

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy

Agnieszka Krawczyk-Łebek

**Synteza i biotransformacje flawonoidów
z grupą metylową**

Synthesis and biotransformation of flavonoids with
a methyl group

Dziedzina: nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina: nauki biologiczne

Słowa kluczowe:

biotransformacje, flawonoidy z grupą metylową, glikozylacja
flawonoidów, entomopatogenne grzyby strzępkowe

Wrocław, 01.06.2022

STRESZCZENIE W JEZYKU POLSKIM

Związki flawonoidowe są wtórnymi metabolitami roślin, powszechnie występującymi w diecie człowieka. Wykazują szereg prozdrowotnych właściwości, wśród których można wymienić: przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne, kardioprotekcyjne, hepatoprotekcyjne i przeciwnowotworowe. Flawonoidy z grupą metylową charakteryzują się zwiększoną stabilnością metaboliczną, poprawioną absorpcją jelitową i biodostępnością. Zastosowanie farmakologiczne flawonoidów jest jednak niewielkie. Związki te naturalnie występują jako mieszanina, najczęściej w formie glikozydów flawonoidowych dobrze rozpuszczających się w wodzie, jednak ich ekstrakcja z materiału roślinnego jest zazwyczaj nieopłacalna z powodu ich niskiej zawartości w przeliczeniu na gram suchej masy oraz wysokiego kosztu rozdzielenia wieloskładnikowych mieszanin związków. Również synteza chemiczna glikozydów flawonoidowych nastęca wielu problemów związanych z pracochłonnymi procedurami koniecznymi aby uzyskać regio- i stereoselektywność procesu oraz niskimi wydajnościami z powodu drastycznych warunków reakcji prowadzących do rozkładu aglikonów flawonoidowych. Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie połączonych metod chemicznych i biotechnologicznych, w których otrzymane na drodze syntezy chemicznej aglikony flawonoidowe są przekształcane do glikozydowych pochodnych z wykorzystaniem układów enzymatycznych entomopatogennych grzybów strzępkowych. Takie podejście pozwala na uzyskanie nowych pochodnych flawonoidowych o poprawionych właściwościach fizykochemicznych i potencjalnie większej aktywności biologicznej.

Celem prezentowanej pracy była synteza wybranych aglikonów flawonoidowych z podstawnikiem metylowym (chalkonów, flawanonów i flawonów), a następnie uzyskanie ich pochodnych glikozydowych z wykorzystaniem całych komórek mikroorganizmów w procesie biotransformacji, a także określenie potencjalnych właściwości fizykochemicznych i aktywności wszystkich otrzymanych związków przy użyciu symulacji komputerowych. Wyniki tych badań zostały przedstawione w monotematycznym cyklu pięciu publikacji. Na podstawie wstępnych badań w małej skali zostały wytypowane trzy najaktywniejsze szczepy entomopatogennych grzybów strzępkowych, tj. *Beauveria bassiana* KCH J1.5, *Isaria fumosorosea* KCH J2 i *Isaria farinosa* KCH J2.6. Zostały one użyte jako biokatalizatory w biotransformacjach prowadzonych w zwiększonej skali, których celem było wyizolowanie i określenie struktur produktów reakcji. Dzięki zastosowaniu cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej oczyściłam i rozdzieliłam otrzymane produkty, a następnie określiłam ich struktury chemiczne metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY HSQC, HMBC) i potwierdziłam ich masy molowe za pomocą spektroskopii masowej. W wyniku biotransformacji 8 substratów flawonoidowych (chalkonów, flawanonów i flawonów) z podstawnikiem metylowym otrzymałam 32 pochodne flawonoidowe spośród których 29 nie zostało wcześniej opisanych w literaturze (2 glikozydy chalkonów, 7 glikozydów dihydrochalkonów, 14 glikozydów flawanonów, 1 pochodna glikozydowa kwasu benzoowego, 5 glikozydów flawonów). Udowodniłam, że badane szczepy mają zdolność przyłączania 4-*O*-metyloglukopiranozy do układu flawonoidowego i są zdolne do redukcji wiązania podwójnego chalkonów pomiędzy C- α a C- β prowadzącej do otrzymania dihydrochalkonów. Szczepy te prowadzą również reakcje hydroksylacji układu flawonoidowego oraz utlenienia podstawnika metylowego do grupy hydroksymetylowej. Pozycja podstawnika metylowego w strukturze związku flawonoidowego miała wpływ na regioselektywność i wydajność procesu biotransformacji. Symulacje komputerowe na podstawie struktur związków chemicznych wskazują, że otrzymane nowe pochodne

glikozydowe charakteryzują się poprawionymi właściwościami fizykochemicznymi i interesującymi aktywnościami biologicznymi, które wymagają dalszych badań w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Uzyskane produkty są obecnie badane w celu scharakteryzowania ich właściwości i wyboru najaktywniejszych związków, dla których można będzie w przyszłości opracować zoptymalizowany proces ich otrzymywania, tak aby mogły stać się komponentami suplementów diety i leków.

STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

Flavonoid compounds are secondary metabolites of plants and commonly found in the human diet. They exhibit numerous pro-health properties, including antimicrobial, anti-inflammatory, cardioprotective, hepatoprotective and anti-cancer. Flavonoids with a methyl group are characterized by increased metabolic stability, improved intestinal absorption, and bioavailability. However, the pharmacological use of flavonoids is quite low. These compounds naturally occur as a mixture, most often in the form of highly water-soluble flavonoid glycosides, but their extraction from plant material is usually unprofitable due to their low concentration per gram of dry weight and the high cost of separation of multi-component mixtures of compounds. Also, the chemical synthesis of flavonoid glycosides causes many problems due to the laborious procedures necessary to obtain regio- and stereoselectivity of the process and low yields because of the drastic reaction conditions leading to the decomposition of the flavonoid aglycones. The solution to this problem is using the combined chemical and biotechnological methods in which the flavonoid aglycones obtained by chemical synthesis are transformed into glycosidic derivatives by entomopathogenic filamentous fungi enzymatic systems. This approach allows for obtaining new flavonoid derivatives with improved physicochemical properties and potentially increased biological activity.

The purpose of the presented work was the synthesis of selected flavonoid aglycones with a methyl moiety (chalcones, flavanones, and flavones), and then obtaining their glycoside derivatives using whole microorganism cells in the biotransformation process, as well as determining potential physicochemical properties and biological activity of all compounds using computer simulations. The results of these studies were presented in a monothematic cycle of five publications. On the basis of initial screening tests, the three most active strains of entomopathogenic filamentous fungi, i.e. *Beauveria bassiana* KCH J1.5, *Isaria fumosorosea* KCH J2, and *Isaria farinosa* KCH J2.6 were selected. They have been used as biocatalysts in scaled-up biotransformations to isolate and determine the structures of the reaction products. Thanks to the use of preparative thin-layer chromatography, I purified and separated the obtained products, and then determined their chemical structures by nuclear magnetic resonance (^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY HSQC, HMBC) and confirmed their molecular weights by mass spectroscopy. As a result of the biotransformation of 8 flavonoid substrates (chalcones, flavanones, and flavones) with a methyl group, I obtained 32 flavonoid derivatives, 29 of which have not been previously described in the literature (2 chalcone glycosides, 7 dihydrochalcone glycosides, 14 flavanone glycosides, 1 glycoside derivative of benzoic acid, flavones). I proved that the tested strains have the ability to attach 4-*O*-methylglucopyranose to the flavonoid system and they are able to reduce the double bond of chalcones between C- α and C- β , leading to dihydrochalcone formation. These strains also carry out the hydroxylation reactions of the flavonoid system and the oxidation of the methyl group to the hydroxymethyl group. The position of the methyl substituent in the structure of the flavonoid compound affects the regioselectivity and efficiency of the biotransformation process. Computer simulations based on the structures of chemical compounds show that the obtained new glycoside derivatives are characterized by improved physicochemical properties and interesting biological activities that require further *in vitro* and *in vivo* studies. The obtained products are currently being tested in order to characterize their properties and select the most active compounds for which the

production process can be optimized in the future so that they can become components of dietary supplements and drugs.