

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238533**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426972**

(22) Data zgłoszenia: **10.09.2018**

(51) Int.Cl.

C12P 19/60 (2006.01)

C07H 17/07 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(54) **Sposób wytwarzania 3',4'-dihydroksy-6-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

23.03.2020 BUP 07/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

06.09.2021 WUP 23/21

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Anna Kasperowicz

PL 238533 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 3',4'-dihydroksy-6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.

Związek ten może znaleźć zastosowanie jako antyoksydant w przemyśle spożywczym oraz jako składnik środków farmaceutycznych i kosmetycznych, a także dodatek do pasz.

Medycyna prewencyjna zyskuje w ostatnich latach coraz większe znaczenie. Uważa się, że >50% współczesnych problemów zdrowia publicznego można zapobiec poprzez stosowanie odpowiedniej diety (Cassidy, A.; Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Mol Aspects Med.* 2018, 61, 76–82). Polifenole, do których zalicza się związki flawonoidowe, stanowią największą grupę wtórnych metabolitów roślinnych przyjmowanych wraz z pokarmem. W związku z ich silnym i zróżnicowanym prozdrowotnym działaniem zaleca się zwiększenie spożycia warzyw i owoców w codziennej diecie ludzi. Rośnie także liczba suplementów diety zawierających w swoim składzie polifenole (Deng J, Yang H, Capanoglu E, Cao H, Xiao J. *Technological aspects and stability of polyphenols. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications.* Elsevier Inc.; 2018. 295–323, Perez-Vizcaino F, Fraga CG. *Research trends in flavonoids and health. Arch Biochem Biophys.* 2018; 646:107–12).

Uważa się, że glikozydy flawonoidowe przed absorpcją w układzie pokarmowym muszą zostać poddane hydrolizie przez mikroflorę jelitową do odpowiednich aglikonów. Dowiedziono jednak, że częściowa absorpcja połączeń cukrowych flawonoidów również jest możliwa.

Cząsteczka glukozy przyłączona w pozycji 3 kwercetyny (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon) zwiększała absorpcję tego związku w jelicie cienkim do 52%, w porównaniu z 24% absorpcją aglikonu kwercetyny i 17% rutynozydu kwercetyny (Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. *Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem.* 2002, 13, 572–584, Hollman, R C.; Bijsman, M. N.; van Gameren, Y; Cnossen, E. R; de Vries, J. H.; Katan, M. B. *The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. Free Radic. Res.* 1999, 31, 569–573).

Flawonoidy w roślinach występują wyłącznie w połączeniu z jednostkami cukrowymi. Glikozylacja skutkuje wzrostem rozpuszczalności cząsteczki flawonoidu w wodzie i wzrostem jego stabilności. Dzięki temu zwiększa się przyswajalność przyjmowanych z pokarmem związków flawonoidowych (J. Xiao, T.S. Muzashvili, M.I. Georgiev, *Biotechnology Advances*, 2014, 32, 1145–1156, 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. J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 3321–3333).

3',4'-Dihydroksy-6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon znany jest z publikacji Julie Rakeł Mikell et al. (2011), „Microbial Metabolism, Part 12, Isolation, Characterization and Bioactivity Evaluation of Eighteen Microbial Metabolites of 4'-Hydroxyflavanone”, *Chem. Pharm. Bull.* 59(6), 692–697.

W ostatnich latach w leczeniu i prewencji chorób coraz większe znaczenie zyskują związki pochodzenia naturalnego i ich odpowiedniki uzyskane na drodze biotransformacji. Dlatego istotne jest poszukiwanie nowych sposobów wytwarzania związków aktywnych biologicznie, które mogą być wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym, ale też kosmetycznym i spożywczym.

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania 3',4'-dihydroksy-6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu.

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 4'-metoksyflawanon, 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. Kolejny produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie. 3',4'-Dihydroksy-6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon znajduje się we frakcji o najwyższej polarności.

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

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

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 168 godzin.

Korzystnie również jest, gdy oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol 9:1.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje hydroksylacja i przyłączenie 4-metoksy- β -D-

-glukozy przy C-6, demetylacja przy C-4' i hydroksylacja 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 3',4'-dihydroksy-6-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu wykorzystując mikroorganizm niebędący patogenem ludzkim.

Wykorzystanie biotransformacji, zamiast syntezy chemicznej, umożliwia, w sposób przyjazny dla środowiska, uzyskanie związków o wyższej biodostępności i aktywności biologicznej, niż użyte substraty (E. Kostrzewa-Susłow, J. Dmochowska-Gładysz, J. Oszmiański, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 49 (1–4), 113–117, W. A. Loughlin, Bioresource Technology, 2000, 74, 49–62).

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

P r z y k ł a d. Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2 ujawniony w zgłoszeniu patentowym o numerze P.416996. Po 96 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 4'-metoksyflawanonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 7 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaniny chloroformu i metanolu w stosunku 9:1. Produkt znajduje się we frakcji o najwyższej polarności.

Na tej drodze otrzymuje się 28,9 mg 3',4'-dihydroksy-6-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu (wydajność 32,8%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma ¹H NMR (600 MHz, Aceton-d₆).

Sygnały pochodzące od szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od jednostki cukrowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	δ [ppm]	J [Hz]	H
5,45 (ddd)	J= 12,9, 5,2, 2,9	H-2	4,92 (d)	J=6,3	1C
3,13 (ddd)	J=16,8, 12,9, 1,3	H-3 _A	3,49 (m)		2C
2,81 (m)		H-3 _E	3,67 (t)	J=9,0	3C
7,49 (t)	J=3,0	H-5	3,27 (t)	J=9,3	4C
7,35 (dd)	J _{7,8} =9,0 J _{7,5} =3,1	H-7	3,49 (m)		5C
7,02 (dd)	J _{8,7} =9,0, J=1,4	H-8	3,87 (d) 3,75 (dd)	J=11,4 J=10,9, 5,5	6C
7,08 (t)	J=1,9	H-2'	3,60 (s)		4C- OCH ₃
6,91 (m)		H-5'			
6,91 (m)		H-6'			

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 3',4'-dihydroksy-6-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu **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 4'-metoksyflawanon 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 3',4'-dihydroksy-6-O- β -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o najwyższej polarności.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.
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 168 godzin.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując ciekową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform:metanol 9:1.

Rysunek

