

100

*Helena Hyvärinen*  
(toim.)

**Kasviperäiset biomolekyylit  
– fenoliset yhdisteet  
ja terpeenit**

**Kirjallisuuskatsaus**



*Helena Hyvärinen (toim.)*

---

# **Kasviperäiset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit**

**Kirjallisuuskatsaus**

---

**Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus**

ISBN 951-729-629-0 (Painettu)  
ISBN 951-729-630-4 (Verkkajulkaisu)  
ISSN 1239-0852 (Painettu)  
ISSN 1239-0844 (Verkkajulkaisu)  
<http://www.mtt.fi/asarja>

*Copyright*  
MTT  
Kirjoittajat

*Julkaisija*  
MTT, 31600 Jokioinen

*Jakelu ja myynti*  
MTT, Tietopalveluyksikkö, 31600 Jokioinen  
Puhelin (03) 4188 2327, telekopio (03) 4188 2339  
sähköposti [julkaisut@mtt.fi](mailto:julkaisut@mtt.fi)

*Painatus*  
Jyväskylän yliopistopaino 2001

Sisäsivujen painopaperille on myönnetty pohjoismainen Joutsenmerkki.  
Kansimateriaali on 75-prosenttisesti uusiokuitua.

## Tiivistelmä

*Avainsanat: kasvinviljely, kasvinsuojelu, biosynteesi, kemiallinen koostumus, torjuntamenetelmät, terveysvaikutukset, fenolit, analyysimenetelmät*

Tässä sarjassa on aiemmin julkaistu kasvien glukosinolaatteja käsittelevä kirjallisuuskatsaus. Tämä kirjallisuuskatsaus käsittelee fenolisia yhdisteitä ja terpeenejä.

Fenoliset yhdisteet ja terpeenit ovat kasvien sekundäärisiä aineenvaihduntatuotteita. Niiden esiintymiseen voidaan vaikuttaa viljelyteknisesti, lajikevalinnalla ja mahdollisesti hyödyntämällä kasvua luonnostaan hidastavia stressitekijöitä. Suomessa kasvua rajoittavat mm. ravinteiden niukkuus, viileyden ja valon yhteisvaikutus sekä kuivuus. Ratkaisevaa on myös korjata sato oikeassa kehitysvaiheessa ja valita runsaasti sekundääriaineita sisältäviä kasvinosia. On oleellista tuntea eri tekijöiden merkitys, kun pyritään sekundääriaineiden avulla erilaistamaan sadon käyttöä tai tuottamaan säilyvämpiä, maukkaampia ja terveellisempiä kasvituotteita.

Kasvien fytochemikaalien tuotantoa voidaan tehostaa ruiskuttamalla kasvustoon elisitoreja, jotka aktivoivat kasvin puolustusta. Lisääntynyt kasvien suoja-aineiden

tuotanto parantaa kasvien terveyttä. Samalla voi muodostua lisää myös ihmisen terveyttä edistäviä bioaktiivisia yhdisteitä.

Useimmat terpeeneihin kuuluvat yhdisteet karkottavat kasveissa kasvissyöjiä tai ehkäisevät syöntiä. Viljelyyn voidaan valita tuholaisia kestäviä lajikkeita ja vastaavasti houkutekaistoille tuholaisia houkuttelevia lajikkeita. Näiltä kaistoilta tuhohyönteiset voidaan torjua.

Fenoliset yhdisteet voivat vaikuttaa terveyteen monella tavalla. Ne saattavat mm. estää syöpää ja vähentää sydän- ja verisuonitautien riskiä. Lisäksi joidenkin fenolisten yhdisteiden on todettu estävän allergioita (anti-allergeenit) sekä virusten, bakteerien ja sienten lisääntymistä.

Erilaiset prosessoinnit, kuivaaminen ja säilyttäminen vaikuttavat fenolisten yhdisteiden ja terpeenien pitoisuuksiin elintarvikkeissa. Fenolisten yhdisteiden määrittämisessä käytetään neste- ja kaasukromatografiaa ja terpeenien määrittämisessä pääosin kaasukromatografiaa.

### Kuvien 3, 4 ja 5 lyhenteiden selitykset

AS:	antosyanidiini syntetaasi
CAD:	kanelihappo alkoholin dehydrogenaasi
CCOMT:	kahvihappo koentsyymi 3- <i>O</i> - metyyli transferaasi
CCR:	kanelihappo koentsyymi reduktaasi
C3H:	4-kumaraatti 3-hydroksylaasi
C4H:	kanelihappo 4-hydroksylaasi
CHI:	kalkoni isomeraasi
CHS:	kalkoni syntetaasi
4CL:	4-kumaryyli koentsyymi-A likaasi
COMT:	kahvihappo <i>O</i> -metyl transferaasi
DAHP syntase:	3-deoksi- <i>D</i> -arabino- heptulosonaatti-7-fosfaatti syntetaasi
DFR:	dihydroflavonoli 4-reduktaasi
F3H:	flavanoni 3-hydroksylaasi
F3'H:	flavonoli 3'hydroksylaasi
F3'5'H:	flavonoli 3'5'hydroksylaasi
F5H:	ferulaatti 5-hydroksylaasi
FLS:	flavonoli syntetaasi
FS:	flavoni syntetaasi
IFR:	isoflavoni reduktaasi
IFS:	isoflavoni syntetaasi
PAL:	fenyylialaniiniammoniumlyaasi
TAL:	tyrosiini ammonium lyaasi
UFGT:	UDP – glukoosi flavonoidi 3- <i>O</i> -glykosyyli transferaasi

# Sisällys

Tiivistelmä . . . . .	3
1 Yleistä fenolisista yhdisteistä. <i>Keskitalo, M., Hyvärinen, H. &amp; Pihlava, J.-M.</i> . . . . .	9
Kirjallisuus . . . . .	12
2 Fenolisten yhdisteiden biokemia ja esiintyminen. <i>Keskitalo, M.</i> . . . . .	14
2.1 Fenolisten yhdisteiden merkitys . . . . .	15
2.1.1 Kasvin kasvu ja kehitys . . . . .	15
2.1.2 Fenoliset yhdisteet ja kasvin stressi. . . . .	15
2.1.3 Kasvit ja ympäröivä ekosysteemi . . . . .	16
2.1.4 Fenoliset yhdisteet ihmisten ja eläinten ravinnossa . . . . .	16
2.2 Fenolisten yhdisteiden sijainti ja biosynteesi . . . . .	16
2.2.1 Sijainti kasvissa . . . . .	16
2.2.2 Sikimaatti- ja fenyylipropanoidisynteetit . . . . .	17
2.2.3 Flavonoidien biosynteesit . . . . .	18
2.2.4 Lignaani biosynteesi . . . . .	18
2.3 Ympäristötekijöiden vaikutus fenolisten yhdisteiden esiintymiseen . . . . .	20
2.3.1 Valo . . . . .	20
2.3.2 Valon voimakkuus. . . . .	21
2.3.3 Päivänpituus . . . . .	22
2.3.4 Fotosynteesistä aktiivinen säteily . . . . .	22
2.3.5 UV- säteily . . . . .	23
2.3.6 Lämpötila . . . . .	24
2.3.7 Ilmansaasteet. . . . .	25
2.3.8 Maaperän kuivuus ja suolaisuus . . . . .	25
2.3.9 Ravinteet . . . . .	25
2.3.10 Ulkoinen kemikaalikäsittely . . . . .	26
2.3.11 Kasvupaikka . . . . .	27
2.3.12 Vuosivaihtelut . . . . .	27
2.4 Geneettisten tekijöiden vaikutus fenolisten yhdisteiden esiintymiseen. . . . .	28
2.4.1 Kasvilaji . . . . .	28
2.4.2 Kasvilajike . . . . .	28
2.4.3 Kehitysvaihe . . . . .	29
2.4.4 Kasvinosa . . . . .	30
2.4.5 Satokomponentit . . . . .	30
Kirjallisuus . . . . .	31
3 Elisitorit kasvitautien torjunnassa. <i>Karjalainen, R.</i> . . . . .	40
3.1 Johdanto . . . . .	40
3.2 Biokemialliset puolustusreaktiot. . . . .	41
3.3 Elisitorit vaikuttavat biokemiallisiin metaboliareitteihin . . . . .	41
3.4 Käytännön torjuntamahdollisuudet . . . . .	42

Kirjallisuus . . . . .	43
4 Flavonoidien ja fenolisten happojen terveysvaikutukset. <i>Mattila, P. &amp; Kumpulainen, J.</i>	45
4.1 Johdanto . . . . .	45
4.2 Antioksidantit ja niiden rooli syövän ja sydän- ja verisuonitautien estossa . . . . .	46
4.3 Fenoliset yhdisteet antioksidanteina . . . . .	46
4.4 Flavonoidien ja fenolisten happojen saanti ja hyväksikäytettävyys. . . . .	47
4.5 Flavonoidien antimikrobiaaliset ominaisuudet . . . . .	48
4.6 Flavonoidien ja fenolisten happojen vaikutukset syövän estossa . . . . .	48
4.7 Flavonoidien ja fenolisten happojen vaikutukset sydän- ja verisuonitautien estossa . . . . .	49
4.8 Yhteenveto . . . . .	50
Kirjallisuus . . . . .	50
5 Lignaanien terveysvaikutuksia. <i>Hyvärinen, H. &amp; Taipale, M.</i> . . . . .	52
5.1 Johdanto . . . . .	52
5.2 Vaikutus syövän estossa . . . . .	54
5.3 Muut terveysvaikutukset . . . . .	55
Kirjallisuus . . . . .	56
6 Prosessointien vaikutus fenolisiin yhdisteisiin. <i>Hyvärinen, H.</i> . . . . .	59
6.1 Yleistä . . . . .	59
6.2 Entsymaattiset reaktiot ja värimuutokset . . . . .	60
6.3 Prosessointien vaikutus . . . . .	61
Kirjallisuus . . . . .	63
7 Fenolisten yhdisteiden analysointi. <i>Piblava, J.-M.</i> . . . . .	66
7.1 Johdanto . . . . .	66
7.2 Flavonoidit . . . . .	67
7.2.1 Rasvan poisto . . . . .	67
7.2.2 Uuttaminen ja hydrolysointi . . . . .	67
7.2.3 Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantitointi . . . . .	68
7.3 Fenoliset hapot ja fenolisten happojen johdannaiset . . . . .	68
7.3.1 Uuttaminen. . . . .	68
7.3.2 Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantitointi . . . . .	69
7.4 Lignaanit . . . . .	69
7.4.1 Uuttaminen ja hydrolysointi . . . . .	69
7.4.2 Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantitointi . . . . .	70
Kirjallisuus . . . . .	71



8 Yleistä terpeeneistä. <i>Keskitalo, M., Linnala, M., Holopainen, J. &amp; Hyvärinen, H.</i> . . . . .	74
Kirjallisuus . . . . .	75
9 Terpeenien biosynteesi ja esiintyminen. <i>Linnala, M., &amp; Keskitalo, M.</i> . . . . .	77
9.1 Terpeenien biosynteesi . . . . .	77
9.2 Terpeenien esiintyminen ja sijainti kasveissa . . . . .	79
9.3 Valon ja lämpötilan vaikutus terpeenien muodostukseen . . . . .	80
9.3.1 Valon voimakkuus . . . . .	80
9.3.2 Valon laatu . . . . .	81
9.3.3 Valojakson pituus . . . . .	81
9.3.4 Lämpötila . . . . .	82
9.4 Terpeenien modifiointi . . . . .	83
Kirjallisuus . . . . .	83
10 Terpeenien merkitys kasvien tuholaiskestävyydelle. <i>Holopainen, J.</i> . . . . .	87
10.1 Johdanto . . . . .	87
10.2 Monoterpeenit . . . . .	88
10.3 Seskviterpeenit . . . . .	88
10.4 Diterpeenit . . . . .	88
10.5 Triterpeenit . . . . .	88
10.6 Haihtuvat yhdisteet . . . . .	89
Kirjallisuus . . . . .	89
11 Prosessointien vaikutus terpeeneihin. <i>Hyvärinen, H.</i> . . . . .	91
11.1 Johdanto . . . . .	91
11.2 Kuivaaminen . . . . .	91
11.3 Prosessointi . . . . .	92
11.4 Säilytys . . . . .	93
Kirjallisuus . . . . .	94
12 Terpeenien analysointi. <i>Piiblava, J.-M.</i> . . . . .	95
12.1 Johdanto . . . . .	95
12.1.1 Yhdisteiden eristäminen . . . . .	95
12.1.2 Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantitointi . . . . .	96
Kirjallisuus . . . . .	96



# 1 Yleistä fenolisista yhdisteistä

Marjo Keskitalo<sup>1)</sup>, Helena Hyvärinen<sup>2)</sup> & Juha-Matti Pihlava<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinviljely ja biotekniikka, 31600 Jokioinen, [marjo.keskitalo@mtt.fi](mailto:marjo.keskitalo@mtt.fi)

<sup>2)</sup> MTT, Elintarvikkeiden tutkimus, Elintarvikekemian ja -tekniikka, 31600 Jokioinen, [helena.byvarinen@mtt.fi](mailto:helena.byvarinen@mtt.fi)

<sup>3)</sup> MTT, Elintarvikkeiden tutkimus, Kemian laboratorio, 31600 Jokioinen, [juba-matti.pihlava@mtt.fi](mailto:juba-matti.pihlava@mtt.fi)

Fenoliset yhdisteet käsittävät laajan ryhmän sekundäärisiä yhdisteitä. Niiden rakenteen tunnusomainen piirre on aromaattinen rengas, johon on liittynyt hydroksiryhmä (-OH). Vaikka fenoleita esiintyy eläimillä ja mikro-organismeilla, suurin osa tällä hetkellä tunnetuista yhdisteistä muodostuu ainoastaan kasveissa (Harborne 1980, Luckner 1990). Rakenteellisesti fenoliset yhdisteet voidaan jakaa useaan ryhmään (Taulukko 1), joista fenolisia happoja, fenyylipropanoideja, flavonoideja ja lignaaneja käsitellään tarkemmin tässä kirjallisuuskatsauksessa.

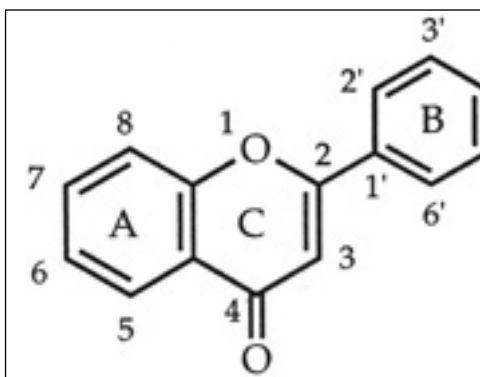
Fenolit esiintyvät kasveissa mono- tai dimeereinä tai fenolisina polymeereinä kuten ligniinit ja tanniinit. Vapaana esiintymisen lisäksi fenolit voivat olla liittyneinä lukuisiin muihin aineenvaihdunnan tuotteisiin kuten aminohappoihin, terpeeneihin ja proteiineihin. Koska fenolit osallistuvat vedyn sitomiseen, esiintyy fenoleita peptideissä ja entsyymeissä. Kemiallisesti fenolit ovat reaktiivisia, usein happamia ja vesiliukoisia. Toinen merkittävä ominaisuus on fenolien kyky sitoa metalleja, millä on vaikutusta yhdisteen biologiseen ominaisuuteen kasvilla. Kolmanneksi, kasveissa olevien nk. fenolaasientsyymien avulla mm. monofenolit hapetetaan helposti difenoleiksi, difenolit kinoneiksi ja edelleen polymeereiksi.

Yksinkertaisista fenoleista suurimman ryhmän muodostavat hydrokinonit, joita

esiintyy mm. ruusun sukuisissa (*Rosaceae*) ja kanervakasveissa (*Ericaceae*). Hydroksibentsoehapon johdannaiset, kuten *p*-hydroksibentsoe-, vanilliini-, protokateku- ja syringahappo esiintyvät pääasiassa glykosideina. Gallushappo esiintyy poikkeuksellisesti esteröityneenä kiniinihappoon, katekiineihin tai kondensoituneisiin tanniineihin (Herrmann 1989). Yleisimmät hydroksikanelihapon johdannaiset, kuten *p*-kumariini-, kahvi-, sinapiini- ja ferulihappo, eivät esiinny suurissa pitoisuuksissa vapaina vaan ovat useimmiten esteröityneenä kiniinihappoon tai glukoosiin. Esimerkiksi klorogeenihappo on kiniinihapon ja kahvihapon esteri. Hydroksikanelihapot voivat esteröityä myös mm. omena-, viini-, sikkimi- ja glukariinihapon kanssa. Fenoliset hapot, joihin kuuluvat hydroksibentsoe- ja hydroksikanelihapot, voivat esiintyä kasveissa konjugoituneina myös moniin muihin yhdisteisiin, kuten alkoholeihin, hydroksirasvahappoihin, terpeenialkoholeihin, steroleihin, triterpenoideihin, ligniiniin sekä fenolien ja sykloheksanolien glykosideihin. Luonnossa yleisesti esiintyvien *O*-asyloitujen flavonoidiglykosidien asyyliryhmä on pääasiassa *p*-kumariini- tai kahvihappo (Herrmann 1989).

Fenyylipropanoideilla aromaattinen fenolirengas on liittynyt hiiliketjuun (C<sub>3</sub>). Fenyylipropanoidien (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> yhdisteiden) lähtöaineena on *p*-kumariinihappo, jonka





**Kuva 1.** Flavonoidien yleinen rakennekaava.

hydroksylaatio ja syklistaatio johtaa hydroksikumariinin muodostumiseen. Kumariinit ovat hydroksikanelihapoista peräisin olevia laktoneja, jotka esiintyvät tuoreessa kasvis-  
sa. Solukon hajottua vapautuu kumariinille tyypillinen heinämäinen haju.

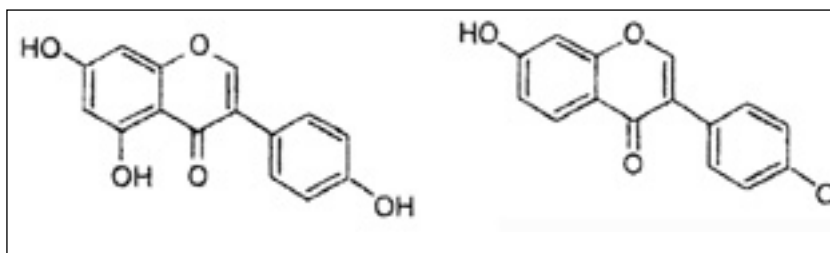
Flavonoideja on tunnistettu yli 4000. Flavonoidit voidaan jakaa ainakin kahteen-  
toista luokkaan molekyylin sisältämän pyranirenkaan hapettumisasteen mukaan (Cook & Samman 1996). Rakenteeltaan ne muodostuvat kahdesta aromaattisesta renkaasta (A ja B), joita yhdistää kolmihiiliatominen yksikkö (C). Flavonoidien yleinen rakennekaava on esitetty kuvassa 1, ja niiden biosynteesistä kerrotaan luvussa 2. Mikäli C-renkaassa ei ole OH-ryhmää, yhdisteet ovat 3-deoksiflavonoideja (flavanonit ja flavonit). Jos C-renkaassa on OH-ryhmä, yhdisteet ovat 3-hydroksiflavonoideja (flavonolit, antosyanidiinit ja flavanolit).

Isflavonoidit poikkeavat muista flavonoideista siten, että B-rengas on liittynyt

C-renkaan C3-hiileen eikä C2-hiileen. Eri-  
laisia isoflavonoideja on tunnistettu yli 800. Useimmat kasvit eivät pysty syntetisoimaan niitä, ja siksi niitä esiintyy vain tietyissä kasveissa. Isoflavonoidifytoestrogenit ovat heterosyklisiä fenoleita, joiden rakenne muistuttaa estrogeeniä. Ne ovat myös lignaanien tavoin difenolisia. Kuvassa 2 on esitetty isoflavonoideista genisteiinin ja daitseiinin rakennekaavat.

Flavonoidien biologiset ominaisuudet vaihtelevat vahvoista pigmenteistä (antosyanidiinit) värittömiin yhdisteisiin (flavanonit). Useimmat flavonoidit esiintyvät luonnossa vesiliukoisina glykosideinä, jolloin yhteen tai useampaan aglykoniosan hydroksyyliinryhmään on liittynyt sokeri, joka voi olla monosakkariidista tetrasakkariidiin. Yleisimmin sokerit ovat kiinnittyneet flavonoidiaglykonin 3, 5 tai 7 hiilen hydroksyyliinryhmään. Tyypillisimmät sokerit ovat glukoosi, galaktoosi, ramnoosi ja ksyloosi (Bravo 1998). Sokereihin O-glykosidisidoksella liittyneitä flavonoideja tunnetaan satoja. Eräät flavonit ovat sitoutuneet sokereihin myös C-glykosidisidoksella, kuten viteksiini ja orientiini. Sokerin hydroksyyliinryhmien asyloituminen alifaattisilla (esim. etikka-, omena-, ja sukkinihappo) tai aromaattisilla (esim. kumariini- ja kahvihappo) hapoilla lisää entisestään flavonoidiryhmän monimuotoisuutta.

Flavonoidit antavat kasveille väriä ja makua (ks. luku 6) ja toimivat antioksidanteina (ks. luku 2 ja 4). Ne suodattavat valoa ja suojaavat kasvia liialliselta UV-säteilyltä (ks. luku 2). Karvaan makunsa vuoksi ne suojelevat kasvia eläimiltä ja tuohyönteil-



**Kuva 2.** Genisteiinin ja daitseiinin rakennekaavat.

siltä. Antibioottisten ominaisuuksiensa vuoksi ne suojelevat kasveja viruksilta, bakteereilta ja sieniltä (ks. luku 3) (Hertog & Hollman 1996).

Kalkonit ja auronit esiintyvät usein keltaista väriä antavina pigmentteinä. Niitä tavataan mm. puiden sydänpuuosassa ja pallokokasvien siemenissä. Ksantonien esiintyminen on kasvikunnassa rajoittunut pääasiassa puuvartisiin kasveihin. Stilbeenit ovat ryhmä fenoleja, jotka vaikuttavat kasveissa usein kasvihormonien tavoin. Eräiden stilbeenien avulla säätelevän mm. abskisiinihapon (ABA) toimintaa. Useat luonnossa esiintyvät kinonit sisältävät myös fenoliryhmän, minkä takia ne luokitellaan kasvifenoleiksi. Eräät kinoneista kuten bentsokinonit ovat niin myrkyllisiä, ettei yhdistettä esiinny lainkaan elävissä soluissa. Toisen ryhmän muodostavat naftakinonit, joita esiintyy mm. puun sydänpuuosassa. Kasvisolukossa naftakinonit ovat värittämiä ja värjäytyvät vasta joutuessaan kosketuksiin happojen kanssa. Suurimman kinoniryhmän muodostavat trisykliset antakinonit, joista eräitä on käytetty mm. tekstiilien värjäyksessä.

Lignaani muodostuvat kahdesta fenyylipropanoidiysiköstä (ks. luku 2) sivuketjujen keskimmäisten hiilien muodostamien hiili-hiilisiidosten avulla. Lignaaneja esiintyy useissa kasveissa ja siemenissä sekä erityisesti havupuissa. Kiinnostusta lignaaneihin ovat lisänneet niiden fysiologiset vaikutukset, joista enemmän luvussa 5. Ligniini on kasvin soluseinien pääkomponentti, joka koostuu kasvista riippuen koniferyyli-, sina-

pyyli- tai *p*-kumaryylialkoholista. Ligniini esiintyy kolmiulotteisena heterogeenisenä makromolekyylinä kiinnittyneenä selluloosaan ja hemiselluloosaan kovalenttisin ja ei-kovalenttisin sidoksin.

Tanniinit poikkeavat edellä esitetyistä fenoleista suuren molekyyli­massansa ansiosta. Tanniinit ovat erittäin hydroksyloituneita yhdisteitä ja ne voivat muodostaa liukenemattomia komplekseja hiilhydraattien ja proteiinien kanssa. Kasvitanniinit voidaan jakaa hydrolysoituviin ja kondensoituneisiin tanniineihin. Hydrolysoituvat tanniinit koostuvat gallushaposta ja sen dimeerisestä kondensaatiotuotteesta, heksahydroksidifeenihaposta, esteröityneenä polyoliin, joka on pääasiassa glukoosia.

Kondensoituneet tanniinit eli proantosyanidiinit ovat ryhmä polyfenolisia yhdisteitä, jotka kemiallisesti ovat katekiinien oligomeerejä. Yleisimmät proantosyanidiinit ovat prosyaniidiinit, jotka koostuvat katekiinin, epikatekiinin ja niiden gallushapojen estereistä muodostamista ketjuista. Toinen yleinen ryhmä ovat prodelfinidiinit, jotka koostuvat vastaavasti gallo­katekiinista, epigallokatekiinista ja niiden johdannaisista (Bravo 1998, Lazarus et al. 1999).

Monet muihin aineenvaihduntaryhmiin kuuluvat molekyylit sisältävät bentseenirenkaan, minkä takia ne voidaan mieltää myös fenoleiksi. Fenoleille tyypillisiä rakenteita sisältävät esimerkiksi alkaloidit, isopreenit ja aromaattiset aminohapot (Harborne 1980, Luckner 1990).

## Kirjallisuus

---

**Bravo, L.** 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56: 317–333.

**Cook, N.C. & Samman, S.** 1996. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and di-

etary sources. *Nutritional Biochemistry* 7: 66–76.

**Harborne, J.B.** 1980. Plant Phenolics. In: Bell, E.A. & Charlwood, B.C. (eds.). *Secondary plant products, Encyclopedia of plant physiology*, Vol 8. Berlin: X Springer-Verlag. p. 329–432. ISBN 3-540-09461-X.

- Herrmann, K.** 1989. Occurance and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. Critical review in food science and nutrition. 28: 315–347.
- Hertog, M.G.L & Hollman, P.C.H.** 1996. Potential health effects of the dietary flavanol quercetin. European Journal of Clinical Nutrition 50: 63–71.
- Kühnau, J.** 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. In: Bourne, G.H. (ed.) World review of nutrition and dietetics vol 24. Basel: S. Karger AG. p. 117–191. ISBN 3-8055-2344-0.
- Lazarus, S.A., Adamson, G.E., Hammerstone J.F. & Schmitz, H.H.** 1999. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and bevarages. Journal of Agriculture and Food Chemistry 47: 3693–3701.
- Luckner, M.** 1990. Secondary metabolism in micro-organisms, plants and animals. 3rd rev. ed. Berlin: Springer-Verlag. 563 p. ISBN 3-540-50287-4.
- Okuda, T., Yoshida, T. & Hatano, T.** 2000. Correlation of oxidative transformations of hydrolysable tannins and plant evolution. Phytochemistry 55: 513–529.
- von Schantz, M. & Hiltunen, R.** 1990. Farmakognosia: rohdokset, luontaistuotteet ja mausteet, yleinen osa. 2nd ed. Helsinki: Yliopistopaino. 308 p. ISBN 951-570-062-0.

# 2 Fenolisten yhdisteiden biokemia ja esiintyminen

Marjo Keskitalo

*MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinviljely ja biotekniikka, 31600 Jokioinen,  
marjo.keskitalo@mtt.fi*

Fenoliset yhdisteet käsittävät laajan ryhmän pääasiassa kasveissa esiintyviä sekundääriaineita. Fenoleihin kuuluvia yhdisteitä esiintyy kaikissa kasveissa, vaikka pitoisuudet ja koostumukset vaihtelevatkin jopa kasvilajikkeiden välillä.

Fenolien merkitys kasvissa on moninainen. Niiden ansiosta kasvissa on puumainen tukiranka, jonka avulla solut pysyvät muodossaan ja kasvit pysyvät pystyssä. Kasvien pintasolukoissa fenolit suojaavat kasvia ulkoisilta uhkatekijöiltä, joita ovat mm. UV-säteily, kasvissyöjät, hyönteiset ja patogeenit. Fenolien avulla kasvi on myös vuorovaikutuksessa ympäröivään ekosysteemiin. Vuorovaikutus voi olla puolustusta, symbioosin aikaansaamista tai houkuttelua. Lisäksi fenolit toimivat kasvissa kasvihormonien tapaan ja ovat mukana kasvin muissa sisäisissä viestitapahtumissa.

Fenolien biosynteesi alkaa fenyylialaniini-aminohaposta, josta se jatkuu monimutkaisina ja -haaraisina reitteinä spesifisiin jatkobiosynteeseihin. Tuloksena on fenolisten happojen, flavonoidien ja lignaanien lisäksi tuhansia muita vähemmän tunnettuja yhdisteitä. Reitit käsittävät avainentsyymien PAL:n lisäksi jo kymmeniä tunnistettuja entsyymejä. Vaikka fenoleja tutkittu vilkkaasti jo useiden vuosien ajan, tiedetään esi-

merkiksi lignaanien biosynteesistä vielä varsin vähän.

Fenolien kuten muidenkin aineenvaihduntatuotteiden muodostukseen ja esiintymiseen vaikuttavat niin geneettiset kuin ympäristötekijätkin. Tässä kirjoituksessa käsitellään ympäristötekijöistä valoa, lämpötilaa, ilmansaasteita, maaperän ominaisuuksia, ravinteita, ulkoista kemikaalikäsittelyä, kasvupaikkaa ja vuosivaihteluita. Valo ja sen eri osatekijät sekä ravinteet ovat keskeisimpiä fenoleihin vaikuttavista ympäristötekijöistä. Geneettiset erot voivat olla suuria, vaikka toisaalta samoja yhdisteitä löydetään kaukaisistakin lajeista. Kasvin kehitysvaihe sekä hyödynnettävä kasvinosa ovat kenties lajien ja lajikkeiden eroakin merkittävämpiä tekijöitä.

Voimakkaat ympäristötekijät voivat häiritä kasvin kasvua ja kehitystä niin, että kasvi stressaantuu. Indusoituviksi fenoleiksi kutsutaankin niitä yhdisteitä, joita alkaa muodostua vasta stressistä kärsivässä kasvissa. Ympäristötekijöiden, viljelymenetelmien, lajikeominaisuuksien sekä myös stressin merkityksen tunteminen fenolien muodostumisessa onkin tärkeää, kun halutaan tuottaa entistä säilyvämpiä, maukkaampia ja terveellisempiä kasvikunnan tuotteita.

*Avainsanat: fenolit, yhdisteet, biosynteesi,  
kasvinviljely, ympäristötekijät*



## 2.1 Fenolisten yhdisteiden merkitys

### 2.1.1 Kasvin kasvu ja kehitys

Kasvin sekundäärisiä aineenvaihduntatuotteita on pitkään pidetty kasvin kasvun ja kehityksen kannalta merkityksettöminä. Viimeaikaiset tutkimukset kuitenkin osoittavat, että sekundääriaineet ovat mukana useissa tärkeissä kasvifysiologisissa ja biokemiallisissa toiminnoissa. Yhdisteiden merkitystä tutkittaessa käytetään usein mutantteja yksilöitä, jolloin voidaan verrata epänormaalisti ja normaalisti tuotettujen aineiden merkitystä kasvin kasvuun (Atanassova et al. 1997, Reuber et al. 1997, Tanaka et al. 1997).

Fenoliset yhdisteet kuten salisyylihappo toimivat signaaleina erilaisissa fysiologisissa ja kemiallisissa tapahtumissa (Lee et al. 1995). Eräillä flavonoideilla on kasvunsäädetyyppistä vaikutusta, sillä esimerkiksi kversetiini, apigeniini ja kemferoli estivät indolylietikkahappo-auksiinin kulkeutumista ja heikensivät siten solujen pituuskasvua (Jacobs & Rubery 1988). Fenoliset yhdistet ovat yleensäkin tärkeitä kasvien kukkimisen yhteydessä. Kukintaan indusoituminen (Quattrocchio et al. 1999) ja siitepölyn elävyys tarvitsevat fenoleita (Burbulis et al. 1996, Ylstra et al. 1996, Napoli et al. 1999). Soijapavulla valoreseptorien toiminnan havaittiin vaikuttavan sekä lehtien flavonoidien että ilmarakojen muodostukseen. Koska lehtien flavonoidipitoisuus ja ilmarakojen lukumäärä olivat käänteisesti riippuvaisia toisistaan, tekijät saattavat olla jollakin tavalla riippuvaisia toisistaan (Buttery et al. 1992, Liu-Gitz et al. 2000).

### 2.1.2 Fenoliset yhdisteet ja kasvin stressi

Fenolisia yhdisteitä muodostuu kasvin tavanomaisen kasvun ja kehittymisen yhteydessä. Silloin pitoisuudet ja koostumukset muuttuvat vähitellen. Yhtäkkisiä muutoksia kasvin sekundääriaineenvaihduntaan aiheuttavat erilaiset ärsykkeet, joihin kasvi reagoi yleensä lisäämällä tuotteiden muo-

dostusta (Lewis et al. 1995, Sainz et al. 1997). Tavanomaisen kasvun ja kehityksen yhteydessä muodostuvien sekundääriyhdisteiden synteesi on riippuvainen yhteyttämisestä ja yhteyttämistuotteiden saatavuudesta. Eräitä sekundääriaineita muodostuu vasta ärsykkeen seurauksena. Yleensä tälläinen ärsyke on seurausta jostakin stressitilasta, jota voivat aiheuttaa monet abioottiset ja bioottiset tekijät (Kurup et al. 1994, Haldimann 1998). Abioottisia tekijöitä ovat mm. valo, ilmansaasteet, lämpötila, kuivuus, suolaisuus, ravinteet ja mekaaninen vioitus. Bioottisia tekijöitä ovat sen sijaan patogeeneit, hyönteiset ja kasvisyöjät. Kasvin kasvuun ja kehitykseen liittyviä tekijöitä kutsutaan tässä yhteydessä myös bioottisiksi tekijöiksi. Yhdisteitä, joita muodostuu ärsykkeiden seurauksena, kutsutaan indusoituviksi (Dixon & Paiva 1995). Näistä molekyyleistä osa kuuluu fenyylipropanoidireitin metaboliatuotteisiin. Indusoituvat fenoliset yhdisteet ovat mukana kasvien antioksidanttiseksi puolustukseksi kutsutussa suojautumismekanismissa (Sairam et al. 1998, Shalata & Tal 1998). Tämä tarkoittaa, että stressitilanteessa kasvissa muodostuu vapaita happiradikaaleja kuten superoksidgeja, hydroksiradikaaleja, vetyperoksidgeja ja happimolekyyliä. Radikaalit voivat vioittaa solukalvoihin kiinnittyneitä lipidejä, proteiineja ja solussa olevaa DNA:ta. Puolustukseksi kasvit alkavat tuottaa antioksidantteja eli radikaalien hapetusvoimaa ehkäiseviä yhdisteitä (Shalata & Tal 1998). Jo nyt tunnetaan useita antioksidanttisia fenoleita, vaikka kaikkien sekundääriyhdisteiden merkitystä ei vielä tiedetäkään (Jagtap & Bhargava 1995). Esimerkiksi antosyaniinin arvellaan estävän omenan kuorisolujen hapettumista ja siten estävän omenan rupisuutta (Ju et al. 1996). Ero indusoituvan ja tavanomaisen kasvun yhteydessä muodostuvien sekundääriaineiden välillä ei kuitenkaan ole vielä selvä.

### 2.1.3 Kasvit ja ympäröivä ekosysteemi

Sekundääriaineet toimivat välittäjäaineina kasvien ja niitä ympäröivän ekosysteemin välillä. Fenolisten yhdisteiden merkityksestä erityisesti tautien mutta myös tuholaisien torjuntaan kerrotaan luvussa 3. Varsinaisen torjuntatarkoituksen lisäksi fenolit ovat mukana monissa viesti- ja vuorovaikutustehtävissä. Fenolit edesauttavat mm. kukkien pölytystä houkuttelemalla hyönteisiä. Sen lisäksi ainakin eräiden kasvien kohdalla fenolit mahdollistavat emikukinnon hedelmöityksen. Palkokasvit tuottavat juuristaan flavonoideja, jotka aktivoivat maaperässä elävien typpibakteerien kasvua ja niiden infektoitumista kasvin juuriin (Pueppke et al. 1998). Fenoliset yhdisteet houkuttelevat symbioosibakteereja ja indusoivat nystyröiden muodostumista sääteleviä geenejä (Coronado et al. 1995, Bandyopadhyay et al. 1996). Eräät isoflavonoidit, kuten soijapavun juurissa esiintyvä genistiini, ovat UV-säteilyä fluoresoivia (Grady et al. 1995). Näyttääkin siltä, että fenoleiden merkitys tulee esille kaikkialla siellä, missä kasvi kohtaa ympäröivän ekosysteemin joko ilmasta, maan pinnalta tai maan kautta.

### 2.1.4 Fenoliset yhdisteet ihmisten ja eläinten ravinnossa

Monet fenoliset yhdisteet ovat aiemmasta käsityksestä poiketen terveydelle edullisia. Kyky suojata soluja vahingoittavilta happiradikaaleilta on liitetty moniin fenoleihin, sillä osa solujen antioksidanteista kuuluu juuri niihin (Shalata & Tal 1998). Erityisesti flavonoidit ja kasvilignaani suojaavat kasvisolujen lisäksi myös nisäkässoluja hapettumiselta (Prasad 1997). Kasvilignaani kuten sekoisolarisiresinolit ovat nisäkäslignaaniensiesteitä, joita syntyy ruuansulatuskanavan mikrobien avulla (Axelson et al. 1982). Muihin aineryhmiin kuuluvia antioksidantteja ovat mm. askorbiinihappo ja glutationi sekä  $\alpha$ -tokoferolit ja karotenoidit

(Shalata & Tal 1998). Lääkekasvista (*Rhinocanthus nasutus*) peräisin olevan lignaani estää influenssavirus A:n kasvua (Kernan et al. 1997). Tattarin fagopyriini on potentiaalisia solujen jakaantumista estäviä yhdisteitä (Samel et al. 1996). Fenolisten yhdisteiden vaikutuksesta ihmisen terveyteen kerrotaan tarkemmin luvuissa 4 ja 5.

Ihmisen lisäksi kasvien sekundääriaineet saattavat vaikuttaa eläinten hyvinvointiin. Esimerkiksi siemenien sisältämät lignaanit aktivoivat eläimillä E-vitamiinia ja nostivat veren  $\alpha$ -tokoferolipitoisuutta. Vaikutus oli erityisen selvä, mikäli eläinten rehussa oli vähän  $\alpha$ -tokoferolia (Yamashita et al. 1995). Ravintokuidun käyttö kananrehussa on muuttanut kananmunien koostumusta. Munan keltuainen sisälsi enemmän monitydyttymättömiä rasvahappoja ja  $\alpha$ -linoleenihappoja, kun rehu sisälsi jauhettua pelavansiementä (Botsoglou et al. 1998).

## 2.2 Fenolisten yhdisteiden sijainti ja biosynteesi

Fenolisten yhdisteiden biosynteesi on mitä ilmeisimmin eniten tutkittu sekundääriainereitti kasveissa. Varhaisimmat tutkimukset käsittelivät kukkien väriin liittyvien antosyaniinipigmenttien muodostusta. Hyvin tutkitun reitin lisäksi myös entsyymien toimintaa ja säätelygeenejä tunnetaan jo pitkälle synteesireittien alajuoksuille. Perinteisen jalostuksen lisäksi geeninsiirtomenetelmää on jo vuosia käytetty tutkimuksissa, joissa on pyritty fenolisten yhdisteiden muokkaamiseen.

### 2.2.1 Sijainti kasvissa

Fenolisten yhdisteiden sijainti riippuu yhdisteen tehtävästä ja sen kemiallisesta luonteesta. Esimerkiksi metyylyryhmän liittyminen flavonoideihin muuttaa sen ominaisuutta vesiliukoisesta rasvaliukoiseksi. Molekyylit, joihin on liittynyt yksi metyylyryhmä ovat vesiliukoisia ja esiintyvät mm. so-

lun vakuoleissa. Esimerkiksi antosyaniinien tiedetään keräytyvän juuri solun vakuoleihin (Alfenito et al. 1998). Jos flavonoideihin on liittynyt kaksi metyyliiryhmää, esiintyvät molekyylit solun rasvaliukoisessa osassa solun sytoplasmassa tai lehden pinnalla olevassa vahakerroksessa (Harborne 1980).

Toinen tyypillinen fenolisten yhdisteiden sijaintipaikka on kasvien pinta ja sen läheisyydessä olevat solukot (epidermis) (Hirota et al. 1998). Hedelmäpuissa sekundaariaineet sijoittuvat nopeasti kasvaviin verson osiin, vaikka sijainti versossa voi vaihdella. Kirsikkapuissa fenoleita esiintyy sekä kaarnassa että johtosolukossa (Feucht 1994). Pintasolukoista käsin fenolit voivat suojata kasvia ulkoisilta uhkatekijöiltä. Kolmas tyypillinen sijaintikohta fenolisille yhdisteille on soluseinät, joissa ne lähinnä muodostavat fysikaalisen tukirangan kasville (Davin & Lewis 2000). Soluseinissä fenolisia yhdisteitä esiintyy tavallisesti sitoutuneena polysakkarideihin (Parr et al. 1997).

Koska fenolisten yhdisteiden biosynteesi tapahtuu solun solulimassa tai solulimakalvostossa, sijaitsevat keskeisimmät entsyymit samoissa kohdissa. Kasvista riippuen esimerkiksi fenyylialaniini ammoniumlyyaasi-entsyymejä (PAL) on tunnistettu juuri solulimasta tai mikrosomeista. Sytokromi P450-tyyppiset entsyymit sijaitsevat ilmeisesti solulimakalvostossa (Rasmussen & Dixon 1999).

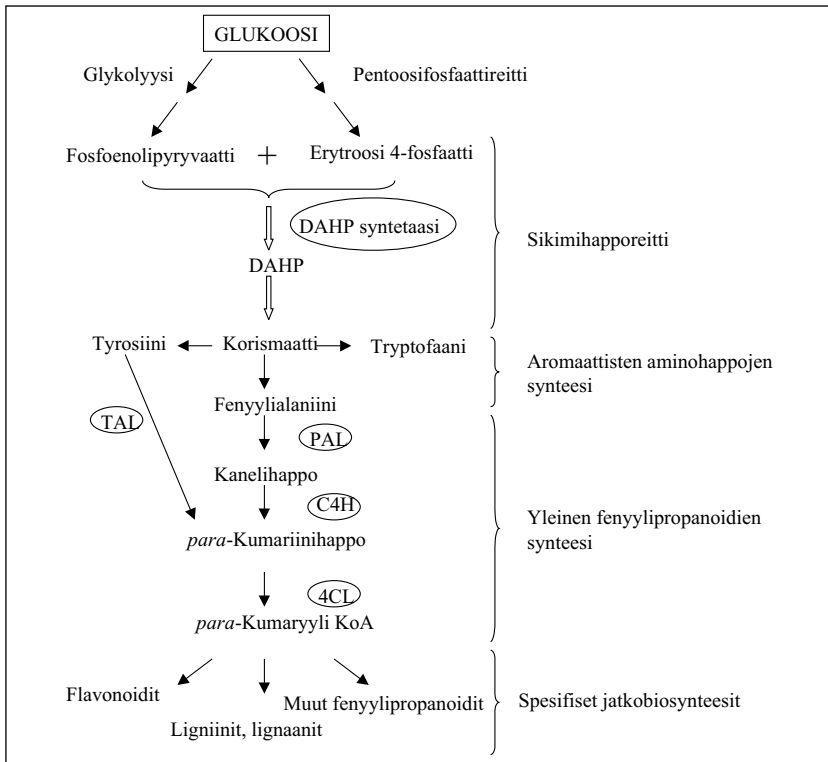
### 2.2.2 Sikimaatti- ja fenyylipropanoidisynteetit

Arviolta 20 % kasvien yhteyttämästä hiilihydraatista käytetään sikimaattisynteesiin mikä on edellytys fenolisten yhdisteiden muodostumiselle. Sikimaattisynteesin tuloksena fosfoenolpyryvaatista muodostuu eri vaiheiden kautta korismaattia, jota tarvitaan fenolisten yhdisteiden lähtöaineena käytettävän L-fenyylialaniinin ja aromaattisten aminohappojen muodostamiseen (Herrmann 1995). Koska korismaattia käytetään edelleen sekä primääriaineiden läh-

töaineina toimivien aminohappojen synteesiin että sekundaariaineiden muodostamiseen, sijaitsee se kahden suuren aineenvaihduntaryhmän haarakohdassa (Kuva 3).

Fenyylialaniinista lähtevä synteesi *p*-kumariinihappoon (hydroksikanelihappo) saakka kuuluu nk. yleiseen fenyylipropanoidisynteesiin. Synteesissä muodostettuja tuotteita käytetään edelleen lähtöaineena jatkobiosynteseissä. L-fenyylialaniinista muodostuu PAL-entsyymin (fenyylialaniini ammoniumlyyaasi) tuloksena *trans*-kanelihappoa. PAL on tärkeä säätelyentsyymi, joka ohjaa aminohapoista johdettujen lähtöaineiden saatavuutta ja vaikuttaa siis kaikkien fenolisten yhdisteiden muodostumiseen. *Trans*-kanelihaposta hydroksyloidaan *p*-kumariinihappoa sytokromi P450-tyyppisen entsyymin C4H (kanelihappo 4-hydroksylaasi) avulla (Rasmussen & Dixon 1999). Ilmeisesti PAL ja C4H entsyymit toimivat koordinoitusti siten, että välituotteiden synteesi ja kanavointi haluttuihin jatkobiosynteesireitteihin on tehokasta. Se varmistaa toivottujen lopputuotteiden muodostumisen (McMullen et al. 1998, Rasmusen & Dixon 1999) (Kuvat 3 ja 4).

*p*-Kumariinihaposta muodostetaan 4CL:n (4-hydroksikanelihappo: koentsyymi-A -ligaasi) välityksellä korkeaenerginen kumaryyli-koentsyymi-A. Kumariinihappo on lähtöaine soluseiniin sitoutuneille fenoleille, ligniinille, fenolisille estereille ja bentsoehapoille (Harborne 1980), vähintään 4000 flavonoidille, joista noin 300 on antosyaniineja (Phippen & Simon 1998), 1000 lignaanille (Obst 1998) sekä tuhansille muille fenolisille yhdisteille. Fenolisten yhdisteiden biosynteesiä on tutkittu viime vuosina erittäin paljon ja aiheesta on kirjoitettu lukuisia julkaisuja (esim. Cramer et al. 1989, Hahlbrock & Scheel 1989, Bate et al. 1994, Wanner et al. 1995, Fukasawa-Akaida et al. 1996, Weisshaar & Jenkins 1998, Rasmussen & Dixon 1999) (Kuva 4).



**Kuva 3.** Fenolisten yhdisteiden muodostumiseen liittyvät biosynteesit (Luckner 1990, Charrier et al. 1995, Dixon & Paiva 1995, Burbulis et al. 1996, Douglas 1996, Moyano et al. 1996, Parr & Bolwell 2000). Lyhenteiden selitykset kts. s. 4.

### 2.2.3 Flavonoidien biosynteesit

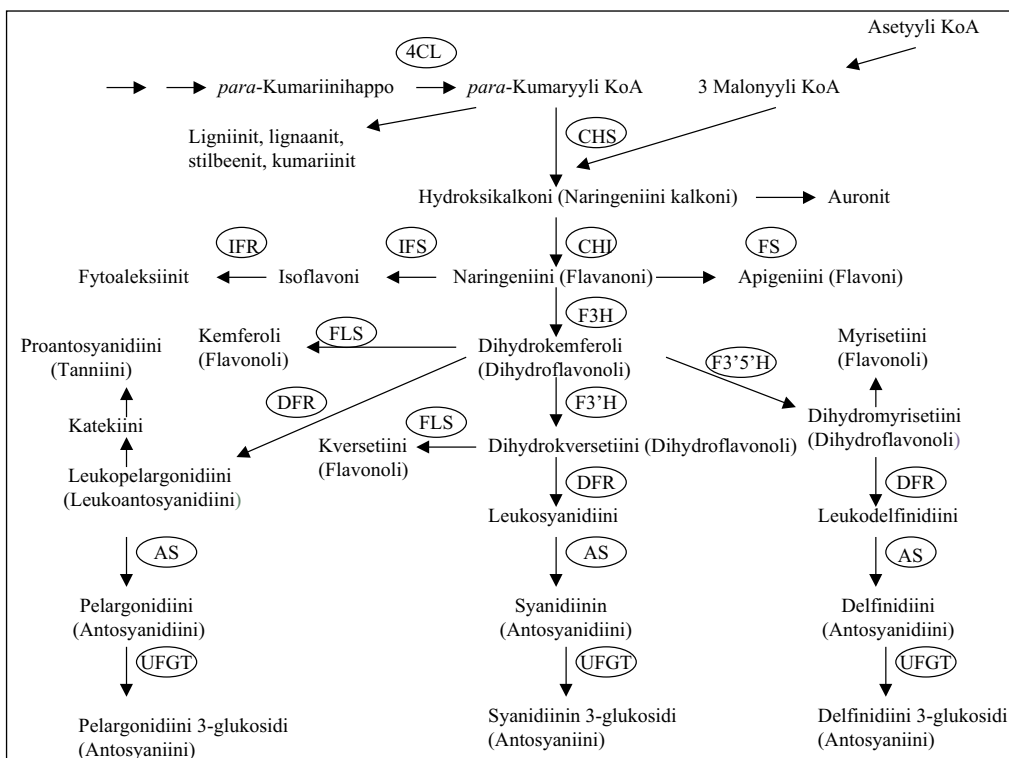
Flavonoidien ja niistä johdettujen antosyaniidien ja antosyaniinien muodostuksessa tärkeät entsyymit C4H:n jälkeen ovat CHS (kalkoni syntetaasi) (Hrazdina et al. 1986) ja CHI (kalkoni isomeraasi), joiden tuloksena kumaryyli-koentsyymi-A:sta ja malonyylikoentsyymi-A:sta muodostetaan esiasteet lukuisille C<sub>15</sub>-tyyppisille fenyylipropanoideille (Claudot et al. 1997). PAL:n ja C4H:n lisäksi CHS saattaa kuulua organisoituun ja tehokkaaseen välituotteiden kanavointiin. On todennäköistä, että monet flavonoidiyhdisteet syntyvät organisoitun multientsyymikompleksin tuloksena (Hrazdina et al. 1986).

Seuraavat merkittävät entsyymit antosyaniinibiosynteesissä ovat F3H (flavanoni 3'-hydroksylaasi) ja DFR (dihydrofla-

vonoli 4-reduktaasi). Nämä ovat mukana tuottamassa lukuisia flavonoideihin kuuluvia yhdisteitä (Charrier et al. 1995), joita ovat mm. auronit, flavanonit, flavonit, flavanonolit, flavonolit, flavan-3,4-diolit eli leukoantosyaniidiinit, flavan-3-olit eli katekiinit ja antosyaniidiinit (Obst 1998). Isoflavanonit muodostuvat flavanoneista IFS:n (isoflavoni syntetaasi) välityksellä (Carrier et al. 1995) (Kuva 4).

### 2.2.4 Lignaaniensynteesi

Pellavan ja rukiin lisäksi lignaaneja esiintyy lukuisissa muissa ruoho- ja puuvartisissa kasveissa kuten marjakuusessa (Das et al. 1995, Shen et al. 1997), douglas-kuusessa (Dellus et al. 1997), nokkosessa (Schöttner



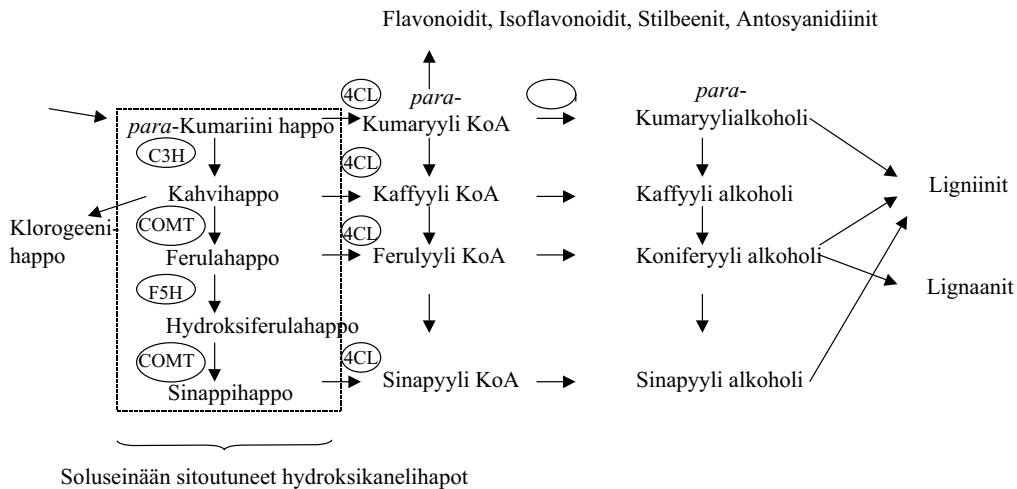
**Kuva 4.** Flavonoidi- ja antosyaniinisynteesien väli- ja lopputuotteet sekä synteesien avainentsyymit (Charrier et al. 1995, Dixon & Paiva 1995, Holton & Cornish 1995, Douglas 1996, Moyano et al. 1996, Tamagnone et al. 1998, Parr & Bolwell 2000). Entsyymien lyhenteet, kts. s. 4.

et al. 1997) ja rohtovirmajuudessa (Bodesheim & Hölzl 1997). Lignaaniin yleisyys osoittaa, että niillä on ollut tärkeä rooli kasvien puolustuksessa mm. antioksidanttisten ominaisuuksien ansiosta (Dinkova-Kostova et al. 1996). Lignaaniin biosynteesiä ei ole vielä täysin selvitetty, mutta se liittyy läheisesti kasvien puumaisen tukirangan eli ligniiniin synteesiin (Kuva 5). Lignaaniin ja ligniiniin lähtöaineina toimivat nk. monolignolit eli *p*-kumaryyli, koniferyyli tai sinapyyli alkoholi, mutta näiden jakautuminen ligniiniin ja lignaaniin synteesiin on erilainen. Lignaaniin esiintyvät tavallisesti monolignolien dimeereinä kun taas ligniinit ovat polymeerejä. Lignaaniin esiintyvät usein sokereihin liittyneinä, esimerkiksi pellavan sekoiisolarisiresinolidi-glukosidi (Axelson et al. 1982).

Lignaaniin biosynteesi erkanelee ligniiniin vaiheessa, jossa *p*-kumariinihapon

(hydroksikanelihappo) alkoholimuotoja esiintyy. Lignaaniin muodostetaan ilmeisesti pelkästään koniferyylialkoholista, kun taas ligniiniin käytetään myös muita kumariinihappojen alkoholimuotoja. Kuva 6 havainnollistaa lignaaniin ja lignaaniin alaryhmien muodostumista. On kuitenkin mahdollista, että kasveissa esiintyvien lignaaniin biosynteesissä on eroja (Umezawa et al. 1997, Davin & Lewis 2000), ja niitä muodostuu ilmeisesti myös muuta kuin fenyylipropanoidireitin kautta (Miyachi & Ozawa 1998).

Lignaaniin biosynteesin entsyymaattinen toiminta on vielä huonosti tunnettu. Yksi harvoista tähän mennessä tunnistetuista entsyymeistä liittyy lähtöaineena toimivat kaksi koniferyylialkoholia  $\beta$ - $\beta$ -sidoksella toisiinsa (Davin et al. 1992), jolloin muodostuu (+)-pinosinioli (Davin et al. 1992, Umezawa & Shimada 1996, Ghisalberti



1997, Kato et al. 1998). Kaksi lignaanisyn-  
teesiin kuuluvaa isoformista entsyymiä,  
(+)-pinoresinoli/(+)-larisiresinoli reduk-  
taasi, muuttavat pinoresinolin larisiresino-  
liksi. Entsyymi sijaitsee siten lignaanisyn-  
teesin tärkeässä haarakohdassa mahdollis-  
taen välituotteiden muodostumisen pinore-  
sinolista eteenpäin (Dinkova-Kostova et  
al. 1996).

## 2.3 Ympäristökijöiden vaikutus fenolisten yhdisteiden esiintymiseen

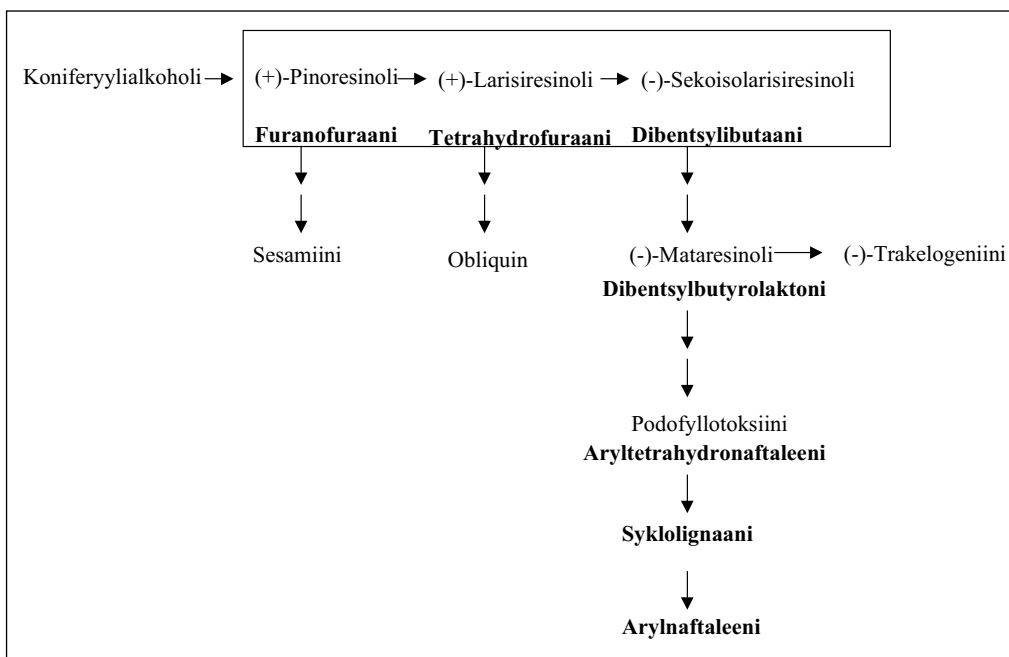
### 2.3.1 Valo

Valo on edellytys normaalille kasvin kasvul-  
le. Ensiksikin se antaa energiaa yhteyttämi-  
seen ja toiseksi valo tuo kasvua sääteleviä  
signaaleja ympäristöstä. Näiden seuraukse-  
na kasvilla voi tapahtua fysiologiaa tai ke-  
miallisia muutoksia. Valo käsitteenä on  
useiden tekijöiden summa, joista ainakin  
valon voimakkuus (intensiteetti), jaksoi-  
suus (päivänpituus) ja laatu vaikuttavat fe-  
nolisten yhdisteiden muodostumiseen.

Maan pinnalle saapuva auringonsäteily  
koostuu säteilystä, josta vain osa on näkyvää

valoa. Näkyvän eli kasveille käyttökelpoi-  
sen valon aallonpituusalue on 400–700 nm.  
Tämän yhteyttämiskelpoisen säteilyn (PAR  
photosynthetic active radiation) lisäksi au-  
ringonsäteily sisältää näkymätöntä ultra-  
violettisäteilyä (UV-A ja UV-B), jonka aa-  
llonpituusalue on 280–400 nm. Kasvi reagoi  
valoon nk. valoreseptorien kautta, joita  
tunnetaan useita: punaista (600–700 nm) ja  
kaukopunaista (700–900 nm), sinistä  
(390–500 nm) sekä ultravioletti-A:ta  
(UV-A, 320–400 nm) ja ultravioletti-B:tä  
(UV-B, 280–320 nm) absorboivat resepto-  
rit (Thompson & White 1991, Chory et al.  
1996). Valoreseptorit välittävät valosta saa-  
mansa ärsykkeen edelleen geeneille, joista  
jo lukuisien tiedetään reagoivan valoon  
(Thompson & White 1991, Adamska 1997,  
Kloppstech 1997).

Valo vaikuttaa kasvin biokemiallisiin ja  
fysiologisiin prosesseihin tavallisesti yhdes-  
sä muiden tekijöiden kanssa. Näitä ovat  
mm. kuivuus (Bartels et al. 1992), ravinteiden  
saatavuus (Tan 1980, Deckmyn &  
Impens 1997), lämpötila (Haldimann et al.  
1995, Janda et al. 1996, Kloppstech 1997,  
Haldimann 1998, Król et al. 1999) ja pato-  
geenit (Logemann et al. 1995, Ju et al.  
1996, Weiergang et al. 1996).



**Kuva 6.** Lignaaniin ja lignaanien alaryhmien mahdolliset biosynteesireitit koniferyylialkoholista lähtien. Kuvaus perustuu onnenpensaan (*Forsythia*) sukuisten kasvien lignaanien muodostumiseen (Dinkova-Kostova et al. 1996, Ghisalberti 1997, Katayama et al. 1997, Umezawa et al. 1997).

### 2.3.2 Valon voimakkuus

Korkea valon voimakkuus saattaa aiheuttaa valostressiä, jolloin valoa on enemmän kuin mitä fotosynteesi pystyy hyödyntämään. Valostressi voi olla merkittävän voimakas, mikäli siihen yhdistyy hyvin matala tai korkea lämpötila (Kloppstech 1997, Król et al. 1999). Valostressissä fotosynteesitehokkuus laskee ja seuraa fotoinhibitio, jolloin muodostuu stressille tyypillisiä happiradiikaaleja (Demmig-Adams & Adams 1992). Tapahtuma voisi olla varsin tuhoisa ilman kasvin omia suojamekanismeja (Adamska 1997), joista yksi on fenolisten antioksidanttien muodostuminen. Antosyaniiniin olivat ensimmäisiä sekundääriaineita, joiden muodostumisessa valon havaittiin olevan oleellinen tekijä (Mancinelli 1985, Rabino & Mancinelli 1986). Valo vaikuttaa myös muiden fenolisten yhdisteiden muodostumiseen erityisten valoreseptorien kautta (Mancinelli 1985), joiden toiminta

on yhteydessä fenyylipropanoidireitin geenin toimintaan (Thompson & White 1991). Kasvit, jotka kasvavat mm. merenrannoilla ja vuoristossa, altistuvat voimakkaaseen valoon. Valon voimakkuus vaikutti antosyaniinipigmenttien (Ben-Tal & King 1997) sekä liukoisten fenolien (Pfeffer et al. 1998) synteesiin. Antosyaniinien määrä lisääntyi, kun kasvatusvalon voimakkuutta lisättiin aina  $550 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  saakka (Ben-Tal & King 1997). Liukoisia fenoleita muodostui yli kaksi kertaa enemmän voimakkaassa valossa kuin himmeämmässä (Pfeffer et al. 1998). Mikäli valostressi jatkuu pitkään, heikkenee primääristen yhteyttämistuotteiden muodostus. Se voi epäsuorasti vaikuttaa myös sekundääriaineisiin.

Kasvin valon saanti ylipäätään vaikuttaa antosyaniinien muodostukseen. Sinapilla antosyaniinipitoisuudet olivat korkeimmillaan jo muutaman tunnin kuluttua kun taas perunalla pitoisuudet olivat huipussaan vasta muutamien vuorokausien kuluttua valo-

käsittelyn alkamisesta. Antosyaniinien muodostumisen edellytys on PAL. Sen aktiivisuus oli korkeimmillaan jo vajaan vuorokauden kuluttua valokäsittelyn alkamisesta (Beggs et al. 1987, Lewis et al. 1998a). Sen sijaan muiden fenolisynteesiin liittyvien ja koordinoitusti toimivien entsyymien (CHS:n, CHI:n ja DHR:n) (Tunen et al. 1988, Lewis et al. 1998a) aktivoitumiseen kului yhdestä kahteen viikkoa (Lewis et al. 1998a). Lopputuotteiden muodostumisen ja biosynteesin avainentsyymien aktiivisuuksilla onkin yleensä havaittu olevan yhteyttä (Beggs et al. 1987, Lewis et al. 1998a). Aikaisemmasta käsityksestä poiketen valo ei aina ole oleellinen kaikkien fenolisten yhdisteiden muodostumiselle, sillä osa synteesiin kuuluvien geeniperheiden jäsenistä toimii valosta riippumattomina (Weiergang et al. 1996, Kubasek et al. 1998).

Varjostus vähentää yhteyttämiskelpoisen valon saatavuutta ja hidastaa yhteyttämistä. Se vaikuttaa myös suoraan fenyylipropanoidisynteesiin. Esimerkiksi soijapapulinjat reagoivat eri tavalla varjostukseen tuottamalla eri määriä flavonoideja (kemferoli triglukosidi). Yleensä varjostus vähentää flavonoidipitoisuuksia (Buttery et al. 1992).

### 2.3.3 Päivänpituus

Kasvit reagoivat eri tavoin päivänpituuteen (Kloppstech 1997). Päivänpituuden merkitystä fenolisten yhdisteiden muodostumiseen on selvitetty varsin vähän. Tattarilla tehdyissä kasvatuskäppikokeissa päivänpituus (12 tuntia ja 19 tuntia) ja lämpötila (18 °C päivä/ 12 °C yö ja 24,5 °C päivä/ 18 °C yö) vaikuttivat tuoremassan ja rutiinin muodostumiseen. Rutiinipitoisuus ja rutiinisato muodostuivat pitkässä päivässä jopa kaksinkertaiseksi lyhyeen päivään verrattuna molemmissa lämpötilajaksoissa. Rutiinipitoisuus ja rutiinisato olivat kuitenkin aina suuremmat lämpimissä oloissa kasvaneilla kasveilla verrattuna viileässä kasvatettuihin molemmissa päivänpituuksissa

(Schneider et al. 1996). Myös japanilaisessa tutkimuksessa pitkä päivä tuotti tattarin siemeniin kaksinkertaisen rutiinipitoisuuden lyhyeen päivään verrattuna. Lyhyessä päivässä kasvatettuna tattarilajikkeiden erot rutiinipitoisuuksissa olivat pienimmät. Rutiinipitoisuus, kukintakauden pituus sekä aikaisten lajikkeiden sadon määrä olivat positiivisesti riippuvaisia toisistaan (Ohsawa & Tsutsumi 1995).

### 2.3.4 Fotosynteettisesti aktiivinen säteily

Fotosynteettisesti aktiivinen säteily (PAR) on näkyvää valoa (400–700 nm), jota kasvit käyttävät yhteyttämiseen tarvittavan energian lähteenä. Näkyvä valo muodostuu mm. valkoisesta, sinisestä ja punaisesta valosta, joille on kasveissa omat valoreseptorit. Valon värit vaikuttavat eri tavalla fenolisten yhdisteiden synteesiin (Feinbaum et al. 1991). Esimerkiksi punaista valoa absorboiva fytochromireseptori indusoi *CHS*-geenin toimintaa kun taas sinistä valoa absorboivan reseptorin toiminta estii *CHS*-geenin aktivoitumisen (Schäfer et al. 1997). Tuloksenä muodostuu erilaisia yhdisteitä valon laadusta riippuen, vaikka yhdisteiden synteesiä säätelevät samat geenit ja entsyymit (Shichijo et al. 1993).

Valkoinen valo lisäsi diferulahappoa, ferulahappoa ja kumariinihappoa nuorena maississa. Se johtui ilmeisesti PAL-entsyymin aktivoitumisesta. Sen sijaan tyrosiini-ammoniumlyyaasi eli TAL aktivoitui vain vähän samoissa oloissa eikä aktivoituminen lisännyt fenyylipropanoidien muodostumista (Parvez et al. 1997). Valkoinen valo lisäsi antosyaniinin muodostumista erityisesti maissin siemenen kuorella (Procissi et al. 1997).

Sininen valo lisäsi synteesin lopputuotteiden kuten antosyaniinin määrää maissin taimilla (Feinbaum et al. 1991). Maissilla tuotteita muodostavat entsyymit (PAL, CHS, CHI ja DFR) aktivoituivat sinisessä valossa jo muutaman tunnin kasvatuksen jälkeen, kun taimia oli aluksi kasvatettu pimeässä kolme vuorokautta. Poikkeuksena



oli PAL, joka aktivoitui taimissa heti siniseen valoon siirtämisen jälkeen (Kubasek et al. 1998). Lituroidulla CHS-entsyymin aktiivisuus lähti laskuun vasta 16 tunnin kulluttua valoimpulssikäsittelystä (Feinbaum et al. 1991). Soijapavulla vähäinen sinisen valon lisäys nosti flavonoidien kerääntymistä, kun kokonais-PAR-säteily pysyi vakiona. Mielenkiintoisena yksityiskohtana havaittiin, että soijapavun ilmarakojen muodostuminen estyi sinisessä valossa vain, jos linja sisälsi flavonoideja. Ilmarakojen muutoksia ei havaittu, jos linja ei tuottanut flavonoideja (Liu-Gitz et al. 2000).

Punainen valo lisäsi fenyylipropanoidireitiltä muodostuvien tuotteiden määrää. Sinapin antosyaniinien muodostuminen lisääntyi voimakkaasti jatkuvassa ja jaksotaisessa punaisessa valossa, mutta kversetiinin muodostuminen lisääntyi vain jatkuvassa punaisessa valossa (Beggs et al. 1987). Antosyaniinin muodostuminen punaisessa valossa kasvatettuna riippui kasvatuslämpötilasta, sillä antosyaniinia muodostui enemmän lämpimässä (24 °C) kuin viileässä (14 °C) (Rabino & Mancinelli 1986). Punainen valo yhdistettynä lämpötilamuutoksiin suosi antosyaniinien muodostusta, sillä tasaaisessa lämpötilassa yhdisteiden määrä ei lisääntynyt. Kun durran taimia pidettiin vuorokausi viileässä (12–20 °C) ennen niiden siirtämistä punaiseen valoon, lisäsi viileäkäsittely entisestään antosyaniinin muodostumista. Indusoituminen oli sitä tehokkaampaa, mitä pidempi viileäkäsittely oli ja mitä nopeammin käsittelyn jälkeen kasvit siirrettiin punaiseen valoon (Shichijo et al. 1993).

### 2.3.5 UV-säteily

Ultraviolettisäteilyä (UV-A 320–400 nm; UV-B, 280–320 nm) saapuu maan pinnalle normaalin auringonsäteilyn yhteydessä, vaikka suurin osa heijastuu ilmakehän otsonikerroksen ansiosta takaisin avaruuteen. Auringonvalon mukana tulevan UV-säteilyn lisäksi on olemassa UV-C (aallonpituus < 280 nm) säteilyä, jota on mah-

dollista tuottaa ainoastaan keinotekoisesti lamppujen avulla. Ilmakehän saastumisen takia otsonikerroksessa olevien aukkojen on ennustettu lähitulevaisuudessa suurenevan. Silloin maahan pääsevän UV-säteilyn määrä kasvaa. UV-säteilyn lisääntyminen voi aiheuttaa hyvin erilaisia ja radikaalejakin muutoksia luonnon elinkierto. Eräs UV-säteilystä johtuva vaikutus voi olla kasvisolujen oksidatiivista stressiä aiheuttavien happiradikaalien lisääntyminen (Yu et al. 1998). Ne voivat vioittaa solukalvoja, jolloin myös solun sisältämä DNA on vaarassa vioituksille. DNA:n vioittuminen voi edelleen johtaa mutaatioihin, joista ainakin osa on organismille tuhoisia (Mazza et al. 1999). Kasvit ovat kuitenkin kehittäneet mekanismin, joka suojaa soluja ainakin nykyistä UV-säteilymäärää vastaan. Suojavista antioksidanteista osa on fenoleita (Stapleton & Walbot 1994, Dawar et al. 1998, Mazza et al. 1999). Kasvien pintasolukko absorboi tällä hetkellä 90–99 % auringonvalon mukana tulevasta UV-säteilystä, josta osa suodattuu juuri fenolisten yhdisteiden ansiosta (Reuber et al. 1996a).

Signaalijärjestelmiä, jotka lisäävät flavonoidien määrää, on tutkittu viime aikoina vilkkaasti. Monet tutkimukset osoittavat, että UV-B vaikuttaa kasveihin enemmän kuin UV-A. Runsas UV-B säteily mm. heikentää kasvien kasvua ja lisää fenolisten yhdisteiden muodostumista (Krizek et al. 1998). Säteilystä johtuvissa signaalijärjestelmissä on myös muita eroja (Shichijo et al. 1993, Reddy et al. 1994, Christie & Jenkins 1996). Esimerkiksi sinapin flavonoidien muodostuminen estyi UV-B-säteilyn takia, vaikka muodostuminen oli aluksi lähtenyt käyntiin kaukopunaisen valon avulla (Buchholz et al. 1995). Järjestelmät voivat toimia myös synergisesti, sillä lituroidulla UV-A-säteily, punainen ja sininen valo stimuloivat edelleen UV-B:n aktivoiman CHS-geenin ilmenemistä (Fuglevand et al. 1996).

UV-B-säteilyn lisäksi myös UV-B:n ja PAR-säteilyn suhde vaikuttaa siihen, miten kasvi säteilyyn reagoi. UV-B-säteilyn lisääntyminen nosti esimerkiksi ohran lippu-

lehden vesiliukoisten flavonoidien pitoisuuksia. Ohran lehdessä yleisesti esiintyvän saponariinin pitoisuus nousi 30 % ja pienempinä pitoisuuksina esiintyvän lutorarin määrä nousi 500 % (Reuber et al. 1996a). Ohran lisäksi (Reuber et al. 1996a, Mazza et al. 1999), vehnän (Sharma et al. 1998), rukiin (Reuber et al. 1996b), maissin (Stapleton & Walbot 1994), soijapavun (Middleton & Teramura 1993), salaatin (Krizek et al. 1998), riisin (Reddy et al. 1994), purjon (Gislefoss et al. 1992), koivun (Lavola 1998), männyn (Schnitzler et al. 1997) ja kuusen (Fischbach et al. 1999) on raportoitu suojautuvan lisääntyneitä UV-B-säteilyä vastaan lisäämällä fenolisten yhdisteiden muodostumista. Poikkeuksiakin on, sillä kaalin flavonoideihin ei UV-B aiheuttanut muutoksia (Gislefoss et al. 1992). Onkin ymmärrettävää, että vähän fenoleita sisältävät mutantit ovat erityisen herkkiä UV-B-säteilylle (Li et al. 1993, Landry et al. 1997). Fenolien lisääntymisen osoitettiin riippuvan PAL-entsyymien aktiivisuudesta myös kokeellisesti (Fuglevand et al. 1996), vaikka myös CHS:llä näyttäisi olevan suuri merkitys (Fuglevand et al. 1996, Reuber et al. 1996b, Loyall et al. 2000).

UV-B-säteilyn vaikutus saattaa perustua siihen, että se pitkittää ja ylläpitää flavonoidien muodostumista ja mm. korkeaa PAL-entsyymiaktiivisuutta. Esimerkiksi ohran taimissa UV-B-käsittely pitkitti fenolien muodostumista, sillä tavallisuudesta poiketen vielä yli kymmenen vuorokautta vanhat taimet muodostivat antosyaniineja käsittelyn ansiosta (Liu & McClure 1995). UV-B:n flavonoidisynteesiä ylläpitävä ominaisuus havaittiin myös kukanväriä selvittävässä tutkimuksessa, jossa antosyaniini-pigmenttien muodostuminen jatkui vielä 1–2 viikkoa käsittelyn jälkeen (Ben-Tal & King 1997).

Kasvin lehtien vanhetessa lisääntyi UV-B-valoa absorboivien pigmenttien osuus, mikä on huomioitava määrittäessä kasvin herkkyyttä UV-B-säteilylle (Reddy et al. 1994, Day et al. 1996). Myös eri fenolit suojaavat kasvia eri tavoin UV-B-säteilyä vastaan (Sheahan 1996).

### 2.3.6 Lämpötila

Lämpötila vaikuttaa kasvien sekundääriainesten muodostumiseen, sillä esimerkiksi viileys saattaa edistää mm. antosyaniinien ja muiden fenolisten yhdisteiden synteesiä (Tan 1980, Christie et al. 1994, Haldimann et al. 1995, Solecka 1997). Fenyylipropanoidilähtöisten sekundääriainesten lisäksi myös muut aminohappojohteiset aineet lisääntyvät kylmäkäsittelyn ansiosta mm. tomaatilla ja kurpitsalla (Ishida et al. 1998, Shen et al. 2000). Toisaalta liika lämpö saattaa ehkäistä antosyaniinien muodostumista (Ulrychova & Sosnova 1970). Lyhyet kylmäkäsittelyt (18 tuntia  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa, jonka jälkeen kuusi tuntia  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa) ovat lisänneet fenoleiden määrää jopa 10–20 %. Useilla kasveilla kukan väri tummenee, kun kasveja kasvatetaan viileässä ( $13\text{--}17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Ben-Tal & King 1997, Shvarts et al. 1997). Ero lämpimässä ja viileässä kasvatetun kukan värissä voitiin havaita vielä kolme viikkoa käsittelyn jälkeenkin (Ben-Tal & King 1997). Viileyden vaikutus tulee esille yleensä vain silloin, jos kasveja kasvatetaan samanaikaisesti valossa (Janda et al. 1996).

Viileys vaikuttaa kiihdyttävästi myös metaboliatuotteita valmistaviin avainentsyymeihin. Esimerkiksi omenan kuoren PAL-aktiivisuus nousi jopa kymmenkertaisesti ja antosyaniinin muodostuminen lisääntyi selvästi, kun omenaa käsiteltiin vaihtuvassa lämpötilassa ( $6/25\text{ }^{\circ}\text{C}$  yö/päivä) tasaisen sijaan ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ :een yö ja päivä) (Tan 1980). Kun rapsia oli kasvatettu kolme viikkoa viileässä ( $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), PAL:n aktivoituminen johti 10 % suurempaan fenolipitoisuuteen. Sen sijaan lyhyt pakkaskäsittely (18 tuntia  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa, jonka jälkeen kuusi tuntia  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa) lisäsi PAL-aktiivisuutta lyhytaikaisesti ja johti 20 % suurempaan fenolipitoisuuteen (Solecka 1997).

Viileys on lisännyt geenituotteiden muodostumista useissa tutkimuksissa. Maissilla *PAL*-, *CHS*-, *4GL* ja *CHI*-geenien ilmeneminen moninkertaistui (3–50 -kertaisesti) viileäkäsittelyn takia ( $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ja transkriptio laski vasta, kun taimet siirret-

tiin lämpimään (25 °C) (Christie et al. 1994). Sitrushedelmällä viileä käsittely (2 °C) lisäsi *PAL*-geenien ilmenemistä lehdistä ja juurissa hyvin nopeasti ja muutos oli pysyvää. Lisäksi kylmyyden aiheuttamia vioituksia ei todettu, vaikka yleensä oireita saadaan lämpötilan laskettua alle 5 °C. Sen sijaan kymmenen astetta korkeammassa lämpötilassa (12 °C) *PAL*:n ilmeneminen lisääntyi vain lyhytkestoisesti (1 vrk) (Sanchez-Ballesta et al. 2000). On arveltu, että viileys toimii eräänlaisena stressisignaalina kuten solukoiden vioittuminenkin ja että se johtaa eräiden geenien aktivoitumiseen (Shvarts et al. 1997).

### 2.3.7 Ilmansaasteet

Hiili-typpe-tasapainoteorian mukaan ilma-kehän hiilidioksidin lisääntyminen saattaa kasvattaa yhteyttämistä. Sen seurauksena tuotteita on enemmän käytettävissä juuri hiilihydraateista muodostettaviin sekundäriaineisiin. Sen sijaan typen saatavuuden parantuminen lisää biomassan kasvua. Se saattaa vähentää hiilihydraattien määrää kasvissa ja sitä kautta myös niistä johdettuja sekundäriaineita (Lavola & Julkunen-Tiitto 1994). Teoriaa tukevat eri kasveilla tehdyt tutkimukset (Lavola & Julkunen-Tiitto 1994, Penuelas et al. 1996). Kun ilman hiilidioksidipitoisuutta lisättiin, kerääntyi koi-vun lehtiin proantosyanideja ja flavonoideja (Lavola & Julkunen-Tiitto 1994). Myös vehnän lippulehden kokonaisfenolipitoisuus nousi (Penuelas et al. 1996). Hiilidioksidin lisäksi muut ilmansaasteet saattavat aiheuttaa stressioireita kasveille. Esimerkiksi pavun (*Phaseolus vulgaris* L.) antioksidanttipitoisuus oli suurimmillaan näytteissä, jotka oli kerätty pakokaasun saastuttamalta alueelta. Antioksidanttien lisääntymistä ei havaittu näytteissä, jotka oli otettu puhtaassa ilmastossa kasvaneista kasveista (Badiani et al. 1993). Otsonin vaikutusta selvittävässä tutkimuksessa havaittiin, että runsaasti otsonia (300 ppb) saaneiden lituruohojen *PAL*-geenien ilmeneminen vähin-

tään kaksinkertaistui käsittelemättömään verrattuna (Sharma & Davis 1994).

### 2.3.8 Maaperän kuivuus ja suolaisuus

Kuivuusstressin yhteydessä kasvi altistuu usein yhtä aikaa korkeaan lämpötilaan, valaistukseen ja vedenpuutteeseen. Kasvien on havaittu reagoivan stressiin aineenvaihdunnallisilla muutoksilla, joista yksi on vapaiden happiradikaalien lisääntyminen ja niiden hapetuskykyä estävien antioksidanttien muodostuminen (Jagtap & Bhargava 1995). Kuivuuden lisäksi myös liika kosteus saattaa aiheuttaa fenolien lisääntymistä (Cohen et al. 1994). Antioksidanttien molekyylien muodostuminen oli erityisen vilkasta, kun kuivuusstressi ajottui kukintavaiheeseen. Taimivaiheessa kuivuus nosti antioksidanttien määrää selvästi kukintavaihetta vähemmän. Kasvin sopeuduttua kuivuuteen antioksidanttien muodostuminen yleensä vähenee (Kurup et al. 1994).

Kuivuuden lisäksi maan suolaisuus aiheuttaa kasveille stressiä. Sen vuoksi vapaiden happiradikaalien muodostuminen kiihtyy. Myös tässä tapauksessa kasvit tuottavat puolustukseksi antioksidantteja (Hernandez et al. 2000; Sreenivasulu et al. 2000).

### 2.3.9 Ravinteet

*Typen puute* on yksi kasvien kasvua eniten rajoittavista tekijöistä. Mikäli ravinteen puute on merkittävää ja pysyvää, saattaa se johtaa kasvissa aineenvaihdunnallisiin muutoksiin. Typen puutteesta aiheutuva stressi voi puolestaan indusoida fenolisten yhdisteiden muodostumista (Lawanson et al. 1972), jota tukee myös hiili-typpe-tasapainoteoria (Lavola & Julkunen-Tiitto 1994). Typen puute saattaa lisätä aminoryhmän irtaantumista fenyylialaniinista, jolloin typpi kierrätetään proteiinisynteesiin ja kanelihappo-osa fenoliin sekundäriaineisiin. Sini-mailasen juurissa flavonoidien ja isoflavonoidien pitoisuudet kasvoivat jo 3–5 vuorokauden kuluttua typpilannoituksen pää-

tyttyä (Coronado et al. 1995) ja maissilla antosyaniinien muodostuminen oli runsaimmillaan 15 vuorokauden kuluttua lannoituksen päättymisestä (Lawanson et al. 1972). Typen puutteessa kasvatettujen tomaattien lehdet sisälsivät vähintään kaksinkertaiset pitoisuudet antosyaniineja ja yhtä flavonolia sekä yli kymmenen prosenttia enemmän ei-flavonolisia yhdisteitä, kun pitoisuuksia verrattiin riittävästi typpeä saaneisiin kasveihin (Bongue-Bartelsman & Phillips 1995). Hiili-tyyppi-tasapainoteorian mukaan typpilannoitus lisää kasvua ja saattaa vähentää hiilihydraateista muodostettavia sekundääriaineiden synteesiä. Näin oli tatarilla, jolla typpilannoitus vähensi rutiinipitoisuutta (Hagels et al. 1995). Mm. palkokasveilla riittävän niukka typpilannoitus on oleellinen tekijä nystyräbakteerien toiminnalle sekä myös niiden aktivoitumista edistävien fenolien muodostumiselle (Coronado et al. 1995). Toisaalta suuret typpimäärät ovat myrkyllisiä ja voivat aiheuttaa kasville stressiä johtaen myös fenolien muodostumiseen (Sanchez et al. 2000). Saattaa olla, että typpilannoituksen avulla säädellään tulevaisuudessa myös fenolisten yhdisteiden muodostumista (Coronado et al. 1995).

Typenpuutteen takia PAL-, CHS- ja DFR-entsyymien aktiivisuudet kasvoivat ja CHI:n laski (Tan 1980). Entsyymiaktiivisuuden nousu lisäsi myös flavonoidien kerääntymistä soluun (Tan 1980, Bongue-Bartelsman & Phillips 1995). Entsyymien lisäksi fenyylipropanoidireitin geenien (*CHS* ja *IFR*) ilmeneminen voimistui typen puutteessa (Coronado et al. 1995).

Fosfori on kasvin kasvulle oleellinen ravinne. Sen puutos voi merkittävästi pienentää biomassan kasvua (Ulrychova & Sosnova 1970). Sekundääriaineisiin fosforin puutteella näyttää olevan päinvastainen vaikutus, sillä maissilla antosyaniinien muodostuminen lisääntyi ja oli runsaimmillaan kymmenen vuorokauden kuluttua lannoituksesta (Lawanson et al. 1972). Runsa flavonoidien muodostuminen fosforin puutteen takia saattaa joidenkin tutkimusten mukaan jopa vähentää kasvin herkkyyttä

UV-B-säteilylle (Murali & Teramura 1985). Fosforin puute aktivoi mm. PAL-entsyymiä (Krause & Reznik 1976, Tan 1980), mikä on lisännyt tatarilla rutiinin muodostumista (Krause & Reznik 1976), soijapavulla flavonoidien (Murali & Teramura 1985) sekä omenalla (Tan 1980), tomaatilla (Ulrychova & Sosnova 1970, Zornoza & Esteban 1984) sekä maissilla (Lawanson et al. 1972) antosyaniinien muodostumista.

Pääravinteiden kuten typen ja fosforin puutteen lisäksi kaliumin puute vaikuttaa fenolien muodostukseen. Maissin taimilla antosyanidipitoisuudet olivat suurimmillaan viiden vuorokauden kuluttua kaliumlannoituksen päätyttyä (Lawanson et al. 1972). Muista ravinteista ainakin mangaanin (Zornoza & Esteban 1984, Caldwell 1998), boorin (Zornoza & Esteban 1984) ja kuparin (Tiller et al. 1994) puutteen on havaittu vaikuttavan edullisesti fenolien muodostumiseen. Liian suuri mangaanilannoitus aiheutti kurpitsan lehtiin vioituksia, minkä arveltiin johtuvan kasvin herkistymisestä UV-säteilyyn. Tämä johtui siitä, että suuri lannoitusmäärä vähensi lehtien UV-säteilyltä suojaavien flavonoidien pitoisuutta (Caldwell 1998).

### 2.3.10 Ulkoinen kemikaalikäsitely

Kasvit muodostavat kasvihormoneja, joiden synteettisesti valmistettuja johdannaisia kutsutaan kasvunsäätteiksi. Ne vaikuttavat kasvifysiologisiin tapahtumiin kuten versojen ja kukkien muodostukseen ja pituuskasvuun. Kasvunsäätteitä on kahdentyyppisiä. Auksiinit ovat oleellisia erityisesti pituuskasvussa ja kukkien muodostumisessa kun taas sytokiniineja tarvitaan versoutumisen aikaansaamiseksi. Auksiinit (indolylietikkahappo, naftyylietikkahappo, gibberelliinihappo ja trijodobentsoehappo) estivät antosyaniinipigmenttien muodostumista maissin taimissa, joista gibberelliinihappo ( $GA_3$ ) esti voimakkaimmin ja naftyylietikkahappo heikoiten (Rengel & Kordan 1987). Sokerin (sakkaroosin) saanti

on ilmeisesti tässäkin tapauksessa oleellista, sillä silloin gibberelliinihappokäsittely johti kasvissa voimakkaaseen antosyaniinimäärän kasvuun. Gibberelliini vaikutti sitä selvemmin, mitä enemmän sakkaroosia oli kasvatustilauksessa (Moalem-Beno et al. 1997).

Sytokiniineillä, päinvastoin kuin auksiineilla, näyttää olevan antosyaniineja lisäävä vaikutus (Margna & Vainjärvi 1983, Deikman & Hammer 1995, Tohver et al. 1995), vaikka eräissä tapauksissa sytokiniinit ovat estäneet antosyaniinisynteesin (Moalem-Beno et al. 1997). Tattarilla kinetiini lisäsi antosyaniinien ja muiden fenolisten yhdisteiden muodostusta nuorissa taimissa jopa kymmenkertaisesti (Margna & Vainjärvi 1983). Kinetiini sai aikaan yhdisteiden muodostusta niissä taimissa, joissa sitä ei valokäsittelyn aikana muodostunut (Tohver et al. 1995). Sytokiniiniruiskutus lisäsi neljän biosynteesiin liittyvän geenin ilmene- mistä (*PAL*, *CHS*, *CHI*, *DFR*). Siihen vaikuttivat sytokiniinin lisäksi valo ja sen rytmitys. Geenien ilmeneminen oli suurinta aikaisin aamulla ja myöhään illalla (Deikman & Hammer 1995).

### 2.3.11 Kasvupaikka

Kasvupaikka tai tietty maantieteellinen sijainti ei ole yksiselitteisesti määriteltävissä oleva tekijä vaan se on mm. lämpötila-, valaistus-, maalaji-, ravinne- ja kosteustekijöiden summa. Eri tekijöistä kasvupaikka aiheutti merkittävimmin vaihtelua tattarin siementen kokonaisflavonoidi- ja rutiinipitoisuuksiin. Sen sijaan kasvukausi aiheutti vaihtelua erityisesti tattarin siemenkuoren flavonoidipitoisuuteen (Oomah & Mazza 1996). Pellavan lignaanipitoisuudet vaihtelivat selvästi neljän eri paikkakunnan välillä, mutta myös vuosien väliset vaihtelut olivat suuria (Thompson et al. 1997).

Suomessa kerätyistä marjoista kasvupaikka vaikutti puolukan mutta ei mustikan ja lakan kversetiinipitoisuuksiin. Myrisetiinin pitoisuus oli länsisuomalaisissa mustikoissa matalampi kuin itäsuomalaisis-

sa marjoissa. Samanlainen trendi havaittiin karpalon kokonaisflavonoidipitoisuuksissa. Eroihin on saattanut vaikuttaa marjojen kypsyyssaste sekä mahdolliset pakkaset ennen marjojen korjuuta (Häkkinen et al. 1999). Mustikoiden antosyaniinikoostumuksessa todettiin eroja, kun verrattiin saman lajikkeen Ranskassa ja Amerikassa viljeltyjä marjoja. Eroja oli mm. mustikoista määritetyissä yhdisteiden lukumäärissä, johon on saattanut vaikuttaa marjojen kypsyserot (Kader et al. 1996). Eurooppalaisen ja afrikkalaisen havupuun (*Pinus halepensis* Mill.) neulasten flavonoidipitoisuudet ja -koostumukset erosivat erityisesti myrisetiinin suhteen. Myrisetiini jakoi havupuupopulaatiot kolmeen maantieteellisesti erotettavaan ryhmään: Kreikka, Pohjois-Afrikka/Länsi-Eurooppa ja Etelä-Eurooppa (Kaundun et al. 1998).

Vuoristossa kasvaville kasveille on oleellista, että ne sietävät nopeita lämpötilamuutoksia, matalaa yölämpötilaa sekä kirkasta auringonpaistetta. Kasvien kestävyys vaativissa sääoloissa saattaa johtua kohonneista sekundääriaineiden pitoisuuksista. Alpeilla kasvavien luonnonkasvien flavonoidi- (Bachereau et al. 1998) sekä antioksidanttipitoisuudet (askorbiinihappoa) (Wildi & Lütz 1996) lisääntyivät kasvupaikan korkeuden mukana (450–3000 m merenpinnasta) sekä vuorokaudenajasta riippuen. Mitä korkeammalla vuoristossa kasvit kasvoivat, sitä enemmän ne sisälsivät erityisesti askorbiinihappoa. Askorbiinihappopitoisuus on riippuvainen valon intensiteetistä ja yleensä sitä todettiin suuria pitoisuuksia keskipäivällä ja vähän yöllä. Antioksidanttipitoisuuksien lisääntyminen ilmeisesti johtui kasvien lisääntyneestä oksidatiivisesta stressistä, jota kirkas valo yhdessä alhaisen lämpötilan ja mahdollisen kylmyysstressin kanssa aiheuttaa vuoristossa (Wildi & Lütz 1996).

### 2.3.12 Vuosivaihtelut

Kasvukausien tiedetään vaikuttavan biomassan ja primääriaineiden muodostumi-

seen, sillä lämpötila, kosteus- ja valo-olot saattavat vaihdella huomattavasti eri vuosina. Koska sekundääriaineiden muodostuminen on riippuvainen primääriaineista, voidaan myös sekundääriaineilla olettaa esiintyvän vaihtelua (Wang & Murphy 1994, Piccaglia et al. 1997). Esimerkiksi amerikkalaisten soijapapulajikkeiden isoflavonipitoisuudet vaihtelivat lähes kolminkertaisesti (12 000–33 000 mg/kg) eri vuosien välillä. Kasvukausi vaikutti erityisesti isoflavonoidien pitoisuuksiin ja perinnölliset tekijät niiden koostumukseen (Wang & Murphy 1994).

Kasvukauden aikana esiintyvää sekundääriaineiden vaihtelua on todettu erällä monivuotisilla kasveilla. Vaihteluiden arvellaan liittyvän mm. talvehtimiseen ja kasvunlähtöön lepokauden tai talven jälkeen. USA:ssa ja Meksikossa kasvava monivuotinen pensas (*Isocoma acradenia*) muodostaa flavonoidipitoista resiiniä, jonka kerääntyminen lehtiin riippuu kehitysvaiheesta ja vuodenaikasta. Korkeimmat resiinipitoisuudet todettiin keväällä ennen vegetatiivista kasvua, jonka jälkeen pitoisuudet laskivat talveä kohti (Clark & Clark 1990). Oliivin lehdistä tunnistettujen flavonoidien pitoisuudet vaihtelivat vuodenaikojen mukaan. Flavonoidit jakaantuivat kolmeen ryhmään vuodenaikaisvaihtelujen perusteella: flavonoidit, joita muodostui erityisesti keväällä, talvella, tai yhtä paljon vuodenaikasta riippumatta (Heimler et al. 1996).

## **2.4 Geneettisten tekijöiden vaikutus fenolisten yhdisteiden esiintymiseen**

### **2.4.1 Kasvilaji**

Suurin osa fenolisista yhdisteistä on rajoitunut tiettyihin kasveihin, vaikka eräät yhdisteet kuten kversetiini ja kahvihappo esiintyvät useissa kasveissa. Määrittämissä menetelmien kehittyminen sekä kiinnostus metaboliatuotteista ovat kiihdyttäneet fenolisiin yhdisteisiin liittyvää tutkimusta. Erityisesti marjat (mansikka ja musta-

viinimarja Häkkinen et al. 1998), hedelmät (omena Lister et al. 1996, viinirypäleet Boss et al. 1996), vihannekset (parsakaali Price et al. 1998, porkkana Parr et al. 1997, sipuli Hirota et al. 1998), vilja- ja vaeviljakasvit (tattari Ohsawa & Tsutsumi 1995, Oomah & Mazza 1996, Wata-nabe et al. 1997 ja Watanabe 1998), kuitu- ja öljykasvit (pellava Oomah et al. 1996), yrtit (basika Phippen & Simon 1998) ja palkokasvit (soijapapu Wang & Murphy 1994 ja Mazur et al. 1998) sisältävät runsaasti fenolisia yhdisteitä.

Suomessa kasvavien marjakasvien kuten juolukan (184 mg/kg), karpalon (157–263 mg/kg) ja mustan viinimarjan (115 mg/kg) kokonaisflavonoidipitoisuudet olivat erityisen korkeita. Esimerkiksi kversetiiniä oli runsaasti mustikassa (20–150 mg/kg), variksenmarjassa (55 mg/kg), tyrnissä (60 mg/kg), aroniassa (85 mg/kg) ja pihlajanmarjassa (60–85 mg/kg). Sen sijaan mustassa viinimarjassa ja karpalossa kversetiinipitoisuudet olivat matalat ja myristisiiniä oli runsaasti (Häkkinen et al. 1999).

### **2.4.2 Kasvilajike**

Sekundäärimetaboliatuotteiden lajike-erot saattavat olla hyvin suuria, sillä lajikevalintaa tehtäessä sekundääriaineet ovat harvoin olleet valintakriteereinä. Flavonoidipitoisuudessa ja koostumuksessa esiintyviä lajike-eroja on havaittu esiintyvän mm. oliivin hedelmissä (Esti et al. 1998), oliivin lehdistä ja kukissa (Akikcioglu & Tanriserver 1997), pensasmustikassa (Prior et al. 1998), viljeltyjen perunoiden mukuloissa (Lewis et al. 1998b), luonnonvaraisten perunoiden mukuloissa (Lewis et al. 1998c), omenissa (Ju et al. 1997), herneessä, hiirenvirnassa (Wang et al. 1998) ja tattarissa (Tohver et al. 1995).

Antosyaniinien puuttuminen kokonaan valkoisen viinirypäleen kuoresta johtuu ilmeisesti UFGT-entsyymiä säätelevän geenin heikosta aktiivisuudesta (Boss et al. 1996). Tämä aiheuttaa puolestaan sen, että valkoisen ja tummakuorisen viinirypäleen

flavonoidit eroavat toisistaan (Boss et al. 1996, Soleas et al. 1997, Waterhouse & Teissedre 1997). Erot raaka-aineen flavonoideissa johtavat eroihin myös viinin laadussa. Punaviineissä on jopa 20 kertaa enemmän fenoliyhdisteitä kuin valkoviineissä (Soleas et al. 1997, Waterhouse & Teissedre 1997).

75 tutkitun sipulilajikkeen (*Allium cepa*) flavonoidipitoisuuksissa oli suuria vaihteluita (Patil et al. 1995, Price & Rhodes 1997). Yleensä keltakuoriset lajikkeet sisälsivät eniten kversetiiniä, mutta myös vaaleanpunaiset ja punaiset sisälsivät sitä runsaasti (55–285 mg/kg FW). Sen sijaan valkokuoriset lajikkeet sisälsivät vähiten kversetiiniä. Sipuli sisältää väristä riippumatta runsaasti vapaita, sokereihin sitoutumattomia flavonoideja, joilla on ilmeisesti suurempi farmaseuttinen vaikutus kuin flavonolien glykosideilla (Patil et al. 1995). Kaikilla kasveilla flavonoidit eivät vaikuta siemenen väriin, sillä keltaisilla ja vihreillä pavuilla (*Phaseolus vulgaris* L.) oli sama flavonoidiprofiili (Hempel & Böhm 1996).

Seitsemän ruislajikkeen laatuominaisuuksia määritettäessä kokonaisravintokuitupitoisuudella ei näyttänyt olevan merkitystä lajikkeiden lignaanipitoisuuteen. Sen sijaan ravintokuituosuuteen kuuluvan  $\beta$ -glukaanin ja lignaaneihin kuuluvan sekoisolarisiresinolin välillä oli varsin selvä negatiivinen korrelaatio ( $r^2=0,81$ ). Sekoisolarisiresinolin (0,45–0,70 mg/kg) ja matairesinolin (0,35–0,50 mg/kg) pitoisuudet eivät riippuneet toisistaan, mikä viittaa siihen että kyseiset lignaanit myös muodostuvat toisistaan riippumatta (Nilsson et al. 1997a/b). Pellavan sekä muista sen sukuisista kasveista (Konuklugil 1996) eristettyjen lignaanien ja muiden fenoleiden pitoisuudet vaihtelivat jopa kolminkertaisesti eri lajikkeiden välillä. Tämä saattaa osaltaan johtua määritysmenetelmästä (Oomah et al. 1996).

### 2.4.3 Kehitysvaihe

Useimpien kasvien sekundäärimetabolia on

riippuvainen kasvin kehitysvaiheesta. Siksi on oleellista tietää kasvien kehitysvaihe, jotta vertailuja aineenvaihduntatuotteiden koostumuksesta ja pitoisuudesta voidaan tehdä. Lituruohon antosyaniinisynteesiin liittyvien geenien ilmeneminen (*PAL*, *CHS*, *CHI*, *DHF*) riippui taimen iästä, kun taimet siirrettiin pimeästä siniseen valoon. Sen sijaan taimen iästä riippumatta geenien ilmenemistä tapahtui aina, kun taimet siirrettiin punaisesta siniseen valoon (Kubasek et al. 1998). Seesaminsiemementen lignaanikoostumus muuttuu nopeasti itämisen jälkeisinä päivinä. Jo noin kahden vuorokauden kuluttua itämisestä sesamiinin pitoisuus laski lähes olemattomiin. Samanaikaisesti siemenessä alkoi muodostua kolmea uutta lignaaniglukosidia (Kuriyama et al. 1995). Basilika on yksi poikkeuksista, sillä jo noin kahden viikon ikäinen taimi muodostaa kaikkia yli kymmentä kukkivassa kasvissa esiintyvää antosyaniinia (Phippen & Simon 1998).

Kasvien sekundääriaineenvaihduntatuotteiden pitoisuus kasvaa yleensä kukkimiseen saakka (Phippen & Simon 1998), minkä jälkeen pitoisuudet laskevat. Iisopin lehtien diosminipitoisuus lisääntyi lehtien vanhetessa jopa 50 % (Marin et al. 1998). Oreganon (*Origanum x majoricum*) maanpäällisen osan kokonaisflavonoidipitoisuus oli korkeimmillaan kukintaa edeltävän kauden ja alhaisimmillaan kukinnan aikana. Ensimmäisen sadonkorjuun jälkeen flavonoidipitoisuus nousi jälleen kukintavaihetta kohti ja oli korkeimmillaan juuri ennen toista kukintaa, vaikka pitoisuus oli silloin selvästi ensimmäistä kukintavaihetta alhaisempi (Palomino et al. 1997). Morsiuskellolla kokonaisflavonoidipitoisuus oli korkeimmillaan silloin, kun heteen ponnat näkyvät. Antosyaniinipitoisuus oli sen sijaan korkeimmillaan vasta viiden päivän kuluttua kukinnan alkamisesta (Justesen et al. 1997). Tattari sisältää eniten rutiinia kukintavaiheessa, jolloin kukkien, varsilehtien ja kehittyvien pähkylöiden rutiinipitoisuus voi olla jopa 12 %. Nuorissa lehdissä rutiinipitoisuus voi olla 10 %, kun se vanhoissa lehdissä on vain 1,5 %. Rutiinin tavoin

kversetiiniä ja hyperosidia esiintyy kasvissa eniten kukintavaiheessa (Hagels et al. 1995).

Syötävien kasvinosien antioksidanttikyky on yksi laatuominaisuuksiin vaikuttavista tekijöistä, mikä muuttuu kehitysvaiheen mukana. Pensasmustikan kokonaisflavonoidi- ja antosyanidipitoisuudet kasvoivat ja mustikan antioksidanttikyky lisääntyi mustikan kypsyessä. Mustikat, jotka korjattiin heti värin muuttuessa siniseksi, sisälsivät vain vähän antosyanideja, ja niiden antioksidanttikyky oli huono verrattuna hyvin kypsiin mustikoihin (Prior et al. 1998). Oliivien kypsymisastetta on pyritty määrittämään kemiallisen koostumuksen avulla, joista yksi mittari on juuri antioksidanttisten fenoliyhdisteiden pitoisuus (Esti et al. 1998).

Hedelmien kuorissa flavonoidipitoisuus yleensä kasvaa ja hedelmälihassa laskee kypsymisen edetessä (Venkitakrishnan et al. 1997). Viinirypäleissä sen sijaan flavonoidien pitoisuudet lisääntyvät kypsymisen edetessä (Colugnati et al. 1996). Punaja vihreäkuorisen omenan flavonoidipitoisuus riippui CHI- ja UFGT-entsyymien ja antoayaniinipitoisuus PAL-, CHI- ja UFGT-glukosyltransferaasi-entsyymien aktiivisuuksista. Raakojen omenien entsyymiaktiivisuudet olivat korkeat, minkä jälkeen aktiivisuudet laskivat. Tuuleentumisvaiheessa ne nousivat uudelleen (Lister et al. 1996).

#### 2.4.4 Kasvinosa

Kasvinosan merkityksen tunteminen fenolisten yhdisteiden muodostumisessa on tärkeää. Kukat saattavat sisältää varsin runsaasti erilaisia flavonoideja ja antosyaniineja. Iisopin kukan verholehdet sisältävät yli puolet kasvin kokonaisdiosminimäärästä ja vegetatiiviset lehdet noin 40 % (Marin et al. 1998). Oliivin (*Olea europaea* L.) lehdet sisälsivät 30 ja kukkanuput 24 kasvinosasta riippuvaa yhdistettä, joista vain 5 yhdistettä esiintyi molemmissa kasvinosissa (Akillioglu & Tanriserver 1997).

Hedelmien, vihannesten ja mukulakas-

vien kuoriosat sisältävät lähes poikkeuksetta runsaasti fenolisia yhdisteitä. Omenan kuorista on analysoitu hedelmälihaa selvästi suurempia pitoisuuksia, mm. yksinkertaisia fenoleja, flavonoideja ja antosyaniineja (Ju et al. 1996). Sipulin uloin kuori ja erityisesti kuoren yläosa sisältää eniten flavonoliglykosideja sekä kversetiiniä, joiden pitoisuudet lisääntyivät sipulin vanhetessa (Hirota et al. 1998). Fenolisia yhdisteitä oli selvästi enemmän perunan mukulan kuoriosassa kuin sen sisäosissa (Lewis et al. 1998b/c).

Viljojen ja vaeviljojen siementen kuoret ovat arvokkaita fenolisten yhdisteiden lähteitä. Tattarin pähkyläkuoren flavonoidipitoisuudet olivat kuorittua siementä korkeammat. Pähkyläkuoren (740–13140 mg/kg) ja kuoritun pähkylän flavonoidipitoisuudet (190–3870 mg/kg) vaihtelivat varsin runsaasti tutkimuksesta riippuen (Oomah & Mazza 1996, Dietrych-Szostak & Oleszek 1999). Kuori sisältää myös UV-valossa punaisena heijastavaa fagopyriiniä (Samel et al. 1996). Rukiin lignaaneista matairesinoli ja sekoisolarisiresinoli sijoittuvat jyvän ulkokerrokseen, mutta sekoisolarisiresinolia voi esiintyä myös tärkkelyspitoisessa endospermässä (Nilsson et al. 1997a, b).

#### 2.4.5 Satokomponentit

Korkea tuoresato saattaa alentaa sekundääristen yhdisteiden pitoisuutta, vaikka kokonaissekundäärisato kasvaisikin. Näin oli pensasmustikalla, jolla marjan koon suureneminen kasvatti kokonaisantosyaniinisatoa ja samalla mustikan antioksidanttikykyä (Prior et al. 1998). Tällä hetkellä hyödennettävä sato muodostuu pääasiassa kasvin primääriaineenvaihduntatuotteista, joista sekundääriset yhdisteet muodostetaan. Tämän takia on hyvä ymmärtää miten sekundääriaineiden lisääminen mahdollisesti vaikuttaa primääriaineisiin. Tattarilla flavonoidi- ja rutiinipitoisuudet näyttivät olevan lievästi riippuvaisia proteiinipitoisuudesta (Oomah & Mazza 1996). Pellavalalla flavonoidien ja proteiinien muodostumi-



nen olivat negatiivisesti riippuvaisia toisistaan (Oomah et al. 1996). Sen sijaan herneen ja hiirenvirnaan fenoli- ja tanniinipitoisuudet eivät olleet lainkaan riippuvaisia

siemenen proteiinipitoisuudesta eikä siemensadosta (Wang et al. 1998).

## Kirjallisuus

---

- Adamska, I.** 1997. ELIPs-light-induced stress proteins. *Physiologia Plantarum* 100: 794–805.
- Akillioglu, M. & Tanrisever, A.** 1997. Description of phenolics in olive trees and determination of composition in two different organs and cultivars. *Science and Technology* 68: 28–31.
- Alfenito, M.R., Souer, E., Goodman, C.D., Buell, R., Mol, J., Koes, R. & Walbot, V.** 1998. Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *The Plant Cell* 10: 1135–1149.
- Atanassova, B., Shtereva, L. & Molle, E.** 1997. Effect of three anthocyaninless genes on germination in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) II. Seed germination under stress conditions. *Euphytica* 97: 31–38.
- Axelsson, M., Sjövall, J., Gustafsson, B.E. & Setchell, K.D.R.** 1982. Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature* 298: 659–660.
- Bachereau, F., Marigo, G. & Asta, J.** 1998. Effect of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*. *Physiologia Plantarum* 104: 203–210.
- Badiani, M., Schenone, G., Paolacci, A.R. & Fumagalli, I.** 1993. Daily fluctuations of antioxidants in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves as affected by the presence of ambient air pollutants. *Plant and Cell Physiology* 34: 271–279.
- Bandyopadhyay, A.K., Jain, V. & Nainawatee, H.S.** 1996. Nitrate alters the flavonoid profile and nodulation in pea (*Pisum sativum* L.). *Biology and Fertility of Soils* 21: 189–192.
- Bartels, D., Hanke, C., Schneider, K., Michel, D. & Salamini, F.** 1992. A desiccation-related *Elip*-like gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA. *The EMBO Journal* 11: 2771–2778.
- Bate, N.J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P.W., Dixon, R.A., Lamb, C.J. & Elkind, Y.** 1994. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7608–7612.
- Beggs, C.J., Kuhn, K., Böcker, R. & Wellmann, E.** 1987. Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* 172: 121–126.
- Ben-Tal, Y. & King, R.W.** 1997. Environmental factors involved in colouration of flowers of Kangaroo Paw. *Scientia Horticulturae* 72: 35–48.
- Bodesheim, U. & Hölzl, J.** 1997. Isolierung, strukturaufklärung und radiofezeptorassays von alkaloiden und lignanen aus *Valeriana officinalis* L. *Pharmazie* 52: 386–391.
- Bongue-Bartelsman, M. & Philips, D.A.** 1995. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 33: 539–546.
- Boss, P.K., Davies, C. & Robinson, S.P.** 1996. Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Australian Journal of Grape and Wine* 2: 163–170.
- Botsoglou, N.A., Yannakopoulos, A.L., Fletouris, D.J., Tserveni-Goussi, A.S. & Psomas I.E.** 1998. Yolk fatty acid composition and cholesterol content in response to level and form of dietary flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4652–4656.
- Buchholz, G., Ehmann, B. & Wellmann, E.** 1995. Ultraviolet light inhibition of phytochrome-induced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledons (*Sinapis alba* L.). *Plant Physiology* 108: 227–234.

- Burbulis, I.E., Iacobucci, M. & Shirley, B.W.** 1996. A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in arabidopsis. *The Plant Cell* 8: 1013–1025.
- Buttery, B.R., Gaynor, J.D., Buzzell, R.I., MacTavish, D.C. & Armstrong, R.J.** 1992. The effects of shading on kaempferol content and leaf characteristics of five soybean lines. *Physiologia Plantarum* 86: 279–284.
- Caldwell, C.R.** 1998. Effect of elevated manganese on the ultraviolet- and blue light-absorbing compounds of cucumber cotyledon and leaf tissues. *Journal of Plant Nutrition* 21: 435–445.
- Charrier, B., Coronado, C., Kondorosi, A. & Ratet, P.** 1995. Molecular characterization and expression of alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavanone-3-hydroxylase and dihydroflavonol-4-reductase encoding genes. *Plant Molecular Biology* 29: 773–786.
- Chory, J., Chatterjee, M., Cook, R.K., Elich, T., Frankhauser, C., Li, J., Nagpal, P., Neff, M., Pepper, A., Poole, D., Reed, J. & Vitart, V.** 1996. From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 12066–12071.
- Christie, J.M. & Jenkins, G.I.** 1996. Distinct UV-A/Blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in arabidopsis cells. *The Plant Cell* 8: 1555–1567.
- Christie, P.J., Alfenito, M.R. & Walbot, V.** 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194: 541–549.
- Clark, L.E. & Clark, W.D.** 1990. Seasonal variation in leaf exudate flavonoids of *Isocoma acradenia* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 18: 145–148.
- Claudot, A.C., Ernst, D., Sandermann, H. & Drouet, A.** 1997. Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. *Planta* 203: 275–282.
- Cohen, Y., Treutter, D. & Feucht, W.** 1994. Water stress induced changes in phenol composition of leaves and phloem of *Prunus avium* L. *Acta Horticulturae* 381: 494–497.
- Colugnati, G., Bregant, F., Battistutta, F., Celotti, E. & Zironi, R.** 1996. Preliminary observations about genotype-training system interaction on cv Sauvignon blanc: evolution of phenolic and aromatic fractions during maturation. *Acta Horticulturae* 427: 339–346.
- Coronado, C., Zuanazzi, J.A.S., Sallaud, C., Quirion, J.C., Esnault, R., Husson, H-P., Kondorosi, A. & Ratet, P.** 1995. Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. *Plant Physiology* 108: 533–542.
- Cramer, C.L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X., Dildine, S.L., Bolwell, G.P., Dixon, R.A., Lamb, C.J. & Schuch, W.** 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Molecular Biology* 12: 367–383.
- Das, B., Rao, S.P., Srinivas, K.V.N.S. & Yadav J.S.** 1995. Lignans of *Taxus baccata*. *Fitoterapia* 5: 473.
- Davin, L.B., Bedgar, D.L., Katayama, T. & Lewis, N.G.** 1992. On the stereoselective synthesis of (+)-pinoresinol in *Forsythia* suspense from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochemistry* 31: 3869–3874.
- Davin, L.B. & Lewis, N.G.** 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursors coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology* 123: 453–461.
- Dawar, S., Vani, T. & Singhal, G.S.** 1998. Stimulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation by UV-B irradiation in thylakoid membranes of wheat. *Biologia Plantarum* 41: 65–73.
- Day, T.A., Howells, B.W. & Ruhland, C.T.** 1996. Changes in growth and pigment concentrations with leaf age in pea under modulated UV-B radiation field treatments. *Plant, Cell and Environment* 19: 101–108.
- Deckmyn, G. & Impens, I.** 1997. Combined effects of enhanced UV-B radiation and nitrogen deficiency on the growth, composition and photosynthesis of rye (*Secale cereale*). *Plant Ecology* 128: 235–240.
- Deikman, J. & Hammer, P.E.** 1995. Induction of anthocyanin by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 108: 47–57.
- Dellus, V., Mila, I., Scalbert, A., Menard, C., Michon, V. & Herve du Penhoat, C.L.M.** 1997. Douglas-fir polyphenols and heartwood formation. *Phytochemistry* 45: 1573–1578.
- Demmig-Adams, B. & Adams, W.W.** 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599–626.
- Dietrych-Szostak, D. & Oleszek, W.** 1999. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4384–4387.

- Dinkova-Kostova, A.T., Gang, D.R., Davin, L.B. & Bedgar, D.L.** 1996. (+)-Pinoresinol/(+) -lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia*. The Journal of Biological Chemistry 271: 29473–29482.
- Dixon, R.A. & Paiva, N.L.** 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell 7: 1085–1097.
- Douglas, C.J.** 1996. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. Trends in Plant Science 1: 171–178.
- Esti, M., Cinquanta, L. & La Notte, E.** 1998. Phenolic compounds in different olive varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 32–35.
- Feinbaum, R.L., Storz, G. & Ausubel, F.M.** 1991. High intensity and blue light regulated expression of chimeric chalcone synthase genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. Molecular & General Genetics 226: 449–456.
- Feucht, W.** 1994. The localization of phenols at the cellular and tissue level. Acta Horticulturae 281: 803–815.
- Fischbach, R.J., Kossmann, B., Panten, H., Steinbrecher, R., Heller, W., Seidlitz, H.K., Sandermann, H., Hertkorn, N. & Schnitzler, J.P.** 1999. Seasonal accumulation of ultraviolet-B screening pigments in needles of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). Plant, Cell and Environment 22: 27–37.
- Fuglevand, G., Jackson, J.A. & Jenkins, G.I.** 1996. UV-B, UV-B, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in arabidopsis. The Plant Cell 8: 2347–2357.
- Fukasawa-Akada, T., Kung, S-D. & Watson, J.C.** 1996. Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. Plant Molecular Biology 30: 711–722.
- Ghisalberti, E.L.** 1997. Cardiovascular activity of naturally occurring lignans. Phytomedicine 4: 151–166.
- Gislefoss, J.S., Kjeldstad, B. & Bakken, A.K.** 1992. Optical properties of the epidermis of leek (*Allium ampeloprasum* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.) after enhanced ultraviolet-B radiation. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B, Soil and Plant Science 42: 173–176.
- Grady, H., Palmer, R.G. & Imsande, J.** 1995. Isoflavonoids in root and hypocotyls of soybean seedling (*Glycine max*, Fabaceae). American Journal of Botany 82: 964–986.
- Hagels, H., Wagenbreth, D & Schilcher, H.** 1995. Phenolic compounds of buckwheat herb and influence of plant and agricultural factors (*Fagopyrum esculentum* Moench and *Fagopyrum tataricum* Gärtner). In: Matano, T. & Ujihara, A (eds.). Current advances in buckwheat research, Vol III. Physiology and ecology. Matsumoto, Japan: Shinshu University Press. p. 801–809. ISBN 4915860035.
- Hahlbrock, K. & Scheel, D.** 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40: 347–369.
- Haldimann, P.** 1998. Low growth temperature-induced changes to pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in chilling sensitivity. Plant, Cell and Environment 21: 200–208.
- , **Fracheboud, Y. & Stamp, P.** 1995. Carotenoid composition in *Zea mays* developed at sub-optimal temperature and different light intensities. Physiologia Plantarum 95: 409–414.
- Harborne, J.B.** 1980. Plant Phenolics. In: Bell, E.A. & Charlwood, B.C. (eds.). Secondary plant products, Encyclopedia of plant physiology, Vol 8. Berlin: X Springer-Verlag. p. 329–432. ISBN 3-540-09461-X.
- Heimler, D., Cimato, A., Alessandri, S., Sani, G. & Pieroni, A.** 1996. Seasonal trend of flavonoids in olive (*Olea europaea* L.) leaves. Agricultura Mediterranea 126: 205–209.
- Hempel, J. & Böhm, H.** 1996. Quality and quantity of prevailing flavonoid glycosides of yellow and green French beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 2114–2116.
- Hernandez, J.A., Jimenez, A., Mullineaux, P. & Sevilla, F.** 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. Plant, Cell and Environment 23: 853–862.
- Herrmann, K.L.** 1995. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. The Plant Cell 7: 907–919.
- Hirota, S., Shimoda, T. & Takahama, U.** 1998. Tissue and spatial distribution of flavanol and peroxidase in onion bulbs and stability of flavanol glucosides during boiling of the scales. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 3497–3502.
- Holton, T.A. & Cornish, E.C.** 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. The Plant Cell 7: 1071–1083.
- Hrazdina, G., Lifson, E. & Weeden, N.F.** 1986. Isolation and characterization of buckwheat (*Fagopyrum*

- esculentum* M.) chalcone synthase and its polyclonal antibodies. Archives of Biochemistry and Biophysics 247: 414–419.
- Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkänen, H.M. & Törrönen, A.R.** 1998. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. Journal of the Science of Food and Agriculture 77: 543–551.
- , **Kärenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkänen, H.M. & Törrönen, A.R.** 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 2274–2279.
- Ishida, B.K., Mahoney, N.E. & Ling, L.C.** 1998. Increased lycopene and flavor volatile production in tomato calyces and fruit cultured *in vitro* and the effect of 2-(4-chlorophenylthio)triethylamine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4577–4582.
- Jacobs, M. & Rubery, P.H.** 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. Science 241: 346–349.
- Jagtap, V. & Bhargava, S.** 1995. Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor* (L) Moench. Exposed to high light, low water and high temperature stress. Journal of Plant Physiology 145: 195–197.
- Janda, T., Szalai, G. & Páldi, E.** 1996. Chlorophyll fluorescence and anthocyanin content in chilled maize plants after return to a non-chilling temperature under various irradiances. Biologia Plantarum 38: 625–627.
- Ju, Z., Yuan, Y., Liu, C., Wang, Y. & Tian, X.** 1997. Dihydroflavonol reductase activity and anthocyanin accumulation in “Delicious”, “Golden delicious” and “Indo” apples. Scientia Horticulturae 70: 31–43.
- , **Yuan, Y., Liu, C., Zhan, S. & Wang, M.** 1996. Relationships among simple phenol, flavonoid and anthocyanin in apple fruit peel at harvest and scald susceptibility. Postharvest Biology and Technology 8: 83–93.
- Justesen, H., Andersen, S.A. & Brandt, K.** 1997. Accumulation of anthocyanins and flavones during bud and flower development in *Campanula isophylla* Moretti. Annals of Botany 79: 355–360.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M. & Metche, M.** 1996. Fractionation and identification of the phenolic compounds of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). Food Chemistry 55: 35–40.
- Katayama, T., Masaoka, T. & Yamada, H.** 1997. Biosynthesis and stereochemistry of lignans in *Zanthoxylum ailanthoides*. Mokuzaï-Gakkaishi: 43: 580–588.
- Kato, M.J., Chu, A., Davin, L.B. & Lewis, N.G.** 1998. Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds. Phytochemistry 47: 583–591.
- Kaundun, S.S., Lebreton, P. & Fady, B.** 1998. Geographical variability of *Pinus halepensis* Mill. As revealed by foliar flavonoids. Biochemical Systematics and Ecology 26: 83–96.
- Kernan, M.R., Sendl, A., Chen, J.L., Jolad, S.D., Blanc, P., Murphy, J.T., Stoddart, C.A., Nanakorn, W., Balick, M.J. & Rozhon, E.J.** 1997. Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. Journal of Natural Products 60: 635–637.
- Kloppstech, K.** 1997. Light regulation of photosynthetic genes. Physiologia Plantarum 100: 739–747.
- Konuklugil, B.** 1996. Aryltetralin lignans from genus *Linum*. Fitoterapia LXVII (4): 379–381.
- Krause, J. & Reznik, H.** 1976. Untersuchungen zur Steigerung der Flavonol-Akkumulation durch P- und N-mangel in *Fagopyrum esculentum* Moench. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 79: 392–400.
- Krizek, D.T., Britz, S.J. & Mirecki, R.M.** 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. Physiologia Plantarum 103: 1–7.
- Król, M., Ivanov, A.G., Jansson, S., Kloppstech, K. & Huner, N.P.A.** 1999. Greening under high light of cold temperature affects the level of xanthophyll-cycle pigments, early light-inducible proteins, and light-harvesting polypeptides in wild-type barley and the Chlorina f2 mutant. Plant Physiology 120: 193–203.
- Kubasek, W.L., Ausubel, F.M. & Shirley, B.W.** 1998. A light independent developmental mechanism potentiates flavonoid gene expression in *Arabidopsis* seedlings. Plant Molecular Biology 37: 217–223.
- Kuriyama, K., Tsuchiya, K. & Murui, T.** 1995. Generation of new lignan glucosides during germination of sesame seeds. Nippon-Nogeikagaku-Kaishi 69: 685–693.
- Kurup, S.S., Nalwadi, U.G. & Basarkar, P.W.** 1994. Phenolic biosynthesis in relation to moisture stress in marigold (*Tagetes erecta* L.). Acta Horticulturae 381: 488–493.
- Landry, L.G., Stapleton, A.E., Lim, J., Hoffmann, P., Hays, J.B., Walbot, V. & Last, R.L.** 1997. An

- arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 328–332.
- Lavola, A.** 1998. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. *Tree Physiology* 18: 53–58.
- & **Julkunen-Tiitto, R.** 1994. The effect of elevated carbon dioxide and fertilization on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth). *Oecologia* 99: 315–321.
- Lawanson, A.O., Akindele, B.B., Fasalojo, P.B. & Akpe, B.L.** 1972. Time-course of anthocyanin formation during deficiencies of nitrogen, phosphorus and potassium in seedlings of *Zea Mays* Linn. Var. E.S.1. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 66: 251–253.
- Lee, H.I., León, J. & Raskin, I.** 1995. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 4076–4079.
- Lewis, C.E., Walker, J.R.L., Lancaster J.E. & Conner, A.J.** 1998a. Light regulation of anthocyanin, flavonoid and phenolic acid biosynthesis in potato minitubers *in vitro*. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 915–922.
- , **Walker, J.R.L., Lancaster, J.E. & Sutton, K.H.** 1998b. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 45–57.
- , **Walker, J.R.L., Lancaster, J.E. & Sutton, K.H.** 1998c. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. II: Wild, tuberous *Solanum* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 58–63.
- Lewis, N.G., Kato, M.J., Lopes, N. & Davin, L.B.** 1995. Lignans: diversity, biosynthesis and function. In: Seidl, P.R., Gottlieb, O.R. & Kaplan, M.A.C. (eds.) *Chemistry of the Amazon: biodiversity, natural products, and environmental issues*. ACS Symposium Series No. 588. Washington, DC: American Chemical Society. p. 135–167. ISBN 0-9412-3159-1
- Li, J., Ou-Lee, T.S., Raba, R., Amundson, R.G. & Last, R.L.** 1993. *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell* 5: 171–179.
- Lister, C.E., Lancaster, J.E. & Walker, J.R.L.** 1996. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71: 313–320.
- Liu, L. & McClure J.W.** 1995. Effects of UV-B on activities of enzymes of secondary phenolic metabolism in barley primary leaves. *Physiologia Plantarum* 93: 734–739.
- Liu-Gitz, L., Britz, S.J. & Wergin, W.P.** 2000. Blue light inhibits stomatal development in soybean isolines containing kaempferol-3-O-2<sup>o</sup>-glycosyl-gentiobioside (K9), a unique flavonoid glycoside. *Plant, Cell and Environment* 23: 883–891.
- Logemann, E., Wu, S.C., Schröder, J., Schmelzer, E., Somssich, I.E. & Hahlbrock, K.** 1995. Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. *The Plant Journal* 8: 865–876.
- Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M. & Frohnmeier, H.** 2000. Glutathione and UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signalling to chalcone synthase in cell cultures. *The Plant Cell* 12: 1939–1950.
- Luckner, M.** 1990. Secondary metabolism in micro-organisms, plants and animals. 3rd rev. ed. Berlin: Springer-Verlag. 563 p. ISBN 3-540-50287-4.
- Mancinelli, A.L.** 1985. Light-dependent anthocyanin synthesis: a model system for the study of plant photomorphogenesis. *The Botanical Review* 51: 107–157.
- Margna, U. & Vainjärv, T.** 1983. Kinetin-mediated stimulation of accumulation of buckwheat flavonoids in the dark. *Zeitschrift für Naturforschung* 38c: 711–718.
- Marin, F.R., Ortuno, A., Benavente-Carcía, O. & Del Rí J.A.** 1998. Distribution of flavone glycoside diosmin in *Hyssopus officinalis* plants: changes during growth. *Planta Medica* 64: 181–182.
- Mazur, W.M., Duke, J.A., Wähälä, K., Rasku, S. & Adlercreutz, H.** 1998. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. *Nutritional Biochemistry* 9: 193–200.
- Mazza, C.A., Battista, D., Zima, A.M., Szwarcberg-Bracchitta, Giordano, C.V., Acevedo, A., Scopel, A.L. & Ballare, C.L.** 1999. The effects of solar ultraviolet-B radiation on the growth and yield of barley are accompanied by increased DNA damage and antioxidant responses. *Plant, Cell and Environment* 22: 61–70.
- McMullen, M.D., Byrne, P.F., Snook, M.E., Wiseman, B.R., Lee, E.A., Widstrom, N.W. & Coe, E.H.** 1998. Quantitative trait loci and metabolic pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 1996–2000.

- Middleton, E.M. & Teramura, A.H.** 1993. The role of flavonolglycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiology* 103: 741–752.
- Miyauchi, T. & Ozawa, S.** 1998. Formation of (+)-eudesmin in *Magnolia kobus* DC. Var. *borealis* SARG. *Phytochemistry* 47: 665–670.
- Moalem-Beno, D., Tamari, G., Leitner-Dagan, Y., Borochoy, A. & Weiss, D.** 1997. Sugar-dependent gibberellin-induced chalcone synthase gene expression in *Petunia corollas*. *Plant Physiology* 113: 419–424.
- Moyano, E., Martinez-Carcia, J.F. & Martin, C.** 1996. Apparent redundancy in *myb* gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *antirrhinum* flowers. *The Plant Cell* 8: 1519–1532.
- Murali, N.S. & Teramura, A.H.** 1985. Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean. VI. Influence of phosphorus nutrition on growth and flavonoid content. *Physiologia Plantarum* 63: 413–416.
- Napoli, C.A., Fahy, D., Wang, H.Y. & Taylor, L.P.** 1999. White anther: a petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene. *Plant Physiology* 120: 615–622.
- Nilsson, M., Åhman, P., Härkönen, H., Hallmans, G., Knudsen, K.E.B., Mazur, W. & Adlercreutz, H.** 1997a. Content of nutrients and lignans in roller milled fractions of rye. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73: 143–148.
- , Åhman, P., Härkönen, H., Hallmans, G., Knudsen, K.E.B., Mazur, W. & Adlercreutz, H. 1997b. Nutrient and lignan content, dough properties and baking performance of rye samples used in Scandinavia. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B, Soil and Plant Science* 47: 26–34.
- Obst, J.R.** 1998. Special (secondary) metabolites from wood. In: Bruce, A. & Palfreyman, J. (eds.). *Forest products biotechnology*. London: Taylor & Francis. p. 151–165. ISBN 0 7484 0415 5.
- Ohsawa, R. & Tsutsumi, T.** 1995. Inter-varietal variations of rutin content in common buckwheat flour (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Euphytica* 86: 183–189.
- Oomah, B.D. & Mazza, G.** 1996. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1746–1750.
- , Mazza, G. & Kenascuk, E.O. 1996. Flavonoid content of flaxseed. Influence of cultivar and environment. *Euphytica* 90: 163–167.
- Palomino, O.M., Gómez-Serranillos, P., Carretero, E. & Cases, A.** 1997. Variation in the flavonoid content of *Origanum x majoricum* in different plant stages by HPLC. *Planta Medica* 63: 584.
- Parr, A.J. & Bolwell, G.P.** 2000. Phenols in plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content of profile. Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 985–1012.
- , Ng, A. & Waldron, K.W. 1997. Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2468–2471.
- Parvez, M.M., Wakabayashi, K., Hoson, T. & Kamisaka, S.** 1997. White light promotes the formation of diferulic acid in maize coleoptile cell walls by enhancing PAL activity. *Physiologia Plantarum* 99: 39–48.
- Patil, B.S., Pike, L.M. & Sun Yoo, K.** 1995. Variation in the quercetin content in different colored onions (*Allium cepa* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 909–913.
- Penuelas, J., Estiarte, M., Kimball, B.A., Idso, S.B., Pinter Jr, P.J., Wall, G.W., Garcia, R.L., Hanskar, D.J., LaMorte, R.L. & Hendrix, D.L.** 1996. Variety of responses of plant phenolic concentration to CO<sub>2</sub> enrichment. *Journal of Experimental Botany* 47: 1463–1467.
- Pfeffer, H., Dannel, F. & Römheld, V.** 1998. Are there connections between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron-deficient sunflower plants? *Physiologia Plantarum* 104: 479–485.
- Phippen, W.B. & Simon, J.E.** 1998. Anthocyanins in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 16734–16738.
- Piccaglia, R., Marotti, M., Chiavari, G. & Gandini, N.** 1997. Effects of harvesting date and climate on the flavonoid and carotenoid contents of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Flavour and Fragrance Journal* 12: 85–90.
- Prasad, K.** 1997. Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed. *Molecular and Cellular Biochemistry* 168: 117–123.
- Price, K.R., Casascelli, F., Colquhoun, I.J. & Rhodes, M.J.C.** 1998. Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (*Brassica oleracea*) and their fate during cooking. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 468–472.
- & Rhodes, M.J.C. 1997. Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion

- (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. Journal of the Science of Food and Agriculture 74: 331–339.
- Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. & Mainland, C. M.** 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 2686–2693.
- Procissi, A., Dolfini, S., Ronchi, A. & Tonelli, C.** 1997. Light-dependent spatial and temporal expression of pigment regulatory genes in developing maize seeds. The Plant Cell: 9: 1547–1557.
- Pueppke, S.G., Bolanos-Vásquez, M.C., Werner, D., Bec-Férte, M.P., Promé, J.C. & Krishnan, H. B.** 1998. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. Plant Physiology 117: 599–608.
- Quattrocchio, F., Wing, J., van der Woude, K., Souer, E., de Vetten, N., Mol, J. & Koes, R.** 1999. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia and its role in the evolution of flower color. The Plant Cell 11: 1433–1444.
- Rabino, I. & Mancinelli, A.L.** 1986. Light, temperature and anthocyanin production. Plant Physiology 81: 922–924.
- Rasmussen, S. & Dixon, R.A.** 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channelling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. The Plant Cell 11: 1537–1551.
- Reddy, V.S., Goud, K.V., Sharma, R. & Reddy, A.R.** 1994. Ultraviolet-B-Responsive anthocyanin production in a rice cultivar is associated with a specific phase of phenylalanine ammonia lyase biosynthesis. Plant Physiology 105: 1059–1066.
- Rengel, Z. & Kordan, H.A.** 1987. Effects of growth regulators on light-dependent anthocyanin production in *Zea mays* seedlings. Physiologia Plantarum 69: 511–516.
- Reuber, S., Bornman, J.F. & Weissenböck, G.** 1996a. A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. Plant, Cell and Environment 19: 593–601.
- , **Bornman, J.F. & Weissenböck, G.** 1996b. Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. Physiologia Plantarum 97: 160–168.
- , **Jende-Strid, B., Wray, V. & Weissenböck, G.** 1997. Accumulation in the chalcone isosalipurposide in primary leaves of berley flavonoid mutants indicates a defective chalcone isomerase. Physiologia Plantarum 101: 827–832.
- Sainz, M.B., Grotewold, E. & Chandler, V.L.** 1997. Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related myb domain proteins. The Plant Cell 9: 611–625.
- Sairam, R.K., Deshmukh, P.S. & Saxena, D.C.** 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. Biologia Plantarum 3: 387–394.
- Samel, D., Donnella-Deana, A. & de Witte, P.** 1996. The effect of purified extract of *Fagopyrum esculentum* (Buckwheat) on protein kinases involved in signal transduction pathways. Planta Medica 62: 106–110.
- Sanchez, E., Soto, J.M., Garcia, P.C., Lopez-Lefebre, L.R., Riveros, R.M., Ruiz, J.M. & Romero, L.** 2000. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. Australian Journal of Plant Physiology 27: 973–978.
- Sanchez-Ballesta, M.T., Lafuente, M.T., Zacarias, L. & Granell, A.** 2000. Involvement of phenylalanine ammonium-lyase in the response of Fortune mandarin fruits to cold temperature. Physiologia Plantarum 108: 382–389.
- Schneider, M., Kuhlmann, H. & Marquard, R.** 1996. Investigations on rutin content in *Fagopyrum esculentum* under specific climatic conditions in the phytotron. In: Pank, F. (ed.) Proceedings International Symposium Breeding research on medicinal and aromatic plants. June 30 – July 4, 1996. Quedlingburg, Germany. p. 351–354. ISSN 0948-5538.
- Schnitzler, J.-P., Jungblut, T.P., Feicht, C., Köfferlein, M., Langebartels, C., Heller, W. & Sanderman Jr, H.** 1997. H. UV-B induction of flavonoid biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. Trees 11: 162–168.
- Schöttner, M., Gansser, D. & Spiteller, G.** 1997. Lignans from the roots of *Urtica dioica* and their metabolites bind to human sex hormone binding globulin (SHBG). Planta Medica 63: 529–532.
- Schäfer, E., Kunkel, T. & Frohnmeyer, H.** 1997. Signal transduction in the photocontrol of chalcone synthase gene expression. Plant, Cell and Environment 20: 722–727.
- Shalata, A. & Tal, M.** 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative

- Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum* 104: 169–174.
- Sharma, P.K., Anand, P., Sankhalkar, S. & Shetye, R.** 1998. Photochemical and biochemical changes in wheat seedlings exposed to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Science* 132: 21–30.
- Sharma, Y.K. & Davis, K.R.** 1994. Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 105: 1089–1096.
- Sheahan, J.J.** 1996. Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 83: 679–686.
- Shen, W., Nada, K. & Tachibana, S.** 2000. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiology* 124: 431–439.
- Shen, Y-C., Chen, C-C., Lin, Y-M. & Kuo, Y-H.** 1997. A Lignan from roots of *Taxus mairei*. *Phytochemistry* 46: 1111–1113.
- Shichijo, C., Hamada, T., Hiraoka, M., Johnson, C.B. & Hashimoto, T.** 1993. Enhancement of red-light-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period. *Planta* 191: 238–245.
- Shvarts, M., Borochoy, A. & Weiss, D.** 1997. Low temperature enhances petunia flower pigmentation and induces chalcone synthase gene expression. *Physiologia Plantarum* 99: 67–72.
- Soleas, G.J., Dam, J., Carey, M. & Goldberg, D.M.** 1997. Toward the fingerprinting of wines: cultivar-related patterns of polyphenolic constituents in Ontario wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3871–3880.
- Solecka, D.** 1997. Changes in Phenolic content and composition in winter oilseed rape plants treated with cold. In: Sowinski, P. (ed.). *Crop development for the cool and wet regions on Europe: workshop held at the Plant Breeding and Acclimatisation Institute, Radzikow, 13-15 March 1997*. The Polish delegation of the management committee of COST 814. p. 156–160. ISBN 92-828-1810-1.
- Sreenivasulu, N., Grimm, B., Wobus, U., & Weschke, W.** 2000. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiologia Plantarum* 109: 435–442.
- Stapleton, A.E. & Walbot, V.** 1994. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiology*. 105: 881–889.
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., Roberts, K. & Martin, C.** 1998. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *The Plant Cell* 10: 135–154.
- Tan, S.C.** 1980. Phenylalanine ammonia-lyase and the phenylalanine ammonium-lyase inactivating system: effects of light, temperature and mineral deficiencies. *Australian Journal of Plant Physiology* 7: 159–167.
- Tanaka, A., Tano, S., Chantes, T., Yokota, Y., Shikazono, N. & Watanabe, H.** 1997. A new *Arabidopsis* mutant induced by ion beams affects flavanoid synthesis with spotted pigmentation in testa. *Genes & Genetic Systems* 72: 141–148.
- Thompson, L.U., Rickard, S.E., Cheung, F., Kenaschuk, E.O. & Obermeyer, W.R.** 1997. Variability in anticancer lignan levels in flaxseed. *Nutrition and Cancer* 1: 26–30.
- Thompson, W.F & White, M.J.** 1991. Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 42: 423–466.
- Tiller, S.A., Parry, A.D. & Edwards, R.** 1994. Isoflavonoid conjugates and their response to developmental change and abiotic stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Acta Horticulturae* 381: 227–234.
- Tohver, A., Laaner, L. & Vainjärv, T.** 1995. Heterogeneity in buckwheat seedling population in relation to light- and kinetin-induced anthocyanin accumulation. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Biology*. 44: 109–118.
- Tunen van, A.J., Koes, R.K., Spelt, C.E., Krol van der, A.R., Stuitje, A.R. & Mol, J.N.M.** 1988. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *The EMBO Journal* 7: 1257–1263.
- Ulrychová, M. & Sosnová, V.** 1970. Effect of phosphorus deficiency on anthocyanin content in tomato plants. *Biologia Plantarum* 12: 231–235.
- Umezawa, T., Okunishi, T. & Shimada, M.** 1997. Stereochemical diversity in lignan biosynthesis. *Wood Research* 84: 62–75.
- & Shimada, M. 1996. Formation of the (+)-secoisolariciresinol by cell-free extracts of *Arctium lappa*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60: 736–737.



- Venkitakrishnan, M., Panjatcharam, V., Kumaravelu, G. & Ramanujam, M.P.** 1997. Physico-chemical changes during maturation and ripening of jambolan fruit. *Indian Journal of Plant Physiology* 2: 267–270.
- Wang, H. & Murphy, P.A.** 1994. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1674–1677.
- Wang, X., Warkentin, T.D., Briggs, C.J., Oomah, B.D., Campbell, C.G. & Woods, S.** 1998. Total phenolics and condensed tannins in field pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Euphytica* 101: 97–102.
- Wanner, L.A., Li, G., Ware, D., Somssich, I.E. & Davis, K.R.** 1995. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 27: 327–338.
- Watanabe, M.** 1998. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) groats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 839–845.
- , **Ohshita, Y. & Tsushida, T.** 1997. Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1039–1044.
- Waterhouse, A.L. & Teissedre, P.L.** 1997. Levels of phenolics in California varietal wines. In: Watkins, T.R. (ed.). *Wine: nutritional and therapeutic benefits*. Washington DC.: American Chemical Society. p. 12–23. ISBN 0-8412-3497-3.
- Weiergang, I., Hipskind, J.D. & Nicholson, R.L.** 1996. Synthesis of 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins in sorghum occurs independent of light. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 377–388.
- Weisshaar, B. & Jenkins, G.I.** 1998. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 251–257.
- Wildi, B. & Lütz, C.** 1996. Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant, Cell and Environment* 19: 138–146.
- Yamashita, K., Iizuka, Y., Imai, T. & Namiki, N.** 1995. Sesame seed and its lignans produce marked enhancement of vitamin E activity in rats fed a low  $\alpha$ -tocopherol diet. *Lipids* 30: 1019–1028.
- Ylstra, B., Muskens, M. & Van Tunen, A.J.** 1996. Flavonols are not essential for fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 32: 1155–1158.
- Yu, G.H., Sung, S. K. & An, G.** 1998. The nopaline synthase (*nos*) promoter is inducible by UV-B radiation through a pathway dependent on reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment* 21: 1163–1171.
- Zornoza, P. & Esteban, M.** 1984. Flavonoids content of tomato plants for the study of the nutritional status. *Plant and Soil* 82: 269–271.

# 3 Elisitorit kasvitautien torjunnassa

Reijo Karjalainen

*MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen, [reijo.karjalainen@mtt.fi](mailto:reijo.karjalainen@mtt.fi),  
Kuopion yliopisto, Ekologisen ympäristötieteen laitos, PL 1627, 70211 Kuopio*

Kasvien fytokeemikaalien tuotantoa voidaan tehostaa kasvustoon ruiskutettavilla elisitorilla, aineilla, jotka aktivoivat kasvin indusoidun puolustuksen. Tunnettuja elisitoriaktiivisia aineita ovat mm. mikrobien soluseinäpreparaatit ja abioottiset kemikaalit, joista eniten tutkittu on salisylihappo.

Indusoituun resistenssiin liittyy usein bioaktiivisten aineiden lisääntynyt tuotanto. Niitä ovat mm. fenoliset yhdisteet, jotka suojaavat kasveja sienitaudeilta, ja joiden oletetaan olevan myös hyödyllisiä ihmisen terveydelle.

*Avainsanat: kasvinsuojelu, kasvitaudit, kemikaalit*

## 3.1 Johdanto

Kasveille on pitkän kehityshistorian aikana kehittynyt monia tehokkaita luontaisia, perinnöllisiä keinoja, joiden avulla ne kykenevät puolustautumaan taudinaiheuttajia vastaan. Näistä puolustuskeinoista osa on kasvissa pysyvästi ja ne toimivat siten passiivisesti taudinaiheuttajia vastaan. Näitä ovat esim. kasvin rakenteelliset esteet, kasvin soluseinien vaharakenteet ja erilaiset solutiivistymät sekä sellaiset biokemialliset reaktiot, joissa kasvi fenolisten yhdisteiden (esim. klorogeenihappo) ja saponiinien avulla estää patogeenin tunkeutumisen kasvin sisälle.

Merkittävä osa kasvin puolustusmekanismeista aktivoituu vasta, kun patogeeni iskeytyy kasviin. Tällöin infektiokohta reagoi nopeasti solujen tiivistymisellä. Tähän liittyy usein mm. fenolisten yhdisteiden ja monien muiden sienten kasvua estävien yhdisteiden (mm. fytoaleksiinit) ke-

rääntymistä. Tämän seurauksena on usein solukuolema (hypersensitiivinen reaktio) ja tunkeutuvan patogeenin kasvun tyrehtyminen (esim. Karjalainen et al. 1998). Infektion seurauksena kasvin puolustusreaktiot eivät rajoitu vain infektiokohdan välittömään läheisyyteen. Tiedetään, että eräät biokemialliset yhdisteet, kuten hydrolyyttiset entsyymit ja niitä edeltävät geenitoiminnat, aktivoituvat ensin tietyn lehden alueella ja sitten vähitellen koko kasvissa (esim. Karjalainen et al. 1998). Tästä resistenssin muodosta käytetään usein termiä SAR (systemic acquired resistance), joka tarkoittaa systeemisesti hankittua kestävyttä. Ilmiö ei ole mitenkään uusi. Jo lähes 100 vuotta sitten havaittiin ensimmäisen kerran, että aikaisemmin lievän infektion saanut kasvi voi olla seuraavan infektion sattuessa kestävämpi useampaa taudinaiheuttajaa vastaan. Kasvinsuojelun kannalta tehtiin merkittävä havainto, kun huomati-

tiin, että ruiskutettaessa kasvin pinnalle tiettyjä aineita eli elisitoreita pystyttiin indusoitu puolustus aktivoimaan kasvissa (Cartwright et al. 1977). Tämä havainto avasi tien uuden sukupolven kasvitautien torjuntamenetelmien kehittämiseksi. Uuden menetelmän hyödyntäminen kasvinsuojelussa on vielä alkuvaiheessa. Tarvitaan parempaa tietoa siitä, millä elisitoriaineilla tietyt metaboliareitit kasvissa aktivoituvat, jotta eri tyyppiset taudinaiheuttajat voidaan tehokkaasti torjua.

### **3.2 Biokemialliset puolustusreaktiot**

Monet puolustusreaktiot aktivoituvat elisitorikäsitellyissä kasvisoluissa erittäin nopeasti. Jo muutaman minuutin kuluttua elisitorikäsitellyissä soluissa tapahtuu ionimuutoksia, joita seuraa vetyperoksidia ja muita hapettavia aineita vapauttava oksidatiivinen purkaus. Näillä aktiivisilla happituotteilla on tärkeä rooli taudinkestävyydessä, sillä ne voivat toimia välituotteina signaalivälitteisessä defense-molekyylien aktivaatiossa. Joissain tapauksissa niiden on todettu suoraan inhiboivan patogeenin kasvua (Alvarez et al. 1998). Hiljattain on typpioksidin (NO) osoitettu olevan keskeinen molekyyli hypersensitiivisen reaktion varhaisvaiheessa yhdessä reaktiivisten happituotteiden (ROI) kanssa (Delledonne et al. 1998).

Elisitorikäsitellyissä soluissa, kuten myös patogeenilla infektoiduissa lehdissä, on salisyylilihapon todettu voimakkaasti lisääntyvän (Mauch-Mani & Metraux 1998). Myös salisyylilihaporuiskutus (aspiriini) kasvin lehdille aktivoi tehokkaasti monet kasvin puolustusgeenit ja proteiinit (esim. Karjalainen et al. 1998). On havaittu, että tupakan tärkeä haihtuva yhdiste metyyli-salisylaatti kykenee aktivoimaan kasvin puolustukseen liittyviä molekyyliä (Shuliev et al. 1997). Nämä havainnot yhdessä siirtogeenisillä kasveilla tehtyjen kokeiden kanssa antavat vahvat todisteet siitä, että salisyylilihapolla on tärkeä rooli kasvin tau-

dinkestävyyden säätelyssä. Tutkimustulokset johtivat kasvinsuojeluyritykset kehittämään synteettisiä salisyylilihappotyyppejä ”elisitoriaineita”, joilla voidaan aktivoida kasvin puolustusmekanismit kasvihuoneissa ja pellolla.

Kaikki kasvit eivät kuitenkaan näytä noudattavan salisyylilihappovälitteistä puolustusmekanismien aktivoitumista. Erityisesti hyönteisille tärkeiden proteinaasi-inhibiittoreiden aktivaatioon vaikuttaa jasmonihappo, joka on linoleenirasvahapon johdannainen (Wasternack & Parthier 1997). Kasvin kasvua edistävien rhizobakteerien (PGPRs) on osoitettu indusoivan systeemistä resistenssiä kasvissa. Tämä eroaa salisyylivälitteisestä SAR resistenssistä siinä, että kasvissa ei indusoidu PR-puolustusproteiineja, vaan aivan toisentyyppejä, hyvin pieniä puolustusyhdisteitä (Pieterse et al. 1998). Tästä resistenssistä käytetään termiä ISR (indusoitu systeeminen resistenssi), joka on sisällöltään laajempi kuin SAR. Toistaiseksi ei kuitenkaan tiedetä tarkkaan, miten näiden kahden indusoidun resistenssityypin signaalivälitysketjut eroavat.

### **3.3 Elisitorit vaikuttavat biokemiallisiin metaboliareitteihin**

Elisitorit ovat ärsykemolekyyliä, jotka aktivoivat kasvin puolustusreaktiot erilaisia stressejä vastaan. Hyvin tehokkaita elisitoreja ovat mm. mikrobien soluseinistä eristetyt fraktiot, joissa usein on aktiivisena osana glukaani (Hahn 1996). Hiivan soluseinistä voidaan hyvin helposti eristää tehokkaita fraktioita, jotka kykenevät aktivoimaan mm. fenyylipropanireitin entsyymejä ja geenejä (Kervinen et al. 1998). Hiivaelisitorien on havaittu aktivoivan mm. ohran ja mansikan puolustusreaktioita pelto-oloissa, mikä on johtanut melko tehokkaaseen härmäntorjuntaan (Lindroos et al. 1996, Reglinski et al. 1994).

Bioottisia elisitoreja on eristetty runsaasti kasvin soluseinistä, jotka ovat raken-

teeltaan erilaisia sokerijohdannaisia (Hahn 1996). Näitä on hyvin vähän pystytty laajemmin hyödyntämään kasvitautien torjunnassa. Kitosaani, äyriäisten kuoresta eristetty glukosamiinien muodostama polymeeri, on todettu tehokkaaksi elisitoriksi, sillä se näyttää aktivoivan monia hydrolyytisiä entsyymejä ja voimistavan rakenteellisia defense-reaktioita, jotka ovat tehokkaita sienitautien torjunnassa (Benhamou et al. 1994).

Abioottiset elisitorit, joita ovat mm. B-aminobutyrihappo ja salisyylihappo sekä jälkimmäisen perusteella tehty synteettinen ”elisitori” benzothiadiazole (BTH) ovat tutkittuimpia elisitoreja. B-aminobutyrihapon tiedetään aktivoivan tomaatissa PR-proteiineja, tunnettuja kasvin puolustukseen liittyviä defense-yhdisteitä. Niiden oletetaan selittävän tomaatissa ruttosienen väheneminen elisitorikäsitellyn seurauksena (Cohen et al. 1994). Glysiinibetaini (Greenstim-valmiste), joka on sokerijuurikkaasta eristetty aminohappojohdannainen, näyttää omaavan elisitoriaktiivisuutta samoin kuin B-aminobutyrihappo, sekä indusoimalla PR-proteiinia tomaatissa (julkaisematon havainto) että aktivoimalla fenolisten yhdisteiden tuottoa mansikassa (Karjalainen et al. in press).

Salisyylihapon on tiedetty jo 20 vuotta tehostavan kasvin taudinkestävyyttä, mutta vasta viimeisen 10 vuoden aikana salisyylihapon tärkeä rooli resistenssin säätelyssä on tarkentunut. Ulkoisesti annettu aspiriinikäsitely aktivoi kasvissa monia taudinkestävyyteen vaikuttavia metaboliareittejä, joista tunnetuimpia ovat hydrolaasit ja fenoliyhdisteet (Mauch-Mani & Metraux 1998). Lisäksi salisyylihappo näyttää vahvistavan ei-patogeenisen sienien aiheuttamaa luonnollisen resistenssin voimakkuutta (Shirasu et al. 1997). Hiljattain havaittiin, että salisyylihappokäsittely inhiboi viruksen lisääntymistä (Chivasa et al. 1997) ja viruksen liikkumista kasvissa (Naylor et al. 1998). Niinpä se tarkentaa salisyylihappovälitteisen resistenssin mahdollista mekanismia viruksilla. Benzothiadiazole (BTH, kauppa-valmiste Bion) on salisyyliha-

pon perusteella synteettisesti tehty ”elisitori”/kasviaktivaattori, joka on erityisesti tarkoitettu viljojen härmätautien torjuntaan. BTH näyttää indusoivan useita SAR-aktiivisuuteen liittyviä geenejä (Lawton et al. 1996, Görlach et al. 1996), mutta sen on todettu myös kurkun juuristossa aiheuttavan voimakkaita rakenteellisia defense-reaktioita ja fenolisten yhdisteiden kerääntymistä infektiokohdan läheisyyteen (Benhamou & Belanger 1998b). BTH aktivoi fenolisia yhdisteitä mansikan lehdillä ja pellolla tehty käsittely lisäsi kahden flavonolin, kversetiinin ja kempferolin pitoisuutta marjoissa (Karjalainen et al. in press). BTH käsittely lisäsi hyvin voimakkaasti mustaherukan lehdissä flavonolien, myrisitiinin ja kversetiinin pitoisuutta (Hukkanen et al. in press). Flavonoideilla tiedetään olevan sekä antifungaalista että virustauteja ehkäisevää aktiivisuutta (Malhotra et al. 1996, Goetz et al. 1999). Nämä alustavat tutkimukset viittaavat siihen, että elisitoreilla kuten BTH:lla voidaan lisätä kasveissa terveyttä edistäviä flavonolisia yhdisteitä.

### 3.4 Käytännön torjuntamahdollisuudet

Kasvitautien torjunta hyödyntämällä kasvien luontaista taudinkestävyyttä kasvinjalostuksen keinoin on ollut modernin kasvinsuojelun kulmakiviä jo useita kymmeniä vuosia. Kasvin resistenssin aktivoiminen ulkoisin elisitorikäsitelyin on vasta tulossa osaksi kasvinsuojelua, ja käytännön tulokset rajoittuvat toistaiseksi enimmäkseen puutarhakasveihin. On ilmeistä, että lähivuosina niin kasvihuoneissa kuin avomaalla elisitoreihin perustuvia kasvitautien torjuntakeinoja tullaan yhä laajemmin käyttämään (Lyon & Newton 1997). Lupaavia tuloksia on jo saatu mm. vihannesten juuristotautien, vihannesten lehtitautien, mansikan ja ruusun härmän torjunnasta.

Tomaatin pahimpia patogeeneja on *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr.sp. *radicalis-lycopersici*, joka on tomaatin juurifusariosin taudinaiheuttaja. Taudin torjunta on

vaikeata, ja eri puolilla maailmaa tauti aiheuttaa jatkuvasti satotappioita. Kanadassa tutkittiin, voiko elisitori vähentää satoissa olevien tomaattien juurifusariosin aiheuttamia tuhoja (Benhamou et al. 1994). Kitosaania annettiin taimille viikon välein, ja tuloksia verrattiin vesikäsitteilyyn. Parhaalla kitosaanikonsentraatiolla (37,5 mg/l) vähennettiin yli 90 %:lla tomaattien kuolleisuutta verrattuna kontrolliin. Kanadalaiset tutkijat osoittivat, että tomaatin lehdistä annettu BTH ruiskutus johti kasvissa systeemisen resistenssin kehittymiseen, joka vähensi juurifusariosin aiheuttamia tuhoja (Benhamou & Belanger 1998a). BTH-käsittelyn havaittiin hillitsevän kurkun juuristotautin, *Pythium ultimum*, aiheuttamia tuhoja (Benhamou & Belanger 1998b). Nämä tulokset viittaavat siihen, että elisitorit voi-

vat vähentää vaikeasti torjuttavien juuristotautien aiheuttamia tuhoja.

Elisitorit näyttävät soveltuvan erityisesti härmätautien torjuntaan. BTH-käsittelyn havaittiin hyvin tehokkaasti vähentävän mansikan härmää kasvihuonekokeessa (Lindroos et al. 1996) ja hiljattain saman elisitorin todettiin vähentävän vehnän härmää pelto-oloissa (Stadnik & Buchenauer 1999). Kukkakaalin käsittely BTH:lla vähensi lehtihometta (Godard et al. 1999). Eräät fosfaattisuolat stimuloivat kasvin puolustusyhdisteitä, joiden on todettu tehoavan mm. kurkun härmään (Reuveni et al. 1995). Uusilla elisitoreilla voidaan kuitenkin torjua monien marjojen, vihannesten ja koristekasvien härmää huomattavasti tehokkaammin kuin fosfaattisuoloilla.

## Kirjallisuus

- Alvarez, M.E., Pennel, R.I., Ishikawa, A., Dixon, R.A. & Lamb, C.J.** 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773–784.
- Benhamou, N. & Belanger, R.R.** 1998a. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis-lycopersici* in tomato. *Phytopathology* 118: 1203–1212.
- & **Belanger, R.R.** 1998b. Induction of systemic resistance to *Pythium damping-off* in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Plant Journal* 14: 13–21.
- , **Lafontaine, P.J. & Nicole, M.** 1994. Seed treatment with chitosan induces systemic resistance to *Fusarium crown and root rot* in tomato plants. *Phytopathology* 84: 1432–1444.
- Cartwright, D.W., Lancake, P., Pryce, R.J., Leworthy, D.P. & Ride, J.P.** 1977. Chemical activation of host defence mechanisms as a basis for crop protection. *Nature* 267: 511–513.
- Chivasa, S., Murphy, A.M., Naylor, M. & Carr, J.P.** 1997. Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. *Plant Cell* 9: 547–557.
- Cohen, Y., Niderman, T., Mösonger, E. & Fluhr, R.** 1994. B-aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 104: 59–66.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. & Lamb, C.J.** 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585–588.
- Godard, J-F., Ziadi, S.M., Monot, C., Le Corre, D. & Silue, D.** 1999. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. *Crop Protection* 18: 397–405.
- Goetz, G., Ekyerat, A., Metais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R. & Pont, Y.** 1999. Resistance factors to grey mould in grape berries: Identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* 52: 759–767.
- Görlach, J., Volrath S., Knauff-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Ostendorp, M.,**

- Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. & Ryals, J.** 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8 (4): 629–643.
- Hahn, M.G.** 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review in Phytopathology* 34: 387–412.
- Hukkanen, A., Mikkonen, T., Kokko, H., Auriola, S., Tiilikkala, K., Kärenlampi, S. & Karjalainen, R.** in press. Induction of flavonoid glycosides in black currant leaves by benzothiadiazole (BTH) and glycine betaine. In: Brennan, R (ed). *Book of Abstract 3 th International Ribes and Rubus Symposium*, Dundee, Scotland 9 - 12 August, 2001.
- Karjalainen, R., Ernst, D. & Woodward, S.** 1998. Molecular biology of host defence. In: Woodward, S., Stenlind, J., Karjalainen, R. & Huttermann, A. (eds.). *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. Wallingford : CAB International. p. 195–211. ISBN 0-85199-275.
- , **Lehtinen, A., Keinänen, M., Julkunen-Tiitto, R., Hietaniemi, V., Pihlava, J-M., Tiilikkala, K. & Jokinen, K.** in press. Benzothiadiazole (BTH) and glycine betaine treatments enhance phenolic compound production in strawberry. *Acta Horticulturae*.
- Kervinen, T., Peltonen, S., Teeri, T. & Karjalainen, R.** 1998. Differential expression of pal genes in barley in response to fungal infection, and elicitor treatment. *New Phytologist* 139: 293–300.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T. & Ryals, J.** 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquires resistance signal transduction pathway. *Plant Journal* 10: 71–82.
- Lindroos, M., Peltonen, S. & Karjalainen, R.** 1996. Mansikan härmää torjutaan kasvin puolustusta herkistävillä aineilla. *Koetointa ja Käytäntö* 53: 20.
- Lyon, G.D. & Newton, A.C.** 1997. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies. *Plant Pathology* 46: 636–641.
- Malhotra, J.C., Onyilagha, J. C., Bohm, B.A., Towers, G.H.N., Harborne, J.B. & French, C.J.** 1996. Inhibition of tomato ringspot virus by flavonoids. *Phytochemistry* 43: 1271–1276.
- Mauch-Mani, B. & Metraux, J-P.** 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogenic attack. *Annals of Botany* 82: 535–540.
- Naylor, M., Murphy, A.M., Berry, J.O. & Carr, J.P.** 1998. Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. *Molecular Plant-microbe Interactions* 11: 860–868.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. & Van Loon, L.C.** 1998. A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1571–1580.
- Reglinski T., Lyon, G.D. & Newton, A.** 1994. Induction of resistance mechanisms in barley by yeast-derived elicitors. *Annals of Applied Biology* 124: 509–517.
- Reuveni, M., Agapov, V. & Reuveni, R.** 1995. Suppression of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by foliar sprays of phosphate and potassium salts. *Plant pathology* 44: 31–39.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A. & Lamb, C.J.** 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defence mechanisms. *Plant Cell* 9: 261–270.
- Shulaev, V., Silverman, P. & Raskin, I.** 1997. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385: 718–721.
- Stadnik, M.J. & Buchenauer, H.** 1999. Control of wheat diseases by benzothiadiazole-derivate and modern fungicides. *Journal of Plant Diseases and Protection* 106: 466–475.
- Wasternack, C. & Parthier, B.** 1997. Jasmonate signalled plant gene expression. *Trends Plant in Plant Science* 2: 302–207.

# 4 Flavonoidien ja fenolisten happojen terveysvaikutukset

Pirjo Mattila & Jorma Kumpulainen

*MTT, Elintarvikkeiden tutkimus, Elintarvikekemian ja -tekniikka, 31600 Jokioinen,  
pirjo.mattila@mtt.fi, jorma.kumpulainen@mtt.fi*

Fenolisten yhdisteiden on raportoitu vaikuttavan terveyteen monella tavalla. Flavonoidien on todettu vaikuttavan erilaisten entsyymien toimintaan, olevan antitumorogeenisia ja estävän sydän- ja verisuonitauteja. Flavonoidien antitumorogeenisuutta ei tosin ole pystytty osoittamaan epidemiologisin kokein yhtä selvästi kuin niiden sydän- ja verisuonitauteja estävää vaikutusta. Edellisten vaikutusten lisäksi flavonoidien on mm. todettu toimivan anti-allergeeneina ja estävän virusten, bakteerien ja sienten lisääntymistä. Fenolisilla hapoilla on todennäköisesti myös samanlaisia vaikutuksia kuin flavonoideilla, mutta

näiden yhdisteiden tutkimus on ollut vähäisempää. Fenolisten yhdisteiden antitumorogeeniset ja sydän- ja verisuonitauteja estävät vaikutukset perustuvat niiden antioksidatiivisuuteen. Useat fenoliset yhdisteet ovat voimakkaita antioksidantteja. Fenolisia yhdisteitä esiintyy kaikissa kasveissa, mutta niiden pitoisuus eri kasveissa vaihtelee suuresti. Kaikki kasvikset eivät siis ole hyviä lähteitä. Parhaita flavonoidien lähteitä ovat hedelmät, marjat, sipulit, vihreä tee ja punaviini. MTT:ssä tehtyjen uusien tutkimusten mukaan flavonoidien kokonaissaanniksi arvioitiin 55 mg/vrk.

*Avainsanat: fenolit, yhdisteet, kemialliset yhdisteet, terveysvaikutukset, antioksidantit, sydän- ja verisuonitaudit, syöpä*

## 4.1 Johdanto

Jo vuosikymmenten ajan runsaan hedelmien ja kasvien käytön on uskottu edistävän terveyttä. Viime aikoina tehdyt laajat epidemiologiset tutkimukset ovat osoittaneet tieteellisesti tämän vanhan uskomuksen (Steinmetz & Potter 1991, Ames et al. 1993). Kasviksissa esiintyviä, terveyteen

edullisesti vaikuttavia yhdisteitä saattavat olla mm. vitamiinit, mineraalit, ravintokuitu, glukosinolaatit, indolit, terpenoidit, kasviterolit, rikkiyhdisteet ja polyfenoliset yhdisteet, kuten flavonoidit ja fenoliset hapot (Meltzer & Malterud 1997). Kyseisten yhdisteiden yksittäis- ja yhteisvaikutusten kartoitus on valtava työsaika, josta riittää tutkimista vuosikymmenien ajaksi elintar-

vikekemisteille, ravitsemustieteilijöille ja lääkäreille.

Polyfenolisten yhdisteiden biologinen aktiivisuus on jo kauan kiinnostanut tutkijoita. Jo 1930-luvulla kyseisten yhdisteiden terveysvaikutusten vuoksi niitä alettiin kutsua P-vitamiineiksi. Nimityksestä luovuttiin, kun havaittiin, että ne eivät ole vitamiinien tavoin elimistölle välttämättömiä. 1970-luvulla flavonoidit herättivät kohua mahdollisina mutageeneina ja karsinogeneeneina. Myöhemmin saatiin päinvastaisia tuloksia. Viimeisen kymmenen vuoden aikana polyfenolisten yhdisteiden tutkimus on lisääntynyt räjähdysmäisesti. Uusimmissa tutkimuksissa flavonoidien on raportoitu vaikuttavan biologisesti monella tavalla. Niiden on mm. todettu toimivan anti-allergeeneina sekä estävän virusten, bakteerien ja sienten lisääntymistä. Lisäksi niiden on todettu vaikuttavan erilaisten entsyymien toimintaan, olevan antikarsinogeneeneja (tosin päinvastaisia tutkimuksia on julkaistu) sekä estävän sydän- ja verisuonitauteja (Meltzer & Malterud 1997, Bravo 1998, Breinholt 1999).

Flavonoidien lisäksi kasviksissa esiintyy suurina pitoisuuksina fenolisia happoja, joilla on todennäköisesti antikarsinogeenisiä sekä sydän- ja verisuonitautia estäviä vaikutuksia. Näiden yhdisteiden tutkimus on ollut vähäisempää kuin flavonoidien (Breinholt 1999).

Fenolisten yhdisteiden oletetut antikarsinogeeniset sekä sydän- ja verisuonitautia estävät vaikutukset perustuvat niiden antioksidatiivisuuteen. Uusimpien tutkimusten mukaan useat fenoliset yhdisteet ovat tehokkaita antioksidantteja, jotka estävät rasvojen hapettumista koeputkessa. Ne näyttävät vähentävän myös elimistössä vapaiden radikaalien aiheuttamaa rasvahappojen hapettumista (Meltzer & Malterud 1997, Bravo 1998, Breinholt 1999).

## 4.2 Antioksidantit ja niiden rooli syövän ja sydän- ja verisuonitautien estossa

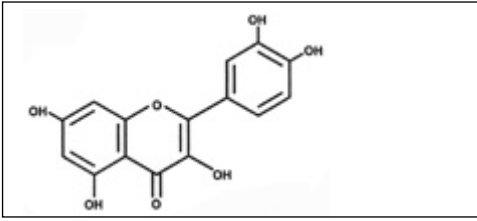
Hapettuminen ja hapen reaktiivisten muotojen ns. vapaiden radikaalien syntyminen oletettavasti aiheuttaa syövän sekä sydän- ja verisuonitautien kehittymisen. Happiradikaalit indusoivat muutoksia geneettiseen materiaaliin hapettamalla tiettyjä DNA:n emäksiä. Geneettisen materiaalin muuntelu voi myös tapahtua epäsuorasti happiradikaalien hapettaessa yksittäisen solun toiminnalle tärkeitä proteiineja ja lipidejä. Tuotettu toiminnallinen vaurio saattaa aiheuttaa mutageeneja, karsinogeneeneja tai ikääntymistä. Jatkuvasti saadaan lisää näyttöä siitä, että LDL:n (low density lipoprotein) hapettuminen käynnistäisi ihmisillä sydän- ja verisuonitautien muodostumisen. Hapettuneella LDL:llä on voimakkaita sytotoksisia ja aterogeenisiä vaikutuksia, jotka saattavat johtaa valtimoiden ahtautumiseen ja verisuonitukokseen (Breinholt 1999).

Ihmisen elimistön antioksidanttipuolustus (katalaasi, superoksididismutaasi ja metalleja sitovat proteiinit) ei riitä täydellisesti estämään hapettumisvaurioita, vaan terveyden ylläpitämiseksi antioksidantteja on saatava ravinnosta (Breinholt 1999). Tärkeimpinä pidettyjä ravintoperäisiä antioksidantteja ovat  $\alpha$ -tokoferoli, retinyylistearaatti,  $\gamma$ -tokoferoli,  $\beta$ -karoteeni ja C-vitamiini (Melzer & Malterud 1997). Edellä mainittuun joukkoon liitetään nykyään myös fenoliset yhdisteet. Niitä esiintyy ravinnossa runsaasti, ja niiden merkitystä syövän sekä sydän- ja verisuonitautien ehkäisyssä pidetään lupaavana.

## 4.3 Fenoliset yhdisteet antioksidantteina

Useat fenoliset yhdisteet ovat voimakkaita antioksidantteja. Eräissä *in vitro* -tutkimuksissa flavonoideilla on todettu olevan jopa voimakkaampia antioksidatiivisia ominai-



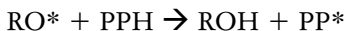
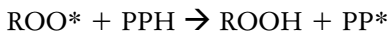


**Kuva 7.** Kversetiinin molekyyli rakenne.

suuksia kuin  $\alpha$ -tokoferolilla (Melzer & Malterud 1997). Polyfenolisten yhdisteiden antioksidatiivisuus riippuu niiden rakenteesta. Antioksidatiivista aktiivisuutta aiheuttavat mm. seuraavat rakenneominaisuudet: *o*-difenolinen ryhmä (B-renkaassa), 2–3 kaksoissidosta konjugoituneena karbonyyliryhmän kanssa C4:ssä ja hydroksyyliiryhmät hiilissä 3 ja 5. Esim. kversetiinin molekyyli rakenteessa ovat kaikki edellä mainitut piirteet (Kuva 7). Flavonoidien antioksidatiivisuutta lisää edellä mainittujen seikkojen lisäksi hydroksylaatioaste ja sitä vähentää sokeriryhmän liittyminen molekyyliin (vain aglykonit ovat antioksidantteja). Fenolisten happojen antioksidatiivinen teho on pienempi kuin flavonoidien (Bravo 1998). Tosin fenolisten happojen pitoisuudet kasviksissa ovat suuret ja niissä esiintyy paljon *o*-difenolisia muotoja, joiden antioksidanttiteho on merkittävä.

Fenoliset antioksidantit vaikuttavat ke-latoimalla hapettumista katalysoivia metalli-ioneja ja muuttaen vapaita radikaaleja vähemmän aggressiivisiksi fenoksidiradikaaleiksi. Lisäksi ne sammuttavat vapaita radikaaleja hapettumisen terminaatiovaiheessa. Fenoliset antioksidantit reagoivat happiradikaalien kanssa seuraavasti (Bravo 1998):

*Vetyatomin luovutus happiradikaaleille*



*Fenoksidiradikaalien reaktiot muiden vapaiden radikaalien kanssa terminaatiovaiheessa*



Antioksidatiivisen toiminnan lisäksi fenoliset yhdisteet saattavat tietyissä olosuhteissa (fenolisten yhdisteiden suuri konsentraatio, korkea pH, raudan läsnäolo, tietty hapettumisprosessin vaihe) toimia pro-oksiantteina (Shahidi ja Wanasundra 1992, Otero et al. 1997, Moran et al. 1997). Fenoliset yhdisteet saattavat siis eräissä tapauksissa olla pikemminkin riski kuin etu terveydelle. Niin lupaavilta kuin fenolisten yhdisteiden terveysvaikutukset tuntuvat, kyseisten yhdisteiden bioaktiiviset ominaisuudet ja toksikologia olisi tarkkaan tutkittava ennen kuin niitä aletaan rikastaa ravintoon.

#### 4.4 Flavonoidien ja fenolisten happojen saanti ja hyväksikäytettävyys

Fenolisia yhdisteitä esiintyy kaikissa kasveissa, mutta niiden pitoisuus eri kasveissa vaihtelee suuresti. Kaikki kasvikset eivät siis ole hyviä lähteitä. Hedelmät ja marjat sisältävät suuria pitoisuuksia samoin kuin sipulit, vihreä tee ja punaviini. Flavonoidien päivittäisen saannin on arvioitu vaihtelevan välillä 50–150 mg/vrk (Breinholt 1999). MTT:ssä tehtyjen uusien tutkimusten mukaan kokonaissaanniksi arvioitiin 55 mg/vrk (Kumpulainen et al. 1999). Kyseinen tutkimus oli erittäin perusteellinen, koska saantiarvioissa oli mukana 24 flavonoidia. Erityisesti appelsiinien (28,5 mg/vrk) ja teen (12 mg/vrk) osuus saannista oli suuri. Vaikka punaviini on erinomainen flavonoidien lähde, sen kulutus on Suomessa niin pientä, että sillä on flavonoidien saannille vain vähäinen merkitys. Fenolisten happojen saannin on arvioitu olevan paljon suurempaa kuin flavonoidien (muutamia grammoja/vrk, Breinholt 1999). Fenolisten happojen saannin arviointi on hankalaa, koska tiedot niiden esiintyvyydestä ja pitoisuuksista elintarvikkeissa ovat puutteelliset. Radtke et al. (1998) tekivät kirjallisuudesta etsimiensä tietojen perus-

teella fenolisten happojen pitoisuuksia koskevan tietokannan, jota käyttämällä he arvioivat saksalaisten keskimääräiseksi saanniksi 222 mg/vrk.

Vaikka flavonoidien saanti on kymmeniä milligrammoja vuorokaudessa, vain murto-osa niistä imeytyy elimistöön. Eräitä katekiineja lukuunottamatta flavonoideista imeytyy vain alle 1%. Imeytymätön jäännös metaboloituu paksusuolen mikrobientsyymien vaikutuksesta muodostaen fenolisia happoja, jotka edelleen voivat imeytyä ja toimia antioksidantteina (Breinholt 1999).

#### 4.5 Flavonoidien antimikrobiaaliset ominaisuudet

Flavonoidien on havaittu olevan tehokkaita antimikrobiaalisia yhdisteitä *in vitro* ja niiden on todettu estävän useiden mikro-organismien kasvua. Flavonoidien antimikrobiaalinen aktiivisuus luultavasti johtuu niiden kyvystä muodostaa komplekseja solun ulkopuolisten ja liukoisten proteiinien ja bakteerien soluseinän kanssa. Lipofiilisimmät flavonoidit voivat lisäksi hajottaa mikrobimembraaneja. Joku aika sitten havaittiin vihreällä teellä olevan antimikrobiaalista aktiivisuutta. Tämä johtuu teen sisältämistä katekiineista. Niiden on havaittu inhiboivan mm. *Vibrio Cholerae*:n, *Streptococcus mutans*:n ja *Shigella*:n kasvua (Murphy Covan 1999).

Flavonoidiyhdisteillä on havaittu inhiboivia vaikutuksia monia viruksia vastaan. Jotkut flavonoidit inhiboivat jopa HIV:ä. Useat ravinnossa suurina pitoisuuksina esiintyvien flavonoidien kuten kversetiinin, hesperetiinin ja katekiinin on todettu inhiboivan mm. hengityselintulehdusta aiheuttavaa virusta (RSV), herpes virusta (HSV-1), tyypin 1 poliovirusta ja parainfluenssavirus tyyppiä 3 (Murphy Covan 1999).

#### 4.6 Flavonoidien ja fenolisten happojen vaikutukset syövän estossa

Flavonoidien merkityksestä syöpäsairauksien kehittymisessä on saatu ristiriitaisia tuloksia. Koe-eläimillä tehdyissä biologisissa kokeissa flavonoideilla on todettu olevan syöpää estävä vaikutus, ei vaikutusta ollenkaan tai vaikutus on ollut syöpää edistävä. Suurimmassa osassa tutkimuksia on todettu, että useilla runsaasti ravinnossa esiintyvillä flavonoideilla (mm. kversetiini, myrisetiini, katekiini, apigeniini) on monia eri syöpälajeja estävää vaikutusta ja että ne inhiboivat syöpää aiheuttavia karsinogeneja (Melzer & Malterud 1997, Bravo 1998).

Flavonoidien syöpää estävän ominaisuuden uskotaan perustuvan monen eri toiminnon yhteisvaikutukseen. Flavonoideilla on nimittäin havaittu useissa eläinkokeissa olevan suuri määrä erilaisia biokemiallisia ja biologisia aktiviteetteja, jotka voivat olla tärkeitä ihmisen syövän estossa. Näitä ovat mm. antioksidanttivaikutus, syövän kasvua hidastava vaikutus ja kyky inhiboida tiettyjen syövän kehittymistä edistävien entsyymien toimintaa (Meltzer & Malterud 1997, Bravo 1998).

Kuten aiemmin mainittiin, eräitä flavonoideja koskevat tutkimukset ovat ristiriitaisia ja syöpää estävän ominaisuuden ohella näillä yhdisteillä on todettu olevan genotoksisia ja pro-oksidiatiivisia vaikutuksia *in vitro*. Erityisesti kversetiinin eniten tutkittuna flavonoidina on todettu useissa koe-eläimillä tehdyissä tutkimuksissa toimivan mahdollisena karsinogeeninä. On epäselvää, toimiiko kversetiinin syöpää indusoiva mekanismi samalla tavalla ihmisen elimistössä. Koe-eläimillä tehdyissä tutkimuksissa on käytetty hyvin suuria pitoisuuksia, joita ihminen ei voi saada mitenkään ravinnosta. Tässä mielessä koe-eläintutkimusten soveltaminen ihmiseen on kyseenalaistettava. Ihmisillä tehdyissä kokeissa näyttöä kversetiinin syöpää aiheuttavasta ominaisuudesta ei ole saatu. Myöskään epidemiologisissa tutkimuksissa ei ole havaittu mitään riskiä flavonoidien suhteen (Bein-

holt 1999).

Vaikka useiden epidemiologisten tutkimusten mukaan runsas hedelmien ja kasvien syönti suojaa erityyppisiltä syöpäsairauksilta, flavonoidien suojaavaa vaikutusta ei ole kyetty epidemiologisissa tutkimuksissa lopullisesti osoittamaan. Kolmesta tehdystä tutkimuksesta kahdessa ei havaittu yhteyttä syöpäsairauksilla ja flavonoidien saannilla (Hertog 1996, Hertog et al. 1994, Goldbohm et al. 1995). Sen sijaan Knekt et al. (1997) havaitsivat käänteisen riippuvuuden flavonoidien saannilla ja syöpäsairauksien esiintyvyydellä.

Kuten flavonoideilla myös fenolisilla hapoilla on eläinkokeissa todettu syöpää inhiboivia vaikutuksia. Myös fenolisilla hapoilla tehdyissä eläinkokeissa on käytetty suuria pitoisuuksia. Ravinnon fenolisten happojen runsaan esiintyvyyden vuoksi käytetyt tasot ovat olleet lähempänä ihmisten saantilukuja kuin flavonoideilla tehdyissä vastaavissa kokeissa. Monet hyvät flavonoidien lähteet ovat myös hyviä fenolisten happojen lähteitä. Todennäköisesti yksin epidemiologisten tutkimusten perusteella on vaikea päätellä, onko mahdollisten positiivisten vaikutusten takana flavonoidit, fenoliset hapot tai vaikuttavatko nämä yhdisteet synergisesti. Tähän mennessä epidemiologisia tutkimuksia fenolisten happojen mahdollisesta vaikutuksesta syövän syntyyn ei ole tehty (Breinholt 1999).

#### **4.7 Flavonoidien ja fenolisten happojen vaikutukset sydän- ja verisuonitautien estossa**

Useissa *in vitro* – ja eläinkokeissa on saatu lupaavia tuloksia flavonoidien suojaavasta vaikutuksesta sydän- ja verisuonitautia vastaan. Flavonoidit pystyvät säätelemään monia prosesseja, joiden arvellaan olevan syynä edellä mainitun sairauden kehittymiseen. Flavonoidit mm. estävät tai viivyttävät LDL:n hapettumista. Lisäksi eräiden flavonoidien on havaittu inhiboivan plakkin kiinnittymistä ja kasautumista, toimivan lipoksigenaasin ja syklo-oksigenaasin inhi-

biittorina ja tämän johdosta vähentävän tromboksaani A2:n muodostumista, edistävän seerumin triglyseriditasoja alentavien sappihappojen eritystä ja hajottavan jo muodostuneita verisuonitukoksia (Melzer & Malterud 1997).

Yhteensä kuusi epidemiologista tutkimusta on tehty flavonoidien vaikutuksesta sydän- ja verisuonitautien estossa (Hertog et al. 1993, Hertog et al. 1995, Keli et al. 1996, Knekt et al. 1996, Hertog et al. 1997, Rimm et al. 1996). Flavonoidien saannilla ja sydän- ja verisuonitautien esiintyvyydellä havaittiin käänteinen yhteys neljässä edellä mainitussa tutkimuksessa. Esim. Hertogin et al. (1993) mukaan riski kuolla sydän- ja verisuonitautiin oli 65 % matalampi niillä, jotka saivat eniten flavonoideja (ylin tertiili, 42 mg/vrk) verrattuna vähiten flavonoideja saavaan ryhmään (alin tertiili, 12 mg/vrk). Hertog et al. 1995, Keli et al. 1996 ja Knekt et al. 1996 saivat samansuuntaisia tuloksia. Hertog et al. (1993, 1995) tutkivat vain flavonolien saantia ja havaitsivat elintarvikeryhmistä teen olevan tärkein tämän yhdisteryhmän lähde. Jopa 61% flavonolien saannista tuli teestä. Tämän vuoksi nimenomaan teen juonnin arveltiin edistävän terveyttä. Walesissa tehty tutkimus (Hertog et al. 1997) antoi päinvastaisia tuloksia; eniten flavonoideja saaneiden (ylin tertiili, 43 mg/vrk) kuolleisuus oli yleisempää kuin vähiten flavonoideja saaneiden (alin tertiili, 14 mg/vrk). Tämän arveltiin johtuvan siitä, että teen juonti on Walesissa kytköksissä epäterveellisiin elintapoihin kuten tupakanpolttoon ja runsaaseen rasvojen käyttöön. Laajin epidemiologinen tutkimus flavonoidien terveysvaikutuksista tehtiin Yhdysvalloissa vuonna 1996 (Rimm et al. 1996). Myöskään tässä tutkimuksessa korrelaatioita flavonoidien saannin ja sydän- ja verisuonitautien esiintyvyyden välillä ei saatu. Knekt et al. (1996) sen sijaan havaitsivat lievän käänteisen korrelaation flavonolien saannin ja sairastavuuden välillä.

*In vitro* -tutkimukset osoittavat, että fenolisilla hapoilla on flavonoidien kaltaisia sydän- ja verisuonitautia ehkäiseviä ominai-

suuksia. Esimerkiksi kahvi-, kumariini-, ja protokatekiinihapot pystyvät estämään LDL:n hapettumista, kahvi- ja kumariinihapot toimivat synergistisesti  $\alpha$ -tokoferolin kanssa ja klorogeeni-, kahvi- ja ferrulihapot toimivat lipoksigenaasin ja syklo-oksogenaasin inhibiittoreina. Yhtäkään epidemiologista tutkimusta ei vielä ole tehty fenolihappojen roolista sydän- ja verisuonitautien estossa (Breinholt 1999).

## 4.8 Yhteenveto

Flavonoidien mahdollinen suojaava vaikutus sydän- ja verisuonitaudeilta on epidemiologisin tutkimuksin selkeämmin osoitettu kuin suojaava vaikutus syöpäsairauksilta. Toisaalta epidemiologisissa tutkimuk-

sisssa haetaan vain korrelaatioita, jotka voivat johtaa harhaan. *In vitro*- ja biologisissa tutkimuksissa on saatu hyvin ristiriitaisia tuloksia fenolisten yhdisteiden terveysvaikutuksista. Tutkimuksissa käytetyt pitoisuudet ovat olleet lähes poikkeuksetta hyvin suuria, jollaisia ei voi saada elintarvikkeita normaalisti nauttimalla. Tutkimusten vertailua hankaloittaa myös se, että on käytetty erilaisia elintarvikkeutteita eikä puhdasaineita, on mitattu erilaisia asioita ja tutkimukset on tehty erilaisissa olosuhteissa. Lisäksi eläinkokein saatuja tuloksia ei voi suoraan soveltaa ihmiseen. Vaikka flavonoidit ja fenoliset hapot ovat lupaavia terveysvaikutteisia yhdisteitä, tarvitaan vielä paljon tutkimusta ennen kuin niiden positiiviset vaikutukset pystytään lopullisesti osoittamaan.

## Kirjallisuus

---

**Ames, B.N., Shigenaga, M.K. & Hagen, T.M.** 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7915–7922.

**Bravo, L.** 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56: 317–333.

**Breinholt, V.** 1999. Desirable versus harmful levels of intake of flavonoids and phenolic acids. In: Kumpulainen, J. & Salonen, J. (eds.). *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease, the proceedings of the Second International Conference on natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease held on 24-27 June 1998 in Helsinki*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. p. 93–105. ISBN 0-85404-793-X.

**Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A., Hertog, M.G.L., Brants, H.A.M. & van Poppel, G.** 1995. Flavonoid intake a risk of cancer: a prospective cohort study. *American Journal of Epidemiology* 141: 6, Supplements.

**Hertog, M.G.L.** 1996. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceedings of the Nutrition Society* 55: 385–397.

–, **Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. & Kromhout, D.** 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007–1011.

–, **Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. & Kromhout, D.** 1994. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen elderly study. *Nutrition and Cancer* 22: 175–184.

–, **Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H. & Katan, M.B.** 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Archives of Internal Medicine* 155: 381–386.

–, **Sweetnam, P.M., Fehily, A.M., Elwood, P.C. & Kromhout, D.** 1997. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 65: 1489–1494.

- Keli, S.O., Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M & Kromhout, D.** 1996. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. *Archives of Internal Medicine* 156: 637–642.
- Knekt, P., Järvinen, R., Reunanen, A. & Maatela, J.** 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British medical journal* 312: 478–481.
- , **Järvinen, R., Seppänen, R., Heliovaara, M., Teppo, L., Pukkala, E. & Aromaa, A.** 1997. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology* 146: 223–230.
- Kumpulainen, J.T, Lehtonen, M. & Mattila, P.** 1999. Trolox equivalent antioxidant capacity of average flavonoids intake in Finland. In: Kumpulainen, J. & Salonen, J. (eds.). *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease, the proceedings of the Second International Conference on natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease held on 24-27 June 1998 in Helsinki*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. p. 141–150. ISBN 0-85404-793-X.
- Meltzer, H.M. & Malterud, K.E.** 1997. Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? *Scandinavian Journal of Nutrition* 41: 50–57.
- Moran, J.F., Klucas, R.V, Grayer, R.J., Abian, J. & Becana, B.** 1997. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biology & Medicine* 22: 861–870.
- Murphy Covan, M.** 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564–582.
- Otero, P., Viana, M., Herrera, E. & Bonet, B.** 1997. Antioxidant and prooxidant effects of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and flavonoids on LDL submitted to different degrees of oxidation. *Free Radical Research* 27: 619–626.
- Radtke, J., Linseisen, J. & Wolfram, G.** 1998. Phenolsäurezufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 37: 190–197.
- Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J. & Willet, W.C.** 1996. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Annals of Internal Medicine* 125: 384–389.
- Shahidi, F. & Wanasundra, P.K.J.P.D.** 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32: 67–103.
- Steinmetz, K.A. & Potter, J.D.** 1991. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes and Control* 2: 325–357.

# 5 Lignaani-terveysvaikutuksia

Helena Hyvärinen & Marianne Taipale

*MTT, Elintarvikkeiden tutkimus, Elintarvikekemian ja -tekniikka,  
31600 Jokioinen, [helena.byvarinen@mtt.fi](mailto:helena.byvarinen@mtt.fi)*

Lignaaneilla on todettu olevan paljon terveydelle edullisia ominaisuuksia. Ne voivat mm. pienentää riskiä sairastua hormoniperäiseen syöpään, kuten rintai- tai eturauhassyöpään,

diabetekseen tai sydän- ja verisuonitauteihin. Pellava on yksi rikkaimmista lignaaneita sisältävistä kasveista ja sen yleisin lignaani on sekoiisolarisiresinoli.

*Avainsanat: terveysvaikutukset, diabetes, sydän- ja verisuonitaudit, syöpä, kemialliset yhdisteet*

## 5.1 Johdanto

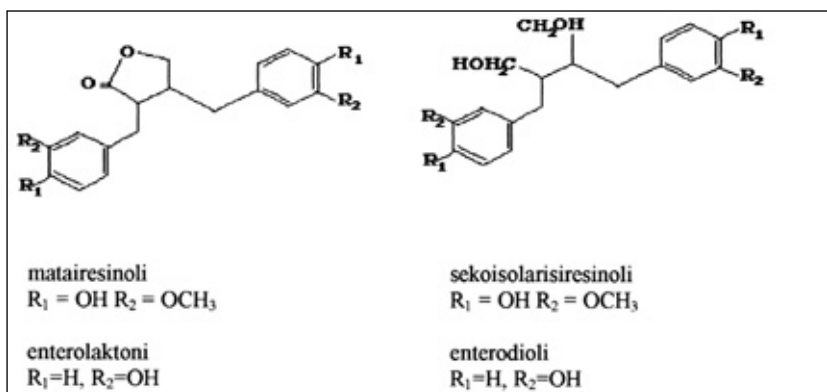
Lignaaneja on tavattu yleisesti korkeimmista kasveista. Niitä on eristetty juurista, lehdistä, kuorista, varren puuosasta ja hartasieritteistä (von Schanz & Hiltunen 1990). Lignaanit toimivat kasveissa puolustusmekanismina mm. kasvitauteja ja hyönteisiä vastaan ja niillä on luultavasti yhteyttä kasvien kasvun säätelyyn (Ayres & Loike 1990). Lignaanit ovat yleensä dimeerejä, joissa on dibentsyylibutaani runko (Pat. US. 5705618). Ne muodostuvat kahdesta fenyylipropanoidiysiköstä sivuketjujen keskimmäisten hiilien muodostamien hiili-hiilidosten tai muiden molekyylien välisten sidosten avulla. Kuvassa 8 on esitetty esimerkkinä sekoiisolarisiresinolin, matairesinolin, enterodiolin ja enterolaktonin kemialliset rakenteet.

Kasviperäiset lignaanit ovat luonnossa esiintyviä hormoninkaltaisia fenolisia fytoestrogeneja (von Schanz & Hiltunen 1990). Suolistobakteerit muuntavat kasvipäisiä lignaaneja nisäkäslignaaneiksi.

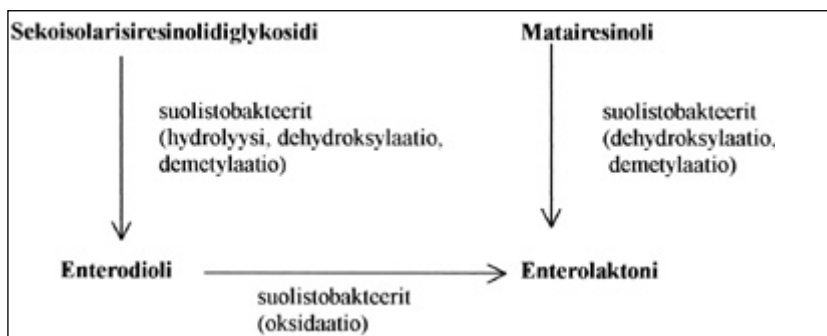
Näin mm. sekoiisolarisiresinoli muuttuu enterodioliksi, joka edelleen suolistobakteerien avulla voi hapettua enterolaktoniksi. Matairesinoli voi hajota suoraan enterolaktoniksi (Adlercreutz 1984, Setchell 1995, Thompson et al. 1996, Rickard & Thompson 1997). Kuvassa 9 on esitetty nisäkäslignaani-terveysvaikutuksia.

Erityisesti Aasiassa käytetään paljon seesaminsiemeniä ja -öljyä. Seesaminsiemenet sisältävät bisepoksilignaaneja kuten seesaminia (0,2–0,5 %) ja seesamolonia (0,2–0,3 %) (Shukla et al. 1996). Seesaminsiemennistä saatavassa öljyssä on puolestaan paljon seesaminolia, joka on antioksidatiivinen. Kang et al. (2000) totesivat, että seesaminoli on tehokkaampi radikaalien sieppaaja kuin esim.  $\alpha$ -tokoferoli ja että se voi estää LDL-kolesterolin hapettumista. Muita viime vuosina paljon tutkittuja lignaaneja on kuudessa esiintyvä hydroksimatairesinoli (HMR), joka soveltuu syövän ehkäisyyn (mm. Saarinen et al. 2000). HMR:n rakenne on esitetty kuvassa 10.

Pellava on yksi rikkaimmista lignaaneita

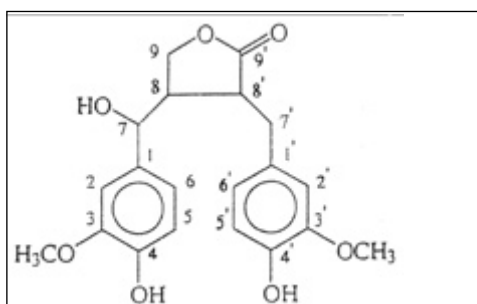


**Kuva 8.** Matairesinoli, sekoisolarisiresinoli, enterolaktoni ja enterodioli.



**Kuva 9.** Nisäkäslignaaniin syntyminen.

sisältävistä kasveista. Se sisältää jopa 800 kertaa enemmän lignaaneja kuin mikään muu kasviperäinen elintarvike. Pellavan yleisin lignaani on sekoisolarisiresinoli, joka esiintyy glukosidina tai diglukosidina



**Kuva 10.** Hydroksimatairesinolin (HMR) rakennekaava.

(Thompson et al. 1991). Obermeyerin et al. (1995) ja Mazurin et al. (1996) mukaan sekoisolarisiresinolia on pellavansiemenissä 800–3700 mg/kg ja pellavansiemenjauhoissa 2260 mg/kg. Uusimpien tutkimuksien mukaan määrät ovat huomattavasti suurempia. Johansonin et al. (2000) mukaan pellavan siemenessä on sekoisolarisiresinolia 3000–6500 mg/kg. Astola & Kumpulainen (2001) raportoivat pellavarouheen sekoisolarisiresinolipitoisuudeksi 7000 mg/kg. Mazur et al. (1996) ovat löytäneet pellavan siemenestä matairesinolia 11 mg/kg. Matairesinolin esiintymisestä pellavassa on ristiriitaista tietoa, usein pellavansiemenissä kerrotaan olevan vain sekoisolarisiresinolia. Matairesinolipitoisuuksien on havaittu suurenevan silloin, kun kasvi altistuu sienitaudeille (Ayres & Loike

1990). Pellavan lignaanipitoisuudet vaihtelevat huomattavasti eri lajikkeiden ja kasvupaikkojen välillä (Thompson et al. 1997).

Tämän kirjallisuuskatsauksen pääpaino on pellavassa esiintyvässä sekoisolarisiresinolissa ja sen glykosidissa sekä enterodioli- ja enterolaktoninisäksilignaaneissa.

## 5.2 Vaikutus syövän estossa

Fytoestrogenien tutkimus alkoi eläinlääketieteellisillä tutkimuksilla. Lampailla ja karjalla huomattiin suuria lisääntymisongelmia alfa-alfa- ja apilapitoisessa ruokinnassa, koska niissä oli paljon fytoestrogenejä. Lignaanien ihmisen terveydelle positiivisia vaikutuksia on tutkittu vasta vuodesta 1981 (Adlercreutz 1996). Lignaanit ovat useiden tutkimusten mukaan antikinogeenisia *in vitro*-solukkoviljelyissä sekä *in vivo*-eläinkokeissa. Lignaanien on osoitettu vaikuttavan ihmisten leukemiasyöpäsolujen jakautumista ja kasvua estävästi (Kurzer et al. 1995). Thompsonin (1993) mukaan tämä johtuu siitä, että estrogeneillä on kasvua sääteiviä ominaisuuksia. Sekoisolarisiretinolidiglykosidi (SDG) vähentää kasvaimien määrää sekä kasvunopeutta rotilla (Thompson et al. 1997). Rickard et al. (2000) esittivät, että pellava ja SDG voivat vähentää plasman insuliinin kaltaista kasvutekijä I:stä (IGF-I), joka on maksassa syntetisoituvaa 70 aminohaposta koostuva polypeptidi. Useissa tutkimuksissa naisilla, joilla on suuri riski sairastua rintasyöpään, ovat plasman IGF-I pitoisuudet korkeat. Kun plasmassa oleva IGF-I määrä pienenee, niin riski sairastua rintasyöpään voi pienentyä.

Nisäksilignaanit käyvät läpi enterohepaattisen kierron (Thompson et al. 1991, Setchell 1995, Jenab & Thompson 1996) eli ne absorboituvat suolistosta, kulkeutuvat maksaan, jonka jälkeen ne palautuvat sapen kautta uudelleen kiertoonsa. Sen jälkeen ne poistuvat paksusuoleen ja lignaanit reabsorboituvat pääasiassa konjugaatteina. Osa lignaaneista kulkeutuu munuun ja poistuu virtsan mukana. Useat kokeet osoitta-

vat, että enterodiolin ja enterolaktonin määrät ihmisen ja rotan virtsassa ovat suoraan verrannollisia kasviperäisten lignaanien määrään ruokavaliossa. Rickard et al. (1996) tutkivat pellavan ja sekoisolarisiretinolidiglykosidin (SDG) vaikutusta rotilla suoritetussa kokeessa. Virtsasta mitattiin enterolaktonin (EL), enterodiolin (ED) ja vapaan sekoisolarisiretinolin (SECO) pitoisuudet. Pitoisuudet virtsassa lisääntyivät lineaarisesti pienillä pellava- tai SDG-määrillä mutta isommilla määrillä mitatut pitoisuudet virtsassa eivät enää lisääntyneet merkittävästi. Kun ruokinnassa käytettiin SDG:tä, niin EL, ED ja SECO määrät virtsassa olivat vain 10–20 % teoreettisesta arvosta. Tämä selittyy joko SDG epätäydellisestä hydrolyysistä, bakteerien vaikutuksesta, hajoamisesta muiksi tuotteiksi tai enterolaktonin ja enterodiolin metaboloitumisesta muiksi yhdisteiksi. Hydrolysoimattomaa SDG:a ei havaittu mittauksissa.

Rintasyöpää potevilla menopausaalisilla sekä postmenopausaalisilla naisilla on virtsassa hyvin matalat määrät lignaaneja (Rickard & Thompson 1997). Adlercreutzin et al. (1986, 1992a/b) mukaan enterolaktonin ja enterodiolin määrät virtsassa ovat merkittävästi pienemmät rintasyöpää sairastavilla potilailla, ei-vegetaristeilla ja niillä, joilla on suuri riski saada hormoniperäinen syöpä verrattuna vegetaristeihin tai niihin, joilla on pienempi riski sairastua hormoniperäisiin syöpiin. Japanissa ja Kiinassa hormoniriippuvaisten syöpien esiintymistiheys on melko alhainen verrattuna esim. USA:han. Suomessa näitä syöpiä esiintyy vähemmän kuin USA:ssa mutta selvästi enemmän kuin Japanissa. Japanissa on viime vuosina luovuttu perinteisestä japanilaisesta ruokakulttuurista ja siirrytty käyttämään länsimaista ruokaa, mikä selittää sen, että Japanissa hormoniriippuvaisten syöpien määrä on lisääntynyt (Adlercreutz 1996).

Lee et al. (1991) ja Obermeyer et al. (1995) osoittivat myös, että fytoestrogenejä sisältävä ruoka saattaa pienentää riskiä sairastua rinta-, suolisto- ja eturauhassyöpiin sekä sydän- ja verisuonitautiin. Jenab ja Thompson (1996) totesivat, että



ruokavalio on yksi suurimmista ympäristötekijöistä, joka vaikuttaa paksusuolen syövän syntyyn. Lee et al. (1991) tutkivat ruuan vaikutusta naisten rintasyöpään ja totesivat ravinnon erilaisen merkityksen ennen vaihdevuosisa ja niiden jälkeen. Tämä johtuu hormonaalisista muutoksista. Heidän mukaansa ruokavalio, jossa on vähän rasvaa ja paljon kasvisproteiineja ja -öljyjä, antaa hyvän suojan rintasyöpää vastaan.

Vielä ei ole osattu selittää tarkasti, miksi ja miten pellava ja sen sisältämät lignaanit estävät syöpäsolujen muodostusta. Useita mahdollisia mekanismeja on kuitenkin esitetty kuten lignaanien antioksidatiiviset ominaisuudet ja vaikutukset aromataasin aktiivisuuteen, plasman sukupuolihormoneihin sitoutuneeseen globuliiniin (SDHG) ja 7- $\alpha$ -hydroksylaasiin (Thompson 1995, Oomah & Mazza 1998). Enterodioliin ja enterolaktonin on todettu toimivan rinta- ja paksusuolen syövän ehkäisijöinä, koska niillä on mm. antioksidatiivista, heikosti estrogeenistä ja heikosti antiestrogeenistä vaikutusta sekä antiaromataasiaktiiviteettiä (Adlercreutz 1984, Thompson 1994, Jenab & Thompson 1996). Lignaanit toimivat antioksidantteina rakenteensa vuoksi, joten ne estävät lipidien hapettumista ja voivat siepata vapaita radikaaleja. Prasad (1997) on todennut, että SDG on OH-radikaalin sieppaaja. Lisäksi sen todettiin vähentävän lipidien peroksidaatiota. Kitts et al. (1999) totesivat SDG:n, enterolaktonin ja enterodiolin estävän linoleiinihapon peroksidaatiota. Ng et al. (2000) osoittivat, että lignaanit estävät lipidien peroksidaatiota eräissä homogenaateissa. Luultavasti yhdisteiden aromaattisilla hydroksyyliyhdyksillä on tärkeä vaikutus yhdisteiden antioksidatiivisille ominaisuuksille. Wang et al. (1994) totesivat, että sekoisolarisiresinolilla, matairesinolilla, enterodiolilla ja enterolaktonilla on aromataasin aktiivisuutta vähentäviä ominaisuuksia. Aromataasi on tärkein entsyymi steroidihormonien aineenvaihdunnassa. Aromataasin pitoisuuden väheneminen johtaa estrogeenimäärän pienemiseen ja se voi edelleen parantaa miehillä erilaisia eturauhassairauksia sekä estää

naisilla mm. rintasyövän syntymistä (Ganßer & Spitteller 1995).

### 5.3 Muut terveysvaikutukset

Kun ruokavalio sisältää paljon lignaaneja, plasmassa olevien nisäkäslignaaniin määrät ovat hyvin korkeita, jopa 500 ng/ml. Tämä määrä on noin 10 000 kertaa suurempi kuin ihmisen normaali steroidisen estrogeenin estradiolin määrä, ja sillä voi olla biologisia vaikutuksia (Rickard & Thompson 1997). Lignaanit stimuloivat ihmisen plasman sukupuolihormoneihin sitoutuneen globuliinin (sex hormone binding globulin, SHBG) tuotantoa maksassa (Wang et al. 1994). SHBG on proteiini, joka sitoo dihydrotestosteronin, testosteronin ja estradiolin ja säätelee siten sukupuolihormonien pitoisuutta plasmassa. Näin lignaanit pienentävät vapaiden steroidien määrää ja biologista aktiivisuutta sekä estävät hormoniriippuvaisten syöpäsolujen kasvua ja leviämistä (Adlercreutz et al. 1992a/b, Mousavi & Adlercreutz 1992). Matalalla SHBG-pitoisuudella on yhteyttä sydän- ja verisuonitauteihin sekä diabetekseen (Tchernof et al. 1999). Orcheson et al. (1998) osoittivat ensimmäistä kertaa sen, että pellavansiemenet ja niistä eristetty puhdas SDG joko lopettaa tai pidentää rottien estrogeenista kiertoa tai muuttaa sen epäsäännölliseksi. Vaikutukset riippuvat annoksen suuruudesta.

Vanharanta et al. (1999) totesivat enterolaktonin vähentävän riskiä sairastua sepevaltimotauteihin. He totesivat plasman enterolaktonin määrän riippuvan ruuan lignaanipitoisuudesta sekä suolistobakteerien aktiivisuudesta. Esim. antibioottilääkitys vähentää enterolaktonin muodostumista useiden viikkojen ajan.

Prasad et al. (2000) tutkivat rottakoikeilla diabeteksen syntymistä. Vapaiden happiradikaalien on osoitettu olevan yhteydessä diabeteksen puhkeamiseen. SDG voi vaikuttaa antioksidanttina happiradikaaleihin ja siten estää/vähentää diabeteksen riskiä. Kokeissa SDG vähensi diabeteksen muodostumista 75 %. Prasad työryh-

mineen esittää, että SDG voi vähentää tai kenties estää tyyppi 1 eli nuoruusiän diabeteksen puhkeamista.

Lignaanit voivat vaikuttaa myös kolesterolitasapainoon inhiboimalla kolesterolin 7- $\alpha$ -hydroksylaasin aktiviteettiä. 7- $\alpha$ -hydroksylaasi on rajoittava entsyymi primäärisen sappihapon muodostumiselle kolesterolista. Suolistobakteerit muuttavat primääriset sappihapot sekundäärisiksi sappihapoiksi kuten deoksisappihapoksi, jonka on todettu korreloivan positiivisesti paksusuolen syövän riskiin (Thompson 1995).

Eläimillä suoritettujen kokeiden tulosten tulkinnassa täytyy olla varovainen, mikäli niistä vedetään johtopäätöksiä ihmisiin. Esim. rotilla suoritetuissa kokeissa täytyy huomioida rottien ja ihmisten ruuansulatuksen erilaisuus. Ihmisillä fermentaatio tapahtuu suurimmaksi osaksi suolistossa, kun taas rotat ovat pääasiassa umpisuolifermentoitujia. Umpisuolessa on korkeampi  $\beta$ -glukuronidaasipitoisuus kuin suolistossa.  $\beta$ -glukuronidaasin aktiivisuus korreloituu merkittävästi pellavamäärään ja virtsaan erittyviin lignaanimääriin (Jenab & Thompson 1996). Toisaalta  $\beta$ -glukuronidaasin aktiivisuus voi lisätä riskiä sairastua paksusuolensyöpään, koska se lisää mm. karsinogeenisten ja mutageenisten yhdisteiden enterohepaattista kiertoa (Reddy et al. 1992). Se, vähentääkö vai suurentaako

$\beta$ -glukuronidaasi-aktiivisuus syöpäriskiä, riippuu siitä, minkä yhdisteiden enterohepaattista kiertoa se lisää.

Vaikka pellava on yksi parhaimmista lignaanin lähteistä, sillä suoritettujen kokeiden eivät ole vertailukelpoisia eristetyillä lignaaneilla tehtyjen kokeiden kanssa. Pellavansiemenissä on ilmeisesti muita enterodiolin ja enterolaktonin esiasteita kuin yleisimmin analysoidut lignaanit (Rickard & Thompson 1998). Puhdistetun SDG:n on todettu vaikuttavan kuten pellavansiemenet, joten on oletettavissa, että pellavansiemenen suojaavat vaikutukset voivat osittain johtua sen sisältämistä lignaaneista (Jenab & Thompson 1996). Lisäksi yksilölliset tekijät vaikuttavat lignaanien metaboliassa (Rowland et al. 2000).

Eräiden tutkimuksien mukaan eräät fytoestrogenit voivat olla haitallisia ihmisille (Thompson 1993, Stone 1994). Lignaanit ja fytoestrogenit voivat eräissä tapauksissa kiihdyttää kasvaimien kasvua, koska estrogeeneilla on kasvua edistäviä vaikutuksia (Miller 1990, Thompson 1993). Thompsonin (1993) mukaan lignaanien aromaattinen koostumus antaa aiheutta olettaa lignaanien olevan mahdollisesti karsinogeenisiä. Eräät puhdistetut lignaanit, kuten podofyllumi, ovat toksisia ja voivat aiheuttaa suurina määrinä väsymystä, oksentelua ja jopa kooman (Ayres & Loike 1990).

## Kirjallisuus

---

**Adlercreutz, H.** 1984. Does fiber-rich food containing animal lignan precursors protect against both colon and breast cancer? An extension of the "Fiber hypothesis". *Gastroenterology* 86 (4): 761–766.

– 1996 Lignans and isoflavonoids. In: Mälkki, Y. & Cummings, J.H. (eds.) COST Action 92: Dietary fibre and fermentation in colon. Bruxelles: European Commission. p. 324–332. ISBN 92-827-6931-3.

–, **Fotsis, T., Bannwart, C., Wähälä, K., Mäkelä, T., Brunow, G. & Hase, T.** 1986. Determination of urinary lignans and phytoestrogens metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets. *Journal of Steroid Biochemistry* 25 (5B): 791–797.

–, **Mousavi, Y., Clark, J., Höckerstedt, K., Hämäläinen, E., Wähälä, K., Mäkelä, T. & Hase, T.** 1992a. Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *Journal of Steroid Biochemistry*

and *Molecular Biochemistry* 41(3-8): 331–337.

–, **Mousavi, Y. & Hockerstedt, K.** 1992b. Diet and breast cancer. *Acta Oncologica* 31(2): 175–181.

**Astola, J. & Kumpulainen, J.** 2001. Lignaanit. In: Kumpulainen, J. (ed.). *Suomalaisten elintarvikkeiden ravitsemuksellinen laatu ja kemiallinen turvallisuus*. Jokioinen: MTT. p. 20–22. ISBN 952-5244-06-7.

**Ayres, D. & Loike, J.D.** 1990 Lignans: chemical, biological and clinical properties. *Chemistry and pharmacology of natural products series 1*. Cambridge: Cambridge University Press. 422 p. ISBN 0 521 30421 0.

**Ganßer, D. & Spiteller, G.** 1995. Aromatase inhibitors from *Urtica dioica* roots. *Planta Medica* 61 (2): 138–140.

**Jenab, M. & Thompson, L.U.** 1996. The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and  $\beta$ -glucuronidase activity. *Carcinogenesis* 17 (6): 1343–1348.

**Johansson, P., Kamal-Eldin, A., Lundgren, L.N. & Åman, P.** 2000. HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11): 5216–5219.

**Kang, M.-H., Naito, M., Sakai, K., Uchida, K. & Osawa, T.** 2000. Mode of action of sesame lignan in protecting low-density lipoprotein against oxidative damage in vitro. *Life Science* 66 (2): 161–171.

**Kitts, D.D., Yuan, Y.V., Wijewickreme, A.N. & Thompson, L.U.** 1999. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodio and enterolactone. *Molecular and Cellular Biochemistry* 202 (1-2): 91–100.

**Kurzer, M.S., Slavin, J.L. & Adlercreutz, H.** 1995. Flaxseed, lignans and Sex hormones. In: Cunnane, S.C. & Thompson, L.U (eds.). *Flaxseed in human nutrition*. Champaign (IL, USA): AOCS Press. p. 136–144. ISBN 0-935315-60-8.

**Lee, H.P., Gourley, L., Duffy, S.W., Estéve, J., Lee, J. & Day, N.E.** 1991. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* 337 (8751): 1197–1200.

**Mazur, W., Fotsis, T., Wähälä, K., Ojala, S., Salakka, A. & Adlercreutz, H.** 1996. Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol and lignans in food samples. *Analytical Biochemistry* 233 (2): 169–180.

**Miller, W.R.** 1990. Endocrine treatment for breast cancer: Biological rationale and current progress. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biochemistry* 37(4): 467–480.

**Mousavi, Y. & Adlercreutz, H.** 1992. Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biochemistry* 41(3-8): 615–619.

**Ng, T.B., Liu, F. & Wang, Z.T.** 2000. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Science* 66 (8): 709–723.

**Obermeyer, W.R., Musser, S.M., Betz, J.M., Casey, R.E., Pohland, A.E. & Page, S.W.** 1995. Chemical studies of phytoestrogens and related compounds in dietary supplements: flax and chapparral. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208 (1): 6–12.

**Oomah, B.D & Mazza, G.** 1998. Flaxseed products for disease prevention. In: Mazza, G. (ed.). *Functional Foods: Biochemical and processing aspects*. Lancaster: Technomic publishing. p. 91–138. ISBN 1-56676-487-4.

**Orcheson, L.J., Rickard, S.E., Seidl, M.M. & Thompson, L.U.** 1998. Flaxseed and its mammalian lignan precursor cause a lengthening or cessation of estrous cycling in rats. *Cancer Letters* 125 (1,2): 69–76.

Pat. US. 5705618. Process for extracting lignans from flaxseed. Westcott, N.D. & Muir, A.D. 6.1.1998. 10 p.

**Prasad, K.** 1997. Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flaxseed. *Molecular and Cellular Biochemistry* 168 (1/2): 117–123.

–, **Mantha, S.V., Muir, A.D & Westcott, N.D.** 2000. Protective effect of secoisolariciresinol diglucoside against streptozotocin-induced diabetes and its mechanism. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 206 (1-2): 141–149.

**Reddy, B.S., Engle, A., Simi, B. & Goldman, M.** 1992. Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology* 102 (5): 1475–1482.

**Rickard, S.E., Orcheson, L.J., Seidl, M.M., Luyengi, L., Fong, H.H.S. & Thompson, L.U.** 1996. Dose-dependent production of mammalian lignans in rats and in vitro from the purified precursor secoisolariciresinol diglycoside in flaxseed. *The Journal of Nutrition* 126 (8): 2012–2019.

- & **Thompsson, L.U.** 1997. Phytoestrogens and lignans: Effects on reproduction and chronic disease. In: Shahidi, F. (ed.). Antinutrients and phytochemicals in food. Washington: American Chemical Society. p. 273–293. ISBN 0-8412- 3498-1.
- & **Thompson, L.U.** 1998. Chronic exposure to secoisolariciresinol diglycoside alters lignan disposition in rats. *The Journal of Nutrition* 128 (3): 615–623.
- , **Yuan, Y.V. & Thompson, L.U.** 2000. Plasma insulin-like growth factor I levels in rats are reduced by dietary supplementation of flaxseed or its lignan secoisolariciresinol diglycoside. *Cancer Letters* 161 (1): 47–55.
- Rowland, I.R., Wiseman, H., Sanders, T.A.B., Adlercreutz, H. & Bowey, E.A.** 2000. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutrition and Cancer* 36 (1): 27–32.
- Saarinen, N.M., Wärrri, A., Mäkelä, S.I., Eckerman, C., Reunanen, M., Ahotupa, M., Salmi, S.M., Franke, A.A, Kangas, L. & Santti, R.** 2000. Hydroxymatairesinol, a novel enterolactone precursor with antitumor properties from coniferous tree (*Picea abies*). *Nutrition and Cancer* 36 (2): 207– 216.
- Setchell, K.D.R.** 1995. Discovery and potential clinical importance of mammalian lignans. In: Cunnane, S.C. & Thompson, L.U (eds.). Flaxseed in human nutrition. Champaign (IL, USA): AOCS Press. p. 82–98. ISBN 0-935315-60-8.
- Shukla, V.K.S., Wanasundara, P.K.J.P.D & Shahidi, F.** 1996. Natural antioxidant from oilseeds. In: Shahidi, F. (ed.). Natural antioxidants: Chemistry, health, effects and applications. Champaign (IL, USA): AOCS Press. p. 97–132. ISBN 0-935315-77-2.
- Stone, R.** 1994. Environmental estrogens stir debate. *Science* 265 (7): 308–310.
- Tchernof, A., Toth, M.J. & Poehlman, E.T.** 1999. Sex-hormone-binding globulin levels in middle-aged premenopausal women. Association with visceral obesity and metabolic profile. *Diabetes Care* 22 (11): 1875–1881.
- Thompson, L.U.** 1993. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Research International* 26 (2): 131–149.
- 1994. Antioxidants and hormone-mediated health benefits of whole grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34 (5&6): 493–497.
- 1995. Flaxseed, lignans and cancer. In: Cunnane, S.C. & Thompson, L.U (eds.). Flaxseed in human nutrition. Champaign (IL, USA): AOCS Press. p. 219–236. ISBN 0-935315-60-8.
- , **Rickard, S.E., Cheung, F., Kenachuk, E.O. & Obermayer, W.R.** 1997. Variability in anticancer lignan levels in flaxseed. *Nutrition and Cancer* 27(1): 26–30.
- , **Robb, P., Serraino, M. & Cheung, F.** 1991. Mammalian lignan production from various foods. *Nutrition and Cancer* 16 (1): 43–52.
- , **Seidl, M.M., Rickard, S.E., Orcheson, L.J. & Fong, H.H.S.** 1996. Antitumorigenic effect of mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutrition and Cancer* 26 (2): 159–165.
- Vanharanta, M., Voutilainen, S., Lakka, T.A., van der Lee, M., Adlercreutz, H. & Salonen, J.T.** 1999. Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: a prospective population-based case-control study. *Lancet* 354 (9196): 2112–2115.
- von Schantz, M. & Hiltunen, R.** 1990. Farmakognosia: rohdokset, luontaistuotteet ja mausteet, yleinen osa. 2nd ed. Helsinki: Yliopistopaino. 308 p. ISBN 951-570-062-0.
- Wang, C., Mäkelä, T., Hase, T., Adlercreutz, H. & Kurzer, M.** 1994. Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human predipocytes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biochemistry* 50 (3/4): 205–212.

# 6 Prosessointien vaikutus fenolisiin yhdisteisiin

Helena Hyvärinen

*MTT, Elintarvikkeiden tutkimus, Elintarvikekemian ja -tekniikka,  
31600 Jokioinen, [helena.byvarinen@mtt.fi](mailto:helena.byvarinen@mtt.fi)*

Erilaisilla prosessoinneilla sekä entsymaattisilla ruskettumisreaktioilla voi olla vaikutusta elintarvikkeiden fenolisten yhdisteiden pitoisuuksiin.

*Avainsanat: fenolit, kemialliset yhdisteet, käsittely*

## 6.1 Yleistä

Flavonoidit antavat kasveille ja hedelmille mm. väriä ja makua. Esim. kemferoli, kversetiini ja myrisetiini aiheuttavat vihreän teen värin. Useiden kasvien punainen, sininen ja violetti väri on peräisin antosyaniineistä. Kasveista on löydetty yli 200 erilaista antosyaniinia ja näistä lähes 70 löytyy hedelmistä. Fenolisilla yhdisteillä on yhteyttä useiden kasvi- ja eläinperäisten elintarvikkeiden makuun. Ne antavat mm. happaman, kitkerän tai fenoliselta vaikuttavan maun.

Oluen kitkerä maku on osin peräisin klorogeenihaposta. Perunan kitkeräisyys johtuu fenolisista yhdisteistä ja flavonoidien glykosidit aiheuttavat puolestaan sitrushedelmien kitkeräyden. Greipin kitkerään makuun vaikuttaa naringiini. Hedelmämehuissa flavonolit osallistuvat mehujen sakan ja sedimenttien muodostumiseen. Fenolisten yhdisteiden johdannaiset antavat makua myös useille yrteille. Chilippurien vä-

kevä ja kirpeä maku johtuu kapsasiinista. Inkiväärin kirpeys johtuu puolestaan vanilliinin johdannaisista. Fenoliset yhdisteet antavat makua myös maitotaloustuotteille. Eräät kypsytetyt italialaiset juustot kuten parmesan, provolone ja peconno romano saavat makunsa fenolisista yhdisteistä (Shahidi & Naczki 1995).

Flavonoidit toimivat myös antioksidantteina vähentäen vapaiden radikaalien muodostumista ja siepaten niitä. Flavonoidien kykyä toimia antioksidanttina on tutkittu useissa in vitro-tutkimuksissa mutta in vivo-tutkimuksia on vähemmän (Pietta 2000). Fenolisten yhdisteiden antioksidatiivisuudesta enemmän luvussa 4.3.

Tärkeimmät fenolisten yhdisteiden läheteet ovat kasvikset (mm. vihreät kasvikset, yrtit, tomaatti, retiisi ja sipuli), hedelmät (mm. omena, aprikoosi, sitrushedelmät, luumu ja viinirypäle), marjat (mm. mansikka, herukat, mustikka, vadelma ja kirsikka) sekä eräät juomat kuten tee ja viinit. Suurimmat flavonoidipitoisuudet löytyvät kas-

vien lehdistä sekä muista maanpäällisistä osista, koska flavonoidien synteesi tarvitsee valoa. Ainoana poikkeuksena on sipuli. Koska flavonoidit sijaitsevat usein kuorikerroksissa, niin esim. sipulien ja hedelmien kuoriminen vähentää huomattavasti flavonoidien saantia. Kasvihuoneissa kasvateissa kasveissa on vähemmän flavonoideja kuin ulkona kasvaneissa. Flavonoidipitoisuuksiin vaikuttavat myös monet muut tekijät kuten esim. kypsäysaste ja hedelmän koko.

Yleensä kversetiiniä on hedelmissä ja vihanneksissa vähemmän kuin 10 mg/kg. Toisaalta sipulista kversetiiniä löytyy 330, karpalosta 170, kaalista 110, pavuista ja omenista 50, mustaherukasta 40 ja parsakaalista, salaattista ja teestä 30 mg/kg. Kemferolia löytyy vain kaalista 200, parsakaalista 60, lehtisukurista 50 ja purjosta 35 mg/kg. Yleensä myrsitiinin, luteoliinin ja apigeniinin pitoisuudet ovat alhaisia (<1 mg/kg). Poikkeuksena ovat pavut, (myrsitiiniä 30 mg/kg), paprika (luteoliinia 10 mg/kg) ja lehtiselleri (varsissa luteoliinia 20 ja apigenenia 100 mg/kg). Kversetiiniä on punaviineissä 10 ja hedelmämehuissa alle 5 mg/l. Isoflavonoideja esiintyy soijapavuisissa ja soijatuotteissa. Soijasta löytyy genisteiiniä 2040 ja daiditseiiniä 1185 mg/kg. Isoflavonoideista 99 % on glykosidimuodossa. Kasvisten, marjojen, hedelmien ja muiden elintarvikkeiden flavonoidipitoisuuksia on kartoitettu lukuisissa tutkimuksissa mm. Hertog et al. 1992a,b, Justen et al. 1998, Häkkinen et al. 1999, 2000, Chu et al. 2000. Törrösen kokoamaan kirjallisuuskatsaukseen (1997) on koottu tietoa elintarvikkeiden flavonoidipitoisuuksista.

Lignaaneja esiintyy siemenissä (pellava, seesam, rapsi), jyvässä (vehnä, ruis, kaura), pavuissa (soija, tarhapapu), leseissä (kaura, vehnä), kasviksissa (valkosipuli, kesäkurpitsa, parsat, porkkana, kaalit), marjoissa (karhunvatukka, mansikka, puolukka, karpalo), hedelmissä (päärynä, luumu), teessä ja viineissä (Thompson et al. 1991, Adlercreutz 1996, Mazur 1998, Mazur et al. 1998). Eniten lignaaneja on pellavansiemenissä, joten ruokavalion täydentämi-

nen niillä lisää lignaanien saantia. Lignaanit ovat sitoutuneet tiukasti jyvien ja siementen aleuronikerrokseen. Aleuronikerros koostuu 1–3 solukerroksesta ja on hyvin tiukasti kiinnittynyt ulompaan kuitu- ja kuorikerrokseen. Tämän vuoksi vain kokojyväjauhot sisältävät lignaaneja (Adlercreutz 1996).

Lignaaneista sekolarisiresinolia löytyy pellavansiemenistä 800–6500 ja pellavansiemenjauhosta 2260 mg/kg ja rouheesta 7000 mg/kg (Hertog et al. 1992a/b, Obermeyer et al. 1995, Mazur et al. 1996, Hollman & Arts 2000, Johansson et al. 2000, Astola & Kumpulainen 2001). Mazur et al. (1996) on löytänyt pellavasta myös matairesinolia 11 mg/kg. Lignaaneja löytyy ruukiista 2,3, porkkanasta 4,8, valkosipulista 3,8, parsakaalista 4,4, karpalosta 15,1, mansikasta 15,8 ja teestä 28 mg/kg (Mazur 1998, Mazur et al. 1998). Meagher & Beecher (2000) ovat koonneet tietoa elintarvikkeiden lignaanipitoisuuksista niin, että pitoisuudet on mitattu suoraan sekoisolarisiresinoli ja matairesinoli-pitoisuuksina ja mittaamalla enterolaktonin ja enterodiolin määrät.

Fenolisten yhdisteiden pitoisuuksiin elintarvikkeissa vaikuttavat sekä erilaiset ruskettumisreaktiot että erilaiset prosessoinnit. Flavonoidit voivat aiheuttaa elintarvikkeiden värinmuutosta. Toiset yhdisteet voivat olla normaalioloissa värittömiä, mutta muuttua ruuan prosessoinnissa värilisiksi tuotteiksi (Shahidi & Naczki 1995).

## 6.2 Entsymaattiset reaktiot ja värimuutokset

Elintarvikkeissa tapahtuva ruskettuminen voi olla joko entsyymaattista tai ei-entsyymaattista. Entsyymaattinen ruskettuminen tapahtuu nopeasti, muutaman tunnin tai muutaman päivän kuluessa, kun taas ei-entsyymaattinen ruskettuminen vie useita päivistä muutamaan kuukauteen (Baron et al. 2000).

Entsyymaattisessa ruskettumisessa flavonoidit, joilla on hydroksyyliyhdyt B-ren-

kaassa, hapettuvat alkaalisissa olosuhteissa kinoneiksi. Reaktiota katalysoivat kaikissa kasvimateriaaleissa esiintyvät mono- ja polyfenolioksidaasit. Nämä muodostavat aminohappojen ja proteiinien kanssa kondensaatiotuotteita. Katekiinit reagoivat herkästi hapen kanssa ja jo neutraaleissa olosuhteissa tapahtuu hapettumista ja polymeroitumista ruskeiksi yhdisteiksi (Kühnau 1976). Entsyymien katalysoimaa ruskettumista tapahtuu mm. perunalla ja banaanilla. Nopea kuumennus höyryssä tai vedessä on yleisesti käytetty polyfenylioksidaasin inaktivointimenetelmä ennen tuotteen pakastusta, purkitusta tai kuivausta. Höyryttämisen kesto ja lämpötila on valittava huolellisesti, jotta vältetään ei-toivotut muutokset tuotteen maussa ja rakenteessa. Entsymaattista ruskettumista tapahtuu kasvisten ja hedelmien kypsymisen ja vanhenemisen aikana sekä silloin kun on tapahtunut kasvukudosten vahingoittumista. Useat teknologiset toimenpiteet kuten pilkkominen ja murskaaminen voivat myös aiheuttaa entsymaattista ruskettumista. Siihen vaikuttavat myös säilöntäolosuhteet ja lämpötila. Ruskettumisen nopeus riippuu mm. fenolisten yhdisteiden pitoisuudesta, fenolioksidaasien aktiivisuudesta, pH:sta, lämpötilasta sekä antioksidanttien määrästä. Antosyaniinien värimuutoksiin vaikuttavat edellisten lisäksi muut värittömät fenoliset yhdisteet (Shahidi & Naczk 1995).

Klorogeenihappo on avainsubstraatti hedelmissä tapahtuvalle entsymaattiselle ruskettumiselle esim. omenoissa ja päärynöissä (Shahidi & Naczk 1995). Hedelmien kypsyessä klorogeenihapon määrä vähennee jopa 70 %. Katekiinien ja klorogeenihapon reaktiolla on myös merkitystä, sillä niiden hapettumistuotteilla on voimakkaampi ruskea väri kuin katekiinien ja klorogeenihapon seoksen hapettumistuotteilla (Oszmianski & Lee 1990).

Värimuutoksiin voivat vaikuttaa myös flavonoidien reagoiminen metallien ja suolojen kanssa kuten esim. parsalla. Reaktiota voidaan estää kuorimalla tuote, koska fenoliset yhdisteet esiintyvät pääasiassa kuorikerroksissa (Herrmann 1976). Valkovii-

nien värimuutokset pullottamisen jälkeen ovat ongelmallisia. Erilaiset hapettumistuotteet voivat aiheuttaa epätoivotun kelta-ruskean värisävyn. Sherryviineillä ei esiinny näitä värimuutoksia, koska niiden valmistuksessa käytetyt hiivat toimivat antioksidanteina vähentäen hapettumistuotteiden määrää (Baron et al. 2000).

Entsymaattinen ruskettuminen katsotaan haitalliseksi, mikäli se aiheuttaa liiallista elintarvikkeiden värin muutosta, virhemakua tai -hajua (Burnette 1977). Entsymaattista ruskettumista voidaan kontrolloida mm. fenylioksidaasien inaktivoinnilla tai inhibitiolla, hapen poistolla, redusoivien yhdisteiden lisäyksellä, fenolisten yhdisteiden modifikaatiolla tai vähentämisellä, kinonien määrän vähentämisellä, pH:n alentamisella sekä ruskettumisreaktion tuotteiden poistolla (Shahidi & Naczk 1995).

### 6.3 Prosessointien vaikutus

Pitkälle hapettuneet flavonoidit (flavanonit, flavonit, flavonolit ja useimmat antosyanidiinit) kestävät suhteellisen hyvin lämpöä, happea, kuivuutta ja happamuutta. Toisaalta valo tuhoaa ne melko nopeasti. Tästä syystä normaalit ruuan valmistukset ja prosessoinnit eivät aiheuta suurta menetystä flavonoideille, mikäli ne eivät altistu voimakkaalle valolle (Kühnau 1976).

Mizuno et al. (1992) totesivat tutkimuksessaan, että vapaa kversetiini hajoaa helposti auringonvalon (40 000 lx) vaikutuksesta. 15 000 lx valo tuhoaa puolet kversetiinistä 48 tunnissa. 12 000 lx valoa kversetiini kesti hyvin jopa kahdeksan tuntia mutta sen jälkeen alkoi nopea hajoaminen. Kversetiinin on toisaalta lämpöstabiili, sillä se kestää kuumentamisen 200 °C lämpötilassa 20 minuutin ajan.

Häkkinen et al. (2000b) tutkivat prosessointien ja säilytyksen vaikutusta marjojen flavonoidipitoisuuksiin. Puolukoiden kversetiinipitoisuus laski 40 %, kun marjoja survottiin ja säilytettiin yön yli +4 – +6 °C:n lämpötilassa. Tämä selittyi kemiallisilla ja

entsymaattisilla reaktioilla, jotka alkavat heti kun marjojen soluseinät rikkoutuvat. Mansikoilla kversetiinipitoisuus laski keittämisen aikana 15 % ja kemferolipitoisuus 18 %. Keittäminen sokerin kanssa ei vaikuttanut mansikan kversetiiniin yhtä paljon kuin keittäminen veden ja sokerin kanssa mustikkaan. Mustikkakeitossa vain 60 % kversetiinistä oli jäljellä. Kversetiinistä suurin osa jää mehun valmistuksessa syntyvään kiinteään jätteeseen. Perinteisellä menetelmällä valmistettuihin mustaherukkamehuihin siirtyi kversetiinistä vain 15 % ja myristiinistä 30 %. Kylmäpuristetussa mustaherukkamehussa oli kversetiiniä lähes kolminkertainen määrä perinteisellä tavalla valmistettuun mehuun verrattuna, mutta myristiinipitoisuudet olivat samat. Kylmäpuristus todettiin paremmaksi menetelmäksi, koska siinä marjojen kuorikerroksissa olevat flavonoidit irtoavat paremmin. Yhdeksän kuukauden pakastusaika vähensi kversetiinipitoisuutta 40 % mustikalla ja puolukalla mutta mustaherukalla ja vadelmalla ei tapahtunut hävikkiä. Myristiini- ja kemferolipitoisuudet eivät muuttuneet.

van der Sluis et al. (1999) totesivat omenamehun valmistuksessa kversetiiniglykosidien jäävän puristusjätteeseen (247 mg/kg, mehu 2,6 mg/kg). Niiden määrä kasvaa yli kymmenkertaiseksi (35 mg/kg) kun valmistuksessa glykosidit uutetaan alkoholiin. Kaack & Austed (1998) tutkivat valmistuksen vaikutusta seljamehun flavonoideihin. Mikäli mehu tytetään tai siihen lisätään askorbiinihappoa, hapettumistuotteiden määrä pienenee. Askorbiinihappo ei kuitenkaan vaikuta kversetiinipitoisuuksiin vaan pelkästään antosyaniineihin. Hedelmät eivät saa joutua tekemisiin hapen kanssa ja hapen määrää tuotteissa on vähennettävä. Vuorinen et al. (2000) totesivat, että mustaherukoista, variksenmarjoista ja mustikoista valmistettujen punaviinien flavonoidipitoisuudet ovat verrattavissa rypäleistä valmistettuihin punaviineihin. Viineistä tutkittiin myristiiniin, kversetiiniin ja kemferolin pitoisuuksia. Karviaismarjoista ja valkoherukoista valmistetuissa valkoviinissä oli kversetiiniä kun taas rypäleistä

valmistetussa viinissä sitä ei ollut.

Ewald et al. (1999) tutkivat erilaisten käsittelyjen vaikutusta sipulien, vihreiden papujen ja herneiden kversetiini- ja kemferolipitoisuuksiin. Sipulilla suurin hävikki tapahtui kuorimisen ja pilkkomisen aikana. Pitoisuudet olivat puolet käsittelemättömän sipulin pitoisuuksista. Syynä hävikkiin on kenties se, että suurin osa sipulin flavonoideista sijaitsee kuorikerroksissa. Myöhemmin tapahtuvat kiehauttamiset ja keittämiset eivät enää vaikuttaneet sipulin kversetiinipitoisuuksiin. Pavuilla ja herneillä erilaiset keittokäsittelyt eivät muuttaneet flavonoidipitoisuuksia.

Stewart et al. (2000) tutkivat tomaattien ja tomaattia sisältävien tuotteiden flavonoideja. Tomaatista löytyy lähinnä kversetiiniä ja kemferolia sekä niiden konjugaatteja kuten rutiinia. 98 % tomaatin flavonoideista on kuorikerroksessa. Lämpimissä maissa kasvaneissa tomaateissa ja kirsikkatomaateissa oli paljon flavonoideja. Flavonoidit kestivät hyvin erilaisia prosessoiteja. Niinpä myös tomaattimehu ja purée sisälsivät paljon flavonoideja. Koska tomaattimehua ja -ketsuppia lisätään useisiin ruokiin, lisäävät ne päivittäistä flavonoidien saantia. Crozier et al. (1997) tutkivat keittämisen vaikutusta tomaatin ja sipulin kversetiiniin. Tavallinen keittäminen pienensi enemmän pitoisuuksia kuin mikroaaltokuuminen. Myöskään paistamisella ei ollut niin suurta vaikutusta pitoisuuksiin kuin keittämisellä.

Häkkinen et al. (2000a) määrittivät prosessointien vaikutusta polyfenoliseen ellagihappoon. Sen pitoisuus mansikkahillossa oli 80 % prosessoimattoman mansikan pitoisuudesta. Ellagihapon määrä mansikoissa ja vadelmissa pieneni 40 ja 30 % yhdeksän kuukauden pakastuksen (-20 °C) aikana. Mansikkahillossa ei tapahtunut enää merkittäviä muutoksia yhdeksän kuukauden säilytyksen aikana +5 °C ja -20 °C lämpötiloissa, koska ellagihapon antioksidatiiviset reaktiot tapahtuivat jo hillonvalmistuksen aikana.

Antosyaniineihin vaikuttavat valo, erilaiset prosessoinnit sekä säilytys. Matalat



lämpötilat edistävät antosyaniinien muodostumista mm. omenalla. Toisaalta matalissa lämpötiloissa kypsyeillä mustaherukoilla on vähemmän antosyaniineja kuin korkeissa lämpötiloissa kypsyeillä. Antosyaniinien stabiilisuuteen vaikuttavat ruuan koostumus, lämpötila, valo sekä muut yhdisteet (esim. askorbiinihappo). Antosyaniinit hajoavat hapen vaikutuksesta ruskeiksi hajoamistuotteiksi. Hajoaminen on verrannollinen lämpötilaan ja lämpökäsittelyn keston. HTST (high temperature short-time)-prosessien käyttö vähentää antosyaniinien hajoamista. Marjamehuissa on osoitettu, että antosyaniinien hajoaminen on mitättömän pientä, kun kuumennusaika 100 °C lämpötilassa on vähemmän kuin kaksitoista minuuttia. Muut lämpökäsittelyt, kuten pastörointi, sterilointi ja konsentroidi nopeuttavat antosyaniinien hajoamista. Säilytyslämpötilan nousu lisää antosy-

aniinien hajoamista (Shahidi & Nacz 1995). Wilska-Jeszka ja Zajac (1991) totesivat antosyaniinien säilyvän sumutuskuivattuina kaksi vuotta ilman värin muutosta. Antosyaniineja on käytetty hiilihappoisissa juomissa, mehujuomissa, jauhemaisissa juomatiivisteissä sekä gelatiinia sisältävissä jälkiruuissa (Sikorski 1996).

Lignaanipitoisuuksiin vaikuttavat myös erilaiset prosessoinnit ja käsittelyt kuten esim. keittäminen, paistaminen tai muu lämpökäsittely (Jenkins 1995). Kun leivonnassa käytetään hiivaa, taikina on vähemmän alkaalista kuin leivinsoodaa käytettäessä. Alkaalisessa ympäristössä lignaanit voivat olla vähemmän stabiileja. Muir & Westcot (2000) totesivat sekoisolarisiresinolidiglykosidin olevan stabiili leivonnan yhteydessä. Se ei myöskään esim. hydrolysoitu leivän valmistuksen aikana.

## Kirjallisuus

- Adlercreutz, H.** 1996 Lignans and isoflavonoids. In: Mälkki, Y. & Cummings, J.H. (eds.) COST Action 92: Dietary fibre and fermentation in colon. Bruxelles: European Commission. p. 324–332. ISBN 92-827-6931-3.
- Astola, J. & Kumpulainen, J.** 2001. Lignaanit. In: Kumpulainen, J. (ed.). Suomalaisten elintarvikkeiden ravitsemuksellinen laatu ja kemiallinen turvallisuus. Jokioinen: MTT. p. 20–22. ISBN 952- 5244-06-7.
- Baron, R., Mayen, M., Merida, J. & Medina, M.** 2000. Comparative study of browning and flavan-3-ols during the storage of white sherry wines treated with different fining agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 226–230.
- Burnette, F.S.** 1977. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality. *Journal of Food Science* 42: 1–6.
- Chu, Y.-H., Chang, C.-L. & Hsu, H.-F.** 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 561–566.
- Crozier, A., Lean, M.E.J., McDonald, M.S. & Black, C.** 1997. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *Journal of the Agriculture and Food Chemistry* 45 (3): 590–595.
- Ewald, C., Fjelkner-Modig, S., Johansson, K., Sjöholm, I. & Åkesson, B.** 1999. Effect of processing in major flavonoids in processed onions, green beans and peas. *Food Chemistry* 64 (2): 231–235.
- Hermann, K.** 1976. Flavonols and flavones in food plants: A review. *Journal of food technology* 11: 433–448.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. & Katan, M.B.** 1992a. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruit commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (12): 2379–2383.
- , **Hollman, P.C.H. & Veneman, D.P.** 1992b. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (9): 1591–1598.

- Hollman, P.C.H & Arts, I.C.W.** 2000. Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1081–1093.
- Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.O, Heinonen, M., Mykkänen, H.M. & Törrönen R.A.** 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (6): 2274–2279.
- , **Kärenlampi, S.O, Mykkänen, H.M., Heinonen, I.M. & Törrönen, A.R.** 2000a. Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage. *European Food Research and Technology* 212(1): 75–80.
- , **Kärenlampi, S.O, Mykkänen, H.M. & Törrönen, A.R.** 2000b. Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *Journal of the Agriculture and Food Chemistry* 48 (7): 2960–2965.
- Jenkins, D.S.** 1995. Incorporation of flaxseed or flaxseed components into cereal foods. In: Cunnane, S. C. & Thompson, L. U (eds.). *Flaxseed in human nutrition*. Champaign (IL, USA): AOCS Press. p. 281–294. ISBN 0-935315-60-8.
- Johansson, P., Kamal-Eldin, A., Lundgren, L.N. & Åman, P.** 2000. HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11): 5216–5219.
- Justen, U., Knuthsen, P. & Leth, T.** 1998. Quantitative analysis of flavanols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and massa spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 799 (1/2): 101–110.
- Kaack, K. & Austed, T.** 1998. Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods for Human Nutrition* 52 (3): 187–198.
- Kühnau, J.** 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. In: Bourne, G.H. (ed.) *World review of nutrition and dietetics* vol 24. Basel: S. Karger AG. p. 117–191. ISBN 3-8055-2344-0.
- Mazur, W.,** 1998. Phytoestrogen content in food. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 12 (4): 729–742.
- , **Fotsis, T., Wähälä, K., Ojala, S., Salakka, A. & Adlercreutz, H.** 1996. Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol and lignans in food samples. *Analytical Biochemistry* 233 (2): 169–180.
- , **Wähälä, K., Rasku, S., Salakka, A., Hase, T. & Adlercreutz, H.** 1998. Lignan and isoflavonoid concentration in tea and coffee. *British Journal of Nutrition* 79 (1): 37–45.
- Meagher, L.P. & Beecher, G.R.** 2000. Assessment of data on the lignan content of foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 13 (6): 935–947.
- Mizuno, M., Tsuchida, H., Kozukue, N. & Mizuno, S.** 1992. Rapid quantitative analysis and distribution of free quercetin in vegetables and fruits. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 39 (1): 88–92.
- Muir, A. D. & Westcott, N. D.** 2000. Quantitation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside in baked goods containing flax seed or flax meal. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 4048–4052.
- Obermeyer, W.R., Musser, S.M., Betz, J.M., Casey, R.E., Pohland, A.E. & Page, S.W.** 1995. Chemical studies of phytoestrogens and related compounds in dietary supplements: flax and chapparral. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208 (1): 6–12.
- Oszmianski, J. & Lee, C.Y.** 1990. Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (5): 1202–1204.
- Pietta, P.G.** 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63 (7): 1035–1042.
- Shahidi, F. & Nazck, M.** 1995. *Food phenolics: Sources, chemistry, effects, applications*. Lancaster, USA: Technomic Publishing Company. 340 p. ISBN 1-56676-279-0.
- Sikorski, Z. E.** 1996. Anthocyanins. In: Sikorski, Z. E (ed.). *Chemical and functional properties of food components*. Lancaster, USA: Technomic Publishing Company. p. 201–205. ISBN 1-56676- 464-5.
- Stewart, A.J., Bozonnet, S., Mullen, W., Jenkins, G.I., Lean, M.E.J. & Crozier, A.** 2000. Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (7): 2663–2669.
- Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M. & Cheung, F.** 1991. Mammalian lignan production from various foods. *Nutrition and Cancer* 16 (1): 43–52.
- Törrönen, R.** 1997. *Elintarvikkeiden flavonoidit. Elintarvikeviraston tutkimuksia* 5/1997. Helsinki: Edita. 44 p. ISBN 951-732-060-4. ISSN 1235-2764.
- van der Sluis, A.A, Dekker, M. & Jongen, W.M.F.** 1999. Effect of processing on content and antioxidant activity of flavonoid in apple juice. In:

**Kumpulainen, J.T. & Salonen, J.T.** (eds.). Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease, the proceedings of the Second International Conference on natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease held on 24-27 June 1998 in Helsinki. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. p. 209–211. ISBN 0-85404-793-X.

**Vuorinen, H., Määttä, K. & Törrönen, R.** 2000. Content of the flavonols myricetin, quercetin and kaempferol in Finnish berry wines. *Journal of the Agriculture and Food Chemistry* 48(7): 2675–2680.

**Wilska-Jeszka, J. & Zajac, K.B.** 1991. Anthocyanins as natural food colourants. *International Food Ingredients* (3): 10–15.

# 7 Fenolisten yhdisteiden analysointi

Juha-Matti Pihlava

*MTT, Elintarvikkeiden tutkimus, Kemian laboratorio, 31600 Jokioinen,  
juba-matti.pihlava@mtt.fi*

Fenolisten yhdisteiden analysointi on haasteellista mm. niiden suuren lukumäärän, vaihtelevien pitoisuuksien, labiilisuuden, kasvin soluseinämatriisiin sitoutumisen ja puuttuvien kaupallisten malliyhdisteiden takia. Analysoinnin helpottamiseksi voidaan tietyissä tapauksissa emäs- tai happo-

käsittelyllä hajottaa ester- tai glykosididoksia. Flavonoideja analysoidaan pääasiassa nestekromatografilla. Fenolisten happojen määrittämisessä käytetään paljon myös kaasukromatografiaa kuten myös lignaanien määrittämisessä.

*Avainsanat: fenolit, kemialliset yhdisteet, analyysimenetelmät, kaasukromatografia, nestekromatografia*

## 7.1 Johdanto

Tässä kirjallisuuskatsauksessa käsitellään elintarvikkeissa esiintyvien fenolisten yhdisteiden määrittämenetelmiä, keskittyen flavonoideihin, fenolisiin happoihin ja lignaaneihin. Laaja aihekenttä on pyritty kattamaan mahdollisimman hyvin muutamilla esimerkeillä.

Flavonoidien määrittäminen tehdään yleensä nestekromatografisesti (Robards & Antolovich 1997), joskin esim. isoflavonoidien määrittämisessä on myös käytetty kaasukromatografiaa (Mazur et al. 1996). Fenolisten happojen määrittäminen on tiettyssä mielessä vielä hankalampaa kuin flavonoidien. Esikäsittelyllä voidaan fenolisia happoja jakaa fraktioihin, jotka analysoidaan erikseen. Fenolisia happoja voidaan määrittää nestekromatografisesti tai kaasukromatografisesti yhdisteiden silyloinnin jälkeen.

Lignaanien analysoinnin elintarvikkeissa tekee hankalaksi niiden alhaiset pitoisuudet. Lignaanien määrittämisessä on käytetty etupäässä kaasukromatografiaa, mutta yhdisteistä ja niiden määristä riippuen myös nestekromatografiaa. Fenolisten yhdisteiden kokonaismäärä on perinteisesti mitattu kolorimetrisesti Folin-Ciocalteau-reagensilla. Tämä reagenssi ei ole kuitenkaan spesifinen fenoleille, joten muut yhdisteet voivat vääristää tulosta (Antolovich et al. 2000).

Muita tekniikoita kuten kapillaarielektroforeesia ovat toistaiseksi käytetty melko vähän. Kattavia kirjallisuuskatsauksia fenolisten yhdisteiden määrittämisestä ovat julkaisseet viime vuosina esim. Robards & Antolovich (1997), Antolovich et al. (2000), da Costa et al. (2000), Merken & Beecher (2000) ja Dalluge & Nelson (2001).

## 7.2. Flavonoidit

### 7.2.1 Rasvan poisto

Ennen flavonoidien uuttamista näytteestä on usein poistettava rasva, koska se häiritsee etenkin kaasukromatografisia määrittämiä. Mazur et al. (1996) eivät havainneet heksaanilla suoritettavan rasvanpoiston alentavan isoflavonoidien saantoa. Sen sijaan Franke et al. (1994) raportoivat, että soijatuotteista heksaanilla tehtävä rasvanpoisto pienensi isoflavonoidien saantoa 30–40 %.

### 7.2.2 Uuttaminen ja hydrolysointi

Yksittäisten flavonoidien kvantitatiivinen määrittäminen on vaikeaa, koska kaikkia mahdollisia flavonoidikonjugaatteja ei ole kaupallisesti saatavilla. Lisäksi tyypillisimpienkin flavonoidien glykosideja voi yhdessä kasvissa olla yli 50 (Herrmann 1988). Yhdisteiden tunnistamisen ja kvantitoimisen helpottamiseksi flavonoidiglykosidit voidaan hajoittaa hapolla sokeriosaksi ja vapaaksi flavonoidiksi. Tavallisimmin hajoitus tehdään suolahapolla. Vaadittava hydrolysointiaika ja happoväkevyys riippuvat matriisista ja hajoitettavasta sidoksesta. Hertog et al. (1992) optimoivat hydrolysointiolosuhteet kuudelle eri tuotteelle, jotka sisälsivät sekä helposti hajoavia flavonoidien glykosideja että vaikeammin hydrolysoituvia glukuronideja. Flavonoliglukuronideja sisältäville tuotteille paras uuttoliuos oli 2,0 M HCl 50 % metanolissa kahden tunnin tai 1,6 M HCl neljän tunnin refluksoinnilla. Tuotteet, jotka sisälsivät flavonoliglykosideja, piti hydrolysoida kiehuvalle 1,2 M HCl 50 % metanolissa korkeintaan kaksi tuntia. Näissä olosuhteissa mahdollinen flavonoli-3-glykosidien hajoaminen oli alle 10 %, joten kemferoliglykosidien hydrolysoimiseksi reaktioaikaa piti kasvattaa neljään tuntiin. Vaikeammin hydrolysoituvien flavoniglykosidien (luteoliini ja apigeniini) hajoittamiseksi vaadittiin neljän tunnin käsittely 2,0 M HCl 50 % metanolissa.

Hydrolysoinnin jälkeen osa uuttoliuoksesta voidaan haihduttaa kuiviin ja liuottaa metanoliin määrittystä varten (Häkkinen ja Auriola, 1998). Flavonoidit voidaan myös tarvittaessa uuttaa happamasta vesiliuoksesta etyyliasetaattiin ja haihduttaa kuiviin jatkokäsittelyä varten (de Simon et al. 1990, Creaser et al. 1992, Kader et al. 1996).

Papujen ja niiden itujen isoflavonoidien tutkimiseksi tehtiin kolmen tunnin happohydrolyysi kiehuvalle 2,0 M HCl 77 % metanolissa (Franke et al. 1994). Isoflavonoideja on myös määritetty hydrolysoimalla näyte entsyymaattisesti ja uuttamalla vapautuneet isoflavonoidit dietyylieetteriin. Eetteri haihdutettiin kuiviin ja näyte liuotettiin sopivaan orgaaniseen liuottimeen, jonka jälkeen se puhdistettiin kaksivaiheisella ioninvaihtokromatografiolla (Mazur et al. 1996).

Seuraavissa esimerkeissä flavonoidiglykosideja ei ole hajoitettu hapolla. Soijatuotteiden isoflavononi-isomeerien uuttamiseksi on käytetty suolahappo-asetonitrili-vettä. Uuton jälkeen näyte suodatettiin, haihdutettiin kuiviin ja liuotettiin 80 % metanoliin (Song et al. 1998). Tattarin flavonoideja, joista määrällisesti tärkein on rutiini (kversetiini-3-rutinosidi) on uutettu 35 °C:ssa 100 % metanolilla 24 tuntia. Uutto- tehokkuus oli verrannollinen 1 tunnin refluksointiin 100 % metanolilla (Ohsawa ja Tsutsumi 1995). Tuoreista pinaatinlehdistä flavonoidit uutettiin 5 % metanolilla (Gil et al. 1999). Sitruhedelmien flavonoideja on uutettu pakkaskuivatusta materiaalista metanoli-dimetyylisulfoksidilla (DMSO) (1:1 v/v) 12 tuntia. Polaaristen komponenttien poistamiseksi näyte puhdistettiin C18 kiinteäfaasiuutto (SPE) -kolonnilla. Mehunäytteet applikoitiin suoraan kolonniin, joka pestiin 10 % metanolilla. Flavonoidit eluotettiin kolonnista metanoli-DMSO:lla (1:1 v/v) (Nogata et al. 1994).

Kversetiinin glukosideja on uutettu pakkaskuivatusta sipulista 70 % metanolilla. Osa uutteesta haihdutettiin ja säädettiin määrätilavuuteen metanoli-DMSO:lla (9:1 v/v) (Price et al. 1997). Arts ja Hollman

(1998) optimoivat menetelmän katekiinien uuttamiseksi hedelmistä ja pavuista. Toisin kuin muut flavonoidit katekiinit esiintyvät useimmin vapaina tai gallushapon estereinä, joten nämä yhdisteet voidaan uuttaa 60–80 % metanolilla ilman happohydrolyysiä. Proantosyanidiineja on uutettu eri elintarvikkeista asetonivesi-etikkahapolla (70: 29,5:0,5 v/v/v). Uutteen haihdutuksen jälkeen näyte puhdistettiin tarvittaessa C18 SPE-kolonilla (Lazarus et al. 1999). Prosyaniidiineja on uutettu viinirypäleen siemenistä ja kuorista etanoli-vesi-kloroformilla (1:1:2 v/v/v). Erottunut kloroformifaasi hylättiin ja 50 % etanolifaasi haihdutettiin määrätilavuuteen (De Freitas & Glories 1999).

Antosyaniinit uutetaan flavyliumkationimuodossa metanolilla, jossa on muurahaishai- tai etikkahappoa. Käyttämällä uutossa heikkoja happoja voidaan estää labiilien asyloitujen antosyaniinien hajoaminen (Antalovich et al. 2000). Wang et al. (2000) tutkivat pensasmustikan antosyaniineja. Näytteistä uutettiin antosyaniinit asetonimetanoli-vesi-muurahaishappo (40:40:20:0,1 v/v/v/v)-seoksella. Uute haihdutettiin kuiviin, liuotettiin veteen ja puhdistettiin C18 SPE-kolonilla. Garcia-Viguera et al. (1998) uuttivat antosyaniineja vadelmahillosta asetonilla. Asetoniute haihdutettiin kuiviin ja liuotettiin 3 %:seen muurahaishappoon. Näyte puhdistettiin C18 kiinteäfaasiuuttokolonilla.

### 7.2.3 Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantitointi

Flavonoidien tunnistamiseen ja kvantitoimiseen käytetään useimmiten korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) varustettuna UV- tai diodirividetektorilla, mutta myös kulometrista elektrodirividetektoria (Achilli et al. 1993, Mullner & Sontag 1999, Mattila et al. 2000) ja massaspektrometria on käytetty (Häkkinen ja Auriola 1998). Yhdisteet erotellaan lähes poikkeuksetta käänteisfaasikolonneilla (Robards & Antalovich 1997). Ajoliuksina

ovat tavallisimmin fosfaattipuskurin ja metanolin (Kawai et al. 1999) tai asetonitriilin seokset (Hertog et al. 1992, Arts ja Hollman 1998), muurahaishapon ja asetonitriilin (Häkkinen ja Auriola 1998) tai metanolin (Kader et al. 1996) seokset sekä etikkahappo-asetonitriili (Franke et al. 1994, Song et al. 1998).

Mazur et al. (1996) käyttivät isoflavonoidien tunnistamiseen ja kvantitoimiseen kaasukromatografi-massaspektrometria isotooppilaimennus- ja kohdeioniseurantatekniikalla. Creaser et al. (1992) määrittivät sitrusmehuista flavonoideja kaasukromatografi-ioniloukkumassaspektrometrilla. Jotta flavonoideja tai isoflavonoideja voitaisiin määrittää kaasukromatografisesti, on niistä ennen määrittystä tehtävä silyilyjohdannaiset.

Proantosyanidiineja on määritetty elintarvikkeista normaalifaasi HPLC:lla käyttäen ajoliuksena gradienttimaisesti dikloorimetäänin, metanolin ja etikkahappovenen seosta. Yhdisteiden tunnistaminen tehtiin massaspektrometrisesti (Lazarus et al. 1999). Viinirypäleen siemenen ja kuorien prosyaniidit analysoitiin käänteisfaasi HPLC:lla käyttäen ajoliuksena gradienttinä asetonitriilin ja vesi-etikkahapon seosta (De Freitas & Glories 1999).

Antosyaanien analysointiin on käytetty käänteisfaasi HPLC:a. Ajoliuksina käytettiin vettä, muurahaishapon ja metanolin seosta gradienttimaisesti (Garcia-Viguera et al. 1998, Wang et al. 2000).

## 7.3 Fenoliset hapot ja fenolisten happojen johdannaiset

### 7.3.1 Uuttaminen

Winter & Herrmann (1986) uuttivat hydroksikanelihappojen estereitä ja glykosideja kasviksista 80 % metanolilla. Uutteesta haihdutettiin alkoholi ja näyte fraktioitiin polyamidikolonissa. Hatcher & Kruger (1997) uuttivat vehnästä vapaat, esteröityneet ja sitoutuneet fenoliset hapot 80 % asetonilla ja metanolilla. Näyte hydrolysoitiin

emäksellä ja hapolla ja fenoliset hapot siirrettiin fraktioittain dietyylieetteri-etyyliasetaattiin. Orgaaniset faasit haihdutettiin kuiviin ja liuotettiin metanoliin. Dimberg et al. (1996) uuttivat fenolisia happoja ja avenantramideja kaurasta 80 % etanolilla, jonka jälkeen uute haihdutettiin kuiviin ja liuotettiin metanoliin. Omenamehuista ja siidereistä (Suarez et al. 1996) sekä viineistä (Soleas et al. 1997) on määritetty vapaita fenolisia happoja ja muita fenolisia yhdisteitä soveltaen näytteen esikäsittelyyn kiinteäfaasiuuttoa. Perunan tärkein fenolinen happo on klorogeenihappo, jota on uutettu kuusi tuntia pakkaskuivatusta materiaalista etanolirefluksoinnilla (Dao & Friedman 1992). Fenolisia yhdisteitä on eristetty oliiviöljystä metanoli-vesiuutolla. Metanoliuutteen haihdutuksen jälkeen näyte liuotettiin asetonitriliin ja loput öljystä poistettiin heksaanuuutolla. Lopuksi asetonitrili-faasi haihdutettiin kuiviin ja näyte liuotettiin metanoliin (Brenes et al. 1999). de Simon et al. (1990) ovat tutkineet fenolisten happojen uuttumista happamasta vesifaasista etyyliasetaattiin ja dietyylieetteriin.

Rukiista on uutettu yksinkertaisia fenoleja, alkyyl- ja alkenyyliresorsinoleja asetonilla, 80 % etanolilla ja metanolilla (Mullin et al. 1992). Häkkinen et al. (2000) optimoivat menetelmän ellagihapolle, joka esiintyy kasveissa vapaana, mutta yleisimmin ellagitanniinina. Esikäsittely koostuu pitkästä happohydrolyysistä 1,2 M suolahapolla (85 °C, 20 tuntia).

### 7.3.2 Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantitointi

Fenolisten happojen tunnistamiseen ja kvantitoimiseen käytetään usein käänteisfaasi HPLC:a UV- tai diodirividetektorilla (Brandl & Herrmann 1984, Winter & Herrmann 1986, Dimberg et al. 1996, Suarez et al. 1996, Hatcher & Kruger 1997, Brenes et al. 1999). LC-MS -yhdistelmää on käytetty teen polyfenolien, mm. klorogeenihappojen, määrittämiseen (Kiehne & Engelhardt 1996). Achilli et al. (1993)

osoittivat HPLC:n varustettuna kulorimetrisellä elektrodirividetektorilla soveltuvan fenolisten happojen määrittämiseen monimutkaisesta matriisista ilman esipuhdistusta. Klorogeenihapon määrittämiseen on käytetty sekä käänteisfaasi HPLC:a että ultravioletti spektrofotometriaa (Dao & Friedman 1992). Ellagihappo määritettiin HPLC:lla käyttäen käänteisfaasi C-18 -kolumnia ja ajoliuoksena gradienttimaisesti muurahaishapon ja asetonitriliin seosta (Häkkinen et al. 2000). Rukiin alk(en)yyliresorsinoleja on määritetty myös nestekromatografisesti (Mullin et al. 1992)

Fenolisia yhdisteitä on myös määritetty silyylijohtoksina kaasukromatografilla, joko liekki-ionisaatiodetektorilla (Weidner & Paprocka 1996, Weidner et al. 1996) tai massaselektiivisellä detektorilla varustettuna (Soleas et al. 1997). Alkyyliresorsinoleja on määritetty silyloimatta on-column-injektiotekniikalla kaasukromatografisesti (Mullin et al. 1992)

## 7.4 Lignaanit

### 7.4.1 Uuttaminen ja hydrolysointi

Ayres ja Loike (1990) ovat tehneet hyvän yleiskatsauksen lignaanien tunnistamisesta ja kvantitoinnista sekä näytteen esikäsittelyssä huomioitavista seikoista. Lignaanien, etenkin sekoisolarisiresinolin, määrittämiseksi kasveista, näyte tavallisesti käsitellään hapolla, jolloin saadaan katkaistua lignaanien ja sokerien sidokset.

Lignaaneja on määritetty isoflavonoidien kanssa hydrolysoimalla näyte entsyymaattisesti ja uuttamalla vapautuneet isoflavonoidit dietyylieetteriin. Jäljelle jääneeseen vesifaasiin lisättiin suolahappoa siten, että väkevyydeksi tuli 2 M. Refluksoinnin (2,5 tuntia) jälkeen vapautuneet lignaanit uutettiin dietyylieetterillä. Yhdistetyt orgaaniset faasit haihdutettiin kuiviin ja liuotettiin sopivaan orgaaniseen liuottimeen, jonka jälkeen näyte puhdistettiin kaksivaiheisella ioninvaihtokromatografialla (Mazur et al. 1996). Liggins et al. (2000) kehittä-

mässä menetelmässä Mazur et al. kuvaamaa menetelmää oli yksinkertaistettu näytteen hydrolysoimiseen hapolla ja vapautuneiden lignaanien uuttamiseen etyyliasetaatimetyl-*tert*-butyleetterillä (1:1).

Johnsson et al. (2000) kehittivät monimutkaisen menetelmän pellavan sekoisolarisiresinoli diglykosidin (SDG) määrittämiseksi. Uutossa käytettiin 1,2-dioksaani-etaanolia (5:95 v/v), jonka jälkeen uutetta hydrolysoitiin emäksellä kaksi vuorokautta. Lopuksi näyte puhdistettiin C-18 SPE-kolonilla. Muir & Westcott (2000) kuvasivat puolestaan nopean menetelmän SDG:n uuttamiseksi pellavan siemenistä ja pellavaa sisältävistä elintarvikkeista kuten leivistä. Uutossa käytettiin 70 % metanolia (60 °C, kolme tuntia). Osalle uutesta tehtiin emäshydrolyysi (kolme tuntia, 0,05 M NaOH), jonka jälkeen näyte neutraloitiin ja analysoitiin.

Pellavanäytteen sekoisolarisiresinoli diglykosidia on myös hydrolysoitu beta-glukuronidaasilla. Entsyymikäsittelyn jälkeen näyte sentrifugoitiin ja supernatantti ladattiin C18 SPE-kolonniin. Kolonni pestiin vedellä, jonka jälkeen lignaani eluoiitiin kolonnista metanolilla (Obermeyer et al. 1995).

Paahdetuista seesaminsiemennistä määritettiin seesamille tyypillisiä, pinoresinolia rakenteellisesti muistuttavia lignaaneja, seesamiinia ja seesamoliinia. Siemenistä uutettiin rasva ja rasvaliukoiset yhdisteet kloroformi-metanolilla ja vesipesun jälkeen orgaaninen faasi haihdutettiin kuiviin. Analysointia varten näyte liuotettiin heksaani-etyyliasetaattiin (90:10 v/v) (Yoshida & Takagi 1997).

#### **7.4.2 Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantitointi**

Sekoisolarisiresinolia ja matairesinolia on määritetty kaasukromatografi-massaspektrometrilla (GC-MS) soveltaen isotooppilai-

mennus- ja kohdeioniseurantatekniikkaa. Sekoisolarisiresinoli muuttui näytteen esikäsittelyyn sisältyvässä happohydrolyysissä kokonaan anhydrosekoisolarisiresinoliksi (Mazur et al. 1996). Toistaiseksi kaikki laajemmat elintarvikkeiden lignaanipitoisuuksia käsittelevät tutkimukset on tehty em. tekniikalla (Adlercreutz & Mazur, 1997, Mazur et al. 1998a, Mazur et al. 1998b). Liggins et al. (2000) käyttivät lignaanien analysointiin GC-MS:a.

Sekoisolarisiresinolia, matairesinolia ja nordihydroguairetiinihappoa on määritetty pellavasta ja chapparal-pensaasta HPLC:lla sekä UV- että MS-detektioinnilla. Yhdisteiden erottelussa pellavasta käytettiin C18-kolonnia ja ajoliuoksina isokraattisesti 0,1 % etikkahappo-asetonitriliä (70:30 v/v). Chapparal-näytteellä ajoliuoksia käytettiin gradienttimaisesti (Obermeyer et al. 1995). Johnsson et al. (2000) ja Muir & Westcott (2000) käyttivät SDG:n analysointiin myös käänteisfaasi HPLC:a käyttäen ajoliuoksina asetonitrili-fosfaattipuskuria (pH 2.8) tai 1 % etikkahappo- metanolia. SDG kvantitoitiin molemmissa tapauksissa 280 nm:n aallonpituudella. Sekoisolarisiresinolidiglykosidin on havaittu esiintyvän kahtena isomeerinä pellavansiemenessä, todennäköisesti enantiomeerisenä (tai raseemisena) ja mesomuotona (Bambagiotti-Alberti et al. 1994).

Seesamin lignaaneja määritettiin samanaikaisesti tokoferolien kanssa normaali-faasi HPLC:lla käyttäen ajoliuoksena heksaani-etyyliasetaatia. Yhdisteet tunnistettiin ja kvantitoitiin fluorosenssi detektorilla (Yoshida & Takagi 1997). Seesamin lignaaneja on myös analysoitu käänteisfaasi HPLC:lla ja UV-detektioinnilla (Kamal-Eldin & Appelqvist 1994).

Nordihydroguairetiinihappoa on määritetty muiden fenolisten antioksidanttien kanssa voista C18-kolonilla ajoliuoksina gradienttimaisesti 5 % etikkahapon ja asetonitrili-metanolin (1:1) seos (Page 1993).



# Kirjallisuus

---

- Achilli, G., Cellarino, G., Gamache, P. & Melzi d'Eril, G.** 1993. Identification and determination of phenolic constituents in natural beverages and plant extracts by means of a coulometric electrode array system. *Journal of Chromatography* 632: 111–117.
- Adlercreutz, H. & Mazur, W.** 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases (Review). *Annals of Medicine* 29: 95–120.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. & Ryan, D.** 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* 125: 989–1009.
- Arts, I. & Hollman, P.C.H.** 1998. Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 5156–5162.
- Ayres, D. & Loike, J.D.** 1990. Lignans: chemical, biological and clinical properties. *Chemistry and pharmacology of natural products series 1*. Cambridge: Cambridge University Press. 422 p. ISBN 0 521 30421 0.
- Bambagiotti-Alberti, M., Coron, S., Ghiara, C., Moneti, G. & Raffaelli, A.** 1994. Investigation of mammalian lignan precursors in flax seed: first evidence of secoisolariciresinol diglucoside in two isomeric forms by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 8: 929–932.
- Brandl, W. & Herrmann, K.** 1984. Über das vorkommen der chlorogensäuren in der kartoffel. *Zeitschrift für Lebensmittel, Untersuchung und Forschung* 178: 192–194.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia P., Rios, J.J. & Garrido, A.** 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 3535–3540.
- Creaser, C., Koupai-Abyazani, M. & Stephenson, R.** 1992. Gas-chromatographic-mass spectrometric characterization of flavonones in citrus and grape juices. *Analyst* 117: 1105–1109.
- da Costa, C.T., Horton, D. & Margolis, S.A.** 2000. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 881: 403–410.
- Dalluge, J.J. & Nelson, B.C.** 2001. Determination of tea catechins. *Journal of Chromatography A* 881: 411–424.
- Dao, L. & Friedman, M.** 1992. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40: 2152–2156.
- De Freitas, V. AP & Glories, Y.** 1999. Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1601–1606.
- de Simon, F., Perez-Illarbe, J., Hernandez, T., Gomez-Cordoves, C. & Estrella, I.** 1990. HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. *Chromatographia* 30: 35–37.
- Dimberg L.H., Moltenberg, E.L., Solheim, R. & Frölicht W.** 1996. Variation in oat groats due to variety, storage and heat treatment. I: Phenolic compounds. *Journal of Cereal Science* 24: 263–272.
- Franke, A.A., Custer, L.J., Cerna, C.M. & Narala, K.K.** 1994. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42: 1905–1913.
- Garcia-Viguera, C., Zafrilla, P., Artes, F., Romero, F., Abellan, P., & Tomas-Barberan, F.A.** 1998. Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78: 565–573.
- Gil, M.I., Ferreres, F. & Tomas-Barberan, F.A.** 1999. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) on the fresh-cut spinach. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 2213–2217.
- Hatcher, D. & Kruger, J.** 1997. Simple phenolic acids in flours prepared from Canadian wheat: relationship to ash content, color, and polyphenol oxidase activity. *Cereal Chemistry* 74: 337–343.
- Herrmann, K.** 1988. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel, Untersuchung und Forschung* 186: 1–5.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. & Venema, D.P.** 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40: 1591–1598.
- Häkkinen, S. & Auriola, S.** 1998. High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and

- glycosides in berries. *Journal of Chromatography A* 829: 91–100.
- , **Kärenlampi S.O., Mykkänen H.M., Heinonen I.M. & Törrönen A.R.** 2000. Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *European Food Research & technology* 212: 75–80.
- Johnsson, P., Kamal-Eldin, A., Lundgren, L.N. & Åman, P.** 2000. HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 5216–5219.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M. & Metche, M.** 1996. Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *Food Chemistry* 55: 35–40.
- Kamal-Eldin, A. & Appelqvist, L.Å.** 1994. Variations in the composition of sterols, tocopherols and lignans in seed oils from four *Sesamum* species. *Journal of American Oil Chemists Society* 71: 149–156.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. & Yano, M.** 1999. HL-60 differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from Citrus juices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 128–135.
- Kiehne, A. & Engelhardt, U.** 1996. Thermospray-LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea. II: Chlorogenic acids, theaflavins and thearubigins. *Zeitschrift für Lebensmittel, Untersuchung und Forschung* 202: 299–302.
- Lazarus, S.A., Adamson, G.E., Hammerstone J.F. & Schmitz, H.H.** 1999. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 3693–3701.
- Liggins, J., Grimwood, R. & Bingham, S.A.** 2000. Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples. *Analytical Biochemistry* 287: 102–109.
- Mattila, P., Astola, J. & Kumpulainen, J.** 2000. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 5834–5841.
- Mazur, W., Duke, J., Wähälä, K., Rasku, S. & Adlercreutz, H.** 1998a. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. *Nutritional Biochemistry* 9: 193–200.
- , **Fotsis, T., Wähälä, K., Ojala, S., Salakka, A. & Adlercreutz, H.** 1996. Isotope dilution gas-chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food samples. *Analytical Biochemistry* 233: 169–180.
- , **Wähälä, K., Rasku, S., Salakka, A., Hase, T. & Adlercreutz, H.** 1998b. Lignan and isoflavonoid concentrations in tea and coffee. *British Journal of Nutrition* 79: 37–45.
- Merken, H. & Beecher, G.R.** 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 577–599.
- Muir, A. D. & Westcott, N. D.** 2000. Quantitation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside in baked goods containing flax seed or flax meal. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 4048–4052.
- Mullin, W.J., Wolgnetz, M.S. & Emery, J.P.** 1992. A comparison of methods for the extraction and quantitation of Alk(en)ylresorcinols. *Journal of Food Composition and Analysis* 5: 216–223.
- Müllner, C. & Sontag, G.** 1999. Determination of some phytoestrogens in soybeans and their processed products with HPLC and coulometric electrode array detection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 364: 261–265.
- Nogata, Y., Ohta, H., Yoza, K.I., Berhove, M. & Hasegawa, S.** 1994. High-performance liquid chromatographic determination of naturally occurring flavonoids in Citrus with a photodiode-array detector. *Journal of Chromatography A* 667: 59–66.
- Obermayer, W., Musser, S., Betz, J., Casey, R., Pohland, A. & Page, S.** 1995. Chemical studies of phytoestrogens and related compounds in dietary supplements: flax and chapparal. *Proceedings of the Experimental Society for Biology and Medicine* 208: 6–12.
- Ohsawa, R. & Tsutsumi, T.** 1995. Inter-varietal variations of rutin content in common buckwheat flour (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Euphytica* 86: 183–189.
- Page, D.** 1993. Liquid chromatographic method for the determination of nine phenolic antioxidants in butter oil: collaborative study. *Journal of AOAC International* 76: 765–779.
- Price, K.R., Bacon, J.R. & Rhodes, M.J.C.** 1997. Effects of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45: 938–942.
- Robards, K. & Antolovich, M.** 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst* 122: 11R–34R.

- Soleas, G., Diamandis, E., Karumanchiri, A. & Goldberg, D.** 1997. A multiresidue derivatization gas chromatographic assay for fifteen phenolic constituents with mass selective detection. *Analytical Chemistry* 69: 4405–4409.
- Song, T. Barua, K., Buseman, G. & Murphy, PA.** 1998. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *American Journal of Clinical Nutrition* 68 (Suppl): 1474S–1479S.
- Suarez, B., Picinelli, A. & Mangas, J.** 1996. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders. *Journal of Chromatography A* 727: 203–209.
- Wang, J., Kalt, W. & Sporns, P.** 2000. Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS analysis of anthocyanins in highbush blueberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 3330–3335.
- Weidner, S. & Paprocka, J.** 1996. Phenolic acids and dormancy in oat (*Avena sativa* L.) and rye (*Secale cereale* L.) caryopses. *Acta Physiologiae Plantarum* 18: 277–286.
- , **Paprocka, J. & Lukaszewicz, D.** 1996. Changes in free, esterified and glycosidic phenolic acids in cereal grains during the after-ripening. *Seed Science & Technology* 24: 107–114.
- Winter, M. & Herrmann, K.** 1986. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 34: 616–620.
- Yoshida, H. & Takagi, S.** 1997. Effects of seed roasting temperature and time on the quality characteristics of sesame (*Sesamum indicum*) oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75: 19–26.

# 8 Yleistä terpeeneistä

Marjo Keskitalo<sup>1)</sup>, Maaria Linnala<sup>1)</sup>, Jarmo Holopainen<sup>2)</sup>  
& Helena Hyvärinen<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinviljely ja biotekniikka, 31600 Jokioinen,  
[marjo.keskitalo@mtt.fi](mailto:marjo.keskitalo@mtt.fi)

<sup>2)</sup> Kuopion yliopisto, Ekologisen ympäristötieteen laitos, PL 1627, 70211 Kuopio,  
[jarmo.holopainen@uku.fi](mailto:jarmo.holopainen@uku.fi)

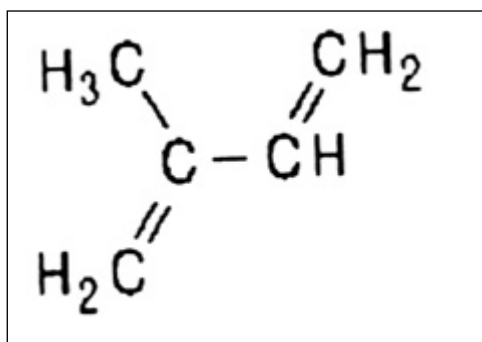
tai MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen

<sup>3)</sup> MTT, Elintarvikkeiden tutkimus, Elintarvikekemian ja -tekniikka, 31600 Jokioinen,  
[helena.hyvarinen@mtt.fi](mailto:helena.hyvarinen@mtt.fi)

Terpeenit kuuluvat rasvaliukoisiin isoprenoidi-johdannaisiin ja niitä esiintyy laajasti kasvi- ja eläinkunnassa sekä mikro-organismeissa (Luckner 1990). Terpeenit muodostuvat toisiinsa liittyneistä viiden hiiliatomin muodostamasta 2-metyyli-2-butadieni- eli isopreeniyksiköistä. Isopreeni- yksikön rakenne on esitetty kuvassa 11. Monoterpeeneillä on perusrungossa kymmenen hiiliatomia (2 isopreeniyksikköä), seskviterpeeneillä 15 ja diterpeeneillä 20 hiiliatomia. Kasveissa tavattuja terpenoideja tunnetaan yli 22000 erilaista yhdistettä (McGarvey & Croteau 1995). Kasvien terpenoidit käsittävät rakenteellisesti monenlaisia yhdisteitä, jotka voidaan jakaa primäärisiin ja sekundäärisiin aineenvaihdun-

tatuotteisiin. Primäärisiin terpenoideihin luokitellaan mm. sterolit, karotenoidit, useat kasvihormonit sekä dolikoleihin, kinoneihin ja proteiineihin sitoutuneet polyprenolit. Primäärisiä terpenoideja esiintyy pääsääntöisesti kaikissa kasveissa. Sen sijaan sekundääristen terpenoidiyhdisteiden kuten mono-, seskvi- ja diterpeenien esiintyminen saattaa olla rajoittunut tiettyihin heimoihin, sukuihin tai joskus jopa lajikkeisiin (Kush 1994, Chappell 1995). Kasveissa esiintyvät aromaattiset eli haihtuvat öljyt koostuvat tavallisesti mono- ja seskviterpeeneistä. Sen lisäksi öljyt saattavat sisältää jonkin verran mm. flavonoideja.

Rakenteensa perusteella monoterpeenit voidaan jakaa avoketjuihin sekä yksi tai kaksi rengasta sisältäviin molekyyliin, joihin on liittynyt tavallisesti hydroksyyli-, okso-, aldehydi-, karboksyyli- tai esteriryhmä (Luckner 1990, Waterman 1993). Monoterpeenejä esiintyy laajasti kasveissa ja niitä käytetään mm. lääke- ja hajusteteollisuudessa. Kasveissa haihtuvat öljyt houkuttelevat pölyttäjiä ja suojelevat tuholaisilta. Niillä on myös sieni-itiöitä ja bakteereja torjuvia vaikutuksia (Deans & Waterman 1993). Monoterpeenejä esiintyy useissa kasviheimoissa kuten *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae* ja *Pinaceae*-heimoissa. Seskviterpeenit ovat terpeeneistä suurin ryhmä, sillä



Kuva 11. Isopreeniyksikkö.

**Taulukko 2.** Terpeenien jaottelu ja esimerkkejä.

	Yhdisteitä
Monoterpeeni	Bornaani, borneoli, $\alpha$ -fellandreeni, $\beta$ -fellandreeni, fenkoni, kamferi, karvakroli, karvoni, p-kymeeni, limoneeni, linaloli, mentoli, mentoni, myrseeni, $\beta$ -myrsiini pinaani, $\alpha$ -pineeni, $\beta$ -pineeni, sabineneeni, sitraali, sitronellaali, $\alpha$ -terpiini, $\gamma$ -terpiini, terpinen-4-oli, $\alpha$ -terpineoli, tujaani, $\alpha$ -tujeeni, tujoli, tujoni, tymoli,
Seskviterpeenit	$\beta$ -farnesaani, $\alpha$ -humuleeni, $\beta$ -humuleeni, $\gamma$ -humuleeni, $\alpha$ -karyofylleeni, $\beta$ -karyofylleeni
Diterpeeni	Kamforaani, kauraani, pimaraani, retinaani
Triterpeenit:	
steroidit	Ergostaani, estraani, kolaani, kolestaani, stigmastaani
sterolit	Ergosteroli, kolesteroli, $\beta$ -sitossteroli, stigmasteroli
saponiinit	Olenaani
sappihapot	Koolihappo, litokoolihappo
steroidihormonit	Aldosteroni, estradioli, kortikosteroni, progesteroni, testosteroni
D-vitamiinit	D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> , D <sub>4</sub> jne.
Tetraterpeenit	Karotenoidit

siihen kuuluu lukumääräisesti useita tuhansia yhdisteitä. Sen lisäksi niistä tunnetaan rakenteellisesti ainakin 200 erilaista runkoa. Seskviterpeenit voivat olla avoketjuisia tai sykliisiä hiilivetyjä, alkoholeja tai ketoneja. Seskviterpeenejä esiintyy mm. *Asteraceae* ja *Cichoriaceae* kasviheimoissa usein yhdessä monoterpeenien kanssa. Diterpeenejä tunnetaan yli 500 erilaista, joista yleisimpiä ovat mm. klorofyllin rakenneosana esiintyvä avoketjuinen fytoli, monosyklinen A-vitamiini eli akseroftoli sekä trisykliset hartsihapot (Goodwin & Mercer 1983). Terpeeneihin kuuluvat myös sellaiset yhdisteet kuin E- ja K-vitamiinit sekä ubikinoni. Taulukossa 2 on esitetty eräitä yleisimpiä terpeeneitä.

Terpeenien terveysvaikutuksia ei tässä

katsauksessa käsitellä tarkemmin, mutta monoterpeenien tiedetään omaavan anti-karsinogeenisia ominaisuuksia. Esim. *d*-limoneeni ennalta annettuna voi ehkäistä karsinogeenisen aineen haitallisia vaikutuksia estämällä karsinogeenin indusoiman haitallisen proteiinisynteesin (Giri et al. 1999). Eläinkokeissa esim. sitrushedelmistä saatava limoneeni on useimmin estänyt rintata-, iho-, maksa ja keuhkosityövän syntyä (Crowell 1999). Mono- ja seskviterpeenien sekä eräiden saponiiniglukosidien tiedetään ehkäisevän vatsahaavan syntyä (Matsunaga et al. 2000). Toisaalta monien tyräkkikasvien diterpeenit ovat kaikille nisäkkäille, ihmisen mukaan lukien, ihoa ärsyttäviä ja myrkyllisiä yhdisteitä (Gerhenzon & Croteau 1991).

## Kirjallisuus

**Chappell, J.** 1995. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiology* 107: 1–6.

**Crowell, P.L.** 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Journal of Nutrition* 129: 775–778.

- Deans, S.G. & Waterman, P.G.** 1993. Biological activity of volatile oils. In: Hay, R.K.H. & Waterman, P.G. (eds.). Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. Harlow : Longman, cop. p. 97–111. ISBN 0-582-00557-4.
- Gerhenson, J. & Croteau, R.** 1991. Terpenoids. In: Rosenthal, G.A. & Berenbaum, M.R. (eds.) Herbivores - their interactions with secondary plant metabolites. Vol. 1. The chemical participants. Vol 1. 2nd ed. San Diego: Academic Press. p. 165–219. ISBN 0-12-597183-4.
- Giri, R.K., Parija, T., & Das, B.R.** 1999. d-limonene chemoprevention of hepatocarcinogenesis in AKR mice: inhibition of c-jun and c-myc. *Oncology Reports* 6: 1123–7.
- Goodwin, T.W. & Mercer, E.I.** 1983. Introduction to plant biochemistry, 2nd ed. Oxford: Pergamon . 677 p. ISBN 0-08-024921-3.
- Kush, A.** 1994. Isoprenoid biosynthesis: the *Hevea* factory. *Plant Physiological Biochemistry* 32: 761–767.
- Luckner, M.** 1990. Secondary metabolism in micro-organisms, plants and animals. 3rd rev. ed. Berlin: Springer-Verlag. 563 p. ISBN 3-540-50287-4.
- Matsunaga, T., Hasegawa, C., Kawasuji, T., Suzuki, H., Saito, H., Sagioka, T., Takahashi, R., Tsukamoto, H., Morikawa, T. & Akiyama, T.** 2000. Isolation of the antiulcer compound in essential oil from the leaves of *Cryptomeria japonica*. *Biological and Pharmaceutical-Bulletin*. 23: 595–598.
- McGarvey, D.J. & Croteau, R.** 1995. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1015–1026.
- Waterman, P. G.** 1993. The chemistry of volatile oils In: Hay, R. K. M & Waterman, P. G (eds.) Volatile oil crops: Their biology, biochemistry and production. New York: John Wiley & Sons. p. 47–61. ISBN 0-470-22087-2.

# 9 Terpeenien biosynteesi ja esiintyminen

Maaria Linnala & Marjo Keskitalo

*MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinviljely ja biotekniikka,  
31600 Jokioinen, [marjo.keskitalo@mtt.fi](mailto:marjo.keskitalo@mtt.fi)*

Isoprenoideihin kuuluvat terpeenit ovat yksi runsaslukuisin ja monimuotoisin kasvien sekundääriaineiden ryhmä. Terpeenejä esiintyy yleisesti mauste-, lääke- ja yrttikasvien haihtuvissa öljyissä, joihin komponentit antavat biologista aktiivisuutta. Kasvi voi sisältää jopa kymmeniä erilaisia terpeenejä ja muita sekundääriaineita. Yhdisteiden kokonaispitoisuus on muutamia poikkeuksia lukuunottamatta yleensä yhden prosentin luokkaa kuiva-aineesta. Eri sekundääriaineista terpeenien muodostumiseen vaikuttavia ympäristö- ja viljelytek-

nisiä tekijöitä on tutkittu eniten. On pitkään arveltu, että haihtuvien öljyjen pitoisuus ja aromikkuus on korkeampi Suomessa kasvavissa kasviksissa kuin etelän maissa viljellyissä kasviksissa. Kaikkia kasveja kattavaa vastausta ei ole löydetty, mutta valon ja lämpötilan on havaittu useissa tapauksissa vaikuttavan terpeenien muodostumiseen. Sen takia ainakin eräillä kasveilla on mahdollista, että pitkä päivä yhdessä optimilämpötilan kanssa lisää terpeenien muodostumista kasvilla.

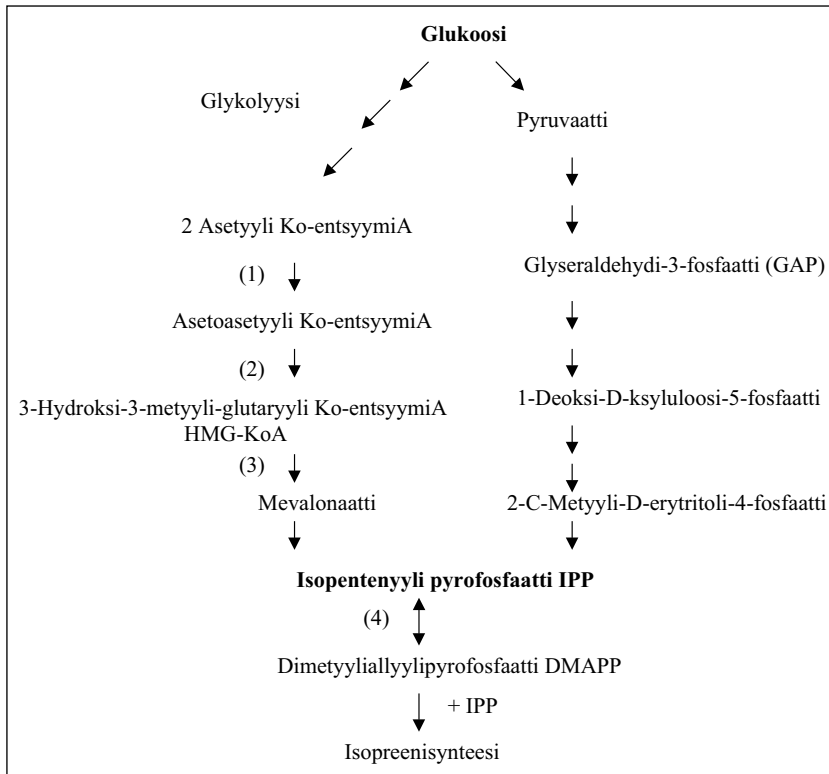
*Avainsanat: kemialliset yhdisteet, biosynteesi, valo, laatu, päivänpituus, lämpötila*

## 9.1 Terpeenien biosynteesi

Isoprenoidibiosynteesin alkuosa tunnetaan jo varsin hyvin ja siitä onkin saatavilla runsaasti kirjallisuutta (esim. van der Heijden & Veerpoorte 1995, Chappell 1995, Weisenborn et al. 1995, Paré & Tumlinson 1997). Mallikasvien kuten perunan, tomaatin (Park et al. 1992) ja lituruohon (Enjuto et al. 1994) lisäksi terpeenisynteesiä on tutkittu mm. kuminalla (Bouwmeester et al. 1998), mintulla (McCaskill & Croteau 1995, Fuchs et al. 1999) ja kumipuulla

(Schaller et al. 1995). Isopreenisynteesi on kiinnostanut tutkijoita myös sen takia, että eläimillä muodostuu sen tuloksena kolesterolia (Chin et al. 1982). Kasvit tuottavat isoprenoidien keskeistä lähtöainetta, isopentenyylipyrofosfaattia (IPP) kahden biosynteesireitin kautta (Kuva 12) (Chappell 1995, Duvold et al. 1997, Lichtenthaler et al. 1997).

Mevalonaattireitin biosynteesi alkaa kolmen asetyyli-KoA:n kondensaatiolla. Siitä syntyy hydroksyylietyyli-glutaryyli-KoA (HMG-KoA), joka pelkistetään



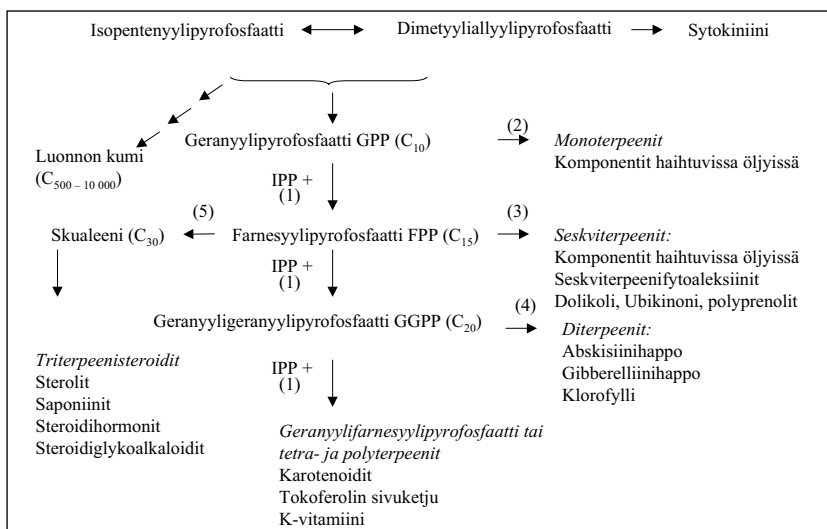
**Kuva 12.** Yksinkertaistettu kaavio isopreenisynteessin perusyksikön, isopentenyylipyrofosfaatin (IPP) muodostumisesta kahden mahdollisen synteesisireitin kautta. Lyhenteiden selitykset: (1) = Asetoasetyyli-Ko-entsyymiolaasi, (2) = HMG KoA syntaasi, (3) = HMG KoA reduktiaasi, (4) = IPP isomeraasi (van der Heijden & Veerpoorte 1995, Kush 1994, Weissenborn et al. 1995, Chappel 1995, Paré & Tumlinson 1997, Keskkitalo 1999).

kuusihiiliseksi mevalonihapoksi. Reaktio on peruuttamaton ja sitä katalysoi HMG-KoA-reduktaasi, joka on avainentsyymi isoprenoidien aineenvaihdunnan säätelyssä. Geeniperheen (*hmg*) tiedetään ohjaavan HMG-KoA-reduktaasin toimintaa ja perheeseen kuuluvien geenien lukumäärä on ainakin osittain riippuvainen kasvista (Chye et al. 1992, Korth et al. 1997, Maldonado-Mendoza et al. 1997). Mevalonihappo fosforyloidaan ja karboksyloidaan, jolloin muodostuu viisihiilinen isopentenyylipyrofosfaatti (IPP). Se on perusyksikkö isoprenoidien muodostumisessa. IPP ja sen isomeeri dimetyyliallyyli-pyrofosfaatti (DMAPP) toimivat lähtöaineena muille isopreneille ketjunpidentämisreak-

tiossa (Goodwin & Mercer 1983, Croteau 1992, Chappell 1995). Mevalonaattireitin lisäksi kasveista on löydetty toinenkin IPP:tä tuottava biosynteesireitti, jossa IPP:tä muodostuu 1-deoksiksyloosi-5-fosfaatista (Duvold et al. 1997, Lichtenthaler et al. 1997, Bouvier et al. 1998).

DMAPP:n kondensoituessa IPP:n kanssa muodostuu kymmenhiilinen ( $C_{10}$ ) geranyylipyrofosfaatti (GPP). GPP voidaan käyttää joko monoterpeenien biosynteesiin tai siihen voidaan yhdistää seuraava IPP-molekyylä, jolloin muodostuu viisitoistahiilinen ( $C_{15}$ ) farnesyylipyrofosfaatti (FPP). FPP:lla on kolme mahdollista aineenvaihdunnallista reittiä. Se voidaan käyttää seskviterpeenien muodostamiseen, ketjunpi-





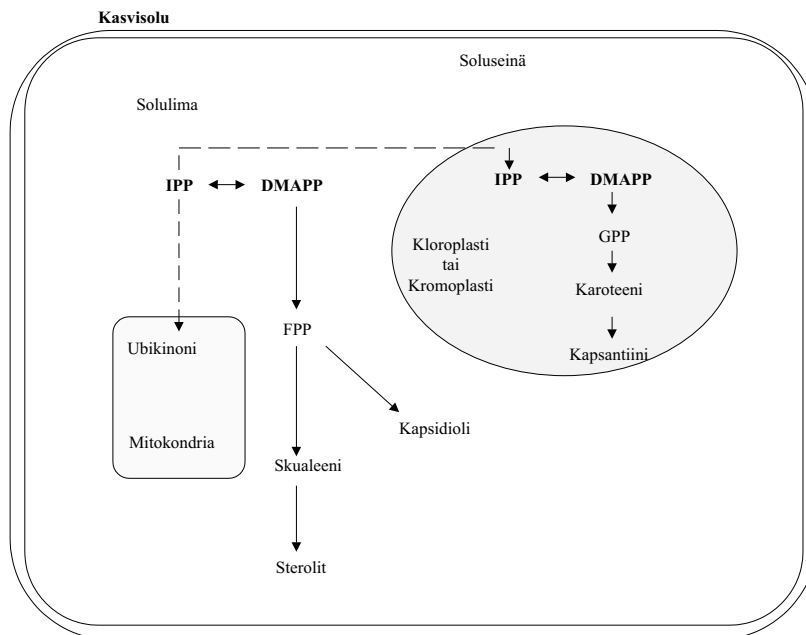
**Kuva 13.** Isopreenisynteesin välivaiheita ja lopputuotteita. Lyhenteiden selitykset: (1) = Prenyylitransferaasi, (2) = Monoterpeenisyntaasi ja/tai syklaasi, (3) = Seskviterpeenisyntaasi ja/tai syklaasi, (4) = Diterpeenisyntaasi ja/tai syklaasi, (5) = Skualeenisyntaasi ja/tai syklaasi (van der Heijden & Veerpoorte 1995, Kush 1994, Weissenborn et al. 1995, Chappel 1995, Paré & Tumlinson 1997, Keskitalo 1999).

dentämiseen C<sub>20</sub>-yhdisteiksi (geranyyligeranyylipyrofosfaatiksi GGPP) tai triterpeenien (C<sub>30</sub>) synteesiin. GGPP:n aineenvaihduntareitit ovat samantyyppiset kuin FPP:llä. Se voidaan muuttaa diterpeeneiksi tai ketjua pidentämällä geranyylifarnesyylipyrofosfaatiksi (C<sub>25</sub>, GFPP) tai dimerisaatiolla tetraterpeeneiksi (C<sub>40</sub>, polyprenolit). Ketjunpidentäminen voi jatkua niin, että muodostuu 500–10 000 isopreeniyksikköä käsittävä molekyyli, jota on esimerkiksi luonnonkumi (Kush 1994). Isopreeniyksiköiden ketjuuntumisessa muodostuu siis prenyylifosfaatteja, jotka eroavat toisistaan isopreeniyksiköiden määrässä (Goodwin & Mercer 1983, Croteau 1992). Prenyylitransferaasit katalysoivat isopreeniyksiköiden polymerisaatiota ja mono-, seskvi- ja diterpeenisyntaasit (-syklaasit) vastaavat GPP:n, FPP:n ja GGPP:n syklistaatioista (Luckner 1990, Croteau 1992, Chappell 1995) (Kuva 13).

## 9.2 Terpeenien esiintyminen ja sijainti kasveissa

Monet yrtti-, mauste- ja lääkekasvit sisältävät terpeeneistä koostuvaa haihtuvaa öljyä. Tavallisesti kasvien öljypitoisuus on yhden prosentin luokkaa kuiva-aineesta, mutta myös suurempia pitoisuuksia esiintyy mm. kuminalla (2–7 %) (Galambosi & Peura 1996). Terpeenit ovat monimuotoisia, sillä esimerkiksi tillistä (Huopalahti 1986) ja eri minttulajeista (Pino et al. 1996, Brophy et al. 1997, Guido et al. 1997) on tunnistettu kymmeniä ja pietaryrtistä jopa yli sata erilaista terpeeniä (Keskitalo 1999, Keskitalo et al. 2001). Kumina on tässäkin suhteessa poikkeus, sillä sen haihtuva öljy sisältää pääasiassa vain kahta monoterpeeniä limoneeniä ja karvonia (Bouwmeester et al. 1998).

Terpeeneihin tarvittava IPP (Isopentenyylipyrofosfaatti) voi muodostua joko mevalonaattireitin kautta tai 1-deoksiksyloosi-5-fosfaatista. Synteesireitit riippuvatkin ainakin osittain siitä, mitkä ovat loppu-



**Kuva 14.** Isopreenien muodostuminen solussa (Hugueneý et al. 1996).

tuotteet. Usein vähän dimeerisoituneet isopreenit kuten mono- ja seskviterpeenit muodostetaan mevalonaattireitin kautta sytoplasmassa, vaikka esimerkiksi mintulla myös plastidit osallistuivat synteesiin (McCaskill & Croteau 1995). Sen sijaan terpeenit, jotka muodostuvat useista isopreeniyksiköistä kuten  $\beta$ -karoteenit ja sterolit, syntetisoidaan usein deoksiksylulooseista ja synteesipaikkana ovat solun plastidit (Hugueneý et al. 1996, Arigoni et al. 1997) (Kuva 14).

Synteesin jälkeen erityisesti mono- ja seskviterpeenit kuljetetaan pois soluista, sillä konsentroituneena ne voivat olla itse solulle myrkyllisiä. Tämän takia ne varastoidaan usein lehden pinnalla oleviin rakkuloihin tai solukarvoihin (Oliveira & Pais 1990, McCaskill & Croteau 1995). Primäärisiä isoprenejä ei yleensä varastoida solujen ulkopuolelle vaan ne kuljetetaan käyttökohteisiin kuten klorofyllit fotosynteesiä suorittaviin soluihin.

### 9.3 Valon ja lämpötilan vaikutus terpeenien muodostukseen

Terpeenit ovat yksi eniten tutkittu ryhmä kasvien sekundääriaineenvaihduntatuotteista. Syynä on varmasti se, että erittäin monet mauste-, yrtti- ja lääkekasvit sisältävät mono- ja seskviterpeeneistä koostuvaa haihtuvaa öljyä. Eri abioottisten ja bioottisten tekijöiden vaikutuksia terpeenien esiintymiseen on selvitetty useissa teoksissa (Bernáth 1992). Sen vuoksi kaikkia mahdollisia tekijöitä ei käsitellä tässä kirjoituksessa. Abioottisista ympäristötekijöistä on keskitytty valoon ja lämpötilaan sen takia, että ne ovat keskeisiä kasvutekijöitä Suomessa.

#### 9.3.1 Valon voimakkuus

Valovoimakkuuden lasku on vähentänyt haihtuvan öljyn pitoisuutta monilla eri kasvilajeilla kuten timjamilla (*Thymus vulgaris* L.) (Li et al. 1996), tillillä (*Anethum graveolens*

L.) (Hälvä et al. 1992a), meiramin sukuisella kasvilla (*Origanum syriacum* (L.)) (Dudai et al. 1992) ja kamomillalla (*Matricaria recutita* L.) (Saleh 1973). Salvian (*Salvia officinalis* L.) öljypitoisuus oli sitä vastoin korkeimmillaan, kun se sai vain noin puolet normaalista valaistuksesta (Li et al. 1996). Valovoimakkuuden lisäys kasvatti tillillä öljypitoisuuden lisäksi yrttisatoa, minkä takia kokonaisöljysato kasvoi. Tillillä öljyntuotanto riippuukin suoraan biomassan tuotannosta ja fotosynteesistä (Hälvä 1993). Kasvilajit voivat kuitenkin erota siinä, miten ne reagoivat valovoimakkuuden kasvuun, eikä haihtuvan öljyn lisäys aina välttämättä liity kasvuun (Li et al. 1996).

Valon voimakkuus voi vaikuttaa myös haihtuvan öljyn koostumukseen. Valon intensiteetin laskiessa timjamissa tymolin ja  $\gamma$ -terpineenin suhteelliset määrät laskivat, mutta  $\rho$ -kymeenin määrä kasvoi (Li et al. 1996). Meiramin sukuisessa kasvissa valon määrän vähentäminen talvella laski  $\rho$ -symeen suhteellista osuutta öljyssä ja nosti tymolin ja  $\gamma$ -terpineenin osuuksia. Kesällä valon määrän väheneminen ei vaikuttanut öljyn koostumukseen (Dudai et al. 1992). Tillillä  $\beta$ -pineenin pitoisuus oli korkeimmillaan himmeässä valossa kun taas muiden analysoitujen yhdisteiden määrät olivat korkeimmillaan kirkkaassa valossa (Hälvä et al. 1992a).

### 9.3.2 Valon laatu

Erilaiset valolaadut eli valon eri aallonpituudet vaikuttavat kasvien kasvuun sekä sekundääriaineiden pitoisuuksiin. UV-säteilyn, sinisen ja punaisen valon merkitystä on tutkittu mm. timjamilla, tillillä, kamomillalla, basilikalla ja piparmintulla. Punainen valo lisäsi timjamin taimien monoterpeenien tuotantoa sekä stimuloi tymolin muodostumista silloin, kun taimia kasvatettiin muuten pimeässä. Myös kaukopunainen valo lisäsi timjamilla (Tanaka et al. 1989), mutta ei tillillä (Hälvä et al. 1992b) monoterpeenien muodostumista. Tillillä si-

nistä valoa saaneet kasvit tuottivat vähiten öljyä ja kasvu oli hitainta verrattuna punaista tai kaukopunaista valoa saaneisiin kasveihin (Hälvä et al. 1992b). Valonlaadun vaikutus tillin öljypitoisuuteen saattaa johtua muutoksista kasvien kehitysvaiheessa tai valon indusoimista ja sekundääriaineiden muodostumista edistävästä tekijöistä kuten hormonimuutoksista (Hälvä et al. 1992b). Kasvit reagoivat mitä ilmeisemmin eri tavalla valon laatuun, sillä kamomillalla valokoinen valo indusoi haihtuvan öljyn muodostumista. Sen sijaan punainen, vihreä ja sininen valokäsittely tuottivat vähemmän öljyä. Basilikalla (*Ocimum basilicum* L.) UV-B-säteily (Johnson et al. 1999) ja piparmintulla (*Mentha x piperita* L.) UV-A säteily lisäsivät haihtuvan öljyn pitoisuutta (Maffei et al. 1999). Piparmintulla UV-A säteily tehoi öljypitoisuuteen vain silloin, jos se annettiin päivällä. Samalla kasvin kasvu parani. Sen sijaan UV-A käsittely pimeässä kasvaneisiin kasveihin heikensi niiden haihtuvan öljyn muodostumista ja kasvin kasvua (Maffei et al. 1999).

### 9.3.3 Valojakson pituus

Valojakson pituuden vaikutusta haihtuvan öljyn pitoisuuteen on tutkittu useilla eri kasvilajeilla. Monilla kasveilla pitkä valojakso on lisännyt öljypitoisuutta (Dragar & Menary 1994). Pimeässä kasvatettujen timjamin taimien lyhytkestoinenkin (kymmenen minuuttia) valokäsittely lisäsi monoterpeenien muodostumista. Tavallisesti öljymäärän kasvu on kuitenkin riippunut valojakson pituudesta (Yamaura et al. 1989). Näin on ollut esimerkiksi rakuunalla (*Artemisia dracunculus*) (Suchorska et al. 1992), piparmintulla (Burbott & Loomis 1967), tillillä (Hälvä et al. 1993) ja meiramin sukuisella kasvilla (Dudai et al. 1992), joilla kaikilla haihtuvien öljyjen muodostuminen parani pitkässä päivässä (kuusitoista tuntia) verrattuna lyhyeen päivään (kahdeksan tuntia). Valojakson pituus on vaikuttanut sen sijaan eri tavalla tuoresatoon: piparmintulla pitkä päivä lisäsi kasvua (Burbott &

Loomis 1967), mutta tillillä se vähensi sitä (Hälvä et al. 1993). Poikkeuksena ovat tutkitut kolme minttulajia (*Mentha arvensis* L., *M. citrata* L. ja *M. cardiaca* L.), joilla haihtuvan öljyn pitoisuudet olivat noin 50–260 % suurempia lyhyen päivän (kahdeksan tuntia) käsittelyssä verrattuna luonnolliseen valoon tai pitkän päivän käsittelyyn (24 tuntia) (Farooqi et al. 1999).

Pitkän valojakson positiivinen vaikutus haihtuvaan öljyn muodostumiseen johtuu mm. piparmintulla (Burbott ja Loomis 1967, Farooqin et al. 1999) ja maustemeiramililla (*Origanum majorana* L.) (Circella et al. 1995) ainakin osaksi lisääntyneestä kasvusta eikä valon suorasta vaikutuksesta monoterpeenisynteesiin. Tutkimukset ovat osittain ristiriitaisia, sillä useissa kokeissa valojakson pituus on edistänyt myös suoraan haihtuvien öljyjen muodostumista tai vaikuttanut öljyn koostumukseen (Dudai et al. 1992, Voirin et al. 1990, Farooqin et al. 1999). Suorat vaikutukset voivat johtua siitä, että päivänpituus aiheuttaa muutoksia biosynteesin hapetus-pelkistys -tapahtumiin (Voirin et al. 1990), entsyymit ja geenit aktivoituvat (Dudai et al. 1992) tai että aineenvaihduntareitissä on muita muutoksia (Farooqi et al. 1999).

Valojakson pituus voi vaikuttaa haihtuvan öljypitoisuuden lisäksi haihtuvan öljyn koostumukseen. Timjamilla tymolin määrä kasvoi suhteellisesti enemmän kuin muiden yhdisteiden, kun taimille annettu valojakso piteni (Yamaura et al. 1989). Myös muilla kasveilla havaittiin, että fenolisten monoterpeenien (tymoli, karvakroli) osuudet kasvoivat ja terpeenihilivetyjen ( $\gamma$ -terpineeni,  $\rho$ -kymeeni) osuudet laskivat päivänpituuden noustessa (Dudai et al. 1992). Mintuilla terpeenien suhteellisissa osuuksissa tapahtuneet muutokset ovat olleet erilaisia: *Mentha citrata* -kasvissa linaloolin osuus kasvoi 15 % ja *M. cardiaca* -kasvissa karvonin osuus aleni 18 % kasvatettaessa kasveja pitkässä päivässä lyhyen sijaan. Rantamintulla (*Mentha arvensis* L.) päivänpituudella ei juurikaan ollut vaikutusta mentolin määrään (Farooqi et al. 1999), vaikka piparmintulla

erityisesti pitkä päivä tuotti runsaasti mentonia (+ mentolia) ja vähän mentofuraania sisältävää öljyä. Lyhyen päivän käsittelyssä pääosa öljystä oli öljyn laatua alentavaa mentofuraania (Voirin et al. 1990).

### 9.3.4 Lämpötila

Lämpötila on lisännyt kontrolloiduissa kasvatusoloissa tehdyissä kokeissa mm. kamomillan (Betray & Vömel 1992), rantamintun (*Mentha arvensis* L.) (Duriyaprapan et al. 1986), meiramin sukuisen kasvin (Dudai et al. 1992), salvian (Bernath et al. 1991) ja tillin (Hälvä et al. 1993) haihtuvan öljyn pitoisuuksia. Lämpötila saattaa vaikuttaa valoa merkittävämmän kasvien haihtuvan öljyn muodostumiseen (Hälvä et al. 1993). Esimerkiksi tillillä (Hälvä et al. 1993) ja meiramin sukuisella kasvulla (Dudai et al. 1992) lämpötilan nousu nosti kasvien öljypitoisuutta sekä pitkällä että lyhyellä valojaksolla. Pitkä valojakso saattaa kuitenkin vähentää lämpötilan vaikutusta (Hälvä et al. 1993). Esimerkiksi rantamintun haihtuvan öljyn tuotantoon päivä- ja yölämpötilat eivät yksin pystyneet vaikuttamaan, sillä niillä on havaittu olevan yhdysvaikutusta. Tietyissä lämpötiloissa päivälämpötila on vaikuttanut öljyntuotantoon enemmän kuin yölämpötila. Korkea yölämpötila saattaa myös kompensoida matalaa päivälämpötilaa (Duriyaprapan et al. 1986).

Lämpötila vaikuttaa myös haihtuvan öljyn koostumukseen. Lämpötilan nousu lisäsi kamomillalla kamatsuleenin ja laski  $\alpha$ -bisabolin osuutta (Betray & Vömel 1992, Fahlen et al. 1997) ja rantamintulla lisäsi mentonin osuutta (Duriyaprapan et al. 1986). Lämpötila on vaikuttanut myös muiden minttulajien öljyn koostumukseen (*Mentha x piperita* L., *Mentha longifolia* L., *Mentha spicata* L., *Mentha rubra* L.) (Fahlen et al. 1997).

Lämpötilan vaikutus haihtuvan öljyn koostumukseen voi riippua myös päivänpituudesta. Lämpötila vaikuttikin erityisesti piparmintun haihtuvan öljyn koostumukseen lyhyellä päivällä. Lämmin yö (25 °C)

tuotti lyhyen päivän käsittelyssä pulegonia ja mentofurania, kun taas kylmä yö (8 °C) tuotti mentonia. Sen sijaan pitkän päivän käsittelyssä yölämpötilat vaikuttivat vain vähän piparmintun (Burbott & Loomis 1967), tillin (Hälvä et al. 1993) ja muiden aromaattisten kasvien (Dudai et al. 1992) öljyjen koostumukseen (Burbott & Loomis 1967). Haihtuvien öljyjen satofysiologiaa käsittelevässä pioneerityössä todettiin, että öljyn koostumukseen vaikuttaa sekä fotosynteesi että yöllä tapahtuva hengitys. Molemmat ovat riippuvaisia lämpötilasta. Lämpiminä öinä hengitys on vilkasta, siinä käytettäviä lähtöaineita kuluu ja seurauksena on hapettavat olot. Sen sijaan kylminä öinä hengitykseen käytettäviä lähtöaineita on saatavilla ja hengityksessä mukana olevat entsyymit pysyvät pelkistyneinä. Hapettavissa ja pelkistävässä oloissa syntyy erilaisia terpeeneitä (Burbott & Loomis 1967).

#### 9.4 Terpeenien modifiointi

Kasvien aineenvaihdunnallisia tuotteita on muokattu perinteisellä kasvinjalostuksella. Sen sijaan bio- ja geeniteknikkaa on käytetty varsin vähän viime vuosiin saakka. Koska kasvien laadullisista ominaisuuksista on tullut yhä tärkeämpiä raaka-aineita funktionaalille elintarvikkeille, tutkitaan tällä

hetkellä vilkkaasti esimerkiksi mahdollisuuksia muokata geeniteknisesti kasvien karoteenisynteesiä (van der Berg et al. 2000). Merkittävin viimeaikainen saavutus on nk. kultaisen riisin (golden rice) jalostaminen geeniteknikan avulla. Kehitysmäisessä tärkeä ravintokasvi riisi sisältää hyvin vähän A-vitamiinin esiastetta  $\beta$ -karoteenia. A-vitamiinin puute aiheuttaa vakavia sairauksia kuten sokeutumista. Nyt geeniteknisesti jalostetun runsaasti  $\beta$ -karoteenia sisältävän riisin toivotaan auttavan eristyneistä alueita, joilla kärsitään A-vitamiinin puutteesta. Kultaisen riisin kehittäminen on ensimmäinen huomattava askel terveellisempien ravintokasvien jalostuksessa (Beyer et al. 2001). Perinteisistä yrttikasveista pioneerikasveina voidaan pitää kuminaa (Krens et al. 1997), minttua (Ishikawa & Sato 1994, Sato et al. 1996), ja pietaryrttiä (Keskitalo et al. 1999), joiden terpeenisynteesiä on pyritty bioteknisesti muokkaamaan. Käytettyjä menetelmiä ovat olleet kromosomiston kaksinkertaistaminen (Raev & Jordanov 1996), protoplastifusio (Ishikawa & Sato 1994, Sato et al. 1996, Keskitalo et al. 1999) tai geenin siirto joko *Agrobacterium tumefaciensin* (Krens et al. 1997) tai partikkelipommituksen (Arokiaraj et al. 1994) välityksellä.

## Kirjallisuus

**Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A. & Zenk, M.H.** 1997. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 10600–10605.

**Arokiaraj, P., Jones, H., Cheong, K.E., Coomber, S. & Charlowood, B.V.** 1994. Gene insertion into *Hevea brasiliensis*. Plant Cell Reports 13: 425–431.

**Bernáth, J.** 1992. Production ecology of secondary plant products. In: Cracer, L.E. & Simon, J.E. (eds). Herbs, spices, and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture and pharmacology. Volume 1. 2nd ed. New York: Food Products Press, An imprint of The Haworth Press. p. 185–234. ISSN 0890-6653.

–, **Danos, B. & Héthelyi, É.** 1991. Variation in essential oil spectrum of salvia species affected by environment. Herba Hungarica 30: 35–46.

- Betray, G. & Vömel, A.** 1992. Influence of temperature on yield and active principles of *Chamomilla recutita* (L.). Rausch. Under controlled conditions. *Acta Horticulturae* 306: 83–87.
- Beyer, P., Al-Babili, S., Xe, X., Lucca, P., Klöti, A., Shang, J. & Potrykus, I.** 2001. "Golden rice": Introducing the  $\beta$ -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. In: Kuokka, A., Nuutila, A.M. & Oksman-Caldentey, K.-M. (eds.). *Plant biotechnology - Better Products from Better Plants (abstracts)*, 10-13. June 2001. Helsinki. VTT Biotechnology. The Phytochemical Society of Europe. p. 15.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R.A. & Camara, B.** 1998. Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiology* 117: 1423–1431.
- Bouwmeester, H.J., Gershenzon, J., Konings, M.C.J.M. & Croteau, R.** 1998. Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway. *Plant Physiology* 117: 901–912.
- Brophy, J.J., Goldsack, R.J., Foster, P.I. & Fookes, C.J.R.** 1997. Leaf essential oil of *Mentha grandiflora* Benth. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research* 9: 459–461.
- Burbott, A.J. & Loomis, W.D.** 1967. Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. *Plant Physiology* 42: 20–28.
- Chalchat, J.-C., Garry, R.P. & Michet, A.** 1997. Variation of the chemical composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. during the growing time. *Journal of Essential Oil Research* 9: 463–465.
- Chappell, J.** 1995. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiology* 107: 1–6.
- Chin, D.J., Luskey, K.I., Faust, J.R., MacDonald, R.J., Brown, M.S. & Goldstein, J.L.** 1982. Molecular cloning of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and evidence for regulating of its mRNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 79: 7704–7708.
- Chye, M.-L., Tan, C.-T. & Chua, N.-H.** 1992. Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Molecular Biology* 19: 473–484.
- Circella, G., Franz, Ch., Novak, J. & Resch, H.** 1995. Influence of day length and leaf insertion on the composition of major essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 10: 371–374.
- Croteau, R.** 1992. Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. In: Cracer, L.E. & Simon, J.E. (eds). *Herbs, spices, and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture and pharmacology*. Volume 1. 2nd ed. New York: Food Products Press, An imprint of The Haworth Press. p. 185–234. ISSN 0890-6653.
- Dragar, V.A. & Menary, R.C.** 1994. Effect of environmental factors on carbon dioxide exchange and essential oil yield in *Olearia phlogopappa* (Labill.). *Journal of Essential Oil Research* 6: 253–259.
- Dudai, N., Putievsky, E., Ravid, U., Palevitch, D. & Halevy, A.** 1992. Monoterpene content in *Origanum syriacum* as affected by environmental conditions and flowering. *Physiologia Plantarum* 84: 453–459.
- Duriyaprapan, S., Britten, E.J. & Basford, K.E.** 1986. The effect of temperature on growth, oil yield and oil quality of Japanese mint. *Annals of Botany* 58: 729–736.
- Duvold, T., Bravo, J.-M., Pale-Grosdemange, C. & Rohmer, M.** 1997. Biosynthesis of 2-C-Methyl-D-erythritol, a putative C5 intermediate in the mevalonate independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Letters* 38: 4769–4772.
- Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arro, M. & Boronat, A.** 1994. *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 927–931.
- Fahlén, A., Welander, M. & Wennersten, R.** 1997. Effects of light-temperature regimes on plant growth and essential oil yield of selected aromatic plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73: 111–119.
- Farooqi, A.H.A., Sangwan, N.S. & Sangwan, R.S.** 1999. Effect of different photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in *Mentha* species. *Plant Growth Regulation* 29: 181–187.
- Fuchs, A., Zinn, S., Beck, T. & Mosandl, A.** 1999. Biosynthesis of menthofuran in *Mentha x piperita*: stereoselective and mechanistic studies. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 4100–4105.
- Galambosi, B. & Peura, P.** 1996. Agrobotanical features and oil content of wild and cultivated forms of caraway. *Journal of Essential Oil Research* 8: 389–397.
- Goodwin, T.W. & Mercer, E.I.** 1983. *Introduction to plant biochemistry*, 2nd ed. Oxford: Pergamon. 677 p. ISBN 0-08-024921-3.

- Guido, S., Alessandra, B., Guido, F., Luigi, C.P. & Emilio, T.P.** 1997. Variability of essential oil composition of *Mentha aquatica* ssp. *aquatica* collected in two different habitats of North Tuscany, Italy. *Journal of Essential Oil Research* 9: 455–457.
- Huguenev, P., Bouvier, F., Badillo, A., Quennemet, J., d'Harlinque, A. & Camara, B.** 1996. Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosol isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiology* 111: 619–626.
- Huopalahti, R.** 1986. Gas chromatographic and sensory analyses in the evaluation of the aroma of dill herb, *Anethum graveolens* L. *Zeitschrift für Lebensmittel, Untersuchung und Forschung* 19: 27–30.
- Hälvä, S.** 1993. Effect of light and temperature on the growth and essential oil of dill (*Anethum graveolens* L.). Thesis, University of Helsinki, Department of Plant Production. Helsinki: Helsingin yliopisto. 56 p. ISBN 0-9636813-4-6.
- , **Craker, L.E., Simon, J.E. & Charles, D.J.** 1992a. Light levels, growth, and essential oil in dill (*Anethum graveolens* L.). *Journal of Herb, Spices & Medicinal Plants* 1(1/): 47–58.
- , **Craker, L.E., Simon, J.E. & Charles, D.J.** 1992b. Light levels, growth, and essential oil in dill (*Anethum graveolens* L.). *Journal of Herb, Spices & Medicinal Plants* 1(1/): 59–69.
- , **Craker, L.E., Simon, J.E. & Charles, D.J.** 1993. Growth and essential oil in dill (*Anethum graveolens* L.) in response to temperature and photoperiod. *Journal of Herb, Spices & Medicinal Plants* 1: 47–56.
- Ishikawa, H. & Sato, H.** 1994. Production of new mint flavor by cell fusion. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan* 161: 45–53.
- Johnson, C.B., Kirby, J., Naxakis, G. & Pearson, S.** 1999. Substantial UV-B-mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry* 51: 507–510.
- Keskitalo, M.** 1999. Exploring biodiversity to enhance bioactivity in the genus *Tanacetum* through protoplast fusion. Academic Dissertation. University of Helsinki, Department of Plant Production, Section of Crop Husbandry. Publication No. 53. 112 p. ISBN 951-45-8824-X.
- , **Angers, P., Earle, E. & Pehu, E.** 1999. Chemical and genetical characterization of calli derived from somatic hybridization between tansy (*Tanacetum vulgare* L.) and pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Schultz-Bip.). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1335–1343.
- Keskitalo, M., Pehu, E. & Simon, J.E.** 2001. Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 267–285.
- Korth, K.L., Stermer, B.A., Bhattacharyya, M.K. & Dixon, R.A.** 1997. HMG-CoA reductase gene families that differentially accumulate transcripts in potato tubers are developmentally expressed in floral tissues. *Plant Molecular Biology* 33: 545–551.
- Krens, P.A., Keizer, C.P. & Capel, I.E.M.** 1997. Transgenic caraway, *Carum carvi* L.: a model species for metabolic engineering. *Plant Cell Reports* 17: 39–43.
- Kush, A.** 1994. Isoprenoid biosynthesis: the *Hevea* factory. *Plant Physiological Biochemistry* 32: 761–767.
- Li, Y., Craker, L.E. & Potter, T.** 1996. Effect of light level on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). *Acta Horticulturae* 426: 419–426.
- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. & Schwender, J.** 1997. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* 101: 643–652.
- Luckner, M.** 1990. Secondary metabolism in micro-organisms, plants and animals. 3rd rev. ed. Berlin: Springer-Verlag. 563 p. ISBN 3-540-50287-4.
- Maffei, M., Canova, D., Berteau, C.M. & Scannerini, S.** 1999. UV-A effects on photomorphogenesis and essential-oil composition in *Mentha piperita*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B-Biology* 52: 105–110.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Vincent, R.M. & Nessler, C.L.** 1997. Molecular characterization of three differentially expressed members of the *Camptotheca acuminata* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) gene family. *Plant Molecular Biology* 34: 781–790.
- McCaskill, D. & Croteau, R.** 1995. Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta* 197: 49–56.
- Oliveira, M.M. & Pais, M.S.** 1990. Glandular trichomes of *Humulus lupulus* var. Brewer's gold (hops): ultrastructural aspects of peltate trichomes. *Journal of submicroscopic cytology and pathology* 22: 241–248.

- Paré, P.W. & Tumlinson, J.H.** 1997. *De novo* biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiology* 114: 1161–1167.
- Park, H., Denbow, C.J. & Cramer, C.L.** 1992. Structure and nucleotide sequence of tomato *HMG2* encoding 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase. *Plant Molecular Biology* 20: 327–331.
- Pino, J.A., Rosado, A. & Fuentes, V.** 1996. Chemical composition of the essential oil of *Mentha arvensis* L. var. *piperascens* Malinv. From Cuba. *Journal of Essential Oil Research* 8: 685–686.
- Raev, R.T. & Jordanov, R.** 1996. Induced polyploidy in lavender. In: Craker, L.E., Nolan, L. & Shetty, K (eds.). *Proceedings of the International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. Acta horticulturae* 426. International Symposium in Medicinal and Aromatic Plants August 27-30, 1995 Amherst, MA 01003 USA. Leiden : International Society for Horticultural Science p. 561–572. ISBN 90-6605-808-0.
- Sato, H., Yamada, K., Mii, M., Hosomi, K., Okuyama, S., Uzawa, M., Ishikawa, H. & Ito, Y.** 1996. Production of an interspecific somatic hybrid between peppermint and gingermint. *Plant Science* 115: 101–107.
- Saleh, M.** 1973. Effects of light upon quality and quantity of *Matricaria chamomilla* oil. *Planta Medica* 24: 337–340.
- Schaller, H., Grausem, B., Benveniste, P., Chye, M-L., Tan, C-T., Song, Y-H. & Chua, N-H.** 1995. Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Müll. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction. *Plant Physiology* 109: 761–770.
- Suchorska, K., Jedraszko, B. & Olszewska-Kaczynska, I.** 1992. Influence of daylength on the content and composition of the essential oil from tarragon (*Artemisia dracunculus* f. *dracunculus*). *Annals of Warsaw Agricultural University* 16: 79–82.
- Tanaka, S., Yamaura, T., Shigemoto, R. & Tabata, M.** 1989. Phytochrome-mediated production of monoterpenes in thyme seedlings. *Phytochemistry* 28: 2955–2957.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H.F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S. & Stahl, W.** 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 880–912.
- Van der Heijden, R. & Verpoorte, R.** 1995. Metabolic enzymes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 85–88.
- Voirin, B., Brun, N. & Bayet, C.** 1990. Effects of daylength on the monoterpene composition of leaves of *Mentha x piperita*. *Phytochemistry* 29: 749–755.
- Weissenborn, D.L., Denbow, C.J., Laine, M., Lång, S., Yang, Z., Yu, X. & Cramer, C.L.** 1995. HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway. *Physiologia Plantarum* 93: 393–400.
- Yamaura, T., Tanaka, S. & Tabata, M.** 1989. Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. *Phytochemistry* 28: 741–744.



# 10 Terpeenien merkitys kasvien tuholaiskestävyydelle

Jarmo Holopainen

*Kuopion yliopisto, Ekologisen ympäristötieteen laitos, PL 1627, 70210 Kuopio,  
jarmo.holopainen@uku.fi  
tai MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Kasvinsuojelu, 31600 Jokioinen*

Kasveja ravintonaan käyttävät hyönteiset reagoivat isäntäkasviinsa haju- ja makuaistin avulla. Useimmat terpeeneihin kuuluvat yhdisteet toimivat kasveissa kasvissyöjiä karkottavina tai syöntiä ehkäisevinä aineina. Kuhunkin kasviryhmään erikoistuneet kasvinsyöjät pystyvät kuitenkin murtaamaan isäntäkasvin kemiallisen puolustuksen ja ne käyttävätkin aineita sopivan kas-

vin tunnistamiseen. Lajikevalinnan avulla voidaan valita tuholaisia kestäviä lajikkeita viljelyyn ja vastaavasti houkuttelevampia lajikkeita houkutekaistoille, joista tuohyönteiset voidaan torjua. Eräät terpeenyhdisteet houkuttelevat kasvustoon tuholaisien loisia ja petoja. Viljelykasvi voidaan aktivoita tuottamaan näitä yhdisteitä elisitorien avulla.

*Avainsanat: kasvinsuojelu, tubohyönteiset, luontaiset vibolliset, kemialliset yhdisteet*

## 10.1 Johdanto

Kaikkiin terpenoidiryhmiin kuuluvilla yhdisteillä on merkitystä kasveja ravintonaan käyttäville eläimille (Gerhæzon & Croteau 1991). Tunnetuimpia lienevät monoterpeeneistä ja diterpeeneistä (hartsihapot) muodostuvat havupuiden pihka-aineet, jotka suojaavat puita erityisesti kaarnakuoriaisia vastaan (Phillips & Croteau 1999). Tyypillisesti hiilipohjaisina yhdisteinä terpeenejä on usein pidetty ns. hiili/typpihypoteesin malliyhdisteinä. Kun typen saanti on vähäistä, kasvi suuntaa yhteytettyä hiiltä kasvun sijasta hiilipitoisiin sekundääriyhdisteisiin. Vastaavasti hyvin lannoitetuissa kasveissa

näiden puolustusyhdisteiden määrät ovat alhaisemmat, koska kasvi on käyttänyt hiiltä enemmän biomassan tuottamiseen. Usein myös lannoituksen tuholaisille altistavaa vaikutusta on perusteltu sillä, että hyvin lannoitetuissa kasveissa on sekä runsaasti typpeä että vähemmän syöntiä ehkäiseviä sekundääriyhdisteitä. Havupuilla hypoteesi näyttää toimivan vain fenolisten yhdisteiden osalta, mutta etenkin diterpeenit käyttäytyvät päinvastaiseen suuntaan ja neulaisen pihka-aineiden pitoisuudet kasvavat typpilannoitusta lisättäessä (Kainulainen et al. 1996). Saman aineryhmän yksittäisten yhdisteiden vasteissa on myös huomattavia eroja.

## 10.2 Monoterpeenit

Monoterpeenit voivat toimia kasveissa pölyttäjiä houkuttavina kukkien hajuaineina, hyönteisten syöntiä ja munintaa ehkäisevinä yhdisteinä tai suoranaisina myrkkyyinä. Yleensä monoterpeenit eivät kuitenkaan ole myrkyllisiä nisäkkäille kasveissa esiintyvänä pitoisuuksina, mutta ne inhiboivat pötsimikrobien toimintaa. Tämän vuoksi esim. hirvi karttaa runsaasti hapettuneita monoterpeenejä sisältävää kuusta ja syömäntyä, jossa pääosa monoterpeeneistä ei ole hapettuneita. Tunnetuimpia myrkkyyjä ovat asterikasveista löytyvät monoterpeeniestereihin kuuluvat pyretroidit, joita on esim. hyönteistentorjuntaan käytetyssä luonnon pyretriinissä. Porkkanassa esiintyy runsaasti erilaisia mono- ja seskviterpeenejä (Kainulainen et al. 1998). Naateissa runsaimmin tavattavat monoterpeenit voivat toimia porkkanakempille joko houkutteena tai karkotteena. Sabineenipitoisuuden noustessa kasvi näyttäisi muuttuvan entistä houkuttavammaksi porkkanakempille, kun taas korkean limoneenipitoisuuden omaavia kasveja kempti välttelee (julkaisematon havainto). Myös havupuilla yksittäisten monoterpeenien väliset suhteet voivat vaikuttaa siihen, houkuttaako vai karkottaako puu kaarnakuoriaisia (Gerhenzon & Croteau 1991). Lisäksi kaarnakuoriaiset käyttävät monoterpeenejä lähtöaineina syntetisoidessaan sukupuoliferomonejaan.

## 10.3 Seskviterpeenit

Nykyisin seskviterpeenejä tunnetaan yli 9000 yhdistettä, ja ne ovat siten kaikkein monimuotoisin terpenoidiryhmä. Drimaani-tyyppiset dialdehydiseskviterpeenit ovat voimakkaita syönnin estäjiä ja niitä tavataan mm. tatarkasveista. Ihminen maistaa ne polttavina, ja ne estävät täysin eräiden yöperhostoukkien ja koloradonkuoriaisten syönnin. Asterikasveista tavattavat seskviterpenilaktoonit ovat laaja ryhmä yhdistettä, jotka ovat myrkyllisiä mm. perhosille,

heinäsirkoille ja kovakuoriaisille. Niitä on myös karjalle myrkyllisissä kasveissa (Gerhenzon & Croteau 1991). Puuvillasta tavattava gossypol ja sen sukuiset fenolisen ryhmän sisältävät seskviterpeenyhdisteet suojaavat kasvia useiden hyönteislajien syönniltä. Toiminnaltaan ne ovat fenolisten yhdisteiden kaltaisia ja estävät proteiineja hajottavien entsyymien toimintaa.

## 10.4 Diterpeenit

Havupuiden pihka-aineiden hartsihapot ovat tyypillisiä diterpeenejä, jotka suojaavat kasveja herbivorien ja patogeenin vioitukselta ja ”paikkaavat” rungon haavaumia. Muita diterpeenejä ovat esim. tyräkkikasveista tavattavat alifaattisten ja aromaattisten happojen mono- ja diesterit, jotka ovat nisäkkäille myrkyllisiä ja myös ihoa ärsyttäviä yhdisteitä. Laidunkarja usein karttaa näitä yhdisteitä sisältäviä kasveja. Klerodaanit (clerodane) ovat hyönteisten syöntiä ehkäiseviä diterpeenejä, joita tavataan mm. huulikukkais- ja asterikasveissa. Ihminen maistaa yhdisteet kitkerinä (Gerhenzon & Croteau 1991).

## 10.5 Triterpeenit

Kuusi isopreeniyksikköä sisältävät triterpeenit ovat rakenteellisesti heterogeeninen aineryhmä. Tärkeimmät kasveja syöviin eläimiin vaikuttavista triterpeeneistä kuuluvat kukurbitakiineihin, limonoideihin ja saponiineihin (Gerhenzon & Croteau 1991). Kurkkukasvissa esiintyvät lehtikuoriaiset ovat immuuneja kukurbitakiineille, mutta ne varastoivat itseensä näitä kitkerältä maistuvia yhdisteitä suojautuakseen saalistajilta. Neempuusta (*Azadirachta indica*) saatava limonoideihin kuuluva azadirachtin on osoittautunut tehokkaaksi hyönteisten syöntiä ehkäiseväksi yhdisteeksi. Saippuamaiset saponiinit voivat estää mm. punkkien ja kovakuoriaisten syöntiä sekä häiritä nahanluontiin osallistuvien ja steroleihin kuuluvien hormonien toimintaa hyönteisis-

sä. Cardenolidiset steroidit (cardenoliidit), jotka vaikuttavat mm. sydämen toimintaan, voidaan myös lukea triterpeeneihin.

## 10.6 Haihtuvat yhdisteet

Monet mono- ja seksviterpeenit ovat eräiden alkoholiin, ketonien ja aldehydien ohella herkästi haihtuvia yhdisteitä. Hyönteis- ja punkkivioitus aiheuttaa muutoksia kasveista haihtuvien yhdisteiden määrissä ja koostumuksissa. Osa haihtumisen lisääntymisestä johtuu yksinkertaisesti kasvisolukon rikkoontumisesta, mutta viotus käynnistää useiden yhdisteiden kemiallisen synteesin. Näin voittuneissa kasveissa muodostuu yhdisteitä, joita ei tavata terveissä voittumattomissa kasveissa. Näiden muutosten evolutiivinen merkitys on vielä epäselvä, mutta kokeellinen tutkimus on osoittanut, että kasveja syövien hyönteisten luontaiset viholliset osaavat käyttää näitä päästöjä hyödykseen etsiessään sopivia saaliseläimiä (Kielty et al. 1996, Paré & Tumlinson 1997). Päästömuutoksia voi aiheuttaa pelkkä mekaaninen kasvisolukon viottuminen, mutta useimmiten joku kasvisyöjän syljessä oleva yhdiste. Eri tuohyönteisten aiheuttamat haihtuvien yhdisteiden päästöt poikkeavat toisistaan ainekoostumukseltaan (De Moraes et al. 1998). Lois- ja

petohyönteiset sekä petopunkit voivat näiden erojen perusteella tunnistaa saalislajinsa.

Tietyt kemialliset yhdisteet, kuten jasmonihappo voivat käynnistää kasvien indusoidun puolustuksen ja näitä elisitoriyhdisteitä pyritään hyödyntämään nykyaikaisessa kasvinsuojelussa (Cortesero et al. 2000, Thaler 1999). Verrattaessa jasmonihapolla käsiteltyjen ja kehrääjäpunkin voittamien kasvien haihtuvien yhdisteiden päästöjä, havaittiin jasmonihappokäsittelyn indusoivan osittain samojen terpenoidien tuotantoa kuin punkit (esim. (*E-beta*-osimeeni). Kaikkia punkkivioituksen käynnistämien yhdisteiden tuotantoa elisitori ei kuitenkaan käynnistänyt (Dicke et al. 1999). Tämä voi vaikuttaa mm. siihen, että petopunkit eivät havaitse jasmonihapolla käsiteltyjä kasveja yhtä tehokkaasti kuin punkkien voittamia kasveja. Petopunkit suunnistavat jasmonihapolla käsitellyille kasveille selvästi tehokkaammin kuin käsittelemättömille verrannekasveille (Gols et al. 1999).

Indusoituvassa puolustuksessa kasvissa käynnistyy haihtuvien yhdisteiden synteesi ja mm. indusoituvat monoterpeeniyhdisteet voivat muodostua eri metaboliareittiä (deoksyksyluloosireitti) kuin normaalissa monoterpeenisynteesissä (mevalonihapporeitti) (Baldwin & Preston 1999).

## Kirjallisuus

**Baldwin, I.T. & Preston, C.A.** 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta* 208: 137–145.

**Cortesero, A.M., Stapel, J.O. & Lewis, W.J.** 2000. Understanding and manipulating plant attributes to enhance biological control. *Biological Control* 17: 35–49.

**De Moraes, C.M., Lewis, W.J., Pare, P.W., Alborn, H.T. & Tumlinson, J.H.** 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393: 570–573.

**Dicke, M., Gols, R., Ludeking, D. & Posthumus, M.A.** 1999. Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *Journal of Chemical Ecology* 25: 1907–1922.

**Gerhenson, J. & Croteau, R.** 1991. Terpenoids. In: Rosenthal, G.A. & Berenbaum, M.R. (eds.). *Herbivores - their interactions with secondary plant metabolites*. Vol. 1. The chemical participants. Vol 1. 2nd ed. San Diego: Academic Press. p. 165–219. ISBN 0-12-597183-4.

- Gols, R., Posthumis, M.A. & Dicke, M.** 1999. Jasmonic acid induces the production of gerbera volatiles that attract the biological control agent *Phytoseiulus persimilis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93: 77–86.
- Kainulainen, P., Holopainen, J., Palomaki, V. & Holopainen, T.** 1996. Effects of nitrogen fertilization on secondary chemistry and ectomycorrhizal state of Scots pine seedlings and on growth of grey pine aphid. *Journal of Chemical Ecology* 22: 617–636.
- , **Tarhanen, J., Tiilikkala, K. & Holopainen, J.K.** 1998. Foliar and emission composition of essential oil in two carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3780–3784.
- Kielty, J.P., Allen-Williams, L.J. Underwood, N. & Eastwood, E.A.** 1996. Behavioral responses of three species of ground beetle (Coleoptera: Carabidae) to olfactory cues associated with prey and habitat. *Journal of Insect Behavior* 9: 237–250.
- Paré, P.W. & Tumlinson, J.H.** 1997. Induced synthesis of plant volatiles. *Nature* 385: 30–31.
- Phillips, M.A & Croteau, R.B.** 1999. Resin-based defences in conifers. *Trends in Plant Science* 4: 184–190.
- Thaler, J.S.** 1999. Jasmonate-inducible plant defence cause increased parasitism of herbivores. *Nature*. 399: 686–688.

# 11 Prosessointien vaikutus terpeeneihin

Helena Hyvärinen

*MTT, Elintarvikkeiden tutkimus, Elintarvikekemian ja -tekniikka,  
31600 Jokioinen, [helena.byvarinen@mtt.fi](mailto:helena.byvarinen@mtt.fi)*

Terpeenit ovat kasveille tyypillisiä sekundaarisia aineenvaihduntatuotteita. Ne muodostavat pääosan kasvien haihtuvista

yhdisteistä. Erilaiset prosessoinnit, kuivaaminen sekä säilyttäminen vaikuttavat kasvien terpeenipitoisuuksiin.

*Avainsanat: kasvit, kemialliset yhdisteet, käsittely, kuivatus, säilytys, säteilytys*

## 11.1 Johdanto

Mausteissa ja sitruhedelmissä terpeenihilivedyt muodostavat pääosan haihtuvista öljyistä. Ne voivat helposti muuttua aromaattisiksi hiilivedyiksi aiheuttaen aromin pilaantumisen. Aromiaineina niiden merkitys ei ole kovin suuri, koska niiden hajukynnys on korkea. Terpeenialkoholit ovat huomattavasti tärkeimpiä aromiaineita, koska niillä on varsin voimakas tuoksu ja niillä on pienissäkin pitoisuuksissa huomattava vaikutus kokonaisaromiin. Pääsääntöisesti kasvien terpeenipitoisuuteen vaikuttavia tutkimuksia löytyy säilytyksestä, kuivauksesta ja eräistä prosessoinneista kuten mehun ja nektarin valmistuksesta.

Lisäksi useissa tutkimuksissa on määritetty eri kasveille tyypillisiä terpeenejä sekä niiden pitoisuuksia: esim. iisoppi (Kerrola et al. 1994), korianteri (Kerrola & Kallio 1993), kumina (Kallio et al. 1994), kumina ja tilli (Bouwmeester et al. 1995), oregano

(Russo et al. 1998), rosmariini (Jaganmohan Rao et al. 1998), rosmariini, salvia ja laventeli (Guillén et al. 1996), kirsikka (Mattheis et al. 1992), vadelma (Pabst et al. 1991), aprikoosi, persikka ja luumu (Krammer et al. 1991), mango (Malundo et al. 1997; Sakho et al. 1998), lehtiselleri (Tang et al. 1990).

## 11.2 Kuivaaminen

Yrttejä voidaan käyttää tuoreina vain hyvin lyhyen ajan keräämisestä. Siksi yrttien käyttöä pidennetään kuivaamalla, pakastamalla tai säilömällä niitä öljyyn tai etikkaan. Lisäksi kasvien öljyjä voidaan tislata talteen. Yrttejä kuivataan joko ilma-kuivauksella, erilaisilla uuneilla sekä pakaskuivauksella. Kuivausmenetelmä ja kuivauslämpötilat vaikuttavat eniten muutokseen terpeenipitoisuuksissa.

Baghavan et al. (1997) tutkivat mikro-

aaltouunilla ja kiertoilmakuivaajalla tehdyn kuivauksen vaikutusta meiramiin. Tuloksia verrattiin tuoreisiin meiramien lehtiin. Meiramien haihtuvista yhdisteistä 95–97 % on monoterpeenejä ja 3–5 % seskviterpeenejä. Meiramiöllyn luonteenomainen aromi muodostuu *cis*- ja *trans*-sabineenihydraateista ja terpin-4-olista. Kiertoilmauunilla kuivattujen lehtien öljypitoisuus oli n. 93 % tuoreiden lehtien pitoisuudesta ja mikroaaltouunilla vain 12–56 % tehosta riippuen. Kun kuivaus tehtiin mikroaaltouunilla isoimmalla teholla, alhaisen kiehumispisteen omaavat terpeenit olivat hävinneet ja korkeammalla kiehuvien yhdisteiden pitoisuudet kasvoivat jonkin verran. Esim. *trans*-sabineenihydraatti oli hävinnyt kokonaan ja terpin-4-olin määrä oli lisääntynyt n. 46 %. Pienemmillä tehoilla öljyn koostumus vastasi kiertoilmakuivauksella saatua öljyä. Parhaimmaksi kuivaustavaksi todettiin kiertoilmakuivaus, koska öljypitoisuus ei pienene kovinkaan paljon eikä öljyn koostumus myöskään muutu liikaa. Vastaavalaaiseen tulokseen päätyi myös Jagamohan Rao et al. (1998) tutkiessaan rosmariinin kuivausta.

Timjamin pakkaskuivaus pienentää Venskutoniksen et al. (1996) mukaan terpeenipitoisuuksia vain 1–3 % tuoreeseen timjamiin verrattuna. Myös ilmakeivauksella saadut tulokset olivat samaa luokkaa kuin pakkaskuivauksella. Timjamille luonteenomaisia terpeeniyhdisteitä ovat mm. tymoli,  $\alpha$ -pineeni ja  $\beta$ -karyofylleeni. Kuivauksessa  $\beta$ -karyofylleenin ja tymolin pitoisuudet kasvoivat ja muiden pienenevät.

Porkkanan aromiin vaikuttavia yhdisteitä on useita: monoterpeeneistä mm.  $\beta$ -pineeni ja p-kymeeni, alkoholeista mm. linaloli, asetaateista mm. linalyyli sekä seskviterpeeneistä mm.  $\alpha$ -farneseeni. Porkkanan pakkaskuivauksessa terpeenipitoisuudet pienenevät peräti 75 %. Yksi syy, joka vaikuttaa hävikkiin, on pakkaskuivauksessa käytetty vakuumi. Terpeenit, joiden kiehumispiste on alhainen, hävisivät kokonaan. Näitä terpeenejä olivat mm.  $\beta$ -pineeni ja p-kymeeni. Myös muissa yhdisteissä

pitoisuudet pienenevät (Heatherbell et al. 1971).

### 11.3 Prosessointi

Shamaila et al. (1996) tutkivat ryöppäyksen vaikutusta porkkanan terpeeneihin. Tutkimuksessa pilkkottuja porkkanoita kiehautettiin 0–300 s. Tuloksia verrattiin tuoreen porkkanan terpeeneihin. Lähes kaikki terpeenit katosivat ryöppäyksen aikana siten, että 70 % hävikistä tapahtui ensimmäisen minuutin aikana. Vähenneminen oli ominaista kaikille terpeeneille mutta reaktionopeus vaihteli. Yleensä porkkanalla monoterpeenien pitoisuudet ovat suuremmat kuin seskviterpeenien. Monoterpeenien määrä pieneni nopeasti ensimmäisen minuutin aikana. Sen jälkeen vähennemisnopeus pieneni ja kolmen minuutin ryöppäyksen jälkeen mono- ja seskviterpeeneiden pitoisuustasot olivat jälleen toisiinsa verrannolliset. Pitoisuuksien pieneminen johtui haihtumisesta, veteen liukenemisesta ja lämpöhajoamisesta. Käsiteltyihin porkkanoihin saa paremman maun sopivalla ryöppäyksellä, nopealla jäähdyttämällä sekä entsyymien inaktivoimisella. Ryöppäysmenetelminä voidaan käyttää höyry- tai mikroaaltoryöppäystä.

Howard & Dewi (1996) tutkivat prosessoinnin ja säilytyksen vaikutusta porkkanaan. Porkkanan pintaa raaputettiin pois ja ne pakattiin LDPE-pusseihin. Porkkanat säilytettiin 2 °C:ssa neljätoista päivää ja sen jälkeen vielä kolme päivää 10 °C:ssa. Säilytyksen aikana kokonaisterpenoidipitoisuus laski 72 % siten, että pääosa pitoisuuden laskusta tapahtui kolmen ensimmäisen päivän aikana. Siirto lämpimämpään ei vaikuttanut enää kovin paljon terpeenipitoisuuksiin. Suurin hävikki tapahtui  $\alpha$ -terpineenisä, jonka pitoisuus pieneni lähes 99 %. Samassa tutkimuksessa porkkanoiden pinnalle levitettiin syötävä selluloosapohjainen polymeerikalvo. Tämä kalvo ei kuitenkaan estänyt terpeenien hävikkiä johtuen käytetyn kalvon ominaisuuksista. Yleensä kal-

voilla voidaan estää terpeenien hävikkiä.

Iversen et al. (1998) tutkivat pastöroinnin ja entsyymikäsittelyn vaikutusta mustaherukkanektariin. Mustaherukalla löytyy samoja terpeeneitä marjoista, nupuista ja lehdistä. Nektarien terpeenipitoisuus poikkeaa mm. marjojen terpeeneistä sen vuoksi, että terpenoidit ovat hydrofobisia eivätkä liukene veteen. Terpeenit kestivät entsyymikäsittelyn ja pastöroinnin hyvin. Entsyymikäsittely pienensi vain  $\alpha$ -karyofylleenin pitoisuutta. Muiden määritettyjen terpeenien pitoisuudet pysyivät samana tai kasvoivat. Entsyymikäsittelyssä tapahtuva muutos maussa johtuu pääosin estereiden hajoamisesta ja tämä yhdessä terpeenimuutosten kanssa vaikuttaa nektarin makuun. Pastöroinnin makua stabiloiva vaikutus perustuu mustaherukan entsyymien inaktivoitumiseen. Leino & Kallio (1993) selittivät mustaherukkaviinien maussa esiintyvät vaihtelut terpeenihilivetyjen määrän vähentymisellä sekä dimetyylisulfidien ja alifaattisten aldehydien määrän lisääntymisellä viinin raaka-aineena käytetyssä mustaherukkamehussa. Mustaherukasta valmistetuissa viineissä on myös vähemmän monoterpeenejä kuin mehuissa. Määrän pieneneminen selittyy käytetyistä lämpötiloista.

Suurin ongelma kuivattujen yrttien säilymisessä on niiden kontaminoituminen mikro-organismeilla. Tehokkain keino mikrobiologisen laadun varmistamiseksi on ollut kuivattujen yrttien säteilyttäminen. Venskutonin et al. (1996) säteilyttivät kuivattuja timjamin lehtiä sekä  $\gamma$ - että  $\beta$ -säteilytyksellä. Vain  $\beta$ -säteilytys vaikutti terpeenipitoisuuteen siten, että  $\gamma$ -terpineenin pitoisuus lisääntyi hieman. Farag Zaiedin et al. (1996) mukaan mustapippurin siemenen  $\gamma$ -säteilyttäminen pienentää  $\beta$ -terpineenin pitoisuutta. Mykreeniä ja limoneeniä ei löytynyt säteilyttämisen jälkeen siemenistä. Samanaikaisesti hapettuneiden terpeenien (esim. alkoholien) määrä siemenissä lisääntyi. Käsittelemättömissä siemenissä hapet-

tuneita terpeeneitä oli 14 % ja säteilytetyissä 41 %. Lisääntyminen selittyy terpeenien aromaattisen renkaan hapettumisella tai hydrolysoitumisella.

## 11.4 Säilytys

Venskutonin et al. (1996) jakoivat timjamin terpeenit kahteen ryhmään sen mukaan, tapahtuiko niissä pieniä vai isoja muutoksia säilytyksen aikana. Pieniä muutoksia tapahtui mm.  $\alpha$ -terpineenissä, p-kymeenissä ja tymolissa eli niiden määrä pysyi lähes samana kymmenen kuukauden säilytyksen aikana.  $\alpha$ -tujeenin, mykreenin ja *trans*-sabineenihiydraattin määrät pienenivät 21–40 %. Myös  $\alpha$ -terpineeni ja  $\gamma$ -terpineeni vähenivät. Karyofylleenioksidin määrä kasvoi kolminkertaiseksi kymmenen kuukauden säilytyksen aikana. Saman aikaisesti  $\beta$ -karyofylleenin määrä pieneni saman verran kuin mitä oksidin määrä lisääntyi.

Basilikalle tyypillisiä yhdisteitä ovat metyylikavikoli, eugenoli, linaloli ja 1,8-kineoli. Niiden pitoisuuteen vaikuttaa kasvupaikka ja esim. suomalaisessa basilikassa metyylikavikolin pitoisuudet (66,4 %) ovat suuremmat kuin linalolin (10,6 %). Pitoisuuksiltaan suomalainen basilika vastaa kuubalaista ja intialaista basilikaa. Kun basilikaa kuivattiin Baritaxin et al. (1992) tutkimuksessa 12 tuntia 45 °C:ssa ja sen jälkeen säilytettiin alumiinipolyetyleenipolyamidi pusseissa kolme, kuusi tai seitsemän kuukautta, terpeenipitoisuudet laskivat 19, 62 ja 66 % säilytysajasta riippuen. Metyylikavikolin ja eugenolin pitoisuudet pienenivät ja vastaavasti linalolin ja 1,8-kineolin pitoisuudet kasvoivat kolmen kuukauden säilytyksen aikana, minkä jälkeen myös ne pienenivät. Kuivauksessa ja säilytyksessä pienenemiset olivat haihtumisen seurausta. Vastaavasti linalolin ja 1,8-kineolin määrän kasvu johtuu glykosidien hydrolysoitumisesta kuivauksen aikana.

- Baghavan, B., Rao, L.J., Singh, M. & Abraham, K.O.** 1997. Effect of drying methods on the flavour quality of marjoram (*Oreganum majorana* L.). *Nahrung* 41 (3): 159–161.
- Baritoux, O., Richard, H., Touche, J. & Derbesy, M.** 1992. Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. Part I. Basil, *Ocimum basilicum* L. *Flavour and Fragrance Journal* 7 (5): 267–271.
- Bouwmeester, H.J., Davies, J.A.R. & Toxopeus, H.** 1995. Enantiomeric composition of carvone, limonene and carveols in seed of dill and annual and biennial caraway varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (12): 3057–3064.
- Farag Zaied, S.E.A., Aziz, N.H. & Ali, A.M.** 1996. Comparing effects of washing, thermal treatments and gamma irradiation on quality of spices. *Nahrung* 40 (1): 32–36.
- Guillén, M.D., Cabo, N. & Burillo, J.** 1996. Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70: 359–363.
- Heatherbell, D.A., Wrolstad, R.E. & Libbey, L.M.** 1971. Carrot volatiles. 1. Characterization and effects of canning and freeze drying. *Journal of Food Science* 36 (2): 219–224.
- Howard, L.R. & Dewi, T.** 1996. Minimal processing and edible coating effects on composition and sensory quality of mini-peeled carrots. *Journal of Food Science* 61 (3): 643–645, 651.
- Iversen, C.K., Jakobsen, H.B. & Olsen, C.-E.** 1998. Aroma changes during black currant (*Ribes nigrum* L.) nectar processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (3): 1132–1136.
- Jagamohan Rao, L., Singh, M., Raghavan, B. & Abraham, K. O.** 1998. Rosemary (*Rosmarinus officianalis* L.): Impact of drying on its flavor quality. *Journal of Food Quality* 21 (2): 107–115.
- Kallio, H., Kerrola, K. & Alhonmäki, P.** 1994. Carvone and limonene in caraway fruits (*Carum carvi* L.) analyzed by supercritical carbon dioxide extraction-gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (11): 2478–2485.
- Kerrola, K., Galambosi, B. & Kallio, H.** 1994. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officianalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (3): 776–781.
- , & **Kallio, H.** 1993. Volatile compounds and odor characteristics of carbon dioxide extracts of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (5): 785–790.
- Krammer, G., Winterhalter, P. Schwab, M. & Schreier, P.** 1991. Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of *Prunus* species: Apricot (*P. armeniaca* L.), peach (*P. persica* L.), yellow plum (*P. domestica* L. ssp. *Syriaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 (4): 778–781.
- Leino, M. & Kallio, H.** 1993. Volatile compounds of blackcurrant juice and wine. *Zeitschrift für Lebensmittel, Untersuchung und Forschung* 196: 410–414.
- Malundo, T.M.M., Baldwin, E.A., Moshonas, M.G., Baker, R.A. & Shewfelt, R.L.** 1997. Method for the rapid headspace analysis of mango (*Mangifera indica* L.) homogenate volatile constituents and factors affecting quantitative results. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (6): 2187–2194.
- Mattheis, J.P., Buchanan, D.A. & Fellman, J.K.** 1992. Volatile compounds emitted by sweet cherries (*Prunus avium* Cv. Bing) during fruit development and ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (3): 471–474.
- Pabst, A., Barron, D., Etiévent, P. & Schreier, P.** 1991. Studies on the enzymatic hydrolysis of bound aroma constituents from raspberry fruit pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 (1): 173–175.
- Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P. & Carnacini, A.** 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letswaart): *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (9): 3741–3746.
- Sakho, M., Chassagne, D., Jaus, A. Chiarazzo, E. & Crouzet, J.** 1998. Enzymatic maceration: effects on volatile components of mango pulp. *Journal of Food Chemistry* 63 (6): 975–978.
- Shamaila, M., Durance, T. & Girard, B.** 1996. Water blanching effects on headspace volatiles and sensory attributes of carrots. *Journal of Food Science* 61 (6): 1191–1195.
- Tang, J., Zhang, Y., Hartman, T.G., Rosen, R.T & Ho, C-T.** 1990. Free and glycosidically bound volatile compounds in fresh celery (*Apium graveolens* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (10): 1937–1940.
- Venskutonis, R., Poll, L. & Larsen, M.** 1996. Influence of drying and irradiation on the composition of volatile compounds of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Flavour and Fragrance Journal* 11 (2): 123–128.



# 12 Terpeenien analysointi

Juha-Matti Pihlava

*MTT, Elintarvikkeiden tutkimus, Kemian laboratorio, 31600 Jokioinen,  
juha-matti.pihlava@mtt.fi*

Kaasukromatografia soveltuu hyvin haihtuvien terpeenien analysointiin. Toisaalta haihtuvuus asettaa vaatimukset yhdistei-

den eristämiseen. Terpeenipitoisuuksien vertailun tekee vaikeaksi se, että eri esikäsitelymenetelmillä saadaan erilaisia tuloksia.

*Avainsanat: kemialliset yhdisteet, analysointimenetelmät, kaasukromatografia*

## 12.1 Johdanto

Yleisimpiä tekniikoita terpeenien ja muiden haihtuvien yhdisteiden eristämiseksi ovat tislaukset, uutto sekä headspace-uutto. Varsinainen yhdisteiden erottaminen tehdään kaasukromatografisesti (von Schants & Hil-tunen 1990).

### 12.1.1 Yhdisteiden eristäminen

Yksi perinteisistä tavoista eristää terpeenejä tutkittavasta materiaalista on vesihöyrytislaukset. Vesihöyrytislaukset voidaan suorittaa kahdella tavalla, joko kiehattamalla näytemateriaalia veden kanssa ja nesteyttämällä haihtuvat yhdisteet jäädyttäjässä tai johtamalla höyryä neste-vesiseoksen läpi ja keräämällä höyrystyvät yhdisteet talteen. Terpeenejä voidaan myös eristää kasvimateriaalista helposti haihtuvilla orgaanisilla liuottimilla Soxhlet-uutolla, jonka etuna vesihöyrytislaukseen on se, ettei uutossa tarvita korkeita lämpötiloja (Milner et al. 1997). Ylikriittistä hiilidioksiduuuuttoa on myös

käytetty haihtuvien yhdisteiden uututtamiseen (Pallado et al. 1997). Edellä mainitut eristystekniikat soveltuvat sekä analyysin mittakaavan työskentelyyn että pilottiluokan eristykseen toisin kuin ns. headspace-uutto.

Headspace-uutossa näyte suljetaan astiaan, jolloin haihtuvat yhdisteet tasapainotuvat astian yläosassa olevaan kaasufaasiin, josta ne voidaan helposti siirtää kaasukromatografiseen analyysiin. Staattisessa headspace-uutossa analyysiin tasapainottuu näytteen ja kaasufaasin välille suljetussa tilassa. Menetelmä soveltuu lähinnä näytteille, jotka sisältävät suuren määrän helposti haihtuvia yhdisteitä. Dynaamisessa headspace-uutossa haihtuvat yhdisteet sekoittuvat näytteen yli virtaavaan kaasuun, josta yhdisteet väkevöidään kylmäloukkuun tai adsorbenttiin. Sopivan keräysajan jälkeen yhdisteet siirretään analyysiin muuttamalla keräysyksikön lämpötilaa (Leino 1993). Dynaamista headspace-uuttoa on käytetty esim. persikan (Narain et al. 1990), paistetun valkosipulin (Kim et al. 1995), mustaherukkamehun ja -viinien (Leino & Kallio

1993), yrttien (Pallado et al. 1997), appelsiinimehujen (Moshonas & Shaw 1994) ja valkoviinien (Garcia-Jares et al. 1995) haihtuvien yhdisteiden eristämässä.

Eri eristysmenetelmillä saadaan hyvin erilaisia tuloksia. Esim. headspace-tekniikalla uutetuissa näytteissä saattaa helposti haihtuvien yhdisteiden suhteellinen osuus olla suurempi kuin vesihöyrytislauksella. Määrällisesti vesihöyrytislauksella saatiin kuitenkin eristetyksi enemmän yhdisteitä kuin headspace-tekniikalla (Wilson et al. 1992). Pallado et al. (1997) vertailivat laventelin, basilikan, inkiväärin ja neilikan haihtuvia öljyjä, jotka oli eristetty vesihöyrytislauksella, liuotinuutolla sekä ylikriittisellä hiilidioksiduutolla. Kaikki haihtuvien öljyjen yhdisteryhmät löytyivät ylikriittisestä hiilidioksiduutuksesta, mutta hyvinkin erilaisilla suhteellisilla osuuksilla perinteisiin menetelmiin verrattuna. Esim.

terpeenihiihivetyjen pitoisuus oli huomattavasti pienempi ylikriittisellä hiilidioksidilla uutetussa öljyssä verrattuna vesihöyrytislaukseen (Pallado et al. 1997).

### 12.1.2 Yhdisteiden tunnistaminen ja kvantitointi

Terpeenien kuten muidenkin haihtuvien yhdisteiden analysointiin käytetään lähes yksinomaan kaasukromatografia joko liekki-ionisaatiodetektorilla (Hendriks et al. 1990, Buchbauer et al. 1993, Putievsky et al. 1994, Buchbauer et al. 1996) tai massaselektiivisellä detektorilla varustettua (Narain et al. 1990, Leino & Kallio 1993, Moshonas & Shaw 1994, Garcia-Jares et al. 1995, Kim et al. 1995, Venskutonis et al. 1995, Weenen et al. 1996, Pallado et al. 1997, Ong et al. 1998).

## Kirjallisuus

---

**Buchbauer, G., Jirovets, L. & Nikiforov, A.** 1996. Comparative investigation of essential clover flower oils from Austria using gas chromatography-flame ionization detection, gas chromatography-mass spectrometry, and gas chromatography-olfactometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1827–1828.

–, **Jirovets, L. Wasicky, M. & Nikiforov, A.** 1993. Headspace and essential oil of apple flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 116–118.

**Garcia-Jares, C. Garcia-Martin, S. & Cela-Torrijos, R.** 1995. Analysis of some highly volatile compounds of wine by means of purge and cold trapping injector capillary gas chromatography. Application to the differentiation of Rias Baixas Spanish white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 764–768.

**Hendriks, H. Van der Elst, D., Van putten, F. & Bos, R.** 1990. The essential oil of Dutch Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) *Journal of Essential Oil Research* 2: 155–162.

**Kim, S., Wu, C., Kobayashi, A., Kubota, K. & Okumura, J.** 1995. Volatile compounds in stir-fried garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2951–2955.

**Leino, M.** 1993. Application of headspace gas chromatography complemented with sensory evaluation to analysis of various foods. 49 p. Turku: University of Turku. The department of biochemistry and food chemistry. Academic dissertation. ISBN 952-90-4431-3.

– & **Kallio, H.** 1993. Volatile compounds of blackcurrant juice and wine. *Zeitschrift für Lebensmittel, Untersuchung und Forschung* 196: 410–414.

**Milner, C., Trengove, R., Bignell, C. & Dunlop, P.** 1997. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of the essential oils of eucalypts: Comparison with other methods. In: Liskens, H.F. & Jackson, J.F. (eds.). *Plant volatile analysis. Modern methods of plant analysis vol 19*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. p. 141–158. ISBN 3-540-61589.

- Moshonas, M. & Shaw, P.** 1994. Quantitative determination of 46 volatile constituents in fresh unpasteurized orange juices using dynamic headspace gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1525–1528.
- Narain, N. Hsieh, T. & Johnson, C.** 1990. Dynamic headspace concentration and gas chromatography of volatile flavour components of peach. *Journal of Food Science* 55: 1303–1307.
- Ong, P., Acree, T. & Lavin, E.** 1998. Characterization of volatiles in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 611–615.
- Pallado, P., Tassinato, G., D'alpaos, M. & Traldi, P.** 1997. Gas chromatography/mass spectrometry in aroma chemistry: a comparison of essential oils and flavours extracted by classical and supercritical techniques. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 11: 1335–1341.
- Putievsky, E., Ravid, U. Dudai, N. & Katzir, I.** 1994. A new cultivar of caraway (*Carum Carvi* L.) and its essential oil. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 2: 81–84.
- Venskutonis, P., Dapkevicius, A. & Baranuskienė, M.** 1995. Flavour composition of some lemon-like aroma herbs from Lithuania. In: Charalambous, G. (ed.). *Food Flavors: generation, analysis and process influence*. 8th International Flavor Conference, Cos (Greece), 6.-8. 7.1994. Amsterdam: Elsevier Science. p. 833–847. ISBN 0-444-82013-2.
- von Schantz, M. & Hiltunen, R.** 1990. *Farmakognosia: rohdokset, luontaistuotteet ja mausteet, yleinen osa*. 2nd ed. Helsinki: Yliopistopaino. 308 p. ISBN 951-570-062-0.
- Weenen, H., Koolhaas, W. & Apriyantono, A.** 1996. Sulfur-containing volatiles of durian fruits (*Durio zibethinus* Murr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3291:3293.
- Wilson, L., Senechal, N. & Widrechner, M.** 1992. Headspace analysis of the volatile oils of *Agastache*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1362–1366.



31600 JOKIOINEN

	<b>Julkaisun sarja ja numero</b> MTT:n julkaisuja. Sarja A 100	
	<b>Julkaisuaika (kk ja vuosi)</b> Syyskuu 2001	
<b>Tekijä(t)</b> Helena Hyvärinen (toim.)	<b>Tutkimushankkeen nimi</b>	
	<b>Toimeksiantaja(t)</b> MTT	
<b>Nimike</b> Kasvipäriset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit. Kirjallisuuskatsaus		
<b>Tiivistelmä</b> <p>Tässä sarjassa on aiemmin julkaistu kasvien glukosinolaatteja käsittelevä kirjallisuuskatsaus. Tämä kirjallisuuskatsaus käsittelee fenolisia yhdisteitä ja terpeenejä.</p> <p>Fenoliset yhdisteet ja terpeenit ovat kasvien sekundäärisiä aineenvaihduntatuotteita. Niiden esiintymiseen voidaan vaikuttaa viljelyteknisesti, lajikevalinnalla ja mahdollisesti hyödyntämällä kasvua luonnostaan hidastavia stressitekijöitä. Suomessa kasvua rajoittavat mm. ravinteiden niukkuus, viileyden ja valon yhteisvaikutus sekä kuivuus. Ratkaisevaa on myös korjata sato oikeassa kehitysvaiheessa ja valita runsaasti sekundääriaineita sisältäviä kasvosioita. On oleellista tuntea eri tekijöiden merkitys, kun pyritään sekundääriaineiden avulla erilaistamaan sadon käyttöä tai tuottamaan säilyvämpiä, maukkaampia ja terveellisempiä kasvituotteita.</p> <p>Kasvien fytokeemikaalien tuotantoa voidaan tehostaa ruiskuttamalla kasvustoon elisitoreja, jotka aktivoivat kasvin puolustusta. Lisääntynyt kasvien suoja-aineiden tuotanto parantaa kasvien terveyttä. Samalla voi muodostua lisää myös ihmisen terveyttä edistäviä bioaktiivisia yhdisteitä.</p> <p>Useimmat terpeeneihin kuuluvat yhdisteet karkottavat kasveissa kasvissyöjiä tai ehkäisevät syönteitä. Viljelyyn voidaan valita tuholaisia kestäviä lajikkeita ja vastaavasti houkutekaistoille tuholaisia houkuttelevia lajikkeita. Näiltä kaistoilta tuhohyönteiset voidaan torjua.</p> <p>Fenoliset yhdisteet voivat vaikuttaa terveyteen monella tavalla. Ne saattavat mm. estää syöpää ja vähentää sydän- ja verisuonitautien riskiä. Lisäksi joidenkin fenolisten yhdisteiden on todettu estävän allergioita (anti-allergeenit) sekä virusten, bakteerien ja sienten lisääntymistä.</p> <p>Erilaiset prosessoinnit, kuivaaminen ja säilyttäminen vaikuttavat fenolisten yhdisteiden ja terpeenien pitoisuuksiin elintarvikkeissa. Fenolisten yhdisteiden määrittämisessä käytetään neste- ja kaasukromatografiaa ja terpeenien määrittämisessä pääosin kaasukromatografiaa.</p>		
<b>Avainsanat</b> kasvinviljely, kasvinsuojelu, biosynteesi, kemiallinen koostumus, biomolekyylit, torjuntamenetelmät, terveysvaikutukset, fenolit, flavonoidit, lignaanit, terpeenit, analyysimenetelmät		
<b>Toimintayksikkö</b> MTT, Elintarvikkeiden tutkimus, Elintarvikekemian ja -tekniikka, 31600 Jokioinen		
<b>ISSN</b> 1239-0852 1239-0844	<b>ISBN</b> 951-729-629-0 (Painettu) 951-729-630-4 (Verkojulkaisu)	<b>Saatavuus</b> <a href="http://www.mtt.fi/asarja">http://www.mtt.fi/asarja</a>
<b>Myynti</b> MTT, Tietopalveluyksikkö, 31600 JOKIOINEN Puhelin (03) 4188 2327 Telekopio (03) 4188 2339 Sähköposti <a href="mailto:julkaisut@mtt.fi">julkaisut@mtt.fi</a>		<b>Sivuja</b> 97 s.

Jyväskylän yliopistopaino 2001

ISBN 951-729-629-0 (Painettu)  
ISBN 951-729-630-4 (Verkkójulkaisu)  
ISSN 1239-0852 (Painettu)  
ISSN 1239-0844 (Verkkójulkaisu)

<http://www.mtt.fi/asarja>