

POZOSTAŁOŚĆ PO EKSTRAKCJI CHMIELU  
NADKRYTYCZNYM DWUTLENKIEM WĘGLA  
JAKO ŹRÓDŁO TECHNOLOGICZNIE  
UŻYTECZNYCH SUBSTANCJI



Mirosław Anioł

POZOSTAŁOŚĆ PO EKSTRAKCJI CHMIELU  
NADKRYTYCZNYM DWUTLENKIEM WĘGLA  
JAKO ŹRÓDŁO TECHNOLOGICZNIE  
UŻYTECZNYCH SUBSTANCJI

*Autor*

dr inż. Mirosław Anioł

*Opiniodawca*

prof. dr hab. inż. Paweł Kafarski

*Redaktor merytoryczny*

prof. dr hab. inż. Ewelina Dziuba

*Opracowanie redakcyjne*

dr Ewa Jaworska

*Korekta*

mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

*Łamanie*

Alina Gebel

*Projekt okładki*

Halina Sebzda

Monografie LXXXIV

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2009

ISSN 1898-1151

ISBN 978-83-60574-83-6

**WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO WE WROCŁAWIU**

**Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki**

**ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel. 71 328-12-77**

**e-mail: [wyd@up.wroc.pl](mailto:wyd@up.wroc.pl)**

---

Nakład 100 + 16 egz. Ark. wyd. 6,5. Ark. druk. 5,5

Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna  
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

# SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW .....	7
PRZEDMOWA .....	9
1. WSTĘP.....	11
1.1. Wybrane związki chemiczne chmielu.....	11
1.2. Skład wychmielin otrzymanych w wyniku ekstrakcji chmielu nadkrytycznym dwutlenkiem węgla i potencjalne możliwości jego utylizacji .	16
2. PRZEDSTAWIENIE I ANALIZA WYNIKÓW .....	19
2.1. Materiały i metody.....	19
2.2. Analiza śladowych ilości terpenoidów zawartych w wychmielinach .....	22
2.3. Odgoryczenie wychmielin .....	27
2.3.1. Opracowanie metody analizy śladowych ilości gorzkich kwasów w wychmielinach .....	27
2.3.2. Izomeryzacja humulonów w wychmielinach za pomocą przegrzanej pary wodnej .....	30
2.3.3. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalników organicznych.....	32
2.3.4. Wpływ rodzaju ekstrahenta na zawartość białka w wychmielinach .....	36
2.3.5. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez enzymy pochodzenia roślinnego .....	39
2.4. Izolowanie ksantohumolu z wychmielin.....	41
2.5. Synteza 8-prenylonaringeniny .....	45
2.6. Synteza pochodnych izoksantohumolu i 8-prenylonaringeniny .....	50
2.7. Biotransformacje flawonoidów chmielu za pomocą roślin wyższych .....	55
2.8. Transformacje 6,7-epoksygeraniolu przez mikroorganizmy .....	69
3. PODSUMOWANIE .....	75
4. PIŚMIENNICTWO .....	77



## WYKAZ SKRÓTÓW

8PN – 8-prenylonaringenina  
AcMe – aceton  
AcOEt – octan etylu  
AL – adlupulon  
EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy, kwas wersenowy  
Et<sub>2</sub>O – eter dietylowy  
EtOH – etanol  
GC – chromatografia gazowa  
HIV – wirus niedoboru odporności  
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa  
IAH – izoadhumulon  
IH – izohumulon  
IKH – izokohumulon  
IR – spektroskopia w podczerwieni  
IXH – izoksantohumulol  
KH – kohumulon  
KL – kolupulon  
MeCN – acetonitryl  
MeOH – metanol  
MS – spektroskopia masowa  
N – naringenina  
NAH – n+adhumulon  
NDS – najwyższe dopuszczalne stężenie  
NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego  
PTFE – politetrafluoroetylen  
PVPP – poliwinylpolipirolidon  
Py – pirydyna  
RSD – względne odchylenie standardowe  
RT – temperatura pokojowa  
SD – odchylenie standardowe  
SDE – ekstrakcja ciągła z jednoczesną destylacją z parą wodną  
SM – sucha masa  
SPME – mikroekstrakcja do fazy stałej  
THF – tetrahydrofuran  
TLC – chromatografia cienkowarstwowa  
UV – spektroskopia w nadfiolecie  
XH – ksantohumulol





## PRZEDMOWA

Przedmiotem prowadzonych badań był stały odpad poprodukcyjny, wychmieliny, które powstają podczas produkcji olejku chmielowego używanego w piwowarstwie w wyniku ekstrakcji szyszek chmielowych za pomocą nadkrytycznego dwutlenku węgla.

Celem badań było opracowanie efektywnej metody odgoryczenia wychmielin, aby mogły być użyte jako pełnowartościowy dodatek paszowy oraz pozyskanie z nich substancji o zastosowaniu praktycznym, co obniżyłoby koszty związane z ich utylizacją.

W skład rozprawy habilitacyjnej wchodzi między innymi 6 publikacji, dotyczących odgoryczenia wychmielin oraz związków w nich obecnych, przede wszystkim ksantohumolu, flawonoidu wykazującego szerokie spektrum działania farmakologicznego, który był podstawowym substratem w syntezie pochodnych. Przeprowadzone badania obejmowały analizę śladowych ilości terpenów w wychmielinach, usuwanie gorzkich kwasów chmielowych za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi, stosowanie do tego celu preparatów enzymatycznych pochodzenia roślinnego oraz izolowanie ksantohumolu. Ponadto opracowano metodę syntezy 8-prenylonaringeniny z izoksantohumolu, która posłużyła także do otrzymania *O*-alkilowych, alkenylowych i acylowych pochodnych, związków o potencjalnej aktywności antynowotworowej i estrogennej. W innych badaniach geraniol, jeden ze składników chmielu, przekształcono w 6,7-epoksy pochodną, którą następnie biotransformowano przy użyciu mikroorganizmów. Ksantohumol, izoksantohumol, 8-prenylonaringeninę oraz ich strukturalny analog – naringeninę poddano działaniu rozdrobnionego miąższu owoców i warzyw w celu opracowania metody ich biotransformacji i otrzymania nowych pochodnych.

Publikacje dotyczące tego opracowania ukazały się w latach 2005–2009 i są wymienione chronologicznie.

1. Anioł M., Huszcza E.: 2005. Biotransformation of 6,7-epoxygeraniol by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 311–315.
2. Anioł M., Huszcza E., Bartmańska A., Żoźnierczyk A., Mączka W., Wawrzeńczyk C.: 2007. Trace analysis of volatiles in spent hop. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 65, 214–218.
3. Anioł M., Żoźnierczyk A.: 2008. Extraction of spent hop using organic solvents. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 66, 208–214.
4. Anioł M., Jarosz A., Żoźnierczyk A.: 2008. Influence of the kind of extractant on the protein content in the spent hop. *Chemistry for Agriculture, CZECH-POL TRADE, Prague–Brussels*, 8, 348–355.

5. Anioł M., Szymańska K., Żołnierczyk A.: 2008. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from isoxanthohumol with magnesium iodide etherate. *Tetrahedron*, 64, 9544–9547.
6. Anioł M., Bartmańska A., Huszcza E., Mączka W., Żołnierczyk A.: 2009. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez enzymy pochodzenia roślinnego. *Przemysł Chemiczny*, 5, 392–395.

Rozprawa habilitacyjna zawiera również dotychczas niepublikowane wyniki badań prowadzonych w ramach dwóch grantów: 1. Grant KBN Nr 3 PO9B 028 27 pt. „Chemiczne i mikrobiologiczne metody detoksykacji poekstrakcyjnego osadu chmielowego pod kątem wymogów paszowych”, 2004–2006 (kierownik: prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk, główny wykonawca: dr inż. Mirosław Anioł); 2. Grant MNiSW Nr N N312 279634 pt. „Otrzymywanie pochodnych flawonoidów izolowanych z wychmielin, będących potencjalnymi prozdrowotnymi dodatkami do żywności, oraz detoksykacja wychmielin”, 2008–2011 (kierownik: dr inż. Mirosław Anioł).

Na podstawie przeprowadzonych badań dokonano 9 zgłoszeń patentowych:

1. M. Anioł, E. Huszcza, A. Bartmańska, A. Żołnierczyk, W. Mączka, C. Wawrzeńczyk. Sposób usuwania gorzkich kwasów z poekstrakcyjnych odpadów chmielowych. Nr rej. UP RP: P-379084, 2006.
2. M. Anioł, K. Szymańska, A. Żołnierczyk. Sposób wytwarzania 8-prenylnaringeniny i jej pochodnych. Nr rej. UP RP: P-384696, 2008.
3. M. Anioł, A. Łątka, A. Żołnierczyk. Nowa 7,4'-di-*O*-allilo-8-prenylnaringenina oraz sposób jej otrzymywania. Nr rej. UP RP: P-387754, 2009.
4. M. Anioł, A. Łątka, A. Żołnierczyk. Nowa 7,4'-di-*O*-allilo-5-*O*-metylo-8-prenylnaringenina oraz sposób jej otrzymywania. Nr rej. UP RP: P-387755, 2009.
5. M. Anioł, A. Łątka, A. Żołnierczyk. Nowa 7,4'-di-*O*-acetylo-5-*O*-metylo-8-prenylnaringenina oraz sposób jej otrzymywania. Nr rej. UP RP: P-387756, 2009.
6. M. Anioł, A. Łątka, A. Żołnierczyk. Nowa 7,4'-di-*O*-pentylo-5-*O*-metylo-8-prenylnaringenina oraz sposób jej otrzymywania. Nr rej. UP RP: P-387757, 2009.
7. M. Anioł, A. Łątka, A. Żołnierczyk. Nowa 7,4'-di-*O*-palmitoilo-5-*O*-metylo-8-prenylnaringenina oraz sposób jej otrzymywania. Nr rej. UP RP: P-387758, 2009.
8. M. Anioł, A. Łątka, A. Żołnierczyk. Nowa 7,4'-di-*O*-palmitoilo-8-prenylnaringenina oraz sposób jej otrzymywania. Nr rej. UP RP: P-387759, 2009.
9. M. Anioł, K. Józefowska, A. Żołnierczyk. Sposób otrzymywania ksantohumolu. Nr rej. UP RP: P-388047, 2009.

Praca w takim kształcie nie powstałaby bez długoterminowych badań, które były możliwe dzięki przyznanej przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego grantom, prowadzonych wspólnie z kolegami z Katedry Chemii.

Za tę współpracę, która zaowocowała licznymi naszymi publikacjami, serdecznie dziękuję.

# 1. WSTĘP

## 1.1. Wybrane związki chemiczne chmielu

Głównym odbiorcą chmielu (*Humulus Lupulus* L.) jest przemysł browarniczy, gdzie używa się go do produkcji piwa, któremu nadaje charakterystyczny gorzki smak i chmielowy aromat. Tradycyjnie jest stosowany w przemyśle kosmetycznym jako składnik szamponów do włosów i w preparatach poprawiających stan skóry oraz wyciągach używanych w leczeniu dolegliwości przewodu pokarmowego. Młode pędy chmielu są jadalne i mogą być spożywane w stanie surowym oraz gotowanym. Sporadycznie stosuje się go jako substancję smakową i konserwującą w przemyśle cukierniczym i wędliniarskim.

Pomimo że chmiel i jego zastosowania praktyczne znane są ludzkości od kilku tysięcy lat, to wciąż budzą zainteresowanie badaczy, czego wynikiem są nowe możliwości wykorzystania chmielu i jego ekstraktu jako czynnika antynowotworowego [33, 36, 170], antibakteryjnego [96, 134, 142], przeciwzapalnego [155], ichtiotoksycznego [4], naturalnego fitoestrogenu [135], leku przeciwko osteoporozie [153], antyutleniacza [19, 148, 155] oraz środka nasennego i uspokajającego [113, 136].

Działanie lecznicze chmielu jest związane z obecnością pewnych związków chemicznych lub ich mieszanin. Niektóre z tych właściwości są już wykorzystywane, a niektóre mogą znaleźć zastosowanie w przyszłości.

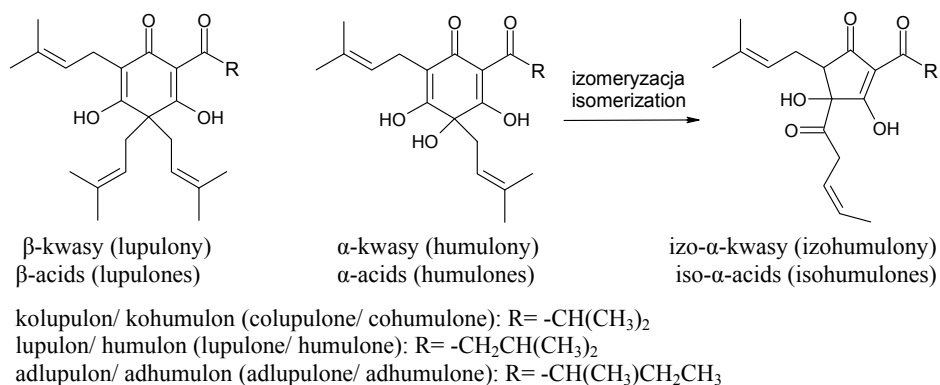
Chmiel zawiera ponad 1000 różnych substancji chemicznych [46], z których najważniejszymi, pod względem posiadanych właściwości, są olejki eteryczne, kwasy chmielowe i flawonoidy.

**Olejki eteryczne**, nazywane olejkami chmielowym, stanowią od 0,5 do 2% suchej masy szyszek i oprócz węglowodorów terpenowych zawierają także produkty ich utlenienia. Skład tej frakcji jest cechą zależną głównie od odmiany uprawianego chmielu, co może być przydatne do jej identyfikacji [92].

**Kwasy chmielowe** są związkami odpowiedzialnymi za gorzki smak oraz przyczyniają się do stabilizowania piany i ochrony przed zakażeniami bakteryjnymi piwa. Wykazują działanie bakteriobójcze, głównie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* i inne), wirusom (cytomegalowirus, wirus opryszczki pospolitej typu 1 i 2, HIV-1), grzybom (*Candida albicans*, *Trichophyton*, *Fusarium*, *Mucor* i innych) oraz malarii (zarodziec sierpowaty) [59, 119].

Kwasy chmielowe stanowią od 5 do 20% suchej masy dojrzałych szyszek chmielowych. Dzieli się je na  $\alpha$ -kwasy, zwane inaczej humulonami, w skład których wchodzi humulon, kohumulon i adhumulon oraz  $\beta$ -kwasy, czyli lupulony: lupulon, kolupulon i adlupulon (rys. 1).

Humulony i lupulony prawie nie mają gorzkiego smaku, który powstaje, w klasycznym sposobie produkcji piwa, w trakcie gotowania brzeczki, kiedy to humulony izomeryzują do rozpuszczalnych izohumulonów, bezpośrednio odpowiedzialnych za goryczkę piwa. W tym czasie lupulony wytrącają się ze względu na słabą rozpuszczalność w wodzie i częściowo rozkładają, a większość olejków eterycznych ulega ulotnieniu. Nie jest możliwa izomeryzacja lupulonów, ponieważ w miejscu grupy hydroksylowej humulonów mają grupę prenylową. Powyższe przekształcenie można wykonać poprzez gotowanie humulonów w roztworach obojętnych lub słabo zasadowych [95, 132]. Zasadowa izomeryzacja jest stosowana w przemyśle w celu przygotowania izo- $\alpha$ -kwasów (tzw. ekstraktu zizomeryzowanego) pod postacią soli potasowych, które dodaje się pod koniec procesu warzenia piwa. Dogodną metodą izomeryzacji humulonów jest zastosowanie 1-procentowego roztworu węgla sodu, który ogrzewany z substratem w ciągu 5 min daje pożądaną produkt [139], lub ogrzewanie bez dostępu powietrza z MgO, ZnO, CaO, albo wodorotlenkami tych metali [54].



Rys. 1. Gorzkie kwasy chmielowe i produkty ich izomeryzacji  
Fig. 1. Hop bitter acids and products of their isomerization

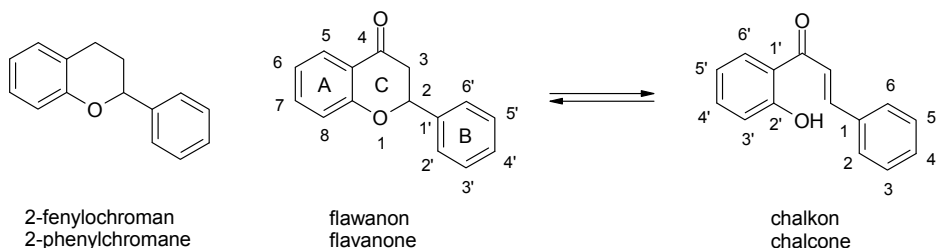
Lupulony są mniej stabilne od humulonów, zwłaszcza w obecności światła, podwyższonej temperaturze oraz w środowisku zasadowym o pH powyżej 10. Można je jednak przechowywać bez rozkładu w roztworach metanolowych, ale wymaga to temperatury poniżej -20°C [68]. Wszystkie kwasy chmielowe jako czyste związki są rozpuszczalne w metanolu, etanolu, acetonie, octanie etylu, eterze etylowym, chlorku metylenu, bardzo dobrze w heksanie [68, 95, 135] i prawdopodobnie w większości rozpuszczalników organicznych. Wydajność ekstrakcji można zwiększyć, przyspieszając osiągnięcie stanu równowagi poprzez zastosowanie ultradźwięków, co znalazło zastosowanie w ekstrakcji chmielu [159].

Badania nad ekstrakcją humulonów, lupulonów, kohumulonów i kolupulonów z roztworów wodnych za pomocą octanu etylu pokazały znaczną zależność rozpuszczalności od pH. Ponieważ są to słabe kwasy [135], to koncentracja ich formy niezdisocjowanej jest najwyższa przy pewnym optymalnym pH, w którym ich rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych jest największa [55]. Stopień ekstrakcji zależy również od obecności protein. W wyżej opisanych badaniach była to albumina z surowicy wołowej,

w której stopień ekstrakcji był tym mniejszy, im większa była zawartość albuminy. Tłumaczy się to kompleksowaniem kwasów chmielowych przez białka [55, 132]. Sugerowano też możliwość tworzenia kompleksów typu metal-humulon-proteina [58].

W szyszkach chmielowych, podczas ich dojrzewania i składowania obserwuje się ciągły proces utleniania  $\alpha$  i  $\beta$ -kwasów, pod wpływem tlenu atmosferycznego, do tzw. żywic twardych [66]. W wyniku ekspozycji humulonów i lupulonów na wolne rodniki, obecne w atmosferze, tworzy się między innymi 2-metylo-3-buten-2-ol [102]. Związek ten jest częściowo odpowiedzialny za właściwości nasenne chmielu i jego ekstraktów [171]. Badania wykonane na myszach, z użyciem ekstraktów chmielowych wzbogaconych w humulony i lupulony, wykazały, że obydwie grupy kwasów są odpowiedzialne za efekt nasenny. Przy czym udowodniono, że aby osiągnąć taki sam skutek, należało zastosować 6 razy większą dawkę lupulonów niż humulonów [136]. Innym związkiem podejrzewanym, że wnosi swój wkład we właściwości nasenne, jest myrcenol, który powstaje z myrcenu podczas gotowania preparatów chmielowych. Jednak jego wpływ nie wydaje się tak jasny [13, 136]. Biorąc pod uwagę ostatnie badania, pytanie – jakie i ile związków jest odpowiedzialnych za właściwości nasenne – pozostaje ciągle otwarte. Innym objawem procesu utlenienia jest zmniejszenie goryczki piwa w trakcie jego dojrzewania. Jest to spowodowane obniżeniem się stężenia izohumulonów z powodu procesów oksydacyjnych. W przechowywanym piwie jest to proces powolny. W temperaturze 40°C, przez 156 dni, w zamkniętym naczyniu zmniejszenie zawartości izohumulonów wynosiło 71% [161]. Zakłada się, że w tym czasie dochodzi do wytwarzania aktywnych form tlenu, takich jak:  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  i rodnika  $\bullet OH$ . Można przyspieszyć ten proces poprzez intensywne napowietrzanie, dodatek nadtlenu wodoru oraz jonów  $Fe(II/III)$ ,  $Cu(I/II)$  lub zastosowanie tych dwóch czynników jednocześnie [85]. W cytowanej pracy przeprowadzono między innymi dwa doświadczenia. W pierwszym wytrząsano piwo przy swobodnym dostępie powietrza z dodatkiem jonów  $Fe^{3+}$  lub  $Fe^{2+}$  o stężeniu 4,4  $\mu M$  przez 10 dni. Drugie doświadczenie przeprowadzono analogicznie z tą różnicą, że dodano  $H_2O_2$  o stężeniu 0,005 M (0,017%). Wyniki pokazały, że w pierwszym doświadczeniu stężenie izohumulonów spadło o 40% a w drugim o 63% i prawie nie zależało od tego, który kation żelaza użyto w reakcji. Podejrzewa się, że mechanizm utlenienia katalizowany przez jony żelaza jest podobny do reakcji Fentona, rozkładu nadtlenu wodoru, bądź też do analogicznej reakcji Habera-Weisa, w której biorą udział jony miedzi.

**Flawonoidy chmielu.** Flawonoidy są związkami zaliczanymi do polifenoli, w których jest obecny szkielet 2-fenylochromanu. Należą do nich flawony, flawon-3-ole (flawonole), izoflawony, flawanony, flawan-3-ole (katechiny), flawan-3,4-diole (leuko-antocyjanidyny), antocyjanidyny i auronny. Do grupy flawonoidów zalicza się również chalkony, ze względu na łatwość zamknięcia się pierścienia z utworzeniem flawanonu (rys. 2).

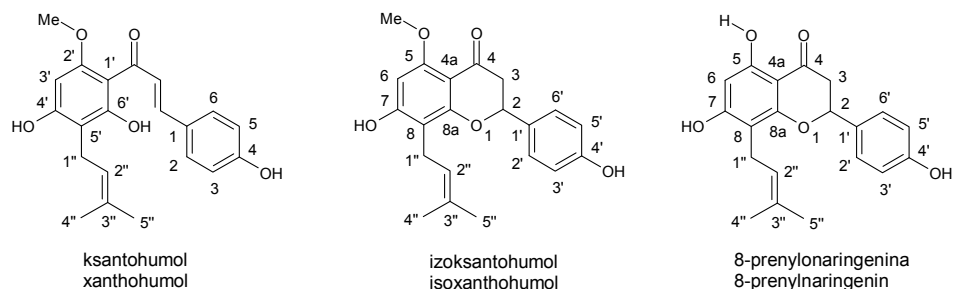


Rys. 2. Układ 2-fenylochromanonu flawonoidów. Izomeryzacja flawanon-chalkon  
Fig. 2. 2-Phenylchromanone moiety of flavonoids. Flavanone-chalcone isomerization

Większość flawonoidów, oprócz 3-flawanoli i 3,4-flawandioli, występuje w roślinach w formie związanej z sacharydami jako *O*-, głównie jako 3-*O*-glikozydy, lub C-glikozydy i polimery [65]. Najczęściej w skład glikozydów wchodzi glukoza, galaktoza, arabinoza, glukoramnoza i ramnoza [37]. Metody ich wstępnego izolowania, w celu ich dalszej analizy jakościowej i ilościowej, z materiału roślinnego przeważnie polegają na ekstrakcji rozpuszczalnikami. Glikozydy flawonoidów, ze względu na swoją dużą polarność, ekstrahuje się z suchego materiału za pomocą alkoholi (metanolu, etanolu i wyższych) i ich roztworów wodnych. Używany jest też aceton, acetonitryl, octan etylu lub eter dietylowy zwłaszcza w celu ekstrakcji aglikonów [98, 128]. Szczególnie przydatny jest słabo rozpuszczalny w wodzie octan etylu, który zapewnia jednocześnie wysoką polarność, konieczną w ekstrakcji polarnych flawonoidów. Zastosowano go między innymi do ekstrakcji baikaliny i baikaleiny oraz flawanonu z mieszanin po przeprowadzeniu biotransformacji [90, 91].

Zakłada się, że w większości przypadków metabolizm glikozydów flawonoidów w organizmie ludzkim rozpoczyna się od ich deglikozylacji w jelicie cienkim [43, 115]. Powyższe związki są zawarte w dużych ilościach w warzywach i owocach. Są one powszechnie znane z ich aktywności przeciwutleniającej, antynowotworowej, antywirusowej, antygrzybiczej i antibakteryjnej, które wykorzystuje się w medycynie i doborze odpowiedniej prozdrowotnej diety.

Najważniejszym flawonoidem występującym w chmielu jest prenylowany chalkon, ksantohumul (XH). Stanowi on od 0,1 do 1% suchej masy szyszek chmielowych [145] (rys. 3).



Rys. 3. Główne flawonoidy chmielu  
Fig. 3. The main hop flavonoids

Towarzyszy mu co najmniej 13 innych prenylowanych chalkonów w ilości 10–100 razy mniejszej, takich jak dezmetyloksantohumol (5–30% ilości XH), ksantogalenol, 4'-*O*-metyloksantohumol, 3'-geranylochalconaringenina, 3',5'-diprenylochalconaringenina, 5'-prenyloksantohumol, flawokawina, ksantohumol B, C, D i E,  $\alpha,\beta$ -dihydroksantohumol i wodzian izodehydrocykloksantohumolu. Wszystkie z nich zawierają w swojej budowie wolną grupę hydroksylową przy atomie węgla 2', tak więc mogą izomeryzować do odpowiednich flawanonów [145, 146, 165]. W podobnie małej ilości występują flawanony, takie jak izoksantohumol (0,6–2% ilości XH), 8-prenyloksantohumol (0,1–0,5% ilości XH) i 6-prenyloksantohumol, 6,8-diprenyloksantohumol, 8-geranyloksantohumol, 6-geranyloksantohumol, 7-*O*-metylo-6-prenyloksantohumol, 7-*O*-metylo-8-prenyloksantohumol, 5,7-di-*O*-metylo-8-prenyloksantohumol i 5,7-di-*O*-metyloksantohumol [147].

Zawartość ksantohumolu w szyszkach chmielowych zależy przede wszystkim od odmiany uprawianego chmielu (tab. 1). Mają na to wpływ również warunki pogodowe panujące podczas jego wegetacji [32].

Tabela 1  
Table 1

Zawartość ksantohumolu w szyszkach chmielowych w sezonie 2005 i 2006 r.  
i polifenoli w sezonie 2006 w stosunku do suchej masy  
Xanthohumol and polyphenol content in hop cones for 2005 and 2006 season

Odmiana Variety	Ksantohumol, sezon 2005 r. [% SM] Xanthohumol content in hop cones in 2005 [% DM]	Ksantohumol, sezon 2006 r. [% SM] Xanthohumol content in hop cones in 2006 [% DM]	Polifenole, sezon 2006 r. [% SM] Polyphenol content in hop cones in 2006 [% DM]
Aurora	0,4	0,4	15,92
Celeia	0,3	0,3	14,66
Taurus	0,7	0,8	7,44
Sth Star	0,4	0,6	14,89
AH Jug2	0,1	0,2	10,76
Merkur	0,4	0,3	16,75
Cicero	0,3	0,3	10,22
279D112	0,5	0,6	13,94
279/112	0,6	0,5	9,83

Ksantohumol powstaje w chmielu na drodze 2'-*O*-metylacji grupy hydroksylowej dezmetyloksantohumolu, drugiego flawonoidu pod względem zawartości w szyszkach chmielowych, przy udziale *O*-metylotransferazy [145]. W ostatnich latach zyskał on duże znaczenie z uwagi na jego silne działanie terapeutyczne. Działa on inhibująco *in vitro* na kancerogenezę w fazie jej inicjacji, promocji i progresji [36, 60, 121, 145]. Najnowsze badania donoszą o jego hamującym wpływie na tworzenie się nowych naczyń krwionośnych (angiogenezy), doprowadzających substancje odżywcze do komórek rakowych [3, 110]. Wśród flawonoidów chmielu najsilniejsze działanie antyoksyda-

cyjne wykazują ksantohumol i dezmetryloksantohumol, które jest silniejsze niż w nieprenyloowanych związkach, takich jak np.  $\alpha$ -tokoferol, jednak jest słabsze niż w kwercetynie [145]. Ksantohumol wykazuje także działanie przeciwwirusowe [27], w tym przeciwko HIV-1 [162]. Jest inhibitorem resorpcji kości [44], co znalazło wyraz w jego opatentowaniu jako leku przeciwko osteoporozie [152]. Głównym źródłem ksantohumolu, izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny w pożywieniu jest piwo. Jednak ze względu na bardzo małe ilości chmielu dodawanego do piwa i rozkład ksantohumolu podczas termicznej obróbki jest on w nim obecny w ilościach śladowych. Niektóre sposoby przygotowania ekstraktu chmielowego wręcz nie pozwalają na jego pozyskanie z powodu bardzo małej rozpuszczalności w ekstrahencie, np. w procesie ekstrakcji chmielu nadkrytycznym dwutlenkiem węgla. Skutkiem tego jest oczywiście jeszcze większe zmniejszenie zawartości ksantohumolu w piwie. Dlatego produkowane są piwa wzbogacone w ten związek. Wydaje się, że raczej w celach marketingowych niż leczniczych. Ze względu na prozdrowotne działanie ksantohumolu, poprawiające ogólną kondycję organizmu, produkowane są preparaty, w których główną substancją czynną jest ten związek, np. MeridiumXN (BioNovix Inc.).

Innymi flawonoidami występującymi w chmielu, które budzą w ostatnich latach bardzo duże zainteresowanie badaczy, jest 8-prenylnaringenina i izoksantohumol. 8-prenylnaringenina jest najsilniejszym znanym fitoestrogenem [111, 174], jednak nie tak silnie działającym jak ludzki estrogen,  $17\beta$ -estradiol. Może ona mieć zastosowanie w terapii hormonalnej związanej z okresem menopauzy u kobiet. Takie działanie, ale o wiele słabsze, wykazuje też izoksantohumol, który w wątrobie ludzkiej jest częściowo transformowany do 8-prenylnaringeniny [116]. Takie przekształcenie zachodzi również pod wpływem mikroflory jelitowej [123]. Obydwa związki wykazują znaczące działanie antynowotworowe przeciwko rakowi piersi [25, 26, 111].

## **1.2. Skład wychmielin otrzymanych w wyniku ekstrakcji chmielu nadkrytycznym dwutlenkiem węgla i potencjalne możliwości jego użycia**

W tradycyjnej metodzie warzenia piwa chmiel jest gotowany z brzeczka, aby nadać jej aromat i gorzki smak. W dzisiejszych czasach tę metodę stosuje się jedynie w małych, lokalnych browarach. W produkcji piwa na masową skalę najczęściej używa się gotowych ekstraktów chmielowych. Skład ekstraktów często modyfikuje się na drodze chemicznej, dokonując izomeryzacji zawartych w nich kwasów chmielowych i, w dalszym procesie, ich uwodornienia. Historycznie do ekstrakcji chmielu stosowano takie rozpuszczalniki jak: etanol (1908, Anglia), chlorek metylenu (1942, Niemcy), trójchlorometan (1960, Niemcy), benzen (1961, Anglia), metanol (1965, Anglia), heksan (1970, USA), ciekły  $\text{CO}_2$  (1980, Anglia) i nadkrytyczny  $\text{CO}_2$  (1982, Niemcy). Najbardziej zaawansowaną technologicznie i pozwalającą otrzymać produkt o najwyższej jakości jest ekstrakcja za pomocą nadkrytycznego dwutlenku węgla, którą przeprowadza się w możliwie jak najniższej temperaturze, aby uniknąć rozkładu kwasów chmielowych. W tych warunkach nie zachodzi także ich izomeryzacja. Nadkrytyczny dwutlenek węgla jest doskonałym niepolarnym rozpuszczalnikiem (stała dielektryczna  $\epsilon = 1,30$  w  $50^\circ\text{C}$



i 115 bar) o polarności porównywalnej z *n*-heksanem ( $\epsilon = 1,89$  w 20°C). Jednak w przeciwieństwie do niego ma większe powinowactwo do substancji polarnych i może tworzyć wiązania wodorowe z donorami protonów [157], takimi jak grupy hydroksylowe i karboksylowe. Polarność nadkrytycznego CO<sub>2</sub> można zwiększyć poprzez podniesienie jego temperatury albo dodatek polarnych rozpuszczalników, takich jak aceton, etanol lub metanol.

Przykładowy skład ekstraktu otrzymanego po zastosowaniu nadkrytycznego CO<sub>2</sub> jest następujący: kwasy chmielowe ogółem 74,4%, w tym kohumulon (13,2%), *n*-humulon i adhumulon (35,3%), kolupulon (12,1%), *n*-lupulon i lupulon (13,8%); olejek chmielowy 8,5 ml/100g (oznaczany metodą destylacji z parą wodną), w tym myrcen (42,9%), kariofilen (7,5%), humulen (27,6%), farnezen (poniżej 0,1%), tlenek kariofilenu (0,1%), linalol (0,3%), limonen (1,2%) geraniol (0,2%), 2-undekanon (0,1%).

Współcześnie metodę ekstrakcji nadkrytycznym CO<sub>2</sub> stosuje się w wielu krajach świata [57, 120] i w Polsce, gdzie w 2000 r. została wybudowana nowoczesna i pierwsza w Polsce oraz Europie Centralnej instalacja tego typu, która znajduje się w Instytucie Nawozów Sztucznych w Puławach. Stała pozostałość otrzymana po ekstrakcji chmielu za pomocą nadkrytycznego dwutlenku węgla zawiera substancje obecne w wyjściowym chmielu i słabo rozpuszczalne w ekstrahencie. Nadkrytyczny CO<sub>2</sub> jest substancją niepolarną, a więc rozpuszcza składniki niepolarne, takie jak kwasy chmielowe, olejki eteryczne i tłuszcze. Substancje polarne pozostają w osadzie poekstrakcyjnym (wychmielinach). Są to białka, aminokwasy, cukry, polifenole, w tym ksantohumul i sole.

Przykładowy skład wychmielin, otrzymanych w wyniku ekstrakcji nadkrytycznej chmielu odmiany Marynka w sezonie 2003/2004, był następujący: sucha masa (94,15%), popiół surowy (10,02%), białko surowe (29,51%), tłuszcz surowy (5,05%), NDF (35,06%), ADF (27,28%), P całkowity (7,07 mg/g), Mg (2,89 mg/g), Ca (2,73 mg/g), K (33,57 mg/g), Na (0,54 mg/g), Zn (79,23 µg/g), Cu (93,71 µg/g) [69], kwasy chmielowe (2 mg/g). Godna odnotowania jest bardzo duża zawartość białka surowego, porównywalna do tej w lucernie (20–25%). W zależności od odmiany chmielu i warunków pogodowych waha się ona pomiędzy 20 a 30%.

Wychmieliny są uciążliwym, pylistym odpadem, którego utylizacja jest ważnym problemem ze względu na zanieczyszczenie środowiska. Dyrektywa Wspólnoty Europejskiej kwalifikuje je jako odpady, które nie mogą być odprowadzane do systemów kanalizacyjnych jako ścieki, ponieważ powodują ich blokowanie [34].

Ze względu na wysoki koszt utylizacji, wychmieliny są najczęściej stosowane w postaci nieprzetworzonej jako nawóz. Znane też są technologie przekształcenia ich w nawóz o dużej zawartości azotu i fosforu [106]. Mogą być także źródłem wysokobiałkowej mąki, otrzymywanej w wyniku ekstrakcji wodnym roztworem izopropanolu i odparowania rozpuszczalników [154] lub też paszy dla przeżuwaczy [112]. Rozważano także możliwości zastosowania ich jako dodatek do fermentacyjnej produkcji olejku zapachowego [97], wytwarzania kwasów organicznych i cukrów prostych w procesie utleniania [52] oraz usuwania toksycznych metali ciężkich z roztworów wodnych [56]. Produkcja tego odpadu jest znacząca. Przykładowo, roczna produkcja wychmielin i wysłodzin browarnianych w Niemczech w 1997 r. wyniosła 1 954 000 ton [97]. W Polsce roczna produkcja samych wychmielin w wyniku ekstrakcji chmielu nadkrytycznym

dwutlenkiem węgla przekracza 1 000 ton. Brak jest innego, alternatywnego zagospodarowania wychmielin, które miałyby szersze zastosowanie [117], chociaż w ostatnim okresie zyskały one znaczenie jako dogodne źródło ksantohumolu [47].

Wychmieliny otrzymane w wyniku ekstrakcji nadkrytycznej dwutlenkiem węgla, ze względu na dużą zawartość białka, w tym aminokwasów takich jak lizyna, metionina i cysteina oraz obecność innych pożądaných składników mogą być wartościowym dodatkiem do paszy [34, 117]. Z uwagi na skład nie budzą zastrzeżeń, jedynie w miedzi obserwuje się przekroczenie wartości NDS, która w roślinach i płodach rolnych przeznaczonych na cele paszowe nie powinna być większa niż 50  $\mu\text{g/g}$  suchej masy. Może to stwarzać problemy w skarmianiu owiec i bydła, dla których dawki toksyczne wynoszą odpowiednio 15 i 115  $\mu\text{g/g}$  [24]. W przypadku skarmiania tych zwierząt tę niedogodność można usunąć, stosując wychmieliny w mieszance z innymi paszami, tak aby nie została przekroczona dawka toksyczna. W USA pozostałości pochmielowych używa się w żywieniu owiec i bydła. W większych browarach wychmieliny są mieszane z wysłódkami i suszone. Jeżeli ich zawartość nie przekracza 5%, to nie ma to znaczącego wpływu na wartości odżywcze.

## 2. PRZEDSTAWIENIE I ANALIZA WYNIKÓW

### 2.1. Materiały i metody

**Wychmieliny**, które były przedmiotem prowadzonych badań, otrzymano w wyniku ekstrakcji chmielu za pomocą nadkrytycznego dwutlenku węgla. Odmianę chmielu Marynka poddano ekstrakcji w sezonie 2004/2005 i 2005/2006 w Zakładzie Ekstraktów Chmielowych Instytutu Nawozów Sztucznych w Puławach. W badaniach dotyczących analizy ilościowej terpenoidów, ekstrakcji gorzkich kwasów oraz ksantohumolu posłużono się średnią próbką, pobraną z około 30 kg wychmielin. Materiał był rozcierany w moździerz i przesiewany przez sito o średnicy oczek 1 mm, aż cała jego ilość przeszła przez sito, wymieszany i przechowywany w temperaturze  $-24^{\circ}\text{C}$  w szczelnym naczyniu o pojemności 3 l. Przed wykonaniem doświadczenia wychmieliny w naczyniu ogrzano do temperatury pokojowej, po czym pobrano ich próbki. Wilgotność użytych do doświadczeń wychmielin została oznaczona poprzez ogrzewanie w  $105^{\circ}\text{C}$  przez 1 h.

**Ekstrakt chmielowy**, otrzymany w wyniku ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla, zawierał 68,8% humulonów oraz lupulonów i pochodził z Zakładu Ekstrakcji Nadkrytycznej Instytutu Nawozów Sztucznych w Puławach.

**Odczynniki** zakupiono w firmie Merck, Sigma-Aldrich i Chempur.

**Roztwór kalibracyjny izohumulonów, humulonów i lupulonów**, użyty w analizie ilościowej, zawierał 15 mg standardu izokwasów (ICS-II: izohumulon (IH; 23,26%), izokohumulon (IKH; 34,29%) i izoadhunulon (IAH; 6,952%)) oraz 15 mg standardu humulonów i lupulonów (ICE-2: *n*-humulon i adhumulon (NAH; 34,94%), kohumulon (KH; 14,45%), *n*-lupulon i adlupulon (NAL; 12,02%) i kolupulon (KL; 12,92%)) w 50 ml zakwaszonego metanolu (0,5 ml 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  w 1000 ml MeOH). Wzorce ICS-II i ICE-2 zakupiono w Labor Veritas (Zürich, Switzerland).

**Roztwory kalibracyjne**, użyte w analizie ilościowej ksantohumolu, naringeniny, izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny, zawierały 2 mg odpowiedniego związku w 50 ml metanolu.

**Owoce i warzywa** w większości przypadków były „świeże” i, oprócz truskawek, kupione w lokalnym sklepie. Większość doświadczeń wykonano w maju i czerwcu, natomiast pietruszkę badano w marcu, topinambur oraz kalarepę w październiku, pigwę w listopadzie, a chrzan oraz czarną rzepę w grudniu. Użyto bulw ziemniaka z dwóch różnych źródeł pochodzenia, krajowego i importowanego z Grecji. Truskawki zebrano pod koniec czerwca jako zielone, twarde owoce. Ze względu na dobre warunki pogodowe truskawki nie były zarażone szarą pleśnią. Nie były także przyskane przeciwko chorobom.

**Analiza jakościowa TLC** została wykonana na płytkach aluminiowych pokrytych żelazem krzemionkowym o grubości 0,2 mm (Kieselgel 60  $\text{F}_{254}$ , Merck). Jako fazę

rozwijającą stosowano głównie mieszaniny chloroformu i metanolu w różnych proporcjach ilościowych. Wizualizację substancji na płytkach uzyskano poprzez spryskanie roztworem 10 g  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  oraz 20 g kwasu fosfomolibdenowego w 1 l 10-procentowego  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i ogrzanie.

**Preparatywna chromatografia kolumnowa** została wykonana na żelu krzemionkowym (Kieselgel 60, 230-400 mesh, Merck) przy użyciu eluentu będącego mieszaniną chloroformu i metanolu.

**Analiza HPLC/UV** była prowadzona przy zastosowaniu aparatu firmy Waters wyposażonym w moduł separacyjny 2690 i detektor diodowy 996. Wykorzystano kolumny z odwróconą fazą C-18: Waters Spherisorb 5  $\mu\text{m}$  ODS2, 4,6x250 oraz Marcherey-Nagel Nucleodur 100-5 C18 ec 4,6x250.

**Analizę GC/EIMS** wykonano przy użyciu chromatografu gazowego Varian CP 3800 połączonego ze spektrometrem masowym Varian Saturn 2000 pracującym przy 20 eV. Chromatograf gazowy był wyposażony w kolumnę Chrompack, CP-Sil 5 CB, 25 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ . Jako gaz nośny zastosowano hel.

**Analizę GC** przeprowadzono na aparacie Hewlett Packard 5890 z zamontowaną kolumną HP-20 M, 25 m x 0,32 mm x 0,3  $\mu\text{m}$  (Hewlett Packard) lub kolumną chiralną CP-Chirasil-Dex CB, 25 m x 0,25 mm. Jako gaz nośny zastosowano wodór.

**Widma  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR** zostały wykonane przy użyciu aparatów: NMR Bruker Avance II, Bruker AMX 500 lub Bruker AMX 300.

**Widma IR** próbek w KBr lub filmie wykonano przy zastosowaniu spektrometru Mattson IR 300.

**Oznaczenie zawartości terpenoidów w wychmielinach** wykonano według metody opisanej w publikacji dotyczącej badań własnych [9].

**Zawartość białka surowego** (N x 6,25) oznaczono metodą Kjeldahla.

**Zawartość białka właściwego** oznaczono metodą z użyciem kwasu wolframowego [99].

**Przygotowanie próbek wychmielin do analizy HPLC kwasów chmielowych** oparto na metodzie EBC 7.7 [5], w której zastosowano trzy modyfikacje dotyczące sposobu wykonania oraz składu układu ekstrakcyjnego. Metoda jest opisana w publikacji dotyczącej badań własnych [12].

**Przygotowanie próbek zawierających ksantohumol, naringeninę, izoksantohumol i 8-prenylnaringeninę oraz analiza HPLC.** Po odparowaniu rozpuszczalnika organicznego z próbki pozostałość rozpuszczono w 2–5 ml metanolu, przefiltrowano i 2–20  $\mu\text{l}$  tak przygotowanego roztworu poddano analizie HPLC. Próbkę umieszczoną w karuzeli były utrzymywane w temperaturze 10°C. Kolumna z odwróconą fazą C-18 (Waters Spherisorb 5 $\mu\text{m}$  ODS2, 4,6x250 mm) była termostatowana w 28°C. Faza mobilna zawierała dwa eluenty: MeCN (A) oraz 1% r-r HCOOH w wodzie (B) i jej przepływ wynosił 1 ml/min. Zastosowano następujący program elucji: 0–1 min: 50% A; 1–16 min: 50–100% A; 16–21 min: 100% A; 21–23 min: 100–50% A; i 23–28 min: 50% A. Zawartość ksantohumolu oznaczono przy 368 nm a naringeniny, izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny przy 290 nm, stosując wzorce zewnętrzne.

**Aktywność enzymatyczną peroksydaz** oznaczono metodą kolorymetryczną z użyciem *o*-dianizydyny przy pH = 6 w temperaturze 25°C [35].

**Rozkład gorzkich kwasów pod wpływem preparatów enzymatycznych owoców i warzyw.** Materiał biologiczny rozdrobniono i odważono 3 g. Następnie dodano poliwinylpolipirrolidon (PVPP, 0,1% (m/m)) i 30 ml 0,1-molowego buforu fosforanowego o pH 6,0. Tak przygotowaną próbę homogenizowano 1 minutę w temperaturze pokojowej. Homogenat sączono, a przesącz wirowano przez 1 godzinę w 4°C przy 15000 rpm (19575 g). Supernatant (30 ml) umieszczono w kolbie Erlenmeyera o pojemności 50 ml. Do kolby dodano 10 mg ekstraktu chmielowego w 1 ml metanolu (substrat) oraz 0,3 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kolbę umieszczono na wstrząsarce laboratoryjnej i prowadzono biotransformację w temperaturze 25°C przez 72 godziny bez dostępu światła (amplituda 6, 120 rpm). W przypadku soku z grejpfruta i pomarańczy medium reakcyjne zawierało sok oraz PVPP 0,1% (V/m) i bufor w stosunku objętościowym 1:1. Próba kontrolna zawierała bufor zamiast ekstraktu roślinnego [175].

**Ekstrakcje wychmielin** przeprowadzono pod chłodnicą zwrotną, w kolbach okrągłodennych o objętości 250 ml, do których wsypywano 2,5 g wychmielin, wlewano odpowiednią objętość rozpuszczalnika (25 lub 50 ml) i natychmiast wstawiano do uprzednio nagranych koszy grzejnych. Czas, w którym zawartość zaczynała wrzeć, wynosił około 1 minuty. Po odpowiednim czasie, licząc od momentu początku wrzenia, kolbę chłodzono zimną wodą przez 2 minuty i szybko sączono jej zawartość. Ze stałej pozostałości odparowano rozpuszczalnik do stałej masy i analizowano w niej zawartość kwasów chmielowych, białka lub ksantohumolu. W przypadku ekstrakcji wodą stałe pozostałości były liofilizowane do stałej masy. Doświadczenia prowadzone w temperaturze pokojowej wykonywano na mieszadzie magnetycznym o szybkości obrotów około 2 000 rpm za pomocą dużej sztabki mieszającej. W takich warunkach tworzyła się emulsja.

**Ekstrakcja wychmielin wspomagana ultradźwiękami** polegała na sonifikacji 2,5 g wychmielin w 50 ml rozpuszczalnika przez 5 min w kolbie okrągłodennej zanurzonej w wodzie o temperaturze 23°C. Pozostałe operacje przygotowania próbki do analizy wykonano analogicznie jak powyżej. Do badań użyto sonifikatora Dr Hielscher UP 200h, Hielscher Ultrasonic GmbH, Teltow, Germany (praca ciągła, amplituda = 80%).

**Izomeryzacja humulonów do izohumulonów w wychmielinach za pomocą przegrzanej pary wodnej** przeprowadzono metodą opisaną w publikacji dotyczącej badań własnych [12].

**Biotransformacje za pomocą owoców i warzyw** przeprowadzono w oparciu o metodę redukcji alifatycznych ketonów i ketoestrów, opisaną poprzednio [131], z tą różnicą, że dla każdego dnia analizy przygotowano osobną kolbę z biotransformacją. Wszystkie czynności wykonywano w taki sposób, aby zapewnić w jak największym stopniu sterylność prowadzonych doświadczeń, stosując ogólnie przyjęte zalecenia, używając nieuszkodzonych warzyw i owoców. Większość bioreagentów obierano, jednocześnie unikając głębokich wcięć w głąb miąższu tak aby nie przenosić w takie miejsca mikroorganizmów. Truskawki bez obierania zalano roztworem podchlorynu sodu, popłukano wodą destylowaną i włożono na 30 min do 70% etanolu. W badaniach przesiewowych stosowano 30 ml wody, 5 g startych owoców lub warzyw i 2 mg substratu, który był rozpuszczony w 1 ml acetonu. Biotransformacje prowadzono bez dostępu światła, przez maksymalnie 72 h, biorąc za każdym razem do analizy całą objętość próbki, którą ekstrahowano octanem etylu, a po odparowaniu rozpuszczalnika analizowano zawartość flawonoidów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

**Ilości mikroorganizmów** oznaczono, stosując dwa rodzaje pożywek:

1. Agar Sabourauda do hodowli grzybów o składzie: pepton mięsno-kazeinowy (10 g), glukoza 1-wodna (40 g), agar (15 g) w 1 l wody.

2. Agar do hodowli bakterii, o składzie: ekstrakt wołowy (2 g), ekstrakt drożdżowy (2 g), aminiobak (5 g), NaCl (4 g), glukoza (10 g), agar (20 g) w 1 l wody.

Posiew wykonano na płytkach Petriego metodą wglębną.

**Demetylacja izoksantohumolu oraz jego eterowych i arylowych pochodnych** została przeprowadzona według metody opisanej w publikacji dotyczącej badań własnych [11].

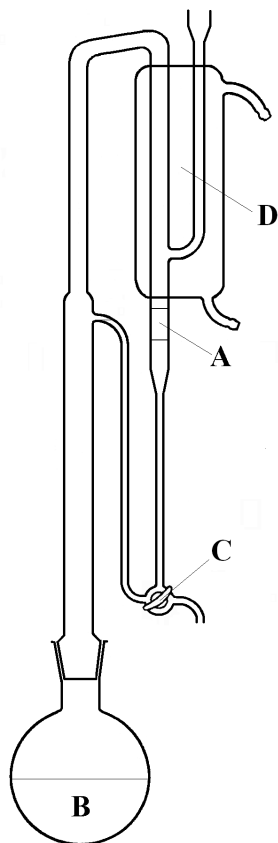
**Grzyby użyte do biotransformacji 6,7-epoksygeraniolu** pochodziły z kolekcji Instytutu Biologii i Botaniki Akademii Medycznej we Wrocławiu (*Rhodotorula marina* AM77, *R. glutinis* AM242, *Saccharomyces cerevisiae* AM464, *Botrytis cinerea* AM235), z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (*Yarrowia lipolytica* AR71) oraz NCAIM (*Candida parapsilosis* Y.01011, *Candida kefir* Y.01070). **Biotransformacje** z ich użyciem wykonano według metody opisanej w publikacji dotyczącej badań własnych [8].

## 2.2. Analiza śladowych ilości terpenoidów zawartych w wychmielinach

Podczas ekstrakcji chmielu za pomocą nadkrytycznego dwutlenku węgla nie wszystkie składniki zapachowe były z niego usuwane do końca, o czym świadczył charakterystyczny chmielowy zapach próbek otrzymanych do badań. Jednym z celów prowadzonych doświadczeń było przekształcenie dotychczasowego odpadu, wychmielin, w wartościowy dodatek do paszy. Biorąc pod uwagę, że zapach może mieć wpływ na atrakcyjność i ilość zjadanej przez zwierzęta karmy, podjęto próby scharakteryzowania jakościowego i ilościowego związków za to odpowiedzialnych.

Rutynową metodą w badaniu składu jakościowego i ilościowego terpenów jest destylacja z parą wodną i analiza destylatu przy wykorzystaniu chromatografii gazowej. Metoda ta wymaga użycia dużej ilości próbki (50–100g) [71]. Inna popularna metoda analizy olejków eterycznych polega na połączeniu ekstrakcji ciągłej i destylacji z parą wodną (SDE) w aparacie Lickensa-Nickersona. W przypadku małych ilości analitów, ze względu na stosunkowo dużą objętość fazy organicznej, z reguły zachodzi konieczność jej zateżenia do objętości 1 ml w aparacie Kuderna-Danisha [16, 28, 29, 31, 51, 87]. Kolejną metodą, w ostatnich latach bardzo popularną, jest mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME). Sposób ten polega na tym, że włókno ze stałym absorbentem zanurza się w badanym roztworze na określony czas, aby doszło do sorpcji analitów. Następnie całość wprowadza się do gorącego dozownika chromatografu gazowego, gdzie anality są uwalniane i przechodzą dalej do kolumny chromatograficznej. Oprócz niepodważalnych zalet, takich jak łatwość wykonania, szybkość osiągania równowagi (od kilku do kilkudziesięciu minut plus czas wykonania analizy chromatograficznej GC), ekonomiczność i uniwersalność, metoda ta ma ograniczenia w stosunku do analitów o wysokich masach cząsteczkowych i tym samym niskiej lotności. Wyniki zależą wtedy znacząco od temperatury, masy i rodzaju próbki [50, 86, 93, 105, 126]. Część związków zawartych w chmielu występuje w formie połączeń z cukrami [63, 89]. Aby oznaczyć olejki eteryczne związane pod postacią glikozydów, analizowaną próbkę poddaje się

destylacji z parą wodną w aparacie typu Clevengera przez 3 h z dodatkiem węgla wapnia. Następnie przeprowadza się ich enzymatyczną hydrolizę i oznacza uwolnione związki [23, 104]. Jeden ze sposobów prowadzenia destylacji z parą wodną, rekomendowany przez Farmakopeę Polską, polega na zastosowaniu aparatu [9] typu Clevengera, wynalezionego przez polskiego badacza, profesora Jakuba Derynga (rys. 4). Modyfikacja tej popularnej w Polsce metody, choć biorąc pod uwagę liczbę publikacji zagranicznych –



Rys. 4. Aparat Derynga: A – ekstrahent, B – zawiesina próbki w wodzie, C – zawór trójdrożny, D – chłodnica  
Fig. 4. Deryng apparatus: A – extracting agent, B – sample suspension in water, C – three-way valve, D – condenser

się do oznaczeń w olejku chmielowym, gdzie ilość powyższych związków jest bardzo duża, a nie w materiale, z którego podczas procesu technologicznego usunięto je z jak największą starannością. W celu znalezienia odpowiedniego sposobu przygotowania

mało rozpowszechnionej w świecie, pozwala na połączenie destylacji ciągłej z parą wodną i ekstrakcji w małej objętości rozpuszczalnika organicznego [122]. Istota działania aparatu jest podobna do tej w metodzie SDE, z tą różnicą, że faza organiczna nie znajduje się w ruchu. Powoduje to nieznaczne wydłużenie czasu ekstrakcji, co z nawiązką rekompensuje brak konieczności dodatkowego zateżnienia roztworu po ekstrakcji. Dużą zaletą jest też możliwość przemycia, po przeprowadzeniu destylacji, górnej części wnętrza aparatu poprzez podniesienie poziomu otrzymanego ekstraktu, stosując dolnie wody górnym króćcem aparatu.

Wychmieliny, które były przedmiotem prowadzonych badań, otrzymano w wyniku ekstrakcji chmielu za pomocą nadkrytycznego dwutlenku węgla. Odmianę chmielu Marynka poddano ekstrakcji w sezonie 2005/2006 w Zakładzie Ekstraktów Chmielowych Instytutu Nawozów Sztucznych w Puławach.

Przeprowadzona wstępna analiza GC i GC-MS wykazała obecność  $\beta$ -myrcenu, limonenu, linalolu, geraniolu, 2-undekanonu,  $\beta$ -kariofilenu i  $\alpha$ -humulenu. Oprócz powyższych związków, które są wyznacznikami jakości olejku chmielowego używanego w produkcji piwa, zbadano także wychmieliny na obecność tlenu kariofilenu. Wychmieliny zawierały śladowe ilości powyższych związków i dlatego poszukiwano sposobu, który pozwalałby na ich selektywne i ilościowe wyodrębnienie z próbek wychmielin, otrzymanych po ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla, o małej masie, rzędu 0,5–1 g.

Opisywane w literaturze metody odnosiły

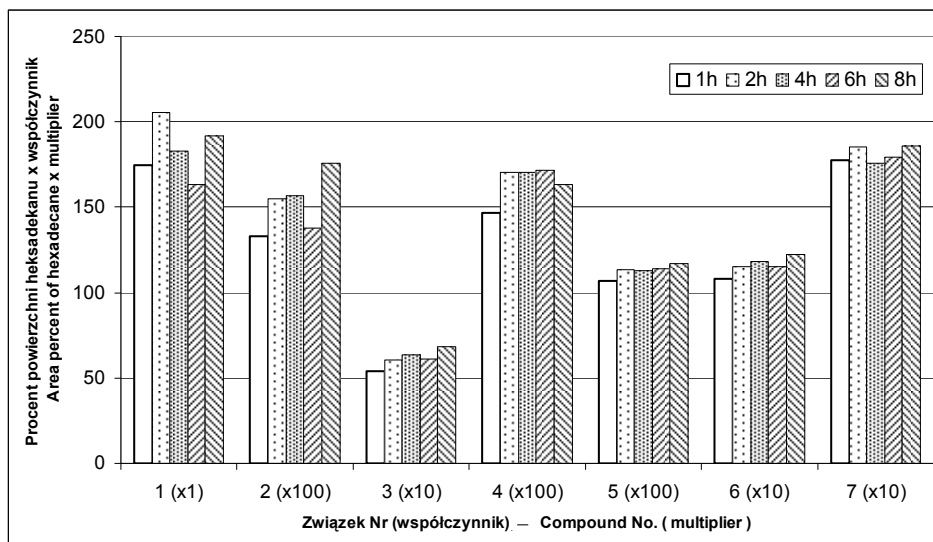
próbki do analizy GC, wstępnie zastosowano destylację z parą wodną z następczą ekstrakcją destylatu za pomocą rozpuszczalników. Niestety, ilość analitów była zbyt mała i zidentyfikowano tylko  $\beta$ -myrcen. Powtarzalność analiz ilościowych tego związku była słaba. Zwiększenie skali destylacji zwiększało objętość rozpuszczalnika potrzebnego do ekstrakcji i dokładnego przemycia odbieralnika. Powstawała konieczność wykonania jeszcze jednej operacji zateżania ekstraktu w aparacie Kuderna-Danisha, co znacznie komplikowałoby całą analizę. Proste odparowanie nadmiaru rozpuszczalnika nie wchodziło w rachubę ze względu na lotność oznaczanych związków. Badany materiał nie pozwalał także na bezpośrednią ekstrakcję małą objętością metanolu, etanolu lub acetonu, ponieważ łągowały one bardziej polarne składniki, które zatykały dozownik chromatografu gazowego. Zastosowano również izooktan, który okazał się nieefektywny, prawdopodobnie ze względu na małą wgłębną penetrację materiału, oraz jego mieszaniny z acetonem, które nie dały pozytywnych rezultatów. Metoda jednoczesnej destylacji-ekstrakcji z użyciem zminiaturyzowanego aparatu Likensa-Nickersona (SDE) zakończyła się także niepowodzeniem. Najlepsze wyniki otrzymano, stosując aparat Derynga, który pozwolił na połączenie destylacji z parą wodną z ekstrakcją w małej objętości izooktanu wynoszącej 1 ml. Użyta metoda miała również tę zaletę, że w swej istocie była podobna do prostej destylacji z parą wodną, którą stosuje się szeroko w celu analizy olejku i innych preparatów chmielowych.

W opracowanym sposobie destylacji poddawano zawiesinę 0,5 g wychmielin w 100 ml wody. Większa ilość wychmielin powodowała silne pienienie się zawartości i przerzucanie zawiesiny poza obręb kolby destylacyjnej. Syfon aparatu był wypełniony wodą destylowaną i zawierał 1 ml izooktanu, a w nim 20  $\mu\text{g}$  heksadekanu, który pełnił funkcję wzorca wewnętrznego. Destylację prowadzono w pięciu aparatach Derynga, które nieznacznie różniły się wymiarami, w tym samym czasie przez 1, 2, 4, 6 lub 8 godzin. Po jej zakończeniu każdy aparat oziębiono i pobrano izooktanowy roztwór badanych związków, który przechowywano w ciemności w temperaturze 4°C, aż do momentu wykonania analizy GC. Podczas prowadzenia destylacji starano się, aby intensywność grzania w każdej kolbie oraz chłodzenie destylatu było takie same. Analizę jakościową przeprowadzono w oparciu o porównanie czasów retencji i widm masowych badanych związków z zakupionymi wzorcami. Aby obliczyć zawartości analitów w wychmielinach, wyznaczono dla każdego z nich współczynnik korelacji ( $f_i$ ), zdefiniowany wyrażeniem  $f_i = G_i S_w / G_w S_i$ , gdzie  $G_i$  jest ilością wzorca badanego związku (na kolumnę nastrzykiwano po 20  $\mu\text{g}$ ),  $G_w$  – ilością wzorca wewnętrznego (20  $\mu\text{g}$  heksadekanu),  $S_i$  jest polem powierzchni pod sygnałem oznaczanego związku, a  $S_w$  – polem powierzchni pod sygnałem pochodzącym od wzorca wewnętrznego. Wartości wyznaczonych współczynników korelacji zależały w niewielkim stopniu od ilości związku podanego na kolumnę chromatograficzną, dlatego pominięto to w oznaczeniach. Jedynie dla tlenu kariofilenu współczynnik ten zależał silnie od ilości tego związku, ze względu na jego rozkład podczas analizy chromatograficznej GC. Jednak nie udało się stwierdzić jego obecności w badanym materiale. Zawartość badanego związku w wychmielinach ( $C$  [ $\mu\text{g}$  /g]) obliczono za pomocą równania:  $C = G_w S_i f_i / G_p S_w$ , gdzie  $G_w$  jest ilością wzorca wewnętrznego (20  $\mu\text{g}$ ) w 1 ml użytego do ekstrakcji izooktanu,  $S_i$  – polem powierzchni pod sygnałem oznaczanego związku,  $f_i$  – współczynnikiem korelacji,  $G_p$  – ilością wychmielin pobranych do analizy (0,5 g), a  $S_w$  – polem powierzchni pod sygnałem wzorca wewnętrznego.



Głównym oznaczanym składnikiem okazał się  $\beta$ -myrcen (241  $\mu\text{g/g}$ ). Analiza GC pokazała również obecność limonenu (7,83  $\mu\text{g/g}$ ), linalolu (8,08  $\mu\text{g/g}$ ), geraniolu (3,08  $\mu\text{g/g}$ ), 2-undekanonu (1,36  $\mu\text{g/g}$ ),  $\beta$ -kariofilenu (11,2  $\mu\text{g/g}$ ) i  $\alpha$ -humulenu (19,1  $\mu\text{g/g}$ ).

W ciągu pierwszej godziny prowadzenia destylacji-ekstrakcji w aparacie Derynga, prawie cała ilość badanych związków ulegała wyizolowaniu. Jednak biorąc pod uwagę otrzymane wyniki, wydaje się, że czas ten powinien być przedłużony do dwóch godzin (rys. 5).



Rys. 5. Profil przeprowadzonej destylacji-ekstrakcji. Wartości średnie obliczone na podstawie danych otrzymanych z 5 aparatów: 1 –  $\beta$ -myrcen, 2 – limonen, 3 – linalol, 4 – geraniol, 5 – 2-undekanon, 6 –  $\beta$ -kariofilen, 7 –  $\alpha$ -humulen [9]

Fig. 5. The extraction time profile. Mean values calculated for data obtained from five apparatuses: 1 –  $\beta$ -myrcene, 2 – limonene, 3 – linalool, 4 – geraniol, 5 – 2-undecanone, 6 –  $\beta$ -caryophyllene, 7 –  $\alpha$ -humulene [9]

Powtarzalność metody oznaczono dla dwóch wybranych aparatów w pięciu powtórzeniach. Aby być pewnym, że badane związki zostaną w całości przedestylowane, zwłaszcza, że nie zaobserwowano jakiegokolwiek ich rozkładu, wybrano 6-godzinny czas pracy aparatu Derynga. Powtarzalność opracowanej metody oznaczania śladowych ilości terpenoidów była dobra, na co wskazywały uzyskane wartości względnych odchyleń standardowych ( $n = 5$ ), mieszczące się dla wszystkich związków w zakresie 2,02–7,78% dla aparatu numer 1 i 2,98–14,3% dla aparatu numer 2. Ponadto, oznaczono i oszacowano powtarzalność metody dla poszczególnych pięciu aparatów w różnych czasach trwania destylacji-ekstrakcji. Najwyższe wartości względnych odchyleń standardowych zaobserwowano dla najbardziej lotnych związków,  $\beta$ -myrcenu i limonenu (11,8–20,4%). Prawdopodobnie ten parametr można poprawić, stosując intensywniejsze chłodzenie. Dla reszty oznaczanych związków zawierała się ona w zakresie od 1,71 do 13,4% (tab. 2).

Tabela 2  
Table 2

Wartości RSD i skład olejków chmielowych w wychmielinach (wilgotność 5,74%) [9]  
RSD values and the content of hop essential oils in the spent hop (5.74% moisture)

Związek Compound	RSD [%]								Zawartość Content [µg/g]
	Aparat Appa- ratus 1, n=5, 6h	Aparat Appa- ratus 2, n=5, 6h	Aparaty Appara- tuses 1-5, n=5, 1h	Aparaty Appara- tuses 1-5, n=5, 2h	Aparaty Appara- tuses 1-5, n=5, 4h	Aparaty Appara- tuses 1-5, n=5, 6h	Aparaty Appara- tuses 1-5, n=5, 8h	Aparaty Appara- tuses 1-5, n=5, 6h	
1. β-Myrcen β-Myrcene	7,78	14,3	19,0	20,4	15,2	18,7	11,8	241	
2. Limonen Limionene	5,61	10,5	18,0	16,1	15,8	17,7	15,8	7,83	
3. Linalol Linalool	3,26	5,68	9,41	6,19	11,4	11,2	8,55	8,08	
4. Geraniol Geraniol	2,94	4,48	5,92	9,55	1,71	8,60	5,07	3,08	
5. 2-Unde- kanon 2-Unde- canone	2,48	4,81	8,14	5,55	8,53	7,54	5,92	1,36	
6. β-Kario- filen β-Caryop- hyllene	2,52	4,39	8,70	10,4	12,4	13,4	12,1	11,2	
7. α-Humulen α-Humulene	2,02	2,98	5,72	6,56	9,54	9,23	8,99	19,1	

Glikozydy są związkami trwałymi w pH bliskim obojętnemu. Aby sprawdzić, czy oznaczane terpenoidy nie pochodzą z kwasowej hydrolizy ich glikozydów, przeprowadzono dodatkowy eksperyment, który polegał na analizie wychmielin z dodatkiem drobnokrystalicznego węgla wapnia w celu zneutralizowania ewentualnie tworzących się kwasów. Przesłanką do wykonania tych badań było to, że zaobserwowano niewielki wzrost kwasowości do około pH = 6,1 podczas wielogodzinnego ogrzewania do wrzenia wody z badanymi wychmielinami w aparacie Derynga. Wzrost kwasowości był niewielki, ale nie można było wykluczyć, że powodował hydrolizę glikozydów. Dodatek 0,5 g węgla wapnia sprawiał, że kwasowość wynosiła 6,8 po 6 godzinach destylacji. Zawartości oznaczanych terpenów nieznacznie różniły się od tych uzyskanych w doświadczeniu bez dodatku węgla wapnia o wartości od -6 do +1%, co świadczyło o tym, że zjawisko hydrolizy glikozydów w oznaczanym materiale można było pominąć.

Podsumowując, opracowana metoda analizy z wykorzystaniem aparatu Derynga i chromatografii gazowej pozwala na analizę śladowych ilości terpenoidów w wychmielinach.

Jej głównymi zaletami jest prostota, mała ilość próbki potrzebnej do jej wykonania (0,5 g) i czułość, która pozwala wykryć zawartości rzędu jednego mikrograma badanego związku w 1 gramie wychmielin (zawartość około  $10^{-4}\%$ ). Poza tym cechuje ją względnie krótki czas wykonania, wynoszący około 2 godzin, który można jeszcze skrócić, zwiększając intensywność grzania, oraz brak dodatkowego etapu zateżenia próbki ze względu na jednoczesną ekstrakcję w małej objętości rozpuszczalnika ( $\leq 1$  ml). Dodatkowo, jest ona podobna do powszechnie stosowanej metody destylacji z parą wodną, której używa się do analizy próbek o dużej masie i dużej zawartości olejków eterycznych. Pozwala to na porównanie wyników otrzymanych z tych analiz; na przykład, na porównanie zawartości lotnych składników w szyszkach chmielowych przed przemysłowym procesem ekstrakcji i po, w otrzymanych wychmielinach.

Powyższe wyniki badań zostały między innymi opisane w publikacji pt. "Trace analysis of volatiles in spent hop" [9].

### **2.3. Odgoryczenie wychmielin**

Współczesna literatura zaleca stosowanie pozostałości chmielowych w produkcji pasz. Podstawową przeszkodą w wykorzystaniu wychmielin jako składnika paszy jest obecność niewyekstrahowanych do końca gorzkich kwasów chmielowych [20, 40, 41, 77, 125, 160], które powodują, że pasza zawierająca wychmieliny jest niechętnie zjadana przez zwierzęta, ze względu na niekorzystne oddziaływanie smakowe i fizjologiczne. Prowadzenie przemysłowej ekstrakcji chmielu nadkrytycznym  $\text{CO}_2$  w celu całkowitego usunięcia gorzkich kwasów z chmielu jest bardzo trudne i nieopłacalne ekonomicznie. Dlatego, aby zastosować wychmieliny jako dodatek do paszy, należy obniżyć ich zawartość do wymaganego przepisami poziomu 0,1 mg/g [133].

Badania własne miały na celu usunięcie gorzkich kwasów z wychmielin za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikami, aby można było je zastosować jako dodatek do paszy dla zwierząt. W tak otrzymanym osadzie oznaczano ilościowo kwasy chmielowe, suchą masę, białko właściwe oraz surowe.

#### **2.3.1. Opracowanie metody analizy śladowych ilości gorzkich kwasów w wychmielinach**

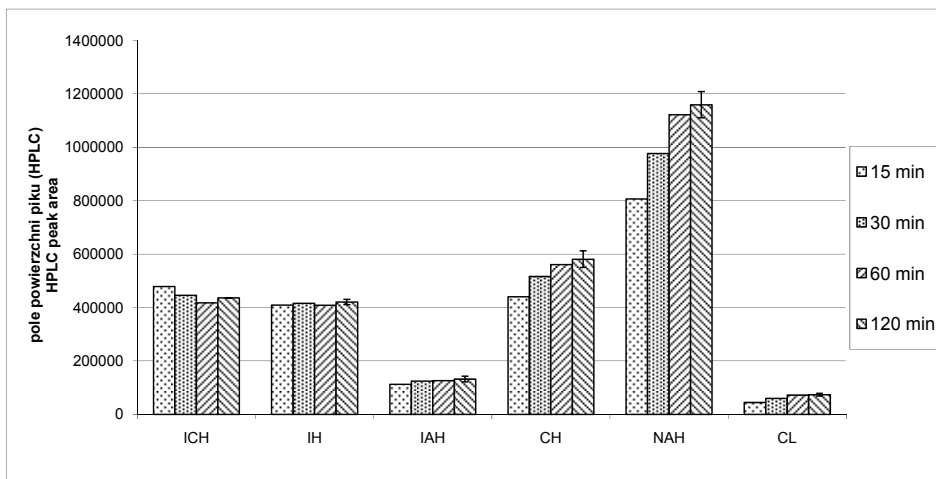
Prowadzone badania, których celem było usunięcie śladowych ilości gorzkich kwasów pozostających w wychmielinach, wymagały opracowania odpowiedniej metody ich analizy ilościowej. W tym celu zmodyfikowano metodę EBC 7.7 [5], w której istotną zmianą było zastosowanie izooktanu w miejsce eteru dietylowego. Głównym powodem rezygnacji ze stosowania eteru dietylowego była silna ekstrakcja zanieczyszczeń z wychmielin, które przeszkadzały w analizie HPLC. Zastosowanie izooktanu spowodowało znaczne osłabienie sygnałów pochodzących z zanieczyszczeń, jednocześnie ilości ekstrahowanych gorzkich kwasów nie uległy znaczącej zmianie. Wyniki otrzymane dla izoadhumulonu były o około 26% większe, co wskazywało na efektywniejszą ekstrakcję tego związku z użyciem izooktanu. W przypadku pozostałych kwasów otrzymano wyniki od 1,9 do 16% mniejsze.

Następną korzyścią użycia izooktanu było to, że jest on bardzo słabo rozpuszczalny w wodzie i metanolu. Do ekstrakcji 0,5 g próbki wychmielin zastosowano układ 0,1 M HCl-MeOH-izooktan (8 ml- 4 ml- 10 ml). Ze względu na nierozpuszczalność izooktanu w mieszaninie metanol-woda jego objętość po analizie wynosiła dokładnie tyle samo co przed nią. W przypadku zastosowania eteru dietylowego, tak jak w powszechnie stosowanej metodzie EBC 7.7, objętość ta stanowiła tylko 81% wartości początkowej, co potwierdzono dodatkowymi doświadczeniami bez dodatku wychmielin. Doświadczenie przeprowadzono w taki sposób, aby zminimalizować w jak największym stopniu straty eteru z uwagi na parowanie. Przydatność metody potwierdzono także eksperymentami, w których porównywano efektywność ekstrakcji poszczególnych humulonów i lupulonów z warstwy wodnej za pomocą eteru dietylowego i izooktanu dla szeregu ich stężeń w 5 powtórzeniach, stosując standardy humulonów i lupulonów (ICE-2, Labor Veritas, Zürich, Switzerland) i izohumulonów (ICS-II, Labor Veritas). Otrzymane wyniki różniły się nie więcej niż kilka procent.

Przed użyciem powyższej metody do oznaczania ilości gorzkich kwasów zbadano, jak zmienia się stopień ich ekstrakcji z wychmielin wraz z upływem czasu. Zamiast wytrząsania, właściwego w metodzie EBC 7.7 [5], zastosowano energiczne mieszanie na mieszadle magnetycznym (2000 rpm), podczas którego tworzyła się emulsja. W przypadku ekstrakcji izohumulonów równowaga ustalała się szybko, w czasie do 30 minut. Humulony i lupulony ekstrahowały się wolniej i po 1 h równowaga nie została jeszcze osiągnięta (rys. 6). Biorąc jednak pod uwagę niewielki, kilkuprocentowy, wzrost ilości humulonów i lupulonów w ekstrakcie po dalszej godzinie mieszania, jako rozsądny wybór do analizy wychmielin przyjęto 60 minut.

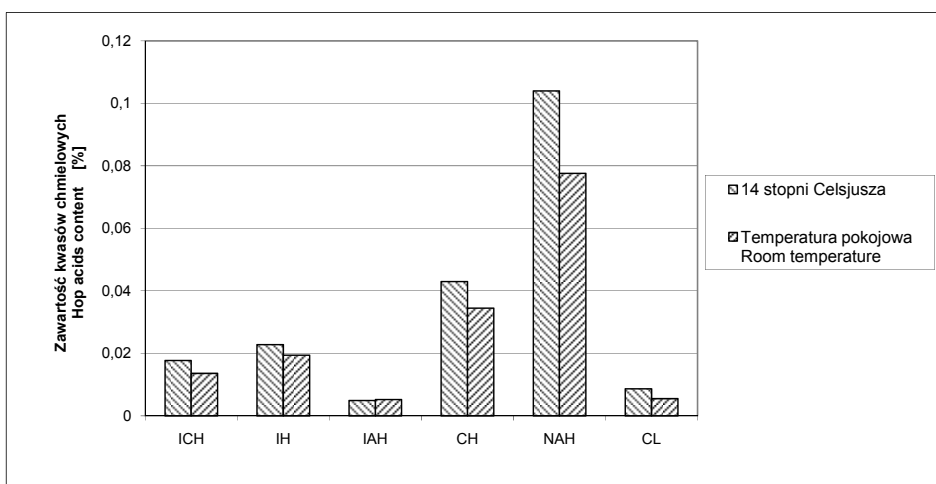
W innym eksperymencie, zamiast intensywnego mieszania analizowanej próbki, wykorzystano ultradźwięki, w krótszym czasie, do 10 minut, ze względu na rozgrzewanie się próbki i intensywne parowanie izooktanu. Otrzymane wyniki nie różniły się znacząco co do ilości oznaczanych kwasów chmielowych, jednak ich rozrzut był istotny. Pomimo prowadzenia ekstrakcji w ujednoczonych warunkach, obejmujących taki sam: czas ekstrakcji, z dokładnością co do sekundy, amplitudę drgań i okres, głębokość zanurzenia elektrody sonifikatora, temperaturę łaźni chłodzącej próbkę, nie udało się poprawić tego parametru. Dlatego tę metodę odrzucono.

Podczas prowadzonych badań zaobserwowano powolne obniżenie zawartości kwasów chmielowych w przechowywanych wychmielinach. Na rysunku 7 przedstawiono porównanie analizy dwóch próbek wychmielin (sezon 2004/2005) przechowywanych w temperaturze pokojowej oraz w 14°C w szczelnie zamkniętych pojemnikach w przeciągu 1 roku. Na rysunku zaznaczono zawartość procentową odpowiednich gorzkich kwasów w wychmielinach. Spadki zawartości gorzkich kwasów były następujące: IKH – 30,1%; IH – 17,5%; KH – 24,6%; NAH – 34,0%; KL – 56,7%. W ciągu tego czasu nastąpił wzrost zawartości izoadhumulonów o 5,4%. Było to związane z zachodzącą powolną izomeryzacją adhumulonów do tego związku. Taką izomeryzację zaobserwowano też w przypadku świeżych wychmielin, otrzymanych tuż po ekstrakcji chmielu odmiany Marynka, w grudniu 2005 roku. Zawierały one śladowe ilości izokwasów i gwałtowny wzrost ich ilości nastąpił w początkowym okresie przechowywania wychmielin w temperaturze pokojowej.



Rys. 6. Zależność stopnia ekstrakcji kwasów chmielowych od czasu dla izooktanu. Temperatura ekstrakcji: 22°C, ICH = izokohumulon, IH = izohumulon, IAH = izoadhumulon, CH = kohumulon, NAH = n+adhumulon, i CL = kolupulon [12]

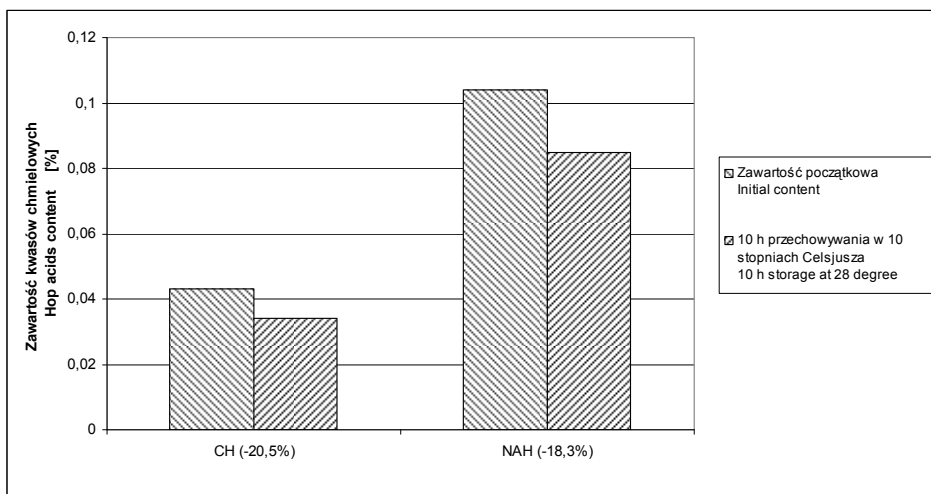
Fig. 6. Hop acids extraction time profile for isooctane. Extraction temperature: 22°C, ICH = isocohumulone, IH = isohumulone, IAH = isoaddhumulone, CH = cohumulone, NAH = n+adhumulone, and CL = colupulone [12]



Rys. 7. Rozkład kwasów chmielowych zawartych w wychmielinach odmiany Marynka w ciągu 1 roku przechowywania w 14°C i w temperaturze pokojowej

Fig. 7. Decomposition of Marynka bitter hop acids during 1 year of storage at 14°C and room temperature

Innym, ważnym zagadnieniem, mającym bezpośredni wpływ na dokładność otrzymanych wyników, był przyspieszony rozkład próbek przygotowanych do analizy HPLC. Kwasy chmielowe znajdujące się w metanолоwych roztworach ekstraktów chmielowych ulegały znaczącemu rozkładowi w temperaturze pokojowej w ciągu kilku godzin. Na przykład w ciągu 11 godzin przechowywania w ciemności w temperaturze 28°C uległo rozkładowi po około 20% kohumulonu i *n*-humulonu i adhumulonu (rys. 8). W tych samych warunkach czyste wzorce powyższych kwasów były całkowicie stabilne. Świadczy to o obecności w wychmielinach substancji przyspieszających rozkład kwasów chmielowych.



Rys. 8. Rozkład (zmiana zawartości procentowej) kohumulonu (CH) i n+adhumulonu (NAH) w roztworach metanолоwych po ich ekstrakcji z wychmielin Marynka w ciągu 10 h przechowywania w 28°C

Fig. 8. Decomposition (changing of percentage content) of methanolic solution of cohumulone (CH) and n+adhumulone (NAH) after extraction of Marynka spent hop during 10 h of storage at 28°C

### 2.3.2. Izomeryzacja humulonów w wychmielinach za pomocą przegrzanej pary wodnej

Podczas sterylizacji wodnych zawiesin wychmielin zaobserwowano, że zawarte w nich humulony ulegają daleko posuniętej izomeryzacji. Prowadziło to do jednoczesnego wzrostu gorzkości wychmielin. Fakt ten jest powszechnie znany i wykorzystuje się go podczas klasycznej metody warzenia piwa, kiedy to chmiel gotuje się z brzczyką. Dochodzi wówczas do przekształcenia humulonów w izohumulony.

Podstawowym zadaniem opisywanych w tym rozdziale badań było usunięcie gorzkości wychmielin, aby mogły stać się wartościowym dodatkiem do paszy. Pasze używane przez hodowców są często parowane i w takiej postaci podawane zwierzętom, dlatego znacznie mniej gorzkie humulony należy traktować podobnie jak wybitnie gorzkie izohumulony, ponieważ podczas obróbki termicznej (parowania) będą ich

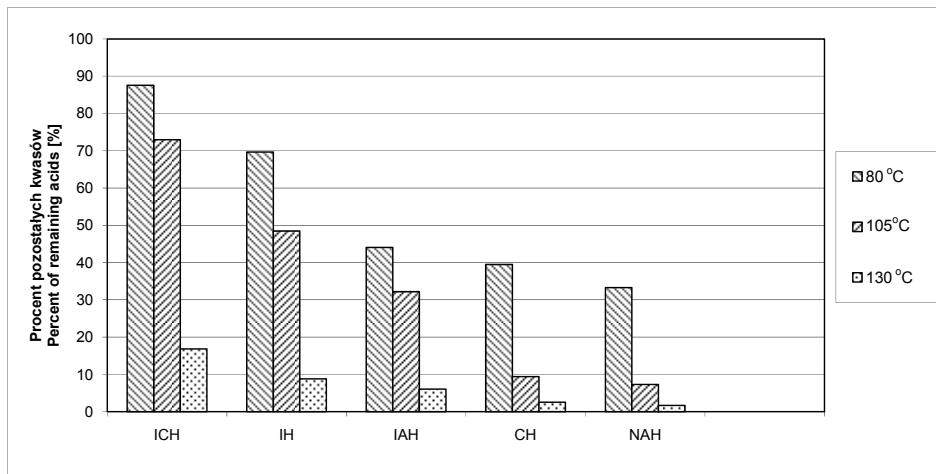
źródłem. Wychodząc z takiego założenia, wychmieliny poddano działaniu przegrzanej pary wodnej w autoklawie, pomimo że spodziewano się wzrostu ich gorzkości. W literaturze nie znaleziono informacji, aby wychmieliny otrzymane po ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla poddawano takiemu zabiegowi. Podejrzewano, że taka obróbka może spowodować ponadto rozluźnienie włókien wychmielin, co mogłoby ułatwić ekstrakcję gorzkich kwasów. Po przeprowadzeniu wstępnych prób – wychmieliny (10 g) ogrzewano w autoklawie w kolbie Erlenmayera o objętości 300 ml w temperaturze 121°C przez 20 minut przy swobodnym dostępie przegrzanej pary wodnej do wnętrza kolby zawierającej wychmieliny. W skrócie proces ten nazwano izomeryzacją wychmielin. Okazało się, że w tych warunkach następował tylko niewielki wzrost wilgotności wychmielin. Zawartość wilgoci wynosiła 8,5%, a więc była wystarczająco mała, aby uniemożliwić rozwój mikroorganizmów w tak spreparowanych wychmielinach, które nadawały się do dalszej ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi.

Użyte do badań wychmieliny (odmiana Marynka, sezon 2005/2006) o wilgotności  $4,47 \pm 0,219\%$ , w tym zastosowane do badań nad procesem izomeryzacji obecnych w nich kwasów, zawierały (wartość średnia  $\pm$  SD,  $n = 3$ ): izokohumulon ( $65,59 \pm 0,12 \mu\text{g/g}$ ), izohumulon ( $134,97 \pm 3,20 \mu\text{g/g}$ ), izoadhumulon ( $21,09 \pm 1,73 \mu\text{g/g}$ ), kohumulon ( $175,91 \pm 9,42 \mu\text{g/g}$ ), *n*-humulon i adhumulon ( $580,70 \pm 24,70 \mu\text{g/g}$ ), kolupulon ( $57,42 \pm 4,00 \mu\text{g/g}$ ) i adlupulon ( $15,65 \pm 0,99 \mu\text{g/g}$ ). Sumarycznie, zawartość izohumulonów, humulonów i lupulonów wynosiła odpowiednio 221,65, 756,61 i 73,07  $\mu\text{g/g}$ , w sumie 1,051  $\mu\text{g/g}$ .

Wychmieliny po izomeryzacji zawierały (wartość średnia  $\pm$  SD,  $n = 3$ ): izokohumulon ( $129,76 \pm 2,01 \mu\text{g/g}$ ), izohumulon ( $399,78 \pm 6,16 \mu\text{g/g}$ ), izoadhumulon ( $51,9 \pm 3,46 \mu\text{g/g}$ ), kohumulon ( $44,39 \pm 1,71 \mu\text{g/g}$ ), *n*-humulon i adhumulon ( $58,73 \pm 3,80 \mu\text{g/g}$ ), kolupulon ( $21,41 \pm 1,55 \mu\text{g/g}$ ) i adlupulon ( $10,68 \pm 0,27 \mu\text{g/g}$ ). Zawartość izohumulonów, humulonów i lupulonów wynosiła odpowiednio 581,44, 103,12 i 32,09  $\mu\text{g/g}$ ; sumarycznie 716,65  $\mu\text{g/g}$ . Oznaczona wilgotność wynosiła  $8,46 \pm 0,348\%$ .

Działanie przegrzanej pary wodnej, w relatywnie krótkim czasie wynoszącym 20 minut, powodowało efektywną izomeryzację humulonów do izohumulonów. W otrzymanych w ten sposób wychmielinach stosunek wagowy izohumulonów do humulonów wynosił 85:15 (przed izomeryzacją 23:77). Proces zachodził z wysokim 70-procentowym odzyskiem powyższych kwasów. Podobnemu zabiegowi poddano sproszkowane szyszki chmielowe zawierające lupulinę, o zawartości izohumulonów nie wyższej niż 1% w stosunku do ilości pozostałych kwasów. W tym przypadku dominował rozkład kwasów przy niewielkiej izomeryzacji humulonów. Na przykład, po 20 minutach odzyskano tylko 23% powyższych kwasów, wyrażoną jako suma izohumulonów i humulonów, przy ich stosunku wagowym 40:60. Uzyskane wyniki pod względem stopnia izomeryzacji kwasów, jak i ich odzysku, były zatem znacznie gorsze niż w przypadku izomeryzacji wychmielin. Powyższy wynik można wytłumaczyć tym, że humulony pozostające w wychmielinach, których nie jest w stanie wyekstrahować nadkrytyczny dwutlenek węgla, istnieją pod postacią kompleksów z białkami i metalami, takimi jak cynk lub miedź [55, 58]. Metale te, będące także składnikami enzymów, występują w chmielu w dużych ilościach i są w stanie katalizować powyższą reakcję. Przesłanką do przedstawionego stwierdzenia jest również fakt, że sole tych metali powszechnie stosuje się w przemysłowych procesach izomeryzacji ekstraktów chmielowych.

W innym eksperymencie wychmieliny były ogrzewane na powietrzu w temperaturach 80–120°C w różnych okresach czasu, do 24 godzin włącznie. W tym przypadku, głównym zaobserwowanym procesem był rozkład gorzkich kwasów. Nie zauważono znaczącej izomeryzacji humulonów do izohumulonów. Te fakty wskazują na to, że w procesie izomeryzacji nieodzowna jest obecność wody. Przykładowe wyniki tego kierunku badań prezentuje rysunek 9.



Rys. 9. Procent pozostających gorzkich kwasów po ogrzewaniu w żądanej temperaturze przez okres 24 h

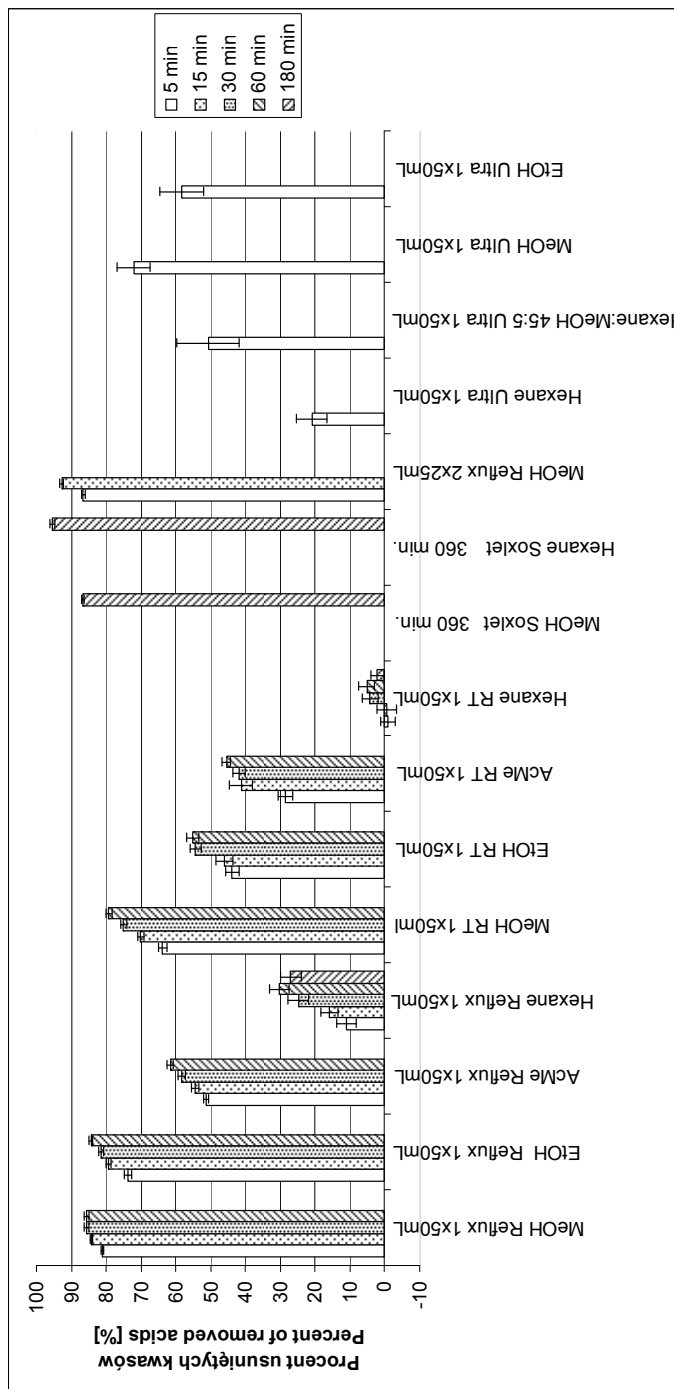
Fig. 9. Percent of remaining bitter acids after heating spent hop at desire temperature for 24 h

Podobny efekt zmniejszenia stopnia izomeryzacji humulonów do izohumulonów obserwowano w przypadkach, kiedy dostęp przegrzanej pary wodnej do wnętrza kolby był w jakikolwiek sposób ograniczany, np. użycie korków z waty stosowanych w biochemii itp.

### 2.3.3. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalników organicznych

We wstępnych badaniach nad usunięciem kwasów chmielowych z wychmielin (Marynka, sezon 2005/2006) zastosowano takie rozpuszczalniki jak metanol, etanol, aceton i heksan w temperaturze wrzenia tych rozpuszczalników oraz temperaturze pokojowej (rys. 10). W ekstrakcjach jednokrotnych używano 2,5 g wychmielin i 50 ml rozpuszczalnika, w dwukrotnych 2 x 25 ml. Podczas ekstrakcji wrzącym rozpuszczalnikiem starano się, aby czas do osiągnięcia wrzenia (1 min), schłodzenia do temperatury pokojowej (2 min) i odsączenia osadu był taki sam we wszystkich eksperymentach. Przeprowadzono także ekstrakcję w aparacie Soxleta oraz wspomaganą ultradźwiękami. Metanol i etanol wybrano ze względu na to, że są przedstawicielami rozpuszczalników protonowych, o dużej polarności, w których atom wodoru grupy hydroksylowej może uczestniczyć w wiązaniu wodorowym z grupami hydroksylowymi kwasów chmielowych, a atom tlenu tej grupy w wiązaniu wodorowym jako akceptor kwaśnych protonów powyższych kwasów. Aceton jest aprotynowym, polarnym rozpuszczalnikiem, zdolnym tworzyć wiązanie wodorowe tylko jako akceptor protonów.





Rys. 10. Zależność stopnia ekstrakcji od czasu jej trwania w temperaturze pokojowej, wrzenia i ekstrakcji ultradźwiękami [12]  
 Fig. 10. Extraction time profiles for extractions of spent hop carried out at room and boiling temperature and ultrasound extraction

Heksan został wybrany jako rozpuszczalnik niepolarny, niezdolny do tworzenia wiązań wodorowych, bardzo podobny w swoim działaniu do nadkrytycznego CO<sub>2</sub>.

W przeprowadzonych badaniach, efektywność ekstrakcji zdefiniowano jako procent usunięcia gorzkich kwasów ( $A_r$ ). Wielkość tę obliczono wg wzoru:  $A_r = 100\% \times (m_a \times m_h - m_{ra} \times m_{rh}) / (m_a \times m_h)$ , gdzie  $m_a$  jest masą kwasów chmielowych w wychmielinach użytych do ekstrakcji (w analizowanej próbce o masie 0,5 g),  $m_h$  – masą wychmielin użytych w ekstrakcji (2,5 g),  $m_{ra}$  – masą kwasów chmielowych w wychmielinach po ekstrakcji (w analizowanej próbce o masie 0,5 g) a  $m_{rh}$  – masą wychmielin po ekstrakcji.

W większości doświadczeń badano zawartość gorzkich kwasów po 5, 15, 30 i 60 minutach ekstrakcji. Największy procent usunięcia gorzkich kwasów z wychmielin zaobserwowano w przypadku zastosowania metanolu i etanolu w temperaturze wrzenia tych rozpuszczalników. Wynosił on po 60 minutach ekstrakcji odpowiednio 86 i 84%. Ponadto, metanol usuwał kwasy szybciej niż etanol. O wiele większe różnice w działaniu tych dwóch rozpuszczalników zanotowano w temperaturze pokojowej. W przypadku metanolu wartość ta spadła nieznacznie do 79%. Etanol działał o wiele mniej efektywnie i w temperaturze pokojowej po 60 minutach ekstrakcji tylko 55% gorzkich kwasów zostało usuniętych. Inne rozpuszczalniki takie jak aceton i heksan wykazywały mniejszą aktywność, zależną od ich polarności. Najgorzej działał heksan, zwłaszcza w temperaturze pokojowej, w której tylko 5% kwasów zawartych w wychmielinach zostało usuniętych po 60 minutach ekstrakcji, pomimo że wszystkie gorzkie kwasy pod postacią czystych związków są dobrze rozpuszczalne w tym rozpuszczalniku. Fakt ten można wytłumaczyć tym, że heksan pod względem działania jest bardzo podobny do nadkrytycznego dwutlenku węgla, który nie był w stanie usunąć całkowicie kwasów chmielowych z szyszek chmielowych podczas ekstrakcji przemysłowej. Aby oznaczyć maksymalny stopień usunięcia gorzkich kwasów, przeprowadzono ekstrakcję dwukrotną (2 x 25 ml metanolu) i ekstrakcję w aparacie Soxleta (za pomocą metanolu i heksanu). Otrzymane rezultaty pokazały, że ekstrakcja dwukrotna była niewiele efektywniejsza od jednokrotnej. W 5-minutowym eksperymencie, w metanolu, stopnie usunięcia gorzkich kwasów wynosiły odpowiednio 87 i 81%. Wydłużenie czasu ekstrakcji do 15 minut prowadziło do 93-procentowego usunięcia gorzkich kwasów w ekstrakcji dwukrotnej i 84-procentowego w jednokrotnej. Powyższe eksperymenty zostały również przeprowadzone w celu sprawdzenia, czy objętość rozpuszczalnika pozostającego w ekstrahowanych wychmielinach nie miała znaczącego wpływu na uzyskane rezultaty. Ekstrakcje przeprowadzone w aparacie Soxleta pokazały, że heksan (95% usuniętych kwasów) był efektywniejszy niż metanol (87% usuniętych kwasów), co może być związane z rozkładem gorzkich kwasów zachodzącym w gorącym heksanie.

Dodatkowo przeprowadzono ekstrakcje wspomagane ultradźwiękami, które w oczywisty sposób były efektywniejsze w stosunku do powyższych, wykonanych w temperaturze pokojowej, lecz mniej efektywne w porównaniu do ekstrakcji w temperaturze wrzenia.

Zbadano także, jak przebiegała ekstrakcja w grupach izohumulonów, humulonów i lupulonów. Polarne rozpuszczalniki, takie jak metanol, etanol i aceton, lepiej ekstrahowały bardziej polarne izohumulony, co było widoczne zwłaszcza w temperaturze pokojowej. W przeciwieństwie do tego heksan ekstrahował w większym stopniu mniej polarne humulony i lupulony.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykonano szereg innych 60-minutowych ekstrakcji dwukrotnych w temperaturze wrzenia zastosowanych rozpuszczalników i ich mieszanin. Ekstrakcja alkoholem *n*-propylowym pozwoliła otrzymać wychmieliny o zawartości gorzkich kwasów chmielowych, w stosunku do suchej masy, wynoszącej 0,010%, a ekstrakcja izopropanolem 0,029%. Zastosowano również mieszaniny rozpuszczalników w stosunku objętościowym 1 (bardziej polarny) : 4 (mniej polarny), otrzymując następujące zawartości gorzkich kwasów: etanol-pentan (0,02%); etanol-heksan (0,019%); etanol-heptan (0,016%); metanol-aceton (0,025%).

Jak już wspomniano, w wychmielinach poddanych działaniu przegrzanej pary wodnej zachodziła szybka izomeryzacja humulonów do izohumulonów, co było związane z niewielkim wzrostem wilgotności. Tak spreparowane wychmieliny zostały poddane ekstrakcji za pomocą heksanu w czasie od 5 do 60 minut. W temperaturze wrzenia heksanu zaobserwowano, że poddanie wychmielin działaniu przegrzanej pary wodnej powoduje wzrost szybkości ekstrakcji, której efektywność po 5 minutach była taka, jak w przypadku niezizomeryzowanych wychmielin po 30–60 minutach. Do przeprowadzenia tego eksperymentu został wybrany heksan ze względu na najmniejszy ubytek masy wychmielin. Ten rozpuszczalnik w czasie 5–60 minut trwania ekstrakcji powodował ubytek suchej masy wychmielin rzędu 3,1–3,3% w temperaturze pokojowej, a temperaturze wrzenia – 2,2–1,9%. W przypadku pozostałych rozpuszczalników ubytki były następujące: odpowiednio 5,6–6,8% i 6,7–6,1% (aceton), 5,1–6,6% i 12–14% (etanol) oraz 14–18% i 19–23% (metanol).

Innym rozpuszczalnikiem użytym do ekstrakcji „zizomeryzowanych” wychmielin był aceton. Cechowały go znacznie lepsza ekstrakcja izohumulonów niż humulonów oraz powodowany przez niego mały ubytek masy wychmielin. Po 60 minutach ekstrakcji we wrzącym rozpuszczalniku 74% gorzkich kwasów uległo usunięciu, a w temperaturze pokojowej 48%. Stanowiło to wzrost w stosunku do ekstrakcji niezizomeryzowanych wychmielin, gdzie powyższe wartości wynosiły odpowiednio 62 i 46%. Dlatego że izomeryzacja wychmielin była związana z około 30% spadkiem ilości gorzkich kwasów, podane procentowe wartości usunięcia gorzkich kwasów w stosunku do wyjściowych wychmielin, po dwóch operacjach izomeryzacji i ekstrakcji, są odpowiednio większe.

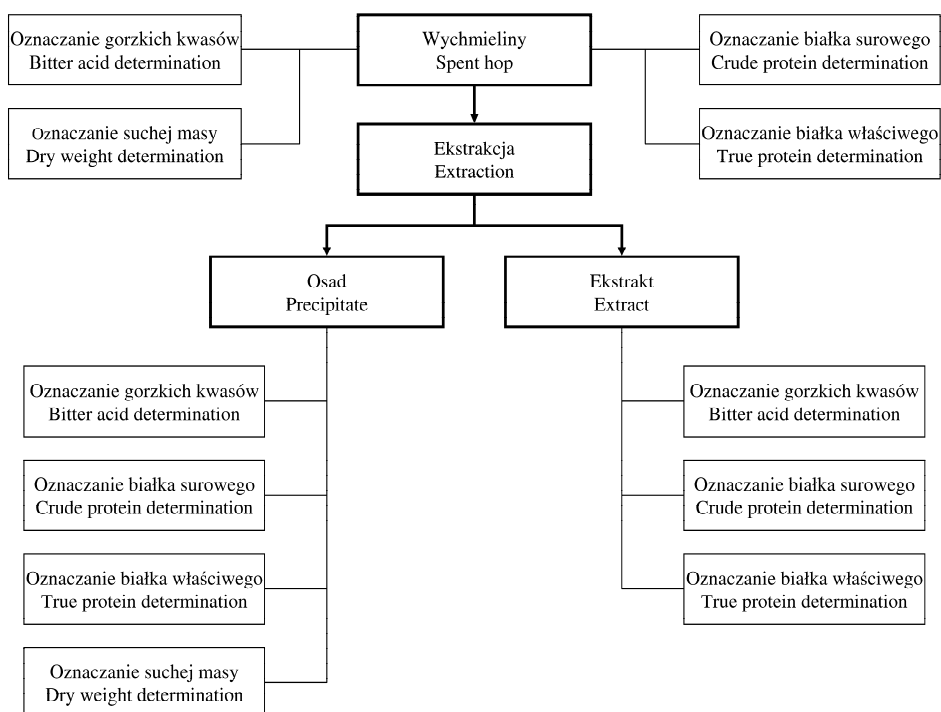
Podsumowując, odgoryczenie wychmielin można przeprowadzić w łatwy sposób, stosując dodatkową ekstrakcję za pomocą metanolu, etanolu lub acetonu, które są znacznie bardziej polarne od nadkrytycznego dwutlenku węgla. Zastosowanie heksanu, podobnego w działaniu do nadkrytycznego CO<sub>2</sub>, jest całkowicie nieefektywne w temperaturze pokojowej. Ta obserwacja tłumaczy, dlaczego niemożliwe jest całkowite odgoryczenie wychmielin za pomocą nadkrytycznego CO<sub>2</sub>, podczas którego nie udaje się osiągnąć zawartości gorzkich kwasów niższej od około 0,1%. Wymaga to zastosowania bardziej polarnego ekstrahenta lub prowadzenia ekstrakcji w podwyższonej temperaturze, ponieważ ekstrakcja heksanem w temperaturze jego wrzenia powoduje zauważalny wzrost wydajności ekstrakcji gorzkich kwasów. Zachodząca z wysoką wydajnością izomeryzacja humulonów do izohumulonów w wychmielinach pod wpływem przegrzanej pary wodnej i następnie ekstrakcja heksanem nie wpływa znacząco na stopień usunięcia gorzkich kwasów, w porównaniu do doświadczenia z zastosowaniem wychmielin niepoddanych izomeryzacji. W przypadku zastosowania acetonu uzyskuje się poprawę wydajności procesu.

Powyższe wyniki badań zostały między innymi opisane w publikacji pt. "Extraction of spent hop using organic solvents" [12].

Na ich podstawie dokonano także zgłoszenia patentowego: M. Anioł, E. Huszcza, A. Bartmańska, A. Żolnierczyk, W. Mączka, C. Wawrzeńczyk. Sposób usuwania gorzkich kwasów z poekstrakcyjnych odpadów chmielowych. Nr rej. UP RP: P-379084, 2006.

### 2.3.4. Wpływ rodzaju ekstrahenta na zawartość białka w wychmielinach

Ze względu na cel badań, jakim było przystosowanie wychmielin do produkcji pasz, zbadano wpływ rodzaju zastosowanego w ekstrakcji rozpuszczalnika na zawartość białka w wychmielinach. Zawartość białka surowego ( $N \times 6,25$ ) oznaczono klasyczną metodą Kjeldahla, a zawartość białka właściwego metodą z użyciem kwasu wolframowego, która pozwala na oznaczenie peptydów zawierających co najmniej trzy aminokwasy [99].



Rys. 11. Schemat doświadczeń  
Fig. 11. The scheme of investigations

W badaniach wykorzystano wychmieliny otrzymane z chmielu odmiany Marynka w sezonie 2004/2005 o wilgotności  $6,14 \pm 0,14\%$ , które zawierały następujące kwasy ( $\mu\text{g/g}$  suchej masy  $\pm$  SD,  $n = 4$ ): izokohumulon ( $146,7 \pm 16,5 \mu\text{g/g}$ ), izohumulon ( $179,0 \pm 38,2 \mu\text{g/g}$ ), izoadhumulon ( $53,7 \pm 11,6 \mu\text{g/g}$ ), kohumulon ( $328,7 \pm 4,75 \mu\text{g/g}$ ),

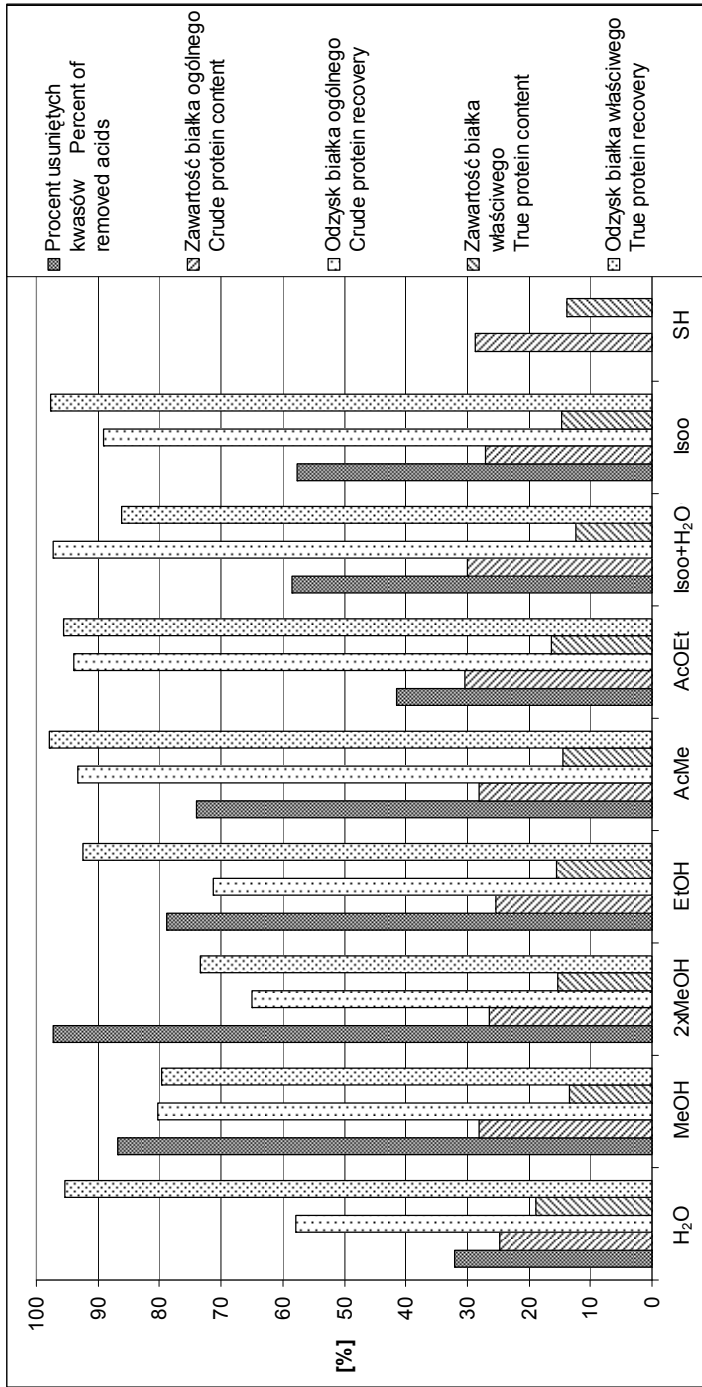
*n*-humulon i adhumulon ( $797,7 \pm 58,0 \mu\text{g/g}$ ), kolupulon ( $56,2 \pm 8,2 \mu\text{g/g}$ ). Adlupulon był nieobecny. Zawartość izohumulonów, humulonów i lupulonów wynosiła odpowiednio 379,4, 1126,41 i 56,2  $\mu\text{g/g}$ ; sumarycznie 1562  $\mu\text{g/g}$ . Zawartość białka ogólnego ( $N \times 6,25$ ) wynosiła  $28,66 \pm 0,39\%$  ( $n = 4$ ), a białka właściwego  $13,93 \pm 0,70\%$  ( $n = 4$ ) w stosunku do suchej masy wychmielin. Znaczna różnica pomiędzy zawartością białka ogólnego i właściwego świadczyła o obecności dużych ilości wolnych aminokwasów lub/i krótkich peptydów. Schemat prowadzonych badań przedstawia rysunek 11.

Wszystkie ekstrakcje przeprowadzono we wrzących rozpuszczalnikach w ciągu 60 minut (rys. 12). Zarówno w wyjściowych wychmielinach, jak i w osadzie poekstrakcyjnym i ekstrakcje oznaczano ilość kwasów chmielowych, zawartość białka ogólnego i białka właściwego. Dodatkowo, w przypadku substancji stałych oznaczono suchą masę, co także wykorzystano w obliczeniach. Pomiar zawartości gorzkich kwasów w wyjściowych wychmielinach oraz w osadzie poekstrakcyjnym i ekstrakcie pozwoliły na ich zbilansowanie. W przypadku ekstrakcji za pomocą izooktanu ilość gorzkich kwasów, jako suma w ekstrakcie i osadzie, stanowiła 97% ilości obecnej w wyjściowych wychmielinach. Biorąc to pod uwagę, można stwierdzić, że ekstrakcji praktycznie nie towarzyszył rozkład gorzkich kwasów.

Najniższą wartość zaobserwowano przy użyciu acetonu, 45%, co świadczyło o tym, że ponad połowa ilości kwasów chmielowych uległa rozkładowi podczas ekstrakcji.

Dla pozostałych rozpuszczalników uzyskano wartości pośrednie: etanol – 90, woda – 80, metanol – 71, 2 x metanol – 59, octan etylu – 74%. Podobny bilans sporządzono ze względu na zawartość białka ogólnego i właściwego. W tym przypadku uzyskane wyniki były bliskie 100%.

Większość eksperymentów wykonano w dwóch powtórzeniach. Zawartość białka surowego w stałych pozostałościach oznaczono metodą Kjeldahla. Po 60 minutach ekstrakcji wodą wynosiła ona 25%. Przy wykorzystaniu pozostałych ekstrahentów liczyły odpowiednio: metanol (28%), 2 x 25 ml metanolu (26%), etanol (25%), aceton (28%), octan etylu (30%), izooktan (27%). Pozostawały więc na dość wysokim poziomie w porównaniu z wyjściowymi wychmielinami, w których zawartość białka wynosiła 29%. Jednak dla etanolu, metanolu i wody było to związane z dość dużym ubytkiem masy wychmielin, wynoszącym od 16 (etanol) do 33% (woda). Powyższe alkohole charakteryzowały się najlepszymi zdolnościami usuwania gorzkich kwasów z wychmielin (79–97%) jednak znaczny ubytek masy był związany z małym odzyskiem białka surowego (65–80%) i białka właściwego (od 73% przy dwukrotnej ekstrakcji metanolem do 92% przy etanolu). Woda okazała się najmniej wydajnym ekstrahentem kwasów chmielowych (32% usuniętych gorzkich kwasów), co w połączeniu z największym ubytkiem masy wychmielin i białka ogólnego oraz potrzebą jej późniejszego usunięcia z wychmielin całkowicie czyniło wodę nieprzydatną do tego zadania. Najsłabszymi zdolnościami usuwania kwasów chmielowych odznaczał się octan etylu, izooktan i mieszanina izooktanu z wodą. Jednak w tym przypadku odzysk białka ogólnego był wyższy niż w przypadku alkoholi i wynosił 89–97%. Sucha masa wychmielin poddana ekstrakcji tymi rozpuszczalnikami ulegała nieznacznemu ubytkowi, a mianowicie 6,4–12%. Niewiele mniej efektywnym od etanolu w usuwaniu gorzkich kwasów z wychmielin okazał się aceton (74% usuniętych gorzkich kwasów).



Rys. 12. Procent usuniętych kwasów, zawartość białka ogólnego, odzysk białka ogólnego, zawartość białka właściwego i odzysk białka właściwego w osadzie po ekstrakcji i w wyjściowych wychmielinach w stosunku do suchej masy. H<sub>2</sub>O – woda, MeOH – metanol, EtOH – etanol, AcMe – aceton, AcOEt – octan etylu, Isoo – izooktan, SH – wychmieliny [10]

Fig. 12. Percent of removed acids, crude protein content, crude protein recovery, true protein content and crude protein recovery in precipitate after extraction and initial spent hop in relation to dry mass. H<sub>2</sub>O – water, MeOH – methanol, EtOH – ethanol, AcMe – acetone, AcOEt – ethyl acetate, Isoo – isooctane, SH – spent hop

Wiązało się to z bardzo dobrym odzyskiem białka ogólnego (93%) i białka właściwego (98%). Także strata masy wychmielin poddanych ekstrakcji była najniższa wśród badanych rozpuszczalników i wynosiła tylko 5,8%. Biorąc pod uwagę powyższe, wydaje się, że najbardziej dogodnym rozpuszczalnikiem do usunięcia gorzkich kwasów z wychmielin jest aceton. Zwłaszcza, że jest to rozpuszczalnik bardzo dobrze ekstrahujący ksantohumul, cenny związek o silnym działaniu farmakologicznym, którego zawartość w badanych wychmielinach wynosiła około 0,5%. Pozwala to na otrzymanie paszy o wysokiej zawartości białka i niskiej zawartości gorzkich kwasów. Jednocześnie roztwór poekstrakcyjny jest bogatym źródłem drogiego ksantohumolu, co znacznie poprawiłoby opłacalność procesu.

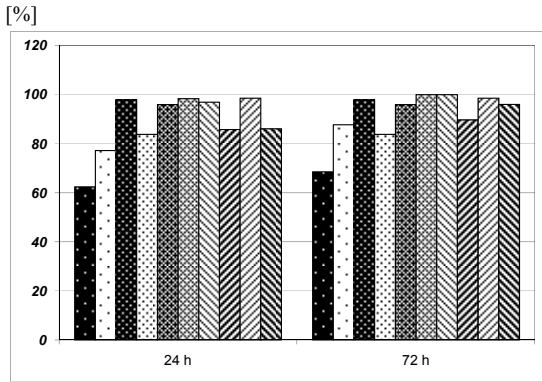
Powyższe wyniki badań zostały między innymi opisane w publikacjach pt. "Influence of the kind of extractant on the protein content in the spent hop" [10].

### **2.3.5. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez enzymy pochodzenia roślinnego**

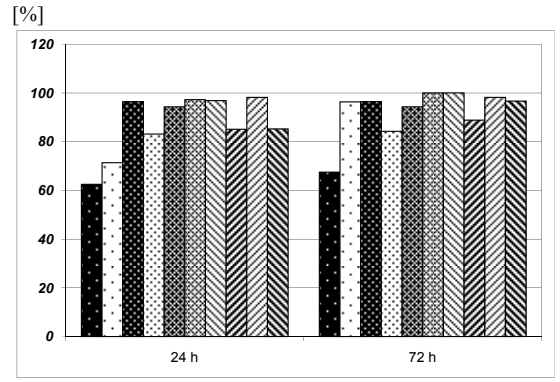
Innym kierunkiem badań nad zastosowaniem poekstrakcyjnego odpadu chmielowego w produkcji pasz było usunięcie szkodliwych składników w nim zawartych w wyniku przekształceń enzymatycznych, wykorzystując do tego enzymy zawarte w owocach i warzywach. Jest to nowy sposób rozwiązania. Do tej pory podjęto próby użycia wybranych mikroorganizmów: grzybów strzępkowych i drożdży do tego celu [75, 76].

W przeprowadzonych pilotażowych badaniach własnych wykorzystano ekstrakt chmielowy, otrzymany w wyniku ekstrakcji szyszek chmielowych nadkrytycznym dwutlenkiem węgla, który zawierał sumarycznie 68,8% humulonów oraz lupulonów i pochodził z Zakładu Ekstrakcji Nadkrytycznej Instytutu Nawozów Sztucznych w Puławach. Wstępnie przeprowadzono badania przesiewowe, w których oznaczano aktywność enzymatyczną peroksydaz w roślinnych preparatach enzymatycznych metodą kolorymetryczną z użyciem *o*-dianizydyny [35]. Okazało się, że 9 testowanych ekstraktów roślinnych wykazywało taką aktywność. We właściwych badaniach nad degradacją gorzkich kwasów – do rozdrobnionego materiału biologicznego dodano poliwinylpolipirolidonu oraz 0,1 M buforu fosforanowego o pH=6,0. Tak przygotowaną próbę homogenizowano, sączono i roztwór wirowano w temperaturze 4°C. Osad zawierający części stałe badanych bioreagentów i PVPP z zaadsorbowanymi na nim związkami fenolowymi odrzucono. Do otrzymanego supernatantu dodano ekstraktu chmielowego w metanolu oraz nadtlenek wodoru i wytrząsano w temperaturze 25°C bez dostępu światła. W przypadku soku z grejpfruta i pomarańczy medium reakcyjne zawierało sok i PVPP w stosunku ilościowym 0,1% (m/V) oraz bufor w stosunku objętościowym 1:1. Próba kontrolna została sporządzona analogicznie, z tą różnicą, że zawierała bufor zamiast ekstraktu roślinnego.

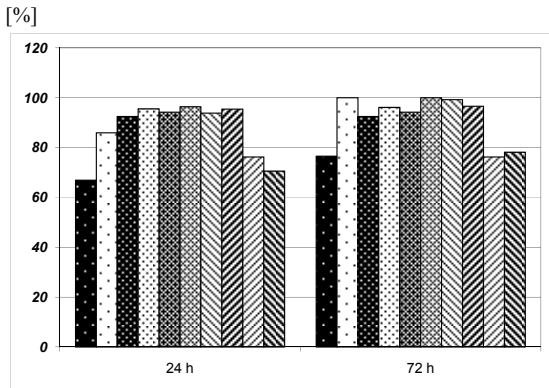
W celu usunięcia humulonów i lupulonów obecnych w wychmielinach zostały wykorzystane preparaty zawierające peroksydazy pochodzące z soku i skórki grejpfruta (*Citrus paradisi*), soku i skórki pomarańczy (*Citrus sinensis*), korzeni chrzanu pospolitego (*Armoracia rusticana*), marchwi (*Daucus carota*), buraka cukrowego (*Beta vulgaris*), pietruszki (*Petroselinum crispum*) oraz owoców jabłoni (*Malus mill*) odmiany Gala (rys. 13).



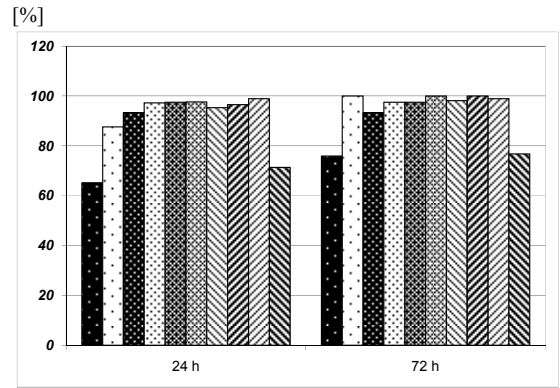
kohumulon, cohumulone



n+adhumulon, n+adhumulone



kolupulon, colupulone



n+adlupulon, n+adlupulone

- – kontrola – control
- – grejpfruit (sok) – grapefruit (juice)    ▨ – grejpfruit (skórka) – grapefruit (peel)
- ▤ – pomarańcza (sok) – orange (juice)    ▩ – pomarańcza (skórka) – orange (peel)
- ▧ – chrzan – chorseradish,
- ▦ – marchew – carrot
- ▨ – burak cukrowy – sugar beet
- ▩ – pietruszka – parsley

Rys. 13. Procent usuniętych humulonów i lupulonów za pomocą preparatów enzymatycznych otrzymanych z wybranych owoców i warzyw [7]

Fig. 13. Percent of removed of humulones and lupulones with enzymatic preparations of selected fruits and vegetables [7]



Podczas prowadzonych badań analizowano zawartość: kohumulonu, adhumulon, kolupulonu i adlupulonu oraz monitorowano rozwój mikroorganizmów i związane z tym zmiany pH i zmętnienia. Doświadczenia prowadzono w 2 powtórzeniach, oznaczając zawartość gorzkich kwasów po 24 i 72 godzinach. Wszystkie testowane bioreagenty wykazywały zdolność do degradowania gorzkich kwasów. Po 24 h prowadzenia doświadczenia ubytek poszczególnych kwasów wynosił od 70 do 98%, a po 72 h od 76 do 100%. W tym samym czasie próby kontrolne wykazywały znacząco mniejszy ubytek kwasów chmielowych w porównaniu do eksperymentów z użyciem preparatów enzymatycznych, który wynosił 62–67% po 24 h i 68–76% po 72 h. W prowadzonych badaniach pilotowych użyto rozcieńczonego roztworu nadtlenu wodoru, także w próbach kontrolnych. Zaobserwowany częściowy rozkład kwasów chmielowych jest prawdopodobnie spowodowany jego utleniającym działaniem, co było wykazane we wcześniejszych badaniach nad utlenianiem kwasów chmielowych katalizowanym jonami metali [85]. Uzyskane wyniki sugerują, że wydłużenie czasu trwania procesu do 72 h nie miało znaczącego wpływu na stopień usunięcia gorzkich kwasów chmielowych.

Najlepszymi bioreagentami okazały się chrzan i marchew, które po 72 h usuwały 100% kohumulonu, 100% *n*-humulon i adhumulon, 99–100% kolupulonu i 98–100% *n*-lupulonu i adlupulonu. Biorąc pod uwagę, że gorzki smak pochodzi od humulonów, dobrymi bioreagentami je degradującymi była także pietruszka (98% usuniętego kohumulonu, *n*-humulon i adhumulon) oraz skórka z pomarańczy i grejpfruta (odpowiednio 96–98% i 94–96%). Sok z tych owoców nie był już tak aktywny (84–88% i 84–96%). Mogło to być spowodowane niskim pH, które wynosiło 3,2–3,9 (użyty 0,1 M bufor fosforanowy miał zbyt małą pojemność buforową, aby zapewnić pH = 6). Natomiast kolupulon, *n*-lupulon i adlupulon były lepiej degradowane w środowisku silnie kwaśnym (odpowiednio, 96–100% i 98–100% po 72 h). Najłabsze wyniki w 24-godzinnej degradacji uzyskano, używając jabłka (86 i 85%). Jednak były one wyższe niż w próbie kontrolnej. W ciągu następnych 48 h wzrosły one znacząco do, odpowiednio, 96 i 97%.

Powyższe wyniki badań pozwalają przypuszczać, że poddanie wychmielin działaniu preparatów enzymatycznych, otrzymanych z niektórych owoców i warzyw, pozwala na znaczące zredukowanie w nich zawartości gorzkich kwasów chmielowych. Stosunkowo tanim źródłem enzymów mogłyby być warzywa i owoce lub odpady przemysłu spożywczego, na przykład wyczłoczyny owocowe, których dodatek do zmodyfikowanych wychmielin wzbogacałby je w składniki odżywcze. Wymaga to jednak przeprowadzenia dodatkowych badań z użyciem wychmielin.

Powyższe wyniki badań zostały opisane w publikacji pt. „Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez enzymy pochodzenia roślinnego” [7].

## 2.4. Izolowanie ksantohumolu z wychmielin

Interesującym związkiem pod względem właściwości farmakologicznych jest ksantohumol, którego zawartość w wychmielinach jest bardzo duża i może dochodzić do 1%. Posiada on silne właściwości przeciwnowotworowe, antywirusowe, przeciwzapalne i przeciwutleniające. Wychmieliny w ostatnim okresie zyskały znaczenie jako dogodne źródło ksantohumolu. Szyszki chmielowe, po ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem

węgla, można poddać dodatkowej ekstrakcji tym czynnikiem w jeszcze wyższej temperaturze (powyżej 60°C) i jeszcze wyższym ciśnieniu (powyżej 500 bar). Powoduje to ekstrakcję ksantohumolu o wysokiej czystości, którego zawartość można zwiększyć, strącając go z roztworów zasadowych poprzez ich zakwaszenie [47, 53]. Pierwszy z tych etapów wymaga jednak z reguły zaprojektowania od podstaw przemysłowej instalacji do ekstrakcji nadkrytycznej. Użycie dodatkowej instalacji, pracującej przy wyższych parametrach ciśnienia i temperatury, wiąże się z pracochłonnym powtórny napełnianiem wychmielinami i opróżnianiem z nich. Do ekstrakcji szyszek chmielowych stosowany może być aceton lub octan etylu. Modyfikacja tej metody polega na ekstrakcji szyszek nadkrytycznym dwutlenkiem węgla i następującej po niej dalszej ekstrakcji z użyciem powyższych rozpuszczalników, metanolu lub etanolu [49, 127-145]. Stosuje się też ekstrakcję za pomocą mieszanin wody i niższych alkoholi alifatycznych, ketonów lub estrów [22]. Metoda otrzymywania ksantohumolu poprzez ekstrakcję roztworami etanolowo-wodnymi została również opatentowana [45].

Do badań własnych użyto wychmielin otrzymanych w sezonie 2005/2006 o wilgotności 5,34%. W celu znalezienia rozpuszczalnika efektywnie i selektywnie ekstrahującego ksantohumol z wychmielin zastosowano ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami. Do wstępnych badań użyto metanolu, etanolu, 70-procentowego wodnego roztworu etanolu, acetonu, octanu etylu, eteru dietylowego, chloroformu oraz mieszaniny heksan-etanol (5:1). Wyniki otrzymane z przeprowadzonych eksperymentów są przedstawione w tabeli 3. Zawartość ksantohumolu (XH) w ekstrakcie została zdefiniowana jako masa ksantohumolu (w gramach) znajdująca się w 100 g ekstraktu po odparowaniu rozpuszczalnika do stałej masy, a wyizolowanie XH z wychmielin – jako masa ksantohumolu, którą uzyskano z ekstrakcji w przeliczeniu na 100 g wychmielin.

Tabela 3  
Table 3

Ekstrakcja ksantohumolu (XH) z wychmielin odmiany Marynka  
Xanthohumol (XH) extraction from Marynka spent hop

Ekstrahent Extractant	Wyizolowanie XH z wychmielin XH isolation from hop spent [%]	Zawartość XH w ekstrakcie XH content in extract [%]
metanol methanol	0,448	2,72
etanol ethanol	0,440	4,35
70% etanol 70% ethanol	0,412	1,64
aceton acetone	0,378	12,64
octan etylu etyl acetate	0,349	11,05
eter dietylowy diethyl ether	0,281	20,03
chloroform chloroform	0,284	10,30
heksan-etanol (83:17) hexane-ethanol (83:17)	0,428	10,71

Najwyższymi stopniami wyizolowania ksantohumolu charakteryzowały się rozpuszczalniki, takie jak metanol (0,448%), etanol (0,44%) i jego mieszanina z heksanem (0,428%) i 70-procentowy etanol (0,412%). Dla mieszaniny heksan-etanol w stosunku 83:17 uzyskano wysoką ponad 10-procentową zawartość ksantohumolu. Dla reszty powyższych rozpuszczalników wysoka wydajność ekstrakcji była jednak okupiona jej niską selektywnością, ponieważ uzyskane ekstrakty zawierały od 1,64% ksantohumolu w 70% etanolu do 4,35% w etanolu. Uzyskana wydajność w przypadku acetonu była tylko nieznacznie mniejsza od uzyskanej przy użyciu najwydajniejszego metanolu (84% tej wartości). Jednocześnie powodował on pożądane, prawie pięciokrotne zwiększenie zawartości ksantohumolu w uzyskanym ekstrakcie. Podobne rezultaty otrzymano w przypadku octanu etylu. Najwyższą zawartość ksantohumolu w ekstrakcie (20%) zapewniało użycie eteru dietylowego, przy wyizolowaniu ksantohumolu z wychmielin wynoszącym 0,281%, co stanowiło 63% najwyższej wartości, uzyskanej przy wykorzystaniu metanolu.

Bardzo dobre efekty otrzymano, używając mieszaniny heksan-etanol, co spowodowało, że przebadano ekstrakty o zmniejszonej zawartości etanolu, aby ograniczyć masę ługowanych zanieczyszczeń. Niestety, wiązało się to ze spadkiem masy ekstrahowanego ksantohumolu i spadkiem wydajności ekstrakcji, aż do zera w przypadku użycia czystego heksanu. Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4  
Table 4

Ekstrakcja ksantohumolu (XH) z wychmielin odmiany Marynka za pomocą mieszanin heksanu i etanolu  
Xanthohumol (XH) extraction from Marynka spent hop using hexane-metanol mixtures

Ekstrahent: heksan:etanol Extractant: hexane:ethanol	Wyizolowanie XH z wychmielin XH isolation from hop spent [%]	Zawartość XH w ekstrakcie XH content in extract [%]
83:17	0,428	10,71
90:10	0,370	10,52
95:5	0,236	9,23
97:3	0,138	6,63
99:1	0,019	1,61
100:0	0,000	0,00

Ekstrakcje przeprowadzone z użyciem ultradźwięków wykazały, że najwyższą zawartość ksantohumolu w ekstrakcie uzyskano, stosując eter dietylowy. Aceton wykazywał lepszą ekstrakcję ksantohumolu, ale był mniej selektywny. Dlatego przeprowadzono podobne badania z eterem etylowym i jego mieszaninami z acetonem w temperaturze pokojowej, wrzenia i w aparacie Soxleta (tab. 5).

W przypadku ekstrakcji wrzącym eterem dietylowym zawartość ksantohumolu zmieniała się nieznacznie w czasie 5–60 minut (18,7–21,8%), jednak przedłużenie czasu miało istotny wpływ na stopień wyizolowania tego związku, który wynosił 0,309% po 60 minutach prowadzenia procesu. Podobny wynik otrzymano poprzez dodatek 20% acetonu V/V i prowadzenie ekstrakcji w ciągu 15 minut (0,305%). W tym przypadku zawartość ksantohumolu była o kilka procent niższa i wynosiła 16,6%. Zwiększanie zawartości acetonu w stosunku do eteru dietylowego powodowało oczekiwany wzrost wydajności ekstrakcji okupiony niewielkim spadkiem selektywności (odpowiednio

0,410 i 14,5% przy użyciu czystego acetonu w ciągu 15 minut ekstrakcji). Co ciekawe, 15-minutowa ekstrakcja wrzącym acetonem zapewniała podobny stopień wyizolowania XH, jak 60-minutowa ekstrakcja wrzącym metanolem czy też etanolem, które wynosiły odpowiednio 0,419 i 0,422%, jednocześnie zapewniając siedmiokrotnie większą zawartość ksantohumolu w ekstrakcie. W celu określenia ilości ksantohumolu, maksymalnie możliwą do uzyskania, przeprowadzono w sumie trzygodzinną ekstrakcję 40 g wychmielin w Aparacie Soxleta za pomocą: najpierw eteru dietylowego, potem acetonu i na końcu etanolu. Po 60 minutach ekstrakcji eterem dietylowym wyizolowanie XH wyniosło 0,383% (80% całości wyekstrahowanego XH w tym doświadczeniu). Jego zawartość była także duża i wynosiła 22,4%. Ekstrakcja acetonem przez kolejne 60 minut pozwoliła uzyskać dalsze 0,058% wyizolowania (12% całości) i następną, etanolem, 0,39% wyizolowania (8% całości).

Tabela 5  
Table 5

Ekstrakcja ksantohumolu (XH) z wychmielin odmiany Marynka za pomocą rozpuszczalników  
Xanthohumol (XH) extraction from Marynka spent hop using various solvents

Ekstrahent Extractant	metoda method	czas time	Wyizolowanie XH z wychmielin XH isolation from hop spent [%]	Zawartość XH w ekstrakcie XH content in extract [%]
Et <sub>2</sub> O	TW	5'	0,214 ±0,0055	18,7
Et <sub>2</sub> O	TW	15'	0,250 ±0,0046	19,9
Et <sub>2</sub> O	TW	30'	0,274 ±0,0001	17,9
Et <sub>2</sub> O	TW	60'	0,309 ±0,0022	21,8
Et <sub>2</sub> O:AcMe 95: 5	TW	15'	0,264 ±0,0176	18,2
Et <sub>2</sub> O:AcMe 90:10	TW	15'	0,275 ±0,0136	17,6
Et <sub>2</sub> O:AcMe 80:20	TW	15'	0,305 ±0,0171	16,6
Et <sub>2</sub> O:AcMe 70:30	TW	15'	0,307 ±0,0050	15,7
Et <sub>2</sub> O:AcMe 60:40	TW	15'	0,301 ±0,0110	15,5
Et <sub>2</sub> O:AcMe 50:50	TW	15'	0,361 ±0,0017	15,7
Et <sub>2</sub> O:AcMe 20:80	TW	15'	0,396 ±0,0294	16,0
AcMe	TW	15'	0,410 ±0,0002	14,5
AcMe	TP	60'	0,337 ±0,0054	16,6
Et <sub>2</sub> O	TP	60'	0,215 ±0,0021	17,4
MeOH	TW	60'	0,419 ±0,0006	2,1
EtOH	TW	60'	0,422 ±0,0029	2,7
Et <sub>2</sub> O	Soxlet	60'	0,383	22,4
+ AcMe	Soxlet	60'	0,058 Σ=0,441	+ 4,4
+ + EtOH	Soxlet	60'	0,039 Σ=0,480	+ + 0,4

Biorąc pod uwagę powyższe, najlepszym spośród przebadanych rozpuszczalnikami jest eter dietylowy, który zapewnia najwyższą selektywność i jedną z najlepszych wydajności. Do wyizolowania ksantohumolu do dalszych badań, ze względu na bezpieczeństwo, wykorzystano jednak drugi pod względem posiadanych właściwości i użyteczności – aceton.

Bardzo dobre wyniki otrzymane przy użyciu eteru dietylowego spowodowały, że do ekstrakcji ksantohumolu zastosowano także eter *tert*-butylowo-metylowy, jednak uzyskane rezultaty były znacznie gorsze.

Ksantohumol był podstawowym substratem do syntezy izoksantohumolu, 8-prenylonaringeniny i innych pochodnych, co zostało opisane w dalszych rozdziałach. Otrzymano go w wyniku ekstrakcji wychmielin za pomocą acetonu w temperaturze pokojowej. Następnie ekstrakt poddano rozdziałowi na żelu krzemionkowym i surowy ksantohumol oczyszczono poprzez opracowaną metodę krystalizacji [11]. Uzyskano około 43% całkowitej ilości ksantohumolu zawartego w wychmielinach. Widmo <sup>1</sup>H NMR było zgodne z danymi literaturowymi [114].

Na podstawie części przeprowadzonych powyższych badań dokonano zgłoszenia patentowego: M. Anioł, K. Józefowska, A. Żolnierczyk. Sposób otrzymywania ksantohumolu. Nr rej. UP RP: P-388047, 2009.

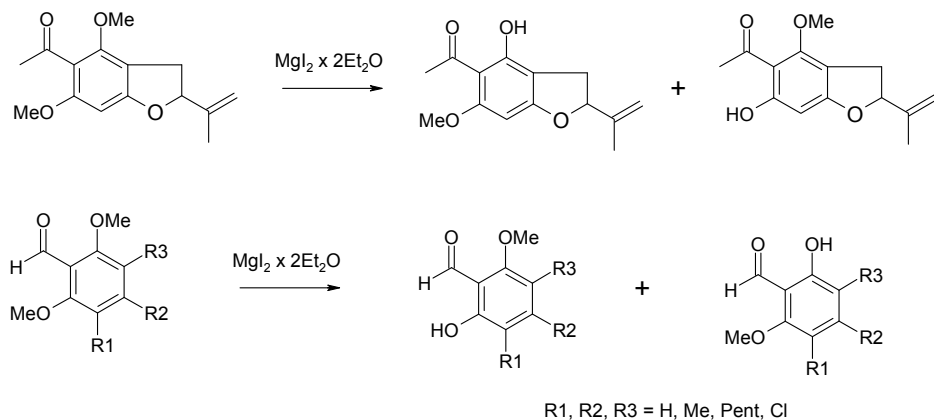
## 2.5. Synteza 8-prenylonaringeniny

Ze względu na interesujące właściwości farmakologiczne 8-prenylonaringeniny związane z jej działaniem estrogennym i antynowotworowym oraz wzrost zainteresowania przemysłu tym związkem podjęto próbę jego syntezy z ksantohumolu.

Najtrudniejszym etapem w syntezie 8-prenylonaringeniny z ksantohumolu poprzez pośredni izoksantohumol było dobranie odpowiedniego odczynnika powodującego demetylację izoksantohumolu. Powyższa reakcja została szczegółowo przebadana przez naukowców niemieckich. Dokonali oni wielu prób jej przeprowadzenia, używając 17 różnych układów demetylujących, czego finalnym efektem było otrzymanie związku docelowego z wysoką 92-procentową wydajnością, którą zapewniał tylko drogi i toksyczny trifluorometanosulfonianu skandu(III). Pozostałe przebadane układy demetylujące charakteryzowały się o wiele mniejszą, lub wręcz zerową wydajnością. Były to: AlBr<sub>3</sub>, BBr<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> (tworzyły się tylko produkty cyklizacji łańcucha prenilowego lub przyłączenia wody do niego, nie otrzymano 8-prenylonaringeniny), AlBr<sub>3</sub>, BBr<sub>3</sub>, MeAlCl<sub>2</sub> w obecności kolidyny (wydajność reakcji wynosiła maksymalnie 30%), ZnBr<sub>2</sub>, CuI, ZnBr<sub>2</sub>/CuI Yb<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>/KI lub CuI, Sm(OTf)<sub>3</sub>/KI, LiI/Py, CeCl<sub>3</sub>/LiI, CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> SNa/DMF (uzyskano produkt o bardzo małej wydajności lub nie powstawał w ogóle). Dość wysoką, 73-procentową wydajność uzyskano poprzez zablokowanie dwóch grup hydroksylowych w izoksantohumolu w reakcji z chlorotriizopropylsilanem, demetylację za pomocą AlBr<sub>3</sub> i usunięcie grupy zabezpieczających w reakcji z (*n*-Bu)<sub>4</sub>NF. Wyniki ich badań zostały zebrane w formie publikacji [165] i światowego zgłoszenia patentowego [166].

W przeszłości przeprowadzono wiele syntez, mających na celu otrzymanie 8-prenylonaringeniny. Pierwsze z nich polegały na bezpośrednim C-prenylowaniu dostępnej w sprzedaży naringeniny, jednak uzyskane wydajności były bardzo małe [79–81, 109, 114, 149]. Synteza, w której uzyskano ją z dość dobrą wydajnością (45%), polegała na przeprowadzeniu naringeniny w octan, utworzeniu eteru prenilowego w reakcji grupy hydroksylowej przy 7 atomie węgla w pierścieniu „A” z 3-metylo-2-buten-1-olem, przegrupowaniu Claisen’a wobec soli europu(III) i zasadowej hydrolizy tak powstałego octanu do 8-prenylonaringeniny [61]. Synteza z 2',4',6'-trihydroksyaceto-fenonu okazała się mało wydajna [140].

W planowaniu badań własnych wzięto pod uwagę inne, nieprzebadane jeszcze odczynniki demetylujące i dealkilujące. Literatura dotycząca tego tematu dostarcza wielu różnorodnych reagentów tego typu. *O*-dealkilacja eterów alkilowych lub aryloalkilowych ma różnorodne zastosowanie w syntezie organicznej, zwłaszcza w deprotekcji uprzednio zabezpieczonej grupy hydroksylowej, pod postacią mało reaktywnego eteru. W zależności od budowy substratu reakcję dealkilacji można przeprowadzić na wiele sposobów. Do odszczepienia prostych grup alkilowych wykorzystuje się kwasy (HCl/Py, HBr, HI), kwasy Lewisa (BCl<sub>3</sub>, *n*-Bu<sub>4</sub>Ni/BCl<sub>3</sub>, BBr<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/Py, AlBr<sub>3</sub>, AlBr<sub>3</sub>/NaI, SiCl<sub>4</sub>/NaI, BeCl<sub>2</sub>, ZnBr<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>/Zn, cieczce jonowe zawierające anion Al<sub>2</sub>Cl<sub>7</sub><sup>-</sup>), zasady (piperydyna, N,N-bis(trimetylosililo)amidek sodu lub litu, diizopropylamidek litu, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>SNa, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>SK, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>SNa), wodorki metali (LiAlH<sub>4</sub>) i inne (warunki redukcji Birch'a: metal I lub II grupy układu okresowego pierwiastków w ciekłym amoniaku lub aminie), CH<sub>3</sub>MgI, CeCl<sub>3</sub>/NaI) [163]. Odczynniki tego typu dają dobre rezultaty, lecz w większości, z powodu ich wysokiej reaktywności, należy brać pod uwagę niepożądane reakcje, jakie mogą zachodzić w innych miejscach cząsteczki. Szczególnie interesującą, ze względu na łagodne warunki prowadzenia, jest reakcja demetylacji z zastosowaniem LiCl w dimetyloformamidzie [48]. Reakcja ta pozwala selektywnie usunąć grupę metylową w pozycji *orto* w stosunku do sprzężonej grupy karbonylowej w aromatycznych ketonach i aldehydach. Jeżeli w związku są obecne grupy metoksylowe w pozycji *meta* i *para*, to ulegają one demetylacji w dalszej kolejności. Podobnie działa BeCl<sub>2</sub> w benzenie lub toluenie [138]. Bardzo dogodnym do przeprowadzenia tego typu chemoselektywnej demetylacji jest MgI<sub>2</sub>·2Et<sub>2</sub>O, który można łatwo otrzymać z magnezu, jodu i eteru dietylowego [156]. Tą rzadko stosowaną metodę użyto do demetylacji 5-acetylo-4,6-dimetoksy-2-izopropenylo-2,3-dihydrobenzofuranu [169] i pochodnych 2,6-dimetoksybenzaldehydu o wydajności 63–94% [168] (rys. 14).



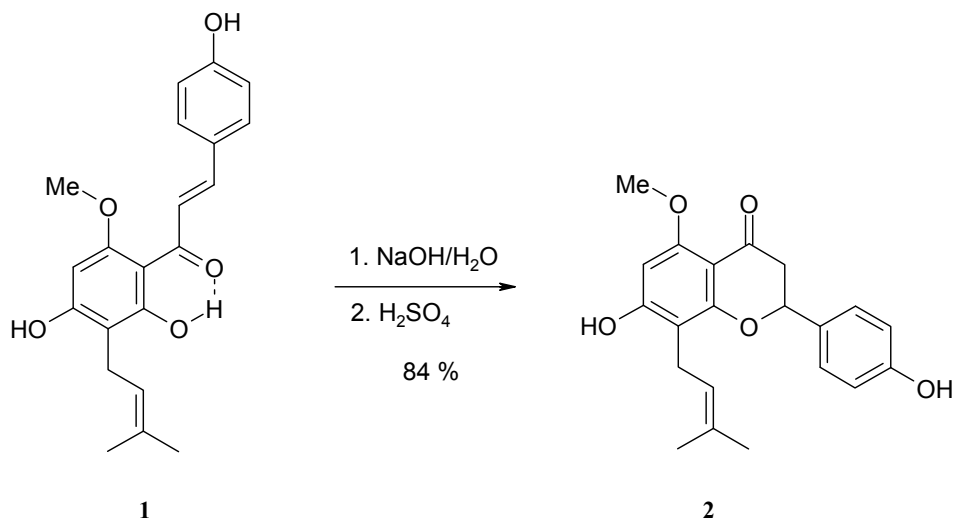
Rys. 14. Demetylacja pochodnych 4,6-dimetoksydihydrobenzofuranu i 2,6-dimetoksybenzaldehydu pod wpływem eteratu jodku magnezu

Fig. 14. Demethylation of 4,6-dimethoxydihydrobenzofuranes and 2,6-dimethoxybenzaldehydes with magnesium iodide etherate

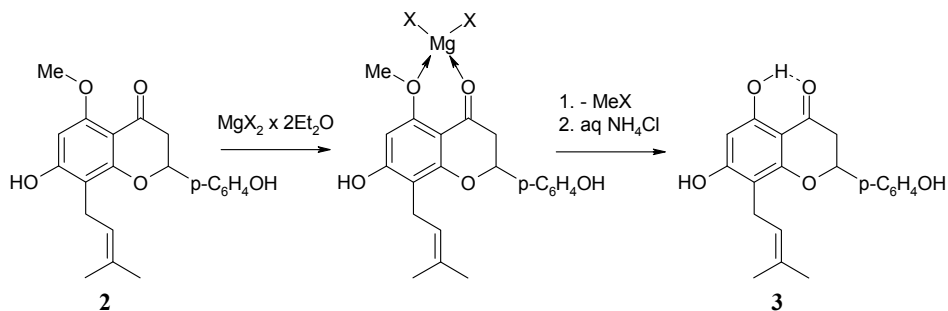
W badaniach własnych wyjściowy w syntezie ksantohumol uzyskano poprzez ekstrakcję wychmielin acetonem, oczyszczenie chromatograficzne na żelu krzemionkowym i krystalizację. Z tego związku otrzymano izoksantohumol z 84–95-procentową wydajnością według znanej procedury (rys. 15), polegającej na zadaniu ksantohumolu 1-procentowym NaOH, zakwaszeniu roztworu [165] i oczyszczeniu produktu za pomocą chromatografii kolumnowej. Wyniki analizy  $^1\text{H}$  NMR produktu były zgodne z danymi literaturowymi [144, 165].

Mając do dyspozycji niewielki wybór nieprzebadanych jeszcze odczynników demetylujących, najpierw zastosowano  $\text{BF}_3$  wobec  $n\text{-Bu}_4\text{NI}$ . Niestety, docelowy produkt tworzył się z niewielką 7-procentową wydajnością (oznaczoną za pomocą HPLC). Dopiero zastosowanie  $\text{MgI}_2 \cdot 2\text{Et}_2\text{O}$  pozwoliło otrzymać wysoką 93-procentową wydajność praktyczną.

Rysunek 16 przedstawia proponowany przebieg reakcji demetylacji izoksantohumolu pod wpływem użytych eteratów jodku, bromku lub chlorku magnezu, oparty na uproszczonym mechanizmie reakcji demetylacji zaproponowanym do pochodnych 2,6-dimetoksybenzaldehydu [168]. Mechanizm ten zakłada tworzenie się kompleksu soli magnezu z grupą karbonylową oraz grupą metoksyową w położeniu *orto*. Następnie w reakcji tej dochodzi to termicznej eliminacji lotnej fluorowcopochodnej metanu z utworzeniem soli magnezowej 8-prenylonaringeniny, która w lekko kwaśnym środowisku zostaje przekształcona w 8-prenylonaringeninę.



Rys. 15. Cyklizacja ksantohumolu (1) do izoksantohumolu (2)  
 Fig. 15. Cyclization of xanthohumol (1) to isoxanthohumol (2)



Rys. 16. Demetylacja izoksantohumolu (**2**) za pomocą eteratów halogenków magnezu. X = I, Br, Cl

Fig. 16. Demethylation of isoxanthohumol (**2**) with etherates of magnesium halogenates. X = I, Br, Cl

Warunki prowadzenia tej reakcji, identyczne z opisanymi dla innych, znacznie mniej polarnych substratów [168, 169], dawały o wiele niższą wydajność produktu. Opracowana metoda otrzymywania 8-prenylnaringeniny polegała w pierwszym rzędzie na syntezie  $MgI_2 \cdot 2Et_2O$  z pierwiastków i eteru dietylowego w temperaturze pokojowej. Następnie w atmosferze  $N_2$  do kolby dodawano izoksantohumol, THF, roztwór eteratu jodku magnezu i całość ogrzewano do wrzenia przez 12 h. Tak dobrane warunki były efektem szeregu przeprowadzonych doświadczeń mających na celu optymalizację wydajności procesu, które polegały na doborze odpowiedniego rozpuszczalnika, temperatury, czasu trwania reakcji, wzajemnego stosunku molowego reagentów i sposobu przerobu mieszaniny poreakcyjnej. Szczególnie istotne było zachowanie ściśle bezwodnych warunków reakcji. W przeciwnym razie tworzyły się produkty uboczne, trudne do oddzielenia od 8-prenylnaringeniny. Po zakończeniu reakcji częściowo odparowano rozpuszczalnik, dodano nasycony roztwór  $NH_4Cl$ , ekstrahowano produkt chlorkiem metylenu, roztwór organiczny suszono za pomocą  $Na_2SO_4$  i wydzielono produkt przy użyciu chromatografii kolumnowej. Podobnie wykonano reakcje z użyciem  $MgBr_2 \cdot 2Et_2O$ ,  $CaI_2 \cdot 2Et_2O$  oraz  $MgCl_2 \cdot 2Et_2O$ , który otrzymano, mieszając bezwodny  $MgCl_2$  w bezwodnym eterze dietylowym. Reakcję z użyciem  $Mg(OAc)_2$  i  $Mg(OMe)_2$  wykonano podobnie jak dla  $MgCl_2$ .  $Mg(OMe)_2$  otrzymano z magnezu i metanolu.

Rezultaty przeprowadzonych reakcji demetylacji izoksantohumolu i ksantohumolu z użyciem soli magnezu i wapnia są przedstawione w tabeli 6. Jako medium reakcyjne został wybrany tetrahydrofuran, w którym dobrze rozpuszczały się reagenty. Pierwsze reakcje, które wykonano w eterze dietylowym, zachodziły bardzo powoli, co mogło być spowodowane niską rozpuszczalnością zarówno izoksantohumolu, jak i 8-prenylnaringeniny oraz niską temperaturą mieszaniny reakcyjnej. Najlepsze wydajności, 88 i 93% (reakcje przeprowadzono na odpowiednio 50 i 400 mg substratu), otrzymano, gdy zastosowano  $MgI_2 \cdot 2Et_2O$  w warunkach ściśle bezwodnych. W przypadku  $MgBr_2 \cdot 2Et_2O$  i  $MgCl_2 \cdot 2Et_2O$  wydajności reakcji były znacząco mniejsze i wynosiły odpowiednio, 38,6 i 3,9%.



Demetylacja ksantohumolu (**1**) i izoksantohumolu (**2**) [11]  
Demethylation of xanthohumol (**1**) and isoxanthohumol (**2**)

	Substrat Substrate	Sól magnezu Magnesium salt	Czas Time [h]	Wydajność Yield [%]	Odzyskany <b>1</b> lub <b>2</b> Recycled <b>1</b> or <b>2</b> [%]
1	<b>1</b>	MgI <sub>2</sub>	48	0 <sup>b,c</sup>	0 <sup>b</sup>
2	<b>2</b>	MgI <sub>2</sub>	12	88 <sup>a</sup> (93 <sup>a</sup> )	0 <sup>b</sup> (0 <sup>b</sup> )
3	<b>2</b>	MgBr <sub>2</sub>	12	39 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
4	<b>2</b>	MgCl <sub>2</sub>	12	4 <sup>a,b</sup>	82 <sup>b</sup>
5	<b>2</b>	CaI <sub>2</sub>	72	11 <sup>a</sup>	73 <sup>b</sup>
6	<b>2</b>	Mg(OAc) <sub>2</sub>	48	0 <sup>b,c</sup>	60 <sup>b</sup>
7	<b>2</b>	Mg(OMe) <sub>2</sub>	48	0 <sup>b</sup>	76 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> wydajność izolowana, reakcje zostały przeprowadzone z użyciem 50 mg **1** lub **2**  
isolated yield, the reaction was carried out with 50 mg of **1** or **2**

<sup>b</sup> wydajność oznaczona za pomocą HPLC  
yield based on HPLC analysis

<sup>c</sup> wiele produktów  
many products

W literaturze nie znaleziono propozycji szczegółowego mechanizmu tej reakcji, jednak wydaje się, że polega ona na nukleofilowym ataku anionu fluorowca na grupę metylową związaną z atomem tlenu. Taki mechanizm został zaproponowany w katalizowanej chlorkiem litu reakcji demetylacji, zachodzącej w pozycji *orto* w stosunku do sprzężonej grupy karbonylowej eterów arylowych [48]. To założenie tłumaczy zmniejszenie reaktywności w szeregu MgI<sub>2</sub> > MgBr<sub>2</sub> > MgCl<sub>2</sub>, ponieważ siła nukleofila, którym jest anion fluorowca, spada w tym samym kierunku (I<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup>). CaI<sub>2</sub> był mniej efektywny niż MgI<sub>2</sub> w reakcji demetylacji i 8-prenylonaringenina tworzyła się z 11-procentową wydajnością po 72 godzinach reakcji. Biorąc pod uwagę, że w drugiej grupie głównej układu okresowego pierwiastków przed wapniem i magnezem znajduje się beryl, oraz że BeCl<sub>2</sub> jest znanym odczynnikiem demetylującym [163], można przewidzieć, że powinien on równie łatwo powodować powyższą reakcję demetylacji izoksantohumolu. W przypadku ksantohumolu (**1**) tworzyła się skomplikowana mieszanina produktów i nie udało się wyizolować dezmetyluksantohumolu, spodziewanego produktu reakcji. Może to być związane z faktem, że w wyjściowym ksantohumolu grupa karbonylowa tworzy z grupą hydroksylową w pozycji *orto* silne, wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe (rys. 15) i nie jest w stanie wytworzyć kompleksu z magnezem, analogicznego do tego, jaki przedstawiono na rysunku 16.

W przypadku zastosowania octanu magnezu: Mg(OAc)<sub>2</sub> i metoksyłanu magnezu: Mg(OMe)<sub>2</sub> nie zaobserwowano tworzenia się 8-prenylonaringeniny. Octan magnezu zastosowano jako donor grupy AcO<sup>-</sup>, która jest słabym nukleofilem i słabą zasadą. Metoksyłan magnezu był źródłem mocnego nukleofila, anionu metoksyłowego (MeO<sup>-</sup>), który jest jednocześnie mocną zasadą i reaguje z grupami fenolowymi izoksantohumolu. W przypadku metoksyłanu magnezu, jeżeli reakcja demetylacji by zachodziła, powinno

być to związane z eliminacją eteru dimetylowego, który jako gaz opuszczałby mieszaninę reakcyjną i tym samym przesuwając równowagę reakcji w kierunku tworzenia produktu. Takiej reakcji jednak nie zaobserwowano.

Wyniki badań prezentowane w tym rozdziale zostały między innymi opisane w publikacji pt. "An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from isoxanthohumol with magnesium iodide etherate" [11].

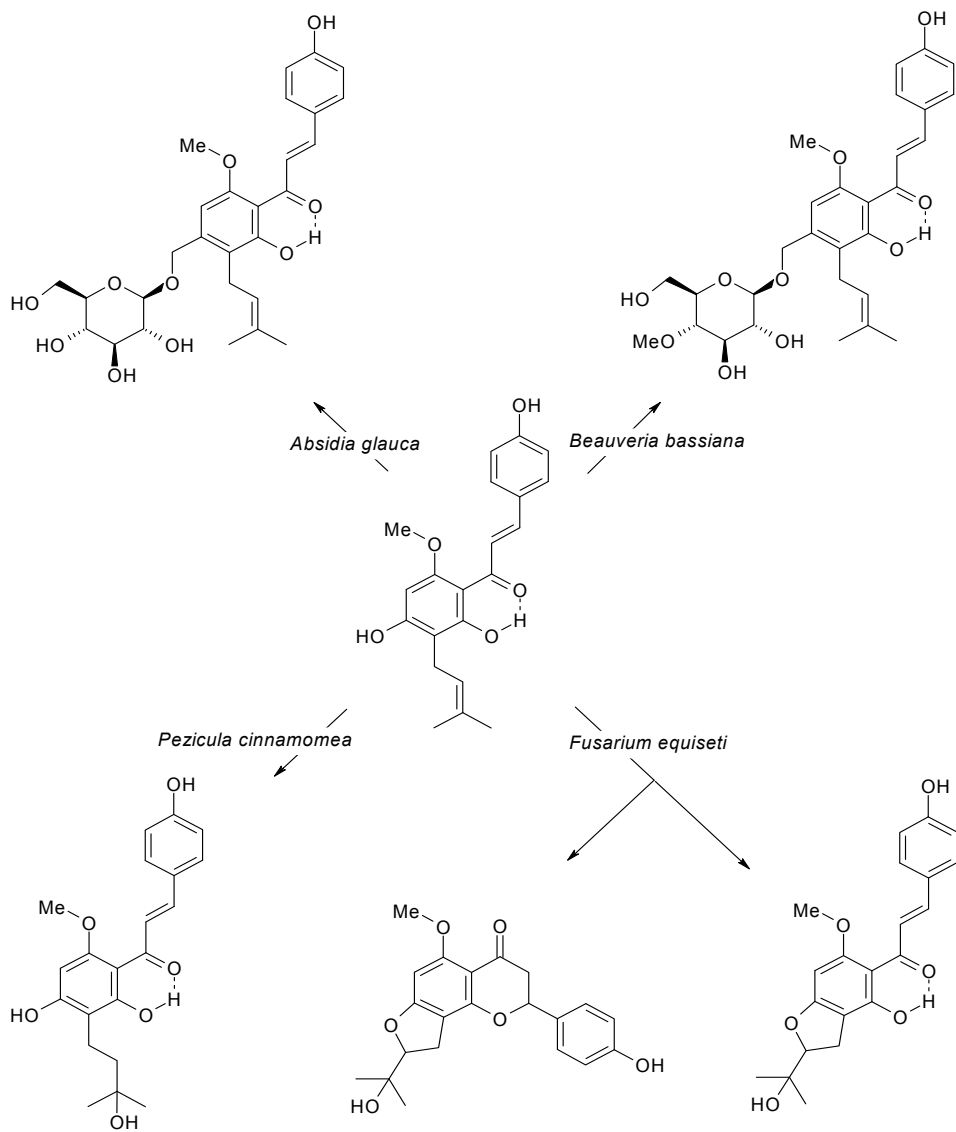
Na podstawie przeprowadzonych badań dokonano także zgłoszenia patentowego: M. Anioł, K. Szymańska, A. Żołnierczyk. Sposób wytwarzania 8-prenylnaringeniny i jej pochodnych. Nr rej. UP RP: P-384696, 2008.

## 2.6. Synteza pochodnych izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny

W literaturze niewiele jest doniesień na temat syntezy pochodnych 8-prenylnaringeniny (izoksantohumol może być rozpatrywany jako jej 4-*O*-metylopochozna). W wyniku metylacji 8-prenylnaringeniny za pomocą siarczanu dimetylu tworzył się eter trimetylowy tego związku. Reakcji towarzyszyło otwarcie pierścienia z utworzeniem dimetylowej pochodnej ksantohumolu [81]. 7,4'-di-*O*-acetylo-8-prenylnaringenina była zsyntezowana z 7,4'-di-*O*-acetylnaringeniny poprzez jej 4-*O*-prenyloowy eter, który był poddany przegrupowaniu Claisen'a-Cope'a [61]. Optycznie czynne 7,4'-di-*O*-metylo- lub diacetylopochozne izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny otrzymano w wyniku enancjoselektywnego uwodornienia grupy karbonylowej do hydroksylowej w pozycji C4 i rozdział produktów za pomocą chromatografii cieczowej. Drugie enancjomery powyższych związków zsyntezowano w wyniku utlenienia otrzymanych alkoholi. W wyniku hydrolizy tak uzyskanych optycznie czystych octanów otrzymano czyste enancjomery izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny, [108]. Opracowując tanią metodę wykrywania śladowych ilości 8-prenylnaringeniny, zsyntezowano hapteny tego związku będące pochodnymi kwasów karboksylowych, które połączono z surowicą albuminy bydłowej w celu produkcji specyficznych przeciwciał u królików. Badania przeprowadzono w związku z oceną ryzyka, jakie niesie spożywanie małych ilości 8-PN, np. w piwie, gdyż związek ten posiada silne właściwości estrogenne. Hapteny zawierały pięć fragmentów różniących się długością o budowie:  $-(CH_2)_nCOOH$  ( $n = 1, 3, 5, 6$  i  $9$ ), które były przyłączone do grup C7-OH lub C4'-OH [136].

Zastosowanie grzybów do transformacji ksantohumolu prowadziło do 4'-*O*-glukozylacji tego związku pod wpływem *Absidia glauca* (rys. 17). Inny mikroorganizm, *Beauveria bassiana*, dostarczył podobny produkt, który dodatkowo był podstawiony w pozycji 4'''-OH grupą metylową. Otrzymano także produkt przyłączenia wody do wiązania podwójnego grupy prenylowej oraz produkty jej cyklizacji w wyniku biotransformacji za pomocą, odpowiednio, *Pezizula cinnamomea* lub *Fusarium equiseti* [74].

Analogiczne produkty cyklizacji otrzymano, przeprowadzając biotransformację ksantohumolu za pomocą *Pichia membranifaciens* [167]. Powyższy przegląd literatury nie obejmuje prac nad związkami uzyskanymi w wyniku badań nad metabolizmem ksantohumolu, izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny w organizmach żywych.



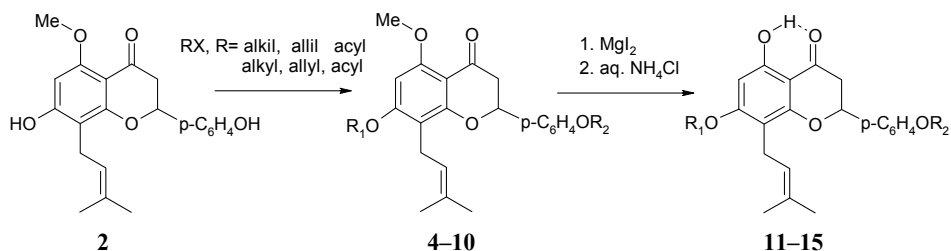
Rys. 17. Transformacja ksantohumolu przez wybrane grzyby  
 Fig. 17. Transformation of xanthohumol by selected fungi

Ta zadziwiająco mała liczba zsyntezowanych analogów powyższych związków jest prawdopodobnie spowodowana ich trudną dostępnością, związaną z bardzo wysokim kosztem zakupu. Poniżej przedstawiono wyniki badań dotyczących syntezy *O*-pochodnych izoksantohumolu i 8-prenylonaringeniny, które są związkami o potencjalnym działaniu farmakologicznym. Wszystkie zsyntezowane, opisane w tym rozdziale pochodne posiadały wyższą lipofilowość niż wyjściowy izoksantohumol (2) i 8-prenylonaringrmina (3).

Estry jako proleki są stosowane, aby zwiększyć lipofilowość leków hydrofilowych, co ułatwia transport przez membrany biologiczne w komórkach, czego rezultatem jest poprawienie wchłaniania leków doustnych. Estry mogą ulegać chemicznym lub enzymatycznym reakcjom w celu uwolnienia substancji czynnej, na przykład hydrolizie przez esterazy [15, 94, 150]. Leki estrogenne w terapii hormonalnej menopauzy u kobiet są często aplikowane naskórną, tak jak w przypadku 8-prenylonaringeniny, którą stosuje się w pewnego typu kremach [42]. W literaturze nie znaleziono informacji na temat badań tego rodzaju, lecz wydaje się, że podobne wchłanianie i działanie estrogenne powinno być obserwowane w przypadku 8-prenylonaringeniny i jej pochodnych. Aby związek mógł przeniknąć przez barierę skóry, powinien posiadać odpowiednią lipofilowość i hydrofilowość. Pierwszy z tych czynników jest konieczny, by nastąpiło wchłanianie do *stratum corneum*. Pewna hydrofilowość jest potrzebna, aby umożliwić absorpcję do wewnętrznych warstw skóry [83]. Takie, zdawałoby się, przeciwstawne wymagania są spełnione dla proleków będących estrami. Mają wysoką lipofilowość, która umożliwia im łatwe przeniknięcie do wnętrza skóry, gdzie ulegają hydrolizie do związków terapeutycznych, będących alkoholami, fenolami lub kwasami karboksylowymi [21, 82, 171]. Co więcej, szybkość hydrolizy może być modyfikowana długością albo rozgałęzieniem łańcucha składowego alkoholu lub kwasu w estrze [142]. Takiego działania można się spodziewać w przypadku acetylowych pochodnych 8-prenylonaringeniny, których synteza była celem poniższych badań. Aby przebadać uniwersalność metody demetylacji, zsyntezowano także pochodne będące eterami, które ze względu na dużą stabilność są rzadko stosowane jako proleki. Jednak nie można całkowicie wykluczyć ich aktywności biologicznej, chociażby ze względu na fakt, że izoksantohumol może być biotransformowany do 8-prenylonaringeniny przy udziale mikroflory jelitowej człowieka, co jest związane z rozczepieniem wiązania eterowego [123, 124].

Głównym celem prowadzonych badań było przebadanie reakcji demetylacji 7-*O*- i 4'-*O*-podstawionych pochodnych izoksantohumolu do odpowiednich pochodnych 8-prenylonaringeniny. Przeprowadzone reakcje obrazuje rysunek 18 i tabela 7.

Jako modelowe substraty do reakcji demetylacji wybrano metylową, *n*-pentyłową, allilową, acetylową i palmitoilową pochodną izoksantohumolu, które różniły się długością łańcuchów alkilowych. Biorąc pod uwagę to, że reakcja zachodziła z dobrą wydajnością w przypadku niepodstawionego izoksantohumolu, założono, że wydajności reakcji demetylacji przeprowadzone na monopodstawionych pochodnych powinny być podobne do reaktywności dipodstawionych związków. Z tego powodu syntezę pochodnych izoksantohumolu wykonano przy dużym nadmiarze czynników acylujących lub alkilujących, aby otrzymać dipodstawione pochodne.



Rys. 18. Synteza pochodnych 8-prenylonaringeniny (**11–15**) z izoksantohumolu poprzez jego pochodne (**4–10**)

Fig. 18. Route of the 8-prenylaringenin derivatives (**11–15**) synthesis from isoxanthohumol (**2**) via isoxanthohumol derivatives (**4–10**)

Tabela 7  
Table 7

Synteza 7-*O*- i 4'-*O*-podstawionych pochodnych izoksantohumolu (**4–8**) i ich demetylacja do 8-prenylonaringenin (**11–15**)  
 Synthesis of 7-*O*- and 4'-*O*-substituted isoxanthohumols (**4–8**) and their demethylation to 8-prenylaringenins (**9–15**)

	Substrat Substrate	Produkt Product	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1a	<b>2</b>	<b>4</b>	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -
1b	<b>2</b>	<b>5</b>	CH <sub>3</sub> -	H
2a	<b>2</b>	<b>6</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	H
2b	<b>2</b>	<b>7</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -
3	<b>2</b>	<b>8</b>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -
4	<b>2</b>	<b>9</b>	CH <sub>3</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> C(O)-
5	<b>2</b>	<b>10</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> C(O)-
6	<b>4</b>	<b>11</b>	CH <sub>3</sub> -	CH <sub>3</sub> -
7	<b>6</b>	<b>12</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	H
8	<b>8</b>	<b>13</b>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub> -
9	<b>9</b>	<b>14</b>	CH <sub>3</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> C(O)-
10	<b>10</b>	<b>15</b>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> C(O)-	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> C(O)-

Estry metylowe (**4** i **5**) zsyntezowano, używając dużego nadmiaru jodku metylu z wydajnościami odpowiednio 69 i 9%. W tym przypadku nie obserwowano rozczepienia pierścienia C, jakie miało miejsce w przypadku metylacji 8-prenylonaringeniny za pomocą siarczanu dimetylu [81]. Alkylowanie jodkiem *n*-pentylu zachodziło z mniejszymi wydajnościami: 28% (**6**) i 14% (**7**). Związki (**8**, **9** i **10**) otrzymano z dobrymi wydajnościami (79–88%) odpowiednio w reakcjach z bromkiem allilu, bezwodnikiem octowym i chlorkiem palmitoilu.

Demetylacje tak otrzymanych pochodnych przeprowadzono za pomocą eteratu jodku magnezu według metody opracowanej poprzednio dla izoksantohumolu. Demetylacja eteru trimetylowego 8-prenylonaringeniny (**4**) potwierdziła, że zachodzi ona w pozycji *orto* w stosunku do grupy karbonylowej sprzężonej z pierścieniem aromatycznym. Zablockowanie dwóch grup hydroksylowych pod postacią eterów metylowych spowo-

dowało obniżenie wydajności reakcji w porównaniu z demetylacją izoksantohumolu i tworzył się główny produkt (**11**) z 61-procentową wydajnością. Jest to produkt naturalny izolowany z *Esenbeckia berlandieri* ssp. *Acapulcensis* [30] i *Azadirachta indica* [141]. Substrat w powyższej reakcji (**4**) jest także obecny w małych ilościach w chmielu [47, 117]. Bardziej wydajna okazała się demetylacja (85%), gdy zastosowano pochodną z dłuższym fragmentem alkilowym, eter *n*-pentylowy (**6**), co prowadziło do produktu (**12**). Kwasy Lewisa, takie jak układ CeCl<sub>3</sub>/NaI, stosuje się w celu deprotekcji eterów allilowych alkoholi i fenoli [18, 151]. Demetylacja 7,4'-di-*O*-alliloizoksantohumolu (**8**) została przeprowadzona w celu sprawdzenia, czy reakcji demetylacji nie towarzyszy dealkilacja, zwłaszcza, że w tym przypadku istniała taka możliwość, ponieważ użyty w dużym nadmiarze jodek magnezu, składający się z magnezu (typowy kwas Lewisa) i jodu (silny nukleofil) mógł to powodować. Diacetylo- i palmitoilopochodne izoksantohumolu, estry, które są często stosowane jako proleki, poddano także reakcji demetylacji, która prowadziła do odpowiednich pochodnych 8-prenylonaringeniny (**14** i **15**) z 88 i 75-procentową wydajnością.

Przeprowadzone badania udowodniły, że jest możliwa synteza 7-*O*- i 4'-*O*-podstawionych pochodnych 8-prenylonaringeniny poprzez demetylację pochodnych izoksantohumolu i nie obserwuje się znaczącego wpływu rodzaju podstawnika w pozycjach 4-*O* i 7-*O* na wydajność reakcji, co czyni ją uniwersalną w otrzymywaniu tego typu związków. Jakkolwiek podczas optymalizacji procesu demetylacji izoksantohumolu bardzo często był obserwowany rozkład reagentów, co było prawdopodobnie związane ze znaną niestabilnością flawonoidów. Opracowana metoda może być zastosowana do syntezy potencjalnie bioaktywnych pochodnych 8-prenylonaringeniny, na przykład w kombinatoryce chemicznej do syntezy bibliotek związków. Pozwala także na podniesienie opłacalności przerobu wychmielin, dotychczasowego produktu odpadowego przemysłu piwowarskiego.

W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymano 4 znane związki, których dane spektroskopowe <sup>1</sup>H NMR i IR były zgodne z literaturowymi. Do tej grupy należały: 7,4'-di-*O*-metyloizoksantohumol (**4**) [147], 7-*O*-metyloizoksantohumol (**5**) [108], 7,4'-di-*O*-metylo-8-prenylonaringenina (**11**) [30, 141] oraz 7,4'-di-*O*-acetylo-8-prenylonaringenina (**14**) [72, 107, 61, 136].

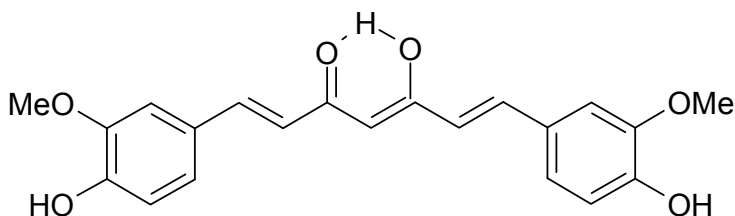
Nowymi związkami, nieopisywanymi dotychczas w literaturze, były: 7-*O*-*n*-pentyloizoksantohumol (**6**), 7,4'-di-*O*-*n*-pentyloizoksantohumol (**7**), 7,4'-di-*O*-allilizoksantohumol (**8**), 7,4'-di-*O*-acetyloizoksantohumol (**9**), 7,4'-di-*O*-palmitoilozoksantohumol (**10**), 7-*O*-pentylo-8-prenylonaringenina (**12**), 7,4'-di-*O*-allilo-8-prenylonaringenina (**13**) i 7,4'-di-*O*-palmitoilo-8-prenylonaringenina (**15**). Ich budowę potwierdzono poprzez analizę widm <sup>1</sup>H NMR i IR.

Na podstawie przeprowadzonych badań dokonano także 6 zgłoszeń patentowych, wymienionych w Przedmowie niniejszego opracowania.

## 2.7. Biotransformacje flawonoidów chmielu za pomocą roślin wyższych

Rośliny są w stanie transformować związki chemiczne zarówno endogenne, jak i ksenobiotyki, za pomocą swojego systemu enzymatycznego. Kultury komórkowe i tkankowe, izolowane enzymy oraz rozdrobnione części roślin stosuje się szeroko do regio- i stereospecyficznych transformacji związków terpenowych, steroidów, alkaloidów, związków aromatycznych, estrów, ketonów, aldehydów, alkoholi, kwasów karboksylowych, pochodnych kumaryny, związków fenolowych i innych. Prowadzone reakcje obejmują utlenienie, epoksydację, redukcję, uwodornienie, hydroksylację, hydrolizę, metylację, cyklizację, acylację, izomeryzację, glikozylację i estryfikację [62, 78].

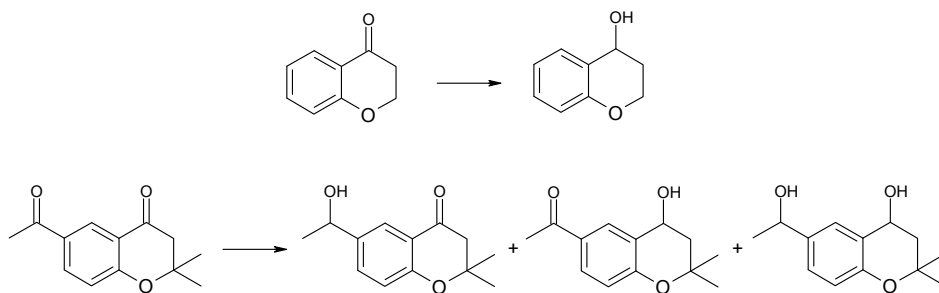
Związki fenolowe w kulturach komórkowych ulegają najczęściej glikozylacji lub estryfikacji [101]. Zawiesina komórek *Catharanthus roseus* (barwinka różowego) glikozyluje dwie grupy fenolowe kurkuminy [84] (rys. 19).



Rys. 19. Kurkumina  
Fig. 19. Curcumine

Krzew *Rauvolfia serpentine* (rauwolfia żmijowa), zioło stosowane w medycynie wielu krajów, katalizuje biosyntezę arbutyny, stosowanej w preparatach do rozjaśniania przebarwień skóry, która jest  $\beta$ -glikozydem hydrochinonu [14]. Glukotransferazy zawarte w wielu roślinach, między innymi w tytoniu szlachetnym (*Nicotiana tabacum*) i winorośli (*Vitis sp.*), powodują glikozylację kwercetyny, najbardziej rozpowszechnionego w świecie roślinnym flawanolu, mającej silne właściwości przeciwutleniające i stosowanej w lecznictwie [88].

Flawanony zawierają w swojej budowie szkielet 4-chromanonu. Ten związek oraz 6-acetylo-2,2-dimetylo-4-chromanon, poddany działaniu *Baccharis crispa*, *Baccharis flabellata*, *Buddleja cordobensis*, *Gardenia augusta*, *Gardenia pulchella*, *Tessaria absinthioides* lub korzenia *Daucus carota*, ulega redukcji z utworzeniem odpowiednich alkoholi [118] (rys. 20). Najwyższą wydajność konwersji 4-chromanonu, powyżej 97%, zaobserwowano w *Daucus carota*. Uzyskana czystość optyczna S-alkoholu wynosiła powyżej 98%. Z podobną wydajnością i czystością optyczną był transformowany drugi substrat, 6-acetylo-2,2-dimetylo-4-chromanon. W tym przypadku w największej ilości tworzył się produkt redukcji grupy acetylowej (74–81%). Mniej uzyskano produktu redukcji grupy karbonylowej pierścienia heterocyklicznego (10–14%). Redukcja dwóch grup karbonylowych naraz zachodziła w niewielkim stopniu (1–8% uzyskanego produktu).



Rys. 20. Redukcja 4-chromanonu i 6-acetylo-2,2-dimetylo-4-chromanonu przez *Daucus carota*  
 Fig. 20. Reduction of 4-chromanone and 6-acetyl-2,2-dimethyl-4-chromanone by *Daucus carota*

Ze względu na dużą aktywność biologiczną flawonoidów chmielu podjęto w prowadzonych badaniach własnych próby wykorzystania systemów enzymatycznych roślin do syntezy ich pochodnych. Owoce, warzywa, inne części roślin oraz ich kultury tkankowe są powszechnie wykorzystywane do redukcji ketonów i alkenów, hydroksylacji, glukozytacji, hydrolizy estrów, epoksydacji i innych. Ze względu na łatwość prowadzenia szczególne znaczenie ma metoda biotransformacji polegająca na użyciu rozdrobnionych owoców i warzyw. Z reguły doświadczenia prowadzi się przez 48 h, zakładając, że w tym czasie rozwijająca się mikroflora nie ma znaczącego wpływu na przebieg procesu i rzadko wykonuje się monitoring mikrobiologiczny. Jak wskazuje dostępna literatura, źródłem stosowanych bioreagentów może być lokalny sklep. Uniemożliwia to jednak dokładne oznaczenie odmiany rośliny i określenie, czy i jakie środki ochrony roślin były zastosowane, co między innymi może mieć wpływ na rozwój mikroflory podczas prowadzonych doświadczeń. Wydajności tego typu biotransformacji zależą także od okresu w roku, w którym są prowadzone, a najlepsze wyniki otrzymuje się, stosując świeżo zebrane rośliny. W jednym z klasycznych toków postępowania bioreagent myje się wodą, moczy przez 20 minut w 5-procentowym roztworze podchlorynu sodu w celu usunięcia mikroorganizmów znajdujących się na powierzchni i tuż pod nią. W tym czasie silnie zasadowy roztwór podchlorynu penetruje miąższ owoców i warzyw na głębokość około 1 mm. Biokatalizator opłukuje się etanolem, przenosząc do komory laminarnej, w której w sterylnych warunkach rozdrabnia się go, odważa do kolb i dodaje bufor lub wodę oraz substrat. Postęp reakcji bada się zazwyczaj poprzez pobieranie ciekłych próbek, ich ekstrakcję rozpuszczalnikiem i oznaczanie ilościowe badanych związków metodami chromatograficznymi [6]. Do tej pory niewiele jest publikacji na temat analogicznych biotransformacji flawonoidów z wykorzystaniem rozdrobnionych warzyw i owoców. Podczas prowadzenia biotransformacji flawonoidów należy uwzględnić fakt, że mogą one być absorbowane przez biomasę, co może prowadzić do trudności z ilościowym wyizolowaniem reagentów po biotransformacji czy też powodować błędy w ich ilościowym oznaczeniu.

Celem prowadzonych badań było opracowanie metody skringu biotransformacji oraz przebadanie przekształceń flawonoidów chmielu na przykładzie ksantohumolu, izoksantohumolu, 8-prenylnaringeniny oraz naringeniny z użyciem rozdrobnionych owoców i warzyw. Podczas prowadzonych doświadczeń badano sterylność środowiska



reakcji, ponieważ przekształcenia tego typu mogą zachodzić również pod wpływem mikroorganizmów, co prowadzi do niejednoznacznych wyników [131]. Posiewy wykonywano, stosując dwa różne podłoża – jedno sprzyjające rozwojowi grzybów i drugie, używane do hodowli bakterii. Standardowo badano też pH. W doborze roślin kierowano się możliwością redukcji przez nie grupy karbonylowej, glikozylacji, dowiedzioną obecnością w nich dużej ilości flawonoidów lub ich dostępnością.

Naringeninę (N), 8-prenylnaringeninę (8PN), izoksantohumul (IXH) i ksantohumul (XH) poddano działaniu 14 rozdrobnionych warzyw i owoców: marchwi (korzeń), pietruszki (korzeń), ziemniaka (bulwa), czosnku (cebula), grejpfruta (owoc), topinamburu (bulwa), chrzanu (korzeń), pigwy (owoc), truskawki (owoc), buraka ćwikłowego (korzeń), kalarepy (korzeń), rabarbaru (liść), rzodkwi (korzeń) i czarnej rzepy (korzeń). Tok prowadzonych doświadczeń zostanie szczegółowo omówiony na przykładzie ksantohumolu i naringeniny, strukturalnego analogu 8-prenylnaringeniny, który nie ma grupy prenylowej. Przed przystąpieniem do właściwej części badań, dobrano ilości poszczególnych reagentów i sposób ich rozdrabniania, tak aby ilość biokatalizatora w stosunku do pozostałych składników była możliwie jak największa, i aby uzyskać jak najlepszy rozdział oraz odzysk fazy organicznej po jednokrotnej ekstrakcji mieszaniny poreakcyjnej. W czasie prowadzonych badań sprawdzono także, czy w obserwowanym zakresie pH od 3 do 8 badane flawonoidy były dobrze ekstrahowane z roztworów wodnych przez octan etylu. Stopień ich odzysku wynosił powyżej 98%. Zastosowana metoda różniła się od klasycznego sposobu postępowania, w którym co pewien czas pobiera się próbki do analizy z tej samej kolby, z tym że na każdy dzień analizy przygotowano osobną próbkę. Taki sposób postępowania wynikał z faktu, że flawonoidy, w tym badane związki, jako związki fenolowe, mogły być absorbowane przez biomasę. W klasycznym sposobie postępowania bardzo uciążliwe i praktycznie niemożliwe byłoby przeniesienie ściśle określonej części zawartości kolby, o ściśle określonym stosunku bioreagenta do roztworu wodnego, tak aby zawartość kolby pozostała dalej sterylna.

Tabele 8–21 przedstawiają, w jaki sposób zmieniała się masa substratów, pH roztworów i ilość mikroorganizmów w czasie trwania transformacji pod wpływem użytych bioreagentów. Biorąc pod uwagę sposób przygotowania biokatalizatorów do transformacji i uzyskane wyniki, można założyć, że w wielu przypadkach obserwowana mikroflora była pochodzenia epifitycznego i nie była wynikiem wtórnego zakażenia. Jednak zakres przeprowadzonych badań nie pozwolił tego stwierdzić kategorycznie. Mikroorganizmów nie identyfikowano, zakładając, że ich obecność w dużej ilości mogła powodować przekształcenia badanych flawonoidów, a ich brak lub mała ilość świadczyła o działaniu systemów enzymatycznych owoców i warzyw, co było przedmiotem badań. Masa substratu była w każdym doświadczeniu taka sama i wynosiła 2 mg. W przypadku pietruszki, marchwi, ziemniaka, czosnku i grejpfruta (tab. 8–12) wybrane doświadczenia wykonano w dwóch powtórzeniach, uzyskując dobrą powtarzalność wyników odnośnie do oznaczanych mas flawonoidów. Dokładne oznaczenie masy badanych związków było istotne z tego powodu, że w sytuacji znaczącego spadku ich ilości podczas procesu oraz braku oznak tworzenia się innych związków (co głównie obserwowano) można było zweryfikować i zmienić przyjętą metodę przerobu mieszaniny poreakcyjnej w celu wyizolowania ewentualnych produktów biotransformacji.

Tabela 8  
Table 8

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu marchwi (*Daucus carota*)  
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Daucus carota*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH
<i>Daucus carota</i>	0	2,15 ±0,08	6,62 ±0,00	9 x 10 <sup>4</sup>	1,65 ±0,16	6,72 0,00	2 x 10 <sup>4</sup>	6,72 ±0,05	4 x 10 <sup>4</sup>
	24	2,34 ±0,09	6,24 ±0,03	>1 x 10 <sup>9</sup>	0,30 ±0,03	6,43 0,20	7 x 10 <sup>6</sup>	6,53 ±0,02	>1 x 10 <sup>9</sup>
	48	2,19 ±0,02	5,76 ±0,02	>1 x 10 <sup>9</sup>	0,16 ±0,01	5,42 0,16	>1 x 10 <sup>9</sup>	6,20 ±0,00	>1 x 10 <sup>9</sup>
	72	2,15 ±0,07	5,48 ±0,02	>1 x 10 <sup>9</sup>	0,12 ±0,01	5,76 0,00	>1 x 10 <sup>9</sup>	4,88 ±0,20	>1 x 10 <sup>9</sup>

\*– ilość komórek mikroorganizmów; Agar 1  
– number of microorganism cells; Agar 1

Tabela 9  
Table 9

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu pietruszki (*Petroselinum crispum*)  
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Petroselinum crispum*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH
<i>Petroselinum crispum</i>	0	–	–	–	2,03 ±0,08	6,23 ±0,00	0	6,34 ±0,04	0
	24	–	–	–	0,09 ±0,02	6,48 ±0,06	0	6,46 ±0,005	0
	48	–	–	–	0,04 ±0,00	6,26 ±0,00	>10 <sup>9</sup>	5,52 ±0,02	>10 <sup>9</sup>
	72	–	–	–	0,03 ±0,01	6,89 ±0,05	>10 <sup>9</sup>	6,58 ±0,16	>10 <sup>9</sup>

\*– ilość komórek mikroorganizmów; Agar 1  
– number of microorganism cells; Agar 1

Tabela 10  
Table 10

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu ziemniaka (*Solanum tuberosum*)  
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Solanum tuberosum*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH
<i>Solanum tuberosum</i>	0	1,12	6,36	0	0,10 ±0,04	6,27 ±0,02	0	6,18	0
	24	0,02	5,98	5 x 10 <sup>5</sup>	0,00 ±0,00	6,01 ±0,01	1,2 x 10 <sup>3</sup>	5,63	3 x 10 <sup>3</sup>
	48	0,02	6,86	>1 x 10 <sup>9</sup>	0,01 ±0,00	5,84 ±0,24	>1 x 10 <sup>9</sup>	7,59	>1 x 10 <sup>9</sup>
	72	0,00	7,58	>1 x 10 <sup>9</sup>	0,01 ±0,01	7,80 ±0,06	>1 x 10 <sup>9</sup>	7,87	>1 x 10 <sup>9</sup>

\*– ilość komórek mikroorganizmów; Agar 1  
– number of microorganism cells; Agar 1

Tabela 11

Table 11

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu czosnku (*Allium*)Degradation of naringenin and xanthohumol by *Allium*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH
<i>Allium</i>	0	–	–	–	2,06 ±0,02	6,61 ±0,06	0	6,64 ±0,00	0
	24	–	–	–	1,49 ±0,14	6,58 ±0,04	0	6,48 ±0,04	0
	48	–	–	–	1,17 ±0,01	6,50 ±0,02	0	6,46 ±0,00	0
	72	–	–	–	0,96 ±0,04	6,44 ±0,00	0	6,41 ±0,01	0

\*– ilość komórek mikroorganizmów; Agar 1

– number of microorganism cells; Agar 1

Tabela 12

Table 12

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu grejpfruta (*Citrus x paradisi*)Degradation of naringenin and xanthohumol by *Citrus x paradisi*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH
<i>Citrus x paradisi</i>	0	2,47 ±0,02	4,26 ±0,04	0	2,32 ±0,06	4,28 ±0,01	0	4,45 ±0,02	0
	24	2,42 ±0,03	4,20 ±0,02	0	2,23 ±0,13	4,20 ±0,00	0	4,15 ±0,02	0
	48	2,73 ±0,02	4,16 ±0,02	0	1,87 ±0,06	4,20 ±0,02	0	4,21 ±0,01	0
	72	2,29 ±0,05	4,20 ±0,02	0	1,54 ±0,13	4,18 ±0,01	0	4,17 ±0,03	0

\*– ilość komórek mikroorganizmów; Agar 1

– number of microorganism cells; Agar 1

Tabela 13

Table 13

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu topinamburu (*Helianthus tuberosus*)Degradation of naringenin and xanthohumol by *Helianthus tuberosus*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH
<i>Helianthus tuberosus</i>	0	1,83	6,77	0	1,75	6,70	0	6,74	0
	24	0,52	6,64	6 x 10 <sup>5</sup> 0	0,09	6,48	>1 x 10 <sup>9</sup> 0	6,32	>1 x 10 <sup>9</sup> 0
	48	0,00	7,18	>1 x 10 <sup>9</sup> 0	0,04	6,60	>1 x 10 <sup>9</sup> 0	7,01	>1 x 10 <sup>9</sup> 0
	72	0,00	7,32	>1 x 10 <sup>9</sup> 0	0,03	7,24	>1 x 10 <sup>9</sup> 0	7,14	>1 x 10 <sup>9</sup> 0

\*– ilość komórek mikroorganizmów; górna wartość – Agar 1, dolna wartość – Agar 2

– number of microorganism cells; upper value – Agar 1, lower value – Agar 2

Tabela 14  
Table 14

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu chrzanu (*Armoracia rusticana*)  
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Armoracia rusticana*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH	[jtk/ml]*
<i>Armoracia rusticana</i>	0	1,62	5,46	1 x 10 <sup>2</sup> 0	0,75	5,52	7 x 10 <sup>2</sup> 2 x 10 <sup>3</sup>	5,44	2 x 10 <sup>2</sup> 1 x 10 <sup>3</sup>
	24	1,35	5,37	0 2 x 10 <sup>2</sup>	0,24	5,32	1 x 10 <sup>3</sup> 4 x 10 <sup>3</sup>	5,53	2 x 10 <sup>3</sup> 3 x 10 <sup>2</sup>
	48	1,33	5,36	0 0	0,16	5,26	0 0	5,60	>1 x 10 <sup>9</sup> >1 x 10 <sup>9</sup>
	72	1,23	5,25	0 0	0,11	5,19	0 0	5,28	>1 x 10 <sup>9</sup> >1 x 10 <sup>9</sup>

\*- ilość komórek mikroorganizmów; górna wartość – Agar 1, dolna wartość – Agar 2  
- number of microorganism cells; upper value – Agar 1, lower value – Agar 2

Tabela 15  
Table 15

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu owoców pigwowca (*Chaenomeles*)  
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Chaenomeles*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH	[jtk/ml]*
<i>Chaenomeles</i>	0	1,76	3,56	0 0	1,68	3,57	0 0	3,47	0 0
	24	0,95	3,54	0 0	0,37	3,57	0 0	3,48	0 0
	48	1,01	3,49	0 0	0,27	3,46	0 0	3,42	0 0
	72	0,95	3,55	0 0	0,00	3,52	0 0	3,50	0 0

\*- ilość komórek mikroorganizmów; górna wartość – Agar 1, dolna wartość – Agar 2  
- number of microorganism cells; upper value – Agar 1, lower value – Agar 2

Tabela 16  
Table 16

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu truskawki (*Fragaria ×ananassa*)  
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Fragaria ×ananassa*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH	[jtk/ml]*
<i>Fragaria ×ananassa</i>	0	2,14	3,30	0	1,65	3,28	0	3,26	0
	24	1,84	3,35	0	1,08	3,32	0	3,27	2 x 10 <sup>4</sup>
	48	1,73	3,35	0	0,99	3,33	0	3,13	5 x 10 <sup>7</sup>
	72	1,78	3,32	0	1,12	3,30	0	3,00	4 x 10 <sup>7</sup>

\*- ilość komórek mikroorganizmów; Agar 1  
- number of microorganism cells; Agar 1

Tabela 17  
Table 17

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu buraka ćwikłowego  
(*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*)  
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH
<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i>	0	2,02	6,05	0 1 x 10 <sup>2</sup>	2,23	6,103	1 x 10 <sup>2</sup> 1 x 10 <sup>2</sup>	6,23	2 x 10 <sup>2</sup> 1 x 10 <sup>2</sup>
	24	0,79	6,15	2 x 10 <sup>2</sup> 3 x 10 <sup>2</sup>	1,44	6,396	2 x 10 <sup>4</sup> 2 x 10 <sup>4</sup>	6,54	>1 x 10 <sup>9</sup> >1 x 10 <sup>9</sup>
	48	0,85	7,06	>1 x 10 <sup>9</sup> >1 x 10 <sup>9</sup>	1,34	6,522	>1 x 10 <sup>9</sup> >1 x 10 <sup>9</sup>	7,01	>1 x 10 <sup>9</sup> >1 x 10 <sup>9</sup>
	72	0,59	6,16	>1 x 10 <sup>9</sup> >1 x 10 <sup>9</sup>	0,92	5,993	>1 x 10 <sup>9</sup> >1 x 10 <sup>9</sup>	7,68	>1 x 10 <sup>9</sup> >1 x 10 <sup>9</sup>

\*– ilość komórek mikroorganizmów; górna wartość – Agar 1, dolna wartość – Agar 2  
– number of microorganism cells; upper value – Agar 1, lower value – Agar 2

Tabela 18  
Table 18

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu kalarepy (*Brassica rupestris*)  
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Brassica rupestris*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH
<i>Brassica rupestris</i>	0	2,21	6,78	0	2,21	6,79	0	6,99	0
	24	1,96	6,90	0	1,98	6,94	0	7,00	0
	48	1,92	6,77	0	1,89	6,93	0	6,92	0
	72	1,73	6,90	0	1,58	6,67	0	6,75	0

\*– ilość komórek mikroorganizmów; Agar 1  
– number of microorganism cells; Agar 1

Tabela 19  
Table 19

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu rabarbaru (*Rheum rhaponticum*)  
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Rheum rhaponticum*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
		[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH
<i>Rheum</i>	0	2,62	3,93	0	2,00	3,92	0	3,93	0
	24	2,39	3,89	0	1,28	3,91	0	3,92	0
	48	2,05	3,94	0	0,90	3,91	0	3,95	0
	72	2,10	3,94	0	1,02	4,00	0	4,01	0

\*– ilość komórek mikroorganizmów; Agar 1  
– number of microorganism cells; Agar 1

Tabela 20  
Table 20

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu rzodkwi (*Raphanus sativus*)  
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Raphanus sativus*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
<i>Raphanus sativus</i>	[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH	[jtk/ml]*
	0	2,21	6,69	4 x 10 <sup>3</sup>	2,16	7,00	3 x 10 <sup>3</sup>	–	>1 x 10 <sup>9</sup>
	24	2,49	6,67	8 x 10 <sup>4</sup>	1,94	6,63	>1 x 10 <sup>9</sup>	6,71	>1 x 10 <sup>9</sup>
	48	2,57	–	7 x 10 <sup>4</sup>	1,58	–	>1 x 10 <sup>9</sup>	6,8	>1 x 10 <sup>9</sup>
	72	2,39	7,37	3 x 10 <sup>4</sup>	1,87	7,73	>1 x 10 <sup>9</sup>	7,68	>1 x 10 <sup>9</sup>

\*– ilość komórek mikroorganizmów; Agar 1  
– number of microorganism cells; Agar 1

Tabela 21  
Table 21

Degradacja naringeniny i ksantohumolu przy użyciu czarnej rzepy  
(*Raphanus sativus var. niger*)

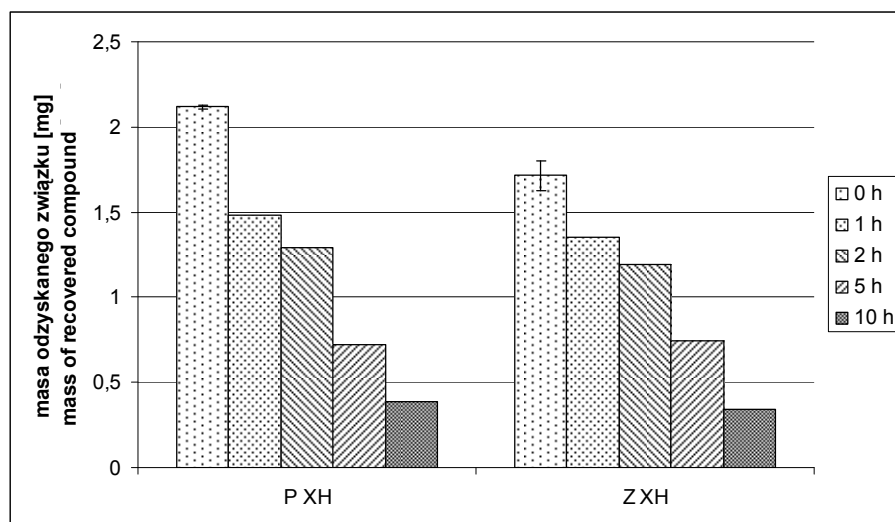
Degradation of naringenin and xanthohumol by *Raphanus sativus var. niger*

Biokatalizator Biocatalyst	Czas Time	Naringenina Naringenin			Ksantohumol Xanthohumol			Próba ślepa Blanc	
<i>Raphanus sativus var. niger</i>	[h]	[mg]	pH	[jtk/ml]*	[mg]	pH	[jtk/ml]*	pH	[jtk/ml]*
	0	2,14	5,77	0 1 x 10 <sup>2</sup>	1,99	5,61	0 0	5,27	0 4 x 10 <sup>3</sup>
	24	2,13	5,30	0 0	1,15	5,15	0 0	5,10	0 6 x 10 <sup>3</sup>
	48	2,13	5,16	0 1 x 10 <sup>2</sup>	0,97	5,09	0 0	4,91	0 3 x 10 <sup>3</sup>
	72	2,04	4,95	0 0	0,79	4,92	1 x 10 <sup>3</sup> 1 x 10 <sup>2</sup>	4,48	2 x 10 <sup>4</sup> >1 x 10 <sup>9</sup>

\*– ilość komórek mikroorganizmów; górna wartość – Agar 1, dolna wartość – Agar 2  
– number of microorganism cells; upper value – Agar 1, lower value – Agar 2

W większości przypadków obserwowano powolne obniżenie zawartości badanych flawonoidów, jednak pietruszka, marchew, ziemniak krajowy (zakupiony w czerwcu), topinambur, chrzan i owoce pigwowca bardzo szybko degradowały ksantohumol w pierwszym dniu trwania procesu (tab. 8–10, 13, 14 i 15). Podobnie szybko była degradowana naringenina za pomocą surowego ziemniaka i topinamburu (tab. 10 i 13). Doświadczenie wykonano także przy użyciu ziemniaka z całkowicie innego źródła pochodzenia, importowanego z Grecji i zakupionego pod koniec maja, otrzymując bardzo podobne wyniki odnośnie do wszystkich badanych substratów, jak w przypadku ziemniaka krajowego. Biorąc pod uwagę fakt, że w odniesieniu do próbek zawierających ksantohumol i naringeninę znaczącą ilość mikroorganizmów obserwowano dopiero po 48 h trwania procesu (tab. 8–10, 13–15), można założyć, że degradacja była spowodowana działaniem badanych roślin, a nie rozwijającą się mikroflorą. Jedynie w transformacji ksantohumolu za pomocą topinamburu (tab. 13) wynik był niejednoznaczny, ponieważ już w ciągu pierwszych 24 h ilość mikroorganizmów przekroczyła mierzalną

wartość  $10^9$  jtk/ml. Początkowo ilość mikroorganizmów oznaczano tylko na podłożu sprzyjającym rozwojowi grzybów (tab. 8, 9, 11, 12, 16–20). W dalszym okresie wprowadzono drugie podłoże sprzyjające rozwojowi bakterii (tab. 13–15, 17, 21). Stosowanie dwóch różnych podłoży dało podobne wyniki odnośnie do ilości oznaczanych mikroorganizmów w przypadku buraka ćwikłowego (tab. 17), chrzanzu (tab. 14), pigwowca (tab. 15) oraz czarnej rzepy (tab. 21) w próbkach zawierających badane flawonoidy. Całkowicie odmienny wynik uzyskano dla mikroorganizmów zasiedlających topinambur (tab. 13), których gwałtowny rozwój zaobserwowano w pierwszych 24 godzinach na podłożu Sabouraud, a nie były one zdolne do wzrostu na bulionie odżywczym. W przypadku chrzanzu (tab. 14; N i XH), niedojrzałych truskawek (tab. 16; N i XH) i rzodkwi (tab. 20; N) zauważono wyraźny inhibujący wpływ naringeniny (N) i ksantohumolu (XH) na wzrost mikroorganizmów. W odniesieniu do truskawek, których wegetacja była kontrolowana, można stwierdzić, że prawdopodobną przyczyną braku rozwoju mikroorganizmów było bardzo niskie pH, wynoszące we wszystkich badanych próbkach około 3,3 (tab. 8), i obecność badanych związków. W tej sytuacji, w próbie ślepej stwierdzono powolny rozwój mikroorganizmów, których zawartość ustabilizowała się na poziomie około  $10^7$  jtk/ml, co było związane z dalszym spadkiem pH do wartości 3,0. Całkowity brak mikroorganizmów zanotowano w próbkach zawierających naringeninę oraz ksantohumol i w próbie ślepej czosnku (tab. 11), grejfruta (tab. 12), owocu pigwowca (tab. 15), kalarepy (tab. 18) oraz rabarbaru (tab. 19). Dwa najszybciej degradujące ksantohumol bioreagenty, pietruszkę i ziemniaka przebadano pod względem szybkości ich działania w pierwszych 10 godzinach. Wyniki, które przedstawiają wykresy na rysunku 21, potwierdzają uprzednio zaobserwowane szybkie zmniejszanie się zawartości ksantohumolu w badanych mieszaninach reakcyjnych.



Rys. 21. Degradacja ksantohumolu przy użyciu pietruszki (PXH) i ziemniaka (ZXH)  
 Fig. 21. Degradation of xanthohumol by parsley and potato

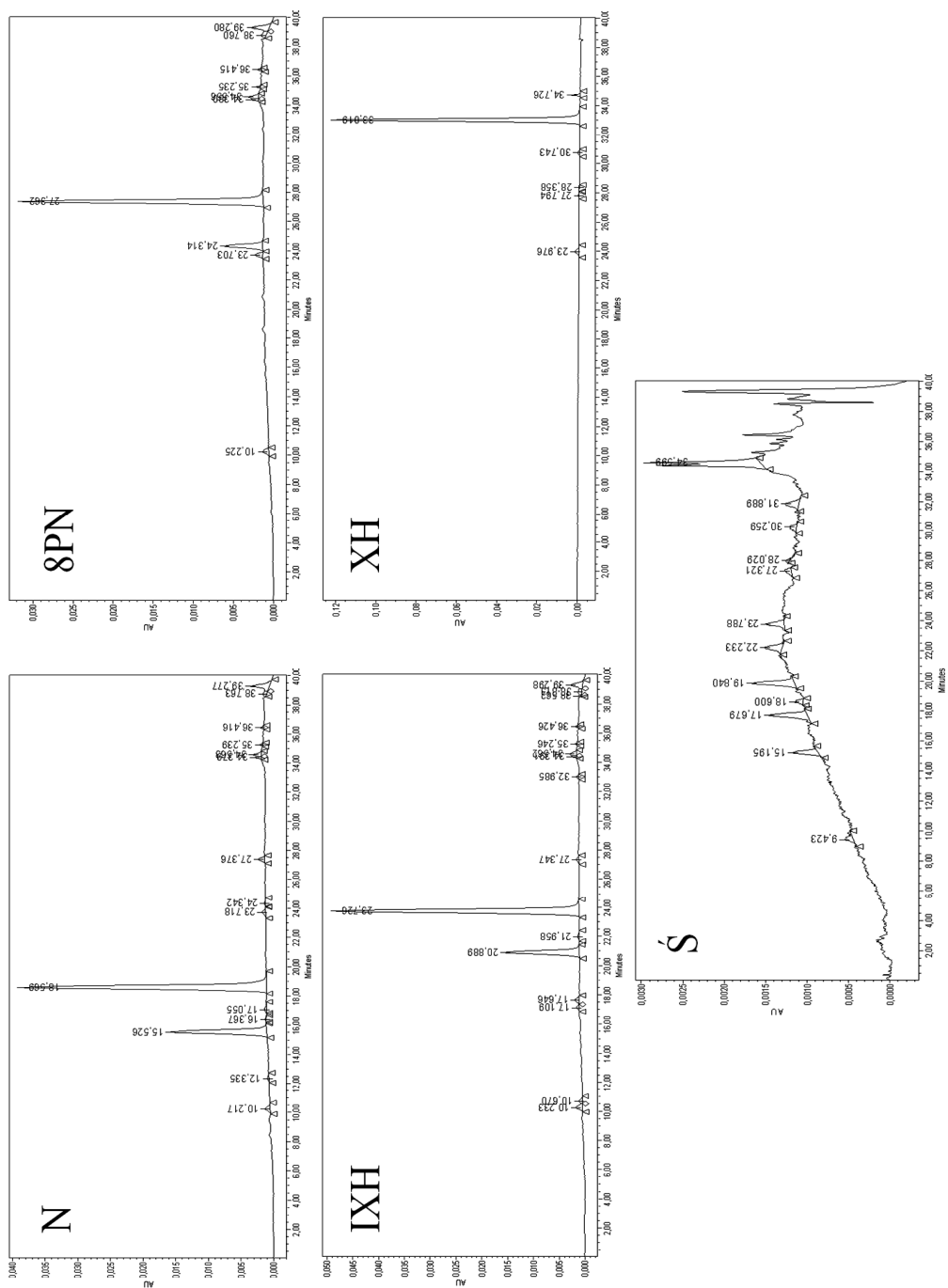
W przypadku buraka ćwikłowego zauważono produkty biotransformacji naringeniny (N), 8-prenylnaringeniny (8PN) i izoksantohumolu (IXH). Związki te w odróżnieniu od ksantohumolu (XH), przy którym nie stwierdzono tworzenia się produktów, cechuje obecność cyklicznego układu flawanonu. Rysunek 22 prezentuje chromatogramy HPLC otrzymane po 24 godzinach trwania biotransformacji (N, 8PN, IXH i próba ślepa (Ś) przy 290 nm a XH przy 360 nm). Na przedstawionych chromatogramach najwyższe piki to substraty. Produkty to drugie pod względem wysokości piki z lewej strony substratów. Obecność produktów transformacji powyższych flawonoidów potwierdzono także za pomocą chromatografii TLC. Dużą ilość mikroorganizmów, oznaczoną na podłożu sprzyjającym rozwojowi bakterii oraz drugim, dla grzybów, zanotowano dopiero w drugim dniu trwania procesu (tab. 17). Biorąc pod uwagę fakt, że produkty były obecne już po 24 h, założono, że za ich powstawanie był odpowiedzialny system enzymatyczny buraka ćwikłowego. Aby to potwierdzić, przeprowadzono doświadczenia, w których naringeninę, izoksantohumol i 8-prenylnaringeninę poddano transformacjom za pomocą drobnoustrojów wyhodowanych na płynnych podłożach do hodowli bakterii oraz do hodowli drożdży, bez dodatku agaru. Po 24 godzinach oznaczono ilość drobnoustrojów za pomocą komory Thoma. Ilości te wynosiły odpowiednio  $4 \times 10^9$  i  $3 \times 10^7$  jtk/ml. Następnie dodano substraty. Na podłożu dla bakterii obserwowano dalszy intensywny wzrost ilości mikroorganizmów, co stwierdzono poprzez pomiary zmętnienia przy długości fali 590 nm. W przypadku pożywki do hodowli drożdży niewielki wzrost zmętnienia w kolejnych dniach wykonano tylko w próbie ślepej, a w kolbach zawierających N, IXH i 8-PN nie zaobserwowano znaczących zmian, co może świadczyć o inhibicji wzrostu mikroorganizmów, wywołanej przez badane flawonoidy.

We wszystkich próbach ilości naringeniny, izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny zmalała nieznacznie w ciągu pierwszych 48 h oraz nie zauważono tworzenia się odpowiednich produktów. Wobec takich wyników doświadczeń należało wykluczyć udział mikroorganizmów w badanych przekształceniach flawonoidów.

Przeprowadzona biotransformacja preparatywna naringeniny dała podobne rezultaty co skringing, jednak podjęte próby wyizolowania trzech produktów za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym z użyciem eluentu będącego mieszaniną chloroformu i metanolu zakończyły się niepowodzeniem ze względu na rozkład związków. Dlatego podjęto próby znalezienia metody mającej na celu podniesienie wydajności zaobserwowanych biotransformacji. W dalszej części niniejszego opracowania zostanie to omówione na przykładzie naringeniny.

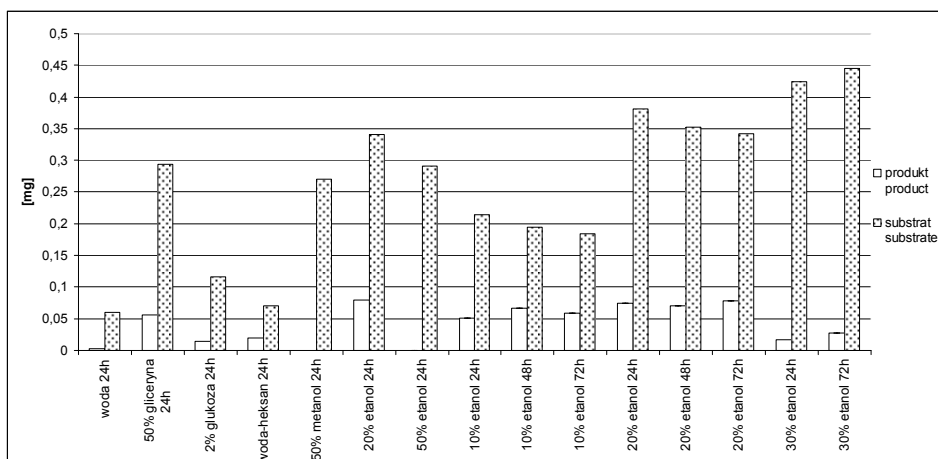
Początkowo optymalizację biotransformacji naringeniny za pomocą buraka ćwikłowego przeprowadzono, zmieniając medium reakcyjne z wodnego na 50-procentowy roztw. wodny gliceryny, 2-procentowy roztw. glukozy, mieszaninę dwufazową wodaheksan (30–10; (v/v)), 50-procentowy roztw. metanolu oraz 20 i 50-procentowy roztw. wodny etanolu. Skringing wykonano, w każdym przypadku używając 0,5 mg naringeniny i 2,5 g bioreagenta (rys. 23). Woda okazała się bardzo złym medium reakcyjnym, ponieważ po 24 h trwania procesu w mieszaninie reakcyjnej ilość produktu wynosiła tylko 0,6% w stosunku do początkowej ilości substratu, którego pozostało jedynie 12% (oznaczono za pomocą HPLC, stosując wzorce zewnętrzne). Wszystkie media reakcyjne zastosowane w miejsce wody powodowały zarówno wzrost ilości produktu, jak i mniejszą degradację substratu.





Rys. 22. Transformacja naringeniny (N), 8-prenylnaringeniny, izoksantohumolu (IXH) i ksantohumolu (XH) za pomocą buraka ćwikłowego. S– próba ślepa. Chromatogramy HPLC mieszanin reakcyjnych po 24 h

Fig. 22. Transformation of naringenin (N), 8-prenylnaringenin (8PN), isoxanthohumul (IXH) and xanthohumul (XH) by beetroot (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*). S– blanc probe. HPLC chromatograms of reaction mixtures after 24 h



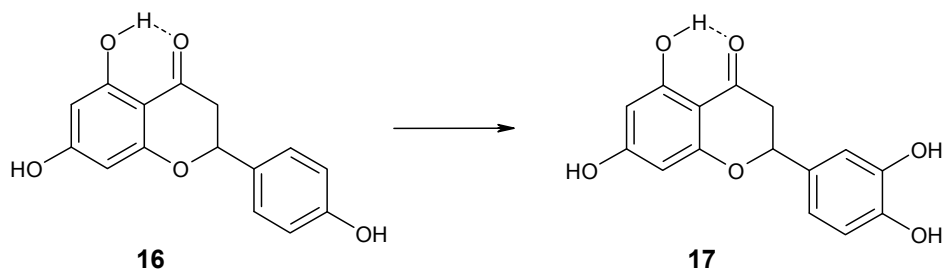
Rys. 23. Optymalizacja procesu biotransformacji naringeniny ( $m=0,5$  mg) za pomocą buraka ćwikłowego

Fig. 23. Optimization of naringenin ( $m=0,5$  mg) biotransformation process by beetroot (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*)

Najlepsze wyniki otrzymano dla roztw. gliceryny, odpowiednio 11- i 59-procent oraz 20-procentowego roztw. etanolu, odpowiednio 16 i 68%. Tak przeprowadzona optymalizacja pozwoliła na 25-krotne zwiększenie ilości produktu w stosunku do eksperymentów, w których użyto wody jako medium reakcyjnego. 50-procentowy metanol czy też 50-procentowy etanol powodowały zahamowanie tworzenia produktu, co wskazywało na całkowitą dezaktywację systemu enzymatycznego i było zgodne z oczekiwaniami, przy założeniu, że badany proces miał podłoże biochemiczne a nie chemiczne. Alkohole, w tak dużym stężeniu, zastosowano także w celu zmniejszenia ewentualnego wiązania reagentów przez biomasę. Na dalszym etapie optymalizacji użyto 10-, 20- i 30-procentowego roztworu etanolu i prowadzono biotransformacje przez 24, 48 i 72 godz. (rys. 23). Zastosowanie 10-procentowego roztw. powodowało niewielkie obniżenie zawartości produktu w mieszaninie poreakcyjnej i ponad dwukrotne zmniejszenie ilości substratu w stosunku do 20-procentowego roztworu etanolu. Biotransformacja była także możliwa w 30-procentowego etanolu, jednak wydajność produktu była około trzykrotnie mniejsza. We wszystkich powyższych przypadkach poddano analizie HPLC roztwory wodno-etanolowe pozostające po ekstrakcji próbek octanem etylu, aby stwierdzić, czy ekstrakcja była ilościowa i otrzymane wyniki w ekstrakcji octanem etylu nie są zafałszowane przez reagenty pozostające w fazie wodno-etanolowej. W fazach wodno-etanolowych nie stwierdzono znaczących ilości reagentów. Do przeprowadzenia biotransformacji preparatywnej wybrano 20-procentowy roztwór etanolu i 48-godzinny okres jej prowadzenia, ponieważ – jak wykazały badania – wydajność nie zmieniała się znacząco w zależności od czasu jej prowadzenia. Użyto w niej 50 mg naringeniny. Po 48 h przeprowadzona analiza klarownego roztworu z osadu bioreagenta wykazała powstanie 5,7 mg produktu (HPLC, 11% w stosunku do masy wyjściowej naringeniny). Produkt ulegał rozkładowi podczas oczyszczania na kolumnie chromatograficznej z użyciem żelu krzemionkowego Kieselgel 60, 230–400 mesh firmy Merck. Był jednak

stosunkowo trwały podczas wykonywania cienkowarstwowej chromatografii preparatywnej na płytkach pokrytych tym samym żelem, tej samej firmy. Tak różne działanie żelów krzemionkowych, mogło być spowodowane różnymi parametrami produkcyjnymi, zwłaszcza aktywowania żelu krzemionkowego, co ma udowodniony wpływ na zdolność silikażelu do rozkładu mniej stabilnych związków. Uzyskane wyniki były satysfakcjonujące, dlatego nie podjęto prób nad dezaktywacją silikażelu do chromatografii kolumnowej. Po standardowej przeróbce obejmującej ekstrakcję silikażelu metanolem, sączenie i rekrytalizację z acetonu otrzymano 3,4 mg produktu. Otrzymany związek charakteryzował się następującymi danymi spektroskopowymi:  $[\alpha]_D^{30} = +2,2$  ( $c = 1\%$ , MeOH). UV (nm): 231, 286.  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz, aceton- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : 2,61 (dd, 1H,  $J = 17,0$  Hz,  $J = 3,1$  Hz, CH-3), 3,01 (dd, 1H,  $J = 17,0$  Hz,  $J = 12,6$  Hz, CH-3), 5,26 (dd, 1H,  $J = 12,6$  Hz,  $J = 3,1$  Hz, CH-2), 5,82 (d, 1H,  $J = 2,0$  Hz, CH-6), 5,85 (d, 1H,  $J = 2,0$  Hz, CH-6), 6,76–6,79 (m, 2H, CH-5', CH-6'), 6,97 (d, 1H,  $J = 1,5$  Hz, CH-2').  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz, aceton- $d_6$ , ppm)  $\delta$ : d 42,8 (C-3), 78,9 (C-2), 96,4 (C-8), 97,2 (C-6), 100,7 (C-10), 114,1 (C-2'), 115,2 (C-5'), 117,7 (C-6'), 130,6 (C-1'), 145,9 (C-3'), 146,2 (C-4'), 163,8 (C-9), 164,5 (C-5), 172,0 (C-7), 194,6 (C-4). IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3370 (OH), 1640 (C=O).

Porównanie widm  $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$ , IR, UV z danymi literaturowymi [67] oraz porównanie czasów retencji otrzymanego związku i zakupionego wzorca wykazało, że system enzymatyczny buraka ćwikłowego spowodował hydroksylację naringeniny w pozycji 3' (rys. 24).



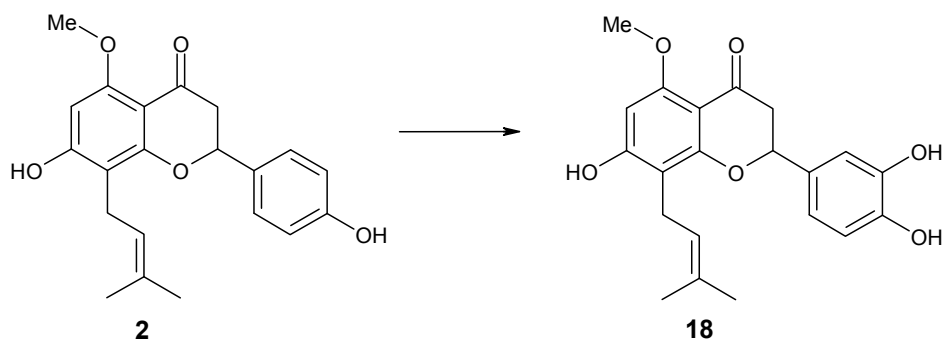
Rys. 24. Hydroksylacja naringeniny za pomocą buraka ćwikłowego  
 Fig. 24. Hydroxylation of naringenin by beetroot (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*)

Charakterystyczną zmianą na widmie  $^1\text{H NMR}$  w stosunku do wyjściowej naringeniny była obecność sygnałów pochodzących od 3 protonów aromatycznych, dających układ AA'B na widmie (6,76–6,79 ppm (2H, CH-5' i CH-6') i 6,97 ppm (1H, CH-2')), który tworzył się w miejsce układu AA'BB' ((7,39 ppm (2H, CH-5' i CH-6') i 6,90 ppm (2H, CH-2' i CH-3')) obecnego na widmie naringeniny.

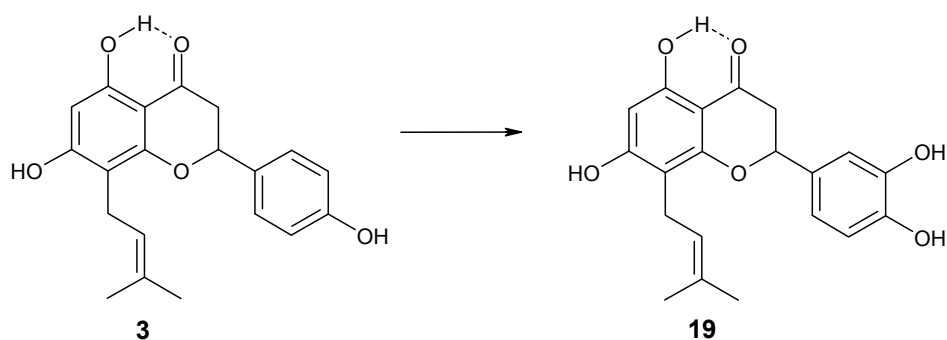
Podobna do powyższej strategia doprowadziła do odkrycia hydroksylacji izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny w pozycji 3' (rys. 25 i 26), którą powodował burak ćwikłowy. Dla wyizolowanych produktów obserwowano analogiczne do powyższej zmiany na widmach  $^1\text{H NMR}$  w stosunku do widm substratów.

Uzyskane wyniki, w tym wykluczenie udziału drobnoustrojów, pozwalają stwierdzić, że w przypadku biotransformacji naringeniny, izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny została wykorzystana jedna ze ścieżek biosyntezy flawonoidów w roślinach,

w której naringenina jest przekształcana w 3'-hydroksypochodną pod wpływem hydroksylazy F3'H, enzymu zawierającego cytochrom P-450 [64, 103]. Izolowany czysty enzym (fenolaza) z liści buraka został poprzednio wykorzystany do przekształcenia naringeniny w jej 3'-hydroksypochodną [129, 158]. W literaturze nie znaleziono doniesień na temat przekształceń izoksantohumolu i 8-prenylnaringeniny za pomocą roślin lub ich fragmentów, w tym buraka czerwonego, czy też enzymów z nich izolowanych. Brak jest także publikacji na temat wykorzystania rozdrobnionego korzenia buraka ćwikłowego do hydroksylacji naringeniny i zwiększenie wydajności procesu poprzez dodanie etanolu. Jak wykazały powyższe badania, zastosowanie biokatalizatorów roślinnych stwarza możliwość syntezy pochodnych flawonoidów o potencjalnym działaniu leczniczym. Zwłaszcza że zaobserwowano transformacje niektórych powyższych flawonoidów za pomocą pigwy, do innych produktów niż w przypadku buraka ćwikłowego. Biorąc pod uwagę to, że spośród 14 bioreagentów tylko dwa były w stanie biotransformować substraty, droga do odkrycia aktywnych bioreagentów roślinnych nie jest łatwa, lecz stwarza możliwość prowadzenia innych typów funkcjonalizacji flawonoidów niż w przypadku powszechnie stosowanych do tego celu drobnoustrojów.



Rys. 25. Hydroksylacja izoksantohumolu za pomocą buraka ćwikłowego  
 Fig. 25. Hydroxylation of isoxanthohumol by beetroot (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*)

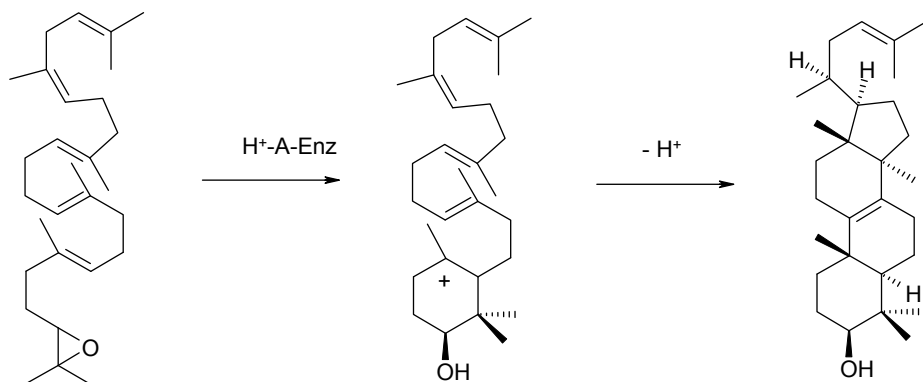


Rys. 26. Hydroksylacja 8-prenylnaringeniny za pomocą buraka ćwikłowego  
 Fig. 26. Hydroxylation of 8-prenylnaringenin by beetroot (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*)

## 2.8. Transformacje 6,7-epoksygeraniolu przez mikroorganizmy

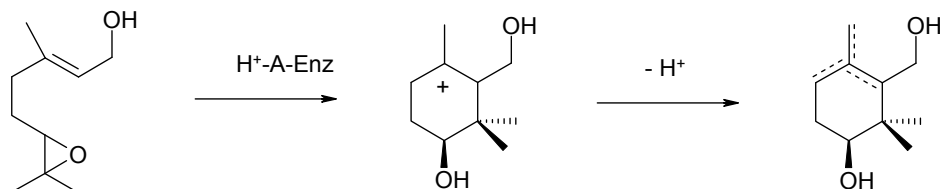
Cyklizacja 2,3-epoksykwalenu do lanosterolu jest jedną z najważniejszych reakcji w biosyntezie steroidów. Polega ona na protonowaniu przez enzym oksiranowego atomu tlenu, co uruchamia kaskadę tworzenia pierścieni. Najpierw zostaje zamknięty pierścień A, tworząc trzeciorzędowy karbokation (rys. 27). W rezultacie doprowadza to do policyklicznego triterpenu, lanosterolu [73].

W opisanych w tym rozdziale badaniach własnych użyto geraniolu (**20**), jednego ze składników frakcji lotnej chmielu, który jest obecny w wychmielinach. Został on przekształcony na drodze chemicznej w 6,7-epoksygeraniol, który poddano biotransformacji za pomocą wybranych grzybów. Podobnym przekształceniem został poddany również nerol (**21**). Wprowadzenie ugrupowania oxiranowego do powyższych związków miało na celu ich upodobnienie do 2,3-epoksykwalenu, związku będącego substratem lanosterolocyklazy oksydoskwalenowej, która jest także obecna w mikroorganizmach.



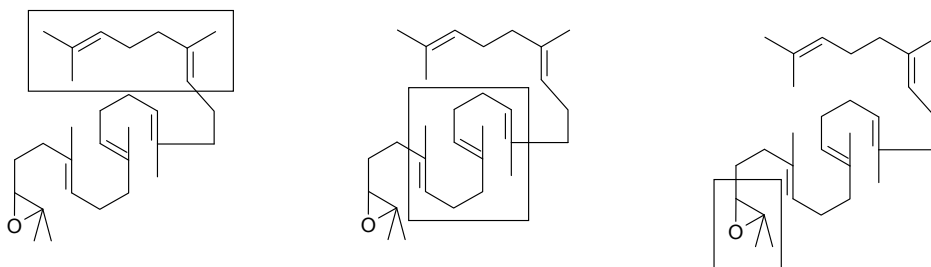
Rys. 27. Cyklizacja 2,3-epoksykwalenu poprzez przejściowy karbokation  
Fig. 27. 2,3-Epoxysqualene cyclisation to lanosterol via intermediate carbocation

Celem podjętych badań było znalezienie mikroorganizmów zdolnych do analogicznej cyklizacji krótszych terpenów, takich jak geraniol i nerol. Rysunek 28 przedstawia planowany przebieg biosyntezy, przy założeniu, że reakcja będzie zachodziła podobnie jak cyklizacja 2,3-epoksykwalenu (rys. 27). Analogiczną chemiczną reakcją cyklizacji, katalizowaną kwasami (octowym i chlorooctowym), obserwowano w przypadku 5,6-epoksy-2,6-dimetylo-1-heptanu [39].



Rys. 28. Spodziewany przebieg reakcji  
Fig. 28. Expected course of reaction of cyclisation of 6,7-epoxygeraniol

Planowane badania wpisują się w bardzo obszerny blok syntezy strukturalnych analogów skwalenu i jego epoksydu, który opisuje dostępna literatura. Syntezowane pochodne zawierały w swojej budowie heteroatomy zamiast atomów węgla [173] oraz zawierały inne grupy funkcyjne [38, 70, 130]. Modyfikacje obejmowały także syntezę analogów pewnego fragmentu szkieletu 2,3-epoksykskalenu, jak to pokazano na rysunku 29. W zależności od budowy substratu stwierdzono cyklizację, brak reakcji lub inhibicję enzymu [1, 164].



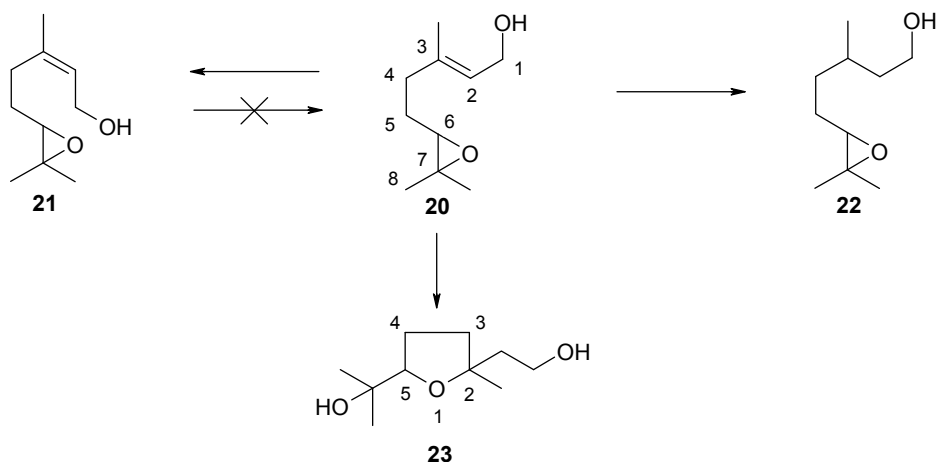
Rys. 29. Modyfikacje strukturalne 2,3-epoksykskalenu  
Fig. 29. structural modifications of 2,3-epoxysqualene

6,7-epoksygeraniol (**20**) i 6,7-epoksynerol (**21**) otrzymano z geraniolu i nerolu wg metody opisanej poprzednio [173], w której poddano je acylowaniu za pomocą chlorku acetylu w pirydynie, co prowadziło do octanów odpowiednich alkoholi. Następnie otrzymane alkohole poddano epoksydacji kwasem *meta*-chloronadbenzoesowym wobec octanu sodu w chlorku metylenu. Zasadowa hydroliza ( $K_2CO_3$  w metanolu) tak otrzymanych epoksyoctanów geraniolu i nerolu prowadziła do związków (**20** i **21**).

Drobnoustroje użyte do biotransformacji pochodziły z kolekcji Instytutu Biologii i Botaniki Akademii Medycznej we Wrocławiu (*Rhodotorula marina* AM77, *Rhodotorula glutinis* AM242, *Saccharomyces cerevisiae* AM464, *Botrytis cinerea* AM235), z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (*Yarrowia lipolytica* AR71) oraz NCAIM (*Candida parapsilosis* Y.01011, *Candida kefyr* Y.01070).

Grzyby hodowano w pożywce Sabourauda metodą wglębną, wstrząsaną. Zawierała ona 30 g glukozy i 10 g peptonu w 1 l wody destylowanej. Kolby z hodowlą wytrząsano w temperaturze 27°C w kolbach Erlenmayera (300 ml) zawierających 50 ml powyższego medium przez okres 2–5 dni. Otrzymaną biomasę izolowano poprzez odwirowanie i użyto do przeprowadzenia biotransformacji. Sucha masa tak otrzymanych komórek *Botrytis cinerea* wynosiła 22 g/l a pozostałych sześciu mikroorganizmów 5–8 g/l. Podczas prowadzenia skringingu użyto po 10 mg odpowiedniego substratu, który biotransformowano w czasie do 7 dni w wytrząsanych kolbach Erlenmayera (300 ml) zawierających odwirowaną biomasę komórek drobnoustrojów, zawieszoną w 50 ml buforu fosforanowego o pH = 7,2. Próbkę pobraną do analizy ekstrahowano dwukrotnie za pomocą chloroformu, suszono, zatężano i poddano analizie GC oraz GC/EIMS. Równocześnie przeprowadzono eksperymenty kontrolne, w których substraty były inkubowane bez dodatku biomasy grzybów. Biotransformacje preparatywne wykonano w analogiczny sposób, używając 100 mg 6,7-epoksygeraniolu.

Przeprowadzony skrining wykazał, że 7 szczepów grzybów było w stanie transformować 6,7-epoksygeraniol (**20**). Nie stwierdzono obecności produktów w przypadku analogicznych doświadczeń przeprowadzonych z użyciem 6,7-epoksynerolu (**21**). Zaobserwowano jedynie powolne zmniejszanie się jego zawartości w mieszaninie reakcyjnej wraz z upływem czasu. Powyższa obserwacja świadczy o tym, że obecność podwójnego wiązania pomiędzy 2 i 3 atomem węgla o konfiguracji *Z* jest konieczna, aby przebadane mikroorganizmy mogły biotransformować substrat. Przeprowadzone doświadczenia z użyciem 6,7-epoksygeraniolu (**20**) jako substratu pozwoliły wyizolować z mieszanin pobiotransformacyjnych 6,7-epoksynerol (**21**, produkt izomeryzacji *cis-trans* podwójnego wiązania geraniolu), 6,7-epoksy citronellol (**22**, produkt redukcji podwójnego wiązania) oraz 2-metylo-2-(2-hydroksyetylo)-5-(2-hydroksyprop-2-yl)tetrahydrofuran (**23**, produkt cyklizacji) (rys. 30).



Rys. 30. Substraty (związki **20** i **21**) i produkty (związki **21**–**23**) biotransformacji  
Fig. 30. Biotransformations substrates (compounds **20** and **21**) and products (compounds **21**–**23**)

6,7-Epoksynerol (**21**) został wyizolowany po biotransformacji 6,7-epoksygeraniolu za pomocą *Rhodotorula marina*. Wstępnie zidentyfikowano go, stosując analizę GC/EIMS, a następnie dodatkowo poprzez porównanie widm  $^1\text{H}$  NMR i IR z widmami tego związku, który otrzymano na drodze chemicznej.

6,7-Epoksy citronellol (**22**) otrzymano jako bezbarwny olej w biotransformacji, w której użyto *Saccharomyces cerevisiae*. Charakteryzował się danymi spektroskopowymi zgodnymi z tymi, które są ogólnie dostępne w literaturze.

2-Metylo-2-(2-hydroksyetylo)-5-(2-hydroksyprop-2-yl)tetrahydrofuran (**23**) otrzymano w biotransformacji za pomocą *Saccharomyces cerevisiae* jako bezbarwny olej, będący mieszaniną dwóch diastereoizomerów w stosunku wagowym 74:26, co zostało oznaczone na podstawie analizy GC. Różnica w zawartości została wykorzystana w przypisaniu sygnałów do odpowiednich atomów w analizie  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR. IR: 3388 (sb), 2972 (s), 2923 (s), 2869 (s), 1372 (s), 1170 (m), 1121 (m), 1055 (s), 1034 (s).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz; poniższe przypisanie sygnałów zostało dodatkowo po-

twierdzone widmami  $^1\text{H}-^1\text{H}$  i  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  COSY). Diastereoizomer 1 (74%),  $\delta$  (ppm): 1,129 i 1,217 (2s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2(\text{OH})\text{C}-$ ), 1,284 (1s, 3H,  $\text{CH}_3-2$ ), 1,721–1,974 (m, 6H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , H-3, H-4), 2,584 (1s, 2H, 2x  $-\text{OH}$ ), 3,746–3,778 and 3,871–3,918 (2m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3,809–3,838 (m, 1H, H-5). Diastereoizomer 2 (26%),  $\delta$  (ppm): 1,123 i 1,236 (2s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2(\text{OH})\text{C}-$ ), 1,277 (1s, 3H,  $\text{CH}_3-2$ ), 1,721–1,974 (m, 6H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , H-3, H-4), 2,584 (1s, 2H, 2x  $-\text{OH}$ ), 3,746–3,778 i 3,871–3,918 (2m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3,809–3,838 (m, 1H, H-5).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ; DEPT 135°: P- sygnał dodatni, N- sygnał ujemny, 0- brak sygnału). Diastereoizomer 1 (74%),  $\delta$  (ppm): 24,38 i 27,67 ( $(\text{CH}_3)_2(\text{OH})\text{C}-$ , P), 26,35 ( $\text{CH}_3-2$ , P), 25,79 (C-4, N), 38,55 (C-3, N), 41,70 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , N), 59,83 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , N), 70,36 ( $(\text{CH}_3)_2(\text{OH})\text{C}-$ , 0), 84,41 (C-2, 0), 86,30 (C-5, P). Diastereoizomer 2 (26%),  $\delta$  (ppm): 25,00 i 27,68 ( $(\text{CH}_3)_2(\text{OH})\text{C}-$ , P), 25,50 ( $\text{CH}_3-2$ , P), 25,96 (C-4, N), 38,15 (C-3, N), 41,96 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , N), 59,76 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , N), 70,89 ( $(\text{CH}_3)_2(\text{OH})\text{C}-$ , 0), 83,87 (C-2, 0), 85,64 (C-5, P). GC-EIMS. Diastereoizomer 1 (74%),  $m/z$  (intensywność %): 189(2, M+1), 171(14), 155(17), 153(5), 143(26), 137(12), 129(31), 125(20), 111(27), 107(13), 99(14), 97(10), 93(70), 85(100), 84(30), 83(25), 81(89), 71(28), 69(50), 67(33), 59(98), 55(57), 43(99). Diastereoizomer 2 (26%),  $m/z$  (intensywność %): 189(3, M+1), 171(12), 155(18), 153(3), 143(8), 137(11), 129(15), 125(11), 111(16), 107(7), 99(9), 97(10), 93(42), 85(61), 84(25), 83(24), 81(57), 71(18), 69(47), 67(29), 59(100), 55(44), 43(74). Analiza spalenkowa  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3$ . Obliczono: C- 63,80; H- 10,71. Znaleziono: C- 63,93; H- 10,70 [8].

Otrzymane wyniki analizy składu mieszanin po biotransformacjach są przedstawione w tabeli 22. W większości przypadków obserwowano tworzenie się skomplikowanych mieszanin związków, z których wyizolowano i oznaczono trzy główne produkty (**21–23**). Biotransformacje były monitorowane w czasie ich trwania za pomocą chromatografii gazowej (analiza ilościowa i jakościowa) i GC/MS (analiza jakościowa), stosując zakupione wzorce badanych substancji. Przeprowadzono również eksperymenty kontrolne, w których nie stwierdzono jakichkolwiek produktów przekształceń epoksydów geraniolu i nerolu podczas inkubowania ich bez dodatku mikroorganizmów.

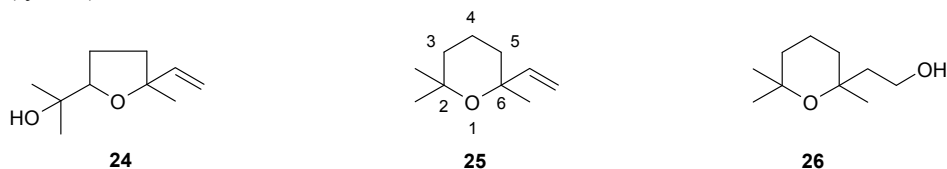
W przypadku *Rhodotorula marina* i *Rhodotorula glutinis* obserwowano izomeryzację 6,7-epoksygeraniolu (**20**) do 6,7-epoksynerolu (**21**) i w mieszaninach poreakcyjnych identyfikowano obydwie te związki. Reakcja miała podobny przebieg, jak w często obserwowanej w grzybach izomeryzacji geraniolu do nerolu [100]. 6,7-epoksycytronellol (**22**), produkt niestereospecyficznej redukcji wiązania podwójnego, w ilości około 30%, zauważono w przypadku biotransformacji prowadzonej za pomocą *Candida parapsilosis*, *Candida kefir* oraz *Saccharomyces cerevisiae*. Związek cykliczny (**23**), po raz pierwszy opisany w niniejszej publikacji jako produkt biotransformacji, tworzył się pod postacią dwóch diastereoizomerów w biotransformacjach za pomocą *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Botrytis cinerea* i *Yarrowia lipolytica* w ilości 11–99%.



Skład mieszaniny po biotransformacji 6,7-epoksygeraniolu (**20**) [8]  
Composition of the biotransformation product mixture of 6,7-epoxygeraniol (**20**)

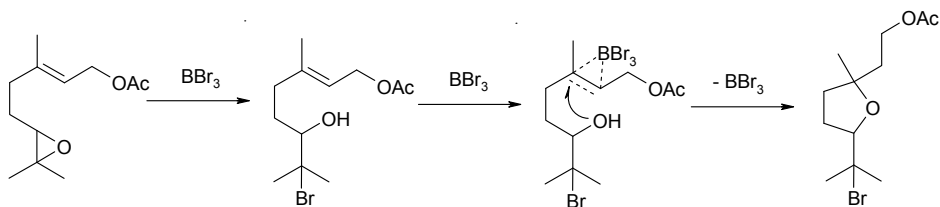
Drobnoustroje Microorganism	Czas transformacji [h] Transformation time	Związek [%, według GC] Compound [%, according to GC]			
		<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>
<i>Rhodotorula marina</i>	120	30	48	0	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72	41	36	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	48	17	28	31	11
<i>Candida kefir</i>	72	26	5	30	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72	0	6	33	61
<i>Yarrowia lipolytica</i>	120	0	0	0	99
<i>Botrytis cinerea</i>	168	0	0	0	85

W literaturze nie znaleziono informacji na temat danych spektroskopowych powyższego związku, dlatego obecność pięcioczłonowego pierścienia tetrahydrofuranu potwierdzono za pomocą spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR. Przesunięcie chemiczne protonów 3-H i 4-H ( $\delta = 1,721\text{--}1,974$  ppm) w związku (**23**) było podobne do przesunięcia chemicznego protonów w analogicznym związku (**24**), które wynosiło 1,70–1,95 [2]. Inna możliwa struktura (**25**) była trudna do przyjęcia, ponieważ przesunięcie chemiczne protonów 4-H i 5-H powinno być podobne do poprzednio zaobserwowanych w **26** ( $\delta = 1,50\text{--}2,10$ ) (rys. 31).

Rys. 31. Struktury dodatkowe  
Fig. 31. Additional structures

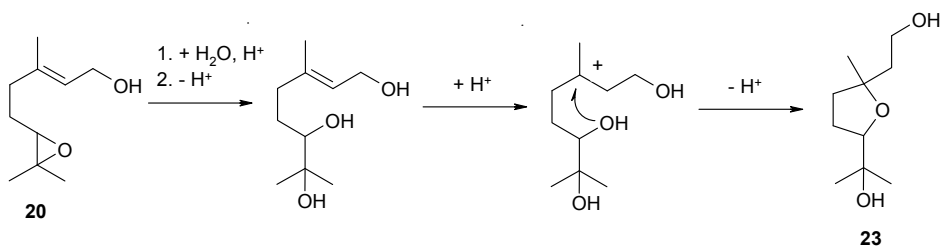
Za prawidłowością przyjętej struktury otrzymanego związku przemawiał również fakt, że przesunięcie chemiczne protonów 3-H w tetrahydrofuranie ( $\delta = 1,75$ ) jest większe niż przesunięcie chemiczne protonów 3-H i 4-H w tetrahydropiranie ( $\delta = \sim 1,6$ ). Wykonane widmo  $^{13}\text{C}$  NMR i jego odmiana DEPT 135° potwierdziły obecność odpowiednich atomów węgla wchodzących w skład grup metylowych i metinowych (P – sygnał dodatni na widmie- w powyższym opisie widma NMR), metylenowych (N – sygnał ujemny) i czwartorzędowych atomów węgla (0 – brak sygnału na widmie DEPT-135, sygnał obecny na „zwykłym” widmie  $^{13}\text{C}$  NMR).

Na rysunku 32 przedstawiono reakcje, jakim ulega octan 6,7-epoksygeraniolu pod wpływem kwasu Lewisa, jakim jest  $\text{BBr}_3$  [17]. Jako związek przejściowy tworzyła się bromohydryna, która pod wpływem nadmiaru  $\text{BBr}_3$  ulegała cyklizacji.



Rys. 32. Mechanizm cyklizacji octanu 6,7-epoksygeraniolu  
Fig. 32. Cyclization mechanism of 6,7-epoxygeranyl acetate

Analogiczny mechanizm można zaproponować w przypadku reakcji tworzenia się produktu (**23**). W pierwszym kroku substrat ulega katalizowanej jonami  $\text{H}^+$  reakcji hydrolizy pierścienia oksiranowego do diolu (rys. 33). Jony  $\text{H}^+$  mogą pochodzić z centrum protonującego enzymu. Przyłączenie kationu wodorowego do podwójnego wiązania prowadzi do powstania stabilnego trzeciorzędowego karbokationu. Jest wtedy możliwy atak nukleofilowy atomu tlenu grupy hydroksylowej na elektrofilowy atom węgla i następujące po nim oddysocjowanie jonu  $\text{H}^+$ . Wynikiem tego jest zamknięcie pierścienia pięciocłonowego, co prowadzi do produktu (**23**).



Rys. 33. Proponowany mechanizm cyklizacji 6,7-epoksygeraniolu  
Fig. 33. Proposed cyclization reaction mechanism of 6,7-epoxygeraniol

Powyższe wyniki zostały między innymi opisane w publikacji pt. "Biotransformation of 6,7-epoxygeraniol by fungi" [8].

### 3. PODSUMOWANIE

Zastosowanie aparatu Derynga i analizy GC do oznaczania zawartości śladowych ilości terpenów (1–200 µg/g) w pozostałości po ekstrakcji szyszek chmielowych nadkrytycznym dwutlenkiem węgla (wychmielin) pozwala na analizę próbek o małej masie, rzędu 0,5 g, dając wyniki o dobrej powtarzalności. Całkiem nieefektywne są prosta destylacja z parą wodną, ekstrakcja rozpuszczalnikami czy też zastosowanie zminiaturyzowanego aparatu Kuderna-Danish'a. Nie obserwuje się tworzenia β-myrcenu, limonenu, linalolu, geraniolu, 2-undekanonu, β-kariofilenu i α-humulenu w wyniku hydrolizy ich glikozydów. Opracowana metoda, ze względu na prostotę i powtarzalność wyników, może stać się standardową w badaniu śladowych ilości terpenów w wychmielinach.

Użycie izooktanu w miejsce stosowanego do tego celu eteru etylowego w metodzie EBC 7.7 daje podobne, nieznacznie zaniżone wyniki i ułatwia analizę śladowych ilości gorzkich kwasów w wychmielinach.

Ekstrakcja wychmielin za pomocą rozpuszczalników, takich jak metanol, etanol, aceton, octan etylu, alkohol *n*-propylowy, alkohol izopropylowy, mieszaniny etanolu z pentanem, heksanem i heptanem umożliwia usunięcie gorzkich kwasów z wychmielin, jednak etanol i metanol powodują znaczne straty suchej masy i białka w osadzie poekstrakcyjnym. Heksan jest całkowicie nieefektywny pod tym względem w temperaturze pokojowej.

Najlepszym ekstrahentem gorzkich kwasów z wychmielin jest aceton, który pozwala na ich usunięcie w stopniu porównywalnym do etanolu i metanolu, najlepszymi ekstrahentami tych substancji. Zapewnia jednocześnie małe straty białka ogólnego i właściwego, niewielkie straty suchej masy i efektywną ekstrakcję ksantohumolu, co znacznie podnosiłoby opłacalność przerobu wychmielin. Przeprowadzone badania mogą znaleźć zastosowanie praktyczne w otrzymaniu wartościowego dodatku paszowego, którego źródłem byłyby wychmieliny.

Działanie przegrzanej pary wodnej o temperaturze 121°C na wychmieliny powoduje szybką i wydajną izomeryzację humulonów do izohumulonów. Może to świadczyć o tym, że pozostające kwasy chmielowe po ekstrakcji szyszek chmielowych za pomocą nadkrytycznego dwutlenku węgla występują tam pod postacią kompleksów w białkami i/lub metalami. W przypadku zastosowania szyszek chmielowych z lupuliną proces ten zachodzi w niewielkim stopniu, a zmniejszenie zawartości gorzkich kwasów jest związane z ich rozkładem.

Preparaty enzymatyczne pochodzenia roślinnego, otrzymane z owoców grejpfruta, pomarańczy, jabłka oraz chrzanu, marchwi, buraka cukrowego i pietruszki wykazują zdolność do znaczącego rozkładu kwasów chmielowych. Wyniki tych badań wskazują, że tak otrzymane, zmodyfikowane wychmieliny mogłyby być źródłem wartościowego dodatku paszowego.

Badania nad poszukiwaniem odpowiedniego ekstrahenta ksantohumolu z wychmielin wykazały, że najbardziej efektywnymi i selektywnymi rozpuszczalnikami do ekstrakcji ksantohumolu są eter dietylowy i aceton, co może znaleźć zastosowanie praktyczne i znacznie poprawić opłacalność ekonomiczną przerabiania wychmielin w paszę.

Eterat jodku magnezu jest odczynnikiem, który dobrze demetyluje izoksantohumol do 8-prenylonaringeniny z wysoką 93-procentową wydajnością. Możliwa jest też demetylacja za pomocą eteratów  $MgBr_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $CaI_2$ , jednak uzyskane wydajności są znacznie niższe. Eterat  $MgI_2$  również efektywnie demetyluje 7-*O*- i 4'-*O*-pochodne alkilowe, allilowe i acylowe izoksantohumolu. Opracowana nowa, tania i łatwa do przeprowadzenia metoda dostarcza związków o potencjalnym działaniu farmakologicznym i pozwala na jak najlepsze wykorzystanie wychmielin.

Rozdrobniony korzeń buraka ćwikłowego powoduje hydroksylację naringeniny, izoksantohumolu i 8-prenylonaringeniny w pozycji 3', czemu sprzyja obecność alkoholu etylowego w ilości do 30% lub obecność gliceryny.

Przeprowadzone bioransformacje 6,7-epoksygeraniolu za pomocą wyselekcjonowanych mikroorganizmów prowadziły do cyklicznych pochodnych tetrahydrofuranu oraz produktów redukcji i izomeryzacji wiązania podwójnego pomiędzy 2. i 3. atomem węgla. Proponowany mechanizm cyklizacji zakłada rozerwanie pierścienia oksiranowego z utworzeniem 6,7-diolu. Następnym krokiem jest prawdopodobnie utworzenie trzeciorzędowego karbokationu z ładunkiem dodatnim na trzecim atomie węgla. Atak nukleofilowy atomu tlenu grupy hydroksylowej (C-6-OH) na ten elektrofilowy atom węgla powoduje zamknięcie pierścienia z utworzeniem pochodnej tetrahydrofuranu.

## 4. PIŚMIENICTWO

- [1] Abe I., Rohmer M., Prestwich G.D.: 1993. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem. Rev.*, 93, 2189–2206.
- [2] Abraham W.R., Stumpf B., Arfmann H.A.: 1990. Chiral intermediates by microbial epoxidations. *J. Essential Oil Res.*, 2, 251–257.
- [3] Albin A., Dell E.R., Vene R., Ferrari N., Buhler D.R., Noonan D.M., Fassina G.: 2006. Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol. *FASEB J.*, 20, 527–529.
- [4] Alvarez Arias B.T.: 2000. Ichtiotoxic plants used in Spain. *J. Ethnopharmacol.*, 73, 505–512.
- [5] Analytica-EBC: 1998.  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids in hops and hop products by HPLC. Section 7. Hops, Method 7.7. Fachverlag Hans Carl, Nurnberg.
- [6] Andrade L.H., Utsunomija R.S., Omori A.T., Porto A.L., Comasseto J.V.: 2006. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. *J. Mol. Cat. B-Enzym.*, 38, 84–90.
- [7] Anioł M., Bartmańska A., Huszcza E., Mączka W., Żołnierczyk A.: 2009. Degradacja gorzkich kwasów chmielowych przez enzymy pochodzenia roślinnego. *Przemysł Chemiczny*, 5, 392–395.
- [8] Anioł M., Huszcza E.: 2005. Biotransformation of 6,7-epoxygeraniol by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 311–315.
- [9] Anioł M., Huszcza E., Bartmańska A., Żołnierczyk A., Mączka W., Wawrzeńczyk C.: 2007. Trace analysis of volatiles in spent hop. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 65, 214–218.
- [10] Anioł M., Jarosz A., Żołnierczyk A.: 2008. Influence of the kind of extractant on the protein content in the spent hop. *Chemistry for Agriculture*, 8, 348–355.
- [11] Anioł M., Szymańska K., Żołnierczyk A.: 2008. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from isoxanthohumol with magnesium iodide etherate. *Tetrahedron*, 64, 9544–9547.
- [12] Anioł M., Żołnierczyk A.: 2008. Extraction of spent hop using organic solvents. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 66, 208–214.
- [13] Aoshima H., Takeda K., Okita Y., Hossain S.J. Koda H., Kiso Y.: 2006. Effects of beer and hop on ionotropic aminobutyric acid receptors. *J. Agr. Food Chem.*, 54, 2514–2519.
- [14] Arend J., Warzecha H., Stöckigt J.: 2000. Hydroquinone: O-glucosyltransferase from cultivated *Rauvolfia* cells: enrichment and partial amino acid sequences. *Phytochemistry*, 53, 187–193.
- [15] Augustijns P., Annaert P., Heylen P., Van den Mooter G., Kinget R.: 1998. Drug absorption studies of prodrug esters using the Caco-2 model: evaluation of ester hydrolysis and transepithelial transport. *Int. J. Pharm.*, 166, 45–53.
- [16] Augusto F., Leite e Lopes A., Alcaraz Zini C.: 2003. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Trends Anal. Chem.*, 22, 160–169.
- [17] Barrero A.F., Alvarez-Manzaneda E.J., Palomino P.L.: 1994. Synthesis of ( $\pm$ )-karahana ether and karahanaenone by selective cyclization of 6,7-epoxygeranyl acetate. *Tetrahedron*, 46, 13239–13250.

- [18] Bartoli G., Cupone G., Dalpozzo R., De Nino A., Maiuolo L., Marcantoni E., Procopio A.: 2001. Cerium-Mediated Deprotection of Substituted Allyl Ethers. *Synlett.*, 1897–1900;
- [19] Batchvarov V., Marinkova G.: 2001. Healthy ingredients in malt, hops and beer. *Khranitel'novkusova-Promishlenost*, 50, 7–8.
- [20] Bath D., Dunbar J., King J., Beny S., Obrich S.: 1995. By products and unusual feeds. *Feedstuffs*, 67, 30.
- [21] Beisson F., Aoubala M., Marull S., Moustacas-Gardies A.M., Voultoiry R., Verger R., Arondel V.: 2001. *Anal. Biochem.*, 290, 179–185.
- [22] Biendl M., Becker H., Nookandeh A.: 2004. Process for producing xanthohumol present in hops and xanthohumol-rich hop extract obtainable thereby. US Patent 6867332.
- [23] Blažević I., Mastelic J.: 2009. Glucosinolate degradation products and other bound and free volatiles in the leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.). *Food Chem.*, 113, 96–102.
- [24] Brodak E., Dobrzański Z.: 1997. *Ekotoksykologiczne problemy chowu zwierząt w rejonach skażeń metalami ciężkimi*, Wyd. Elma, Wrocław.
- [25] Brunelli E., Minassi A., Appendino G., Moro L.: 2007. 8-Prenylaringenin, inhibits estrogen receptor- $\alpha$  mediated cell growth and induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 107, 140–148.
- [26] Brunelli E., Pinton G., Chianale F., Graziani A., Appendino G., Moro L.: 2009. 8-Prenylaringenin inhibits epidermal growth factor-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation by targeting phosphatidylinositol-3-OH kinase activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 113, 163–170.
- [27] 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., Russell J., Hartman T., Ptak R.: 2004. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. *Antivir. Res.*, 61, 576–62.
- [28] Cai J., Liu B., Ling P., Su Q.: 2002. Analysis of free and bound hop essential oils by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in uncased and cased tobaccos. *J. Chromatogr. A*, 947, 267–275.
- [29] Cai J., Liu B., Su Q.: 2001. Comparison of simultaneous distillation extraction and solid-phase microextraction for the determination of volatile flavor components. *J. Chromatogr. A*, 930, 1–7.
- [30] Cano A., Espinoza M., Ramos C.H., Delgado G.: 2006. New prenylated flavanones from *Esenbeckia berlandieri* ssp. *Acapulcensis*. *J. Mexican Chem. Soc.*, 50, 71–75.
- [31] Carasek da Rocha E.C., Falleiros Pini G., Pires Valente F.A., Pires Valente, A.L.: 1998. Modification of glass micro-extractor aiming to enrichment of traces of water contaminating organochlorinated pesticides and their quantitative gas chromatographic analysis. *Quim. Nova*, 21, 109–113.
- [32] Ceh B., Kac M., Kosir I. J., Abram V.: 2007. Relationships between Xanthohumol and Polyphenols Content in Hop Leaves and Hop Cones with Regard to Water Supply and Cultivator. *Int. J. Mol. Sci.*, 8, 989–1000.
- [33] 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.
- [34] Chojnacka K., Górecki H., Chojnacki A., Hoffmann J., Dobrzański Z., Górecka H.: 2004. Potential possibilities of utilization of spent hops after supercritical extraction with karbon dioxide. *Chemistry for Agriculture*, 5, 553–557.
- [35] Clemente E.: 1998. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, 49, 29–36.

- [36] Colgate E.C., Miranda C.L., Stevens J.F., Bray T.M., Ho E.: 2007. Xanthohumol, a prenyl-flavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett.*, 246, 201–209.
- [37] Cook N.C., Samman S.: 1996. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, 7, 66–76.
- [38] Corey E.J., Cheng H., Baker C.H., Matsuda S.P.T., Li D., Song X.: 1997. Studies on the substrate binding segments and catalytic action of lanosterol synthase. Affinity labeling with carbocations derived from mechanism-based analog of 2,3-oxidosqualene and site-direct mutagenesis probes. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 1289–1296.
- [39] Corey E.J., Staas D.: 1998. Demonstration of a common mechanistic pathway for the acid-catalyzed cyclization of 5,6-unsaturated oxiranes in chemical and enzymatic systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 3526–3527.
- [40] Council Directive 1999/29/EC on the undesirable substances and product in animal nutrition, *Official Journal of the European Communities* 1999, 115.
- [41] Daoued I.S., Kusiński S.: 1993. Liquid CO<sub>2</sub> and ethanol extraction of hops. *J. I. Brewig*, 99, 147–152.
- [42] Darbre P.D.: 2006. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer *Endocrinol. Metab Clin.*, 20, 121–143.
- [43] Day A., duPont M.S., Ridley S.: 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver glucuronidase activity. *FEBS Lett.*, 436, 71–75.
- [44] Effenberger K.E., Johnsen S.A., Monroe D.G., Spelsberg T.C., Westendorf J.J.: 2005. Regulation of osteoblastic phenotype and gene expression by hop- derived phytoestrogens, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 96, 387–399.
- [45] Erdelmeier C., Koch E.: 2005. Extracts from hop, methods for producing the same and their use. US Patent Application 20050042318.
- [46] 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.
- [47] Faltermeier A., Massinger S., Schulmeyr J.: 2006. Preparing xanthohumol-containing powder with high purity, useful as food additive, comprises preparing xanthohumol-enriched hop extract, separating undissolved by-products, neutralizing and precipitating xanthohumol, separating and drying German Patent Application DE 10 2006018988.
- [48] Fang Z., Zhou G.C., Zheng S.L., He G.L., Li J.L., He L., Bei D.: 2007. Lithium chloride-catalyzed selective demethylation of aryl methyl ethers under microwave irradiation. *J. Mol. Catal. A-Chem.*, 274, 16–23.
- [49] Fanghong G., Wujiu Z., Xiaojian Z., Xulei S., Tao S., Yijing W., Deliang W.: 2009. Method for extracting xanthohumol from *Lupulus*. China Patent Application CN 101440029.
- [50] Field J., Nickerson G., James D., Heider C.: 1996. Determination of essential oils in hops by headspace solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1768–1772.
- [51] Filek G., Bergamini M., Lindner W.: 1995. Steam distillation-solvent extraction, a selective sample enrichment technique for the gas chromatographic-electron-capture detection of organochlorine compounds in milk powder and other milk products. *J. Chromatogr. A*, 712, 355–364.
- [52] Fisher K., Bipp H.P.: 2005. Generation of organic acids and monosaccharides by hydrolytic and oxidative transformation of food processing residues. *Bioresource Technol.*, 96, 831–842.
- [53] Forster A., Schulmeyr J., Schmidt R., Simon K., Ketterer M., Forchhammer B., Geyer S., Gehrig M.: 2004. Method of producing a xanthohumol-concentrated hop extract and use thereof. US Patent Application 2004121040.

- [54] Forster II R.T.: 1995. Method for the production of a purified iso-alpha-acid concentrate from hop extract. World Patent WO 1995020037.
- [55] Fung S.Y., Zuurbier K.W.M., Paniego N.B., Scheffer J.J.C., Verpoorte R.: 1997. Conversion of deoxyhumulone into the hop a-acid humulone. *Phytochemistry*, 44, 1047–1053.
- [56] Gardea-Torresdey J., Hejazi M., Parsons J.G., Tiemann K., Henning J.: 2001. Environmental applications of hops derived biomaterials for the purpose of toxic metal ion removal from solution. Preprints of Extended Abstracts presented at the ACS National Meeting, American Chemical Society, Division of Environmental Chemistry, San Diego, 41, 441–446.
- [57] Gardner D.S.: 1993. Commercial Scale Extraction of Alpha-Acids and Hop Oils with Compressed CO<sub>2</sub>. Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents. King M.B., Bott T.R., eds. Blackie, Academic and Professional, London, UK., 84–100.
- [58] Gardner R.J.: 1972. Surface viscosity and gushing. *J. I. Brewing*, 78, 391–399.
- [59] Gerha C.: 2005. Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition Food Res.*, 49, 827–831.
- [60] Gerhäuser. C.: 2005. Beer constituents as potential cancer chemopreventiveagents. *Eur. J. Cancer*, 41, 1941–1954.
- [61] Gester S., Metz P., Zierau O., Vollmer G.: 2001. An efficient synthesis of the potent phytoestrogens 8-prenylnaringenin and 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin by europium(III)-catalyzed Claisen rearrangement G. *Tetrahedron*, 57, 1015–1018.
- [62] Giria A., Dhingraa V., Girib C.C., Singh A., Ward O.P., Narasu M.L.: 2001. Biotransformations using plant cells, organcultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol. Adv.*, 19, 175–199.
- [63] Goldstein H., Ting P., Navarro A., Ryder D.: 1999. Water-soluble hop flavor precursors and their role in beer flavor. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, 27, 53–62.
- [64] Halbwirt H., Forkmann G., Stich K.: 2004. The A-ring specific hydroxylation of flavonols in position 6 in *Tagetes* sp. is catalyzed by a cytochrome P450 dependent monooxygenase. *Plant Sci.*, 167, 129–135.
- [65] Hammerstone J.F., Lazarus S.A., Schmitz H.H.: 2000. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J. Nutr.*, 130, 2086–2092.
- [66] Hampton R., Nickerson G., Whitney P., Haunold A.: 2002. Comparative chemical attributes of native North American hop, *Humulus Lupulus* var. *lupuloides* E. Small. *Phytochemistry*, 61, 855–862.
- [67] Hattori M., Shu Y.Z., El-Sedawy A.L., Namba T., Kobashi K., Tomimori T.: 1988. Metabolism of homoorientin by human intestinal bacteria. *J. Nat. Prod.*, 51, 874–878.
- [68] Hermans-Lokkerbol A.C.J., Hoek A.C., Verpoorte R.: 1997. Preparative separation of bitter acids from hop extracts by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, 771, 71–79.
- [69] Hoffmann J., Hoffmann K., Anioł M., Wawrzeńczyk Cz.: 2006. Investigation on inactivation of the waste hop for fodder aims applying inorganic chemicals, *Chemistry for Agriculture*, 6, 181–185.
- [70] Hoshino T., Yoshiyuki S.: 2001. Enzymic products of the 2,3-oxidosqualene analog having an ethyl residue at 10-position. First trapping of the trimethylcyclohexanone ring by lanosterol synthase. *Tetrahedron Lett.*, 42, 7319–7323.
- [71] Howard G.A.: 1970. Institute of Brewing Analysis Committee. The determination of hop oil. *J. I. Brewing*, 76, 381–386.
- [72] Huempel M., Schleuning W.D., Schaeffer O., Isaksson P., Bohlmann R.: 2005. Use of 8-Prenylnaringenin for hormone replacement therapy. European Patent Application EP 1524269.



- [73] Huff M.W., Telford D.E.: 2005. Lord of the rings – the mechanism for oxidosqualene: lanosterol cyclase becomes crystal clear. *Trends in Pharm. Sci.*, 26, 335–340.
- [74] Huszcza E.: 2008. Mikrobiologiczne przekształcenia związków biologicznie aktywnych z grupy steroidów oraz składników wchłmielin. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław.
- [75] 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.
- [76] Huszcza E., Bartmańska A., Anioł M., Mączka W., Żołnierczyk A., Wawrzeńczyk C.: 2008. Degradation of hop bitter acids by fungi. *Waste Manage.*, 28, 1406–1410.
- [77] Hysert D., Probasco G., Forster A. Smidt R.: 1998. Effect of hop powdery mildew on the quality of hops, hop products and beer, Hop Powdery Mildew Electronic Symposium, za [30].
- [78] Ishihara K., Hamada H., Hirata T., Nakajima N.: 2003. Biotransformation using plant cultured cells. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 23, 145–170.
- [79] Ito C., Mizuno T., Matsuoka M., Kimura Y., Sato K., Kajiura I., Omura M., Ju-Ichi M., Furukawa H.: 1988. A new flavonoid and other new components from citrus plants. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 3292–3295.
- [80] Jain A.C., Gupta R.C., Sarpal P.D.: 1978. Synthesis of racemic 8-C-Prenyl-6'',6''-dimethylpyrano(2'',3'':7,6)naringenin. *Chem. Lett.*, 7, 995–998.
- [81] Jain A.C., Gupta R.C., Sarpal P.D.: 1978. Synthesis of (±) lupinifou, di-o-methyl xanthohumol and isoxanthohumol and related compounds. *Tetrahedron*, 34, 3563–3567.
- [82] Jewell C., Prusakiewicz J. J., Ackermann C., Payne N.A., Fate G., William F.M.: 2007. The distribution of esterases in the skin of the minipig. *Toxicol. Lett.*, 173, 118–123.
- [83] Kalia Y. N., Guy R.H.: 2001. Modeling transdermal drug release. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 48, 159–172.
- [84] Kaminaga Y., Nagatsu A., Akiyama T., Sugimoto N., Yamazaki T., Maitani T., Mizukami H.: 2003. Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *FEBS Lett.*, 555, 311–316.
- [85] Kaneda H., Kano Y., Koshino S., Ohya-Nishiguchi H.: 1992. Behavior and role of iron ions in beer deterioration. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, 40, 2102–2107.
- [86] Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J.: 2000. Applications of solidphase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A*, 880, 35–62.
- [87] Kim N.S., Lee D.S.: 2002. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 982, 31–47.
- [88] Kokubo T., Ambe-Ono Y., Nakamura M., Ishida H., Yamakawa T., Kodama T.: 2001. Promotive Effect of Auxins on UDP-Glucose: Flavonol Glucosyltransferase Activity in *Vitis* sp. Cell Cultures. *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 564–569.
- [89] Kollmannsberger H., Nitz S.: 2002. Glycosidically bound flavour compounds in hop (*Humulus lupulus* L.): Enzymatical liberation of aglycones. *Adv. Food Sci.*, 24, 106–115.
- [90] Kostrzewa-Susłow E., Dmochowska-Gładysz J., Białońska A., Ciunik Z.: 2008. Microbial transformations of flavanone by *Aspergillus Niger* and *Penicillium chermesinum* cultures. *J. Mol. Catal B-Enzym.*, 52–53, 34–39.
- [91] Kostrzewa-Susłow E., Dmochowska-Gładysz J., Oszmiański J.: 2007. Microbial transformation of baicalin and baicalein. *J. Mol. Catal B-Enzym.*, 49, 113–117.
- [92] Kovačević M., Kač M.: 2002. Determination and verification of hop varieties by analysis of essentials oils. *Food Chem.*, 77, 489–494.
- [93] Kovačević M., Kač M.: 2001. Solid-phase microextraction of hop essential oils: Potential use for determination and verification of hop varieties. *J. Chromatogr. A*, 918, 159–167.

- [94] Kretzschmar G., Vollmer G., Schwab P., Tischer S., Metz P., Zierau O.: 2007. Effects of the chemically synthesized flavanone 7-(*O*-prenyl)naringenin-4-acetate on the estrogen signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 107, 114–119.
- [95] Kunze R.: 1999. *Technologia piwa i sodu*. Wydawnictwo Piwochmiel, 18–36.
- [96] Larson A.E., Yu R.R.Y., Lee O.A., Price S., Haas G.J., Johnson E.A.: 1996. Antimicrobial activity of hop extracts against *listeria monocytogenes* in media and in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 33, 195–207.
- [97] Laufenberg G., Kunz B. Nystroem M.: 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresouce Technol.*, 87, 167–198.
- [98] Lermusieau G., Liegeois C., Collin S.: 2001. Reducing power of hop cultivars and beer ageing. *Food Chem.*, 72, 413–418.
- [99] Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P.J.: 1996. Standarization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 57, 347–358.
- [100] Limberger R.P., Ferreira L., Castilhos T., Aleixo A.M., Petersen R.Z., Germani J.C., Zuanazzi J.A., Fett-Neto A.G., Henriques A.T.: 2003. The ability of *Bipolaris sorokiniana* to modify geraniol and (-)-alpha-bisabolol as exogenous substrates. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 61, 552–555.
- [101] Malepszy S. (red.): 2004. *Biotransformacje substancji chemicznych*. Biotechnologia Rolin, PWN, Warszawa, 144–169.
- [102] Mannering G.J., Shoeman J.A.: 1996. Murine cytochrome P4503A is induced by 2-methyl-3-buten-2-ol, 3-methyl-1-pentyn-3-ol (meparfynol), and tert-amyl alcohol. *Xenobiotica*, 26, 487–493.
- [103] Marles S., Heather R., Gruber M.Y.: 2003. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry*, 64, 367–383.
- [104] Masteli J., Jerkovi I.: 2003. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated compounds of seasonally collected *Satureja Montana* L. *Food Chem.*, 80, 135–140.
- [105] Matich A.J., Rowan D.D., Banks N.H.: 1996. Solid-phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple hop essential oils. *Anal. Chem.*, 68, 4114–4118.
- [106] McGarrity M.J.: 2000. Fertilizer from brewery cleaning and rinsing solutions. US Patent 6042629.
- [107] Metz P., Schwab P.: 2006. Preparation of (2S)- and (2R)-8-prenylnaringenin, used in e.g. pharmaceuticals, comprises reducing racemic mixture of 8-prenylnaringenin derivative with formic acid and base, separating non-transferred enantiomer and splitting acyl residue German Patent Application DE 10 2006032500.
- [108] Metz P., Schwab P.: 2008. Method for producing enantiopure flavanones. World Patent Application WO 2008003774.
- [109] Mizobuchi S., Sato Y.: 1984. A new flavone with antifungal activity isolated from hops. *J. Agric. Biol. Chem.*, 48, 2771–2775.
- [110] Mojzis J., Varinska L., Mojzisova G., Kostova I., Mirossay L.: 2008. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol. Res.*, 57, 259–265.
- [111] Monteiro R., Faria A., Azevedo I., Calhau C.: 2007. Modulation of breast cancer cell survival by aromatase inhibiting hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 105, 124–130.
- [112] Moore W.P.: 1978. Process for improved ruminant feed supplements. US Patent 4109019.
- [113] Muller C.E., Schumacher B., Brattstromm A., Abourashed E.A., Koetter U.: 2002. Interactions of valerian extracts and fixed valerian-hop extracts combination with adenosine receptors. *Life Sci.*, 71, 1939–1949.

- [114] Nagar A., Gurjal V.K., Gupta S.R.: 1978. Synthesis of lupinifolin. *Tetrahedron Lett.*, 23, 2031–2034.
- [115] Nemeth K., Plumb G.W., Berrin J.G.: 2003. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur. J. Nutr.*, 42, 29–42.
- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] Orden A.A., Bisogno F.R., Giordano O.S., Sanz M.K.: 2008. Comparative study in the asymmetric bioreduction of ketones by plant organs and undifferentiated cells. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 51, 49–55.
- [119] Oshugi M., Basnet P., Kadota S., Isbii E., Tamora T., Okumura Y., Namba T.: 1997. Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori*. *J. Trad. Med.*, 14, 186–191.
- [120] Palmer M.V., Ting, S.S.T.: 1995. Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chem.*, 53, 345–352.
- [121] Plazar J., Filipič M., Geny M.M.: 2008. Groothuis Antigenotoxic effect of Xanthohumol in rat liver slices. *Toxicol. in Vitro*, 22, 318–327.
- [122] Farmakopea Polska V: 1999. Warszawa, 58–59.
- [123] Possemiers S., Heyerick A., Robbens V., De Keukeleire D., Verstraete W.: 2005. Activation of proestrogens from hops (*Humulus lupulus* L.) by intestinal microbiota; Conversion of isoxanthohumol into 8-prenylnaringenin. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6281–6288.
- [124] Possemiers S., Rabot S., Espin J.C., Bruneau A., Philippe C., Gonzalez-Sarrias A., Heyerick A., Tomas-Barberan F.A., De Keukeleire D., Verstraete W.: 2008. Eubacterium limosum Activates Isoxanthohumol from Hops (*Humulus lupulus* L.) into the Potent Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin In Vitro and in Rat Intestine. *J. Nutr.*, 138, 1310–1316.
- [125] Preston R.L.: 2008. Typical composition of feeds for cattle and sheep. <http://beefmagazine.com/nutrition/typical-composition-feeds-cattle-sheep>, Pobrano: sierpień 2009.
- [126] Prosen H., Župančič-Kralj L.: 1999. Solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.*, 18, 272–282.
- [127] Qimin L., Lianqing M., Lihua M., Lijuan M., Fuyu D.: 2009. Method for abstraction of enriched xanthohumol in hop draff with carbonic anhydride. China Patent Application CN 101492357.
- [128] Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.T.: 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A*, 1112, 31–63.
- [129] Roberts R.J.; Vaughan P.F.T.: 1971. Hydroxylation of kaempferol, dihydrokaempferol, and naringenin by a phenolase preparation from spinach beet. *Phytochemistry*, 10, 2649–2652.
- [130] Robustel B., Abe I., Prestwich G.D.: 1998. Synthesis and enzymatic Cyclization of (3S)11-fluoro-2,3-oxidosqualene. *Tetrahedron Lett.*, 39, 957–960.
- [131] Rodriguez P., Barton M., Aldabalde V., S. Onetto S.: 2007. Are endophytic microorganisms involved in the stereoselective reduction of ketones by *Daucus carota* root. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 49, 8–11.
- [132] Royle L., Ames J.M., Hill C.A., Gardner D.S.J.: 2001. Analysis of hop acids by capillary electrophoresis. *Food Chem.*, 74, 225–231.
- [133] Rozporządzenie ministra rolnictwa i rozwoju z dnia 28 czerwca 2004 r. w sprawie dopuszczalnych zawartości substancji niepożądanych w paszach, Dz. U. z dnia 19 lipca 2004 r.
- [134] Sakamoto K., Konings W.N.: 2002. Anti-microbial effects of hop. *Cerevisia*, 27, 184–188.

- [135] Sakamoto K., Konings W.N.: 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. I. J. Food Microbiol., 89, 105–124.
- [136] Schaefer O., Bohlmann R., Schleunig W.D., Schulze-Forster K., Huempel M.: 2005. Development of a Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of 8-Prenylnaringenin in Biological Matrices. J. Agric. Food Chem., 53, 2881–2889.
- [137] Schiller H., Forster A., Vonhoff C., Hegger M., Biller A., Winterhoff H.: 2006. Sedating effects of *Humulus lupulus* L. extracts. Phytomedicine, 13, 535–541.
- [138] Sharghi H., Tamaddon F.: 1996.  $\text{BeCl}_2$  as a new highly selective reagent for dealkylation of aryl-methyl ethers. Tetrahedron, 52, 13623–13640.
- [139] Shaw S.J., Smith P.J.: 1968. The synthesis and some rearrangements of 2-acetyl-4,6-diethyl-1,3,4-trihydroxycyclo-2,6-dien-5-one. J. Chem.Soc. C, 1882–1885.
- [140] Sherif E.A., Islam A., Krishnamurti M.: 1982. A new synthesis of 4<sup>''</sup>,5,7-trihydroxy-8-(3,3-dimethylallyl) flavanone. Indian J. Chem. B, 21B, 478–479.
- [141] Siddiqui B.S., Ali S.T., Rasheed M., Kardar M.N.: 2003. Chemical constituents of the flowers of *Azadirachta indica*. Helv. Chim. Acta, 86, 2787–2796.
- [142] Silverman R.: 2004. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action 2nd Edition ISBN: 0-12-643732-7 Academic Press.
- [143] Simpson W.J., Smith A.R.: 1992. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. J. Appl. Bacteriol., 72, 327–334.
- [144] Stevens J.F., Ivancic M., Hsu V.L., Deinzer M.L.: 1997. Prenylflavonoids from *Humulus Lupulus*. Phytochemistry, 44, 1575–11585.
- [145] Stevens J.F., Page J.E.: 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer to your good health. Phytochemistry, 65, 1317–1330.
- [146] 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.
- [147] Stevens J.F., Taylor A.W., Nickerson G.B., Ivancic M., Henning J., Haunold A., Deinzer M.L.: 2000. Prenyl flavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O'-methylxanthohumol. Phytochemistry, 53, 759–775.
- [148] Tagashira M., Watanabe M., Uemitsu N.: 1995. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. Biosci. Biotech. Bioch., 59, 740–742.
- [149] Tahara S., Katagiri Y., Ingram J.L., Mizutani J.: 1994. Prenylated flavonoids in the roots of yellow lupin. Phytochemistry, 36, 1261–1271.
- [150] Taylor M.D.: 1996. Improved passive oral drug delivery via prodrugs. Adv. Drug Deliver. Rev., 19, 131–148.
- [151] Thomas R.M., Reddy G.S., Iyengar D.S.: 1999. An efficient and selective deprotection of allyl ethers by a  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -NaI system. Tetrahedron Lett., 40, 7293–7294.
- [152] Tobe H., Kitamura K., Komiyama O.: 1997. Method for treating osteoporosis. US Patent 5679716.
- [153] Tobe H., Muraki Y., Kitamura K., Komiyama O., Sugioka T., Maruyama H.B., Matsuda E., Nagai M.: 1997. Bone resorption inhibitors from hop extract. Biosci. Biotech. Bioch., 61, 158–159.
- [154] Townsley P.M., Weaver R.: 1982. Process for preparing protein flour from brewery waste. US Patent 4315038.
- [155] Trouillas P., Calliste C.A., Allais D.P., Simon A., Marfak A., Delage C., Duroux J.L.: 2003. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. Food Chem., 80, 399–407.
- [156] Urakata M., Tsutsui H., Takeuchi N., Hoshino O.: 1999. Enantioselective radical-mediated reduction of  $\alpha$ -alkyl- $\alpha$ -iododihydrocoumarins in the presence of a chiral magnesium iodide. Tetrahedron, 55, 10295–10304.

- [157] Valle J.M., Rogalski T., Zetzl C., Brunner G.: 2005. Extraction of boldo (*peumus boldus* M.) leaves with supercritical CO<sub>2</sub> and hot pressurized water. *Food Res. Int.*, 38, 203–213.
- [158] Vaughan P.F.T., Butt Vernon S., Grisebach H., Schill L.: 1969. Hydroxylation of flavonoids by a phenolase preparation from leaves of spinach beet. *Phytochemistry*, 8, 1373–1378.
- [159] Vinatoru M.: 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.*, 8, 303–313.
- [160] Wallen S.E., Marshall H.F.: 1979. Protein quality evaluation of spend hops. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 635–636.
- [161] Walters M.T., Heasman A.P., Hughes P.S.: 1997. Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 2: extended storage trials. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 55, 91–108.
- [162] Wang Q., Ding Z., Liu J., Zheng Y.: 2004. Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops *Humulus lupulus*. *Antivir. Res.*, 64, 189–194.
- [163] Weissman S.A., Zewge D.: 2005. Recent advances in ether dealkylation. *Tetrahedron*, 61, 7833–7863.
- [164] Wendt K.U., Schulz G.E., Corey E.J., Liu D.R.: 2000. Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 2812–2833.
- [165] Wilhelm H., Wessjohann L.A.: 2006. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from xanthohumol by a novel demethylation process. *Tetrahedron*, 62, 6961–6966.
- [166] Wilhelm H., Wessjohann L.A., Biendl M.: 2006. Method for producing naringenin derivatives from xanthohumol. World Patent Application WO 2006099914.
- [167] Wimal H.M., Herath W., Ferreira D., Khan I.A.: 2003. Microbial transformation of xanthohumol. *Phytochemistry*, 62, 673–677.
- [168] Yamaguchi S., Nedachi M., Yokoyama H., Hirai Y.: 1999. Regioselective demethylation of 2,6-dimethoxybenzaldehydes with magnesium iodide etherate. *Tetrahedron Lett.*, 40, 7363–7365.
- [169] Yamaguchi S., Takai M., Hanazome I., Okada Y., Kawase Y.: 1987. Synthesis and Structural Studies of Remirol. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 60, 3603–3605.
- [170] Yasukawa K., Takeuchi M., Takido M.: 1995. Humulon, a bitter in the hop, inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology*, 52, 156–158.
- [171] Zanoli P., Zavatti M.: 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.*, 116, 383–396.
- [172] Zhao L., Fang L., Xu Y., Zhao Y., He Z.: 2008. Effect of *O*-acylmenthol on transdermal delivery of drugs with different lipophilicity. *Int. J. Pharm.*, 352, 92–103.
- [173] Zheng Y.F., Doodd D.S., Oehschlager A.C.: 1995. Synthesis of vinyl sulfide analogs of 2,3-oxidosqualene and their inhibition of 2,3-oxidosqualene lanosterol-cyclases. *Tetrahedron*, 51, 5255–5276.
- [174] 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.
- [175] Metoda została opracowana w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu przez dr inż. Annę Katarzynę Żołnierczyk.

# RESIDUE AFTER HOP SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTION AS A SOURCE OF TECHNOLOGICALLY USEFUL SUBSTANCES

## S u m m a r y

This research is directed towards utilization of the spent hop, obtained after extraction with supercritical carbon dioxide. This waste product of the hop industry is rich in xanthohumol, anti-cancer and antioxidant agent, where its content ranges up to 1% of dry matter. The spent hop can be also used as a valuable animal feed because of the high protein content and adequate amount of nutritive substances.

The traces of volatile constituents of the spent hop, obtained after industrial supercritical CO<sub>2</sub> extraction, distilled and extracted in the Deryng apparatus have been determined by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. Isooctane as an extracting solvent was used containing hexadecane as an internal standard. Advantages of this method were that it was easy to carry out, quick and similar to the common method of steam distillation used in the analysis of hop products. A sample concentration was not necessary as in the SDE method. The RSD values obtained were lower than 20,4% for concentrations between 1,36 and 241 µg/g. Hydrolysis of glycosides of determined compounds during the analysis was not observed.

On order to remove bitter constituents, spent hops were extracted with different solvents (methanol, ethanol, acetone, ethyl acetate, n-propanol, isopropanol, isooctane, hexane, mixtures of ethanol and unpolar solvents (pentane, hexane, heptane) and under different conditions, namely room and boiling temperatures and ultrasonic extraction. The modification of EBC 7.7 method using isooctane instead diethyl ether for low concentration of bitter acid analysis in spent hop was also worked up. The content of hop acids, true and crude protein, lost of dry mass was determined. The total content of hop acids in the extracted spent hops was 1051 µg/g (222 µg/g bitter isohumulones and 757 µg/g humulones). The percentage of acids removed depended on the polarity of the solvents applied. The best results were obtained for ethanol and methanol (more than 80%) and the worst for hexane (30%) for 60 min. extractions in boiling solvent. However, in the case of methanol and ethanol, it was connected with relatively significant loss of crude protein and mass. Acetone was also a good solvent for bitter acids removal (up to 74%). This medium lets to recover high amounts of crude (93,4%) and true (97,7%) protein. Hexane at room temperature barely extracted hop acids (5% of hop acids removed). Fast isomerization of humulones into isohumulones was observed in overheated water steam at 121°C. Humulones in lupulin of hop cones were not significantly affected by isomerization and the predominant process was decomposition of those compounds. The isomerized spent hops resulting from this process contained 581 µg/g of isohumulones and 103 µg/g of humulones were extracted with hexane and acetone.

The latter was slightly better at extracting hop acids from isomerized spent hops than from unisomerized hops, enabling the removal of more than 74% (in comparison to initial unisomerized spent hop) of hop acids.

Plant enzyme extracts obtained from grapefruit (*Citru paradisi*), orange (*Citrus sinensis*), horseradish (*Armoracia rusticana*), carrot (*Daucus carota*), sugar beet (*Beta vulgaris*), parsley (*Petroselinum crispim*) and apple (*Malus mill*) were tested for their ability to degrade humulones and lupulones. Degradation experiments were carried out in the dark at 25°C. The best efficiency was achieved for enzyme extract of horseradish. After 72 hours of the biotransformation there was observed total degradation of all hop bitter acids. The percentage of removed acids varied from 80 to almost 100% for the rest of investigated biocatalysts.

Extractions using methanol, ethanol, 70% ethanol, acetone, ethyl acetate, diethyl ether and its mixtures with acetone, chloroform, hexane and its mixtures with ethanol were performed to extract xanthohumol from spent hops. Extraction efficiency decreased with reduced polarity of the solvent and was equal to zero for hexane. The worse selectivity with boiling solvent extractions was observed for methanol, ethanol and 70% ethanol, the most polar solvents, (1,6-2,7% of xanthohumol present in the extract), and the best for diethyl ether (17,4%). Acetone was one of the best extracting agent (16,7%). Acetone and diethyl ether possessed also high efficiency to extract xanthohumol. During the Soxhlett-extraction they extracted more than 80% of total amount of xanthohumol.

Xanthohumol was isolated from supercritical carbon dioxide–spent hop by the extraction with acetone, purification on silica gel, and subsequent crystallization and was then converted into isoxanthohumol with 95% yield. For the first time, magnesium and calcium salts for the demethylation of isoxanthohumol into 8-prenylnaringenin (8PN), the strongest known phytoestrogen and potential anticancerogenic agent, were used. The best yield 93% occurred when MgI<sub>2</sub> etherate in anhydrous THF was applied. Salts such as MgBr<sub>2</sub> (yield 39%), MgCl<sub>2</sub> (yield 4%), CaI<sub>2</sub> (yield 11%), Mg(OAc)<sub>2</sub> (no 8PN), Mg(OMe)<sub>2</sub> (no 8PN) were also investigated. Several analogues of 7-*O*- and 4'-*O*-substituted isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin, potential prodrugs, were synthesized. Acyl, alkyl and allyl derivatives of isoxanthohumol underwent the demethylation process using MgI<sub>2</sub>·x2Et<sub>2</sub>O in anhydrous THF with the yields of 61-89%. Eight new compounds were obtained.

The capability of biotransformation of 14 commuted roots of vegetables (carrot, parsley, horse-radish, red beet, kohlrabi, radish, black turnip), plant fruits (grapefruit, quince, strawberry), bulbs (potato, topinambur, garlic) and leaves (rhubarb) was tested on naringenin, 8-prenylnaringenin, isoxanthohumol and xanthohumol. During the experiments the growth of the microorganisms was monitored in order to exclude microbial origin of transformations. The enzyme system of beetroot was able to carry out the hydroxylation at 3' carbon of naringenin, isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. The products were isolated and their structure was established by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR.

The biotransformation of 6,7-epoxygeraniol by resting cells of nine species of fungi was investigated. 6,7-epoxynerol (5–48%) was the main product obtained from the transformation in *Rhodotorula marina* and *Rhodotorula glutinis* cultures. In the case of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis* and *Candida kefyr*, 6,7-epoxy-

citronellol (30–33%) was mainly observed. Cultures of *Yarrowia lipolytica*, *Botrytis cinerea* and *S. cerevisiae* promoted the cyclisation of 6,7-epoxygeraniol to 2-methyl-2-(2-hydroxyethyl)-5-(2-hydroxyprop-2-yl)tetrahydrofuran with the yield of 11–99%. 6,7-Epoxynerol was not biotransformed by investigated microorganisms.

**Key words:** Spent hop, biotransformation, extraction, demethylation, volatiles analysis, Deryng apparatus, hop bitter acids, hop flavonoids, 8-prenylnaringenin, isoxanthohumol, xanthohumol, naringenin, 6,7-epoxygeraniol