

Stručný úvod do problematiky obsahových látek řas a sinic – důkazy o výskytu fenolických metabolitů

VACEK J.¹, ŠNÓBLOVÁ M.², KLEJDUS B.²

¹Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ústav lékařské chemie a biochemie

²Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Ústav chemie a biochemie

Došlo 26. května 2009 / Přijato 15. června 2009

SOUHRN

Stručný úvod do problematiky obsahových látek řas a sinic – důkazy o výskytu fenolických metabolitů

Řasy a sinice představují skupinu fotosyntetizujících organismů, které se významně podílejí na primární produkci planety. Mnohé z obsahových látek řas jsou využívány a testovány v biotechnologických postupech a farmaceutickém nebo potravinářském průmyslu. Jde převážně o fykolooidy a vybrané nízkomolekulární produkty metabolismu, jako jsou vitaminy, glykosidy, toxiny nebo fotosyntetické pigmenty. Mnohé z těchto látek vykazují antioxidační, antimikrobiální, virostatické nebo protirakovinné účinky, a je proto diskutována jejich využitelnost ve farmakochemickém a biomedicinském výzkumu a vývoji. V předkládaném textu jsou ve stručnosti uvedeny významné obsahové látky řas a nové poznatky týkající se výskytu fenolických sloučenin v řasách a sinicích.

Klíčová slova: řasy – sinice – metabolity – fenoly

Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 103–108

SUMMARY

A short introduction to algal and cyanobacterial constituents – the occurrence of phenolic metabolites

Algae and cyanobacteria belong to photosynthetic organisms responsible for primary production of the Earth. Algae are able to synthesize different compounds (phycocolloids and low-molecular metabolites, such as vitamins, glycosides, toxins, and photosynthetic pigments) which are applied and tested in biotechnology, pharmacy, and food industry. Many of algal metabolites are antioxidants and/or antimicrobial agents and therefore the application of these metabolites in pharmaceutical and biomedical research and development is discussed. In the present review, the compounds important for chemical industry and basic algal phenolic metabolites are described.

Key words: algae – cyanobacteria – metabolites – phenols

Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 103–108

Má

Úvod

Řasy společně se sinicemi patří mezi vývojově nejstarší fotosyntetizující organismy, které se vyskytují ve sladkovodním, brakickém i oceánském prostředí. Vzhledem k tomu, že některé druhy řas řadíme mezi

extremofilní druhy¹⁾, lze v jejich metabolismu identifikovat metabolické dráhy, jejichž produkty umožňují přežít v nehostinném prostředí horských vřídél, na povrchu krystalků ledu nebo v jiných hraničních podmínkách. Produkty těchto metabolických drah se obvykle v jiných přírodních zdrojích nevyskytují a mohou

Adresa pro korespondenci:

prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.

Ústav chemie a biochemie

Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

Zemědělská 1, 613 00 Brno

e-mail: klejdusb@seznam.cz

být uplatněny ve farmacii, potravinářství a biomedicínských oborech.

Z potravinářského hlediska jsou řasy v případě Evropského kontinentu využívány jako potravinové doplňky a nejínek je tomu v západních rozvinutých ekonomikách, jako je USA. Naproti tomu v asijských státech (Japonsko, Čína, Korea) představují řasy nemalý podíl surovin běžně používaných pro přípravu potravin, konzumují se zde pokrmy připravené z řas rodu *Laminaria*, *Undaria*, *Glacillaria*, *Euchema* a další ²⁾.

Řasy obsahují velké množství různých primárních a sekundárních metabolitů, z nichž mnohé mají antioxidační vlastnosti nebo vykazují jiné fyziologické účinky na zdraví savců včetně člověka. Původně byly průmyslově využívány pouze stélkaté řasy, avšak s rozvojem nových flokulačních, filtračních a extrakčních postupů docházelo a dochází k intenzivnímu využití i mikroskopických druhů řas, jako jsou zástupci rodu *Chlorella* a *Spirulina* ³⁾. Z ekonomického hlediska představují významnou skupinu látek fykokoloidy, o kterých bude pojednáno v následujícím odstavci.

Chemické složení a průmyslově využívané obsahové látky

Bylo prokázáno, že řasy obsahují velké množství bílkovin a nízký obsah tuků. Řada odborníků v potravinářském průmyslu považovala produkty z řas jako východisko z potravinové krize, která postihla mnohé africké i asijské rozvojové země. Nutno podotknout, že některé druhy řas jsou také typické tím, že obsahují značné množství nukleových kyselin, které jsou u savců katabolizovány na kyselinu močovou. Její nadbytek může představovat pro organismus zátěž. Už z tohoto hlediska jsou mnohé druhy řas předurčeny pro využití ve formě potravinových doplňků nebo doplňků krmiv pro hospodářská zvířata. U zástupců rodu *Chlorella* se na základě výše uvedeného nedoporučuje denní příjem více jak 40 g sušiny na osobu ^{2, 4)}.

Obsahové látky řas jsou intenzivně využívány v průmyslu. Asi největší uplatnění našly fykokoloidy, jako jsou kyselina alginová a algináty produkované mořskými chaluhami. Ty jsou využívány jako emulgační činidla a gelové roztoky. Podobné využití také nalézá tzv. karagenan v případě ruduch nebo známý agar (galaktosový polymer), který je hojně využíván v potravinářském, farmaceutickém a obecně chemickém průmyslu ^{5, 6)}.

Kromě výše uvedeného představují řasy významný zdroj vitaminů, antioxidantů, polyketidů, nenasycených mastných kyselin a přírodních barviv (fotosyntetických pigmentů). V případě vitaminů se jedná o zástupce skupiny B, vitamin H (biotin), vitamin C (kyselina L-askorbová) nebo provitamin A (β -karoten). Řasy obecně produkují značné množství karotenoidů (významné antioxidanty) a jsou považovány za významný zdroj chlorofylů, minerálních látek a vlákniny. Z minerálních látek se jedná především o jod, selen nebo chrom ⁷⁾. Detailní informace o ekonomicky významných obsahových látkách řas, popřípadě i sinic, je možné nalézt v recentních přehledech ^{4-6, 8-10)}.

Toxické metabolity

U mnohých výše uvedených metabolitů byl prokázán antibakteriální, antivirový nebo i protinádorový účinek ⁴⁾ (tab. 1). Kromě zdraví prospěšných látek byly u řas a sinic nalezeny toxické sloučeniny, které bývají nazývány jako fykotoxiny ⁹⁻¹¹⁾. Jde o látky, které jsou minimálně toxické vůči svým producentům, ale vyznačují se vysokou toxicitou vůči ostatním organismům vyskytujících se v lokalitě výskytu řas nebo sinic.

Řasy a sinice vyměšují tyto sloučeniny do vodního prostředí, a zabraňují tak jeho kolonizaci jinými druhy. Tyto látky (často se jedná o aldehydy, deriváty aminokyselin a lineární nebo cyklické peptidy) byly identifikovány především u sinic, a to jak u sladkovodních, tak i u mořských zástupců ¹¹⁻¹²⁾. Jedná se o alelopatika a toxiny, jako jsou cyanobakterin, fischelerin A, nostocin A, kyselina domoová, anatoxin A, homoanatoxin A, muskorid A, mikrocystiny a saxitoxiny. Účinek těchto látek je založen na blokování důležitých metabolických pochodů, jako jsou inhibice enzymového aparátu, syntézy nukleových kyselin, generování vysoce toxických reaktivních forem kyslíku nebo zablokování fotosyntézy. Toxiny obsažené ve fytoplanktonu, kterým se živí ryby nebo jiní vodní živočichové, se mohou potravním řetězcem dostat i do potravy člověka, a způsobit tak závažné otravy, které jsou nejčastěji založeny na jejich neurotoxickém účinku ¹¹⁾. V rámci distribuce toxických metabolitů je nutné podotknout, že popsání toxinů se v potravinářsky využívaných řasách nevyskytují nebo se vyskytují ve stopovém množství. Naopak v případě sinic kolonizujících vodní toky a nádrže mohou tyto látky představovat závažné hygienické riziko.

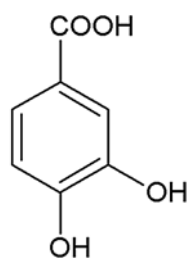
Tab. 1. Vybrané skupiny obsahových látek řas a jejich možný účinek na zdraví člověka

Obsahová látka*	Fyziologický účinek
kyselina alginová, xylofukany	antivirová aktivita
α -tokoferol, fenolické látky	antioxidační účinek
polynenasycené mastné kyseliny, steroly	redukce hladiny cholesterolu
foláty, porfyriny	zabránění vzniku rakoviny, protinádorový účinek

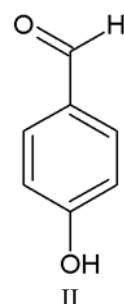
* Uvedené látky byly identifikovány v následujících druzích: *Sargassum vulgare*, *Undaria pinnatifida*, *Ulva* spp., *Chondrus crispus*, *Porphyra* spp., *Cystoseira* spp.

Fenolické sloučeniny a jejich deriváty

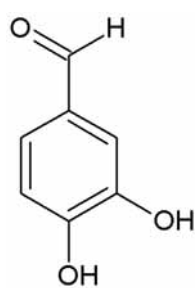
Stanovení fenolických látek v řasách a sinicích se věnovala řada autorů. Většina z nich použila k analýzám spektrofotometrické Folin-Ciocalteovo stanovení, které poskytuje informaci o celkovém zastoupení fenolických látek ve zkoumaném materiálu, např. v případě sinice *Nostoc commune*¹³⁾. K detailnějšímu popisu fenolů řas je aplikována kapalinová chromatografie (HPLC nejčastěji na reverzní stacionární fázi) v kombinaci s hmotnostními detektory (MS) nebo nukleární magnetickou rezonancí (NMR) a široké spektrum extrakčních postu-



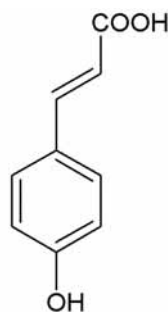
I



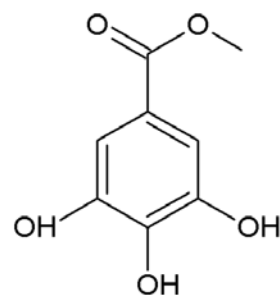
II



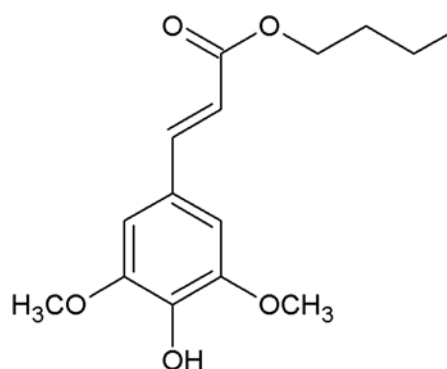
III



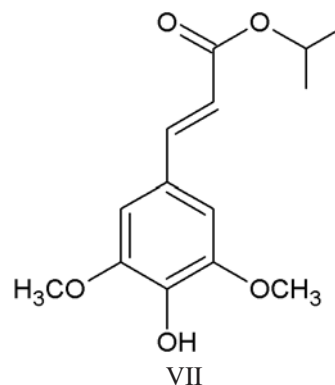
IV



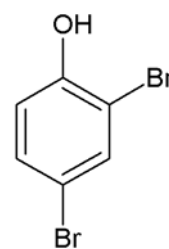
V



VI

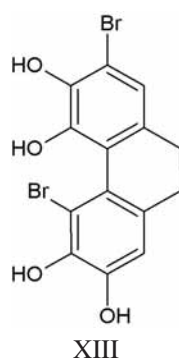
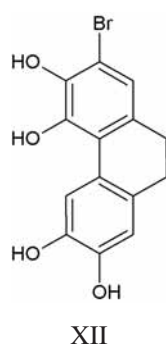
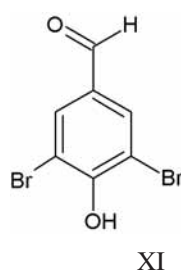
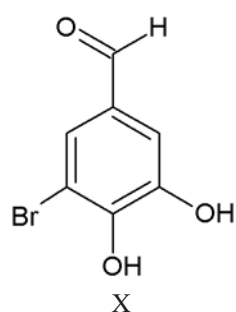
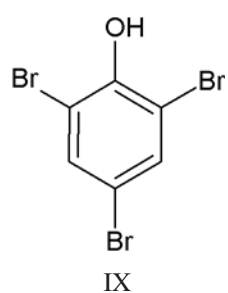


VII

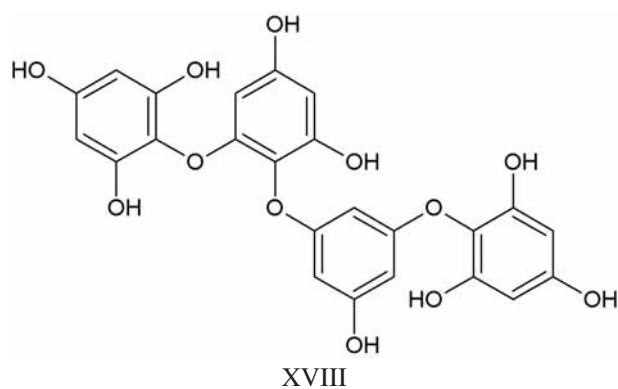
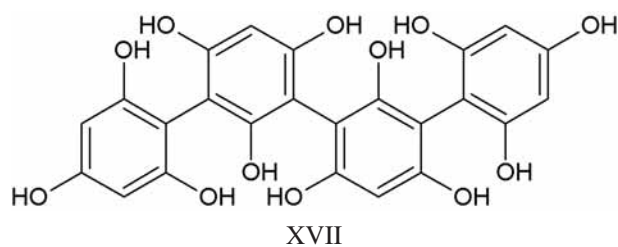
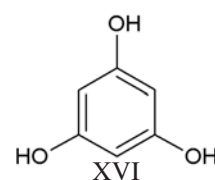
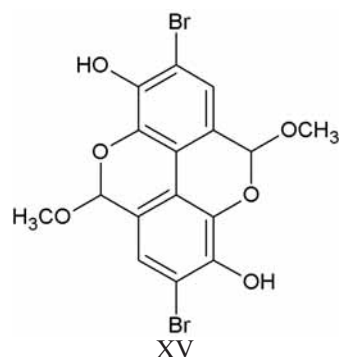
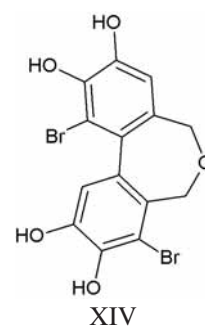


VIII

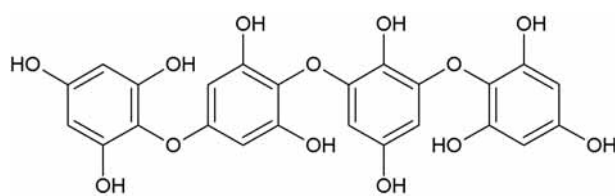
pů¹⁴⁻¹⁶⁾. Předpokládá se, že řasy syntetizují fenoly z podobných důvodů, jako je tomu u vyšších rostlin. Fenolické látky obsažené ve vyšších rostlinách plní ochranou funkci před patogeny a funkci signálních molekul při jejich napadení herbivorními škůdci¹⁷⁾. Obecně lze rozdělit fenolické látky řas a sinic do dvou



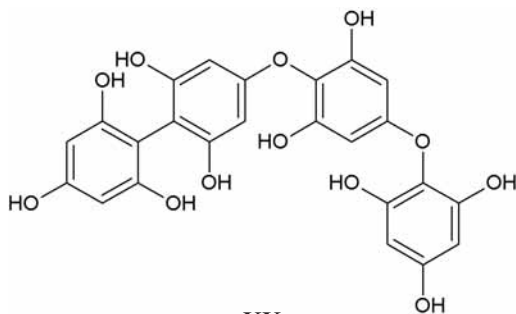
skupin. Do první skupiny spadají monomerní fenoly, které jsou většinou odvozené od samotného fenolu, což jsou obvykle jednoduché fenoly obsahující ve své molekule pouze jednu hydroxylovou skupinu, nebo fenolické



kyseliny a jejich hydroxyderiváty. Ty jsou obvykle řazeny mezi polyfenolické látky, jejichž molekuly obsahují více hydroxylových skupin. Do druhé skupiny patří výhradně polyfenoly tvořené kovalentně propojenými floroglucinoly (1,3,5-trihydroxybenzeny), které vytvářejí oligomerní a polymerní struktury obecně nazývané florotaniny.



XIX



XX

V případě monomerních fenolů byly v řase *Spongiochloris spongiosa* a v zástupcích sladkovodních sinic nalezeny hydroxyderiváty kyseliny benzoové, často odvozené od kyseliny protokatechové (kyselina 3,4-dihydroxybenzoová) (I) a vybrané hydroxyderiváty benzaldehydů, 4-hydroxybenzaldehyd (II) a 3,4-dihydroxybenzaldehyd (III) ¹⁸. Kromě jednoduchých fenolů a monomerních polyfenolů vycházejících z kyseliny benzoové byly v mořských (*Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiformes*) a sladkovodních řasách objeveny hydroxyderiváty kyseliny skořicové, jako je kyselina *p*-kumarová (kyselina 4-hydroxyskořicová) (IV) ¹⁹ a její estery. Uvedené látky byly izolovány pomocí optimalizovaných extrakčních postupů a analyzovány metodou HPLC-MS ^{18, 19}.

Z esterů kyseliny benzoové a skořicové je znám methylester kyseliny 3,4,5-trihydroxybenzoové (V), *n*-butylester a isopropylester kyseliny 3,5-dimetoxy-4-hydroxyskořicové (VI, VII). Tyto látky byly identifikovány pomocí ¹H- a ¹³C-NMR v hnědé řase *Spatoglossum variabile* ²⁰. Z dalších látek byly studovány halogenderiváty a sírné deriváty fenolů ²¹. Z halogenderivátů převládají bromované fenoly, jako jsou 2,4-dibromfenol (VIII), 2,4,6-tribromfenol (IX) a vybrané hydroxybenzaldehydy (X, XI). V červené mořské řase *Polysiphonia urceolata* byly nalezeny i složitější struktury fenantrenu, 7-brom-9,10-dihydrofenantren-2, 3, 5, 6-tetraol (XII), 4,7-dibrom-9,10-dihydrofenantren-2,3,5,6-tetraol (XIII) a aromatické hydroxyderiváty, 1,8-dibrom-5,7-dihydrodibenzo[*c,e*]oxepin-2,3,9,10-tetraol (XIV), urceolatol (XV) ²². Sírných derivátů jednoduchých fenolů a polyfenolů bylo u řas prokázáno výrazně méně nežli halogenderivátů, mezi ty nejznámější patří vidalol A izolovaný z řasy *Vidalia obtusiloba* nebo některé sírné deriváty odvozené od fenolu nebo jeho oligomerů ^{21, 23}.

Mezi farmaceuticky a potravinářsky zajímavou skupinu přírodních fenolů patří flavonoidy, mezi něž řadíme isoflavonoidy, které jsou označovány jako rostlinné estrogeny (fytoestrogeny). Tyto látky se běžně vyskytují

v pletivech vyšších rostlin (např. v sóji), konkrétní flavonoidy nebo podobné polyfenoly však nebyly v řasách ani sinicích identifikovány. Nicméně na základě nedávno provedených spektrometrických analýz v extraktech řasy *Spirulina platensis* ²⁴ byla prokázána přítomnost látek s flavonoidním skeletem. Uvedené bylo potvrzeno také spektrofotometrickým měřením pomocí borohydrid/chloranilového testu v metanolických extraktech vybraných hnědých řas ²⁵.

Florotaniny jsou asi nejznámější fenolické látky řas, které jsou přítomny v poměrně vysokých koncentracích u zástupců rodu *Fucus* a *Ascophyllum* ^{26, 27}. Tyto látky mohou tvořit až 15 % z celkové sušiny, jsou integrální součástí buněčných stěn řas a bylo prokázáno, že plní významné funkce při interakcích mezi řasami a organismy, které se jimi živí. Jak bylo uvedeno výše, jedná se o lineární nebo větvené oligomerní a polymerní struktury, navzájem propojených floriglucinolových jednotek, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje nejčastěji od 10 do 100 kDa. Florotaniny tvoří velmi rozsáhlou skupinu metabolitů čítající asi 150 látek, které jsou rozdělovány do jednotlivých skupin podle typu vazby spojující monomery floriglucinolů (XVI). Mezi nejznámější a nejčastěji studované florotaniny řadíme tetrafukol A (XVII), tetraforetol B (XVIII), tetraiso-fuhalol (XIX) a fukodifloretole A (XX). Uvedení zástupci jsou nejčastěji zkoumáni v řase *Fucus vesiculosus*, k čemuž jsou využívány různé izolační postupy a HPLC separace na reverzních i normálních fázích ^{28, 29}.

ZÁVĚR

Metabolické produkty řas vykazují různé fyziologické účinky na *in vitro* nebo *in vivo* systémy včetně přímého dopadu různých přípravků (primárně potravinových doplňků řas) na metabolismus člověka. Obsahové látky řas včetně fenolických metabolitů mají prokazatelné antioxidační účinky a mohou významně přispívat k eliminaci volných radikálů a oxidačních činidel v organismu ^{22, 30}. Kromě výše uvedeného mají řasy a jejich produkty velmi příznivé nutriční ukazatele, což bylo nastíněno výše.

Literatura z přelomu 20. a 21. století uvádí, že roční obrát spojený s využíváním řas činí 5–6 miliard USD ročně, což koresponduje s progresivním uplatněním řas v různých technologických postupech, farmacii a potravinářském průmyslu. Předpokládáme, že konkrétní obsahové látky řas, a to především biologicky aktivní metabolity, mohou být v budoucnu aplikovány jako antioxidační komponenty léčiv, inhibitory enzymů a toxiny účinné proti vybraným buněčným liniím. Zda naleznou fenolické monomery nebo složité struktury florotaninů řas a sinic uplatnění v některém z odvětví farmaceutického nebo potravinářského průmyslu však stále zůstává otázkou.

Výzkum fenolických látek v řasách a sinicích na Ústavu chemie a biochemie MZLU v Brně je financován prostředky z grantového projektu GAČR 525/07/0338.

LITERATURA

1. **Kalina, T., Váňa, J.:** Sinice, řasy, houby a mechorošty a podobné organismy v současné biologii. Praha: Karolinum 2005.
2. **Šetlík, I., Doucha, J.:** Sinice a řasy. In: **Prugar, J. a kol.** Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Praha: Výzkumný ústav pivovarnický a sladařský, a.s. 2008.
3. **Grima, E. M., Belarbi, E. H., Fernandez, F. G. A., Medina, A. R., Chisti, Y.:** Biotechnol. Adv., 2003; 20, 491–515.
4. **Plaza, M., Cifuentes, A., Ibanez, E.:** Food Sci. Technol., 2008; 19, 31–39.
5. **Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcao, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., Pinto, E.:** Comp. Biochem. Phys. C, 2007; 146, 60–78.
6. **Pulz, O., Gross, W.:** Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004; 65, 635–648.
7. **Burianová, I., Machát, J., Nedobová, E., Doucha, J., Kanický, V.:** Chem. Listy, 2005; 14, 273–276.
8. **Kreitlow, S., Mundt, S., Lindequist, U.:** J. Biotechnol., 1999; 70, 61–63.
9. **Leflaive, J., Ten-Hage, L.:** Freschw. Biol., 2007; 52, 199–214.
10. **Skulberg, O. M.:** J. Appl. Phycol., 2000; 12, 341–348.
11. **Hrdina, V., Měrka, V., Patočka, J., Hrdina, R.:** Voj. zdrav. Listy, 2008; 127, 110–122.
12. **Dembitsky, V. M., Řezanka, T.:** Folia Microbiol., 2005; 50, 363–391.
13. **Briones-Nagata, M. P., Martinez-Goss, M. R., Hori, K.:** J. Appl. Phycol., 2007; 19, 675–683.
14. **Vacek, J., Klejdus, B., Lojková, L., Kubáň, V.:** J. Sep. Sci., 2008; 31, 2054–2067.
15. **Vacek, J., Klejdus, B., Lojková, L., Kubáň, V.:** Čes. slov. Farm., 2008; 57, 85–94.
16. **Klejdus, B., Vacek, J., Lojková, L., Benešová, L., Kubáň, V.:** J. Chromatogr. A, 2008; 1195, 52–59.
17. **Boudet, A.-M.:** Phytochemistry, 2007; 68, 2722–2735.
18. **Klejdus, B., Kopecký, J., Benešová, L., Vacek, J.:** J. Chromatogr. A, 2009; 1216, 763–771.
19. **Onofrejšová, L., Vašíčková, J., Klejdus, B., Stratil, P., Mišurcová, L., Kráčmar, S., Kopecký, J., Vacek, J.:** J. Pharm. Biomed. Anal., 2009; (v tisku).
20. **Hayat, S., Atta-Ur-Rahman, Choudhary, M. I., Khan, K. M., Abbaskhan, A.:** Chem. Pharm. Bull., 2002; 50, 1297–1299.
21. **de Carvalho, L. R., Roque, N. F.:** Quim. Nova, 2000; 23, 757–764.
22. **Li, K., Li, X.-M., Ji, N.-Y., Wang, B.-G.:** J. Nat. Prod., 2008; 71, 28–30.
23. **Ragan, M. A., Jensen, A.:** Phytochemistry, 1979; 18, 261–262.
24. **Mendiola, J. A., Marín, F. R., Hernández, S. F., Arredondo, B. O., Senorans, F. J., Ibanez, E., Reglero, G.:** J. Sep. Sci., 2005; 28, 1031–1038.
25. **Šnóblova, M., Klejdus, B., Vacek, J.:** nepublikované výsledky, 2009.
26. **Koivikko, R.:** Brown algal phlorotannins improving and applying chemical methods, University of Turku, Finland, doktorská práce, 2008.
27. **Koivikko, R., Lojonen, J., Honkanen, T., Jormalainen, V.:** J. Chem. Ecol., 2005; 31, 195–212.
28. **Koivikko, R., Lojonen, J., Pihlaja, K., Jormalainen, V.:** Phytochem. Anal., 2007; 18, 326–332.
29. **Parys, S., Rosenbaum, A., Kehraus, S., Reher, G., Glombitza, K.-W., König, G. M.:** J. Nat. Prod., 2007; 70, 1865–1870.
30. **Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., Jiang, Y.:** Food Chem., 2007; 102, 771–776.