

Tekniikan kandidaatintyö

Luonnon fenolihdisteet pintojen mikrobikontaminaatioiden estämisessä

Lappeenranta 2018
Tatu Kärki

LAPPEENRANNAN TEKNILLINEN YLIOPISTO
LUT School of Engineering Science
Kemiantekniikan koulutusohjelma

Tatu Kärki

Luonnon fenoliyhdisteet pintojen mikrobikontaminaatioiden estämisessä

Kandidaatintyö 2018

Työn ohjaaja: FM Tiina Virtanen

Työn tarkastaja: TkT Mari Kallioinen

TIIVISTELMÄ

Lappeenrannan teknillinen yliopisto

LUT School of Engineering Science

Kemiantekniikka

Tatu Kärki

Luonnon fenolihdisteet pintojen mikrobikontaminaatioiden estämisessä

Kandidaatintyö

Kevät 2018

39 sivua, 22 kuvaa, taulukko

Työn ohjaaja: FM Tiina Virtanen

Työn tarkastaja: TkT Mari Kallioinen

Hakusanat: fenolihdisteet, mikrobit, bakteerit, quorum sensing inhibition

Luonnon fenolihdisteillä tiedetään yleisesti olevan antimikrobisia ominaisuuksia lukuisia mikrobeja vastaan, kuten ihmisille tauteja aiheuttavat mikrobit eli patogeenit. Fenolihdisteiden antimikrobiset ominaisuudet perustuvat niiden kykyyn estää mikrobeja viestimästä keskenään. Mikrobeista erityisesti bakteerien tiedetään kommunikoivan keskenään signaalimolekyyliden avulla ja kontrolloivan siten muun muassa mikrobipopulaation kokoa ja mikrobeissa tapahtuvaa proteiinisynteesiä. Fenolihdisteet rajoittavat eri tavoin signaalimolekyyliden kulkeutumista bakteerien välillä ja näin rajoittavat mikrobipopulaatioiden kasvua.

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää kuinka fenolihdisteet toimivat patogeenien leviämisen estämisessä pintojen välityksellä. Työssä käsiteltiin kirjallisuuden pohjalta fenolihdisteitä ja mikrobeja yleisesti ja kummankin pääryhmiä sekä luokittelua. Fenolihdisteet ovat kemiallisilta ominaisuuksiltaan suhteellisen epästabiileja. Niiden hajoamista kiihdyttävät emäksinen pH, korkeat lämpötilat, valo ja UV-säteily. Stabiilisuuden parantamiseksi on olemassa mikrokapselitekniikka, jonka käyttöä pohditaan ja analysoidaan tässä työssä ja ehdotetaan mahdollisia teknisiä ratkaisuja fenolihdisteiden kestävyysparantamiseksi mikrokapselitekniikalla.

ABSTRACT

Lappeenranta University of technology

School of Engineering Science

Chemical Engineering

Tatu Kärki

Natural phenolic compounds in the prevention of surface microbial contamination

Bachelor's thesis

Spring 2018

39 pages, 22 figures, table

Inspectors of the thesis: M.Sc. Tiina Virtanen & D.Sc. Mari Kallioinen

Keyword: phenolic compounds, microbes, bacteria, quorum sensing inhibition

Natural phenolic compounds are commonly known to have antimicrobial properties against numerous microbes including pathogens which cause diseases to humans. The antimicrobial properties of phenolic compounds are based on their ability to prevent microbes from communicating with each other. Microbes are known to communicate with each other by signal molecules which in turn controls the size of the microbial population and protein synthesis in microbes. Phenolic compounds limit the transmission of signal molecules between bacteria in different ways thus limiting the growth of microbial populations.

The purpose of this study was to find out how the phenolic compounds work to prevent the spread of pathogens on the surfaces. Study deals with phenol compounds and microbes were commonly discussed based on the literature. Phenolic compounds are relatively instable due to their chemical properties. Their degradation is accelerated by basic pH, high temperature, light and UV radiation. To improve stability, there is a microcapsule technology, which is discussed and analysed in this work and suggested as possible technical solutions to improve the stability of phenolic compounds.

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	7
2	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	8
3	FENOLIYHDISTEET	9
3.1	Luonnossa esiintyvät fenolit	9
3.2	Luonnossa esiintyvien fenolien pääryhmät	10
3.2.1	Flavonoidit	10
3.2.2	Fenoliset hapot	13
3.2.3	Fenoliset aldehydit.....	14
3.2.4	Lignaani.....	15
3.2.5	Tanniinit	16
3.2.6	Stilbeenit.....	17
4	MIKROBIT	18
4.1	Mikrobiluokat	18
4.1.1	Bakteerit	19
4.1.2	Virukset.....	20
4.1.3	Muut mikrobit.....	21
4.2	Yleiset taudinaiheuttajat tasopinnoilla.....	21
4.2.1	Pneumokokki	22
4.2.2	A-ryhmän streptokokki	22
4.2.3	Stafylokokki.....	22
4.2.4	Escherichia coli.....	23
4.3	Mikrobien välinen viestintä	23
5	MIKROBIEN VÄLISEN VIESTINNÄN ESTÄMINEN	25
5.1	Signaalimolekyylien toiminnan estäminen	26
5.2	Patogeenien toimintaa rajoittavat luonnonfenolit.....	27
5.2.1	Kversetiini ja luteoliini	27
5.2.2	Krysiini.....	28
5.2.3	Gallushappo	28
5.2.4	4',6,7-Trihydroksi-isoflavoni	29
5.2.5	Proantosyanidit.....	29
5.2.6	Epigallokatekiinigallaatti.....	29
5.2.7	Sanguiin H-6.....	30
6	FENOLIYHDISTEIDEN KÄYTTÖKOHTTEET	30
6.1	Fenoliyhdisteiden stabiilisuus ja niiden käyttöön liittyvät mahdolliset ongelmat	31
6.2	Potentiaaliset tekniset sovellukset fenoliyhdisteiden käyttöön liittyen	32

7 JOHTOPÄÄTÖKSET	34
LÄHDELUETTELO	35

Lyhenneluettelo

AI	Autoinduseri
AHL	N-asyyli-homoseriini-laktoni
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
EGCG	Epigallokatekiinigallaatti
EHEC	Enterohemorraaginen <i>Escherichia coli</i> -bakteeri
RNA	Ribonukleiinihappo
QS	Quorum sensing
QSI	Quorum sensing inhibition

1 JOHDANTO

Luonnossa esiintyy lukuisia fenolihdisteitä ja ne ovat pääosin lähtöisin kasvikunnasta. Osalla niistä tiedetään olevan antimikrobisia ominaisuuksia (Hyvärinen 2001, 48), jotka johtuvat pääosin fenolihdisteiden kyvystä estää mikrobien välinen kommunikointi mikrobipopulaatioissa. Mikrobeista erityisesti bakteereiden on havaittu viestivän keskenään. Ne säätelevät viestinnän kautta muun muassa bakteeripopulaation kokoa ja bakteereissa tapahtuvaa proteiinisynteesiä (Madigan et al. 2012, 248, 250). Fenolihdisteiden toiminta perustuu erityisesti juuri bakteerien leviämisen ehkäisemiseen.

Suomessa pneumokokkibakteeri aiheuttaa kymmeniä tuhansia sairastumisia ja se on yleinen keuhkokuumeen aiheuttaja. Lukuisista sen aiheuttamista sairauksista aiheutuu runsaasti työ- ja koulupoissaoloja ja se leviää erityisesti influenssakausien aikana herkästi. Suomessa pneumokokki-infektion hoitoon käytetään yleisesti antibiootteja, mikä edesauttaa antibioottiresistenttien bakteerikantojen syntyä. Antibiooteilla hoidettavia bakteeritartuntoja tulisi tästä syystä pyrkiä vähentämään niin globaalisti kuin Suomessakin ja yksi mahdollinen keino tähän löytyä fenolien antimikrobisesta tehosta. (THL 2012) (Pfizer Oy 2016)

Työn tavoitteena on kirjallisuuden avulla selvittää fenolihdisteiden potentiaali ehkäistä mikrobien leviämistä pintojen välityksellä. Työssä käsitellään yleisimpiä luonnossa olevia fenolihdisteitä ja ihmisiä sairastuttavia mikrobeita eli patogeenejä, jotka tarttuvat erilaisten pintojen välityksellä. Fenolihdisteistä esitellään tarkemmin yleisimpiä patogeenejä vastustavia yhdisteitä ja käsitellään fenolihdisteiden hajoamiseen liittyviä tekijöitä. Fenolihdisteiden hajoaminen muodostaa ongelman niiden käytön kannalta ja tähän esitetään ratkaisuna mikrokapselointitekniikka, josta esitetään muutamia teknisiä sovelluksia stabiilisuuden parantamiseksi.

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Tässä kandidaatintyössä materiaaleina on käytetty eri tietokannoista löytyviä tieteellisiä artikkeleita ja julkaisuja sekä kirjallisuutta. Fenoleihin ja tekniisiin sovelluksiin on pääasiassa käytetty tieteellisiä artikkeleita ja mikrobeja käsitelty kirjallisuuden avulla.

Tieteellisistä artikkeleista on pyritty etsimään tutkimustietoa erityisesti fenolien antimikrobisista ominaisuuksista. Fenolien stabiilisuuteen vaikuttavat tekijät ovat olleet toinen keskeinen asia mihin on pyritty etsimään luotettavaa tutkimustietoa.

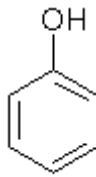
Käytetyt tietokannat ja hakusanat on esitettyinä taulukossa I. Tietokantojen lisäksi tietoa on etsitty myös järjestöjen kuten Terveyden ja hyvinvoinninlaitoksen kotisivuilta. Osa lähteistä on ollut myös suomenkielisiä.

Taulukko I Käytetyt tietokannat ja hakusanat.

Tietokannat	Käytetyt hakusanat
SCOPUS	Phenolic compounds, Quorum sensing, Quorum sensing inhibition, Natural, Phenols, Microbes, Pathogens, Antimicrobial activity, Bacteria, Viruses
ScienceDirect	
Web of Science	
Terveyskirjasto	

3 FENOLIYHDISTEET

Fenoliyhdisteet ovat aromaattisia yhdisteitä. Niiden kemialliseen rakenteeseen kuuluu bentseenirengas, johon on kiinnittyneenä hydroksi- eli alkoholiryhmä (kuva 1). Rakenteensa puolesta fenoliyhdisteet voidaan jakaa useaan eri ryhmään, joista yleisimpiä ovat flavonoidit, lignaanit ja fenolihapot. Fenoliyhdisteet muodostuvat suurimmaksi osaksi kasveissa, mutta niitä esiintyy myös eläimissä ja mikrobeissa. (Hyvärinen 2001, 9)

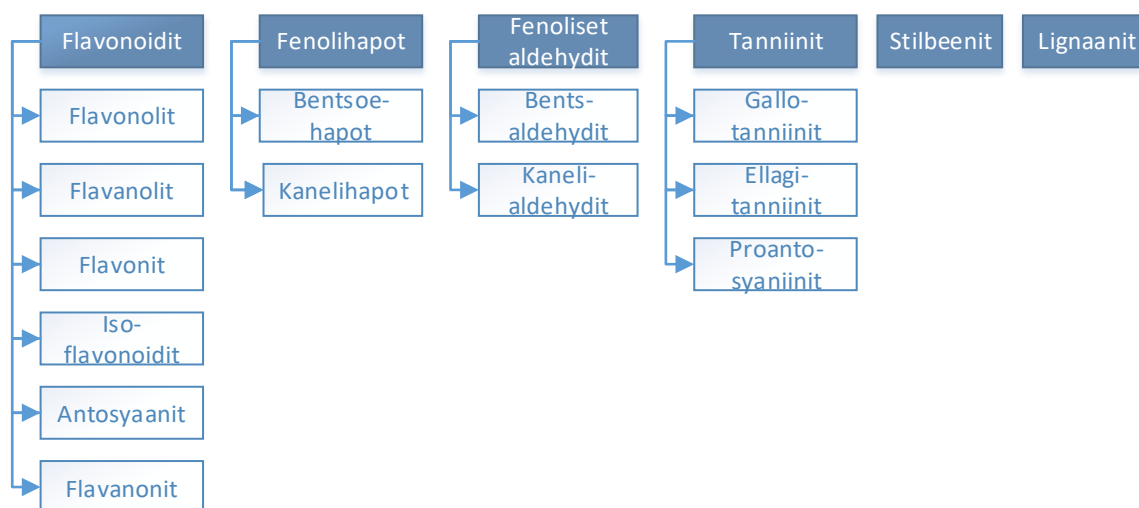


Kuva 1. Fenolin rakennekaava eli bentseenirengas, johon kiinnittyneenä alkoholiryhmä –OH. (Työterveyslaitos)

Kemiallisilta ominaisuuksiltaan fenolit ovat happamia, reaktiivisia ja osa niistä on vesiliukoisia. Fenolien reaktiivisuus aiheutuu hydroksyyliiryhmän heikosti happamasta protonista, joka irtoaa helposti johtaen fenoksidin muodostumiseen. Fenolit kykenevät myös sitomaan metalleja itseensä ja ne hapettuvat myös helposti luonnossa esiintyvien entsyymien avulla. (Hyvärinen 2001, 9)

3.1 Luonnossa esiintyvät fenolit

Luonnossa esiintyvistä fenoleista suurin osa löytyy kasvikunnasta. Erityisesti niitä on marjoissa, hedelmissä ja kasveissa (Mattila & Törrönen, 2006). Kaikissa kasveissa on fenoliyhdisteitä ja niitä sijaitsee pääosin kasvien varsiosassa luoden puumaisen rakenteen varsiosaan sekä kasvien pintasolukoissa suojaamassa kasveja muun muassa liialliselta UV-säteilyltä, kasvinsyöjiltä, hyönteisiltä ja taudinaiheuttajilta (Hyvärinen 2001, 14). Fenoliyhdisteiden muodostumiseen luonnossa vaikuttavat valonmäärä, lämpötila ja pH eli kasvupaikkaan liittyvät tekijät. Muutokset edellä mainituissa olosuhteissa heikentävät fenoliyhdisteiden stabiilisuutta fenolityypistä riippuen. Fenoliyhdisteitä esiintyy luonnossa tuhansia erilaisia ja ne on luokiteltu kemiallisten rakenteiden mukaan pääryhmiin ja alaryhmiin. Luonnonfenoliyhdisteiden pääryhmät ja alaryhmät ovat esitettyinä kuvassa 2. (Hyvärinen 2001, 23)



Kuva 2. Luonnossa esiintyvien fenoliyhdisteiden (pääryhmät tummissa) laatikoissa ja niiden alaryhmät (vaaleissa laatikoissa). (Puupponen-Pimiä et al., 2004, muokattu)

3.2 Luonnossa esiintyvien fenolien pääryhmät

Tässä kappaleessa käydään läpi luonnossa esiintyvien fenoliyhdisteiden kemiallisia rakenteita ja pääryhmiä tarkemmin. Samalla lukijalle avataan fenolien kemiaan liittyvää keskeistä termistöä ja sanastoa. Lisäksi käydään läpi eri fenolityyppien kemialliset rakenteet.

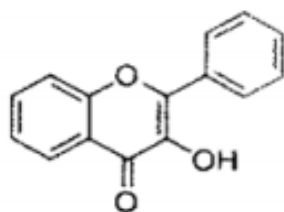
3.2.1 Flavonoidit

Flavonoidit antavat kasveille niille ominaisen värin ja maun sekä toimivat antioksidanteina. Lisäksi ne suojaavat kasveja liialta UV-säteilyltä ja karvaan makunsa ansiosta myös eläimiltä ja tuholaisilta. Flavonoideilla on myös havaittu olevan antibioottisia vaikutuksia ja ne suojaavat täten kasveja bakteereilta, viruksilta ja sieniltä (Hertog & Hollman 1996). Flavonoidit ovat myös antioksidanttisia yhdisteitä ja antioksidanttisuuteen vaikuttaa niiden rakenteessa olevat hydroksiryhmät eli mitä korkeampi hydroksylaatioaste, sitä korkeampi antioksidanttisuus yhdisteillä on. Vastaavasti flavonoidien rakenteessa olevat sokeriryhmät heikentävät antioksidanttisia vaikutuksia. (Hyvärinen 2001, 47)

Flavonoideihin kuuluu suuri joukko erilaisia polyfenoleita. Ne voidaan jakaa kuuteen pääryhmään flavonolit, flavanolit, flavonit, isoflavonit, antosyaanit ja flavanonit, joiden kemialliset perusrakenteet ovat esitettyinä kuvissa 3-8. Kuvissa 3-8 on esitettyinä vain jokaiselle pääryhmälle ominaiset kemialliset rakenteet, mutta niiden sisällä on paljon vaihtelua muun muassa kaksoissidosten paikan

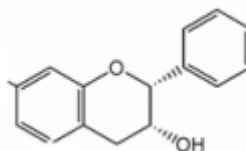
ja hydroksi-ryhmän kiinnittymiskohdan suhteen. Flavonoidit esiintyvät myös sulfaattisina ja metyloituneina yhdisteinä eli niihin voi olla liittyneinä rikki- tai metyyliiryhmiä. Lisäksi flavonoidit voivat muodostaa komplekseja oligosakkaridien, lipidien, amiinien, karboksyylihappojen ja orgaanisten happojen kanssa. Tyypillisesti flavonoidit esiintyvät luonnossa vesiliukoisina glykosideinä eli vähintään yhteen hydroksiryhmään on kiinnittynyt sokeri kuten glukoosi, galaktoosi, ramnoosi tai ksyloosi (Hyvärinen 2001, 10). Flavonoidiyhdisteitä tunnetaan noin 8000 erilaista. (de Lourdes Reis Giada 2013, 90,91)

Flavonolit ovat biologisesti aktiivisia molekyyliä ja niillä on useita vaikutuksia, joista tunnetuin on voimakas antioksidanttisuus. Antioksidanttisuudella tarkoitetaan molekyylien kykyä poistaa soluista tehokkaasti happiradikaaleja sitomalla ne itseensä. (Saint-Cricq de Gaulejac et al. 1999) Flavonolien rakenteelle (kuva 3.) on tyypillistä keskimmäiseen renkaaseen kiinnittynyt hydroksiryhmä (Hyvärinen 2001, 11).



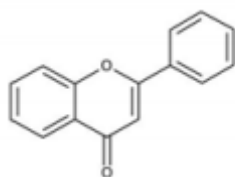
Kuva 3. Flavonoleilla on kuvan mukainen kemiallinen rakenne, jossa keskimmäisessä renkaassa on kaksoissidos hiilten välillä ja siihen kiinnittynyt hydroksiryhmä. (de Lourdes Reis Giada 2013, 91)

Flavanoleille (kuva 3) ominaista on keskimmäiseen renkaaseen kiinnittynyt hydroksiryhmä kuten flavonoleilla (Hyvärinen 2001, 11). Flavanolien ja flavonolien rakenteelliset erot ovat niiden keskimmäisessä renkaassa, missä flavanoleilla ei ole kaksoissidoksia ja siksi ne saavat huomattavasti enemmän variaatioita stereokemiallisen rakenteensa suhteen. Lisäksi flavanoleissa ei ole keskimmäiseen renkaaseen kaksoissidoksella sitoutunutta happiatomia.



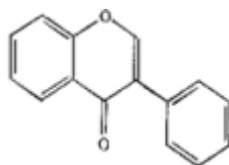
Kuva 4. Flavanoleilla on kuvan mukainen kemiallinen rakenne, jossa keskimmäisessä renkaassa ei ole kaksoissidosta hiilien välillä mihin hydroksiryhmä kiinnittyy. (de Lourdes Reis Giada 2013, 91)

Flavonien keskimmaiseen rengasrakenteeseen ei kiinnity hydroksiryhmää, mikä on niille tyypillinen ominaispiirre ja niissä hydroksiryhmiä sijaitsee vain reunimmaisissa rengasrakenteissa (kuva 5). (Hyvärinen 2001, 11).



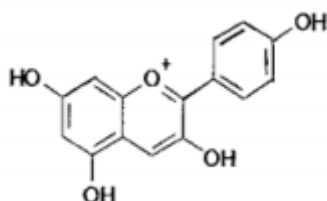
Kuva 5. Flavoneilla on kuvan mukainen kemiallinen rakenne, jossa keskimmaiseen renkaaseen ei ole kiinnittynyt hydroksiryhmää. (de Lourdes Reis Giada 2013, 91)

Isoflavonoidit eroavat muista flavonoideista rakenteensa perusteella, siten että niiden oikeanpuolimmaisoin rengas on kiinnittynyt eri kohtaan kuin muilla flavonoideilla (kuva 6). Rengasrakenne on siis kiinnittynyt yhden alemmaan hiileen keskimmaisessä renkaassa. (Hyvärinen 2001, 11)



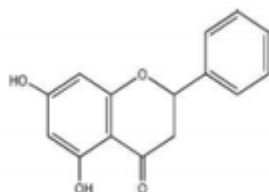
Kuva 6. Isoflavonoideille on kuvan mukainen kemiallinen rakenne, jossa niiden oikeanpuolimmaisoin rengasrakenne on kiinnittynyt yhtä hiiltä alemmas keskimmaiseen hiileen kuin muilla flavonoideilla. (de Lourdes Reis Giada 2013, 91)

Flavonoidien suurin yksittäinen ryhmä ovat antosyaanit, jotka absorboivat hyvin näkyvää valoa niissä esiintyvien vahvojen pigmenttien avulla. Luonnossa ne esiintyvät kasvisolujen solunesteessä ja antavat muun muassa marjoille joko oranssin, sinisen tai punaisen värin. (Puupponen-Pimiä et al. 2004, 2)



Kuva 7. Antosyaaneille on kuvan mukainen kemiallinen rakenne, jossa on kaksi kaksoissidosta keskimmaisessä renkaassa, mistä seuraa positiivinen osittaisvaraus keskimmaiseen renkaaseen kuuluvalla happiatomille. (de Lourdes Reis Giada 2013, 91)

Flavanoneille ominainen rakenteellinen seikka on, ettei niiden keskimmäiseen rengasrakenteeseen ole sitoutunut hydroksiryhmää (kuva 8). Vastaava flavonoidien erikoispiirre on siis myös flavoneilla. Flavoneista ne eroavat puuttuvan kaksoissidoksen ansiosta keskimmäisen renkaan hiilien välillä. Flavanonit ovat värittömiä yhdisteitä. (Hyvärinen 2001, 13)

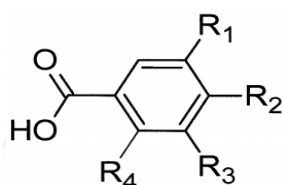


Kuva 8. Flavanoneille on kuvan mukainen kemiallinen rakenne, jossa keskimmäisessä rengasrakenteessa ei ole kaksoissidoksia. (de Lourdes Reis Giada 2013, 91)

3.2.2 Fenoliset hapot

Fenoliset hapot voidaan jakaa kahteen pääryhmään, bentsoehappoihin ja kanelihappoihin, sekä molempien johdannaisiin. Näille molekyyileille on tyypillistä, että niihin kuuluu bentseenirengas, johon on liittyneenä karboksyyliiryhmä ja yksi tai useampi hydroksi- ja/tai metoksyyliryhmä. (de Lourdes Reis Giada 2013, 94)

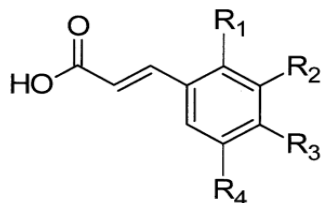
Bentsoehapot koostuvat seitsemästä hiiliatomista, joista kuusi muodostaa bentseenirenkaan ja yksi kuuluu karboksyylihapporyhmälle, joka on kiinnittyneenä renkaaseen (kuva 9). Ne ovat yksinkertaisimpia luonnosta löytyviä fenolihappoja ja niitä on vihanneksissa kanelihappoja enemmän. Yleisimmät bentsoehapot ovat vanilliinihappo, syringiinihappo, gentisiinihappo, salisyylihappo ja gallushappo. (de Lourdes Reis Giada 2013, 94)



Kuva 9. Bentsoehappoilla on kuvan mukainen perusrakenne, missä R-kirjaimilla on esitetty erilaisia kemiallisia sivuryhmiä. Kemialliset sivuryhmät voivat olla esimerkiksi hydroksi- tai aldehydyryhmiä. (de Lourdes Reis Giada 2013, 94)

Kanelihapot muodostuvat yhdeksästä hiiliatomista, mistä kuusi muodostaa bentseenirenkaan ja kolme renkaaseen kiinnittyneen propeenihapporyhmän. Kanelihapot esiintyvät vain harvoin vapaina

luonnossa ja ovat yleensä esterimuodossa kiinnittyneinä muihin happoihin. Yleisimmät kanelihapot ovat *p*-kumariini-, ferula-, kahvi- ja sinappihappo.



Kuva 10. Kanelihapoilla on kuvan mukainen perusrakenne, missä R-kirjaimilla on esitetty erilaisia kemiallisia ryhmiä. Kemialliset ryhmät voivat olla esimerkiksi hydroksi- tai aldehydiryhmä. (de Lourdes Reis Giada 2013, 95)

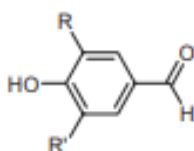
3.2.3 Fenoliset aldehydit

Fenoliset aldehydit ovat kemialliselta rakenteelta samanlaisia kuin fenoliset hapot, tosin niissä rengasrakenteeseen on kiinnittynyt aldehydiryhmä happoryhmän sijaan. Aldehydiryhmällä tarkoitetaan hiiliatomia, jolla on kaksoissidos happeen ja yksinkertainen sidos vetyatomiin. Fenoliset aldehydit voidaan jakaa kahteen pääryhmään bentsaldehydeihin (kuva 11) ja kanelialdehydeihin (kuva 12). (Figueiredo et al. 2007, 106)

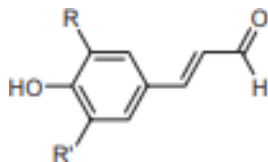
Bentsaldehydejä on useita erilaisia, johtuen sen rengasrakenteeseen kiinnittyvistä kemiallisista ryhmistä kuten esimerkiksi hydroksi- tai metoksiyhmistä sekä niiden sijainnista rengasrakenteessa. Metoksiyhmällä tarkoitetaan hiiltä, jolla on kolme sidosta vetyatomeihin ja yksi sidos happiatomiin, minkä avulla se kiinnittyy tässä tapauksessa bentseenirenkaaseen. Bentsaldehydeillä on havaittu antimikrobisia vaikutuksia eli ne tuhoavat ja rajoittavat mikrobin kasvua. Friedman et al. (2006, 1814, 1815)

Friedman et al. (2006, 1814, 1815) tekemässä tutkimuksessa havaittiin bentsaldehydien antimikrobisuuteen vaikuttavan niiden bentseenirenkaaseen kiinnittyneiden hydroksiryhmien lukumäärä sekä sijainti. Tutkimuksen tulosten perusteella havaittiin rengasrakenteeseen kiinnittyneiden hydroksiryhmien lukumäärän kasvaessa antimikrobisten ominaisuuksien lisääntyvän. Lisäksi merkittävämpänä tekijänä oli hydroksiryhmien sijainti rengasrakenteessa antimikrobisuutta tutkittaessa. Parhaat antimikrobiset vaikutukset ilmenivät yhdisteillä, joiden toiseen hiileen aldehydiryhmästä oikealle luettuna oli kiinnittynyt hydroksiryhmä kun kyseessä oli yhden hydroksiryhmän yhdiste. Kahden hydroksiryhmän yhdisteillä tehokkain oli yhdiste, missä

hydroksiryhmät olivat kiinnittyneet edellä mainittuun toiseen hiileen sekä viidenteen hiileen eli vastakkaisiin kulmiin rengasrakennetta. Kuitenkin lähes yhtä tehokas oli yhdiste, missä hydroksiryhmät olivat toiseen ja kolmanteen hiileen kiinnittyneinä. Tutkimuksessa kaikkein tehokkain yhdiste mikrobeja vastaan oli bentsaldehydi, missä oli kolme hydroksiryhmää kiinnittyneenä toiseen, neljänteen ja kuudenteen hiilen rengasrakenteessa eli aldehydiryhmän molemmin puolin ja sitä vastapäätä. Tutkimuksessa antimikrobisuutta mitattiin neljää erilaista bakteeria vastaan, mitkä olivat kampylobakteereihin kuuluva *C. jejuni*, kolibakteereihin kuuluva *E. coli*, listeriabakteereihin kuuluva *L. monocytogenes* ja salmonellabakteereihin kuuluva *S. enterica*. (Friedman et al. 2003, 1811-1820)



Kuva 11. Fenolisten bentsaldehydien perusrakennekaava on kuvan mukainen, jossa rengasrakenteeseen on kiinnittynyt aldehydiryhmä sekä hydroksiryhmä. R-kirjaimilla on esitetty mahdolliset renkaaseen kiinnityneet kemialliset ryhmät kuten hydroksi- tai metoksyryhmä. (Figueiredo et al. 2007, 106)



Kuva 12. Fenolisten kanelialdehydien perusrakennekaava on kuvan mukainen, jossa rengasrakenteeseen on kiinnittynyt propeenialdehydiryhmä sekä hydroksiryhmä. R-kirjaimilla on esitetty mahdolliset renkaaseen kiinnityneet kemialliset ryhmät kuten hydroksi- tai metoksyryhmä. (Figueiredo et al. 2007, 106)

3.2.4 Lignaanit

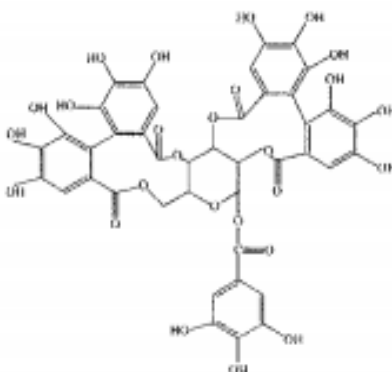
Lignaaniin perusrakenteena on fenyylipropani-yksikkö eli bentseenirenkaaseen kiinnittynyt kolmen hiilen hiilivety. Ne voidaan karkeasti jakaa lignaaneihin, neolignaaneihin ja hybridilignaaneihin. Tavalliset lignaanit ja neolignaanit koostuvat kahdesta fenyylipropani-yksiköstä, joihin on kiinnittynyt erilaisia kemiallisia ryhmiä kuten hydroksiryhmiä. Neolignaanit eroavat tavallisista

lignaaneista erilaisen sidosrakenteensa vuoksi. Hybridilignaaniin rakenteeseen on liittynyt jokin toinen fenoliryhmä kuten esimerkiksi flavonoidi, jolloin se nimetään flavonolignaaniksi. Lignaanit muodostuvat luonnossa fenyylipropanoidi monomeereistä. (Kiyama 2016, 186)

3.2.5 Tanniinit

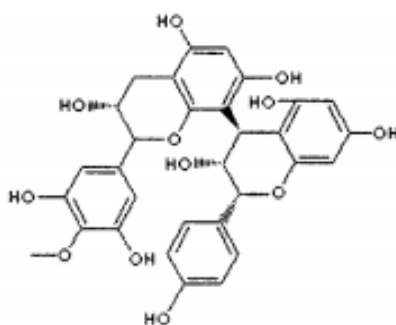
Tanniinit eroavat muista fenoliyhdisteistä suuren molekyyli­massan takia ja niiden hydroksylaatioaste on korkea eli niiden rakenteeseen on liittynyt useita hydroksiryhmiä. Tanniinit voivat muodostaa liukenemattomia molekyylikomplekseja hiilihydraattien ja proteiinien kanssa. Tanniinien taipumus kompleksien muodostumiseen johtuu niiden kemiallisesta rakenteesta. Kasveissa esiintyvät tanniinit voidaan jakaa hydrolysoituihin ja kondensoituneisiin tanniineihin. Kondensoituneet tanniinit koostuvat kemiallisesti erilaisten katekiinien oligomeereistä. Hydrolysoituvat tanniinit koostuvat gallushaposta ja sen dimeerisistä kondensaattiotuotteista. Kondensoituneita tanniineja kutsutaan yleisesti proantosyanideiksi ja hydrolysoituvia joko gallotanniineiksi tai ellagitanniineiksi. (Hyvärinen 2001, 12) Tanniinit ovat antimikrobisia yhdisteitä ja erityisen tehokkaita antimikrobisilta ominaisuuksiltaan ovat ellagitanniinit (Puupponen-Pimiä et al. 2004, 998).

Gallotanniinit ja ellagitanniinit hydrolysoituvat helposti hapoilla, emäksillä tai entsyymeillä. Gallotanniinit tuottavat hydrolyysin jälkeen glukoosia ja gallushappoa. Ellagitanniinit sisältävät yhtä tai useampaa fenolia, jotka ovat liittyneet glukoosiin kaksoisesterinä gallushapon lisäksi. Ne voivat myös muodostaa molekyyli­painoltaan suuria polymeerejä kondensoitumisreaktioiden kautta. (de Lourdes Reis Giada 2013, 91).



Kuva 13. Ellagitanniini kasuariktiinin kemiallinen rakennekaava on kuvan mukainen. (de Lourdes Reis Giada 2013, 93)

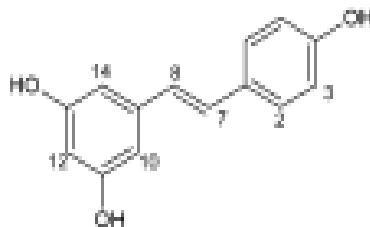
Proantosyanidit ovat polymeerisiä flavonoideja, jotka muodostuvat yhteen liittyneistä antosyaaneista (kuva 14) (de Lourdes Reis Giada 2013, 93). Proantosyanidit ovat värittömiä oligomeerejä ja polymeerejä, joita esiintyy hedelmissä, marjoissa, pähkinöissä ja siemenissä. Polymeereillä tarkoitetaan molekyyliä, jotka koostuvat useasta pienestä samanlaisesta yhteen polymeroituneesta monomeerista. Oligomeerit eroavat polymeereistä siten, että ne voivat koostua useasta erilaisesta monomeeristä. Proantosyanidien polymeroitumisaste vaikuttaa yhdisteiden kemialliseen aktiivisuuteen. (Jirikova et al. 2013, 12577)



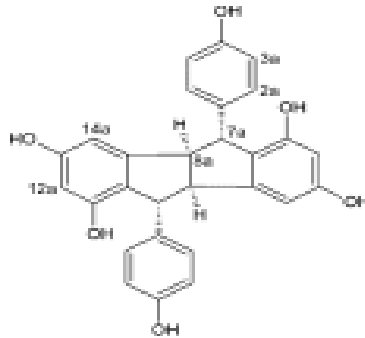
Kuva 14. Proantosyanidien kemiallinen perusrakenne on kuvan mukainen. (de Lourdes Reis Giada 2013, 93)

3.2.6 Stilbeenit

Stilbeenit muodostuvat tavallisesti difenyylieteenimolekyylin ympärille. Difenyylieteenin rakennekaava on sama kuin kuvan 15 molekyyllillä, lukuun ottamatta siltä puuttuvaa kolmea OH-ryhmää. Osa stilbeeneistä muodostuu stilbeeni-monomeereista kuten kuvan 15 resveratrolin. Kahdesta toisiinsa liittyneestä resveratrolin monomeeristä muodostuu dimeeri pallidoli, joka on esitettyä kuvassa 16. Stilbeenejä tavataan luonnossa erilaisina *cis-trans*-isomeereina. (Bias 2017,4952)



Kuva 15. Stilbeeni resveratrolin *trans*-isomeerin rakennekaava on kuvan mukainen. (Bias 2017,4954)



Kuva 16. Pallidolin rakennekaava, jossa kaksi on resveratrolimolekyyliä yhdistyneenä. (Bias 2017 ,4954)

4 MIKROBIT

Tässä kappaleessa käsitellään mikrobeja eli mikro-organismeja ja niihin liittyviä keskeisiä termejä. Mikrobit käsitellään pääpiirteittäin, jotta lukija saa peruskäsityksen aiheesta ja ymmärtää työn kannalta keskeiset termit. Työn lopputuloksen kannalta ei ole tarpeellista avata kaikkia mikrobeihin liittyviä asioita laajasti.

Mikrobit ovat yksisoluisia mikroskooppisen pieniä organismeja, jotka koostuvat useasta eri eliöluokasta ja niitä esiintyy eritoten maaperässä, vesistöissä, ihmisissä, eläimissä ja kasveissa. Niihin luetaan mukaan myös virukset, vaikka viruksilta puuttuu mikrobeille ominainen solurakenne. Solurakenteen määritelmänä on, että solulla on sitä ympäröivä kuori eli solukalvo, minkä sisällä on solulle ominaiset soluelimet. Solukalvo ei kuitenkaan eristä solua ympäröivästä maailmasta, koska se on puoliläpäisevä. Solut voivat kommunikoida, liikkua ja vaihtaa aineita ympäristönsä kanssa eli ne ovat jatkuvassa muutoksessa. (Madigan et al. 2012, 30, 31)

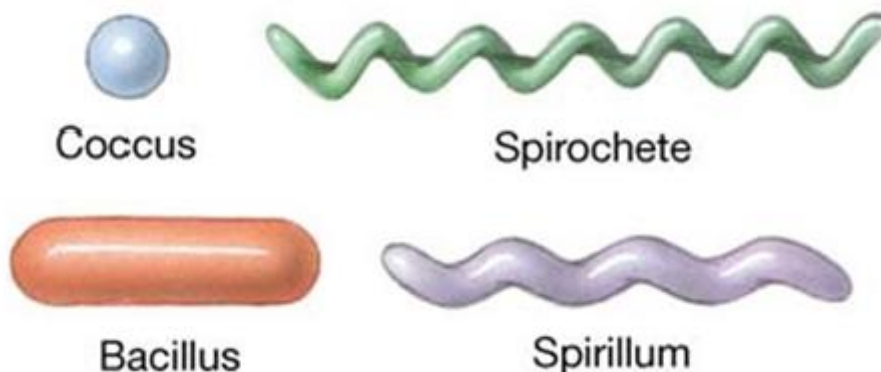
Solut jaetaan esi- ja aitotumallisiin soluihin niiden rakenteen mukaan. Aitotumallisilla soluilla on perintöainesta ympäröivä tumakalvo ja ne ovat kooltaan esitumallisia suurempia sekä rakenteeltaan monimutkaisempia (Madigan et al. 2012, 60, 61). Esitumallisia soluja ovat lähinnä bakteerit ja arkeonit ja aitotumallisia ovat eläin-, kasvi-, sienisolut ja alkueliöt. Esitumalliset solut eroavat huomattavasti kasvi- ja eläinsoluista, koska ne kykenevät elämään omana yksikkönään eli ne eivät ole riippuvaisia muista soluista. Kasvi- ja eläinsolut esiintyvät vain osina monisoluisia rakenteita kuten eläinten elimien tai kasvien osina. (Madigan et al. 2012, 30,31)

4.1 Mikrobiluokat

Tässä kappaleessa käsitellään mikrobiluokista bakteereita ja viruksia, jotka ovat tämän työn kannalta keskeisimmät mikrobiluokat. Muut mikrobiluokat käsitellään kevyemmin.

4.1.1 Bakteerit

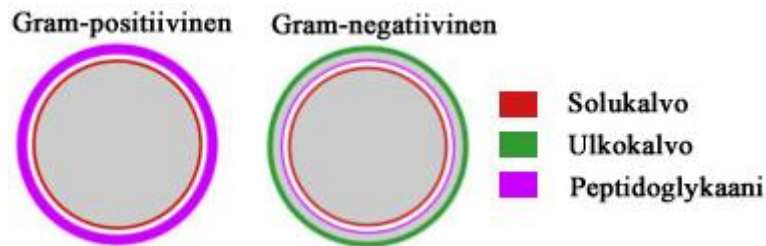
Bakteerit ovat esitumallisia soluja ja usein aiotumallisia soluja pienempiä. Tavallisesti bakteerit ovat noin kaksi mikrometriä ja sitä pienempiä läpimitaltaan. On kuitenkin olemassa myös suurempia bakteereja. Bakteereja voidaan jaotella luokkiin usealla eri tavalla, joista yleisin on bakteerien ulkomuotoon perustuva jaottelu. Ulkomuotonsa perusteella bakteerit jaotellaan kokkeihin, basilleihin, sprilleihin, spirokeetoihin sekä useaan muuhun kategoriaan (kuva 17). Kokit ovat muodoltaan pyöreitä ja pallomaisia, basillit pitkulaisia ja suorita, sprillit pitkulaisia sekä kaareutuvia ja spirokeetat spiraalinmuotoisia. (Madigan et al. 2012, 76)



Kuva 17. Tavallisimmat bakteerit niiden latinan kielisillä nimillä esitettyinä: *coccus* eli kokkibakteerit, *spirochete* eli spirokeetat, *bacillus* eli basillit ja *spirillum* eli sprillit. (microbeonline.com 2013, muokattu)

Bakteereja voidaan jaotella myös gram-positiivisuuden tai -negatiivisuuden mukaan. Gram-positiivisuus tai -negatiivisuus määritetään värjäämällä bakteerit kristallivioletilla sekä jodiliuoksella, minkä jälkeen ne käsitellään alkoholilla, huuhdellaan vedellä ja käsitellään vielä safraniinilla sekä lopuksi huuhdellaan vedellä. Gram-positiiviset bakteerit ovat purppuran tai violetin sävyisiä ja gram-negatiiviset pinkin tai punaisen sävyisiä käsittelyjen jälkeen. Kyseinen reaktio selittyy bakteerien erilaisella soluseinän rakenteella. Gram-positiivisilla bakteereilla soluseinä sisältää paksun peptidoglykaanikerroksen eli mureenikerroksen, mikä koostuu sokereista ja aminohapoista. Gram-negatiivisilla bakteereilla soluseinässä on lisäksi lipidirakenteita. Jodiliuos muodostaa kristallivioletin kanssa kompleksimolekyylin, joka tunkeutuu soluihin värjäten ne. Alkoholikäsitelyn

seurauksena gram-negatiivisten solujen soluseinämästä liukenee lipidejä ja soluseinä rikkoutuu osittain. Sen seurauksena kristallivioletti-jodi kompleksimolekyylit tulevat niistä ulos huuhtelun yhteydessä ja bakteereista tulee värittömiä. Gram-positiivisilla bakteereilla sen sijaan alkoholikäsitteily kutistaa niiden mureenikerroksen rakenteita ja kompleksimolekyylit eivät mahdu enää niistä ulos, minkä seurauksena niihin jää kristallivioletin väri. Tämän jälkeen voidaan gram-negatiiviset bakteerit värjätä vielä punaisiksi safraniinilla. (Madigan et al. 2012, 54, 86)



Kuva 18. Pelkistetty kuva gram-positiivisten ja gram-negatiivisten bakteerien soluseinien rakenteista. (Solunetti 2006)

4.1.2 Virukset

Virukset ovat yksi mikrobien pääluokista. Ne ovat kooltaan aito- ja esitumallisia soluja huomattavasti pienempiä ja niiltä puuttuu monia soluille tyypillisiä ominaisuuksia. Pienimmät virukset voivat olla vain 10 nm mittaisia halkaisijaltaan, joten viruksien kokoluokka ilmaistaan tavallisesti nanometreinä. Yleisimpien bakteerien ja arkeonien kokoluokka on muutaman mikrometrin luokkaa. Eri virukset voivat myös vaihdella paljon kooltaan. (Madigan et al. 2012, 61)

Viruksien suurin ero muihin mikrobeihin on niiden solurakenteen puuttuminen eli ne eivät ole soluja. Viruksien perusrakenteeseen kuuluu nukleiinihappo DNA eli deoksiribonukleiinihappo tai RNA eli ribonukleiinihappo ja sitä ympäröivä proteiinikalvo eli kapsidi. Osalla viruksia on vielä yksi kalvo eli vaippa ja se koostuu lipidikerroksesta, johon on uppoutuneena proteiineja. Virukset infektoivat eli sairastuttavat kaikenlaisia mikrobisia soluja. Useat virukset aiheuttavat sairauksia infektoimissaan soluissa ja vaikuttavat myös muilla tavoin. Virukset voivat muokata infektoimiensa solujen genetiikkaa ja tällä tavoin aiheuttaa muutoksia solujen toimintaa, minkä seurauksena solujen toiminta voi heikentyä, mutta osassa tapauksissa jopa parantua. (Madigan et al. 2012, 61, 266, 267)

Yleisen tietämyksen mukaan uskottiin pitkään, etteivät virukset kommunikoi ympäristönsä kanssa (Madigan et al. 2012, 61). Viime aikoina on löydetty bakteriofagiviruksia, jotka loisivat bakteereissa

ja tuhoavat niitä. Bakteriofagivirukset laskevan populaationsa kokoa, kun isäntäbakteerien lukumäärä on laskenut riittävän alas, etteivät ne tuhoa koko bakteeripopulaatiota ja samalla kaikkia isäntäbakteereitaan eli ne kommunikoivat ympäristönsä kanssa. (Erez et al. 2017)

4.1.3 Muut mikrobit

Bakteerien ja virusten lisäksi on myös useita muita mikrobeja, kuten arkeonit, sienet, sekä osa levistä ja alkueliöistä. Sienistä, levistä ja alkueliöistä mikrobeiksi luokitellaan yksisoluisina esiintyvät organismit.

Arkeonit ovat tumattomia yksisoluisia bakteerien kaltaisia mikrobeja. Ne voidaan jakaa kahteen pääryhmään, jotka ovat creanarchaeotat ja euryarchaeotat. Creanarchaeotat ovat valtaosin vain erityisen kuumissa oloissa eläviä mikrobeja eli ne luokitellaan täten hypertermofiileiksi. Euryarchaeotat jaotellaan kolmeen eri ryhmään: metanogeeneiksi, erittäin halofiiliseksi ja happoja kestäviksi termofiileiksi. (Madigan et al. 2012, 609, 610) Arkeonien ei ole havaittu aiheuttavan ihmisille sairauksia, joten niitä pidetään yleisesti ihmisille vaarattomina (Aminov 2013, 3).

Sienisoluista mikrobeiksi luokitellaan hiivasolut, koska ne ovat yksisoluisia. Ne kuuluvat aitotumallisiin soluihin rakenteensa vuoksi ja muodostava rihmastoja ja itiöemiä. Osa hiivasoluista aiheuttaa ihmisille sairauksia ja tauteja. Levät ovat aitotumallisia soluja sienisolujen tavoin, mutta ne esiintyvät pääasiassa vedessä. (Madigan et al. 2012, 638, 639) Kaikkia leviä ei luokitella mikrobeihin, koska osa niistä koostuu useista eri soluista. Hiivasolujen tavoin osa levistä aiheuttaa sairauksia ja tauteja ihmisille (Tartar et al. 2002, 277).

Alkueliöt eli protistit ovat kirjava joukko erilaisia mikrobeja, joihin luokitellaan muun muassa erilaisia leviä, ameeboja ja sienisoluja. Ominaisuuksiensa tai rakenteidensa puolesta niitä ei voida luokitella edellä mainittuihin mikrobiryhmiin suoraan, joten ne muodostavat oman alkueliöryhmänsä. Alkueliöistä osa aiheuttaa ihmisille sairauksia. (Madigan et al. 2012, 638, 639)

4.2 Yleiset taudinaiheuttajat tasopinnoilla

Taudinaiheuttajilla eli patogeeneillä tarkoitetaan ihmisille erilaisia infektiosairauksia aiheuttavia mikrobeja, kuten bakteereita tai viruksia (Madigan et al. 2012, 841). Seuraavaksi käsitellään yleisimpiä tasopinnoilla esiintyviä ja niiden välityksellä leviäviä patogeenejä.

4.2.1 Pneumokokki

Pneumokokki on kokkibakteereihin kuuluva gram-positiivinen streptokokkisuvun bakteeri latinan kieliseltä nimeltään *streptococcus pneumoniae*. Pneumokokit esiintyvät tavallisesti diplokokkeina eli kahtena toisiinsa kiinnittyneenä kokkibakteerina, mutta ne voivat esiintyä lyhyissä useamman kokin ketjuissa. Pneumokokkeja on tunnistettu 45 erilaista serotyyppiä eli alaryhmää, joten ei voida puhua yksittäisestä bakteerista vaan useista hieman erilaisista bakteereista, joilla on sama kantamuoto. Serotyypit eroavat keskenään muun muassa rakenteidensa puolesta. Pneumokokille parhaat kasvuolosuhteet takaavat hapeton ja hiilidioksidirikas ympäristö. Pneumokokki leviää tyypillisesti pisaratartuntana aivastaessa ja se voi tarttua myös kosketuksen välityksellä. (Ampofo & Byington 2018, 737) Yleisimmät sen levittämät taudit ovat kuumeiset yleisinfektiot ja korvatulehdukset (THL 2012).

4.2.2 A-ryhmän streptokokki

A-ryhmän streptokokki on gram-positiivinen kokkimuotoinen bakteeri, joka kasvaa tyypillisesti ketjumuodostelmassa ja on latinan kieliseltä nimeltään *streptococcus pyogenes*. A-ryhmän streptokokit voidaan jakaa vielä yli sataan eri serotyyppiin. Se on yksi yleisimmistä lapsia ja nuoria infektoivista patogeenisista bakteereista ja sen aiheuttamien tautien kirjo on laaja. Yleisimmät a-ryhmän streptokokin aiheuttamat oireet ovat nielutulehdus ja erilaiset ihotulehdukset. (Nizet & Arnold 2018, 715) A-ryhmän streptokokki tunkeutuu ihmiseen tyypillisesti hengitysteiden limakalvojen kautta esimerkiksi aivastaessa tai kosketustartuntana käsien välityksellä. (THL 2012).

4.2.3 Stafylokokki

Stafylokokit ovat gram-positiivisia bakteereja, jotka kestävät happamia ja suolaisia olosuhteita sekä suuria lämpötilan vaihteluita. Lisäksi ne voivat selvitä esimerkiksi pölyssä tai vaatteissa muutamia päiviä elinvoimaisina. Stafylokokkeista puhuttaessa tarkoitetaan yleensä sen *staphylococcus aureus* serotyyppejä, mitkä ovat yleisimpiä taudinaiheuttajia stafylokokkeista. Stafylokokit esiintyvät yleensä

kokkibakteeriryppäissä toisin kuin esimerkiksi streptokokit, jotka kasvavat ketjumaisesti. (Daum 2018, 692)

Staphylococcus aureus bakteeria esiintyy terveilläkin ihmisillä, mutta se ei aiheuta määränsä tai vallitsevien elinolojen takia sairastumista ja osa ihmisistä kantaa sitä jatkuvasti. Yleisimmät sen aiheuttamat infektiot ovat erilaisia ihoinfektioita, jotka voivat olla erityisen vakavia etenkin päätyessään leikkauspotilaiden leikkaushaavoihin. Yleisin leviämistapa on kosketuksen avulla joko toisen ihmisen iholta tai erilaisten pintojen välityksellä. (THL 2012)

4.2.4 Escherichia coli

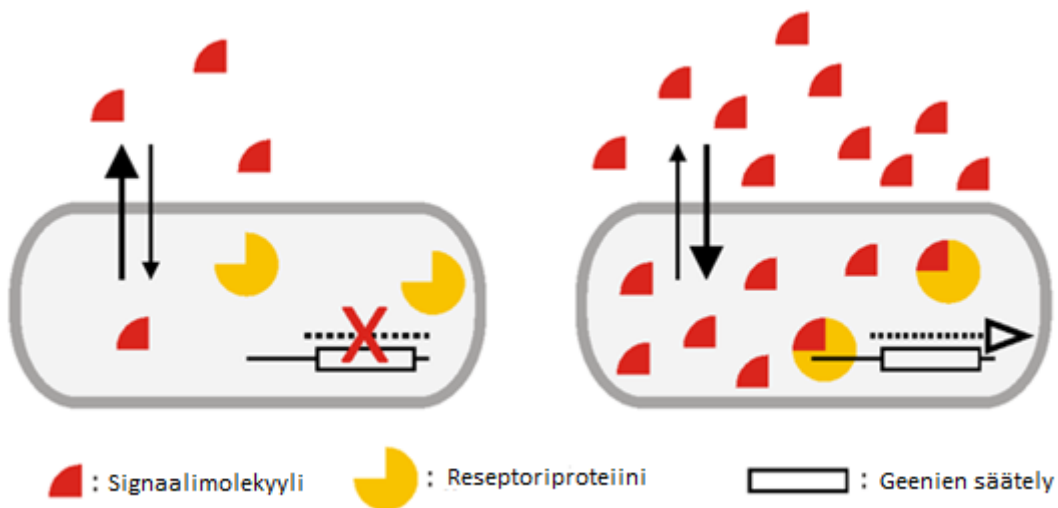
E. coli eli *escherichia coli* bakteeri on gram-negatiivinen basilli eli sauvanmuotoinen kolibakteeri. Sillä on arviolta 50000–100000 erilaista serotyyppiä. Patogeenisten serotyyppien määrä on kuitenkin huomattavasti pienempi ja niistä kaikkein yleisintä kutsutaan lyhenteellä EHEC, joka tulee enterohemorraginen *Escherichia coli* nimestä. (Rivas et al. 2015, 4)

EHEC tarttuu nisäkkäiden tai lintujen ulosteesta ja jo hyvin pieni määrä bakteereita saa aiheutettua taudin ihmiselle. Tartunnan saanut ihminen voi edelleen levittää käsissään bakteereja erilaisille pinnoille ja toisiin ihmisiin. Tavallisimmat oireet tartunnan saaneella ovat ripuli ja vatsakrampit. (THL 2012)

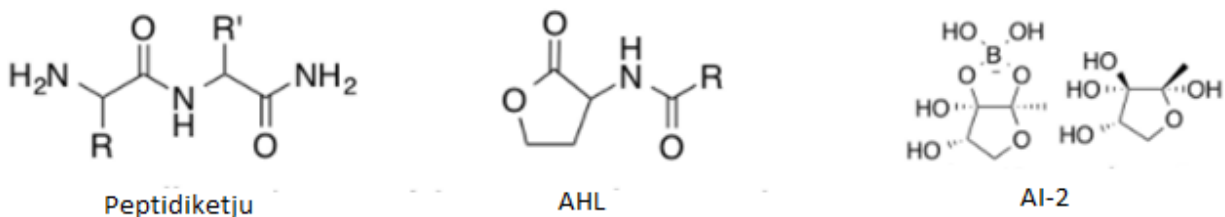
4.3 Mikrobien välinen viestintä

Osan mikrobeista on havaittu viestivän keskenään ja tätä viestintää kutsutaan sen englannin kielisellä nimellä quorum sensing:ksi eli QS:ksi. QS on erityisesti gram-negatiivisilla bakteereilla havaittu ilmiö, mutta sitä esiintyy myös gram-positiivisilla bakteereilla. Se on mekanismi, joka säätelee mikrobien määrää sen hetkisessä mikrobipopulaatiossa. Patogeeniset bakteerit viestivät sen avulla esimerkiksi kannattaako niiden alkaa kasvattamaan bakteerien määrää tai vaihtoehtoisesti olla kasvattamatta sitä. Tämä johtuu pitkälti siitä, saako patogeeni aiheutettua taudin sen hetkisellä populaatiolla ja onko sillä käytössä sopivat olosuhteet populaation kasvua varten. (Madigan et al. 2012, 249)

QS:ssä keskeisessä asemassa ovat siinä käytettävät viestinviejämolekyylit eli signaalimolekyylit. Nämä molekyylit diffuntoituvat vapaasti soluseinän läpi joka puolelle mikrobia. Tämän seurauksena mikrobisolut saavat suuren määrän signaalimolekyyleja sisäänsä, jos niitä ympäröi paljon samaa signaalimolekyylejä käyttäviä mikrobeja. Solun sisällä signaalimolekyylit sitoutuvat aktivoivaan proteiiniin ja käynnistävät niissä proteiinisynteesin (Kuva 19). Proteiinisynteesin seurauksena solu alkaa tuottaa signaalimolekyylejä itse ja vapauttaa niitä ympäristöönsä eli signaalimolekyylit käynnistävät ketjureaktion. Eri mikrobiluokilla on erilaiset signaalimolekyylit, gram-negatiivisilla bakteereilla on esimerkiksi useita erilaisia signaalimolekyylejä. Yleisimmät signaalimolekyylit gram-negatiivisilla bakteereilla ovat *N-asyyli-homoseriini-laktonit* eli AHL:t ja *auto-induuserit* eli AI:t, joista yleisin on AI-2. Gram-positiivisilla bakteereilla signaalimolekyyleinä toimivat yleensä lyhyet peptidiketjut (Kuva 20). (Madigan et al. 2012, 249, 250) Gram-positiivisilla bakteereilla on usein monta erilaista signaalimolekyyleä, mitkä vaikuttavat niiden toimintaan ja AI-2 toimii myös osalla niistä yhtenä signaalimolekyylinä. (Kalia 2013).



Kuva 19. Signaalimolekyyliden toimintaperiaate kohdesolussa. Kun signaalimolekyyliden pitoisuus solun ulkopuolella on suurempi kuin solun sisällä, signaalimolekyylit diffuntoituvat solun sisään ja käynnistävät proteiinisynteesin eli geenien säätelyn. (Weigel 2016, muokattu)



Kuva 20. Signaalimolekyyliden kemialliset perusrakenteet: Gram-positiivisille mikrobeille tyypillinen peptidiketju, joka toimii signaalimolekyylinä. Gram-negatiivisille

ominainen AHL-signaalimolekyyli. Eri mikrobilajien välisessä viestinnässä keskeinen AI-2 signaalimolekyyli. (Ryan & Washburn, muokattu)

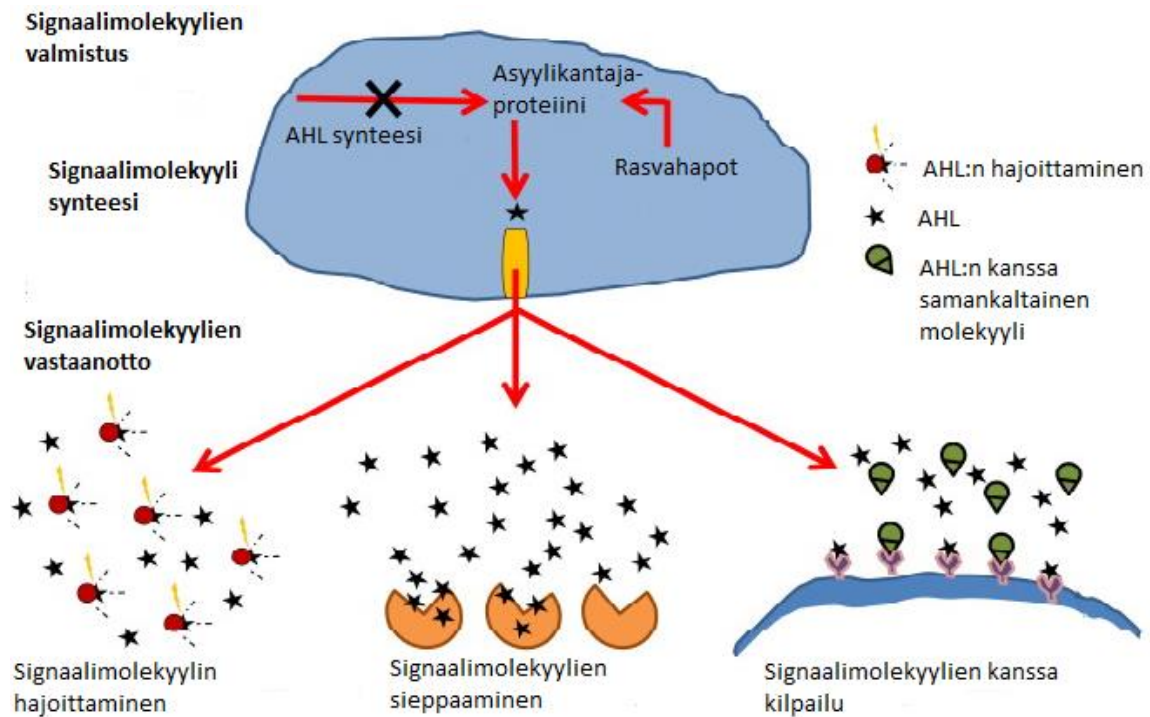
Edellä mainittujen signaalimolekyylien tuottamiseen pohjautuvien mekanismien lisäksi on olemassa myös mekanismi, jossa mikrobi reagoi muiden mikrobien tuottamiin signaalimolekyyliin, muttei itse tuota niitä. Signaalimolekyyliit voivat säädellä mikrobien toimintaa, vaikka ne eivät itse siis pystyisikään tuottamaan niitä. Tämä pätee esimerkiksi eräisiin hiivasieniin kuten *candida albicansiin*. (Kalia 2013)

Virusten välillä on havaittu myös QS-ilmiö. Erez *et al.* (2017) tutkimusryhmä havaitsi *bacillus* bakteerisuvun bakteriofagien viestivän keskenään. Bakteriofagit muokkasivat populaationsa kasvua isäntäsolujen määrän mukaan. Kun isäntäsolujen määrä oli laskenut riittävän alas, bakteriofagit eivät enää tarttuneet terveisiin bakteerisoluihin ja jättivät ne näin ollen infektoimatta. Tällä tavoin ne varmistivat isäntäsolujen säilymisen, jotta ne voivat jatkossakin loisia isäntäsoluissa niiden lukumäärän kasvaessa. Erez *et al.* (2017) arvioivat myös muidenkin virusten kuin bakteriofagien viestivän keskenään ja pitivät mahdollisena jopa eläinsoluja infektoivien virusten viestivän keskenään populaation koon säätelystä. Tutkimus virusten QS:n osalta on vielä alkutekijöissään ja vaatii paljon lisätutkimusta muidenkin kuin bakteriofagien osalta, jotta kyseistä ilmiötä opittaisiin ymmärtämään paremmin.

5 MIKROBIEN VÄLISEN VIESTINNÄN ESTÄMINEN

Mikrobien välistä viestintää eli QS:iä voidaan häiritä ja estää erilaisilla inhibiittoreilla. Tästä käytetään englanninkielistä termiä quorum sensing inhibition eli lyhennettynä QSI. Useimmat inhibiittorit toimivat seuraavilla tavoilla signaalimolekyyliä vastaan: hajottamalla tai inaktivoimalla niitä, estämällä biosynteesin kohdesolussa, estämällä havaitsemisen kohdesolussa kilpailemalla niiden kanssa tai sieppaamalla niitä. (Kuva 21) (Mookherjee *et al.* 2018) (Truchado *et al.* 2015)

Luonnossa esiintyvien fenolien inhibointikyky johtuu pääosin niiden samanlaisesta rakenteesta signaalimolekyylien kanssa sekä niiden kyvystä tuhota signaalimolekyyliä. Luonnon fenoliyhdisteet voivat sitoutua signaalimolekyylien sijaan, mikrobien reseptoreihin niiden samankaltaisen rakenteen ansiosta ja näin estää viestinkulun mikrobipopulaatiossa. AHL signaalimolekyylien reseptorina toimivat LuxR-suvun proteiinit, jotka säätelevät mikrobien proteiinisynteesiä. AI signaalimolekyylien reseptoreina on taas LuxP/Q tyyppin proteiinit. (Truchado *et al.* 2015)



Kuva 21. Signaalimolekyylien toiminnan estämistavat eli QSI:n eri keinot fenoliyhdisteillä: AHL synteesin estäminen, signaalimolekyylien hajottaminen, sieppaaminen tai niiden kanssa kilpailu. (Truchado et al. 2015, muokattu)

5.1 Signaalimolekyylien toiminnan estäminen

Signaalimolekyylien estämisessä käytettävien molekyylien tulisi olla samankaltaisia kuin signaalimolekyylit itse eli kemiallisesti kestäviä, reaktiivisia, ihmisille harmittomia ja pienimoolimassaisia, jotta ne toimisivat halutulla tavalla. AHL synteesin estämisessä flavononien on havaittu vaikuttavan *yersinia enterocolitica* bakteeribasillin AHL synteesiä säätelevien geenien toimintaan ja täten estävän AHL synteesin jo itse mikrobissa. Muun muassa tällä tavoin fenoliyhdisteiden on mahdollista häiritä bakteerien signaalimolekyylien tuotantoa, vaikka bakteerit pystyisivät vastaan ottamaan signaalimolekyyliä itseensä. (Truchedo et al. 2015)

Signaalimolekyylien hajoaminen voi tapahtua joko entsyymaattisesti tai ei-entsyymaattisesti. Kolme yleisintä entsyymiä, jotka toimivat AHL signaalimolekyyliä vastaan, ovat AHL-laktonaasit, asyylaasit ja oksidoreduktaasit. AHL-laktonaasi hydrolysoi AHL:n homoseriinilaktonirenkaan esterisidoksella ja täten inaktivoi sen toiminnan signaalimolekyylinä. Asyylaasi- ja oksidoreduktaasientsyymit hajottavat AHL:n rakenteen. Ei-entsyymaattinen signaalimolekyylien

inaktivointi tapahtuu vasta-aineiden välityksellä, jotka voivat muun muassa hydrolysoida AHL-molekyyliä tehden sen toimintakyvyttömäksi. Luonnon fenolihdisteiden signaalimolekyylien hajottaminen ja inaktivointi ei ole entsymaattista. (Mookherjee et al. 2018) Muun muassa resveratrolin stilbeenin on havaittu hajottavan ja muokkaavan *yersinia enterocolitica*:n AHL signaalimolekyyliä tehden niistä toimintakyvyttömiä (Truchado et al. 2015).

Signaalimolekyylien niin sanotulla sieppaamisella tarkoitetaan molekyylien kykyä sitoa signaalimolekyyliä itseensä sen sijaan, että ne päätyisivät kohdemikrobien niitä tunnistaviin reseptoreihin. Edellisen lisäksi molekyylit voivat jäljitellä signaalimolekyylien rakennetta ja kiinnittyä signaalimolekyylien sijasta kohdemikrobin reseptoreihin kilpaillen signaalimolekyylien kanssa. (Truchado et al. 2015)

5.2 Patogeenien toimintaa rajoittavat luonnonfenolit

Tässä kappaleessa käsitellään tasopinnoilla esiintyvien patogeenien toimintaa vastustavia luonnon fenolihdisteitä. Antimikrobisia ominaisuuksia on lukuisilla fenolihdisteillä, joten niitä kaikkia ei käydä läpi, vaan ainoastaan keskeisimmät fenolihdisteet käsitellään tässä. Fenolihdisteillä on usein antimikrobisia vaikutuksia lukuisia muitakin mikrobeja kuin vain patogeenejä kohtaa, mutta tässä kappaleessa keskitytään vain patogeenien kasvua rajoittaviin fenolihdisteisiin (Barbieri et al. 2017).

5.2.1 Kversetiini ja luteoliini

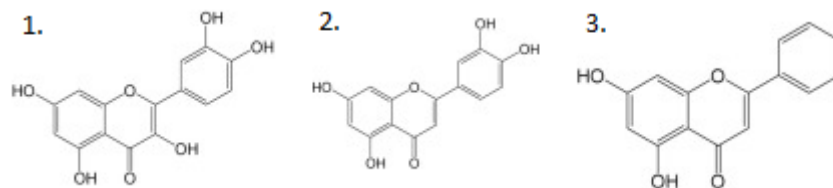
Kversetiini on flavonoleihin kuuluva fenolihdiste, jota on runsaasti muun muassa sipuleissa. Sillä on antimikrobisia ominaisuuksia sekä gram-negatiivisia että gram-positiivisia bakteereita vastaan. Kversetiini on 6.25 µg/ml pitoisuudessa antimikrobisesti aktiivinen stafylokokkia vastaan ja 128 µg/ml pitoisuudessa sen on havaittu rajoittavan streptokokki A:n kasvua. (Barbieri et al. 2017) Kversetiini estää myös *E.coli* bakteerin biofilmin muodostumista 0.02–0.33 mM pitoisuuksissa (Truchado et al. 2015).

Luteoliini eroaa rakenteeltaan kversetiinistä sen keskimmaisesta renkaasta puuttuvan hydroksiryhmän takia eli se luokitellaan flavoneihin flavonolien sijasta. Antimikrobisilta ominaisuuksiltaan kversetiini ja luteoliini eivät eroa suuresti toisistaan, sillä luteoliinilla on

antimikrobisia vaikutuksia myös stafylokokkia vastaan ja se rajoittaa streptokokin ja *E. coli* -bakteerin kasvua. (Barbieri et al. 2017)

5.2.2 Krysiini

Krysiini on luteoliinin kaltainen flavoni, jolla on vain vasemmanpuolimmaiseen renkaaseen kiinnittyneenä hydroksiryhmiä. Sillä on antimikrobisia ominaisuuksia sekä gram-positiivisia että gram-negatiivisia bakteereita vastaan. Voimakkain vaikutus sillä on stafylokokkia sekä *E. coli* -bakteereja vastaan ja se on antimikrobisesti aktiivinen niitä molempia vastaan jo 6.25 µg/ml pitoisuudessa. Krysiini on siis yhtä tehokas stafylokokkia vastaan kuin kversetiini, mutta se on myös yhtä tehokas *E. coli*a kuin stafylokokkia vastaan toisin kuin kversetiini tai luteoliini. (Barbieri et al. 2017)



Kuva 22. Kversetiinin (1.), luteoliinin (2.) ja krysiinin (3.) kemialliset rakennekaavat. (Barbieri et al. 2017)

5.2.3 Gallushappo

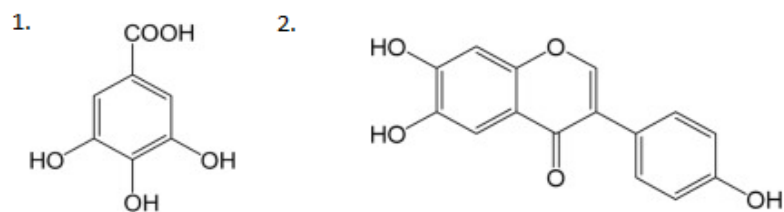
Gallushappo on fenolihappo ja sitä esiintyy lähes kaikissa kasveissa ja erityisen paljon sitä on tummissa hedelmissä, marjoissa sekä teessä. Gallushapolla on havaittu olevan *E. coli* bakteerin kasvua ja biofilmin muodostumista vastustavia vaikutuksia 8 mg/ml pitoisuudessa. Antibioittiresistenttejä *E. coli* bakteereita eli MDR *E. coli* bakteereita vastaan gallushapon on havaittu lääkehoidon kanssa vähentävän tarvittavaa lääkepitoisuutta 2-8 kertaisesti. Gallushapolla on siis havaittavissa MDR *E. coli*:a vastustavia vaikutuksia ja yleisesti katsottuna se antimikrobiset vaikutukset ovat voimakkaampia gram-negatiivisia kuin gram-positiivisia bakteereita vastaan. (Kuva 23) (Barbieri et al. 2017)

5.2.4 4',6,7-Trihydroksi-isoflavoni

4',6,7-Trihydroksi-isoflavoni, joka tunnetaan myös englanninkielisellä nimellä demethyltexasin, on isoflavoni, jota esiintyy pääasiassa palkokasveissa kuten soijapavuissa. Isoflavonit pääsääntöisesti vastustavat stafylokokkibakteereja ja niistä Barbieri *et al.* (2017) mukaan 4',6,7-Trihydroksi-isoflavoni on kaikkein tehokkain antimikrobisilta ominaisuuksiltaan. Pitoisuudessa 16–128 µg/ml sillä on havaittu antimikrobisia ominaisuuksia stafylokokkibakteereja vastaan. (Kuva 23)

5.2.5 Proantosyanidit

Proantosyanidit ovat kondensoituneita tanniineja ja niitä esiintyy luonnossa kasvavissa marjoissa kuten puolukoissa ja mustikoissa. Proantosyanideilla on antimikrobisia ominaisuuksia *E. coli* -bakteereja vastaan ja ne heikentävät *E. coli* biofilmin muodostumista. Proantosyanidit estävät *E. coli* kasvua 20-150 µg/ml pitoisuudessa riippuen hieman mikä yhdiste on kyseessä. (Barbieri *et al.* 2017)



Kuva 23. Gallushapon (1.) ja 4',6,7-Trihydroksi-isoflavoni (2.) kemialliset rakennekaavat. (Barbieri *et al.* 2017)

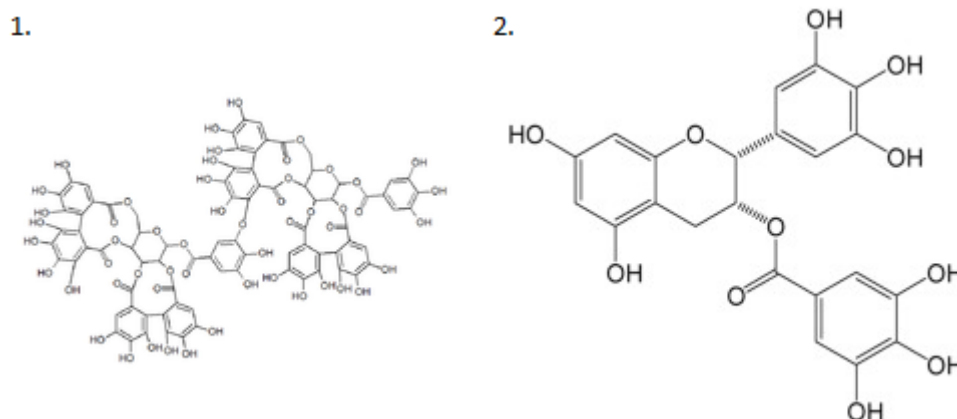
5.2.6 Epigallokatekiinigallaatti

Epigallokatekiinigallaatti eli lyhennettynä EGCG on erityisesti teelehdissä esiintyvä flavanoli, mihin on kiinnittyneenä gallushappo. EGCG:llä on voimakkaampi vaikutus gram-positiivisia bakteereja vastaan kuin gram-negatiivisia, koska

gram-negatiivisten lipopolysakkaridikerroksesta. EGCG:llä on antimikrobista aktiivisuutta streptokokki A:ta ja stafylokokkia vastaan 5 µg/ml pitoisuudessa, kun bakteerien pitoisuus on vastaavasti 20 µg/ml. Gram-positiivisia bakteereja vastaan esiintyvät EGCG:n antimikrobiset ominaisuudet johtuvat pääosin sen kyvystä tuhota mikrobin solukalvoja ja estää biofilmin muodostumista. EGCG:llä on havaittu myös antimikrobisia vaikutuksia *E. coli* -bakteeria vastaan, tosin vaikutus on huomattavasti pienempi kuin streptokokki A:ta tai stafylokokkia vastaan. (Kuva 24) (Barbieri et al. 2017)

5.2.7 Sanguiin H-6

Sanguiin H-6 on vadelmissa esiintyvä ellagitanniini. Sillä on havaittu olevan streptokokki-A:ta ja pneumokkia vastustavia vaikutuksia ja se ehkäisee myös stafylokokin toimintaa. Streptokokki-A:ta ja pneumokkia vastaan sanguiini H-6:n minimi-inhibointi konsentraatio on 0.5 mg/ml. Stafylokokille 1 mg/ml pitoisuutta inhihoiva minimikonsentraatio sanguiini H-6:ta on 0.25 mg/ml. Sanguiini H-6:lla on myös antimikrobisia vaikutuksia useita muita bakteereja kohtaan. (Kuva 24) (Barbieri et al. 2017)



Kuva 24. Sanguiini H-6:n (1.) ja EGCG:n (2.) kemialliset rakennekaavat. (Barbieri et al. 2017)

6 FENOLIYHDISTEIDEN KÄYTTÖKOHTEET

Potentiaalisia käyttökohteita fenoliyhdisteille mikrobikontaminaatioiden estämiseksi ovat erilaiset pinnat, joihin ihmiset koskevat, kuten ovenkahvat ja kaiteet. Fenoliyhdisteiden käyttö on tarkoitettu pääosin rajoittamaan pintojen välityksellä leviävien patogeenien mikrobipopulaatioiden kasvua ja

osassa tapauksissa jopa tuhoamaan koko populaation. Pääasiallisia ympäristöjä, missä fenoliyhdisteitä voitaisiin käyttää ehkäisemään mikrobien kontaminaatioita ja leviämistä ovat esimerkiksi koulut, lentokentät ja sairaalat.

6.1 Fenoliyhdisteiden stabiilisuus ja niiden käyttöön liittyvät mahdolliset ongelmat

Suurin osa fenoliyhdisteistä on herkkiä haitallisille ympäristöolosuhteille kuten epäsuotuisille lämpötiloille, valolle ja pH:n muutoksille. Fenoliyhdisteet hapettuvat herkästi antioksidanttisten ominaisuuksiensa ansiosta, minkä takia ne ovat myös alttiita hajoamiselle jo luonnostaan. Lisäksi jos niitä lämpökäsitellään kauan tai varastoidaan pitkään, yhdisteiden hajoamista tapahtuu enemmän. (Hong-Nam et al. 2016)

Hong-Nam *et al.* (2016) mukaan happamissa oloissa pH:n ollessa 3–7 välissä, fenoliyhdisteet ovat melko stabiileja. Parhaiten ne säilyvät pH:n ollessa 7. Suurta eroa ei kuitenkaan havaittu happamien ja neutraalien olojen välillä niiden stabiilisuudessa. Emäksisissä olosuhteissa pH:n noustessa yli 7:n havaitaan fenoliyhdisteiden hajoamisen kasvua ja voidaan olettaa pH:n kasvun emäksiseen suuntaan entisestään lisäävän fenolien hajoamista. Fenoliyhdisteiden käytössä mikrobikontaminaatioita vastaan erilaisilla pinnoilla, missä tapahtuu pH:n muutoksia muun muassa erilaisten emäksisten puhdistus- tai pesuaineiden käytön takia, fenoliyhdisteet menettävät antimikrobisen tehonsa. Emäksisten puhdistusaineiden käyttöä tulisi välttää ja miettiä mahdollisia vaihtoehtoisia ratkaisuja niiden käytön sijaan fenoleilla käsitellyillä pinnoilla.

Lämpötilan vaikutus fenoliyhdisteiden hajoamiseen pääsääntöisesti tehostuu, kun lämpötila nousee riittävän korkealle. Hong-Nam *et al.* (2016) tekemien kokeiden mukaan 90 minuutin käsittely 50–100 °C asteessa ei vaikuta merkittävästi fenolipitoisuuteen ja kaikkien kokeiden jälkeen fenolipitoisuus oli vielä vähintään 91% alkuperäisestä määrästä. Tästä voidaan päätellä fenoliyhdisteiden hajoamisen olevan suhteellisen pientä huoneenlämmössä. Huoneenlämpötilan pitkäaikaisvaikutuksia fenoliyhdisteisiin on huomattavasti vaikeampi arvioida ja lämpötilan suhteen tulisi suorittaa fenolikohtaisia lisätutkimuksia stabiilisuuden määrittämiseksi. Fenoleiden voidaan kuitenkin olettaa hajoavan huoneenlämmössä jatkuvasti.

Hong-Nam *et al.* (2016) tutkivat valon vaikutusta fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen. Kun fenolipitoisuuksia mitattiin 5 tunnin ajan valolle altistetusta näytteestä ja valolta suojatusta näytteestä, havaittiin valon tehostavan hajoamista. Valolla käsiteltyjen näytteiden fenolipitoisuudet olivat 94.87–

97.55% valolta suojatuista näytteistä. Valon vaikutuksesta fenoliyhdisteiden hajoamiseen tulisi tehdä pitkäaikaistutkimusta ja tehdä samalla fenolityyppikohtaisia kokeita, jotta sen vaikutuksia voitaisiin arvioida paremmin. Voidaan kuitenkin todeta valon aiheuttavan fenoliyhdisteiden hajoamista ja rajoittavan fenolien käyttöaikaa.

UV-säteilyn vaikutusta fenoliyhdisteistä ellagitanniineihin ovat tutkineet Zahri *et al.* (2007), jotka mittasivat muun muassa ellagiinihapon ja gallushapon hajoamista UV-valossa. Ellagiinihappo hajosi kokonaan 72 tunnin kuluttua ja gallushappo 216 tunnissa. Lisäksi Zahri *et al.* (2007) mittasivat tammessa olevia fenoliyhdisteitä ja tutkivat niiden pitoisuutta 216 tunnin UV-käsittelyn ajan missä niiden pitoisuus laski 68%, kun fenolipitoisuus oli alussa n. 3,1% ja lopussa n. 1,1%. Koetulosten pohjalta voidaan olettaa UV-valon hajottavan fenoliyhdisteitä varsin tehokkaasti, joten fenoleilla käsitellyt pinnat tulisi suojata UV-valon lähteiltä kuten auringon valolta.

6.2 Potentiaaliset tekniset sovellukset fenoliyhdisteiden käyttöön liittyen

Fenoliyhdisteiden käytön kannalta on olennaista saada pidennettyä niiden käyttöikää mahdollisimman paljon, jotta fenoliyhdisteiden antimikrobinen tehokkuus säilyisi mahdollisimman pitkään. Yksi mahdollinen keino tähän on nano- tai mikrokapselit, joiden avulla fenoliyhdisteiden reaktiivisuutta ulkoisten tekijöiden kanssa saadaan vähennettyä. Nano- ja mikrokapselit eroavat toisistaan vain kokonsa puolesta: mikrokapselit ovat suurempia. Mikrokapselien avulla voidaan myös kontrolloida fenoliyhdisteiden vapautumista kapselien ulkopuolelle ja täten vapauttaa niitä pitkän ajan kuluessa vähän kerrallaan. (Dubey *et al.* 2009 82,83)

Mikrokapselien toimintaperiaate on päällystää aktiivinen aine, tässä tapauksessa fenoliyhdisteet, mono- tai polymeereillä ja rajoittaa niiden reagoimista ympäristönsä kanssa. Mikrokapselointi voidaan toteuttaa usealla eri tekniikalla, jotka voidaan jakaa kemiallisiin ja mekaanisiin menetelmiin. Päällystysaineena mikrokapseloinnissa voidaan käyttää useita erilaisia mono- tai polymeerejä, jotka muodostavat kalvon aktiivisen aineen ympärille. Tekniikka ja päällystysaine tulee valita kyseisen kapseloitavan fenoliyhdisteen perusteella. Mikrokapselit vapauttavat myös erilaisilla tavoilla sisällään olevia yhdisteitä, joista kolme tyypillisintä tapaa on kalvon mekaaninen repeäminen, liukeneminen tai sulaminen. Lisäksi on olemassa muita mekanismeja aktiivisten aineiden vapauttamiseksi, kuten diffuusio eli pitoisuus ero kalvon sisällä ja ulkopuolella, joka vapauttaa aineita kapselin ulkopuolelle. Vähemmän yleisiä vapautustapoja on ablaatio eli kalvon hidas eroosio ja kalvon tekeminen biohajoavista materiaaleista. On myös olemassa valon (Okawa *et al.* 2014) ja pH:n

(Broaders et al. 2010) vaikutuksesta aktiivisia aineita vapauttavia mikrokapseleita. (Dubey et al. 2009, 82-86)

Mikrokapselointitekniikkaa käytetään lääketeollisuudessa muun muassa lääkeainetableteissa, jotta saadaan säilöttyä vaikuttava lääkeaine ruuansulatuskanavaan tuhoutumatta ennen sinne päätymistä. Ruokateollisuudessa säilöntäaineita voidaan kapseloida, jotta niiden vaikutusaikaa saadaan pidennettyä. Mikrokapseloinnilla pystytään myös muun muassa valmistamaan itse itsensä korjaavia komposiittimateriaaleja, jossa komposiittikuitujen sidosaineita on kapseloituina itse materiaaliin ja materiaalin rikkoutuessa ne vapautuvat ja alkavat sitoa kuituja takaisin toisiinsa. (Dubey et al. 2009, 83)

Fenoliyhdisteiden käytössä tasopinnoilla keskeisessä osassa on pintojen käsittely kapseloituilla fenoliyhdisteillä. Pinnat voidaan käsitellä muun muassa fenolisia mikrokapseleita sisältävillä maaleilla tai lakoilla. Muita potentiaalisia pintojen käsittelytapoja ovat fenolisia mikrokapseleita sisältävät puhdistusaineet. Käytettävät mikrokapselit voivat sisältää erilaisia fenoliyhdisteitä, jotka valitaan kohdepatogeenejä vastaan. Lisäksi tärkeää on valmistaa monia erilaisia mikrokapseleita. Mikrokapseloiden erilaisuudella pyritään muun muassa aikaan saamaan kapselien rakenteiden eriaikaista hajoamista ja luomaan erilaisten kapseloiden hajoamisesta aikajana, jossa eri kapselit hajoavat toistensa jälkeen taaten jatkuvan fenolien vapautumisen. Monikerroksisten alginaattikapselien on havaittu vapauttavan proteiineja yli 30 päivää ja silloinkin vasta n. 30% niiden alkuperäisestä proteiinipitoisuudesta, tosin ensimmäisenä päivänä vapautuu jo n. 18% ja loput 30%:sta seuraavien 30 päivän aikana (Khanna et al. 2010), vastaavaa tekniikka voitaisiin mahdollisesti soveltaa fenolienkin osalta. Eri pinnoitusaineista tehdyt kapselit saadaan myös hajoamaan tai tuhoutumaan erilaisissa ympäristöoloissa ja näin fenolien toiminnasta saadaan käyttövarmempaa eivätkä epäedulliset ympäristöolosuhteet tuhoa kerralla kaikkia kapseleita. Mikrokapseloiden käytön suhteen on tehtävä lisätutkimusta, kun aktiivisena aineena ovat fenoliyhdisteet.

Pintakäsittelyn lisäksi mahdollinen keino fenolien käyttämiseen pinnoilla olisi kyllästä materiaali fenoleilla. Puumateriaaleja on kyllästetty jo kauan parantamaan niiden käyttökestävyyttä, joten kyllästysaineeseen voitaisiin mahdollisesti käyttää fenoliyhdisteitä ja saada puumateriaalit näin hyvin fenolipitoisiksi. Fenolipolymeerejä voitaisiin käyttää komponentteina rakennusmateriaalien valmistuksessa. Ligniinejä on jo käytetty elintarvikepakkauksissa parantamaan pakkausten kestävyysominaisuuksia ja tekemään niistä kulutusta paremmin kestäviä. Ligniinin sekä tanniinin käyttö erilaisissa rakennusmateriaaleissa on myös varteen otettava vaihtoehto ja kehittää niiden pohjalta fenolisia rakennuskomponentteja. (Panzella & Napolitano 2017)

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän kandidaatintyön tarkoitus oli kirjallisuuden perusteella kehittää fenoliyhdisteiden käyttömahdollisuuksia pintojen mikrobikontaminaatioiden estämisessä. Fenoliyhdisteillä tiedetään olevan antimikrobisia ominaisuuksia, joista ne vastustavat erityisesti bakteerien kasvua. Esimerkiksi gallushapon on havaittu rajoittavan myös antibioottiresistenttiä *E. coli* -bakteeria. Mikrobeista keskityttiin patogeeneihin ja niiden leviämisen estämiseen tasopintojen kautta ihmisiin. Luonnon fenoliyhdisteiden hajoaminen aiheuttaa kuitenkin ongelmia niiden käytön suhteen, koska ne hajoavat emäksisen pH:n, korkean lämpötilan, valon tai UV-säteilyn takia. Fenoliyhdisteiden käyttöä voidaan parantaa mikrokapselitekniikalla, jossa fenoliyhdisteet kapseloidaan. Kapselit vapauttavat fenoleita vähän kerrallaan, josta seuraa fenolien käyttöajan pidentyminen. Suojattavat pinnat voitaisiin käsitellä fenolisia kapseleita sisältävillä pinnoitteilla, kuten maaleilla, lakoilla tai puhdistusaineilla.

Pintojen käsittelyn sijaan voitaisiin vaihtoehtoisesti valmistaa rakennusmateriaaleja, jotka sisältävät jo itsessään fenoleita. Luonnossa esiintyvistä fenoleista suurin osa löytyy kasvikunnasta erityisesti marjoista, hedelmistä ja kasveista, joten näistä kerättyjä fenolisia osia voitaisiin käyttää muun muassa lastulevyissä osakomponentteina. Lisäksi rakennusmateriaaleihin voitaisiin lisätä mikrokapseleita parantamaan antimikrobisen tehon kestävyyttä. Rakennusmateriaalina voitaisiin käyttää myös itsestään korjautuvia komposiittimateriaaleja, joiden pinta ja mahdollisesti jopa rakenteet olisi käsitelty mikrokapseloiduilla fenoliyhdisteillä kulutusta tai iskuja vaativilla pinnoilla ja ne täten itse korjaisivat itseään ja samalla pitäisivät fenolipitoisuutta ulkopinnallaan yllä.

Fenoliyhdisteiden epästabiilisuus on fenolien hyödyntämisessä tasopinnoilla suurin haaste, joka tulisi ratkaista riittävän tehokkaasti esimerkiksi juuri mikrokapseleiden avulla ennen kuin niitä voitaisiin alkaa tuotteistamaan jatkuvaan käyttöön tässä tarkoituksessa. Fenoliyhdisteiden stabiilisuutta heikentävistä edellä mainituista tekijöistä tulisi tehdä tutkimusta niiden yhteisvaikutuksesta fenoliyhdisteiden hajoamiseen. Ympäristötekijöiden yhteisvaikutuksen perusteella pystyttäisiin arvioimaan vasta kattavasti fenoliyhdisteiden stabiilisuutta muun muassa sairaaloiden tai koulujen tyyppisissä ympäristöissä. Yhteisvaikutusta tulisi tutkia fenolikohtaisesti stabiileimpien yhdisteiden löytämiseksi.

Kehitettävien mikrokapselien toiminta-ajan pituus tulee tulevaisuudessa määrittelemään fenolihdisteiden pinnoitusvälin tarpeen tasopinnoilla. Mikrokapselien erilaisia vapautusmekanismeja voitaisiin tutkia ja soveltaa fenolihdisteiden stabiilisuuden parantamiseksi muun muassa kehittämällä mikrokapselita, jotka vapauttavat fenolihdisteitä tavallista enemmän epästabiileissa ympäristöolosuhteissa, kuten UV-säteilyn kasvaessa. Nykyisellä mikrokapselien toiminta ajalla, mikä vaihtelee muutamasta tunnista jopa kuukauteen, on mahdollista käyttää fenolihdisteitä ehkäisemään tautien leviämistä pintojen välityksellä paikallisten epidemioiden aikana. Mikrokapselien toiminta-ajan pidentyessä riittävästi kyseeseen voi tulla fenolihdisteiden jatkuva käyttötasopinnoilla, mikä olisi yksi mahdollinen osaratkaisu muun muassa antibioottiresistenttien bakteerikantojen leviämistä vastaan.

LÄHDELUETTELO

- Aminov, R. I. (2013). Role of Archaea in Human Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 42. s.1-3
- Ampofo, K. & Byington C. L. (2018). *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 5th Edition. s.737
- Barbieri R., Coppo E., Marchese A., Daglia M., Sobarzo-Sanchez E., Nabavi S. F. & Nabavi S. M. (2017). *Microbiological Research* vol. 196 Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity s.44-68
- Berman J. (2012). *Current Biology*, Vol. 22, Issue 16 s. 620-622
- Biais B. (2017). "Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65.24 s.4952-4960
- Broaders K. E., Pastine, S. J., Grandhe, S. & Fréchet J. M. J. (2010). Acid-degradable Solid-walled Microcapsules for pH-responsive Burst-release Drug Delivery *Chemical Communications* Vol.47, s.665-667
- Daum R. S. (2018) *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 5th Edition. s.692
- Dubey R., Shami T. C. & Bhasker Rao K.U. (2009). Microencapsulation Technology and Applications, *Defence Science Journal*, Vol. 59, s. 82-95
- Figueiredo A. R., Campos F., de Freitas V., Hogg T. & Couto J. A. (2007). Effect of Phenolic Aldehydes and Flavonoids on Growth and Inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology*, Volume 25, s.105-112
- de Lourdes Reis Giada M. (2013). Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants, Chapter 4, *Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power*. InTech
- Erez Z., Steinberger-Levy I., Shamir M., Doron S., Stokar-Avihail A., Peleg Y., Melamed S., Leavitt A., Savidor A., Albeck S., Amitai G. & Sorek R. (2017). Communication Between Viruses Guides Lysis–lysogeny Decisions *Nature* 541, s.488-493

- Friedman M., Henika P. R. & Mandrell R. E. (2003). Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, Vol. 66, s.1811-1821
- Hertog, M. G. L. & Hollman, P. C. H. (1996). Potential Health Effects of the Dietary Flanonol Quercetin. *European Journal of Clinical Nutrition* 50 s. 63-71.
- Hong-Nan S., Tai-Hua M. & Li-Sha X. (2016). Effect of pH, Heat, and Light Treatments on the Antioxidant Activity of Sweet Potato Leaf Polyphenols, *International Journal of Food Properties* vol. 20
- Hyvärinen H. (2001). Kasviperäiset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit. Kirjallisuuskatsaus, Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT).
- Jurikova T., Balla S., Sochor J., Pohanka M., Mlcek J. & Baron M. (2013). Flavonoid Profile of Saskatoon Berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) and Their Health Promoting Effects, *Molecules* 18. Artikkelikatsaus. Julkaistu: 11.9.2013
- Kalia V. C. (2013). *Biotechnology Advances* vol. 31 s. 224-245
- Kiyama R. (2016) Biological Effects Induced by Estrogenic Activity of Lignans, *Trends in Food Science & Technology* Volume 54, August 2016, s. 186-196
- Khanna O., Moya M. L., Greisler H. P., Opara E. C., & Brey E. M. (2010). Multilayered Microcapsules For the Sustained-Release of Angiogenic Proteins From Encapsulated Cells. *American Journal of Surgery*, 200(5), s. 655–658.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. P. & Clark D. P. (2012). 12. p. *Brock Biology of Microorganisms*. San Francisco, CA, Pearson Education, Inc.
- Mattila P. & Törrönen R. (2006). Marjoista saa runsaasti hyödyllisiä fenoliyhdisteitä. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT). 63. vuosikerta. Numero 2. s. 11.
- Microbeonline.com (2013), Characteristics Shape of Pathogenic Bacteria. [Viitattu: 4.3.2018]
Saatavilla: https://microbeonline.com/wp-content/uploads/2013/05/bacteria_shapes.jpg
- Mookherjee A., Singh S. & Maiti M. K. (2018) Quorum Sensing Inhibitors: Can Endophytes Be Prospective Sources, *Archives of Microbiology* vol. 200 s.355-369

- Nizet, V. & Arnold J., C. (2018). Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases, 5th Edition. s.715
- Okawa D. C., Pastine S. J., Zettl, A. K., & Frechet, J. M. J. (2014) "Microcapsule and Methods of Making and Using Microcapsules", United States.
- Pansella L. & Napolitano A. (2017). Natural Phenol Polymers: Recent Advances in Food and Health Applications
- Pfizer Oy (2016), Pneumokokki, Tietoa pneumokokista. [Viitatu 29.3.2018] Saatavilla: <https://www.pneumokokki.fi/tietoa-pneumokokista>
- Rivas, L., Mellor, G. E., Gobijs, K. & Fegan, N. (2015). Detection and Typing Strategies for Pathogenic Escherichia coli.
- Ryan M. & Washburn L. Quorum Sensing 101 [Viitattu 16.3.2018] Saatavilla: <https://sites.tufts.edu/quorumsensing/quorumsensing101/>
- Solunetti – Bakterien soluseinä (2006). [Viitattu 2.3.2018] Saatavilla: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakterien_soluseina/2/
- Tartar A, Boucias D.G., Adams B.J., Becnel J.J (2002). "Phylogenetic Analysis Identifies the Invertebrate Pathogen Helicosporidium sp as a Green Alga". Int J Syst Evol Microbiol. 52 s. 273–279
- THL – Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, Bakteritaudit. (2012) [Viitattu: 3.3.2018] Saatavilla: <https://thl.fi/fi/web/infektiaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteritaudit>
- Truchado P., Larrosa M., Castro-Ibanez I. & Allende A. (2015). Trends in Food Science & Technology Vol. 43, Plant Food Extracts and Phytochemicals: Their Role as Quorum Sensing Inhibitors. s. 189-204
- Weigel C. (2016), Quorum Sensing for the Mutes. [Viitattu 16.3.2018] Saatavilla: <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2016/10/quorum-sensing-for-the-mutes.html>

Zahri S., Belloncle C., Charrier F., Pardon P., Quideau S. & Charrier B. (2007). UV Light Impact on Ellagitannins and Wood Surface Colour of European Oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*). *Applied Surface Science* vol. 253 s. 4985-4989