

# ENZYMATYCZNE I CHEMICZNE MODYFIKACJE FOSFOLIPIDÓW

## ENZYMATIC AND CHEMICAL MODIFICATIONS OF PHOSPHOLIPIDS

**Anna Chojnacka\*, Natalia Niezgoda**

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biotechnologii i Nauk  
o Żywności, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław  
\*e-mail: [anna.chojnacka@upwr.edu.pl](mailto:anna.chojnacka@upwr.edu.pl)*

---

### Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

### Wprowadzenie

1. Chemiczna i chemoenzymatyczna synteza glicerofosfolipidów
  - 1.1. Koniugaty fosfolipidowe z izomerami sprzężonego kwasu linolowego
  - 1.2. Koniugaty fosfolipidowe z DHEA
  - 1.3. Koniugaty fosfolipidowe z niesteroidowymi związkami przeciwzapalnymi (NLPZ)
2. Modyfikacje enzymatyczne glicerofosfolipidów
  - 2.1 Strukturyzowane fosfolipidy z bioaktywnymi kwasami tłuszczowymi
    - 2.1.1. Wzbogacanie PC żółtka jaja w kwasy *n*-3 i *n*-6 WNKT
    - 2.1.2. Wzbogacanie PC żółtka jaja w sprzężony kwas linolenowy (CLnA)
    - 2.1.3. Wzbogacanie PC żółtka jaja w sprzężony kwas linolowy (CLA)

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr hab. Anna Chojnacka**, prof. uczelni, w 2006 roku rozpoczęła pracę w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii uzyskała w 2007 r., broniąc pracy pt.: „Enzymatyczny rozdział racemicznych acyklicznych alkoholi allilowych”. Stopień doktora habilitowanego nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia uzyskała w roku 2019. Jej zainteresowania naukowe dotyczą opracowania nowych metod enzymatycznych modyfikacji fosfolipidów, otrzymywania strukturyzowanych lipidów metodami chemicznymi i chemoenzymatycznymi oraz optymalizacji procesów kinetycznego rozdziału drugorzędowych alkoholi allilowych

z zastosowaniem lipaz i fosfolipaz.



<https://orcid.org/0000-0002-2975-5605>



**Dr inż. Natalia Niezgoda**, w 2018r. rozpoczęła pracę na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii uzyskała w 2016 r., broniąc pracy pt.: „Chemoenzymatyczne modyfikacje fosfolipidów izomerami sprzężonego kwasu linolowego (CLA)”. W 2017 r. odbyła sześciomiesięczny staż naukowy na Wydziale Farmacji Uniwersytetu w Coimbrze (Portugalia) biorąc udział w projekcie badawczym dotyczącym wykorzystania nanoformulacji z niesteroidowymi związkami przeciwzapalnymi w terapii oczu. Jej zainteresowania naukowe związane są z szerokopojętymi modyfikacjami fosfolipidów w celu

opracowywania nowych multifunkcyjnych związków mogących znaleźć zastosowanie w farmacji i żywieniu.



<https://orcid.org/0000-0002-1154-9707>

---

**ABSTRACT**

At the moment, phospholipids are among the most interesting molecules. The possibilities of chemical and enzymatic modifications, while maintaining their integrity and unique nature, also contribute to these compounds' great interest.

This review paper concerns the preparation of new phospholipid conjugates containing fragments of biologically active compounds not found naturally in phospholipids, and phospholipids enriched with specific fatty acids with health-promoting properties (structured phospholipids).

Chemical methods for the synthesis of phospholipids containing conjugated linolenic acid (CLA), dehydroepiandrosterone (DHEA) or selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) at the *sn*-1 and/or *sn*-2 position have been described. In addition, the evaluation of the antiproliferative activity of the obtained conjugates against selected cancer cell lines was also described. Enzymatic methods of modifying natural phospholipids leading to their enrichment with bioactive polyunsaturated fatty acids and conjugated acids have also been described.

Keywords: structured phospholipids, phospholipid conjugates, bioactive fatty acids, phospholipid modification, dehydroepiandrosterone, NSAIDs, lipase, phospholipase

Słowa kluczowe: fosfolipidy strukturyzowane, koniugaty fosfolipidowe, bioaktywne kwasy tłuszczowe, modyfikacje fosfolipidów, sprzężony kwas linolowy, dehydroepiandrosteron, niesteroidowe leki przeciwzapalne, lipaza, fosfolipaza

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ALA	- kwas $\alpha$ -linolenowy
AOT	- dokuzynian sodu
Balb/3T3	- linia komórkowa mysich fibroblastów
B16	- linia komórkowa czerniaka mysiego
Caco-2	- linia komórkowa gruczolakoraka jelita grubego
GLA	- kwas $\gamma$ -linolenowy
GPC	- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocholina
DHA	- kwas dokozaheksaenowy
DHEA	- dehydroepiandrosteron (3 $\beta$ -hydroksy-androst-5-en-17-on)
suc-DHEA	- monobursztynian DHEA (monobursztynian 3' $\beta$ -O-androst-5'-en-17'-onylu)
EPA	- kwas eikozapentaenowy
LA	- kwas linolowy
CLA	- sprzężony kwas linolowy
CLnA	- sprzężony kwas linolenowy
DBTO	- tlenek dibutylocyny
DCC	- <i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DMAP	- 4-( <i>N,N</i> -dimetyloamino)pirydyna
DMF	- dimetyloformamid
E <sub>CLA</sub>	- efektywne wbudowanie CLA
GPC	- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocholina
IBU	- ibuprofen (kwas 2-(4-izobutylofenylo)propionowy)
HL-60	- linia komórkowa białaczki promielocytowej
HT-29	- linia komórkowa raka jelita grubego
LDL	- lipoproteiny o niskiej gęstości
LNCaP	- linia komórkowa raka prostaty
LPC	- lizofosfatydylocholina
MCF-7	- linia komórkowa gruczolakoraka piersi
NAP	- naproksen (kwas 2-(6-metoksy-2-naftylo)propionowy)
NLZP	- niesteroidowe leki przeciwzapalne
NNKT	- niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe
PA	- kwas palmitynowy
1-PA-LPC	- 1-palmitoilolizofosfatydylocholina
PL	- fosfolipid
PLA <sub>2</sub>	- fosfolipaza A <sub>2</sub>
PLA <sub>1</sub>	- fosfolipaza A <sub>1</sub>
PC	- fosfatydylocholina
PSO	- olej z pestek granatu
SA	- kwas stearynowy
1-SA-LPC	- 1-stearoilofosfatydylocholina
1,2-diSA-PC	- 1,2-distearoilofosfatydylocholina
SPC	- strukturyzowana fosfatydylocholina
SPL	- strukturyzowane fosfolipidy
WNKT	- wielonienasycone kwasy tłuszczowe
TAG	- triacyloglicerole

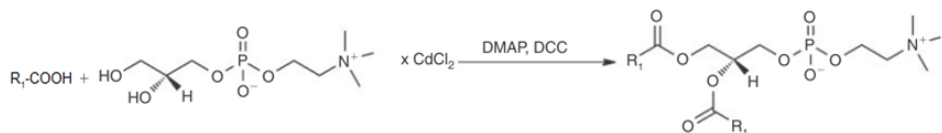
## WPROWADZENIE

Wśród biologicznie aktywnych lipidów, fosfolipidy (PL) przyciągają dużą uwagę ze względu na swoje wyjątkowe właściwości odżywcze i funkcjonalne. Z uwagi na swój amfifilowy charakter i zdolność przenikania przez błony, stały się one doskonałą matrycą do wprowadzania do organizmu substancji aktywnych biologicznie. Duże postępy w wiedzy w zakresie biochemii fosfolipidów i rozwój współczesnej bioinżynierii zaowocowały powstaniem nowatorskich koncepcji i znacznym postępowaniem technologicznym w zakresie modyfikacji enzymatycznych i syntezy chemicznej fosfolipidów do zastosowań przemysłowych, farmaceutycznych i w żywieniu człowieka. Najważniejsze kwestie obejmują otrzymywanie nowych analogów fosfolipidów zawierających fragmenty biologicznie aktywnych związków nie występujących w fosfolipidach naturalnie, (tzw. koniugatów fosfolipidowych) oraz fosfolipidów wzbogaconych w konkretne kwasy tłuszczowe o właściwościach prozdrowotnych, o zwiększonej wartości żywieniowej lub korzystnych parametrach funkcjonalnych (tzw. strukturyzowanych fosfolipidów) charakteryzujących się nowymi właściwościami funkcjonalnymi. W Katedrze Chemii (obecnie Chemii Żywności i Biokatalizy) Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu od lat prowadzone są badania nad chemoenzymatycznym otrzymywaniem glicerofosfolipidów o znaczeniu prozdrowotnym, tzw. super fosfolipidów, które oprócz kwasów tłuszczowych występujących w fosfolipidach naturalnie zawierają biologicznie aktywne związki, takie jak izomery sprzężonego kwasu linolowego (CLA) [1,2], fragment związku steroidowego (dehydroepiandrosteronu) [3,4] czy niesteroidowe związki przeciwzapalne [5]. Prowadzone są także badania nad wykorzystaniem lipaz i fosfolipaz do wzbogacania naturalnych fosfolipidów w bioaktywne wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny n-3 i n-6 takie jak kwas linolowy [6],  $\alpha$ - i  $\gamma$ -linolenowy [7], eikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA) [8] a także w sprzężone kwasy tłuszczowe, takie jak kwas punikowy [9] i izomery sprzężonego kwasu linolowego [10, 11,12].

### 1. CHEMICZNA I CHEMOENZYMATYCZNA SYNTEZA GLICEROFOSFOLIPIDÓW

Głównym wyzwaniem w syntezie fosfolipidów jest skonstruowanie struktury chiralnej i zachowanie konfiguracji na dalszych etapach syntezy chemicznej. Stosunkowo prostą, a przez to rozpowszechnioną metodą syntezy chemicznej homopodstawionej fosfatydylocholiny, zawierającej takie same reszty acylowe w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 jest estryfikacji Steglicha. Polega ona na reakcji kompleksu chlorku kadmu i dowolnego fragmentu glicero-3-fosforanowego, np. *sn*-glicero-3-fosfocholiny (GPC) z kwasem karboksylowym w obecności 4-(*N,N*-dimetylo-

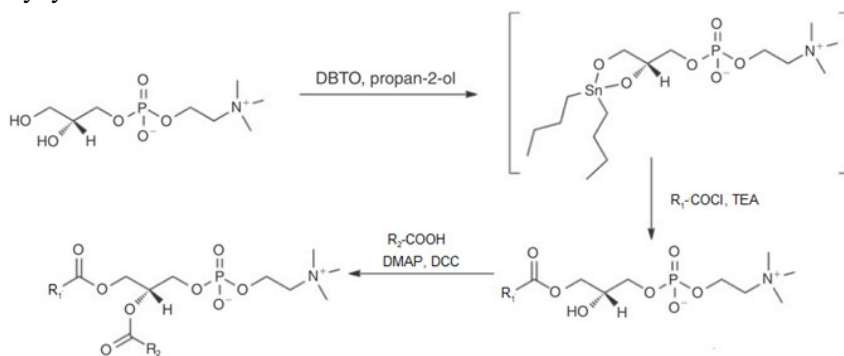
amino)pirydyny (DMAP) i odczynnika sprzęgającego, jakim jest *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC) (Rys. 1).



Rysunek 1. Schemat estyfikacji Steglicha *sn*-glicero-3-fosfocholiny  
Figure 1. Scheme of Steglich esterification of *sn*-glicero-3-phosphocholine

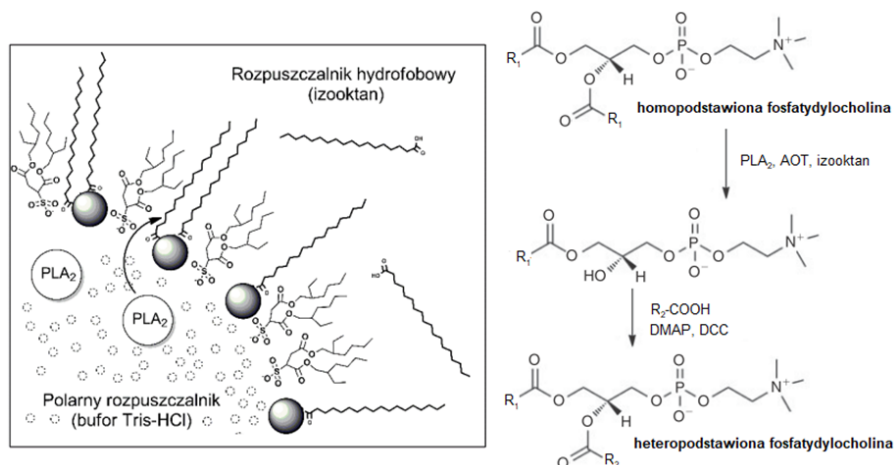
Zaletą tej metody jest możliwość uzyskania stereoizomerycznie czystego produktu o konfiguracji naturalnych glicerofosfolipidów, gdy jako substrat zostanie zastosowany *sn*-glicerofosforan (GPC).

Synteza heteropodstawionych glicerofosfolipidów, zawierających różne reszty acylowe w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 jest wyzwaniem, wymagającym zastosowania regioselektywnych odczynników chemicznych lub katalizy enzymatycznej. W literaturze opisanych jest kilka metod syntezy tej grupy związków [13]. Dwie z nich są szczególnie przydatne w syntezie fosfolipidów o ściśle zdefiniowanym składzie reszt acylowych. Pierwsza opiera się na syntezie 1-acylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny z GPC z użyciem tlenku dibutylocyny (DBTO). Produktem przejściowym w tej reakcji jest cząsteczka acetalu dibutylocynowego glicerofosfocholiny, który w wyniku działania chlorku kwasu tłuszczowego podstawiany jest regioselektywnie grupą acylową w pozycji *sn*-1 (Rys. 2). Otrzymaną w ten sposób 1-acylo lizofosfatydylocholinę (1-acylo LPC) poddaje się kolejnej estyfikacji metodą Steglicha z użyciem kwasu tłuszczowego, który ostatecznie zajmuje pozycję *sn*-2 w fosfatydylocholinie.



Rysunek 2. Dwuetapowa synteza heteropodstawionej fosfatydylocholino: monoacylowanie *sn*-glicero-3-fosfocholiny za pośrednictwem tlenku dibutylocyny, po którym następuje estyfikacja Steglicha  
Figure 2. The two-step synthesis of heterosubstituted phosphatidylcholines: tin-mediated monoacylation of *sn*-glycero-3-phosphocholines followed by a Steglich esterification

Druga metoda to proces chemoenzymatyczny, gdzie 1-acylo LPC uzyskuje się w wyniku hydrolizy homopodstawionej fosfatydylochliny z wykorzystaniem *sn*-2 specyficznej fosfolipazy (PLA<sub>2</sub>) jako katalizatora, a następnie po oczyszczeniu poddaje się estryfikacji Steglicha (Rys. 3). Szczególnie wydajnie i szybko hydroliza przebiega w układach micelarnych, w których PLA<sub>2</sub> ulega enkapsulacji w micelach powstałych z fosfatydylochliny (PC) i dokuzynianu sodu (AOT). Bardzo duża efektywność tej metody jest związana z powstaniem granicy międzyfazowej lipid-woda. W odwróconych micelach polarne głowy fosfolipidu skierowane są do wewnątrz miceli, a łańcuchy hydrofobowe na zewnątrz, w kierunku rozpuszczalnika jakim jest izooktan. Metoda ta pozwala uzyskać całkowitą hydrolizę PC do 1-acylo LPC już po 15 minutach reakcji [14,15].



Rysunek 3. Dwuetapowa chemoenzymatyczna synteza heteropodstawionej fosfatydylochliny. Struktura odwróconej miceli w środowisku reakcji enzymatycznej hydrolizy fosfatydylochliny.

Figure 3. Two-step chemoenzymatic synthesis of heterosubstituted phosphatidylcholine. Struktura of reverse micelles in the environment of the enzymatic reaction of phosphatidylcholine hydrolysis.

### 1.1. KONIUGATY FOSFOLIPIDOWE Z IZOMERAMI SPRĘŻONEGO KWASU LINOLOWEGO

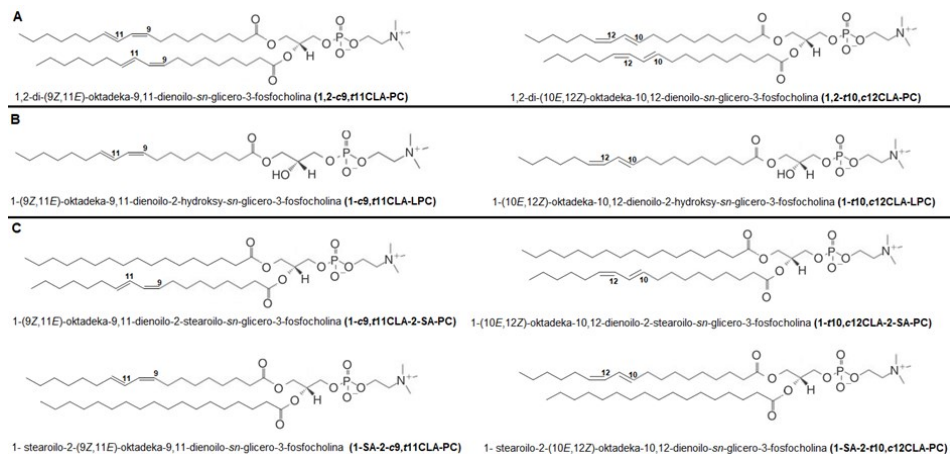
Terminem sprężony kwas linolowy (CLA, ang. *conjugated linoleic acid*) opisywane są izomery pozycyjne i geometryczne kwasu tłuszczowego C18:2 z dwoma sprężonymi wiązaniami podwójnymi. Najczęściej stosowane w badaniach naukowych są izomery *cis*-9,*trans*-11 CLA (*c9,t11*) i *trans*-10,*cis*-12 CLA (*t10,c12*). Kwas *cis*-9,*trans*-11 CLA (kwas rumenowy) występuje głównie w tłuszczach pochodzących od przeżuwaczy, a jego biosynteza jest związana z metabolizmem bakterii symbiotycznych zasiedlających żwacz, głównie *Butyrivibrio fibrisolvens* [16] *trans*-10,*cis*-12 CLA nie występuje naturalnie i otrzymuje się go w wyniku

alkalicznej izomeryzacji kwasu linolowego. Izomer ten jest wytwarzany razem z *cis*-9,*trans*-11 w stosunku równomolowym [17]. Dane literaturowe dowodzą, że CLA ma różnorodny wpływ na funkcje fizjologiczne organizmów żywych, w tym na zmniejszenie zachorowalności na nowotwory, zmianę metabolizmu lipidów, stymulację układu odpornościowego, zmniejszenie ryzyka miażdżycy. Ponadto wykazano, że aktywność biologiczna CLA jest izomerycznie specyficzna [18].

W zespole prof. Wawrzeńczyka przeprowadzono badania, których celem była synteza koniugatów fosfolipidowych z izomerami CLA, mogących znaleźć zastosowanie jako prolek lipidowy zwiększający dostępność CLA w organizmie [1,2].

Pierwszą grupę stanowiły homopodstawione fosfatydylocholino zawierające identyczne reszty kwasów tłuszczowych: *c*9,*t*11CLA lub *t*10,*c*12CLA w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 (Rys. 4A). Otrzymano je w wyniku estryfikacji Steglicha (Rys.1).

Po 40 h reakcji prowadzonej w bezwodnych warunkach i przy stosunku molowym reagentów GPC:CLA:DMAP:DCC 1:4:2:4,2 uzyskano produkty z dobrą wydajnością powyżej 75% i czystością >98%. Skład izomeryczny reszt CLA w produktach fosfolipidowych był taki sam jak w kwasach tłuszczowych użytych do estryfikacji (>95%). Struktura otrzymanych fosfolipidowych koniugatów z CLA została potwierdzona metodą spektroskopową.



Rysunek 4. Struktury koniugatów fosfolipidowych z CLA

Figure 4. Structures of phospholipid conjugates of CLA

**Drugą grupą** otrzymanych związków były heteropodstawione fosfatydylocholino, zawierające określony izomer CLA w pozycji *sn*-1 lub *sn*-2. Synteza tych związków zakładała dwa etapy: (i) otrzymanie odpowiednich 1-acylo LPC z zastosowaniem DBTO, (ii) estryfikację Steglicha (Rys. 2). Ponieważ po



pierwszym etapie procesu, pomimo zastosowanych różnych metod ekstrakcji nie udało się wyizolować produktu z zadowalającą czystością i wydajnością zastosowano alternatywne podejście. Polegało one na hydrolizie odpowiednich homopodstawionych fosfatydylocholin (distearoil-PC, 1,2-*c*9,*t*11CLA-PC oraz 1,2-*t*10,*c*12CLA-PC) w odwróconych micelach przy użyciu fosfolipazy A<sub>2</sub> z trzustki wieprzowej jako katalizatora (Rys. 3). Wydajność izolowana poszczególnych 1-acylo LPC (Rys. 4B) w tym przypadku mieściła się w zakresie 89-99%. W kolejnym etapie 1-acylo-LPC poddano acylowaniu, czego efektem było uzyskanie dwóch typów heteropodstawionych PC: zawierających resztę kwasu stearynowego (SA) w pozycji *sn*-1 oraz izomer CLA w pozycji *sn*-2, oraz z odwrotnym podstawieniem tych reszt kwasowych (Rys. 4C). Wyniki analizy pozycyjnej wszystkich badanych heteropodstawionych PC ujawniły, niewielkie ilości produktu ubocznego (ok. 10%), który był wynikiem częściowej migracji reszt acylowych z pozycji *sn*-1 do pozycji *sn*-2 w LPC. Prawdopodobnym powodem mógł być lekko kwaśny charakter żelu krzemionkowego stosowanego na etapie oczyszczania 1-acylo LPC metodą chromatografii kolumnowej. Badania dowodzą, że w roztworach lizofosfatydylocholin o pH 6-9 ustala się stan równowagi, w którym stosunek 1-acylo LPC do 2-acylo LPC wynosi 9:1 [19].

Wykonano testy biologiczne na aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek nowotworowych białaczki promielocytowej (HL-60), raka piersi (MCF-7) i raka jelita grubego (HT-29) w celu określenia zależności struktura-aktywność pomiędzy poszczególnymi grupami koniugatów fosfolipidowych z izomerami CLA. Wszystkie heteropodstawione PC wykazywały mniejszy efekt cytotoksyczny od homopodstawionych PC, a w badaniach nie wykazano różnicy pomiędzy efektem antyproliferacyjnym dla PC z CLA w pozycji *sn*-2 a PC z CLA w pozycji *sn*-1. Wśród homopodstawionych fosfatydylocholin, 1,2-*c*9,*t*11CLA-PC wykazywała lepszą aktywność w stosunku do linii HL-60 i MCF-7 niż PC z dwoma resztami izomeru *t*10,*c*12CLA. Z kolei w przypadku testów na linii HT-29 aktywniejsze okazały się zarówno homo- jak i heterokoniugaty PC z izomerem *t*10,*c*12CLA. Lizofosfatydylocholin wykazały wyższą cytotoksyczność od PC w przypadku testów na liniach HL-60.

Kolejne badania [20] dowiodły, że nanonośniki lipidowe (stałe nanocząstki lipidowe, SLN oraz nanostrukturalne nośniki lipidowe, NLC) w których wykorzystano koniugaty fosfolipidowe z CLA (1,2-diCLA-PC) jako jeden z surfaktantów stabilizujących dyspersję charakteryzowały się wysoką stabilnością i bardzo dobrymi parametrami fizycznymi. Co najważniejsze wykazywały lepszy efekt nekrotyczny w stosunku do komórek ludzkiego raka naskórkowego (A431) i czerniaka złośliwego skóry (MeWo) w porównaniu do nanonośników stabilizowanych distearoilofosfatydylocholiną (1,2-diSA-PC). Te obiecujące wyniki

badają potwierdzają, że koniugaty fosfolipidowe z CLA mogą znaleźć zastosowanie nie tylko jako stabilizatory nanoosiłków, ale mogą działać wspólnie z innym lekiem lub markerem poddanym enkapsulacji w macierzy lipidowej, a tym samym znaleźć zastosowanie w skojarzonych terapiach farmakologicznych.

## 1.2. KONIUGATY FOSFOLIPIDOWE Z DHEA

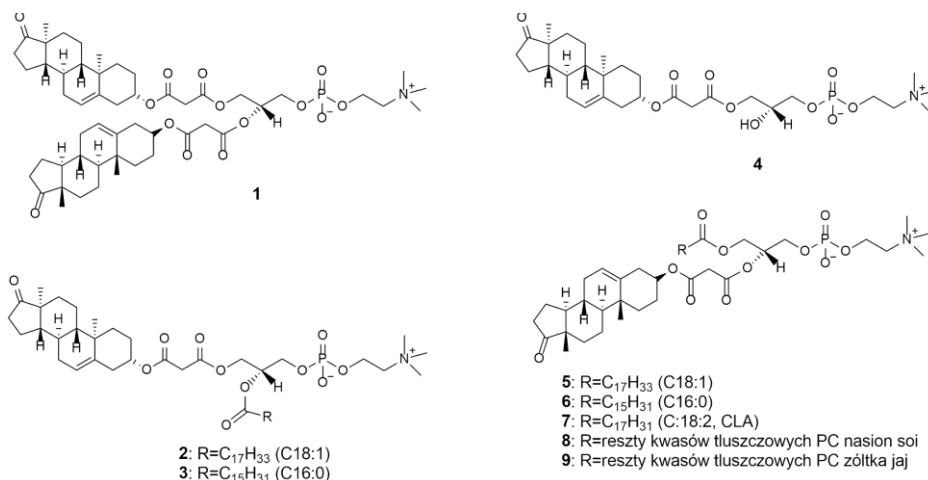
Dehydroepiandrosteron (DHEA) to naturalnie występujący androgenny steroid, który wytwarzany jest głównie w warstwie siatkowatej kory nadnerczy z 17-hydroksypregnenolonu. DHEA jest istotnym związkiem w biosyntezie hormonów płciowych, takich jak testosteron czy estradiol [21]. Szeroki zakres jego działania sprawił, że określa się go mianem „superhormonu”. Wykazano aktywność przeciwnowotworową DHEA wobec kilku linii komórek nowotworowych [22]. Udowodniono również jego przydatność w leczeniu otyłości, obniżaniu poziomu cholesterolu i glukozy we krwi, wzmacnianiu układu odpornościowego, poprawie pamięci, czy spowalnianiu postępów chorób Alzheimera i Parkinsona [23].

Ponieważ fosfolipidy mogą być efektywnymi nośnikami DHEA postanowiono otrzymać pochodne fosfatydylocholiny (PC) zawierające kowalencyjnie związaną cząsteczkę DHEA w pozycjach *sn*-1 i/lub *sn*-2 [3].

DHEA nie posiada wolnej grupy karboksylowej, wykorzystano więc kwas bursztynowy jako łącznik do wytworzenia wiązania estrowego z grupami hydroksylowymi szkieletu glicerolowego. DHEA został zestryfikowany bezwodnikiem bursztynowym w obecności DMAP, a otrzymany z wysoką wydajnością (96%) monobursztynian DHEA (suc-DHEA) posłużył w kolejnych etapach do estryfikacji pozycji *sn*-1 i/lub *sn*-2.

Uzyskano 9 pochodnych fosfatydylocholiny zawierających w swojej strukturze jedną lub dwie cząsteczki DHEA (Rys. 5).

Homopodstawioną di-(suc-DHEA)-PC (**1**) uzyskano w reakcji estryfikacji metodą Steglicha (Rys. 1). Przy zastosowaniu 4-krotnego nadmiaru monobursztynianu DHEA w stosunku do GPC otrzymano produkt estryfikacji obu pozycji (*sn*-1 i *sn*-2) z wydajnością 52%. Dwie fosfatydylocholiny (**2**, **3**) zawierające przyłączone resztkę suc-DHEA w pozycji *sn*-1 a kwas oleinowy lub palmitynowy w pozycji *sn*-2 otrzymano na ścieżce syntezy wg [24] (Rys. 2). W pierwszej kolejności z monobursztynianu DHEA w reakcji z 3-krotnym nadmiarem chlorku oksalilu otrzymano z bardzo wysoką wydajnością (98%) jego chlorek kwasowy, który następnie poddano reakcji z acetalem dibutylocynowym glicerofosfocholiny. Uzyskaną w ten sposób 1-suc-DHEA-LPC (**4**) zestryfikowano następnie odpowiednim kwasem tłuszczowym, stosując dwukrotny nadmiar molowy kwasu.



Rysunek 5. Struktury koniugatów fosfolipidowych z DHEA  
Figure 5. Structures of phospholipid conjugates of DHEA

Trzecią grupę fosfolipidów stanowiły fosfatydylocholiny z resztą suc-DHEA przyłączoną w pozycji *sn*-2. Zsyntezowano 2-suc-DHEA-PC (**5-9**), które posiadały w pozycji *sn*-1: kwas palmitynowy, kwas oleinowy, CLA lub naturalne kwasy tłuszczowe fosfatydylocholiny pozyskanej z nasion soi lub żółtka jaja kurzego. W pierwszym etapie, stosując opisaną wyżej metodykę D'Arrigo uzyskano syntetyczne 1-acylo-LPC zawierające reszty kwasów palmitynowego, oleinowego lub CLA. Naturalne 1-acylo-LPC otrzymano natomiast w wyniku hydrolizy enzymatycznej naturalnych PC wyizolowanych z soi i żółtka jaja, prowadzonej w obecności fosfolipazy A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) z trzustki wieprzowej [14]. W kolejnym etapie syntezy ponownie wykorzystując metodę estryfikacji Steglicha przyłączano resztą suc-DHEA do pozycji *sn*-2 lizofosfatydylocholin uzyskując pożądane fosfatydylocholiny z dobrymi wydajnościami (61-82%).

Uzyskane pochodne PC posiadające steroidowe ugrupowanie DHEA zostały poddane badaniom na aktywność antyproliferacyjną wobec prawidłowej linii komórkowej mysich fibroblastów (Balb/3T3) oraz nowotworowych linii: białaczki promielocytowej (HL-60), mysiego czerniaka (B16) oraz raka prostaty (LNCaP). Żaden z otrzymanych fosfolipidów nie wykazywał toksyczności wobec prawidłowych komórek mysich fibroblastów (Balb/3T3). Najbardziej aktywnym związkiem wobec wszystkich linii komórek nowotworowych była fosfatydylocholina (**7**) posiadająca w pozycji *sn*-1 kwas CLA a DHEA w pozycji *sn*-2. Fosfolipidy zawierające tylko DHEA czyli di-(suc-DHEA)-PC (**1**) i 1-suc-DHEA-LPC (**4**) pozostały nieaktywne w stosunku do wszystkich linii komórkowych.

### 1.3. KONIUGATY FOSFOLIPIDOWE Z NIESTEROIDOWYMI ZWIĄZKAMI PRZECIWZAPALNYMI (NLPZ)

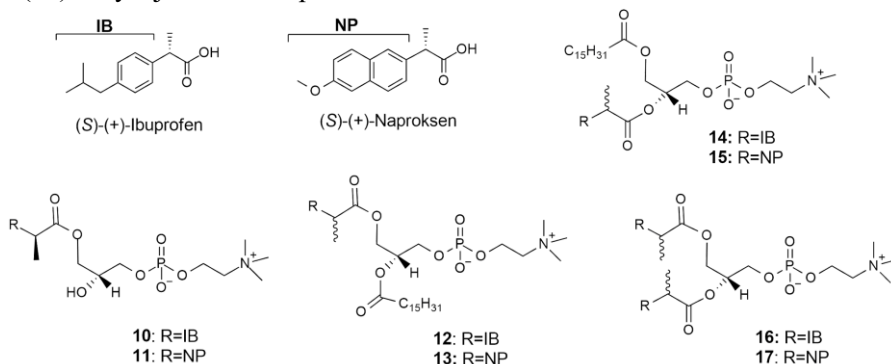
Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) wykazują działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe [25] i są obecnie jednymi z najczęściej stosowanych leków na świecie. Stosuje się je również wspomagająco przy chorobach reumatoidalnych oraz dnie moczanowej [26-28]. Udowodniono również ich właściwości antynowotworowe [29-33]. NLPZ to bardzo zróżnicowana strukturalnie grupa związków, wśród których najbardziej znane to pochodne kwasu 2-arylopropionowego (profeny), do których należą między innymi ibuprofen i naproksen.

Oprócz pozytywnych oddziaływań na organizm człowieka, NLPZ posiadają także niepożądane skutki uboczne. Jednym z najpoważniejszych jest uszkodzanie błony śluzowej przewodu pokarmowego, co prowadzi do powstawania owrzodzeń i różnego rodzaju krwawień [34,35]. Z racji tego, że hydroliza fosfolipidów następuje dopiero w jelitach, interesującym wydaje się wykorzystanie tych związków jako nośników NLPZ. Przeprowadzono więc badania nad wbudowaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych z grupy profenów do struktury fosfatydylocholin [5]. (*S*)-(+)-Ibuprofen (IBU) oraz (*S*)-(+)-naproksen (NAP) posiadają grupy karboksylowe, mogą więc tworzyć bezpośrednio wiązanie estrowe z grupami hydroksylowymi szkieletu glicerolowego PL.

Zsyntetyzowano osiem koniugatów w tym 6 fosfatydylocholin z ibuprofenem lub naproksenem w pozycjach *sn*-1 i/lub *sn*-2 oraz dwie lizofosfatydylocholinę zawierające NLPZ w pozycji *sn*-1 (Rys. 6). Ścieżkę syntezy rozpoczęto od otrzymania odpowiednich 1-acylo-LPC. Najpierw zsyntezowano chlorki kwasowe *S*-profenów w wyniku reakcji z chlorkiem oksalilu w obecności katalitycznych ilości bezwodnego dimetyloformamidu (DMF). Następnie zastosowano wspomnianą wcześniej metodę acylowania *sn*-glicero-3-fosfocholiny chlorkiem odpowiedniego kwasu z wykorzystaniem DBTO oraz trietyloaminy (Rys. 2). Uzyskano 1-NAP-LPC (**10**) oraz 1-IBU-LPC (**11**) z dobrymi wydajnościami (odpowiednio 70 i 68%). W kolejnym etapie odpowiednią 1-acylo LPC estryfikowano metodą Steglicha z kwasem palmitynowym (PA) otrzymując fosfatydylocholinę **12** i **13**, z wydajnościami odpowiednio 25% i 57%. PC z wbudowanymi NLPZ w pozycji *sn*-2 i kwasem palmitynowym w pozycji *sn*-1 uzyskano w analogicznej ścieżce. Najpierw przygotowano 1-PA-LPC z chlorku palmitoilu, a następnie estryfikowano ją ibuprofenem lub naproksenem ponownie stosując warunki Steglicha. Wydajności otrzymanych produktów (**14**, **15**) w tym wypadku wynosiły 41% i 53%

Fosfatydylocholinę zawierające ugrupowania ibuprofenu lub naproksenu w obu pozycjach *sn*-1 i *sn*-2 zsyntetyzowano w jednoetapowej estryfikacji Steglicha dwóch

wolnych grup hydroksylowych GPC w obecności czterokrotnego molowego nadmiaru ibuprofenu lub naproksenu. Uzyskano 1,2-diIBU-PC (**16**) oraz 1,2-diNAP-PC (**17**) z wydajnościami odpowiednio 61% i 72%.



Rysunek 6. Struktury koniugatów fosfolipidowych z NLPZ  
Figure 6. Structures of phospholipid conjugates of NSAIDs

W prowadzonych warunkach syntezy przyłączone cząsteczki *S*-profenów ulegały racemizacji, prowadząc w rezultacie do uzyskania fosfatydylocholin (**12-17**) w postaci mieszanin diastereoizomerów. Izomeryzacja zachodziła w obecności DMAP oraz DCC i była prawdopodobnie wynikiem enolizacji grupy karboestrowej z udziałem H węgla asymetrycznego *S*-profenów.

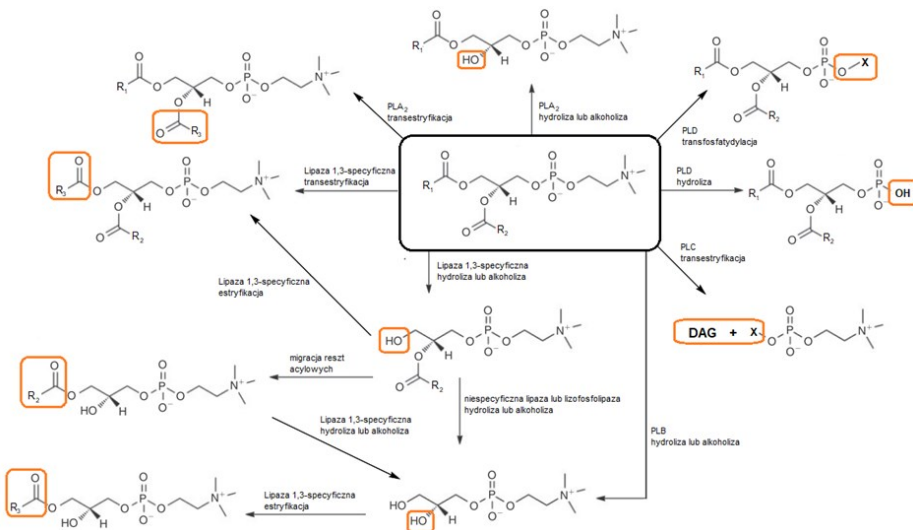
Przeprowadzono również porównawcze badania cytotoksyczności ibuprofenu, naproksenu oraz ich fosfolipidowych koniugatów wobec komórek ludzkiej białaczki promielocytowej (HL-60), ludzkiego raka jelita grubego (Caco-2) oraz prawidłowych komórek nabłonka jelita świńskiego (IPEC-J2). Wyniki tych badań wskazywały, że fosfolipidy z NLPZ w obu pozycjach (**14** i **15**) były bardziej cytotoksyczne niż sam ibuprofen lub naproksen, natomiast zarówno 1-NAP-LPC oraz 1-IBU-LPC były mniej toksyczne wobec wszystkich badanych linii komórkowych. Z kolei fosfolipidy z NLPZ w pozycji *sn*-1 i kwasem palmitynowym w *sn*-2 (**10** i **11**) wykazywały niższą cytotoksyczność wobec komórek Caco-2 i komórek prawidłowych (IPEC-J2) niż związki referencyjne.

## 2. MODYFIKACJE ENZYMATYCZNE GLICEROFOSFOLIPIDÓW

Wykorzystywanie enzymów, jako biokatalizatorów w syntezie i modyfikacji fosfolipidów, niesie wiele korzyści ze względu na selektywność katalizowanych reakcji, ale także ze względu na to, że wpisują się one w nowoczesne proekologiczne metody biotechnologii zalecane przez Green Chemistry.

Wymianę reszt acylowych w fosfolipidach można przeprowadzić na kilka sposobów (Rys. 7). Pierwszym z nich jest dwuetapowa modyfikacja polegająca na wstępnej lizie fosfolipidów, wyodrębnieniu powstałego lizofosfolipidu i jego estryfikacji wybranym donorem reszt acylowych, w wyniku czego otrzymuje się zmodyfikowany fosfolipid. Lizę można przeprowadzić w środowisku wodnym (hydroliza) lub w środowisku bezwodnym, w obecności alkoholu jako czynnika lizującego (alkoholiza).

Drugą z metod modyfikacji PL jest ich bezpośrednia transestryfikacja z użyciem kwasu karboksylowego (acydoliza) lub estrów tych kwasów (interestryfikacja). Mimo że procesy transestryfikacji prowadzi się bezpośrednio, używając jako substratu fosfolipidu, to wymiana reszty acylowej zajdzie tylko wtedy, gdy w mieszaninie reakcyjnej część substratu ulegnie hydrolizie. Zatem zarówno w procesach jedno-, jak i dwuetapowych kluczowym etapem jest powstawanie puli cząsteczek lizofosfolipidu będącego substratem dla enzymatycznego podstawienia pożądaną grupą acylową.



Rysunek 7. Enzymatyczne metody modyfikacji glicerofosfolipidów

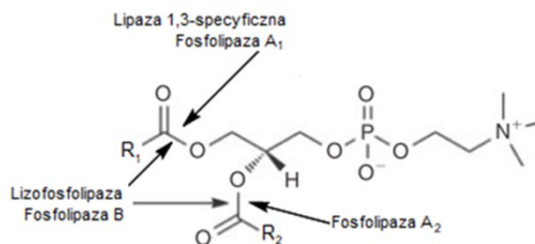
Figure 7. Enzymatic method for modification of glycerophospholipids

Obie metody są szeroko stosowane w modyfikacjach fosfolipidów. Posiadają swoje zalety i wady, a dobór odpowiedniej z nich podyktowany jest zazwyczaj żądaną czystością produktu końcowego [36].

Enzymami wykorzystywanymi do modyfikacji części hydrofobowej glicerofosfolipidów są fosfolipazy i *sn*-1,3 regioselektywne lipazy (Rys. 8). Fosfolipaza A<sub>1</sub> (1-acylohydrolaza fosfatydylocholiny, PLA<sub>1</sub>) i fosfolipaza A<sub>2</sub> (2-acylohydrolaza fosfatydylocholiny, PLA<sub>2</sub>) należą do hydrolaz, które specyficznie

hydrolizują wiązanie estrowe odpowiednio w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 glicerofosfolipidów [37]. Natomiast fosfolipaza B hydrolizuje oba wiązania estrowe zarówno w pozycji *sn*-1 jak i *sn*-2.

Wiele lipaz charakteryzuje się większą stabilnością od fosfolipazy A<sub>1</sub> oraz większą dostępnością w formie preparatów komercyjnych zarówno w postaci liofilizowanej, immobilizowanej (Lipozyme TL IM, Novozyme 435) jak i w formie roztworów. W porównaniu do PLA<sub>1</sub> i PLA<sub>2</sub> nie wymagają jonów wapnia oraz pozostają aktywne w aktywności wody poniżej 0,22 [38].



Rysunek 8. Regioselektywność enzymów wykorzystywanych do modyfikacji glicerofosfolipidów  
Figure 8. Regioselectivity of enzymes used to modify glycerophospholipids

## 2.1. STRUKTURYZOWANE FOSFOLIPIDY Z BIOAKTYWNYMI KWASAMI TŁUSZCZOWYMI

Enzymatyczne modyfikacje glicerofosfolipidów umożliwiają między innymi wymianę obecnych oryginalnie w fosfolipidach kwasów tłuszczowych na inne, biologicznie aktywne kwasy, a co za tym idzie zmianę wartości żywieniowych takich fosfolipidów. Prowadzone badania miały na celu uzyskanie strukturyzowanych fosfolipidów wzbogaconych w kwasy tłuszczowe o znaczeniu prozdrowotnym, w tym kwasy wielonienasycone (WNKT) *n*-3 i *n*-6 oraz zawierające sprzężone układy wiązań podwójnych. Proces otrzymywania fosfolipidów wzbogaconych o zdefiniowane kwasy tłuszczowe w określonych pozycjach szkieletu glicerolowego (strukturyzowanych fosfolipidów, SPL) przeprowadzono na drodze enzymatycznej modyfikacji fosfatydylocholiny (PC) uzyskanej z żółtek jaj kurzych [6-12,39].

### 2.1.1. Wzbogacanie PC żółtka jaja w kwasy *n*-3 i *n*-6 WNKT

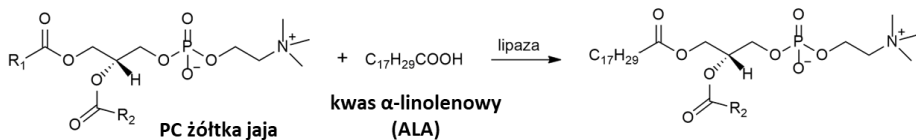
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny *n*-3, w tym kwasy  $\alpha$ -linolenowy (ALA, C18:3, 9,12,16, all *cis*), dokozaheksaenowy (DHA, C22:6, 4,7,10,13,16,19, all *cis*) i eikozapentaenowy (EPA, 20:5, 5,8,11,14,17, all *cis*) wpływają korzystnie na gospodarkę lipidową organizmu, wykazują właściwości przeciwzakrzepowe i przeciwpalne, a także działanie ochronne na układ sercowo-naczyniowy [40,41].

DHA i EPA wykazują bardzo wysoką aktywność biologiczną. Obniżają poziom cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL, zapobiegają stłuszczeniu wątroby [42,43]. DHA odpowiada za prawidłową pracę mózgu oraz jest niezbędny do tworzenia odpowiedniej ilości połączeń synaptycznych i zachowania plastyczności neuronów [44,45]. EPA przypisuje się aktywność w hamowaniu rozwoju niektórych rodzajów guzów nowotworowych [46,47]. Kwasy *n*-6 WNKTY są ważnymi związkami biorącymi udział w utrzymaniu prawidłowej struktury i funkcjonowania skóry [48]. Kwas linolowy (LA, C18:2, 9,12, all *cis*) wbudowywany jest w ceramidy będące swoistym uszczelniaczem skóry, chroni więc organizm przed nadmierną utratą wody [49]. Z kolei kwas  $\gamma$ -linolenowy (GLA, C18:3; 6,9,12, all *cis*) poprawia przepływ krwi w naczyniach krwionośnych, jest również niezbędny w profilaktyce i leczeniu suchej, podrażnionej i zaczerwienionej skóry [50].

Większość tych kwasów (ALA, GLA, EPA, DHA,) nie występuje w naturalnej fosfatydylocholiny żółtka jaja lub występuje w niewielkiej ilości (LA), przeprowadzono więc szereg badań prowadzących do otrzymania strukturyzowanej PC (SPC) wzbogaconej w kwasy *n*-3 i *n*-6 WNKTY.

Analiza składu kwasów tłuszczowych czystej fosfatydylocholiny wyizolowanej z żółtek jaj kurzych wykazała, że dominującymi w niej kwasami są nasycony kwas palmitynowy (C16:0, ok. 40%) oraz mononienasycony kwas oleinowy (C18:1, *c*9, ok. 27%). Ze względu na brak w naturalnej fosfatydylocholiny kwasu  $\alpha$ -linolenowego, będącego prekursorem polienowych kwasów tłuszczowych z rodziny *n*-3, w pierwszej kolejności opracowano metodę enzymatycznego wprowadzenia tego kwasu do jej cząsteczki [7,51].

Podjęto próby wzbogacenie PC w kwas  $\alpha$ -linolenowy zarówno w pozycji *sn*-1 jak i *sn*-2 [51]. Do modyfikacji pozycji *sn*-1 PC wykorzystano jednoetapowy proces acydolizy (Rys. 9), w którym jako donor grup acylowych zastosowano dostępną komercyjnie mieszaninę kwasów tłuszczowych, zawierającą ponad 70% ALA.



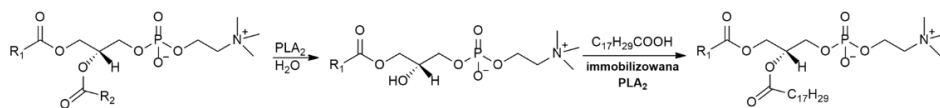
Rysunek 9. Schemat katalizowanej lipazami acydolizy fosfatydylocholiny z kwasem  $\alpha$ -linolenowym  
 Figure 9. Scheme of lipase-catalyzed acidolysis of phosphatidylcholine with  $\alpha$ -linolenic acid

Trzy komercyjnie dostępne preparaty immobilizowanych lipaz: Novozym 435 (CALB, lipaza B z *Candida antarctica*), Lipozyme® (RML, lipaza z *Mucor miehei*) oraz Lipozyme TL IM (TLL, lipaza z *Thermomyces lanuginosus*) przetestowano jako biokatalizatory w tym procesie. Warunki reakcji były następujące: temperatura 52-



55 °C, ponad 5-krotny nadmiar kwasów w stosunku do PC, 20% dodatek enzymu w stosunku do masy substratów oraz heptan jako medium reakcyjne.

Wprowadzenie ALA w pozycję *sn*-2 wymagało zastosowania procesu dwuetapowego, obejmującego regioselektywną hydrolizę fosfatydylocholiny do 1-acylo LPC, którą przeprowadzono na całej masie żółtka. Następnie wyizolowaną z mieszaniny produktów 1-acylo LPC poddano procesowi estryfikacji kwasem  $\alpha$ -linolenowym (Rys. 10). Oba etapy były katalizowane przez fosfolipazę  $A_2$  - hydrolizę przeprowadzono w zawiesinie żółtka przy użyciu płynnego preparatu enzymatycznego a przed etapem estryfikacji enzym był unieruchomiony na Supelite DAX-8.



Rysunek 10. Schemat dwuetapowego procesu wprowadzania ALA w pozycję *sn*-2 fosfatydylocholiny  
Figure 10. Scheme of a two-step process of introducing ALA into the *sn*-2 position of phosphatidylcholine

Ponieważ użyte w procesach enzymy (lipazy oraz  $PLA_2$ ) wykazują selektywność tylko wobec jednej pozycji (*sn*-1 lub *sn*-2 PC) teoretycznie przy 100% wydajności procesów (acydoliza PC lub estryfikacja 1-acylo LPC) maksymalny stopień wbudowania nowego kwasu, jaki można osiągnąć w tego typu procesach wynosi 50%.

Najwyższy stopień inkorporacji ALA w pozycję *sn*-1 (28%) uzyskano w procesie acydolizy z użyciem immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica* (Tab. 1). Pozostałe lipazy charakteryzowały się niższą aktywnością, przy czym wszystkie zastosowane preparaty wykazywały regioselektywność wobec pozycji *sn*-1, o czym świadczyła zmniejszona zawartość kwasów nasyconych w PC po procesach modyfikacji. Fosfolipaza  $A_2$  również efektywnie wbudowała cząsteczkę ALA w procesie estryfikacji 1-acylo LPC. W tym wypadku w reakcji prowadzonej w toluenie uzyskano około 25%-owe wbudowanie kwasu w pozycję *sn*-2 fosfatydylocholiny.

Kolejne badania nad otrzymaniem strukturyzowanych fosfolipidów wzbogaconych w WNKT skupiły się na reakcjach z użyciem *sn*-1,3-regioselektywnych lipaz, gdyż enzymy te pozwalają na wprowadzanie takich kwasów w cząsteczkę fosfolipidu z zachowaniem nienasyconych kwasów tłuszczowych (C18:1, C18:2 i C20:4) naturalnie występujących w pozycji *sn*-2 szkieletu glicerolowego PC.

Tabela 1. Profil kwasów tłuszczowych [% wg GC] w fosfatydylocholinie wyizolowanej z żółtka jaja kurzego oraz uzyskanej po modyfikacji enzymatycznej  
 Table 1. Fatty acid profile [% acc. to GC] in egg yolk phosphatidylcholine and obtained after enzymatic modification

Kwas tłuszczowy	PC żółtka jaja			Enzymatycznie modyfikowana PC			
	Total	Modyfikacja pozycji <i>sn</i> -1		Modyfikacja pozycji <i>sn</i> -2			
		<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	Novozym 435	Lipozyme RM IM	Lipozyme TL IM	PLA <sub>2</sub> (Lecitase 10L)
C16:0	40	66	1	6	16	24	43
C16:1	1	2	-	1	<1	<1	<1
C18:0	17	28	1	3	6	11	17
C18:1	27	3	55	30	27	28	4
C18:2	12	1	35	30	26	23	10
<b>C18:3 ALA</b>	-	-	-	<b>28</b>	<b>23</b>	12	<b>25</b>
C20:4	3	-	8	2	1	1	-

Badania dotyczące wzbogacenia fosfatydylocholinie w EPA i DHA objęły dwa etapy: otrzymanie koncentratu WNKT z oleju z wątroby dorsza, a następnie zastosowanie go jako donora grup acylowych w procesie katalizowanej lipazami acydolizy PC [8]. Koncentrat otrzymano wykorzystując znaną metodę kompleksowania mocznikiem wcześniej zhydrolizowanego oleju [52]. Wyjściowy olej zawierał 27% *n*-3 WNKT. Kompleksowanie mocznikiem pozwoliło na uzyskanie koncentratu zawierającego ponad trzykrotnie większą ilość *n*-3 WNKT (87%), w którym DHA i EPA stanowiły odpowiednio 45% oraz 27%.

Reakcje acydolizy PC uzyskanym koncentratem WNKT prowadzono w standardowych warunkach procesu acydolizy, ustalonych na podstawie wcześniejszych badań [7]. Wyjściową fosfatydylocholinę wyizolowano z żółtek jaj pochodzących od kur karmionych paszą wzbogaconą w WNKT, zawierała więc ona niewielkie ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny *n*-3 (około 4%).

Tym razem zbadano aktywność 7 różnych lipaz jako biokatalizatorów oraz przeprowadzono dobór optymalnych warunków procesu acydolizy (rodzaj rozpuszczalnika, stosunek molowy substratów oraz ilość dodanego enzymu). Warunki procesu acydolizy katalizowanej Novozymem 435 (heksan jako medium reakcyjne, temperatura 55° C, 1/3 stosunek molowy PC/WNKT, 20% dodatek enzymu, czas reakcji 48 godzin) pozwoliły na otrzymanie strukturyzowanej PC (SPC) zawierającej 27,5% *n*-3 WNKT (Tab. 2). Kwasem, który wprowadzony został w największej ilości do fosfolipidów był DHA (17,6%).

Czynnikiem, który najbardziej wpływał na proces inkorporacji kwasów EPA i DHA do cząsteczki PC okazała się ilość koncentratu kwasów WNKT w mieszaninie reakcyjnej. Zwiększenie stosunku molowego PC/WNKT z 1/3 do 1/10 w procesie

prowadzonym w heksanie z 20% dodatkiem enzymu, skutkowało zwiększeniem zawartości kwasów *n*-3 w zmodyfikowanej PC z 27,5% nawet do 45,5%, niestety znacząco spadła wydajność z jaką uzyskiwano zmodyfikowaną PC.

Tabela 2. Skład kwasów tłuszczowych [% wg GC] w fosfatydylocholinie natywnej (PC żółtka jaja) oraz produktach jej acydolizy z koncentratem WNKT, prowadzonej w obecności Novozym 435  
Table 2. Fatty acid composition [% acc. to GC] in native phosphatidylcholine (egg yolk PC) and products of its acidolysis with PUFA concentrate, carried out in the presence of Novozym 435

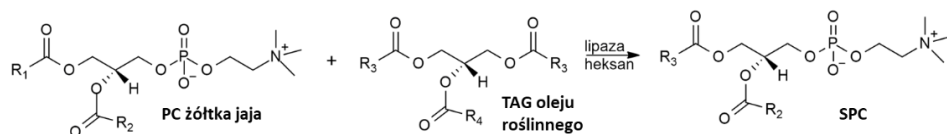
Kwas tłuszczowy	PC natywna			PC zmodyfikowana		
	Total	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	Total	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2
C16:0	34,2±0,11	64,1±0,22	0,8±0,04	15,7±0,48	28,5±0,65	0,5±0,55
C18:0	15,7±0,05	29,2±0,55	1,1±0,09	9,5±0,27	19,5±0,35	0,3±0,13
C18:1	29,0±0,04	5,5±0,33	56,3±0,32	30,1±0,09	7,5±0,12	52,1±0,95
C18:2	15,3±0,02	1,2±0,05	28,8±0,55	15,9±0,34	1,5±0,25	29,0±0,84
<b>C18:4 SDA <i>n</i>-3</b>	-	-	-	<b>2,1±0,06</b>	<b>3,8±0,22</b>	<b>0,2±0,06</b>
C20:4 <i>n</i> -6	2,0±0,01	-	4,5±0,06	1,8±0,08	3,5±0,12	0,5±0,08
<b>C20:5 EPA <i>n</i>-3</b>	0,6±0,02	-	1,4±0,06	<b>7,8±0,13</b>	<b>14,5±0,35</b>	<b>1,5±0,12</b>
<b>C22:6 (DHA) <i>n</i>-3</b>	3,2±0,05	-	7,1±0,22	<b>17,6±0,11</b>	<b>29,1±0,84</b>	<b>3,2±0,55</b>
<b>Σ <i>n</i>-3 WNKT</b>	<b>3,8</b>	<b>0</b>	<b>8,5</b>	<b>27,5</b>	<b>47,4</b>	<b>4,9</b>

Analiza pozycyjna SPC wykazała, że kwasy EPA i DHA wbudowały się prawie całkowicie w pozycję *sn*-1, zastępując kwasy nasycone występujące w tej pozycji w fosfatydylocholinie natywnej. Zaproponowana metoda pozwala więc na uzyskanie 1-DHA-PC w łagodnych warunkach procesu, z naturalnych substratów (PC żółtka jaja, olej z wątroby dorsza) przy udziale komercyjnie dostępnej regioselektywnej lipazy (Novozym 435).

Ponieważ w naturze można znaleźć oleje bogate w bioaktywne kwasy tłuszczowe, kolejnym aspektem badań było zastosowanie naturalnych triacylogliceroli (TAG), czyli olejów roślinnych w procesach enzymatycznego wzbogacania fosfolipidów w *n*-3 i *n*-6 WNKT [51]. W przypadku wzbogacenia PC w kwas  $\alpha$ -linolenowy (*n*-3 WNKT) takim surowcem był olej lniany zawierający ok. 58% kwasu  $\alpha$ -linolenowego. W celu zwiększenia ilości *n*-6 WNKT, jako źródło tych kwasów wykorzystano oleje słonecznikowy, krokoszowy oraz olej z wiesiołka (zawierające ponad 70% kwasu linolowego,) a także olej z ogórecznika (zawierający 40% LA). Dodatkowo oleje z wiesiołka oraz ogórecznika zawierały niewielkie ilości kwasu  $\gamma$ -linolenowego (*n*-6 WNKT), odpowiednio 10% oraz 20%.

Tym razem zaproponowano metodę opartą na procesie interstryfikacji czyli wymianie reszt acylowych pomiędzy fosfolipidem a triacyloglicerolami oleju roślinnego (Rys. 11). W badaniach przetestowano aktywność tych samych trzech

komercyjnie dostępnych preparatów immobilizowanych lipaz. Zastosowano podobne warunki reakcji, zmniejszono jedynie stosunek molowy substratów PC/TAG z 1/5 na 1/2, gdyż wykorzystany w tym procesie donor grupy acylowej czyli TAG zawiera w jednej cząsteczce aż dwa dostępne dla lipaz łańcuchy kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1 i *sn*-3.



Rysunek 11. Schemat katalizowanej lipazami interestryfikacji fosfatydylocholin - olejami roślinnymi  
Figure 11. Scheme of lipase-catalyzed interesterification of phosphatidylcholine with plant oils

Preparat immobilizowanej lipazy z *C. antarctica* (Novozym 435) ponownie najefektywniej wprowadzał zarówno kwasy *n*-3 jak i *n*-6 do cząsteczki PC (Tab. 3).

Tabela 3. Skład kwasów tłuszczowych [% wg GC] w fosfatydylocholinie natywnej (PC żółtka jaja) oraz produktach jej interestryfikacji olejami roślinnymi, katalizowanej przez Novozym 435  
Table 3. Fatty acid composition [% acc. To GC] in native phosphatidylcholine (egg yolk PC) and products of its interesterification with plant oils, catalyzed by Novozym 435

Kwasy tłuszczowe	PC żółtka jaja	SPC (olej lniany)	SPC (olej krokoszy)	SPC (olej słonecznikowy)	SPC (olej z wiesiołka)	SPC (olej z ogórecznika)
C16:0	30	8	8.8	13.9	9.4	15.7
C16:1	1.5	1	-	-	-	-
C18:0	15	3	5.4	8.0	4.5	9.2
C18:1	28	28	39.5	35.7	32.2	35.5
C18:2 (LA)	20	22	<b>43.9</b>	<b>38.7</b>	<b>46.7</b>	<b>28.2</b>
C18:3 (ALA)	-	<b>34</b>	-	-	-	-
C18:3 (GLA)	-	-	-	-	<b>4.0</b>	<b>7.3</b>
C20:4 (ARA)	4.5	3	2.4	3.7	3.2	4.1
Σ <i>n</i> -6 WNKT	24.5	25	46.3	42.4	53.9	39.6
Σ <i>n</i> -3 WNKT	-	34	-	-	-	-

W procesie interestryfikacji PC olejem lnianym uzyskano strukturyzowaną fosfatydylocholinę (SPC) zawierającą w składzie kwasów tłuszczowych aż 34% ALA, nieznacznie więcej niż w procesie acydolizy PC katalizowanej przez ten enzym [7]. Regioselektywność zastosowanej lipazy spowodowała znaczące obniżenie zawartości kwasów nasyconych (z 45% do 11%) w uzyskanej SPC, natomiast zawartość kwasów mononienasyconych pozostała na zbliżonym poziomie jak w PC natywnej. Oprócz uzyskania fosfatydylocholinę zawierającej ponad 35% kwasów *n*-

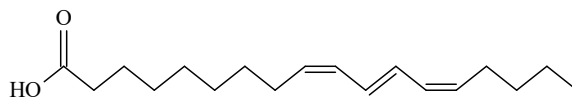
3 WNKT (w tym 34% ALA), nastąpiła istotna redukcja stosunku  $n-6/n-3$  WNKT w PC z 24,5 do 0,7, co jest bardzo istotne z punktu zastosowania takiego produktu jako suplementu diety. Niższy stosunek kwasów tłuszczowych  $n-6/n-3$  jest bardziej pożądany w diecie gdyż zmniejsza ryzyko wielu chorób przewlekłych, w tym chorób sercowo-naczyniowych, nowotworów oraz chorób zapalnych i autoimmunologicznych [53].

W procesie interestryfikacji PC żółtka jaja olejami bogatymi w kwas linolowy (olejem krokoszowym, słonecznikowym czy olejem z wiesiołka) uzyskano porównywalne wyniki wbudowania LA do PC. Maksymalny wzrost zawartości tego kwasu w cząsteczce PC z 20% do 46,7% osiągnięto przy zastosowaniu preparatu Novozym 435 i oleju z wiesiołka jak dawcy acylu. W przypadku olejów krokoszowego i słonecznikowego w obecności tego samego enzymu zawartość LA w SPC wzrosła odpowiednio do 43,9 i 38,7% (Tab. 3). Zastosowanie oleju z wiesiołka pozwoliło na uzyskanie produktu o bardzo niskiej zawartości kwasów nasyconych (14%) i około 54%-owej zawartości kwasów  $n-6$  niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), w tym 46,7% LA i 4% GLA. Zastosowanie oleju z ogórecznika w procesie interestryfikacji katalizowanej tą samą lipazą również dało produkt zawierający oba te kwasy w ilościach 28% LA i 7% GLA.

### 2.1.2. Wzbogacanie PC żółtka jaja w sprzężony kwas linolenowy (CLnA)

Zaproponowana metoda interestryfikacji fosfatydylocholinoi żółtka jaja kurzego z wykorzystaniem TAG olejów roślinnych została również wykorzystana do uzyskania SPC wzbogaconej w kwas punikowy [9].

Kwas punikowy (9Z,11E,13Z – oktadekatrienowy) należy do grupy izomerów sprzężonych kwasów linolenowych, które są geometrycznymi i pozycyjnymi izomerami kwasu linolenowego (18:3), zawierającymi układ trzech sprzężonych wiązań podwójnych (Rys. 12).



Rysunek 12. Wzór kwasu punikowego, 18:3; 9Z,11E,13Z oktadekatrienowego  
Figure 12. Formula of puniceic acid, 18:3; 9Z,11E,13Z octadecatrienoic acid

CLnA wykazują szereg korzyści zdrowotnych [54-56] m.in. właściwości antykancerogenne. Udowodniono cytotoksyczne działanie kwasu punikowego wobec linii komórkowych nowotworów piersi, prostaty i okrężnicy. Liczne badania

potwierdzają również działania antyoksydacyjne, regulujące gospodarkę lipidową oraz wpływ tego kwasu na wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej.

Zimnotłoczony, nieoczyszczony olej z pestek granatu (PSO) zawierający ponad 77% kwasu punikowego w TAG, wykorzystano jako donor grupy acylowej w procesie interestryfikacji PC żółtka jaja. Wstępny skrining enzymów ponownie wykazał najwyższą aktywność lipazy B z *Candida antarctica* (Novozym 435), a analiza wpływu badanych czynników, pozwoliła na optymalizację parametrów procesu interestryfikacji katalizowanej lipazą B z *Candida antarctica* zarówno pod względem ilości wbudowanego kwasu punikowego, jak wydajności izolowania SPC. W optymalnych warunkach (1/3 stosunek molowy substratów PC/PSO, 20% dodatek enzymu, 72 godziny reakcji) można uzyskać strukturyzowaną fosfatydylocholinę zawierającą prawie 50% wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym 28,8% kwasu punikowego, z ok. 40% wydajnością izolowania SPC.

### 2.1.3. Wzbogacanie PC żółtka jaja w sprzężony kwas linolowy (CLA)

Podjęto również badania nad wprowadzaniem izomerów sprzężonego kwasu linolowego do fosfolipidów w procesie acydolizy fosfatydylocholiny z żółtka jaja kurzego [12]. Podczas optymalizacji procesu acydolizy musi zostać osiągnięty pewien kompromis pomiędzy stopniem wbudowania CLA, a wydajnością modyfikowanej PC. Należy więc monitorować nie tylko stopień wbudowania CLA w fosfolipidy, ale również stopień hydrolizy. Dlatego jako najbardziej złożone kryterium oceny efektywności procesu zaproponowano parametr „efektywnego wbudowania CLA” ( $E_{CLA} = (\text{ilość moli CLA w PC} + \text{ilość moli CLA w LPC}) / \text{ilość moli PC poddanego acydolizie} \times 100\%$ ), który opisuje zawartość reszt CLA w PC i LPC w stosunku do początkowej ilości fosfatydylocholiny wykorzystanej w reakcji. Do optymalizacji procesu acydolizy wykorzystano mieszaninę izomerów *c9,t11* i *t10,c12*CLA w stosunku molowym 1:1 uzyskaną w wyniku alkalicznej izomeryzacji kwasu linolowego [17].

Przeprowadzono badania przesiewowe czterech lipaz immobilizowanych: TLL, CALB i RML oraz lipazy z *Burkholderia cepacia* (BCL) i trzech liofilizowanych lipaz: z *Aspergillus niger* (ANL), z trzustki wieprzowej (HPL) i z *Candida cylindracea* (CCL). Jedynie trzy lipazy (TLL, RML, CALB) wykazały wysoką aktywność dając produkt fosfolipidowy o zawartości CLA powyżej 20%. Najwyższe efektywne wbudowanie CLA uzyskano z wykorzystaniem lipazy z *Rhizomucor miehei* (RML), w tym przypadku  $E_{CLA}$  wyniosło 21%.

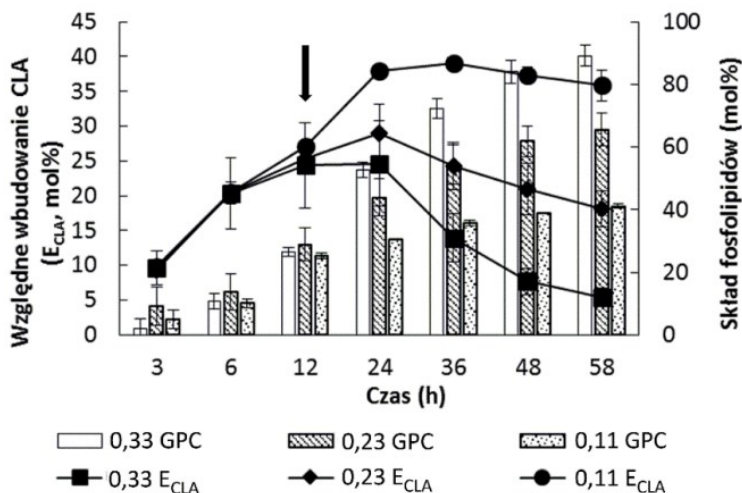
Po 24 h acydolizy prowadzonej w rozpuszczalnikach hydrofobowych (heptan, izooktan czy toluen), efektywne wbudowanie wyniosło 15-20%. W przypadku rozpuszczalników hydrofilowych (DMSO, dioksan) osiągnięto jedynie 3,5%

wbudowania. Najwyższy poziom  $E_{CLA}$  (20%) uzyskano w przypadku reakcji prowadzonej w heptanie.

Badając wpływ wody na wydajność fosfolipidów i zawartość CLA w produktach modyfikacji, przeprowadzono eksperymenty w kontrolowanej aktywności wody ( $a_w$ ) w zakresie od 0,11 do 0,87, w temperaturze 55°C. Przed rozpoczęciem reakcji substraty dodatkowo inkubowano w wybranej aktywności wody przez 24 h. Najwyższe wartości efektywnego wbudowania uzyskiwano po 12 h. Całkowita zawartość PC i LPC badana w czasie, spadała szybciej w reakcjach prowadzonych przy wyższej aktywności wody. Uzyskane wyniki wskazują, że wysoka zawartość wody przyspiesza hydrolizę PC oraz migrację reszty acylowej z 2-acylo LPC, a następnie hydrolizę powstałej w jej wyniku 1-acylo LPC do GPC. Najwyższą wartość  $E_{CLA}$  otrzymano w przypadku prowadzenia reakcji w  $a_w = 0,33$ . W optymalnych warunkach procesu prowadzonego w heptanie, przy tej aktywności wody, w temperaturze 45°C, przy 8-krotnym nadmiarze CLA do PC i 24% zawartości enzymu w stosunku do sumarycznej masy substratów, uzyskano efektywne wbudowanie CLA na poziomie 25%.

Obniżając aktywność wody podczas acydolizy można doprowadzić do przesunięcia równowagi reakcji z hydrolizy w stronę estryfikacji, doprowadzając do powstania dodatkowej ilości fosfatydylocholiny.

W kolejnych doświadczeniach prowadzono kontrolę aktywności wody poprzez obniżenie  $a_w$  z 0,33 do 0,23 lub 0,11 po 12 h trwania acydolizy. Po 24 h takiej reakcji prowadzonej w  $a_w = 0,23$  zaobserwowano wzrost  $E_{CLA}$  o około 4%. Po 36 h reakcji, w której aktywność została zredukowana do 0,11 uzyskano  $E_{CLA}$  na poziomie 39,0%, (Rys. 13). W tych warunkach zawartość CLA w PC osiągnęła 33,8%, a w LPC 50,1%, a wydajności PC i LPC wynosiły odpowiednio 39,5 i 25,3%. Analiza składu kwasów tłuszczowych w otrzymanych produktach acydolizy wykazała, że wbudowanie CLA nastąpiło tylko w pozycję *sn*-1 fosfatydylocholiny. Wysoka zawartość reszt sprzężonego kwasu linolowego w LPC sugeruje, że lizofosfatydylocholina tworzyła się głównie poprzez estryfikację GPC w wyniku obniżenia aktywności wody.

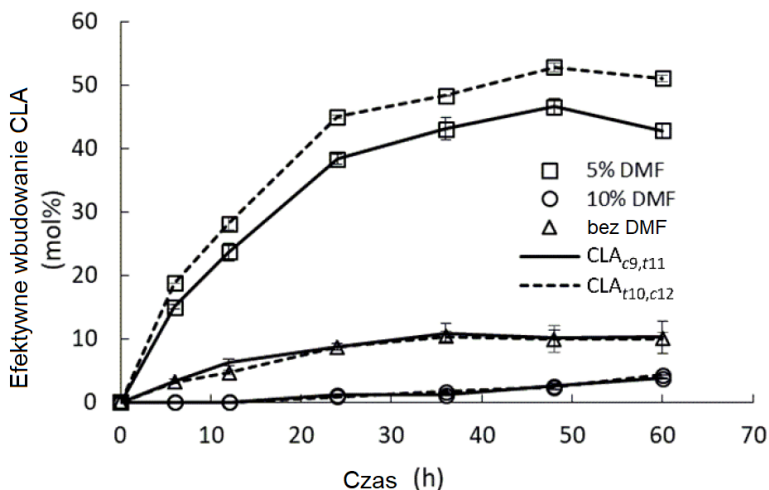


Rysunek 13. Wpływ zmiany aktywności wody podczas acydolizy fosfatydylocholiny z żółtka jaja kurzego sprężonym kwasem linolowym na efektywne wbudowanie CLA do PL. (Strzałka wskazuje moment zmiany aktywności wody)

Figure 13. Effect of water activity change during acidolysis of egg-yolk phosphatidylcholine with conjugated linoleic acid on the effective incorporation of CLA into PL. (Arrow points water activity change)

W badaniach nad opracowaniem wydajnej metody enzymatycznej syntezy fosfolipidów z pojedynczymi czystymi (>90%) izomerami *c9,t11* i *t10,c12* CLA zbadano trzy immobilizowane lipazy (RML, CALB, TLL) pod kątem specyficzności wobec izomerów CLA w acydolizie fosfatydylocholiny żółtka jaj [10]. RML i CALB charakteryzowała niewielka selektywność w stosunku do izomeru *c9,t11* CLA. TLL wykazała największą różnicę we wbudowaniu poszczególnych izomerów CLA do cząsteczki PC, które dla *c9,t11* CLA wyniosło 8,8%, a dla *t10,c12* CLA tylko 1,4%. W optymalnych warunkach reakcji prowadzonych w heptanie, w stosunku molowym PC/CLA 1:6; 24% wag. RML i przy kontroli aktywności wody, w tych badaniach zastosowano dodatek (5% lub 10%) dimetyloformamidu (DMF) jako substancji naśladowującej wodę (z ang. *water mimicking co-solvent*). Przy aktywności wody na poziomie 0,11 z 5% dodatkiem DMF po 48 h uzyskano efektywne wbudowanie *c9,t11* CLA i *t10,c12* CLA na poziomie odpowiednio 53 i 47% (Rys. 14). W porównaniu do wcześniejszych wyników acydolizy przeprowadzonej przy  $a_w = 0,23$ ,  $E_{CLA}$  wzrosło o 25–30% jedynie w wyniku dodania rozpuszczalnika imitującego wodę i zmniejszenia aktywności wody do 0,11. Ponadto przeprowadzone badania wykazały, że lipazy wykazują selektywność względem fosfatydylocholin różniących się składem reszt kwasów tłuszczowych i lepiej akceptują natywną fosfatydylocholinę z żółtka jaja niż syntetyczną 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny.

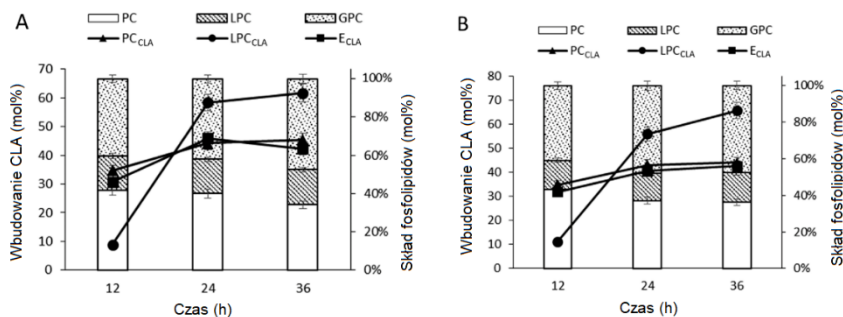




Rysunek 14. Wpływ dodatku dimetyloformamidu (DMF) na efektywność inkorporacji izomerów CLA w reakcji acydolizy fosfatydylochliny z żółtka jaja

Figure 14. Effect of dimethylformamide (DMF) on the effective incorporation of *c9,t11*CLA and *t10,c12*CLA in the acidolysis reaction of phosphatidylcholine from egg yolk

Proces acydolizy fosfatydylochliny (PC) żółtka jaja kurzego przeprowadzono również przy użyciu koncentratów CLA otrzymanych z oleju słonecznikowego i oleju z krokosza barwierskiego [11]. Koncentraty uzyskano w wyniku dwuetapowego procesu polegającego na hydrolizie i jednoczesnej izomeryzacji TAG, a następnie krystalizacji adduktów mocznika z uzyskanymi kwasami tłuszczowymi. Otrzymane koncentraty zawierały ponad 90% sprzężonego kwasu linolowego i składały się głównie z *c9,t11* i *t10,c12* CLA z niską zawartością innych izomerów (<2,5%). Kompleksowanie z mocznikiem nie tylko zwiększyło zawartość CLA w koncentracie, ale także wzbogaciło wyjściową równomolową mieszaninę obu izomerów w izomer *t10,c12*. Preparaty CLA były następnie wykorzystywane w procesie acydolizy (temp. 45°C, medium reakcyjne: heptan, stosunek molowy CLA/PC, 8:1, 24% wag. Lipazy RML). Początkową aktywność wody, która wynosiła 0,33, zmniejszono po 12h trwania reakcji do 0,11. Ustalone warunki reakcji pozwoliły uzyskać PC i LPC zawierające odpowiednio 42–44% oraz 62–65% reszt acylowych CLA. Wysoką efektywną inkorporację CLA (42%) uzyskano po 36 h reakcji (Rys. 15).



Rysunek 15. Wbudowanie CLA w fosfatydylocholinę i lizofosfatydylocholinę oraz skład fosfolipidów w mieszaninie reakcyjnej podczas acydolizy koncentratami CLA wytworzonymi na bazie oleju słonecznikowego (A) oraz oleju z krokosza barwierskiego (B)

Figure 15. Incorporation of CLA into PC and LPC and phospholipids distribution in the reaction mixture of PC acidolysis with CLA concentrate from sunflower oil (A) and safflower oil (B)

## UWAGI KOŃCOWE

Nowe koniugaty fosfolipidowe otrzymane zaprezentowanymi metodami chemicznymi lub chemoenzymatycznymi, zawierające takie bioaktywne związki jak dehydroepiandrosteron, niesteroidowe leki przeciwzapalne czy CLA, mogą być doskonałymi nośnikami tych substancji, zwiększając między innymi ich biodostępność. Dodatkowo niektóre z uzyskanych połączeń wykazują wyższe aktywności antyproliferacyjne względem badanych linii nowotworowych lub niższą cytotoksyczność wobec zdrowych komórek niż wyjściowe substancje.

Uzyskane strukturyzowane fosfolipidy, wzbogacone w kwasy *n-3* lub *n-6* WNKT można nazwać lipidami multifunkcjonalnymi zawierającymi dwa funkcjonalne fragmenty: reszty kwasów NNKT oraz cholinę, co daje ogromną szansę na wykorzystanie ich jako nutraceutyki, dodatki do formulacji produktów kosmetycznych lub dodatki funkcjonalne do żywności. Zastosowanie tanich olejów roślinnych zamiast syntetycznych dawców grup acylowych w procesie wzbogacania fosfolipidów w kwasy wielonienasycone może znacznie obniżyć koszt takiego procesu.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] N. Niezgoda, P. Mituła, K. Kempieńska, J. Wietrzyk, C. Wawrzeńczyk, *Aust. J. Chem.*, 2013, **66**, 354.
- [2] N. Niezgoda, A. Gliszczyńska, W. Gładkowski, K. Kempieńska, J. Wietrzyk, C. Wawrzeńczyk, *Aust. J. Chem.*, 2015, **68**, 1065. <https://doi.org/10.1071/CH14606>.
- [3] M. Kłobucki, A. Grudniewska, D.A. Smuga, M. Smuga, J. Jarosz, J. Wietrzyk, G. Maciejewska, C. Wawrzeńczyk, *Steroids*, 2017, **118**, 109.

- [4] D.A. Smuga, M. Smuga, A. Świzdor, A. Panek, C. Wawrzęczyk, *Steroids*, 2010, **75**, 1146. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.08.001>.
- [5] M. Kłobucki, A. Urbaniak, A. Grudniewska, B. Kocbach, G. Maciejewska, G. Kielbowicz, M. Ugorski, C. Wawrzęczyk, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 220. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36571-1>.
- [6] A. Chojnacka, W. Gładkowski, G. Kielbowicz, A. Gliszczynska, N. Niezgodą, C. Wawrzęczyk, *Grasas Aceites*, 2014, **65**, e053
- [7] A. Chojnacka, W. Gładkowski, G. Kielbowicz, C. Wawrzęczyk, *Biotechnol. Lett.*, 2009, **31**, 705.
- [8] A. Chojnacka, W. Gładkowski, A. Grudniewska, *Molecules*, 2017, **22**, 1771.
- [9] A. Chojnacka, W. Gładkowski, A. Gliszczynska, N. Niezgodą, G. Kielbowicz, C. Wawrzęczyk, *Catal. Commun.*, 2016, **75**, 60.
- [10] N. Niezgodą, A. Gliszczynska, *Catalysts*, 2019, **9**, 1012. <https://doi.org/10.3390/catal9121012>.
- [11] N. Niezgodą, A. Gliszczynska, W. Gładkowski, A. Chojnacka, G. Kielbowicz, C. Wawrzęczyk, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2016, **118**, 1566. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500589>.
- [12] N. Niezgodą, A. Gliszczynska, W. Gładkowski, A. Chojnacka, G. Kielbowicz, C. Wawrzęczyk, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2016, **123**, 14.
- [13] P. D'Arrigo, S. Servi, *Molecules*, 2010, **15**, 1354. <https://doi.org/10.3390/molecules15031354>.
- [14] M.A.P. Morgado, J.M.S. Cabral, D.M.F. Prazeres, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1995, **63**, 181. <https://doi.org/10.1002/jctb.280630214>.
- [15] G. Kielbowicz, A. Chojnacka, A. Gliszczynska, W. Gładkowski, M. Kłobucki, N. Niezgodą, C. Wawrzęczyk, *Talanta*, 2015, **141**, 137.
- [16] D.L. Palmquist, A.L. Lock, K.J. Shingfield, D.E. Bauman, *Adv. Food Nutr. Res.*, 2005, **50**, 179. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(05\)50006-8](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(05)50006-8).
- [17] C. Niezgodą, N. Miłuła, P., Wawrzęczyk, *Przem. Chem.*, 2011, **90**, 949.
- [18] K. Koba, T. Yanagita, *Obes. Res. Clin. Pract.*, 2014, **8**, e525. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.10.001>.
- [19] D. Sugasini, P. V. Subbaiah, *PLoS One.*, 2017, **12**, 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187826>.
- [20] A. Pucek, N. Niezgodą, J. Kulbacka, C. Wawrzęczyk, K.A. Wilk, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2017, **532**, 377. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.061>.
- [21] F. Labrie, V. Luu-The, A. Bélanger, S.X. Lin, J. Simard, G. Pelletier, C. Labrie, *J. Endocrinol.*, 2005, **187**, 169. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06264>.
- [22] R. López-Marure, P.G. Contreras, J.S. Dillon, *Eur. J. Pharmacol.*, 2011, **660**, 268. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.03.040>.
- [23] M.D. Johnson, R.A. Bebb, S.M. Sirrs, *Ageing Res. Rev.*, 2002, **1**, 29. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00369-4](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00369-4).
- [24] P. D'Arrigo, E. Fasoli, G. Pedrocchi-Fantoni, C. Rossi, C. Saraceno, D. Tessaro, S. Servi, *Chem. Phys. Lipids*, 2007, **147**, 113. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.03.008>.
- [25] S. Shah, V. Mehta, *Postgrad. Med. J.*, 2012, **88**, 73. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2011-130291>.
- [26] B. Möller, M. Pruijm, S. Adler, A. Scherer, P.M. Villiger, A. Finckh, *Ann. Rheum. Dis.*, 2015, **74**, 718. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204078>.
- [27] P.C. Gøtzsche, *Control. Clin. Trials.*, 1989, **10**, 31. [https://doi.org/10.1016/0197-2456\(89\)90017-2](https://doi.org/10.1016/0197-2456(89)90017-2).
- [28] M.M. Corkill, *Gout, N. Z. Med. J.*, 1994, **107**, 337. <https://doi.org/10.1097/rhu.0b013e3181896921>.
- [29] T. Iwama, *J. Gastroenterol.*, 2009, **44**, 72. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2265-7>.
- [30] D. Wang, R.N. Dubois, *Gut.*, 2006, **55**, 115. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.047100>.
- [31] Y.I. Cha, R.N. DuBois, *Annu. Rev. Med.*, 2007, **58**, 239.

- <https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131253>.
- [32] D. Wang, R.N. DuBois, *Annu. Rev. Med.*, 2013, **64**, 131. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-112211-154330>.
- [33] D. Mazhar, R. Ang, J. Waxman, *Br. J. Cancer.*, 2006, **94**, 346. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602942>.
- [34] K.D. Rainsford, *Am. J. Med.*, 1999, **107**, 27. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00365-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00365-4).
- [35] I. Bjarnason, J. Hayllar, A.N. Dre. J. Macpherson, A.N. Thon. S. Russell, *Gastroenterology*, 1993, **104**, 1832. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90667-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90667-2).
- [36] X. Xu, A.F. Vikbjerg, Z. Guo, L. Zhang, A.K. Acharya, *Phospholipid Technology and Applications*, Woodhead Publishing, 2012.
- [37] Z. Guo, A.F. Vikbjerg, X. Xu, *Biotechnol. Adv.*, 2005, **23**, 203. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.02.001>.
- [38] D. Egger, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1997, **1343**, 76. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(97\)00115-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00115-5).
- [39] A. Chojnacka, W. Gładkowski, *Catalysts*, 2018, **8**, 281.
- [40] P.M. Kris-Etherton, K.D. Hecker, A.E. Binkoski, *Nutr. Rev.*, 2004, **62**, 414. <https://doi.org/10.1301/nr.2004.nov.414-426>.
- [41] F.B. Hu, M.J. Stampfer, J.A.E. Manson, E.B. Rimm, A. Wolk, G.A. Colditz, C.H. Hennekens, W.C. Willett, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, **69**, 890. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.890>.
- [42] S. Tandy, R.W.S. Chung, W.A.T. Elaine, A.K.K. Berge, M. Griinari, J.S. Cohn, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 9339. <https://doi.org/10.1021/jf9016042>.
- [43] S.M. Kwak, S.K. Myung, Y.J. Lee, H.G. Seo, *Arch. Intern. Med.*, 2012, **172**, 686. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2012.262>.
- [44] W.J. Lukiw, N.G. Bazan, *J. Nutr.*, 2008, **138**, 2510. <https://doi.org/10.3945/jn.108.096016>.
- [45] J.M. Alessandri, P. Guesnet, S. Vancassel, P. Astorg, I. Denis, B. Langelier, S. Aïd, C. Poumès-Ballihaut, G. Champeil-Potokar, M. Lavialle, *Reprod. Nutr. Dev.*, 2004, **44**, 509. <https://doi.org/10.1051/rnd:2004063>.
- [46] S.T. Russell, M.J. Tisdale, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.*, 2005, **72**, 409. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.03.002>.
- [47] A.P. Simopoulos, *J. Am. Coll. Nutr.*, 2002, **21**, 495. <https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719248>.
- [48] J. Callaway, U. Schwab, I. Harvima, P. Halonen, O. Mykkänen, P. Hyvönen, T. Järvinen, *J. Dermatolog. Treat.*, 2005, **16**, 87. <https://doi.org/10.1080/09546630510035832>.
- [49] H.S. Hansen, B. Jensen, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.*, 1985, **834**, 357. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90009-8).
- [50] M. Białek, J. Rutkowska, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015, **69**, 892. <https://doi.org/10.5604/17322693.1162991>.
- [51] A. Chojnacka, W. Gładkowski, G. Kielbowicz, C. Wawrzenczyk, *Lipid Technol.*, 2012, **24**, 33. <https://doi.org/10.1002/lite.201200171>.
- [52] D.G. Hayes, Y.C. Bengtsson, J.M. Van Alstine, F. Setterwall, *JAOCS*, 1998, **75**, 1403. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0190-9>.
- [53] Simopoulos A.P., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, **54**, 438.
- [54] M.E. Grossman, N.K. Mizuno, T. Schuster, M.P. Cleary, *Int. J. Oncol.*, 2010, **36**, 421. <https://doi.org/10.3892/ijo>.
- [55] P. Aruna, D. Venkataramanamma, A.K. Singh, R.P. Singh, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016, **15**, 16. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12171>.
- [56] R. Holic, Y. Xu, K.M.P. Caldo, S.D. Singer, C.J. Field, R.J. Weselake, G. Chen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, **102**, 3537. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8883-y>.

---

Praca wpłynęła do Redakcji 26 marca 2023 r.

