

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237130**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422812**

(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-3',4',5-trihydroksyflawanon i sposób otrzymywania 7-O-β-D-4''-O-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanonu**

(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 237130 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 7-O- $\beta$ -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanon, o wzorze 2 przedstawionym na rysunku oraz sposób otrzymywania 7-O- $\beta$ -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanonu. 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- $\beta$ -D-4""-metoksy-glukopiranozylo- $\beta$ -[1""-hydroksyizopropyl]-4,2'-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylo- $\alpha,\beta$ -dihydrochalkon, z opisu PL213614(B1) – 7-O- $\beta$ -D-4""-metoksyglukopiranozyd 8-prenylonaringeniny, z PL 226314 – 4'-O- $\alpha$ -D-4""-O-metylo-glukopiranozylo-1",2", $\alpha,\beta$ -tetrahydroksantohumolu K, z PL210638(B1) znane jest otrzymywanie 7-O- $\beta$ -D-4""-metoksyglukopiranozydu izoksantohumolu, z PL222788(B1) – otrzymywanie 4'-O- $\beta$ -D-4""-metoksy-glukopiranozylo-4,2'-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylo- $\alpha,\beta$ -dihydrochalkonu, natomiast opis patentowy PL215796(B1) ujawnia otrzymywanie (Z)-6-O- $\beta$ -D-4""-O-metylo-glukopiranozylo-4'-hydroksy-4-metoksy-7-prenyloauronu.

Istotą wynalazku jest 7-O- $\beta$ -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanon.

Istotą wynalazku jest także sposób otrzymywania tego związku, polegający na tym, że substrat, którym jest 3',4',5,7-tetrahydroksyflawanon, poddaje się transformacji mikrobiologicznej, w wyniku czego otrzymuje się 7-O- $\beta$ -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanon. 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 frakcję 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- $\beta$ -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanonu, jako głównego produktu reakcji w kulturze *Beauveria bassiana*. Wydajność reakcji osiąga poziom ponad 35%.

Wynalazek jest bliżej objaśniony w przykładzie wykonania.

**P r z y k ł a d:** Do kolby o pojemności 300 cm<sup>3</sup>, w której znajduje się 100 cm<sup>3</sup> sterylnej pożywki zawierającej 3 g glukozy i 1 g aminobaku na 1 dm<sup>3</sup> 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 3',4',5,7-tetrahydroksyflawanonu, o wzorze 1, rozpuszczonego w 1,5 cm<sup>3</sup> 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 14 mg surowego ekstraktu, który oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaninę chloroform : metanol w stosunku objętościowym 7:1. Po oczyszczeniu otrzymuje się 8,68 mg 7-O- $\beta$ -D-4"-O-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanonu, o wzorze 2 z wydajnością 35,9%.

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

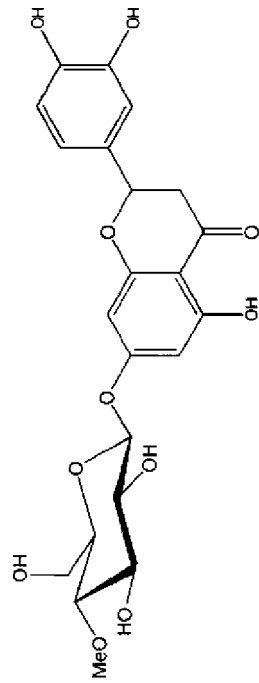
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,72 (1H, dd,  $J = 3,1$ ; 17,1 Hz, H-3<sub>aeq</sub>), 2,74 (1H, dd,  $J = 3,1$ ; 17,1 Hz, H-3<sub>beq</sub>), 3,01 (1H, m, H-4"), 3,21 (1H, m, H-2"), 3,27 (1H, m, H-3), 3,42 (2H, m, H-3", H-5"), 3,44 (3H, s, 4"-OCH<sub>3</sub>), 3,47 (1H, m, Ha-6"), 3,60 (1H, m, Hb-6"), 4,98 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz, H-1"<sub>a</sub>), 5,01 (1H, d,  $J = 7,8$ , H-1"<sub>b</sub>), 5,42 (1H, m, H-2), 6,12 (1H, d,  $J = 2,2$  Hz, H-6<sub>a</sub>), 6,13 (1H, d,  $J = 2,2$  Hz, H-6<sub>b</sub>), 6,14 (1H, d,  $J = 2,2$  Hz, H-8), 6,88 (1H, m, H-2'), 6,75 (2H, m, H-5', H-6'), 12,04 (5-OH<sub>a</sub>), 12,05 (5-OH<sub>b</sub>),

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 42,16 (C-3<sub>a</sub>), 42,20 (C-3<sub>b</sub>), 59,71 (4"-OCH<sub>3</sub>), 60,15 (C-6"<sub>a</sub>), 60,17 (C-6"<sub>b</sub>), 73,22 (C-2"), 75,60 (C-5"<sub>a</sub>), 75,62 (C-5"<sub>b</sub>), 76,03 (C-3"<sub>a</sub>), 76,05 (C-3"<sub>b</sub>), 78,77 (C-2), 78,83 (C-4"), 95,41 (C-8<sub>a</sub>), 95,43 (C-8<sub>b</sub>), 96,41 (C-6<sub>a</sub>), 96,45 (C-6<sub>b</sub>), 99,13 (C-1"<sub>a</sub>), 99,25 (C-1"<sub>b</sub>), 103,32 (C-10), 114,49 (C-2'), 115,39 (C-5'), 118,14 (C-6'<sub>a</sub>), 118,17 (C-6'<sub>b</sub>), 129,23 (C-1'<sub>a</sub>), 129,25 (C-1'<sub>b</sub>), 145,26 (C-4'), 145,86 (C-3'<sub>a</sub>), 145,88 (C-3'<sub>b</sub>), 162,75 (C-9<sub>a</sub>), 162,81 (C-9<sub>b</sub>), 162,95 (C-5<sub>a</sub>), 162,98 (C-5<sub>b</sub>), 165,13 (C-7<sub>a</sub>), 165,22 (C-7<sub>b</sub>), 197,24 (C-4<sub>a</sub>), 197,28 (C-4<sub>b</sub>).

### Zastrzeżenia patentowe

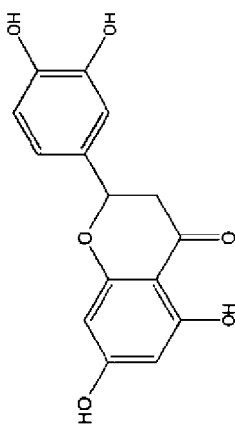
1. 7-*O*- $\beta$ -*D*-4"-*O*-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanon o wzorze 2.
2. Sposób otrzymywania -*O*- $\beta$ -*D*-4"-*O*-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanonu, **znamienny tym**, że na drodze reakcji mikrobiologicznej transformacji substratu, którym jest 3',4',5,7-tetrahydroksyflawanon o wzorze 1, otrzymuje się 7-*O*- $\beta$ -*D*-4"-*O*-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanon 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*- $\beta$ -*D*-4"-*O*-metylo-glukopiranozylo-3',4',5-trihydroksyflawanon o wzorze 2.
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



WZÓR 2

*Beauveria bassiana*



WZÓR 1