

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240567**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428170**

(22) Data zgłoszenia: **14.12.2018**

(51) Int.Cl.

C12P 7/62 (2022.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C07C 69/025 (2006.01)

C07C 33/22 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania butanolanu 1-(S)-fenyloetylu oraz 1-(R)-fenyloetanolu na drodze biotransformacji z wykorzystaniem szczepu *Arthrospira maxima* CCALA 27**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
15.06.2020 BUP 13/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
02.05.2022 WUP 18/22

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

AGNIESZKA ŚLIŻEWSKA, Żagań, PL

EWA ŻYMAŃCZYK-DUDA, Smolec, PL

**MAŁGORZATA BRZEZIŃSKA-RODAK,
Wrocław, PL**

MAGDALENA KLIMEK-OCHAB, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner

PL 240567 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania butanolanu 1-(S)-fenyloetylu oraz 1-(R)-fenyloetanolu na drodze biotransformacji z wykorzystaniem szczepu *Arthrospira maxima* CCALA 27 znajdujące zastosowanie jako chiralne bloki budulcowe wykorzystywane do syntez w przemyśle chemicznym czy farmaceutycznym.

Znacząco rosnący udział metod biotechnologicznych (biotransformacji) w procesach otrzymywania związków chemicznych/biologicznie aktywnych związany jest między innymi z możliwością otrzymywania czystych enancjomerów, między innymi sposobem rozdziału mieszaniny racemicznej w prosty i wydajny – zwykle jednoetapowy sposób, co w przypadku syntez chemicznych jest często procesem żmudnym, wieloetapowym i kosztownym.

W patencie PL 194403 B1 został opisany sposób otrzymywania 1-(R)-fenyloetanolu drogą biotransformacji. W sposobie tym racemiczny 1-(R,S)-fenyloetanol zostaje poddany utlenieniu przy wykorzystaniu korzeni selera (*Apium graveolens*).

Dotychczas otrzymywanie butanolanu 1-(S)-fenyloetylu oraz 1-(R)-fenyloetanolu drogą biotransformacji z wykorzystaniem sinic jako biokatalizatorów, dokładnie szczepu *Arthrospira maxima* CCALA 27 nie zostało opisane w literaturze.

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania butanolanu 1-(S)-fenyloetylu o wzorze 1 oraz chiralnego 1-(R)-fenyloetanolu o wzorze 2, polegający na tym, że butanolan 1-(R,S)-fenyloetylu poddaje się biotransformacji z wykorzystaniem trzytygodniowej hodowli szczepu cyjanobakterii *Arthrospira maxima* CCALA 27 inkubowanej w temperaturze około 25°C, przy ciągłym naświetlaniu hodowli światłem fluorescencyjnym (SunGlo, 8W) w ciągu 5 dni.

Korzystnie trzytygodniową hodowlę szczepu cyjanobakterii *Arthrospira maxima* CCALA 27 prowadzi się na podłożu SM (Spirulina Medium).

Korzystnie produkt w postaci 1-(R)-fenyloetanolu wydziela się z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą dwukrotnej ekstrakcji około 50 ml octanu etylu.

Korzystnie produkt w postaci butanolanu 1-(S)-fenyloetylu wydziela się z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą dwukrotnej ekstrakcji około 50 ml octanu etylu.

Korzystnie optymalne stężenie substratu – butanolanu 1-(R,S)-fenyloetylu wynosi 1 mM.

Przedmiot wynalazku jest przedstawiony za pomocą schematu reakcji, wzorami oraz w przykładach ich wykonania.

Przykład 1

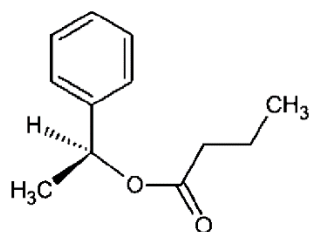
Proces zakładania hodowli wykonuje się poprzez przenoszenie trzytygodniowego inokulum szczepu w objętości 10 ml, do świeżego podłoża o objętości 100 ml. Hodowlę badanego szczepu prowadzi się w warunkach stałego naświetlania świetlówką fluorescencyjną Power-Glo (8W, T5, Hagen), w temperaturze około 25°C w kolbach Erlenmeyer'a o objętości 250 ml. Hodowle zawierają po 100 ml podłoża SM (Spirulina Medium). Substrat – butanolan-1-(R,S)-fenyloetylu dodaje się do trzytygodniowych hodowli, w stężeniu 1 mM. Biotransformację prowadzi się przez 5 dni, w warunkach stacjonarnych, w temperaturze około 25°C, przy ciągłym naświetlaniu świetlówką fluorescencyjną Power-Glo (8W, T5, Hagen). W celu zakończenia biotransformacji po 5 dniach, hodowlę odwirowuje się w wirówce przy 4500 rpm przez 20 minut. Otrzymany supernatant ekstrahuje się dwukrotnie octanem etylu porcjami po około 50 ml. Powstałą w wyniku ekstrakcji frakcję organiczną suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Następnie środek suszący usuwa się przez filtrację, a przesącz zatęża się na wyparce rotacyjnej. Identyfikacji produktu oraz sprawdzenia wydajności reakcji dokonuje się z wykorzystaniem chromatografii gazowej. Wykorzystano kolumnę Varian CP Chirasil-Dex CB, 25 m x 0.25 mm, ID x 0.25 µm. Próbkę przygotowano w octanie etylu. Po biotransformacji przeprowadzonej w powyższy sposób otrzymano butanolan-1-(S)-fenyloetylu z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym e.e% = 97,4% oraz 1-(R)-fenyloetanol nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym e.e% = 40,4%.

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest to, iż otwiera on drogę do syntezy innych związków, ze względu na możliwość otrzymania konkretnych izomerów optycznych (R bądź S), które stanowią cenny blok budulcowy. Wynalazek pozwala na otrzymanie w jednym procesie wzbogaconych mieszanin enancjomerycznych zarówno alkoholu: 1-(R)-fenyloetanolu, jak i estru: butanolanu 1-(S)-fenyloetylu, który pozostaje jako nieprzereagowany substrat z mieszaniny racemicznej butanolanu 1-(R,S)-fenyloetylu, użytego jako materiał wyjściowy.

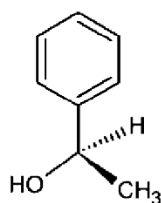
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania butanolanu 1-(*S*)-fenyloetylu o wzorze 1 oraz chiralnego 1-(*R*)-fenyloetanolu o wzorze 2, **znamienny tym**, że butanolan 1-(*R,S*)-fenyloetylu poddaje się biotransformacji z wykorzystaniem trzytygodniowej hodowli szczepu cyjanobakterii *Arthrospira maxima* CCALA 27 inkubowanej w temperaturze około 25°C, przy ciągłym naświetlaniu hodowli światłem fluorescencyjnym (SunGlo, 8W) w ciągu 5 dni.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że trzytygodniową hodowlę szczepu cyjanobakterii *Arthrospira maxima* CCALA 27 prowadzi się na podłożu SM (Spirulina Medium).
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że produkt w postaci 1-(*R*)-fenyloetanolu wydziela się z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą dwukrotnej ekstrakcji około 50 ml octanu etylu.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że produkt w postaci butanolanu 1-(*S*)-fenyloetylu wydziela się z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą dwukrotnej ekstrakcji około 50 ml octanu etylu.
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że optymalne stężenie substratu – butanolanu 1-(*R,S*)-fenyloetylu wynosi 1 mM.

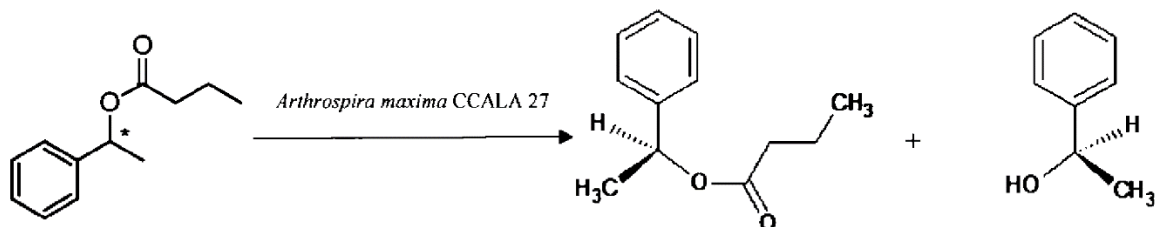
Rysunki



Wzór 1



Wzór 2



Schemat reakcji