

Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego  
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"  
Nr POIG.01.03.01-00-158/09

Opracowanie zrealizowano w ramach projektu POIG 01.03.01-00-158/09

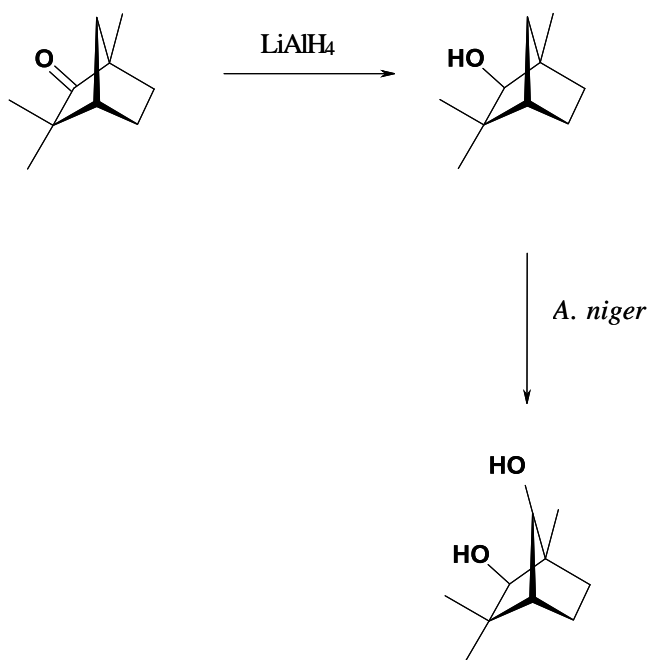
Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym

Zadanie badawcze nr 5. Chemoenzymatyczna synteza pochodnych terpenoidowych o potencjalnej  
aktywności biologicznej.

Politechnika Wroclawska

## Chemoenzymatyczna synteza (+)-7-hydroksy-2-fencholu

Innym przykładem wykorzystywania mikroorganizmów w syntezie nowych związków  
terpenoidowych jest hydroksylacja (–)-fencholu (schemat 2)



Schemat 2.

W dwuszyjnej kolbie okrągłodennej ustawionej na mieszadle magnetycznym umieszcza się 60 ml bezwodnego eteru dietylowego i 1.2 g LiAlH<sub>4</sub>. Do wkraplacza dodaje się 50 ml bezwodnego eteru dietylowego i 3.42 g (–)-2-fenchonu. Mieszaninę wkrapla się powoli do kolby. Postęp reakcji kontroluje się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), wykorzystując eluent o składzie heksan: octan etylu w stosunku 2:1. Wykonuje się pierwszy pomiar po 2.5 godzinach od rozpoczęcia reakcji, po czym do mieszaniny reakcyjnej



Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego  
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"  
Nr POIG.01.03.01-00-158/09

wprowadza się stopniowo dodatkowe 0.4 g  $\text{LiAlH}_4$  w celu zwiększenia stopnia redukcji. Reakcję kończy się po 3.5 godzinach dodaje się powoli 100 ml wody destylowanej. Warstwę eterową dekantuje się i całość przemywa się trzema porcjami eteru dietylowego. Zebrane warstwy eterowe łączy się i osusza nad bezwodnym siarczanem (VI) magnezu. Otrzymany alkohol o masie 2.26 g umieszcza się w lodówce, gdzie po upływie doby krystalizuje w postaci bezbarwnych kryształów. Kryształy (+)-2-fencholu rozpuszcza się w acetonie w stosunku 1:1. Tak przygotowane próbki produktu pośredniego poddaje się biotransformacji z użyciem szczepu *Aspergillus niger* (krzywą wzrostu dla wymienionego mikroorganizmu wykonuje się w sposób opisany w punkcie 1). Biotransformację prowadzi się w kolbach Erlenmayera o pojemności 250 ml, zawierających 100 ml płynnego podłoża  $\alpha$ -medium (20 g glukozy, 20 g wody peptonowej, 5 g ekstraktu drożdżowego, 1 l wody destylowanej,  $\text{pH}=7.0$ ), na wytrząsarce paletowej przy temperaturze  $28^\circ\text{C}$ . Kolby zaszczepia się 1 ml inoculum, które hodowano przez 48h. Po 24 h dodaje się kryształy substratu rozpuszczone w acetonie (450  $\mu\text{l}$  alkoholu, 500  $\mu\text{l}$  acetonu). Do 6 kolb dodaje się po 75  $\mu\text{l}$  roztworu, który zawierał 35  $\mu\text{l}$  substratu. Dodatkowa hodowla (kolba nr 7) stanowi niezawierającą substratu kontrolę, inkubowana w takich samych warunkach, co właściwa biotransformacja. Biokonwersję prowadzi się 7 dni. Postęp reakcji kontroluje się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, gdzie eluentem jest heksan: octan etylu w proporcjach 2:1. Wcześniej natomiast wykonuje się ekstrakcję 2 ml hodowli z 2 ml octanu etylu. Po zakończeniu procesu biotransformacji przesącza się pod zmniejszonym ciśnieniem zawartość kolb w celu oddzielenia mikroorganizmów od płynu hodowlanego. W ten sposób otrzymany przesącz ekstrahuje się trzykrotnie 100 ml octanu etylu. Ekstrakt suszy się nad bezwodnym siarczanem (VI) magnezu. Po osuszeniu, środek suszący odfiltrowuje się, a rozpuszczalnik odparowuje na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszcza się za pomocą chromatografii kolumnowej, gdzie eluent to heksan: octan etylu w stosunku 20:1.

Produkt tj. (+)-7-hydroksy-2-fenchol posiada następujące właściwości fizyczne i spektralne:

$[\alpha]_D^{20} = 2.1^\circ$  ( $c=0.5$ ;  $\text{CHCl}_3$ );  $M_w=170.25$  g/mol.

**IR** (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3446.92 (vs), 2954.79 (vs), 1729.00 (s)

**GC-MS**:  $m/z=170.1357$  ( $M^+$ )

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 300 MHz): 0.84 (s, 4H, 3H przy C-10 i 1H przy C-6); 1.02 (s, 3H przy C-7); 1.11 (s, 3H przy C-9); 1.56 (d, 1H przy C-5,  $J=10.64$  Hz); 1.69 (s, 2H, 1H przy C-4); 2.18 (dd, 1H przy C-6,  $J=-13.79$ ; 2.1 Hz), 3.22 (s, 1H przy C-2); 4.14 (d, 1H przy C-8,  $J=6.67$  Hz).

**$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 75 MHz): 18.90 (C-9); 19.55 (C-10); 30.63 (C-7); 36.58 (C-5); 38.18 (C-6); 55.68 (C-4); 71.57 (C-8); 83.53 (C-2).