

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **234826**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422146**

(51) Int.Cl.

**C12P 19/60 (2006.01)**

**C12R 1/65 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **07.07.2017**

(54) **Sposób otrzymywania mieszaniny 3'-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-  
-metoksyflawanonu i 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**14.01.2019 BUP 02/19**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**30.04.2020 WUP 04/20**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU, 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 234826 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania mieszaniny 3'-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu o wzorze 2 i 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu o wzorze 3 przedstawionych na rysunku.

Budowa chemiczna otrzymanych składników mieszaniny wskazuje na ich aktywność biologiczną oraz ich potencjalne zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. W literaturze opisano aktywność przeciwnowotworową 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu [J.A. Manthey, N. Guthrie: „Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines”, J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 5837–5843].

W literaturze znana jest metoda otrzymywania 3'-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu i 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu w zawieszinowej kulturze komórek wilca ziemniaczanego (*Ipomoea batatas*) [K. Shimoda, H. Hamada, H. Hamada: „Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures”, *Phytochemistry*, 2007, 69, 1135–1140].

Nie jest znana natomiast metoda otrzymywania tej mieszaniny na drodze transformacji mikrobiologicznej.

Szczep *Absidia coerulea* AM 93 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 *Absidia coerulea*. Opisano m. in. jego zdolność do glikozylacji związków flawonoidowych. W wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w żywych komórkach kultury *Absidia coerulea* otrzymano szereg związków. Z opisu patentowego PL 223 441 znana jest metoda otrzymywania 4'-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-4,2'-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylo- $\alpha,\beta$ -dihydrochalkonu, z opisu PL 226315 znany jest sposób otrzymywania 2'-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-1'',2'', $\alpha,\beta$ -tetrahydroksantohumolu C, z PL 223446 – 4'-O- $\beta$ -D-glukopiranozyloksantohumolu C, opis PL 222175 ujawnia otrzymywanie 4'-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo- $\beta$ -[1'''-hydroksyizopropyl]-4,2'-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylo- $\alpha,\beta$ -dihydrochalkonu, opis PL 222731 wskazuje na otrzymywanie mieszaniny 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-5-hydroksy-4'-metoksyizoflawonu i 5-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-7-hydroksy-4'-metoksyizoflawonu, natomiast PL 219084 opisuje otrzymywanie 4'-O- $\beta$ -D-glukozylo-2',4-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkonu.

Istotą wynalazku jest sposób otrzymywania mieszaniny 3'-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu i 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu, polegający na tym, że substrat, którym jest 3',5,7-trihydroksy-4'-metoksyflawanon, poddaje się transformacji mikrobiologicznej, w wyniku czego otrzymuje się mieszaninę 3'-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu i 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu. Grzyby strzępkowe z gatunku *Absidia coerulea* 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 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 także jest, gdy transformację prowadzi się szczepem *Absidia coerulea* AM 93.

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

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w żywych komórkach kultury *Absidia coerulea* następuje reakcja glikozylacji substratu.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie, w łagodnych warunkach mieszaniny 3'-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu i 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu, jako głównych produktów reakcji w kulturze *Absidia coerulea*. Wydajność reakcji dla 3'-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu osiąga poziom ponad 5%, zaś dla 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu 35%.

Wynalazek jest bliżej objaśniony w przykładzie wykonania.

**P r z y k ł a d 1.** 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 *Absidia coerulea* AM 93. Po 6 dniach wzrostu drobnoustrojów w temperaturze 26°C i przy ciągłym wstrząsaniu, dodaje się 15 mg 3',5,7-trihydroksy-4'-metoksyflawanonu, 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 12,5 mg surowego ekstraktu, który oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaninę chloroform : metanol w stosunku objętościowym 7:1. Po oczyszczeniu otrzymuje się 9,5 mg mieszaniny 3'-O-β-D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu, o wzorze 2 i 7-O-β-D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu, o wzorze 3 z wydajnością 5,6% dla 3'-O-β-D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu i 35,5% dla 7-O-β-D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu.

Uzyskane produkty charakteryzują się następującymi danymi spektralnymi:

3'-O-β-D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanon:

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,70 (1H, dd, J=3,2; 17,1 Hz, H-3<sub>eq</sub>), 3,14 (1H, t, J=9,4 Hz, H-4"), 3,25-3,28 (1H, m, H-2"), 3,24-3,41 (2H, m, H-3", H-5"), 3,27 (1H, m, H-3<sub>ax</sub>), 3,40-3,47 (1H, m, Ha-6"), 3,64-3,67 (1H, m, Hb-6"), 3,77 (3H, s, 4'OCH<sub>3</sub>) 4,95 (1H, d, J=7,6 Hz, H-1"), 5,45 (1H, dd, J=3,2; 12,3 Hz, H-2), 5,88 (1H, d, J=2,1 Hz, H-6), 5,90 (1H, d, J=2,1 Hz, H-8a), 5,91 (1H, d, J=2,1 Hz, H-8b), 7,00 (1H, d, J=8,4 Hz, H-5'a), 7,01 (1H, d, J=8,4 Hz, H-5'b), 7,07 (1H, dd, J=2,1; 8,4 Hz, H-6'a), 7,08 (1H, dd, J=2,1; 8,4 Hz, H-6'b), 7,23 (1H, d, J=2,1 Hz, H-2'),

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 41,95 (C-3a), 42,04 (C-3b), 55,74 (4'OCH<sub>3</sub>a), 55,77 (4'OCH<sub>3</sub>b), 60,59 (C-6"), 69,71 (C-4") 73,16 (C-2"), 76,34 (C-3"), 77,02 (C-5"), 78,47 (C-2), 95,09 (C-8), 95,49 (C-6), 99,68 (C-1"a), 99,96 (C-1"b), 101,75 (C-10), 112,20 (C-5'), 113,79 (C-2'), 120,35 (C-6'a), 120,60 (C-6'b), 130,89 (C-1'a), 130,91 (C-1'a), 146,30 (C-3'), 149,14 (C-4'), 162,92 (C-9a), 162,94 (C-9b), 163,49 (C-5), 166,80 (C-7), 196,28 (C-4).

7-O-β-D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanon

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,75 (1H, dd, J=3,2; 17,1 Hz, H-3a<sub>eq</sub>), 2,77 (1H, dd, J=3,2; 17,1 Hz, H-3b<sub>eq</sub>), 3,14 (1H, t, J=9,4 Hz, H-4"), 3,20 (1H, m, H-2"), 3,24-3,41 (2H, m, H-3", H-5"), 3,27 (1H, m, H-3<sub>ax</sub>), 3,40-3,47 (1H, m, Ha-6"), 3,64-3,67 (1H, m, Hb-6"), 3,77 (3H, s, 4'OCH<sub>3</sub>) 4,96 (1H, d, J=7,7 Hz, H-1"a), 4,98 (1H, d, J=7,7 Hz, H-1"b), 5,48 (1H, dd, J=3,2; 12,3 Hz, H-2a), 5,49 (1H, dd, J=3,2; 12,3 Hz, H-2b), 6,13 (1H, d, J=2,1 Hz, H-6a), 6,14 (1H, d, J=2,1 Hz, H-6b), 6,15 (1H, d, J=2,1 Hz, H-8a), 6,16 (1H, d, J=2,1 Hz, H-8b), 6,88 (1H, m, H-6'), 6,94 (2H, m, H-2', H-5'),

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 42,16 (C-3), 55,70 (4'OCH<sub>3</sub>), 60,59 (C-6"), 69,51 (C-4"), 73,03 (C-2"), 76,34 (C-3"), 77,09 (C-5"), 78,50 (C-2a), 78,54 (C-2b), 95,86 (C-8), 96,50 (C-6), 99,47 (C-1"a), 99,59 (C-1"b), 103,30 (C-10), 112,00 (C-5'), 114,17 (C-2'), 117,85 (C-6'), 130,85 (C-1'), 146,49 (C-3'), 147,99 (C-4'a), 148,00 (C-4'b), 162,62 (C-9a), 162,66 (C-9b), 162,86 (C-5), 165,23 (C-7a), 165,31 (C-7b), 197,10 (C-4).

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania mieszaniny 3'-O-β-D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu i 7-O-β-D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu **znamienny tym**, że na drodze reakcji mikrobiologicznej transformacji substratu, którym jest 3',5,7-trihydroksy-4'-metoksyflawanon o wzorze 1, otrzymuje się mieszaninę 3'-O-β-D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu, o wzorze 2 i 7-O-β-D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu, o wzorze 3, w taki sposób, że grzyby z gatunku *Absidia coerulea* namnaża się w płynnym podłożu mikrobiologicznym, charakterystycznym dla grzybów, przy ciągłym mieszaniu reagentów, w temperaturze od 12 do 40°C, po czym po upływie od 3 do 7 dni, do narośniętej hodowli dodaje się substrat i dalej prowadzi się 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 mieszanina 3'-O-β-D-glukopiranozylo-5,7-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu i 7-O-β-D-glukopiranozylo-3',5-dihydroksy-4'-metoksyflawanonu.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że grzybem z gatunku *Absidia coerulea* jest szczep *Absidia coerulea* AM93.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 26°C.

## Rysunek

