ALTERNATOR
Misliti znanost.

Čreslovine – večnamenska skrivnost dreves

3. 12. 2020

Številka: 54/2020

Avtor:

- Gregor Hostnik



Po tradicionalnem postopku je treba iz palme sagovca izprati tanine, da sagova »moka« sploh postane užitna in brez grenkobe. Foto: Arne Hodalič

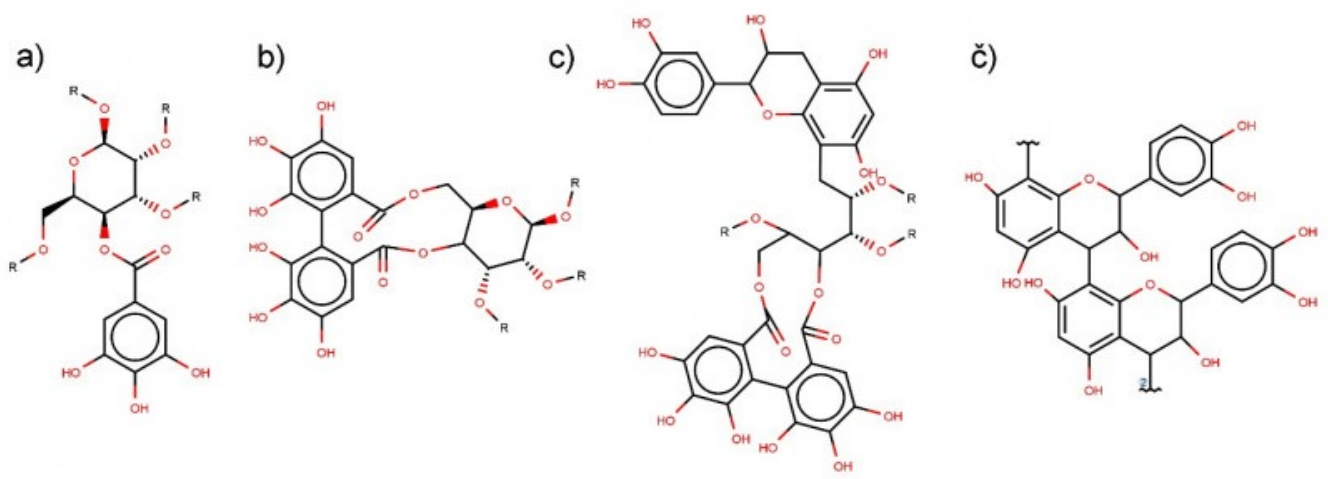
Kaj imajo skupnega usnje, vino in dobro staran viski? Eno skrivno, a ključno sestavino, imenovano čreslovina. Čreslovine oziroma tanini (izraz *tannin* izhaja iz francoskega izraza za strojenje *tanner* (https://fran.si/193/marko-snoj-slovenski-etimoloski-slovar/4292763/tann?View=1&Query=tanin)) so spojine, ki so prisotne v številnih rastlinskih vrstah, sintetizirajo pa jih tudi nekatere vrste alg. Čreslovine sodijo med rastlinske sekundarne metabolite, kar pomeni, da jih rastlina – v nasprotju z beljakovinami in ogljikovimi hidrati – ne potrebuje neposredno za rast ali razmnoževanje, temveč v rastlini opravljajo druge funkcije. Njihova naloga je, da ščitijo rastlino pred rastlinojedimi živalmi, mikroorganizmi in okoljskim stresom. Poleg njihovega pomena za rastline so čreslovine tudi industrijsko pomembne kemikalije. Uporabljamo jih namreč za strojenje usnja, kot sestavino v lepilih in zaščitnih premazih za les, skozi zgodovino pa so se uporabljale tudi za pripravo črnila. V sodobnem času poskušamo z njimi nadzorovati razrast bakterij pri gojenju živali, proučujemo pa tudi njihove protioksidativne in protirakotvorne lastnosti.

Zakaj so čreslovine posebne?

Mehanizem, preko katerega čreslovine ščitijo rastline pred rastlinojedimi živalmi, še ni povsem pojasnjen. Živali naj bi odvračale s svojim trpkim okusom. Poleg tega čreslovine z vezavo na beljakovine znižujejo hranilno vrednost rastlin. Pri prežvekovalcih pa lahko celo povečajo količino dostopnih beljakovin, saj preprečijo, da bi bakterije v vampu te beljakovine razgradile. Na gosenice z bazičnim pH-jem v prebavilih vplivajo tudi z oksidativno škodo, ki jo lahko naredijo pri visokem pH-ju. Pomembno vlogo igrajo tudi pri obrambi rastlin pred mikrobi. Ker lahko čreslovine reagirajo tudi s prostimi kisikovimi radikali in kemijskimi toksini, ščitijo rastline tudi pred oksidativnim in kemijskim stresom. Zato ni presenetljivo, da se v rastlini zaradi močnejšega okoljskega stresa (neugodni pogoji za rast, poškodbe ipd.) poveča sinteza čreslovin. Da dosežejo nek zadovoljiv učinek, morajo rastline sintetizirati kar znatne količine čreslovin, zato govorimo o čreslovinah kot o kvantitativni obrambi pred vsemi zgoraj naštetimi dejavniki (http://www.novapublishers.org/catalog/product_info.php?products_id=26575) .

Črešlovine so strukturno razmeroma raznolika skupina rastlinskih sekundarnih metabolitov, za katere je značilno, da imajo molsko maso med 300 in 3000 g/mol (zgolj za primerjavo: molska masa glukoze je 180 g/mol, medtem ko je molska masa inzulina 5808 g/mol) in da z železovim(III) kloridom tvorijo značilno modro obarvane koordinacijske spojine. Molska masa črešlovin je omejena glede na njihovo zmožnost strojenja usnja. Obstajajo namreč tudi spojine z višjo (ali nižjo molsko maso), ki bi jih po njihovih strukturnih lastnostih lahko prav tako uvrstili med črešlovine, vendar pa niso uporabne za strojenje usnja (https://doi.org/10.1039/B101061L) .

Na podlagi njihove kemijske strukture se črešlovine delijo na dve, lahko pa tudi na štiri ali celo več skupin. Če se tu osredotočimo na delitev na dve skupini, se črešlovine razdelijo na *hidrolizirajoče* (spojine, ki jih je mogoče s hidrolizo razgraditi na njihove osnovne gradnike) in *proantocianidine* (ki jih ne moremo neposredno hidrolizirati do njihovih osnovnih gradnikov). Hidrolizirajoče črešlovine se nato naprej delijo na elagitanine in galotanine, obstajajo pa tudi črešlovine, ki so sestavljene iz gradnikov, zaradi katerih bi jih lahko uvrstili tako med proantocianidine kot med hidrilozirajoče črešlovine. Takrat govorimo o kompleksnih črešlovinah. S spodnje slike lahko vidimo, da so črešlovine razmeroma raznolika skupina spojin, za posamezno rastlinsko vrsto pa je značilno, da tvori množico različnih črešlovin, ki pa se navadno uvrščajo v isto skupino (https://doi.org/10.1039/B101061L) .



Na sliki so prikazane shematske strukture različnih skupin črešlovin. Na sliki a) vidimo tipičen strukturni element galotaninov, medtem ko je na sliki b) prikazan tipičen strukturni element elagitaninov. Obe skupini spojin uvrščamo med hidrolizirajoče črešlovine. Na sliki c) najdemo strukturo kompleksnih črešlovin, medtem ko je na sliki č) prikazana struktura proantocianidina. R označuje, da so na preostale kisikove atome vezane različne polifenolne skupine.

Uporabnost črešlovine skozi zgodovino

Zaradi njihove prisotnosti v človeku dostopnem okolju ni presenetljivo, da so v uporabi že od prazgodovine. Njihova prva in verjetno še vedno ena najbolj razširjenih uporab je strojenje usnja. Pri strojenju se dandanes črešlovine uporabljajo komplementarno s kromovimi strojili. Čeprav se predvsem zaradi enostavnosti in hitrosti procesa 90 % usnja izdela z uporabo kromovih strojil, je proces strojenja s črešlovinami še vedno v uporabi. Usnje, strojeno s črešlovinami, ima namreč vseeno nekatere prednosti, kot je denimo večja trajnost (https://pubs.rsc.org/en/content/ebook/978-1-84973-434-9) . Kot smo omenili že uvodoma, pa je bila druga pomembna uporaba črešlovin v zgodovini za pripravo črnila (https://www.britannica.com/science/tannin) . Skozi zgodovino je bila mešanica galne (strogo gledano galna kislina ni črešlovina, temveč le osnovni gradnik črešlovin) in taninske kisline ter železovih ionov več stoletij eno najpogosteje uporabljenih črnil. Razlog za priljubljenost tega črnila je bila med drugim njegova obstojnost. A to črnilo je imelo tudi nekaj slabosti; z leti je namreč nekoliko spreminjalo barvo (iz modrikasto črne barve sčasoma preide v rjavo), poleg tega pa je počasi razžiralo papir. Zaradi tega se je v začetku 20. stoletja, s pojavom kvalitetnejših črnil, to črnilo počasi umaknilo iz splošne uporabe.

Poleg neposredne uporabe so črešlovine tudi ključna sestavina mnogih živil – verjetno najbolj znana sta viski, kjer so za okus ključne črešlovine iz hrastovega lesa, ki se v viski izlužijo iz sodov, in pa vino, kjer imajo pri rdečih vinih črešlovine še posebej pomembno vlogo. Poleg tega, da so ključna komponenta okusa (pri suhih vinih dobimo suh okus zaradi obarjanja beljakovin v slini), so pomembne tudi za oksidacijsko stabilnost vina. Črešlovine pa so prisotne tudi v pravem čaju in še marsikje. Ker jih najdemo v živilih, ki jih ljudje dojemamo kot zdrava (jagodičevje, sadje, stročnice, ječmen, različni oreški) in jih za pogosto uživanje priporočajo tudi razne prehranske smernice, se njihove ugodne učinke na zdravje skuša razložiti tudi z vsebnostjo črešlovin v teh živilih.

Zaradi vsega naštetega so črešlovine predmet mnogih študij, v katerih se nakazuje, da imajo lahko določene zdravju ugodne lastnosti (https://www.elsevier.com/books/pharmacognosy/badal-mccreath/978-0-12-802104-0) . Ker črešlovine zavirajo rast določenih vrst bakterij *in vitro*, se proučuje možnost njihove uporabe kot zamenjave za antibiotike v krmi živali (preventivna uporaba antibiotikov je v EU prepovedana, črešlovine pa se že uporabljajo pri reji živali kot sredstvo, s katerim naj bi preprečevali rast bakterij). Poleg tega potekajo tudi intenzivne študije njihovih protirakotvornih in protioksidativnih lastnosti. Kljub temu da so predvsem pri slednjih dveh lastnostih rezultati raziskav *in vitro* ugodni, pa še vedno manjka dokončna potrditev teh učinkov *in vivo*. Le to nam še dodatno zapleta dejstvo, da naj črešlovine ne bi

učinkovale na kratek rok (kot npr. različna zdravila), temveč naj bi imele neke ugodne učinke šele po dolgotrajnem uživanju primernih količin. Poleg tega je povsem možno, da bodo imele različne skupine čreslovin različne protibakterijske, protirakotvorne in protioksidativne lastnosti.

Glede na to, da so čreslovine v našem okolju splošno prisotne in da imajo številne načine uporabe, nadaljnje možnosti njihove uporabe pa so že predmet intenzivnega proučevanja, bi bilo pričakovati, da so te spojine že zelo dobro raziskane. Vendar ni tako, saj se tudi v številnih novejših študijah uporablja bolje ali slabše definirane surove rastlinske ekstrakte. Razlogov za to je več. Eden od njih je, da so se skozi zgodovino čreslovine uporabljale le za strojenje usnja in pri pripravi barvila. Kljub temu, da so čreslovine prisotne v mnogih živilih, je dolgo časa prevladovalo mnenje, da niso prehransko pomembne (niso ne škodljive ne koristne). Ker je praktično v vsakem rastlinskem viru prisotna cela vrsta različnih čreslovin, so tudi rastlinski ekstrakti zmes mnogo različnih čreslovin. Posledično je izolacija čistih spojin iz ekstraktov izredno zahtevna in seveda draga (cena čistih spojin je lahko tudi milijonkrat višja od cene surovih ekstraktov). Poleg tega pa gre pri čreslovinah za razmeroma raznoliko skupino spojin, ki imajo nekaj skupnih lastnosti.

Preskok k uporabi bolj čistih čreslovin se je zgodil že sredi 19. stoletja. Do takrat so namreč živalske kože strojili tako, da so jih namakali skupaj s sekanci hrastovega lesa – na podoben način kot se še danes pogosto pospešuje zorenje viskija. Ta metoda je bila izredno počasna, saj je bilo treba kože namakati kar dvanajst mesecev. Razlog za počasnost je, da se morajo čreslovine najprej izlužiti iz lesa v vodo, šele nato pa lahko reagirajo s kožo, ki se jo stroji. V sredini 19. stoletja so namesto sekancev hrastovega lesa začeli uporabljati že pripravljene ekstrakte čreslovin. To je nekoliko izboljšalo ponovljivost postopka, glavna prednost pa je bila, da je dodajanje ekstraktov čreslovin omogočilo bistveno pospešitev postopka, saj strojenje ni več trajalo dvanajst mesecev, temveč se je tipičen postopek skrajšal na osemindvajset dni. Drugi preskok, ki predstavlja praktično uporabo čistih spojin namesto rastlinskih ekstraktov čreslovin, pa nas čaka v prihodnosti.

Tehnike za določanje sestave čreslovin

Za izvedbo ponovljivih študij sta pomembni karakterizacija vzorcev in morebitna izolacija čistih spojin. Za določanje sestave izvlečkov čreslovin so se najprej razvile analitske tehnike, povezane z njihovo neposredno uporabo. Ena starejših, a še vedno uveljavljenih, je določanje *strojilnosti*. S tem testom določimo vsebnost komponent, ki se bodo ob strojenju vezale na kožo živali. Kromatografsko kolono (stekleno cevko s frito na spodnji strani) napolnimo z delno ustrojeno zmleto suho govejo kožo (kožni prah). Skozi kolono se najprej spusti vodo, da kožni prah nabrekne, nato pa še raztopino čreslovin. Iz tega, kolikšen delež vzorca se je vezal na kožni prah, določimo strojilnost vzorca in vsebnost čreslovin v vzorcu. Na ta način lahko določimo, kolikšna je celotna vsebnost strojil (torej čreslovin), ne dobimo pa podrobnejših podatkov o kemijski sestavi vzorca. Če se ukvarjate s strojenjem usnja, vam takšen analizni rezultat že zadošča, če pa ste npr. kemik ali mikrobiolog, pa vas zanimajo še dodatni podatki o sestavi vzorca, ki bi vam omogočili vzpostaviti povezavo med strukturo spojin v vzorcu in lastnostmi/funkcijo vzorca. Zato obstajajo še drugi testi, pri katerih lahko s pomočjo različnih reagentov določimo vsebnost elagitaninov, galotaninov in proantocianidinov (glavni strukturni elementi teh skupin čreslovin so prikazani na zgornji sliki). S temi testi določimo le koncentracijo čreslovin iz posamezne skupine, ne izvemo pa, katere spojine so prisotne v vzorcu. Testi so seveda občutljivi tudi za motnje, kakršna je na primer prisotnost vitamina C (https://www.elsevier.com/books/pharmacognosy/badal-mccreath/978-0-12-802104-0) .

Boljše podatke o sestavi vzorcev lahko dobimo s sodobnimi analiznimi tehnikami, ki so se uveljavile v zadnjih letih. Ena izmed njih je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC (https://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography)), sklopljena z masno spektrometrijo (https://sl.wikipedia.org/wiki/Masna_spektrometrija) (MS (https://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry)). Pri tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti se vzorec nanese na kromatografsko kolono, nato pa se ga skozi kolono spira s topilom. Ker se različne spojine različno močno vežejo na kolono, se iz kolone sperejo ob različnem času (temu postopku ločevanja pravimo *kromatografska ločba*). Sestavo raztopine po izhodu iz kolone lahko opazujemo z različnimi detektorji. Od vseh detektorjev je največ podatkov lahko dobiti z masno spektrometrijo, saj je z njo mogoče določiti molsko maso spojin, ki izstopajo iz kromatografske kolone, kot tudi molske mase sestavnih delov teh spojin. Iz tega pa lahko izkušen analitik določi strukturo posameznih spojin in celo oceni njihovo koncentracijo v vzorcu. Ta ima v primerjavi s preostalimi tehnikami številne prednosti. V primerjavi z ostalimi tehnikami za določanje strukture, kot sta npr. jedrska magnetna resonanca (NMR (https://sl.wikipedia.org/wiki/Jedrska_magnetna_resonanca)) in infrardeča spektroskopija (IR (https://sl.wikipedia.org/wiki/Infrarde%C4%8Da_spektroskopija)), namreč omogoča analizo kompleksnih vzorcev, saj je prvi korak analize ločba spojin na kromatografski koloni. Velika prednost v primerjavi s HPLC-jem, sklopljenim z detektorjem, ki meri jakost prepuščene ultravijolične in vidne svetlobe, pa je možnost, da določimo, kateri spojini pripada vrh, ne da bi imeli že vnaprej pripravljene standarde. To močno olajša identifikacijo novih spojin v naravnem ekstraktu.

Kako do čistih spojin?

Čeprav so prve čiste čreslovine izolirali že v 60. letih 20. stoletja, je bila izolacija takrat razmeroma zahtevna in seveda draga. Tudi dandanes sestoji izolacija iz več zaporednih kromatografskih ločb. Vendar pa je mogoče te ločbe z uporabo sodobnih instrumentov do precejšnje mere avtomatizirati. Na ta način si lahko pripravimo vzorce standardov, katerih strukturo še dodatno potrdimo z uporabo komplementarnih tehnik (kot sta npr. NMR (https://sl.wikipedia.org/wiki/Jedrska_magnetna_resonanca) in FTIR (https://en.wikipedia.org/wiki/Fourier-transform_infrared_spectroscopy)), standarde pa lahko nato uporabljamo pri analizi novih vzorcev. Prav tako je mogoče na ta način pripraviti čiste spojine in proučevati protimikrobne, protioksidativne in protirakotvorne lastnosti teh spojin,

namesto da bi proučevali le surove naravne ekstrakte. Glavna prednost je, da ta pristop omogoča lažjo primerjavo rezultatov različnih študij. Tudi če so v dveh študijah uporabili dobro karakterizirane naravne ekstrakte, je malo verjetno, da bodo imeli ekstrakti v obeh študijah enako sestavo (drugačen postopek ekstrakcije in različen vhodni material – drugo rastišče rastline), zaradi česar je včasih težko ugotoviti, kolikšen del razlike v rezultatih je mogoče pripisati razlikam v sestavi. Druga prednost tega pristopa pa je, da nam omogoča primerjavo med strukturo in funkcijo teh spojin (in morebitno primerjavo z rezultati računalniških izračunov). Če namreč odkrijemo, da nek naravni ekstrakt črešlovin učinkovito zavira rast bakterij, to še vedno težko povežemo z vsebnostjo neke posamezne komponente, saj je sam ekstrakt sestavljen iz več desetih komponent in je težko pripisati aktivnost samo eni od njih. Poleg tega pa je najverjetneje aktivnih več komponent takšnega ekstrakta. Pogosto govorimo celo o sinergiji spojin v ekstraktu, ki je seveda povsem mogoča, vendar pa jo je le s poskusi s surovimi naravnimi ekstrakti težko potrditi. Za uspešno potrditev sinergijskega delovanja komponent je treba izolirati čiste spojine, pokazati, da je njihova aktivnost nižja od aktivnosti ekstrakta, nato pa pripraviti mešanico čistih spojin, ki mora imeti močnejšo aktivnost, kot je vsota aktivnosti posameznih komponent. Če tega nismo dosegli ali pa je aktivnost mešanice čistih spojin nižja od aktivnosti naravnega ekstrakta, je verjetneje, kot da gre za sinergijo, to, da smo spregledali še kakšno od aktivnih spojin v surovem naravnem ekstraktu. Črešlovine tako v sebi nosijo še kar nekaj neodkritih skrivnosti ...