

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234136**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **418556**

(22) Data zgłoszenia: **05.09.2016**

(51) Int.Cl.
C07H 17/07 (2006.01)
C12P 19/60 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(54) **7-O-β-D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawon i sposób otrzymywania
7-O-β-D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
12.03.2018 BUP 06/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.01.2020 WUP 01/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODniczy
WE WROCLAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

SANDRA SORDON, Komprachcice, PL
JAROSŁAW POPŁOŃSKI,
Szklarska Poręba, PL
TOMASZ TRONINA, Międzybórz, PL
EWA HUSZCZA, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 234136 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 7-O- β -D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawon, o wzorze 2 przedstawionym na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania 7-O- β -D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawonu.

Związek ten jest biologicznie czynny i może mieć zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.

W dostępnej literaturze nie znaleziono doniesień o przedmiotowym związku ani o sposobach jego otrzymywania.

Glukozyłacja flawonoidów zwiększa ich hydrofilowość, co można wykorzystać podczas produkcji rozpuszczalnych w wodzie nutraceutyków. Związek według wynalazku jest potencjalnym materiałem wyjściowym dla dalszych strukturalnych modyfikacji, które mogą okazać się użyteczne w produkcji aktywniejszych związków.

Istotą wynalazku jest 7-O- β -D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawon.

Istotą wynalazku jest także sposób otrzymywania tego związku, polegający na tym, że substrat, którym jest 4',5,7-trihydroksyflawon, poddaje się transformacji mikrobiologicznej, w wyniku czego otrzymuje się 7-O- β -D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawon. Grzyby strzępkowe z gatunku *Beauveria bassiana* namnaża się w płynnym podłożu mikrobiologicznym, przy ciągłym mieszananiu reagentów, w temperaturze 12–40°C. Następnie do narośniętej hodowli dodaje się substrat i dalej prowadzi się proces, aż do całkowitego zużycia substratu. Po zakończeniu transformacji roztwór transformacyjny ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, oddziela frakcję organiczną, osusza bezwodnym siarczanem magnezu, odparowuje rozpuszczalnik i tak otrzymany surowy produkt oczyszcza się za pomocą technik chromatograficznych.

Korzystnie jest, gdy grzybem strzępkowym jest *Beauveria bassiana* AM278.

Korzystnie również jest gdy reakcję prowadzi się w temperaturze 26°C.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w żywych komórkach kultury *Beauveria bassiana* następuje reakcja glikozyłacji w substracie.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie, w łagodnych warunkach 7-O- β -D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawonu, jako głównego produktu reakcji w kulturze *Beauveria bassiana*. Wydajność reakcji osiąga poziom ponad 15%.

Wynalazek jest bliżej objaśniony w przykładzie wykonania.

Przykład 1

Do kolby o pojemności 300 cm³, w której znajduje się 100 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 3 g glukozy i 1 g aminobaku na 1 dm³ wody destylowanej, wprowadza się grzyby strzępkowe *Beauveria bassiana* AM278. Po 6 dniach wzrostu drobnoustrojów w temperaturze 26°C i przy ciągłym wstrząsaniu, dodaje się 15 mg 4',5,7-trihydroksyflawonu, o wzorze 1, rozpuszczonego w 1,5 cm³ dimetylosulfotlenku. Transformację prowadzi się przy ciągłym wstrząsaniu przez 10 dób. Po tym czasie hodowlę zakwasza się 1-molowym kwasem chlorowodorowym do pH 4,5.

Następnie, uzyskany roztwór transformacyjny ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Uzyskuje się 4,52 mg surowego ekstraktu, który oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaninę chloroform : metanol w stosunku objętościowym 9:1. Po oczyszczeniu otrzymuje się 3,75 mg 7-O- β -D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawonu, o wzorze 2 z wydajnością 15,1%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ : 3,06 (1H, m, H-4''), 3,27 (1H, m, H-2''), 3,44 (1H, m, H-3''), 3,47 (3H, s, 4''-OCH₃), 3,50 (1H, m, H-5''), 3,52 (1H, m, Ha-6''), 3,66 (1H, m, Hb-6''), 5,09 (1H, d, J=7,8 Hz, H-1''), 6,44 (1H, m, J=2,2 Hz, H-8), 6,82 (1H, m, J=2,2 Hz, H-6), 6,86 (1H, s, H-3), 6,94 (2H, m, J=8,8 Hz, H-3', H-5'), 7,95 (2H, m, J=8,8 Hz, H-2', H-6'), 12,97 (1H, s, 5-OH);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ : 60,16 (C-6''), 73,29 (C-2''), 75,69 (C-5''), 76,12 (C3''), 78,84 (C-4''), 94,77 (C-6), 99,48 (C-8), 99,54 (C-1''), 103,11 (C-3), 105,37 (C-10), 116,03 (C-3', 5'), 121,00 (C-1'), 128,64 (C-2', 6'), 156,97 (C-5), 161,15 (C-9), 161,44 (C-4'), 162,87 (C-7), 164,29 (C-2), 182,02 (C-4).

Zastrzeżenia patentowe;

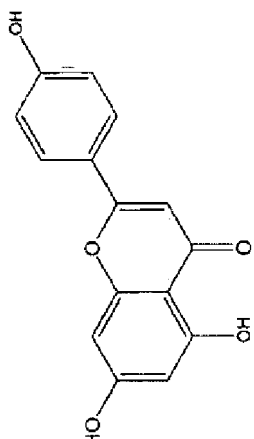
1. 7-O- β -D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawon, o wzorze 2.
2. Sposób otrzymywania 7-O- β -D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawonu, **znamienny tym**, że na drodze reakcji mikrobiologicznej transformacji substratu, którym jest 4',5,7-trihydroksyflawon o wzorze 1, otrzymuje się 7-O- β -D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawon o wzorze 2, w taki sposób, że grzyby z gatunku *Beauveria bassiana*, namnaża się w płynnym podłożu mikrobiologicznym, charakterystycznym dla grzybów strzępkowych, przy ciągłym mieszaniu reagentów, w temperaturze 12–40°C, po czym po upływie od 3 do 7 dni, do narośniętej hodowli dodaje się substrat i dalej prowadzi proces, aż do całkowitego zużycia substratu, po czym po zakończeniu transformacji roztwór transformacyjny ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, oddziela frakcję organiczną, odwadnia, odparowuje rozpuszczalnik i tak otrzymany surowy produkt oczyszcza się za pomocą technik chromatograficznych, w wyniku czego otrzymuje się czysty produkt, którym jest 7-O- β -D-4'''-O-metylo-glukopiranozylo-5,4'-dihydroksyflawon.
3. Sposób według, zastrz. 2, **znamienny tym**, że grzybem strzępkowym jest *Beauveria bassiana* AM278.
4. Sposób według, zastrz. 2, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 26°C.

Rysunek



WZÓR 2

Beauveria bassiana



WZÓR 1