

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240683**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429923**

(51) Int.Cl.

C12P 7/22 (2006.01)

C07C 33/26 (2006.01)

C12R 1/685 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **15.05.2019**

(54)

Sposób otrzymywania (S)-1-fenylloetan-1,2-diolu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

16.11.2020 BUP 24/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

23.05.2022 WUP 21/22

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

BEATA SZMIGIEL-MERENA, Wrocław, PL

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

EWA ŻYMAŃCZYK-DUDA, Smolec, PL

MAGDALENA KLIMEK-OCHAB, Wrocław, PL

AGNIESZKA ŚLIŻEWSKA, Żagań, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner

PL 240683 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania (S)-1-fenylloetan-1,2-diolu znajdującego zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym. (S)-1-Fenylloetan-1,2-diol pośredniczy w syntezie wielu wartościowych związków, stosowanych w przemyśle chemicznym, agrochemicznym oraz farmaceutycznym, m.in. w produkcji leków, stosowanych w chorobach układu nerwowego i metabolicznych.

W publikacji Cui Z. i inni p.t. "Highly efficient bioreduction of 2-hydroxyacetophenone to (S)- and (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol by two substrate tolerance carbonyl reductases with cofactor regeneration" w *Journal of Biotechnology* 2017, 243, 1–9 i w publikacji Yaohui L. i inni p.t. "Efficient bioreduction of 2-hydroxyacetophenone to (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol through homologous expression of (S)-carbonylreductase II in *Candida parapsilosis* CCTCC M203011" w *Process Biochemistry* 2016, 51, 1175–1182 przedstawiono metodykę otrzymywania (S)-1-fenylloetan-1,2-diolu z 2-hydroksyacetoenu, przy udziale reduktazy pozyskiwanej z mikroorganizmów.

W publikacji Ali T. i inni p.t. „Halogenated compounds from directed fermentation of *Penicillium concentricum*, an endophytic fungus of the liverwort *Trichocolea tomentella*” w *Journal of Natural Products* 2017, 80, 1397–1403 opisano izolację (R,S)-1-fenylloetan-1,2-diolu ze szczepu *Penicillium concentricum*.

W publikacji Rebey I. B. i inni p.t. „Relation between salt tolerance and biochemical changes in cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds” w *Journal of Food and Drug Analysis* 2017, 25, 391–402 i w publikacji Benrejda A. i inni p.t. „Extraction and Analysis of Essential Oil of Cumin” w *Asian Journal of Chemistry* 2012, 5, 1949–1951 przedstawiono otrzymywanie 1-fenylloetan-1,2-diolu z kminku (*Cuminum cyminum*).

Sposób otrzymywania (S)-1-fenylloetan-1,2-diolu z wykorzystaniem mikroorganizmu *Aspergillus niger* jako biokatalizatora reakcji oraz 2-fenylloetanolu jako substratu nie został dotychczas opisany w literaturze naukowej ani patentowej.

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania (S)-1-fenylloetan-1,2-diolu z wykorzystaniem mikroorganizmu *Aspergillus niger* (KKP 2301) jako biokatalizatora reakcji oraz 2-fenylloetanolu jako substratu reakcji, w 4-dniowym procesie biotransformacji, prowadzonym w bioreaktorze.

Korzystnie biokatalizator otrzymuje się w trakcie hodowli na podłożu ziemniaczanym (PDB).

Korzystnie optymalny czas hodowli *Aspergillus niger* to 3 dni w 23°C, na wyrząsarce rotacyjnej (135 rpm).

Korzystnie czas biotransformacji potrzebny do uzyskania największej ilości (S)-1-fenylloetan-1,2-diolu wynosi 4 dni.

Korzystnie proces biotransformacji prowadzi się w bioreaktorze.

Zaletą sposobu według wynalazku jest umożliwienie uzyskania (S)-1-fenylloetan-1,2-diolu metodą biokatalityczną przyjazną dla środowiska oraz otrzymanie 335 mg związku (wydajność reakcji 65%).

Wynalazek został bliżej przedstawiony w przykładzie jego wykonania oraz na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia widmo masowe (S)-1-fenylloetan-1,2-diolu.

Przykład 1

Szczep *Aspergillus niger* hoduje się w 100 mL podłoża PDB w kolbie Erlenmayer'a (250 mL). Podłoże ziemniaczane PDB przygotowuje się następująco: 200 g umytych, pokrojonych w kostkę ziemniaków gotuje się przez 1 h w 1 litrze wody, a następnie wywar przesącza się przez gazę, uzupełnia wodą destylowaną do 1 L, dodaje 20 g glukozy i sterylizuje w autoklawie.

Do 100 mL medium dodaje się 50 µL inokulum *A. niger* (20 000 zarodników/µL) otrzymanego przez przemycie hodowli na stałym podłożu ziemniaczanym (PDA) sterylnym 0,05% roztworem Tritonu X-100 w ilości 10 mL. Hodowlę *A. niger* prowadzi się na wyrząsarce rotacyjnej 135 rpm w temperaturze 23°C. Proces wzrostu mycelium prowadzi się do osiągnięcia fazy wzrostu logarytmicznego, którą wyznaczono na podstawie krzywej wzrostu – w tym przypadku były to 3 dni. Następnie biomase oddziela się poprzez filtrację na sączku karbowanym i przemywa wodą destylowaną.

Tak przygotowany biokatalizator, w ilości 320 g mokrej biomasy, otrzymanej z hodowli mikroorganizmu w 20 kolbach, umieszcza się w bioreaktorze (1300 mL), zawierającym medium reakcyjne, które stanowi 750 mL wody destylowanej oraz 458 mg (5 mM) substratu – 2-fenylloetanolu. Mieszanie wewnątrz bioreaktora wynosi 200 rpm, napowietrzanie 0.5 L/min, temperatura 23°C.

Po zakończonym procesie, komórki *A. niger* oddziela się od medium reakcyjnego na sączku karbowanym i przemywa wodą destylowaną. Mieszaninę reakcyjną ekstrahuje się octanem etylu, frakcję

organiczną suszy bezwonnym siarczanem magnezu, a następnie odparowuje na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Próbki analizowano za pomocą HPLC, GC, MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HSQC, HMBC. Metoda HPLC oraz GC umożliwia porównanie czasów retencji (S)-1-fenyletan-1,2-diolu w próbce z jego komercyjnie dostępnym wzorcem oraz dzięki wykonaniu krzywej kalibracyjnej określenie ilości (S)-1-fenyletan-1,2-diolu w próbce. Spektroskopie NMR oraz MS pozwalają potwierdzić obecność (S)-1-fenyletan-1,2-diolu w próbce.

Czwarty dzień biotransformacji jest czasem potrzebnym do uzyskania największej ilości (S)-1-fenyletan-1,2-diolu i wynosi ona 335 mg związku otrzymanego w całej objętości reakcyjnego medium (wydajność reakcji 65%). Produkt otrzymany według przykładu posiada następujące dane spektralne:

MS (TOF MS ES+) obliczono dla $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 161.076, znaleziono: 161.0538.

Metody biokatalitycznego otrzymywania produktów, z zastosowaniem mikroorganizmów jako biokatalizatorów reakcji, stanowią ekonomiczny i przyjazny dla środowiska sposób. Z uwagi na udział (S)-1-fenyletan-1,2-diolu w syntezie cennych związków, opracowanie opłacalnych i zgodnych ze środowiskiem metod jego otrzymywania jest niezwykle istotne.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania (S)-1-fenyletan-1,2-diolu, **znamienny tym**, że 2-fenyletanol poddaje się 4-dniowej reakcji biotransformacji z użyciem szczepu *Aspergillus niger* (KKP 2301) jako biokatalizatora reakcji, przy czym proces biotransformacji prowadzi się w bioreaktorze.
2. Biokatalityczny sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że biokatalizator otrzymuje się w trakcie hodowli na podłożu ziemniaczanym (PDB).
3. Biokatalityczny sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że optymalny czas hodowli *Aspergillus niger* to 3 dni w 23°C , na wytrząsarce rotacyjnej o obrotach 135 rpm.

Rysunek

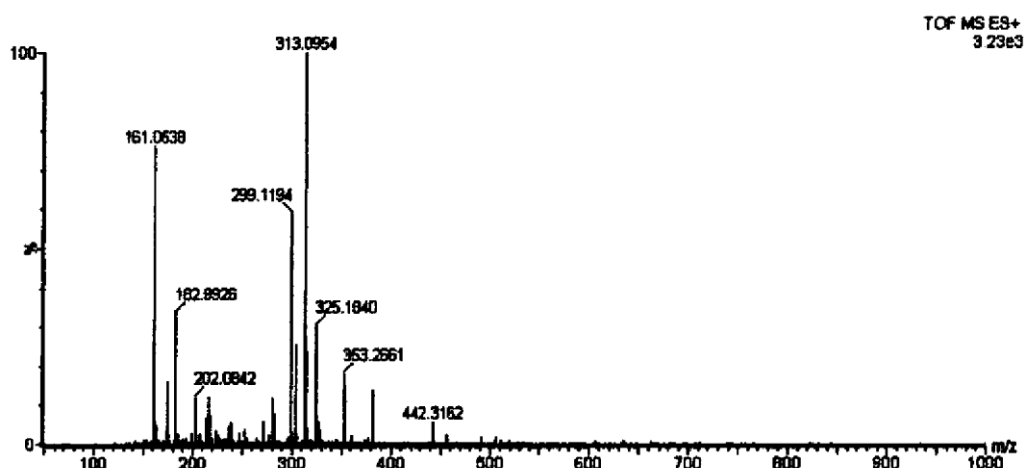


Fig. 1