14	14.69	18.51	22.32	28.72
de _p (%)	99.8	99.7	99.6	99.5	99.4	99.3	99.3

[0066] 实施例 6：

[0067] 选择发酵培养基成分为：蛋白胨 5，乳糖 1，酵母膏 5，硫酸铵 2，磷酸氢二钾 2，氯化钠 3，硫酸镁 0.8，调节 pH 至 5.0。将寡养单胞菌 GS11 (*Stenotrophomonas* sp. GS11) 的种子液以 3% (v/v) 接种量接种于 50mL 的上述发酵培养基中，置于 37℃、200r/min 恒温摇床中发酵 2 天后，取出 5mL 发酵液冷冻干燥制得固体催化剂，将固体催化剂以 100g/L 的浓度、薄荷醇异构体混合物 (d- 异薄荷醇 13.5%，1- 异薄荷醇 13.5%，d- 薄荷醇 25.7%，1- 薄荷醇 25.7%，d- 新异薄荷醇 9.6%，1- 新异薄荷醇 9.6%，d- 新薄荷醇 1.2%，1- 新薄荷醇 1.2%) 以 4g/L 的浓度、乙酸对氯苯酯以 80g/L 的浓度 (酰化剂乙酸对氯苯酯与薄荷醇异构体混合物的摩尔比为 18 : 1) 加入 5ml 二甲苯中，置于 55℃、200r/min 恒温摇床中振荡反应 85h，离心 (10000rpm, 5mins) 去除固体后，再进行气相色谱分析：

[0068]

反应时间	3h	15h	35h	50h	60h	70h	85h
转化率 (%)	23.27	26.6	34.54	41.66	44.92	46.81	48.32
de _p (%)	99.8	99.7	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6

[0069] 实施例 7 :

[0070] 选择发酵培养基成分为 : 蛋白胨 1, 乳糖 5, 酵母膏 7, 磷酸二氢钾 3, 氯化钠 1, 硫酸镁 0. , 2, 调节 pH 至 7. 0。将寡养单胞菌 GS11 (*Stenotrophomonas* sp. GS11) 的种子液以 1% (v/v) 接种量接种于 50mL 的上述发酵培养基中, 置于 25℃、200r/min 恒温摇床中发酵 1 天后, 取出 5mL 发酵液冷冻干燥制得固体催化剂, 将固体催化剂以 75g/L 的浓度、薄荷醇异构体混合物 (d- 薄荷醇 50%, 1- 薄荷醇 50%) 以 10g/L 的浓度、乙酸乙烯酯以 110g/L (酰化剂乙酸乙烯酯与薄荷醇异构体混合物的摩尔比为 20 : 1) 的浓度加入 5ml 甲苯中, 置于 40℃、200r/min 恒温摇床中振荡反应 100h, 离心 (10000rpm, 5mins) 去除固体后, 再进行气相色谱分析, 得到最终底物的转化率为 65. 46%, 产物非对映体过量值为 99. 7%。

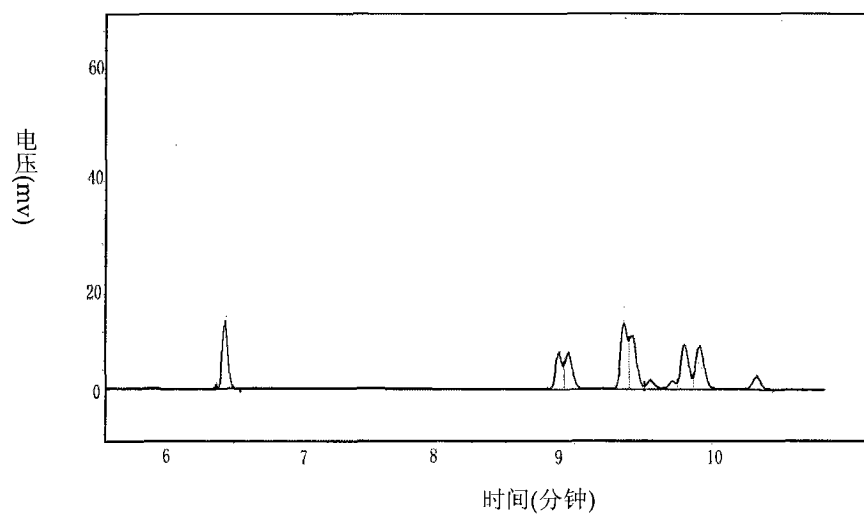


图 1

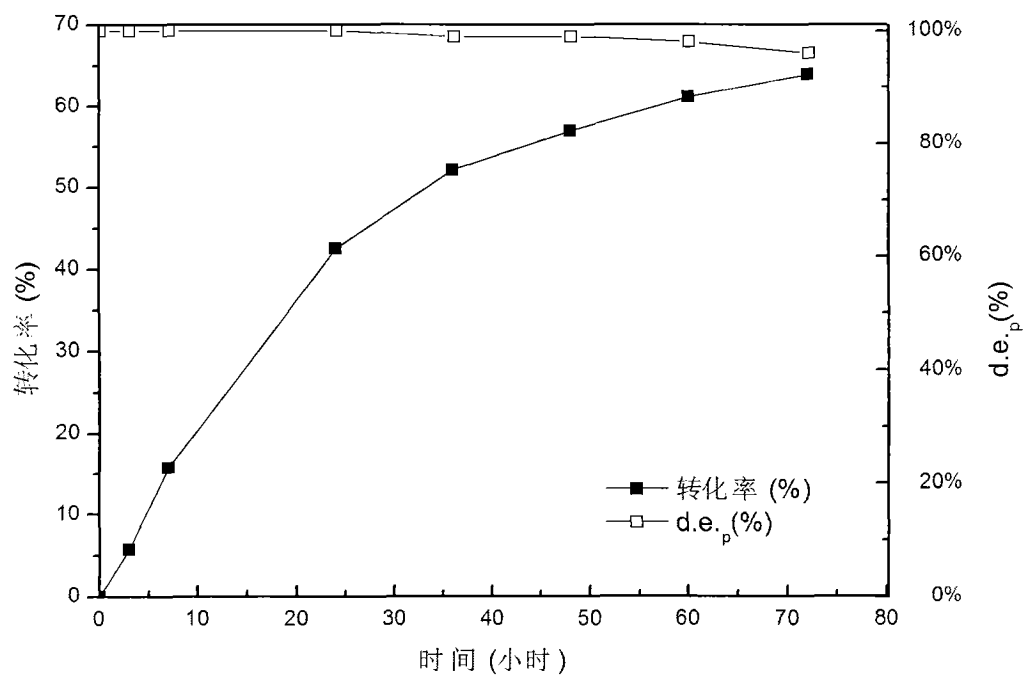


图 2