

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246775 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438354**

(22) Data zgłoszenia: **2021.07.05**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.01.09 BUP 02/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.03.03 WUP 09/2025**

(51) MKP:

C12P 19/44 (2006.01)

C07H 15/203 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

AGNIESZKA KRAWCZYK-ŁEBEK, Wrocław, PL

EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL

MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL

TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

**Sposób wytwarzania 2',4-dihydroksy-2-metylo-3'-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-
-dihydrochalkonu**

PL 246775 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 2',4-dihydroksy-2-metylo-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu.

Wynalazek może znaleźć zastosowanie do wytwarzania związku przeciwtłeniającego, przeciwdrobnoustrojowego, substancji wzmacniającej smak i potencjalnego słodzika w preparatach farmaceutycznych, produktach spożywczych oraz formułacjach kosmetycznych.

Naturalne flawonoidy z jedną lub kilkoma grupami metylowymi występują w roślinach sporadycznie. Z azjatyckiego drzewa *Syzygium nervosum* (*Cleistocalyx operculatus*) izolowano C- i O-metylowane chalkony: (E)-4,2',4'-trihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon, (E)-2',4'-dihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon, (E)-2',4'-dihydroksy-6'-metoksy-3'-metylochalkon, (E)-2,2',4'-trihydroksy-6'-metoksy-3',5'-dimetylochalkon. Związki te wykazywały silną inhibicję wobec enzymów pochodzących od dwóch szczepów wirusa grypy: H1N1 oraz H9N2. Blokowały one działanie neuraminidaz, umożliwiających wirusom opuszczanie zakażonych komórek poprzez rozkład ich błon komórkowych (Dao T. T., Tung B. T., Nguyen P. H., Thuong P. T., Yoo S. S., Kim E. H., Kim S. K., Oh W. K. C-methylated flavonoids from *Cleistocalyx operculatus* and their inhibitory effects on novel influenza A (H1N1) neuraminidase. *Journal of Natural Products* 2010, 73, 1636–1642).

Naturalne dihydrochalkony floretyna i jej glikozyd florydzyna, które występują w skórce i mięszu jabłka, wykazują licznie udokumentowane właściwości prozdrowotne: antyoksydacyjną, przeciwzapalną, przeciwcukrzycową, przeciwnowotworową i kardioprotekcyjną (Choi Y. Biochemical basis of anti-cancer-effects of phloretin – a natural dihydrochalcone. *Molecules* 2018, 24, 278; Tian L., Cao J., Zhao T., Liu Y., Khan A., Cheng G. The bioavailability, extraction, biosynthesis and distribution of natural dihydrochalcone: phloridzin. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 962).

W badaniach nad dihydrochalkonem naringiny z udziałem transgenicznym myszy jako modeli zwierzęcych choroby Alzheimera, zaobserwowano efekt złagodzenia deficytów poznawczych, co stwarza możliwość zastosowania tego związku jako środka leczniczego (Yang W., Zhou K., Zhou Y., An Y., Hu T., Lu J., Huang S., Pei G. Narindin dihydrochalcone ameliorates cognitive deficits and neuropathology in APP/PS1 Transgenic Mice. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2018, 10, 169).

Dihydrochalkony wykazują słodki smak i mogą znaleźć zastosowanie jako prozdrowotne słodziki (Janeczko T., Gładkowski W., Kostrzewa-Susłow E. Microbial transformations of chalcones to produce food sweetener derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2013, 98, 55–61; Łuźny M., Kozłowska E., Kostrzewa-Susłow E., Janeczko T. Highly effective, regiospecific hydrogenation of methoxychalcone by *Yarrowia lipolytica* enables production of food sweeteners. *Catalysts* 2020, 10, 1135). Najlepiej poznany i zbadany dihydrochalkon pozyskiwany ze skórek owoców cytrusowych – dihydrochalkon neohesperydyny (E-959) został dopuszczony do stosowania jako słodzik i substancja wzmacniająca smak, a jego zastosowanie reguluje Rozporządzenie Komisji Europejskiej nr 1129/2011 z 11 listopada 2011 r.

Większość flawonoidów, poza katechinami, jest obecna w roślinach w połączeniu z cukrami, jako β -glikozydy. Glikozylacja skutkuje: wzrostem rozpuszczalności w wodzie i stabilności cząsteczki flawonoidu oraz przyswajalności przyjmowanych z pokarmem związków flawonoidowych. Zasadniczo glukozydy są jedynymi glikozydami, które mogą być absorbowane w jelicie cienkim. Natomiast flawonoidy niezaabsorbowane w jelicie cienkim oraz zaabsorbowane flawonoidy wydzielone z żółcią ulegają degradacji wraz z rozerwaniem struktury pierścieniowej przez mikroorganizmy (Hollman, P. C. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 2004, 42, 74–83; Plaza, M.; Pozzo, T.; Liu, J.; Gulshan Ara, K. Z.; Turner, C.; Nordberg Karlsson, E. Substituent effects on *in vitro* antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2014, 62, 3321–3333).

Hollman i in., wykazali, że cząsteczka glukozy przyłączona w pozycji 3 kwercetyny (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon) zwiększa absorpcję tego związku w jelicie cienkim do 52%, w porównaniu z 24% absorpcją aglikonu kwercetyny i 17% rutynozydu kwercetyny (Hollman, P. C.; Bijsman, M. N. C. P.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P. J.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, 1999, 31, 569–573).

Znany jest szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5 ujawniony w literaturze (Kozłowska E., Urbaniak M., Hoc N., Grzeszczuk J., Dymarska M., Stępień Ł., Płaskowska E., Kostrzewa-Susłow E., Janeczko T. Cascade biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) by *Beauveria* species. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13449).

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',4-dihydroksy-2-metylo-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu.

Istota sposobu według wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5. Po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 2'-hydroksy-2-metylochalkon, 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',4-Dihydroksy-2-metylo-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w czwartym paśmie od linii startu.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 cm³.

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 *Beauveria bassiana* KCH J1.5, następuje redukcja wiązania podwójnego oraz hydroksylacja przy C-4 oraz hydroksylacja i przyłączenie 4-metoksy- β -D-glukozy przy C-3'. 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',4-dihydroksy-2-metylo-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu 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.

P r z y k ł a d

Do kolby stożkowej o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 2'-hydroksy-2-metylochalkonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ 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 pośredniej polarności, w czwartym paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 4,7 mg 2',4-dihydroksy-2-metylo-3'-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu (wydajność 5,0%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma ^1H NMR (601 MHz, Aceton- d_6)

Sygnały pochodzące od szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od jednostki cukrowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	δ [ppm]	J [Hz]	H
3,33 (m)		α	4,91 (d)	7,8	1''
2,94 (m)		β	3,50 (m)		2''
6,65 (d)	2,5	3	3,62 (td)	9,0; 3,9	3''
6,59 (dd)	8,2; 2,6	5	3,22 (m)		4''
7,03 (d)	8,2	6	3,44 (ddd)	9,6; 4,7; 2,1	5''
7,39 (dd)	8,0; 1,3	4'	3,81 (ddd)	11,6; 5,2; 2,1	6''
			3,68 (ddd)	11,7; 7,0; 4,8	
6,85 (td)	8,0; 2,1	5'	3,56 (s)		C4''- OCH ₃
7,64 (dd)	8,1; 1,4	6'	4,63 (d)	3,7	C2''-OH
2,27 (s)		C2-CH ₃	4,40 (d)	4,0	C3''-OH
8,02 (s)		C4-OH	3,75 (dd)	12,8; 5,8	C6''-OH
12,20 (s)		C2'-OH			

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 2',4-dihydroksy-2-metylo-3'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkonu **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Beauveria bassiana* KCH J1.5, następnie po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 2'-hydroksy-2-metylochalkon 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 rozpuszczalnikami organicznymi niemieszającymi się z wodą i oczyszcza chromatograficznie, przy czym produkt reakcji jakim jest 2',4-dihydroksy-2-metylo-3'-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-dihydrochalkon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w czwartym paśmie od linii startu.
2. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 cm³.
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 9 dni.
5. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowsłupową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform : metanol w stosunku objętościowym 9 : 1.

Rysunek

