

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **240564**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428167**

(22) Data zgłoszenia: **14.12.2018**

(51) Int.Cl.

C12P 7/62 (2022.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C07C 69/025 (2006.01)

C07C 33/22 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania butanolanu 1-(S)-fenyloetylu oraz 1-(R)-fenyloetanolu na drodze biotransformacji z wykorzystaniem szczepu *Leptolyngbya foveolarum* CCALE 76**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
15.06.2020 BUP 13/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
02.05.2022 WUP 18/22

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

AGNIESZKA ŚLIŻEWSKA, Żagań, PL

EWA ŻYMAŃCZYK-DUDA, Smolec, PL

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

MAGDALENA KLIMEK-OCHAB, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner

PL 240564 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania butanolanu 1-(S)-fenyloetylu oraz 1-(R)-fenyloetanolu na drodze biotransformacji z wykorzystaniem szczepu *Leptolyngbya foveolarum* CCALA 76 znajdujące zastosowanie jako chiralne bloki budulcowe wykorzystywane do syntez w przemyśle chemicznym, czy farmaceutycznym.

Znacząco rosnący udział metod biotechnologicznych (biotransformacji) w procesach otrzymywania związków chemicznych/biologicznie aktywnych związany jest między innymi z możliwością otrzymywania czystych enancjomerów, między innymi sposobem rozdzielenia mieszaniny racemicznej w prosty i wydajny – zwykle jednoetapowy sposób, co w przypadku syntez chemicznych jest często procesem żmudnym, wieloetapowym i kosztownym. Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania butanolanu 1-(S)-fenyloetylu oraz 1-(R)-fenyloetanolu na drodze biotransformacji z wykorzystaniem sinic. Wymienione związki są ważnymi chiralnymi blokami budulcowymi wykorzystywanymi do syntez w przemyśle chemicznym, czy farmaceutycznym.

W patencie PL 194403 B1 został opisany sposób otrzymywania 1-(R)-fenyloetanolu drogą biotransformacji. W sposobie tym racemiczny 1-(R,S)-fenyloetanol zostaje poddany utlenieniu przy wykorzystaniu korzeni selera (*Apium graveolens*).

Wynalazek dotyczy sposobu, w którym do otrzymania butanolanu 1-(S)-fenyloetylu oraz 1-(R)-fenyloetanolu wykorzystuje się organizmy żywe do przeprowadzenia procesu biotransformacji.

Dotychczas otrzymywanie butanolanu 1-(S)-fenyloetylu oraz 1-(R)-fenyloetanolu drogą biotransformacji z wykorzystaniem sinic jako biokatalizatorów, dokładnie szczepu *Leptolyngbya foveolarum* CCALA 76 nie zostało opisane w literaturze. Wynalazek przedstawiony poniżej otwiera drogę do syntezy innych związków, ze względu na możliwość otrzymania konkretnych izomerów optycznych (R, bądź S), które stanowią cenny blok budulcowy. Wynalazek pozwala na otrzymanie w jednym procesie wzbogaconych mieszanin enancjomerycznych zarówno alkoholu: 1-(R)-fenyloetanolu, jak i estru: butanolanu 1-(S)-fenyloetylu, który pozostaje jako nieprzereagowany substrat z mieszaniny racemicznej butanolanu-1-(R,S)-fenyloetylu, użytego jako materiał wyjściowy.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest sposób otrzymywania 1-(R)-fenyloetanolu o wzorze 2 oraz butanolanu 1-(S)-fenyloetylu o wzorze 1, polegający na tym, że butanolan 1-(R,S)-fenyloetylu poddaje się biotransformacji z wykorzystaniem trzytygodniowej hodowli szczepu cyjanobakterii *Leptolyngbya foveolarum* CCALA 76 inkubowanej w temperaturze około 25°C, przy ciągłym naświetlaniu hodowli światłem fluorescencyjnym (SunGlo, 8W) w ciągu 5 dni.

Korzystnie trzytygodniową hodowlę szczepu cyjanobakterii *Leptolyngbya foveolarum* CCALA 76 prowadzi się na podłożu BG 11 (Blue-Green Medium).

Korzystnie produkt w postaci 1-(R)-fenyloetanolu wydziela się z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą dwukrotnej ekstrakcji około 50 ml octanu etylu.

Korzystnie produkt w postaci butanolanu 1-(S)-fenyloetylu wydziela się z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą dwukrotnej ekstrakcji około 50 ml octanu etylu.

Korzystnie optymalne stężenie substratu – butanolanu 1-(R,S)-fenyloetylu wynosi 1 mM.

Przedmiot wynalazku jest przedstawiony za pomocą schematu reakcji oraz w przykładach jego wykonania i określony wzorami.

Przykład 1:

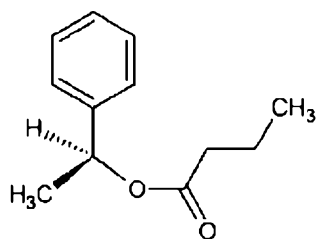
Proces zakładania hodowli wykonuje się poprzez przenoszenie trzytygodniowego inokulum szczepu w objętości 10 ml, do świeżego podłoża o objętości 100 ml. Hodowle badanego szczepu prowadzi się w warunkach stałego naświetlania świetłówką fluorescencyjną Power-Glo (8W, T5, Hagen), w temperaturze około 25°C w kolbach Erlenmeyer'a o objętości 250 ml. Hodowle zawierają po 100 ml podłoża BG 11 (Blue-Green Medium). Substrat- butanolan-1-(R,S)-fenyloetylu dodaje się do trzytygodniowych hodowli, w stężeniu 1 mM. Biotransformację prowadzi się przez 5 dni, w warunkach stacjonarnych, w temperaturze około 25°C, przy ciągłym naświetlaniu świetłówką fluorescencyjną Power-Glo (8W, T5, Hagen). W celu zakończenia biotransformacji po 5 dniach, hodowle odwirowuje się w wirówce przy 4500 rpm przez 20 minut. Otrzymany supernatant ekstrahuje się dwukrotnie octanem etylu porcjami po około 50 ml. Powstałą w wyniku ekstrakcji frakcję organiczną suszy się bezwodnym siarczanem magnezu. Następnie środek suszący usuwa się przez filtrację, a przesącz zatęża się na wyparce rotacyjnej. Identyfikacji produktu oraz sprawdzenia wydajności reakcji dokonuje się z wykorzystaniem chromatografii gazowej. Wykorzystano kolumnę Varian CP

Chirasil-Dex CB, 25 m x 0.25 mm, ID x 0.25 μ m. Próbkę przygotowano w octanie etylu. Po biotransformacji przeprowadzonej w powyższy sposób otrzymano butanolan-1-(S)-fenyloetylu z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym e.e%=100% oraz 1-(R)-fenyloetanol z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym e.e%=83,1%.

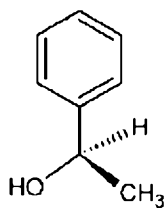
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania 1-(R)-fenyloetanolu o wzorze 2 oraz butanolanu 1-(S)-fenyloetylu o wzorze 1, **znamienny tym**, że butanolan 1-(R,S)-fenyloetylu poddaje się biotransformacji z wykorzystaniem trzytygodniowej hodowli szczepu cyjanobakterii *Leptolyngbya foveolarum* CCALE 76 inkubowanej w temperaturze około 25°C, przy ciągłym naświetlaniu hodowli światłem fluorescencyjnym (SunGlo, 8W) w ciągu 5 dni.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że trzytygodniową hodowlę szczepu cyjanobakterii *Leptolyngbya foveolarum* CCALE 76 prowadzi się na podłożu BG 11 (Blue-Green Medium).
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że produkt w postaci 1-(R)-fenyloetanolu wydziela się z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą dwukrotnej ekstrakcji około 50 ml octanu etylu.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że produkt w postaci butanolanu 1-(S)-fenyloetylu wydziela się z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą dwukrotnej ekstrakcji około 50 ml octanu etylu.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że optymalne stężenie substratu – butanolanu 1-(R,S)-fenyloetylu wynosi 1 mM.

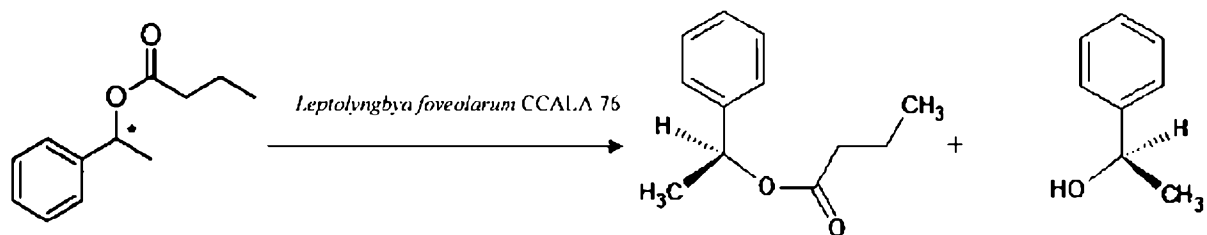
Rysunki



Wzór 1



Wzór 2



Schemat reakcji