

# **Udvikling af højtverdiprodukt fra bioraffineret rødkløver: Skalerbare metoder til ekstraktion af det bioaktive stof biochanin A fra rødkløverpulp til bekæmpelse af spolorm.**



**Græs-Prof projektrapport**

**Udarbejdet af Emil Alsholm Hundebøll og Mette Lübeck**

**Aalborg Universitet 2024**

## Indholdsfortegnelse:

1. Forord.....	2
2. Indledning.....	2
2.1 Formål og afgrænsning.....	3
2.2 Valg af solvent og processeringsmetoder.....	3
3. Materialer og metoder.....	6
3.1 Plantemateriale og pulp.....	6
3.2 Autohydrolyse.....	6
3.3 Solvent Ekstraktion.....	6
3.4 Tørvægtsbestemmelse.....	6
3.5 Isoflavon analyse med HPLC-DAD-HRMS.....	6
3.6 Dataanalyse.....	7
4. Resultater.....	7
5. Diskussion og konklusion.....	11
6. Litteraturliste.....	13
7. Bilag.....	16

## 1. Forord

Denne rapport er udarbejdet som en levering til en arbejdsopgave i projektet Værdiskabelse med Græsprotein (Græs-Prof), støttet af GUDP med j.nr. 34009-19-1591. Det overordnede formål i Græs-Prof er at bane vejen for, at produktion af græsprotein bliver et nyt attraktivt forretningsområde for dansk landbrug ved at skabe bedst mulig økonomi i græsprotein gennem udvikling af optimale indsatsfaktorer i produktionen. Rapporten er en del af en arbejdsopgave, som har til formål at undersøge, om der i kløvergræsser er bioaktive stoffer, der kan anvendes til behandling mod indvoldsorm og som kan udvindes fra fraktioner fra proteinframstillingen. Tidligere forsøg i arbejdsopgaven har identificeret biochanin A, som særligt findes i rødkløver og som har vist stor *in vitro* effekt overfor indvoldsorm. I rapporten vil det derfor blive undersøgt, hvilke potentielle skalerbare metoder, der findes til at udvinde biochanin A.

## 2. Indledning

Historisk har naturen været den største kilde til bioaktive molekyler med unik strukturel og biologisk variation. De ældste tegn på brugen af bioaktive stoffer fra planter og dermed anvendte plantebaserede midler stammer fra Mesopotamien dateret til 2600 f.Kr. og 2900 f.Kr. fra Egypten. De biologisk aktive stoffer

tilhører en gruppe kaldet sekundære metabolitter. Disse metabolitter adskilles fra primære metabolitter ved, at de ikke er essentielle for liv, men øger overlevelsesmulighederne for organismen – f.eks. ved at stofferne udskilles og er giftige for andre organismer (Dias et al., 2012).

En plante med et højt indhold af sekundære metabolitter er rødkløver (*Trifolium pratense*). Rødkløver har et højt indhold særligt af en interessant gruppe af sekundære metabolitter, isoflavoner, herunder biochanin A, formononetin, daidzein og genistein (Kazlauskaitė et al., 2021). Biochanin A er af særlig interesse grundet dets antiparasitiske egenskab overfor *Ascaris suum* (svinets spolorm), der er blevet påvist i *in vitro* forsøg med ekstrakter fra rødkløverpulp samt i forsøg med forskellige isoflavoner (ikke-publicerede resultater). Det har vist sig, at ekstrakter fra rødkløverpulp, som er en sidestrøm fra bioraffineringsprocessen til proteinoprensning (Santamaria-Fernandez & Lübeck, 2020), har langt højere effekt overfor ormene end ekstrakter fra intakte planter (ikke-publicerede resultater). For at kunne undersøge, om ekstrakterne har potentiale til bekæmpelse eller hæmning af parasitter i produktionsdyr, er det nødvendigt at have metoder, der kan anvendes til ekstraktion i større skala således, at der kan udføres forsøg *in vivo* i forskellige produktionsdyr. Hvis det viser sig, at ekstrakterne på sigt vil kunne anvendes som foderadditiv, vil det også være yderst relevant at udvikle skalerbare metoder.

### 1.1 Formål og afgrænsning

I denne rapport vil skalerbare metoder til ekstraktion af biochanin A fra rødkløverpulp derfor undersøges. En række metoder kan bruges til ekstraktion og oprensning af molekyler fra plantemateriale og som har forskellige fordele og ulemper. På laboratorieskala anvendes ofte solventer, der er giftige, flygtige og brandfarlige, da disse i mange tilfælde giver høje ekstraktionsudbytter, og hvor skalaen og konventionelt udstyr i laboratoriet tillader sikkert arbejde med disse solventer. Men anvendelsen af giftige solventer introducerer store udfordringer ved opskalering af disse processer og sådanne solventer er heller ikke tilladte i det økologiske landbrug. Derfor er valget af solvent en vigtig faktor i udarbejdelsen af en skalerbar metode. Ydermere skal processeringen under selve ekstraktionen overvejes, såsom decoction (kogning), soxhlet, maceration (udblødning), percolation (nedsivning), ultralyd og mikrobølger. Hvis de helt specifikke enkelte stoffer fra ekstraktet skal oprenses, anvendes en fraktionering. Dette inkluderer ofte kromatografi, membran filtrering, ionbytning eller solventer med selektiv opløselighed for stofferne (Abubakar & Hague, 2020; Ma et al., 2013). I denne rapport vil der ikke blive fokuseret på én endelig fraktionering eller enkelt stof oprensning, da det er udenfor denne rapport's rammer, og det er uvist, hvorvidt det er nødvendigt, før dyreforsøg er blevet udført.

### 1.2 Valg af solvent og processeringsmetoder

For at minimere produktionsomkostninger vil en velegnet solvent skulle være lettilgængelig og have en lav pris. Derudover vil en lav risikoprofil for solventen være ønsket for at sikre god processikkerhed og et lavt klimatryk, som vil minimere de miljømæssige påvirkninger fra processen (Capello et al., 2007). Til valget af solvent tages GRAS status (Generally Recognized as Safe) og livscyklusvurdering (Life Cycle Assessment) med fokus på lavt cumulative energy demand (CED) og lav CO<sub>2</sub> udledning med i overvejsen. Baseret på disse overvejsler blev acetone og ethanol udvalgt. I gruppen af polære solventer er ethanol og acetone også foretrukne solventer i medicinalbranchen (Tobiszewski et al., 2015). Af de nævnte overvejsler har ethanol mere favorable aspekter såsom GRAS-status og højere flammepunkt, hvilket bidrager til processikkerhed (FDA, 2023, National Academies of Sciences, 2016). Ethanol har yderligere et lavere CED og CO<sub>2</sub> udledning sammenlignet med acetone, og det kan fremstilles miljøvenligt via fermentering (Aditiya et al., 2016; Amelio et al., 2014; Raymond et al., 2010). Ethanol og acetone har begge den favorable egenskab, at de er bionedbrydelige (Pielech-Przybylska et al., 2006; De Bruyn et al., 2020). En mulighed for at øge

ekstraktionsudbyttet er via brugen af hjælpestoffer f.eks cycleodextriner, der er cykliske sukermolekyler, som ifølge litteraturen har vist at øge udbyttet af isoflavoner. Mekanismen bag formodes at være via kompleksdannelse med forbedret opløselighed (Kazlauskaite et al., 2021). En anden lovende ekstraktionsmetode er superkritisk CO<sub>2</sub> ekstraktion. Her anvendes CO<sub>2</sub> under superkritiske forhold, hvilket giver det en væskelignende form, hvor det har god diffusion i matrix, lav viskositet og overfladespænding, og dets egenskaber kan justeres ved at variere temperatur og tryk. Metoden er ikke toksisk eller brandbar, og der er ikke mulighed for resterende CO<sub>2</sub> i ekstraktet, da CO<sub>2</sub> ved normale atmosfæriske forhold er som gas. Udfordringer ved metoden er behovet for højt specialiseret udstyr samt CO<sub>2</sub>'s begrænsede opløselighedsevner, hvilket kan nødvendiggøre brugen af et co-solvent, som kan modarbejde fordelene ved processen (Díaz-Reinoso et al., 2006). Superkritisk CO<sub>2</sub> ekstraktion blev dog ikke undersøgt i denne rapport.

En faktor, der påvirker den biologiske aktivitet af isoflavonerne, er, at de naturligt forekommer som glycosider, der er inaktive grundet bindingen af en sukkerenhed. Derfor anvendes ofte syre eller base hydrolyse til at frigive den aktive aglycon. En ny interessant artikel har derfor undersøgt auto-hydrolyse som et grønt og let alternativ til at frigive aglyconet og derved få dannet et bioaktivt stof. Under auto-hydrolyse opbevares plantematerialet i vand under mild opvarmning for at tillade naturligt fremkommende enzymer adgang til glykosidbindingen, så den kan hydrolyseres (Malca-Garcia et al., 2021).

Processeringen er ligeledes en vigtig overvejelse. Opvarmning vil gerne undgås, da det introducerer høje omkostninger til energi og opvarmning af brandbare solventer skal begrænses for at mindske risiko ved processen. Derfor vil maceration og ultralyd anvendes, og ydermere vil det undersøges, om tilføjelsen af hjælpestoffer vil øge udbyttet. For at undgå brugen af stærkt ætsende stoffer vil autohydrolyse undersøges som alternativ.

Derfor er ideen bag en skalerbar fremstilling af et biochanin A ekstrakt fra rødkløverpulp at anvende ethanol eller acetone assisteret af auto-hydrolyse og ultralyd.

Solventkoncentrationen skal bestemmes, og acetone anvendes ved 70% på baggrund af tidligere erfaringer (upublicerede resultater) og fra litteraturen. Ethanol koncentrationerne og forsøgsparametre er baseret på fund i litteraturen (tabel 1 og tabel 2).

**Tabel 1. Anvendt litteratur til bestemmelse af ethanol koncentrationer.**

Artikel	EtOH (%)	Ratio	Titel
Malca-Garcia 2021	100	1:30	Auto-hydrolysis of red clover as "green" approach to (iso)flavonoid enriched products
Sivesind 2005	88,8	1:20	Effects of the Environment, Cultivar, Maturity, and Preservation Method on Red Clover Isoflavone Concentration
Butkutè 2017	70	1:10	Perennial legumes as a source of ingredients for healthy food: proximate, mineral and phytoestrogen composition and antibacterial activity
Gligor 2023	70	1:10	An In Vitro and In Vivo Assessment of Antitumor Activity of Extracts Derived from Three Well-Known Plant Species
Gligor 2022	70	1:10	Red Clover and the Importance of Extraction Processes—Ways in Which Extraction Techniques and Parameters Affect <i>Trifolium pratense</i> L. Extracts' Phytochemical Profile and Biological Activities
Kazlauskaite 2021	50/70	1:30	Novel Extraction Method Using Excipients to Enhance Yield of Genistein and Daidzein in <i>Trifolium pratense</i> L.

Gościński 2023	50	1:100	Multidirectional Effects of Red Clover ( <i>Trifolium pratense</i> L.) in Support of Menopause Therapy
Butkutė 2014	50	1:40	Source of variation of isoflavone concentrations in perennial clover species
Kazlauskaitė 2022	50	1:30	The Effect of Traditional and Cyclodextrin-Assisted Extraction Methods on <i>Trifolium pratense</i> L. (Red Clover) Extracts Antioxidant Potential
<b>Ekstraktion fra andre planter</b>			
Yatsu 2016	96	1:12/1:20	Isoflavone-aglycone fraction from <i>Glycine max</i> : a promising raw material for isoflavone-based pharmaceutical or nutraceutical products
Ma 2013	80	1:6	Simple and efficient preparation of biochanin A and genistein from <i>Dalbergia odorifera</i> T. Chen leaves using macroporous resin followed by flash chromatography
Franke 1994	76,8	1:50	Quantitation of Phytoestrogens in Legumes by HPLC

**Tabel 2. Anvendt litteratur til bestemmelse af forsøgsparametre.**

Artikel	UAE (min)	Maceration (min)	Titel
Zgórka 2009	30		Ultrasound-assisted solid-phase extraction coupled with photodiode-array and fluorescence detection for chemotaxonomy of isoflavone phytoestrogens in <i>Trifolium</i> L. (Clover) species
Rijke 2001	60		Determination of isoflavone glucoside malonates in <i>Trifolium pratense</i> L. (red clover) extracts: quantification and stability studies
Taujenis 2015	60		Identification of isoflavones and their conjugates in red clover by liquid chromatography coupled with DAD and MS detectors
Klejdus 2001	60		Identification of isoflavone conjugates in red clover ( <i>Trifolium pratense</i> ) by liquid chromatography–mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction
Wang 2009	30		Variable Isoflavone Contents of Red Clover Products Affect Intestinal Disposition of Biochanin A, Formononetin, Genistein and Daidzein
LEMEŽIENĖ 2015	30	90	The concentration of isoflavones in red clover ( <i>Trifolium pratense</i> L.) at flowering stage
Saviranta 2007	30		Red clover ( <i>Trifolium pratense</i> L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar
Zgórka 2009	30		Pressurized liquid extraction versus other extraction techniques in micropreparative isolation of pharmacologically active isoflavones from <i>Trifolium</i> L. species
Temerdashev 2021	30	1440	Assessment of the Concentrations of Isoflavonoids in Red Clover ( <i>Trifolium pratense</i> L.) of the Fabaceae Family Using Extraction by Different Methods
Kazlauskaitė 2021	30		Cyclodextrin-Assisted Extraction Method as a Green Alternative to Increase the Isoflavone Yield from <i>Trifolium pratense</i> L. Extract
Tsao 2006		960	Isoflavone Profiles of Red Clovers and Their Distribution in Different Parts Harvested at Different Growing Stages



### 3. Materialer og metoder

#### 2.1 Plantemateriale og pulp

Hammon rødkløver blev høstet fra en forsøgsmark på Højbakkegaard ved Københavns Universitet og leveret som frossen helplante af Professor Stig Milan Thamsborg, Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab, Københavns Universitet. Plantematerialet blev optøet ved 5°C, hvorefter det blev presset igennem en Angel® Juicer to gange for at separere juice og pulp.

#### 2.2 Autohydrolyse

Autohydrolyse blev udført ved at udbløde pulp i vand i ratioen 1:12 (g/ml) ved 28°C i 24 timer. Pulpen blev efterfølgende filteret igennem et 45 µm polypropylen filter (Millipore®) i en Büchner tragt for at separere vandet fra pulpen. Det tilbageholdte, nu autohydrolyseret pulp blev anvendt til solvent ekstraktion.

#### 2.3 Solvent Ekstraktion

Til solvent ekstraktion blev 5 g pulp udblødt i 60 ml (1:12) solvent i 2 timer, hvorefter det blev sonikeret i 30 minutter i et Bandelin Sonorex Digitec DT 156 ultralydsbad med en nominal kraft på 160 W ved stuetemperatur. De sonikerede prøver blev filteret igennem et 45 µm polypropylen filter (Millipore®) i en Büchner tragt for at separere pulp fra solvent. Permeatet blev inddampet i et RapidVap® Vakuumbfordampningssystem, og det koncentreret ekstrakt blev frysetørret for at fjerne det resterende vand.

#### 2.4 Tørvægtsbestemmelse

Tørvægtsbestemmelse blev udført ved at notere vægten af vådt plantemateriale som efterfølgende blev tørret i 24 timer ved 105°C, hvorefter materialet blev vejlet igen for at bestemme væsketabet.

#### 2.5 Isoflavon analyse med HPLC-DAD-HRMS

Til isoflavon analyse blev 5 mg af hvert ekstrakt afvejet og opløst i 1 ml methanol ≥99.9% grade methanol (HiPerSolv, VWR). De opløste prøver blev centrifugeret ved 14.100 x g i en Eppendorf™ MiniSpin® plus centrifuge. Standard opløsninger af biochanin A (96,5%, Sigma-Aldrich), formononetin (98,9%, Supelco®), genistein (99%, Sigma-Aldrich) og daidzin (99,6%, Supelco®) blev fremstillet med samme fremgangsmetode. Biochanin A (0,5-0,015 mg/ml), formononetin (0,25-0,015 mg/ml), genistein (0,25-0,0078 mg/ml) og daidzein (0,125-0,0078 mg/ml) standardrækker blev lavet via en fortyndingsrække i methanol. Ved analysen blev standarderne kørt fra lavest til højest koncentration men en vask imellem hvert stof.

Ekstraktet med en 10 µl injektionsvolumen blev analyseret med HPLC-DAD-HRMS på et Hitachi LaChrome Elite HPLC-system med en L-2130 pumpe, L-2200 autosampler, 40°C L-2300 kolonneovn udstyret med en phenomenex Kinetex 5 µm XB-C18 100 Å kolonne. En L-2450 DAD-detektor målte fra 190-900 nm koblet til en Bruker compact MS ESI-qTOF i positive mode. En gradient på 1,2 ml/min startede på 10% acetonitril (HiPerSolv) tilsat 0.1% formic acid (98%, Sigma-Aldrich) og 90% LCMS-grade vand (HiPerSolv) tilsat 0.1% formic acid og steg til 100% acetonitril over 17 minutter hvor den blev holdt på 100% ACN indtil 21 minutter. Systemet blev styret af HyStar v. 3.2 (Bruker Daltonics) og dataanalyse blev udført i Compass DataAnalysis v. 4.2 (Bruker Daltonics).

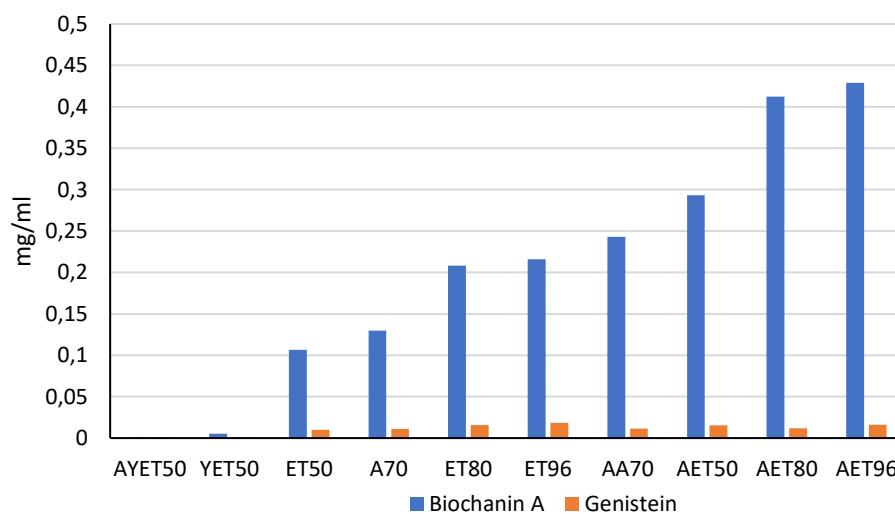
## 2.6 Dataanalyse

Isoflavon kvantificering blev udført med ekstern kalibrering via standardrækker. Standardrækker findes i bilag. Elueringspeak i HPLC kromatogrammer blev identificeret ud fra ion masse, UV spektra samt elueringstiden sammenholdt med standarder. En ensidet parvis t-test blev anvendt til udregning af P værdi. ChemCals MF analysis blev anvendt til bestemmelse af monoisotopiske masse.

## 4. Resultater

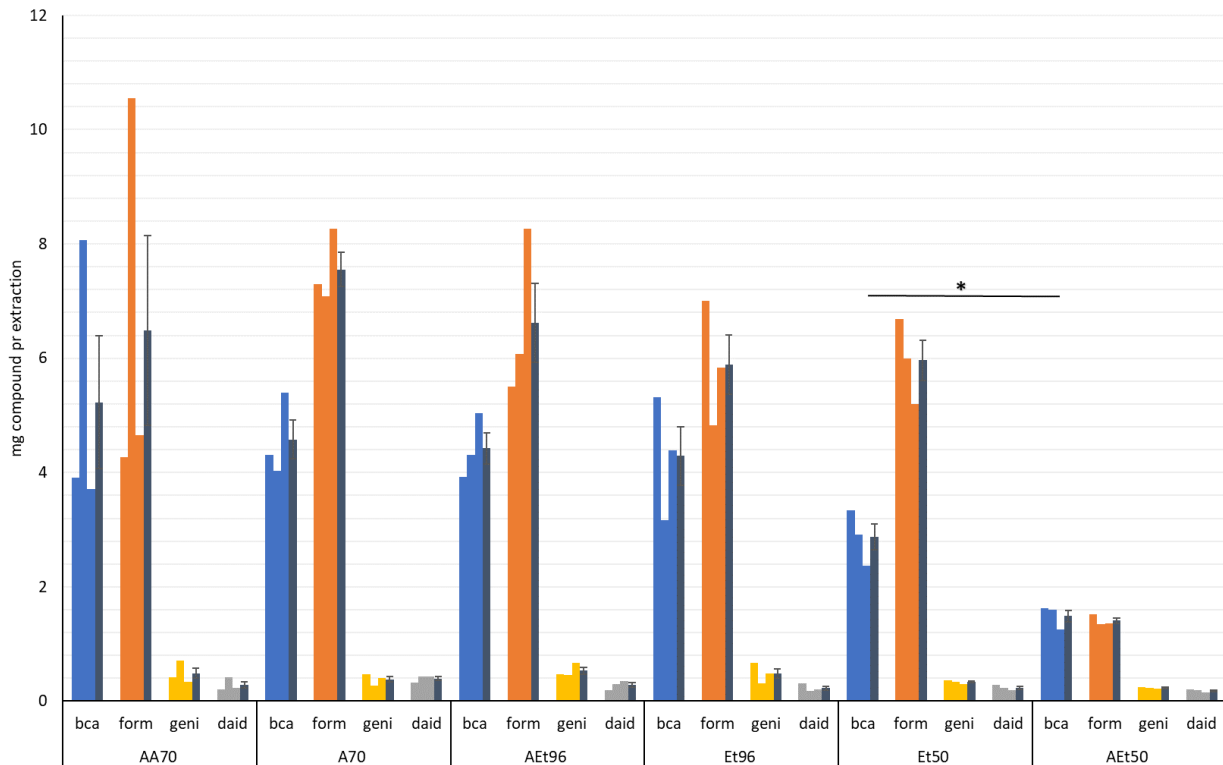
En indledende analyse blev først udført med enkeltbestemmelse for at sammenligne ekstraktionsmetoder. For at afgrænse prøveantallet blev kun biochanin A og genistein undersøgt (figur 1). Denne indledende analyse blev også anvendt til at udvikle ekstraktionsforholdene og bekræfte analysemetoden. Efterfølgende blev udvalgte og lovende forhold gentaget med triplikater for bedre nøjagtighed samt flere standarder, biochanin A, genistein, formononetin og daidzein, blev inkluderet. I det tidligere studium blev ekstraktion foretaget med 70% acetone A70 (ikke-publicerede resultater).

Til navngivning af prøver anvendes følgende forkortelser; Et: Ethanol, A: Acetone, 50-70-80-96: Solvent koncentration, A foran: Autohydrolyseret, Y:  $\gamma$ -Cyclodextrin. BCA: Biochanin A, Geni: Genistein, Form: Formononetin, Daid: Daidzein.



**Figur 1: Indledende analyse af BCA og Geni. 5 mg ekstrakt opløst i 1 ml methanol. Sorteret efter BCA koncentration med lavest koncentration i prøverne til venstre i figuren.**

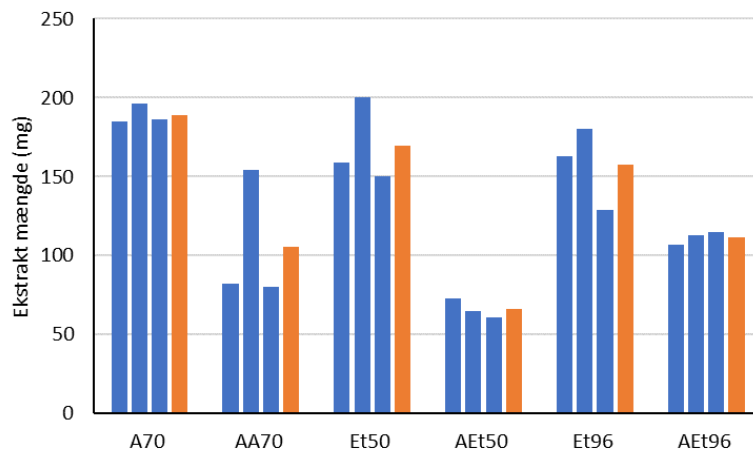
Ekstraktmængden ved de forskellige ekstraktionsmetoder blev ikke målt, og i stedet er det koncentrationen af det udvundne ekstrakt, der fremgår i figur 1. AYET50 og YET50 var begge udenfor grænserne for standardkurven, og derfor har den udregnede koncentration for disse to prøver lav sikkerhed. Men da begge prøverne er under standardkurvens laveste koncentration, er konklusionen for de to ekstraktioner, at  $\gamma$ -Cyclodextrin ikke har vist sig at være gavnlige for ekstraktionen. Til gengæld viste den indledende analyse en positiv effekt af autohydrolyse, samt at høje koncentrationer af ethanol medfører højest ekstraktion af biochanin A. Generelt er der et lavt indhold af genistein i prøverne, hvilket i mindre grad er påvirket af solvent koncentration. Baseret på denne indledende analyse blev autohydrolyse, acetone 70%, ethanol 50% og 96% udvalgt til mere grundig analyse med triplikat bestemmelse (figur 2).



**Figur 2: Totalt udbytte pr ekstraktion af Biochanin A, Formonotin, Genistein og Daidzein. Triplikator med gennemsnit (grå) og Standard fejl (SEM). Sorteret efter højest gennemsnitlig BCA-udbytte. P værdier udregnet med ensidet parvis t test.**

Der blev anvendt en ensidet parvis t test til at analysere resultaterne. Ved at sammenligne autohydrolyserede prøver med ikke autohydrolyserede blev der for prøverne ikke set en konsekvent og entydig effekt. For anvendelse af 50% ethanol var der dog en signifikant forskel på prøverne, hvor der var en signifikant mindre mængde ekstraheret BCA i forbindelse med autohydrolysering i forhold til prøver, der ikke først var autohydrolyserede. Sammenligningen af solventer viste ikke nogen signifikant effekt, dog er der en marginal  $P = 0.06$  reduktion ved anvendelse af 50% ethanol sammenlignet med anvendelse af 96% ethanol eller 70% acetone. Data indikerer, at 70% acetone og 96% ethanol har sammenlignelige ekstraktionsevner og er ligeledes mere effektive end 50% ethanol. Den positive effekt af autohydrolysen set i den indledende analyse formodes at skyldes en forskel i ekstraktmængden, hvilket kunne påvirke koncentrationen. Ved autohydrolyse hvor der blev anvendt samme mængde tørstof sker der en 44,7% gennemsnitlig reduktion i ekstraktmængden (figur 3), som der ikke blev medregnet i den indledende analyse.



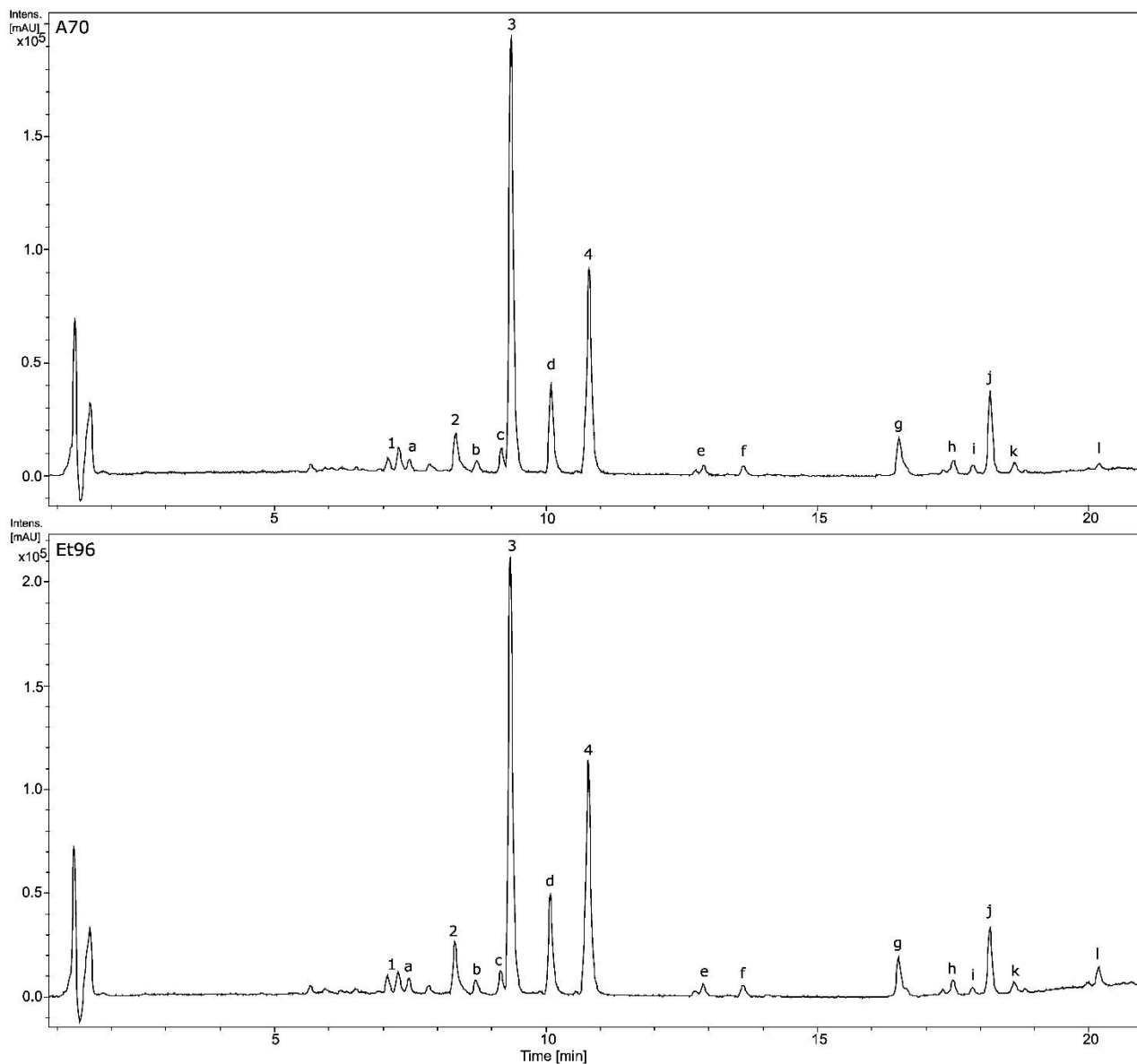


**Figur 3: Ekstrakt mængder fra hver ekstraktion, angivet i mg. Blå: Målinger, Orange: Gennemsnit**

Koncentrationen af biochanin A og formononetin er sammenlignelige, dog med en højere mængde formononetin (figur 2). Ved tidligere forsøg har koncentration af biochanin A og formononetin stort set været ens (ikke-publicerede resultater). Variation er dog begrænset. Generelt ses en lav mængde genistein og daidzein i prøverne hvilket også stemmer ens med tidligere observationer.

Som det ses af ekstrakterne, er der et højt indhold af biochanin A, men et lige så højt indhold af formononetin (figur 2). Tidligere *in vitro* undersøgelser har vist, at de forskellige isoflavoner testet i samme koncentration på 250 µg/ml har vidt forskellig effekt på spolorm (ikke-publicerede resultater). Den største dødelighed ses ved biochanin A, hvor der er tæt på 100% dødelighed for spolorm, som derfor er den isoflavon, der er mest betydningsfuld at ekstrahere. Formononetin har derimod ingen effekt, så selv om stoffet også forekommer i ekstraktet, er det ikke bioaktivt overfor de spolorme, der er blevet testet.

Kromatogrammer for A70 og Et96 er vist i figur 4 som eksempel. Her ses, at ekstrakterne indeholder relativt få stoffer. Da der i forsøget er inkluderet 4 forskellige stoffer som standard, er det derfor kun muligt konkret at kunne identificere disse peaks (1, 2, 3 og 4). Baseret på kendte rødkløver stoffer fra litteraturen, ion masser samt tilgængelige UV spektra er mulige stoffer identificeret i HPLC kromatogrammerne (a, b, c, og d) (Wu 2003) (tabel 3). Disse potentielle stoffer er calycosin, pratensein, pseudobaptigenin og irilon. Yderligere ion masser er noteret i tabel 4.



Figur 4: A70 og Et96 kromatogram med notering.

**Tabel 3: Stofnavn med tilhørende afmærkning i kromatogrammer (figur 4). Teoretisk masse er monoisotopisk masse af  $[M+H]^+$  ion. Afvigelsen mellem teoretisk og den observeret masse er udregnet i ppm.**

Stofnavn	#	Formel	Teoretisk masse	Observeret masse	Afvigelse ppm
Daidzein	1	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	255,06573	255,0654	-1,293784
Genistein	2	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	271,06065	271,0607	0,184461
Formononetin	3	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	269,08138	269,0812	-0,668943
Biochanin A	4	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	285,07630	285,0762	-0,350783
Calycosin	a	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	285,0762	285,0763	0,350783
Pratensein/Irilin B	b	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	301,07121	301,0713	0,298933
Pseudobaptigenin	c	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	283,06065	283,0607	0,176641
Irilone	d	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	299,05556	299,0555	-0,200632

**Tabel 4: Afmærkning i kromatogrammer (figur 4) med observeret ionmasse.**

#	Ion masse
e	277,2162
f	279,2306
g	691,349
h	256,264
i	609,2732
j	593,2761
k	593,2773
l	855,7435

## 5. Konklusion/diskussion

Anvendelsen af 70% acetone og 96% ethanol giver de højeste ekstraktionsudbytter og anvendelse af de to solventer har sammenlignelige udbytter. Derfor er faktorerne omkring den praktiske anvendelse af disse to solventer den afgørende faktor. Pris indekset i Europa for ethanol og acetone er sammenlignelige ifølge businessanalytiq (Breugel, 2024ab). En bekymring ved de fremstillede ekstrakter er muligheden for solvent rester i ekstraktet, og her har ethanol fordele ved en betydelig lavere toksitet end acetone, men omvendt er acetone lettere at fjerne grundet dets lavere kogepunkt og højere damptryk. Procesmæssigt er ethanol mere favorabelt, med højere flammepunkt, lavere CO<sub>2</sub> udledning ved fremstilling, og lavere toksicitet med en B-værdi for ethanol på 5 mg/m<sup>3</sup>, hvorimod acetone har en B-værdi på 0,4 mg/m<sup>3</sup>. Baseret på de sammenlignelige ekstraktionsudbytter for 70% acetone og 96% ethanol, men mere favorable egenskaber for ethanol, falder anbefaling på brugen af 96% ethanol med en minimumratio på 12 ml pr g pulp kombineret med 30 minutters sonikering.

Der er i litteraturen udført simulering af skalering af en lignende proces til den undersøgte i denne rapport. Simuleringen finder ved sammenligning af forskellige proces skaleringer, at anvendelsen af membraner er med til at reducere prisen på et isoflavon tilskud baseret på rødkløver. Yderligere reduktion af prisen fremkom også ved at anvende membraner til at genanvende solvent (Kawachale & Kumar, 2011). Kombineres viden fra litteraturen med denne rapports fund vil man ved en opskaleret proces anvende 96% ethanol og minimum 12 ml ethanol pr gram rødkløver pulp. Pulpen vil blive blandet med ethanol i en tank med omrører påsat en sonikator probe, der kører i 30 minutter. Blandingen skal filtreres for at separere solvent indeholdende isoflavoner fra pulpen. Dette vil blive opkoncentreret med ultrafiltrering (UF) for at reducere indfødningsvolumen. Permeatet fra UF kan efterfølgende opkoncentreres yderligere med en membrantechnologi kaldet revers osmose (RO). Det opkoncentrerede retentat fra RO processen vil efterfølgende skulle fordampes for at fjerne overskydende ethanol. Daidzein, genistein, formononetin og biochanin A har alle god termostabilitet ved neutral pH; og ved opvarmning til 150C over 7 timer var der begrænset nedbrydning af stofferne (Stintzing et al., 2006). Dette gør det muligt at fjerne ethanol med opvarmning.

For at genanvende solvent skal retentat fra UF, permeat fra RO og kondenseret ethanol fra fordampning opsamles og rengøres. Genanvendelse af solvent vil reducere omkostninger samt vil gøre processen mere miljøvenlig.

Dyrkning af rødkløver sker ofte i form af kløvergræs, og der blev også i dette arbejde foretaget en analyse af rajgræs, hvor der ikke blev identificeret isoflavoner. Dette betyder, at ekstraktionen idealt skal udføres på ren rødkløver, da effektiviteten sandsynligvis vil falde proportionalt med græsmængden i kløvergræs blandinger. Ydermere er der set forskellige isoflavon koncentrationer i forskellige sorter af rødkløver, og sorten Hammon er identificeret til sorten med den højeste biochanin A koncentration (ikke-publicerede resultater). Sæsonmæssige variation, mark placering og plantealder har også vist at have en indflydelse på isoflavon mængder, dog har sorten den største indflydelse. Det bedste høsttidspunkt identificeret i litteraturen er unge planter, der ikke er blomstret (Sivesind et al., 2005, Saviranta & Seguin, 2007), hvilket også passer godt med de optimale tidspunkter for høst til proteinudvinding (Santamaria-Fernandez et al., 2019).

Til fremtidigt arbejde er det vigtigt at undersøge, hvorvidt der er behov for grundig oprensning af ekstraktet til et enkelt bioaktivt stof fremfor ekstraktionsmetoderne anvendt i denne rapport, hvor der blev ekstraheret flere stoffer. I *in vitro* forsøg har biochanin A vist at være ansvarlig for den potente antiparasitisk effekt på spolorm, og derfor kan en synergetisk effekt sandsynligvis udelukkes i dette tilfælde. Ved fremstilling af et antiparasitisk bioaktivt stof skal oprensningen derfor fokuseres på biochanin A. Størrelses- og strukturforskellen mellem stofferne i ekstraktet er for lav til at anvende membraner, derfor vil en oprensning skulle bygges på søjle kromatografi, specifik kompleksdannelse eller krystallisering.

En udfordring med videre arbejde med rødkløveksktraktet er dets konsistens, da det har høj viskositet og er klæbrigt. Præliminært arbejde har vist, at tilsætning af 0,4 % CaCl<sub>2</sub> til ethanolen efter ekstraktionen giver et endeligt ekstrakt med en pulveragtig konsistens.

Dyreforsøg er et vigtigt næste trin at udføre, da den antiparasitiske effekt er vigtigt at bestemme *in vivo*, da det ikke vides, om ekstraktet tilsat som et foderadditiv har en effekt i dyret. Rødkløver ekstrakter og kostskud har fordelen af en lang historie. Brugen af rødkløver ekstrakter og isoflavoner er særlig udbredt ved lindring af symptomer ved postmenopausale kvinder, hvor det har vist at være sikkert at indtage (Powles 2008). Baseret på dette kan fodring af rødkløver ekstrakter til svin for at hæmme eller bekæmpe spoleorms infektion formodes at være sikkert. Men denne antagelse skal bekræftes i dyreforsøg. Ydermere er den effektive dosering nødvendig at undersøge.

Videre arbejde vil derfor fokusere på dyreforsøg for validering af biochanin A *in vivo* og hvis det viser sig at have gavnlige effekt, skal der arbejdes med opskalering og med at finde den korrekte implementering i landbruget, så det kan gavne erhvervet.

## 6. Litteraturliste

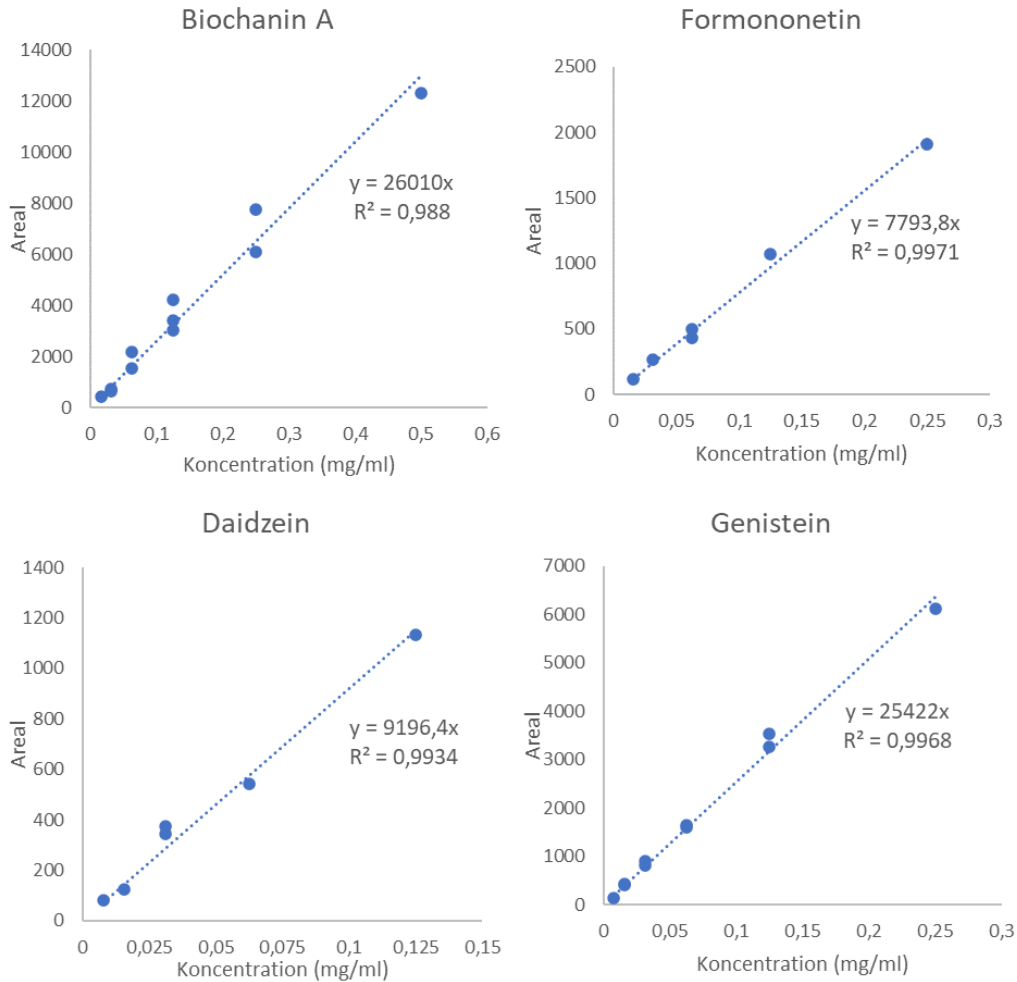
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020).** Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(1), 1.
- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016).** Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 66, 631-653.
- Amelio, A., Genduso, G., Vreysen, S., Luis, P., & Van der Bruggen, B. (2014).** Guidelines based on life cycle assessment for solvent selection during the process design and evaluation of treatment alternatives. *Green Chemistry*, 16(6), 3045-3063.
- Breugel, M (2024)a.** Acetone price index  
<https://businessanalytq.com/procurementanalytics/index/acetone-price-index/> tilgået marts 2024
- Breugel, M (2024)b.** Ethanol price index  
<https://businessanalytq.com/procurementanalytics/index/ethanol-price-index/> tilgået marts 2024
- Capello, C., Fischer, U., & Hungerbühler, K. (2007).** What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9(9), 927-934.
- De Bruyn, W. J., Clark, C. D., Senstad, M., Toms, N., & Harrison, A. W. (2020).** Biological degradation of ethanol in Southern California coastal seawater. *Marine Chemistry*, 218, 103703.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012).** A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336.
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006).** Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(7), 2441-2469.
- Kawachale, N., & Kumar, A. (2011).** Simulation, scale-up and economics of adsorption and membrane based processes for isoflavones recovery. *Chemical Engineering Research and Design*, 89(4), 428-435.
- Kazlauskaitė, J. A., Ivanauskas, L., & Bernatoniene, J. (2021).** Cyclodextrin-Assisted Extraction Method as a Green Alternative to Increase the Isoflavone Yield from *Trifolium pratensis* L. Extract. *Pharmaceutics*, 13(5), 620.
- Ma, F. Y., Luo, M., Zhao, C. J., Li, C. Y., Wang, W., Gu, C. B., ... & Fu, Y. J. (2013).** Simple and efficient preparation of biochanin A and genistein from *Dalbergia odorifera* T. Chen leaves using macroporous resin followed by flash chromatography. *Separation and Purification Technology*, 120, 310-318.
- Malca-Garcia, G. R., Liu, Y., Dong, H., Nikolić, D., Friesen, J. B., Lankin, D. C., ... & Pauli, G. F. (2021).** Auto-hydrolysis of red clover as “green” approach to (iso) flavonoid enriched products. *Fitoterapia*, 152, 104878.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2016.** *Chemical Laboratory Safety and Security: A Guide to Developing Standard Operating Procedures*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/21918>.
- Pielech-Przybylska, K., Ziemiński, K., & Szopa, J. S. (2006).** Acetone biodegradation in a trickle-bed biofilter. *International biodeterioration & biodegradation*, 57(4), 200-206.

- Powles, T. J., Howell, A., Evans, D. G., McCloskey, E. V., Ashley, S., Greenhalgh, R., ... & Tidy, A. (2008).** Red clover isoflavones are safe and well tolerated in women with a family history of breast cancer. *Menopause international*, 14(1), 6-12.
- Raymond, M. J., Slater, C. S., & Savelski, M. J. (2010).** LCA approach to the analysis of solvent waste issues in the pharmaceutical industry. *Green Chemistry*, 12(10), 1826-1834.
- Santamaría-Fernández, M., Karkov Ytting, N., & Lübeck, M. (2019).** Influence of the development stage of green plants for the recovery yields of extractable proteins using lactic acid fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 162, 875-881.
- Santamaría-Fernández, M. & Lübeck, M. (2020).** Production of leaf protein concentrates in green biorefineries as alternative feed for monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology*, 268, 114605.
- Saviranta, N. M., Anttonen, M. J., von Wright, A., & Karjalainen, R. O. (2008).** Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(1), 125-132.
- Sivesind, E., & Seguin, P. (2005).** Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6397-6402.
- Stintzing, F. C., Hoffmann, M., & Carle, R. (2006).** Thermal degradation kinetics of isoflavone aglycones from soy and red clover. *Molecular nutrition & food research*, 50(4-5), 373-377.
- Tobiszewski, M., Tsakovski, S., Simeonov, V., Namieśnik, J., & Pena-Pereira, F. (2015).** A solvent selection guide based on chemometrics and multicriteria decision analysis. *Green Chemistry*, 17(10), 4773-4785.
- U.S FOOD & DRUG ADMINISTRATION. 2023.** CFR - Code of Federal Regulations Title 21.
- Wu, Q., Wang, M., & Simon, J. E. (2003).** Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of chromatography A*, 1016(2), 195-209.



## 7 Bilag

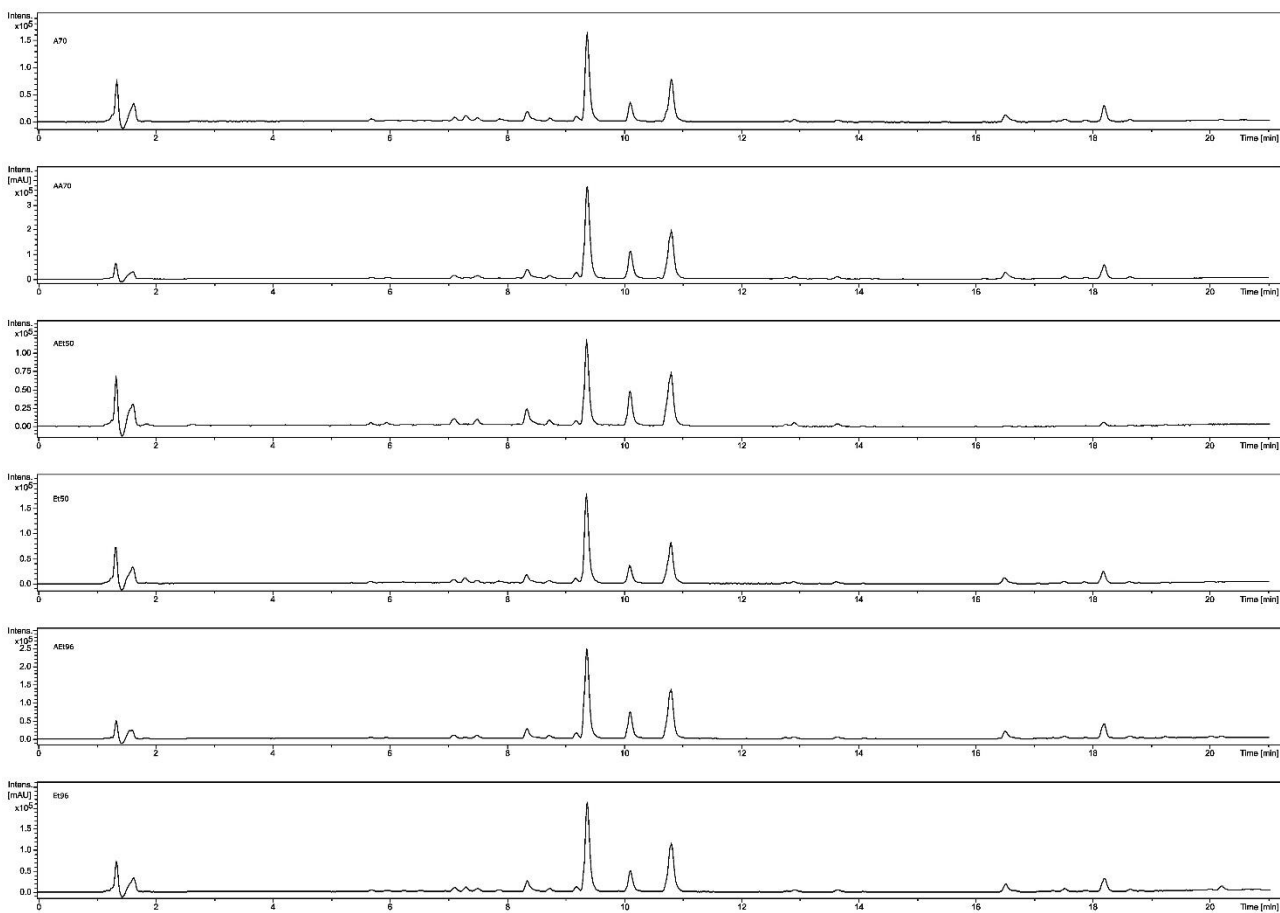
Standardkurverne har alle en acceptabel forklaringsgrad på  $R^2 \geq 0.98$  samt befinder alle prøvemålinger sig indenfor standardkurvens grænser med undtagelse af datapunkter noteret i tabel.



Standard kurver anvendt til ekstern kalibrering.

Oversigt med prøver udenfor standardrækkens koncentration, derfor har disse datapunkter lavere nøjagtighed.

Daidzein		Formononetin		Biochanin A		Genistein	
A70 1	Under	AA70 1	Over	Aet80	Over	Yet50	Under
Et50 1	Under	AA70 2	Over	Aet96	Over	AYEt50	Under
Et50 2	Under	AA70 3	Over	Yet50	Under		
Et50 3	Under	Aet96 1	Over	AYEt50	Under		
Et96 1	Under	Aet96 2	Over				
Et96 2	Under	Aet96 3	Over				



Udsnit af alle kromatogrammer, A70, AA70, Aet50, Et50, Aet96, Et96.