

Izolácia kyseliny šikimovej z ihličia *Picea abies*. Vyhliadky do budúcnosti

EV Ožimková¹, EM Korotková², MG Sulman¹, EM Sulman¹, VP Molčanov¹

¹Vzdelávacia inštitúcia vyššieho vzdelávania federálneho štátneho rozpočtu, Štátna technická univerzita v Tveri, ulica Nikitina 22, Tver 170026, Ruská federácia

²Univerzita Åbo Akademi, Laboratórium chémie dreva a papiera, 3 Porthansgatan, Turku 20540, Fínsko

*Zodpovedajúci e-mail: sulman@online.tver.ru

Abstrakt.

Predmetom výskumu bolo zloženie a koncentrácia hydrofilných extraktív v ihličkách *Picea abies*. Bol vyhodnotený optimálny čas zberu smrekového ihličia na produkciu **kyseliny šikimovej**. **Koncentrácia kyseliny šikimovej sa pohybovala od 4,7 mg/g ihličia smrekového zozbieraného v auguste do 94,7 mg/g ihličia smrekového zozbieraného v novembri.**

Úvod

Kyselina šikimová alebo kyselina 3,4,5-trihydroxycyklohex-1-én-1-karboxylová je dôležitý chirálny metabolit v rastlinách a mikroorganizmoch. Prvá kyselina šikimová bola izolovaná z japonskej rastliny *Illicium religiosum* v roku 1885, ale jeho štruktúra bola objasnená až o 50 rokov neskôr [1, 2]. V súčasnosti sa kyselina šikimová úspešne používa ako prekurzor pre rôzne vysokohodnotné chemikálie.

Kyselina šikimová sa tiež používa ako prekurzor vo farmaceutickom priemysle. V posledných desaťročiach sa štúdie kyseliny šikimovej uskutočňovali obzvlášť aktívne, pretože sa používa ako základný materiál na syntézu liečiva inhibitora neuraminidázy. Tento liek sa používa na liečbu a prevenciu chrípky A a chrípky B. Deriváty kyseliny šikimovej majú mnoho farmakologických účinkov, ako sú antikoagulačné, protizápalové, antibakteriálne a antioxidačné účinky [3, 4]. Preto je kyselina šikimová ako dôležitý prekurzor pre chemický a farmakologický priemysel potrebná v relatívne veľkých množstvách. V globálnom priemysle existujú tri hlavné prístupy k výrobe kyseliny šikimovej: izolácia z lignocelulózovej biomasy, mikrobiologická a chemická syntéza [1, 3, 4].

Prvá úspešná syntéza kyseliny šikimovej v laboratóriu sa uskutočnila v roku 1960. Všetky metódy chemickej syntézy však majú niekoľko nevýhod - vysokú cenu, nízky výťažok cieľového produktu a vysokú pravdepodobnosť tvorby biologicky neaktívnych izomérov [2]. Ďalšou možnosťou výroby kyseliny šikimovej je mikrobiologická syntéza. Mnoho mikroorganizmov je schopných syntetizovať kyselinu šikimovú, ale jej výťažok je extrémne nízky [5]. V súčasnosti je hlavným zdrojom kyseliny šikimovej biomasa. V súčasnosti sa kyselina šikimová úspešne izoluje z čínskeho badiánu (*Illicium verum*). Výťažok cieľového produktu je 3 až 7 % hmotn. suchých semien. Žiaľ, badián sa pestuje len v špecifických klimatických zónach [2-4].

Niekoľko štúdií ukázalo, že kyselina šikimová sa dá ľahko izolovať z ihlíc niekoľkých druhov borovic. Podľa odhadov výskumu asi 35,5 milióna m³ dreveného odpadu sa ročne vyprodukuje v Ruskej federácii. Odpad sa líši od kôry a uzlov až po piliny. **Za odpad sa považuje aj ihličie z ihličnatých stromov** [6]. Chemické zloženie ihličia ihličnatých stromov však umožňuje ich použitie pri výrobe rôznych liečiv, parfumov, hnojív a krmiva pre zvieratá [7]. Ihličnany čeľade Pinaceae sú schopné produkovať mnoho cenných chemikálií, ako sú mono- a seskviterpény, fenoly, kyseliny a iné zlúčeniny [8, 9].



Efektívne priemyselné spracovanie ihliel má však určité problémy, napríklad sezónne zmeny v obsahu určitých chemických zlúčenín. Preto je potrebné študovať sezónne zmeny v chemickom zložení ihliel. Výsledky tejto štúdie pomôžu vyvinúť efektívne spôsoby spracovania ihliel s cieľom izolácie cenných zlúčenín [10].

Na izoláciu kyseliny šikimovej z ihliel sa ako extrakčné rozpúšťadlá môžu použiť polárne organické rozpúšťadlá a voda. Ak však vezmeme do úvahy ekonomické kritériá a environmentálne predpisy pre priemyselné procesy, používanie veľkých objemov organických rozpúšťadiel je často nerentabilné. Kľúčom k budúcim biorafinériám dreva je neustály vývoj zelených techník s cieľom získať efektívnejšie separačné procesy s minimálnym dopadom na životné prostredie. Voda je v porovnaní s inými priemyselne používanými rozpúšťadlami lacná, ľahko sa s ňou manipuluje a je netoxická, a preto je veľmi dobrým rozpúšťadlom pre chemický priemysel.

Cieľom tejto štúdie bolo posúdiť možnosť využitia ihličia *Picea abies* ako zdroja kyseliny šikimovej, ako aj zhodnotiť vplyv času zberu na koncentráciu kyseliny šikimovej v ihličí smreka.

Materiály a metódy

Smrekové ihličie sa zbieralo mesačne počas jedného roka, z toho istého stromu *Picea abies*, rastúce v ekologicky čistej zóne Kalininského okresu, Tverská oblasť. Suroviny sa zbierali v suchom počasí a len zo zdravých, dobre vyvinutých, nepoškodených stromov rastúcich ďaleko od veľkých priemyselných areálov a pri cestách s hustou premávkou. Prvotné spracovanie surovín sa uskutočňovalo hneď po zbere a spočívalo v triedení nazbieraného ihličia. Poškodené suché ihličie a iné nečistoty boli odstránené.

Ihly sa vysušili na vzduchu a rozomleli na veľkosť častíc 2 až 3 mm. Potom sa ihly extrahovali destilovanou vodou pri teplote miestnosti $23 \pm 1^\circ\text{C}$ počas 24 hodín. Pomer tuhej látky ku kvapaline bol 1:20. Extrakt sa oddelí od zvyšku na filtri. Stanovili sa celkové rozpustené pevné látky (*TDS* – *Total dissolved solids*) extraktov.

Extrakt sa kvantitatívne analyzovali plynovou chromatografiou s použitím metódy vnútorného štandardu. Alikvóty extraktov sa odparili, potom sa k vzorkám pridala vnútorná štandardná zmes, odparila sa v prúde dusíka a ďalej sa sušila vo vákuovom exsíkátore. Silylácia vysušených vzoriek sa uskutočnila zmesou pyridínu, N,O-bis(trimetylsilyl)trifluóracetamidu (BSTFA) a chlórtrimetylsilánu (TMCS) v pomere 1:4:1 obj./obj. pri 70°C počas 45 minút. Potom boli simulované vzorky prenesené do GC fľaštičiek pomocou Pasteurových pipiet a analyzované pomocou GC-FI vybaveného dĺžkou 25 m x 0,20 mm id kolónou potiahnutou zosieťovaným metyl polysiloxánom (HP-1, hrúbka filmu 0,11 μm).

Jednotlivé zlúčeniny eluované GC sa identifikovali analýzou GC-MS (prístroj HP 6890-5973 GC-MSD). Zlúčeniny boli identifikované ako silylované deriváty.

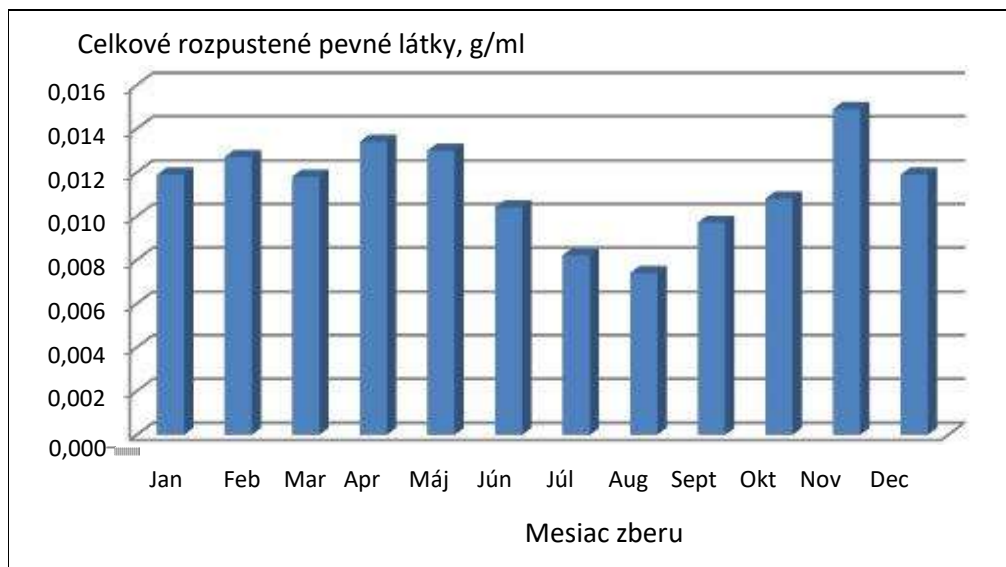
Výsledky a diskusia

Výsledky analýzy extraktov smrekového ihličia potvrdzujú komplexné zloženie hydrofilných extraktívnych látok v ihličí (tab. 1). V extraktoch boli nájdené rôzne skupiny zlúčenín: organické kyseliny (jablčná, chinová a iné), uhľohydráty, cukrové alkoholy (xylitol, sorbitol) atď. V priebehu roka boli zistené výrazné zmeny v zložení extraktívnych látok.

Tab. 1. Chemické zloženie hydrofilných extraktívnych látok z ihličiek *Picea abies*.

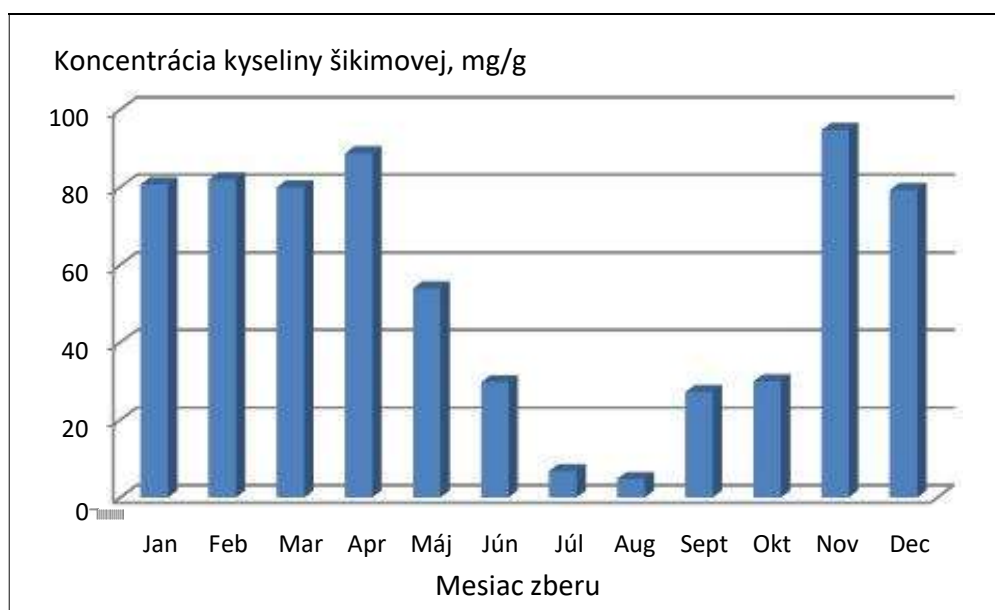
Zlúčenina	Koncentrácia extrakčných látok v ihličkách, mg/g											
	Jan	Feb	Mar	Apr	Máj	Jún	Júl	Aug	Sept	Okt	Nov	Dec
Kyselina šťafeľová	0,32	0,34	0,31	0,20	0,28	0,36	0,81	0,63	0,29	0,33	0,78	0,36
Kyselina benzoová	0,64	0,82	0,58	0,42	0,98	3,09	0,82	0,25	1,23	0,98	3,41	0,64
Kyselina fosforečná	8,83	9,09	6,40	5,24	5,63	4,30	14,18	3,13	5,04	5,41	8,49	6,42
Glycerol	3,33	3,41	2,54	2,92	2,43	1,65	-	-	1,57	1,53	5,64	2,39
Prolín	2,57	2,30	3,01	3,41	6,91	2,22	0,29	0,54	1,85	2,08	6,62	3,28
2,3-dihydroxy- kyselina propánová	0,31	0,31	0,27	0,19	0,29	0,65	2,40	1,06	0,46	0,55	0,97	0,30
4-hydroxy- kyselina benzoová	0,71	0,76	0,69	0,91	0,94	1,24	0,60	0,14	0,98	1,15	1,54	0,66
Kyselina jablčná	1,64	1,71	1,74	2,43	1,92	1,50	0,67	0,49	1,54	1,80	3,44	1,61
4-hydroxy- acetofenón	15,98	15,83	17,55	17,49	12,22	16,14	2,09	2,37	15,19	15,92	21,51	18,27
Kyselina šikimová	80,69	81,96	79,94	88,69	53,86	29,69	6,79	4,71	27,16	29,21	94,72	79,25
Kyselina citrónová	1,84	2,57	1,86	3,77	3,03	2,95	16,83	5,25	2,40	2,43	2,68	2,05
Kyselina chinová	45,6	45,50	42,51	44,64	38,7	36,65	22,9	18,57	30,55	37,11	48,21	41,26
Pinitol	38,72	39,81	35,27	37,38	31,07	27,86	10,52	6,48	27,38	27,24	41,55	36,43
1-guaacyl- glycerol	0,72	0,74	0,60	0,68	0,69	0,84	0,21	0,20	0,74	0,79	1,08	0,64
Kyselina glukónová	0,37	0,51	0,27	0,34	0,54	4,11	2,29	2,01	1,05	0,98	2,14	0,30
Myo-inozitol	2,25	2,26	2,83	4,73	3,64	3,08	0,44	0,53	2,73	2,86	7,84	2,79
(+)-katechín	1,76	1,29	2,72	2,63	4,87	7,47	-	0,11	4,81	5,00	3,95	2,67
Mono/ disacharidy	201,09	189,22	203,98	246,48	248,71	147,0	69,81	21,16	151,18	160,33	354,39	210,35

Zistil sa rozdiel v TDS extraktoch, získaných z ihličia zozbieraného počas roka. Na obrázku 1, je možné vidieť, že maximálny TDS bol zistený v extraktoch z ihličia novembrového a aprílového/májového a najnižší v extraktoch z ihličia augustového. Leto (jún-august) je obdobím intenzívneho rastu ihličia a premeny nových výhonkov a koncentrácia extraktívnych látok v ihličí je najnižšia v roku. Pomerne vysokú koncentráciu ťažobných látok koncom jesene a zimy možno vysvetliť adaptačnými mechanizmami rastlín a znížením rastových procesov v tomto období.



Obr. 1. Celkové rozpustené pevné látky v extraktach zo smrekového ihličia.

Koncentrácia kyseliny šikimovej v smrekových ihličkách sa tiež v priebehu roka mení (obrázok 2). Maximálna koncentrácia kyseliny šikimovej (94,7 mg/g) bola zistená v ihličkách zozbieraných v novembri. Na základe výsledkov tejto štúdie sa obdobie od novembra do apríla odporúča ako čas zberu ihiel sprue na produkciu kyseliny šikimovej.



Obr. 2. Koncentrácia kyseliny šikimovej v smrekovom ihličí.

Záver

Výsledky tejto práce potvrdzujú, že ihly *Picea abies* možno použiť ako sľubný zdroj kyseliny šikimovej. Na každý meter kubický vyťaženého smrekového dreva ide nazmar približne 36 kg ihličia. Z týchto ihiel možno izolovať 3,4 kg kyseliny šikimovej s obyčajnou vodou ako extrakčným rozpúšťadlom.

Pod'akovanie

Autori by sa chceli poďakovať Annike Smeds (Univerzita Åbo Akademi) za technickú radu a pomoc s GC-MS analýzou extraktov.

Redakcia Dr.FYTO Team s veľkým nadšením interpretuje tento výskum svojim čitateľom a posielala srdečnú vďaku autorom:

- **EV Ožimková¹,**
- **EM Korotková²,**
- **MG Sulman¹,**
- **EM Sulman¹,**
- **VP Molčanov¹**

Referencie

- [1] Rawat G, Tripathi P, Firdaus J a Saxena 2013b Appl Biochem Biotechnol. 169 p 2290–2302
- [2] Rawat G, Tripathi P a Saxena R.2013c Appl Microbiol Biotechnol. 97 p 4277–4287
- [3] Bochkov D. a kol. 2011 Chémia rastlinných surovín 3 p 81-87
- [4] Tripathi P., Rawat G., Yadav S a Saxena R 2015 Journal of Microbiology 107 s. 419–431
- [5] Ghosh S, Mohan U a Chand U 2016 World Journal of Microbiology and Biotechnology 32 s. 127
- [6] Medvedev S., Bezrukih Y a Mohirev A. 2015 Aktuálne smery výskumu XXI. storočia: teória a prax 2-1 s. 400-403
- [7] Ditrih V. a kol. 2010 Ihličnany boreálnej zóny 10. s 346–351
- [8] Reshma P, Reshma S, Gaikwad D a Snehal J 2016 Indian Journal of Applied Research 16 s. 32-33
- [9] Chylková J, Tomášková M, Jehlcka V, Selešovská R a Hlavata P 2017 Monatshefte für *Chemie - Chemický mesačník* 1 str. 1-7
- [10] Ozhimkova E, Korotkova E, Uschapovsky I a Sulman E 2019 Bulletin Štátnej univerzity v Tveri. Edícia: Chémia 1 s. 128-133