

**MIKROBIOLOGICZNE PRZEKSZTAŁCENIA
ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH
Z GRUPY STEROIDÓW
ORAZ SKŁADNIKÓW WYCHMIELIN**

EWA HUSZCZA

**MIKROBIOLOGICZNE PRZEKSZTAŁCENIA
ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH
Z GRUPY STEROIDÓW
ORAZ SKŁADNIKÓW WYCHMIELIN**



WROCLAW 2008

Opiniodawca

prof. dr hab. Antoni Polanowski

Redaktor merytoryczny

prof. dr hab. inż. Ewelina Dziuba

Opracowanie redakcyjne

mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

Korekta:

Janina Szydłowska

Łamanie i projekt okładki

Teresa Alicja Chmura

Monografie LXI

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2008

ISSN 1898-1151

ISBN 978-83-60574-39-3

WYDAWNICTWO UNIwersYTETU PRZYRODnicZEGO WE WROCLAWIU

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki

ul. Sopocka 23, 50–344 Wrocław, tel. 071 328–12–77

e-mail: wyd@up.wroc.pl

Nakład 100 + 16 egz. Ark. druk. 5,5

Druk i oprawa: Wydawnictwo Tekst Sp. z o.o.

ul. Kossaka 72, 85–307 Bydgoszcz

SPIS TREŚCI

PRZEDMOWA	7
1. WSTĘP	9
1.1. Mikrobiologiczne transformacje steroidów.....	12
1.2. Biologicznie aktywne związki wytwarzane przez chmiel	17
1.3. Biotransformacje flawonoidów chmielowych.....	22
1.4. Wychmieliny jako źródło substancji odżywczych i biologicznie aktywnych	29
2. PRZEDSTAWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW	33
2.1. Mikrobiologiczne transformacje steroidów.....	33
2.1.1. Transformacje steroidów przez <i>Absidia glauca</i>	34
2.1.2. Transformacje steroidów przez <i>Botrytis cinerea</i>	38
2.1.3. Transformacje steroidów przez <i>Beauveria bassiana</i>	40
2.2. Mikrobiologiczna degradacja gorzkich kwasów chmielowych.....	44
2.2.1. Selekcja drobnoustrojów degradujących gorzkie kwasy chmielowe	44
2.2.2. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez wyselekcjonowane grzyby	47
2.2.2.1. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez <i>Trametes versicolor</i>	52
2.2.2.2. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez <i>Candida</i> <i>parapsilosis</i>	55
2.3. Mikrobiologiczne transformacje ksantohumolu.....	61
2.3.1. Materiały i metody	61
2.3.2. Selekcja drobnoustrojów transformujących ksantohumol	64
2.3.3. Transformacja ksantohumolu przez <i>Absidia glauca</i>	65
2.3.4. Transformacja ksantohumolu przez <i>Beauveria bassiana</i>	66
2.3.5. Transformacja ksantohumolu przez <i>Pezicula cinnamomea</i>	67
2.3.6. Transformacja ksantohumolu przez <i>Fusarium equiseti</i>	68
3. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	71
PIŚMIENNICTWO	73

PRZEDMOWA

Na niniejszą rozprawę habilitacyjną składają się trzy prace dotyczące mikrobiologicznych transformacji steroidów oraz cztery poświęcone mikrobiologicznym przekształceniom związków zawartych w wychmielinach. Publikacje te zestawiono chronologicznie, a numery w nawiasach odpowiadają spisowi cytowanej literatury.

[93] Huszcza E., Dmochowska-Gładysz J.: 2003. Transformations of testosterone and related steroids by *Absidia glauca* culture. *J. Basic Microbiol.*, 43, 113–120.

[94] Huszcza E., Dmochowska-Gładysz J.: 2003. Transformations of testosterone and related steroids by *Botrytis cinerea*, *Phytochemistry*, 62, 155–158.

[95] Huszcza E., Dmochowska-Gładysz J., Bartmańska A.: 2005. Transformations of steroids by *Beauveria bassiana*, *Z. Naturforsch.*, 60c, 103–108.

[90] Huszcza E., Bartmańska A., Anioł M., Mączka W., Żołnierczyk A., Wawrzeńczyk C.: 2007. Screening for the hop bitter acids degrading microorganisms, *Ecol. Chem. Eng.*, 14, 57–61.

[89] Huszcza E., Bartmańska A.: 2008. The implication of yeast in debittering of spent hops, *Enz. Microbial Technol.*, 42, 421–425.

[91] Huszcza E., Bartmańska A., Anioł A., Mączka W., Żołnierczyk A., Wawrzeńczyk C.: 2008. Degradation of hop bitter acids by fungi. *Waste Manage.*, 28, 1406–1410.

[92] Huszcza E., Bartmańska A., Tronina T.: 2008. Glycosylation of xanthohumol by fungi, *Z. Naturforsch.*, 63c, 557–560.

Wyniki opisanych badań, mogące znaleźć praktyczne zastosowanie, otrzymały ochronę patentową bądź też czynione są starania o jej uzyskanie:

1. Dmochowska-Gładysz J., Huszcza E., Sposób wytwarzania 11 α -hydroksy-1-dehydrotestosteronu, patent PL 194390.
2. Dmochowska-Gładysz J., Huszcza E., Sposób wytwarzania 14 α -hydroksy-1-dehydrotestosteronu, patent PL 194389.
3. Huszcza E., Bartmańska A., Anioł M., Mączka W., Żołnierczyk A., Jarosz A., Wawrzeńczyk C., Sposób rozkładu humulonów i lupulonów, Nr rej. UP RP: P-37044.
4. Huszcza E., Bartmańska A., Tronina T., Sposób wytwarzania 4'-*O*- β -D-glukozylo-2',4-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkonu, Nr rej. UP RP: P-385440.
5. Huszcza E., Bartmańska A., Tronina T., Sposób wytwarzania 4'-*O*- β -D-4'''-metoksy-glukozylo-2',4-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkonu, Nr rej. UP RP: P-385441.

W rozdziałach 2.3.3, 2.3.5 i 2.3.6 rozprawy habilitacyjnej zamieszczono również niepublikowane wyniki badań, prowadzonych w ramach grantu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, grant N312279634 „Otrzymywanie pochodnych flawonoidów izolowanych z wychmielin, będących potencjalnymi prozdrowotnymi dodatkami do żywności, oraz detoksykacja wychmielin”. Wyniki badań opisane w rozdziale 2.2 były finansowane przez Komitet Badań Naukowych, grant nr 3 PO9B 028 27, „Chemiczne i mikrobiologiczne metody detoksykacji poekstrakcyjnego odpadu chmielowego pod kątem wymogów paszowych”.

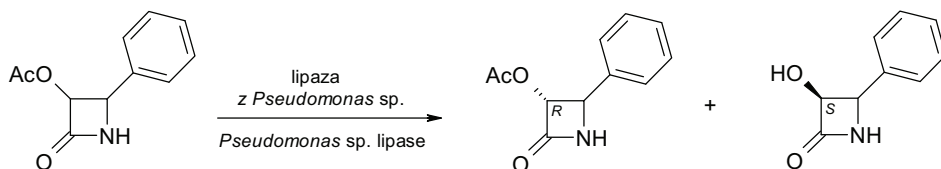
1. WSTĘP

Biotransformacje to katalizowane przez enzymy przekształcenia związków dla nich obcych (ksenobiotyków). Zawężenie substratów do związków nieswoistych odróżnia biotransformację od biosyntezy, która odnosi się do zdolności syntetycznej układów biologicznych w ich środowisku naturalnym. Chociaż rola enzymów w naturze polega na regulacji szlaków metabolicznych, to wyniki badań prowadzonych przez ostatnie trzydzieści lat wykazały, że specyficzność substratowa wielu z nich jest mniejsza niż początkowo sądzono i akceptują one substraty nawet dość znacznie różniące się pod względem struktury. Na przykład syntaza arbutynowa z rauwolfii żmijowej (*Rauwolfia serpentina*) przekształca 35 fenolowych związków o zróżnicowanej budowie, wśród nich: fenole, pochodne kumaryny, antrachinonu, chinolinonu i flawonoidy [73].

Wyróżnia się dwie podstawowe strategie prowadzenia biotransformacji: stosowanie czystych lub częściowo oczyszczonych enzymów, albo całych komórek. Każda z tych metod ma swoje wady i zalety. Enzymy można obecnie kupować tak jak zwykłe odczynniki chemiczne lub też wyizolować je w stosunkowo prosty sposób. Dotychczas wykorzystywane były przede wszystkim w laboratoriach biochemicznych, a obecnie coraz częściej stosowane są również przez chemików organicznych.

Biokatalizatory są zbudowane z L-aminokwasów i dzięki temu posiadają zdolność do wytwarzania optycznie czynnych produktów z prochiralnych lub racemicznych substratów. Od katalizatorów chemicznych odróżnia je wysoka specyficzność nie tylko w odniesieniu do reakcji, którą katalizują, ale też budowy akceptowanych substratów i tworzonych produktów.

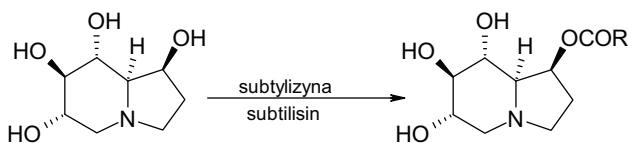
Katalityczna aktywność enzymów ogranicza się zazwyczaj do jednego typu reakcji, dającej jeden produkt, natomiast powstawanie produktów ubocznych przypisuje się działaniu innych enzymów. Z trójwymiarowej i asymetrycznej budowy miejsc aktywnych enzymów wynika **stereoselektywność**, w tym **enancjoselektywność**, katalizowanych reakcji. Można więc otrzymywać tylko jeden stereoizomer (enancjomer) lub mieszaninę z przewagą jednego z nich. „Asymetryczny rozpuszczalnik”, jakim jest dla substratu kieszeń enzymu, sprawia, że na drodze biotransformacji daje się rozdzielać mieszaniny stereoizomerów (**stereospecyficzność**), w tym mieszaniny racemiczne (**enancjospecyficzność**). Na przykład enzymatyczny rozdział racemicznego octanu cis-3-(acetyloksy)-4-fenyl-2-azetydynonu do odpowiedniego (3*S*)-alkoholu i nieprzereagowanego (3*R*)-octanu (rys. 1), będącego prekursorem leku antynowotworowego o nazwie Taxol, prowadzony jest z użyciem lipazy z *Pseudomonas* sp. SC 13856. Wydajność tej reakcji wynosi ponad 48% (teoretyczne maksimum równe jest 50%), a nadmiar enancjomeryczny otrzymanego (3*R*)-octanu przekracza 99,5% [145].



Rys. 1. Enancjospetyficzna hydroliza octanu cis-3-(acetyloksy)-4-fenyl-2-azetydynonu

Fig. 1. Enantiospecific hydrolysis of cis-3-(acethyloxy)-4-phenyl-2-azetidinone

Biokatalizatory przeważnie rozróżniają pozycje tych samych bądź podobnych grup w cząsteczce substratu i przekształcają tylko jedną z nich (**regioselektywność**, **diastereoselektywność**). Wysoką regioselektywność wykazuje subtylizyna wykorzystywana do acylacji kastanosperminy (rys. 2). Estryfikacji ulega tylko jedna z czterech drugorzędowych grup hydroksylowych o podobnej reaktywności, wydajność reakcji wynosi 91%, a powstająca pochodna dwudziestokrotnie silniej hamuje replikację wirusa HIV [122, 183].

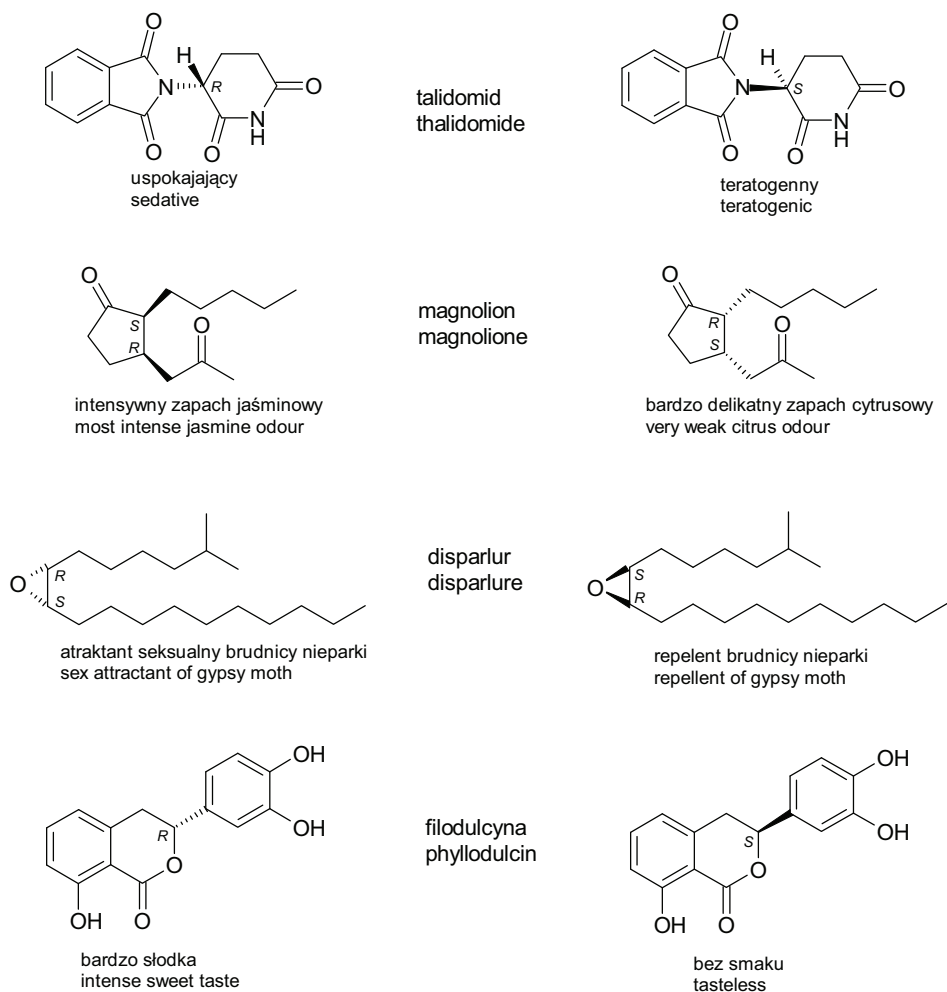


Rys. 2. Regioselektywna acylacja kastanosperminy

Fig. 2. Regioselective acylation of castanospermine

Otrzymywanie czystych optycznie związków ma szczególne znaczenie w przemyśle farmaceutycznym i agrochemicznym. Na zróżnicowane właściwości biologiczne enancjomerów można podać wiele przykładów. Jednym z nich, najbardziej spektakularnym i jednocześnie tragicznym w skutkach, było zastosowanie w latach sześćdziesiątych leku o nazwie Thalidomide, którego składnik (*R*)-talidomid posiada właściwości uspokajające, natomiast (*S*)-talidomid teratogenne. Ofiarami medykamentu padło wtedy ok. 12 000 dzieci, które urodziły się z wadami genetycznymi, a także – w sposób pośredni – ich rodziny. Kilka wybranych przykładów różnic we właściwościach biologicznych enancjomerów pokazano na rysunku 3.

Enzymy przyspieszają reakcje co najmniej milionkrotnie, przeważnie ze współczynnikiem 10^8 – 10^{10} , w łagodnych warunkach, jakie panują w komórkach wytwarzających je organizmów, tj.: w środowisku wodnym, w temp. poniżej 40°C, w pH bliskim neutralnemu i przy ciśnieniu normalnym. Dlatego sam proces biotransformacji bywa zwykle mało kosztowny. Należy jednak zaznaczyć, że istnieją również pewne typowe niedogodności związane z wysokimi kosztami izolowania i oczyszczania produktów, niskim stężeniem stosowanych substratów, a więc i powstałych produktów, oraz – w przypadku enzymów różnych od hydrolaz – dodatkiem i regeneracją koenzymów.



Rys. 3. Biologiczna aktywność enancjomerów [110, 172, 173, 206]

Fig. 3. Biological effect of enantiomers [110, 172, 173, 206]

Jednym ze sposobów obniżenia kosztów biotransformacji jest zastosowanie komórek roślin, zwierząt i drobnoustrojów. Najszersze zastosowanie znalazły transformacje mikrobiologiczne ze względu na niezwykłą różnorodność wytwarzanych przez drobnoustroje enzymów i dogodność prowadzenia procesu, w tym rozwiązanie problemu regeneracji koenzymów. Komórki drobnoustrojów z powodu małych rozmiarów

w porównaniu do roślinnych i zwierzęcych są zdolne do relatywnie szybkiego wzrostu. Jest to wynikiem dużego stosunku powierzchni do objętości małych komórek, który daje możliwość intensywniejszego pobierania składników odżywczych z otoczenia. Najczęściej stosowaną metodą jest transformacja we wstrząsanych kulturach wgłębnych w warunkach namnażania lub rzadziej – w hodowlach otrzymanych poprzez zawieszenie biomasy w odpowiednim buforze. Badania rozpoczyna się zwykle od selekcji drobnoustrojów przekształcających substrat w pożądaną pochodną lub pochodne, z jak najwyższą wydajnością i stereoselektywnością. Wprawdzie przy ich doborze można kierować się pewnymi ogólnymi zasadami, np. użytecznością drożdży do reakcji redukcji lub z reguły większą przydatnością grzybów strzępkowych do hydroksylacji, to w większości przypadków nie daje się uniknąć badań selekcyjnych dla każdego z przeznaczonych do transformacji związków. W uzasadnionych przypadkach drobnoustroje poddaje się immobilizacji, a także udoskonala ich cechy poprzez mutagenезę. Niebagatelne znaczenie dla wydajności biotransformacji ma oprócz samego biokatalizatora optymalizacja jej warunków, tj. dobór odpowiedniej temperatury, natlenienia, pH, źródła substancji odżywczych, zastosowanie związków powierzchniowo czynnych, rozpuszczalników organicznych, induktorów, inhibitorów enzymów i innych. Chociaż mnogość możliwych reakcji katalizowanych przez zestaw enzymów jednego drobnoustroju i wymienionych wyżej czynników wpływających na przebieg reakcji są dla niektórych chemików zniechęcające, to nie da się zaprzeczyć, że biotransformacje stanowiące swoisty pomost pomiędzy chemią i biochemią mają kluczowe znaczenie m.in. w produkcji żywności, witamin, chiralnych leków i związków chemicznych o specjalnych cechach, niedostępnych lub trudno dostępnych na drodze klasycznej syntezy. Zastosowanie biokatalizatorów umożliwia prowadzenie wysoce selektywnych transformacji na najwyższym osiąganym obecnie poziomie syntezy organicznej. W minionych dwóch dekadach metoda ta stała się jednym z niezbędnych narzędzi syntezy asymetrycznej, nie tylko w sferze rozważań naukowych, ale też w skali przemysłowej.

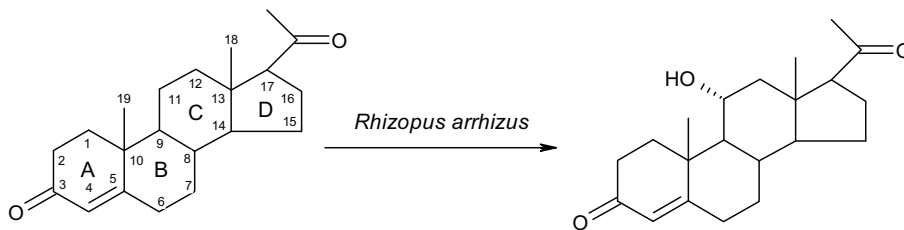
Odrębnym aspektem mikrobiologicznych transformacji jest ich przydatność w śledzeniu przemian substratów w drobnoustrojach i odnoszenie ich do metabolizmu ssaków. Zaproponowana przez Smitha i Rosazzę w 1974 r. koncepcja zastosowania mikroorganizmów jako modeli metabolizmu ssaków (microbial models of mammalian metabolism) wciąż znajduje potwierdzenie w badaniach [1, 5, 33, 39, 171, 200]. Na drodze mikrobiologicznych transformacji leków i innych ksenobiotyków uzyskuje się znaczne ilości znanych lub nowych metabolitów, mogących służyć jako substancje wzorcowe metabolitów ssaków, w ilościowych i jakościowych badaniach farmakologicznych czy toksykologicznych.

1.1. Mikrobiologiczne transformacje steroidów

Transformacje steroidów przez drobnoustroje były przedmiotem licznych badań, których wyniki znalazły zastosowanie w biotechnologii. Poświęcono temu zagadnieniu szereg prac przeglądowych i monografii [30, 50, 82, 119, 120, 162].

Począwszy od 1952 roku, kiedy to Murray i Peterson z Upjohn Company [136] opatentowali otrzymywanie 11 α -hydroksyprogesteronu dzięki mikrobiologicznej hydro-

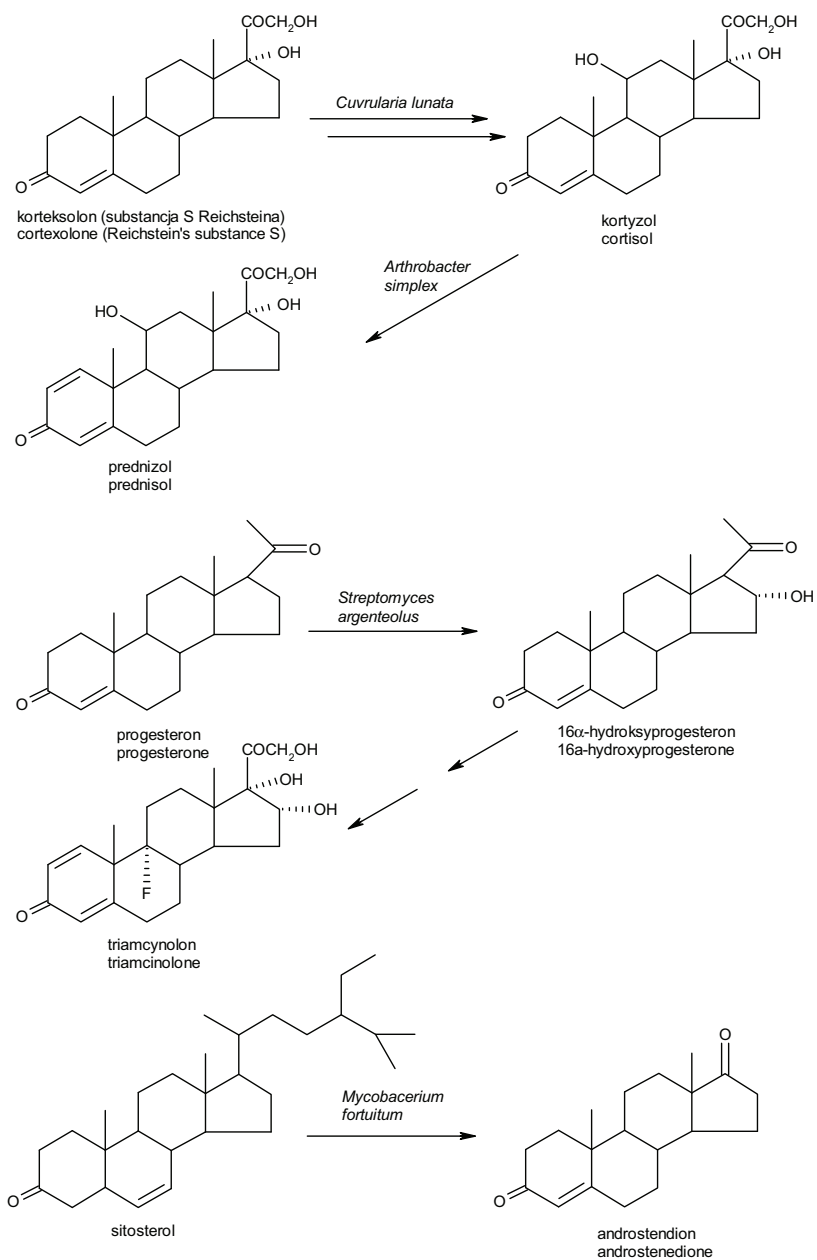
ksylacji progesteronu z użyciem grzybów *Rhizopus arrhizus* (rys. 4), obniżając w ten sposób koszt tego leku z 200 do 6 \$ za 1 g, zastosowanie biotransformacji do otrzymywania leków i hormonów steroidowych bardzo się upowszechniło.



Rys. 4. Transformacja progesteronu przez *Rhizopus arrhizus*

Fig. 4. Transformation of progesterone by *Rhizopus arrhizus*

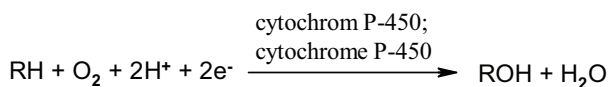
Steroidy są szeroko stosowane jako środki antykoncepcyjne, leki przeciwzapalne, moczopędne, antyandrogenne, progestagenne, immunosupresyjne, przeciwnowotworowe, anaboliczne i inne [108, 187, 205]. Największe znaczenie mają reakcje hydroksylacji, dehydrogenacji, a także selektywnej degradacji łańcucha bocznego steroli. Mikrobiologiczna hydroksylacja steroidów, będąca drogą detoksykacji i jednocześnie oksydatywnej degradacji ksenobiotyków, jest najczęściej opisywaną biotransformacją steroidów. Niemal każdy atom węgla szkieletu steroidowego można hydroksylować regio- i stereoselektywnie, stosując odpowiednie drobnoustroje. Katalityczne zdolności enzymów pozwalają przy tym na funkcjonalizację nieaktywowanych atomów węgla szkieletu steroidowego, co jest trudne do osiągnięcia metodami chemicznymi. Wprowadzenie atomu tlenu w pozycji 11 ma kluczowe znaczenie dla aktywności przeciwzapalnej [162], natomiast steroidy hydroksylowane w pozycji 16 α posiadają większą aktywność glukokortykoidową [53]. Reakcje hydroksylacji w pozycjach 7 α i 14 α prowadzą do leków antynowotworowych i moczopędnych [119]. Kilka przykładów zastosowania drobnoustrojów do otrzymywania leków steroidowych w skali przemysłowej zamieszczono na rysunku 5.



Rys. 5. Przykłady hydroksylacji steroidów o znaczeniu przemysłowym
 Fig. 5. Examples of industrial steroids hydroxylations

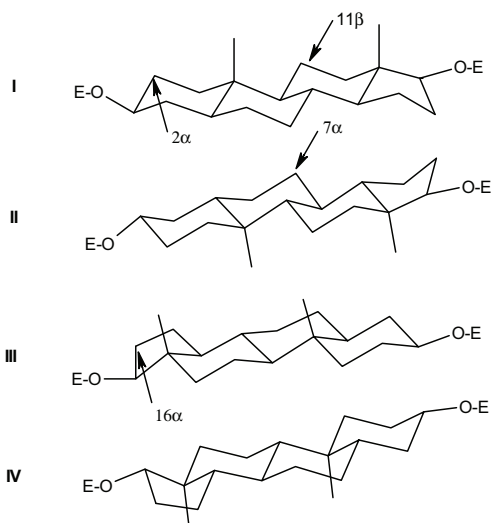
Curvularia lunata hydroksyluje korteksolon w pozycji 11 β , dając kortyzol [124]. Tworzenie wiązania podwójnego C₁-C₂, wzmagające działanie terapeutyczne kortyzonu i kortyzolu, zachodzi z udziałem *Arthrobacter simplex*, *Bacillus sphaericus* i *Bacterium cyclooxydans*. Otrzymuje się w ten sposób odpowiednio: prednizon i prednizolon [140]. *Streptomyces argenteolus* utlenia progesteron do 16 α -hydroksyprogesteronu, będącego prekursorem Triamcynolonu (16 α -hydroksy-9 α -fluoroprednizolonu), jednego z najsukuczniejszych steroidowych leków przeciwzapalnych [162]. Innym ważnym przemysłowo procesem jest degradacja sitosterolu do androstendionu, katalizowana przez *Mycobacterium fortuitum* [81]. Sitosterol izolowany z materiału roślinnego jest materiałem wyjściowym do produkcji wielu leków steroidowych.

Za proces hydroksylacji steroidów oraz innych hydrofobowych ksenobiotyków przez drobnoustroje odpowiadają monoooksygenazy cytochromu P-450, szeroko rozpowszechnione również w świecie zwierząt i roślin. Są ostatnim ogniwem łańcucha transportu elektronów. Katalizują wprowadzenie jednego z dwóch atomów tlenu cząsteczkowego do substratu z jednoczesną redukcją drugiego atomu w cząsteczce wody. Reakcję można podsumować następująco:



Każdy cytochrom P-450 (CYP) zawiera hem jako grupę prostetyczną, do której koordynacyjnie wiązany jest tlen cząsteczkowy, przez co ulega aktywacji. Redukujące równoważniki pochodzą z NAD(P)H. Cytochromy mitochondrialne nie pobierają elektronów bezpośrednio z NADPH i wymagają pośrednictwa dwóch dodatkowych białek: reduktazy zawierającej FAD i FMN, odbierającej elektrony z NADPH i białka posiadającego centrum żelazowo-siarkowe, zwanego ferredoksyną, pośredniczącego w transporcie pomiędzy reduktazą a związanym z błoną CYP. Monoooksygenazy związane z retikulum endoplazmatycznym wymagają jedynie flawoproteinowej reduktazy NADPH cytochromu P-450 [147]. Cytochromy P-450 są niestabilnymi, związanymi z błonami enzymami, które trudno jest izolować bez utraty aktywności. Po solubilizacji z mikrosomalnej błony łatwo przechodzą w nieaktywną formę P-420. W literaturze można znaleźć informacje o izolowaniu i oczyszczaniu tych białek oraz o klonowaniu kodujących je genów z wielu organizmów [188]. Jak dotąd opisano stosunkowo niewiele mikrobiologicznych hydrolaz steroidowych, np.: 7 α -hydroksylazę z *Phycomyces blakesleeanus* [2], 11 α -hydroksylazę z *Aspergillus ochraceus* [156], *Aspergillus fumigatus* [170], *Rhizopus nigricans* [22], 14 α -hydroksylazę z *Mucor piriformis* [117], 15 α -hydroksylazę z *Penicillium raistrickii* [97], 16 α -hydroksylazę ze *Streptomyces roseochromogenes* [14], 6 β -hydroksylazę z *Bacillus thermoglucosidasius* [166], 7 β -hydroksylazę z *Botryosphaeria obtusa* [169], 11 β -hydroksylazę z *Cochliobolus lunatus* [100] i 15 β -hydroksylazę z *Bacillus megaterium* [13]. Badania nad oddziaływaniami hydroksylaza – steroid prowadzono na niewielu przykładach, ze względu na wspomniane wyżej problemy z izolowaniem i zachowaniem aktywności enzymu. Ustalono, że tylko dla nielicznych drobnoustrojów można przewidzieć pozycję substratu, w której nastąpi hydroksylacja, np. dla *Aspergillus ochraceus* i *Beauveria bassiana* (zwanego wcześniej *Sporotrichum sulphurescens* i *Beauveria*

sulphurescens), tworzących przede wszystkim 11α -hydroksypochodne [11, 65, 163]. Często obserwuje się hydroksylacje konkretnego związku w kilku pozycjach, prowadzone przez ten sam mikroorganizm. Na podstawie badań z użyciem *Aspergillus tamaris* i różnych androgenów Brannon i wsp. zaobserwowali, że substrat może wiązać się z enzymem poprzez funkcje tlenowe pierścieni A (C-3) i D (C-17) w czterech różnych orientacjach, co sprawia, że pewne pozycje w cząsteczce steroidu stają się ekwiwalentne [20] (rys. 6).



Rys. 6. Możliwe ułożenia steroidu w kieszeni enzymatycznej cytochromu P-450, wynikające z dwupunktowego wiązania

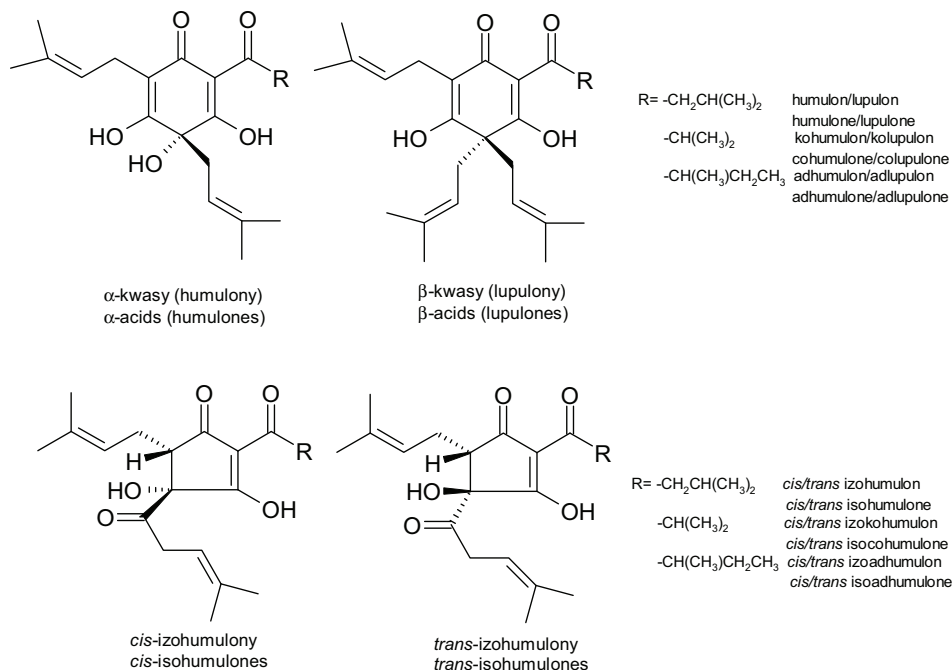
Fig. 6. Possible orientation of steroid in the enzyme pocket of cytochrome P-450 as a result of two-side binding

Zjawisko to potwierdzono później, stosując metodę ukierunkowanej mutagenyzy [99]. Przykładowo, za ekwiwalentne uważa się pozycje 11β i 7α , jeśli cząsteczkę steroidu obróci się z pozycji oznaczonej jako I, do II, a także pozycje 2α i 16α , jeśli cząsteczkę steroidu obróci się z pozycji oznaczonej jako I, do III. *Rhizopus nigricans*, *R. arrhizus* i *Aspergillus ochraceus* wykazują zdolność do hydroksylowania pozycji 11β i 7α [16, 30, 101], a cytochrom P-450 2C11 z wątroby szczura – w pozycjach 2α i 16α [158].

Chociaż mikrobiologiczne transformacje steroidów mają już długą, udokumentowaną licznymi artykułami naukowymi historię, nadal są efektywną metodą otrzymywania nowych, coraz aktywniejszych pochodnych oraz narzędziem do śledzenia metabolizmu leków steroidowych w organizmach ssaków. Na przestrzeni dwóch lat, 2006 i 2007, w samym czasopiśmie „Steroids” pojawiło się 12 doniesień tego typu.

1.2. Biologicznie aktywne związki wytwarzane przez chmiel

Jak dotąd zidentyfikowano ponad 1000 związków chemicznych obecnych w chmielu [48]. Tak zwane **gorzkie kwasy** stanowią od ok. 5 do 25% suchej masy dojrziałych szyszek chmielowych [137, 192]. Dzieli się je na α -kwasy, inaczej humulony oraz β -kwasy, zwane lupulonami, które są odpowiednio di- lub triprenyłowymi pochodnymi floroglucynolu (rys. 7).



Rys. 7. Główne gorzkie kwasy chmielowe

Fig. 7. The main hop bitter acids

Naturalne humulony są izomerami *R*. W stanie czystym występują jako opalizujące żółtawe ciała stałe, są słabymi kwasami, bardzo słabo rozpuszczają się w wodzie i prawie wcale nie są gorzkie. Cechuje je wysoka aktywność bakteriostatyczna, będąca wynikiem ingerencji charakterystycznych dla tych związków grup prenylowych w funkcjonowanie błony cytoplazmatycznej drobnoustrojów. Z tego względu β -kwasy posiadające więcej grup prenylowych niż α -kwasy są silniejszymi bakteriostatykami. Połączenie takich właściwości z przeciwutleniającymi sprawia, że związki te mogą w przyszłości znaleźć wiele zastosowań, przede wszystkim w przemyśle spożywczym, poza browarnictwem, w którym β -kwasy uważa się za składnik niepożądany, gdyż są bardzo podatne na utlenienie, a większość produktów ich psucia posiada nieprzyjemny smak i zapach.

Największe zainteresowanie wykazuje przemysł cukrowniczy, w którym lupulony wykorzystuje się do obniżania aktywności bakterii w trakcie ekstrakcji buraków cukrowych, zamiast używanej dotąd formaliny [12].

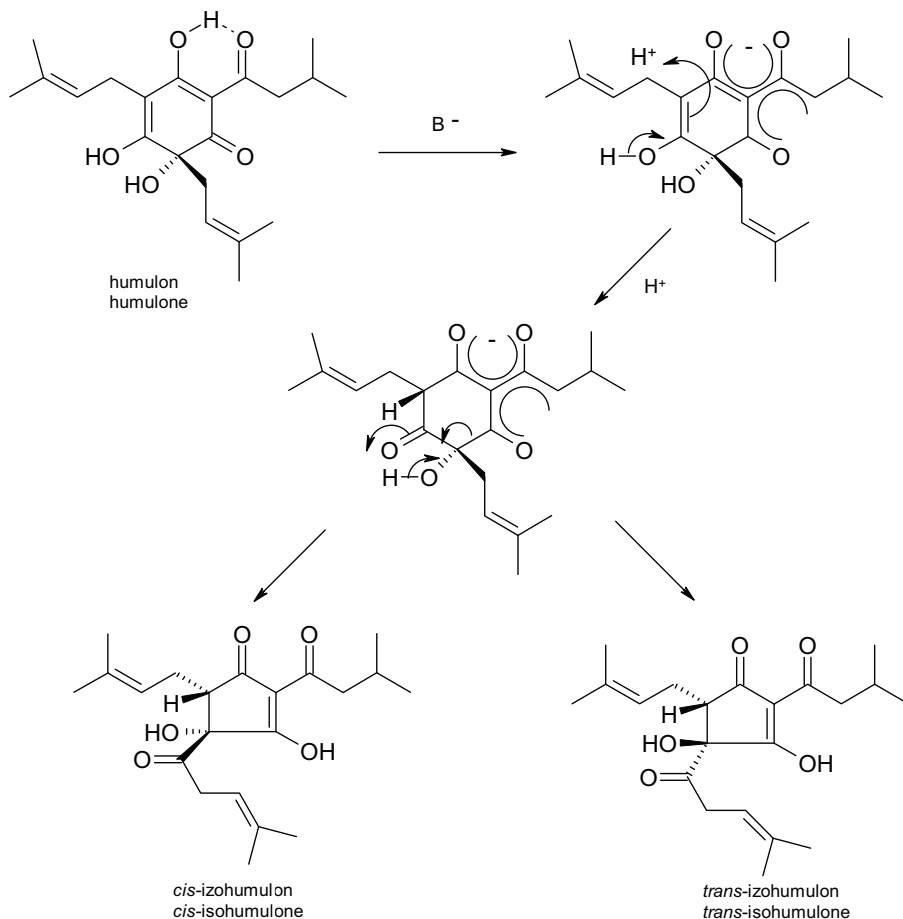
Chmielowe α -kwasu izomeryzują w trakcie warzenia do izo- α -kwasów, bezpośrednio odpowiedzialnych za sensoryczne właściwości piwa (rys. 8). Ich gorycz jest porównywalna do chininy, związku wzorcowego w porównywaniu gorzkiego smaku. W tym samym czasie β -kwasu ulegają rozkładowi i nie pojawiają się w produkcie finalnym [79]. Handlowo dostępny „preizomeryzowany ekstrakt chmielowy”, używany w browarnictwie do zwiększenia stężenia gorzkich izo- α -kwasów w piwie, otrzymuje się najczęściej w pH zasadowym. Ostatecznie izo- α -kwasu stanowią do 80% wszystkich składników pochodzenia chmielowego w piwie. Oprócz nadawania piwu charakterystycznego zapachu i goryczy przyczyniają się do ochrony przed zakażeniami bakteryjnymi i stabilizowania piany. Reakcję izomeryzacji α -kwasów do izo- α -kwasów można też prowadzić metodą naświetlania światłem ultrafioletowym o długości fali 365 lub 254 nm [43]. Coraz częściej obok ekstraktu chmielowego stosuje się „zredukowany preizomeryzowany ekstrakt chmielowy”, zawierający dihydroizo- α -kwasu i tetrahydroizo- α -kwasu, które sprawiają, że piwo jest bardziej odporne na działanie światła i ma stabilniejszą pianę [42].

Ekstrakt chmielowy znajduje zastosowanie w farmaceutykach o działaniu usypiającym i uspokajającym [159], hamującym resorpcję kości [185], w których α -kwasu odgrywają główną rolę. Liczne badania wykazały jego aktywność przeciwbakteryjną i przeciwrzybiczną [114, 132, 155, 167], przeciwutleniającą [179], przeciwpalną [201], przeciwwirusową [25] i przeciwnowotworową [164].

Olejki eteryczne z chmielu zawierają wiele składników, z których do dziś zidentyfikowano około 300 [48]. W procesie produkcji piwa większość z nich ulatnia się podczas gotowania brzezki. W suchych szyszkach chmielu znajduje się od 0,5 do 2% olejków eterycznych, przy czym od 57 do 82% stanowią myrcen, β -kariofilen i humulen. Szczegółowa analiza składu olejku eterycznego może być podstawą do określenia odmiany chmielu, z której został on otrzymany [111]. Ostatnie badania wykazały, że drożdże browarnicze wykazują zdolność do transformacji terpenoidów obecnych w olejku chmielowym [105]. Chmielowy olejek eteryczny ma zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym, kosmetycznym, tytoniowym i spożywczym [116].

Duże zainteresowanie budzą ostatnio izolowane z chmielu **flawonoidy**. Są one wydzielane wraz z kwasami gorzkimi i olejkami eterycznymi przez gruczoły lupulinowe, a wyizolowano ich dotąd około 30 [129, 131, 174, 176–178, 210].

Flawonoidy występują szeroko w świecie roślinnym, w owocach, warzywach i produktach otrzymywanych z roślin, takich jak: herbata i wino oraz w dodatkach do żywności i lekach ziołowych. Obok powszechnie znanych właściwości przeciwutleniających, przeciwrakowych [133] wykazują też aktywność antygrzybiczną, antybakteryjną i antywirusową [37].



Rys. 8. Mechanizm izomeryzacji humulon [44]

Fig. 8. Mechanism of the isomerization of humulone [44]

Grupy prenylowe obecne w wielu cząsteczkach flawonoidów, charakterystyczne dla produktów metabolizmu chmielu, wzmacniają ich działanie przeciwutleniające [9], co stwierdzono w różnych układach utleniających lipidy *in vitro*, np. we frakcji mikrosomalnej wątroby szczura [153].

Flawonoidem występującym w chmielu w największej ilości jest ksantohumol. Stanowi od 0,1 do 1% suchej masy szyszek. Izolowało go wiele grup badawczych, które stwierdziły, że w stężeniu od 10- do 100-krotnie mniejszym towarzyszą mu między innymi: izoksantohumol, 5'-prenyloksantohumol, dezmetylksantohumol, ksantogalenol, 8-prenylonaringenina i 6-prenylonaringenina [174, 175] (rys. 9). Ponieważ poekstrak-

cyjny odpad chmielowy stanowi bardzo dogodne źródło ksantohumolu, nie obserwuje się większego zainteresowania jego chemiczną syntezą. Znalaziono dwie prace dotyczące totalnej syntezy ksantohumolu [103, 194].

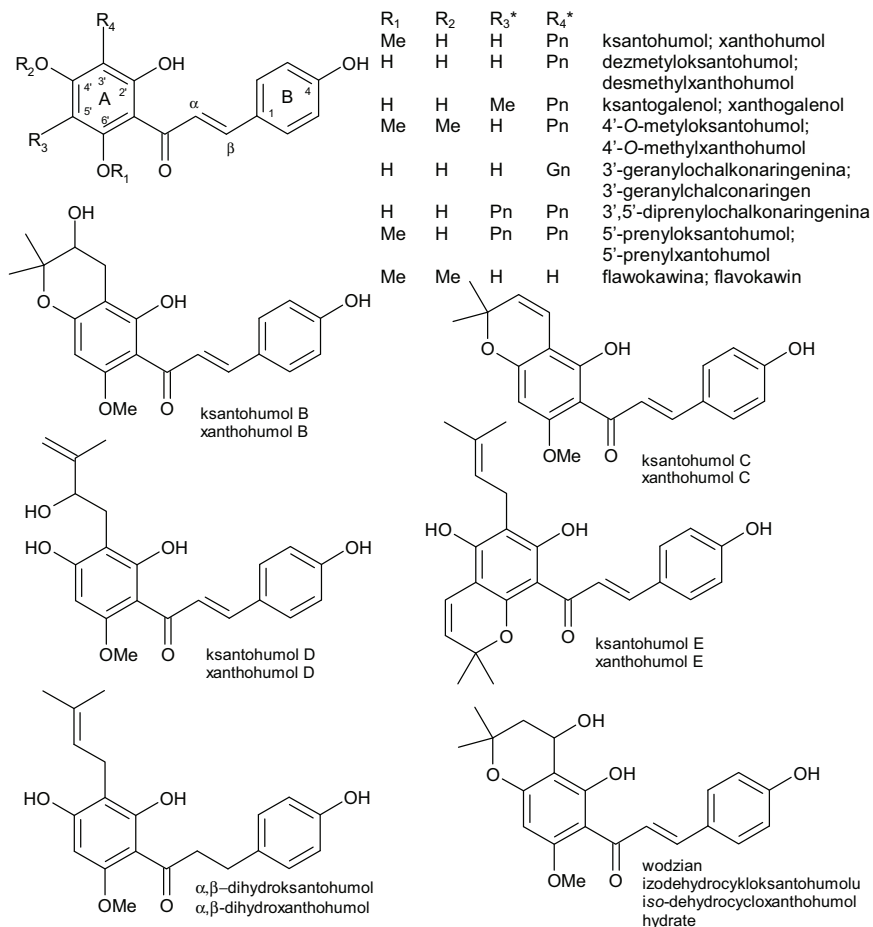
Ze względu na pozytywne działanie ksantohumolu na organizm ludzki coraz powszechniejsze staje się wzbogacanie piwa i innych napojów w ten związek, poprzez dodawanie specjalnych ekstraktów dostępnych handlowo [8, 54]. Jednocześnie prowadzone są badania zmierzające do zwiększenia zawartości tego flawonoidu w ekstrakcie chmielowym, a także w samych szyszkach chmielowych, poprzez selekcję i genetyczną modyfikację chmielu [123, 143]. Opatentowano również użycie ksantohumolu jako leku na osteoporozę [184], pojawiają się też doniesienia o możliwości stosowania go jako nowego terapeutyku w zakażeniach HIV-1 [197], leku na raka piersi [66], prostaty [35] i inne rodzaje nowotworów [45, 60, 63, 130], leku antywirusowego [25] i przeciwzapalnego [32].

8-Prenylnaringenina, rzadziej zwana hopeiną, to najsilniejszy poznany dotąd fitoestrogen, działający jak 17- β -estradiol [29]. Z tego względu podejmowane są próby stosowania 8-prenylnaringeniny przy dolegliwościach związanych z menopauzą, w tym także osteoporozą [29] oraz w celu powiększania piersi [55, 62]. Leki stosowane dotąd w hormonalnej terapii zastępczej, oparte na mieszaninie estrogenów izolowanych z moczu końskiego (np. Premarin), wykazują efekty uboczne, m.in. w postaci zwiększonego ryzyka zapadania na rozmaite choroby nowotworowe [207]. Dlatego opracowuje się alternatywne terapie estrogenowe, w których 8-prenylnaringenina budzi uzasadnione nadzieje na zastosowanie. Poza chmielem, w którym występuje jako mieszanina racemiczna, izolowano ją także z tajlandzkiego drzewa *Anaxagorea luzonensis*, perełkowca (*Sophora flavescens*) i innych roślin z rodziny *Compositae* [17, 107]. Nieustannie trwają poszukiwania nowych, wydajnych metod chemicznej syntezy tego związku [61, 198].

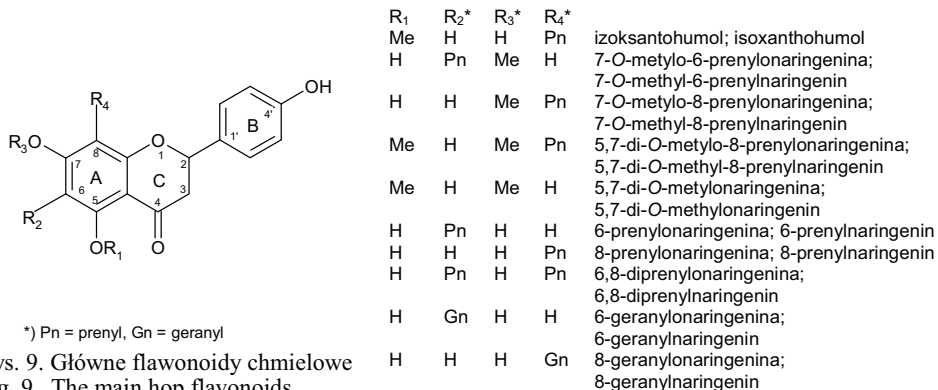
Izoksantohumol występuje w ekstrakcie chmielowym w 10-krotnie większej ilości niż 8-prenylnaringenina [62] i dodatkowo powstaje z ksantohumolu w procesie wytwarzania piwa. Wykazuje aktywność cytotoksyczną i antyproliferacyjną wobec komórek raka płuc [130], lecz nie posiada właściwości estrogennych. Ze względu na jego obecność w piwie – sporo uwagi poświęca się temu związkowi jako prekursorowi 8-prenylnaringeniny. Wiadomo, że enzymy wątrobowe i drobnoustroje przewodu pokarmowego człowieka zdolne są do demetylacji izoksantohumolu do 8-prenylnaringeniny [67, 139, 148, 149], opracowuje się też chemiczne metody demetylacji [198]. Izoksantohumol i demetyloksantohumol, który w wyniku prostej reakcji cyklizacji w środowisku zasadowym przekształca się w 8-prenylnaringeninę, nazywane są proestrogenami.

Biologicznej aktywności składników chmielu z uwzględnieniem najnowszych doniesień poświęcono ostatnio aż dwie prace przeglądowe [29, 204].

chalkony / chalcones



flawanony / flavanones

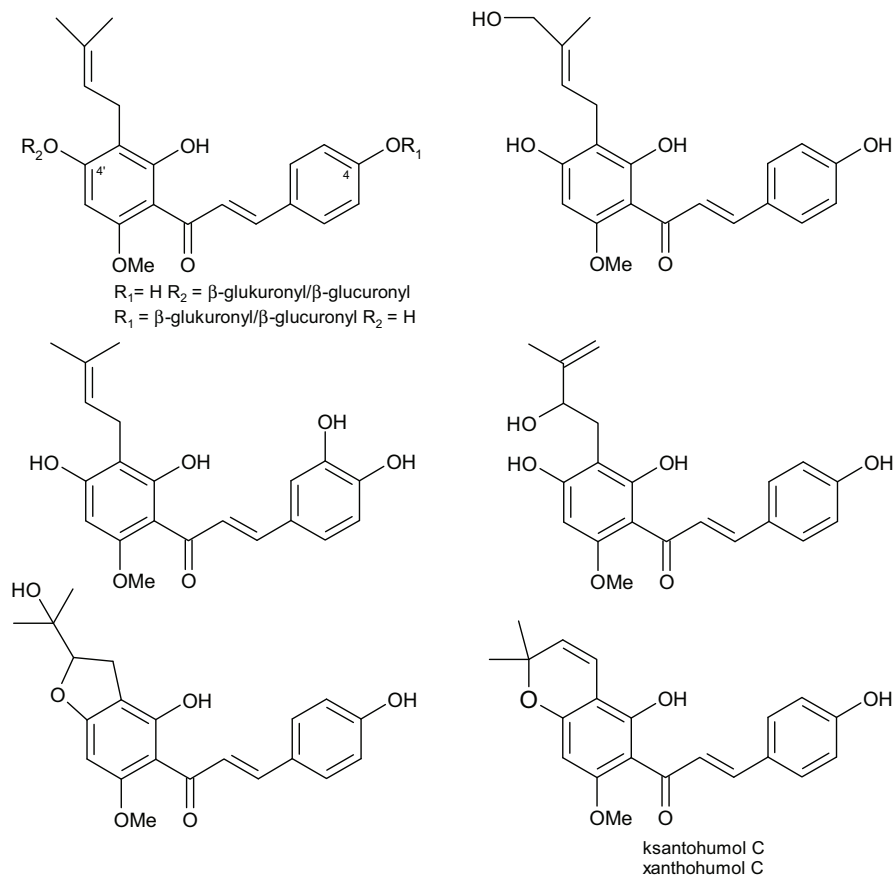


Rys. 9. Główne flawonoidy chmielowe
Fig. 9. The main hop flavonoids

1.3. Biotransformacje flawonoidów chmielowych

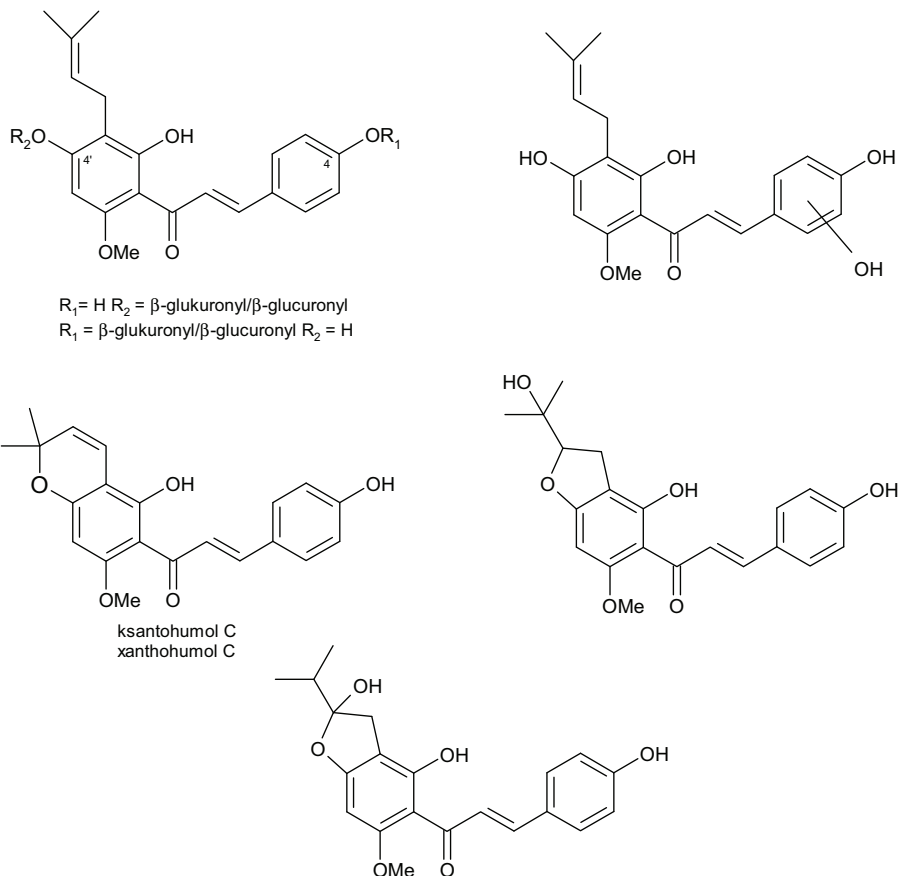
Do badania metabolizmu flawonoidów chmielowych w organizmie człowieka, przede wszystkim ksantohumolu i 8-prenylonaringeniny, zastosowano jako modele: szczury, frakcje mikrosomalne wątroby ludzkiej i szczurzej, ludzkie enzymy oraz drobnoustroje.

W procesie transformacji ksantohumolu przez mikrosomy wątroby ludzkiej i szczurzej następowała glukuronidacja w pozycjach C-4 i C-4' (rys. 10, 11), przy czym druga z wymienionych pozycji była uprzywilejowana ze względu na przestrzenną zawadę, którą stanowi grupa prenylowa w pierścieniu A [203].



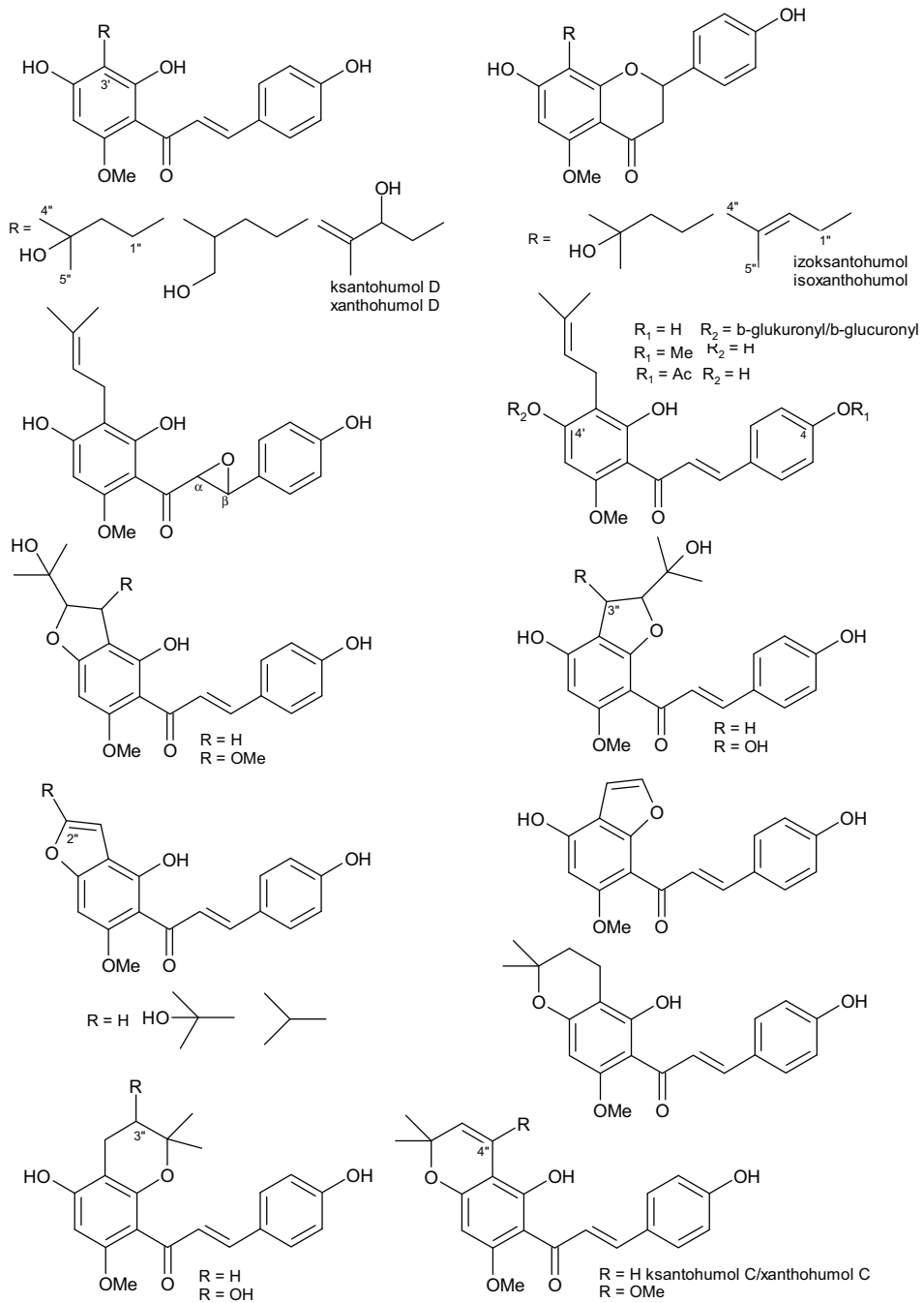
Rys. 10. Produkty transformacji ksantohumolu przez mikrosomy ludzkiej wątroby
Fig. 10. Human liver microsomes transformation products of xanthohumol

Enzymy mikrosomalnej frakcji wątroby ludzkiej hydroksylowały metylową grupę podstawnika prenylowego, dając tylko izomer *trans*, a także pozycję C-2''' łańcucha prenylowego [139]. Mikrosomy wątroby ludzkiej i szczurzej wytwarzały dodatkowo jeden produkt hydroksylacji w pierścieniu B oraz kilka produktów cyklizacji łańcucha prenylowego [139, 202].



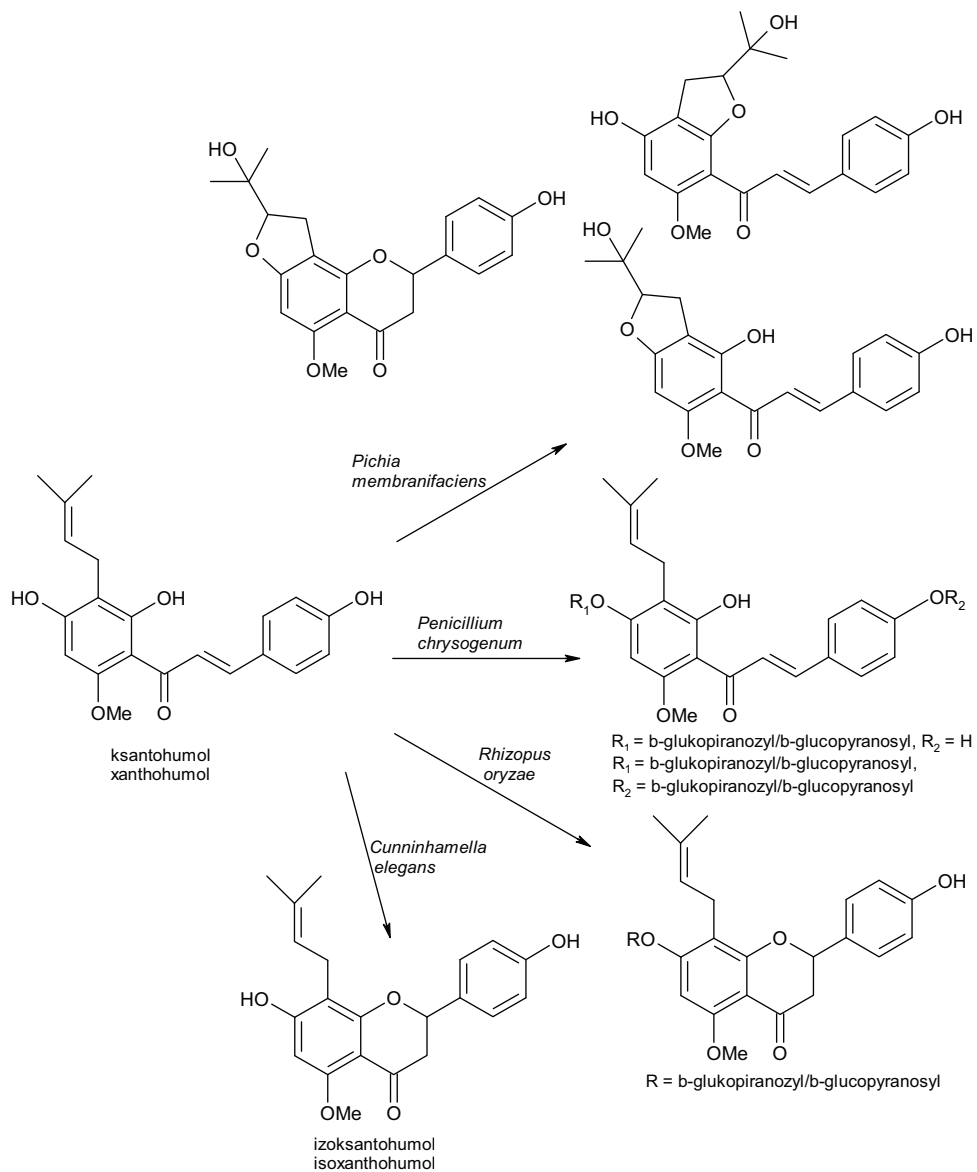
Rys. 11. Produkty transformacji ksantohumolu przez mikrosomy wątroby szczura
 Fig. 11. Rat liver microsomes transformation products of xanthohumol

Z odchodów szczurów karmionych ksantohumolem (1 g na 1 kg masy ciała) wyizolowano, oprócz ksantohumolu stanowiącego 89% ekstraktu, 11% metabolitów, wśród których oznaczono 16 związków pokazanych na rysunku 12. Były to produkty hydroksylacji, *O*-metylacji, *O*-acetylowania, epoksydacji i cyklizacji łańcucha prenylowego oraz glukuronidacji w pozycji C-4' [141]. Zastosowanie ludzkich glukuronozylotransferaz i sulfotransferaz do badania drugiej fazy metabolizmu ksantohumolu *in vitro* wykazało możliwość tworzenia różnych monoglukuronidów i monosiarczanów w przewodzie pokarmowym [154].



Rys. 12. Metabolity ksantohumolu obecne w odchodach szczura

Fig. 12. Xanthohumol metabolites in faeces of rats

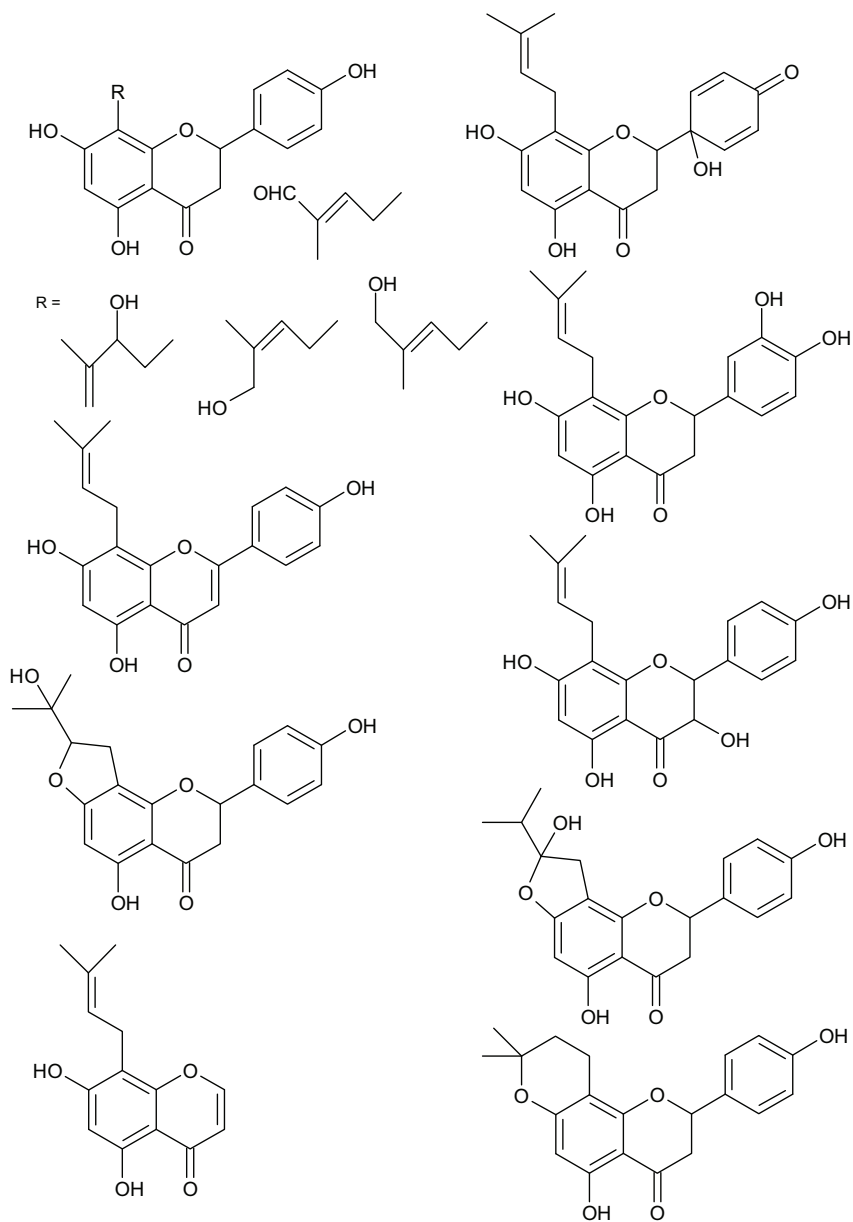


Rys. 13. Mikrobiologiczne transformacje ksantohumolu
 Fig. 13. Microbial transformation of xanthohumol

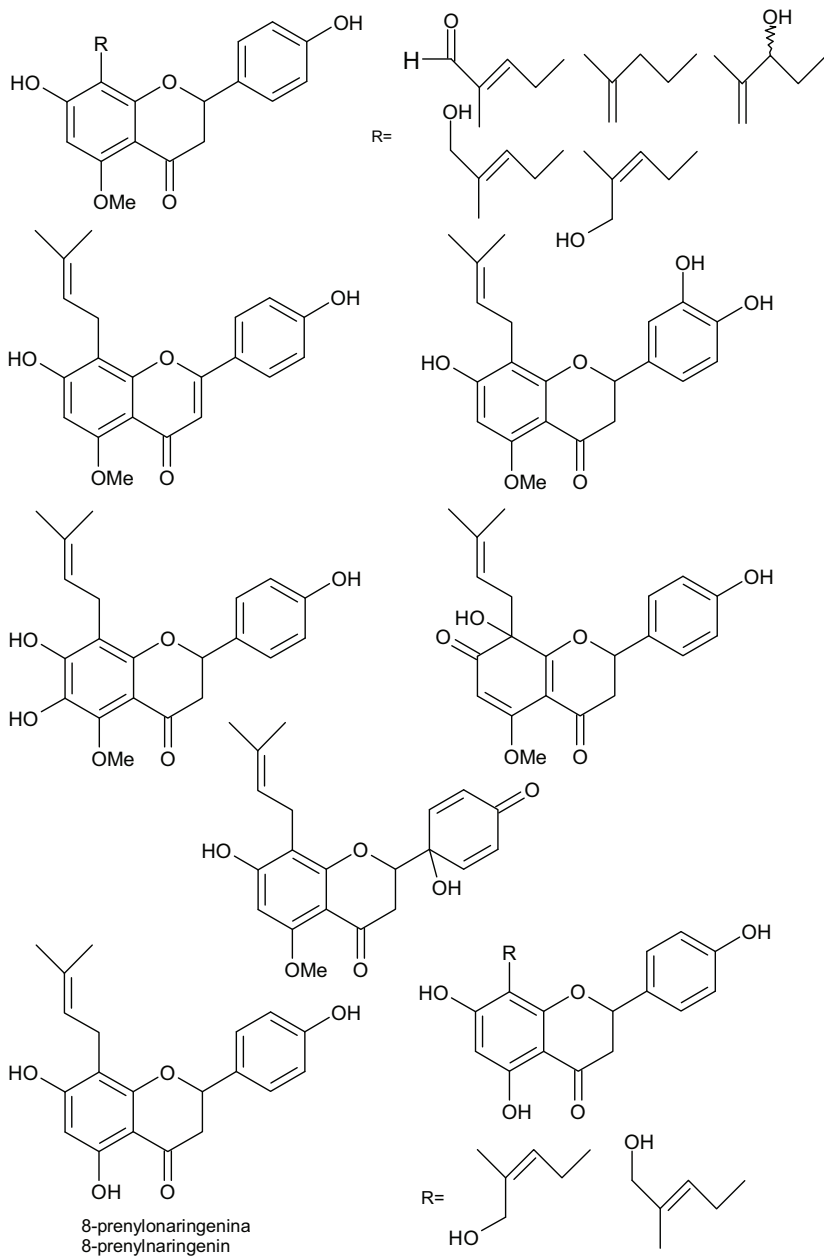
Mikrobiologicznej transformacji ksantohumolu poświęcono dotychczas jedynie cztery prace, z których jedna jest wynikiem badań autorki niniejszej rozprawy, przedstawionych w rozdziale 2.3 [76, 77, 92, 104]. W wyniku selekcji drobnoustrojów obejmujących sumarycznie 59 mikroorganizmów wyłoniono cztery grzyby, transformujące ksantohumol z wysoką wydajnością. Produktami biotransformacji z ich udziałem były chalconowe produkty cyklizacji grupy prenylowej, obecne również w odchodach szczurów karmionych ksantohumolem i glukozylacji w pozycjach C-4 i/lub C-4', a także flawanony: izoksantohumol, jego C-7 glukozyd oraz produkt cyklizacji jego grupy prenylowej (rys. 13).

8-Prenylonaringenina została intensywnie przetestowana pod kątem aktywności estrogennej, jednak jej metabolizmowi poświęcono niewiele prac. Nikolic i wsp. użyli mikrosomów ludzkiej wątroby i zaobserwowali 12 produktów metabolizmu 8-prenylonaringeniny (rys. 14) [138]. Biotransformacja zachodziła w łańcuchu prenylowym i szkieletcie flawanonu. Utlenianie miało miejsce głównie w terminalnej grupie metylowej, a w powstających produktach przeważał izomer *trans*. Dwa z powstałych związków: *trans*-8-(4''-hydroksyprenylo)naringenina i *trans*-8-(4''-oksprenylo)naringenina, wykazywały aktywność estrogeną *in vitro* [209]. Nie znaleziono doniesień literaturowych o metabolizmie 8-prenylonaringeniny przez drobnoustroje, za to inne chmielowe flawanony: 6-prenylonaringeninę i 6,8-diprenylonaringeninę zastosowano jako substraty do transformacji w hodowlach grzybów *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea* i *Ascochyta rabiei* [180]. Drobnoustroje nie transformowały drugiego z substratów, natomiast z 6-prenylonaringeniny powstawały: 3-hydroksy- i 2,3-di-hydrodihydroksyprenylo-podstawiona naringenina oraz dihydrofurano-podstawiona naringenina.

Transformacje izoksantohumolu prowadzono głównie w celu określenia dróg jego przekształceń w organizmie człowieka i potwierdzenia słusznych, jak się okazało, przypuszczeń, że może on być prekursorem 8-prenylonaringeniny. Enzymatyczne transformacje z udziałem ludzkich cytochromów P-450 dały produkt demetylacji, czyli 8-prenylonaringeninę oraz produkty hydroksylacji terminalnej grupy metylowej zarówno izoksantohumolu, jak i 8-prenylonaringeniny, przede wszystkim jej izomer *trans* (rys. 15) [67]. 8-Prenylonaringenina powstawała również podczas transformacji izoksantohumolu przez frakcję mikrosomalną wątroby ludzkiej [139]. Zdolność do demetylacji izoksantohumolu wykazywały drobnoustroje przewodu pokarmowego człowieka, w tym wyodrębnione bakterie *Eubacterium limosum* [148, 149].



Rys. 14. Produkty transformacji 8-prenylaringeniny przez mikrosomy wątroby ludzkiej
 Fig. 14. Human microsomes transformation products of 8-prenylaringenin



Rys. 15. Produkty transformacji izoksantohumolu przez ludzkie mikrosomy wątroby i cytochromy P-450

Fig. 15. Human liver microsomes and cytochromes P-450 transformation products of isoxanthohumol

1.4. Wychmieliny jako źródło substancji odżywczych i biologicznie aktywnych

Poekstrakcyjny odpad chmielowy, określane najczęściej jako wychmieliny, jest produktem odpadowym przemysłu browarniczego i stanowi bogate źródło cennych związków zarówno odżywczych, jak i wykazujących różnorodną aktywność biologiczną. Powstaje podczas ekstrakcji szyszek chmielowych, żeńskich kwiatostanów chmielu (*Humulus lupulus* L.), prowadzonej w celu uzyskania gorzkich kwasów oraz olejków eterycznych. Ekstrakt taki dodaje się do piwa, by nadać mu charakterystyczny zapach i gorzki smak.

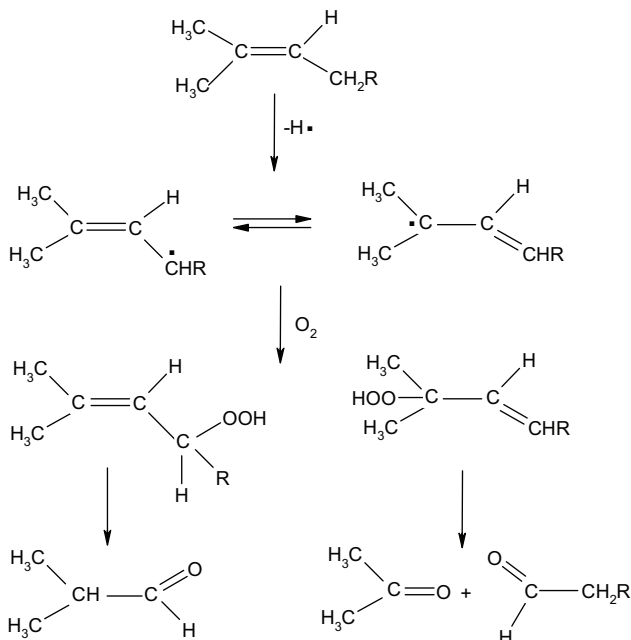
Wychmieliny nie znalazły dotąd innego powszechnego zastosowania niż jako nawóz. Duże browary dodają czasem niewielkie ilości wychmielin, ok. 5%, do suszonych wysłodzin przeznaczonych na paszę. Jedne z wcześniejszych badań dotyczyły użycia wychmielin jako karmy dla owiec [195] i krów [38]. Podejmowano próby zastosowania ich do produkcji olejków eterycznych [115], jako źródła cukrów i kwasów organicznych [51, 142, 189] oraz do usuwania metali ciężkich z roztworów wodnych [58].

Poekstrakcyjny odpad chmielowy ze względu na bardzo dużą, porównywalną z suszem lucerny zawartość białka, 20–30% w zależności od gatunku chmielu, może stanowić podstawowy składnik mieszanek paszowych dla zwierząt. Jednakże obecność gorzkich kwasów, pożądana w przypadku ekstraktu chmielowego, tolerowana w wychmielinach przeznaczonych na nawóz, jest nie do przyjęcia w wychmielinach przeznaczonych na dodatki do pasz. Warunkiem tego ostatniego sposobu wykorzystania jest zmiana gorzkiego smaku, powodującego niechęć zwierząt do spożywania wychmielin, oraz pozbycie się innych niepożądanych składników. Jest nim przede wszystkim działający uspokajająco i nasennie 2-metylo-3-buten-2-ol, powstający podczas rozkładu gorzkich kwasów [199]. Tak więc usunięcie z wychmielin gorzkich kwasów rozwiązuje jednocześnie dwa problemy: niechętnego spożywania paszy i ospałości karmionych nią zwierząt.

Produkty chmielowe, takie jak: szyszki, proszki, granulaty i ekstrakt chmielowy, są podatne na degradację, dlatego ich przechowywanie wymaga odpowiednich warunków. Na przykład granulaty pakuje się próżniowo w folię i magazynuje w temp. od -2 do $+4^{\circ}\text{C}$, aby uniknąć utlenienia i polimeryzacji żywicy chmielowej oraz olejków eterycznych [26]. Granulat o wilgotności 7%, przechowywany w temp. 30°C z dostępem i bez dostępu tlenu, tracił odpowiednio 70 i 3% β -kwasów i 62 i 19% α -kwasów, przy czym ubytek tych ostatnich można tłumaczyć częściowym przekształceniem w izo- α -kwasy [52]. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych powoduje nie tylko obniżenie goryczki sensorycznej, ale również powstawanie rozmaitych produktów. Mechanizm degradacji i budowa wszystkich produktów tego procesu nie została jeszcze do końca poznana [190].

Głównymi czynnikami wpływającymi na rozkład gorzkich kwasów w piwie są: światło, temperatura i tlen atmosferyczny. Ulegają one przede wszystkim autooksydacji i reakcji wolnorodnikowej, przyspieszanej przez jony żelaza, miedzi i nadtlenek wodoru [102]. Jony metali przejściowych katalizują reakcje typu Fentona (Fe^{2+}) i Habera-Weissa (Cu^{+}), dające aktywne formy tlenu, takie jak rodniki hydroksylowe. W nienasyconych

łańcuchach bocznych kwasów gorzkich, na atomach węgla sąsiadujących z wiązaniem podwójnym, tworzą się nadtlenki, rozpadające się następnie do izobutanalu i acetonu (rys. 16). Dlatego β -kwasów z geminalnymi grupami izoprenylowymi są najbardziej podatne na autooksydację, a zredukowane kwasy gorzkie są na nią odporne.

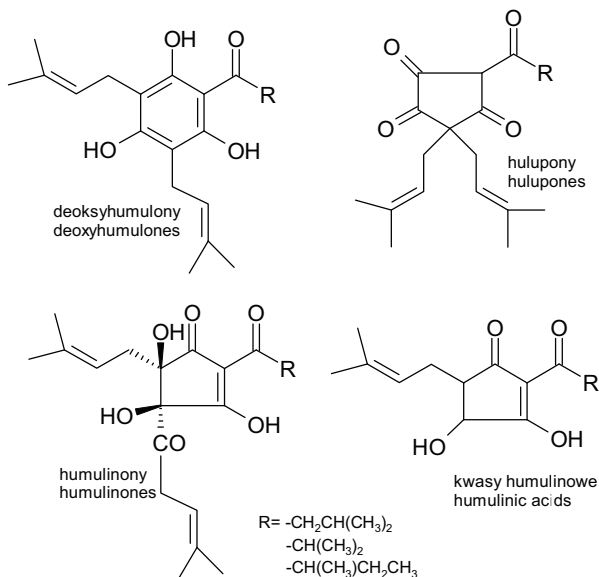


Rys. 16. Proponowany mechanizm autooksydacji łańcucha prenylowego [23]
 Fig. 16. Proposed autooxidation of prenyl side chain [23]

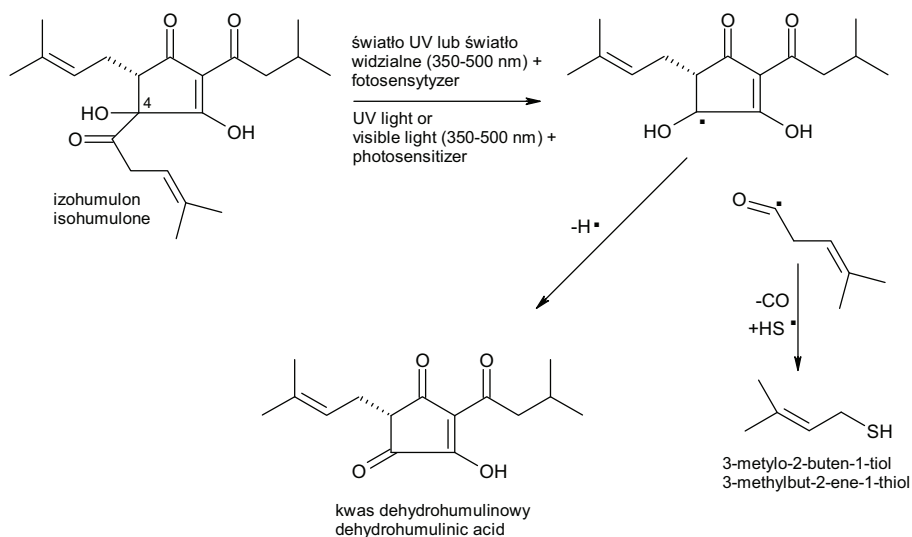
Reakcje autooksydacji dotyczą nie tylko łańcuchów izoprenylowych, ale również pierścienia. Utlenianie humulonów daje m.in. humulinon o intensywnie gorzkim smaku, z β -kwasów powstają hulupony (rys. 17), dwukrotnie bardziej gorzkie niż izo- α -kwasów i ok. 40 innych związków opisanych przez Verzelego i De Keukeleirego [192].

Efektom naświetlania izo- α -kwasów jest powstawanie 3-metylo-2-buten-1-tiolu o bardzo nieprzyjemnym zapachu skunksa, tzw. „skunky thiol”, wyczuwanego przez niektórych ludzi nawet w stężeniu $0,4 \text{ ng dm}^{-3}$. Z tego powodu piwo konfekcjonuje się w ciemnych butelkach i przechowuje w ciemnych pomieszczeniach. Wyżej wymieniony związek pochodzi z reakcji fotolizy łańcucha bocznego, uwalniającej rodnik 4-metylo-3-pentenoilowy, ulegający dekarboksylacji, a następnie reakcji z rodnikiem tiolowym, pochodzącym np. z cysteiny, tworząc wspomniany wyżej merkaptan i kwas dehydrohumulinowy (rys. 18). Wrażliwym na światło UV chromoforem w izohumulonach jest acyloinowa grupa utworzona z trzeciorzędowej grupy hydroksylowej na C-4 i karbonylowej grupy łańcucha bocznego. Przedstawiony na rys. 18 mechanizm, zaproponowany

przez Kuroiwę i współpracowników [113], potwierdził obecność 3-metylo-2-buten-1-tiolu w naświetlanych piwach. Ponieważ izohumulony nie absorbują światła widzialnego, pod jego wpływem opisany wyżej proces zachodzi w obecności fotoreaktywnych, absorbujących to światło związków, tzw. fotosensytyzerów, takich jak ryboflawina [96].



Rys. 17. Niektóre produkty oksydacyjnego rozkładu chmielowych kwasów gorzkich
Fig. 17. Some oxidative degradation products of hop bitter acids



Rys. 18. Powstawanie w piwie związków zapachowych typu „uderzenie świetlne”
Fig. 18. Formation of the lightstruck flavour in beer

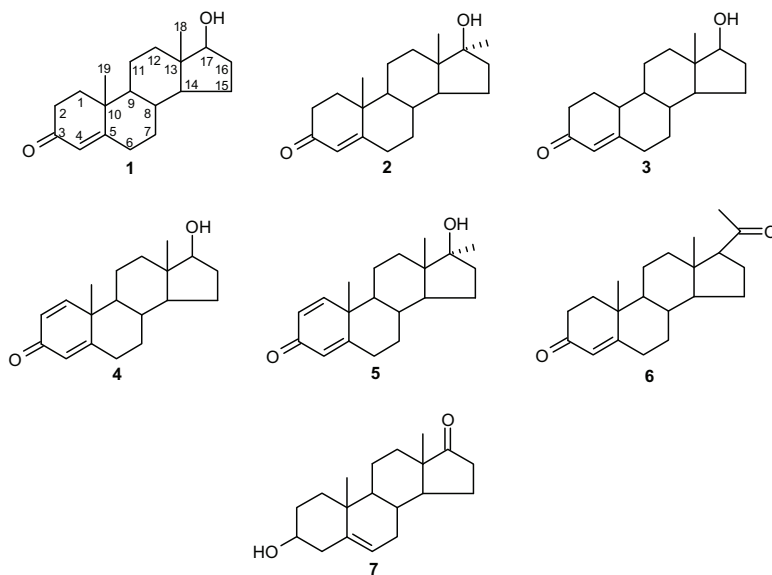
Problem mikrobiologicznego psucia produktów chmielowych, poza piwem, jest mało zbadany. Poza pracami autorki tej dysertacji [89–91] nie ma innych doniesień o mikrobiologicznych przekształceniach gorzkich kwasów chmielowych, co może wynikać z ogólnie znanych właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych tych związków. Podjęto natomiast próby takich biotransformacji z użyciem zawieszinowych kultur komórkowych roślin: chmielowych komórek kalusowych [152] i rozdrobnionego miąższu owoców i warzyw [125]. Pierwsza z przytoczonych prac powstała jako następstwo obserwacji, że w zebranych dojrzałych szyszkach chmielowych zachodzi degradacja α -kwasów. Wykazano w niej, że wytwarzane przez komórki kalusowe enzymy utleniają humulon i kohumulon do humulinonu i kohumulinonu, znanych produktów peroksydacji tych substratów [191] posiadających gorzki smak. Druga z prac wykazała zdolność enzymów zawartych w miąższu owoców i warzyw, takich jak jabłko, chrzan i pietruszka, do transformacji α - i β -kwasów do nieokreślonych bliżej produktów o zwiększonej polarności [125].

Rozpuszczalnikiem szczególnie obecnie polecanym do produkcji ekstraktu chmielowego jest nadkrytyczny dwutlenek węgla, ponieważ wydobywa z szyszek chmielowych niemal cały olejek eteryczny, daje wysoki stosunek humulonów do mniej gorzkich lupulonów oraz zawiera małe ilości twardych żywic, triglicerydów, wosków, chlorofili i nieorganicznych soli, przez co produkt finalny, którym jest piwo, ma lepiej wyważony smak i aromat. Metoda ta ma jednak swoje ograniczenia, np. związki polarne, takie jak flawonoidy nie mogą być wydajnie ekstrahowane czystym nadkrytycznym dwutlenkiem węgla [72, 127]. W tej przemysłowo stosowanej metodzie ekstrakcji większość flawonoidów pozostaje w materiale odpadowym, w wychmielinach, przez co stanowi on szczególnie dogodne źródło tych naturalnych związków o bardzo szerokim spektrum aktywności biologicznej. Związki takie jak ksantohumol mogą stać się substancjami wiodącymi do syntezy nowych pochodnych i z dużym prawdopodobieństwem można założyć, że produkty te będą wykazywać aktywność biologiczną. Są też składnikami nutraceutyków, których przykładami mogą być preparaty Meridium XN (BioNovix Inc.) i VitaXan (ProMedX Health, Inc.).

2. PRZEDSTAWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

2.1. Mikrobiologiczne transformacje steroidów

W wyniku selekcji drobnoustrojów transformujących 17α -metylotestosteron (2) wyłoniono trzy grzyby, które zastosowano do modyfikacji hormonów: testosteronu (1), progesteronu (6) i dehydroepiandrosteronu (7) oraz ich syntetycznych pochodnych: 17α -metylotestosteronu (2), 19-nortestosteronu (3), 1-dehydrotestosteronu (4) i 1-dehydro- 17α -metylotestosteronu (5) (rys. 19). Były to: *Absidia glauca* AM177, *Beauveria bassiana* AM446 oraz *Botrytis cinerea* AM235, pochodzące z kolekcji Katedry Biologii i Botaniki Akademii Medycznej we Wrocławiu.



Rys. 19. Substraty steroidowe: testosteron (1), 17α -metylotestosteron (2), 19-nortestosteron (3), 1-dehydrotestosteron (4), 1-dehydro- 17α -metylotestosteron (5), progesteron (6) i dehydroepiandrosteron (7)

Fig. 19. Steroids substrates: testosterone (1), 17α -methyltestosterone (2), 19-nortestosterone (3), 1-dehydrotestosterone (4), 1-dehydro- 17α -methyltestosterone (5), progesterone (6) and dehydroepiandrosterone (7)

Substraty dobrano w taki sposób, by można było śledzić zależność przebiegu biotransformacji od ich budowy. Różnice w stosunku do testosteronu (**1**) polegały na obecności dodatkowego wiązania podwójnego C₁-C₂ (związki **4**, **5**), dodatkowej grupy 17 α -metylowej (związki **2**, **5**) i braku grupy metylowej w pozycji 19 (związek **3**). Wiadomo, że wspomniane modyfikacje budowy zwiększają aktywność anaboliczną i obniżają androgeną, sprawiając, że takie pochodne mogą być efektywnymi anabolikami [4]. W przypadku *Beauveria bassiana*, gatunku dobrze rozpoznanego, wręcz modelowego w dziedzinie biotransformacji [65], zastosowano dwa dodatkowe substraty – powszechnie badany progesteron (**6**) i rzadziej stosowany dehydroepiandrosteron (**7**).

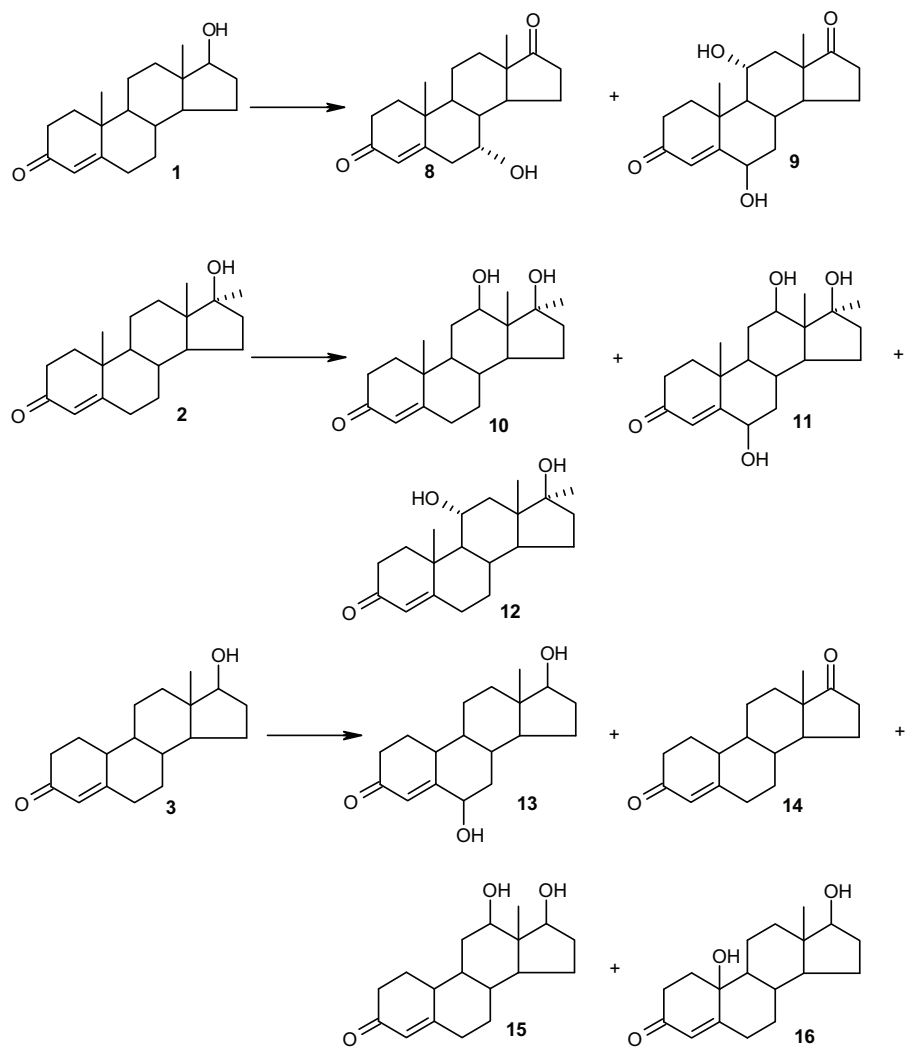
2.1.1. Transformacje steroidów przez *Absidia glauca*

Przedstawione w tym rozdziale wyniki biotransformacji zostały opublikowane w artykule „Transformations of testosterone and related steroids by *Absidia glauca* culture” [93].

Rodzaj *Absidia* znany jest ze zdolności do hydroksylacji steroidów [24, 30, 34, 118, 165, 186, 196, 208]. W przypadku gatunku *A. glauca*, przede wszystkim w steroidach, o 21 węglach odnotowano następujące typy hydroksylacji: 1 β , 3 β , 6 β , 7 β , 11 α , 11 β i 14 α [30, 34, 118, 208]. Wcześniejsze badania prowadzone przy użyciu *A. coerulea* wykazały wyraźną zależność pomiędzy strukturą substratu a przebiegiem biotransformacji [24].

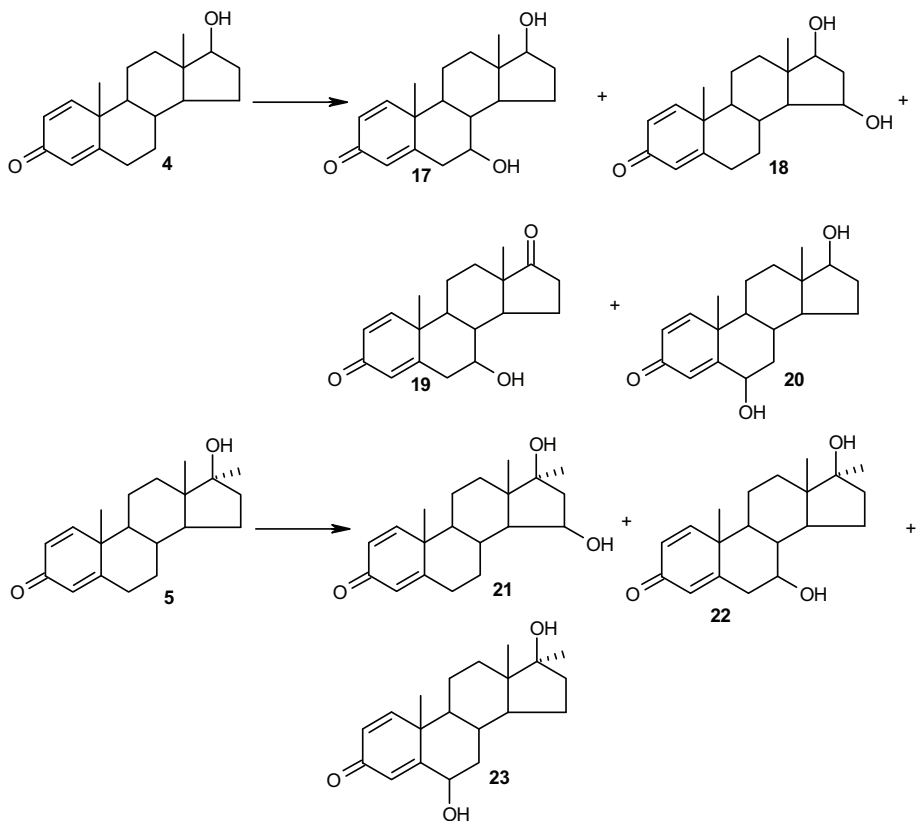
Wzory produktów biotransformacji steroidów przez *Absidia glauca* AM177 zamieszczono na rys. 20a i 20b, natomiast wydajności otrzymanych związków pokazuje tabela 1.

Transformacje prowadzono do momentu przereagowania całego substratu, co zajmowało drobnoustrojom od 3 do 7 dni. Wszystkie testowane substraty ulegały hydroksylacji, a w przypadku związków **1**, **3** i **4**, obserwowano dodatkowo utlenienie grupy hydroksylowej przy C-17 do karbonylowej. Hydroksylacja w pozycji 6 β miała miejsce w biotransformacji każdego z użytych związków, jest więc stosunkowo niezależna od budowy substratu, chociaż można zauważyć, że największe stężenia 6 β -alkoholi (**9**, **11**, **13**) otrzymano z substratów bez wiązania podwójnego w pozycji C₁-C₂. Tego typu transformacja jest w przypadku 4-en-3-oksosteroidów powszechna zarówno u ssaków, jak i mikroorganizmów [30, 126, 151]. 1-Dehydrosteroidy (**4**, **5**) były hydroksylowane od strony β , w pozycjach 6 β , 7 β i 15 β , przy czym 7 β - i 15 β -produkty izolowano wyłącznie z transformacji substratów posiadających wiązanie podwójne C₁-C₂. Natomiast 12 β -hydroksylacja miała miejsce tylko w substratach z dodatkową grupą 17 α -metylową lub przy braku grupy 19-metylowej, 7 α -hydroksylacja tylko w przypadku testosteronu (**1**), a 11 α -hydroksylacja w przypadku testosteronu i 17 α -metylotestosteronu (**2**). 17 α -Metylowa grupa nie hamowała hydroksylacji w pierścieniu D. Ponieważ atomy wodoru w pozycjach 6 β i 12 β mogą znajdować się w analogicznym położeniu wobec centrum aktywnego enzymu po obrocie cząsteczki o 180° wokół osi wyznaczonej przez C3 i C17 oraz jednoczesnej zamianie pozycji wiązania steroidu C-3 na C-17 (rys. 6, położenia I i III), transformacje te mogą być prowadzone przez ten sam układ enzymatyczny. Potwierdzeniem tego przypuszczenia może być produkt podwójnej hydroksylacji 6 β ,11 α -dihydroksy-17 α -metylotestosteron (**11**).



Rys. 20a. Transformacje steroidów przez *Absidia glauca*

Fig. 20a. Transformation of steroids by *Absidia glauca*



Rys. 20b. Transformacje steroidów przez *Absidia glauca*
 Fig. 20b. Transformation of steroids by *Absidia glauca*

Wprowadzenie grupy hydroksylowej do 19-nortestosteronu w pozycji 10 β jest typowe dla 19-nor-4-en-3-oksosteroidów [70, 83]. W wielu przypadkach odnotowano konkurencję pomiędzy 6 β - a 10 β -hydroksylacją w tego typu związkach i postuluje się, że są efektem działania tej samej 6 β -hydroksylazy [161]. Dla rodzaju *Absidia* opisano już hydroksylację w pozycji 15 β [34, 208], ale informacje te nie dotyczą gatunku *A. glauca*. Nie znaleziono również doniesień o 12 β -hydroksylacji prowadzonej przez grzyby *Absidia*.

Tabela 1
Table 1

Transformacja steroidów przez *Absidia glauca*
Transformation of steroids by *Absidia glauca*

Substrat Substrate	Produkty Products	Wydajność ^a Yield ^a [%]
testosteron 1 testosterone 1	7 α -hydroksyandrostendion 8	38
	7 α -hydroksyandrostenedione 8 6 β ,11 α -dihydroksyandrostendion 9 6 β ,11 α -dihydroksyandrostenedione 9	30
17 α -metylotestosteron 2 17 α -methyltestosterone 2	12 β -hydroksy-17 α -metylotestosteron 10	32
	12 β -hydroksy-17 α -methyltestosterone 10	
	6 β ,11 α -dihydroksy-17 α -metylotestosteron 11	26
	6 β ,11 α -dihydroksy-17 α -methyltestosterone 11 11 α -hydroksy-17 α -metylotestosteron 12 11 α -hydroksy-17 α -methyltestosterone 12	19
19-nortestosteron 3 19-nortestosterone 3	6 β -hydroksy-19-nortestosteron 13	23
	6 β -hydroksy-19-nortestosterone 13	
	19-norandrostendion 14	21
	19-norandrostenedione 14	
	12 β -hydroksy-19-nortestosteron 15	18
	12 β -hydroksy-19-nortestosterone 15 10 β -hydroksy-19-nortestosteron 16 10 β -hydroksy-19-nortestosterone 16	16
1-dehydrotestosteron 4 1-dehydrotestosterone 4	7 β -hydroksy-1-dehydrotestosteron 17	50
	7 β -hydroksy-1-dehydrotestosterone 17	
	15 β -hydroksy-1-dehydrotestosteron 18	22
	15 β -hydroksy-1-dehydrotestosterone 18	
	7 β -hydroksy-1-dehydroandrostendion 19	10
	7 β -hydroksy-1-dehydroandrostenedione 19	
	6 β -hydroksy-1-dehydrotestosteron 20 6 β -hydroksy-1-dehydrotestosterone 20	9
1-dehydro- 17 α -metylotestosteron 5 1-dehydro- 17 α -methyltestosterone 5	15 β -hydroksy-1-dehydro-17 α -metylotestosteron 22	28
	15 β -hydroksy-1-dehydro-17 α -methyltestosterone 22	
	7 β -hydroksy-1-dehydro-17 α -metylotestosteron 23	26
	7 β -hydroksy-1-dehydro-17 α -methyltestosterone 23	
	6 β -hydroksy-1-dehydro-17 α -metylotestosteron 24 6 β -hydroksy-1-dehydro-17 α -methyltestosterone 24	20

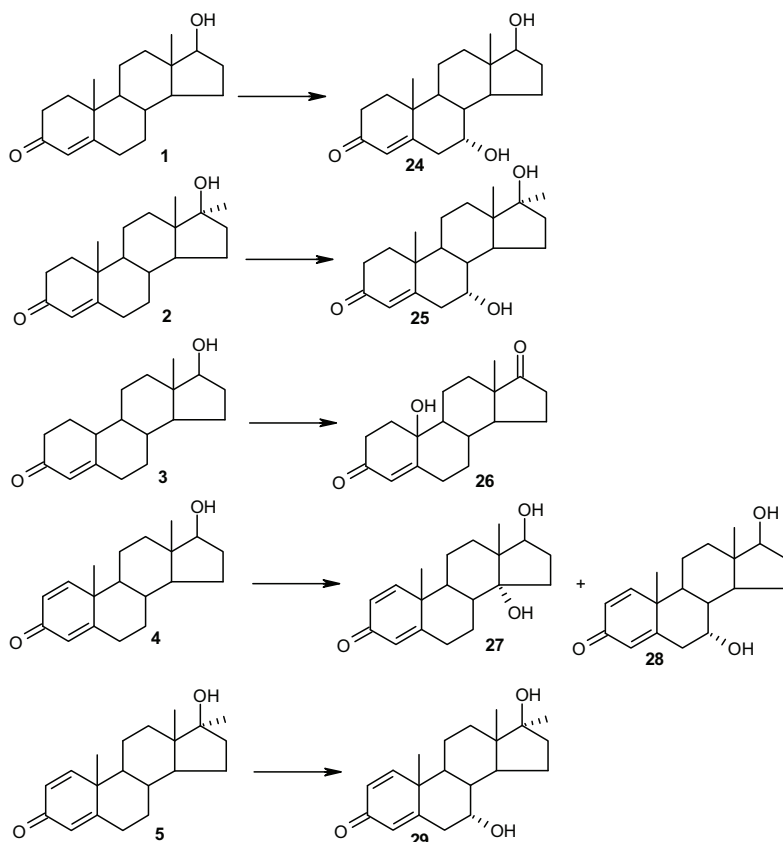
^a wydajność wyznaczona metodą GC
yield determined by GC

2.1.2. Transformacje steroidów przez *Botrytis cinerea*

Przedstawione w tym rozdziale wyniki biotransformacji zostały opublikowane w artykule „Transformations of testosterone and related steroids by *Botrytis cinerea*” [94].

Botrytis cinerea to powszechnie występujący patogen infekujący wiele przemysłowo uprawianych roślin, w tym: winorośl, sałatę, marchew, truskawki i tytoń. Z tego względu znaczna część prac dotyczących tego drobnoustroju to biotransformacje ewentualnych czynników przeciwgrzybiczych oraz warunkujących jego patogenność [3]. Literaturowe przykłady transformacji pokazały zdolność *B. cinerea* do hydroksylacji 4-en-3-oksosteroidów głównie w pozycjach 11 α i 11 β , w steroidach o 21 węglach w pozycjach 2 β i 6 β [30], 7 β w testosteronie oraz 11 α i 16 β w pregnenolonie [49].

Wzory produktów biotransformacji steroidów przez *Botrytis cinerea* AM235 pokazano na rys. 21, natomiast wydajności otrzymanych związków zamieszczono w tabeli 2. Transformacje prowadzono do zaniku substratu, od 3 do 11 dni.



Rys. 21. Transformacja steroidów przez *Botrytis cinerea*

Fig. 21. Transformation of steroids by *Botrytis cinerea*

Transformacja steroidów przez *Botrytis cinerea*
Transformation of steroids by *Botrytis cinerea*

Substrat Substrate	Produkty Products	Wydajność ^a Yield ^a [%]
testosteron 1 testosterone 1	7 α -hydroksytestosteron 24 7 α -hydroxytestosterone 24	76
17 α -metylotestosteron 2 17 α -methyltestosterone 2	7 α -hydroksy-17 α -metylotestosteron 25 7 α -hydroxy-17 α -methyltestosterone 25	82
19-nortestosteron 3 19-nortestosterone 3	10 β -hydroksy-19-norandrost-4-en-3,17-dion 26 10 β -hydroxy-19-norandrost-4-en-3,17-dione 26	78
1-dehydrotestosteron 4 1-dehydrotestosterone 4	14 α -hydroksy-1-dehydrotestosteron 27 14 α -hydroxy-1-dehydrotestosterone 27 7 α -hydroksy-1-dehydrotestosteron 28 7 α -hydroxy-1-dehydrotestosterone 28	68 27
1-dehydro- 17 α -metylotestosteron 5 1-dehydro- 17 α -methyltestosterone 5	7 α -hydroksy-1-dehydro-17 α -metylotestosteron 29 7 α -hydroxy-1-dehydro-17 α -methyltestosterone 29	52

^a wydajność wyznaczona metodą GC
yield determined by GC

Wszystkie produkty, z wyjątkiem **26** i **27**, posiadają grupę 7 α -hydroksylową. Tylko jeden substrat, 1-dehydrotestosteron (**4**), uległ hydroksylacji w pozycji 14 α . Drugi z substratów z wiązaniem nienasyconym C₁-C₂, 1-dehydro-17 α -metylotestosteron (**5**) był hydroksylowany tylko w pozycji 7 α . Wynik ten jest zgodny z obserwacjami poczynionymi dla grzybów z rzędu *Mucorales*, że duży podstawnik w pozycji C-17 utrudnia hydroksylację w pozycji 14 α [24, 168], podczas gdy 17 β -hydroksysteroidy, jak np. testosteron (**1**), podlegają wspomnianej modyfikacji [112]. Biotransformacja 19-nortestosteronu (**3**) dostarczyła jeden produkt będący efektem, wspomnianej w rozdziale 2.1.1, typowej dla 19-nor-4-en-3-oksosteroidów hydroksylacji w pozycji 10 β [70, 83] oraz utlenienia C-17 alkoholu do ketonu. Porównanie dróg transformacji testosteronu (**1**) i 17 α -metylotestosteronu (**2**) pokazuje, że dodatkowa grupa 17 α -metylowa nie wpływa na pozycję hydroksylacji, chociaż częściowa redukcja wiązania podwójnego C₁-C₂, miała miejsce tylko w obecności tego podstawnika, tj. wtedy, gdy substratem był 1-dehydro-17 α -metylotestosteron (**5**). W prowadzonych wcześniej badaniach nad przekształcaniami α -kamfolenonów, ten sam szczep wprowadzał grupę hydroksylową w pozycję allilową lub poprzez uprzednią epoksydację [46]. W przypadku transformacji steroidów allilowa pozycja C-6 pozostawała niezmienną, nie obserwowano też epoksydacji, co jednak nie wyklucza takich związków pośrednich w przebiegu hydroksylacji.

Szczep *Botrytis cinerea* AM235 wydajnie hydroksyluje 4-en-3-oksosteroidy w pozycji 7 α . Pochodne te stanowiły 26–82% wszystkich ekstrahowanych z hodowli związków. W literaturze nie znaleziono doniesień o tego typu transformacji prowadzonej

przez *B. cinerea*. Oprócz interesującej ze względów praktycznych 7 α -hydroksylacji, prowadzącej do związków wyjściowych w syntezie diuretyków, obserwowano także 14 α -hydroksylację wykorzystywaną do syntezy hormonów i leków nasercowych [86, 120].

2.1.3. Transformacje steroidów przez *Beauveria bassiana*

Przedstawione w tym rozdziale wyniki biotransformacji zostały opublikowane w artykule „Transformation of steroids by *Beauveria bassiana*” [95].

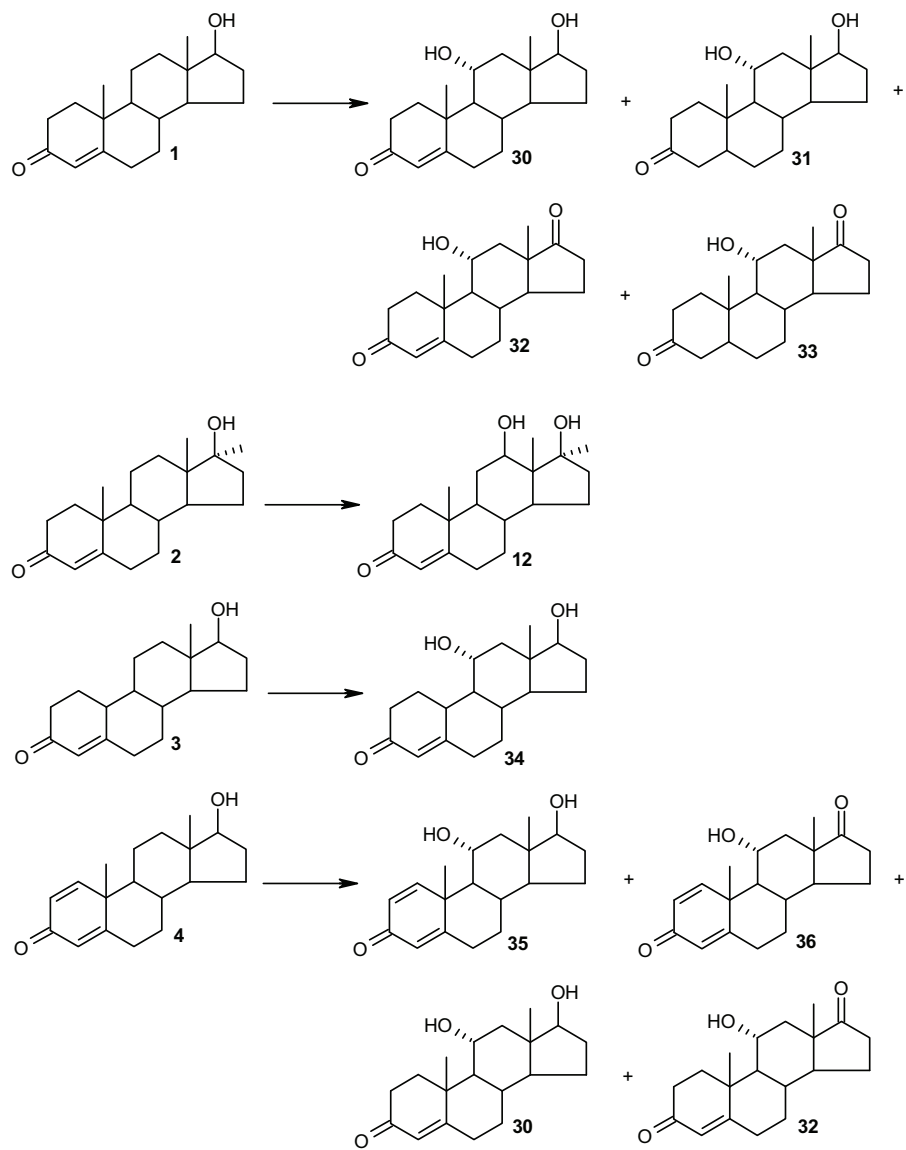
Beauveria bassiana to szeroko rozpowszechniony grzyb owadobójczy, atakujący ponad sto gatunków [69]. Stosowany jest do zwalczania owadów szkodników w rolnictwie [15, 135]. Gatunek ten hydroksyluje 4-en-3-oksosteroidy przede wszystkim w pozycji 11 α [10, 27, 28, 64, 160], rzadziej w pozycjach 6 β i 11 α , [27, 28, 64]. Hydroksylacje w pozycjach 6 β , 11 α , 11 β i 15 β obserwowano w B-norsteroidzie, 17 α , 21-dihydroksy-B-nor-pregn-4-en-3,20-dionie [157]. Poza reakcjami hydroksylacji *Beauveria bassiana* wykazuje zdolność do redukcji 17-ketonu do 17 β -alkoholu [10] i degradacji łańcucha bocznego w progesteronie, prowadzącej do testosteronu [160].

Wzory produktów biotransformacji steroidów przez *Beauveria bassiana* AM446 pokazano na rys. 22a i 22b, natomiast wydajności otrzymanych związków zamieszczono w tabeli 3.

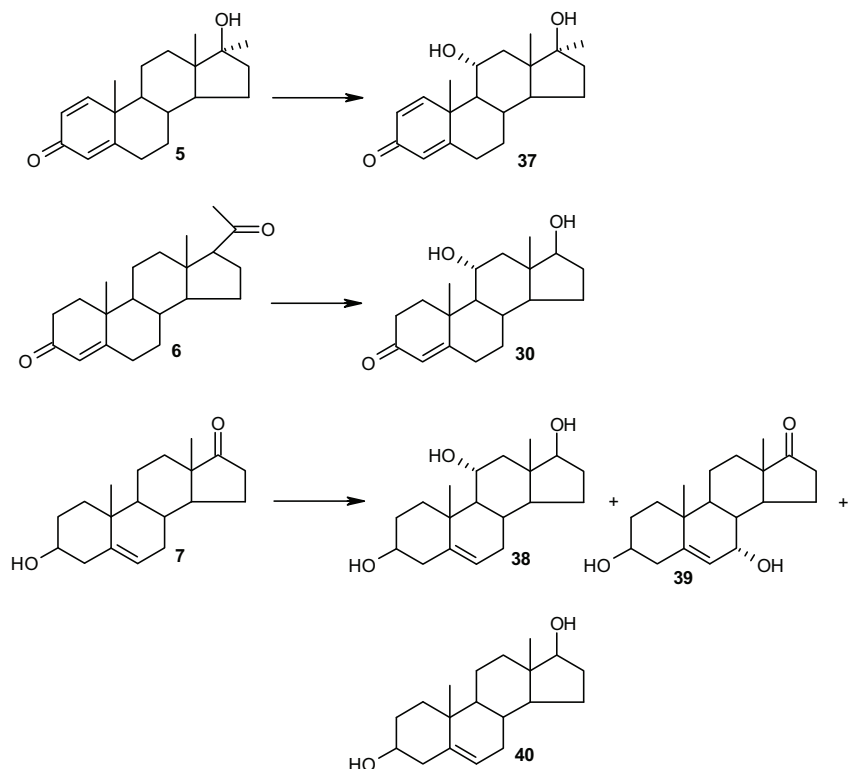
Transformacje prowadzono do momentu przekształcenia całego substratu, tj. od 3 do 10 dni. Wszystkie produkty transformacji 4-en-3-oksosteroidów posiadały grupę 11 α -hydroksylową. Oprócz reakcji hydroksylacji zaobserwowano dwie inne reakcje typu red-oks: nasycenie wiązania podwójnego C₄-C₅ w testosteronie (**1**) i wiązania C₁-C₂ w 1-dehydrotestosteronie (**4**) oraz utlenienie 17 β -alkoholu do 17-ketonu w tych samych substratach (**1,4**). Obecność grupy 17 α -metylowej hamowała redukcję wiązań podwójnych C₄-C₅ w 17 α -metylotestosteronie (**2**) i wiązania C₁-C₂ w 1-dehydro-17 α -metylotestosteronie (**5**). Warto zauważyć, że w przypadku 19-nortestosteronu (**3**) nie zachodziło ani utlenienie węgla C-17, ani nasycenie wiązania podwójnego C₄-C₅. Związek ten był stosunkowo słabo metabolizowany, co jest zgodne z wynikami badań Shibahary i wsp., którzy pomimo indukcji 11 α -hydrolazy z *Aspergillus ochraceus* otrzymywali 11 α -hydroksy-19-nortestosteron z niewielką wydajnością [163].

Transformacja progesteronu (**6**) prowadziła do 11 α -hydroksytestosteronu (**30**), powstającego z wysoką 94% wydajnością. Interesujące jest, że odcięcie łańcucha bocznego i hydroksylacja dały w efekcie jeden produkt, co dotąd nie było obserwowane dla żadnego szczepu *B. bassiana*, okazało się także, iż 11 α -hydroksytestosteron (**30**) lepiej jest otrzymywać na drodze transformacji progesteronu (**6**) niż testosteronu (**1**).

Z przedstawionych w tym rozdziale wyników można wyciągnąć wniosek, że różnice strukturalne zastosowanych 4-en-3-oksosteroidów nie wpływały na regio- i stereoselektywność hydroksylacji. Szkielet steroidowy był zawsze atakowany od strony α w pozycji C-11. Chociaż pozycje 6 β i 11 α są ekwiwalentne w kompleksie enzym-substrat (rys. 6), to w żadnym z eksperymentów nie otrzymywano produktów 6 β -, ani 6 β ,11 α -hydroksylacji. W przypadku innych, znanych z hydroksylowania steroidów w pozycji 11 α drobnoustrojów, takich jak: *Rhizopus nigricans* [211], *Aspergillus ochraceus* [181] i *Cephalosporium aphidicola* [19], obserwowano zależność pomiędzy strukturą substratu, a dokładniej podstawnika przy węglu C-17, a przebiegiem transformacji.



Rys. 22a. Transformacja steroidów przez *Beauveria bassiana*
 Fig. 22a. Transformation of steroids by *Beauveria bassiana*



Rys. 22b. Transformacja steroidów przez *Beauveria bassiana*
 Fig. 22b. Transformation of steroids by *Beauveria bassiana*

W celu poszerzenia puli substratów użyto do biotransformacji dodatkowo C₅-C₆ nienasycony steroid, dehydroepiandrosteron (7), oczekując typowej dla stosowanego drobnoustroju 11 α -hydroksylacji, z drugiej zaś strony – typowej dla 5-ensteroidów hydroksylacji w allilowej pozycji C-7. Jako główny produkt otrzymano 5-androsten-3 β ,11 α ,17 β -triol (38), powstający w wyniku reakcji obserwowanych na przykładzie 4-en-3-oksosteroidów. Obecność wśród produktów transformacji androstendiolu (40) sugeruje, że 11 α -hydroksylację poprzedza redukcja C-17-ketonu do 17 β -alkoholu. 11 α -Hydroksylacja dehydroepiandrosteronu (7) bez utlenienia na C-3 jest charakterystyczna dla tzw. „11 α -hydroksylatorów”, jakimi są: *Rhizopus nigricans* [150], *Rhizopus arrhizus* [84] i *Aspergillus ocraceus* [11]. Natomiast 7 α -hydroksydehydroepiandrosteron (39) jest produktem nietypowym dla *Beauveria bassiana* AM446, za to powstaje powszechnie w hodowlach innych grzybów, np. *Fusarium culmorum* [109] i wraz z androstendiolem (40) w różnych komórkach myszy. 7 α -hydroksydehydroepiandrosteron (39) jest silniejszym aktywatorem procesu odpowiedzi immunologicznej od dehydroepiandrosteronu (7) [134].

Tabela 3
Table 3

Transformacja steroidów przez *Beauveria bassiana*
Transformation of steroids by *Beauveria bassiana*

Substrat Substrate	Produkty Products	Wydajność ^a Yield ^a [%]
testosteron 1 testosterone 1	11 α -hydroksytestosteron 30 11 α -hydroxytestosterone 30 5 α -androstan-11 α ,17 β -diol-3-on 31 5 α -androstan-11 α ,17 β -diol-3-one 31 11 α -hydroksyandrost-4-en-3,17-dion 32 11 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione 32 5 α -androstan-11 α -ol-3,17-dion 33 5 α -androstan-11 α -ol-3,17-dione 33	55 15 10 8
17 α -metylotestosteron 2 17 α -methyltestosterone 2	11 α -hydroksy-17 α -metylotestosteron 12 11 α -hydroxy-17 α -methyltestosterone 12	95
19-nortestosteron 3 19-nortestosterone 3	11 α -hydroksy-19-nortestosteron 34 11 α -hydroxy-19-nortestosterone 34	40
1-dehydrotestosteron 4 1-dehydrotestosterone 4	11 α -hydroksy-1-dehydrotestosteron 35 11 α -hydroxy-1-dehydrotestosterone 35 11 α -hydroksyandrost-1,4-dien-3,17-dion 36 11 α -hydroxyandrost-1,4-diene-3,17-dione 36 11 α -hydroksytestosteron 30 11 α -hydroxytestosterone 30 11 α -hydroksyandrost-4-en-3,17-dion 32 11 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione 32	56 13 11 9
1-dehydro-17 α -metylotestosteron 5 1-dehydro-17 α -methyltestosterone 5	11 α -hydroksy-1-dehydro-17 α -metylotestosteron 37 11 α -hydroxy-1-dehydro-17 α -methyltestosterone 37	87
progesteron 6 progesterone 6	11 α -hydroksytestosteron 30 11 α -hydroxytestosterone 30	94
dehydroepiandrosteron 7 dehydroepiandrosterone 7	5-androsten-3 β ,11 α ,17 β -triol 38 7 α -hydroksydehydroepiandrosteron 39 7 α -hydroxydehydroepiandrosterone 39 androstendiol 40 androstenediol 40	60 13 8

^a wydajność wyznaczona metodą GC
yield determined by GC

Istnieje wiele doniesień naukowych na temat bardzo wysokiej regio- i stereoselektywności reakcji katalizowanych przez enzymy *Beauveria bassiana*. Jeden ze szczepów tego gatunku, *B. bassiana* ATCC 7159, znany również jako *B. sulfurescens* i *Sporotrichum sulfurescens*, uznano nawet za drobnoustroj modelowy, a przez to stosowany do różnego typu reakcji, takich jak: hydroksylacja nasyconych i aromatycznych atomów węgla, przekształceń keton-alkohol, redukcji i utleniania alkenów, utleniania siarczków, utleniania typu Baeyera-Villigera, glikozydacji, hydrolizy estrów i epoksydów oraz dealkylacji. Wyniki tych badań zostały zebrane przez Grogana i Hollanda [65]. Dla tych autorów najistotniejsze wydaje się być użycie *B. bassiana* do selektywnej hydroksylacji szerokiego spektrum związków organicznych, takich jak amidy, laktamy, karbaminiany, azydy i sulfonamidy.

Beauveria bassiana AM446 wytwarza 11 α -hydroksylowane pochodne steroidów, szczególnie dehydroepiandrosteronu (7), 17 α -metylotestosteronu (2) i 1-dehydro-17 α -metylotestosteronu (5). Przy niskiej specyficzności substratowej charakteryzuje się szczególnie wysoką regio- i stereoselektywnością.

2.2. Mikrobiologiczna degradacja gorzkich kwasów chmielowych

W przeprowadzonych badaniach związkami modelowymi były α - i β -kwasy (rys. 7), składniki dostępnego handlowo ekstraktu chmielowego. Ekstrakt ten wprowadzono do uprzednio narośniętych kultur z powodu jego dobrze poznanych właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych, opisanych w rozdziale 1.2. Dlatego też próby hodowania drobnoustrojów na pożywkach zawierających 100 mg gorzkich kwasów w dm⁻³, czyli w ilości odpowiadającej maksymalnej zawartości izo- α -kwasów w bardzo gorzkich piwach angielskich [42], nie dały pozytywnych rezultatów.

2.2.1. Selekcja drobnoustrojów degradujących gorzkie kwasy chmielowe

Przedstawione w tym rozdziale wyniki badań zostały opublikowane w artykule „Screening for the hop bitter acids degrading microorganisms” [90].

Poszukiwanie mikroorganizmów degradujących gorzkie kwasy chmielowe przeprowadzono wśród 54 drobnoustrojów, głównie grzybów. Pochodziły one z następujących kolekcji: Katedry Biologii i Botaniki Akademii Medycznej we Wrocławiu (oznaczone AM), Katedry Fitopatologii Leśnej Akademii Rolniczej w Krakowie (oznaczone ARK), Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności (oznaczone AR) oraz Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (oznaczone KCh), a także NCAIM i CBS. Zastosowano również drobnoustroje dostępne handlowo, oferowane przez firmy: Biowin, Biomed, Biocodex i Coopers Brewery.

Po dodaniu ekstraktu chmielowego do hodowli inkubowano mieszaniny biotransformacyjne przez 7 dni w warunkach laboratoryjnych, przy wytrząsaniu i naturalnym świetle. Początkowe stężenie gorzkich kwasów w każdej próbie wynosiło sumarycznie 297,32 mg dm⁻³ (kohumulon 57,8 mg dm⁻³, humulon i adhumulon 139,76 mg dm⁻³, kolu-

pulon 51,68 mg dm⁻³, lupulon i adlupulon 48,08 mg dm⁻³). Wzory dodawanych α - i β -kwasów przedstawia rysunku 7. Rezultaty przeprowadzonych badań pokazano w tabeli 4. Ubytek kwasów gorzkich w próbie kontrolnej wynosił 33,6% i był niższy niż we wszystkich badanych kulturach. W hodowlach 9 drobnoustrojów: *Nigrospora oryzae* AM8, *Trametes versicolor* AM536, *Inonotus radiatus* ARK70, *Crumenulopsis sororia* ARK59, *Coryneum betulinum* ARK16534, *Cryptosporiopsis radicola* ARK16671, *Rhodotorula glutinis* AM242, *Fusarium equiseti* KCh15 i *Candida parapsilosis* NCAIM Y-1011 – po 7 dniach inkubacji z ekstraktem chmielowym nie obserwowano α - i β -kwasów.

Zdolność do rozkładu gorzkich kwasów chmielowych nie zależała od przynależności taksonomicznej mikroorganizmów. Na przykład grzyby *Fusarium equiseti* KCh15 degradowały substraty całkowicie w ciągu 7 dni, podczas gdy pozostałe szczepy *Fusarium*, takie jak: *F. equiseti* KCh22, *F. culmorum* AM7, AM10, AM196, AM282, *F. oxysporum* AM13, *F. avenaceum* AM11, AM12, *F. tricinctum* KCh16, *F. semitectum* AM20, *F. solani* AM203, *F. scirpi* AM199 nie degradowały. Podobne rezultaty otrzymano dla rodzaju *Rhodotorula*. W przeciwieństwie do *R. glutinis* AM242, zastosowanie *R. rubra* AM4, AM82 i *R. marina* AM77 nie dało satysfakcjonujących wyników. Lupulony pozostały tylko w 2 kulturach, natomiast humulony aż w 43. Wyniki te znajdują uzasadnienie w większej podatności β -kwasów na utlenianie w stosunku do α -kwasów, co opisano wcześniej w rozdziale 1.3. Wartość pH hodowli wśród 9 wyselekcjonowanych drobnoustrojów całkowicie degradujących dodane związki wynosiło od 3,8 dla *Coryneum betulinum* do 7,3 dla *Rhodotorula glutinis*. Ta pozorna niezależność degradacji od wartości pH mieszaniny reakcyjnej znalazła wyjaśnienie w późniejszych badaniach, opisanych w rozdziale 2.2.2.

Tabela 4
Table 4

Skład gorzkich kwasów chmielowych w ekstrakcie izooktanowym hodowli po 7 dniach transformacji: kohumulon 1, humulon+adhumulon 2, kolupulon 3, lupulon+adlupulon 4
Composition of hop bitter acids: cohumulone 1, humulone+adhumulone 2, colupulone 3, lupulone+adlupulone 4 in isoctane extracts of 7 days transformation cultures

	Drobnoustroje Microorganisms	Chmielowe kwasy gorzkie [mg dm ⁻³] ^a Hop bitter acids [mg dm ⁻³] ^a			
		1	2	3	4
1	2	3	4	5	6
1.	<i>Nigrospora oryzae</i> AM8	0	0	0	0
2.	<i>Trametes versicolor</i> AM536	0	0	0	0
3.	<i>Inonotus radiatus</i> ARK70	0	0	0	0
4.	<i>Crumenulopsis sororia</i> ARK59	0	0	0	0
5.	<i>Coryneum betulinum</i> ARK16534	0	0	0	0
6.	<i>Cryptosporiopsis radicola</i> ARK16671	0	0	0	0
7.	<i>Rhodotorula glutinis</i> AM242	0	0	0	0
8.	<i>Fusarium equiseti</i> KCh15	0	0	0	0
9.	<i>Candida parapsilosis</i> NCAIM Y-1011	0	0	0	0
10.	<i>Fusarium equiseti</i> KCh22	0	0,32	0	0
11.	<i>Chaetomium</i> sp, ARK16651	0	0,60	0	0
12.	<i>Rafaella</i> ARK16669	0	1,35	0	0

Tabela 4
Table 4

1	2	3	4	5	6
13.	<i>Endomyces fibuliger</i> NCAIM Y-973	0	1,49	0	0
14.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> KCh26	0,77	1,31	0	0
15.	<i>Fusarium scirpi</i> AM199	0,62	1,69	0	0
16.	<i>Fusarium solani</i> AM203	1,31	2,85	0	0
17.	<i>Candida kefyri</i> NCAIM Y-1070	0,88	3,61	0	0
18.	Wine Yeast Burgundy Biowin	1,18	3,34	0	0
19.	<i>Penicillium notatum</i> KCh904	1,52	3,24	0	0
20.	<i>Fusarium semitectum</i> AM20	5,11	1,12	0	0
21.	<i>Fusarium culmorum</i> AM10	2,33	6,27	0	0
22.	<i>Pezizula cinnamomea</i> ARK15753	2,31	6,81	0	0
23.	Brewers' Yeast Real Ale Coopers Brewery	2,36	7,42	0	0
24.	<i>Fusarium avenaceum</i> AM11	2,95	7,83	0	0
25.	<i>Fusarium tricinctum</i> KCh16	3,58	7,68	0	0
26.	Wine Yeast Honey Biowin	2,46	9,11	0	0
27.	Wine Yeast Malaga Biowin	3,37	10,23	0	0
28.	ARK16666	4,52	9,14	0	0
29.	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> AM67	3,81	10,03	0	0
30.	<i>Fusarium oxysporum</i> AM21	4,25	10,49	0	0
31.	Wine Yeast Madera Biowin	3,91	10,84	0	0
32.	<i>Fusarium avenaceum</i> AM12	5,05	12,41	0	0
33.	<i>Fusarium culmorum</i> AM7	6,76	11,90	0	0
34.	<i>Rhodotorula rubra</i> AM82	4,38	14,81	0	0
35.	<i>Fusarium culmorum</i> AM282	8,21	18,24	0	0
36.	<i>Saccharomyces pastorianus</i> NCAIM Y-1244	8,09	16,95	0	0
37.	<i>Candida sake</i> CBS159	6,82	18,24	0	0
38.	<i>Disculina betulina</i> ARK16538	10,16	23,65	0	0
39.	<i>Pycniidiella resiniae</i> ARK16050	8,90	26,53	0	0
40.	Wine Yeast Universal Biowin	10,07	25,43	0	0
41.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AM464	11,40	25,58	0	0
42.	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Biomed	19,65	21,87	1,43	2,09
43.	<i>Saccharomyces brasiliensis</i> NCAIM Y-1223	11,94	30,85	0	0
44.	<i>Fusarium oxysporum</i> AM13	15,06	29,96	0	0
45.	<i>Saccharomyces boulardii</i> Biocodex	15,15	33,77	0	0
46.	<i>Rhodotorula rubra</i> AM4	14,44	41,98	1,56	1,17
47.	<i>Papularia rosea</i> KCh17	17,36	35,07	4,22	4,06
48.	<i>Fusarium culmorum</i> AM196	19,61	42,14	0	0
49.	<i>Epithyrium resiniae</i> ARK16051	18,62	44,37	0	0
50.	<i>Rhodotorula marina</i> AM77	20,69	49,32	0	0
51.	<i>Fusarium culmorum</i> AM9	25,69	45,31	0	0
52.	<i>Pleurotus ostreatus</i> AM482	28,35	43,82	0	0
53.	<i>Gleophyllum odoratum</i> ARK16034	22,95	55,39	4,24	4,35
54.	<i>Yarrowia lipolytica</i> AR71	21,30	50,86	11,11	8,22
	KONTROLA – CONTROL	49,59	123,0	13,62	11,05

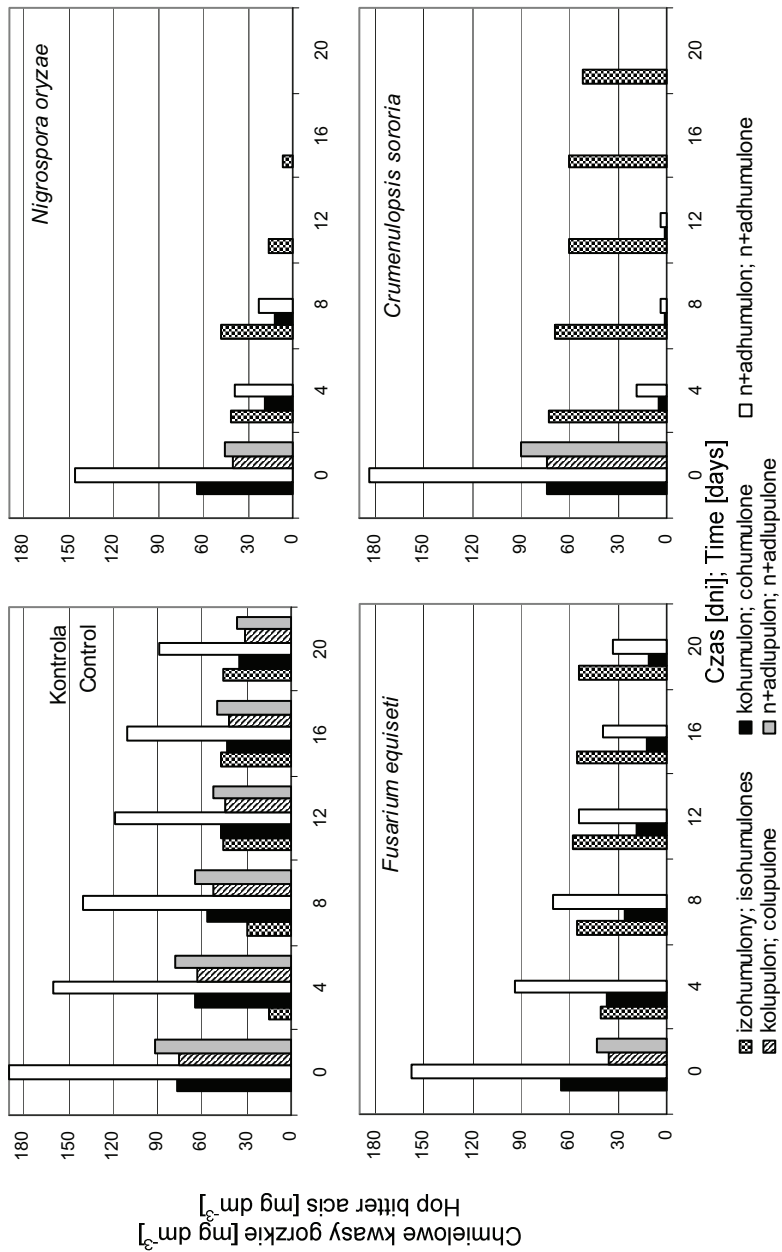
^a oznaczone metodą HPLC,
determined according to HPLC

2.2.2. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez wyselekcjonowane grzyby

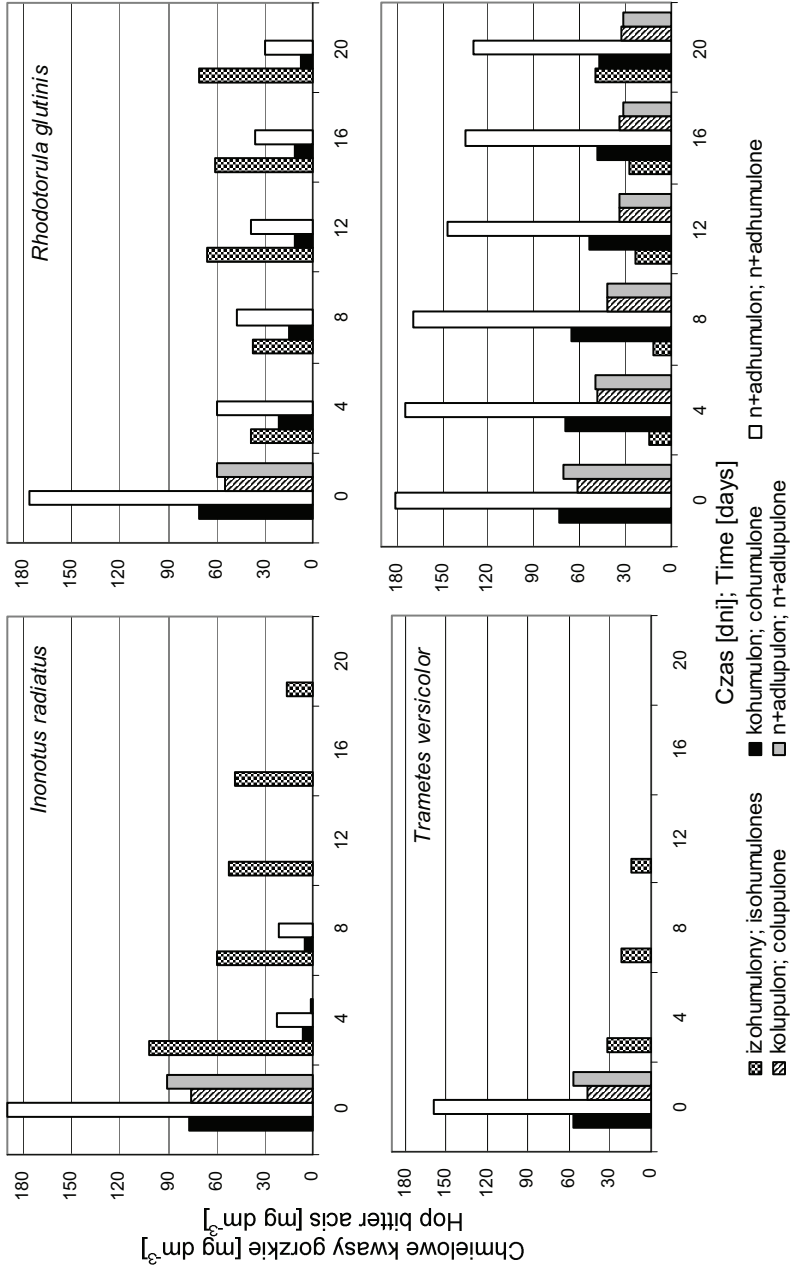
Przedstawione w tym rozdziale wyniki badań zostały opublikowane w dwóch artykułach: „Degradation of hop bitter acids by fungi” [91] i „The implication of yeast in debittering of spent hops” [89].

Dla wyłonionych na drodze selekcji 9 grzybów przeprowadzono badania mające określić ich zdolność do rozkładu gorzkich kwasów chmielowych w ciemności. Jak wspomniano w rozdziale 1.3, humulony, lupulony i izo- α -kwasy są wrażliwe na działanie światła. Wpływu tego czynnika nie brano pod uwagę w badaniach selekcyjnych, tak więc nie ustalono, w jakim stopniu enzymy obecne w prehodowlach odpowiadają za ubytek dodawanych związków. Do kultur znajdujących się w stacjonarnej fazie wzrostu dodawano ekstrakt chmielowy, uzyskując stężenie α - i β -kwasów równe $444,3 \text{ mg dm}^{-3}$. Sucha masa drobnoustrojów w tych hodowlach wynosiła: *Nigrospora oryzae* (5 dni) – $7,0 \text{ g dm}^{-3}$, *Rhodotorula glutinis* (3 dni) – $8,5 \text{ g dm}^{-3}$, *Trametes versicolor* (3 dni) – $3,2 \text{ g dm}^{-3}$, *Crumenulopsis sororia* (9 dni) – $1,4 \text{ g dm}^{-3}$, *Inonotus radiatus* (10 dni) – $2,6 \text{ g dm}^{-3}$, *Coryneum betulinum* (4 dni) – $3,1 \text{ g dm}^{-3}$, *Cryptosporiopsis radicola* (4 dni) – $2,4 \text{ g dm}^{-3}$, *Fusarium equiseti* (5 dni) – $7,3 \text{ g dm}^{-3}$, *Candida parapsilosis* (3 dni) – $10,3 \text{ g dm}^{-3}$. Przez 20 dni w odstępach czterodniowych oznaczano zawartość kwasów gorzkich, w tym tworzących się izo- α -kwasów, a także pH mieszaniny reakcyjnej. Rezultaty tych eksperymentów pokazano na rysunkach 23 i 24.

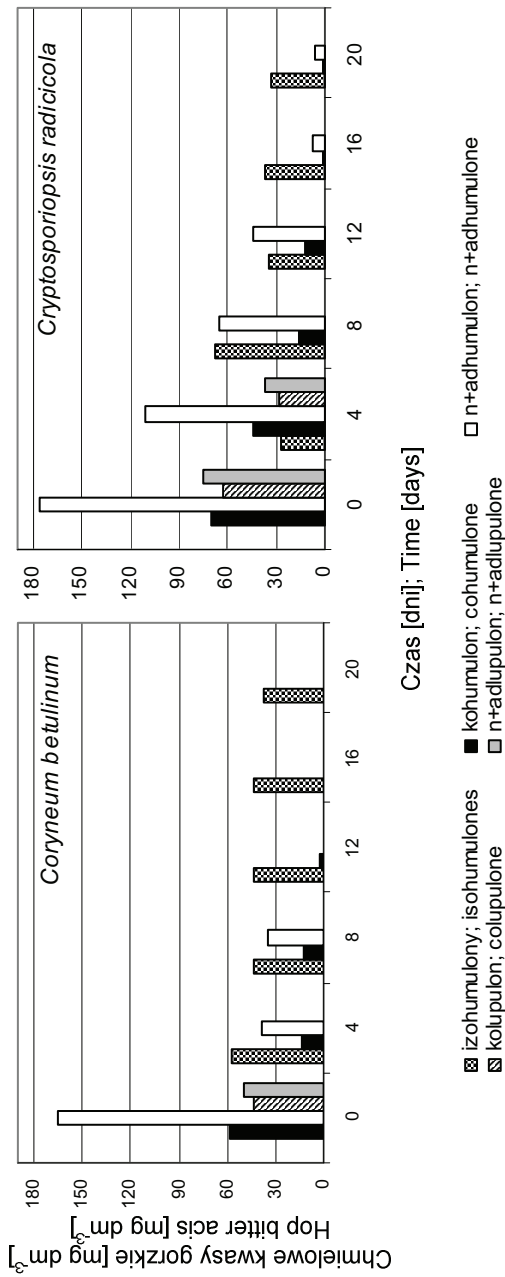
a)



b)



c)

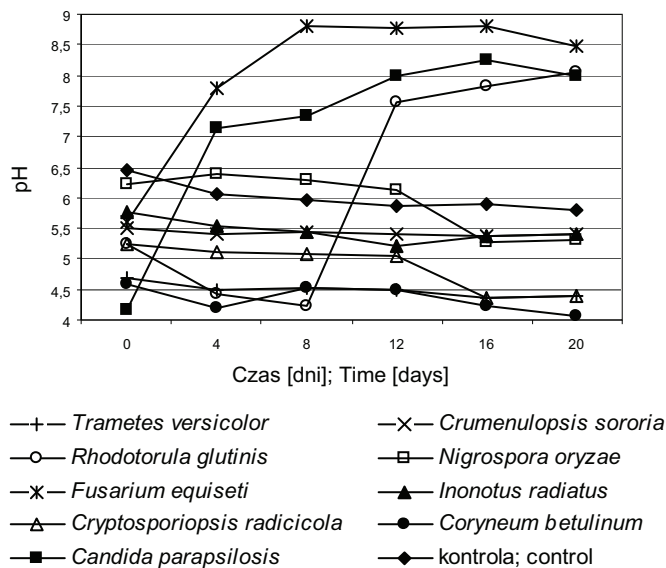


Rys. 23. Skład gorzkich kwasów chmielowych w kontroli i hodowlach: a) *Fusarium equiseti*, *Crumenulopsis sosoria*, *Nigrospora oryzae*, *Inonotus radiatus*, *Rhodotorula glutinis*, *Trametes versicolor*, *Candida parapsilosis*, c) *Coryneum betulinum* i *Cryptosporiopsis radicicola* podczas 20-dniowej inkubacji z ekstraktem chmielowym w ciemności

Fig. 23. Composition of hop bitter acids in control and culture of: a) *Fusarium equiseti*, *Crumenulopsis sosoria*, *Nigrospora oryzae*, *Inonotus radiatus*, *Rhodotorula glutinis*, *Trametes versicolor*, *Candida parapsilosis*, c) *Coryneum betulinum* and *Cryptosporiopsis radicicola* during 20 days of incubation with hop extract in darkness

Jak widać na rys. 23, ilość wyekstrahowanych gorzkich kwasów chmielowych z hodowli jest mniejsza niż w przypadku próby kontrolnej. Zjawisko to może wynikać z wiązania się humulonów i lupulonów z białkami obecnymi w medium hodowlanym oraz ze ścianami komórkowymi drobnoustrojów [56]. Tego typu związki fenolowe w wodnych roztworach o niskim pH wiążą białka, prawdopodobnie poprzez oddziaływanie hydrofobowe, co powoduje obniżenie wydajności ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi.

W eksperymentach kontrolnych obniżenie zawartości humulonów i lupulonów po 20 dniach sięgało 56%. W tym samym czasie powstało 46,4 mg dm⁻³ izohumulonów. Pojawiały się one również we wszystkich hodowlach, najwięcej w kulturze *Inonotus radiatus* (102 mg dm⁻³), a najmniej w kulturze *Trametes versicolor* (32 mg dm⁻³), w której omawiane związki rozkładane były najszybciej.



Rys. 24. Wartości pH pożywki Sabourauda (kontrola) i badanych kultur w czasie 20-dniowej inkubacji z ekstraktem chmielowym

Fig. 24. pH of Sabouraud medium (control) and of the tested culture broths during 20 days of incubation with hop extract

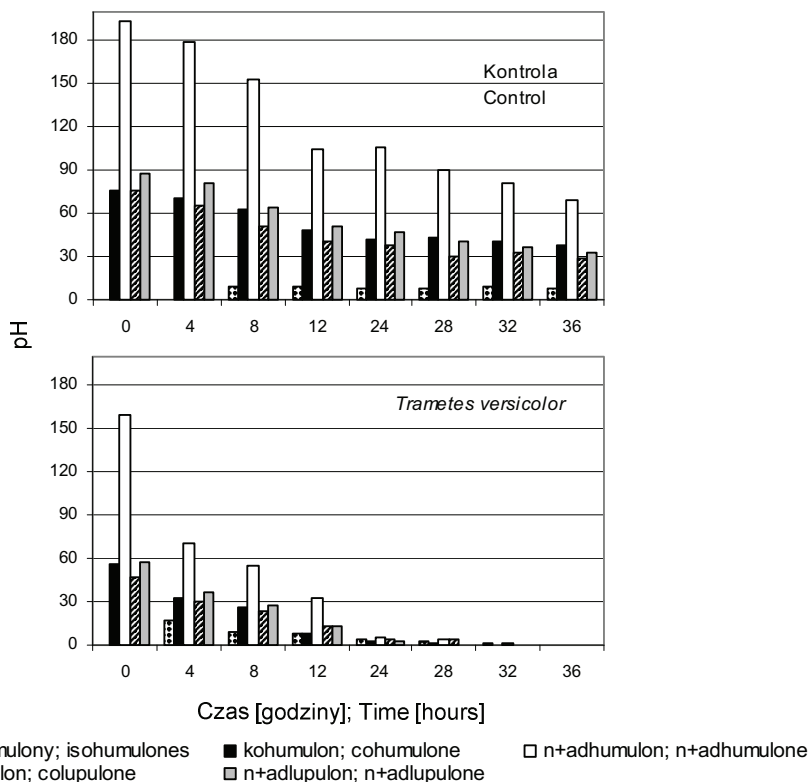
Zmiany pH zachodzące w hodowlach podczas inkubacji z ekstraktem chmielowym (rys. 24) pokazują zależność pomiędzy wysokim pH kultury a niską efektywnością rozkładu. Grzyby *Candida parapsilosis*, *Fusarium equiseti* i *Rhodotorula glutinis*, których pH hodowli wynosiło ok. 8, degradowały gorzkie kwasy chmielowe mniej efektywnie niż pozostałe drobnoustroje. Należy tu wspomnieć, że wszystkie próby tuż przed ekstrakcją były zakwaszane do pH ok. 2 w celu przeprowadzenia kwasów gorzkich

w niezdysocjowane, a więc w formy dające się wydajniej ekstrahować. W badaniach selekcyjnych, prowadzonych w warunkach laboratoryjnych, przy czasowym naświetlaniu światłem słonecznym, omawiane grzyby prowadziły degradację wydajniej. Jedną z możliwych przyczyn może być swoisty synergizm fotolizy i biodegradacji, który nie ma miejsca w doświadczeniach prowadzonych w ciemności. W przypadku drożdży pojawiły się uzasadnione podejrzenia, że w ich hodowlach produkowana jest ryboflawina działająca jak fotosensytyzer (patrz rozdz. 1.3). Natomiast *Fusarium equiseti* jest fitopatogenem należącym do rodzaju znanego z wytwarzania fitotoksyn indukujących powstawanie reaktywnych form tlenu, które w naturze mają za zadanie niszczyć błony komórkowe gospodarza, a w opisanych wyżej doświadczeniach sprzyjać mogły rozkładowi badanych substancji goryczkowych [75].

2.2.2.1. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez *Trametes versicolor*

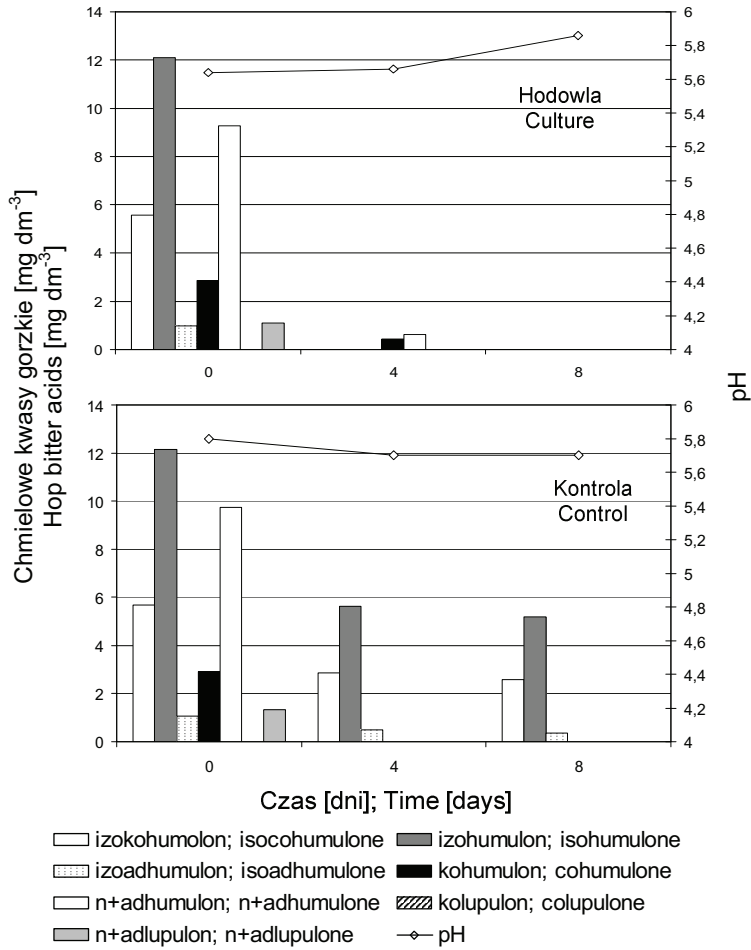
Dla *Trametes versicolor*, grzybów najefektywniej rozkładających humulony i lupulony z ekstraktu chmielowego, przeprowadzono eksperyment, w którym kwasy gorzkie rozkładane były w warunkach zdefiniowanego naświetlania. Zastosowano do tego celu lampę jarzeniową. Jak pokazano na rys. 25, już po 36 godzinach nie obserwowano gorzkich kwasów. W tym samym czasie w próbach kontrolnych pozostało 39% dodanych α - i β -kwasów oraz powstało 8,12 mg dm⁻³ izo- α -kwasów. Następstwem tych obiecujących wyników stały się próby rozkładu w analogicznych warunkach kwasów gorzkich zawartych w wychmielinach. Badania rozpoczęto od określenia minimalnego czasu pasteryzacji wychmielin. Ustalono, że 36 godzin ekspozycji na temperaturę 85°C powoduje wyjałowienie wychmielin, a przy tym zmianę składu gorzkich kwasów – przybywało izo- α -kwasów, a ubywało α - i β -kwasów. Wprowadzenie 10 g jałowych wychmielin do 100 cm⁻³ kultury *T. versicolor* dawało stężenie gorzkich kwasów równe 33,6 mg dm⁻³ (14,2 mg dm⁻³ α - i β -kwasów oraz 19,4 mg dm⁻³ izo- α -kwasów).

Chociaż w doświadczeniu tym początkowe stężenie gorzkich kwasów było znacznie niższe niż przy dodawaniu ekstraktu chmielowego (440 mg dm⁻³), to proces ich degradacji zachodził wolniej, co przedstawia rysunek 26. Przyczyny tego zjawiska mogą być różne. Wychmieliny tworzące nietransparentną i gęstą zawiesinę w hodowli drobnoustrojów zmniejszały dostęp światła, mającego pozytywny wpływ na rozkład gorzkich kwasów chmielowych. Poza tym obecność wielu dodatkowych, bliżej nieokreślonych związków mogła obniżać aktywność enzymów drobnoustrojów. Wychmieliny zawierają duże ilości białek, które w niskim pH wiążą gorzkie kwasy [56], co prawdopodobnie utrudniało kontakt z enzymami biorącymi udział w biodegradacji.



Rys. 25. Skład gorzkich kwasów chmielowych w hodowli *Trametes versicolor* i kontroli podczas 36 godzin inkubacji z wychmielinami na świetle
 Fig. 25. Composition of hop bitter acids in *Trametes versicolor* culture and control during 36 hours of incubation with hop extract in the light

Grzyby z gatunku *Trametes versicolor* zostały wcześniej rozpoznane jako efektywnie degradujące różne biologicznie aktywne związki, np. herbicyd primisulfuron [21], stosowany w mydłach środek antybakteryjny i przeciwgrzybiczny triclosan [88], rakotwórczy i oporny na mikrobiologiczną degradację perchloroetylen [121]. Całe komórki, a także wytwarzana przez nie lakkaza stosowane są do dekoloryzacji ścieków [87, 146]. Przy wybielaniu ścieków pochodzących z przemysłu papierniczego sam proces fotolizy powodował 9% odbarwienie, natomiast fotokataliza z użyciem *T. versicolor* – 42% odbarwienie [146]. Przytoczone dane wskazują, że omawiane grzyby dysponują bogatym systemem enzymatycznym, bardzo użytecznym w rozmaitych procesach rozkładu.



Rys. 26. Skład gorzkich kwasów chmielowych w hodowli *Trametes versicolor* i kontroli podczas 8 dni inkubacji z wychmielinami

Fig. 26. Composition of hop bitter acids in *Trametes versicolor* culture and control during 8 days of incubation with spent hops

2.2.2.2. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez *Candida parapsilosis*

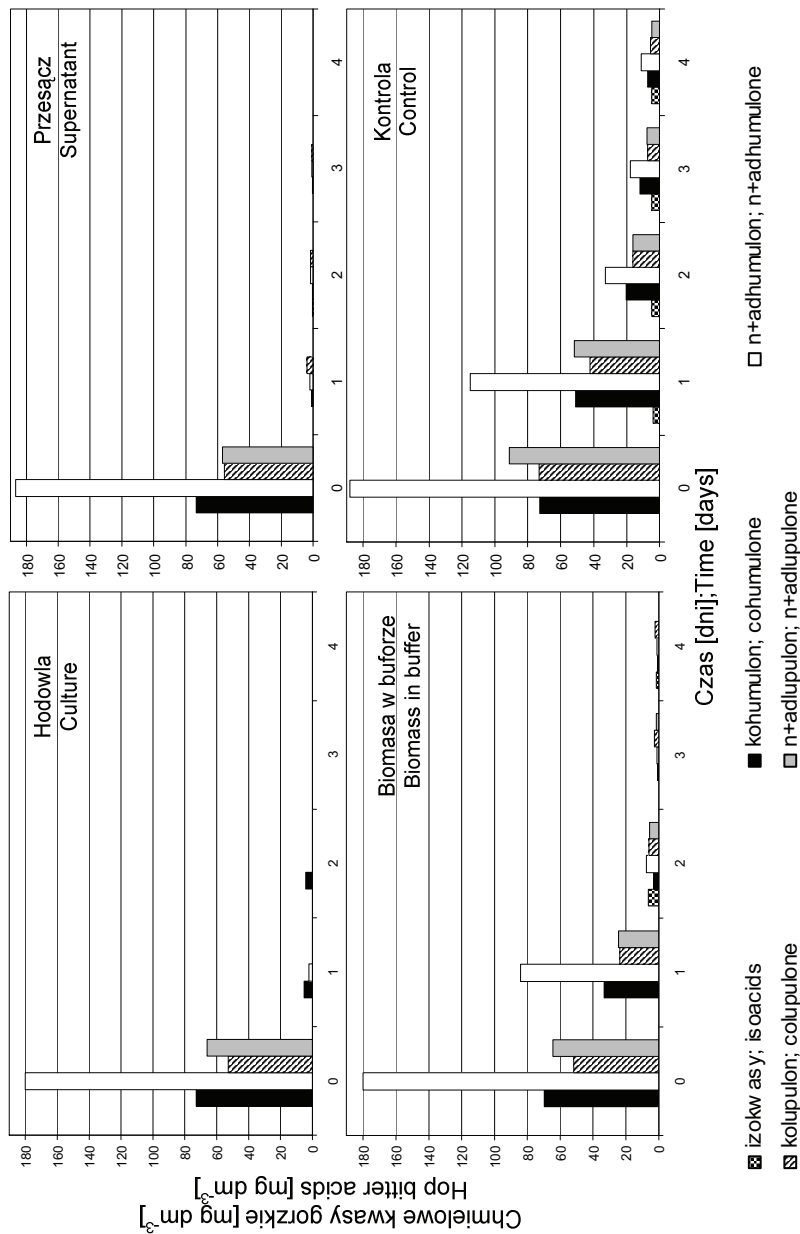
Wyniki badań z udziałem drożdży *Candida parapsilosis* zamieszczone w tab. 4 i na rys. 23b wskazują, że proces degradacji gorzkich kwasów chmielowych w hodowlach tych drobnoustrojów w znacznym stopniu zależy od warunków, w których jest prowadzony. Gdy eksperymenty przeprowadzono przy naświetlaniu światłem słonecznym, po 7 dniach obserwowano całkowitą degradację, natomiast analogiczne doświadczenie przeprowadzone w ciemności, dawało rezultaty gorsze niż w próbach kontrolnych. W celu określenia optymalnych warunków rozkładu gorzkich kwasów przez *C. parapsilosis* ekstrakt chmielowy dodawano do 3-dniowej hodowli, przesącza pohodowlanego z 3-dniowej hodowli oraz biomasy z 3-dniowej hodowli zawieszanej w buforze fosforanowym o pH 7,2. Jak wynika z danych rys. 27, całkowity zanik dodanych α - i β -kwasów, a także powstających izo- α -kwasów, następuje najszybciej, bo już w 3 dobie po dodaniu do 3-dniowej hodowli.

Po 24 godzinach inkubacji z ekstraktem chmielowym zawartość badnych substancji goryczkowych w hodowli i supernatancie była podobna: 2,8 i 2,4%, natomiast w przypadku biomasy zawieszanej w buforze, w tym samym czasie, pozostało jeszcze 63% gorzkich kwasów w odniesieniu do ich zawartości w kontroli.

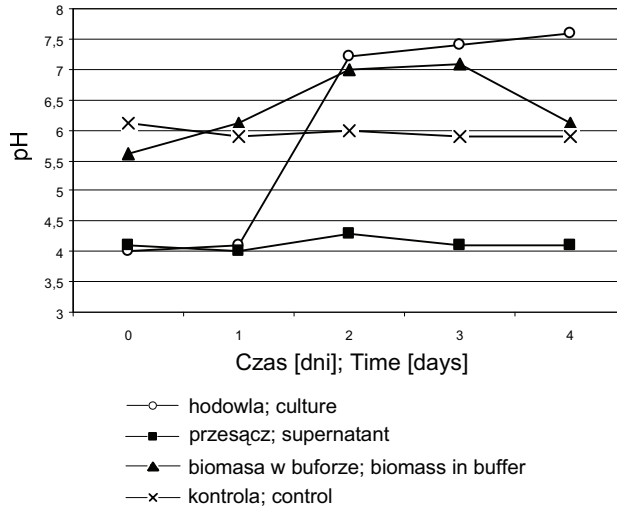
Rysunek 28 przedstawia zmiany pH w opisywanych mieszaninach biotransformacyjnych i kontroli, zachodzące podczas 4-dniowej inkubacji. Nie obserwuje się jednoznacznej zależności pomiędzy odczynem a degradacją, która zachodziła efektywnie zarówno w supernatancie o pH wynoszącym około 4, jak i hodowli o pH sięgającym po drugiej dobie wartości 7,5. Można więc przypuszczać, że za rozkład gorzkich kwasów odpowiadają enzymy zewnątrzkomórkowe, przy czym należy mieć na uwadze zdolność *C. parapsilosis* do wytwarzania ryboflawiny, pozytywnie wpływającej na fotolizę tych związków (patrz rozdz. 1.3).

Współzależność pomiędzy suchą masą drożdży a ilością powstającej w hodowli ryboflawiny pokazuje rysunek 29.

Uzupełnieniem tych danych stało się doświadczenie polegające na rozkładzie gorzkich kwasów chmielowych dodawanych do hodowli w różnym wieku. Tak jak przewidywano, im starsza była hodowla w momencie dodawania ekstraktu chmielowego, tym mniej związków goryczkowych oznaczano po 1 dniu inkubacji (rys. 30).

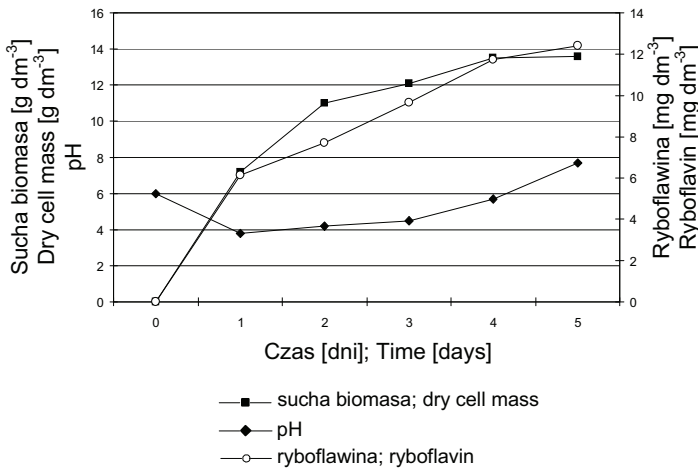


Rys. 27. Skład gorzkich kwasów chmielowych w 3-dniowej hodowli, przesączu z 3-dniowej hodowli oraz w zawiesinie biomasy z 3-dniowej hodowli *Candida parapsilosis* w buforze fosforanowym podczas 4 dni inkubacji z ekstraktem chmielowym
 Fig. 27. Composition of hop bitter acids in 3-days old culture, supernatant of 3-days old culture and suspension of biomass of 3-days old *Candida parapsilosis* culture in phosphate buffer during 4 days of incubation with hop extract



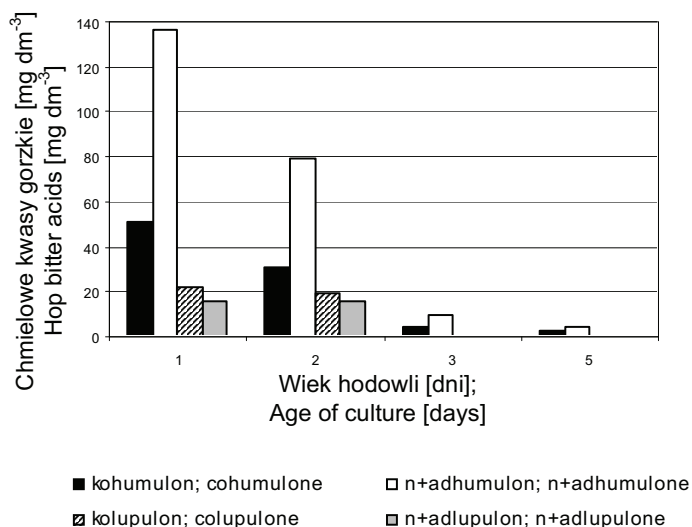
Rys. 28. pH w 3-dniowej hodowli, przesączu z 3-dniowej hodowli oraz w zawiesinie biomasy z 3-dniowej hodowli *Candida parapsilosis* w buforze fosforanowym podczas 4 dni inkubacji z ekstraktem chmielowym

Fig. 28. pH of 3-days old culture, supernatant of 3-days old culture and suspension of biomass of 3-days old *Candida parapsilosis* culture in phosphatebuffer during 4 days of incubation with hop extract



Rys. 29. Zależność pomiędzy przyrostem biomasy, ryboflawiny i zmianami pH w hodowli *Candida parapsilosis*

Fig. 29. Correlation between cell growth, riboflavin, and pH of *Candida parapsilosis* culture over time



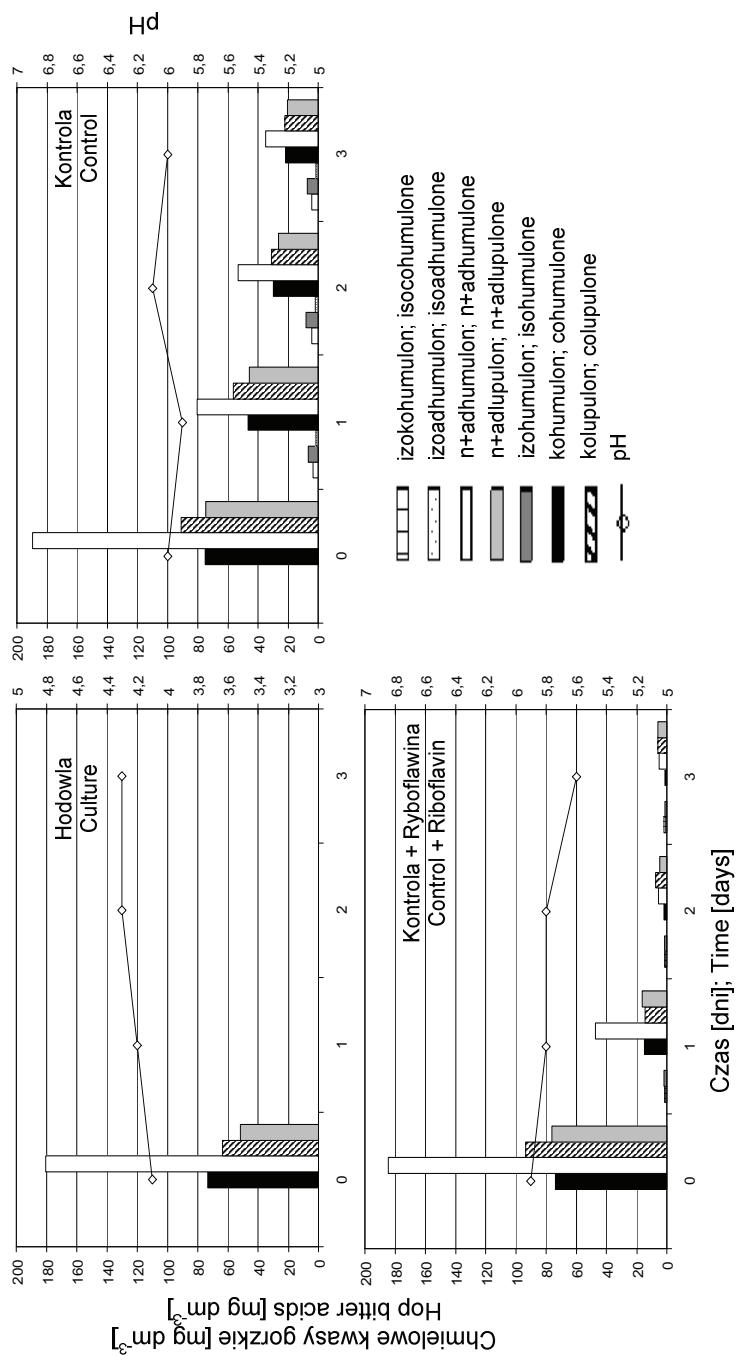
Rys. 30. Skład gorzkich kwasów chmielowych po 1 dniu inkubacji ekstraktu chmielowego w hodowlach *Candida parapsilosis* o różnym wieku

Fig. 30. Composition of hop bitter acids after 1-day of incubation with hop extract in *Candida parapsilosis* cultures versus age of culture

W hodowlach znajdujących się w fazach spowolnienia i stacjonarnej, tj. 3- i 5-dniowej pozostało jedynie 1,5 i 3% dodanych gorzkich kwasów, a w hodowli 1-dniowej będącej w fazie wykładniczej – 51% rozkładanych związków.

Jednym z ważniejszych czynników wpływających na rozkład gorzkich kwasów chmielowych jest temperatura [26, 106], dlatego dla porównania przebiegu procesu degradacji zachodzącego w temp. 25°C po dodaniu ekstraktu chmielowego do 3-dniowej hodowli *C. parapsilosis* (rys. 27) przeprowadzono analogiczny eksperyment w temperaturze 40°C.

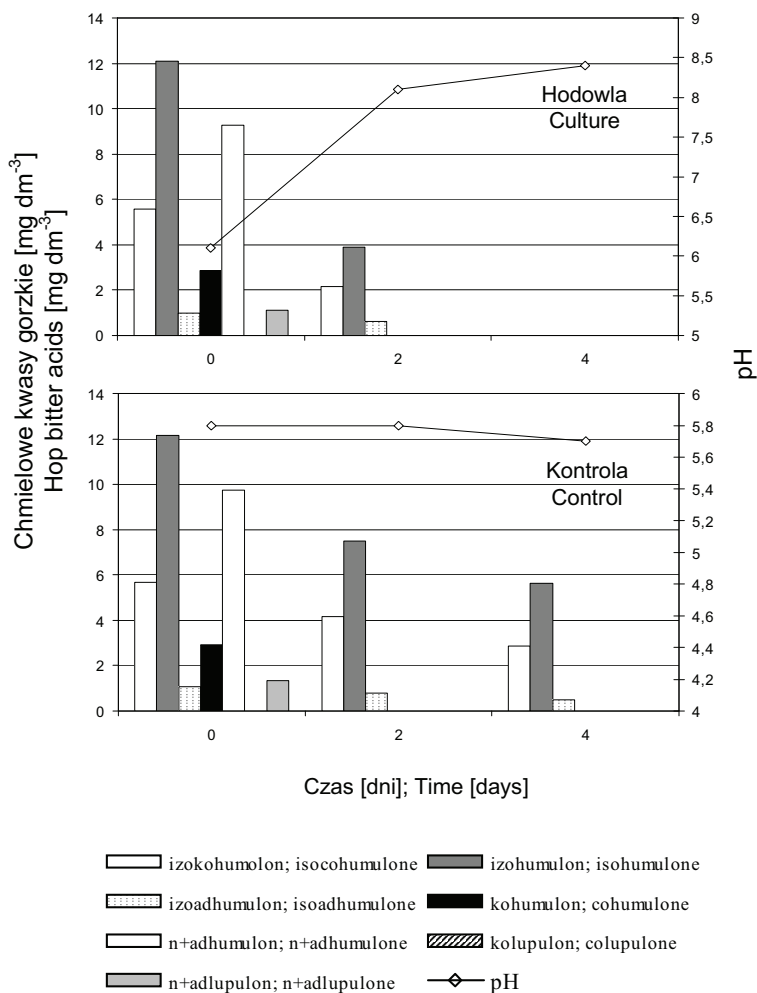
Dodatkowo, oprócz próby kontrolnej, polegającej na inkubacji ekstraktu chmielowego w sterylnej pożywce, kontrolę rozszerzono o sterylną pożywkę zawierającą ryboflawinę o stężeniu 9,66 mg dm⁻³, odpowiadającym zawartości tej witaminy w 3-dniowej hodowli *C. parapsilosis*. Ocena wyników tych doświadczeń, pokazanych na rys. 31, prowadzi do wniosków, że podniesienie temp. z 25 do 40°C skraca czas potrzebny do całkowitego rozkładu badanych substancji goryczkowych z trzech dni do jednej doby, oraz że nie tylko sama ryboflawina odpowiada za degradację kwasów gorzkich w hodowli omawianych drożdży. Po 24 godzinach reakcji w hodowli nie obserwowano gorzkich kwasów, natomiast w próbach kontrolnych, bez i z dodatkiem ryboflawiny, pozostało ich jeszcze odpowiednio 37 i 22%.



Rys. 31. Skład gorzkich kwasów chmielowych w hodowli *Candida parapsilosis* podczas 4 dni inkubacji z ekstraktem chmielowym w temp. 40°C

Fig. 31. Composition of hop bitter acids in *Candida parapsilosis* cultures during 4 days of incubation with hop extract at 40°C

Podobnie jak w przypadku grzybów *Trametes versicolor* podjęto próbę rozkładu gorzkich kwasów obecnych w wychmielinach w hodowli *Candida parapsilosis*. Jak widać na rys. 32, po 4 dobach inkubacji wychmielin w hodowli *C. parapsilosis* gorzkie kwasy zostały całkowicie rozłożone przy relatywnie wysokim pH. Rezultat ten, chociaż lepszy niż przy zastosowaniu *T. versicolor*, jest gorszy niż przy rozkładzie gorzkich kwasów z ekstraktu chmielowego w hodowlach obydwu grzybów (rys. 25 i 27). Można przypuszczać, że przyczyny tego zjawiska w obu przypadkach są podobne.



Rys. 32. Skład gorzkich kwasów chmielowych w hodowli *Candida parapsilosis* podczas 4 dni inkubacji z wychmielinami

Fig. 32. Composition of hop bitter acids in *Candida parapsilosis* cultures during 4 days of incubation with spent hops

Wydaje się, że stosowanie drożdży, szczególnie paszowych, powinno przynieść wyraźne korzyści przy fotodegradacji gorzkich kwasów chmielowych, ze względu na wytwarzanie znacznych ilości ryboflawiny pełniącej rolę fotosensytyzera oraz wzbogacenie wycmielin w witaminy i inne cenne substancje odżywcze podnoszące wartość tego odpadu jako dodatku do paszy. Jak się okazało, żaden z badanych gatunków drożdży mających zastosowanie w przemyśle spożywczym nie wykazywał zdolności do efektywnej degradacji badanych związków goryczkowych. Wyłoniony na drodze selekcji szczep drożdży *Candida parapsilosis* NCAIM Y.01011 właściwości takie posiada, co potwierdzają dodatkowo doniesienia literaturowe o przydatności tych grzybów w procesach degradacji fenoli i estrów kwasu hydroksybenzoowego [47, 128]. Grzyby te jednak nie mogą stanowić elementu paszy, ponieważ – w pewnych przypadkach – wykazują działanie chorobotwórcze [36], przez co badania z ich udziałem mają jedynie charakter modelowy.

2.3. Mikrobiologiczne transformacje ksantohumolu

Część przedstawionych w tym rozdziale wyników, opisana w podrozdziałach 2.3.2 i 2.3.4, została opublikowana w artykule „Glycosylation of xanthohumol by fungi” [92].

2.3.1. Materiały i metody

Mikroorganizmy. Grzyby zastosowane do transformacji ksantohumolu pochodziły z następujących kolekcji: Katedry Biologii i Botaniki Akademii Medycznej we Wrocławiu (oznaczone AM), Katedry Fitopatologii Leśnej Akademii Rolniczej w Krakowie (oznaczone ARK), Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (oznaczone KCh) i NCAIM. Zastosowano też dostępne handlowo drożdże, oferowane przez firmę Coopers Brewery.

Warunki prowadzenia hodowli. Grzyby namnażano metodą wgłębną, wstrząsaną, w pożywce Sabourauda składającej się z 3% glukozy i 1% peptonu, w temperaturze 25°C. W badaniach selekcyjnych stosowano kolby Erlenmeyera o pojemności 100 ml, zawierające 25 ml podłoża. Przy powiększeniu skali transformacji używano kolb Erlenmeyera o pojemności 300 ml, zawierających 100 ml podłoża.

Warunki biotransformacji. Biotransformacje prowadzono w ciemności w warunkach opisanych wyżej. Przy selekcji drobnoustrojów do hodowli dodawano 10 mg ksantohumolu rozpuszczonego w 0,5 ml acetonu i mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 7 dni. Przy powiększeniu skali, do czterech kolb z hodowlą dodawano po 30 mg ksantohumolu rozpuszczonego w 2 ml acetonu, a reakcje prowadzono, w zależności od drobnoustroju, od 6 do 9 dni. Wszystkie eksperymenty realizowano w dwukrotnym powtórzeniu i z kontrolą (sterylna pożywka z substratem).

Wydzielanie i oczyszczanie produktów biotransformacji. Produkty biotransformacji ekstrahowano octanem etylu, odparowany ekstrakt rozpuszczano w metanolu i analizowano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Przy analizach TLC stosowano płytki aluminiowe z żelam krzemionkowym (60 F254, Merck) i eluent będący mieszaniną chloroformu oraz metanolu w stosunku 9:1. Analizy HPLC prowadzono przy użyciu chromatografu Waters 2690 Alliance, wyposażonego w detektor Waters 996 Photodiode Array Detector oraz

kolumnę analityczną Waters Spherisorb (5 μm ODS2 4,6 \times 250 mm), przy przepływie eluentu równym 1 ml min^{-1} . Jako eluent stosowano acetonitryl i 1% roztwór kwasu mrówkowego w gradiencie liniowym od 40 do 60% acetonitrylu. Produkty biotransformacji oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym 60 (230–400 mesh), eluent stanowiła mieszanina chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1.

Identyfikowanie produktów biotransformacji. Widma magnetycznego rezonansu jądrowego: ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT–135, 2D ^1H – ^1H NMR (COSY) oraz 2D ^1H – ^{13}C NMR wykonano przy użyciu spektrometru NMR Bruker Avance 600 MHz. Próbkę rozpuszczano w DMSO- d_6 lub acetonie- d_6 . Widma w ultrafiolecie wykonano za pomocą spektrofotometru UV Visible Spectrofotometer Cintra 20, GBS, w metanolu. Skręcalność optyczną mierzono na polarymetrze Autopol IV Rudolph, w metanolu. Masę molekularną określono, stosując spektrometr masowy Bruker micrOTOF-Q. Dichroizm kołowy określono przy użyciu aparatu JASCO J-715, w metanolu.

Ksantohumol. Ksantohumol izolowano z wychmielin pochodzących z Instytutu Nawozów Sztucznych w Puławach, powstających podczas ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla szyszek chmielowych odmiany „Marynka”, zebranych w 2005 roku. Stosowano ekstrakcję octanem etylu, połączoną z sonifikacją. Ekstrakt po odparowaniu poddawano rozdzielaniu metodą chromatografii kolumnowej, wykorzystując żel Sephadex – LH 20 i metanol jako eluent. Otrzymane żółto-pomarańczowe kryształy poddano analizie NMR, której wyniki zamieszczone poniżej są zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi ksantohumolu [141, 174].

UV λ_{max} 365 nm. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 14,62 (1H, *s*, 2'-OH), 10,58 (1H, *s*, 4-OH), 10,08 (1H, *s*, 4'-OH), 7,73 (1H, *d*, J = 15,5 Hz, Ha C=O), 7,64 (1H, *d*, J = 15,5 Hz, H β C=O), 7,53 (2H, *d*, J = 8,5 Hz, H-2, H-6), 6,80 (2H, *d*, J = 8,4 Hz, H-3, H-5), 6,05 (1H, *s*, H-5'), 5,10 (1H, *t*, J = 6,9 Hz, H-2''), 3,83 (3H, *s*, O-Me), 3,10 (2H, *d*, J = 6,9 Hz, H-1''), 1,66 (3H, *s*, H-4''), 1,56 (3H, *s*, H-5''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 192,1 (C=O), 165,0 (C-2'), 162,8 (C-4'), 160,9 (C-6'), 160,3 (C-4), 142,9 (C- β), 130,3 (C-3''), 130,1 (C-2, C-6), 126,5 (C-1), 124,2 (C- α), 123,4 (C-2''), 116,4 (C-3, C-5), 107,8 (C-3'), 104,9 (C-1'), 91,4 (C-5'), 56,1 (C6'-O-Me), 25,9 (C-5''), 21,5 (C-1''), 18,1 (C-4'').

Wydajność izolacji wynosiła 5,17 mg ksantohumolu z 1 g wychmielin.

4'-O- β -D-glukozylo-2',4-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkon (**42**): (32,0 mg, wydajność 18,3%) UV λ_{max} 366 nm. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 14,21 (1H, *s*, 2'-OH), 10,13 (1H, *s*, 4-OH), 7,77 (1H, *d*, J = 15,5 Hz, Ha C=O), 7,72 (1H, *d*, J = 15,5 Hz, H β C=O), 7,61 (2H, *d*, J = 8,5 Hz, H-2, H-6), 6,86 (2H, *d*, J = 8,5 Hz, H-3, H-5), 6,42 (1H, *s*, H-5'), 5,35 (1H, *d*, J = 4,6 Hz, 2'''-OH), 5,19 (1H, *t*, J = 6,7 Hz, H-2''), 5,15 (1H, *s*, 3'''-OH), 5,11 (1H, *d*, J = 4,9 Hz, 4'''-OH), 5,01 (1H, *t*, J = 3,7 Hz, H-1''), 4,75 (1H, *d*, J = 5,4 Hz, 6'''-OH), 3,94 (3H, *s*, C-6'-O-Me), 3,76 (1H, *m*, H-6'''), 3,45 (1H, *m*, H-5'''), 3,43 (1H, *m*, H-6'''), 3,37 (1H, *m*, H-1''), 3,36 (1H, *m*, H-3'''), 3,33 (1H, *m*, H-2'''), 3,13 (1H, *m*, H-1''), 3,13 (1H, *m*, H-4'''), 1,74 (3H, *s*, H-4''), 1,61 (3H, *s*, H-5''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 193,0 (C=O), 163,6 (C-2'), 161,6 (C-4'), 160,9 (C-6'), 160,7 (C-4), 143,8 (C- β), 130,6 (C-3''), 131,2 (C-2, C-6), 126,3 (C-1), 124,0 (C- α), 123,3 (C-2''), 116,5 (C-3, C-5), 110,0 (C-3'), 106,7 (C-1'), 100,6 (C-1''), 91,1 (C-5'), 78,0 (C-5''), 77,4 (C-3'''), 73,8 (C-2'''), 70,6 (C-4'''), 61,4 (C-6'''), 56,5 (C-6'-O-Me), 26,0 (C-5''), 21,7 (C-1''), 18,2 (C-4'').

4'-*O*- β -D-4''''-metoksy-glukozylo-2',4-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkon (**43**): (44,4 mg, wydajność 24,7%) UV λ_{\max} 366 nm. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 14,21 (1H, s, 2'-OH), 10,15 (1H, s, 4-OH), 7,76 (1H, d, J = 15,5 Hz, H α C=O), 7,72 (1H, d, J = 15,5 Hz, H β C=O), 7,61 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-2), 6,86 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-3, H-5), 6,39 (1H, s, H-5'), 5,44 (1H, d, J = 5,5 Hz, 2'''-OH), 5,32 (1H, d, J = 5,6 Hz, H-3'''-OH), 5,19 (1H, t, J = 6,7 Hz, H-2''), 5,04 (1H, d, J = 7,8 Hz, H-1'''), 4,85 (1H, d, J = 5,4 Hz, 6'''-OH), 3,93 (3H, s, O-Me), 3,69 (1H, m, H-6'''), 3,52 (1H, m, H-4'''), 3,51 (1H, m, H-6'''), 3,47 (3H, s, C-4'''-O-Me), 3,45 (1H, m, H-3'''), 3,35 (1H, m, H-1''), 3,32 (1H, m, H-2'''), 3,13 (1H, dd, J = 13,8, 6,7 Hz, H-1''), 3,0 (1H, t, J = 9,0 Hz, H-5'''), 1,74 (3H, s, H-4''), 1,61 (3H, s, H-5''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 193,0 (C=O), 163,6 (C-2'), 161,5 (C-4'), 160,9 (C-6'), 160,6 (C-4), 143,8 (C- β), 130,6 (C-3''), 131,2 (C-2, C-6), 126,4 (C-1), 124,1 (C- α), 123,2 (C-2''), 116,5 (C-3, C-5), 110,0 (C-3'), 106,7 (C-1'), 100,2 (C-1'''), 91,0 (C-5'), 79,8 (C-5'''), 77,1 (C-3'''), 76,5 (C-4'''), 74,0 (C-2'''), 60,9 (C-6'''), 60,2 (C-4'''-O-Me), 56,5 (C-6'-O-Me), 26,0 (C-5''), 21,7 (C-1''), 18,2 (C-4'').

3'-(3'''-metylo-3''-hydroksy-butylo)-2',4,4'-trihydroksy-6'-metoksychalkon (**44**) : (63,9 mg, wydajność 53,3%) UV λ_{\max} 366 nm. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 14,61 (1H, s, 2'-OH), 10,47 (1H, s, 4-OH), 10,07 (1H, s, 4'-OH), 7,78 (1H, d, J = 15,5 Hz, H α C=O), 7,68 (1H, d, J = 15,5 Hz, H β C=O), 7,58 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-2, H-6), 6,85 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-3, H-5), 6,10 (1H, s, H-5'), 4,14 (1H, s, 3''-OH), 3,94 (3H, s, C6'-O-Me), 2,49 (2H, m, H-1''), 1,48 (2H, m, H-2''), 1,14 (6H, s, H-4'', H-5''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 192,2 (C=O), 165,2 (C-2'), 163,0 (C-4'), 160,8 (C-6'), 160,4 (C-4), 142,9 (C- β), 131,0 (C-2, C-6), 126,6 (C-1), 124,4 (C- α), 116,5 (C-3, C-5), 109,0 (C-3'), 105,0 (C-1'), 91,4 (C-5'), 69,5 (C-3''), 56,2 (C6'-O-Me), 43,1 (C-2''), 29,6 (C-4'', C-5''), 17,7 (C-1'').

2''-(2'''-hydroksyizopropyl)-dihydrofuranol[2'',3'':4',3']-2',4-dihydroksy-6'-metoksychalkon (**45**): (6,8 mg, wydajność 5,7%) $[\alpha]_D^{+20,45^\circ}$ (c 0,493; MeOH). UV λ_{\max} 370 nm. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 14,61 (1H, s, 2'-OH), 7,86 (1H, d, J = 15,5 Hz, H α C=O), 7,74 (1H, d, J = 15,5 Hz, H β C=O), 7,61 (2H, d, J = 8,4 Hz, H-2, H-6), 6,91 (2H, d, J = 8,4 Hz, H-3, H-5), 6,09 (1H, s, H-5'), 4,77 (1H, dd, J = 7,9 Hz, 1,7 Hz, H-2''), 3,99 (3H, s, C6'-O-Me), 3,73 (1H, br. s, 2'''-OH), 3,09 (1H, dd, J = 7,9 Hz, 7,2 Hz, H-3'a), 3,03 (1H, dd, J = 9,6 Hz, 5,4 Hz, H-3'b), 1,27 (3H, s, H-1''') 1,23 (3H, s, H-3'''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 194,4 (C=O), 169,3 (C-2'), 165,8 (C-4'), 164,2 (C-6'), 161,6 (C-4), 144,2 (C- β), 132,2 (C-2, C-6), 127,0 (C-1), 126,2 (C- α), 117,8 (C-3, C-5), 107,8 (C-3'), 107,6 (C-1'), 93,7 (C-2''), 87,8 (C-5'), 57,6 (C6'-O-Me), 28,4 (C-3''), 27,0 (C-3'''), 26,74 (C-1''').

Mieszanina (2*R*, 2''*S*)- i (2*R*, 2''*R*)-2''-(2'''-hydroksyizopropyl)-dihydrofuranol-[2'',3'':7,8]-4'-hydroksy-5-metoksyflawanonu (**46a i 46b**): (46,6 mg, wydajność 38,8%) $[\alpha]_D^{+38,65^\circ}$ (c 0,702; MeOH); UV λ_{\max} 291 nm; ESIMS (10 eV) $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ 371,1440 (obliczony dla $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$ H 371,1489); $[\theta]_{289} = 11,83$; ^1H NMR (aceton- d_6): δ = 7,378/7,374 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-2', H-6'), 6,890/6,887 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-3', H-5'), 6,120/6,119 (1H, s, H-6), 5,43/5,42 (1H, dd, J = 12,6 Hz, 3,0 Hz, H-2), 4,738/4,731 (1H, dd, J = 9,5 Hz, 7,8 Hz, H-2''), 3,793 (6H, s, C5-O-Me), 3,094/3,042 (4H, m, H-3''), 2,980/2,978 (2H, dd, J = 16,2 Hz, 12,6 Hz, H-3 α), 2,61/2,64 (1H, dd, J = 16,2 Hz, 3,0 Hz, H-3 β), 1,264/1,259 (3H, s, H-1'''), 1,208/1,201 (3H, s, H-3'''). ^{13}C NMR (aceton- d_6): δ = 188,93 (C=O), 168,50/168,47 (C-9), 164,97/164,93 (C-7), 161,05/160,95 (C-5), 159,51 (C-4'), 132,30 (C-1''), 129,75 (C-2', C-6'), 117,13 (C-3', C-5'), 107,49/107,45

(C-8), 107,41/107,32 (C-10), 93,41/93.36 (C-2''), 89,53/89,51 (C-6), 80,63/80,54 (C-2), 72,37 (C-2'''), 57,31 (C5-O-Me), 47,36/47,28 (C-3), 28,77/28,68 (C-3''), 26,97/26,91 (C-1'''), 26,63/26,50 (C-3''').

2.3.2. Selekcja drobnoustrojów transformujących ksantohumol

Badania selekcyjne przeprowadzone na 29 drobnoustrojach wyłoniły 11 grzybów, zdolnych do transformacji ksantohumolu (tab. 5).

Tabela 5
Table 5

Selekcja grzybów transformujących ksantohumol
Screening for xanthohumol transforming fungi

Drobnoustroje Microorganisms	*
<i>Fusarium equiseti</i> AM15	+
<i>Poria placenta</i> ARK2213	-
<i>Verticillium</i> sp. AM424	-
<i>Candida viswanathi</i> AM120	-
<i>Spicaria fusispora</i> AM136	+
<i>Mortierella vinaceae</i> AM149	+
<i>Absidia glauca</i> AM177	+
<i>Botrytis cinerea</i> AM235	-
<i>Beauveria bassiana</i> AM278	+
<i>Stemphylium botryosum</i> AM279	+
<i>Absidia cylindrospora</i> AM336	+
<i>Aphanocladium album</i> AM417	-
<i>Spicaria divaricata</i> AM423	-
<i>Pezicula cinnamomea</i> ARK15753	+
<i>Mucor hiemalis</i> AM450	-
<i>Aspergillus ochraceus</i> AM456	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AM464	-
<i>Cunninghamella japonica</i> AM472	+
<i>Pleurotus ostreatus</i> AM482	-
<i>Laetiporus sulphurens</i> AM515	-
<i>Laetiporus sulphurens</i> AM525	-
<i>Trametes versicolor</i> AM536	+
<i>Penicillium notatum</i> KCh904	+
<i>Saccharomyces brasiliensis</i> NCAIM Y-1223	-
<i>Saccharomyces pasterianus</i> NCAIM Y-1244	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> PMI67	-
<i>Candida parapsilopsis</i> NCAIM Y-1011	-
<i>Candida kefyri</i> NCAIM Y-1070	-
Brewer's Yeast Real Ale COOPERS BREWERY	-

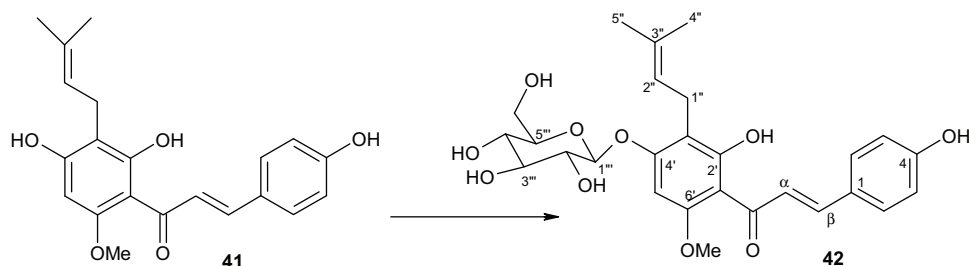
* Zdolność do transformacji ksantohumolu: (+) zdolny; (-) niezdolny
Capability of transformation of xanthohumol: (+) capable; (-) incapable

Dwa z nich, *Cunninghamella japonica* i *Penicillium notatum*, należały do rodzajów opisanych wcześniej jako transformujące ksantohumol [104]. Inne dwa grzyby: *Aspergillus flavus* i *Botrytis cinerea* znane są z transformacji prenylowanych flawonoidów [180]. Na przykładzie grzybów *Aspergillus ochraceus* AM456 przytoczone tu wyniki potwierdzają przydatność rodzaju *Aspergillus* do prowadzonych przez nas transformacji, natomiast w hodowlach *Botrytis cinerea* AM235 ksantohumol nie ulegał żadnym przekształceniom.

W dalszej części niniejszej pracy opisano wyniki transformacji ksantohumolu przez cztery wyselekcjonowane grzyby: *Absidia glauca*, *Beauveria bassiana*, *Pezizula cinnamomea* i *Fusarium equiseti*.

2.3.3. Transformacja ksantohumolu przez *Absidia glauca*

Po przeprowadzeniu trwającej 7 dni biotransformacji ksantohumolu (**41**) otrzymano 4'-*O*- β -D-glukozylo-2',4-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkon (**42**) (rys. 33) z wydajnością 18,3%.



Rys. 33. Transformacja ksantohumolu przez *Absidia glauca*
Fig. 33. Transformation of xanthohumol by *Absidia glauca*

Produkt ten powstał w wyniku *O*-glikozydacji ksantohumolu (**41**) w pozycji C-4', o czym świadczy jedenaście dodatkowych sygnałów na widmie ^1H NMR, pochodzących od protonów reszty cukrowej, położonych w rejonie δ 3,13–5,35 i sześć dodatkowych sygnałów na widmie ^{13}C NMR w zakresie δ 61,4–100,6. Przesunięcie sygnału od H-5' produktu (δ 6,42) w stronę niższego pola w stosunku do ksantohumolu (δ 6,05) sugeruje przyłączenie reszty cukrowej w pozycji C-4. Taki sam związek powstawał z wydajnością 5,5% podczas transformacji ksantohumolu przez *Penicillium chrysogenum* [104], a jego dane spektroskopowe, a także inne dane literaturowe potwierdzają, że do substratu przyłączona została β -D-glukopiranoza [98, 193].

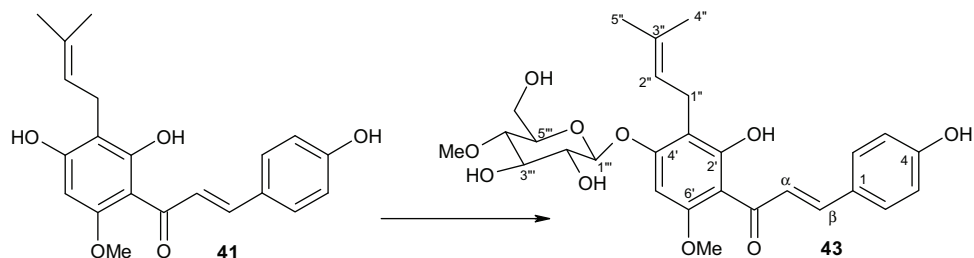
Sprzęganie ksenobiotyków z glukozą, kwasem glukuronowym, glicyną czy kwasami nieorganicznymi, zwane II fazą detoksykacji, zwiększa hydrofilowość związku i ułatwia jego usuwanie z organizmu. Flawonoidy często usuwane są z organizmu człowieka lub innych ssaków w formie glukuronidów [18, 68, 141, 144]. Większość naturalnie występujących flawonoidów to *O*-glikozydy, przeważnie zawierające glukozę [71],

jednak w świecie drobnoustrojów reakcja sprzężania z cukrami jest stosunkowo rzadko obserwowana. Jej skutkiem jest zwykle obniżenie aktywności przeciwutleniającej oraz wzrost biodostępności i rozpuszczalności [74]. Badania wchłaniania kwercetyny w jelicie cienkim wykazały, że reszta glukozy powoduje wzrost absorpcji do 52% w porównaniu do aglikonu 24%, a także rutyny (kwercetyno-3-rutynozydu) 17% [59]. Działanie nabłonkowego systemu transportu glukozy sprawia, że glukozydy są uprzywilejowane w stosunku do innych glikozydów [85]. Z drugiej strony, drobnoustroje przewodu pokarmowego, a także pewne hydrolazy obecne w jelicie cienkim i wątrobie mają zdolność hydrolizy wiązań β -glikozydowych, opornych na działanie enzymów trzustkowych [40, 41].

Glikozydy ksantohumolu, szczególnie glukozydy, mogą być zatem w niektórych przypadkach użyteczniejsze niż sam aglikon, np. przy produkcji prozdrowotnych napojów. Autorzy wynalazków tego rodzaju, licznie opatentowanych ostatnimi czasy [6–8, 54, 80], zmuszeni byli, z powodu małej rozpuszczalności ksantohumolu w wodnych roztworach, rozpuszczać go wstępnie w etanolu.

2.3.4. Transformacja ksantohumolu przez *Beauveria bassiana*

Po przeprowadzeniu trwającej 6 dni biotransformacji ksantohumolu (**41**) otrzymano 4'-*O*- β -D-4''-metoksy-glukozylo-2',4-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkonu (**43**) (rys. 34) z wydajnością 24,7%, odzyskano 12,3% substratu.



Rys. 34. Transformacja ksantohumolu przez *Beauveria bassiana*

Fig. 34. Transformation of xanthohumol by *Beauveria bassiana*

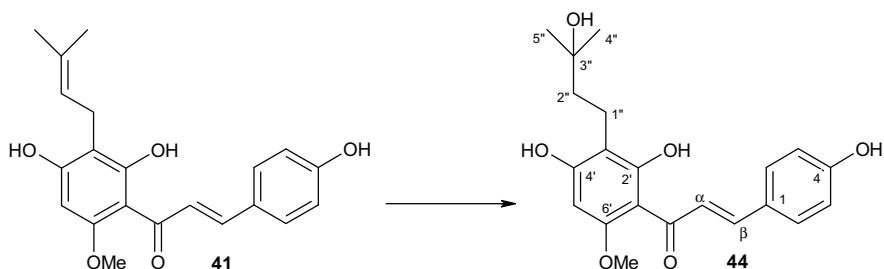
Widma NMR tego związku i opisanego w rozdziale 2.3.4 4'-*O*- β -D-glukozylo-2',4-dihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkonu (**42**) są bardzo podobne. Różnią się liczbą dodatkowych sygnałów: na widmie ^1H NMR zamiast dwunastu obserwowano trzynaście, pochodzących od protonów zmetylowanej reszty cukrowej w rejonie δ 3,0–5,44, a na widmie ^{13}C NMR zamiast sześciu – siedem w zakresie δ 60,2–100,2. Przesunięcie sygnału od H-5' produktu w stronę niższego pola (δ 6,39) w stosunku do ksantohumolu (δ 6,05) sugeruje podstawienie reszty cukrowej w pozycji C-4. Brak sygnału od protonu 4'''-OH i pojawienie się singletu od trzech protonów przy δ 3,47 wskazuje na metylację w pozycji C-4'''. Jednocześnie na widmie ^1H - ^{13}C NMR obserwuje się korelację tego sygnału z sygnałem przy 60,2 ppm, typowym dla węgla grupy metoksylowej.

Sprzężanie flawonoidów z resztą glukozy i jej metylacja w pozycji C-4 są charakterystyczne dla gatunku *Beauveria bassiana*. Transformacja 3-hydroksyflawonu przez *Beauveria bassiana* ATCC 13144 dała dwa produkty: 3,4-dihydroksyflawon i 3-O-β-D-4"-metoksy-glukozyloflawon, a 7-hydroksyflawonu przez *Beauveria bassiana* ATCC 7159 prowadziła do dwóch metyloglikozydów: 7-O-β-D-4"-metoksy-glukozylo-4'-hydroksyflawonu i 7-O-β-D-4"-metoksy-glukozyloflawonu [79].

Grupa metoksylova w reszcie glukozy związku **43**, może powodować zmniejszenie rozpuszczalności w roztworach wodnych w stosunku do produktu **42**.

2.3.5. Transformacja ksantohumolu przez *Pezicula cinnamomea*

Po przeprowadzeniu trwającej 9 dni biotransformacji ksantohumolu (**41**) otrzymano 3'-(3"-metylo-3"-hydroksy-butylo)-2',4,4'-trihydroksy-6'-metoksychalkon (**44**) (rys. 35) z wydajnością 53,3%.



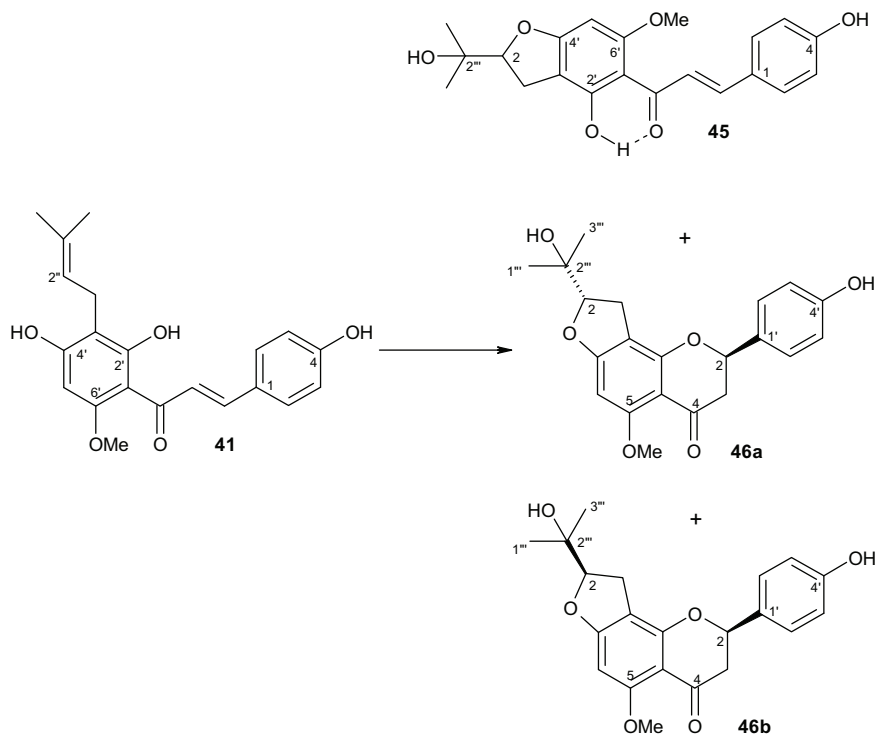
Rys. 35. Transformacja ksantohumolu przez *Pezicula cinnamomea*
Fig. 35. Transformation of xanthohumol by *Pezicula cinnamomea*

Produkt **44** powstał w wyniku addycji wody do wiązania podwójnego grupy prenylowej substratu, co łatwo stwierdzić na widmie ^1H NMR na podstawie braku trypletu od protonu H-2" przy δ 5,10 i pojawieniu się multipletu o integracji 2 przy δ 1,48. Pojawia się też dodatkowy sygnał od protonu grupy hydroksylowej przy δ 4,14. Grupy metylowe reszty prenylowej, rozróżnialne w substracie, w produkcie **44** stają się równocenne i dają jeden sygnał o integracji 6, przy δ 1,14. Na widmie ^{13}C NMR zamiast sygnałów przy δ 123,4 i 130,3, odpowiadających węglom wiązania podwójnego grupy prenylowej C-2" i C-3", obecne są sygnały przy δ 43,1 i 69,5, przy czym ten drugi, pochodzący od węgla C-3", jest – dzięki odsłaniającemu działaniu grupy hydroksylowej – przesunięty w stronę niższego pola.

Otrzymany związek wyizolowano wcześniej z odchodów szczurów karmionych ksantohumolem [141], co potwierdza przydatność transformacji mikrobiologicznych do badania metabolizmu ssaków.

2.3.6. Transformacja ksantohumolu przez *Fusarium equiseti*

Po przeprowadzeniu trwającej 7 dni biotransformacji ksantohumolu (**41**) otrzymano 2''-(2'''-hydroksyizopropyl)-dihydrofurano-[2'',3'':4',3']-2',4-dihydroksy-6'-metoksychalkon (**45**) z wydajnością 5,7% i parę diastereoizomerów (2*R*, 2''*S*)- i (2*R*, 2''*R*)-2''-(2'''-hydroksyizopropyl)-dihydrofurano-[2'',3'':7,8]-4'-hydroksy-5-metoksyflawanonu (**46a**, **46b**) (rys. 36) w stosunku 1:1, z wydajnością 38,8%.



Rys. 36. Transformacja ksantohumolu przez *Fusarium equiseti*

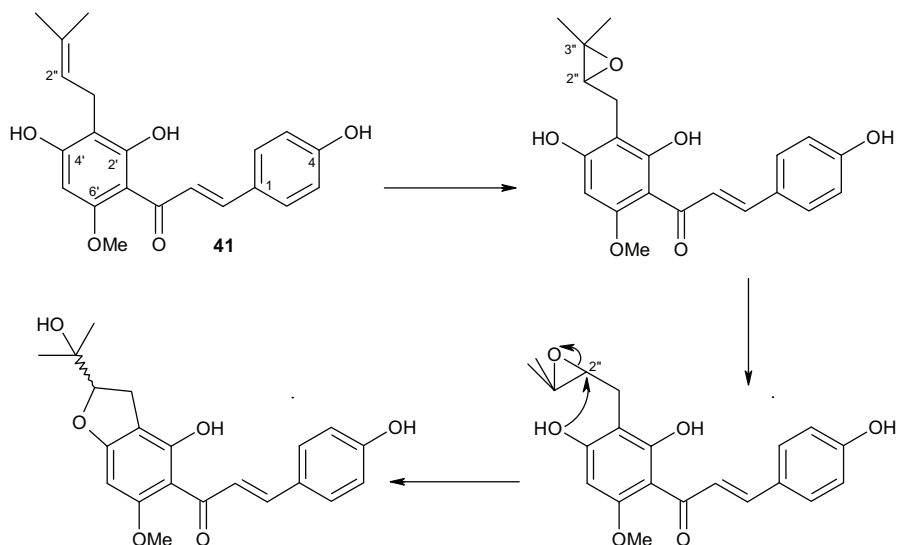
Fig. 36. Transformation of xanthohumol by *Fusarium equiseti*

Widmo NMR produktu **45** i wykazuje duże podobieństwo do widma ksantohumolu (**41**). Brak na widmie protonowym trypletu przy $\delta = 5,10$, pochodzącego od protonu przy węglu olefinowym 2'', a na widmie węglowym sygnałów przy $\delta = 130,3$ i 123,4 od węgli C-2'' i C-3'' oraz pojawienie się dubletu dubletów przy $\delta = 4,77$ (H-2''), sprzężonego na widmie COSY z sygnałami przy $\delta = 3,03$ (H-3'' β) i $\delta = 3,09$ (H-3'' α), świadczą o powstaniu pierścienia dihydrofuranowego. Natomiast położenie sygnału od protonu grupy C-2' hydroksylowej przy bardzo niskim polu, 14,61 ppm, wskazuje na wiązanie wodorowe z grupą karbonylową, a więc na cyklizację łańcucha prenylowego z udziałem grupy C-4' fenolowej.

Drugi produkt transformacji ksantohumolu przez *Fusarium equiseti* okazał się być równomolową mieszaniną diastereoizomerów, o czym świadczy podwojenie większości sygnałów na widmach NMR oraz ich jednakowa integracja. Przesunięcie maksimum absorpcji światła ultrafioletowego dla mieszaniny produktów **46a** i **46b** w kierunku krótszych fal, do 291 nm, sugeruje cyklizację typu chalkon-flawanon. Przypuszczenia te znajdują potwierdzenie w widmach NMR. Nie obserwuje się sygnałów od protonów olefinowych H α C=O i H β C=O, pojawiają się za to sygnały o wartościach przesunięcia chemicznego typowych dla pierścienia C flawanonu: 5,43/5,42 (H-2), 2,980/2,978 (H-3 α) i 2,61/2,64 (H-3 β). Podobnie jak w przypadku związku **45** nastąpiła modyfikacja części prenylowej cząsteczki. Na widmie ¹H NMR zamiast trypletu przy $\delta = 5,10$, pochodzącego od protonu przy węglu olefinowym 2'', pojawia się dublet dubletów przy $\delta = 4,738/4,731$ (H-2''), sprzężony na widmie COSY z multipletem przy $\delta = 3,094/3,042$ (H-3''). Natomiast na widmie ¹³C NMR zamiast sygnałów przy $\delta = 130,3$ i $123,4$ od węgli C-2'' i C-3'' obecne są sygnały 28,77/28,68 od C-3''' i 93,41/93,36 od C-2''. Sygnał przy $\delta = 72,37$ pochodzi od czwartorzędowego atomu węgla C-2''', co potwierdza widmo DEPT. Obserwowany na widmie masowym pseudomolekularny pik [M-H]⁺ m/z 371,1440 określa masę cząsteczkową zgodną z postulowaną strukturą produktów **46a** i **46b**.

Izomery (-) związku **45** i 2S związków **46a** i **46b** zostały wcześniej opisane jako produkty transformacji ksantohumolu przez *Pichia membranifaciens* ATCC2254 [76]. Otrzymano je z wydajnością 3,3% dla enancjomerów związków **46a** i **46b** i 0,58% dla związku **45**. Wykazują one aktywność antymalaryczną [77]. Enzymatyczna cyklizacja chalkonu do flawanonu zaszła w kulturze *P. membranifaciens* stereoselektywnie, z wytworzeniem izomeru 2S, podobnie jak w transformacji ksantohumolu przez *Cunninghamella elegans* [104] i odwrotnie niż w przypadku *Cunninghamella echinulata* [77]. Zastosowane grzyby *Fusarium equiseti* dają jako produkt mieszaninę diastereoizomerów **46a** i **46b** jedynie o konfiguracji 2R lub w nadmiarze 2R, o czym świadczy pozytywny efekt Cottona przy $\lambda = 289$ nm. Izomery 2S flawanonów i 3-hydroksyflawanonów, najczęściej występujące w przyrodzie, dają negatywny efekt Cottona w rejonie 270–290 nm [57]. Prawdopodobnie powstanie flawanonu poprzedzało selektywne zamknięcie łańcucha prenylowego do dihydrofuranu o nieustalonej konfiguracji na atomie C-2''. Przekształcenie to obserwowano też jako efekt transformacji ksantohumolu przez frakcję mikrosomalną wątroby ludzkiej [139] i szczurzej [202], a także układ trawienny szczurów karmionych ksantohumolem [141], przy czym stereochemia tej reakcji nie była przedmiotem wspomnianych badań

Grzyby takie jak *Botrytis cinerea* i *Saccharomyces cerevisiae* posiadają mono-oxygenazy zdolne do epoksydacji podwójnego wiązania w reszcie izoprenylowej [182]. Ksantohumol i związki do niego podobne mogą być epoksydowane, a następnie hydroli-zowane albo zredukowane do alkoholi. Mimo prowadzonych badań nie potwierdzono jeszcze tej hipotezy, jednak Yilmazer i współpracownicy sugerują, że powstawanie związków, w których łańcuch prenylowy ulega cyklizacji, poprzedza epoksydacja nienasyconego wiązania grupy prenylowej, a następnie nukleofilowy atak grupy fenolowej przy C-2' na węgiel C-2'' (rys. 37) [202].



Rys. 37. Proponowana droga przekształcenia ksantohumolu do pochodnej dihydrofuranowej [201]
 Fig. 37. Proposed transformation pathway of xanthohumol dihydrofurano-derivative formation [201]

Otrzymane produkty transformacji ksantohumolu przez *Fusarium equiseti* nie zostały wcześniej opisane i – zważywszy na działanie antymalaryczne ich 2*S*-izomerów [77] – mogą wykazywać podobną aktywność biologiczną.

3. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. W wyniku transformacji 7 substratów steroidowych przez grzyby *Absidia glauca*, *Botrytis cinerea* i *Beauveria bassiana* otrzymano 33 pochodne, w tym 31 hydroksylowanych.

2. Praktyczne znaczenie, ze względu na pożądaną pozycję hydroksylacji, a także wysoką jej wydajność, mają następujące biotransformacje:

- testosteronu przez *Botrytis cinerea*, prowadząca do 7 α -hydroksytestosteronu,
- 17 α -metylotestosteronu przez *Botrytis cinerea*, prowadząca do 7 α -hydroksy-17 α -metylotestosteronu,
- 1-dehydrotestosteronu przez *Botrytis cinerea*, prowadząca do 14 α -hydroksy-1-dehydrotestosteronu,
- 17 α -metylotestosteronu przez *Beauveria bassiana*, prowadząca do 11 α -hydroksy-17 α -metylotestosteronu,
- 1-dehydro-17 α -metylotestosteronu przez *Beauveria bassiana*, prowadząca do 11 α -hydroksy-1-dehydro-17 α -metylotestosteronu,
- progesteronu przez *Beauveria bassiana*, prowadząca do 11 α -hydroksytestosteronu,
- dehydroepiandrosteronu przez *Beauveria bassiana*, prowadząca do 5-androsten-3 β , 11 α , 17 β -triolu.

3. Zaobserwowano nie opisaną dotąd dla rodzaju *Absidia* hydroksylację steroidów w pozycji 12 β i przez gatunek *Botrytis cinerea* w pozycji 7 α .

4. Potwierdzono na przykładzie hydroksylacji steroidów niską specyficzność substratową i jednocześnie bardzo wysoką regio- i stereoselektywność enzymów *Beauveria bassiana*.

5. Drobnoustroje wykazują zdolność rozkładu gorzkich kwasów chmielowych.

6. Przy rozkładzie gorzkich kwasów chmielowych w hodowlach drożdży, oprócz naświetlania, znaczącą rolę odgrywa stężenie wytwarzanej przez nie ryboflawiny.

7. W wyniku transformacji ksantohumolu przez grzyby *Absidia glauca*, *Beauveria bassiana*, *Pezizula cinnamomea* i *Fusarium equiseti* otrzymano 5 produktów, powstających na skutek sprzęgania substratu z resztą glukozy, hydroksylacji łańcucha prenylowego, cyklizacji łańcucha prenylowego do pierścienia dihydrofuranowego oraz izomeryzacji chalkonu do flawanonu.

8. Produkty transformacji ksantohumolu przez *Fusarium equiseti* są nowe, a ze względu na poznaną aktywność antymalaryczną ich enancjomerów mogą być biologicznie czynne.

9. Transformacje zarówno steroidów, jak i flawonoidów przez grzyby prowadzą do produktów obserwowanych w transformacjach z udziałem enzymów, komórek i organizmów ssaków. Potwierdza to zasadność stosowania drobnoustrojów do badań modelowych metabolizmu tych związków w organizmie człowieka i jednocześnie do otrzymywania tych metabolitów w ilościach preparatywnych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abourashed E.A., Clark A.M., Hufford C.D.: 1999. Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: an update review. *Curr. Med. Chem.*, 6, 359–374.
- [2] Ahmed F., Williams R.A.D., Smith K.E.: 1995. Microbial transformations of steroids-IX. Purification of a progesterone hydroxylase cytochrome P-450 from *Phycomyces bakesleeanus*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 52, 203–208.
- [3] Aleu J., Collado I.G.: 2001. Biotransformations by *Botrytis* species. *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 13, 77–93.
- [4] Applezweig N.: 1962. *Steroid drugs*, McGraw-Hill Book Company, New York, s. 87.
- [5] Azerad R.: 1999. Microbial models for drug metabolism. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 169–218.
- [6] Back W., Zuercher A., Wunderlich S.: 2004. Process for manufacture of xanthohumol-containing beverage from malt and/or unmalted cereal worts and beverages made by this process. Patent nr: DE 102 56 166.
- [7] Back W., Zuercher A., Wunderlich S.: 2006. Natural xanthohumol-containing extract, process for its manufacture and beverages made from it. Patent nr: DE 10 2004 063 125.
- [8] Back W., Zuercher A., Wunderlich S.: 2007. Natural xanthohumol-containing extract, process for its manufacture and beverages so produced. Patent nr: DE 10 2004 063 125 B4.
- [9] Barron D., Ibrahim R.K.: 1996. Isoprenylated flavonoids-a survey. *Phytochemistry*, 43, 921–982.
- [10] Bayunova V.I., Gabinskaya K.N., Kolyanova T.S., Korobova Y.N., Grinenko G.S.: 1989. *Beauveria* sp. II. Transformation of androst-4-ene-3,17-dione and androst-1,4-diene-3,17-dione. *Khim. Farm. Zh.*, 23, 471–473.
- [11] Bell A.M., Browne J.W., Denny W.A., Jones E.R.H., Kasal A., Meakins G.D.: 1972. Microbial hydroxylation of steroids. Part VI. Hydroxylation of simple mono- and di-oxygenated 5 α -androstanes and of 3-oxoestrans with the fungus *Aspergillus ochraceus*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 23, 2930–2936.
- [12] Benitez J.L., Forster A., De Keukeleire D., Moir M., Sharpe F.R., Verhagen L.C., Westwood K.T.: 1997. *Manual of Good Practice: Hops and Hop Products*, Hans Carl Verlag, Nürnberg, Germany.

- [13] Berg A., Gustafsson J.A., Ingelman-Sundberg M., Carlstrom K.: 1976. Characterization of a cytochrome P450-dependent steroid hydroxylase system present in *Bacillus megaterium*. J. Biol. Chem., 251, 2831–2838.
- [14] Berrie J.R., Williams R.A.D., Smith K.E.: 1999. Microbial transformation of steroids – XI. Progesterone transformation by *Streptomyces roseochromogenes* – purification and characterization of the cytochrome P-450 progesterone 16 α -hydroxylase system. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 71, 153–165.
- [15] Bing L.A., Lewis L.C.: 1991. Suppression of *Ostinia nubilalis* (Huebner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Environ. Entomol., 20, 1207–1211.
- [16] Bird T.G.C., Fredericks P.M., Jones E.R.H., Meakins G.D.: 1980. Microbial hydroxylation. XXIII. Hydroxylation of fluoro-5 α -androstanones by the fungi *Calonectria decora*, *Rhizopus nigricans* and *Aspergillus ochraceus*. J. Chem. Soc. Perkin. Trans., I, 750–755.
- [17] Bohlmann F., Zdero C., King R.M., Robinson H.: 1979. New prenylflavonoids from *Marshallia grandiflora*. Phytochemistry, 18, 1246–1247.
- [18] Boutin J.A., Meunier F., Lambert P.H., Hennig P., Bertin D., Serkiz B., Volland J.B.: 1993. *In vivo and in vitro glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats*. Drug. Metab. Dispos., 21, 1157–1166.
- [19] Boynton J., Hanson J.R., Hunter A.C.: 1997. The hydroxylation of some 13 α -methylsteroids by *Cephalosporium aphidicola*. Phytochemistry, 45, 951–956.
- [20] Brannon D.R., Parrish F.W., Wiley B.J., Long L.: 1967. Microbial transformation of a series of androgens with *Aspergillus tamaris*. J. Org. Chem., 32, 1521–1527.
- [21] Braschi I., Pusino A., Gessa C., Bollag J.-M.: 2000. Degradation of primisulfuron by a combination of chemical and microbiological processes. J. Agric. Food Chem., 48, 2565–2571.
- [22] Breskvar K., Cresnar B., Hudnik-Plevnik T.: 1987. Resolution and reconstitution of cytochrome P-450 containing steroid hydroxylating system of *Rhizopus nigricans*. J. Steroid Biochem., 14, 395–399.
- [23] Briggs D.E., Boulton C.A., Brookes P.A., Stevens R.: 2004. Brewing. Science and practice. Woodhead Publishing Limited, Cambridge i CRC Press, Boca Raton, Boston, New York , Washington.
- [24] Brzezowska E., Dmochowska-Gładysz J., Kołek T.: 1996. Biotransformation XXXIX. Metabolism of testosterone, androstenedione, progesterone and testosterone derivatives in *Absidia coerulea* culture. J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 57, 357–362.
- [25] Buckwold V.E., Wilson R.J.H., Nalca A., Beer B.B., Voss T.G., Turpin J.A., Buckheit III R.W., Wei J., Wenzel-Mathers M., Walton E.M., Smith R.J., Pallansch M., Ward P., Wells J., Chuvala L., Sloane S., Paulman R., Russel J., Hartman T., Ptak R.: 2004. Antiviral activity of hop constituents against series of DNA and RNA viruses, Antiviral Res., 61, 57–62.
- [26] Canbas, A., Erten H., Özşahin F.: 2001. The effect of storage temperature on the chemical composition of hop pellets. Process. Biochem., 36, 1053–1058.

- [27] Čapek A., Fassatiova O.: 1977. Some chemical characteristic of species of the genus *Beauveria*. *Folia Microbiol.* (Prague), 22, 308–310.
- [28] Čapek A., Hanc O., Tadra M., Tuma J.: 1966. Microbial transformation of steroids XXV. Effect of substituents on the direction of the transformation of steroids by *Beauveria bassiana*. *Folia Microbiol.* (Prague), 11, 159–162.
- [29] Chadwick L.R., Pauli G.F., Farnsworth N.R.: 2006. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with the emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine*, 13, 119–131.
- [30] Charney W., Herzog H.L., 1967. Microbial transformations of steroids, A Handbook, Academic Press, New York.
- [31] Chen W.J., Lin J.K.: 2004. Mechanisms of cancer chemoprevention by hop bitter acids (beer aroma) through induction of apoptosis mediated by Fas and caspase cascades. *J. Agric. Food. Chem.*, 52, 55–64.
- [32] Cho Y.-C., Kim H.J., Kim Y.-J., Lee K.Y., Choi H.J., Lee I.-S., Kang B.Y.: 2008. Differential anti-inflammatory pathway by xanthohumol in IFN- γ and LPS-activated macrophages. *Int. Immun.*, 8, 567–573.
- [33] Choudhary M.I., Musharraf S.G., Siddiqui Z.A., Khan N.T., Ali R.A., Ur-Rahman A.: 2005. Microbial transformation of mestranol by *Cunninghamella elegans*. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 53, 1011–1013.
- [34] Clegg A.S., Jones E.R.H., Meakins G.D., Pinhey J.T.: 1970. The preparation of 1 β , 11 α -dihydroxy-steroids by microbiological hydroxylation. *Chem. Commun.*, 1029.
- [35] Colgate E.C., Miranda C.L., Stevens J.F., Bray T.M., Ho E., 2007. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett.*: 246, 201–209.
- [36] Cuenca-Estrella M., Moore C.B., Barchiesi F., Bille J., Chryssanthou E., Denning D.W., Donnelly J.P., Dromer F., Dupont B., Rex J.H., Richardson M.D., Sancak B., Verweij P.E, Rodríguez-Tudela J.L.: 2003. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Infection*, 9, 467–474.
- [37] Cushnie T.P.T., Lamb A.J.: 2005, Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 26, 343–356.
- [38] Daenicke R., Rohr K., Engling F.-P.: 1991. Influence of brewers' spent hops silage in diets for dairy cows on digestion and performance variables. *Proceedings of the VDLUFA Kongress, Ulm*, 33:539–544.
- [39] Davis P.J.: 1988. Microbial models of mammalian drug metabolism. *Dev. Ind. Microbiol*, 29, 179–219.
- [40] Day A.J., DuPont M.S., Ridley S., Rhodes M., Rhodes M.J., Morgan M.R., Williamson G.: 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.*, 468, 166–170.

- [41] Day A.J., Canada F.J., Diaz J.C., Kroon P.A., Mclauchlan R., Faulds C.B., Plumb G.W., Morgan G.W., Michael R., Williamson G.: 2000. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolyzed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.*, 468, 166–170.
- [42] De Keukeleire D., Verzele M.: 1971. The absolute configuration of the isohumulones and the humulinic acids. *Tetrahedron*, 27, 4939–4945.
- [43] De Keukeleire D., Blondeel G.M.: 1979. The mechanism of the region specific and stereospecific photorearrangement of humulone to the beer bitter component trans-isocohumulone. *Tetrahedron*, 15, 1343–1346.
- [44] De Keukeleire D.: 2000. "Fundamentals of beer and hop chemistry" *Quimica Nova*, 23, 108–112.
- [45] Dietz B.M., Kang Y.H., Liu G., Egger A.L., Yao P., Chadwick L.R.: 2005. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem. Res. Toxicol.*, 18, 1296–1305.
- [46] Dmochowska-Gładysz J., Kołek T., Siewiński A., Derdziński K., Zabza A., Nespiak A.: 1986. Introduction of oxygen function into isoprenoid systems by means *Botrytis cinerea* (Persoon). *J. Basic. Microbiol.*, 26, 577–585.
- [47] Eppink M.H.M., Cammaart E., van Wassenaar D., Middelhoven W.J., van Berkel W.J.H.: 2000. Purification and properties of hydroquinone hydroxylase, a FAD-dependent monooxygenase involved in the catabolism of 4-hydroxybenzoate in *Candida parapsilosis* CBS604. *FEBS J.*, 267, 6832–6840.
- [48] Eri S., Khoo B.K., Lech J., Hartman T.G.: 2000. Direct thermal desorption-gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils in support of varietal characterization. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1140–1149.
- [49] Farooq A., Tahara S.: 2000. Biotransformation of testosterone and pregnenolone catalyzed by the fungus *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.*, 63, 489–491.
- [50] Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S.: 2003. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enz. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 688–705.
- [51] Fischer K., Bipp H.-P.: 2005. Generation of organic acids and monosaccharides by hydrolytic and oxidative transformation of food processing residues. *Biores. Technol.* 96, 831–842.
- [52] Forster A., Beck B.: 1985. Hops and hop pellets. *Brauwelt Int.*, 2, 151–154.
- [53] Frye L.L., Leonard D.A.: 1987. Lanosterol analogs: dual-action inhibitors of cholesterol biosynthesis [w:] *Biochemistry and function of sterols*, Boca Raton, FL: CRC Press, s. 23.
- [54] Fuesser H., Tretzel J., Wydra M.: 2004. Xanthohumol-containing beverage. Patent nr: EP 1 431 385 A1.
- [55] Fugh-Berman A.: 2003. „Bust enhancing” herbal products. *Obstet. Gynecol.*, 101, 1345–1349.
- [56] Fung S.-Y., Zuurbier K.W.M., Paniego N.B., Scheffer J.J.C., Verpoorte R.: 1997. Conversion of deoxyhumulone into the hop α -acid humulone. *Phytochemistry*, 44, 1047–1053.

- [57] Gaffield W.: 1970. Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides. *Tetrahedron*, 26, 4093–4108.
- [58] Gardea-Torresdey J., Hejazi M., Tiemann K., Parsons J.G., Duarte-Gardea M., Henning J.: 2002. Use of hop (*Humulus lupulus*) agricultural by-products for the reduction of aqueous lead(II) environmental health hazards. *J. Hazardous Materials*, B91, 95–112.
- [59] Gee J.M., DuPont S., Rhodes M.J., Johnson I.T.: 1998. Quercetin glucosides interact with intestinal glucose pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 19–25.
- [60] Gerhäuser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H.-R., Frank N., Bartsch H., Becker H.: 2002. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer Ther.* 1, 959–969.
- [61] Gester S., Metz P., Zierau O., Vollmer G.: 2001. An efficient synthesis of the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin and 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin by europium(II)-catalyzed Claisen rearrangement. *Tetrahedron*, 57, 1015–1018.
- [62] Goldham N.G., Sauer M.J.: 2001. Identification, quantitation and biological activity of phytoestrogens in a dietary supplement for breast enhancement. *Food Chem. Toxicol.*, 39, 1211–1224.
- [63] Goto K., Asai T., Hara S., Namatame I., Tomoda H., Ikemoto M., Oku N.: 2005. Enhanced antitumor activity of xanthohumol, a diacylglycerol acyltransferase inhibitor, under hypoxia. *Cancer Lett.*, 219, 215–222.
- [64] Griffiths D.A., Brown D.E., Jezequel S.G.: 1993. Metabolism of xenobiotics by *Beauveria bassiana*. *Xenobiotica*, 23, 1085–1100.
- [65] Grogan G.J., Holland H.L.: 2000. The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. *J. Mol. Catal.*, 9, 1–32.
- [66] Guerreiro S., Monteneiro R., Martins M.J., Calhau C., Azevedo I., Soares R.: 2007. Distinct modulation of alkaline phosphatase isoenzymes by 17 β -estradiol and xanthohumol in breast cancer MCF-7 cells. *Clinical Biochem.* 40, 268–273.
- [67] Guo J., Nikolic D., Chadwick L.R., Guido F.P., Van Breemen R.B.: 2006. Identification of human hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 8-prenylnaringenin and isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.). *Drug Metab. Dispos.*, 34, 1152–1159.
- [68] Hackett A.M.: 1986. Plant flavonoids in biology and medicine, biochemical pharmacological and structure activity relationships. Liss, New York, s. 177.
- [69] Hajek A.E., St. Leger R.J.: 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.*, 39, 293–322.
- [70] Hanson J.R., Nasir H., Parvez A.: 1996. The hydroxylation of testosterone and some relatives by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*, 42, 411–415.
- [71] Havsteen B.H.: 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharm. Therap.*, 96, 67–202.
- [72] He G., Xiong H., Chen Q., Ruan H., Wang Z., Traore L.: 2005. Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Zhejiang Univ. Sci.*, 6B, 999–1004.

- [73] Hefner T., Arend J., Warzecha H., Siems K., Stoeckit J.: 2002. Arbutin synthase, a novel member of the 1 β glycosyltransferase family, is unique multifunctional enzyme converting various natural products and xenobiotics. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 1731–1741.
- [74] Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J.: 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13, 572–584.
- [75] Heiser I., Osswald W., Elstner E.F.: 1998. The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins. *Plant Physiol. Biochem.*, 36, 703–713.
- [76] Herath H.M.W., Ferreira D., Khan J.A.: 2003. Microbial transformation of xanthohumol. *Phytochemistry*, 62, 73–677.
- [77] Herath H.M.W., Ferreira D., Khan S.I., Khan J.A.: 2003. Identification and biological activity of microbial metabolites of xanthohumol. *Chem. Pharm. Bull.*, 51, 1237–1240.
- [78] Herath H.M.W., Mikell J.R., Hale A.L., Ferreira D., Khan H.J.A.: 2005. Microbial metabolism. Part 6. Metabolites of 3- and 7-hydroxyflavones. *Chem. Pharm. Bull.*, 54, 320–324.
- [79] Hoek A.C., Hermans-Lokkerbol A.C.J, Verpoorte R.: 2001. An improved NMR method for the quantification of α -acids in hops and hop products. *Phytochemical Analysis*, 12, 53–57.
- [80] Hoepfner F.G., Wunsch H., Berg K., Buchner P.: 2004. Process for manufacture of a beverage. Patent nr: DE 103 20 250 A1.
- [81] Hogg J.A.: 1992. Steroids, the steroid community, and Uphjon in perspective: a profile of innovation. *Steroids*, 57, 593–616.
- [82] Holland H.L., Diakow P.R.P.: 1979. Microbial hydroxylation of steroids 5. Metabolism of androst-5-ene-3,17-dione and related compounds by *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145. *Can. J. Chem.*, 57, 436–440.
- [83] Holland H.L., Diakow P.R.P.: 1978. The mechanism of the microbial hydroxylation of steroids 4. The C-6 β hydroxylation of androst-4-ene-3,17-dione and related compounds by *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145. *Can. J. Chem.*, 56, 694–702.
- [84] Holland H.L.: 1999. Recent advances in applied and mechanistic aspects of the enzymatic hydroxylation of steroids by whole-cell biocatalysts. *Steroids*, 64, 178–186.
- [85] Hollman P.C., Buijsman M.N., van Gameren Y., Cnossen E.P., de Vries J.H., Katan M.B.: 1999. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic. Res.*, 31, 569–573.
- [86] Hu S., Genain G., Azerad R.: 1995. Microbial transformation of steroids: contribution to 14 α -hydroxylation. *Steroids*, 60, 337–352.
- [87] Hu X., Zhao X., Hwang H.: 2007. Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere*, 66, 1618–1626.
- [88] Hundt K., Martin D., Hammer E., Jonas U., Kindermann M.K., Schauer F.: 2000. Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4157–4160.

- [89] Huszcza E., Bartmańska A.: 2008. The implication of yeast in debittering of spent hops, *Enz. Microbial. Technol.*, 42, 421–425.
- [90] Huszcza E., Bartmańska A., Anioł M., Mączka W., Żołnierczyk A., Wawrzeńczyk C.: 2007. Screening for the hop bitter acids degrading microorganisms, *Ecol. Chem. Eng.*, 14, 57–61.
- [91] Huszcza E., Bartmańska A., Anioł A., Mączka W., Żołnierczyk A., Wawrzeńczyk C.: 2008. Degradation of hop bitter acids by fungi, *Waste Manage.*, 28, 1406–1410.
- [92] Huszcza E., Bartmańska A., Tronina T.: 2008. Glycosylation of xanthohumol by fungi, *Z. Naturforsch.*, 63c, 557–560.
- [93] Huszcza E., Dmochowska-Gładysz J.: 2003. Transformations of testosterone and related steroids by *Absidia glauca* culture. *J. Basic Microbiol.*, 43, 113–120.
- [94] Huszcza E., Dmochowska-Gładysz J.: 2003. Transformations of testosterone and related steroids by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 62, 155–158.
- [95] Huszcza E., Dmochowska-Gładysz J., Bartmańska A.: 2005. Transformations of steroids by *Beauveria bassiana*, *Z. Naturforsch.*, 60c, 103–108.
- [96] Huvaere K., Olsen K., Andersen M.L., Skibsted L.H., Heyerick A., De Keukeleire D.: 2004. Riboflavin-sensitized photooxidation of isohumulones and derivatives. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3, 337–340.
- [97] Irrgang S., Schlosser D., Fritsche W.: 1997. Involvement of cytochrome P-450 in the 15 α -hydroxylation of 13-ethyl-gon-4-ene-3,17-dione by *Penicillium raistrickii*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 60, 339–346.
- [98] Ito H., Nishitani E., Konoshima T., Takasaki M., Kozuka M., Yoshida T.: 2000. Flavonoid and benzophenone glycosides from *Coleogyne ramosissima*. *Phytochemistry*, 54, 695–700.
- [99] Iwasaki M., Davis D.G., Darton T.A., Pedersen L.G., Negishi M.: 1995. Multiple steroid-binding orientations: alteration of regiospecificity of dehydroepiandrosterone 2- and 7-hydroxylase activities of cytochrome P-450 2a-5 by mutation of residue 209. *J. Biochem.*, 306, 29–33.
- [100] Janig G.R., Pfeil D., Muller-Frohme M., Henning M., Schwarze W.: 1992. Steroid 11 β -hydroxylation by a fungal microsomal cytochrome P-450. *J. Steroid Mol. Biol.*, 43, 1117–1123.
- [101] Jones E.R.H., Meakins G.D., Miners J.O., Wilkins A.L.: 1975. Microbial hydroxylation. XXI. Hydroxylation of 3-halo-17-oxo, 3-halo-17-oxo and 17-halo-3-oxoandrostenes by the fungi *Calonectria decora*, *Rhizopus nigricans* and *Aspergillus ochraceus*. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, 1, 2308–2312.
- [102] Kaneda K., Kano H., Koshino Y., Ohya-Nishiguchi S.: 1992. Behavior and role of iron ions in beer deterioration. *J. Agric. Food. Chem.*, 40, 2102.
- [103] Khuspe R.S., Erhardt P.W.: 2007. Total synthesis of xanthohumol. *J. Nat. Prod.*, 70, 1507–1509.
- [104] Kim H.J., Lee I.S.: 2006. Microbial metabolism of the prenylated chalcone xanthohumol. *J. Nat. Prod.*, 69, 1522–1524.
- [105] King A.J., Dickinson J.R.: 2003. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *Yeast Res.* 3, 53–62.

- [106] King B.M., Duineveld C.A.A.: 1999. Changes in bitterness as beer ages naturally. *Food Qual. Preference*, 10, 315–324.
- [107] Kitaoka M., Kadokawa H., Sugano M., Ichikawa K., Taki M., Takaishi S., Iijima Y., Tsutsumi S., Boriboon M., Akiyama T.: 1998. Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopenentylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med.*, 64, 511–515.
- [108] Ko D., Heiman A.S., Chen M., Lee H.J.: 2000. New steroidal anti-inflammatory antedugs: methyl 21-desoxy-21-chloro-11 β ,17 α -dihydroxy-3,20-dioxo-1,4-preg-nadiene-16 α -carboxylate, methyl 21-desoxy-21-chloro-11 β -hydroxy-3,20-dioxo-1,4-preg-nadiene-16 α -carboxylate, and their 9 α -fluoro derivatives. *Steroids*, 65, 210–218.
- [109] Kołpek T.: 1999. Biotransformation XLVII. Transformation of 5-ene steroids in *Fusarium culmorum* culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 71, 83–90.
- [110] Koumbis A.E., Chronopoulos D.D.: 2005. A short and efficient synthesis of (+)-disparlure and its enantiomer. *Tetrahedron Lett.*, 46, 4353–4355.
- [111] Kovačević M., Kač M.: 2002. Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. *Food Chem.*, 77, 489–494.
- [112] Krishnan R., Madyastha K.M., Viswamitra M.A.: 1991. The crystal structure of 14 α , 17 β -dihydroxyandrost-4-ene-3-one monohydrate and 14 α , 17 β -dihydroxyandrost-1,4-diene-3-one monohydrate. *Steroids*, 56, 440–445.
- [113] Kuroiwa Y., Hashimoto N., Hashimoto H., Kokubo E., Nakagawa K.: 1963. Factors essential for the evolution of sunstruck flavour. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 181–193.
- [114] Larson A.E., Yu R.Y., Lee O.A., Price, S., Haas G.J.: 1996. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *Food Microbiol.*, 33, 195–207.
- [115] Laufenberg G., Kunz B., Nystroem M.: 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Biores. Tech.*, 87, 167–198.
- [116] Leung A.Y.: 1980. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, John Wiley & Sons. New York.
- [117] Madyastha K.M., Joseph T.: 1993. Studies on the 11 alpha-hydroxylation of progesterone in *Mucor piriformis*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 45, 563–569.
- [118] Mahato S.B., Banerjee S., Podder S.: 1989. Steroid transformations by microorganisms – III. *Phytochemistry*, 28, 7–40.
- [119] Mahato S.B., Majumdar I.: 1993. Current trends in microbial steroid biotransformation. *Phytochemistry*, 34, 883–898.
- [120] Mahato S.B., Garai S.: 1997. Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids*, 62, 332–345.
- [121] Marco-Urrea E., Gabarrell X., Sarra M., Caminal G., Vincent T., Reddy A.: 2006. Novel aerobic perchloroethylene degradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 7796–7802.
- [122] Margolin A.L., Delinck D.L., Whalon M.R.: 1990. Enzyme-catalyzed regioselective acylation of castanospermine. *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 2849–2854.

- [123] Matoušek J., Vrba L., Novak P., Patzak J., De Keukeleire J., Škopek J., Heyerick A., Roldan-Ruiz I., De Keukeleire D.: 2005. Cloning and molecular analysis of the regulatory factor HIMybl in hop (*Humulus lupulus* L.) and the potential of hop to produce bioactive prenylated flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4793–4798.
- [124] Mazumder T.K., Sonomoto K., Kanaka A., Fukui S.: 1985. Sequential conversion of cortexolone to prednisolone by immobilized mycelia of *Curvularia lunata* and immobilized cells *Arthrobacter simplex*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 154–161.
- [125] Mączka W., Anioł M., Huszcza E., Bartmańska A., Żołnierczyk A., Wawrzeńczyk C.: Plant-mediated transformation of hop extract components, wyniki nieopublikowane.
- [126] Mehmood Z., Kelly D.E., Kelly S.L.: 1995. Progesterone biotransformation by human P4503A4 in yeast. *Biotechnol. Lett.*, 17, 83–88.
- [127] Menaker A., Kravets M., Koel M., Orav A.: 2004. Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs. *C. R. Chimie*, 7, 629–633.
- [128] Middelhoven W.J., Coenen A., Kraakman B., Gelpke M.D.S.: 1992. Degradation of some phenols and hydroxybenzoates by the imperfect ascomycetous yeasts *Candida parapsilosis* and *Arxula adeninivorans*: evidence for an operative gentisate pathway. *Anton. Leeuw.*, 62, 181–187.
- [129] Milligan S., Kalita J., Poock V., Heyerick A., De Cooman L., Rong L., De Keukeleire D.: 2002. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction*, 123, 235–242.
- [130] Miranda C.L., Stevens J.F., Helmrich A., Henderson M.C., Rodriguez R.J., Yang Y.H., Deinzer M.L., Barnes D.W., Buhler D.R.: 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 271–285.
- [131] Mizobuchi S., Sato Y.: 1994. A new flavanone with antifungal activity isolated from hops. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2771–2775.
- [132] Mizobuchi S., Sato Y.: 1995. Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 399–403.
- [133] Moon Y.J., Wang X., Morris M. M.: 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*, 20, 187–210.
- [134] Morfin R., Courchay G.: 1994. Pregnenolone and dehydroepiandrosterone as precursors of native 7-hydroxylated metabolites which increase the immune response in mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 50, 91–100.
- [135] Mulock B., Chandler L.: 2000. Field-cage studies of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae) for the suppression of adult western corn rootworm, *Diabrotica vigifera vigifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biocontrol Sci. Technol.*, 10, 51–60.
- [136] Murray H.C., Petersen D.H.: 1952. Oxygenation of steroids by Mucorales fungi. Patent nr: US 2602769.
- [137] Neve R.A.: 1991. Hops. Chapman & Hall, New York.

- [138] Nikolic D., Li Y., Chadwick L.R., Grubjesic S., Schwab P., Metz P., Van Breemen R.B.: 2004. Metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*) by human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 32, 272–279.
- [139] Nikolic D., Li Y., Chadwick L.R., Pauli G.F., Van Breemen R.B.: 2005. Metabolism of xanthohumol and isoxanthohumol, prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.), by human liver microsomes. *J. Mass. Spectrom.*, 40, 289–299.
- [140] Nobile A., Charney W., Perlman P.L., Herzog H.L., Payne C.C., Tully M.E., Jevnik M.A., Herschberg E.B.: 1955. Microbiological transformation of steroids (I) $\Delta^{1,4}$ -diene-3-keto steroids. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 4184.
- [141] Nookandeh A., Frank N., Steiner F., Ellinger R., Schneider B., Gerhäuser C., Becker H., 2004. Xanthohumol metabolites in faeces of rats. *Phytochemistry*, 65, 561–570.
- [142] Oosterveld A., Voragen A.G.J., Schols H.A.: 2002. Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. *Carbohydr. Polym.*, 49, 407–413.
- [143] Oriniakova P., Pavingerova D., Matousek J.: 1999. Methodical aspects of hop (*Humulus lupulus* L.) genetic transformation. *Rostl. Výř.*, 45, 219–227.
- [144] Otake Y., Hsieh F., Walle T.: 2002. Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid galangin by human liver microsomes and hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.*, 30, 576–581.
- [145] Patel R.N., Banerjee A., Ko R.Y., Howell J.M., Li W.S., Comezoglu F.T.: 1994. Enzymatic preparation of (3*R*)-*cis*-3-(acetylthoxy)-4-phenyl-2-azetidinone: a taxol side chain synthon. *Biotech. Appl. Biochem.*, 20, 23–33.
- [146] Pedroza A.M., Mosqueda R., Alonso-Vante N., Rodríguez-Vázquez R.: 2007. Sequential treatment via *Trametes versicolor* and UV/TiO₂/Ru_xSe_y to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production. *Chemosphere*, 67, 793–801.
- [147] Porter T.D., Kasper C.D.: 1986. NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry*, 29, 1682–1687.
- [148] Possemiers S., Heyerick A., Veerle R., De Keukeleire, Verstraete W.: 2005. Activation of proestrogens from hops (*Humulus lupulus* L.) by intestinal microbiota; conversion of isoxanthohumol into 8-prenylnaringenin. *Agric. Food Chem.*, 53, 6281–6288.
- [149] Possemiers S., Bolca S., Grootaert C., Heyerick A., Decroos K., Dhooge W., De Keukeleire, Rabot S., Verstraete W., Van de Wiele T.: 2006. The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. *J. Nutr.*, 136, 1862–1867.
- [150] Raspe G., Richler H.: 1960. Patent nr: Ger. 1080553.
- [151] Rendic S., Nolteernsting E., Schänzer W.: 1999. Metabolism of anabolic steroids by recombinant human cytochrome P450 enzymes. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of metabolites. *J. Chromatogr. B.*, 735, 73–83.

- [152] Robins R.J., Furze J.M., Rhodes M.J.C.: 1985. α -Acid degradation by suspension culture cells of *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 24, 709–714.
- [153] Rodriguez R.J., Miranda C.L., Stevens J.F., Deinzer M.L., Buhler D.R.: 2001. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 39, 437–445.
- [154] Rüfer C.E., Gerhäuser C., Frank N., Becker H., Kulling S.E.: 2005. In vitro phase II metabolism of xanthohumol by human UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 851–856.
- [155] Sakamoto K., Konings W.N.: 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.*, 89, 105–124.
- [156] Samanta T.B., Ghosh D.K.: 1987. Characterization of progesterone 11 α -hydroxylase of *Aspergillus ochraceus* TS: a cytochrome linked monooxygenase. *J. Steroid Biochem.*, 28, 327–332.
- [157] Sanada V., Fajkos J., Protiva J.: 1977. Microbial oxygenation of norsteroids with *Beauveria bassiana*. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 42, 3646–3653.
- [158] Schenkman J.B.: 1992. Steroid metabolism by constitutive cytochromes P-450. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 43, 1023–1030.
- [159] Schiller H., Forster A., Vonhoff C., Hegger M., Biller A., Winterhoff H.: 2006. Sedating effects of *Humulus lupulus* L. extracts. *Phytomedicine* 13, 535–541.
- [160] Schubert A., Heller K., Onken D., Schwarz S., Siebert R., Zaumseil J.: 1962. Conversion of steroids with microorganisms. *Z. Chem.*, 2, 289–297.
- [161] Schubert K., Schlegel J., Groh H., Rose G., Hörhold C.: 1972. Stoffwechsel von Steroidpharmaka VII. Struktur-Stoffwechsel-Beziehungen bei der mikrobiellen Hydrierung unterschiedlich substituierter Testosteronderivative. *Endokrinologie*, 59, 99–114.
- [162] Sedlaczek L.: 1988. Biotransformation of steroids. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 7, 186–236.
- [163] Shibahara M., Moody J.A., Smith L.L.: 1970. Microbial hydroxylations V. 11 α -Hydroxylation of progesterone by cell-free preparations of *Aspergillus ochraceus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 202, 172–179.
- [164] Shimamura M., Hazato T., Ashino H., Yamamoto Y., Iwasaki E., Tobe H., Yamamoto K., Yamamoto S.: 2001. Inhibition of angiogenesis by humulone, a bitter acid from beer hop. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 220–224.
- [165] Shirasaka M., Ozaki M., Sugawara S.: 1961. Microbiological transformation of steroid compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7, 341–352.
- [166] Sideso O., Williams R.A.D., Welch S.G., Smith K.E.: 1998. Progesterone 6-hydroxylation catalysed by cytochrome P-450 in the moderate thermophile *Bacillus thermoglucosidasus* strain 12060. *J. Steroid Mol. Biol.*, 67, 163–169.
- [167] Simpson W.J., Smith A.R.: 1992. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *J. Appl. Microbiol.*, 72, 327–334.
- [168] Singh K., Sehgal S.N., Vezina C.: 1967. Transformation of steroids by *Mucor griseocyanus*. *Can. J. Microbiol.*, 13, 1271–1281.

- [169] Smith K.E., Latif S., Kirk D.N.: 1989. Microbial transformations of steroids – V. Transformation of progesterone by whole cells and extracts of *Botryosphaeria obtusa*. J. Steroid Biochem., 33, 927–934.
- [170] Smith K.E., Ahmed F., Williams R.A.D., Kelley S.: 1994. Microbial transformation of steroids – VIII. Transformation of progesterone by whole cells and microsomes of *Aspergillus fumigatus*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 49, 93–100.
- [171] Smith R.V., Rosazza J.P.: 1974. Microbial models of mammalian metabolism. Arch. Biochem. Biophys., 161, 551–558.
- [172] Smithells R.W., Newman C.G.H.: 1992. Recognition of thalidomide defects, J. Med. Genet., 29, 716–723.
- [173] Stang A.Q., Helmchem G.: 2005. Enantioselective syntheses and fragrance properties of the four stereoisomers of Magnolione® (magnolia ketone), Helvetica Chimica Acta, 88, 2738–2746.
- [174] Stevens J.F., Ivanic M., Hsu V., Deinzer M.L.: 1997. Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. Phytochemistry, 44, 1575–1585.
- [175] Stevens J.F., Page J.E.: 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! Phytochemistry, 65, 1317–1330.
- [176] Stevens J.F., Taylor A.W., Clawson J.E., Deinzer M.L.: 1999. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. J. Agric. Food Chem., 47, 2421–248.
- [177] Stevens J.F., Taylor A.W., Deinzer M.L.: 1999. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 832, 97–107.
- [178] Stevens J.F., Taylor A.W., Nickerson, G.B., Ivanic M., Henning J., Haunold A., Deinzer M.L.: 2000. Prenylflavonoid variation in hops (*Humulus lupulus*): distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methyl-xanthohumol. Phytochemistry, 53, 759–775.
- [179] Tagashira M., Watanabe M., Uemitsu N.: 1995. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 740–742.
- [180] Tahara S., Mitsuharu T., Barz W.: 1997. Fungal metabolism of prenylated flavonoids. Phytochemistry, 44, 1031–1036.
- [181] Tan L., Smith L.: 1968. Microbial hydroxylations II. Oxidative cleavage of the 17 β -acetyl side chain of progesterone by *Aspergillus ochraceus*. Biochim. Biophys. Acta, 152, 758–769.
- [182] Tanaka M., Tahara S.: 1997. FAD-dependent epoxidase as a key enzyme in fungal metabolism of prenylated flavonoids. Phytochemistry, 46, 683–687.
- [183] Taylor L., Kang M.S., Brennan T.M., Bridges C.G., Sunkara P.S., Tyms A.S.: 1994. Inhibition of alpha-glucosidase I of the glycoprotein-processing enzymes by 6-O-butanoyl castanospermine (MDL 28,574) and its consequences in human immunodeficiency virus-infected T cells. Antimicrob. Agents Chemother., 38, 1780–1787.
- [184] Tobe H., Kitamura K., Komiyama O.: 1997. Pharmaceutical composition for treating osteoporosis. Patent nr: USA 5. 679. 716.

- [185] Tobe H., Muraki Y., Kitamura K., Kmiyama O., Sato Y., Sugioka T., Marnyama H.B., Matsuda E., Nagai M.: 1997. Bone resorption inhibitors from hop extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 158–159.
- [186] Truckenbrodt G., Langbein G., Auweiler J., Henkel H.: 1991. Manufacture of pregnanes with *Absidia*. Patent nr: East Ger. 292 675.
- [187] Tuba Z., Bardin C.W., Dancsi A., Francsics-Czinege E., Molnar C., Falkay G., Koide S.S., Kumar N., Sundaram K., Dukat-Abrok V., Balogh G.: 2000. Synthesis and biological activity of a new progestogen, 16-methylene-17 α -hydroxy-18-methyl-19-norpregn-4-ene-3,20-dione acetate. *Steroids*, 65, 266–274.
- [188] Van den Brink J.M., Van Gorcom R.F.M., Van den Hondel C.A.M.J.J., Punt P.J.: 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Gen. Biol.*, 23, 1–17.
- [189] Vanderhaegen B., Neven H., Coghe S., Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Verachtert H.: 2003. Bioflavoring and beer refermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62, 140–150.
- [190] Vanderhaegen B., Neven H., Verachtert H., Derdelinckx G.: 2006. The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem.*, 95, 357–381.
- [191] Verzele M.: 1979. *Brewing Science*. Academic Press., London, s. 279.
- [192] Verzele M., De Keukeleire D.: 1991. Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids. Elsevier, Amsterdam.
- [193] Vitali A., Monache G.D., Zappia G., Misiti D., Gacs-Baitz E., Botta B.: 1999. B-glucosyltransferase in cell cultures of *Verbesina Caracasana*. *Heterocycles*, 5, 721–730.
- [194] Vogel S., Ohmayer S., Brunner G., Heilmann J.: 2008. Natural and non-natural prenylated chalcones: synthesis, cytotoxicity and anti-oxidative activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 4286–4293.
- [195] Wallen S., Marshall H.F.: 1979. Protein quality evaluation of spent hops. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 635–636.
- [196] Wang J., Chen C., Li B., Zhang J., Yu Y.: 1998. Production of hydrocortisone from cortexolone-21-acetate by immobilized *Absidia orchidis* in cosolvent-containing media. *Enz. Microbiol. Technol.*, 22, 368–373.
- [197] Wang Q., Ding Z.H., Liu J.K., Zheng Y.T.: 2004. Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from hops *Humulus lupulus*. *Antiviral Res.*, 64, 189–194.
- [198] Wilhelm H., Wessjohann L.A.: 2006. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylonaringenin from xanthohumol by a novel demethylation process. *Tetrahedron*, 62, 6961–6966.
- [199] Wolfhart R., Wurm G., Hansel R., Schmidt H.: 1983. Detection of sedative-hypnotic active ingredients in hops. 5. Degradation of bitter acids to 2-methyl-3-buten-2-ol, a hop constituent with sedative-hypnotic activity. *Arch Pharm (Weinheim)*, 316, 132–137.
- [200] Xie Z.Y., Huang H.H., Zhong D.F.: 2005. Biotransformation of pantoprazole by the fungus *Cunninghamella blakesleeana*. *Xenobiotica*, 35, 467.
- [201] Yamamoto K., Wang J., Yamamoto S., Tobe H.: 2000. Suppression of cyclooxygenase-2 gene transcription by humulon of beer hop extract studied with reference to glucocorticoid. *FEBS Lett.*, 465, 103–106.

- [202] Yilmazer M., Stevens J.F., Deinzer M.L., Buhler D.R.: 2001. *In vitro* biotransformation of xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), by rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 29, 223–231.
- [203] Yilmazer M., Stevens J.F., Buhler D.R.: 2001. *In vitro* glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Lett*; 491: 252–256.
- [204] Zanolli P., Zavatti M.: 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharm.*, 116, 383–396.
- [205] Zeelen F.J.: 1990. *Pharmaceutical chemistry of steroids*. Amsterdam: Elsevier.
- [206] Zehnter R., Gerlach H.: 1995. Enantiodifferentiation in taste perception of the phylloolulcins. *Tetrahedron Asymmetry*, 6, 2779–2786.
- [207] Zhang F., Swanson S.M., von Breemen R.B., Liu X., Yang Y., Gu C., Bolton J.L.: 2001. Equine estrogen metabolite 4-hydroxyequilenin induces DNA damage in the rat mammary tissues: formation of single-strand breaks, apurinic sites, stable adducts, and oxidized bases. *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 1654–1659.
- [208] Zhou W.S., Yin Z.H.: 1980. Hydroxylation of 16-dehydropregesterone by *Absidia orchidis*. *Hua Hsueh Hsueh Pao*, 38, 467–474.
- [209] Zierau O., Hauswald S., Schwab P., Metz P., Vollmer G.: 2004. Two major metabolites of 8-prenylnaringenin are estrogenic *in vitro*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 92, 107–110.
- [210] Zuurbier K.W., Leser J., Berger T., Hofte A.J., Schröder G., Verpoorte R., Schröder J.: 1998. 4-Hydroxy-2-pyrone formation by chalcone and stilbene synthase with non-physiological substrates. *Phytochemistry*, 49, 1945–1951.
- [211] Žakelj-Narvič M., Belič I.: 1987. Hydroxylation of steroids with 11 α -hydroxylase of *Rhizopus nigricans*. *J. Steroid Biochem.*, 28, 197–201.

MICROBIAL TRANSFORMATIONS OF BIOACTIVE STEROIDS AND SPENT HOPS CONSTITUENTS

S u m m a r y

As a result of biotransformation of testosterone and its analogues: with an additional C₁-C₂ double bond, with an additional 17 α -methyl group, and without a methyl group at C-19, and also progesterone and dehydroepiandrosterone by *Absidia glauca*, *Botrytis cinerea* and *Beauveria bassiana* fungi, 33 of derivatives were obtained, including 31 hydroxylated ones.

The most important for practical reasons, due to the desired position of hydroxylation and high yield of this reaction are the following biotransformations: testosterone to 7 α -hydroxytestosterone by *Botrytis cinerea*, 17 α -methyltestosterone to 7 α -hydroxy-17 α -methyltestosterone by *Botrytis cinerea*, 1-dehydrotestosterone to 14 α -hydroxy-1-dehydrotestosterone by *Botrytis cinerea*, 17 α -methyltestosterone to 11 α -hydroxy-17 α -methyltestosterone by *Beauveria bassiana*, 1-dehydro-17 α -methyltestosterone to 11 α -hydroxy-1-dehydro-17 α -methyltestosterone by *Beauveria bassiana*, progesterone to 11 α -hydroxytestosterone by *Beauveria bassiana*, and dehydroepiandrosterone to 5-androsten-3 β , 11 α ,17 β -triol by *Beauveria bassiana*. The last product is a new compound.

There have been two processes observed not reported so far: hydroxylation of steroids at 12 β position by genera *Absidia* and hydroxylation at 7 α position by species *Botrytis cinerea*. Low substrate specificity along with a very high regio- and stereoselectivity of *Beauveria bassiana* enzymes were confirmed for hydroxylation of steroids.

Research on degradation of hop bitter acids showed that microorganisms are capable of their decomposition. As far as yeast cultivation is concerned, except for irradiation and temperature, concentration of riboflavin produced by these microorganisms is significant in this process.

As a result of transformation of xanthohumol by the fungi: *Absidia glauca*, *Beauveria bassiana*, *Pezizula cinnamomea* and *Fusarium equiseti* 6 products were obtained, which were formed by conjugation of the substrate with glucose moiety, hydroxylation of prenyl chain, cyclisation of prenyl chain to dihydrofuran ring and rearrangement of chalcone to flavanone. The products of xanthohumol transformation by *Fusarium equiseti*: 2''-(2'''-hydroxyisopropyl)-dihydrofuran-[2'',3'':4',3']-2',4-dihydroxy-6'-methoxychalcone, and also (2*R*, 2''*S*)- and (2*R*, 2''*R*)-2''-(2'''-hydroxyisopropyl)-dihydrofuran-[2'',3'':7,8]-4'-hydroxy-5-methoxyflavanone are new compounds.

Key words: biotransformation, steroids, hop flavonoids, biodegradation, hop bitter AIDS, microorganisms