

Luonnontuotealan monitieteistä tutkimusta Pirkanmaalla

Erikoistutkija Tytti Sarjala, Luke, Parkano

9.2.2016 Tampere

Tehomolekyylejä metsästä uuttamalla, fraktioimalla ja testaamalla

- **Terveyttä metsästä 2008-2011 (EAKR)/Sarjala**
- **BIOAKT, Pirkanmaan verkostopohjainen bio-osaamislaboratorio 2012-2013 (EAKR)/Sarjala**
- **BIOSTEP - Luonnosta lääkeaihoita 2014 (EAKR)/Sarjala**
- **Bioaktiiviset yhdisteet osana tulevaisuuden biotaloutta, 2012-2016 (Luke)/Sarjala**
- **FORLEAP-Metsäbiomassan sivuvirroista uusia tuotteita, 2015-2018 (EAKR)/Sarjala**
- **Yhteistyökumppanit:**

Luke: dos. Pekka Saranpää (puun kemia ja ominaisuudet)

TaY, Lääketiet. laitos: prof. Hannu Uusitalo (Silmälääketiede), FT Ulla Aapola,

TaY, Lääketiet. laitos: prof. Eeva Moilanen (Immunofarmakologia), LT Katriina Vuolteenaho

HY: prof. Kristiina Wähälä (org. kemia, lääkeainekemia)

TTY: prof. Robert Franzén (org. kemia, lääkeaine- ja luonnonaineiden synteesi)

TTY: prof. Matti Karp (teollinen biotekniikka)

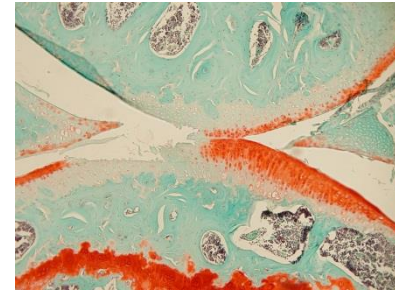


PIRKANMAAN LIITTO

BIOAKT- ja BIOSTEP-hankkeet (EAKR): antioksidatiivisten ominaisuuksien testausmenetelmien kehitystä solumalleilla

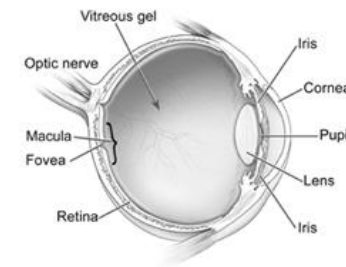
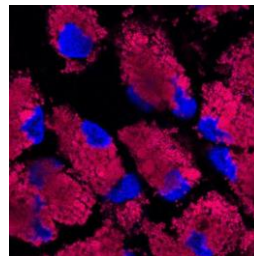
- **Immunofarmakologia, prof. Eeva Moilanen, LT Katriina Vuolteenaho**

- Immortalisoitu ihmisen rustosolulinja
- Nivelrikko, rustosolukko
- Utteiden vaikutus MMP entsyymiaktiivisuuteen



- **Silmälääketiede, prof. Hannu Uusitalo, FT Ulla Aapola**

- Silmän verkkokalvon pigmenttiepiteelisolumalli (RPE), kokeellinen silmän ikärappeumamalli
- RPE-solut, fagosytoosi
- Sarveiskalvon haavanparanemismalli

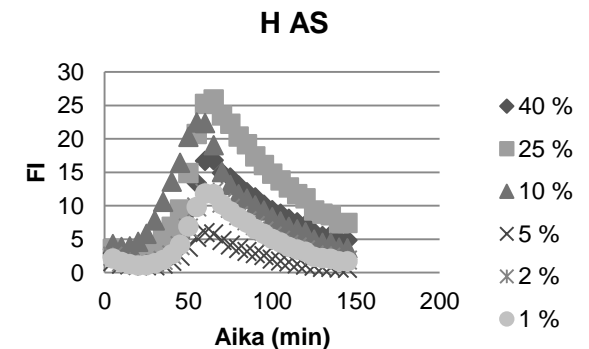
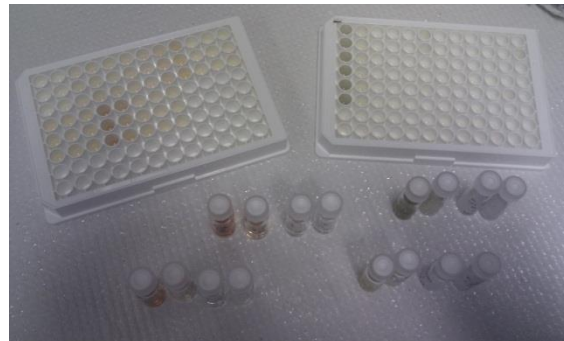
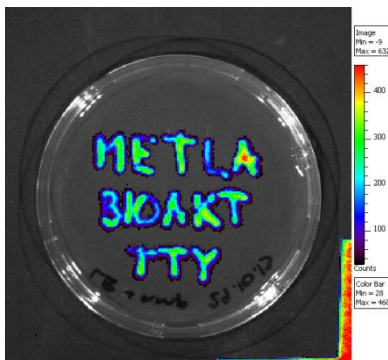


© Luonnonvarakeskus

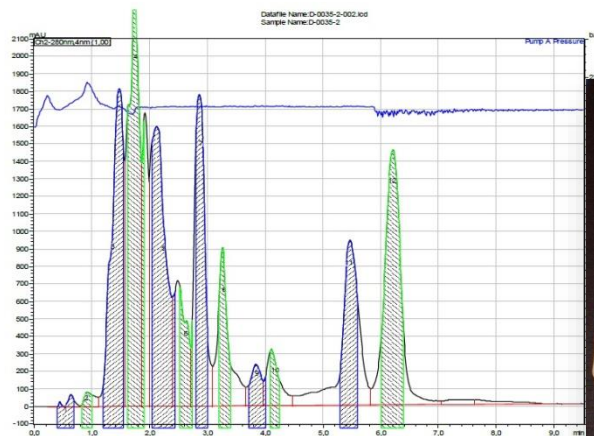
Testaukset biosensoreilla TTY:llä

DI Jenni Tienaho, Prof. Matti Karp, Prof. Robert Franzen

- Bakteerisensoreina käytettiin geneettisesti modifioituja *Escherichia coli* –bakteereja. Toinen kanta on muokattu siten, että se tuottaa valoa oksidatiivisten aineiden läsnä ollessa ja toinen bakteerin perimää eli DNA:ta vaurioittavien aineiden läsnä ollessa.
- *E. coli* DPD2511 – Oksidatiiviset ja antioksidatiiviset ominaisuudet
- *E.coli* DPD2794 –DNA:ta vaurioittavat tekijät



Testattavien uutteidien fraktiointi prep. HPLC:llä



Fraktioiden bioaktiivisuuden esitestaus Luke (Parkano) ja jatkotestaus solumallitesteillä (TaY, TTY).

Fraktioiden kemiallisen rakenteen selvitys, HY, kemian laitos.

FORLEAP-metsäbiomassan sivuvirroista uusia tuotteita



Euroopan unioni
Euroopan aluekehitysrahasto

- Hankkeen kesto kolme vuotta, 1.11.2015-31.10.2018
- Rahoittajat: Euroopan aluekehitysrahasto (EAKR), Pirkanmaan liitto (60%), Luoteis-Pirkanmaan seudun kunnat ja Parkanon kaupunki (8%), omarahoitusosuus 32% (Luke, TTY)
- Hankkeen toteuttavat Luke, Parkano (koordinoija, dos. Tytti Sarjala, FT Riina Muilu-Mäkelä, DI Jenni Tienaho) ja Tampereen teknillinen yliopisto (kemian ja biotekniikan laitos, prof. Robert Franzén, prof. Matti Karp, DI Jenni Tienaho)



PIRKANMAA



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Metsästä saatavat raaka-aineet ja metsäbiomassan sivuvirrat ovat uusiutuvia, arvokkaita lähteitä uusille korkean jalostusarvon tuotteille

Metsistä saatavat sivuvirrat saatava hyötykäyttöön.

Uusiutuvia raaka-aineita hyödynnetään öljypohjaisten synteettisten yhdisteiden sijaan

Metsästä saatavat raaka-aineet sisältävät rajattomasti arvokkaita ainesosia korkean jalostusarvon tuotteiksi



Kuoret, kannot, neulaset, sammalet, sienet jne.



Stilbeenit, sikimihappo, lignaanit, sokerit ym. bioaktiiviset yhdisteet

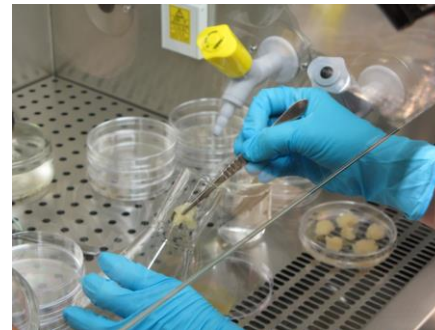
Esim. kosmetiikka, säilöntäaineet, lääkkeet, funktionaaliset elintarvikkeet, suoja-aineet, pakkaukset





Miten saadaan PK-yritysten hyvät ideat kehitettyä raaka-aineesta korkean jalostusarvon tuotteiksi?

- Tarvitaan osaamista ja tietoa
- Tarvitaan laitteita
- Tarvitaan osaavaa henkilöstöä



Tuoteidea ja
markkinatuntemus

Raaka-aineen
ominaisuudet,
käyttömahdollisuudet,
testaus, tutkimus

Tuotteistaminen

Liiketoimintastrategia ja
kaupallistaminen

Markkinointi



Tuotekehityksen jarrut? Voiko tutkimuksen keinoin auttaa?



Euroopan unioni
Euroopan aluekehitysrahasto

Tehtyjen haastattelujen perusteella voi olla useita syitä, esimerkiksi:

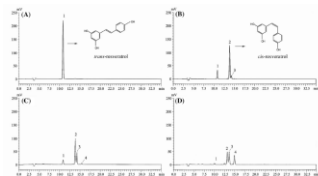
- Raaka-aineiden tuotekehitysmahdollisuuksia ei tunneta
 - Yrityksillä ei ole henkilöresursseja, aikaa eikä erityisasiantuntemusta perehtyä ja seurata tutkimustietoa, etenkin kun uusin ja merkittävin tutkimustieto julkaistaan aina vertaisarvioituissa lehdissä ja alan kansainvälisissä kongresseissa. Ongelma koskee erityisesti PK-yrityksiä.
- Tuotekehitykseen tarvittavia välineitä tai analyysilaitteita ei ole, eikä sellaiseen kannata väliaikaista tarvetta varten investoida.
- Tuotekehitykseen liittyvä ongelma vaatii vaivalloisen ja monimutkaisen analyttisen prosessin, jonka pystytys lyhyttä projektia varten jää tekemättä.
- Metsästä saatavia raaka-aineita hyödyntävissä biotuotealan yrityksissä kaivattiin vertailevaa tietoa suomalaisten ja ulkomaisten raaka-aineiden välisistä eroista esim. bioaktiivisissa ominaisuuksissa ja tehoaineiden pitoisuuksissa. Toivottiin tiedon keruuta yksiin kansiin.

Food Chemistry 171 (2015) 137–143

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



ISSN 0361-5219, Solid Fuel Chemistry, 2008, Vol. 42, No. 2, pp. 68–73. © Allerton Press, Inc., 2008.

Original Russian Text © A.A. Ivanov, N.V. Yudina, E.I. Korotkova, O.I. Lomovsky, 2008, published in Khimiya Tverlogo Topliva, 2008, No. 2, pp. 7–13.

Antioxidants in the Water-Soluble Carbohydrate Fractions of the Moss *Sphagnum fuscum* and *Sphagnum Peat*

A. A. Ivanov^a, N. V. Yudina^a, E. I. Korotkova^b, and O. I. Lomovsky^c



PIRKANMAA

Tytti Sarjala



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

© Luonnonvarakeskus


Luke
LUONNONVARAKESKUS

Hankkeen tavoitteet?



Euroopan unioni
Euroopan aluekehitysrahasto

- Hankkeessa pyritään metsätalouden **sivuvirtojen** hyödyntämiseen ja edistämään uusiutuvien luonnonvarojen hyödyntämistä uusiutumattomien sijasta.
- Hankkeessa pyritään luomaan **matalan kynnyksen tuotekehitysalusta**, jolla tuetaan pk-yritysten tuotekehitystä, jossa käytetään entistä enemmän metsäbiomassasta aiemmin hyödyntämättömiä osia.
- Hankkeessa luodaan yritysten kanssa yhteistyössä niiden testauksen ja tuotekehityksen tarpeisiin **räätälöityjä analyysi- tai testausmenetelmäratkaisuja**, joilla voidaan määrittää raaka-aineiden sisältämien tehoaineiden koostumusta ja bioaktiivisuutta.



PIRKANMAA



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Testausmenetelmien soveltaminen erilaisten uutteiden ja yhdisteiden tehoaineiden mittaamiseen

Esimerkiksi:

- Antioksidatiiviset ominaisuudet
- Antimikrobiset ominaisuudet

Antioksidatiivisuus

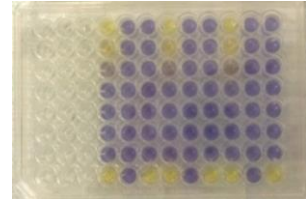
Kasveissa syntyy useiden tavalliseen solun aineenvaihduntaan ja useiden stressiin liittyvien reaktioiden seurauksena reaktiivisia happiradikaaleja (O_2^- , H_2O_2 , HO^-)



- Vaikka kasvit tarvitsevat pieniä määriä happiradikaaleja erilaisiin signalointitapahtumiin, niillä on erilaisia mekanismeja suojautua ylimääräisten happiradikaalien oksidatiivista haittavaikutusta vastaan. Happiradikaalit aiheuttavat soluissa esim. lipidiperoksidaatiota kalvoissa, proteiinien hapettumista ja DNA:n vaurioita
- Antioksidatiiviset suojautumismekanismit kasveissa
 - Entsyymien avulla (esim. superoksididismutaasi, katalaasi, askorbaattiperoksidaasi, glutathionireduktaasi jne....)
 - Non-entsyymaattiset antioksidantit, kuten askorbiinihappo eli C-vitamiini, glutathioni (tripeptidi), proliini, α -tocopherol (E-vitamiini), karotenoidit, flavonoidit

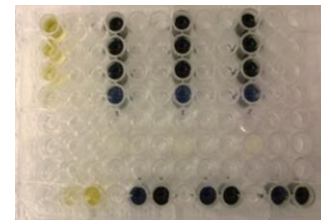
Testauspatteristo antioksidatiivisuuden mittaukseen

- **H₂O₂-scavenging' - Antioksidatiivisuusmittaus**
- Perustuu raudan hapettumiseen happamissa olosuhteissa vetyperoksidin läsnä ollessa. Mikäli mukana antioksidatiivisia yhdisteitä, raudan hapettumista ei tapahdu.
- $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$

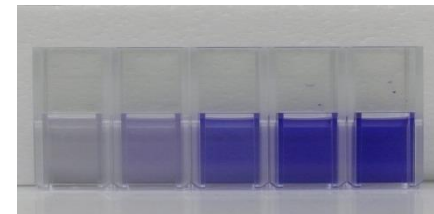


Fenolijhdisteiden seulonta – Folin Ciocalteun menetelmä

- kolorimetrinen menetelmä fenolisten ja polyfenolisten antioksidanttien seulontaan.
- Testi mittaa fenolijhdisteiden totaalipelkistämiskapasiteettia.



- **FRAP = ‘Ferric reducing antioxidant power’ tai ‘Ferric reducing ability of plasma’- Antioksidatiivisuusmittaus**
- Antioksidantti pelkistää happamissa olosuhteissa $[\text{Fe}(\text{III})(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ -kompleksin kirkkaasta syvän siniseksi. FRAP-arvoja verrataan tunnettujen rauta(II)-kompleksikonsentraatioiden aiheuttamiin väri-intensiteetti-arvoihin.
- Antioksidatiivinen aine aiheuttaa aktiivisuuden testissä, mikäli sillä on kyky pelkistää kelatoitu rauta(III)kompleksi. Reaktiota käytetään usein mittaamaan polyfenoleita sisältävien ravintoaineiden antioksidatiivista kapasiteettia.



- **ORAC – ‘Oxygen Radical Absorbance Capacity’-
Antioksidatiivisuusmittaus**
- Mitattava yhdiste aiheuttaa aktiivisuuden, mikäli se kykenee suojaamaan fluoresoivaa molekyyliä peroksyyliradikaalien hajottavalta vaikutukselta. Tulokset ilmoitetaan Trolox-ekvivalentteina (E-vitamiinijohdannainen).

Pure Appl. Chem., Vol. 85, No. 5, pp. 957–998, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>

© 2013 IUPAC, Publication date (Web): 26 February 2013

**Methods of measurement and evaluation of
natural antioxidant capacity/activity
(IUPAC Technical Report)***

Reşat Apak^{1,‡}, Shela Gorinstein², Volker Böhm³, Karen M. Schaich⁴,
Mustafa Özyürek¹, and Kubilay Güçlü¹

is straightforward when normalising pure known compounds, but when relating TE to extracts with unknown composition and concentration it becomes the source of one of the most serious limitations of the ORAC assay. ORAC units = mmol TE per what? Which of these units should be used—mL, L, g or kg fresh weight (FW), g or kg dry weight (DW), 100 g serving, average size serving, mol phenol?

A reference base is clearly required for all ORAC values, but it must also be appropriate for the product. Because so much attention has been given to absolute ORAC values in the popular press, it has become common practice to express ORAC values on whatever basis will provide the largest numbers.



Miten tavoitteisiin päästään? Toimenpiteet?

- Suorat kontaktit yrityksiin. Luken ja TTY:n osaaminen tunnetuksi Pirkanmaan yrityksille. Asiakaslähtöisten kehitystehtävien ideointi → **matalan kynnyksen tuotekehitysalusta**
- Suomenkielinen kooste kotimaisen ja ulkomaisen raaka-ainemateriaalin **tehoainekoostumuksen eroista**
- **Tuotedokumentaatioiden** näkökulmasta tarpeelliseksi havaittu suomalaisten raaka-aineiden tehoainekoostumuksen analysointi
- Uttomenetelmien vertailu tehoaineiden uuttamiseksi lähtömateriaaleista sekä fraktiointi prep. HPLC:llä, tunnistus, molekyylin muokkauksen vaikutukset bioaktiivisuuteen

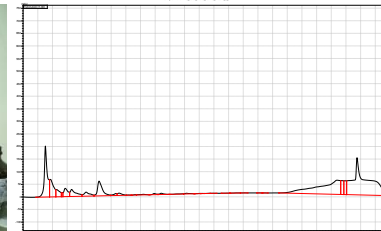
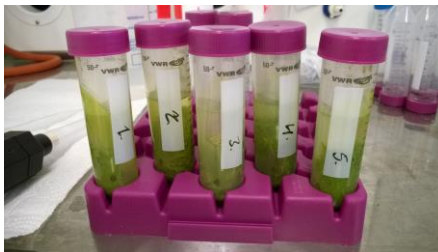




Euroopan unioni
Euroopan aluekehitysrahasto

...lisää toimenpiteitä

- Mielenkiintoisiksi osoittautuneiden bioaktiivisten yhdisteiden eristäminen ja tunnistaminen sekä mahdollinen muokkaus **semisynteetin** keinoin erilaisiin käyttötarkoituksiin (tarve: teollisuuden selektiiviset katalyytit, lääkeaineiden synteesi) (prof. Robert Franzén, TTY, katalyyttinen enantioselektiivinen syntetiikka)
- Antimikrobisten vaikutusten testausmenetelmien kehittäminen (tarve: kosmetiikka, pakkausmateriaalit, pinnoitteet, elintarvikkeet). **Mikrobiosensoriteknikan** hyödyntäminen kehittäelyssä (prof. Matti Karp, TTY).



PIRKANMAA



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Mitä hankkeessa saadaan aikaan?

- Uutta tietoa metsästä saatavien **raaka-aineiden** bioaktiivisista ominaisuuksista **tuotedokumentaatioiden** käyttöön.
- Antimikrobiaalisten ominaisuuksien räätälöitävissä oleva testaustyökalu
- ”**Työkalupaketti**” yritysten tuotekehityksen tarpeisiin
- Mahdollinen **synteesimenetelmä kiraalisten yhdisteiden** valmistamiseksi. Kiralia-keskuksen valmistaminen molekyyliin vaatii tehokkaan katalyytin.
- Metsät hyödynnetään monipuolisesti ja sivuvirtojen käyttö kestäväällä ja vähähiilisyyteen pyrkivällä tavalla → **Uudet tuoteideat!**



Pitkällä aikavälillä hankkeen mahdollisia hyötyjä:

- **Matalan kynnyksen tuotekehitysalusta** PK-yrityksille, jonka avulla tutkimus voidaan jalkauttaa tuotekehityksen osaksi
- Synteettisiä yhdisteitä pystytään mahdollisesti korvaamaan **uusiutuvilla** raaka-aineilla (vähähiilisyystavoite)
- Katalyyttitutkimus hyödyttää **biojalostukseen ja lääkeainesyntetiikkaan** liittyviä hankkeita
- Tutkijat oppivat biotalouden kehityksestä **tuotteistamisen ja kaupallistamisen** näkökulmaa ja opitaan jalkauttamaan tutkimustietoa tuotekehitykseen
- Tavallinen kuluttaja saa turvallisempia ja laadukkaampia tuotteita ja luodaan **kilpailuetua** suomalaisille yrityksille



PIRKANMAA



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Kiitos!