

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237133**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422815**

(22) Data zgłoszenia: **12.09.2017**

(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-hydroksyflawanon i sposób otrzymywania
7-O-β-D-4''-O-metylo-glukopiranozylo-5-hydroksyflawanonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
25.03.2019 BUP 07/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.03.2021 WUP 06/21

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

**SANDRA SORDON, Komprachcice, PL
EWA HUSZCZA, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Anna Kasperowicz

PL 237133 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 7-O- β -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-5-hydroksyflawanon, o wzorze 2 przedstawionym na rysunku oraz sposób otrzymywania 7-O- β -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-5-hydroksyflawanonu. Budowa chemiczna otrzymanego związku wskazuje na jego aktywność biologiczną oraz potencjalne zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.

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

Glikozylacja 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.

Szczep *Beauveria bassiana* AM278 zdeponowany jest w kolekcji mikroorganizmów Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław).

Znane są procesy biotransformacji przy udziale grzybów strzępkowych z gatunku *Beauveria bassiana*. Opisano m.in. jego zdolność do glikozylacji związków flawonoidowych. W wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w żywych komórkach kultury *Beauveria bassiana* otrzymano szereg związków przy udziale tego gatunku, takich jak: z opisu PL222200(B1) – 4'-O- β -D-4""-metoksy-glukopiranozylo- β -[1""-hydroksyizopropyl]-4,2'-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylo- α,β -dihydrochalkon, z opisu PL213614 (B1) – 7-O- β -D-4""-metoksyglukopiranozyd 8-prenylonaringeniny, z PL 226314 – 4'-O- β -D-4""-O-metylo-glukopiranozylo-1",2", α,β -tetrahydroksantohumolu K, z PL210638(B1) znane jest otrzymywanie 7-O- β -D-4""-metoksyglukopiranozydu izoksantohumolu, z PL222788(B1) – otrzymywanie 4'-O- β -D-4""-metoksy-glukopiranozylo-4,2'-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylo- α,β -dihydrochalkonu, natomiast opis patentowy PL215796(B1) ujawnia otrzymywanie (Z)-6-O- β -D-4""-O-metylo-glukopiranozylo-4'-hydroksy-4-metoksy-7-prenyloauronu.

Istotą wynalazku jest 7-O- β -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-5-hydroksyflawanon.

Istotą wynalazku jest także sposób otrzymywania tego związku, polegający na tym, że substrat, którym jest 5,7-dihydroksyflawanon, poddaje się transformacji mikrobiologicznej, w wyniku czego otrzymuje się 7-O- β -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-5-hydroksyflawanon. Grzyby strzępkowe z gatunku *Beauveria bassiana* namnaża się w płynnym podłożu mikrobiologicznym, przy ciągłym mieszaniu 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 frakcją organiczną, osusza bezwodnym siarczanem magnezu, odparowuje rozpuszczalnik i tak otrzymany surowy produkt oczyszcza się za pomocą technik chromatograficznych.

Korzystnie jest, gdy grzybem z gatunku *Beauveria bassiana* jest szczep *Beauveria bassiana* AM278.

Korzystnie 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 glikozylacji substratu.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie, w łagodnych warunkach 7-O- β -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-5-hydroksyflawanonu, jako głównego produktu reakcji w kulturze *Beauveria bassiana*. Wydajność reakcji osiąga poziom ponad 70%.

Wynalazek jest bliżej objaśniony w przykładzie wykonania.

P r z y k ł a d: 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 5,7-dihydroksyflawanonu, 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 20 mg surowego ekstraktu, który oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaninę chloroform : metanol w stosunku objętościowym 7:1. Po oczyszczeniu otrzymuje się 9,25 mg 7-O- β -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-5-hydroksyflawanonu, o wzorze 2 z wydajnością 73%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,84 (1H, dd, $J=3,1$; 17,1, H-3eq_a), 2,84 (1H, dd, $J=3,1$; 17,1, H-3eq_b), 3,02 (1H, m, H-4''), 3,22 (1H, m, H-2''), 3,26 (1H, m, H-3ax), 3,37-3,43 (2H, m, H-3'', H-5''), 3,44 (3H, s, 4''-OCH₃), 3,47 (1H, m, Ha-6''), 3,60 (1H, m, Hb-6''), 5,00 (1H, d, $J=7,8$ Hz, H-1''_a), 5,02 (1H, d, $J=7,8$ Hz, H-1''_b), 5,64 (1H, dd, $J=3,2$; 12,6 Hz, H-2_a), 5,65 (1H, dd, $J=3,2$; 12,6 Hz, H-2_b), 6,15 (1H, m, H-6^a), 6,16 (1H, m, H-6_b), 6,19 (1H, m, H-8_a), 6,20 (1H, m, H-8_b), 7,53 (2H, m, H-2', H-6'), 7,40 (1H, m, H-4'), 7,44 (2H, m, H-3', H-5'), 12,03 (1H, s, 7-OH),

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 42,16 (C-3_a), 42,19 (C-3_b), 59,67 (4''-OCH₃), 60,12 (C-6''), 73,19 (C-2''), 75,58 (C-5''), 76,00 (C-3''_a), 76,02 (C-3''_b), 78,65 (C-2_a), 78,67 (C-2_b), 78,79 (C-4''), 95,47 (C-8_a), 95,49 (C-8_b), 96,60 (C-6), 99,11 (C-1''_a), 99,22 (C-1''_b), 103,31 (C-10), 126,75 (C-2', C-6'), 128,61 (C-3', C-5'), 128,70 (C-4'), 138,45 (C-1'_a), 138,47 (C-1'_b), 162,55 (C-9_a), 162,58 (C-9_b), 162,93 (C-5_a), 162,95 (C-5_b), 165,16 (C-7_a), 165,25 (C-7_b), 196,83 (C-4_a), 196,85 (C-4_b).

Zastrzeżenia patentowe

1. 7-*O*- β -D-4''-*O*-metylo-glukopiranozylo-5-hydroksyflawanon, o wzorze 2.
2. Sposób otrzymywania 7-*O*- β -D-4''-*O*-metylo-glukopiranozylo-5-hydroksyflawanonu, **znamienny tym**, że na drodze reakcji mikrobiologicznej transformacji substratu, którym jest 5,7-dihydroksyflawanon o wzorze 1, otrzymuje się 7-*O*- β -D-4''-*O*-metylo-glukopiranozylo-5-hydroksyflawanon 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-hydroksyflawanon.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że grzybem z gatunku *Beauveria bassiana* jest szczep *Beauveria bassiana* AM278.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 26°C.

Rysunek

