

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **238970**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430872**

(51) Int.Cl.
C12P 17/04 (2006.01)
C12R 1/15 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **14.08.2019**

(54)

Sposób wytwarzania (+)-izomeru-(3R)-3-n-butyloftalidu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

22.02.2021 BUP 04/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

25.10.2021 WUP 30/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

JAKUB PANNEK, Wrocław, PL
DAWID HERNIK, Lubliniec, PL
JOANNA GACH, Bystrzyca Kłodzka, PL
EWA SZCZEPAŃSKA, Trzebnica, PL
FILIP BORATYŃSKI, Wrocław, PL
TERESA OLEJNICZAK, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 238970 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania (+)-izomeru-(3R)-3-n-butyloftalidu o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym jako aromat produktów spożywczych.

(+)-Izomer-(3R)-3-n-butyloftalidu jest bicyklicznym laktonem, o strukturze identycznej jak naturalnie biosyntezywany lakton, izolowany z roślin z rodziny Apiaceae. (Leon A., Del-Angel M., Avila J. L., Delgado G.. Phthalides: distribution in nature, chemical reactivity, synthesis, and biological activity. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 2017, 104, 127–245).

(+)-Izomer-(3R)-3-n-butyloftalidu jest metabolitem wtórnym oznaczanym w selerze, lubczyku, pietruszce, nadającym tym roślinom charakterystyczny aromat, kojarzony jako zapach selera (Beck J.J., Shen-Chieh C. The structural diversity of phthalides from the Apiaceae. *Journal of Natural Products* 2007, 70 (5), 891–900).

Znane są metody otrzymywania racemicznego 3-n-butyloftalidu z bezwodnika ftalidowego poprzez syntezę ze związkami metaloorganicznymi (Karmakar R., Pahari P., Mal D. Phthalides and phthalans: synthetic methodologies and their applications in the total synthesis. *Chemical Reviews* 2014, 114, 6213–6284).

Brak jest doniesień literaturowych o otrzymywaniu (+)-izomeru-(3R)-3-n-butyloftalidu metodami biotransformacji, poprzez enancjoselektywne utlenienie dioli bakteriami w hodowlach płynnych lub stałych.

Istotą wynalazku jest to, że do podłoża składającego się z 1% peptonu, 0,2% kazeiny, 0,2% ekstraktu drożdżowego, 6% chlorku sodu i 2% glukozy, dodaje się inoculum hodowli *Rhodococcus ruber* PCM2166.

Po upływie co najmniej 48 godzin dodaje się do hodowli racemiczny 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksypentylo)benzen, o stężeniu nie większym niż 0,6 g/dm³. Następnie, po całkowitym przereagowaniu substratu, ekstrahuje się otrzymany produkt, po uprzednim zakwaszeniu kwasem solnym do pH nie wyższego niż 4, otrzymując (+)-izomer-(3R)-3-n-butyloftalid o wzorze 2.

Otrzymuje się (+)-izomer-(3R)-3-n-butyloftalid w wyniku enancjoselektywnego utlenienia diolu przy użyciu *Rhodococcus ruber* PCM2166.

Korzystnie jest, gdy dodaje się *inoculum* 2-dniowej hodowli bakterii.

Korzystnie także jest, gdy OD₆₀₀ wynosi od 0,6 do 0,7.

Korzystne również jest, gdy proces biotransformacji prowadzony jest w temperaturze 28°C i przepływie powietrza 1 v/m.

Zasadniczą zaletą sposobu, według wynalazku, jest to, że szczep *Rhodococcus ruber* PCM2166 hodowany na podłożu płynnym enancjoselektywnie utlenienia izomery (+) i (-) diolu (wzór 1) do (+)-izomeru 3-n-butyloftalidu (wzór 2) ze stopniem przereagowano 90–95% i nadmiarem enancjomerycznym ee = 87–94% wykorzystując dwa różne mechanizmy utlenienia.

Wynalazek jest bliżej określony na przykładzie wykonania.

P r z y k ł a d:

Szczep *Rhodococcus ruber* PCM2166 pozyskano z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów, znajdującej się w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu. Hodowlę *Rhodococcus ruber* PCM2166 prowadzi się w bioreaktorze (Brunswick, USA) w naczyniu o pojemności 7 L, zawierającym 3,5 L wysterylizowanego podłoża o składzie: 1% peptonu, 0,2% kazeiny, 0,2% ekstraktu drożdżowego, 6% chlorku sodu i 2%, glukozy, do którego dodaje się 10% objętościowych *inoculum* 2-dniowej hodowli *Rhodococcus ruber* PCM2166 o OD₆₀₀ = 0,6–0,7. Hodowlę prowadzi się w temperaturze 28°C, przy mieszaniu 600 rpm mieszadłem łopatkowym i przepływie powietrza 1 v/m. Do 2-dniowej hodowli dodaje się racemiczny 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksypentylo)benzen o wzorze 1, w stężeniu 0,5–0,6 g/dm³. Proces kontroluje się analizując go technikami chromatografii gazowej. Nadmiar enancjomeryczny wyznacza się z analizy GC na kolumnie z wypełnieniem chiralnym Cyclosil-B i L-Val. Po 14 dniach transformacji i całkowitym przereagowaniu substratu, produkt ekstrahuje się octanem etylu, po uprzednim zakwaszeniu 10% kwasem solnym do pH=4. Ekstrakt jest osuszany nad bezwodnym siarczanem magnezu. Po odparowaniu rozpuszczalnika surowy produkt poddaje się chromatografii na żelu krzemionkowym stosując eluent heksan : aceton w stosunku objętościowym 3:1 uzyskując 874.3 mg (+)-enancjomery o nadmiarze enancjomerycznym ee = 93% ([α]²³_D = +44,86 (c 1,0 CHCl₃)). Wydajność po oczyszczeniu wynosi 59%.

Użyty substrat o wzorze 1 charakteryzuje się następującymi danymi spektroskopowymi:
 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0,91 (t, 3, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 1,24-1,34 (m, 1, jeden z $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 1,34-1,44 (m, 2, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 1,44-1,53 (m, 1, jeden z $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 1,78-1,95 (m, 2, $\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-}$), 2,65 (s, 2, OH), 4,70 (d, 1, $J = 12,1$ Hz, jeden z $\text{-CH}_2\text{-OH}$), 4,78 (d, 1, $J = 12,1$ Hz, jeden z $\text{CH}_2\text{-OH}$), 4,93 (dwa d, 1, $J = 6,8$ Hz, $=^2\text{C-CH(OH)CH}_2\text{-}$), 7,26 (m, 1, $=^4\text{CH-}$), 7,31-7,35 (m, 2, $=^3\text{CH-}$, $=^6\text{CH-}$), 7,41-7,44 (m, 1, $=^5\text{CH-}$).

^{13}C NMR (151 MHz), δ (ppm): 14,02 ($\text{CH}_3\text{-}$), 22,64 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 28,51 ($\text{-CH}_2\text{-}$), 36,78 ($\text{-CH}_2\text{-}$), 63,80 ($\text{-CH}_2\text{-OH}$), 71,68 ($=^2\text{C-CH(OH)-}$), 126,52 ($=^3\text{CH-}$), 127,80 ($=^6\text{CH-}$), 128,47 ($=^5\text{CH-}$), 129,77 ($=^4\text{CH-}$), 138,14 ($=^1\text{C-CH}_2\text{OH}$), 142,59 ($=^2\text{C-CH(OH)-}$).

GC-EIMS 194 (M+1)

Uzyskany produkt o wzorze 2 charakteryzuje się następującymi danymi spektroskopowymi:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0,89 (t, 3, $J = 7,18$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 1,31-1,44 (m, 2, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 1,44-1,54 (m, 2, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 1,65-1,80 (m, 1, jeden z $\text{-}^3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 1,99-2,12 (m, 1, jeden z $\text{-}^3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 5,46 (dd, 1, $J = 7,85$ Hz, $J = 3,7$ Hz, $\text{-}_3\text{CH-O-}$), 7,42 (d, 1, $J = 7,65$ Hz, $=^4\text{CH-}$), 7,75 (t, 1, $J = 7,5$ Hz, $=^6\text{CH-}$), 7,66 (t, 1, $J = 7,5$ Hz, $=^5\text{CH-}$), 7,88 (d, 1, $J = 7,7$ Hz, $=^7\text{CH-}$).

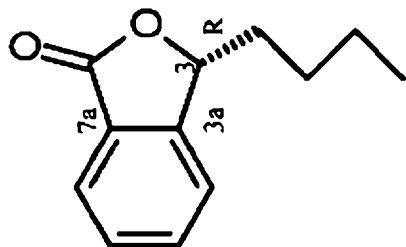
^{13}C NMR (151 MHz), δ (ppm): 13,99 ($\text{CH}_3\text{-}$), 22,55 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), 27,00 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 34,57 ($\text{-CH}_2\text{-CH-O-}$), 81,57 (-CH-O-), 121,68 ($=^4\text{CH-}$), 125,81 ($=^7\text{CH-}$), 126,19 ($=^7\text{aC-C(O)-}$), 129,14 ($=^6\text{CH-}$), 134,05 ($=^5\text{CH-}$), 150,27 ($=^3\text{aC-C-O-}$), 170,82 ($\text{-O-}^1\text{C(O)-C-}$).

GC-EIMS 191 (M+1).

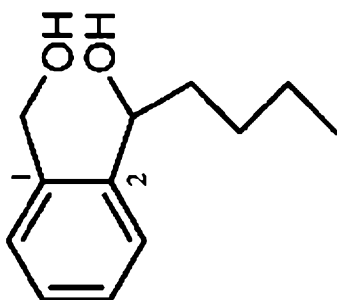
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania (+)-izomeru-(3R)-3-n-butyloftalidu **znamienny tym**, że do podłoża składającego się z 1% peptonu, 0,2% kazeiny, 0,2% ekstraktu drożdżowego, 6% chlorku sodu i 2% glukozy, dodaje się *inoculum* hodowli *Rhodococcus ruber* PCM2166, kolejno po upływie co najmniej 48 godzin, dodaje się racemiczny 1-hydroksymetylo-2-(1-hydroksypentylo)benzen o wzorze 1, o stężeniu nie większym niż 0,6 g/dm³, następnie po całkowitym przereagowaniu substratu, produkt ekstrahuje się, po uprzednim zakwaszeniu kwasem solnym do pH nie wyższego niż 4, otrzymując (+)-izomer-(3R)-3-n-butyloftalid o wzorze 2.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dodaje się *inoculum* 2-dniowej hodowli bakterii.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że OD₆₀₀ wynosi od 0,6 do 0,7.
4. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w temperaturze 28°C i przepływie powietrza 1 v/m.

Rysunek

**Wzór 2**

Rhodococcus ruber PCM2166

**Wzór 1**