

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245489 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **435009**

(22) Data zgłoszenia: **2020.08.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.02.21 BUP 08/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.08.12 WUP 33/2024**

(51) MKP:

C12P 7/26 (2006.01)

C07C 49/825 (2006.01)

C07C 49/807 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU, Wrocław, PL
UNIwersytet JANA KOCHANOWSKIEGO
W KIELCACH, Kielce, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**MATEUSZ ŁUŻNY, Wrocław, PL
DAGMARA KACZANOWSKA, Grzędy, PL
BARBARA GAWDZIK, Zagnańsk, PL
ALICJA WZOREK, Wilków, PL
ALEKSANDRA PAWLAK, Wrocław, PL
BOŻENA OBMIŃSKA-MRUKOWICZ,
Wrocław, PL
EWA KOZŁOWSKA, Wrocław, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3''-bromofenylo)-propan-1-onu

PL 245489 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3''-bromofenylo)-propan-1-onu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym do otrzymania środka słodzącego oraz w przemyśle farmaceutycznym do otrzymywania prekursora leków regulujących pracę serca.

Dihydrochalkony są syntezowane przez rośliny i charakteryzują się słodkim smakiem. Również syntetyczne związki posiadające ugrupowanie dihydrochalkonu wykazują wysokie wrażenie słodkości (Winnig M, Bufe B, Kratochwil NA, Slack JP, Meyerhof W. 2007 BMC Struct. Biol. 7, 66; Krammer G, Ley J, Riess T, Haug M, Paetz S, Kindel G, Schmidtman R. Patent No.: US 20100233102; Sep, 16, 2010. Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press, London 1993, Krutosikowa A., Uher M.: Naturalne i syntetyczne substancje o słodkim smaku. PWN, Warszawa 1990; 2'-Hydroksydihydrochalkon jest wykorzystywany jako blok budulcowy w syntezie propafenonu – substancji czynnej leków przeciwnarciowych (Noe CR, Knollmüller M, Oberhauser B, Steinbauer G, Wagner E. 1986 Chemische Berichte, 119, 729–743; Ecker G, Chiba P, Hitzler M, Schmid D, Visser K, Cordes HP, Csöllei J, Seydel JK, Schaper K-J. 1996 J. Med. Chem. 39, 4767–4774; Ecker G, Noe CR, Fleischhacker W. 1997 Monatsh. Chem. 128, 53–59). Znana jest również ich aktywność tej grupy związków względem patogennych mikroorganizmów, w tym gram-dodatnich i gram-ujemnych bakterii oraz grzybów (Awouafack MD, Kusari S, Lamshöft M, Ngamga D, Tane P, Spiteller M. 2010 Planta Med. 76, 640–643). Dihydrochalkon (floretyna) jest aktywnym inhibitorem tyrozynazy grzybowej (Zhang L-Q, Yang X-W, Zhang Y-B, Zhai Y-Y, Xu W, Zhao B, Liu D-L, Yu H-J. 2012 Food Chem. 132, 936–942).

Szczep *Yarrowia lipolytica* KCh 71 był wcześniej ujawniony w literaturze (Janeczko T, Gładkowski W, Kostrzewa-Susłow E. 2013 J. Mol. Cat. B-Enzym. 98, 55–61; Janeczko T, Dymarska M, Siepka M, Gniłka R, Leśniak A, Popłoński J, Kostrzewa-Susłow E. 2014 J. Mol. Cat. B-Enzym. 109, 47–52; Janeczko T, Kostrzewa-Susłow E. 2014 Tetrahedron: Asymmetry, 25, 1264–1269; Łużny M, Krzywda M, Kozłowska E, Kostrzewa-Susłow E, Janeczko T. (2019) Effective hydrogenation of 3-(2''-furyl)- and 3-(2''-thienyl)-1-(2'-hydroxyphenyl)-prop-2-en-1-one in selected yeast cultures. Molecules, 24, 3185).

Znana jest chemiczna metoda uzyskiwania 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3''-bromofenylo)-propan-1-onu. W wyniku zasadowej hydrolizy 3-(3'-bromiobenzyl)-4-hydroksycumaryby uzyskano z wydajnością 80% 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3''-bromofenylo)-propan-1-onu (L. P. Zalukaev, M. P. Aleksyuk (1968) Synthesis of 3-halobenzyl-4-hydroxycoumarins and their hydrolysis. Chem Heterocycl Compd 4, 696). W literaturze nie ma doniesień dotyczących biotechnologicznego uzyskania 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3''-bromofenylo)-propan-1-onu.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla drożdży wprowadza się szczep *Yarrowia lipolytica* KCh 71. Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3''-bromofenylo)-prop-2-en-1-on o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 1 godzinę. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

W wyniku regioselektywnej redukcji podwójnego wiązania otrzymuje się 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3''-bromofenylo)-propan-1-on, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Yarrowia lipolytica* KCh 71.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,2 g : 1 L.

Korzystnie także jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 3 godziny.

Korzystnie także jest, gdy oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym hexan : aceton w stosunku objętościowym 9 : 1.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Yarrowia lipolytica* KCh 71, następuje regioselektywna redukcja podwójnego wiązania w substracie. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą (chloroform).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3''-bromofenylo)-propan-1-onu, z wydajnością izolowaną na poziomie 80% (konwersją według GC > 95%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Przykład. Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 5 g aminobaku i 15 g glukozy, wprowadza się szczep *Yarrowia lipolytica* KCh 71. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3"-bromofenylo)-prop-2-en-1-onu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ tetrahydrofuranu (THF). Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 3 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się trzykrotnie chloroformem, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaniny heksan i aceton 9 : 1.

Na tej drodze otrzymuje się 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3"-bromofenylo)-propan-1-on (konwersja według GC na poziomie > 95%).

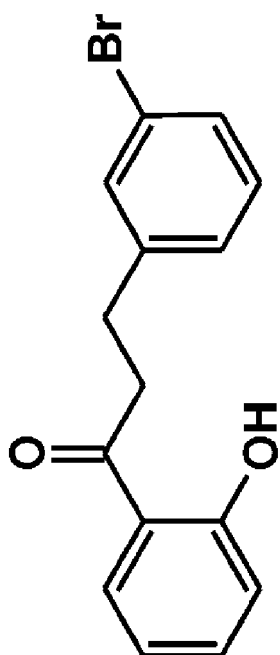
Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi: ¹H NMR (600 MHz) (CDCl₃) δ (ppm): 3.00–3.08 (m, 2H, H-3), 3.29–3.35 (m, 2H, H-2), 6.89 (dd, 1H, J = 8.2, 7.1, 1.1 Hz, H-5'), 6.99 (ddd, 1H, J = 8.4, 1.1, 0.4 Hz, H-3'), 7.14–7.20 (m, 2H, H-2", H-5"), 7.33–7.37 (m, 1H, H-4"), 7.41–7.42 (m, 1H, H-6"), 7.48 (ddd, 1H, J = 8.4, 7.2, 1.7 Hz, H-4'), 7.74 (dd, 1H, J = 8.1, 1.6 Hz, H-6'), 12.23 (s, 1H, -OH).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ = 29.57 (C-3), 39.75 (C-2), 118.74 (C-3'), 119.12 (C-5'), 119.30 (C-1'), 122.72 (C-3"), 127.27 (C-2"), 129.58 (C-4"), 129.85 (C-6'), 130.28 (C-5"), 131.61 (C-6"), 136.60 (C-4'), 143.21 (C-1"), 162.56 (C-2'), 204.86 (C-1).

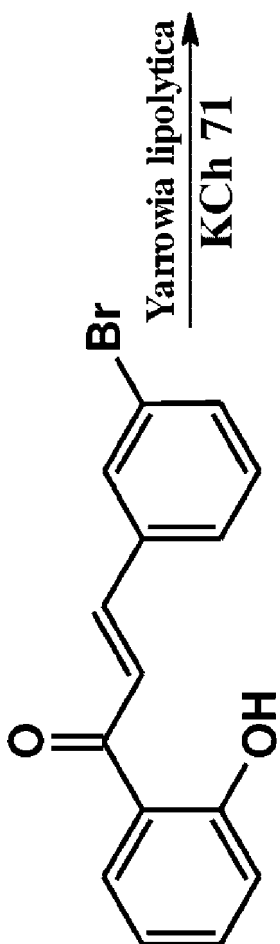
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3"-bromofenylo)-propan-1-onu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla drożdży wprowadza się szczep *Yarrowia lipolytica* KCh 71, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 1-(2'-hydroksyfenylo)-3-(3"-bromofenylo)-prop-2-en-1-on o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 1 godzinę, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.
2. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,2 g : 1 L.
3. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
4. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 3 godziny.
5. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkownikową chromatografię preparatywną w układzie eluującym hexan : aceton w stosunku objętościowym 9 : 1.

Rysunek



Wzór 2



Wzór 1

Yarrowia lipolytica
KCh 71