

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10)

**PL 438638 A1**

(12)

## Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **438638**(22) Data zgłoszenia: **2021.07.30**(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.02.06 BUP 06/2023**

(51) MKP:

**C07H 15/203** (2006.01)**C12P 19/44** (2006.01)**C12R 1/645** (2006.01)

(71) Zgłaszający:

**UNIwersytet Przyrodniczy  
we Wrocławiu, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y):

**AGNIESZKA KRAWCZYK-ŁEBEK, Wrocław, PL  
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL  
MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL  
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

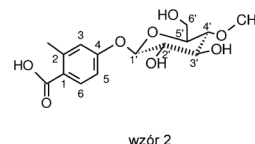
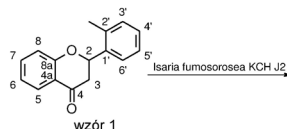
**Anna Kasperowicz, Wrocław, PL**

(54) Tytuł:

**2-Metylo-4-O-β-D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwas benzoesowy i sposób wytwarzania 2-metylo-4-O-β-D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwasu benzoesowego**

(57) Skróć opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest 2-metylo-4-O-β-D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwas benzoesowy o wzorze 2. Zgłoszenie obejmuje także sposób wytwarzania 2-metylo-4-O-β-D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwasu benzoesowego charakteryzuje się tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2, następnie po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 2'-metyloflawanon 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 96 godzin, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie, przy czym 2-metylo-4-O-β-D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwas benzoesowy o wzorze 2 znajduje się we frakcji o dużej polarności, w piątym paśmie od linii startu.



2-Metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwas benzoesowy  
i sposób wytwarzania

2-metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwasu benzoesowego

Przedmiotem wynalazku jest 2-metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwas benzoesowy o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania 2-metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwasu benzoesowego.

2-Metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwas benzoesowy może znaleźć zastosowanie jako konserwant w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych oraz produktach spożywczych.

Wiele naturalnych związków chemicznych występuje w postaci zmetylowanej lub glikozylowanej, o poprawionej stabilności, rozpuszczalności w wodzie i aktywności. Metylacja i glikozylacja są powszechne wśród związków flawonoidowych, a obecność grupy metylowej powoduje ogromną poprawę ich właściwości biologicznych takich jak aktywność przeciwdrobnoustrojowa czy przeciwutleniająca (Brito-Arias. M. *Synthesis and Characterization of Glycosides*. Springer 2007; M., Koirala, N.; Thuan, N.H.; Ghimire, G.P.; Thang, D.V.; Sohng, J.K. *Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production*. *Enzyme and Microbial Technology* 2016, 86, 103–116).

Kwas benzoesowy został dopuszczony jako substancja dodatkowa w żywności zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 18.09.2008 r., a Rozporządzenie Komisji UE nr 231/2012 ustanawia jego

specyfikację jako dodatku w żywności. Znajduje się również w wykazie substancji uniemożliwiających rozwój i przetrwanie mikroorganizmów w czasie przechowywania produktu, dozwolonych w produktach kosmetycznych (załącznik V do Rozporządzenia Parlamentu i Rady (WE) nr 1223/2009).

Pochodna kwasu benzoesowego będąca przedmiotem wynalazku, dzięki przyłączonej grupie metylowej i 4'-O-metyloglukozie, wykazuje potencjał do zastosowania jako konserwant o poprawionej rozpuszczalności oraz zwiększonej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Znany jest szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2 ujawniony w zgłoszeniu patentowym o numerze P.416996.

W ostatnich latach, w leczeniu różnych chorób i ich zapobieganiu, coraz większe znaczenie zyskują związki pochodzenia naturalnego oraz ich odpowiedniki uznawane za naturalne, które uzyskano na drodze przekształceń mikrobiologicznych. Dlatego istotne jest opracowywanie nowych metod wytwarzania związków aktywnych biologicznie na drodze biotransformacji, użytecznych dla przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i spożywczego.

W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat otrzymywania 2-metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwasu benzoesowego.

Istotą wynalazku jest 2-metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwas benzoesowy.

Istota sposobu polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2. Po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 2'-metyloflawanon, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, przez co najmniej 96 godzin. Następnie produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą oraz oczyszcza chromatograficznie. 2-metylo-4-

O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwas benzoesowy znajduje się we frakcji o dużej polarności, w piątym paśmie od linii startu.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg:1 cm<sup>3</sup>.

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

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 9 dni.

Korzystnie również jest, gdy oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym z chloroformem i metanolem w stosunku objętościowym 9:1.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje rozszczepienie pierścienia C układu flawanonu oraz hydroksylacja i przyłączenie 4-metoksy- $\beta$ -D-glukozy przy C-4 w nowopowstałej cząsteczce kwasu o-metylobenzoesowego.

Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą (octan etylu).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 2-metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwasu benzoesowego w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu oraz wykorzystując mikroorganizm niebędący patogenem ludzkim.

Wykorzystanie biotransformacji, zamiast syntezy chemicznej, umożliwia, w sposób przyjazny dla środowiska, uzyskanie związków o większej biodostępności i aktywności biologicznej, niż użyte substraty. Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Przykład. Do kolby stożkowej o pojemności 2000 cm<sup>3</sup>, w której znajduje się 500 cm<sup>3</sup> sterylnej pożywki zawierającej 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 2'-metyloflawanonu o wzorze 1, rozpuszczonego

w 1 cm<sup>3</sup> dimetylosulfotlenku. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 9 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się dwukrotnie octanem etylu, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie z zastosowaniem jako eluentu mieszaniny chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1. Produkt znajduje się we frakcji o dużej polarności, w piątym paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 4,7 mg 2-metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwasu benzoowego (wydajność 6,8%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

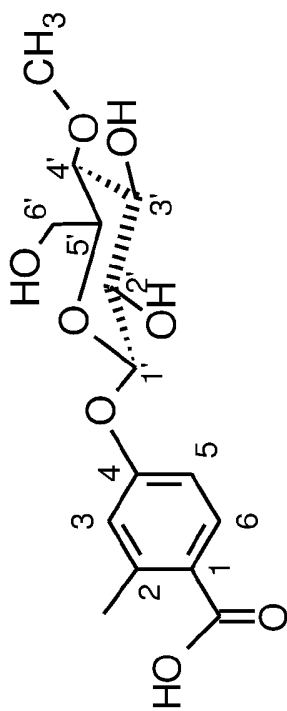
Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma <sup>1</sup>H NMR (601 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>)

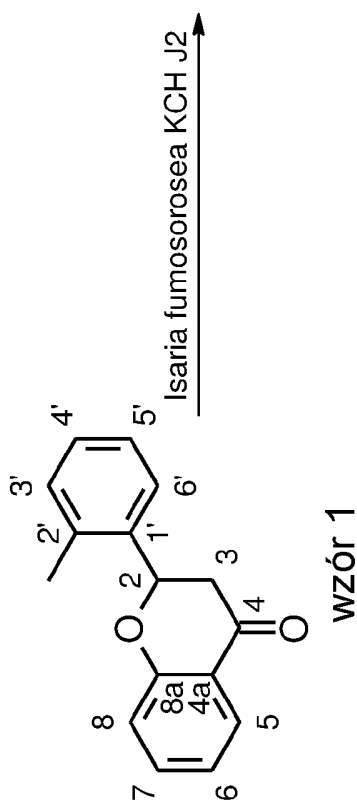
| Sygnały pochodzące od protonów szkieletu flawonoidowego |          |                   | Sygnały pochodzące od protonów jednostki cukrowej |                  |                      |
|---|----------|-------------------|---|------------------|----------------------|
| $\delta$ [ppm]  | J [Hz]   | H                 | $\delta$ [ppm]                                    | J [Hz]           | H                    |
| 6,86 (d)  | 9,0      | 3                 | 4,86(d)   | 7,8              | 1'                   |
| 7,29 (dd)   | 9,0; 3,0 | 5                 | 3,45 (tt)   | 5,3; 3,6         | 2'                   |
| 7,62 (d)  | 2,9      | 6                 | 3,61 (m)  |                  | 3'                   |
| 2,65 (s)  |          | 2-CH <sub>3</sub> | 3,15 (m)  |                  | 4'                   |
| 11,92 (s)   |          | COOH              | 3,50 (ddd)  | 9,6; 5,7;<br>1,7 | 5'                   |
|   |          |                   | 3,87 (m)  |                  | 6'                   |
|   |          |                   | 3,68 (m)  |                  |                      |
|   |          |                   | 3,55 (s)  |                  | C4'-OCH <sub>3</sub> |
|   |          |                   | 4,64 (d)  | 3,6              | C2'-OH               |
|   |          |                   | 4,41 (d)  | 4,0              | C3'-OH               |

## Zastrzeżenia patentowe

1. 2-metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwas benzoesowy o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 2-metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwasu benzoesowego **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2, następnie po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 2'-metyloflawanon 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 96 godzin, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie, przy czym 2-metylo-4-O- $\beta$ -D-(4'-O-metyloglukopiranozylo)-kwas benzoesowy o wzorze 2 znajduje się we frakcji o dużej polarności, w piątym paśmie od linii startu.
3. Sposób według zastrz. 2., **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg:1 cm<sup>3</sup>.
4. Sposób według zastrz. 2., **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
5. Sposób według zastrz. 2., **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 9 dni.
6. Sposób według zastrz. 2., **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkwarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol w stosunku objętościowym 9:1.



WZÓR 2



WZÓR 1



## SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI ZGŁOSZENIA NR P.438638

Klasyfikacja zgłoszenia: C07H15/203 (2006.01), C12P19/44 (2006.01), C12R1/645 (2006.01)

Poszukiwania prowadzone w klasach: C07H, C12P

Bazy komputerowe, w których prowadzono poszukiwania: EPODOC, WPI, BAZY DANYCH UPRP, STN: REGISTRY, CAPLUS, REAXYSFILEBib, REAXYSFILESub

| Kategoria dokumentu | Dokumenty – z podaną identyfikacją   | Odniesienie do zastrz. |
|---------------------|--|------------------------|
| A                   | JP2020141576 A (UNIV TOYAMA PREFECTURAL) 2020.09.10 (par.[0011] związek 4HBAG)   | 1-6                    |
| A                   | Hsu FL, Yang LM, Chang SF, Wang LH, Hsu CY, Liu PC, Lin SJ. Biotransformation of gallic acid by Beauveria sulfurescens ATCC 7159. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Mar;74(3):659-66. doi: 10.1007/s00253-006-0692-z (fig.1 związek 4)   | 1-6                    |
| A                   | Kei Shimoda, Shin-ya Yamane, Hidetada Hirakawa, Shinji Ohta, Toshifumi Hirata. Biotransformation of phenolic compounds by the cultured cells of Catharanthus roseus. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 16 (2002) 275–281. https://doi.org/10.1016/S1381-1177(01)00073-X (schemat 1 związek 6b) | 1-6                    |

 Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie

A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie,  
 E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia,  
 L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu,  
 O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób,  
 P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa,  
 T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku,  
 X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie,  
 Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy,  
 & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.

Sprawozdanie wykonał/-a: Agnieszka Ucińska

data 15.02.2022r.

Ekspert

/-podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym-/  
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

## Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z 30.07.2021 r.