

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **236624**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **425894**

(51) Int.Cl.
C12P 7/22 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **12.06.2018**

(54)

Sposób otrzymywania 1-fenylloetan-1,2-diolu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

25.02.2019 BUP 05/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

08.02.2021 WUP 03/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

BEATA SZMIGIEL-MERENA, Wrocław, PL
MAŁGORZATA BRZEZIŃSKA-RODAK,
Wrocław, PL

MAGDALENA KLIMEK-OCHAB, Wrocław, PL
PAULINA MAJEWSKA, Kobierzyce, PL
EWA ŻYMAŃCZYK-DUDA, Smolec, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 236624 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania 1-fenyl-1,2-diolu z wykorzystaniem mikroorganizmu *Rhizopus oryzae* (DSM 1185) jako biokatalizatora reakcji. Otrzymany produkt w postaci 1-fenyl-1,2-diolu jest ważnym produktem pośrednim w syntezie wielu specjalistycznych związków chemicznych, agrochemikaliów oraz wartościowych farmaceutyków.

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 oraz w publikacji Hu Q. i inni p.t. "Highly enantioselective reduction of 2-hydroxy-1-phenylethanone to enantiopure (R)-phenyl-1,2-ethanediol using *Saccharomyces cerevisiae* of remarkable reaction stability" w *Bioresource Technology* 2010, 101, 8502–8508, a także w publikacji Zhang R. i inni p.t. "Improved production of (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol by a codon-optimized R-specific carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* in *Escherichia coli*" w *Applied Biochemistry Biotechnology* 2010, 160, 868–878 opisano procedurę otrzymywania 1-fenyl-1,2-diolu z 2-hydroksyacetofenonu dzięki aktywności reduktazy pozyskiwanej z mikroorganizmów.

W publikacji Kamble M.P. i inni p.t. "Biocatalytic resolution of (R,S)-styrene oxide using a novel epoxide hydrolase from red mung beans" w *Catalysis Today* 2018, 309, 236–241 oraz w publikacji Hee Sook K. i inni p.t. "Biosynthesis of (R)-phenyl-1,2-ethanediol from racemic styrene oxide by using bacterial and marine fish epoxide hydrolases" w *Biotechnology Letters* 2008, 30, 127–133, a także w publikacji Cao L. i inni p.t. "Enantioconvergent production of (R)-1-phenyl-1,2-ethanediol from styrene oxide by combining the *Solanum tuberosum* and an evolved *Agrobacterium radiobacter* AD1 epoxide hydrolases" w *Biotechnology and Bioengineering* 2006, 3, 522–529 przedstawiono otrzymywanie 1-fenyl-1,2-diolu z tlenku styrenu przy użyciu hydrolaz epoksydowych wyizolowanych z roślin lub bakterii.

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 1-fenyl-1,2-diol został wyizolowany 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 procedurę otrzymywania 1-fenyl-1,2-diolu z kminku – *Cuminum cyminum*.

1-Fenyl-1,2-etanodiol jest bardzo ważnym blokiem budulcowym w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym. Pośredniczy w syntezie aktywnych składników chemicznych i agrochemikaliów, a także leków, stosowanych m.in. w chorobach układu nerwowego i zaburzeniach metabolicznych. Zastosowanie mikroorganizmów całokomórkowych jako biokatalizatorów, zapewnia ekonomiczną i zgodną ze środowiskiem metodę otrzymywania produktów. Z uwagi na udział 1-fenyl-1,2-etanodiolu w syntezie wartościowych związków, opracowanie przyjaznych środowisku i opłacalnych metod jego otrzymywania jest niezwykle istotne.

Szczep *Rhizopus oryzae* (DSM 1185) został ujawniony w kolekcji Niemieckiego Zbioru Mikroorganizmów i Hodowli Komórkowych GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH).

Biokatalityczny sposób otrzymywania 1-fenyl-1,2-etanodiolu z wykorzystaniem mikroorganizmu *Rhizopus oryzae* jako biokatalizatora reakcji oraz 2-fenyl-1,2-etanodiolu jako substratu nie został dotychczas opisany w literaturze naukowej ani patentowej.

Istotą wynalazku jest biokatalityczny sposób otrzymywania 1-fenyl-1,2-etanodiolu, który polega na tym, że 2-fenyl-1,2-etanodiol poddaje się 3 dniowej reakcji biotransformacji z użyciem immobilizowanego szczepu *Rhizopus oryzae* (DSM 1185) jako biokatalizatora reakcji, przy czym szczep *Rhizopus oryzae* (DSM 1185) otrzymuje się w trakcie hodowli na podłożu ziemniaczanym (PDB) z równoczesną immobilizacją na piankach poliuretanowych.

Korzystnie optymalny czas hodowli *Rhizopus oryzae* to 2 dni w 23°C, na wytrząsarce rotacyjnej (135 rpm).

Korzystnie biokatalizator immobilizowany jest na piankach poliuretanowych o średnicy porów w zakresie 740–1040 μm .

Zaletą sposobu według wynalazku jest umożliwienie uzyskania 1-fenylo-1,2-etanodiolu metodą biokatalityczną – przyjazną dla środowiska oraz otrzymanie 2 mg związku z 30 mg substratu.

Sposób wynalazku został przedstawiony w przykładzie jego realizacji oraz na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia widmo 1-fenylo-1,2-etanodiolu otrzymanego sposobem według wynalazku.

P r z y k ł a d

Szczep *Rhizopus oryzae* hoduje się z równoczesną jego immobilizacją na piankach poliuretanowych Filtren S28089 o kształcie sześciątów o długości boku 1 cm i średnicy porów 740–1040 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, opisanego w bazie DSMZ. 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 podłoża dodaje się 500 μL inokulum *R. oryzae* (1400 zarodników/ μL) otrzymanego przez przemycie hodowli na stałym podłożu ziemniaczanym (PDA) sterylnym 0,05% roztworem Tritonu X-100 w ilości 10 mL. Hodowlę *R. oryzae* prowadzi się na wytrząsarce rotacyjnej 135 rpm w temperaturze 23°C. Proces wzrostu mycelium prowadzi się do osiągnięcia fazy wzrostu logarytmicznego, którą wyznacza się na podstawie krzywej wzrostu – w tym przypadku były to 2 dni. Następnie z immobilizowaną biomasą oddziela się poprzez filtrację na sączku karbowanym i przemywa wodą destylowaną.

Tak przygotowany biokatalizator umieszcza się w kolbie Erlenmayer'a (250 mL), zawierającej medium reakcyjne, które stanowi 50 mL wody destylowanej oraz 30 mg (5 mM) substratu – 2-fenyloetanolu.

Po zakończonym procesie, komórki *R. oryzae* zostają oddzielone od medium reakcyjnego na sączku karbowanym i przemywane są 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, ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HSQC, HMBC, MS. Metoda HPLC umożliwia porównanie czasów retencji 1-fenylo-1,2-etanodiolu w próbce z jego komercyjnie dostępnym wzorcem oraz dzięki wykonaniu krzywej kalibracyjnej określenie ilości 1-fenylo-1,2-etanodiolu w próbce. Spektroskopie NMR oraz MS pozwalają potwierdzić obecność 1-fenylo-1,2-etanodiolu w próbce.

Trzeci dzień biotransformacji jest czasem potrzebnym do uzyskania największej ilości 1-fenylo-1,2-etanodiolu i wynosi ona 2 mg związku otrzymanego w całej objętości reakcyjnego medium.

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.

Widmo otrzymanego związku według wynalazku przedstawione jest na fig. 1.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania 1-fenylo-1,2-etanodiolu, **znamienny tym**, że 2-fenyloetanol poddaje się 3 dniowej reakcji biotransformacji z użyciem immobilizowanego szczepu *Rhizopus oryzae* (DSM 1185) jako biokatalizatora reakcji, przy czym szczep *Rhizopus oryzae* (DSM 1185) otrzymuje się w trakcie hodowli na podłożu ziemniaczanym (PDB) z równoczesną immobilizacją na piankach poliuretanowych.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że optymalny czas hodowli *Rhizopus oryzae* to 2 dni w 23°C, na wytrząsarce rotacyjnej o obrotach 135 rpm.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że biokatalizator immobilizowany jest na piankach poliuretanowych o średnicy porów 740–1040 μm .

Rysunek

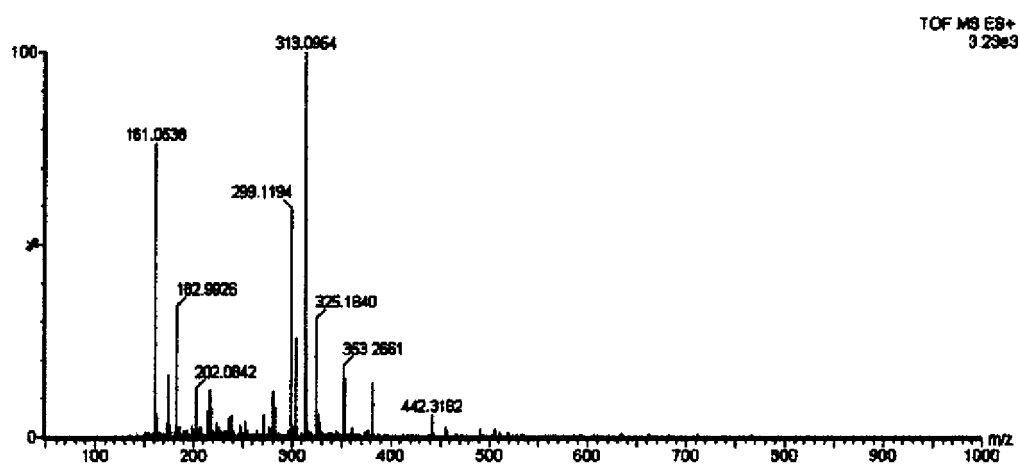


Fig. 1