

Case-esimerkkejä Tbio-hankkeesta

Nokkos-, kanervankukka- ja puna-apilauutteet

Anni Hirvonen, Jouko Käsmä, Marianne Mäki, Tuija Kallio, Vesa Virtanen.
Oulun yliopisto, Kajaanin yliopistokeskus, Mittaustekniikan yksikkö (MITY)
Kehräämöntie 7, Kajaani

Tausta

Oulun yliopiston Mittaustekniikan yksikön Tbio-hankkeessa (Teollisesti ja kaupallisesti kehittyvä yritysten bio- ja mittaustekniikan toiminta-, tuotekehitys- ja pilotointiympäristö) pyritään kehittämään luonnontuotealaa, nostamaan luonnontuotteiden jalostusastetta, tunnistamaan raaka-aineiden ja lopputuotteiden aktiivisuus sekä laatu. Tavoitteena on parantaa yritysten prosessiosaamista ja toimintatavaksi edellytyksiä luonnontuotteiden jalostusasteen nostamiseksi. Hankkeessa kehitetään yritysten tarvitsemää erityisanalytiikkaa raaka-aineiden ja lopputuotteiden kemiallisen koostumuksen ja aktiivisuuden todentamiseen.

Hankkeen toimenpiteet on toteutettu yrittäjien tarpeita mukailleen. Tavoitteena oli esimerkiksi kehittää nokkosuuttamista ultraäänien avulla niin, että siitä saadaan uutettua mahdollisimman paljon arvoaineita. Ultraääntä käytetään laajasti kasvien uuton tehostamiseen (Vardanega ym. 2014). Kosmetiikka-sovellutuksiin haluttiin kehittää puna-apilan ja kanervankukan uuttoa sekä todentaa niiden arvoaineiden pitoisuuksia ja vaikuttavuutta. Kanervankukan vesiuutteella on aiemmin havaittu antimikrobista vaikutusta useita mikrobeja vastaan (Mazzanti ja Mascellino 1996, Vučić ym. 2014).

Materiaalit ja menetelmät

Kasviestrogeenit:

Puna-apilan kasviestrogeenien (daitseiini, genisteiini, biokaniini A ja formononetiini) analysointiin kehitettiin menetelmää HPLC-laitteella (mukailleen Pettersson ja Kiessling 1984). Ajoliuoksina käytettiin 1 % muurahaishappoa ja ACN:aa. Kasviestrogeeneista daitseiinille, genisteiinille ja biokaniini A:lle käytettiin DAD-detektoria ja formononetiini FLD-detektoria.

Uuttokokeet:

Ultraäänien vaikutusta nokkosuuttamiseen ja kanervankukan kokonaisfenolien uuttamiseen testattiin kahdella ultraäänilaitteella: 30 litran, 40 kHz ultraäänipesurilla (Shenzhen ECT Testing Technology Co., 600 W) ja max. 250 ml näytteiden homogenisointiin tarkoitettulla 30 kHz ultraäänisauvalla (Dr. Hielscher, 50 W).

Kuivatusta kanervankukasta ja nokkosjuuhteesta tehtiin vesiuuttoa ultraäänien kanssa ja ilman. Uutoista määritettiin kokonaisfenolit Folin-Ciocalteu-menetelmällä ja nokkosuutteiden klorogeenihapon pitoisuudet HPLC-DAD-laitteella. Useita eri uuttoaikoja ja -lämpötiloja testattiin. Kanervauutteiden antioksidatiivisuus määritettiin ORAC-menetelmällä.

Antimikrobisuuskokeet:

Puna-apilauutteen, kanervankukauutteen ja mustaherukanlehtiutteen antimikrobisuutta tutkittiin Bioscreen C -laitteen avulla. Käytetyt mikrobit olivat *Candida albicans* (ATCC 32723) ja *Stafylococcus aureus* (E-70045). Nämä ovat tyypillisiä iholla ja limakalvoilla esiintyviä mikrobeja, joiden kannoista osa voi aiheuttaa ihoinfektioita.

Bioscreen C -laitteella tutkittiin uuttelelle altistetun mikrobin kasvua Honeycomb-kuoppalevyllä 24 tai 48 tuntia ajan. Kuoppiin pipetoitiin kasvatusliemi, mikrobilaimennos ja tutkittava uute. Laite mittaa kuopista absorbanssin, joka on suoraan verrannollinen mikrobin kasvuun.

Tulokset

Kasviestrogeenit:

Kehitetyn kasviestrogeenien analysointimenetelmän avulla puna-apiloista valmistetuista uutteista saatiin kvantitoitua neljän kasviestrogeenin pitoisuudet. Daitseiinin pitoisuudeksi saatiin keskimäärin 4-19 µg/g, genisteiinin 16-23 µg/g, biokaniini A:n 5-35 µg/g ja formononetiinin 49-224 µg/g kuivattua puna-apilaa kohti. Menetelmän avulla määritettiin ostopalveluna kaupallisen luonnontuotteen häpyalueen voiteen sisältämän puna-apilauutteen kasviestrogeenien pitoisuudet (Kuva 1).



Kuva 1. Raisan Terveyspirtin/ Sheikkis oy:n tuote, johon on käytetty puna-apilauutetta.

Uuttokokeet:

Tuloksista huomattiin, että ultraäänipesuriksi tarkoitettulla 40 kHz laitteella ei ollut vaikutusta nokkosuuttamiseen kokonaisfenolien ja klorogeenihapon uuttamiseen (Taulukko 1). Myöskään kanervankukan kokonaisfenoleihin tai antioksidatiivisuuteen ei alustavien tulosten perusteella 40 kHz ultraäänellä ollut vaikutusta. Pienen mittakaavan 30 kHz ultraäänisauvalla saatiin aistinvaraisesti erilaisia (vihreämpiä) nokkosuutteita, mutta uutteiden arvoaineanalyytit ovat vielä kesken.

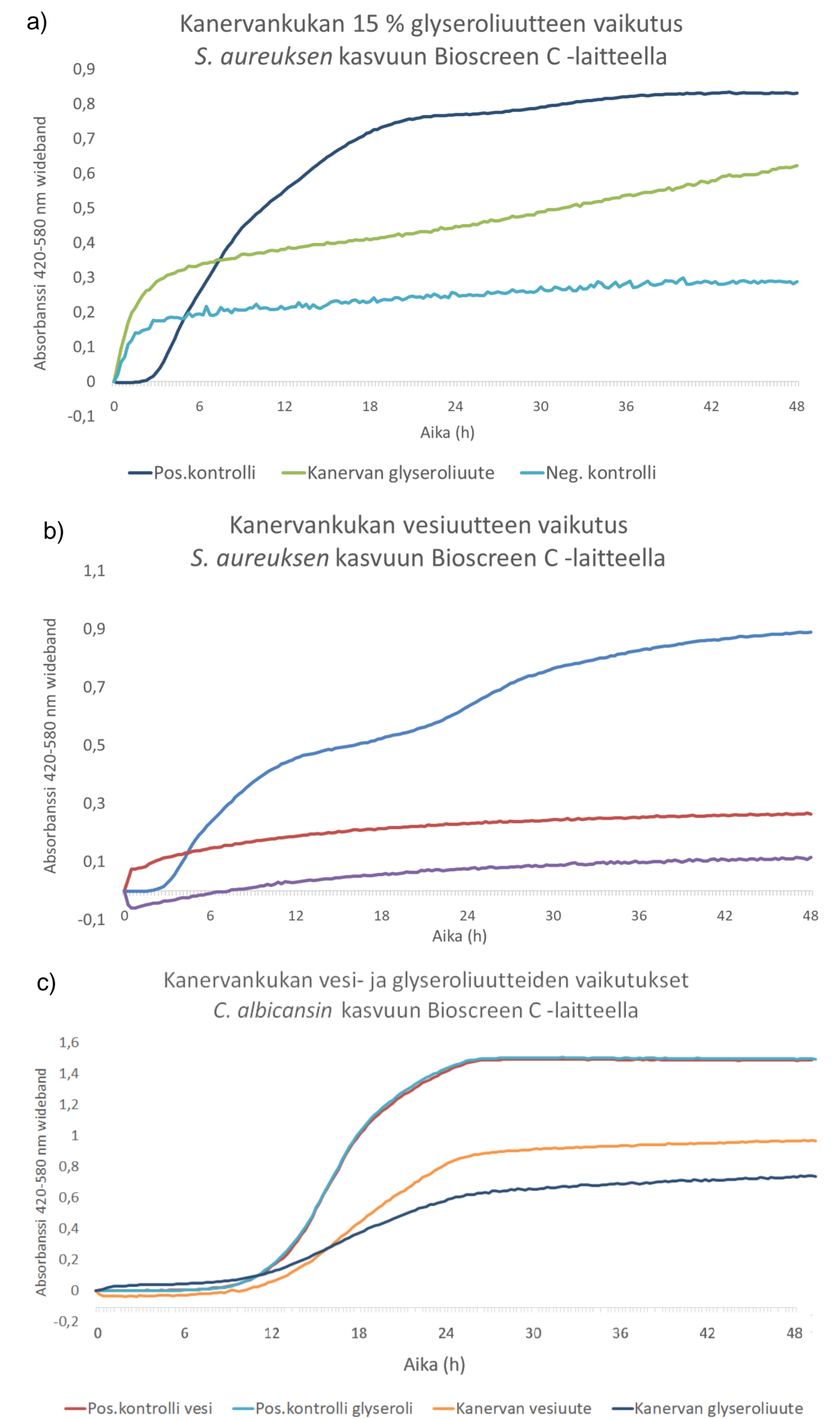
Taulukko 1. Ultraäänihauuteen (40 kHz) vaikutus kuivatun nokkosuuttamiseen kokonaisfenolien ja klorogeenihapon uuttamiseen. Uutteet valmistettu veteen.

Uuttotapa	Ei ultraääntä		40 kHz ultraäänihauute	
	Kok.fenolit (mg/100ml)	Klo.happo (µg/ml)	Kok.fenolit (mg/100ml)	Klo.happo (µg/ml)
Nokkosta 1:20, ryöppäys 85°C, uutto 60 min 40°C	224	618	220	597
Nokkosta 1:20, ryöppäys 85°C, uutto 1,5 h 40°C, 1 L	236	565	234	557
Nokkosta 1:20, ryöppäys 85°C, uutto 1,5 h 40°C, 15 L	285	534	303	525
Nokkosta 1:30, ryöppäys 85°C, uutto 30 min 40°C	241	399	250	399

Antimikrobisuuskokeet:

Puna-apilauute ja mustaherukanlehtiute eivät estäneet hiivan (*C. albicans*) kasvua. Kanervankukauutteet vähensivät selvästi *S. aureuksen* kasvua (Kuva 2 a ja b) ja hieman *C. albicansin* kasvua (Kuva 2 c). Tulokset ovat kuitenkin alustavia ja lisää toistoja ja menetelmän optimointia tarvitaan.

S. aureus ei lähde kasvamaan ennen n. 2 tunnin inkubointia, joten muut häiritsevät tekijät, kuten kanervauutteiden väri tai saostuminen kokeen alussa, selittävät Kuvassa 2 a ja b absorbanssiarvon jyrkkää nousua heti aikapisteen 0 h jälkeen. Negatiivisten kontrollien kohonneet absorbanssiarvot kertovat myös näytteen häiritsevistä tekijöistä. Alustavien testien perusteella vaikuttaa siltä, että kanervan vesiuute (Kuva 2b) estää paremmin *S. aureuksen* kasvua kuin kanervan 15 % glyseroliuute (Kuva 2a). Häiritsevien tekijöiden vuoksi kanervankukan antimikrobisen tehon voimakkuudesta ei ole vielä varmuutta.



Kuva 2. Kanervankukan uuttoaikojen vaikutukset *S. aureuksen* (a ja b) ja *C. albicansin* (c) kasvuun Bioscreen C -laitteella.

Positiivinen kontrolli kuvaa uuttoluoksen (vesi tai 15 % glyseroli) vaikutusta mikrobin kasvuun ilman kanervaa. Negatiivinen kontrolli sisältää kanervauutetta ja kasvatusliuosta ilman mikrobia ja se kuvaa kanervauutteen värin ja mahdollisen saostumisen vaikutusta absorbanssiarvoon. Kanervauutteen pitoisuus testissä oli 33 µl/ml. Uute sisältää 1:10 (w/v) kuivattua kanervankukkajauhetta, mikä vastaa testissä kanervankukan pitoisuutta 3,3 mg/ml.

Johtopäätökset

40 kHz ultraäänihauuteella ei ollut havaittavaa vaikutusta nokkosuuttamiseen kokonaisfenolien tai klorogeenihapon uuttamiseen. Kun käytetään ultraääntä tehostamaan luonnontuotteen uuttoa, käytetty kasvi, uuttoluoto sekä laitteiden taajuus, teho ja malli voivat vaikuttaa arvoaineiden uuttamiseen. Kaikilla laitteilla ei siis saada vaikutusta fenolisten yhdisteiden uuttamiseen nokkosuuttamisesta.

Kanervankukan vaikutus *S. aureuksen* ja *C. albicansin* kasvun estoon vaikuttavaa lupaavalta, ja tätä tullaan tutkimaan vielä tarkemmin.

Puna-apilauutteella ei havaittu antimikrobista vaikutusta *C. albicansia* vastaan, mutta puna-apilan sisältämät kasviestrogeenien pitoisuudet saatiin kvantitoitua hankkeen aikana kehitetyllä menetelmällä.

Lähteet:

- Vardanega R, Santos DT ja Meireles MA. Pharmacogn Rev. 2014, 8(16):88-95. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation.
- Vučić DM, Petković MR, Rodić-Grabovac BB, Stefanović OD, Vasić SM ja Comić LR. Bosn J Basic Med Sci. 2014, 14(4):234-8. In vitro activity of heather [*Calluna vulgaris* (L.) Hull] extracts on selected urinary tract pathogens.
- Pettersson ja Kiessling, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984, 67, 3, 503-505. Liquid Chromatographic Determination of the Plant Estrogens Coumestrol and Isoflavones in Animal Feed.