

# Bioaktiivisuustestit, Uutto- ja pyrolyysipilotit

Jenni Tienaho

# Testisuunnitelma

Uutteet analysoidaan antioksidantti- ja antibakteerisuusominaisuuksien suhteen käyttäen määrittelyksiin *in vitro* kuoppalevymenetelmiä. Koska antioksidatiiviset yhdisteet toimivat erilaisilla mekanismeilla, myös niiden havaitsemiseen on eri tavoin toimivia testausmenetelmiä. Näistä **FRAP** (ferric reducing antioxidant power) -menetelmä perustuu antioksidanttien kykyyn pelkistää rautakompleksi elektroninsiirtomekanismia käyttäen ja **ORAC** (oxygen radical absorbance capacity) -menetelmä taas antioksidanttien kykyyn estää peroksyyliradikaalia hajottamasta fluoresoivaa molekyyliä vetyatominsiirtomekanismia käyttäen. Lisäksi, koska fenoliset yhdisteet ovat tunnettuja antioksidatiivisista ominaisuuksistaan, **totaalifenolikapasiteetti** tutkitaan käyttäen Prussian blue -menetelmää, mikä perustuu fenolisten yhdisteiden kykyyn pelkistää ferrisyanidin ferrosyanidiksi, joka taas muodostaa rautakloridin kanssa preussinsinistä pigmenttiä. Antibakteerisuuden tutkimiseen käytetään bakteeribiosensoreita ***Escherichia coli* K12+pcGLS11** (gram-negatiivinen) ja ***Staphylococcus aureus* RN4220+pAT19** (gram-positiivinen). Kyseiset kannat on geneettisesti manipuloitu tuottamaan jatkuvaa luminesenssivalosignaalia ja luminometrillä mitattava valosignaali alenee annosvasteisesti antibakteeristen yhdisteiden läsnä ollessa. Menetelmän vahvuutena konventionaalisiiin kokeisiin verrattuna on sen nopeus, sillä tulos saavutetaan yleensä vain 60 minuutin reaaliaikaisella mittauksella verrattuna yliyön kasvatukseen ja lisäksi se vaatii kuoppalevymenetelmän huomattavasti pienempiä näytemääriä kuin erilaiset maljauskokeet.

## Antioksidanttimenetelmät:

FRAP  
ORAC

## Totaalifenolimenetelmä:

Prussian blue

## Antibakteerisuusmenetelmät:

*E. coli*  
*S. aureus*  
biosensoritestit

# Uutteet testeihin

Aluksi tehdään kolme yksivaiheista uuttoa ja sen jälkeen kaksi kaksivaiheista uuttoa seuraavan taulukon mukaisesti. Lukessa tehtyjen aikaisempien projektien perusteella – Tannins for waste water treatment (TanWat), Sustainable Binders from bark (SusBinders), Boosting the use of high-value substances from trees: innovating treatment techniques for improved usability in products (InnoTrea), Termisten puunesteiden raaka-aineet, ominaisuudet ja teollinen käyttö (Norpyro) – alle 90 °C:een uutoista kuoresta uutuu erittäin vähän hiilihydraatteja ja tanniineja, joten näin alhaisten lämpötilojen käyttö ei ole perusteltua. Kaksivaiheisella uutolla saadaan kaksi jaetta: tanniinirikas jae ja hemiselluloosarikas jae.

Vaihe	Lämpötila, °C	Aika, min	Paine, bar	Vaihe	Lämpötila, °C	Aika, min	Paine, bar
I	90	60	1	II	-	-	-
I	140	60	3,6	II	-	-	-
I	170	60	7,9	II	-	-	-
I	90	60	1	II	140	60	3,6
I	90	60	1	II	170	60	7,9

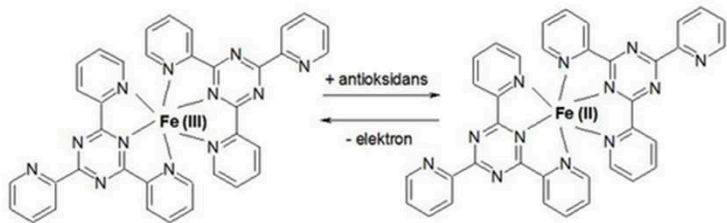
Käsittely	Suunnitelma		Toteuma	
	Lpt vaiheess	Lpt. Vaihees	Lpt vaiheess	Lpt. Vaiheessa
1	90	-	72	-
2	140	-	135	-
3	170	-	166	-
4	90	140	80	137
5	90	170	81	165

## Näytelistä

lab nro	Näyte
1	Napy1 5.4.22 KK
2	Napy2 6.4.22 KK
3	Napy3 7.4.22 KK
4	Napy4 14.4.22 vaihe1 KK
5	Napy4 14.4.22 vaihe2 KK
6	Napy5 20.4.22 vaihe1 KK
7	Napy5 20.4.22 vaihe2 KK

# Antioksidanttitestit

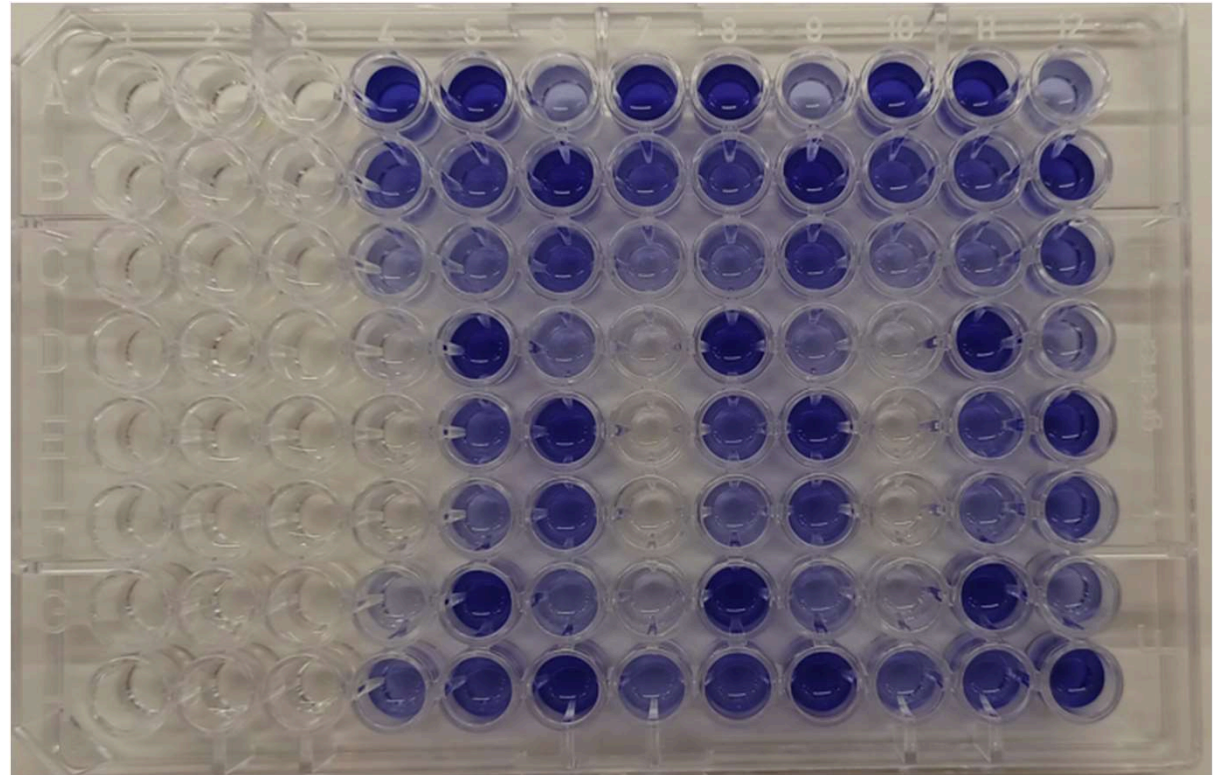
## FRAP



kirkas

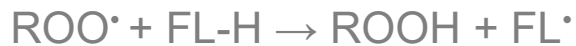
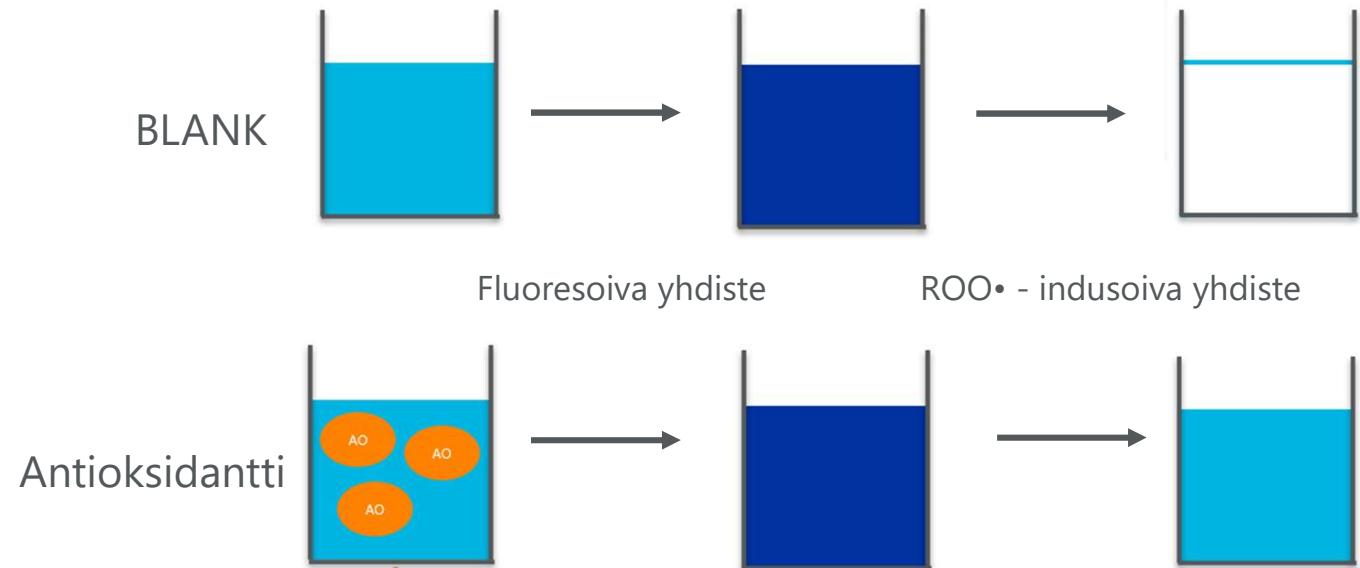
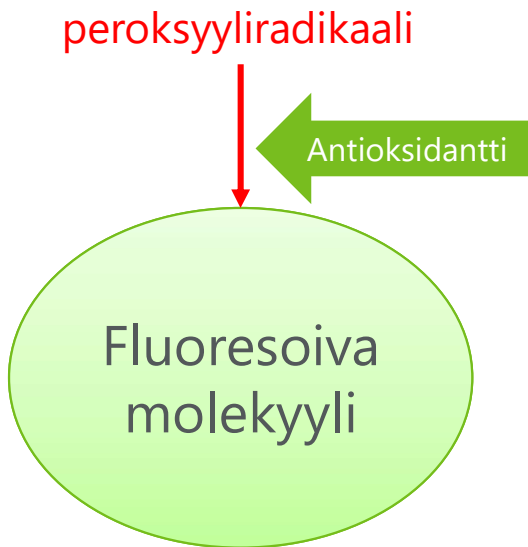
Tumman sininen

**Perustuu antioksidanttien  
kykyyn pelkistää kelatoituja  
metalli-ioneja**



# Antioksidanttitestit

## ORAC



Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(16), 4437-4444.

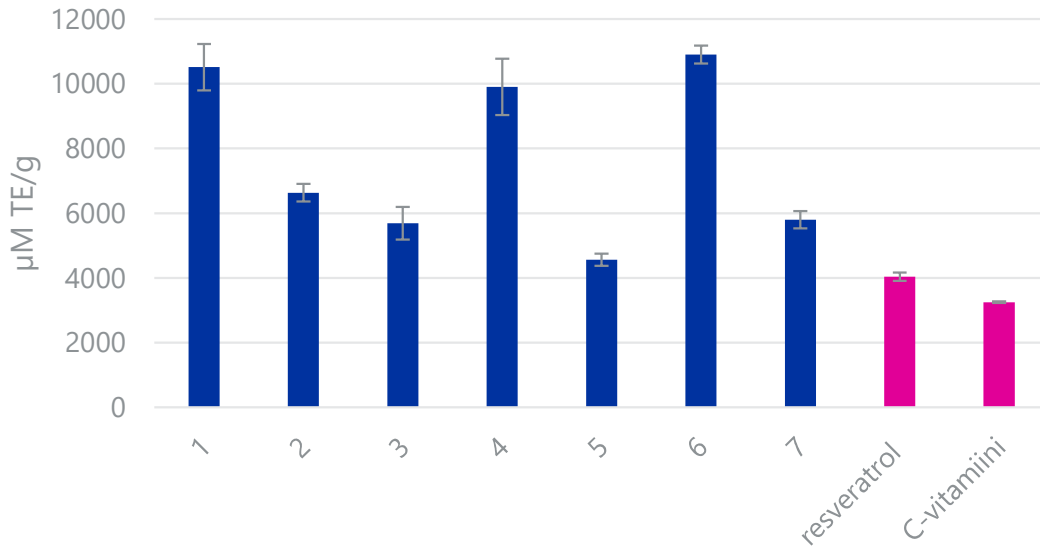
Prior, R. L., Hoang, H. A., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., ... & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(11), 3273-3279.

# Tulokset - Antioksidanttitestit

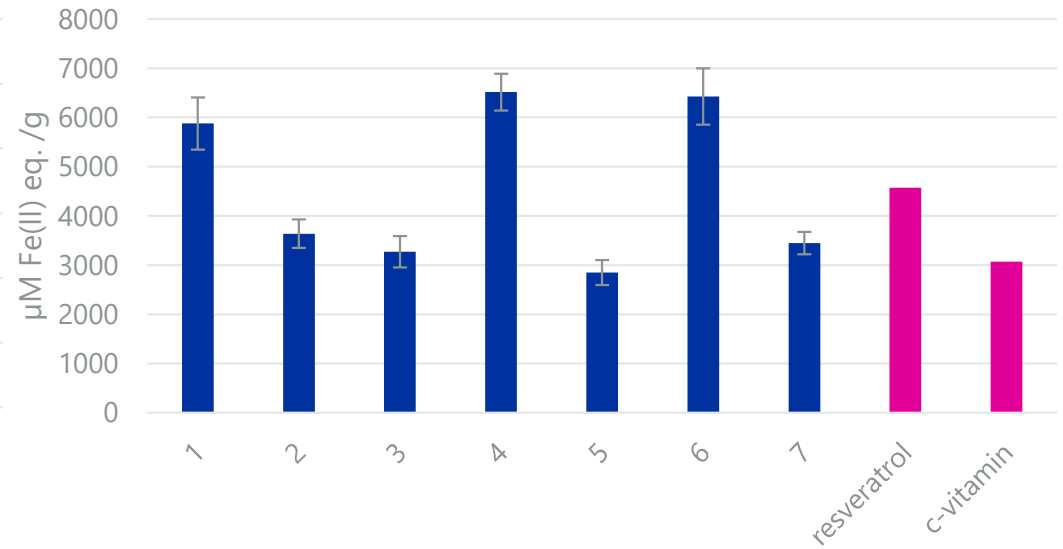
kuivapainot laskettu veden tiheyden avulla

Uutteiden kuiva-aineet IR		Näytteet						
	1	2	3	4	5	5		
			1	2	1	2	veden tiheys: 0.99823 g/cm3	
ka. %	0.609	1.455	1.799	0.496	1.09	0.497	1.318	998.23 g/L
g/L	6.079221	14.52425	17.95816	4.951221	10.88071	4.961203	13.15667	

ORAC



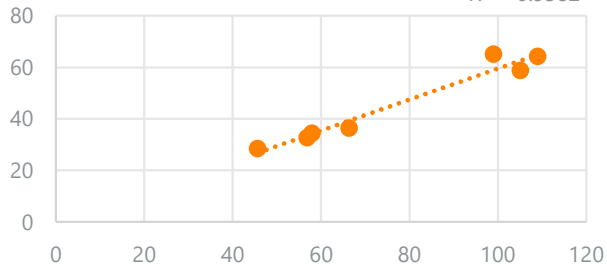
FRAP



ORAC/FRAP

$$y = 0.6012x - 0.6223$$

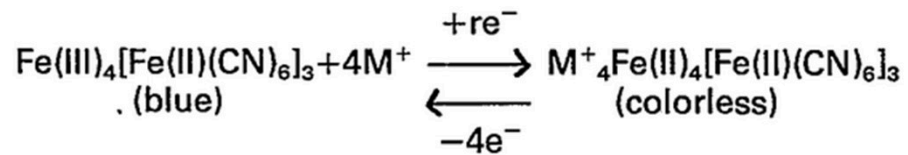
$$R^2 = 0.9582$$



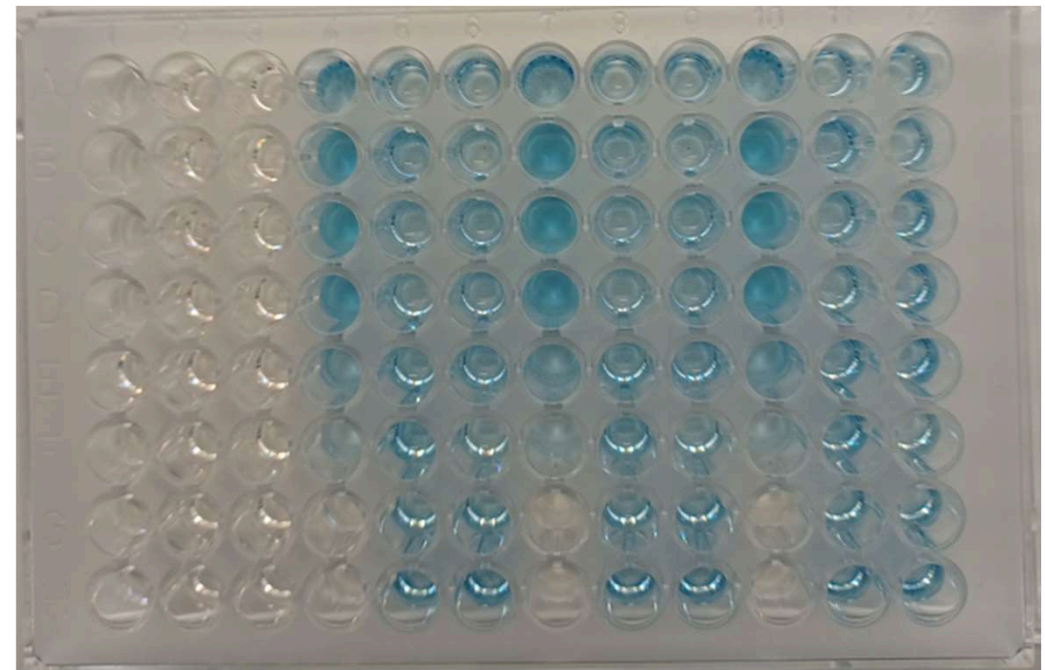
Käsittely	Suunnitelma		Toteuma	
	Lpt vaiheess	Lpt. Vaihees	Lpt vaiheess	Lpt. Vaiheessa
1	90	-	72	-
2	140	-	135	-
3	170	-	166	-
4	90	140	80	137
5	90	170	81	165

# Totaalifenolikapasiteetti

## Prussian blue



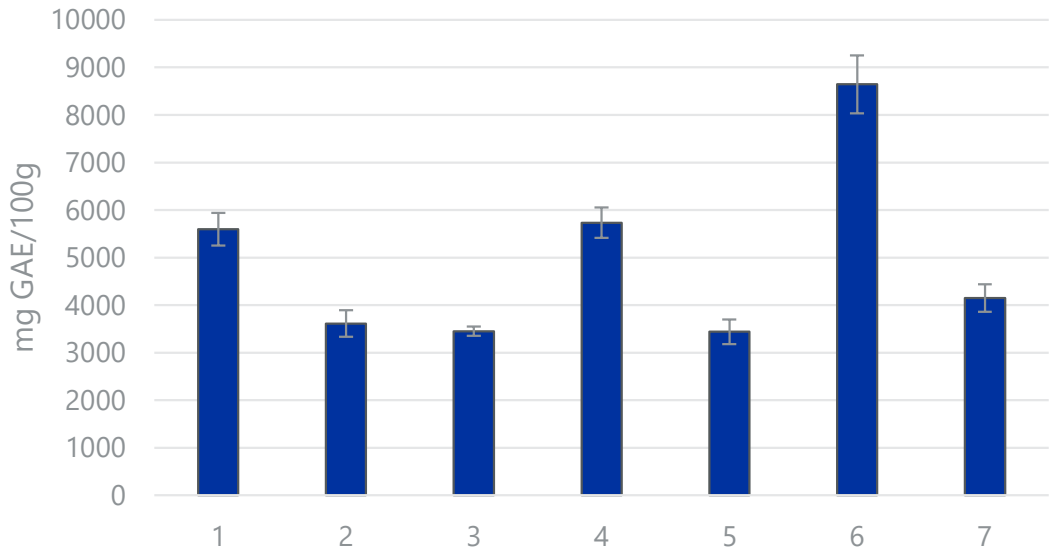
Perustuu fenolisten yhdisteiden  
kykyyn pelkistää kelatoituja  
metalli-ioneja



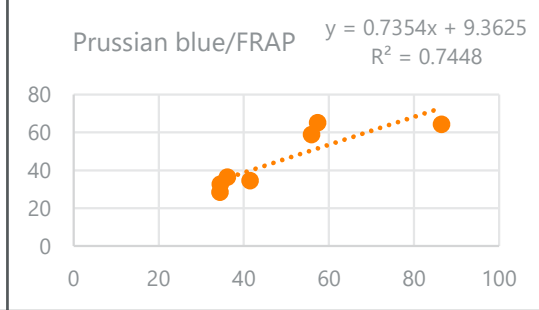
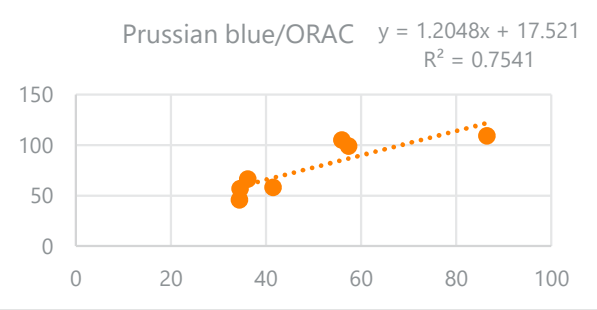
Graham, H. D. (1992). Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(5), 801-805.

# Tulokset – TPC (totaalifenolikapasiteetti)

TPC (Prussian blue/100g)



Vaihe	Lämpötila, °C	Aika, min	Paine, bar	Vaihe	Lämpötila, °C	Aika, min	Paine, bar
I	90	60	1	II	-	-	-
I	140	60	3,6	II	-	-	-
I	170	60	7,9	II	-	-	-
I	90	60	1	II	140	60	3,6
I	90	60	1	II	170	60	7,9



kuivapainot laskettu veden tiheyden avulla

Uutteiden kuiva-aineet IR								
Näytteet								veden tiheys: 0.99823 g/cm3
1	2	3	4_1	4_2	5_1	5_2		
ka. %	0.609	1.455	1.799	0.496	1.09	0.497	1.318	998.23 g/L
g/L	6.079221	14.52425	17.95816	4.951221	10.88071	4.961203	13.15667	

Käsittely	Suunnitelma		Toteuma	
	Lpt vaiheess	Lpt. Vaihees	Lpt vaiheess	Lpt. Vaiheessa
1	90	-	72	-
2	140	-	135	-
3	170	-	166	-
4	90	140	80	137
5	90	170	81	165

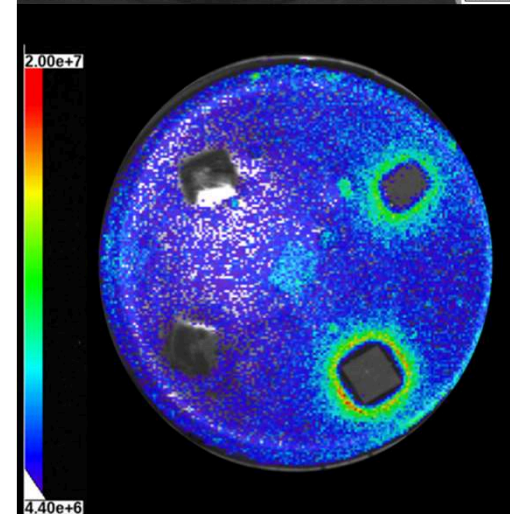
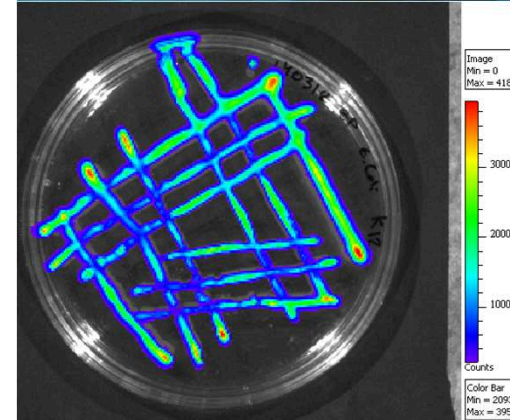


# Bakteeribiosensorit

*E. coli* K12+pcGLS11    *S. aureus* RN4220 + pAT19

Geneettisesti manipuloitu tuottamaan jatkuvaa luminesenssivalosignaalia, jota voidaan seurata luminometrilla. Antibakteeristen aineiden läsnäolo heikentää valosignaalia annosvasteisesti.

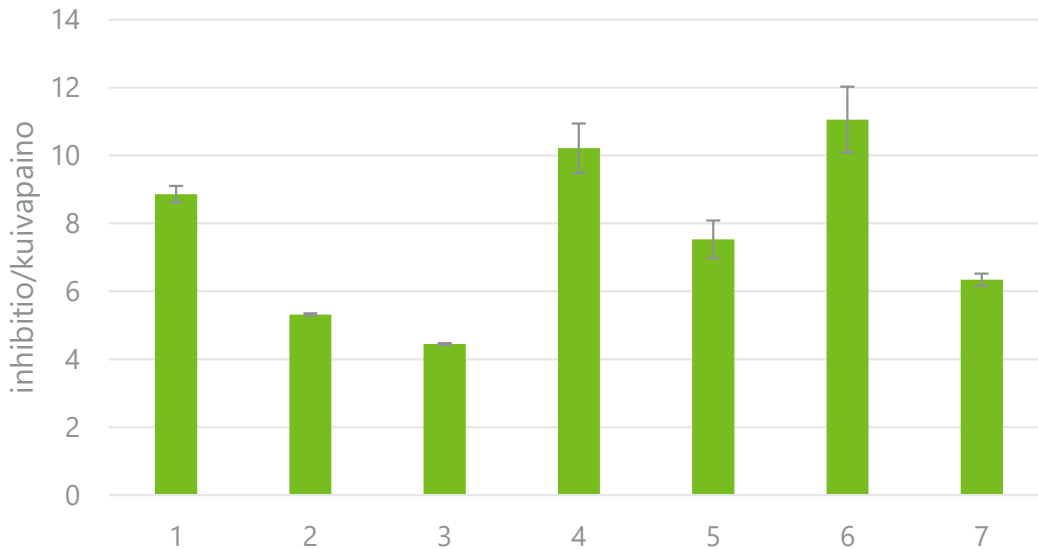
Kumpikin ensi kerran julkaistu: Vesterlund et al. (2004)



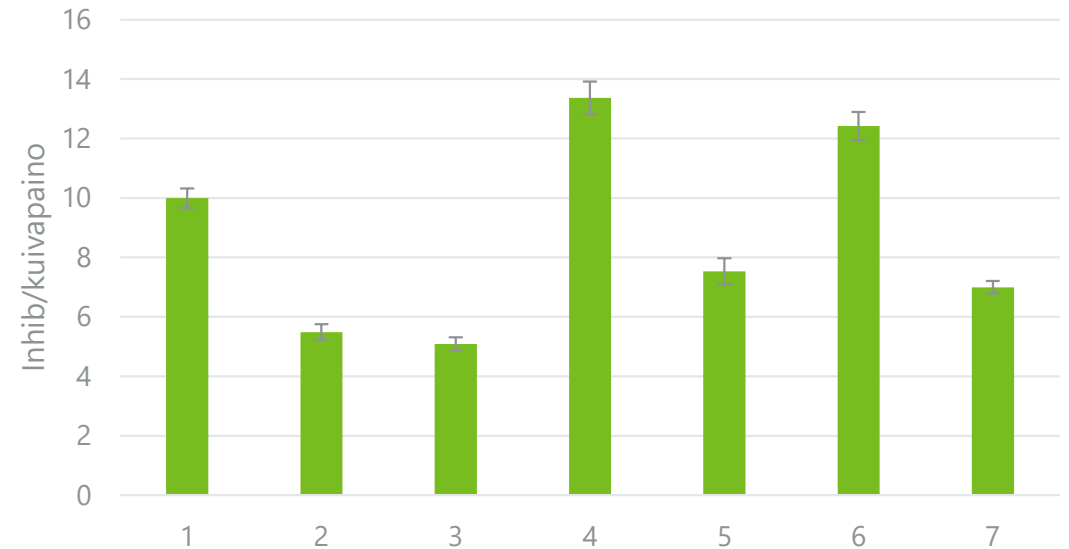
# Tulokset - bakteeribiosensorit

Käsittely	Suunnitelma		Toteuma	
	Lpt vaiheess	Lpt. Vaihees	Lpt vaiheess	Lpt. Vaiheessa
1	90	-	72	-
2	140	-	135	-
3	170	-	166	-
4	90	140	80	137
5	90	170	81	165

*E. coli* - inhibitio/kuivapaino (12,5%)



*S. aureus* - inhibitio/kuivapaino (12,5%)

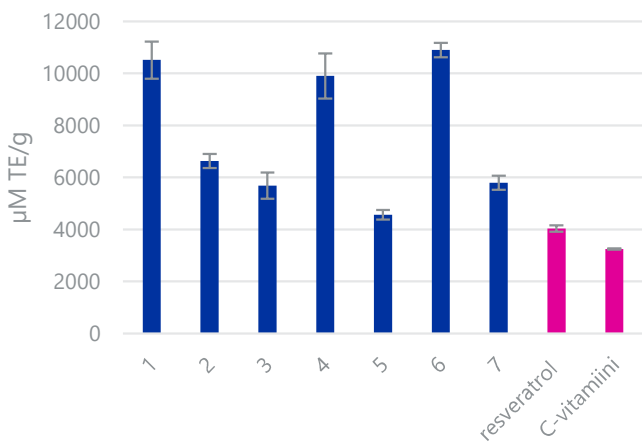


kuivapainot laskettu veden tiheyden avulla

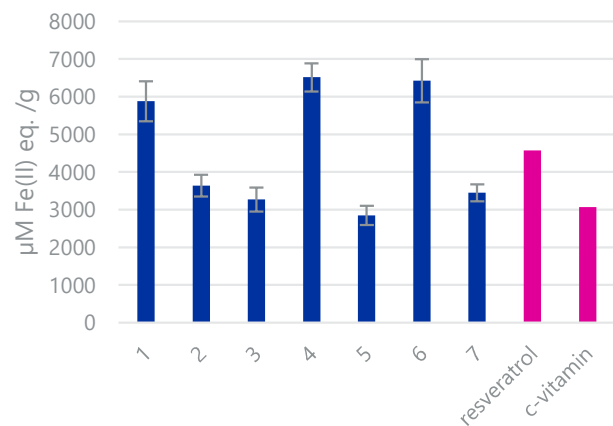
Uutteiden kuiva-aineet IR							
Näytteet							
	1	2	3	4	5	6	7
ka.%	0.609	1.455	1.799	0.496	1.09	0.497	1.318
g/L	6.079221	14.52425	17.95816	4.951221	10.88071	4.961203	13.15667

veden tiheys: 0.99823 g/cm<sup>3</sup>  
998.23 g/L

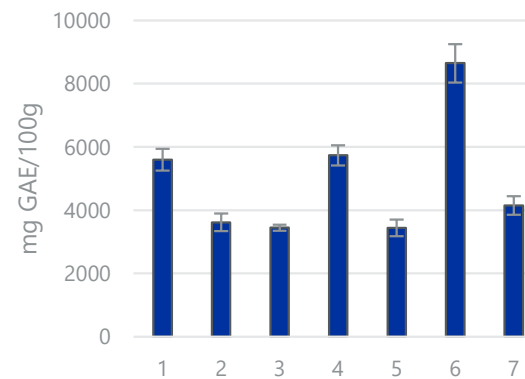
ORAC



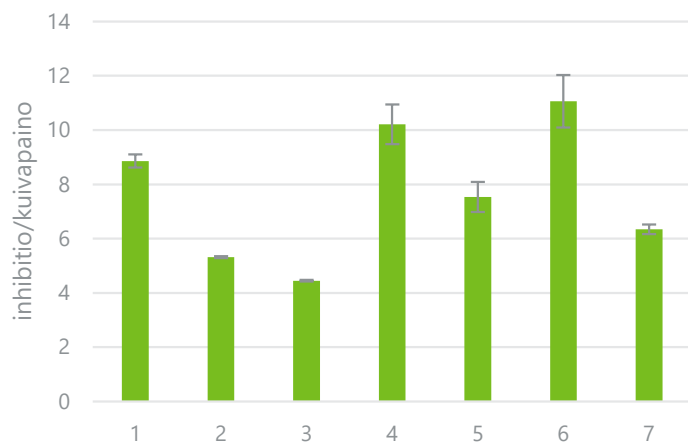
FRAP



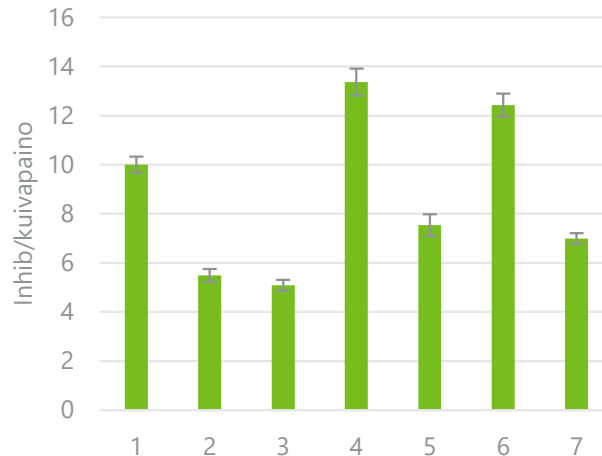
TPC (Prussian blue/100g)



*E. coli* inhibitio/kuivapaino



*S. aureus* - inhibitio/kuivapaino



Korrelaatiot:

	PB	ORAC	FRAP	E.coli	S.aureus
PB	1	0.868362	0.86304	0.866347	0.829387
ORAC		1	0.978889	0.808153	0.83526
FRAP			1	0.866103	0.916753
E.coli				1	0.971338
S.aureus					1

**Kiitos!**