

Puna-apilalajikkeiden kasviestrogeenit

Eeva Mustonen¹, Mikko Tuori², Ilkka Saastamoinen¹, Päivi Nykänen-Kurki³, Mika Isolahti⁴, Hannu Saloniemi¹, Aila Vanhatalo²

¹Helsingin yliopisto, Kliinisen eläinlääketieteen laitos, PL 57, 00014 eeva.a.mustonen@helsinki.fi

²Helsingin yliopisto, Kotieläintieteen laitos, PL 28, 00014 HY etunimi.sukunimi@helsinki.fi

³MTT, Ekologinen tuotanto, Karilantie 2 A, 50600 MIKKELI etunimi.sukunimi@mtt.fi

⁴MTT, Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasema, Tutkimusasantie 15, 92400 RUUKKI

Tiivistelmä

Puna-apila on käytetyin ja Suomen olosuhteissa parhaiten menestyvä nurmipalkokasvi. Puna-apila sisältää kasviestrogeeneista isoflavoneja biokaniini A:ta, genisteiiniä, daidtseiiniä ja formononetiinia. Isoflavonit pystyvät sitoutumaan elimistön estrogeenireseptoreihin. Yhdisteiden sitoutumiskyky vaihtelee suuresti ja vaatii hyvin korkeita pitoisuuksia. Estrogeenisesti aktiivisin on formononetiiniin ja daidtseiiniin metaboliatuote ekuoli. Hyvin runsas kasviestrogeenien saanti voi alentaa lampaiden hedelmällisyyttä tai aiheuttaa muita lisääntymiseen liittyviä häiriöitä. Tapausselostuksia kasviestrogeenien aiheuttamista lisääntymishäiriöistä naudoilla löytyy hyvin vähän, vaikka isoflavoneiden metabolia on todennäköisesti hyvin samankaltainen lampaille ja naudoilla.

Puna-apilan virallisesta lajikekokeesta kerättiin kasviestrogeeninäytteet MTT:n Ekologisen tuotannon Mikkelin toimipaikasta ja Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasemalta Ruukista vuosina 2003 ja 2004. Näytteet otettiin ruuduittain viidestä puna-apilalajikkeesta (Betty, Bjursele, Borealin linja [Bor], Ilte ja Jokioinen). Kasviestrogeenit biokaniini A, genisteiini, daidtseiini ja formononetiini analysoitiin eläinlääketieteellisen tiedekunnan Kotieläinhygienian laboratoriossa nestekromatografimenetelmällä.

Tutkituista puna-apilalajikkeista eniten kasviestrogeeneja sisälsi Ilte, 1,4 % kuiva-aineesta. Betty ja Jokioinen sisälsivät kasviestrogeeneja 1,2 % kuiva-aineesta sekä Bjursele ja Bor keskimäärin 1,1 % kuiva-aineesta. Pääosa isoflavoneista oli formononetiinia. Ilten formononetiinipitoisuus oli lajikkeista suurin, 0,8 % kuiva-aineesta. Kasviestrogeenien pitoisuus Suomessa viljellyssä puna-apilassa on vaihdellut välillä 1 – 2,5 % kuiva-aineesta. Kasvukauden olosuhteilla oli selvä vaikutus kasviestrogeenien pitoisuuksiin. Vuonna 2004 pitoisuus oli 1,3 % kuiva-aineesta ja vuonna 2003 1,1 %. Formononetiinia muodostui kesän 2004 aikana enemmän kuin 2003. Kasvupaikka vaikutti jonkin verran pitoisuuksiin. Kasviestrogeeneja oli Ruukista kerätyissä näytteissä vähän enemmän kuin Mikkelistä kerätyissä näytteissä. Kesän eri niittojen pitoisuudet erosivat selvästi toisistaan. Ensimmäisessä niitossa heinäkuun alussa kasviestrogeenien kokonaismäärä oli 1,1 % kuiva-aineesta ja toisessa niitossa syyskuun alussa vastaavasti 1,3 %.

Asiasanat

biokaniini A, daidtseiini, formononetiini, genisteiini, isoflavoni, kasviestrogeeni, puna-apilalajike

Johdanto

Puna-apila on käytetyin ja Suomen olosuhteissa parhaiten menestyvä nurmipalkokasvi. Puna-apila sisältää kasviestrogeeneista isoflavoneja, kuten biokaniini A:ta, genisteiiniä, daidtseiiniä ja formononetiinia (Petterson ym. 1984, Kallela ym. 1988, Saloniemi ym. 1995, Sarelli ym. 2003). Isoflavonit pystyvät sitoutumaan elimistön estrogeenireseptoreihin. Yhdisteiden sitoutumiskyky vaihtelee suuresti ja vaatii hyvin korkeita pitoisuuksia.

Eri isoflavoneilla on erilainen metabolia pötsissä ja muualla ruuansulatuskanavassa. Biokaniini A demetyloidaan pötsissä ensin genisteiniksi, joka metaboloituu edelleen p-etyylifenoliksi ja fenolihapoksi, joilla ei todennäköisesti ole estrogeenisia vaikutuksia. Formononetiini metaboloituu daidtseiiniksi ja edelleen ekuoliksi ja sen hajoamistuotteiksi. Estrogeenisesti aktiivisin ja merkittävin on formononetiinin ja daidtseiinin metaboliatuote ekuoli (Shutt ym. 1968, Cox ym. 1974, Lundh 1990).

Hyvin runsas kasviestrogeenien saanti voi alentaa lampaiden hedelmällisyyttä tai aiheuttaa muita lisääntymiseen liittyviä häiriöitä. Eniten kasviestrogeenien aiheuttamia lisääntymiseen liittyviä ongelmia on havaittu Australiassa ja Uudessa-Seelannissa, maissa joissa lampaat laiduntavat ympäri vuoden (Adams 1995). Tapausselostuksia kasviestrogeenien aiheuttamista lisääntymishäiriöistä naudoilla löytyy hyvin vähän (Mustonen, 2005). Tarkkaa syytä lampaiden nautoja suuremmalle herkkyydelle ei ole toistaiseksi pystytty selvittämään. Isoflavonien metabolia on todennäköisesti hyvin samankaltainen lampaille ja naudoilla (Lundh 1990).

Lypsylehmien runsas kasviestrogeenien saanti vaikuttaa myös maidon pitoisuuksiin. Pilottitutkimuksessa havaittiin suomalaisen luomumaidon sisältävän enemmän ekuolia tavanomaisesti tuotettuun maitoon verrattuna (Hoikkala ym, julkaisematon). Maidon kasviestrogeenipitoisuuksia on mitattu myös mm. Australiassa (King ym 1998) ja Ranskassa (Antignac ym. 2004).

Puna-apilalajikkeiden kasviestrogeenipitoisuuksia on Suomessa viimeksi tutkittu kasvukaudella 1985. Tässä tutkimuksessa selvitettiin nykyisin käytössä olevien puna-apilalajikkeiden kasviestrogeenipitoisuudet vuosien 2003 ja 2004 virallisten lajikekokeiden yhteydessä.

Aineisto ja menetelmät

Puna-apilan virallinen lajikekoe toteutettiin Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen (MTT) Ekologisen tuotannon Mikkelin toimipaikassa ja Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasemalla Ruukissa vuosina 2003 ja 2004. Lajikekokeen niittojen yhteydessä koeruuduilta otettiin näytteet myös kasviestrogeenianalyysjää varten. Kenttäkokeessa oli neljä kerrannetta. Näytteet kerättiin ruuduittain viidestä puna-apilalajikkeesta (Betty, Bjursele, Borealin linja [Bor], Ilte ja Jokioinen). Koe niitettiin ensimmäisen kerran heinäkuun alussa ja toisen kerran syyskuun alussa. Bjursele ei ollut mukana varsinaisessa lajikekokeessa, vaan sitä koskevat näytteet otettiin kokeiden suojaruuduista. Näytteet pakastettiin odottamaan isoflavonianalyysjää.

Kasviestrogeenit biokaniini A, genisteiini, daidtseiini ja formononetiini analysoitiin eläinlääketieteellisen tiedekunnan Kotieläinhygienian laboratoriossa nestekromatografimenetelmällä (Sarelli 2003). Tulokset analysoitiin tilastollisesti SAS ohjelmalla. Kasviestrogeenipitoisuuksille laskettiin aritmeettiset keskiarvot vuosien, koepaikkojen, niittojen ja lajikkeiden suhteen. Aineiston varianssianalyysissä käytettiin havaintojen logaritmimuunnoksia, luokittelijoina olivat vuosi, koepaikka, lajike ja niitto sekä kahden tekijän yhdysvaikutukset.

Tulokset

Eri lajikkeiden kasviestrogeenien pitoisuudet on esitetty taulukossa 1. Tutkituista puna-apilalajikkeista eniten kasviestrogeeneja sisälsi Ilte, 1,4 % kuiva-aineesta. Betty ja Jokioinen sisälsivät kasviestrogeeneja 1,2 % kuiva-aineesta sekä Bjursele ja Bor keskimäärin 1,1 % kuiva-aineesta. Pääosa isoflavoneista oli formononetiinia. Ilten formononetiinipitoisuus oli lajikkeista suurin, 0,8 % kuiva-aineesta. Seuraavana oli Betty, jonka formononetiinipitoisuus oli 0,7 % kuiva-aineesta. Bjursele, Bor ja Jokioinen sisälsivät formononetiinia keskimäärin 0,6 % kuiva-aineesta.

Taulukko 1. Puna-apilalajikkeiden kasviestrogeenipitoisuudet

Kasviestrogeeni, % kuiva-aineesta	Betty	Bjursele	Bor	Ilte	Jokioinen	Keskiarvon keskivirhe	Tilastollinen merkitsevyys
Daitseiini	0,030	0,027	0,023	0,031	0,025	0,00104	***
Genisteiini	0,055	0,052	0,050	0,052	0,049	0,00153	
Formononetiini	0,715	0,603	0,595	0,772	0,632	0,0134	***
Biokaniini A	0,366	0,446	0,451	0,584	0,444	0,0172	***
Yhteensä	1,165	1,128	1,120	1,439	1,150	0,0287	***

Kasvukauden olosuhteilla oli selvä vaikutus kasviestrogeenien pitoisuuksiin. Vuonna 2004 pitoisuus oli 1,3 % kuiva-aineesta ja vuonna 2003 1,1 % (Taulukko 2). Formononetiinia muodostui kesän 2004 aikana enemmän kuin 2003. Kasvupaikka vaikutti jonkin verran pitoisuuksiin. Sekä kasviestrogeenien kokonais- että formononetiinipitoisuus oli Ruukista kerätyissä näytteissä vähän suurempi kuin Mikkelistä kerätyissä näytteissä. Kesän eri niittojen pitoisuudet erosivat selvästi toisistaan. Ensimmäisessä niitossa heinäkuun alussa kasviestrogeenien kokonaismäärä oli 1,1 % kuiva-aineesta ja toisessa niitossa syyskuun alussa vastaavasti 1,3 %. Formononetiinin pitoisuus oli syyskuun niitossa 0,8 % kuiva-aineesta, vastaavasti heinäkuussa formononetiinia oli 0,6 %. Kasvuasteeltaan puna-apila oli ensimmäisessä niitossa kukinnan alussa. Toisessa niitossa kasvusto oli lehtevää odellmaa.

Taulukko 2. Koevuoden, koepaikan ja niittoaajankohdan vaikutus puna-apilan kasviestrogeenipitoisuuksiin

Kasviestrogeeni, % kuiva-aineesta	Vuosi 2003	Paikka		Niitto		SEM	Tilast. merkitsevyys			
		2004	Mikkeli	Ruukki	Heinäk.		Syysk.	Vuosi	Paikka	Niitto
Daitseiini	0,031	0,023	0,025	0,029	0,029	0,025	0,00066	***	***	***
Genisteiini	0,051	0,052	0,052	0,052	0,054	0,050	0,00097			**
Formononetiini	0,607	0,720	0,644	0,683	0,570	0,757	0,0085	***	***	***
Biokaniini A	0,406	0,510	0,434	0,482	0,413	0,503	0,0109	***	**	***
Yhteensä	1,096	1,305	1,155	1,246	1,066	1,335	0,0181	***	**	***

SEM=keskiarvon keskivirhe

Tulosten tarkastelu

Puna-apila sisälsi isoflavoneja, erityisesti formononetiinia ja biokaniini A:ta. Genisteiinin ja daidsteiinin pitoisuudet olivat vajaa kymmenesosa formononetiinin pitoisuuksista. Lajikkeiden välillä oli eroja. Lisäksi kasvuaste ja lämpötila vaikuttivat pitoisuuksiin. Kirjallisuuden mukaan kasviestrogeeneja muodostuu runsaimmin keväällä nopean kasvun vaiheessa ja syksyllä jälkikasvussa. Kylmän sään kasvukauden aikana on todettu lisäävän kasviestrogeenien pitoisuuksia.

Kasviestrogeenien pitoisuus Suomessa viljellyssä puna-apilassa on vaihdellut välillä 1 – 2,5 % kuiva-aineesta (Saloniemi ym. 1995). Kasvukaudella 1985 heinäkuun niitossa kasviestrogeenien kokonaismäärä oli runsas 1 % kuiva-aineesta ja elokuun niitossa vajaa 1,5 % kuiva-aineesta (Kallela ym. 1988). Kesällä 1999 kerätyissä näytteissä kasviestrogeenipitoisuus vaihteli 0,8 – 1,1 % välillä kuiva-aineesta (Sarelli ym. 2003). Tässä tutkimuksessa kasviestrogeenien kokonaispitoisuus oli samaa tasoa aiempien analyysien ja kirjallisuuden kanssa. Uusista lajikkeista Ilte sisälsi kasviestrogeeneja muita lajikkeita enemmän.

Tutkitut lajikkeet sisälsivät eniten formononetiinia ja biokaniini A:ta. Märehtijät metaboloivat eri isoflavoneja eri tavoin, biokaniini A:n ja genisteiinin metaboliatuotteet eivät ole estrogeenisesti aktiivisia. Formononetiinin ja daidsteiinin metaboliatuote ekuoli on estrogeenisesti aktiivisena tärkein puna-apilarehun metaboliitti märehtijöillä.

Johtopäätökset

Puna-apilan lajikevalinnalla voidaan vaikuttaa erityisesti rehun formononetiinipitoisuuteen. Kasvukauden olosuhteilla, kasvupaikalla ja niiton ajankohdalla on vaikutusta rehun kasviestrogeenipitoisuuksiin. Kylmyys lisää kasviestrogeenien määrää. Tavallista kylmemmän kasvukauden jälkeen erityisesti syksyn sadossa voi olla tavallista enemmän kasviestrogeeneja, samoin Pohjois-Suomessa etelää enemmän.

Kirjallisuus

- Adams , N. R. 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 73:1509-1515.
- Antignac, J., Cariou, R., Bizec, B. L., Andre, F. 2004. New data regarding phytoestrogens content in bovine milk. *Food Chem.* 87:275 – 281. Cox, R.I.,
- Braden A. W. 1974. The metabolism and physiological effects of phyto-oestrogens in livestock. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 10:122 – 129.
- Hoikkala, A., Mustonen, E., Saastamoinen, I., Jokela, T., Taponen, J., Saloniemi, H., Wähälä, K. 2005. Significantly more equol in organic skimmed milk, julkaisematon.
- King, R. A., Mano, M. M., Head, R.J. 1998. Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk sample. *J Dairy Res.* 65: 479-489.
- Lundh. 1990. Uptake, metabolism and biological effect of plant estrogens in sheep and cattle. Sveriges Lantbruksuniversitet. Thesis.
- Mustonen, E. 2005. Kasviestrogeenien vaikutukset lampailla ja naudoilla / kirjallisuuskatsaus. *Suom. Eläinlääkäril.* 111: 240-243
- Kallela, K., Saastamoinen, I., Huokuna, E., Hakkola, H. 1988. Kasviestrogeenipitoisuuden vaihtelut muutamien puna-apilalajikkeiden välillä Pohjois- ja Etelä-Suomessa. *Suom. Eläinlääkäril.* 94: 287- 291.
- Petterson, H., Holmberg, T., Kiessling, K-H., Rutqvist, L. 1984. Växtöstrogener i foder och reproduktionsstörningar hos idisslare. *Svensk. Vet. Tidsskrift.* 36: 677-682.
- Saloniemi, H., Wähälä, K., Nykänen-Kurki, P., Kallela, K., Saastamoinen, I. 1995. Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208:13-17.
- Sarelli, L., Tuori, M., Saastamoinen, I., Syrjälä-Qvist, L., Saloniemi, H. 2003. Phytoestrogen content of birdsfoot trefoil and red clover: Effects of growth stage and ensiling method. *Acta Agr.Scand. Section A- Animal Science.* 53:58-63.
- Shutt, D.A., Braden, A. W. H. 1968. The significance of equol in Relation to the Oestrogenic responses in Sheep Ingesting Clover with high Formononetin Content. *Aust. J. Agric. Res.* 19:545-553.