

**VALOINTENSITEETIN, TYPEN MÄÄRÄN JA VUODENAIKAISUUDEN  
VAIKUTUS PIHARATAMON LEHTIUUTTEIDEN FENOLISTEN  
YHDISTEIDEN PITOISUUTEEN JA ANTIBAKTEERISIIN  
OMINAISUUKSIIN**



Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Puutarhatalous, Lepaa

Kevät 2021

Milla Kössilä

---

Tekijä	Milla Kössilä	Vuosi 2021
Työn nimi	Valointensiteetin, typen määrän ja vuodenaikaisuuden vaikutus piharatamon lehtiuutteiden fenolisten yhdisteiden pitoisuuteen ja antibakteerisiin ominaisuuksiin	
Ohjaaja	Marika Tossavainen	

---

## TIIVISTELMÄ

Opinnäytetyössä tutkittiin kerrosviljelmässä kahdessa eri valointensiteetissä ja tyyppipitoisuudessa viljeltyjen ja luonnosta kesällä ja syksyllä kerättyjen piharatamoiden (*Plantago major*) fenolisten yhdisteiden tuottoa, uutomenetelmän vaikutusta fenolisten yhdisteiden uutumiseen sekä uutteen antibakteerisia ominaisuuksia. Työn tilaajana oli Hamk Bio -tutkimusyksikkö.

Fenolisten yhdisteiden uutoissa käytettiin paineistettua liotinuuttoa (ASE) (90 °C ja 120 °C) ja ultraäänitehostettua uuttoa. ASE-uutoissa uuttoliuoksena oli 25 % ja ultraäänitehostetuissa uutoissa 25, 70 ja 100 % etanoli. Kokonaisfenolipitoisuudet mitattiin spektrofotometrisesti Folin-Ciocalteu -menetelmällä ja uutteen vaikutusta kolmen eri bakteerin kasvuun testattiin kasvatusmaljoilla.

Korkeampi uuttolämpötila (120 °C) tehosti fenolisten yhdisteiden uuttoa. Luonnossa kasvaneilla piharatamoilla oli korkeammat kokonaisfenolipitoisuudet kuin viljellyissä piharatamoissa. Vuodenaikaisuuden vaikutus näkyi kesäkuussa kerättyjen lehtien korkeampana kokonaisfenolipitoisuutena kuin syyskuussa kerättyjen lehtien. Korkea valointensiteetti lisäsi kokonaisfenolien määrää viljellyissä piharatamoissa. Merkittävää bakteerien kasvua inhiboivaa vaikutusta piharatamouutteilla ei havaittu.

Avainsanat ratamot, piharatamo, fenoliset yhdisteet, antibakteerisuus

Sivut 28 sivua ja liitteitä 1 sivu

Lepaa

---

Author	Milla Kössilä	Year 2021
Subject	Effect of light intensity, nitrogen supply and seasonality on concentration of phenolic compounds and antibacterial properties of <i>Plantago major</i> leaf extracts	
Supervisor	Marika Tossavainen	

---

ABSTRACT

In this thesis, production of phenolic compounds of *Plantago major* grown in vertical farm and collected from the wild were studied. Effect of extraction temperature and method on the yield of phenolic compounds was investigated. Antibacterial properties of leaf extracts were studied. Plants were farmed under two different light intensities, and two nitrogen levels were used for fertilization. This thesis was commissioned by HAMK Bio Research Unit.

Pressurized solvent extraction (ASE) (90 °C and 120 °C) and ultrasonic assisted extraction were used for extraction of phenolic compounds. In both extractions, ethanol was used as an extraction solvent (25% in ASE and 25, 70 and 100% in ultrasonic assisted extraction). The total phenol contents were measured spectrophotometrically (Folin-Ciocalteu method). Growth inhibition of three bacterial strains was tested using disk diffusion method. A higher extraction temperature enhanced extraction of phenolic compounds. *P. major* grown in the wild had higher total phenol concentrations than cultivated plants. Total phenol content was higher in leaves collected in June than those collected in September. In cultivated plants high light intensity increased the amount, of phenolic compounds. No significant bacterial growth inhibition was obtained.

Keywords *Plantago spp.*, *Plantago major*, phenolic compounds, antibacterial

Pages 28 pages and appendices 1 page

## Sisällys

1	Johdanto .....	1
2	Ratamot ja niiden hyödyntäminen .....	2
2.1	Ratamoiden historia kansanlääkinnässä .....	3
2.2	Ratamoiden käyttö kotimaisessa luonnonkosmetiikassa .....	3
3	Ratamoiden kemiallinen koostumus .....	4
3.1	Kemialliset yhdisteet ratamoiden maanpäällisissä osissa .....	4
3.2	Piharatamoiden fenoliset yhdisteet ja niiden vaikutukset .....	5
3.3	Fenolisten yhdisteiden uuttomenetelmät .....	6
4	Ratamoiden antibakteerisuus .....	7
5	Aineisto ja menetelmät .....	7
5.1	Piharatamoiden kasvatusta kerrosviljelykontissa .....	8
5.2	Luonnosta kerätyt piharatamot .....	9
5.3	Näytteiden esikäsittely .....	9
5.3.1	Paineistettu liotinuutto .....	10
5.3.2	Ultraäänitehostettu etanoli- ja etanolivesiuutto .....	10
5.3.3	Jatkokäsittely ennen kokonaisfenolianalyysiä .....	10
5.3.4	Uutteiden jatkokäsittely antibakteerisuuden testaukseen .....	11
5.4	Kokonaisfenolimääritys Folin-Ciocalteu -menetelmällä .....	11
5.5	Bakteerien kasvatusta ja uutteiden testaus .....	11
5.5.1	Bakteerien kasvatustuotteiden ja -maljojen valmistus .....	12
5.5.2	Bakteerien esikasvatusta .....	12
5.6	Piharatamouutteiden antibakteerisuuden testaus kasvatustuotteilla .....	13
5.6.1	Antibakteerisuuden testaus ASE-uutteilla .....	13
5.6.2	Ultraäänitehostetun uutteen uutteiden antibakteerisuuden testaus ..	14
5.6.3	Konsentroitujen ultraäänitehostetun uutteen uutteiden testaus .....	14
5.7	Tulosten tilastollinen käsittely .....	15
6	Tulokset .....	15
6.1	Uuttolämpötilan ja kasvuolosuhteiden vaikutus kokonaisfenolipitoisuuteen	15
6.2	Kokonaisfenolipitoisuudet ultraäänitehostetuissa uutuoissa .....	17
6.3	Uutteiden antibakteerisuuden testaus kasvatustuotteilla .....	18
7	Tulosten tarkastelu .....	20
8	Pohdinta .....	22
	Lähteet .....	23

## Kuvat, taulukot ja kaavat

Kuva 1. Piharatamon maanpäällisissä osissa olevia vaikuttavia aineita, ominaisuuksia ja käyttökohteita (Alkuperäinen kuva Adom ym., 2017. Soveltanut Kössilä, 2021).....	5
Kuva 2. Kerrosviljelykontissa kasvatettuja piharatamoita (Kössilä, 2020).....	9
Kuva 3. Piharatamoiden ASE -uutteista mitatut kokonaisfenolipitoisuudet (mg GAE/g)	16
Kuva 4. Piharatamoiden kokonaisfenolipitoisuudet ultraäänitehostetun uuton uutteissa. .....	17
Kuva 5. Ultraäänitehostetun uuton uutteet kasvatusmaljalla. ....	18
Kuva 6. Ultraäänitehostetun uuton uutteet kasvatusmaljalla (raakauute) .....	19
Taulukko 1. Piharatamoiden lannoituskäsittelyt ja valointensiteetti kasvatuskokeessa ..	8
Taulukko 2. Eri uuttomenetelmillä valmistettujen piharatamouutteiden antibakteerisuustesteissä käytetyt bakteerit ja uuttomenetelmät. ....	11

## Liitteet

Liite 1	Filtterille pipetoitujen piharatamouutteiden pitoisuudet antibakteerisuus kokeissa ( $\mu\text{g/ml}$ )
---------	---

## 1 Johdanto

Luonnonkasveja ja viljeltyjä kasveja hyödynnetään paitsi ravintona myös esimerkiksi ravintolisissä, rohdoksina ja kosmeettisissa tuotteissa. Kasveja voidaan käyttää joko sellaisenaan, kuivattuna tai erilaisina uutteenä. Kasveilla ja niiden kemiallisilla yhdisteillä on mm. terveysvaikutuksia ja antibakteerisia ominaisuuksia, joita voidaan hyödyntää käytettäessä kasveja ravintona tai rohdoksina.

Kasvuolosuhteilla (mm. lämpötila, ravinteet ja valo) ja keräysvuodenajalla on merkittävä vaikutus kasvien kemialliseen koostumukseen. Siksi eri vuodenaikoina tai vuosina kerätyn sadon koostumus heijastuu suoraan tuotteisiin, joiden valmistukseen kasveja käytetään. Aikaisempi tutkimus osoitti, että luonnossa kasvaneilla ratamoilla (*Plantago spp.*) oli korkeammat plantamajosidi ja verbaskosidi pitoisuudet kuin kasvihuoneessa kasvatetuilla ratamoilla. Plantamajosidi mm. estää bakteerien kasvua haava-alueella ja verbaskosidi on antimikrobinen yhdiste. (Kelly ym., 2018)

Useiden kasvien osalta tiedetään, että sekundääristen, kasvia suojaavien metaboliayhdisteiden (mm. antioksidantit) tuotto tehostuu stressaavissa kasvuoloissa.

Esimerkiksi heinäratamon (*Plantago lanceolata*) kemiallisiin puolustusyhdisteisiin kuuluvien iridoidien ja antimikrobisen verbascosidin tuoton on osoitettu aktivoituvan ravinnerajoitteisissa kasvuoloissa ja altistettaessa korkealle valointensiteetille. (Miehe-Steie ym., 2015) Eräs tärkeä yhdisteryhmä kasveissa on fenoliset yhdisteet. Niillä on antibakteerisia vaikutuksia, ne suojaavat sydän- ja verisuonitaudeilta ja parantavat immuunipuolustusta. (Piippo, 2018, ss. 126 – 127)

Tämän opinnäytetyön kirjallisuuskatsauksessa selvitin piha- heinä- ja soikkoratamon (*Plantago media*) historiaa kansanlääkinnässä ja niiden nykyistä käyttöä. Opinnäytetyössäni tutkin, miten kasvuolosuhteet vaikuttivat viljeltyjen ja eri vuodenaikoina luonnossa kasvaneiden piharatamoiden kokonaisfenolipitoisuuteen. Lisäksi tutkin uuttolämpötilan ja uuttomenetelmän vaikutusta fenolisten yhdisteiden uuttumiseen. Kokeellisessa osuudessa piharatamoiden lehtijauheista tehtiin eri uuttomenetelmillä (paineistettu liotinuutto ja ultraäänitehostettu uutto) uutteenä, joista mitattiin kokonaisfenolipitoisuudet spektrofotometrisesti Folin-Ciocalteu -menetelmällä. Paineistetussa liotinuutossa yhdisteiden uuttumiseen vaikuttavat uuttoaika, paine ja lämpötila. Uuttolämpötiloina paineistetussa liotinuutossa käytettiin 90 °C ja 120 °C ja

uuttoliuoksena 25 % etanolia. Ultraäänitehostetun uuton uutteissa uuttoliuoksina käytettiin 25 %, 70 % ja 100 % etanolia. Piharatamouutteiden antibakteerista vaikutusta *Escherichia coli* (517339) *Staphylococcus aureus* (DSM20231) ja *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerien kasvuun testattiin kasvatusmaljoilla.

Analysoimani piharatamot kasvatettiin osana biotalous 4.0 projektia, Hämeen ammattikorkeakoulun (HAMK) Lepaan yksikössä kerrosviljelykontissa. Biotalous 4.0 hankkeessa tehtiin yhteistyötä Päre Skincare -kosmetiikkayrityksen kanssa ja yhteistyön pohjalta yritys kehitti piharatamoihin perustuvan tuotesarjan. Yritys voi mahdollisesti hyödyntää jatkossa tutkimustietoa, jota tässä opinnäytetyössä tuotettiin. Luonnossa kasvaneiden piharatamoiden lehdet keräsin Hausjärveltä kesällä ja syksyllä 2020.

## 2 Ratamot ja niiden hyödyntäminen

Ratamoita kasvaa ympäri maailmaa ja lajeja on noin 265. Ilman siitepölypitoisuutta koskevassa tutkimuksessa on todettu, että piharatamoa on esiintynyt mm. Tanskassa, Suomessa, Ruotsissa ja Islannissa jo tuhansia vuosia sitten. (Adoma ym., 2017)

Piharatamolla on erittäin runsas siementuotanto ja yksi kasvi voi tuottaa kesässä yli 20 000 siementä. Kasvin leviäminen on hyvin tehokasta, koska siementen pinta limautuu kosteudesta, jolloin ne tarttuvat helposti ihmisiin, eläimiin ja kulkuvälineisiin siirtyen näin uusille kasvupaikoille. (Luontoportti, 2021)

Suomessa luontaisina kasvavat ratamot ovat monivuotisia ruohoja ja niiden lehdet ovat yleensä tyviruusukkeellisia. Kasvupaikasta ja lajista riippuen ne ovat kukintoineen 5 - 50 cm korkeita. Piharatamo kasvaa luonnonvaraisena Suomessa melkein kaikkialla. Piharatamon lehtien maanmyötäinen kasvutapa hankaloittaa sadonkorjuuta, minkä vuoksi sitä ei suosita peltoviljelyssä. Heinäratamo on Suomessa yleinen vain Ahvenanmaalla, Turun saaristossa ja Varsinais-Suomen rannikolla. Euroopassa heinäratamoa viljellään lääketieteellisuuden tarpeisiin. Soikkoratamoa kasvaa Suomessa yleisenä vain Ahvenanmaan kalkkiniityillä. Ulkomaiset siemensekoitukset voivat sisältää soikkoratamon siemeniä ja laji voikin ilmestyä puistonurmikolle. (Luontoportti, 2021)

Ratamoita hyödynnetään Suomessa moniin eri käyttötarkoituksiin. Piha-, heinä- ja soikkoratamon käyttö on sallittu ravintolisissä, rohdoksissa, elintarvikkeissa ja kosmetiikassa.

Ratamoiden nuoria lehtiä voi käyttää salaatteihin, kastikkeisiin ja leipätaikinaan. Piharatamon lehdistä ja siemenistä tehdään mehua, siirappia, teetä, haudetta ja yskänpastilleja. (Piippo, 2018, s. 127) Heinäratamo lievittää limakalvon ärsytystä ja sitä käytetään hoidettaessa katarreja ja muita ylähengitysteiden tulehduksia (Holm & Hiltunen, 2003, s. 116). Tuotteita löytyy kaupallisesti valmistettuina ja niitä voi tehdä myös itse.

## **2.1 Ratamoiden historia kansanlääkinnässä**

Rautalehti, haavanlehti, laastarilehti ja rakkoruoho ovat kansan keskuudessa yleisesti käytettyjä nimiä piharatamosta. Kansanlääkinnässä ratamon lehdet ovat yksi perinteisimmistä haavojen hoitoon käytetyistä rohdoskasveista. (Piippo, 2018, s. 126)

Ratamo tunnetaan kansanlääkinnässä ”verta puhdistavana” rohtona. Sitä on käytetty suoliston ja mahan haavaumien, struuman, maksa- ja sappivaivojen sekä ripulin hoitoon. Ulkoisesti ratamoa on käytetty hyönteisten puremiin, paiseisiin, rakkoihin ja hiertymiin. Viikingit käyttivät piharatamon lehtiä nopeuttaakseen haavojen paranemista. Muinaiset Rooman sotilaat hoitivat marsseilla hiertymiä ja rakkoja ratamon lehdillä, jotta pystyivät jatkamaan matkaa. Ratamon lehdistä valmistetun kylvyn on kerrottu helpottavan väsyneitä ja hiertyneitä jalkoja. Ulkoisen käytön lisäksi lehdistä on keitetty teetä ja siirappia, joista saatiin apua hengitysteiden tulehdusten ja yskän hoitoon. (Raipala-Cormier, 2019, ss. 47 - 55)

## **2.2 Ratamoiden käyttö kotimaisessa luonnonkosmetiikassa**

Kotimaista luonnonkosmetiikkaa valmistavilla yrityksillä on valikoimissaan tuotteita, joiden raaka-aineina on käytetty piha- ja heinäratamoa. Ratamoita käytetään mm. yrttisavinaamioissa, hoitoöljyissä, kasvonaamioissa, jalkakylpysuoloissa ja kasvovoiteissa.

Ratamonlehdet sisältävät mm. allantoinia, joka pehmentää arpikudosta ja uudistaa ihosoluja. (Gonçalves & Romano, 2016; Rønsted ym., 2003) Piha- ja heinäratamon sisältämät aineet puhdistavat, rauhoittavat ja hoitavat ihoa. Ratamoa sisältävät tuotteet helpottavat mm. hyönteisten puremia, finnejä, hiertymiä ja ihoruuusua. (Raipala-Cormier, 2019, ss. 47 - 55) Piharatamon lehdissä on flavonoideista rutiinia, joka ylläpitää ihon kuntoa. Siemenissä on fenolisista yhdisteistä ferulahappoa joka suojaa ihoa auringolta. (Piippo, 2018, ss. 30 - 32)



### 3 Ratamoiden kemiallinen koostumus

Tässä luvussa kerrotaan yleisesti ratamoiden eri kasvosien kemiallisista yhdisteistä ja niiden hyödyntämispotentiaalista. Työni kokeelliseen osuuteen liittyen kuvaan fenolisia yhdisteitä tässä kappaleessa tarkemmin.

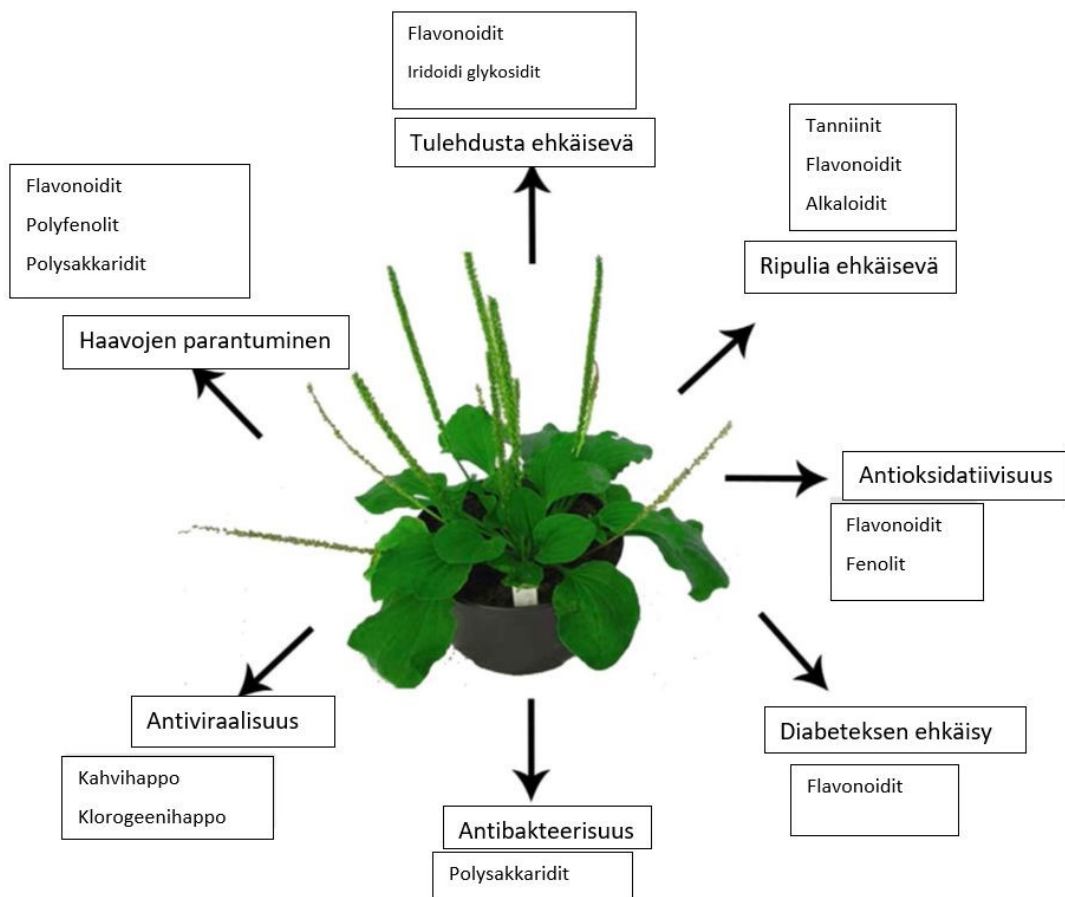
#### 3.1 Kemialliset yhdisteet ratamoiden maanpäällisissä osissa

Ratamoiden maanpäällisissä osissa vallitsevia yhdisteryhmiä ovat fenyylipropanoidiglykosidit, iridoidit, triterpeenit, polysakkaridit, polyfenolit ja alkaloidit.

Maanpäällisissä osissa on fenolisiin yhdisteisiin kuuluvia (Kuva 1) flavonoideja, tanniineja ja fenolisia happoja. (Hyvärinen, toim., 2001) Fenyylietanoidiglykosidit, erityisesti verbaskosidi ja plantamajosidi ovat ratamoiden keskeisiä bioaktiivisia yhdisteitä (Rønsted ym., 2003).

Ratamoiden lehdissä on orgaanisista hapoista mm. oleanoli-, sitruuna-, kaneli-, bentsoe-, fumariini- ja ursolihappoa. Lehdissä on myös hartsia, piihappoa, kaliumia, sinkkiä, C- vitamiinia, kalsiumia, magnesiumia, koliinia, allantoiinia ja rutiinia. Piharatamon siemenissä on runsaasti limaa ja paljon rasvahappoja. Siemenissä on karotenoideja, luteoliinia, rutiinia, katekiineja, kolkisiinia, verbaskosidia, naringeniinia ja fenolisista yhdisteistä kahvi-, syringa-, vanilliini- ja ferulahappoa. (Piippo, 2018 s. 126)

Kuva 1. Piharatamon maanpäällisissä osissa olevia vaikuttavia aineita, ominaisuuksia ja käyttökohteita (Alkuperäinen kuva Adom ym., 2017. Soveltanut Kössilä, 2021).



### 3.2 Piharatamoiden fenoliset yhdisteet ja niiden vaikutukset

Kasveissa fenoliset yhdisteet toimivat kasvihormonien tapaan ja ne myös suojaavat kasvia ulkoisilta uhkatekijöiltä kuten liialliselta UV- säteilyltä, tuhohyönteisiltä, patogeneilta ja viruksilta. Ne vaikuttavat kasvin väriin, koostumukseen, säilyvyyteen ja makuun. Fenolisia yhdisteitä on luonnonkasveissa enemmän kuin viljellyissä ja kukinnan jälkeen fenolisten yhdisteiden määrä laskee. (Piippo, 2018, s. 30) Ympäristö- ja geneettiset tekijät vaikuttavat fenolisten yhdisteiden muodostukseen ja niiden esiintymiseen. Ympäristötekijöistä merkittävimpiä ovat ravinteet ja valo. Ravinteista typen puutos voi aiheuttaa kasville stressiä, joka puolestaan saa aikaan joidenkin fenolisten yhdisteiden lisääntymistä. (Hyvärinen, toim., 2001)

Piharatamon lehdissä fenolisista yhdisteistä on flavonoideja ja tanniineja. Flavonoidit mm. ehkäisevät tulehduksia ja vahvistavat hiussuonia. Lehdissä on flavonoideista rutiinia, kemferolia ja kversetiiniä. Kemferoli alentaa verenpainetta, parantaa immuunipuolustusta ja estää tulehduksia. Kversetiini alentaa verensokeria, vahvistaa hiussuonia, lievittää ruhjeita ja estää suonikohjuja. Lehdissä on fenolihapoista mm. ellagi-, galli-, ferula-, syringa- ja kahvihappoa. Niillä on tulehduksia estävä vaikutus ja ne voivat ehkäistä allergioita tai lievittää niiden aiheuttamia oireita. Ne ylläpitävät ihon ja sidekudoksen kuntoa, lievittävät ruhjeita ja parantavat immuunipuolustusta. (Piippo, 2018, ss. 30 - 32)

Piharatamon siemenissä on fenolisista hapoista mm. ferula- ja kahvihappoa, flavonoideista rutiinia ja luteoliinia, jotka ovat antioksidantteja. Ferulahappo suojelee hermostoa, soluseiniä, ihoa auringolta ja maksaa myrkyiltä. Se myös normalisoi verenpainetta, laukaisee kouristuksia ja estää tulehduksia. Kahvihappo on immunostimulantti, antihistamiini ja se torjuu viruksia ja bakteereita. Se suojelee maksaa myrkyiltä, estää tulehduksia ja verihiutaleiden kokkaroitumista. Rutiini ylläpitää ihon, verisuonten ja sidekudoksen kuntoa, ehkäisee diabetesta, alentaa verenpainetta ja lisää C- vitamiinin imeytymistä ravinnosta. Luteoliinilla on tulehduksia ja kihtiä estävä vaikutus ja se lisää virtsan eritystä. (Piippo, 2018, ss. 30 - 32)

### **3.3 Fenolisten yhdisteiden uuttomenetelmät**

Fenolisten yhdisteiden uuttoon käytetään yleisimmin etanoli- tai etanoli-vesi-uuttoa. Muita käytettyjä liuottimia ovat vesi, metanoli, heksaani, asetoni ja kloroformi. Uuton tehostamiseksi voidaan käyttää mm. lämpötilaa, painetta ja ultraääntä. Adom ym., (2017) ovat käyneet läpi tutkimuksia, joissa on tutkittu piharatamon maanpäällisten osien farmakologista ja biologista aktiivisuutta käyttäen edellä mainittuja liuottimia. Tulokset osoittivat piharatamon maanpäällisten osien sisältävän runsaasti aktiivisia kemiallisia ainesosia (Kuva 1).

Jokić ym., (2009) tutkivat soijapavun fenolisia yhdisteitä ja flavonoidien kokonaispitoisuutta käyttäen uuttoliuottimena 50, 60, 70 ja 80 % etanoli -vesi -liuoksia ja uuttolämpötilana 80 °C. Kokeen toisessa osassa oli käytetty uuttolämpötiloina 25, 40, 50, 60, 70 ja 80 °C ja uuttoliuoksena

50 % etanolia. Tutkimuksessa tulokset osoittivat, että paras fenoliuuton saanto soijapavuista saatiin 50 % etanoli- vesiliuoksella uuttolämpötilan ollessa 80 °C.

#### 4 Ratamoiden antibakteerisuus

Piharatamouutteiden on osoitettu inhiboivan mm. *E. coli*, *P. aeruginosa* ja *S. aureus* bakteerien kasvua (Stanisavljevic ym., 2008). Piharatamoiden sisältämät iridoideihin kuuluvat aukubiini ja katalboli ehkäisevät bakteerien kasvua. Aukubiini tuhoaa erityisesti stafylokokki- bakteereita. (Piippo, 2003, s. 269)

Karima ym., (2015) tutkimuksessa piharatamon lehtien antibakteerisuutta testattiin mm. *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ja *Proteus mirabilis* -bakteereiden kasvuun. Tutkimuksessa etyyliasetaattiuute inhiboi bakteereiden kasvua paremmin kuin tutkimuksessa myös käytetty vesiuute.

Tässä tutkimuksessa testattiin ratamouutteiden antibakteerisia vaikutuksia *E. coli*, *P. aeruginosa* ja *S. aureus* -bakteerien kasvuun. Nämä bakteerit valittiin, koska aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet piharatamouutteiden inhiboivan bakteereiden kasvua.

*E. coli*- bakteerit ovat pääasiassa hyödyllisiä ja ne kuuluvat ihmisen suoliston normaalibakteeristoon mutta ne voivat esiintyä myös taudinaiheuttajana (Ruokavirasto, 2019). *S. aureus* on yleinen bakteeri ihmisen iholla, nenän ja suun limakalvoilla sekä ulosteissa. Paiseet, märkänäppylät ja karvatuppitulehdus ovat muun muassa *S. aureus* bakteerin aiheuttamia tulehduksia ihossa. *P. aeruginosa* aiheuttaa infektioita yleensä vain huonokuntoisille potilaille. (THL, 2021)

#### 5 Aineisto ja menetelmät

Tässä työssä tutkittiin viljeltyjen ja luonnosta kerättyjen piharatamoiden fenolisten yhdisteiden tuottoa, eri uuttomenetelmiä fenolisten yhdisteiden uuttamisessa sekä piharatamouutteiden antibakteerisia vaikutuksia. Tutkimuksessa käytettyjen piharatamoiden kasvatusta oli osa Opetus- ja koulutusministeriön rahoittamaa Biotalous 4.0 -projektia (1.1.2019-31.12.2021) ja kasvatuksesta vastasi Roosa Mattila.

## 5.1 Piharatamoiden kasvatusta kerrosviljelykontissa

Opinnäytetyössäni analysoituja piharatamoita kasvatettiin kolmessa erilaisessa kasvuolosuhteessa (Taulukko 1) käyttäen kahta eri valointensiteettiä sekä kahta eri typpipitoisuutta kasvatuksen aikana. Kasvatuksessa käsittelyt olivat korkea valointensiteetti ja lisätyppilannoitus (HI+N), korkea valointensiteetti (HI) ja matala valointensiteetti (LI) (Taulukko 1).

Kahdessa käsittelyssä valointensiteetti oli  $250 \mu\text{mol s/m}^2$  (HI ja HI+N) ja yhdessä  $130 \mu\text{mol s/m}^2$  (LI). Kaikissa kasvatuksissa sinisen valon aallonpituuden osuus spektristä oli 6 %. Kasvatuksessa käytettyjen LED-valaisimien spektri koostui pääosin sinisen ja punaisen valon aallonpituuksista.

Kaikissa käsittelyissä peruslannoituksessa käytettiin Kekkilän Kukka-Superex- lannoitetta (NPK 11-3-26) ja kalsiumnitraattia ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) (emoliuokset 15,2 % ja 4,2 %). Ravinteiden syötön kontrollointi tapahtui johtokyvyn (EC) mukaan (asetusarvo oli EC 1,5). Käsittelyssä HI+N kasvit saivat tyyppiä ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) lisälannoitteena kolmen päivän välein (1 ml pitoisuutta 1,26 mg/ml. Tässä kokeessa kasvatettujen piharatamoiden kasvatusaika kerrosviljelykontissa oli 51 vuorokautta. Kerrosviljelykontin lämpötila oli asetettu  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ :n ja ilman suhteellinen kosteus 80 %:n. Kasvatuskokeessa (Kuva 2) kussakin käsittelyssä oli 36 kasvia. Fenolisten yhdisteiden uuttoa varten kaikkien kasviyksilöiden lehdet samasta käsittelystä yhdistettiin ja säilytettiin pakastimessa kuivaamiseen saakka.

Taulukko 1. Piharatamoiden lannoituskäsittelyt ja valointensiteetti kasvatuskokeessa. HI+N = korkea valointensiteetti ja lisätyppi, HI = korkea valointensiteetti ja LI = matala valointensiteetti. Peruslannoitus = Kukka-Superex ja ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ). Lisätyppi = ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) (1,26 mg/ml).

KÄSITTELY	VALOINTENSITEETTI	LANNOITUS
HI+N	$250 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$	peruslannoitus ja lisätyppi 3 päivän välein
HI	$250 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$	peruslannoitus
LI	$130 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$	peruslannoitus

Kuva 2. Kerrosviljelykontissa kasvatettuja piharatamoita (Kössilä, 2020).



## 5.2 Luonnosta kerätyt piharatamot

Luonnossa kasvaneiden piharatamoiden lehdet kerättiin Hausjärveltä. Kasvien kemiallinen koostumus vaihtelee kasvukauden aikana, joten tämän vuoksi lehtiä kerättiin kesällä ja syksyllä. Ensimmäinen keräyspäivä oli 22.6.2020 (**näytteet C ja D**) ja toinen 14.9.2020 (**näytteet A ja B**). Lehdet kerättiin molempina keräyspäivinä samoista kasveista. Tämä varmistettiin siten, että ensimmäisellä keräyskerralla kasvit ja kasvupaikka kuvattiin tarkasti. Kerätyt lehdet säilytettiin pakastimessa kuivaamiseen saakka.

## 5.3 Näytteiden esikäsittely

Ennen fenolisten yhdisteiden uuttoa lehtiä kuivattiin yön yli lämpökaapissa (30 °C).

Kuivatut lehdet jauhettiin jauhatusmyllyllä (IKA A 10 Basic).

Kerrosviljelykontissa kasvaneille piharatamon lehdille riitti laitteella jauhatus, mutta luonnosta kerätyt lehdet vaativat jauhamisen vielä huhmareella, jotta jauheesta saatiin tarpeeksi hienoa. Lehtijauheiden karkeuserot olivat jauhatuksenkin jälkeen hyvin selkeät.

### 5.3.1 Paineistettu liotinuutto

Piharatamoiden lehtijauheet uutettiin paineistetulla liotinuutolla (Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ Accelerated Solvent Extraction) -uuttolaitteella. Tästä uuttomenetelmästä käytän jatkossa nimitystä ASE-uutto. Uuttohylsyihin punnittiin piharatamoiden lehtijauhetta n. 125 mg ja hylsyt asetettiin uuttolaitteeseen. Uuttoliuoksena käytettiin 25 % etanolia. Kaikille lehtinäytteille tehtiin uutot 90 °C ja 120 °C lämpötilassa. Molemmassa lämpötiloissa uuttoaika oli 10 minuuttia.

Näytteistä (A, C, D, HI+N, HI ja LI) tehtiin kolme rinnakkaisuuttoa molemmassa lämpötiloissa, uuton toistettavuuden varmistamiseksi ja tilastollista analyysia varten (kts. kappale 5.7).

Näytteestä B tehtiin vain yksi uutto (90 °C ja 120 °C), koska näytettä ei ollut riittävästi rinnakkaisiin uuttoihin.

### 5.3.2 Ultraäänitehostettu etanoli- ja etanolivesiuutto

Ultraäänitehostetussa etanoli- ja etanolivesiuutossa fenolisten yhdisteiden uuttoon käytettiin kolmea erilaista uuttoliuosta, 25 %, 70 % ja 100 % etanolia. Tästä uuttomenetelmästä käytän jatkossa nimitystä ultraäänitehostettu uutto. Kaikille lehtinäytteille tehtiin uutot 70 % ja 100 % etanolilla. Ultraäänitehostettu uutto, jossa käytettiin 25 % etanolia tehtiin vain kuudelle näytteelle (A, C, D, HI+N, HI ja LI). Näyte B jätettiin jauheen vähäisyyden vuoksi pois. Koeputkiin punnittiin piharatamoiden lehtijauhetta n. 300 mg ja lisättiin 2 ml uuttoliuoksia eli 25 % etanolia (0,5 ml etanolia ja 1,5 ml MQ-vettä), 70 % etanolia (1,4 ml etanolia ja 0,6 ml MQ-vettä) tai 100 % etanolia. Koeputket peitettiin foliolla ja laitettiin ultraäänihäuteeseen (Bandelin sonorex digitec) 30 minuutiksi uuton tehostamiseksi. Sonikoinnin jälkeen näyteputket sentrifugoitiin (Jouan centrifuge CR 3i, 5 minuuttia, 3500xG, 20 °C), jotta lehtimassa erottui uuttoliuottimesta. Erottunut uuttoliuos pipetoitiin uusiin koeputkiin.

### 5.3.3 Jatkokäsittely ennen kokonaisfenolianalyysiä

Kaikki tehdyt ASE-uutteet tasattiin 50 ml:n MQ-vedellä ennen kokonaisfenolipitoisuuksien analysointia spektrofotometrillä (kts. kappale 5.4). Uutteiden tasaus tehtiin, jotta ne olisivat mittauksissa vertailukelpoisia, koska uuttohylsyistä ei uutu täysin samaa määrää uutetta jokaiseen koeputkeen. Ultraäänitehostetun uuton uutteista (25 %, 70 % ja 100 % etanoli) mitattiin myös kokonaisfenolipitoisuudet spektrofotometrisesti. Näitä uutteita ei konsentroidu eikä tasattu.

### 5.3.4 Uutteiden jatkokäsittely antibakteerisuuden testaukseen

Antibakteerisuuden testausta varten (kts. kappale 5.6.1) ASE- uutolla tehtyjä piharatamouutteita konsentroidiin (Techne Sample Concentrator-tyyppihaihdutin, 40 °C) siten, että uutteen tilavuus ennen bakteerimaljoille aplikointia oli 17 ml. Konsentroidi tehtiin kaikille ASE-uutteille (A, B, C, D, HI+N, HI ja LI).

Antibakteerisuuden testauksessa käytettiin myös ultraäänitehostetulla uutolla (70 % ja 100 % etanoli) uutettuja näytteitä (A, B, C, D, HI+N, HI ja LI) joita ei haihdutettu eli nämä uutteen olivat nk. raakauutteita.

Antibakteerisuuskokeet luonnossa kasvaneiden näytteiden (A, B, C ja D) osalta haluttiin toistaa vahvemmalla näytteellä ja siksi ultraäänitehostetulla uutolla uutetut näytteet (70 % ja 100 % etanoli) konsentroidiin kuiviksi tyyppihaihduttimella (Techne Sample Concentrator) 40 °C lämpöhauteessa. Konsentroidin jälkeen koeputkiin pipetoitiin 500 µl 100 % etanolia.

### 5.4 Kokonaisfenolimääritys Folin-Ciocalteu -menetelmällä

ASE-uutolla ja ultraäänitehostetulla uutolla uutettujen näytteiden kokonaisfenolipitoisuudet mitattiin spektrofotometrisesti Folin-Ciocalteu -menetelmällä. Standardisuora tehtiin gallihapolla. Eppendorf -putkiin pipetoitiin 200 µl kasviuutetta, 1 ml Folinin fenolireagenssin laimennosta (1:10) ja 0,8 ml 7,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> -liuosta. Putkia sekoitettiin ja seisoitettiin pimeässä 30 minuuttia. Näytteet mitattiin spektrofotometrillä (Shimadzu UV- 1800), aallonpituudella 765 nm. Laite nollattiin ennen mittausten suorittamista MQ-vedellä täytetyllä mittauskyvetillä. Tuloksissa (kuvat 3 ja 4) uutteen kokonaisfenolipitoisuudet ilmoitetaan mg GAE/g kuivapaino (GAE on gallihappoekvivalentti).

### 5.5 Bakteerien kasvatus ja uutteen testaus

Eri uutettomien menetelmillä uutettujen piharatamouutteiden bakteerien kasvua inhihoivaa vaikutusta testattiin kasvatusmaljoilla. Taulukossa 2 esitetään näytteistä eri uutettomien menetelmillä valmistetut uutteen ja antibakteerisuuskokeissa viljellyt bakteerit (*E. coli*, *S. aureus* ja *P. aeruginosa*).

Taulukko 2. Eri uutettomien menetelmillä valmistettujen piharatamouutteiden antibakteerisuustesteissä käytetyt bakteerit ja uutettomien menetelmät.



A ja B = 14.9.2020 ja C ja D = 22.6.2020 kerätyt näytteet. HI+N = korkea valointensiteetti ja lisätyppi, HI = korkea valointensiteetti ja LI = matala valointensiteetti.

UUTTOMENETELMÄ	NÄYTE	BAKTEERIVILJELY
ASE-uutto 90 °C (konsentroidu)	A, B, C, D, HI+N, HI, LI	<i>E. coli</i> ja <i>S. aureus</i>
ASE-uutto 120 °C (konsentroidu)	A, B, C, D, HI+N, HI, LI	<i>E. coli</i> ja <i>S. aureus</i>
Ultraäänitehostettu uutto 100 % etanoli (raakauute)	A, B, C, D, HI+N, HI, LI	<i>S. aureus</i> ja <i>P. aeruginosa</i>
Ultraäänitehostettu uutto 70 % etanoli (raakauute)	A, B, C, D, HI+N, HI, LI	<i>S. aureus</i> ja <i>P. aeruginosa</i>
Ultraäänitehostettu uutto 100 % etanoli (konsentroidu)	A, B, C, D	<i>S. aureus</i> ja <i>P. aeruginosa</i>

### 5.5.1 Bakteerien kasvatusliuosten ja – maljojen valmistus

Bakteerien esikasvatusta varten valmistettiin kasvatusliuos lisäämällä mittapulloon 5 g Nutrient Broth No. 2 jauhetta sekä 200 ml MQ-vettä. Liuos autoklavoitiin 121°C:ssa 15 minuuttia.

Bakteerit kasvatettiin kasvatusmaljoilla TGE-Agar- jauheesta (Merck, 10128) valmistetussa kasvualustassa. Kasvualusta valmistettiin lisäämällä mittapulloon 28,8 g TGE-Agar jauhetta ja 1200 ml MQ-vettä. Liuos autoklavoitiin 121°C:ssa 15 minuuttia.

Autoklavoinnin jälkeen agar -liuos kaadettiin petrimaljoille laminaarivirtauskaapissa, jossa ilmavirtauksen avulla työtila pystytään pitämään steriilinä ja välttämään kontaminaatioiden syntyminen. Valmiit kasvatusmaljat säilytettiin jääkaapissa kannet alaspäin. Näin estettiin kosteuden kertyminen maljojen pinnoille.

### 5.5.2 Bakteerien esikasvatus

Bakteerien esikasvatus tehtiin ennen varsinaista koetta, jotta niiden kasvu kasvatusmaljoilla kokeessa olisi nopeampaa. Pakastetut bakteerit siirrostettiin erikseen laminaarivirtauskaapissa kontaminaatioiden välttämiseksi. Siirrostuksen jälkeen esikasvatusmaljat siirrettiin kasvatuskaappiin 37 ° C lämpötilaan vuorokaudeksi.

Pakastetusta *E.coli* -bakteerikannasta siirrostettiin ensin bakteerimassaa steriilillä silmukalla koeputkeen johon oli pipetoitu 10 ml kasvatusliuosta. Liuosta sekoitettiin. Esikasvatusmaljalle liuosta levitettiin steriilillä vanupuikolla koeputkesta.

Pakastettua *S.aureus* ja *P.aeruginosa* -bakteerikantoja siirrostettiin steriilillä siirrostussilmukalla koeputkiin joihin oli pipetoitu 2 ml kasvatusliuosta. Näiden kahden bakteerin tiedettiin kasvavan hitaammin kuin *E. coli*, joten kasvatusliuoksen määrä oli siitä syystä pienempi. Liuosta sekoitettiin ja koeputkesta pipetoitiin 100 µl esikasvatusmaljalle, johon se levitettiin huolellisesti siirrostuskolmiolla. Levityksessä käytettiin siirrostuskolmiota vanupuikon sijaan, koska *E. coli* bakteerimassa kasvoi maljoilla epätasaisesti vanupuikolla levityksen jälkeen.

## 5.6 Piharatamouutteiden antibakteerisuuden testaus kasvatusmaljoilla

Antibakteerisuuden testauksessa käytettiin ASE- uutolla ja ultraäänitehostetulla uutolla uutettuja uutteita (Taulukko 2). Antibakteerisuuden testauksessa käytettiin kiekkommenetelmää (engl. disk diffusion method), jossa kasviuutteet pipetoidaan bakteerikasvatusmaljoille asetetuille filttiereille (Whatman® Antibiotic Assay Discs diameter 6 mm). Piharatamouutteiden pitoisuudet (µg/ml) filttiereille pipetoituna bakteerien kasvatusmaljoilla esitetään liitteessä 1.

Uutteiden bakteerien kasvua inhiboiva vaikutus arvioitiin filtlerin ympärille muodostuvan bakteerivapaan vyöhykkeen perusteella. Vyöhykkeen laajuus mitattiin ja määritelmänä käytettiin Chiheb ym., (2009) menetelmää: - ei vaikutusta (<10 mm halon halkaisija), + keskiasteinen vaikutus (halon halkaisija ≥ 10 mm ja < 16 mm), ++ selkeä vaikutus (halon halkaisija ≥ 16 mm). Antibakteerisuustestit suoritettiin eri bakteerien ja uutteiden osalta hieman eri tavoin, jotka selitän seuraavissa kappaleissa. Kaikki antibakteerisuustestit tehtiin kasvatuskaapissa 37 °C lämpötilassa.

### 5.6.1 Antibakteerisuuden testaus ASE-uutteilla

Antibakteerisuuden testauksessa käytetyt uutteet olivat konsentroituja ASE-uutteita ja mukana oli kaikki lehtinäytteet (Taulukko 2). Bakteerit olivat esikasvatetut *E. coli* ja *S. aureus*.

Esikasvatusmaljoilta siirrostettiin steriilillä silmukalla yksi bakteeripesäke koeputkeen, jossa oli 2 ml kasvatusliuosta. Liuosta sekoitettiin. Steriili vanupuikko kastettiin liuokseen ja sillä siveltiin uuden kasvatusmaljan pinta. Maljalle aseteltiin pinseteillä neljä filttieriä, joista kolmeen pipetoitiin

eri kasviuutteita 20 µl. Yksi filtteri oli nollanäyte, eli siihen pipetoitiin 20 µl MQ- vettä. Samanlaisia maljoja tehtiin aina kolme kappaletta eli kaikista viljelyistä tehtiin kolme toistoa sekä 90 °C uutetuille näytteille että 120 °C uutetuille näytteille. Bakteerien kasvua kasvatuskaapissa seurattiin vuorokauden välein (24 h ja 48 h).

### 5.6.2 Ultraäänitehostetun uuton uutteen antibakteerisuuden testaus

Antibakteerisuuden testauksessa käytettiin konsentroimattomia ultraäänitehostetusta uutosta saatuja uutteenäytteitä (70 % ja 100 % etanoli), jotka oli uutettu kaikista piharatamoiden lehtinäytteistä (Taulukko 2).

Käytetyt bakteerit olivat *S. aureus* ja *P. aeruginosa*. Bakteereita ei esikasvatettu vaan siirrostus tehtiin suoraan pakastetusta bakteerikannasta. Pakastettua kantaliuosmassaa siirrostettiin steriilillä siirrostussilmukalla koeputkeen, johon oli pipetoitu 2 ml kasvatusliuosta. Liuosta sekoitettiin ja sen annettiin seistä hetken. Liuosta pipetoitiin kasvatusmaljalle 20 µl ja se levitettiin tasaisesti siirrostuskolmiolla. Maljalle aseteltiin pinseteillä kolme filtteriä, joihin jokaiseen pipetoitiin eri kasviuutteita 20 µl. Näiden lisäksi jokaiselle maljalle aseteltiin kaksi filtteriä nollanäytteiksi, toiselle filtterille pipetoitiin 20 µl 70 % etanolia ja toiseen 20 µl 100 % etanolia. Samanlaisia maljoja tehtiin kolme kappaletta. Kasvatuskaapissa olevia maljoja seurattiin vuorokauden välein seitsemän päivän ajan.

### 5.6.3 Konsentroitujen ultraäänitehostetun uuton uutteen testaus

Tässä antibakteerisuuden testauksessa oli mukana vain luonnosta kerättyjen piharatamoiden konsentroidut ultraäänitehostetun uuton näytteet A, B, C ja D (Taulukko 2). Bakteerit olivat esikasvatetut *S. aureus* ja *P. aeruginosa*. Maljoilta siirrostettiin steriilillä silmukalla yhdestä bakteerikasvustosta pesäke koeputkeen, jossa oli 2 ml kasvatusliuosta. Sekoitettua liuosta pipetoitiin 200 µl uusille kasvatusmaljoille ja levitettiin siirrostuskolmiolla. Maljalle aseteltiin pinseteillä kolme filtteriä, joihin jokaiseen pipetoitiin eri kasviuutteita 20 µl. Jokaiselle maljalle tuli lisäksi yksi nollanäyte-filtteri, johon pipetoitiin 100 % etanolia 20 µl. Rinnakkaismaljoja tehtiin kolme kappaletta. Valmiit maljat laitettiin kasvatuskaappiin ja maljoja seurattiin kolmen päivän ajan.

## 5.7 Tulosten tilastollinen käsittely

Uuttolämpötilan vaikutusta kokonaisfenolien uuttosaantoon ASE-uutoissa ja uutteen kokonaisfenolipitoisuuksia eri kasvuoloissa kasvaneiden piharatamoiden osalta analysoitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (Anova). Kokonaisfenolipitoisuuksien välisiä eroja eri uutteissa (viljellyistä ja luonnosta kerätyistä näytteistä tehdyt uutteet) testattiin erikseen 90 °C ja 120 °C uutettujen näytteiden osalta. Aineiston normaalijakautuneisuus testattiin Shapiro-Wilkin -testillä. Varianssien yhtäsuuruus testattiin Levenen -testillä. Parivertailussa käytettiin Tukey-Kramer-testiä. Kaikissa analyyseissä käytettiin JMP Pro 15 -tilastoanalyysiohjelmää ja merkitsevyytensä  $p < 0,05$ .

## 6 Tulokset

### 6.1 Uuttolämpötilan ja kasvuolosuhteiden vaikutus kokonaisfenolipitoisuuteen

ASE-uutteissa (näytteet A, C, D, HI+N, HI ja LI) fenolisten yhdisteiden pitoisuudet 120 °C uutoissa olivat kaikkien näytteiden osalta korkeammat kuin 90 °C uutoissa ( $p < 0,05$ ) (Kuva 3).

Kokonaisfenolipitoisuus 90 °C uutoissa oli matalin (3,97 mg/g) matalassa valointensiteetissä (LI) kasvaneissa piharatamoissa ( $p < 0,05$ ). Korkein kokonaisfenolipitoisuus oli luonnosta kesällä kerättyjen piharatamoiden (näyte C) uutteissa (Kuva 3).

Kokonaisfenolipitoisuudessa 120 °C uutoissa näytteiden D ja LI uutteen välillä oli eniten eroa.

Luonnossa kasvaneen näytteen D uutteen oli korkeampi (7,58 mg/g) kokonaisfenolipitoisuus kuin matalassa valointensiteetissä kasvaneen näytteen LI uutteen (4,60 mg/g) ( $p < 0,05$ ).

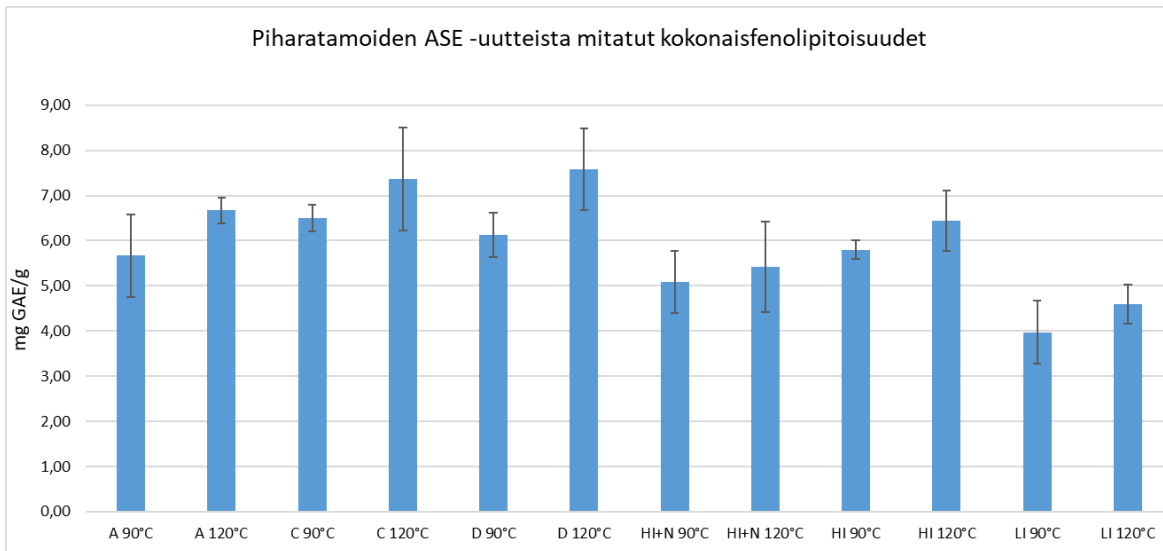
Korkeassa valointensiteetissä (HI) kasvaneista piharatamoista uutetuissa näytteissä oli molemmissa uuttolämpötiloissa korkeammat kokonaisfenolipitoisuudet kuin matalassa valointensiteetissä (LI) kasvaneilla piharatamoilla ( $p < 0,05$ ).

Luonnosta kesällä kerättyjen piharatamoiden (C ja D) uutteen oli molemmissa uuttolämpötiloissa korkeammat kokonaisfenolipitoisuudet kuin syksyllä kerätyn näytteen A uutteen.

Kuva 3. Piharatamoiden ASE -uutteista mitatut kokonaisfenolipitoisuudet (mg GAE/g)

(keskiarvo  $\pm$  keskihajonta n=3) uuttolämpötiloissa 90°C ja 120°C. Uutoissa käytettiin 25 % etanolia.

A = 14.9.2020, C ja D = 22.6.2020 kerätyt näytteet. HI+N = korkea valointensiteetti ja lisätyyppi, HI = korkea valointensiteetti ja LI = matala valointensiteetti.

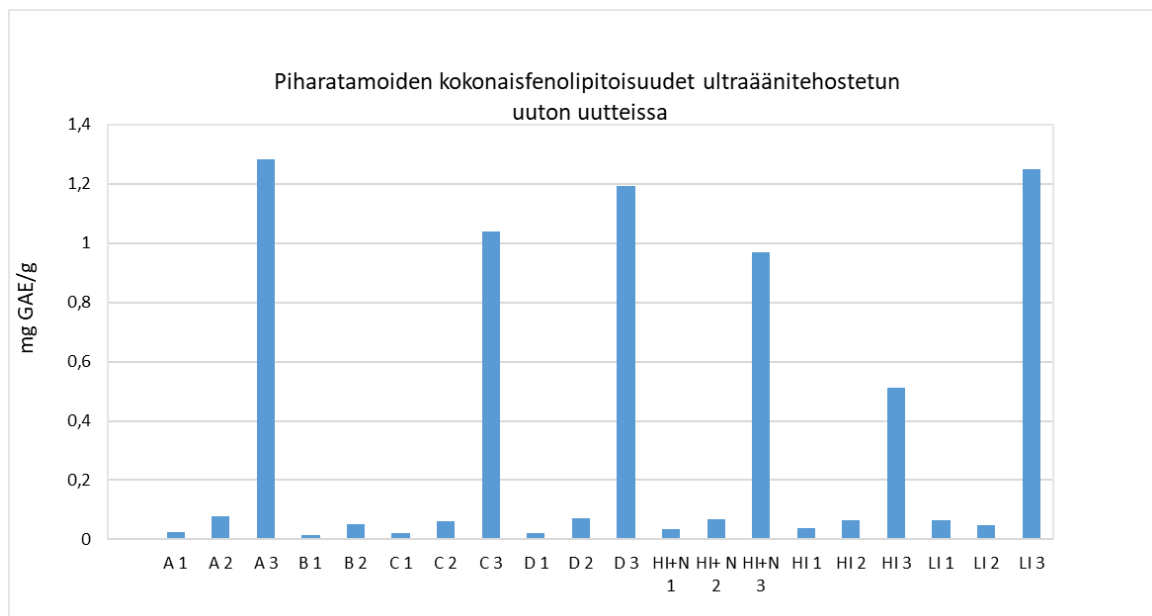


## 6.2 Kokonaisfenolipitoisuudet ultraäänitehostetuissa uutoissa

Ultraäänitehostetun uuton uutteissa (Kuva 4) kokonaisfenolipitoisuus oli suurempi 25 % etanolilla tehdyissä uutteissa kuin 70 % ja 100 % etanolilla tehdyissä. Luonnossa kasvaneissa piharatamo näytteissä oli korkeammat kokonaisfenolipitoisuudet kuin kerrosviljelykontissa kasvatetuissa, lukuun ottamatta näytettä LI. Korkeimmat kokonaisfenolipitoisuudet olivat näytteissä A3 1,28 mg/g, LI3 1,25 mg/g ja D3 1,19 mg/g (Kuva 4). Vähiten fenolisia yhdisteitä uuttui 100 % etanolilla, lukuun ottamatta näytettä LI jossa 100 % etanolilla saatiin hieman korkeampi fenolipitoisuus kuin 70 % etanolilla.

Ultraäänitehostetun uuton uutteissa olivat kaikilla liottimilla uutettuina pienemmät kokonaisfenolipitoisuudet kuin ASE-uutoissa.

Kuva 4. Piharatamoiden kokonaisfenolipitoisuudet ultraäänitehostetun uuton uutteissa. Uutot tehtiin 100 %, 70 % ja 25 % etanolilla. 1 = 100 %, 2 = 70 % ja 3 = 25 % etanoliuutto. Näytteestä B tehtiin vain 70 % ja 100 % etanoliuutot.



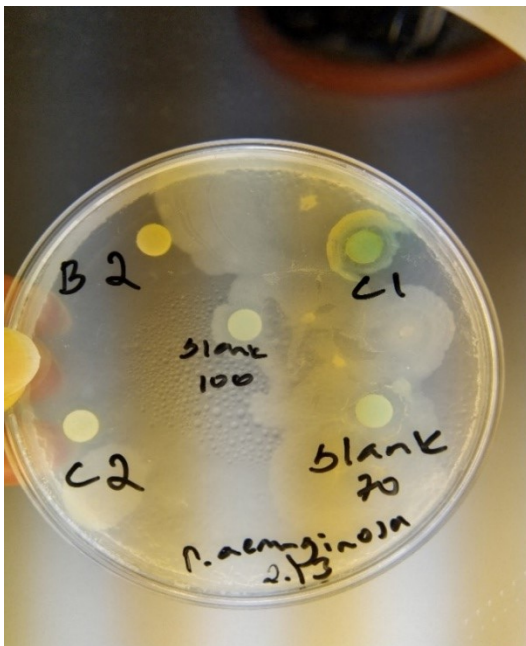
### 6.3 Uutteiden antibakteerisuuden testaus kasvatusmaljoilla

Konsentroidut ASE -uutteet eivät aiheuttaneet inhibitioita *E. coli* ja *S. aureus* -bakteereiden kasvussa kasvatusmaljoilla.

Myöskään ultraäänitehostetun uutteen uutteilla (raakauutteet) ei ollut inhiboivaa vaikutusta *P. aeruginosa* -bakteerin kasvuun kasvatusmaljoilla. *P. aeruginosa* kasvoi maljoilla epätasaisesti, jättäen osan filttreistä paljaksi bakteerikasvustosta (Kuva 5). *S. aureus* kasvoi hyvin heikosti maljoilla (Kuva 6), joten siitä ei ole tuloksia.

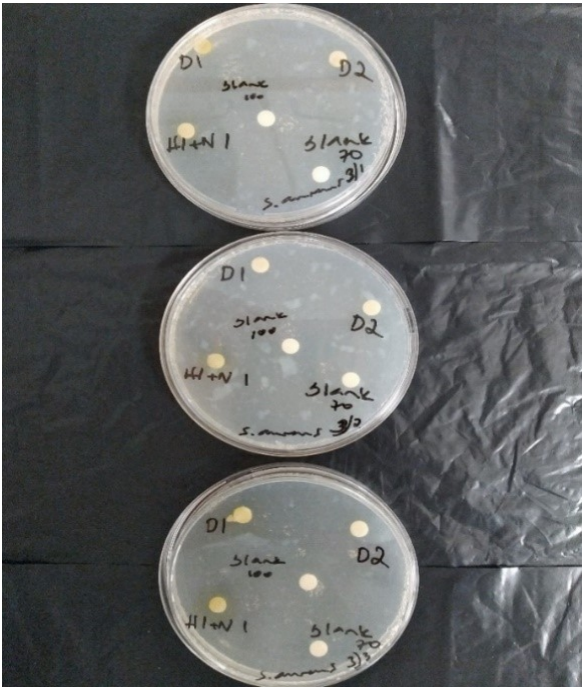
Kuva 5. Ultraäänitehostetun uutteen uutteet kasvatusmaljalla.

Bakteerina oli *P. aeruginosa*. B2 = 70 %, C1 = 100 %, C2 = 70 % etanolilla uutetut uutteet. Blank 70 ja 100 = ovat nollanäytteitä, joissa on 70 % ja 100 % etanoli (Kössilä, 2020).



Kuva 6. Ultraäänitehostetun uutteen kasvatustulokset kasvatustuloksella (raakauute)

Bakteerina *S. aureus* (Kösilä, 2020).



Konsentroidut ultraäänitehostetun uutteen (A2, C2 ja D2) aiheuttivat *P. aeruginosa* -bakteerilla vähäistä kasvun inhibitiota kaikissa kolmessa rinnakkaisnäytteessä. Vastaavasti myösnollafilttereiden ympärille muodostui selkeät halot rinnakkaisnäytteissä, joten tulokset jäivät uutteen vaikutuksesta epäselväksi. *S. aureus* ei lähtenyt kasvuun maljoilla, joilla näitä utteita testattiin.



## 7 Tulosten tarkastelu

Tulokset indikoivat, että vuodenaikaisuudella on merkitystä piharatamoiden kokonaisfenolipitoisuuteen. Tuloksen varmistamiseksi olisi vielä tehtävä ratamokasvatuskoe, jossa olisi uutoksia rinnakkaisista kasvatuksista. Luonnossa kasvien lehdet tulisivat kerätä ennen kukintaa, koska kukinnan jälkeen fenolisten yhdisteiden määrä kasveissa laskee. Parhaimmat keruuajat piharatamon lehdille ovat touko- kesä-, heinä- ja elokuu. Nämä ajat ovat kuitenkin suuntaa antavia, koska kasvu-aika voi vaihdella vuosittain ja paikkakunnittain. (Piippo, 2018, s.30) ASE-uutteista mitatut kokonaisfenolipitoisuudet luonnosta kerättyjen piharatamoiden osalta osoittivat, että lehtien keruuajalla oli merkitystä. Kesäkuussa kerättyjen lehtien kokonaisfenolipitoisuudet olivat korkeammat kuin syyskuussa kerätyissä lehdissä.

Luonnossa kasvaneiden piharatamoiden uutteissa kokonaisfenolipitoisuudet olivat korkeammat kuin kerrosviljelykontissa matalassa valointensiteetissä (LI) kasvaneilla piharatamoilla. Tämä näkyi molemmissa uuttolämpötiloissa sekä 90 °C että 120 °C uutoissa.

Luonnossa kasvit joutuvat puolustautumaan taudeilta ja tuholaisilta, kilpailemaan kasvutilasta sekä sietämään erilaisia ympäristötekijöitä (esim. kuumuus ja kuivuus) ja näiden syiden aiheuttaman stressin tiedetään lisäävän kasveilla mm. fenolisten yhdisteiden tuottoa.

Kasveille saattaa aiheutua valostressiä korkeasta valointensiteetistä. Valon voimakkuus eli intensiteetti, jaksoisuus (päivänpituus) ja valon laatu vaikuttavat kasvin fenolisten yhdisteiden tuottoon. (Hyvärinen, toim., 2001)

Tutkimuksessani tulokset tukevat tätä asiaa, koska luonnossa kasvaneilla piharatamoilla oli korkeammat kokonaisfenolipitoisuudet kuin kerrosviljelykontissa korkeassa valointensiteetissä (HI+N ja HI) kasvaneilla.

Lämpötilan vaikutus ASE-uutoissa uuttoaantoon oli selkeä, sillä kaikissa 120 °C uutoissa oli korkeammat kokonaisfenolipitoisuudet kuin 90 °C uutoissa. Aikaisempi tutkimus Mazzutti ym., (2016) jossa tutkittiin piha- ja heinäratamon fenolipitoisuutta ja antioksidanttiaktiivisuutta korkeimmat tulokset saatiin uuttolämpötilan ollessa 200 °C. Kyseisessä tutkimuksessa matalin uuttolämpötila oli 25 °C ja korkein 200 °C. Tutkimuksessa uuttoliuksena oli vesi ja uuttomenetelminä käytettiin mikroaaltotehostettua (MAE) -uuttoa ja subkriittistä vesi-uuttoa (SWE eli subcritical water extraction), jotka tehtiin ASE -uuttolaitteella.

Kemiallisesti kasvien fenoliset yhdisteet ovat usein happamia, reaktiivisia ja vesiliukoisia (Hyvärinen, H. toim., 2001). Omassa tutkimuksessani vesiliukoisuus korostui selvästi mitattaessa kokonaisfenolipitoisuuksia ultraäänitehostetun uuton uutteista. Tulokseni osoittivat, että 100 % etanoli uutti piharatamoiden fenolisia yhdisteitä heikosti. Parhaiten fenoliset yhdisteet uuttuivat 25 % etanoliin.

Aikaisempi tutkimus on osoittanut piharatamon lehdistä valmistettujen (70 % vesi-etanoli) uutteen inhihoivan mm. *E. coli*, *S. aureus* ja *P. aeruginosa* -bakteerien kasvua. Kyseisessä tutkimuksessa ultraäänikäsittelyajat vaihtelivat (2,5, 5, 10, 20, 40 ja 60 minuuttia) ja uutteita tehtiin myös ilman ultraäänikäsittelyä. (Stanisavljević ym., 2008)

Työssäni antibakteerisuuden testauksessa käytetyt ultraäänitehostetulla uutolla valmistetut uutteet luonnosta kerätyistä näytteistä (A2, C2 ja D2) aiheuttivat vähäistä kasvun inhibitiota *P. aeruginosa* -bakteerilla. *S. aureus* ja *E. coli* -bakteereiden kasvuun uutteilla ei ollut vaikutusta. ASE-uutteilla tehdyt antibakteerisuuskokeet eivät aiheuttaneet inhibitiota bakteerien kasvun suhteen. Kuumuus tuhoaa kasvin antibakteerisen vaikutuksen, joten bakteerien ehkäisyyn kannattaa käyttää kylmävesiuutetta (Piippo, 2018, s.126). Tutkimuksessani ASE -uutoissa käytetyt uuttolämpötilat 90 °C ja 120 °C ovat saattaneet vaikuttaa piharatamoiden bakteereita tuhoavan aineen aukubiinin tuhoutumiseen, ja tämä on osaltaan vaikuttanut siihen, miksi inhibitiota bakteereita vastaan ei esiintynyt.

## 8 Pohdinta

Opinnäytetyöni tavoitteena oli tutkia kasvuolosuhteiden, vuodenaikaisuuden ja uuttolämpötilan vaikutusta piharatamoiden kokonaisfenolipitoisuuteen sekä antibakteerisiin ominaisuuksiin. Tutkimuskysymyksiin saatiin vastauksia, ja osa omista tuloksistani vahvisti aikaisemmin tehtyjen tutkimusten tuloksia. Aiempaa tutkimustietoa tukevia tuloksia olivat uuttolämpötilan merkitys fenolisten yhdisteiden uuttumiseen, käytettyjen uuttoliuosten vahvuuden merkitys piharatamoiden antibakteeristen ominaisuuksien kannalta ja luonnossa kasvaneiden piharatamoiden korkeat kokonaisfenolipitoisuudet. Tärkeänä huomiona tuloksissa pidän myös luonnosta kerättyjen piharatamoiden oikeaa keräysaikaa, koska sillä on suuri merkitys vaikuttavien aineiden esiintymiseen niissä.

Ratamoiden kasvatusta kerrosviljelykontissa olisi ollut mielenkiintoista kokeilla myös heinä- ja soikkoratamon osalta, nämä ovat kuitenkin hieman harvinaisempia Suomessa kuin piharatamo, joka meillä kasvaa lähestulkoon kaikkialla. Tutkimukseni osoitti sen, että vaikka kasveille voidaan luoda säädellyt kasvuolosuhteet niin kaikkia haluttuja ominaisuuksia ei välttämättä saada kontrolloiduissa oloissa lisääntymään kasveissa.

Luonnonkasvien käytöstä ja niiden ominaisuuksista riittäisi vielä tutkittavaa. Kotimainen luonnonkosmetiikka onneksi hyödyntää jo paljon luonnonkasveja mutta monia ominaisuuksiltaan hyviä kasveja on varmasti jo jäänyt unholaan. Luonnonkasvien käyttö kausikasvien tapaan yksityisissä pihoidissa ja yleisissä puistoissa on ilahduttavasti kasvussa. Suomessa on jo useampia taimistoja, jotka tuottavat kotimaisia luonnonkasveja. Ihmiset eivät enää näe pelkästään rikkakasveja, vaan luonnonkasvit nähdään osana luonnon monimuotoisuutta.

## Lähteet

Adoma, M.B., Tahera, M., Mutalabisina, M.F., Amria, M.S., Kudosa, M.B.A., Sulaimanb, M.W.A.W., Senguptaa, P., Susantic, D. 2017. *Chemical constituents and medical benefits of Plantago major*. Biomedicine & Pharmacotherapy. Volyme 96.

Galvez M, Martin-Cordero C, Lopez-Lazaro M, Cortes F, Ayuso MJ. 2003. *Cytotoxic effect of Plantago spp. on cancer cell lines*. J Ethnopharmacol 88: 125 – 130

Chiheb, I., Riadi, H., Martinez-Lopez, J., Dominguez, F., Gomez, V., Bouziane, H. & Kadiri, M. (2009). *Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco*. African Journal of Biotechnology.

Gonçalves, S. & Romano, A. 2016. *The medicinal potential of plants from the genus Plantago (Plantaginaceae)*. Industrial Crops and Products.

Holm, Y. ja Hiltunen, R. (2003). *Lääkkeitä luonnosta*. Tampere.

Hyvärinen, H. (toim.2001). *Kasvipiperäiset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit*. Kirjallisuuskatsaus. MTT:n julkaisuja sarja A.

Jokić, S., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Velić, D., Tomas, S., Bilić, M., Bešvir, Ž. 2009. *The effect of solvent and temperature on extraction yield of phenolic compounds from soybeans, antioxidant activity and colour of extracts*.

Kelly, M.T., Lykke, A.M., Mondolot, L., Ravin, H.W. 2018. *Growth conditions modify the concentrations of bioactive caffeic acid derivatives, amino acids and the structure of Plantago leaves*. International Journal of Biological and Chemical Sciences.

Luontoportti (2020). *Heinäratamo*. Noudettu osoitteesta <http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kukkakasvit/heinaratamo>

Luontoportti (2020). *Piharatamo*. Noudettu osoitteesta  
<http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kukkakasvit/piharatamo>

Luontoportti (2020). *Soikkoratamo*. Noudettu osoitteesta  
<http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kukkakasvit/soikkoratamo>

Miehe-Steier, A., Roscher, C., Reichelt, M., Gershenzon, J., Unsicker, M S. 2015. *Light and Nutrient Dependent Responses in Secondary Metabolites of Plantago lanceolate Offspring Are Due to Phenotypic Plasticity in Experimental Grassland*.

Mazzutti, S., Ferreira, S.R.S., Herrero, M., Iba, E. 2016. *Intensified aqueous-based processes to obtain bioactive extracts from Plantago major and Plantago lanceolata*.

Piippo, S. (2003). *Luonnon lääkeyrtit I*. Helsinki.

Piippo, S. (2003). *Luonnon lääkeyrtit II*. Helsinki.

Piippo, S. (2018). *Suomen luonnon lääkekasvit*. Helsinki.

Pro Luonnonkosmetiikka ry (n.d). Noudettu osoitteesta <https://www.luonnonkosmetiikka.fi>

Raipala-Cormier, V. (2019). *Frantsila luonnon kotiapteekki*. Helsinki.

Ruokavirasto (2019). *Escherichia coli*. Noudettu osoitteesta  
<https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/escherichia-coli/>

Ruokavirasto (2019). *Staphylococcus aureus*. Noudettu osoitteesta  
<https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikkeiden-turvallisen-kayton-ohjeet/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/staphylococcus-aureus/>

Rønsted, N., Franzyk, H., Mølgaard, P., Jaroszewski, J.W. & Jensen, S.R. 2003. *Chemotaxonomy and evolution of Plantago L.* Plant Syst Evol.

Stanisavljevic, I.T., Stojicevic, S.S., Velickovic, D.T., Lazic, M.L., Veljkovic, V.B. 2008. *Screening the Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Extracts from Plantain (Plantago major L.) Leaves.*

THL (2020). *Pseudomonas aeruginosa*. Noudettu osoitteesta <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/taudit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/pseudomonas>

Zubair, M., Rumpunen, K., Lindholm, C., Nybom, H. 2010. *Genetic and phytochemical variations in Plantago major*. 28th international horticultural congress. Lisboa, Portugal, August 22-27, 2010. Poster presentation.

Zubair, M., Nybom, H., Ahnlund, M., Rumpunen, K. 2012. *Detection of genetic and phytochemical differences between and within populations of Plantago major L. (plantain).*

**Liite 1: Filterille pipetoitujen piharatamouutteiden pitoisuudet antibakteerisuus kokeissa  
(µg/ml)**

ASE-uutto 90 °C	ASE-uutto 120 °C	Ultraäänitehostetun uuton uutteen (raakauute)  70 % etanoli	Ultraäänitehostetun uuton uutteen (raakauute)  100 % etanoli	Ultraäänitehostetun uuton uutteen (konsentroidu)  100 % etanoli
A 106,54 µg/ml	A 137,15 µg/ml	A 11,57 µg/ml	A 3,49 µg/ml	A1 55,82 µg/ml
B 120,80 µg/ml	B 120,80 µg/ml	B 7,94 µg/ml	B 2,17 µg/ml	A2 185,12 µg/ml
C 133,30 µg/ml	C 133,30 µg/ml	C 9,06 µg/ml	C 2,99 µg/ml	B1 34,77 µg/ml
D 142,06 µg/ml	D 142,06 µg/ml	D 10,72 µg/ml	D 3,28 µg/ml	B2 127,02 µg/ml
HI+N 97,54 µg/ml	HI+N 97,54 µg/ml	HI+N 10,08 µg/ml	HI+N 5,43 µg/ml	C1 47,89 µg/ml
HI 124,06 µg/ml	HI 124,06 µg/ml	HI 9,80 µg/ml	HI 5,75 µg/ml	C2 144,94 µg/ml
LI 89,39 µg/ml	LI 89,39 µg/ml	LI 7,31 µg/ml	LI 9,68 µg/ml	D1 52,40 µg/ml