

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **234344**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **425896**

(51) Int.Cl.

C12P 7/42 (2006.01)

C12R 1/685 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **12.06.2018**

(54)

Sposób otrzymywania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

03.12.2018 BUP 25/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.02.2020 WUP 02/20

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

BEATA SZMIGIEL-MERENA, Wrocław, PL

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

PAULINA MAJEWSKA, Kobierzyce, PL

EWA ŻYMAŃCZYK-DUDA, Smolec, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 234344 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego z wykorzystaniem szczepu *Aspergillus niger* (KKP 2301) jako biokatalizatora reakcji. Otrzymany produkt w postaci kwasu 4-hydroksyfenylooctowego znajduje zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym jako substancja o aktywności antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej i rozjaśniającej przebarwienia skóry, a także jest blokiem budulcowym.

W publikacji Allouche N. i inni p.t. "Use of whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol" w *Applied and Environmental Microbiology* 2004, 4, 2105–2109 opisano procedurę otrzymywania śladowych ilości kwasu 4-hydroksyfenylooctowego jako produktu ubocznego podczas biotransformacji tyrosolu do hydroksytyrozolu przy użyciu *Pseudomonas aeruginosa* jako biokatalizatora. W publikacji Zhang Y. i inni p.t. "A new inositol derivative from *Prenanthes macrophylla*" w *Journal of Asian Natural Products Research* 2012, 2, 182–185 oraz w publikacji Rojas L.B. i inni p.t. "Colorimetric evaluation of phenolic content and GC-MS characterization of phenolic composition of alimentary and cosmetic argan oil and press cake" w *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 9122–9127 przedstawiono procedurę izolacji kwasu 4-hydroksyfenylooctowego z roślin. W publikacji Tsuruta T. p.t. "Antioxidant substance production by the transformation of sweet potato using *Aspergillus niger*" w *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 2009, 363–367 opisano otrzymywanie kwasu 4-hydroksyfenylooctowego ze słodkich ziemniaków z wykorzystaniem mikroorganizmu *Aspergillus niger*. W publikacji Koma D. i inni p.t. "Production of aromatic compounds by metabolically engineered *Escherichia coli* with an expanded shikimate pathway" w *Applied and Environmental Microbiology* 2012, 17, 6203–6216 i w publikacji Hyun-Sun Ko i inni p.t. "Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* HS124 against *Phytophthora blight* is mediated by the production of 4-hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes" w *Current Microbiology* 2009, 59, 608–615 oraz w publikacji Tserkovniak L. S. i inni p.t. "Phosphate-mobilizing bacteria *Bacillus subtilis* as phenolic producers" w *Applied Biochemistry and Microbiology* 2009, 3, 279–284, a także w publikacji Sopheareth M. i inni p.t. "Isolation and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth" w *Current Microbiology* 2006, 53, 358–364 przedstawiono procedurę otrzymywania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego ze szczepów bakterii. W publikacji Kumar A. i inni p.t. "Facile 1,2-aryl migration of 2-halomethyl-2-(4'-hydroxyphenyl) ketals: A novel single step synthesis of 4-hydroxyphenylacetic acid and its derivatives" w *Synthetic Communications* 1997, 27(7), 1133–1141 opisano procedurę otrzymywania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego z wykorzystaniem metody chemicznej.

Fenolowe pochodne i m.in. kwas 4-hydroksyfenylooctowy są przedmiotem zainteresowania z uwagi na bardzo wysoką aktywność antyoksydacyjną, a antyoksydanty chronią żywe organizmy przed chorobami nowotworowymi, udarem mózgu, chorobami serca, cukrzycą, a także schorzeniami skóry. Korzystny wpływ antyoksydantów na zdrowie człowieka skłania do ciągłego poszukiwania alternatywnych metod ich otrzymywania. Metody biokatalitycznego otrzymywania produktów, z zastosowaniem mikroorganizmów jako biokatalizatorów reakcji, stanowią ekologiczny i przyjazny dla środowiska sposób. Kwas 4-hydroksyfenylooctowy znajduje zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym jako substancja o aktywności antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej i rozjaśniającej przebarwienia skóry, a także jest ważnym prekursorem do dalszych syntez. Wykazuje również aktywność antybiotyczną, wykorzystywaną w przemyśle rolniczym. Ze względu na korzystne działanie kwasu 4-hydroksyfenylooctowego, opracowanie przyjaznych środowisku metod jego otrzymywania jest niezwykle istotne.

Biokatalityczny sposób otrzymywania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego z wykorzystaniem szczepu *Aspergillus niger* jako biokatalizatora reakcji oraz 2-fenyloetanolu jako substratu, nie została dotychczas opisana w literaturze naukowej ani patentowej.

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego, który polega na tym, że 2-fenyloetanol poddaje się 3-dniowej reakcji biotransformacji z użyciem szczepu *Aspergillus niger* (KKP 2301) jako biokatalizatora reakcji, przy czym biokatalizator stanowi wypełnienie kolumny z ciągłą recyrkulacją medium reakcyjnego.

Korzystnie biokatalizator otrzymuje się w trakcie hodowli na podłożu ziemniaczanym (PDB) z równoczesną immobilizacją na piankach poliuretanowych.

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

Korzystnie biokatalizator immobilizowany jest na piankach poliuretanowych o średnicy porów w zakresie 1060–1600 µm.

Zaletą sposobu według wynalazku jest umożliwienie uzyskania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego metodą biokatalityczną przyjazną dla środowiska oraz otrzymanie 11 mg związku (wydajność reakcji 10%).

Sposób wynalazku został przedstawiony w przykładzie jego wykonania oraz na rysunku na którym na:

fig. 1 przedstawiono widmo masowe MS (TOF MS ES+) obliczone dla $C_8H_8O_3Na$ $[M+Na]^+$ 175.0552, znaleziono: 175.0728 dla otrzymanego związku według sposobu,

fig. 2 przedstawiono widmo masowe MS (TOF MS ES+) obliczone dla $C_8H_9O_3$ $[M+H]^+$ 153.0552, znaleziono: 153.0944 dla otrzymanego związku według sposobu.

P r z y k ł a d

Hodowlę badanego szczepu *Aspergillus niger* prowadzi się z równoczesną jego immobilizacją na piankach poliuretanowych Filtren TM 25133 o kształcie sześciątów o długości boku 1 cm i średnicy porów 1060–1600 μm , 20 sztuk pianek poliuretanowych dodaje się do kolby Erlenmayer'a (250 mL) zawierającej 100 mL podłoża PDB i sterylizuje w autoklawie. Podłoże PDB przygotowuje się według przepisu nr 129 dostępnym w bazie DSMZ. 200 g umytych, pokrojonych w kostkę ziemniaków gotuje się przez 1 h w 1 litrze wody, a następnie otrzymany 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 przemywanie hodowli na stałym podłożu ziemniaczanym (PDA) sterylnym 0,05% roztworem Tritonu X-100 w ilości 10 mL. Hodowlę *A. niger* prowadzi się na wytrząsarce rotacyjnej 135 rpm w temperaturze 23°C w obecności pianek poliuretanowych. Proces wzrostu mycelium prowadzi się do osiągnięcia fazy wzrostu logarytmicznego, którą wyznaczono na podstawie krzywej wzrostu, w tym przypadku były to 3 dni. Następnie zimmobilizowaną biomasę oddziela się poprzez filtrację na sączku karbowanym i przemywa wodą destylowaną.

Tak przygotowanym biokatalizatorem wypełnia się kolumnę. Proces prowadzi się przez 3 dni z ciągłą recyrkulacją medium reakcyjnego, które stanowi 150 mL wody destylowanej oraz 90 mg (5 mM) substratu-2-fenyloetanolu. Cyrkulacja medium (3 mL/min) przez upakowaną biokatalizatorem kolumnę jest zapewniona dzięki pompie perystaltycznej.

Po zakończeniu procesu, zimmobilizowana biomasa *A. niger* zostaje odseparowana od medium reakcyjnego na sączku karbowanym i przemyta wodą destylowaną. Mieszaninę reakcyjną ekstrahuje się octanem etylu, frakcję organiczną suszy bezwonnym siarczanem magnezu i odparowuje na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Próbki analizowano za pomocą HPLC, 1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HSQC, HMBC, MS. Metoda HPLC pozwala porównać czasy retencji kwasu 4-hydroksyfenylooctowego w próbce z jego komercyjnie dostępnym wzorcem oraz dzięki wykonaniu krzywej kalibracyjnej określić ilość kwasu 4-hydroksyfenylooctowego w próbce. Spektroskopie NMR oraz MS pozwalają potwierdzić obecność kwasu 4-hydroksyfenylooctowego w próbce.

Trzeci dzień biotransformacji jest czasem potrzebnym do uzyskania największej ilości kwasu 4-hydroksyfenylooctowego i wynosi ono 11 mg związku otrzymanego w całej objętości reakcyjnego medium.

Produktem reakcji jest kwas 4-hydroksyfenylooctowy – widmo 1,2 przedstawiono na fig. 1 i fig. 2.

Produkt otrzymany według przykładu posiada następujące dane spektralne:

MS (TOF MS ES+) obliczono dla $C_8H_9O_3$ $[M+H]^+$ 153.0552, znaleziono: 153.0944;

MS (TOF MS ES+) obliczono dla $C_8H_8O_3Na$ $[M+Na]^+$ 175.0552, znaleziono: 175.0728.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania kwasu 4-hydroksyfenylooctowego, **znamienny tym**, że 2-fenyloetanol poddaje się 3-dniowej reakcji biotransformacji z użyciem szczepu *Aspergillus niger* (KKP 2301) jako biokatalizatora reakcji, przy czym biokatalizator stanowi wypełnienie kolumny z ciągłą recyrkulacją medium reakcyjnego.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że biokatalizator otrzymuje się w trakcie hodowli na podłożu ziemniaczanym (PDB) z równoczesną immobilizacją na piankach poliuretanowych.

3. 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.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że biokatalizator immobilizowany jest na piankach poliuretanowych o średnicy porów 1060–1600 μm.

Rysunki

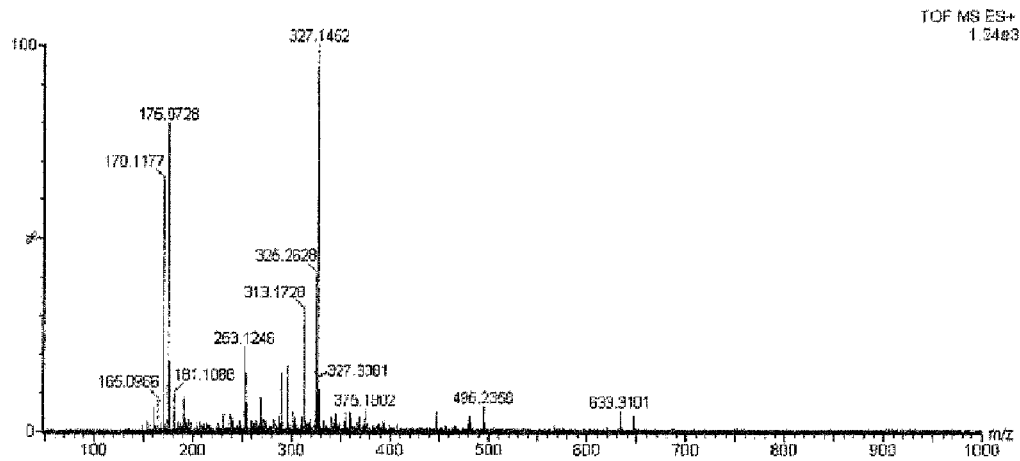


Fig. 1

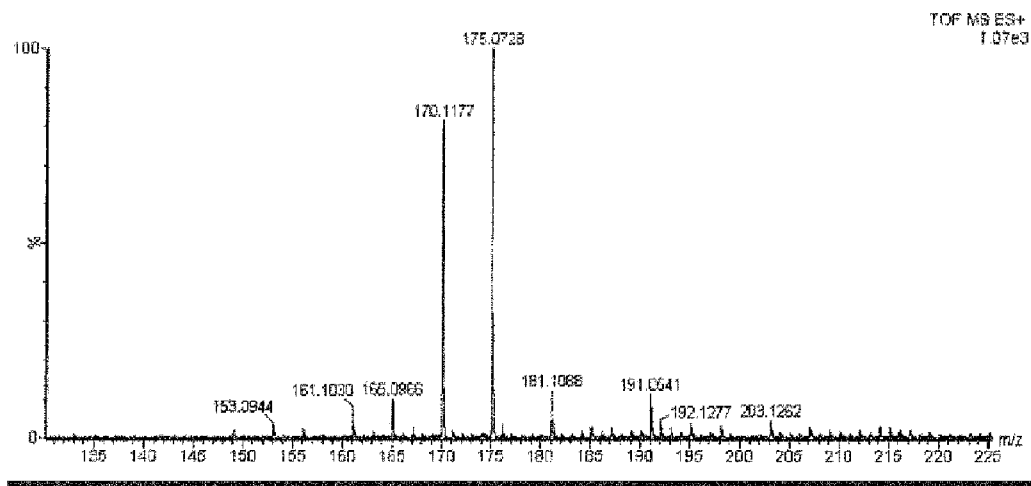


Fig. 2