

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244019 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **436245**

(22) Data zgłoszenia: **2020.12.06**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.06.13 BUP 24/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.11.20 WUP 47/2023**

(51) MKP:

C12P 19/60 (2006.01)

C07H 17/07 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL

EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL

TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania 6-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu

PL 244019 B1

Opis wynalazku

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

6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon może znaleźć zastosowanie jako związek przeciwtleniający i przeciwdrobnoustrojowy w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych oraz produktach spożywczych.

Flawonoidy stanowią ważną grupę polifenoli zawartych w owocach i warzywach. Współodpowiadają za kolor i aromat wielu pokarmów pochodzenia roślinnego i stanowią istotny składnik diety ludzi. Związki te coraz częściej stanowią substancje aktywne suplementów diety, ze względu na ich działanie prozdrowotne i zapobiegające rozwojowi różnorodnych schorzeń, w tym chorób cywilizacyjnych.

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, P. C.; Bijsman, M. N.; van Ameren, Y.; Cnossen, E. P.; 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).

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.

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 uzyskane metodami biotechnologicznymi. Dlatego istotne jest opracowywanie nowych metod wytwarzania związków aktywnych biologicznie na drodze biotransformacji, użytecznych dla przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i spożywczego.

Znana jest metoda otrzymywania 6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu przy wykorzystaniu szczepu *Beauveria bassiana* (ATCC 7159). W czasie 14-dniowej biotransformacji 6-hydroksyflawanonu uzyskano wydajność wynoszącą 37.6% (Mikell, J. R., Herath, W., Khan, I. A. Eleven Microbial Metabolites of 6-Hydroxyflavanon Chem. Pharm. Bull. 2015, 63, 579–583). Związek ten został otrzymany również w wyniku biotransformacji 6-hydroksyflawanonu w kulturze szczepu *Beauveria bassiana* (ATCC 13144) z wydajnością na poziomie 0.8% (Herath, W., Mikell, J. R., Hale, A. L., Ferreira, D., Khan, I. A. Microbial Metabolism Part 9. Structure and Antioxidant Significance of the Metabolites of 5,7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 5- and 6-Hydroxyflavones. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 2008 56(4) 418–422).

Nie są znane metody otrzymywania 6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu przy wykorzystaniu szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2.

Istota sposobu według wynalazku, 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 6-hydroksyflawanon, 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. 6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w trzecim 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 4 dni.

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

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje przyłączenie 4-metoksy- β -D-glukozy do grupy hydroksylowej przy C-6. 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 6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu jako jedyne produktu 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 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 10 g aminobaku i 30 g sacharozy, wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg 6-hydroksyflawanonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 4 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 trzecim paśmie od linii startu.

Na tej drodze otrzymuje się 15,3 mg 6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu (wydajność 17,7%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

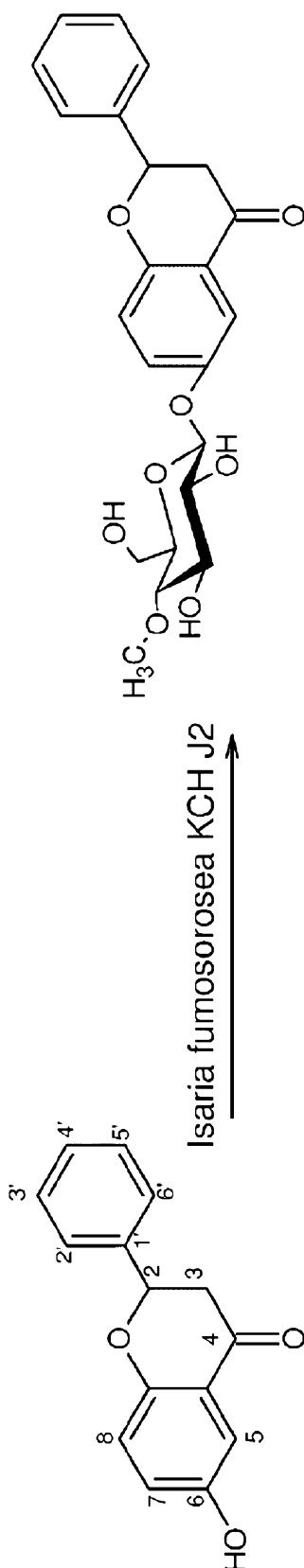
Opis sygnałów pochodzących z widma ¹H NMR (601 MHz, Aceton-d₆)

Sygnały pochodzące od szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od jednostki glikozydowej		
δ [ppm]	J [Hz]	H	CUKIER δ [ppm]	J [Hz]	H
5,59 (dd)	$J_{2,3A}=13,1$ $J_{2,3E}=2,9$	H-2	4,89 (d)	$J=7,7$	1C
3,13 (dd)	$J_{3A,2}=13,1$ $J_{3A,3E}=16,8$	H-3 _A	3,46 (m)		2C
2,87 (m)		H-3 _E	3,63 (m)		3C
7,47 (d)	$J_{5,7}=3,1$	H-5	3,24 (m)		4C
-		H-6	3,46 (m)		5C
7,34 (dd)	$J_{7,5}=3,1$ $J_{7,8}=8,9$	H-7	3,82 (m) 3,71 (m)		6C
7,03 (d)	$J_{8,7}=9,0$	H-8	3,57 (s)		C4-OCH ₃
7,58 (m)		H-2'			
7,45 (m)		H-3'			
7,39 (m)		H-4'			
7,45 (m)		H-5'			
7,58 (m)		H-6'			

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanonu o wzorze 2 **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 6-hydroksyflawanon 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 6-O- β -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawanon o wzorze 2 znajduje się we frakcji o pośredniej polarności, w trzecim 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 4 dni.
5. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że oczyszczanie prowadzi się wykorzystując cienkowsarstwową chromatografię preparatywną w układzie eluującym chloroform : metanol w stosunku objętościowym 9 : 1.

Rysunki



wzór 2

wzór 1