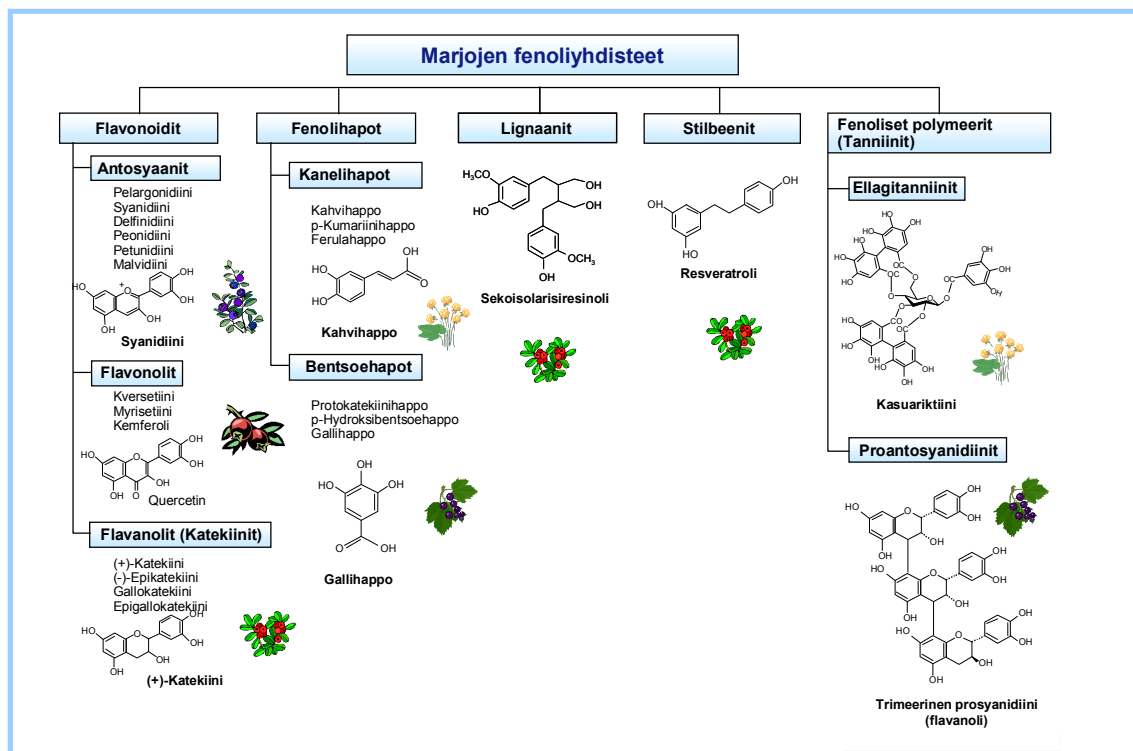


Selvitys marjojen fenolisten yhdisteiden eristämisen teknologiasta



Olavi Myllymäki ja Mirja Mokka, VTT
Timo Sainio, Lappeenrannan teknillinen opisto

Raportin nimi Selvitys marjojen fenoliyhdisteiden eristämisen teknologioista		
Asiakkaan nimi, yhteyshenkilö ja yhteystiedot Sitra Liisa Rosi	Asiakkaan viite	
Projektin nimi Marjojen fraktiointi	Projektin numero/lyhytnimi 20144	
Raportin laatija(t) Olavi Myllymäki ja Mirja Mokkila, VTT; Tuomo Sainio, LTY	Sivujen/liitesivujen lukumäärä 17	
Avainsanat Marjojen fenoliyhdisteet, marjojen fraktiointi	Raportin numero VTT-R-07449-07	
<p>Tiivistelmä</p> <p>Selvitys liittyy Sitran ERA-ohjelman marjaklusterin toimintaan, jonka tavoitteena on löytää malleja kotimaisen marjaraaka-aineen ja marja-alan osaamisen tuotteistamiseksi kansainvälisille markkinoille korkean jalostusarvon tuotteina. Potentiaalisena uutena tuoteryhmänä esiin ovat nousseet erilaiset marjafraktiot. Tämän selvityksen tavoitteena oli patenttihaun sekä VTT:n ja Lappeenrannan teknillisen yliopiston asiantuntijoiden näkemysten perusteella arvioida marjojen fenolisten yhdisteiden eristämiseen soveltuvia teollisen mittakaavan teknologioita. Tavoitteena on antaa SITRAn marjaklusterin toimijoille taustatietoa arvioitaessa mahdollisuuksia synnyttää alan teollisuutta Suomeen.</p> <p>Selvitys antaa hyvän yleiskuva marjan fenolisten yhdisteiden erottamisen teolliseen mittakaavaan soveltuvista teknologioista. Selvityksessä tarkastellaan prosesseja, joilla valmistettuja rikasteita voidaan käyttää elintarvike-, lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa ja joissa rikastettavat (uutettavat) yhdisteet säilyvät mahdollisimman muuttumattomina. Prosessissa käytettävien kemikaalien tulee olla elintarvikkeiden valmistukseen soveltuvia ja regeneroitavia, eivätkä ne saa muodosta kohtuutonta kuormitusta ympäristölle. Myös kustannusten on pysyttävä kohtuullisina. Lähtökohtana on ollut myös koko marjan mahdollisimman hyvä hyödyntäminen.</p> <p>Pääosa aiheeseen liittyvistä patenteista käsitteli fenolisten yhdisteiden adsorptioerotusta, joka onkin fraktiointiprosessin kriittisin yksikköoperaatio. Myös useat muut erotusprosessin vaiheet sekä myös prosessilaitteiden valinta vaativat kokeellista selvittämistä ja simulointia tehdassuunnittelun lähtökohtien määrittämiseksi.</p>		
Luottamuksellisuus	Luottamuksellinen	
Espoo 18.10.2007 Allekirjoitukset		
Anu Kaukovirta-Norja Teknologiapäällikkö, VTT	Mirja Mokkila Asiakaspääll., erikoistutkija, VTT	Tuomo Sainio Tutkija, LTY
VTT:n yhteystiedot PL 1000, 02044 VTT		
Jakelu (asiakkaat ja VTT) Liisa Rosi, Sitra Veli-Markku Korteniemi, Lapinnova Oy Olavi Myllymäki, VTT Erkki Paatero, Lappeenrannan teknillinen yliopisto		
<i>VTT:n nimen käyttäminen mainonnassa tai tämän raportin osittainen julkaiseminen on sallittu vain VTT:ltä saadun kirjallisen luvan perusteella.</i>		

SISÄLTÖ

1 SELVITYKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET	4
2 SELVITYKSEN TOTEUTUS	4
3 MARJAT FENOLISTEN YHDISTEIDEN LÄHTEENÄ	5
3.1 Marjojen fenoliset yhdisteet ja niiden pitoisuudet	5
3.2 Prosessoinnin vaikutukset marjojen fenolisiin yhdisteisiin	6
4. FENOLISTEN YHDISTEIDEN RIKASTAMINEN JA ERISTÄMINEN	6
4.1 Patenttikirjallisuutta adsorptiokromatografiaan perustuvista erotusprosesseista	7
4.1.1 Fenolisten yhdisteiden uutto biomassasta	7
4.1.2 Adsorptioerotus	8
4.1.3 Fenolirikasteen kuivatus	11
5 TULOSTEN TARKASTELU	11
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	15
7 EHDOTUS JATKOTOIMENPITEIKSI	16
Lähdeviitteet	17

1 SELVITYKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET

Selvitys liittyy Sitran ERA-ohjelman marjaklusterin toimintaan, jonka tavoitteena on löytää malleja kotimaisen marjaraaka-aineen ja marja-alan osaamisen tuotteistamiseksi kansainvälisille markkinoille korkean jalostusarvon tuotteina. Yhtenä mahdollisena tuoteryhmänä esiin ovat nousseet erilaiset marjafraktiot.

Markkinoilla olevien marjajauheiden ja -uutteiden valikoima on laaja. Lukumääräisesti eniten löytyy eri marjoista tehtyjä jauheita, joissa fenolisten yhdisteiden kokonaismäärä, antosyaanien tai ellagitanniinien pitoisuudet on vakioitu. Yksinkertaisimmillaan tällaiset tuotteet on valmistettu kuivaamalla ja jauhamalla marjat tai konsentroimalla ja kuivaamalla marjamehu, jolloin pitoisuuksissa päästään parhaimmillaan 5–10 %:iin kuiva-aineesta (McKenzie, 2003, WO 03084559, Majoie, 1972, DE1767614). Standardoituja antosyaaniuutteita, joissa antosyaanipitoisuus on tavallisesti 25 %, valmistetaan mustikasta, pensasmustikasta, mustaherukasta ja puolukasta. Vadelmasta valmistetaan 25 % ellagitanniinipitoisuuteen vakioitua uutetta.

Selvityksen tavoitteena on tehdyn patenttihaun tulosten sekä VTT:n ja Lappeenrannan teknillisen yliopiston asiantuntijoiden osaamisen perusteella arvioida marjojen fenolisten yhdisteiden rikastamiseen ja eristämiseen soveltuvia teollisen mittakaavan teknologioita, joilla päästään korkeampiin fenolisten yhdisteiden pitoisuuksiin kuin mihin päästään esimerkiksi pelkästään kuivaamalla. Tavoitteena on antaa SITRAn marjaklusterin toimijoille taustatietoa arvioitaessa mahdollisuuksia synnyttää alan teollisuutta Suomeen ja tehdä ehdotus seuraavan vaiheen toimenpiteistä.

2 SELVITYKSEN TOTEUTUS

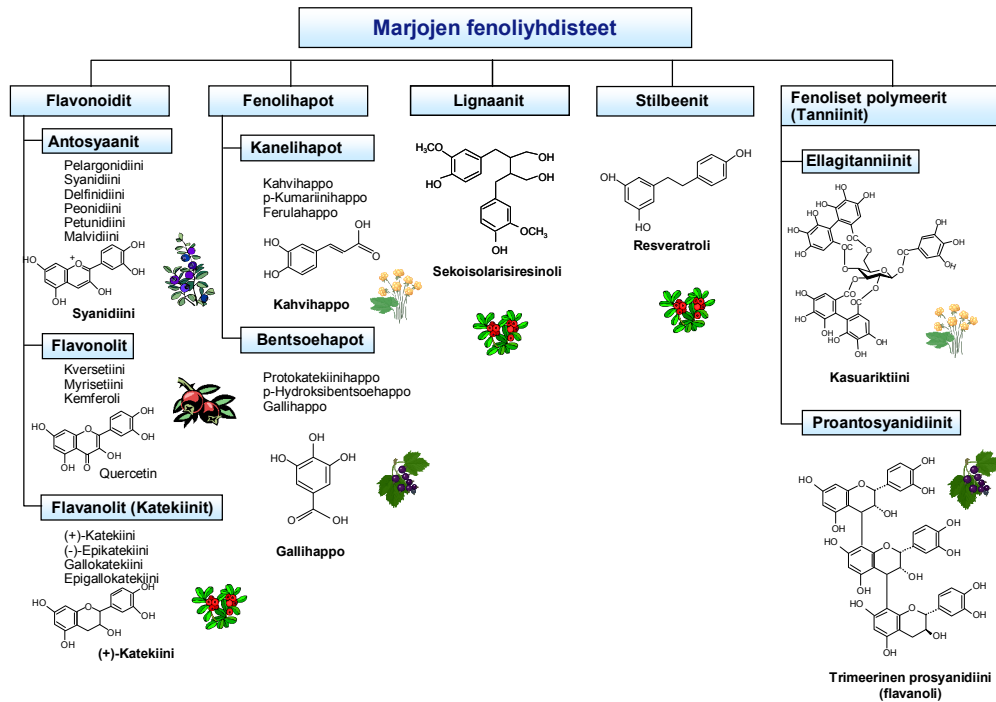
Selvitys käsittää patenttihaun marjojen, erityisesti karpalon, mustaherukan, mustikan ja puolukan fenolisten yhdisteiden eristämisen teknologioista sekä VTT:n ja Lappeenrannan teknillisen yliopiston (LTY) fraktioinnin asiantuntijoiden analyysin haun tuloksista. Analyysin tulosten sekä VTT:n ja LTY:n asiantuntijoiden arvioiden perusteella tehtiin arvio marjojen fenolisten yhdisteiden eristämismahdollisuuksista ja lupaavimmista teollisen mittakaavan prosesseista.

Tietoanalyytikko Anu Saloheimo VTT:ltä vastasi patenttihausta. Tarkempi kuvaus patenttihaun toteutuksesta on esitetty liitteessä 1. Erikoistutkija Mirja Mokka ja tutkija Olavi Myllymäki VTT:ltä sekä tutkija Tuomo Sainio ja professori Erkki Paatero LTY:stä arvioivat marjojen fenolisten yhdisteiden eristämismahdollisuuksia ja lupaavimpia teollisen mittakaavan prosesseja sekä tekivät ehdotuksen seuraavan vaiheen toimenpiteiksi. Tulokset esitellään myöhemmin sovittavana ajankohtana marjaklusterille ja mahdollisille julkisille rahoittajille.

3 MARJAT FENOLISTEN YHDISTEIDEN LÄHTEENÄ

3.1 Marjojen fenoliset yhdisteet ja niiden pitoisuudet

Marjojen fenolisten yhdisteiden kirjo on suuri. Kasvikunnasta on tunnustettu tähän mennessä yli 8000 fenoliyhdistettä, joista yli 6000 on flavonoideja. Marjojen tärkeimmät fenolisten yhdisteiden ryhmät on esitetty kuvassa 1.

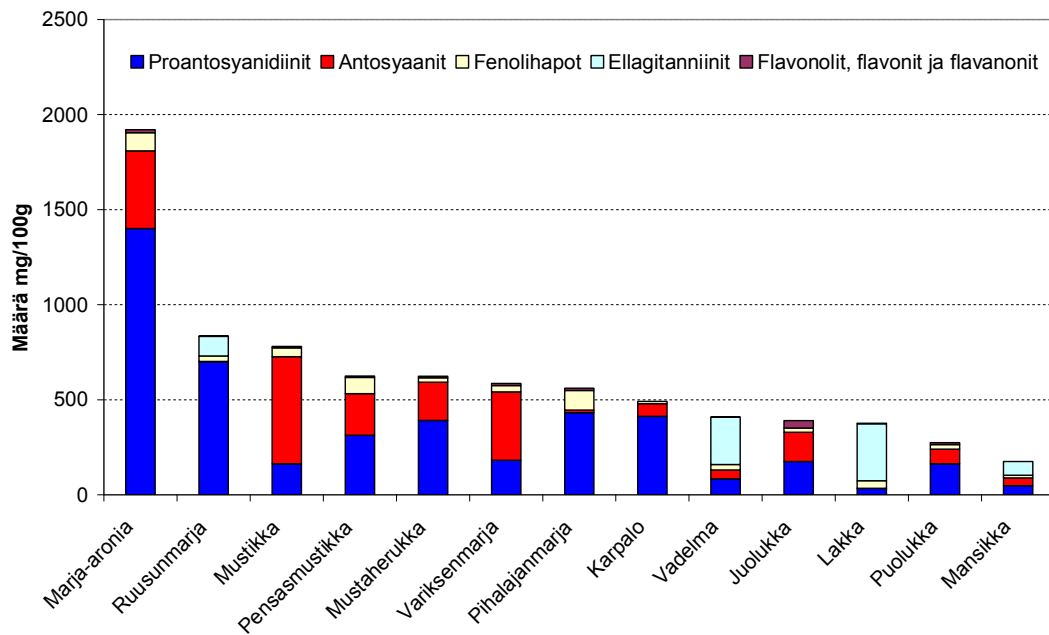


Kuva 1. Marjoissa esiintyvien fenolisten yhdisteiden luokittelu (Puupponen-Pimiä et al., 2005)

MTT:n ja Kuopion yliopiston yhteistyönä on tutkittu tärkeimpien fenolisten yhdisteiden pitoisuudet Suomessa käytettävistä kasviperäisistä elintarvikkeista marjat mukaan lukien (Törrönen, 2006). Kuvaan 2 on koottu tärkeimpien marjojemme fenolisten yhdisteiden pitoisuudet.

Tarkastelun kohteina olleista marjoista, karpalosta, mustherukasta, mustikasta ja puolukasta, mustikka sisältää eniten antosyaaneja ja sen fenolisten yhdisteiden kokonaismäärä on myös suurin. Mustaherukka ja karpalo sisältävät runsaasti proantosyanidiineja.

Marjojen fenolisten yhdisteiden pitoisuuksiin vaikuttavat monet tekijät, kuten lajike, kasvupaikan maantieteellinen sijainti, sääolosuhteet ja kypsyysaste.



Kuva 2. Suomalaisten marjojen fenolisten yhdisteiden pitoisuudet (Törrönen, 2006).

3.2 Prosessoinnin vaikutukset marjojen fenolisiin yhdisteisiin

Prosessointi- ja säilöntämenetelmien vaikutuksia marjojen fenolisiin yhdisteisiin on Törrösen tekemän selvityksen (2006) mukaan tutkittu kunnolla vain muutamien marjojen flavonolien (kversetiini, kamferoli ja myrisetiini) ja ellagitanniinien osalta. Vaikutukset ovat erilaisia eri marjoilla ja eri yhdisteillä. Tietoa puuttuu erityisesti antosyaanien osalta, vaikkakin tiedetään, että hillonvalmistuksessa antosyaanit tuhoutuvat herkemmin kuin flavonolit ja ellagitanniinit. Antosyaanien rikastusprosessiin Gabetta ja Zini (1991, EP 0412300) suosittelevat pH-arvoa alle 3 ja alle 40 °C:n lämpötilaa.

4. FENOLISTEN YHDISTEIDEN RIKASTAMINEN JA ERISTÄMINEN

Seuraavassa esitellään prosesseja, joilla valmistettuja rikasteita voidaan käyttää elintarvike- ja lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa ja joissa rikastettavat (uutettavat) yhdisteet säilyvät mahdollisimman muuttumattomina. Prosessissa käytettävien kemikaalien tulee olla elintarvikkeiden valmistukseen soveltuvia ja regeneroitavia eivätkä ne saa muodosta kohtuutonta kuormitusta ympäristölle tai aiheuta kohtuuttomia kustannuksia prosessissa.

Tarkastelun ulkopuolelle on rajattu prosessit, joissa käytetään esimerkiksi antosyaaneja hajottavaa emästä ja vetyperoksidia tai seoksesta vaikeasti poistettavaa rikkidioksidia. Patenteja, joissa fenolisten yhdisteiden rikastamisprosessissa on käytetty butanolia, amyylialkoholia tai etyyliasetaatia ei myöskään ole tarkasteltu. Edellä olevista esimerkkinä on Liettin ja Bonatin patentti (1983, US 4413004), jossa mustikan antosyaanit uutetaan suolahappopitoiseen metanoliin, josta antosyaanit saostetaan lyijyasetaatilla.

4.1 Patenttikirjallisuutta adsorptiokromatografiaan perustuvista erotusprosesseista

Fenolisten yhdisteiden erotusprosessin uutossa käytetään joko pelkkää vettä, jonka pH on säädetty happamalle alueelle, veden ja orgaanisen liuottimen seosta, tai orgaanista liuotinta. Elintarvikeprosesseissa orgaanisena liuottimena kyseeseen tulee lähinnä etanoli. Patenttikirjallisuudessa kuvatut prosessit jakautuvat kahteen pääryhmään uuttoa seuraavan prosessivaiheen perusteella. Ensimmäisessä ryhmässä fenolisia yhdisteitä sisältävä uute puhdistetaan neste-neste-uutolla. Toisen ryhmän patenteissa fenoliset yhdisteet eristetään uutteesta adsorptioerotuksella. Adsorptioerotus on lähinnä selektiivisyytensä vuoksi selvästi yleisempi menetelmä kuin neste-neste-uutto. Fenolisten yhdisteiden rikastaminen 20 %:iin tai sitä suurempiin pitoisuuksiin tehdään yleisimmin adsorptiokromatografialla.

Daugherty et al. (2005, CA 2554182), Gourdin et al. (2005, WO 2005072762) ja Tempesta et al. (2002, WO 0217732) kuvaavat marjojen fenolisten yhdisteiden rikastusprosessin, jossa rikastetun jakeen fenolisten yhdisteiden pitoisuus kohoaa yli 20 %:iin seuraavasti:

1. Fenolisten yhdisteiden uutto raaka-aineesta vesipohjaiseen happamaan liukseen.
2. Liukenemattoman aineosan suodatus uutteesta.
3. Kuormituksessa kiintoaineeton uute tuodaan kontaktiin adsorbenttiin (polymeerihartsin) kanssa, johon fenoliset yhdisteet kiinnittyvät. Kuormitus lopetetaan, kun hartsi ei enää kykene sitomaan fenolisia yhdisteitä ("break-through").
4. Hartsin pesu uutteesta olevista, fenoleihin lukeutumattomista, hartsiin kiinnittymättömistä yhdisteistä kuten sokerit.
5. Fenolisten yhdisteiden eluointi hartsista etanoli-vesiseoksella.
6. Fenolipitoisen eluaatin konsentrointi ja kuivaus.

Kappaleissa 4.1.1–4.1.3 esitellään lyhyesti edellä kuvatun prosessin eri vaiheisiin liittyvää patenttikirjallisuutta.

4.1.1 Fenolisten yhdisteiden uutto biomassasta

Tempesta et al. (2002) WO 0217732, Bailey et al. (2002) US 20020055471

Fenoliset yhdisteet rikastetaan marjoista puristetuista happamista mehuista tai puristekakun tai kuivatun marjan vesi-etanoliiuutteesta. Uutteen etanolipitoisuus on 0–95 % ja happopitoisuus 0,5–3 %. Happona voidaan käyttää esimerkiksi suolahappoa, rikkihappoa tai etikkahappoa.

Majoie (1972) DE 1767614

Mehusaantoa puristus- tai sentrifugointiprosessissa tehostetaan soluseinämiä hajottavilla entsyymeillä, jolloin mehusaanto- ja puristekakun kuiva-ainepitoisuus kasvavat. Menetelmä on tunnettua tekniikkaa.

Daugherty ja Tempesta (2006) WO 2006014499

Mustikkapakaste laimennettiin vedellä lisäämällä vettä noin puolet marjamäärästä. Seos homogenoitiin ja käsiteltiin pektinaasilla 40 °C:ssa 30 minuutin ajan suspensiota sekoittaen. Seos väkevöitiin 0,5 %:ksi (w/w) rikkihapon suhteen, kuumennettiin 45 °C:een ja sekoitettiin 15 minuuttia. Suspensio suodatettiin dikalsiittipedin ja 25 µm painesuotimen läpi.

Toisessa Daughertyn *et al.* patentin esimerkissä kuivattua mustikkaa uutettiin rikkihapolla (5g/l) happamaksi tehdyllä vedellä. Ensimmäinen uutto tehtiin 6-kertaisella vesimäärällä ja sitten kahdesti 4-kertaisella vesimäärällä alkuperäiseen mustikkaraaka-aineeseen nähden, jolloin 88 % antosyaaneista uutui. 2,3 l uutetta suodatettiin 30 µm polypropyleenisuodattimella. Suodatettua uutetta ja suodattimen pesuvettä oli yhteensä 2,43 l. Antosyaanisäannoksi määritettiin 90,9 %.

4.1.2 Adsorptioerotus

Adsorptioon perustuvat fenolisten yhdisteiden rikastusprosessit voidaan toteuttaa joko siten, että fenoliset yhdisteet adsorboituvat kiintofaasiin epäpuhtauksien eluoutuessa nopeasti kolonnin läpi, tai siten, että epäpuhtaudet adsorboituvat kiintofaasiin fenolisten yhdisteiden kulkeutuessa kolonnin läpi. Ensin mainitussa prosessissa, jota yleisimmin käytetään teollisessa valmistuksessa, erotuskolonnilla on yleensä suurempi kapasiteetti, mutta tällöin fenoliset yhdisteet on eluotava kolonnista sopivalla liuottimella, mikä saattaa johtaa laimentumiseen.

Rikastus voidaan toteuttaa yksivaiheisena (lataus ja eluointi) tai monivaiheisena (lataus, eluointi monessa osassa eri liuotinkoostumuksilla). Monivaiheisella prosessilla tavoitellaan joko yksivaiheista korkeampaa saantoa (viimeinen eluointi voimakkaalla liuottimella) tai adsorboituneiden fenolisten yhdisteiden fraktiointia esimerkiksi polymeroitumisasteen mukaan.

Adsorptioprosessissa fenoleja sisältävä nestevirta johdetaan pystyasennossa olevaan kolonniin, johon on pakattu adsorbenttipeti. Tyypillisesti pedin korkeus on vähintään 1,5-kertainen kolonnin leveyteen nähden. Erotusprosessin kapasiteettia voidaan nostaa kasvattamalla kolonnin halkaisijaa tai, mikäli painehäviö ei kasva liian suureksi, kolonnin korkeutta.

Fenolisten yhdisteiden erotuksessa adsorbentti on tyypillisesti hydrofobinen neutraali polymeerihartsi (esim. styreenin ja divinyylibentseenin kopolymeeri). Teollisen mittakaavan prosesseissa kiintofaasin partikkelikoko on tyypillisesti 200–700 µm. Adsorptiokapasiteetin maksimoimiseksi adsorbentilla tulisi olla suuri ominaispinta-ala ja kolonnin tehokkuuden maksimoimiseksi diffuusiovastus adsorbenttipartikkelien sisällä tulisi olla mahdollisimman pieni. Tämän vuoksi adsorbentteina käytetään tyypillisesti ns. makrohuokoisia hartseja, joissa on suhteellisen suurikokoisia huokosia aineensiirron nopeuttamiseksi ja ominaispinta-alan kasvattamiseksi. Kaupallinen hartsi ”elvytetään” valmistajan antamien ohjeiden mukaisesti adsorptioprosessia varten. Elvytyksessä hartsi pestään yleensä useita kertoja emäs-, happo-, ja etanoliliuoksilla, jonka jälkeen se on valmis kuormitukseen.

Kuormitusvaiheessa fenolipitoinen neste kulkeutuu (tyypillisesti pumpattuna, joissakin tapauksissa gravitaatiolla) kolonnin läpi tulppavirtauksena, josta fenoliset yhdisteet kiinnittyvät hartsin pinnalle. Fenolisten yhdisteiden adsorboituessa hartsiin, polaariset, ei-fenoliset yhdisteet, kuten sokeri, suolat, orgaaniset hapot jne. eivät kiinnity hartsiin, vaan ne ovat helposti pestävissä hartsipedistä happamalla vesiliuoksella.

Sokerien poiston jälkeen fenoliset yhdisteet eluoidaan hartsista vesi-etanoliliuokseen, jossa on tyypillisesti 50–95 % etanolia ja 5–50 % vettä. Eluointiliuosta kuluu 1–12 kertaa hartsipedin tilavuus. Lisättäessä eluentin etanolipitoisuutta 90 %:iin kolonnista uuttuu antosyaanien lisäksi hartsiin kiinnittyneitä proantosyanidiineja.

Yleensä hartsin toimittaja antaa suosituksia kuormitusnopeudesta, pesunopeudesta ja pesuveden tilavuudesta sekä eluointinopeudesta ja eluointiin käytettävästä liuostilavuudesta. Kuormitus-, pesu- ja eluointinopeudet sekä eri vaiheisiin käytettävät liuostilavuudet ilmoitetaan tyypillisesti kertalukuna hartsipedin tilavuutta kohden. Kaikki prosessivaiheet tehdään yleensä ympäristön lämpötilassa, vaikkakin kolonnin termostoiminen esimerkiksi aineensiirron nopeuttamiseksi on myös mahdollista. Hartsista eluoidun ekstraktin fenolisten yhdisteiden pitoisuus voi olla 70–75 % kuiva-aineesta.

Hartseina käytetään kaupallisia, elintarvikekelpoisia polymeereja, jotka kestävät satoja kuormituskertoja. Näistä patenteissa mainitaan kaupalliset hartsit Amberlite XAD 16 ja XAD 4 (styreeni-divinyylibenzeeni, Rohm & Haas) sekä XAD 7HP –hartsi (polyacryliesteri, Rohm & Haas). Myös SP-207-hartsia (Supelco; Bellafonte, PA), joka on huokoinen brominoitu styreenipolymeeri, on käytetty. Adsorbentin runkona voi olla myös muu polymeeri, kuten polyamidi tai dekstraanipolymeeri (Sephadex LH 20, Amersham Biosciences).

Soulier ja Dufour (2002) US 2002018821

Kolonneihin, jossa oli 25 l Amberlite XAD 16 –hartsia, kaadettiin 70 l mustikkauutetta. Hartsi pestiin 105 litralla demineralisoitua vettä, jonka jälkeen hartsiin kiinnittynyt antosyaani eluointiin 200 litralla 40 % etanolia. Eluaatti konsentroidiin alipaineessa 26–31 °C:ssa, jossa prosessissa etanoli otettiin talteen ja vesiliuos sumutuskuivattiin jauheeksi, jossa oli 53 % antosyaaneja.

Lang (2002) WO 0220112

20 litran Amberlite XAD 16 –hartsikolonnin kuormitettiin 152,4 kg:lla appelsiininkuoriekstraktia kuormitusnopeudella 20 l/h. Myös pesunopeus oli 20 l/h, ensin 40 litralla vettä, jota seurasi pesu 40 litralla 10 % etanolia. Hartsiin kiinnittyneet flavonoidit eluointiin etanoliliuoksella, jossa etanoliliuoksen konsentraatio nostettiin vähitellen 95%:iin, eluointinopeudella 20 l/h. Menetelmä on analoginen marjojen fenolisten yhdisteiden adsorptiolle.

Shrikhande et al. (2003) US 6544581

25 litraan XAD 7HP-hartsia adsorpoitiin greipinsiemen uutetta kuormitusnopeudella 62,5 l/h. Litra hartsi adsorboi 80–100 g fenolisia yhdisteitä. Pesuvaihe tehtiin 25 litralla vettä (1 petitilavuus), jonka jälkeen fenoliset yhdisteet eluointiin 25 litralla 95 % etanolia nopeudella 25 l/h. Fenolipitoista eluenttia saatiin 31 litraa. Eluentista haihdutettiin alkoholi ja jäännös sumutuskuivattiin. Kahdeksasta panosoperaatiosta saatujen jauheiden fenolisten yhdisteiden

kokonaispitoisuus vaihteli 89–93 % saantojen vaihdella 1,7–2,4 % lähtöaineesta eli greipinsiemenistä. Polymeeristen fenolisten yhdisteiden osuus fenolisten yhdisteiden kokonaismäärästä laski käsittelyssä noin kolmanneksella uutteeseen verrattuna.

Gourdin *et al.* (2005) US 2005266104

Suodatetun kiintoaineettoman uutteen määrä, jolla voidaan kuormittaa hartsikolonnia, riippuu raaka-aineesta, josta se on uutettu. Mustikasta uutetusta ekstraktista kiinnittyi litraan SP-207-hartsia 16–30 g fenolisia yhdisteitä. Pensasmustikasta valmistetusta uutteesta litraan SP-207-hartsia kiinnittyi noin 15–45 g fenolisia yhdisteitä. Seljauutteesta puolestaan litraan hartsia kiinnittyi 15–40 g fenolisia yhdisteitä. Uutteen kiintoainepitoisuuden ennen adsorptiota tulisi olla alle 200 g/litra.

Daugherty *et al.* (2005) CA 2554182 litraan SP-207 hartsia kiinnittyi 17 g mustikasta uutettuja antosyaaneja. Pesuliukuksia käytettiin 3,5 kertaa hartsin tilavuus ja eluointiin 10 kertaa hartsin tilavuus 70 % etanoliliuosta.

Daugherty ja Tempesta (2006) WO 2006014499

Mehusaantoa parannettiin pektinaasikäsittelyllä. Adsorptiokolonne oli pakattu 170 ml:lla SP-207-hartsia. Kolonnia kuormitettiin 2,4 litralla mustikkauutetta. Kolonnin hartsi pestiin 0,1 % etikkahappoliuoksella. Pesun jälkeisessä eluointioperaatiossa 70 % etanolilla saadun eluaatin antosyaanipitoisuus oli 40 % kuiva-aineesta 79 %:n saannolla.

Daugherty ja Tempesta (2006) WO 2006014499

Kuivattua mustikkaa uutettiin rikkihappoliuokseen. 170 ml:n hartsikolonnia kuormitettiin 2,24 litralla fenolipitoista suodosta, jossa kiintoainetta oli 2,98 % Kuormitusnopeus oli 2,2 ml/min. Fenolisten yhdisteiden hävikki oli 0,9 % kuormituksessa ja pesujen jälkeen 4,1 %. Eluoinnin jälkeen kuivatussa eluointijakeessa antosyaanipitoisuus oli 43 % 88,4 %:n saannolla.

Hu (2007) CN 1923891

Fenoliset yhdisteet uutettiin rypäleiden siemenistä kuumalla vedellä (95 °C), sentrifugoitiin ja suodatettiin, minkä jälkeen uute käsiteltiin makrohuokoisella polymeerihartsilla. Hartsi pestiin vedellä ja fenoliset yhdisteet uutettiin 40–60 % etanolilla. Etanolin talteenotto tehtiin 70 °C:ssa 0,4–0,6 barin paineessa. Uute sumutuskuivattiin. Tuotteen polyfenolipitoisuus oli > 95 % ja saanto 6 %.

Hong *et al.* (2005) KR 2005079431

Oligomeeriset proantosyanidiinit eristettiin rypäleiden siemenistä. Fenoliset yhdisteet adsorboitiin makrohuokoiseen polystyreenihartsin vesi-etanoliliuoksesta. Haluttu oligomeerijae voidaan eristää monomeerisistä ja polymeerisistä yhdisteistä monivaiheisella eluoinnilla (10 %, 70 % ja 90 % etanolia eluentissa).

Edellä mainittujen lisäksi patettikirjallisuudessa on esitetty monia prosesseja, joita ei voida sellaisenaan ajatella elintarvikesovelluksiin. Niistä on kuitenkin löydettävissä huomionarvoisia yksityiskohtia.

- Hilton *et al.* (1977, US 4320009) käyttivät anioninvaihtohartsia (IRA-400) ja kationinvaihtohartsia (IR-124) antosyaaniekstraktin sisältämien ravinteiden

poistoon hiivojen kasvun ehkäisemiseksi ja tuotteen säilyvyyden parantamiseksi.

- Fredj ja Dietlin (1989, FR 2641283) käyttivät polyamidiadsorbenttia yleisemmin käytettyjen polystyreenin ja polyakryyliesterin sijaan antosyaaniuutteen puhdistuksessa (eluenttina metanoli).
- Tempesta *et al.* (2002, WO 2002017732) käyttivät bromattua hartsia, joka aromaattisen renkaan suuremmasta hydrofobisuudesta huolimatta adsorboi antosyaaneja heikommin kuin tavanomainen polystyreenihartsi. Näin saatiin aikaan parempi eluoitavuus.

4.1.3 Fenolirikasteen kuivatus

Eluointivaiheen jälkeen etanolin haihdutuksesta jäänyt vesiliuos voidaan kuivata, usein kantaja-aineen kanssa, jolloin saadaan jauhemainen jae (**Nair, 2005, US2005037130**). Edellytyksenä kuivaukselle on, että seos ei sisällä vapaita sokereita eikä lipidejä tai muita makromolekyylejä kuten pektiinejä.

Slimestad, (2003), US2003091660

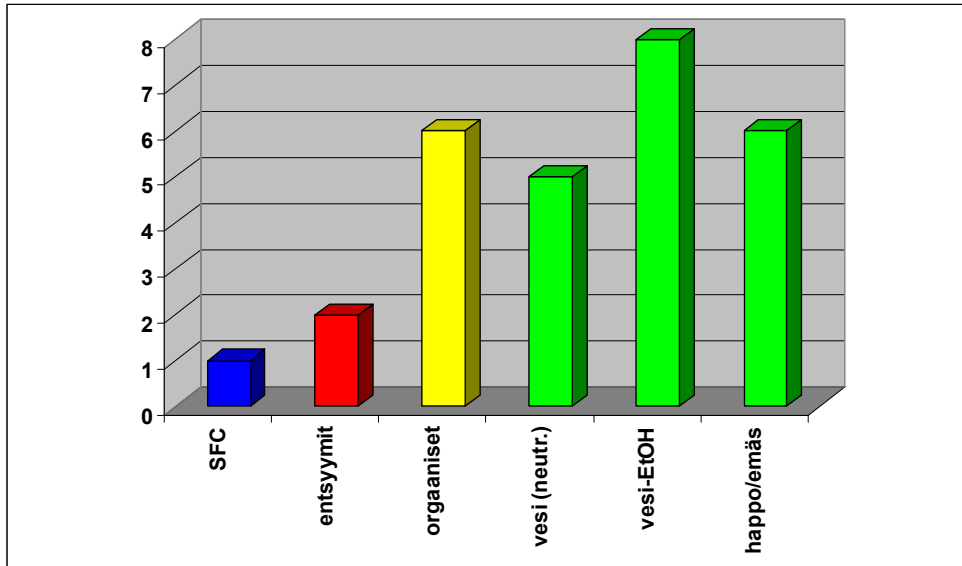
Vesiliuos sumutuskuivataan, mieluiten typpi-ilmakehässä, 130–160 °C:ssa. Sumutuskuivaimen menevän liuoksen kuiva-ainepitoisuus on n. 8–15 %. Kuivauksessa voidaan apuaineena käyttää maltodekstriiniä, jota voi olla kolmannes fenolisten yhdisteiden määrästä. Maltodekstriinillä nostetaan kuivan jauheen lasisiirtymälämpötilaa ja parannetaan siten sen juoksevuutta.

Niro AS:n konstruoimissa järjestelmissä typpi-ilmakehä muodostaa suljetun kierron sumutuskuivaimessa. Myös pakkaskuivaus on sopiva kuivausmenetelmä, mutta kalleutensa johdosta sen käytön kannattavuus on arvioitava tapauskohtaisesti.

5 TULOSTEN TARKASTELU

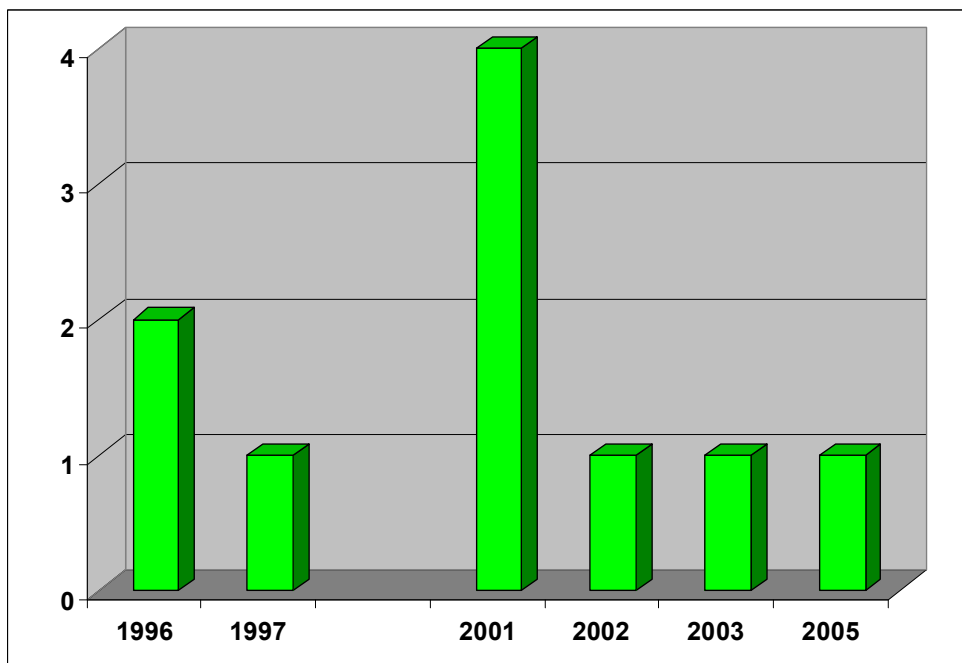
Pääosa hyödyllisistä patenteista käsitteli fenolisten yhdisteiden adsorptioerotusta, joka onkin fraktiointiprosessin kriittisin yksikköoperaatio. Adsorptioon perustuvalla uutteen puhdistuksella saavutetaan pelkkään uuttoon verrattuna korkeampi tuotteen puhtausaste. Elintarvikesovellukseen sopivia adsorptiohartseja on kaupallisesti saatavilla useilta valmistajilta. Erotus on tyypillisesti panosprosessi, mutta voidaan toteuttaa teollisessa valmistuksessa jatkuvatoimisesti käyttämällä useita rinnakkaisia kolonneja. Usein vaikeutena on skaalata laboratoriomitan adsorptioprosessi kannattavaksi, teknisesti toteutettavaksi ja helposti ohjattavaksi teolliseen mittakaavaan prosessiksi.

Kuvassa 3 on esitetty tarkasteltujen patenttien ryhmittely fenolisten yhdisteiden uuttamiseen biomassasta käytettyjen liuotinten mukaisesti. Orgaanisilla liuottimilla (keltainen) tarkoitetaan muita yhdisteitä kuin etanolia (esim. etyyliasettaatti ja butanoli). Valtaosa patenteista perustuu siis vesi- tai vesi-etanoli-uuttoon, mikä onkin elintarvikesovelluksia ajatellen välttämätöntä. Entsyymejä (lähinnä pektinaasi) käytetään estämään uutteen geeliytymistä ja viskositeetin kasvua.

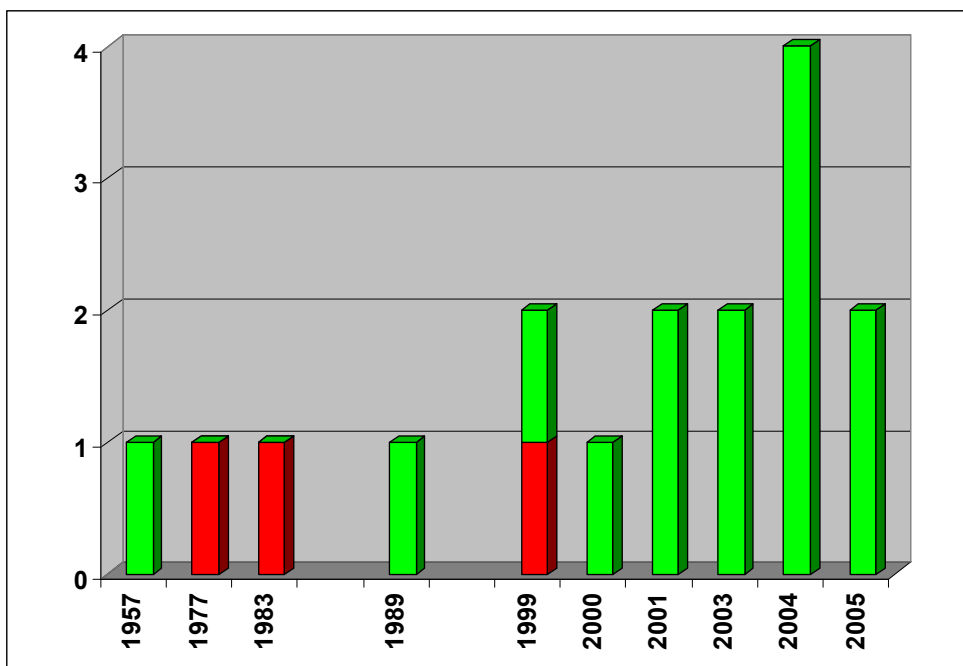


Kuva 3. Neste-kiinteä- uutossa käytetyt liuottimet ja niiden esiintymistiheys patentiaineistossa.

Kuvissa 4 ja 5 on esitetty vuosittain niiden patenttien lukumäärät, joissa hyödynnetään neste-neste-uuttoa, adsorptiota tai ultrasuodatusta uutteen puhdistuksessa ja fenolisten yhdisteiden talteenotossa. Mainittu vuosiluku viittaa patenttihakemuksen jättöpäivämäärään. Kuvista havaitaan, että fenolisten yhdisteiden talteenottoon liittyviä patenteja on julkaistu 2000-luvulla selvästi enemmän kuin aikaisemmillä vuosikymmenillä. Adsorptioerotus on selvästi yleisempi menetelmä kuin neste-neste-uutto lähinnä selektiivisyytensä vuoksi. Kalvosuodatusta on käytetty vain harvoin.

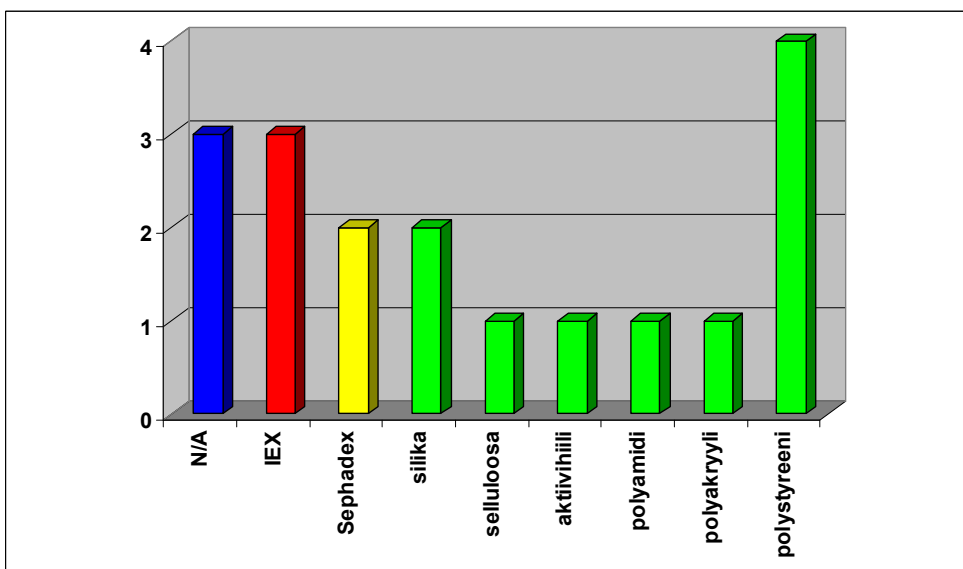


Kuva 4. Neste-kiinteä- ja neste-neste-uuttoa erotusmenetelmänä hyödyntävien patenttien lukumäärät vuosittain.



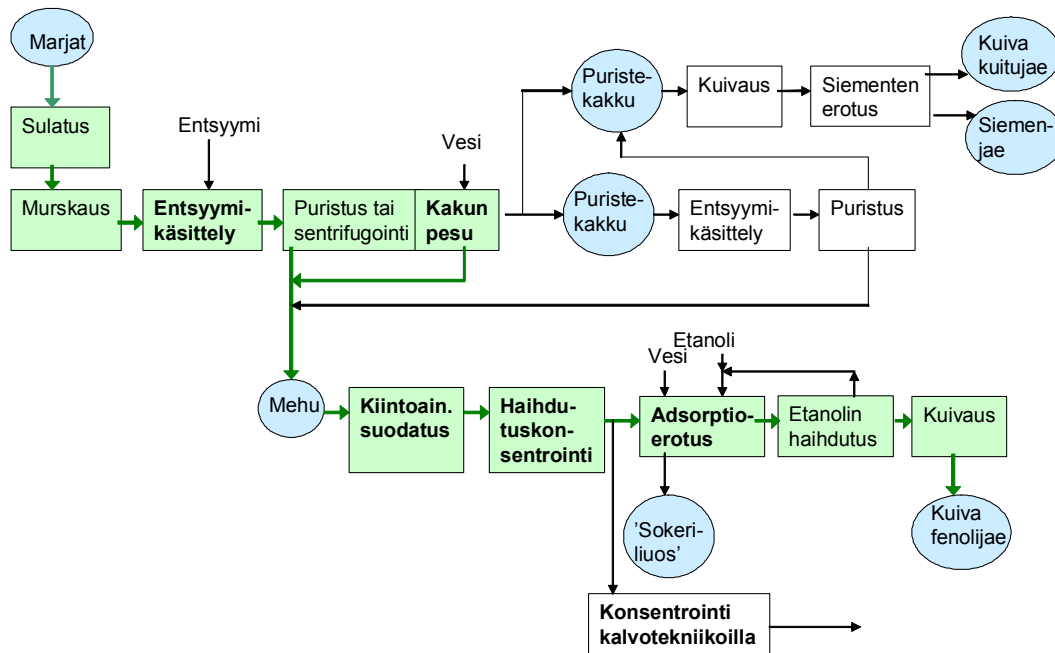
Kuva 5. Adsorptioerotusta (vihreä) ja/tai ultrasuodatusta (punainen) hyödyntävien patenttien lukumäärät vuosittain.

Kuvassa 6 on listattu adsorbenttimateriaaleja, joita patenttikirjallisuudessa on käytetty uutteen käsittelyssä. Polystyreeni (neutraali polymeeri) on yleisimmin käytetty adsorbentti. Sillä on myös FDA-hyväksyntä. Ioninvaihtoa (IEX) on käytetty lähinnä suolojen poistamiseen tuotteesta, eikä sillä yleensä pyritä erottamaan selektiivisesti fenolisia yhdisteitä. Sephadex on kokoeksluusiogeeli, mutta joissakin patenteissa (kuten myös eräissä akateemisissa julkaisuissa) sitä on käytetty myös adsorbenttina.



Kuva 6. Stationaarifaasimateriaalit uutteen adsorptioerotusta hyödyntävissä patenteissa. N/A = tietoa ei saatavilla, IEX = ioninvaihtohartsit.

Kuvassa 7 on esitetty prosessikaavio fenoli-/antosyaaniuutteen valmistuksen vaihtoehdoista, joissa liuottimina käytetään vain vettä ja etanolia. Lähtökohtana on oletettu, että raaka-aineena on pakastettu kokonainen marja, josta fenoliset yhdisteet irrotetaan ensin mahdollisimman tehokkaasti mehuun, josta ne sitten edelleen konsentroidaan. Fenolisia yhdisteitä voidaan erottaa myös mehun valmistuksen puristekakusta, jonne marjan fenolisista yhdisteistä jää jopa 20–50 % marjalajista ja entsyymikäsittelystä riippuen. Puristekakussa fenoliset yhdisteet ovat sitoutuneet voimakkaasti marjan kuitufraktioon ja niiden irrottaminen on hankalaa ja saannot jäävät pieniksi. (VTT:n ja Kuopion yliopiston yhteistyössä tekemät marjatutkimukset Maxfun (EU) ja Enzmarja (MMM)).



Kuva 7. Fenoli-/antosyaaniuutteen valmistusprosessi.

Kuvassa 7 kuvatun prosessin entsyymikäsittelyn tarkoituksena on hajottaa marjojen pektiini, jolloin mehusaanto paranee ja marjan fenoliset yhdisteet saadaan irrotetuksi mehufraktioon. Jos pektiiniä ei hajoteta, se aiheuttaa ongelmia myös adsorptioerotuksessa ja kuivauksessa. Tarkasteltavista marjoista karpalolla, mustaherukalla ja puolukalla on korkea pektiinipitoisuus. Vaikka mustikan pektiinipitoisuus on matala, myös se tarvitsee entsyymikäsittelyn. Mehun puristuksessa käytettyjen kaupallisten entsyymivalmisteiden pääkomponentit ovat soluseiniä rikkovia pektinaaseja, kuten polygalakturonaasia ja pektiinilyaasia. Entsyymivalmisteet sisältävät lähes aina myös sivuaktiivisuuksina muita glykosidaaseja, kuten α -arabinosidaasia, β -galaktosidaasia ja β -glukosidaasia, jotka saattavat heikentää esim. antosyaanien stabiilisuutta joidenkin marjojen kohdalla. Nämä sivuaktiivisuudet voivat irrottaa antosyaanin sokeri-yksikön ja hajoamisen seurauksena muodostunut yhdiste on epästabiilimpi kuin alkuperäinen antosyaani. Tästä seuraa mehun värin ja bioaktiivisuuden väheneminen. Puristuksessa käytettävä entsyymivalmiste pitää aina valita marjakohtaisesti ja sopivan valmisteen löytämiseksi sen sivuaktiivisuuksien tulee olla tiedossa. Marjojen entsyymikäsittely tehdään n. 40 °C:n lämpötilassa ja marjan omassa pH:ssa, vaikka ne eivät olisikaan optimaalisia entsyymien toiminnan kannalta. Korkeammat lämpötilat ja pH-arvot hajottavat marjojen antosyaaneja ja eivät siksi tule kyseeseen.

Mehun fenolisten yhdisteiden saantoa voidaan parantaa kakun pesulla, mutta pesu on optimoitava veden määrän ja saannon välillä, sillä saannon parantaminen ei saa kuitenkaan lisätä edelleen prosessoitavan nesteen määrää kohtuuttomaksi.

Puristuksen jälkeen mehusta erotetaan kiintoaineet suodattamalla tai sentrifugoimalla. Laitevalintaan vaikuttavat mehun kiintoaineen määrä ja partikkelikoko, joihin puolestaan vaikuttavat edeltävät prosessivaiheet, murskaus ja puristus. Suodatettu mehu konsentroidaan adsorptioerotuksen kannalta optimaaliseen väkevyyteen.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Marjojen fenolisten yhdisteiden eristäminen on teknologisesti mahdollista teollisessa mittakaavassa. Prosessissa tarvittava teknologia ja sen yksikköoperaatiot ovat yleisesti tunnettuja. Fenolisten yhdisteiden eristämiseen liittyvissä patenteissa on yleensä suojattu koko prosessi uutosta kuivaukseen, vaikkakin keksinnöllisyys on yleensä rajoittunut esimerkiksi uutovaiheessa käytettävään liuotinkoostumukseen tai adsorptioerotuksessa käytettävään adsorbenttiin. Vaikka patenteissa tyypillisesti luetellaankin laaja kirjo tuotefraktion käyttökohteita (ravintolisät, väriaineet, kosmetiikkatuotteet), ei tämä estä yksityiskohdiltaan toisenlaisella prosessilla tuotettujen fraktioiden hyödyntämistä mainituissa käyttökohteissa.

Vaikka selvityksen perusteella on saatu hyvä yleiskuva marjan fenolisten yhdisteiden erottamisen teknologioista ja koko prosessista, sisältyy prosessiin yksikköoperaatioita, jotka on optimoitava kokeellisesti ja simuloinnein tehdassuunnittelun lähtökohtien määrittämiseksi. Vasta sen jälkeen voidaan arvioida prosessin investointi- ja käyttökustannuksia.

Kriittisin yksikköoperaatio on adsorptioerotus, jonka suunnittelun kriteereinä voidaan pitää tuotteen puhtautta ja saantoa, eluentin kulutusta (m^3/kg), ja spesifistä tuottavuutta ($\text{kg}/\text{m}^3/\text{a}$). Jatkuvatoimisen erotusprosessin adsorptiovaiheeseen tarvitaan kaksi tai useampia kolonneja sekä, tavoiteltaessa korkeaa saantoa, välisäiliöitä kierrätysvirtoja varten. Adsorptioerotuksessa tarvitaan väkevää etanoliliuosta, joten myös prosessin turvallisuuteen on kiinnitettävä erityistä huomiota.

Erotusmateriaalilta vaaditaan korkeaa adsorptiokapasiteettia ja hyvää eluoitavuutta, jotka ovat keskenään ristiriitaiset ominaisuudet. Näin ollen erotusmateriaalin ominaisuudet on optimoitava yhdessä eluentikoostumuksen kanssa. Erotukseen ajettavan liuoksen konsentraatio, kolonnin kuormitettavuus, ajettavuus ja kapasiteetti on määritettävä kokeellisesti. Tämän jälkeen prosessin suunnittelua voidaan jatkaa matemaattisen mallinnuksen avulla.

Marjojen entsyymikäsittelyn optimointi (prosessoitavalle marjalle sopivan entsyymivalmisteen valinta ja annostus) pektiinin hajottamiseksi on oleellista koko loppuprosessin onnistumisen kannalta. Muita kokeellisesti optimoitavia yksikköoperaatioita ovat puristekakun pesu, kiintoaineen erotus puristuksen ja pesun jälkeen sekä sitä seuraava konsentroida. Myös adsorptioerotuksen jälkeisen nestemäisen uutteen kuivaus vaatii kokeellista optimointia.

7 EHDOTUS JATKOTOIMENPITEIKSI

Fenolisten yhdisteiden eristämisen prosessin tehdassuunnittelun lähtökohtien määrittämiseksi vaadittavat kokeelliset optimoinnit ja simuloinnit ehdotetaan toteutettaviksi yritysten, VTT:n, Lappeenrannan teknillisen yliopiston ja mahdollisten muiden tutkimustahojen kanssa yhteistyönä tehtävässä hankkeessa. Tavoitteena on koota hankkeeseen yrityksiä koko marjojen jalostusketjusta, raaka-aineen toimittajista jakeiden valmistajiin ja loppukäyttäjiin saakka. Myös yrityksiä, joilla on osaamista prosessin yksikköoperaatioista tai niiden suunnittelusta, toivotaan hankkeeseen yhteistyökumppaneiksi.

VTT:llä on pitkäaikainen kokemus marjojen entsyymiavusteisista prosesseista ja entsyymikäsittelyn vaikutuksista marjojen fenoliin yhdisteisiin. VTT:llä on myös hyvä laitekanta ja osaamista useimpien erotusprosessin yksikköoperaatioiden pilot-mittakaavan optimointiin.

Yksikköoperaatioista kriittisimpänä adsorptioprosessin kehittämiseen tulisi panostaa hankkeessa. Lappeenrannan teknillisessä yliopistossa adsorptioerotusta on tutkittu 1980-luvulta lähtien ja kehitetty adsorptioerotuksen simulointiin tarvittavia työkaluja ja adsorbenttimateriaaleja.

Suomessa on kansainvälisesti vertailtuna korkeatasoista osaamista teollisen mittakaavan kromatografisesta erotuksesta (Danisco Oy, Kantvikin tutkimuskeskus). Lisäksi insinööritoimistoista ainakin Rintekno Oy:llä on runsaasti kokemusta kolonnierotusprosessien suunnittelusta. Kaupallisesti saatavilla olevien hydrofobisten polymeeriadsorbenttien lisäksi tulisi selvittää myös mahdollisuus räätälöityihin materiaaleihin, erityisesti mikäli olemassa olevat patentit estävät tunnettujen kaupallisten materiaalien käytön. Finex Oy valmistaa Kotkassa muun muassa fenolisten yhdisteiden adsorptioon soveltuvia elintarvikelaatuisia polymeeriadsorbentteja.

Marjojen fenolisten yhdisteiden eristämiseen ja jalostamiseen liittyvä tutkimushanke korkean teknologian tuotteiden kehittämiseksi voidaan toteuttaa esimerkiksi yritysryhmähankkeena. Se voisi sopia myös Tekesin innovaatioläheisen julkisen tutkimuksen hankkeessa toteutettavaksi tai Tekesin keväällä 2007 käynnistyneeseen BioRefine-ohjelmaan, jossa biomassan jalostukseen muiksi kuin energiatuotteiksi keskittyvä julkisen tutkimuksen rahoitushaku aukeaa syksyllä 2007.

Lähdeviitteet

Bailey, D.T., Freeberg, D.R., Gertenbach, D., Gourdin, G.T., Richheimer, S.L., Tempesta, M.S. & Daugherty, F.J. Pat. US 20020055471. 2002. Efficient method for producing compositions enriched in anthocyanins. Appl. US 20010943158, 20.8.2001. Publ. 9.5.2002. 17 s.

Daugherty, F.J. & Tempesta M.S. Pat. WO 2006014499. 2006. Cinnamon extract enriched for polyphenols and methods of preparing same. Phenolics LLC (US). Appl. WO 2005US24003, 6.7.2005. Publ. 2.9.2006. 125 s.

Daugherty, F.J., Tempesta M.S., Freeberg, D.R., Nichols, R.L., Richhmeier, S.L., Gourdin, G.T. & Bailey, D.T Pat. CA 2554182. 2005. Compositions enriched in phenolic compounds and methods for producing same. Phenolics LLC (US). Appl. CA 20052554182, 20.1.2005. Publ. 11.8.2005. 119 s.

ENZMARJA, Hallitulla entsyymaattisella prosessoinnilla terveellisempiä ja laadukkaampia mehuja. MMM-projekti, 2004–2005.

Frejd, D. & Ditlin, F. Pat. FR 2641283. 1990. Purification of colored substances, especially anthocyanosides, from berries. Newpharm (FR). Appl. FR 1989-54, 4.1.1989. Publ. 6.7. 1990. 6 s.

Gabetta, B. & Zini, G. Pat. EP 0412300. 1991. Process for the preparation of extracts having high content in anthocyanosides. Inverni Della Beffa Spa (IT). Appl. EP 19900113064, 9.7.1990. Publ. 13.2.1991. 5 s.

Gourdin, G.T., Richheimer, S.T., Bailey, D.T., Nichols, R., Freeberg, D.R., Tempesta, M.S. & Daugherty J.F. Pat. WO 2005072762. 2005. Compositions enriched in phenolic compounds and methods for producing same. Phenolics LLC (US). Appl. WO 2005US01984, 20.1.2005. Publ. 11.8.2005. 117 s.

Gourdin, G.T., Richhmeier, S.L., Tempesta, M.S., Bailey, D.T., Nichols, R., Daugherty, F.J. & Freeberg, D.R. Pat. US 2005266104. 2005. Efficient method for producing compositions enriched in total phenols. Phenolics LLC (US). Appl. US 20050179771, 12.7.2005. Publ. 1.12.2005. 55 s.

Hilton, B.W., Lin, R.I. & Topor, M.G. Pat. US 4320009. 1982. Processed anthocyanin pigment extracts. Frito-lay, Inc. (US). Appl. US 1979-17824, 5.3.1979. Publ. 16.3.1982. 7 s.

Hong, T.H., Hong, W.H. & Huh, Y.S. Pat. KR 2005079431. 2005. Method for rapid, inexpensive separation and isolation of oligomeric proanthocyanidins from wild grape seed extract. Daejeon Health Sciences College (KR). Appl. KR 2004-7681, 5.2.2004. Publ. 10.8.2005.

Hu, Y. Pat. CN 1923831. 2007. Method for extracting polyphenol from grape seed. Zhejiang Recover Biotech Com, Ltd. (CN). Appl. CN 2005-10060603, 1.9.2005. Publ. 7.3.2007. 7 s.

Lang, T.R. Pat. WO 0220112. 2002. Process for selectively extracting bioactive components. Food Ingredients Technologies (AU). Appl. WO 2001AU01113, 4.9.2001. Publ. 14.3.2002. 4 s.

Lietti, A. & Bonati, A. Pat. US 4413004. 1983. Pharmaceutical compositions. Inverni Della Beffa Spa (IT). Appl. US 19820445075, 29.11.1982. Publ. 1.11.1983. 11 s.

Majoie, B. Pat. DE 1767614. 1972. Process for extracting anthocyanins and medicaments containing such compounds. Rech S Ind Sorisa Soc (D). Appl. DE 19681767614, 29.5.1968. Publ. 30.3.1972. 25 s.

MAXFUN, Novel enzyme-aided extraction technologies for maximized yield and functionality of bioactive components of consumer products and ingredients from by-products. EU-projekti, 2003–2005. <http://maxfun.vtt.fi/>

McKenzie, M.A. Pat. WO 03084559. 2003. Vaccinium species compositions with novel beneficial properties. Arctos Pharmaceuticals Inc (US). Appl. WO 2003US10200, 3.4.2003. Publ. 16.10.2003. 105 s.

Nair, M.G. Pat. US 2005037130. 2005. Method and composition for producing berry derived products. University Michigan (US). Appl. US 20040821581, 9.4.2004. Publ. 17.2.2005. 14 s.

Puupponen-Pimiä, R, Nohynek, L. Alakomi, H-L. & Oksman-Caldentey K-M. 2005. Bioactive berry compounds–novel tools against human pathogens. Mini-review. Applied Microbiological Biotechnology. 67:8-18.

Shrikhande, A.J., Race, E.J., Wightman, J.D. & Sambueso, R.D. Pat. US 6544581. 2003. Process for extraction, purification and enrichment of polyphenolic substances from whole grapes, grape seed and grape pomace. Canandaigua Wine Company Inc (US). Appl. US 20000599333, 22.6 2000. Publ. 8.4.2003. 13 s.

Slimestad, R. Pat. US 2003091660. 2003. Product. Appl. US 20020145510, 15.5 2002. Publ. 5.15.2003. 4 s.

Soulier, C. & Dufour, D. Pat. US 2002018821. 2002. Process for the purification of red fruit extract containing anthocyanosides extract obtained from the process and use of said extract. Appl. US 20010929269, 14.8.2001. Publ. 14.2.2002. 6 s.

Tempesta, M.S., Daugherty, F.J., Bailey, D.T., Freeberg, D.R., Gertenbach, D., Gourdin, G. & Richhmeier, S. Pat. WO 2002017732. 2002. Efficient method for producing compositions enriched in anthocyanins. Hauser Inc, Tempesta, M.S and Daugherty, F.J. (US). Appl. WO 2001US27161. 31.8.2001. Publ. 7.3.2002. 36 s.

Törrönen, R. 2006. Tutkimustietoa marjojen terveellisyydestä ja terveysvaikutuksista. Elintarvikkeiden terveysvaikutusten tutkimuskeskus (ETTK), Kliinisen ravitsemuksen yksikkö, Kuopion yliopisto.