

# DIHYDROCHALKONY JAKO NATURALNA ALTERNATYWA DLA OBECNIE STOSOWANYCH SŁODZIKÓW

## DIHYDROCHALCONES AS A NATURAL ALTERNATIVE TO CURRENTLY USED SWEETENERS

**Monika Dymarska<sup>\*</sup>, Dagmara Filip, Martyna Perz,  
Tomasz Janeczko, Edyta Kostrzewa-Susłow**

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,  
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy,  
ul. C. K. Norwida 25, 50-375 Wrocław  
<sup>\*</sup>e-mail: monika.dymarska@upwr.edu.pl*

---

### Abstract

#### Wprowadzenie

1. Negatywny wpływ cukru na zdrowie
2. Odczuwanie słodkości
3. Słodziki
  - 3.1. Półsyntetyczne substancje słodzące
  - 3.2. Intensywne substancje słodzące
4. Potencjał dihydrochalkonów do stosowania jako słodziki
  - 4.1. Ekstrakcja dihydrochalkonów z materiału roślinnego
  - 4.2. Synteza chemiczna dihydrochalkonów
  - 4.3. Znaczenie biotransformacji w syntezie dihydrochalkonów
  - 4.4. Przykłady biotechnologicznego wytwarzania dihydrochalkonów
    - 4.4.1. Biokatalizatory prokariotyczne
    - 4.4.2. Biokatalizatory eukariotyczne

#### Uwagi końcowe

#### Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr inż. Monika Dymarska** w 2010 roku ukończyła biotechnologię na Wydziale Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W latach 2011-2014 była zatrudniona na stanowisku asystenta naukowego w projekcie „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym”. W latach 2014-2018 realizowała studia doktoranckie na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Pracę doktorską obroniła w 2019 roku. Jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.



 <https://orcid.org/0000-0002-2688-8883>

**Mgr inż. Dagmara Filip (Kaczanowska)** studiowała biotechnologię na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. W trakcie studiów była aktywną członkinią Studenckiego Koła Naukowego OrgChem. Studia ukończyła w 2019 roku uzyskując tytuł magistra inżyniera.

**Mgr Martyna Perz (Krzywda)** studia I stopnia na kierunku biotechnologia odbyła na Uniwersytecie Wrocławskim. Studia magisterskie z zakresu biotechnologii ukończyła na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu w 2020 roku. Od 2020 roku realizuje doktorat w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności.



 <https://orcid.org/0000-0002-3011-950X>

**Dr hab. Tomasz Janeczko** w 2001 roku ukończył chemię, w zakresie chemia środowiska, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W 2007 roku uzyskał tytuł doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii. W 2015 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego. Jest zatrudniony na stanowisku profesora Uczelni w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.



 <https://orcid.org/0000-0002-9757-6684>

**Prof. dr hab. inż. Edyta Kostrzeva - Susłow** w roku 1997 ukończyła Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej. W 2007 roku uzyskała tytuł doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii. W 2015 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego, a w 2020 roku tytuł profesora nauk ścisłych i przyrodniczych. Jest zatrudniona w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.



 <https://orcid.org/0000-0002-9259-0161>

## ABSTRACT

The craving for sweets is a universal desire that connects people of all ages and cultures. Traditionally used sweeteners based on sugars, such as sucrose or glucose-fructose syrup, are known for their multidirectional negative impact on human health. With the development of research into artificial sweeteners and natural sucrose alternatives, more and more consumers are turning to healthier options to satisfy their sweet tooth.

Among the potential new sweeteners of natural origin, dihydrochalcones deserve special attention. These compounds belong to polyphenols and are present in plants. In the daily diet of people, their source may be citrus fruits, strawberries and apples. Dihydrochalcones, like other polyphenols, have a high and diverse health-promoting effect, e.g. antioxidant, antimicrobial or anticancer. Unfortunately, their extraction from plant material is challenging and economically unprofitable.

The article presents a brief description of traditionally used sweeteners based on sugar, as well as alternative sweeteners. Methods for the chemical synthesis of dihydrochalcones are presented here, and the biotransformation processes involved in producing these sweet-tasting compounds are discussed.

Keywords: sugar, sweeteners, dihydrochalcones, biotransformations

Słowa kluczowe: cukier, słodziki, dihydrochalkony, biotransformacje

---

---

## WPROWADZENIE

Słodki smak pożądaný jest przez ludzi w różnym wieku, pochodzących z różnych klas i kultur. Słodycz od zawsze odgrywała istotną rolę w żywieniu człowieka, pomagając ukierunkować zachowania żywieniowe na produkty dostarczające zarówno energii, jak i niezbędnych składników odżywczych [1]. Po spożyciu słodkiego pokarmu aktywacji ulegają obwody mózgowe generujące przyjemność. Według badań klinicznych ten obwód jest taki sam lub pokrywa się z tym, który pośredniczy w uzależniającym charakterze narkotyków, takich jak alkohol i opiaty [2].

Najwcześniej stosowanymi substancjami słodzącymi były miód i soki roślinne. W przemyśle spożywczym tradycyjnie najczęściej stosowaną substancją jest sacharoza – dwucukier, którego głównymi źródłami pozyskiwania są trzcina cukrowa i buraki cukrowe [3].

Smak i profil słodkości czystej sacharozy określa się „złotym standardem”. Ponieważ cukier ten jest powszechnie wykorzystywany w produktach spożywczych, ludzie utożsamiają słodkość ze smakiem sacharozy [4]. Sacharoza jest dobrze rozpuszczalna w wodzie, a także stabilna chemicznie i termicznie. Dodatkowym atutem tego dwucukru jest możliwość jego wykorzystania w konserwowaniu żywności, a także nadawaniu jej odpowiedniej lepkości i tekstury [5]. Sacharoza jest jednak wysoce kaloryczna, a jej zwiększone spożycie skutkuje dodatnim bilansem energetycznym. Nadmierne spożycie sacharozy uważa się za jedną z przyczyn m. in. otyłości, cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych, czy nowotworów [6,7]. Obecnie coraz częściej jest ona wypierana przez bogaty we fruktozę syrop pozyskiwany z kukurydzy, który wykazuje jeszcze bardziej negatywny efekt metaboliczny niż sacharoza [8].

Powyższe fakty stanowią silny impuls do poszukiwania niskoenergetycznych substytutów sacharozy, które posiadałyby porównywalne z nią parametry fizykochemiczne i sensoryczne, a ich spożycie nie byłoby obarczone tak negatywnym wpływem na organizm [4].

### 1. NEGATYWNY WPŁYW CUKRU NA ZDROWIE

Glukoza to główny cukier magazynowany w organizmach zwierząt, natomiast u roślin jest to sacharoza złożona z cząsteczki glukozy i fruktozy. Ponieważ ludzie od zawsze konsumowali produkty pochodzenia roślinnego, w ich diecie obecna była również fruktoza [9,10]. Zwiększone wykorzystanie fruktozy w przemyśle spożywczym początkowo wiązało się z przekonaniem, że stanowi ona zdrowszą alternatywę dla glukozy, ze względu na jej niższy indeks glikemiczny i fakt, że metabolizm fruktozy nie jest regulowany przez insulinę. Uważano, że dzięki temu fruktoza może być bezpiecznie stosowana u pacjentów z cukrzycą [11,12]. Fruktoza

jest też najśłodszy naturalnie występującym cukrem, co umożliwi wykorzystanie mniejszych jej ilości do zapewniania pożądanego poziomu słodkości produktów, co obniża ich kaloryczność w stosunku do produktów słodzonych glukozą czy sacharozą [13,14]. Jednak już w latach 60-tych XX wieku zaobserwowano, że zwiększone spożycie fruktozy u zwierząt i ludzi wywołuje hipertriglicydemie na poziomie dużo wyższym niż w wyniku spożywania skrobi czy glukozy [10]. Pomimo tego udział fruktozy w diecie ludzi wzrósł w ciągu ostatnich 40 lat o 30% [15]. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) rekomenduje, by cukry dodawane do żywności nie stanowiły więcej niż 10% naszej diety. Szacuje się jednak, że młodzież z samej tylko fruktozy może czerpać więcej niż 15% dziennej dawki kalorii, a dorośli niemal 20% [13,16]. Wynika to w dużym stopniu z powszechnego wykorzystywania w przemyśle spożywczym syropu kukurydzianego o wysokiej zawartości fruktozy (HFCS). Słodziwo to zostało po raz pierwszy wprowadzone do użytku w USA w 1972 roku w odpowiedzi na rosnące zapotrzebowanie przemysłu spożywczego na alternatywy dla rafinowanego cukru, którego produkcja jest droga [9,17]. HFCS jest tańszy, słodszy i trwalszy niż sacharoza. Słodziak ten nie ulega krystalizacji w produkcji, zapewnia zachowanie wilgotności wypieków i łatwo się rozpuszcza dodany do napojów. Szacuje się, że stanowi on obecnie 40% odżywczych substancji słodzących dodawanych do żywności [9,13,18]. Produkcja HFCS opiera się na wykorzystaniu enzymów pozyskanych z mikroorganizmów – w pierwszym etapie skrobia kukurydziana hydrolizowana jest do monosacharydów, następnie izomeraza ksylozy konwertuje część glukozy do fruktozy. Najbardziej popularny HFCS zawiera 55% fruktozy i 45% glukozy. Dzięki temu jest on słodszy i ma płynną konsystencję [10].

Pomimo tego, że glukoza i fruktoza mają tę samą kaloryczność, są one odmiennie metabolizowane w organizmach zwierząt i różnią się wpływem na rozwój chorób metabolicznych [19]. Glukoza jest podstawowym paliwem energetycznym dla większości tkanek i komórek zwierzęcych, natomiast fruktoza jest metabolizowana głównie w wątrobie [10]. Podczas absorpcji w przewodzie pokarmowym, gdy stężenie fruktozy w jelicie jest niższe niż 1 mM, duża jej ilość jest przekształcana w glukozę w enterocytach. Ta konwersja zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie fruktozy, ułatwiając jej wchłanianie. Jeśli jednak stężenie fruktozy wzrośnie powyżej tego poziomu, mniej fruktozy jest metabolizowane w enterocytach, przez co w niezmienionej formie przechodzi ona do krwioobiegu i ulega metabolizmowi wątrobowemu [16]. W wątrobie ulega przekształceniu do fruktozo-1-fosforanu, którego większość jest następnie metabolizowana do aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Związek ten może zostać przekształcony i uwolniony jako mleczan lub przekształcony w glukozę (glukoneogeneza). Po uwolnieniu do krążenia ogólnoustrojowego glukoza i mleczan mogą być wykorzystywane jako substrat energetyczny przez mózg, serce i tkankę mięśniową. Aldehyd 3-fosfoglicerynowy może jednak również ulec konwersji do acetylo-CoA stanowiącego prekursor kwasów tłuszczowych, lub do glicerolo-3-fosforanu przekształcanego dalej do triglicerydów [12,18].

U ludzi z nadwagą dieta bogata w fruktozę lub z identyczną ilością glukozy (25% całkowitego spożycia kalorii) skutkowała podobnym przyrostem masy ciała. Jednak tylko fruktoza w diecie specyficznie zwiększa lipogenezę *de novo* w wątrobie, wywołuje dyslipidemię, zmniejsza wrażliwość na insulinę i zwiększa otyłość trzewną. Tłuszcz trzewny, zwany także tłuszczem brzuszny, jest magazynowany pod jamą otrzewnej i jest aktywny w wydzielaniu cytokin prozapalnych. Słuszczenie wątroby, trzustki, mięśni szkieletowych, czy serca upośledza procesy metaboliczne i funkcjonowanie tych narządów. Zatem przechowywanie tłuszczu trzewnego jest bardziej szkodliwe metabolicznie w porównaniu z tłuszczem podskórnym. Osoba może nadal wyglądać na szczupłą z zewnątrz, ale mieć parametry metaboliczne osoby otyłej, jest to określane jako „chudy na zewnątrz, tusty w środku” (“thin on the outside, fat on the inside”, TOFI) [12,19]. Przyjmowanie fruktozy przyczynia się także wprost do zwiększonego spożycia pokarmu i otyłości poprzez regulację ośrodkowego układu nerwowego [19]. Spożyta fruktoza obniża wrażliwość organizmu na leptynę, nazywaną hormonem sytości [12], natomiast stymuluje wydzielanie greliny, nazywanej hormonem głodu [19].

Spożywanie zwiększonych ilości fruktozy wiąże się bezpośrednio z rozwojem takich schorzeń jak: cukrzyca typu 2; niealkoholowa słuszczeniowa choroba wątroby i jej agresywna postać, niealkoholowe słuszczeniowe zapalenie wątroby; niektóre nowotwory, zwłaszcza wątroby, trzustki i okrężnicy; oraz choroby układu krążenia i nerek [9,12]. Nadmiar fruktozy w diecie sprzyja również zaburzeniom neurologicznym i psychiatrycznym, takim jak wzmożony lęk, depresja i choroba Alzheimera [15].

## 2. ODCZUWANIE SŁODKOŚCI

Wysoka wrażliwość na słodki smak jest wrodzona, a poszukiwanie słodkich pokarmów jest uwarunkowane ewolucyjnie. Stopień odczuwania słodkości i poziom odczuwanej przyjemności po spożyciu słodkich pokarmów są natomiast zróżnicowane osobniczo [20,21]. Język i podniebienie miękkie są obszarami wyposażonymi w receptory smaku słodkiego i w tych miejscach zaczyna się jego odczuwanie po spożyciu pokarmu [22]. Proces ten jest złożony i opiera się na interakcji pomiędzy słodką substancją a centrami aktywnymi obecnymi w receptorach, które znajdują się w komórkach nabłonka [23]. Związki zdolne do wywoływania słodkiego smaku często znacząco różnią się budową, dlatego wiele ośrodków naukowych podjęło próby wykazania zależności pomiędzy strukturą chemiczną związku a jego słodkością [24]. Już w XIX wieku wykazano znaczenie stereochemii związków w mechanizmie odczuwania słodkości. W 1886 roku Piutti, udowodnił w toku prowadzonych przez siebie badań, że aminokwas D-asparagina jest słodki, a jego L-izomer nie [24].

### 3. SŁODZIKI

Substancje słodzące można podzielić na dwie grupy: odżywcze i nieodżywcze. Odżywcze zawierają monosacharydy (fruktozę i galaktozę), disacharydy (sacharozę) oraz poliole (alkohole cukrowe), które w różnym stopniu są źródłem energii. Natomiast nieodżywcze substancje słodzące, takie jak acesulfam K, aspartam, sacharyna i sukraloza nie zawierają kalorii w ilościach istotnych dla codziennego bilansu energetycznego [8].

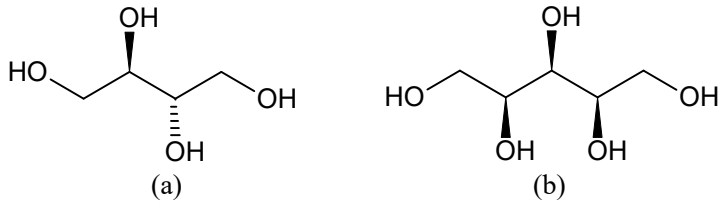
Konsumenci coraz częściej skupiają się na wartości odżywczej kupowanych produktów spożywczych, a nie jedynie na ich smaku i koszcie. Rosnąca świadomość wpływu diety na zdrowie, częstość występowania chorób wynikających ze źle zbilansowanej diety, a także moda na zdrowy styl życia stale potęgują popularność niskokalorycznych produktów spożywczych [25] i są impulsem do poszukiwania nowych substancji słodzących o obniżonej kaloryczności [26]. Zadaniem tych substancji, określanych mianem słodzików, jest naśladowanie słodkości sacharozy, bez drastycznego podnoszenia kaloryczności produktu [25]. Idealny słodzik musi być całkowicie bezpieczny dla zdrowia, a także powinien cechować się stabilnością w całym procesie wytwarzania i przechowywania produktu finalnego [4,27].

#### 3.1. PÓLSYNTETYCZNE SUBSTANCJE SŁODZĄCE

Pólsyntetyczne substancje słodzące, są grupą niskokalorycznych związków, które charakteryzują się nieco niższą słodkością niż sacharoza [28]. Współtworzą one strukturę produktu i są wykorzystywane jako wypełniacze, a także związki konserwujące. By zapewnić konsumentom satysfakcjonujący poziom słodkości, związki te mogą być łączone z innymi słodzikami [29]. Chemicznie pólsyntetyczne substancje słodzące to głównie alkohole cukrowe – poliole. Są to pochodne cukrów, w których grupa aldehydowa lub ketonowa jest zastąpiona grupą hydroksylową [30]. Spożycie polioli nie wiąże się z ryzykiem rozwoju próchnicy, dlatego są one często stosowanymi zamiennikami cukru, szczególnie w cukiernictwie. Dodatkowo, związki te nie powodują wahań poziomu glukozy we krwi, ponieważ zmniejszają odpowiedź glikemiczną i poprawiają wrażliwość insulinową [31]. Wśród alkoholi cukrowych ksylitol, erytrytol, mannitol i sorbitol są najczęściej wskazywane jako potencjalne alternatywy dla zastąpienia sacharozy w produktach spożywczych i należą do najczęściej stosowanych alkoholi cukrowych, obok m.in. maltitolu, laktitolu i izomaltozy [32]. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę ksylitolu i erytrytolu.

Erytrytol (rys. 1a) to czterowęglowy alkohol cukrowy zawierający w swojej strukturze cztery grupy hydroksylowe. Jest białą, krystaliczną, bezwoną substancją o słodkości na poziomie 60-80% słodczy sacharozy [4]. Na tle innych polioli wyróżnia się sposobem otrzymywania – erytrytol jest produkowany na skalę przemysłową przy wykorzystaniu biokatalizatorów [33]. Erytrytol może być wytwa-

rzany biotechnologicznie z glicerolu, glukozy lub fruktozy poprzez kilka konwersji enzymatycznych do erytrozy, która jest następnie przekształcana przez reduktazę erytrozy do polioliu [32]. Erytrytol najczęściej stosowany jest do produkcji niskokalorycznych napojów i gum do żucia [31].



Rysunek 1. Struktura chemiczna erytrytolu (a) i ksylitolu (b)  
Figure 1. Chemical structure of erythritol (a) and xylitol (b)

Ksylitol (rys. 1b) jest związkiem powszechnie obecnym w owocach i warzywach, a także jest produktem pośrednim metabolizmu węglowodanów u ssaków. U ludzi jest wolno wchłaniany i nie powoduje gwałtownych zmian stężenia glukozy we krwi [34]. Obecnie w celu zaspokojenia przemysłowego zapotrzebowania na ten słodzik wykorzystuje się chemiczną metodę jego syntezy. W tym procesie ksyloza ekstrahowana z biomasy lignocelulozowej poddawana jest katalitycznemu uwodornieniu w celu wytworzenia ksylitolu [35]. Związek ten można wytwarzać biotechnologicznie z substratów lignocelulozowych, które są przekształcane w hydrolizaty bogate w ksylozę i ostatecznie przekształcane w ksylitol przez reduktazę ksylozową [32]. Związek ten wykazuje działanie przeciwpóchnicze a także remineralizacyjne i dlatego powszechnie stosuje się go do produkcji preparatów stomatologicznych, a także syropów, czy suplementów diety [36]. Wykazano jednak, że wysokie spożycie ksylitolu (20-30 g) może skutkować niegroźną biegunką osmotyczną [34].

### 3.2. SUBSTANCJE INTENSYWNIE SŁODZĄCE

Drugą grupą środków słodzących są te o dużo wyższej słodczy niż sacharoza, nazywane są one środkami intensywnie słodzącymi lub alternatywnymi słodzikami [37]. W tabeli 1 przedstawiono porównanie popularnie stosowanych substancji słodzących pod kątem ich słodkości i kaloryczności.

Biorąc pod uwagę siłę słodzącą intensywnie słodzących substancji, stosuje się znacznie mniejszy ich dodatek, niż sacharozy, zatem ładunek energetyczny takiego produktu jest dużo niższy. Niestety, smak wielu alternatywnych słodzików nie jest stabilny, często obserwuje się obce posmaki [42]. Związki te stosowane są jednak powszechnie w batonach, płatkach, jogurtach „light”, dżemach, lekach, czy pastach do zębów [43].

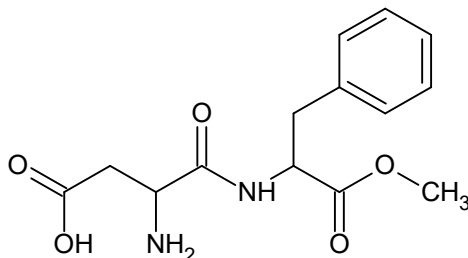


Tabela 1. Zestawienie wybranych substancji słodzących stosowanych jako dodatki do żywności pod kątem ich siły słodzącej i kaloryczności [38–41]

Table 1. List of selected sweeteners used as food additives in terms of their sweetening power and calorific value [38–41]

Słodzik	Symbol „E”	Siła słodząca	Wartość energetyczna [kcal/g]
Sacharoza	-	1	4
Taumatyna	E957	2000	4
Aspartam	E951	200	4
Acesulfam K	E950	150-200	0
Erytrytol	E968	0.7	0.2
Ksylitol	E967	1	2.5
Dihydrochalkon neohesperydyny	E959	1500-2000	2

Aspartam (rys. 2) to najpopularniejszy słodzik na świecie Jego zaletą jest zwiększanie intensywności innych smaków i aromatów, natomiast wadą – stosunkowo niska rozpuszczalność, a także ograniczona stabilność termiczna oraz chemiczna [5,44]. Aspartam to dipeptyd, na który składa się ester metylowy L-feniloalaniny i kwas L-asparaginowy [37]

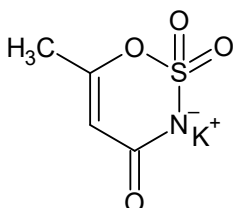


Rysunek 2. Struktura chemiczna aspartamu

Figure 2. Chemical structure of aspartame

Po spożyciu związek ten ulega całkowitemu rozpadowi do kwasu asparaginowego, feniloalaniny i metanolu, który uwalniany jest z aspartamu pod wpływem chymotrypsyny [44]. Metanol w organizmie jest utleniany do formaldehydu i dalej do kwasu mrówkowego wykazujących działanie toksyczne [30]. Spożycie produktów zawierających aspartam wiąże się z występowaniem suchości w jamie ustnej, zmianami nastroju, wymiotami, a także chronicznym bólem głowy [45]. W badaniach na szczurach wykazano również potencjalne działanie rakotwórcze tego słodziku. U samców zaobserwowano zwiększone występowanie i wzrost nowotworów złośliwych, a u obu płci większą częstotliwość chłoniaka i białaczki. Zastosowana w badaniu dawka była zbliżona do tej, która jest dopuszczona do stosowania u ludzi [46].

Acesulfam – K (Rys. 3) to słodzik charakteryzujący się szybko wyczuwalnym słodkim smakiem [44], który jednak w wyższych stężeniach może dawać niepożądany posmak [47]. Związek jest wysoce termostabilny, a także rozpuszczalny, dzięki czemu może być stosowany w wytwarzaniu różnorodnych produktów spożywczych [44].



Rysunek 3. Struktura chemiczna acesulfamu - K  
Figure 3. Chemical structure of acesulfame – K

W badaniach na myszach wykazano, że słodzik ten podawany w wysokiej dawce (60 mg/kg masy ciała) uszkadza ich materiał genetyczny [48].

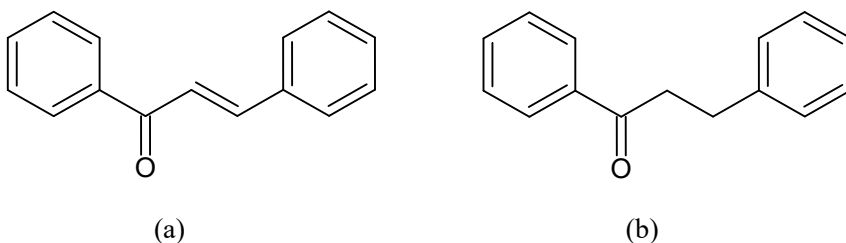
Taumatyna to, na chwilę obecną, jedyny alternatywny słodzik produkowany na skalę przemysłową. Została ona wyizolowana z owoców afrykańskiej rośliny *Thaumatococcus daniellii*. Związek ten jest białkiem występującym pod postacią pięciu różnych form [49]. Taumatyna ulega całkowitemu rozkładowi w organizmie ludzkim i uważa się, że jest bezpieczna dla zdrowia. Cechuje się też dużo wyższą słodkością od sacharozy (tab. 1). Jej wadą jest mało opłacalny proces ekstrakcji z materiału roślinnego [50].

Alternatywne słodziki pozwalają zmniejszyć spożycie cukru i obniżyć kaloryczność przyjmowanych posiłków, co ma bezsprzecznie pozytywny wpływ na zdrowie ludzi. Niestety, coraz częściej spożycie substancji słodzących wiązane jest z różnorodnymi, nierzadko poważnymi, problemami zdrowotnymi. Wśród nich należy wymienić dysbiozę mikrobioty jelitowej [51], stan zapalny [26], przyczynianie się do chorób układu krążenia [52], nowotworów układu moczowego u kobiet [53], a nawet, paradoksalnie, zaburzeń metabolicznych i otyłości [51,54]. Z tego powodu stale poszukuje się alternatyw, które byłyby całkowicie bezpieczne dla ludzi, a najlepiej – dodatkowo pozytywnie wpływałyby na ich zdrowie.

#### 4. POTENCJAŁ DIHYDROCHALKONÓW DO STOSOWANIA JAKO SŁODZIKI

Chalkony to wtórne metabolity roślin, są zaliczane do związków flawonoidowych. W roślinach stanowią prekursorów dla flawanonów, flawonów

i izoflawonów. Cechą charakterystyczną tej grupy związków jest intensywna żółta lub pomarańczowa barwa [55,56]. Chalkony składają się z dwóch pierścieni aromatycznych połączonych trójwęglową  $\alpha,\beta$ -nienasyconą karbonylową strukturą. Po raz pierwszy ich syntezę chemiczną dokonało dwóch uczonych – Kostanecki i Tambor i oni są twórcami nazwy „chalkony” [57,58]. Związki te ze względu na łatwość pozyskiwania na drodze syntez chemicznej, a także szeroki wachlarz aktywności biologicznych są potencjalnie atrakcyjnymi kandydatami na substancje aktywne środków farmaceutycznych, a także dodatki do żywności. Udowodniono, że te roślinne polifenole wykazują aktywność m. in. przeciwutleniającą, przeciwzapalną, przeciwmikrobiologiczną, przeciwnowotworową, przeciwcukrzycową, przeciwotyłościową, hepatoprotekcyjną, a także kardioprotekcyjną [57–59].



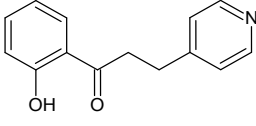
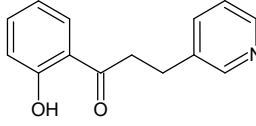
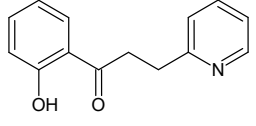
Rysunek 4. Struktura chemiczna chalkonu (a) i dihydrochalkonu (b)  
Figure 4. Chemical structure of chalcone (a) and dihydrochalcone (b)

Dzięki uwodornieniu chalkonów uzyskuje się dihydrochalkony (Rys. 4) – związki o wysokim potencjale do zastosowania jako syntetyczne słodziki [60]. Smak tej grupy związków silnie zależy od struktury związku i obecnych w nim podstawników [61], nie wszystkie dihydrochalkony są słodkie, a ich smak może zależeć również od stężenia (Tab. 2) [62].

Dihydrochalkony, podobnie jak chalkony są syntezowane w roślinach, często w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny. Biosynteza tych dwóch klas związków flawonoidowych przebiega podobnie, jednak biosynteza dihydrochalkonów wymaga przekształcenia p-kumaroilo-CoA, głównego prekursora chalkonów otrzymywanego drogą szikimową, w p-dihydrokumaroilo-CoA przez dehydrogenazę zależną od NADPH. Uważa się, że syntaza chalkonu katalizuje wtedy addycję trzech cząsteczek malonylo-CoA, otrzymanego na szlaku poliketydowym, do jednej cząsteczki p-dihydrokumaroilo-CoA. Pierścień A powstaje zatem na szlaku poliketydowym, natomiast B jest tworzony na szlaku fenylopropanoidowym [63].

Tabela 2. Porównanie dihydrochalkonów z azotem wbudowanym w pierścień B. Na podstawie [62]

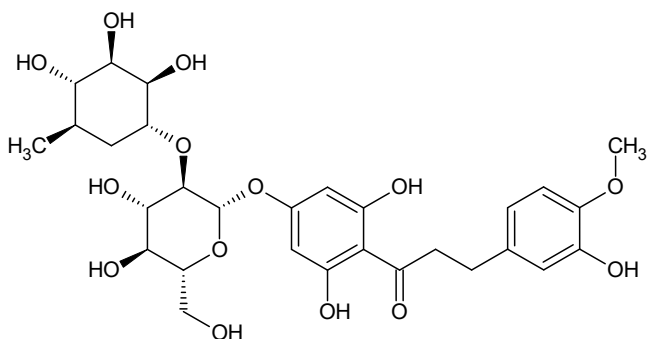
Table 2. Comparison of dihydrochalcones with nitrogen incorporated into the B ring. Based on [62]

		
0,01-0,1 ppm – brak	0,1 ppm – brak smaku	-
1 ppm – bardzo słabo słodki	1 ppm – słaby słodki smak, cierpki	1 ppm – umami
10 ppm – słodki	10 ppm – opóźniony słodki smak, cierpki	10 ppm – silny smak podobny do umami
100 ppm – bardzo słodki, lukrecyjowy	100 ppm – słabo słodki, chemiczny, gorzki	100 ppm – intensywny umami, lekko gorzki

Podobnie jak inni przedstawiciele związków flawonoidowych, również dihydrochalkony są wysoce aktywne biologicznie. Ich prozdrowotne działanie to między innymi aktywność przeciwutleniająca, przeciwzapalna, przeciwdiabetyczna, przeciwnowotworowa, czy hepatoprotekcyjna [63,64].

Słodki smak, bliska zerowej kaloryczność, naturalne pochodzenie i wykazywane działanie prozdrowotne czynią z dihydrochalkonów atrakcyjnych kandydatów na nowoczesne dodatki do żywności.

Najlepiej zbadanym związkiem jest dihydrochalkon neohesperydyny (NHDC) (Rys. 5), który po raz pierwszy został opisany jako intensywnie słodka substancja przez Horowitza w 1963 roku [60]. Związek ten pozyskać można poprzez chemiczną modyfikację neohesperydyny – naturalnego glikozydu flawonoidowego, który obecny jest w skórce gorzkiej pomarańczy [60,65].



Rysunek 5. Struktura chemiczna dihydrochalkonu neohesperydyny

Figure 5. Chemical structure of neohesperidin dihydrochalcone

NHDC nie tylko wykazuje słodkość około 1500 razy wyższą od sacharozy, ale również hamuje aktywność receptorów smaku gorzkiego [66]. Posmak NHDC określa się jako lukrecjowy, jego kaloryczność to około 2 kcal/1 g (8.4 kJ), co ze względu na stosowanie tego dodatku w bardzo małych ilościach nie ma dużego znaczenia żywieniowego. Istotną zaletą tego związku jest wysoka stabilność termiczna [50]. Dzięki temu dihydrochalkon neohesperydyny jest stosowany w przemyśle spożywczym i jest zarejestrowany w krajach Unii Europejskiej jako dodatek E959 [64,67].

NHDC może być wykorzystywany zarówno jako słodzik w napojach, gumach do żucia czy sosach, a także jako modyfikator smaku w margarynach, produktach mięsnych i galaretkach owocowych. Znane jest również zastosowanie tego związku w preparatach farmaceutycznych do maskowania gorzkiego smaku substancji aktywnych, a także jako dodatku poprawiającego smak pasz [68].

#### 4.1. EKSTRAKCJA DIHYDROCHALKONÓW Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO

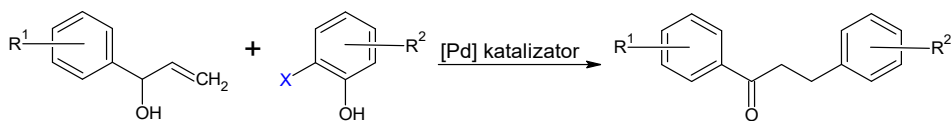
Naturalnym źródłem dihydrochalkonów są rośliny, a najbardziej bogate w te związki są jabłonie zawierające do 14% dihydrochalkonów w suchej masie liści. Dihydrochalkony można pozyskać z materiału roślinnego poprzez ekstrakcję z użyciem takich rozpuszczalników, jak etanol, eter dietylowy, metanol, heksan, dichlorometan, a także dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym [64,69]. Tradycyjne metody ekstrakcji obarczone są szeregiem niedogodności – stosowane rozpuszczalniki są nierzadko toksyczne, czas ekstrakcji sięga kilkunastu dni, proces prowadzony jest często w wysokiej temperaturze, co jest wysoce energochłonne i może powodować degradację wrażliwych związków [70]. Materiał roślinny nierzadko jest trudny do pozyskania, metabolity wtórne zazwyczaj syntezowane są w niewielkich ilościach i tylko w określonych organach roślinnych, uprawa uzależniona jest od warunków klimatycznych. Często musi upłynąć wiele lat, by materiał roślinny zawierał metabolity w satysfakcjonujących ilościach, dla przykładu, korzenie *Panax ginseng* (żeń-szeń) są gotowe do zbioru po około sześciu latach, a cisy najwięcej taksolu produkują dopiero po około sześćdziesięciu latach [71].

#### 4.2. SYNTEZA CHEMICZNA DIHYDROCHALKONÓW

Chemicznie dihydrochalkony można otrzymać między innymi przez regioselektywną redukcję podwójnego wiązania węgiel-węgiel w  $\alpha,\beta$ -nienasyconych ketonach.

Do bezpośredniego uwodornienia chalkonów do dihydrochalkonów niezbędne jest użycie soli (kompleksów) metali, takich jak iryd, pallad, ruten, czy nikiel [72].

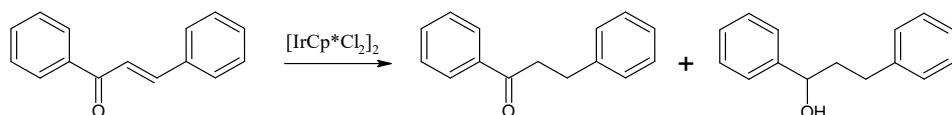
Odczynniki stosowane w tych reakcjach są silnie łatwopalne, z tego względu muszą być zachowane ściśle kontrolowane warunki reakcji [73]. Briot w 2004 roku zaproponował użycie palladu do otrzymywania dihydrochalkonów. Przykładowa reakcja została umieszczona na schemacie 1. Arylowanie palladem 1-arylo-2-propen-1-olu, jest kluczowym etapem procesu. Dzięki tej metodzie możliwe jest otrzymanie szerokiego wachlarza różnorodnych pochodnych [74].



Schemat 1. Chemiczna synteza dihydrochalkonu ( $R^1R^2$ : -H, -OH, -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -Br, -Cl etc.) [74]

Scheme 1 Chemical synthesis of dihydrochalcone ( $R^1R^2$ : -H, -OH, -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -Br, -Cl etc.) [74]

Redukcja  $\alpha,\beta$ -nienasyconych ketonów zachodzi również przy użyciu innych katalizatorów, takich jak  $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$  [75] (Schemat 2).



Schemat 2. Przebieg reakcji uwodornienia z zastosowaniem  $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$  [75]

Scheme 2 The course of the hydrogenation reaction with  $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$  [75]

Wydajność tej reakcji w optymalnych warunkach była bardzo wysoka i wynosiła 83-99%. Najwyższą wydajność tworzenia się dihydrochalkonu - 99% uzyskano stosując  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (5 mol%) w propanolu [75]. Zestawienie warunków reakcji wraz z uzyskanymi wydajnościami przedstawiono w tabeli 3.

Innym katalizatorem umożliwiającym przeprowadzenie chemoselektywnego uwodornienia są metaliczne nanocząstki rutenu [76]. Substratami wykorzystanymi w badaniu były 3-buten-2-on, 3-penten-2-on oraz 4-metyl-3-penten-2-on. Katalizatorem były nanocząstki rutenu o średnicy 7nm. Reakcja przebiegła z bardzo wysoką selektywnością wynoszącą >99.9%. Kolejną zaletą omawianego procesu są jego łagodne warunki (roztwór etanolu, 35°C, 1–10 bar  $\text{H}_2$ ) i możliwość wielokrotnego stosowania nanocząsteczek rutenu w reakcjach uwodorniania nienasyconych ketonów [76].

Kolejną bardziej przyjazną dla środowiska naturalnego metodą umożliwiającą chemoselektywną redukcję  $\alpha,\beta$ -nienasyconych związków karbonylowych, w tym chalkonów, jest zastosowanie kompleksów palladu z N-heterocyklicznymi karbenami. Stosowanie karbenowych kompleksów palladu jest zgodne z zaleceniami zielonej chemii ze względu na możliwość ich regeneracji i ponownego wykorzystania [64].

Tabela 3. Zestawienie reagentów w reakcji uwodornienia chalkonu wraz z wydajnością. Do reakcji zastosowano: chalkon (0,2 mmol),  $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$  (1mol%), reagent (0,5 equiv.), rozpuszczalnik (1ml), 85°C, 5h [75]

Table 3. List of reagents used in the chalcone hydrogenation reaction along with the yield. The following were used in the reaction: chalcone (0.2 mmol),  $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$  (1mol%), reagent (0.5 equiv.), solvent (1ml), 85°C, 5h [75]

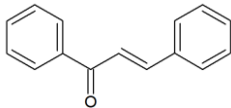
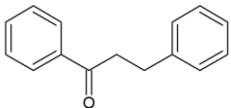
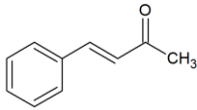
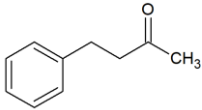
L.p.	Rozpuszczalnik	Reagent	Wydajność [%]	
			Dihydrochalkon	Alkohol
1	MeOH	$\text{K}_2\text{CO}_3$	31	0
2	EtOH	$\text{K}_2\text{CO}_3$	36	0
3	1-PrOH	$\text{K}_2\text{CO}_3$	70	0
4	1-BuOH	$\text{K}_2\text{CO}_3$	57	0
5	2-PrOH	$\text{K}_2\text{CO}_3$	92	0
6	2-PrOH	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	89	0
7	2-PrOH	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	61	64
8	2-PrOH	KOH	2	86
9	2-PrOH	NaOH	3	84
10	2-PrOH	$\text{NEt}_3$	14	0
11*	2-PrOH	$\text{K}_2\text{CO}_3$	99	0
12	2-PrOH	-	66	0

11\* - zastosowano 5mol%  $\text{K}_2\text{CO}_3$

Kolejnym selektywnym katalizatorem umożliwiającym uwodornianie podwójnego wiązania w  $\alpha,\beta$ -nienasyconych ketonach jest  $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$  [77]. Zastosowanie wodorku miedzi na powierzchni pirogenicznej krzemionki umożliwia uzyskanie większej aktywności i selektywności katalizatora. Część zastosowanych w badaniu związków uległa konwersji w bardzo wysokim procencie i z dużą selektywnością (Tabela 4), dodatkową zaletą tej reakcji jest brak produktów ubocznych, takich jak alkohole [77].

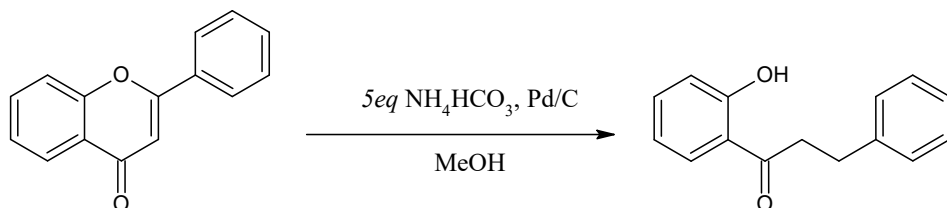
Tabela 4. Uwodornienie nienasyconych ketonów w obecności 8%  $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$ , 1 atm  $\text{H}_2$ , temperatura: 90°C, rozpuszczalnik – toluen. Wybrane związki na podstawie [77]

Table 4. Hydrogenation of unsaturated ketones in the presence of 8%  $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$ , 1 atm  $\text{H}_2$ , temperature: 90°C, solvent – toluene. The compounds were selected based on [77]

Lp.	Substrat	Produkt	Czas [h]	Konwersja [%]	Selektywność [%]
1			3	100	100
2			6	100	96

2'-Hydroksydihydrochalkony można również otrzymać przez chemiczne rozszczepienie pierścienia C we flawonie, które zachodzi podczas katalitycznego

uwodornienia. Flawon w reakcji z mrówczanem amonu w obecności Pd/C w metanolu i w atmosferze azotu dał 2'-hydroksydihydrochalkon z 20% wydajnością (Schemat 3) [78].



Schemat 3. Katalityczne uwodornienie flawonu z towarzyszącym mu rozszczepieniem pierścienia C [78]

Scheme 3 Catalytic hydrogenation of a flavone with C-ring cleavage [78]

Dostępne na rynku hydroksypochodne związków flawonoidowych, takie jak kwercetyna i naryngenina również mogą stanowić substraty do produkcji dihydrochalkonów. Opisano pięcioetapowy proces, w którym wydajność wynosi od 23% do 37% [64]

Większość opisywanych w literaturze chemicznych metod syntezy dihydrochalkonów z odpowiadających im flawonów, czy chalkonów jest nieopłacalna ekonomicznie, ponieważ wymaga przynajmniej dwuetapowej syntezy, wydzielenia odpowiedniego produktu pośredniego i skomplikowanej procedury uwodorniania pod wysokim ciśnieniem [64].

Znaczna część odczynników, które stosuje się w omawianych powyżej reakcjach jest toksyczna i szkodliwa dla środowiska. Z tego względu należy wybierać reagenty odnawialne, które zmniejszają ilość odpadów. Katalizatory powinny cechować się jak najwyższą selektywnością, a uzyskiwane produkty nie powinny pozostawać w środowisku [79].

#### 4.3. ZNACZENIE BIOTRANSFORMACJI W SYNTEZIE DIHYDROCHALKONÓW

W porównaniu ze swoimi chemicznymi odpowiednikami enzymy są uznane za zielone katalizatory, ponieważ pozyskiwane są z surowców odnawialnych i działają w łagodnych warunkach temperatury i ciśnienia. Ogromną zaletą katalizowanych przez nie reakcji jest ich wysoka regio- i enancjoselektywność [80–82]. Biokataliza staje się ważnym narzędziem do produkcji związków chemicznych o złożonej strukturze. Do skali przemysłowej opracowano już co najmniej 134 procesy biotransformacji [83].



Enzymy pochodzenia mikrobiologicznego odznaczają się wieloma zaletami:

-Są aktywne i stabilne.

-Katalizują reakcje z dużą wydajnością, a zmieniając warunki reakcji (zastosowane medium reakcji, temperatura, dodatek jonów metali) można wpływać na rodzaj i ilość wytwarzanego produktu.

-Dzięki rozwojowi procesów fermentacji szczególnie wyselekcjonowane szczepy są w stanie wytwarzać oczyszczone, dobrze scharakteryzowane enzymy na dużą skalę.

-Materiał genetyczny mikroorganizmów jest łatwy do sekwencjonowania, wiele genomów jest dostępnych w otwartych bazach danych, co umożliwia badania bioinformatyczne i odkrywanie nowych sekwencji kodujących białka o aktywności enzymatycznej.

-Mikroorganizmy będące źródłem enzymów wykorzystywanych w biotechnologii są bardziej podatne na modyfikowanie narzędziami inżynierii genetycznej, co umożliwia otrzymywanie nowych preparatów enzymatycznych o poprawionych właściwościach i wyższych możliwościach aplikacyjnych w przemyśle [81,84,85].

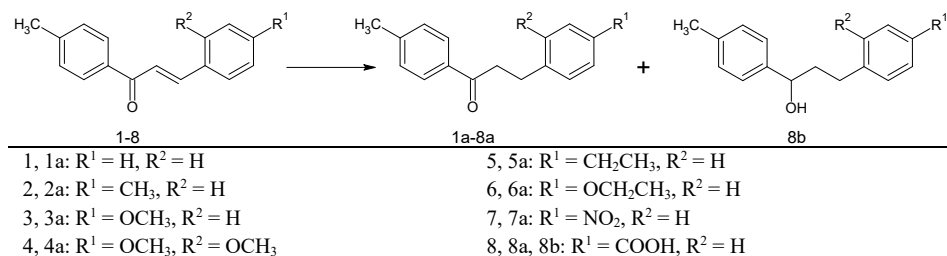
Biotransformacje oparte na oczyszczonych enzymach nie są jednak również wolne od wad, do których należą pracochłonne procedury izolowania i oczyszczania enzymów, wysoki koszt, większa wrażliwość na zmiany warunków środowiska reakcji oraz toksyczność substratu lub wytwarzanego produktu, a także konieczność stosowania drogich kofaktorów enzymów. Biokatalizatory całokomórkowe mogą być namnażane z wykorzystaniem niedrogich podłoży, umożliwiają kaskadowe przemiany substratów, wspomagają regenerowanie kofaktorów, zatem są tańszą i efektywną alternatywą dla preparatów enzymatycznych [82,86,87].

#### 4.4. PRZYKŁADY BIOTECHNOLOGICZNEGO WYTWARZANIA DIHYDROCHALKONÓW

Bogaty aparat enzymatyczny wielu grup drobnoustrojów umożliwia uzyskanie produktów *trans*-uwodornienia wiązania podwójnego trójwęglowego fragmentu chalkonu [88]. Przeprowadzone do tej pory badania dowodzą, że transformacje chalkonów do dihydrochalkonów możliwe są przy wykorzystaniu jako biokatalizatorów komórek bakterii, grzybów strzępkowych, czy drożdży [89]. Odnalezione w literaturze przykłady przedstawiają wyłącznie biokatalizatory całokomórkowe, brak jest prac opisujących wykorzystanie czystych enzymów do otrzymywania dihydrochalkonów.

## 4.4.1 BIAKATALIZATORY PROKARIOTYCZNE

Wiele gatunków bakterii jest zdolnych do uwodorniania podwójnego wiązania w  $\alpha,\beta$ -nienasyconych ketonach [90]. W badaniach, w których jako substraty zastosowano pochodne 4'-metylochalkonu, biokatalizatory stanowiły bakterie *Gordonia* sp. DSM44456 i *Rhodococcus* sp. DSM364 (schemat 4).

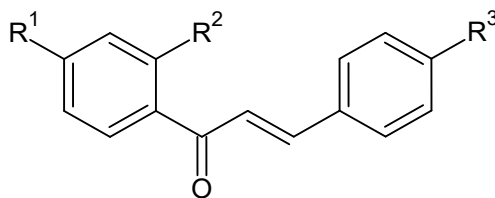


Schemat 4. Biotransformacje pochodnych 4'-metylochalkonu przy zastosowaniu *Gordonia* sp. DSM44456 i *Rhodococcus* sp. DSM364. Na podstawie [90].

Scheme 4. Biotransformations of 4'-methylchalcone derivatives using: *Gordonia* sp. DSM44456 and *Rhodococcus* sp. DSM364 [90]

Reakcja w kulturach obu szczepów przebiegała z wysoką wydajnością wynoszącą od 38% do ponad 99%. 4'-Metylochalkon oraz jego pochodne podstawione grupami alifatycznymi, alkoksylowymi, a także grupą nitrową (1-7) dały wyłącznie produkty redukcji podwójnego wiązania, natomiast w przypadku 4'-metylochalkonu podstawionego grupą karboksylową (8) powstał także produkt dodatkowej redukcji grupy karbonylowej chalkonu. Analizując przebieg biotransformacji substratu 8 odkryto, że po pierwszej godzinie zarówno szczepy *Gordonia* sp., jak i *Rhodococcus* sp. wytworzyły wyłącznie produkt 8a (Schemat 7), redukcja grupy karbonylowej (produkt 8b) rozpoczynała się dopiero od szóstej godziny inkubacji z substratem. Omawiane powyżej biokatalizatory bakteryjne wykorzystano również w biotransformacjach chalkonu, 4-metoksychalkonu i chalkonu naryngeniny. Wszystkie reakcje przebiegały chemoselektywnie skutkując wyłącznie tworzeniem się nasyconych pochodnych 1,3-difenylo-1-propanonu. Po 72 godzinach uzyskano produkty z wydajnością od 13% do 94% [91].

W badaniach Stompor i wsp. zastosowali siedem różnorodnie podstawionych chalkonów pozyskanych na drodze syntezy chemicznej (Rys. 6) i jeden komercyjnie zakupiony chalkon bez dodatkowych grup funkcyjnych [92].



1: R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H, R <sup>3</sup> = Cl	5: R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> ; R <sup>2</sup> = H; R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>
2: R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H, R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>	6: R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> ; R <sup>2</sup> = H; R <sup>3</sup> = OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
3: R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = OH, R <sup>3</sup> = CH <sub>3</sub>	7: R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> ; R <sup>2</sup> = H; R <sup>3</sup> = Br
4: R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> ; R <sup>2</sup> = H; R <sup>3</sup> = H	8: R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = R <sup>3</sup> = H

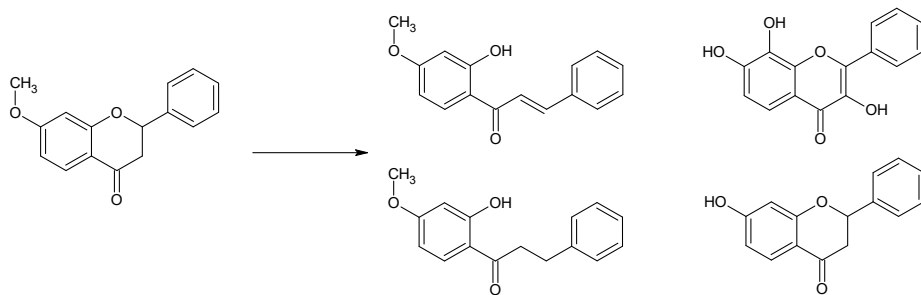
Rysunek 6. Substraty zastosowane do otrzymania dihydrochalkonów w kulturach bakterii z rodzajów *Rhodococcus* i *Lactobacillus* i drożdży z rodzaju *Rhodotorula* [92]

Figure 6. Substrates used to obtain dihydrochalcones in cultures of bacteria of the genus *Rhodococcus* and *Lactobacillus* and yeast of the genus *Rhodotorula* [92]

Wykorzystując jako biokatalizatory bakterie z rodzaju *Rhodococcus* i *Lactobacillus*, a także drożdże z rodzaju *Rhodotorula* uzyskano redukcję wiązania podwójnego chalkonów z wydajnością od 12% do 72% w czasie od 3 do 7 dni [92].

Wydajnymi mikroorganizmami zamieszkującymi środowisko wodne zdolnymi do przekształcania chalkonów okazały się cyjanobakterie. W doświadczeniu substratem był chalkon, a biokatalizatorami halofilne komórki *Spirulina platensis*, a także słodkowodne: *Anabaena laxa*, *Anabaena sp.*, *Aphanizomenon klebahnii*, *Nodularia moravica*, *Chroococcus minutus*, *Merismopedia glauca* and *Synechocystis aquatilis*. Wszystkie testowane organizmy były zdolne do redukcji podwójnego wiązania chalkonu w ciągu 14 dni biotransformacji, z różną wydajnością wynoszącą od 3% do >99%. Cyjanobakterie *Anabaena sp.* i *C. minutus* poza głównym produktem wytwarzały niewielkie ilości produktów redukcji grupy karbonylowej [89].

Chalkony na drodze biotransformacji mogą powstawać nie tylko w wyniku uwodornienia odpowiednich chalkonów, ale także otwarcia heterocyklicznego pierścienia C flawanonów. Takie uzdolnienia posiada szczep bakterii *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, który 7-metoksyflawanon przekształcał do czterech różnych produktów w wyniku hydroksylacji, *O*-demetylacji, dehydratacji i otwarcia pierścienia C (Schemat 5). W tym ostatnim przypadku zaobserwowano utworzenie się zarówno dihydrochalkonu, jak i chalkonu. Dihydrochalkon powstał z niewielką wydajnością wynoszącą 3.7% [93].



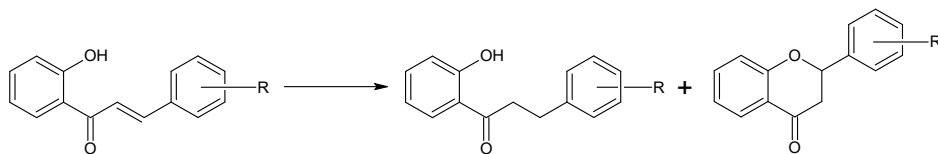
Schemat 5. Biotransformacje 7-metoksyflawanonu w kulturze bakterii *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 [93]

Scheme 5. Biotransformations of 7-methoxyflavanone in *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 strain culture [93]

Omawiane bakterie przekształciły, zastosowany jako substrat 5,7-dimetoksyflawanon w ciągu 12 dni, wyłącznie do analogicznego dihydrochalkonu i chalkonu z wydajnościami, odpowiednio 54.1% i 2.7%. Prawdopodobnie chalkon jest produktem pośrednim prowadzącym do powstania dihydrochalkonu [93].

#### 4.4.2 BIOKATALIZATORY EUKARIOTYCZNE

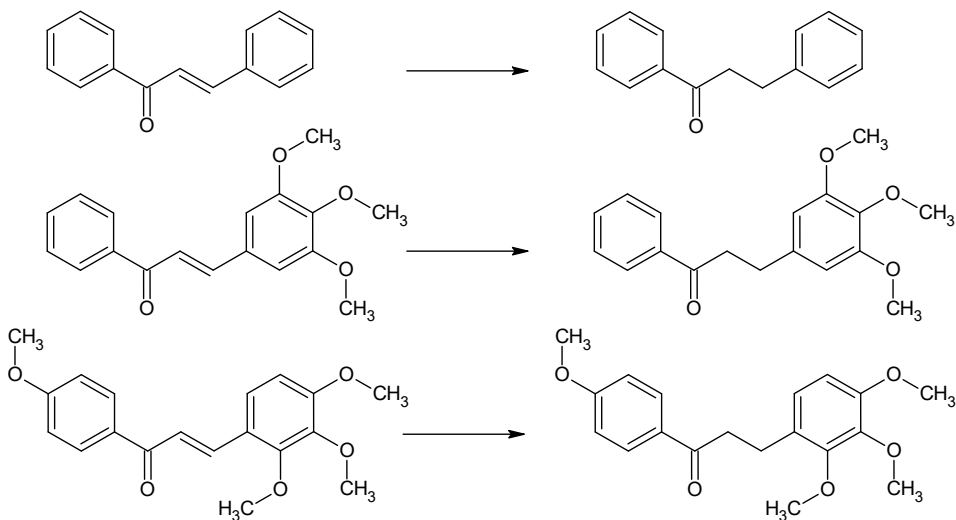
Dobrym źródłem enzymów redukujących wiązanie podwójne jest morski grzyb *Penicillium raistrickii* CBMAI 931. W doświadczeniu substraty stanowiła grupa 2'-hydroksychalkonów zawierających grupę metoksyłową, a także atomy fluorowców – Cl, Br, F. Wiązania podwójne we wszystkich substratach zostały zredukowane w ciągu 14 dni, a wydajność wyniosła od 25% do 83%. Oprócz dihydrochalkonów, produktami reakcji były flawanony powstające z wydajnością 3-9% (schemat 6). Na stopień konwersji substratu wpływał rodzaj podstawnika obecnego w substracie. Badany szczep przekształcał z nieznacznie większą wydajnością 2'-hydroksychalkon, gdy w pierścieniu B w pozycji *para* obecna była grupa metoksyłowa (53%), niż kiedy w tej samej pozycji znajdowała się silnie elektroujemna grupa akceptorowa – Cl (41%). Stopień lipofilności podstawnika skorelowany był ze stopniem konwersji substratu, prawdopodobnie dlatego, że związki zawierające bardziej lipofilne podstawniki mogą lepiej przenikać przez błonę komórkową. W przytoczonym eksperymencie bromopochodne chalkonów biotransformowane były z większą wydajnością od analogicznych chloropochodnych, a najwyższe wydajności uzyskano dla chalkonu zawierającego atom fluoru. Wynikać to może z tworzenia się silnych wiązań wodorowych pomiędzy fluorem a resztami aminokwasów tworzących centrum aktywne w enzymie [94,95].



Schemat 6. Chemoselektywna hydrogenacja 2'-hydroksychalkonów w kulturze *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 [95]

Scheme 6. Chemoselective hydrogenation of 2'-hydroxychalcones in the culture of *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 [95]

Szczepy grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*, które wcześniej szeroko stosowane były w biotransformacjach flawonów [96], również posiadają zdolność do przekształcania chalkonów w dihydrochalkony. Endofityczne grzyby z gatunku *Aspergillus flavus* są zdolne do redukowania podwójnego wiązania chalkonu, 3,4,5-trimetoksychalkonu i 2,3,4,4'-tetrametoksychalkonu (Schemat 7). Wydajność wynosiła od 15.6% dla 2,3,4,4'-tetrametoksychalkonu do 74.5% dla chalkonu [97].



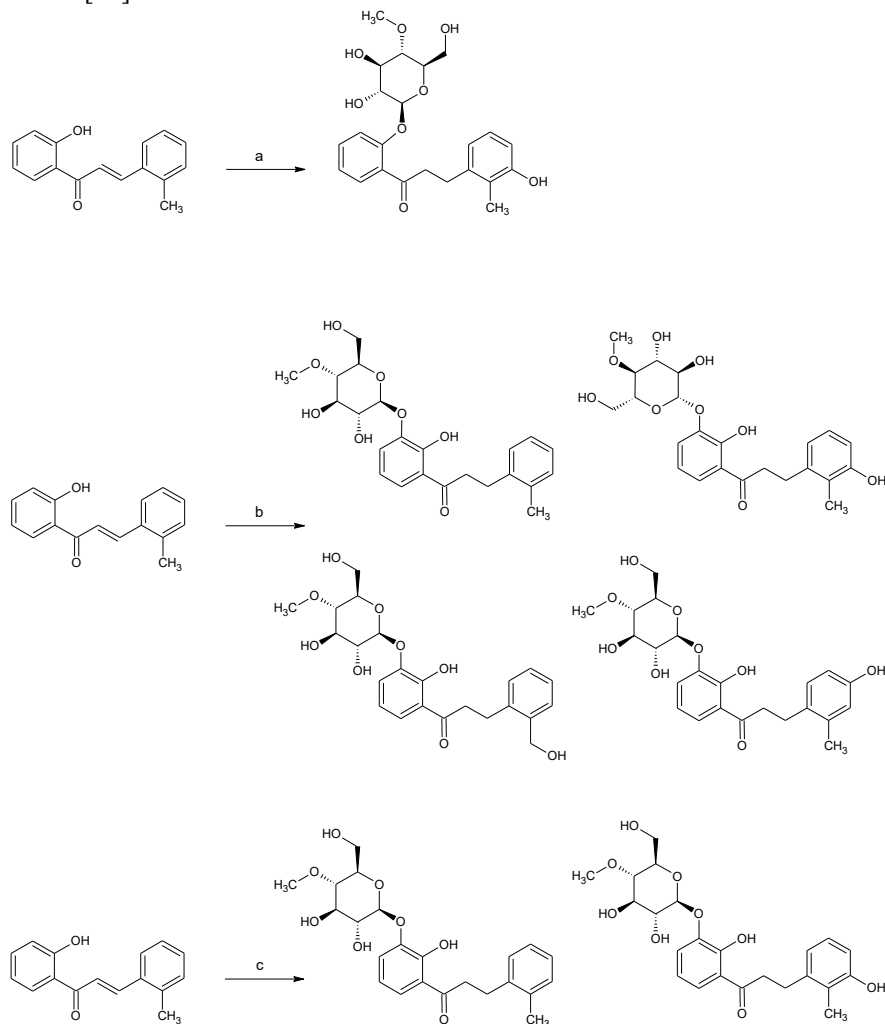
Schemat 7. Biotransformacje chalkonu i jego metoksy pochodnych przeprowadzonych przez *Aspergillus flavus* [97]

Scheme 7. Biotransformations of chalcone and its methoxy derivatives carried out by *Aspergillus flavus* [97]

Entomopatogenne grzyby strzępkowe, od niedawna stosowane do biotransformacji związków flawonoidowych, w swoich komórkach wytwarzają enzymy umożliwiające kaskadowe przekształcenia ksenobiotyków. Mikroorganizmy

te są zdolne nie tylko do prowadzenia redukcji podwójnego wiązania chalconów, ale jednocześnie wprowadzają do struktury związku cząsteczki 4-*O*-metyloglukopiranozy, dzięki czemu poprawiają ich stabilność, rozpuszczalność w wodzie i biodostępność [98,99].

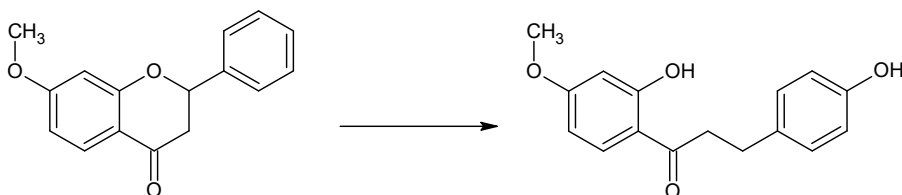
2'-Hydroksy-2-metylochalcon uzyskany na drodze syntezy chemicznej został poddany biotransformacjom w hodowlach szczepów *Beauveria bassiana* KCH J1.5, *Isaria fumosorosea* KCH J2 i *Isaria farinosa* KCH J2.6. W rezultacie otrzymano pięć nowych glikozylowanych dihydrochalconów (Schemat 8) z wydajnością od 2.9% do 13.1% [99].



Schemat 8. Biotransformacje 2'-hydroksy-2-metylochalconu w kulturach: *Isaria fumosorosea* KCH J2 (a), *Beauveria bassiana* KCH J1.5 (b) i *Isaria farinosa* KCH J2.6 (c) [99]

Scheme 8. Biotransformations of 2'-hydroxy-2-methylchalcone in the cultures of: *Isaria fumosorosea* KCH J2 (a), *Beauveria bassiana* KCH J1.5 (b) and *Isaria farinosa* KCH J2.6 (c) [99]

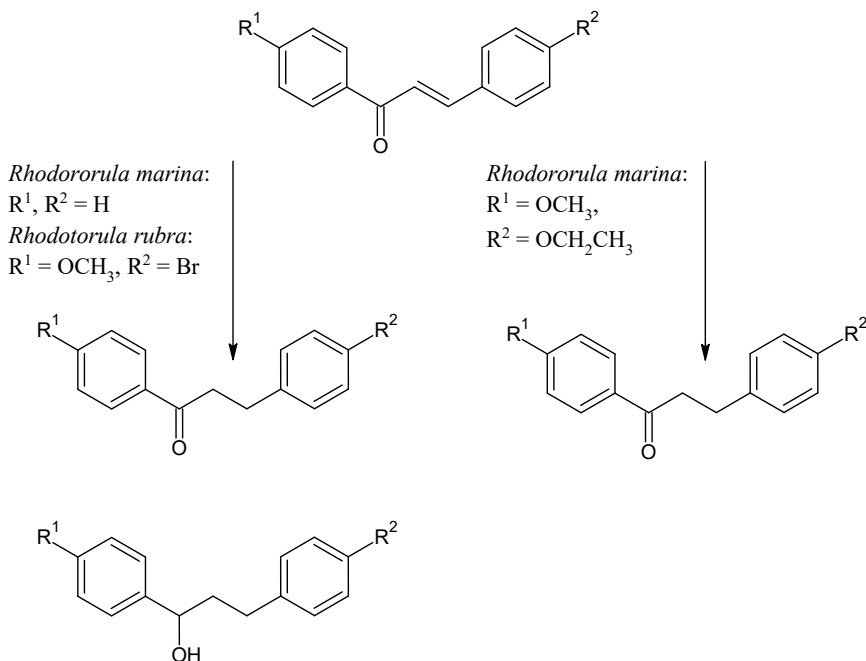
Podobnie jak wspomniany wcześniej szczep bakterii *S. maltophilia* KB2, również grzyb strzępkowy *Penicillium chermesinum* 113 posiada zdolność konwersji flawanonów do odpowiednich dihydrochalkonów. W kulturze tego szczepu 7-metoksyflawanon został przekształcony wyłącznie do 4,2'-dihydroksy-4'-metoksydihydrochalkonu z wydajnością izolowaną wynoszącą 15% po 15 dniach biotransformacji (Schemat 9). 7-Metoksyflawon w kulturze tego samego szczepu uległ jedynie hydroksylacji w pozycję C-4' [100].



Schemat 9. Biotransformacje 7-metoksyflawanonu w kulturze szczepu *Penicillium chermesinum* 113 [100]

Scheme 9. Biotransformations of 7-methoxyflavanone in *Penicillium chermesinum* 113 strain culture [100]

Komórki drożdży stanowią bardzo wydajne narzędzie do produkcji dihydrochalkonów z chalkonów. Schemat 10 przedstawia przykładową redukcję biokatalizowaną komórkami drożdży.



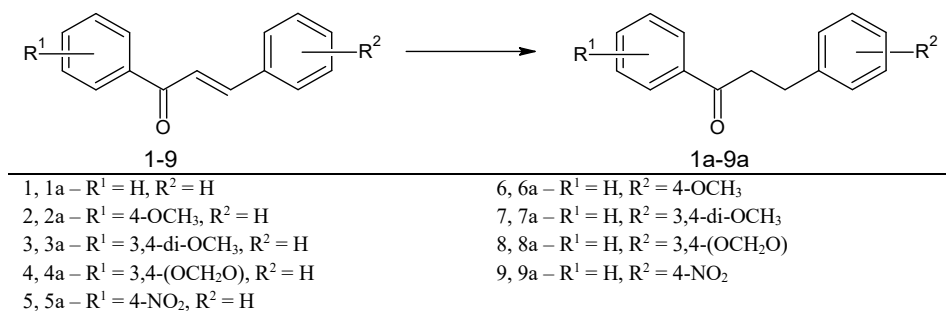
Schemat 10. Przykład biotransformacji chalkonu z użyciem drożdży *Rhodotorula marina* i *Rhodotorula rubra* [79]

Scheme 10. An example of chalcone biotransformation using yeasts *Rhodotorula marina* and *Rhodotorula rubra* [79]

Drożdże z rodzaju *Rhodotorula* posiadają zdolność przekształcania chalkonów niepodstawionych, a także podstawionych grupą metoksyową, czy bromem [56,92].

Janeczko i wsp. porównali przebieg biotransformacji pomiędzy kilkoma gatunkami drożdży (*Yarrowia lipolytica* KCh 71, *Rhodotorula glutinis* KCh 242, *Rhodotorula rubra* KCh 4, *Saccharomyces cerevisiae* KCh 464) i grzybów strzępkowych (*Syncephalastrum racemosum* KCh 105, *Chaetomium* sp. KCh 6651, *Didymosphaeria igniaria* KCh 6670, *Absidia coerulea* KCh 93, *Fusarium culmorum* KCh 10) i wykazali, że pierwsza grupa mikroorganizmów jest zdolna do redukcji podwójnego wiązania chalkonów dużo szybciej. Już po jednej godzinie biotransformacji od 80 do 99% substratu (chalkonu i 2'-hydroksychalkonu) ulegało konwersji. W większości przypadków po trzech godzinach procesu następował jednak spadek zawartości dihydrochalkonu w mieszaninie poreakcyjnej, co było spowodowane redukcją grupy karbonylowej [56].

Modelowy biokatalizator drożdżowy stanowią komórki *Saccharomyces cerevisiae*, które są w stanie zredukować różnie podstawione chalkony (Schemat 11).



Schemat 11. Bioredukcja chalkonu i jego pochodnych przez *Saccharomyces cerevisiae* [101]

Scheme 11. Bioreduction of chalcone and its derivatives by *Saccharomyces cerevisiae* [101]

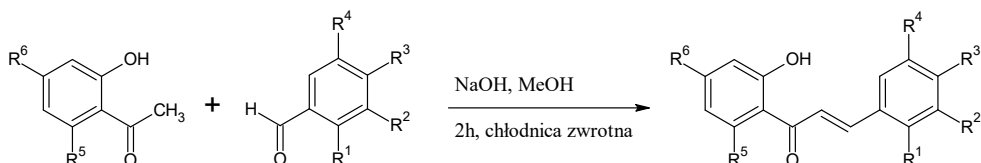
W przypadku wszystkich zastosowanych substratów głównemu produktowi nie towarzyszyły produkty uboczne, takie jak alkohole. Dodatkowo zbadano, jak warunki podczas biotransformacji wpływają na jej przebieg, dzięki czemu wykazano, że temperatura 35-45°C i pH  $\geq$  5,5 są najkorzystniejsze i umożliwiają >99% konwersję substratów. Również gęstość komórek biokatalizatora wpływa na wydajność redukcji, a najlepsze wyniki uzyskano dla gęstości 100 g/L całych komórek *S. cerevisiae* [101].

Spośród drożdżowych biokatalizatorów na szczególną uwagę zasługuje gatunek *Y. lipolytica*. Stale rosnące zainteresowanie tymi drożdżami wynika z ich potencjału do katalizowania różnorodnych reakcji, a także łatwości w hodowli wynikającej między innymi z wysokiej tolerancji na zmiany pH, stężenia soli oraz



akceptowania szerokiej gamy źródeł węgla, co podnosi ekonomiczną opłacalność procesu. Co ważniejsze, status GRAS (Generally Recognized As Safe) czyni szczepy tych drożdży atrakcyjnym i przyjaznym dla środowiska narzędziem mikrobiologicznym do produkcji nutraceutyków, żywności fermentowanej i suplementów diety. Drożdże *Y. lipolytica* są dopuszczone w krajach Unii Europejskiej do obrotu jako nowa żywność od 2019 roku (Rozporządzenie UE 2019/760). Maksymalna stosowana dawka wynosi 3 g dziennie dla dzieci w wieku od 3 do 10 lat. Powyżej 10 roku życia dawka wynosi 6 g dziennie [102].

Wysokie zdolności biokatalityczne szczepu *Y. lipolytica* KCh 71, w porównaniu z innymi gatunkami drożdży, zostały dowiedzione przy wykorzystaniu pięciu pochodnych chalkonu uzyskanych na drodze syntezy Claisena–Schmidta (Schemat 12).



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>
1	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H
2	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H
3	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H
4	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
5	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
6	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
7	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
8	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Schemat 12. Synteza metoksychalkonów metodą kondensacji Claisena–Schmidta [102]

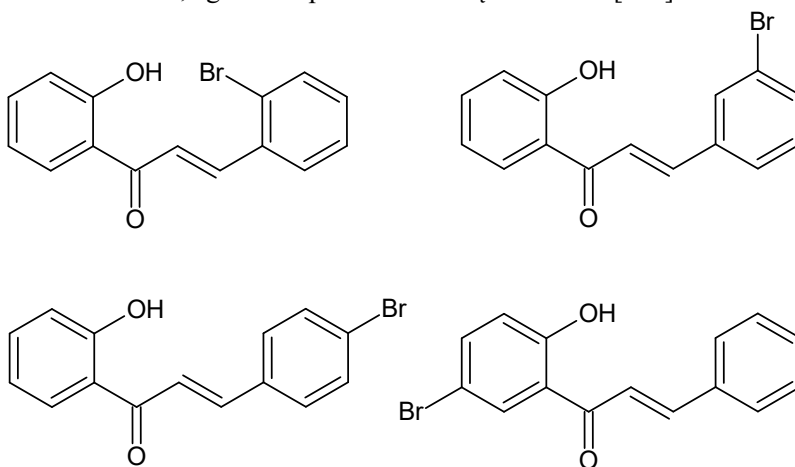
Scheme 12. Synthesis of methoxychalcones by Claisen-Schmidt condensation [102]

Aktywność drożdży *Y. lipolytica* porównano ze szczepami: *Rhodotorula rubra* KCh 4, *Rhodotorula marina* KCh 77, *R. rubra* KCh 82, *Candida viswanathii* KCh 120, *R. glutinis* KCh 242, *Saccharomyces cerevisiae* KCh 464 i *Candida parapsilosis* KCh 909.

Substraty 1-4 były konwertowane przez szczep *Y. lipolytica* KCh 71 do analogicznych chalkonów z bardzo wysokimi wydajnościami wynoszącymi od 88 do 99% już po jednej dobie, jedynie substrat 5 był przekształcany mniej efektywnie. W jego przypadku maksymalna zaobserwowana wydajność wyniosła 20% po siedmiu dniach biotransformacji. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń badacze wysnuli wniosek, że wydajność biotransformacji jest skorelowana ujemnie z liczbą podstawników metoksylowych obecnych w pierścieniu B, a produktów redu-

kcji nie zaobserwowano w ogóle, kiedy dwie grupy metoksyłowe obecne były w pierścieniu A [102].

Stosując ten sam panel biokatalizatorów i pochodne 2'-hydroksychalkonu podstawione bromem w różnych pozycjach pierścienia A i B (Rys. 7) wykazano kluczowe znaczenie położenia atomu bromu dla przebiegu biotransformacji: ilość tworzonego dihydrochalkonu malała w zależności od pozycji atomu bromu w szkieletcie chalkonu, zgodnie z prawidłowością  $2>3>5'>4$  [103].



Rysunek 7. Bromopochodne 2'-hydroksychalkonu zastosowane w biotransformacjach katalizowanych przez drożdże [103]

Figure 7. Bromo derivatives of 2'-hydroxychalcone used in yeast-catalysed biotransformations [103]

## UWAGI KOŃCOWE

Ukierunkowanie konsumentów na wybór smacznych, ale jednocześnie zdrowych produktów spożywczych jest silnym impulsem do badań nad substytutami tradycyjnie stosowanej sacharozy.

Słodzik powinien nadawać pożywieniu cechy organoleptyczne jak najbardziej zbliżone do tych uzyskiwanych przy użyciu cukru, ale jednocześnie w jak najmniejszym stopniu wpływać na kaloryczność potrawy i nie powodować wahań poziomu glukozy we krwi po jej spożyciu. Idealnie, jeżeli jego pochodzenie byłoby naturalne, a także gdyby zapewniał dodatkowe korzyści zdrowotne konsumentom i poprawiał trwałość żywności. Część dihydrochalkonów, związków pochodzenia roślinnego lub ich bliskich analogów, ma szansę sprostać tym wymaganiom. Dzięki naturalnemu pochodzeniu dihydrochalkony mogą być stosowane w żywności funkcjonalnej i zyskać szeroką akceptację wśród konsumentów. Intensywnie słodki smak i bliska zerowej kaloryczność stanowią znaczące atuty tej grupy polifenoli, w stosunku do sacharozy. Wykazywana przez te związki aktywność biologiczna, w tym przeciwutleniająca i przeciwmikrobiologiczna, może nie

tylko wpływać pozytywnie na zdrowie spożywających je ludzi, ale również przedłużać trwałość żywności.

Dihydrochalkony można pozyskiwać w wyniku ekstrakcji, syntezy chemicznej lub biotransformacji. Ta ostatnia metoda wydaje się optymalna ze względu na uzyskiwane wysokie wydajności, stosunkowo niski koszt, a także znikomy negatywny wpływ na środowisko naturalne. Odkryto do tej pory wiele wydajnych biokatalizatorów i metod umożliwiających pozyskiwanie znaczących ilości dihydrochalkonów. Do dziś jako dodatek do żywności stosowany jest jednak jedynie dihydrochalkon neohesperydyny.

Niezbędne są intensywne badania nad określeniem poziomu słodkości nowo uzyskiwanych dihydrochalkonów, ich bezpieczeństwa, a także potencjału prozdrowotnego. Dzięki temu możliwe będzie rozszerzenie wachlarza zdrowych i naturalnych zamienników sacharozy.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] F. Hutteau *et al.*, *Food Chem*, 1998, **63**, 9.
- [2] A. Drewnowski *et al.*, *Journal of Nutrition*, 2012, **142**, 1142S.
- [3] G. Eggleston, *Chemistry's Role in Food Production and Sustainability: Past and Present*. American Chemical Society, 2019, **1314**.
- [4] F.R. Bornet, *Am J Clin Nutr*, 1994, **59**, 763S.
- [5] U. Świerczek, A. Borowiecka, J. Feder-Kubis, *Zywnosc. Nauka. Technologia. Jakosc/Food. Science Technology. Quality*, 2016, **4**, 15.
- [6] X. Qi, R.F. Tester, *Mol Nutr Food Res*, 2020, **64**, 1901082.
- [7] L. Kłosiewicz-Latoszek, B. Cybulska, *Probl Hig Epidemiol*, 2011, **92**, 181.
- [8] X. Li *et al.*, *Front Nutr*, 2022, **9**, 1013310.
- [9] M.A. Febbraio, M. Karin, *Cell Metab*, 2021, **33**, 2316.
- [10] M.A. Herman, M.J. Birnbaum, *Cell Metab*, 2021, **33**, 2329.
- [11] Y. Wu *et al.*, *Cell Metab*, 2022, **34**, 1042.
- [12] J.J. DiNicolantonio *et al.*, *Prog Cardiovasc Dis*, 2018, **61**, 3.
- [13] M.A. Payant, M.J. Chee, *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, **128**, 346.
- [14] J.A. Welsh, S.A. Cunningham, *Pediatr Clin North Am*, 2011, **58**, 1455.
- [15] F. Gomez-Pinilla, R.P. Cipolat, L.F.F. Royes, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, **1867**.
- [16] D. de F. Lelis *et al.*, *Life Sci*, 2020, **259**.
- [17] L. Sukiasyan, *Curr Probl Cardiol*, 2023, **48**.
- [18] A. Pepin, K.L. Stanhope, P. Imbeault, *Nutrients*, 2019, **11**.
- [19] H. Jiang *et al.*, *Journal of Genetics and Genomics*, 2021, **48**, 531.
- [20] S.N. Jayasinghe *et al.*, *Nutrients*, 2017, **9**, 750.
- [21] C. Fitch, K.S. Keim, *J Acad Nutr Diet*, 2012, **112**, 739.
- [22] D.R. Reed, T. Tanaka, A.H. McDaniel, *Physiol Behav.*, 2006, **88**, 215.
- [23] A. Shil *et al.*, *Nutrients*, 2020, **12**, 1862.
- [24] L. Hough, *Low-Calorie Foods and Food Ingredients*. Low-Calorie Foods and Food Ingredients, Springer, Boston, MA, 1993.
- [25] A.A. Alsunni, *Int J Gen Med*, 2020, **13**, 775.
- [26] A.R. Basson, A. Rodriguez-Palacios, F. Cominelli, *Front Nutr*, 2021, **8**, 746247.
- [27] M.-J. Gwak *et al.*, *Food Sci Biotechnol*, 2012, **21**, 889.
- [28] Kroger Manfred, Meister Kathleen, Kava Ruth, *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2006, **5**, 35.
- [29] M. Michelle Reyes, S.A. Gravina, J.E. Hayes, *Chem Senses*, 2019, **44**, 571.
- [30] A. Koszowska *et al.*, *Nowa Medycyna*, 2014, **1**, 36.

- [31] D. Storey *et al.*, *Eur J Clin Nutr*, 2007, **61**, 349.
- [32] B.N. Paulino *et al.*, *Curr Opin Food Sci*, 2021, **41**, 36.
- [33] P. Liang *et al.*, *Biotechnol Adv*, 2023, **64**, 108105.
- [34] E. Winkelhausen, S. Kuzmanova, *J Ferment Bioeng*, 1998, **86**, 1.
- [35] D. Umair *et al.*, *Frontiers in Sustainability*, 2022, **3**, 826190.
- [36] Cronin Joseph R., *Alternative & Complementary Therapies*, 2004, **9**, 139.
- [37] S.A. Hutchinson, G.S. Ho, C.-T. Ho, *Food Reviews International*, 1999, **15**, 249.
- [38] M. Kwon *et al.*, *Nutrients*, 2022, **14**, 1087.
- [39] Sękalska Beata, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2007, **3**, 127.
- [40] M. Grembecka, *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2015, **66**, 195.
- [41] M. Carrocho, P. Morales, I.C.F.R. Ferreira, *Food and Chemical Toxicology*, 2017, **107**, 302.
- [42] K. Świąder *et al.*, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2019, **92**, 160.
- [43] A.C. Sylvestry, K.I. Rother, *Physiol Behav*, 2016, **164**, 446.
- [44] K.R. Tandell, *J Pharmacol Pharmacother*, 2011, **2**, 236.
- [45] Whitehouse Christina R., Boullata Joseph, McCauley Linda, AAOHN J., 2008, **56**, 251.
- [46] M. Soffritti *et al.*, *Environ Health Perspect*, 2007, **115**, 1293.
- [47] K. Büchner *et al.*, *Foods*, 2022, **11**, 2734.
- [48] A. Mukherjee, J. Chakrabarti, *Food and Chemical Toxicology*, 1997, **35**, 1177.
- [49] J. Grupińska *et al.*, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2015, **48**, 1.
- [50] J. Myszkowska-Ryciak *et al.*, *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika*, 2010, **59**, 365.
- [51] H. Emamat *et al.*, *EXCLI J*, 2020, **19**, 620.
- [52] C. Debras *et al.*, *BMJ*, 2022, **378**, e071204.
- [53] L. Liu *et al.*, *Food Sci Nutr*, 2021, **9**, 4589.
- [54] J. Shearer, S.E. Swithers, *Rev Endocr Metab Disord*, 2016, **17**, 179.
- [55] W. Dan, J. Dai, *Eur J Med Chem*, 2020, **187**, 111980.
- [56] T. Janeczko, W. Gładkowski, E. Kostrzewa-Susłow, *J Mol Catal B Enzym*, 2013, **98**, 55.
- [57] H. ur Rashid *et al.*, *Bioorg Chem*, 2019, **87**, 335.
- [58] D.K. Mahapatra, S.K. Bharti, *Life Sci*, 2016, **148**, 154.
- [59] E. Karimi-Sales, G. Mohaddes, M.R. Alipour, *Pharmacol Res*, 2018, **129**, 177.
- [60] G.E. Inglett *et al.*, *J Food Sci*, 1969, **34**, 101.
- [61] R.M. Horowitz, B. Gentili, 1963.
- [62] Wang Yili *et al.*, 2015.
- [63] C. Rivière, in *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier B.V., 2016, **51**, 253.
- [64] M. Stompor, D. Broda, A. Bajek-Bil, *Molecules*, 2019, **24**, 4468.
- [65] DuBois Grant E. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1977, **25**, 763.
- [66] X. Shi *et al.*, *J Funct Foods*, 2022, **95**, 105184.
- [67] M. Younes *et al.*, *EFSA Journal*, 2022, **20**, 7595.
- [68] M.G. Lindley, *Advances in Sweeteners*. Springer, Boston, MA, 1996.
- [69] Z. Xiao *et al.*, *Food Chem*, 2017, **231**, 324.
- [70] S.L. Rodríguez De Luna, R.E. Ramírez-Garza, S.O. Serna Saldívar, *Scientific World Journal*, 2020, **2020**, 6792069.
- [71] K. Ramirez-Estrada *et al.*, *Molecules*, 2016, **21**, 182.
- [72] P. Chen, W. Li, Y. Wang, *Catal Commun*, 2019, **125**, 10.
- [73] M. Luźny *et al.*, *Molecules*, 2019, **24**, 1.
- [74] A. Briot *et al.*, *Journal of Organic Chemistry*, 2004, **69**, 1374.
- [75] S.J. Chen, G.P. Lu, C. Cai, *RSC Adv*, 2015, **5**, 13208.
- [76] F.A. Khan, A. Vallat, G. Süß-Fink, *J Mol Catal A Chem*, 2012, **355**, 168.
- [77] N. Ravasio *et al.*, *Tetrahedron Lett*, 1996, **37**, 3529.
- [78] M.-H. Kim *et al.*, *J Appl Biol Chem*, 2007, **50**, 85.
- [79] G.P. Rosa *et al.*, *ACS Sustain Chem Eng*, 2017, **5**, 7467.
- [80] C. de Carvalho, M. da Fonseca, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, 2011, **2**, 451.
- [81] X. Liu, C. Kokare, in *Biotechnology of Microbial Enzymes Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, Elsevier Inc., 2017, 267.
- [82] Y.S. Anteneh, C.M.M. Franco, *Front Microbiol*, 2019, **10**.
- [83] A.J.J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**, 548.
- [84] S. Raveendran *et al.*, *Food Technol Biotechnol*, 2018, **56**, 16.

- [85] J.L. Adrio, A.L. Demain, *Biomolecules*, 2014, **4**, 117.
- [86] B. Lin, Y. Tao, *Microb Cell Fact*, 2017, **16**.
- [87] J. Ren, C.D. Barton, J. Zhan, *Fitoterapia*, 2022, **161**, 1.
- [88] S. Raimondi *et al.*, *J Biotechnol*, 2011, **156**, 279.
- [89] B. Żyszka, M. Anioł, J. Lipok, *Microb Cell Fact*, 2017, **16**, 136.
- [90] J. Kozłowska *et al.*, *RSC Adv*, 2018, **8**, 30379.
- [91] M. Stompor *et al.*, *J Mol Catal B Enzym*, 2013, **97**, 283.
- [92] M. Stompor, M. Kałużny, B. Żarowska, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, **100**, 8371.
- [93] E. Kostrzewa-Susłow *et al.*, *Molecules*, 2017, **22**, 1830.
- [94] S. Burmaoglu *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, **26**, 3172.
- [95] I.L. de Matos, M. Nitschke, A.L.M. Porto, *Marine Biotechnology*, 2019, **21**, 430.
- [96] W. AnMing *et al.*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, **4**, 847.
- [97] M.J.C. Corrêa *et al.*, *J Braz Chem Soc*, 2011, **22**, 1333.
- [98] M. Dymarska *et al.*, *PLoS One*, 2017, **12**, e0184885.
- [99] A. Krawczyk-Łebek *et al.*, *Int J Mol Sci*, 2021, **22**, 9619.
- [100] E. Kostrzewa-Susłow, T. Janeczko, *Molecules*, 2012, **17**, 14810.
- [101] V.D. Silva, B.U. Stambuk, M. da G. Nascimento, *J Mol Catal B Enzym*, 2010, **63**, 157.
- [102] M. Łużny *et al.*, *Catalysts*, 2020, **10**, 1135.
- [103] M. Łużny *et al.*, *Molecules*, 2022, **27**, 3681.

Praca wpłynęła do Redakcji 1 marca 2023 r.

