



Резюме на проект по Фонд „Наука“ № 17018 – Конкурсна сесия 2017:

„Определяне на въглехидрати, протеини и фенолни съединения в черноморски водорасли от вид *Cystoseira barbata* и *Ulva rigida*“

Ръководител: Проф. Любомир Евстатиев Македонски, дх

Целите на научноизследователския проект тангентират с едно от основните предизвикателства на съвременния свят, а именно сблъсъкът с оксидативния стрес, респективно борбата със свободните радикали и предотвратяването на тяхното вредно въздействие върху организмите.

Свободни радикали – в повечето случаи това са така наречените реактивни кислородни видове (РОС), получаващи се чрез молекулярния кислород в метаболитните процеси в тялото. Те имат способността да увреждат структурата на клетъчната ДНК, протеините и липидите, да променят биохимичните съединения и да „корозират“ клетъчните мембрани. Тези негативни ефекти са директно свързани с развитието на различни заболявания, в това число злокачествени туморни образувания, атеросклероза, респираторни заболявания и мн. др.

Оксидативното действие на тези видове, освен директно влияние в организмите, има пряка връзка и с влошаването на характеристиките на храната – липидно окисляване или гранясване, разрушаване на други биологично-активни естествено съдържащи се вещества и др. Това води до съществени загуби в хранителната стойност, влошаване на вкусовите качества на храната и я лишава от полезните ѝ свойства за организмите.

Контролирането на РОС, както в хранителната промишленост, така и в човешкия организъм, естествено поражда нужда от прием или влагане на антиоксидантни вещества. Синтетичните антиоксиданти не се предпочитат поради сериозни опасения относно токсичността им. Нуждата от естествени антиоксиданти е пряко свързана с научни проучвания, свързани с откриване на естествени субстанции с висок антиоксидантен потенциал и липса на токсичност за организмите. Поради това много от настоящите проучвания са съсредоточени върху характеризирани състава и антиоксидантния потенциал на некултивирани растения, в това число и морски водорасли.

Морските водорасли се характеризират с изключително разнообразие на видове в зависимост от разпространението си. В много страни те се използват в кулинарията, поради високата си хранителна стойност и синтезираните в тях витамини, минерали, есенциални аминокиселини, протеини и други естествени биологичноактивни компоненти включени в състава им. Освен директно като храна, приема на морски

водорасли може да бъде под форма на хранителни добавки, деликатеси, подправки и др. Морските водорасли са намерили широко приложение и в други отрасли – в козметичната, фармацевтичната, селскостопанската и други индустрии. Много съвременни научни проучвания разкриват потенциала им като суровина-източник на естествени природни антиоксиданти, макронутриенти и включените вторични метаболити и доказават ползите им за подобряване здравето на индивидите.

Важна група биологичноактивни компоненти с висок антиоксидантен потенциал са фенолните киселини и флавоноидите. Те са широко разпространени в различни растителни видове. Разнообразието в съдържанието им в растителните морски видове се определя както от средата за живот, различието на условията в местообитанието и климатични показатели. Фенолните киселини и флавоноидите са с доказано позитивно влияние върху човешкото здраве и имат противовъзпалителни, противоалергични и противовирусни свойства, както и потенциал за превенция на някои сърдечно-съдови заболявания, хипертония, диабет и др. Природните полифенолни съединения, включително флавоноидите, са безопасни за човешкото здраве, нетоксични антиоксиданти. Много изследвания показват, че високият хранителен прием на естествени феноли е обвързан с по-голяма продължителност на живота и понижен риска от развитие на някои хронични заболявания, някои видове рак, диабет, затлъстяване и понижено кръвно налягане.

В акваторията на България има широко биоразнообразие на морски макроводорасли - 165 вида, сред които червени (Rhodophyta), зелени (Chlorophyta) и кафяви (Phaeophyta), за чиито макро- и микронутриентен състав има оскъдни данни в научната литература.

Целта на настоящия проект е да бъде определен макронутриентния състав – въглехидрати, протеини и липиди, както и избрани фенолни съединения в черноморски водорасли от видовете *Cystoseira barbata* (от род Phaeophyta, кафяви водорасли) и *Ulva rigida* (от род Chlorophyta, зелени водорасли), събрани от българската акватория на Черно Море. Провеждането на тези изследвания ще охарактеризира макронутриентния състав на тези водорасли и ще покаже потенциала на избраните видове като ценен източник на вещества с висока антиоксидантна активност. Заложените хроматографски определяния на избрани фенолни съединения ще разширят научната стойност на получената информация и респективно приложния ѝ характер. Това ще даде възможност за включването на конкретните проучени видове в различни хранителни режими, съпровождащи лечение или използвани при превенция на някои заболявания.

Изпълнението на проекта ще доведе до разширяване познанието за българската черноморска флора и по-конкретно на алгологията в страната ни. Заложената цел за разпространение на добитата информация ще повиши обществената осведоменост относно ползата на черноморските водорасли и техни екстракти за човешкото здраве.

При изпълнението на проекта ще се разработи нов течно-хроматографски метод за идентифициране и количествено определяне на избрани полифенолни киселини и флавоноиди в тъкани на Черноморските водорасли. Това ще даде възможност за по-нататъшното му използване при изследване на тези компоненти в различни растителни матрици.

Заложените изследвания целят разширяване на научните знания в направление “Роля на храните в лечението и рехабилитацията на различни заболявания”. Те ще доведат до повишаване компетентността на членовете на екипа, чрез усвояването и внедряването на нови аналитични методики.

Постигнати резултати:

Дейност 1: Анализ

Направеното проучване в литературните данни подсказва двата популярни и широко разпространени вида, които са обект на анализите, а именно *Cystoseira barbata* и *Ulva rigida*. *Cystoseira barbata* принадлежи към семейството на Кафявите водорасли (род Phaeophyta), а *Ulva rigida* спада към вид Зелени водорасли (род Chlorophyta). Те осигуряват биоактивни съединения като витамини, минерали, каротеноиди, протеини, незаменими мастни киселини, диетични фибри и различни функционални полизахариди.

Дейност 2: Избор на методики

- ❖ Ултразвукова екстракция и вортекс с два вида екстрагенти – етанол и метанол;
- ❖ Течно-хроматографска техника с УВ-детекция, като разделянето бе извършено чрез обратнофазова аналитична колона;
- ❖ Спектрофотометрично определяне на общото фенолно съдържание (ОФС) на изследваните два вида черноморски водорасли чрез използване на реагента на Folin–Ciocalteu;
- ❖ Киселинна хидролиза с концентрирана сярна к-на и 5% р-р на фенол за определяне на общото съдържание на въглехидрати (ОСВ).

Дейност 3: Пробонабиране

Пробонабирането на избраните макроводорасли се осъществи през периода април – септември 2018 г. Събраните морски растения *Cystoseira barbata* и *Ulva rigida* са диво растящи от северното Черноморие (регион Варна). Принадлежността на водораслите към клас и род бяха определени от колеги-биолози от Института по океанология към БАН.

Дейност 4: Съдържание на индивидуални фенолни киселини и общо фенолно съдържание

❖ Съдържание на индивидуални фенолни съединения

И двата екстрагента извличат анализирани компоненти и могат да бъдат използвани за екстракция на полярните фенолни съединения. Етанолът е в пъти по-слаб екстрагент от метанола, като за 4ХБК и Кв количеството на екстрахираните фенолни съединения е недостатъчно за детекция – под границите на количествено определяне. Съдържанията на 4ХБК при метаноловите екстракти и на двете макроводорасли са значително по-високи от тези на другите фенолни киселини и флавоноида. По отношение нивата на всички анализирани вещества може да се каже, че те са близки в двете проби, като най-ниски се отчитат при *Ulva rigida* и за шестте компонента при екстрагент етанол.

❖ Общо фенолно съдържание

Общото фенолно съдържание (ОФС) на екстрактите морски водорасли е определено спектрофотометрично чрез използване на реагента на Folin–Ciocalteu.

Нивата на общи феноли за двата изследвани черноморски вида показват близки резултати в метаноловите екстракти. При двата етанолови екстракта обаче има значителна разлика – съдържанието на общи феноли в етанолов екстракт на *Ulva rigida* е почти два пъти по-високо от това в етанолов екстракт на *Cystoseira barbata*. Това се отдава най-вероятно на видовите различия, местообитанието и други екзогенни фактори, специфични за района.

От направения преглед на получените данни за ОФС може да се каже, че откритите количества са значими и определено допълват общия антиоксидантен потенциал на екстрактите от анализирани морски видове водорасли.

Наред с всички полезни компоненти като витамини, минерали, мастни киселини, есенциални елементи, аминокиселини, полизахариди и др., оценките на антиоксидантните свойства на природните съединения са много важни поради употребата им в медицината, хранителната и козметичната индустрия. Подложени на различни външни въздействия, както и в резултат на метаболитни процеси, живите системи генерират активни частици, които провокират бърза и лесна нежелана реакция на окисление. Резултатите от такъв вид реакции довеждат до вредни странични реакции, понякога дори и смърт за живата клетка. Едни такива частици са свободните радикали и реактивните кислородни видове (РКВ). Повишеното им ниво в живите организми уврежда структурата на биомолекулите и променя техните функции, може да доведе до клетъчна дисфункция и дори клетъчна смърт. Кумулативният ефект на РКВ може да увеличи оксидативния стрес на системно ниво и се проявява под формата на различни здравословни проблеми като рак, заболявания, свързани с възрастта и сърдечно-съдови заболявания. Антиоксидантите под формата на фенолни киселини, флавоноиди, каротеноиди и др. се грижат концентрацията на тези частици да бъде в граници, в които нежеланият ефект е минимален. Поради тази причина, всички нови данни за инхибиращата способност на съответните екстракти от Черноморски водорасли дават допълнителен научен принос, като обогатяват информацията за

антиоксидантните свойства на морската растителност, в частност двата вида *Ulva rigida* и *Cystoseira barbata*. Резултатите от изследването на двата вида водорасли показват тясната зависимост от вида на екстрактора. Екстрактите на метанол в трите нива на концентрация показват по-висока инхибираща активност и при двата вида водорасли.

Дейност 5: Определяне общо съдържание на въглехидрати

Анализът на общи въглехидрати в два вида черноморски водорасли е проведен по метод, включващ реакция на киселинна хидролиза с концентрирана сярна киселина и 5% фенол и последващо спектрофотометрично определяне при дължина на вълната 490 nm. Съдържанието на общи въглехидрати в черноморско водорасло вид *Cystoseira barbata* са изследвали Z. MANEV и колектив [Z. MANEV et. al., 2013]. Установените резултати са в границите 2,3 – 9,6 g/kg, които са много близки и сравними с настоящите за *Cystoseira barbata* – 5,6 g/kg ; Данните за общи въглехидрати във вид *Ulva rigida* са по-високи от цитираните за кафявото водорасло – 17,0 g/kg., което най- вероятно се дължи на разлика в използваните екстрагенти и местообитанието на събраните проби за анализ.