

PROTEIINIEN IMEYTYMISEN TUTKIMINEN *IN*
VITRO -MALLEILLA

Ojala Katriina

Kandidaatin tutkielma

Ravitsemustiede

Lääketieteen laitos

Terveystieteiden tiedekunta

Itä-Suomen yliopisto

Toukokuu 2018

Itä-Suomen yliopisto, Terveystieteiden tiedekunta
Kansanterveystieteen ja kliinisen ravitsemustieteen yksikkö
Ravitsemustiede
OJALA KATRIINA M: Proteiinien imeytymisen tutkiminen *in vitro* -malleilla
Kandidaatin tutkielma, 32 sivua, 3 liitettä (7 sivua)
Ohjaaja: Kati Väkeväinen
Toukokuu 2018

Avainsanat: *in vitro* -menetelmä, proteiinit, imeytyminen, *in vitro* – *in vivo* -korrelaatio

PROTEIINIEN IMEYTYMISEN TUTKIMINEN *IN VITRO* -MALLEILLA

Yksi tärkeimmistä ruoan makronutrienteista ovat ruoan sisältämät proteiinit ja erityisesti kasvipäriset proteiinit ovat olleet suuren kiinnostuksen kohteena sekä kuluttajien, että tutkijoiden parissa viime vuosina. Proteiinien imeytymiseen ja hydrolysoitumiseen voivat vaikuttaa monet tekijät, mutta niiden imeytymisestä ruoansulatuskanavassa tiedetään edelleen suhteellisen vähän. Koe-eläimillä tehdyt *in vivo* -tutkimukset tarjoavat luotettavimpia vastauksia ihmisen ruoansulatuskanavan toimintaan liittyen, mutta ne ovat usein kalliita, hitaita ja eettisesti kyseenalaisia tuottaa. Tämän vuoksi proteiinien hajoamista ruoansulatuksen eri vaiheissa on tutkittu viime aikoina paljon erilaisia *in vitro* -ruoansulatusmalleja hyödyntäen. Tämän kandidaatin tutkielman tavoitteena oli käydä läpi näitä eri *in vitro* -malleja ja selvittää, kuinka niitä voidaan hyödyntää proteiinien imeytymien tutkimisessa. Tutkielma tuotettiin kirjallisuuskatsauksena.

Tämän tutkielman perusteella voidaan todeta, että *in vitro* -mallit ovat käyttökelpoinen työkalu proteiinien imeytymisen tutkimisessa. Niillä voidaan ennustaa suhteellisen hyvin proteiinien käyttäytymistä *in vivo* erityisesti silloin, kun ruokanäytteenä toimii yksinkertainen proteiiniliuos tai ruokamatriisi. *In vitro* -mallien kyvystä ennustaa monimutkaisempien ateriakokonaisuuksien imeytymistä elimistöstä ei kuitenkaan tiedetä tarpeeksi, joten aterian muiden komponenttien vaikutusta imeytymiseen on toistaiseksi vaikea ennustaa. Tutkimuksissa käytetyissä *in vitro* -malleissa on myös suuria eroja, jotka vaikuttavat saatuihin tuloksiin, mikä vaikeuttaa tulosten vertailua. Tulosten vertailun parantamiseksi, tulisi jatkossa tehdä tutkimusta hyödyntäen kansainvälisessä konsensuksessa laadittuja standardeja *in vitro* -malleille, joilla on onnistuttu parantamaan tulosten yhtenevyyttä ja *in vitro* – *in vivo* -korrelaatiota.

LYHENNELUETTELO

SSF	Simulated Salivary Fluid	Sylkeä jäljittelevä liuos
SGF	Simulated Gastric Fluid	Mahanestettä jäljittelevä liuos
SIF	Simulated Intestinal Fluid	Pohjukaissuolinestettä jäljittelevä liuos
IVIVC	<i>In vitro-in vivo</i> correlation	<i>In vitro – in vivo</i> -korrelaatio
EAA	Essential amino acids	Välttämättömät aminohapot
OPA	o-phthalaldehyde spectrophotometric assay	o-ftaalialdehydi spektrofotometrinen menetelmä
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	Natrium-dodekyyli-sulfaatti- polyakryyliamidi-geelelektroforeesi
BCA	The bicinchoninic acid assay	Bisinkoniinihappoanalyysi
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry	Nestekromatografia-massaspektrometri
HPLC	High performance liquid chromatography	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

SISÄLTÖ

1.	JOHDANTO.....	5
2.	RUOANSULATUS.....	6
	2.1 Proteiinien imeytyminen ruoansulatuskanavasta.....	6
	2.2 Kasviproteiinien imeytymiseen vaikuttavat tekijät.....	8
3.	<i>IN VITRO</i> -MALLIT.....	8
	3.1 Staattiset mallit.....	9
	3.1.1 Laboratorioiden sisäiset menetelmät.....	12
	3.1.2 INFOGEST-menetelmä.....	13
	3.2 Dynaamiset mallit.....	15
	3.2.1 Yksiosaiset mallit.....	15
	3.2.2 Kaksi- ja moniosaiset mallit.....	16
	3.3 Proteiinien imeytymistuotteet ja niiden analysointi.....	17
	3.3.1 Kokonaiset proteiinit.....	18
	3.3.2 Peptidit ja aminohapot.....	19
4.	<i>IN VITRO</i> – <i>IN VIVO</i> -KORRELAATIO.....	20
	4.1 <i>In vivo</i> -tutkimuksen peruseriaatteet.....	20
	4.2 Proteiinien imeytymisen <i>in vitro</i> ja <i>in vivo</i> -tutkimuksen aineiston korrelaatio.....	21
5.	POHDINTA.....	23
6.	JOHTOPÄÄTÖKSET.....	26
	LIITTEET.....	33

1. JOHDANTO

In vitro -tutkimusmenetelmillä yleensä viitataan elävän organismin ulkopuolella tehtäviin kokeisiin, joissa tutkimuksen mallisysteemi, kuten mikrobi, solu tai biologinen yhdiste, tuodaan luontaisen ympäristönsä ulkopuolelle (Gad ja Strauss 2000). *In vitro* -testit voivat olla mitä tahansa aina mikrobeilla tuotetuista kokeista erilaisiin matemaattisiin tietokonemalleihin. *In vivo* -tutkimusmenetelmät vastaavasti sijoittuvat elävään organismiin ja ne toteutetaan selkärangkaisilla koe-eläimillä tai ihmisillä.

Kiinnostus ihmisen ruoansulatusjärjestelmää mallintavia *in vitro* -menetelmiä kohtaan on kasvanut huomattavasti viime vuosien aikana. Ruoansulatusmalleja käytetään laajasti monissa tieteellisissä tutkimuksissa korvaamaan osittain ihmis- ja eläinkokeita, jotka ovat usein kalliita, aikaa vieviä ja eettisesti kyseenalaisia (Rozan ym. 1997, Hur ym. 2011, Minekus ym. 2014, Bohn ym. 2017). Erilaisia *in vitro* -ruoansulatusmalleja on olemassa runsaasti ja ne vaihtelevat yksinkertaisista staattisista yksiosaisista (*monocompartmental*) malleista, dynaamisiin moniosaisiin (*multicompartmental*) malleihin (Guerra ym. 2012). Kiinnostus näitä malleja kohtaan on kasvanut erityisesti ravitsemustieteellisessä tutkimuksessa, jossa ollaan oltu yhä kiinnostuneempia ihmisen ruoansulatuksen toiminnasta ja nautitun ruoan ominaisuuksien, kuten aistittavan rakenteen (*texture*), fysikaalisen rakenteen (*structure*), mikrorakenteen (*microstructure*), kemiallisten ominaisuuksien ja kemiallisen koostumuksen (*composition*) vaikutuksista elimistöön ja ihmisen terveyteen (Kong ja Singh 2008, Chen ym. 2011). *In vitro* -mallit ovat kuitenkin nykyisellään liian yksinkertaisia kuvaamaan ihmisen ruoansulatusjärjestelmää (Guerra ym. 2012, Bohn ym. 2017). Tämä ei kuitenkaan vähennä *in vitro* -menetelmien merkittävyyttä tutkimustyökaluina ja niitä voidaan hyödyntää muun muassa esikokeissa ennen monimutkaisempiin *in vivo* -kokeisiin siirtymistä tai uusien hypoteesien rakennuksessa (Minekus ym. 2014).

Proteiinien *in vitro* -tutkimuksessa kiinnostuksen kohteena ovat olleet ruoansulatuksen aikana tapahtuvat kemialliset muutokset, kuten proteiinien hydrolyysi ja rakenteelliset muutokset, kuten proteiinien hajoaminen peptideiksi ja vapaiksi aminohapoiksi (Gatellier ja Santé-Lhoutellier 2009, Hur ym. 2011). Myös erilaisten käsittelymenetelmien, kuten fermentoinnin (Abdel-Aal 2008, Rui ym. 2016) tai kypsennyksen (Gatellier ja Santé-Lhoutellier 2009) vaikutusta proteiinien imeytymiseen on tutkittu. Ymmärtämällä paremmin ruokamatriisin hajoamiseen ja sen komponenttien imeytymiseen liittyviä prosesseja, on mahdollista tuottaa esimerkiksi parempia tuotteita kullekin kuluttajakohderyhmälle (Luo ym. 2015). Tälle tiedolle on myös kysyntää, koska kiinnostus proteiinien merkitystä kohtaan on kasvanut viime vuosina

tasaisesti kuluttajien silmissä (Nunes 2014). Jotta ruoan proteiinien terveysvaikutuksia ja mahdollisia haittoja, kuten allergiaa aiheuttavia ruoan proteiineja, voitaisiin ymmärtää paremmin, on tarpeen tutkia tarkemmin niiden hajoamista, imeytymistä ja metaboliaa elimistössä (Do ym. 2016).

Tämän kandidaatin tutkielman tavoitteena on käydä läpi, minkälaisia *in vitro* -malleja on olemassa, mitkä ovat niiden perustoimintaperiaatteet ja kuinka niitä voidaan hyödyntää proteiinien imeytymisen tutkimisessa. Lisäksi tarkastellaan lyhyesti proteiinien imeytymisen tutkimiseen käytettäviä *in vivo* -malleja ja verrataan, kuinka *in vitro* -malleilla saatu tutkimusaineisto korreloi *in vivo* -malleilla saadun aineiston kanssa.

2. RUOANSULATUS

Ihmisen ruoansulatus on monimutkainen prosessi, jossa nautittu ruoka hajotetaan kehon toimesta ravintoaineiksi (Guerra ym. 2012). Nämä ravintoaineet hyödynnetään muun muassa kehon kasvuun, solujen ylläpitoon ja elimistön polttoaineeksi. Ruoansulatuksen voidaan ajatella koostuvan kahdesta pääprosessista, jotka ilmenevät ruoansulatusjärjestelmässä samanaikaisesti: ruoan mekaanisesta hienonnuksesta, jonka tarkoituksena on pienentää ruoan partikkelien kokoa sekä entsyymaattisesta hienonnuksesta, jonka aikana ruoan makromolekyylit, kuten proteiinit, hiilihydraatit ja lipidit, pilkotaan pienemmiksi osakomponenteiksi eli aminohapoiksi, peptideiksi, vapaiksi rasvahapoiksi ja erikokoisiksi sakkarideiksi hydrolyysireaktioilla. Hydrolysoidut partikkelit voivat tämän jälkeen siirtyä verenkierron kuljetettavaksi elimistössä. Ruoan hajottaminen tapahtuu pääasiassa suussa ja mahalaukussa. Entsyymaattinen hajotus ja ravintoaineiden sekä veden imeytyminen verenkiertoon taas tapahtuu suurelta osin ohut- ja paksusuolella (Guerra ym. 2012).

2.1 Proteiinien imeytyminen ruoansulatuskanavasta

Proteiinien hajotuksen katsotaan alkavan vasta mahalaukussa, jossa ruoan tulo saa aikaan gastriini-nimisen ruoansulatuksen peptidihormonin erityksen (Voutilainen ja Mutanen 2012). Gastriinin erityksellä saa mahalaukun laajenemaan ja se myös lisää mahahapon erittymistä maharauhasten katesoluista. Ruoan sisältämät proteiinit turpoavat hapon vaikutuksesta, mikä saa aikaan pepsinogeenien aktivoitumisen.

Pepsinogeenit ovat pepsinien inaktiivisia esiasteita, jotka jaetaan immunologisiin perusteisiin kahteen ryhmään pepsinogeeni I ja II (Hirschowitz 1984). Pepsinogeenien erityksellä tapahtuu

maharauhasten pääsoluista ja niitä on eristetty yhteensä seitsemän erilaista ihmisen mahalaukusta. Aktivoituessaan, kukin näistä pepsinogeneista muodostaa erilaisen pepsiinin.

Pepsinogeenien erityistä aktivoivat mahahapon lisäksi pepsinogeneista muodostuvat pepsiinit eli kyseessä on autokatalyyttinen reaktiosarja (Voutilainen ja Mutanen 2012). Muodostuneet pepsiinit alkavat hajottaa ruoan proteiineja hydrolysoimalla niitä eripituisiksi polypeptideiksi, joissa on >20 aminohappoa, oligopeptideiksi, joissa on 2–20 aminohappoa ja vapaiksi aminohapoiksi. Pepsiinit toimivat 1,6–3,2 pH:ssa, minkä vuoksi ruokasulan pH:n täytyy ensin laskea mahan happamassa ympäristössä ennen kuin pepsiinit voivat alkaa hydrolysoida ruoan proteiineja. Ruoan puskuroiva vaikutus voi siis hidastaa proteiinien pilkkoutumista mahassa (Luo ym. 2015). Mahalaukussa tapahtuva proteiinien hydrolyysi ei kuitenkaan ole elimistölle välttämätöntä vaan proteiinien pääasiallinen pilkkoutuminen tapahtuu ohutsuolessa, minkä vuoksi esimerkiksi mahalaukun puuttuminen ei vaikuta merkittävästi proteiinien lopulliseen imeytymiseen (Bojsen-Møller ym. 2015).

Ruokamassan siirtyessä mahalaukusta pohjukaissuoleen mahalaukussa erittyneiden pepsiinien toiminta lakkaa, koska ruokamassan happamuus nousee yli pepsiinien pH-optimin (Voutilainen ja Mutanen 2012). Tässä vaiheessa ruokamassa sisältää edelleen kokonaisia proteiineja, suuria polypeptidejä ja vapaita aminohappoja. Ruokamassan saapuminen pohjukaissuoleen ja sen happamuus saa aikaan myös sekretiinin ja kolekystokiniinin erityksen. Näiden vaikutuksesta haima alkaa erittää haimanestettä, joka sisältää useita proteiineja hajottavia entsyymejä. Haimasta erittyessään nämä entsyymit ovat pepsinogeenien tapaan inaktiivisessa muodossa ja ne aktivoituvat vasta ohutsuolessa. Haimanesteen sisältämiin proteolyyttisiin entsyymeihin kuuluvat trypsinogeeni, kymotrypsinogeeni, proelastaasi sekä prokarboksipeptidaasi.

Ohutsuolen limakalvon solut erittävät sapon vaikutuksesta enteropeptidaasi-entsyymiä, joka aktivoi haimanesteen sisältämää trypsinogeenin muuttumista trypsiiniksi (Weaver ja Kelley 2012). Pepsiinin tapaan trypsiini on autokatalyyttinen eli trypsiini aktivoi edelleen trypsinogeenin tuotantoa. Tämän lisäksi trypsiini aktivoi haimanesteen muidenkin proteolyyttisten entsyymien muuttumisen niiden aktiivisiin muotoihin eli kymotrypsiiniksi, elastaaniksi ja karboksipeptidaasiksi (Weaver ja Kelley 2012, Voutilainen ja Mutanen 2012). Trypsiini sitoutuu hajoamattomiin ruoan proteiineihin ja hajoamattoman proteiinin määrä määrittää sen, kuinka kauan trypsiini on kykenevä aktivoimaan trypsinogeenin eritystä (Voutilainen ja Mutanen 2012). Kun ruoan proteiinien hajotus etenee, trypsiinin määrä ohutsuolessa lisääntyy. Määrän noustessa tarpeeksi korkeaksi, käynnistyy haiman negatiivinen takaisinkytkentä, joka saa aikaan trypsinogeenin erityksen vähenemisen.

Proteolyttiset entsyymit alkavat hajottaa ruoan peptidejä, joko peptidiketjun sisältä (endopeptidaasit) tai polypeptidien karboksyyli päästä (eksopeptidaasit) (Voutilainen ja Mutanen 2012). Ohutsuolessa tapahtuvan hydrolyysin seurauksena syntyy pääasiallisesti oligopeptidejä, mutta jonkin verran vapautuu myös vapaita aminohappoja. Peptidien hajotus aminohapoiksi tapahtuu kuitenkin suurimmalta osin suolen epiteelisolujen pinnalla tai solujen sisällä. Suolen solujen pinnalla tapahtuu oligopeptidien pilkkoutuminen aminohapoiksi aminopeptidaasien vaikutuksesta. Osa pilkkotaan myös di- ja tripeptideiksi tripeptidaasien hydrolysoimana. Nämä di- ja tripeptidit hajotetaan lopullisesti vapaiksi aminohapoiksi suolen limakalvon solujen sisällä intrasellulaaristen peptidaasien avulla. Tämän jälkeen vapaat aminohapot siirtyvät verenkierron kuljettamina maksaan.

2.2 Kasviproteiinien imeytymiseen vaikuttavat tekijät

Kasvipohjaisia proteiininlähteitä tarkasteltaessa ollaan kiinnostuneita erityisesti niiden aminohappokoostumuksesta ja proteiinien imeytyvyydestä suhteessa eläinperäisiin proteiininlähteisiin (Weaver ja Kelley 2012). Proteiinien ravitsemuksellinen arvo riippuu proteiinin laadusta eli sen aminohappokoostumuksesta ja sen rakenteesta, mutta myös nautitun ruoan muista komponenteista (Rozan ym. 1997). Jotkin kasvipohjaiset proteiinin lähteet sisältävät tasapainoisesti kaikkia välttämättömiä aminohappoja (*essential amino acids*, EAA), mutta ne sisältävät myös antinutrientteja (*anti-nutritional factors*). Tämän vuoksi näitä proteiininlähteitä, kuten soijapapuja ja rapsinsiemenjauhoa (*rapeseed meal*), täytyy käsitellä, ennen kuin ne sopivat rehuksi tai ihmisravinnoksi. Näillä käsittelyillä voi olla vaikutuksia proteiinien ravitsemukselliseen arvoon, sillä ne usein muuttavat proteiinien rakennetta. Muutkin tekijät, kuten kuidun määrä, mikä useissa kasvipohjaisissa proteiininlähteissä on korkea, voivat vaikuttaa proteiinien imeytyvyyteen negatiivisesti (Rozan ym. 1997). Näin ollen eri lähteistä saaduilla proteiineilla voi olla eroja niiden imeytyvyydessä ja hyödynnettävyydessä.

3. *IN VITRO* -MALLIT

In vitro -malleilla tarkoitetaan tässä yhteydessä ihmisen ruoansulatuskanavan toimintaa jäljitteleviä mallinnusmenetelmiä. Tutkimuksissa käytettyjä *in vitro* -ruoansulatusmalleja on olemassa monimutkaisuudeltaan eritasoisia, suurin osa kirjallisuudessa esitetyistä malleista on staattisia, eli ne eivät huomioi ruoansulatuksenaikaisia mekaanisia ja fysiokemiallisia muutoksia ja prosesseja (Hur ym. 2011, Guerra ym. 2012). Myös dynaamisia malleja, jotka

ottavat nämä prosessit huomioon, on kehitelty ja hyödynnetty tutkittaessa muun muassa lääkeaineiden ja ruoan imeytymistä (Kong ja Singh 2010, Guerra ym. 2016). Staattisia malleja on käytetty tutkittaessa muun muassa mykotoksiinien (Versantvoort ym. 2005), erilaisten makroravintoaineiden, kuten hiilihydraattien (Hasjim ym. 2010), proteiinien (Kopf-Bolanz ym. 2012, Rui ym. 2016) ja lipidien (Mun ym. 2007, Larsson ym. 2012), imeytyvyyttä ja niiden vapautumista ruoan matriiseista (*bioavailability*). Kaikkein tyypillisimmät ruokänäytteet, joita *in vitro* -malleilla on analysoitu, ovat erilaiset kasvipohjaiset ruoat, kuten tärkkelys, tee, riisi tai leipä, joiden osuus kaikista tutkituista näytteistä oli Hurin ym. (2011) katsausartikkelin mukaan 45 %. Artikkelin mukaan toiseksi eniten oli tutkittu lihanäytteitä (18 %) ja kolmanneksi eniten maitotuotteita (9 %), mereneläviä (9 %) ja erilaisia emulsioita (9 %).

Ihanteellisessa tilanteessa *in vitro* -mallit voisivat tarjota tarkkoja vastauksia lyhyessä ajassa ja korvata ihmis- ja eläinkokeet (Coles ym. 2005). Todellisuudessa vielä ei ole onnistuttu kehittämään menetelmiä, jotka pystyisivät täysin mallintamaan *in vivo* -menetelmien avulla saavutettavia olosuhteita, ja eivätkä edes monimutkaisimmatkaan mallit ota huomioon esimerkiksi ruoansulatuskanavan palautejärjestelmiä, sen mikrobistoa, immuunijärjestelmää tai spesifisiä hormonaalisia säätelymekanismeja (Coles ym. 2005, Guerra ym. 2012). Lisäksi vain muutamat mallit ottavat huomioon myös ruoansulatuksen viimeisen vaiheen eli imeytymisen ohutsuolesta solumallien, kuten Caco-2 solujen, avulla (Kopf-Bolanz ym. 2012, Minekus ym. 2014). Proteiinien imeytymistä tutkittaessa yksikään tämän kirjallisuuskatsauksen käsittelemä malli ei ollut hyödyntänyt solumalleja tutkittaessa aminohappojen tai di- ja tripeptidien imeytymistä ohutsuolesta verenkiertoon.

3.1 Staattiset mallit

Staattiset *in vitro* -mallit ovat käytetyimpiä ruoansulatusmalleja ja ne eivät ota huomioon ruoansulatuskanavan dynaamisia ominaisuuksia, kuten esimerkiksi mahalaukun tyhjenemistä (Guerra ym. 2012). Ne voivat sisältää yhdestä kolmeen vaihetta riippuen tutkimuksen tavoitteista. Nämä vaiheet ovat oraallinen vaihe, mahalaukkuvaihe ja ohutsuolivaihe. Suurin osa kirjallisuudessa esiintyvistä malleista on kehitetty jotain spesifistä käyttötarkoitusta, kuten proteiinien hajoamisen (Kopf-Bolanz ym. 2012) tai maaperän myrkkujen vapautumisen tutkimista (Oomen ym. 2003), varten.

Suurimmassa osassa malleista on samankaltaiset pääprosessit. Tyypillisessä esimerkissä mahalaukkuvaihetta mallinnetaan inkuboimalla homogenoitua ruokänäytettä mahanestettä jäljittelevässä liuoksessa (*simulated gastric fluid*, SGF) yhdessä pepsiinien kanssa 1–3 tuntia

(Guerra ym. 2012). Mahalaukkuvaiheenaikainen pH on muuttumaton, ja sen arvo vaihtelee mallista riippuen 1 ja 2 välillä. Myös lämpötila säilyy muuttumattomana ja on tyypillisesti asetettu 37 °C:een, kuten taulukossa 1 kootusti esitetyistä tutkimuksista voidaan havaita. Tämän vaiheen jälkeen yleensä seuraa ohutsuolivaihe, jonka aikana ruokasulaa inkuboidaan yhdessä haiman ruoansulatusentsyymien kanssa. Tässä vaiheessa on mahdollista myös lisätä sappineste. Ohutsuolen olosuhteita pyritään mallintamaan säätämällä pH-arvo 6:n ja 7:n välille (Taulukko 1), minkä katsotaan vastaavan ohutsuolen fysiologista happamuutta ihmisellä.

Kuten taulukosta 1 voidaan havaita, osa malleista sisältää aivan mallinnuksen alussa myös oraalisen vaiheen, jossa homogenoitua ruokanäytettä inkuboidaan sylkinestettä jäljittelevässä liuoksessa (*simulated salivary fluid*, SSF). Pureskelu on moninainen tapahtuma, johon vaikuttavat muun muassa ruoan koostumus ja määrä sekä pureskeluvoima, hampaiden kunto ja pureskelukierrosten lukumäärä (Lucas ym. 1986, Fontijn-Tekamp ym. 2000, Engelen ym. 2005). Kaikki nämä seikat vaikuttavat nielaistujen ruokapartikkelien kokoon, muotoon ja pinta-alaan (Agrawal ym. 1997). Ruoan pureskelu ja siihen kuuluva aika ovat täten hyvin yksilöllisiä tapahtumia, ja sen vuoksi niitä on vaikea ottaa huomioon staattisissa *in vitro* -malleissa (Minekus ym. 2014). Kiinteät ruokapartikkelit suositellaan standardoimaan kokonsa puolesta mahdollisimman homogeeniseksi massaksi hyödyntämällä kaupallisesti saatavilla olevia lihamyllyjä.

Eri malleissa on käytetty eri inkubointiaikoja oraalisen vaiheen mallintamiseen. Pisimmillään ruokanäytettä on inkuboitu viisi minuuttia (Versantvoort ym. 2005, Kopf-Bolanz ym. 2012), mutta kansainvälisessä yhteisymmärryksessä laadittu harmonoitu (*harmonized*) malli suosittelee lyhyempää, kahden minuutin inkubointiaikaa (Minekus ym. 2014). Todellinen pureskeluaika on huomattavasti lyhyempi, mutta *in vitro* -malleissa liian lyhyt aika saattaisi vaikuttaa tulosten tarkkuuteen ja toistettavuuteen (Minekus ym. 2014). Tutkimuksissa, joissa oli käytetty nestemäisiä ruokamatriiseja, kuten maitoa tai proteiiniliuosta, inkubointiaika saattoi olla vain muutamia kymmeniä sekunteja (Taulukko 1) (Rinaldi ym. 2014, Luo ym. 2015).

Staattisia malleja, joissa hyödynnetään muitakin parametrejä, kuten mekaanisten voimien vaikutusta ruokanäytteen partikkelikokoon, löytyy kirjallisuudesta paljon (Chen ym. 2011). Yksikään staattinen malli ei kuitenkaan ota huomioon muun muassa mahalaukun happamuuden asteittaista laskua ruoan puskurointikyvyn vaikutuksesta, mahalaukun säädelyä tyhjennystä, suolessa tapahtuvia happamuuden muutoksia, suoliston mikrobistoa eikä ruoansulatusnesteiden erityisnopeuksia (Guerra ym. 2012).

Taulukko 1. Proteiinien imeytymisen tutkimiseen käytettyjen *in vitro* -menetelmien eroja.

	Näyte	Oraalinen vaihe		Mahalaukkuvaihe			Ohutsuolivaihe			T (C°)	Lähde
		Aika (min)	pH	Aika (min)	pH	Dynaaminen	Aika (min)	pH	Dynaaminen		
Laboratorioiden sisäiset menetelmät	Homogenoitu ja pastöroitu täysmaito	5	6,8	120	2–3	-	120	6,5–7	-	37	(Kopf-Bolanz ym. 2012)
	Erilaiset juustot (n=5)	2	6,8	120	2–3	-	180	6–7	-	37±1	(Fang ym. 2016)
	Pastöroitu maito	20 s	6,8	30	2–3	-	60	6–7	-	37	(Rinaldi ym. 2014)
	Pastöroitu jogurtti	2	6,8	60	2–3	-	60	6–7	-	37	(Rinaldi ym. 2014)
	SMP ¹ + kaseiini + β-laktoglobuliini	-	-	60	1,2	-	60	7,5	-	37	(Do ym. 2016)
	Naudanliha (raaka + kypsä)	-	-	120	1,8	X	130	8	X	37±1	(Gatellier ja Santé-Lhoutellier 2009)
	Proteiiniliuokset ja -geelit (kananmunan valkuainen + WPI ²)	15 s	7	180	1,8–2	X	-	-	-	37	(Luo ym. 2015)
	Lampaanliha	-	-	60	1,8	-	30	8	-	37	(Santé-Lhoutellier ym. 2008)
	Soijamaito + tofu (<i>soymilk curd</i>)	3	7	60	2	-	120	7	-	37	(Rui ym. 2016)
	Biotofu ³	3	7	60	2±0,02	-	120	7±0,02	-	37	(Xing ym. 2016)
	Maissi- + durrajauho	-	-	120	2	-	-	-	-	37	(Nunes ym. 2004)
	Vehnäleipä	5	6,9	240	Jatkuva muutos	X	-	-	-	37	(Hoebler ym. 2002)
	Speltti + vehnä	-	-	30	1,9	-	360	7,5	-	37	(Abdel-Aal 2008)
Harmonoitu menetelmä	SMP ¹	2	7	120	3	-	120	7	-	37	(Egger ym. 2016)

1. MP = skim milk powder (rasvaton maitojauhe), 2. WPI = whey protein isolate (heraproteiini-isolaatti), 3. sis. soijamaitoa ja lehmänmaitoa

3.1.1 Laboratorioiden sisäiset menetelmät

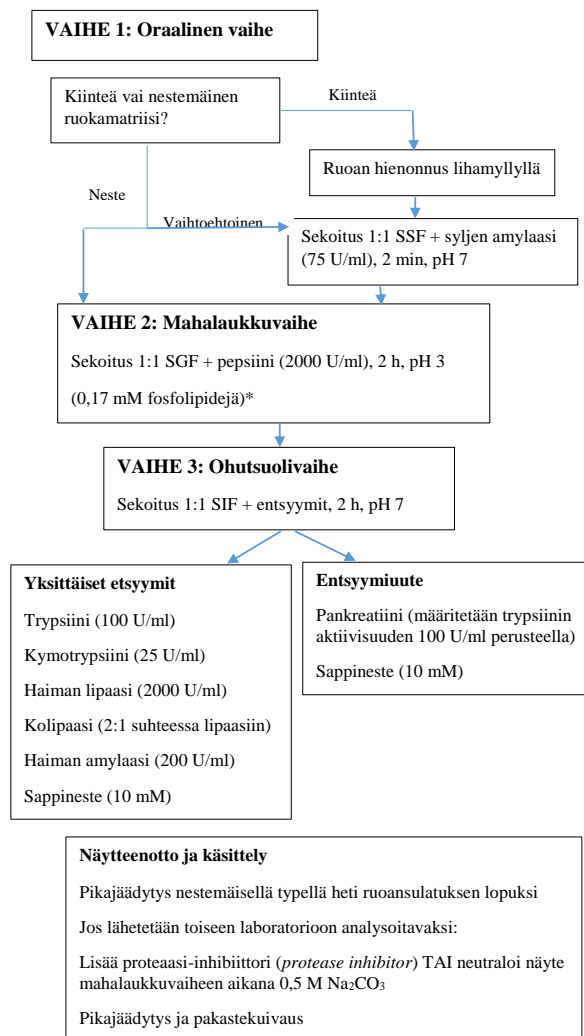
Suurin osa tutkimuksessa käytetyistä staattisista *in vitro* -menetelmistä johdetaan aikaisemmissa tutkimuksissa ja kirjallisuudessa käytetyistä menetelmistä (Minekus ym. 2014). Tästä huolimatta kirjallisuudessa kuvailtujen yksittäisten eli laboratorioiden sisäisten (*in-house*) menetelmien välillä on huomattavaa vaihtelua valittujen parametrien välillä. Esimerkiksi mahalaukkuvaiheessa asetettu pH voi vaihdella eri mallien välillä jopa pH-arvosta 2 (Biehler ym. 2011) pH-arvoon 4 (Reboul ym. 2006). Muuttamalla *in vitro* -mallin parametrejä voidaan vaikuttaa joidenkin yhdisteiden imeytymiseen suolessa tai vapautumiseen ruokamatriisista (Minekus ym. 2014). Esimerkiksi valittu pH-arvo vaikuttaa joidenkin entsyymien toimintaan ja aktiivisuuteen. Samoin vaikuttaa eri suolojen, kuten kalsiumin, konsentraatio, joka voi myös vaihdella eri mallien välillä. Nämä erot käytettyjen mallien välillä tekevät tutkimustulosten vertailun eri tutkimusryhmien välillä vaikeaksi, mikä hankaloittaa päätelmien tekoa saatujen tulosten perusteella.

Proteiinien imeytymistutkimuksista valtaosa on tehty laboratorioiden sisäisen protokollan mukaan. Laboratorioiden sisäisten menetelmien erot ovat suuria, ja niiden tärkeimmät muuttujat on esitetty taulukossa 1. Merkittävimmät erot laboratorioiden sisäisten mallien välillä on käytettyjen entsyymien aktiivisuuksissa (Egger ym. 2016). Proteiinien imeytymisen kannalta tärkeä pepsiinientsyymi on yksi kriittinen tekijä, joka voi vaikeuttaa laboratorioiden välisten tulosten vertailtavuutta. Sen aktiivisuus tulisi aina määrittää samalla standardoidulla menetelmällä, koska aktiivisuuden erot aiheuttavat suurta vaihtelua proteiinien hydrolysoitumisessa mahalaukkuvaiheen aikana. Pepsiinin aktiivisuus on myös hyvin herkkä pH:n vaihteluille, ja kuten taulukosta 1 havaitaan, mahalaukkuvaiheen pH vaihtelee 1,2:n ja 3:n välillä mallista riippuen.

Menetelmien lisäksi käytettyjen reagenssien välillä voi olla suurta vaihtelua. Esimerkiksi valituilla proteolyytisillä entsyymeillä on merkitystä proteiinien imeytymisen tutkimisen kannalta (Abdel-Aal 2008, Hur ym. 2011). Abdel-Aalin (2008) tutkimuksen mukaan yksivaiheinen *in vitro* -malli, jossa käytettiin kolmea entsyymiä, trypsiiniä, kymotrypsiiniä ja peptidaasia, tuotti keskimäärin 39–66 % korkeamman imeytymisasteen kuin kahdella entsyymillä, pepsiinillä ja pankreatiinilla, tuotettu kaksivaiheinen malli. Myös proteiinien hydrolyysituotteita analysoitaessa käytetyt analyysimenetelmät voivat Abdel-Aalin (2008) mukaan vaikuttaa malleilla saataviin imeytymistuloksiin. Myös käytettyjen entsyymien lähteet voivat vaihdella suuresti. Esimerkiksi siasta, naudasta, jäniksestä ja ihmisestä alun perin eristettyjä entsyymejä on käytetty (Minekus ym. 2014).

3.1.2 INFOGEST-menetelmä

Laboratorioiden välisen vertailtavuuden parantamiseksi on pyritty kehittämään standardoitu ruoansulatusmalli (Egger ym. 2016). The COST Action INFOGEST on kansainvälinen verkosto, jossa sadat tutkijat 32 eri maasta tutkivat ruoansulatusjärjestelmää (Minekus ym. 2014). Tämän verkoston yksi päätavoite on yhdenmukaistaa käytänteet eri laboratorioiden protokollien välillä ja määrittää ne olosuhteet, jotka ruoansulatusta jäljitellessä vastaisivat parhaiten ihmisen ruoansulatusta, olisivat käytännöllisiä toteuttaa ja toimisivat mahdollisimman laajasti eri tutkimuskysymyksiä tarkasteltaessa. Näitä tavoitteita varten kehitettiin standardoitu staattinen *in vitro* -malli, joka perustuu kansainväliseen konsensusukseen. Mallin vaiheet on esitetty yleisesti kuvassa 1.



Kuva 1. Yleiskuva staattisen *in vitro* -ruoansulatusmallin vaiheista harmonoidussa menetelmässä. SSF = simulated salivary fluid, SGF = simulated gastric fluid, SIF = simulated intestinal fluid. Entsyymit on ilmoitettu aktiivisuuden mukaan yksikköä per ml (U/ml) lopullisesta ruoansulatusseoksesta, kussakin ruoansulatuksen vaiheessa. *Lisäys vain, jos ruokanäyte ei sisällä fosfolipidejä. (Muokattu Minekus ym. 2014)

Näytteenotto ruoansulatuksen aikana on kriittinen vaihe, johon on myös esitetty yksityiskohtaiset suositukset harmonoidussa (*harmonized*) menetelmässä (Kuva 1). On tärkeää jäähdyttää näytteet mahdollisimman nopeasti reaktion etenemisen estämiseksi (Minekus ym. 2014). Jos tätä ei tehdä, ruokanäytteen proteiinien hydrolyysi jatkuu näytteenoton jälkeenkin, mikä vääristää myöhemmin näytteiden analysoinneissa saatuja tuloksia. Suositeltavaa on, että jokaiselle aikapisteelle, jossa näytteitä kerätään, olisi oma näytteenottoletku sen sijaan, että näytteet kerättäisiin suoraan reaktioastiasta. Näytteet tulisi pikajäähdyttää nestemäisellä tyypellä heti reaktion päätyttyä jatkoanalyysyjä varten. Tämä hidastaa reaktion etenemistä näytteessä. Jos näytteet analysoidaan toisessa laboratoriossa, tulee ruoansulatus pysäyttää kokonaan ennen pikajäädystä ja pakastekuivausta. Tähän on olemassa kaksi tapaa. Näytteeseen voi lisätä natriumbikarbonaattia mahalaukkuvaiheen aikana näytteen pH:n neutraloimiseksi tai siihen voi lisätä proteaasi-inhibiittoria ruoansulatuksen loppuksi.

Harmonoidun protokollan kehittämisen jälkeen suoritettiin laboratorioden välisiä kokeita INFOGEST-verkoston sisällä menetelmän validoimiseksi (Egger ym. 2016). Tutkimus vertasi laboratorioden sisäisten menetelmien ja harmonoidun menetelmän välisiä eroja ja harmonoidun menetelmän tulosten toistettavuutta ja yhtenevyyttä laboratorioden välillä. Ruokanäytteenä toimi rasvaton maitojauhe ja tutkimuksen kohteena oli proteiinien hydrolysoitumisaste. Näytteet kerättiin mahalaukku- ja ohutsuolivaiheen aikana.

Tulokset osoittivat, että harmonoitu menetelmä paransi tulosten yhtenevyyttä verrattuna laboratorioden sisäisiin menetelmiin erityisesti ohutsuolivaiheen aikana (Egger ym. 2016). Erityisen selvästi parannus tuli esille yhdessä maidon pääproteiineista, β -laktoglobuliinissa ja sen hydrolysoitumisasteen tuloksissa, joissa laboratorioden sisäisten menetelmien erot tulivat selkeimmin esille. Osassa näytteistä proteiini oli hydrolysoitunut täysin mahalaukkuvaiheen aikana, kun taas osassa se oli edelleen kokonaisena vielä ohutsuolivaiheen jälkeenkin. Aikaisemmin on todettu, että β -laktoglobuliini ei hajoa pepsiniin vaikutuksesta *in vitro* eli se on resistentti sen vaikutuksille. Tämä havainto vahvistui harmonoidun menetelmän avulla. Tämän lisäksi harmonoidulla menetelmällä saadut peptidiprofiilit (*peptide patterns*), joista nähdään, minkä kokoisia peptidejä näyte sisältää milläkin ajanhetkellä, korreloivat selvemmin keskenään ja tuloksissa oli pienempi keskihajonta kuin laboratorioden sisäisillä menetelmillä saaduissa tuloksissa erityisesti ohutsuolivaiheen aikana. Mahalaukkuvaiheen aikana tuloksissa ei ollut juuri eroja, mikä voi johtua yleisesti matalammasta hydrolyysiasteesta mahassa. Tämä osoittaa, että harmonoidulla menetelmällä voidaan parantaa tulosten vertailtavuutta, mikä laboratorioden sisäisillä menetelmillä oli aikaisemmin haastavaa (Egger ym. 2016).

3.2 Dynaamiset mallit

Pääasiallinen ero staattisten ja dynaamisten *in vitro* -mallien välillä, on se, että dynaamiset mallit pyrkivät mallintamaan myös mekaanisia ja fysiokemiallisia prosesseja sekä väliaikaisia muutoksia ohutsuolen luumenin sisällä tapahtuvissa olosuhteissa (Guerra ym. 2012). Kuten taulukosta 1 voidaan havaita, dynaamisia malleja on hyödynnetty proteiinien tutkimisessa huomattavasti staattisia vähemmän. Liitteessä 1 on esitetty kaavakuvamaisesti tyypillisten dynaamisten mallien rakenne ja niiden huomioimat fysiologiset ominaisuudet.

3.2.1 Yksiosaiset mallit

Mahalaukussa tapahtuva ruoansulatus on dynaaminen vaihe, jossa mahalaukun osilla on eri tehtävät (Guerra ym. 2012). Mahan proksimaalisessa osassa mahalaukun pohjukka toimii ruoan varastointipaikkana ja siellä ruokasula joutuu kosketuksiin mahanesteen kanssa. Distaalisessa osassa mahaportin sopessa syntyvät aaltoliikkeet hajottavat ruoan partikkeleita pienempään kokoon ja sekoittavat mahalaukun sisältöä homogeeniseksi massaksi. Mahalaukun lopusta löytyy mahaportti, joka säätelee ruokasulan pääsyä pohjukaissuoleen sulkijalihaksen avulla. Näitä mekanismeja kuvaamaan on kehitetty dynaamisia yksiosaisia mahalaukun olosuhteita jäljitteleviä malleja.

Monet staattiset mallit pyrkivät mallintamaan mahavaiheen liikkeitä yksinkertaisesti sekoittamalla homogenoidun ruokanäytteen mahanesteen kanssa ravistelevassa hauteessa tai pyöröravistelijalla (Kong ja Singh 2010). Dynaamisissa Human Gastric Simulator (HGS) mallissa mahalaukun peristalttisia aaltoliikkeitä pyritään jäljittelemään mekaanisella ajolaitteella, joka ympäröi lateksista valmistettua sylinterimäistä pussia. Vähemmän hienostuneet mallit, kuten Dynamic Gastric Model (DGM), pyrkivät mallintamaan ruokanäytteeseen kohdistuvia mekaanisia voimia murskaamalla näytteen ulomman ja sisemmän sylinterin väliin. Tämä ei kuitenkaan kuvaa fysiologisia mahalaukun aaltoliikkeitä.

Proteiinien hajotus ja imeytyminen alkaa jo mahalaukusta ja yksiosaisia dynaamisia malleja on hyödynnetty proteiinien hydrolyysiasteen ja peptidiprofiilien tutkimiseksi mahalaukkuvaiheen aikana (Hoebler ym. 2002, Luo ym. 2015). Luo ym. (2015) kehittivät dynaamisen mahalaukkua jäljittelevän U-stomacher-nimisen mallin tutkiakseen proteiinien vapautumista proteiinigeelimatriisista. Koe suoritettiin pepsiinin kanssa ja ilman pepsiiniä, jotta voitiin tarkastella pepsiinin vaikutusta hydrolyysiin. Malli koostui kahdesta muovisesta ruiskusta (50 ml), jotka oli yhdistetty toisiinsa silikonisella letkulla ja kiinnitetty rautaiseen jalustaan.

Ruiskujen männistä toinen oli yhdistetty ruiskun sisällön aistittavaa rakennetta tarkkailevaan analysaattoriin. Analysaattori sääteli männän liikettä ja merkitsi ylös puserrukseen tarvittavan voiman. U-stomacher pidettiin suljetussa kammiossa, jossa ympäröivä lämpötila saatiin vakioitua 37 °C:een kokeen ajaksi.

Tutkitut näytteet olivat sylinterimäisiä geelipaloja, jotka oli valmistettu joko kananmunan valkuaisesta tai heraproteiini-isolaatista (Luo ym. 2015). Palojen annettiin liikkua vapaasti ruiskujen ja silikoniletkun sisällä yhdessä mahanestettä jäljittelevän liuoksen kanssa, joka joko sisälsi pepsiniä tai ei. Rakenneanalyysointin näytteeseen kohdistuvaa voimaa säädeltiin painamalla ensimmäinen mäntä ensin alas tasaisella nopeudella (8 mm/s) kymmenen sekunnin ajan. Tämän jälkeen mäntä pysäytettiin kolmeksi sekunniksi, minkä jälkeen mäntä nostettiin takaisin sen aloitusasentoon. Näitä syklejä toistettiin kolmen tunnin ajan ja jokaisen tunnin kohdalla otettiin näyte erillistä letkua pitkin. Jokainen sykli kesti yhteensä 20 sekuntia, minkä tarkoituksena oli jäljitellä aikaa, joka kuluu mahalaukun supistumiseen.

Hoeblerin ym. (2002) kehittämä malli poikkesi aiemmin esitellyistä yksiosaisista malleista siinä, että se ei yksinkertaisen sekoituksen lisäksi huomionnut näytteeseen kohdistuvia fyysisiä voimia. Se kuitenkin otti huomioon näytteen asteittaisen happamuuden muutoksen säätelemällä suolahapon lisäämistä ruokasulanäytteeseen perustuen fysiologiseen ihmisiltä kerättyyn *in vivo* -tutkimusaineistoon (Hoebler ym. 1999). Se sääteli myös mahalaukun tyhjennystä perustuen sioilla tehdystä kokeesta saatuun aineistoon ja pepsinin lisäsvauhtia mahalaukkuvaiheen aikana (Hoebler ym. 2002). Ruokamatriisina toimi leipä, josta tutkittiin sekä proteiinien että hiilihydraattien hydrolyysiä sekä leivässä tapahtuvia fysikaalisia muutoksia ruoansulatuksen aikana.

3.2.2 Kaksi- ja moniosaiset mallit

Vaikka yksiosaiset, mahalaukun olosuhteita jäljittelevät mallit ovat olennaisessa osassa mahassa tapahtuvan ruoansulatuksen tutkimisessa, ne tarjoavat vain osittaisen kuvan ruoansulatuskanavan toiminnasta (Guerra ym. 2012). Jotta nautitun ruoan komponenttien todellista kohtaloa voitaisiin tarkastella, on tutkittavan ruokanäytteen käytävä läpi ruoansulatuksen kaikki vaiheet. Tätä varten on kehitetty kaksi- ja moniosaisia *in vitro* -malleja.

Kaksiosaiset mallit pyrkivät mallintamaan mahalaukun ja proksimaalisen ohutsuolen sisäisiä olosuhteita (Guerra ym. 2012). Tietokoneen avulla säädellään vaiheiden lämpötilaa ja pH:n asteittaista muutosta mahalaukkuvaiheen aikana, jossa ruokanäytteen pH-arvo lasketaan

suolahapolla. Ohutsuolivaiheen aikana ruokasulan happamuus nostetaan natriumbikarbonaatilla. Myös mahalaukun tyhjennystä ja pepsiniin, haimanesteen ja sappinesteen lisäystä säädellään.

Gatellier ja Santé-Lhoutellier (2009) kehittivät mahalaukkua ja pohjukkaissuolta jäljittelevän kaksiosaisen dynaamisen mallin tutkiakseen lihan kypsennyksen vaikutusta sen proteiinien hydrolyysiin ja peptidiprofiiliin. Staattisista malleista poiketen kyseiseen malliin oli yhdistetty puoliautomaattinen jatkuva virtaus, joka mahdollisti proteiinien hydrolyysissä vapautuneiden aminohappojen ja pienten peptidien kulkeutumisen passiivisen diffuusion avulla dialyysikalvon läpi. Suodatetun liuoksen absorbanssia monitoroitiin jatkuvasti proteiinien hydrolyysin tarkkailemiseksi. Mahalaukkuvaiheen dialyysikalvosta suodattuivat läpi 10 kDa pienemmät peptidit ja aminohapot. Ohutsuolivaiheen kalvon läpi pääsivät vain 1 kDa pienemmät partikkelit. Pyrkimyksenä oli mallintaa mahalaukun ja suolen sisällä tapahtuvaa jatkuvaa aminohappojen ja pienten peptidien siirtämistä lumenista solujen sisälle ja sieltä lopulta verenkiertoon.

Tämän hetkistä *in vitro* -malleista TNO gastro-Intestinal Model 1 eli TIM-1 on ainut malli, joka kattaa mahalaukkuvaiheen ja ohutsuolivaiheen kaikki kolme osaa, duodenum, jejunum ja ileum ja yhdistää ne ruoansulatuskanavassa tapahtuviin dynaamisiin ominaisuuksiin (Guerra ym. 2012). Siinä integroituvat yhteen ihmisen ruoansulatuksen tärkeimmät muuttujat. Se säätelee lämpötilaa, pH-arvon muutoksia ruoansulatuksen eri vaiheissa, mahalaukun ja suolen läpikuluaikaa, peristalttisista sekoitusta ja kuljetusta. Se säätelee ruoansulatusnesteiden eritystä ja imee vettä ja pieniä molekyylejä passiivisesti dialyysijärjestelmän avulla. TIM-1:n katsotaan jäljittelevän kaikkein parhaiten ihmisen ruoansulatuskanavaa. Sitä on hyödynnetty useissa ravitsemustutkimuksissa, kuten raudan ferromuodon imeytymisen tehokkuutta arvioitaessa sekä toksikologian ja lääkeaineiden tutkimuksissa (Guerra ym. 2012). Se ei kuitenkaan huomioi muun muassa suolistomikrobien merkitystä paksusuolella tapahtuvan fermentaation aikana (Liite 1). Ruoan proteiinien imeytymistä sillä ei ole löytyneen kirjallisuuden valossa tutkittu oletettavasti sen kalliin hinnan ja epäkäytännöllisyyden vuoksi.

3.3 Proteiinien imeytymistuotteet ja niiden analysointi

Ruokänäytteiden imeytymistä tutkittaessa, kunkin vaiheen aikana otetaan säännöllisin väliajoin näytteitä esimerkiksi kerran tunnissa (Luo ym. 2015). Näytteiden sisäiset reaktiot pysäytetään täysin, jotta ne eivät vaikuttaisi lopputulokseen, minkä jälkeen näytteet siirtyvät analysoitaviksi (Minekus ym. 2014). Käytetyt analyysimenetelmät riippuvat tutkituista muuttujista. Proteiinien

imeytymisessä ollaan kiinnostuneita muun muassa proteiinien hydrolysoitumisasteesta, imeytymisnopeudesta, peptidiprofiileista ja liukoisten proteiinien ja vapautuneiden aminohappojen määristä. Proteiinien imeytymisessä tutkittuja parametrejä ja niiden tutkimiseen käytettyjä analyysimenetelmiä sekä saatuja päätuloksia on esitelty tutkimuskohtaisesti liitteessä 2.

3.3.1 Kokonaiset proteiinit

Kokonaisten proteiinien määrittämiseksi ruokanäytteestä on olemassa monia erilaisia analyysimenetelmiä. Selvitettäessä kokonaisproteiinien määrää näytteessä voidaan hyödyntää esimerkiksi Kjeldahl-menetelmää, jota käytetään typen kvantitatiiviseen määrittämiseen orgaanisista yhdisteistä (Abrams ym. 2014). Liukoisten proteiinien konsentraatiota selvitettäessä voidaan hyödyntää esimerkiksi Bradford-analyysiä (Rui ym. 2016, Xing ym. 2016). Bradford-analyysi on nopea, kolorimetrinen proteiinin määrittämyskoe, joka perustuu absorbanssin muutokseen Coomassie Brilliant Blue G-250 -väriaineessa (Bradford 1976). Proteiinin määrä liuoksessa määritetään mittaamalla näytteen absorbanssin arvo spektrofotometrillä aallonpituudella 595 nm ja tuloksia verrataan standardiin, jossa on tunnettu määrä proteiinia. Standardina voi toimia esimerkiksi naudan seerumin albumiini (Rui ym. 2016, Xing ym. 2016). Proteiinien ja peptidien konsentraatiota voidaan mitata myös bisinkoniinihappoanalyysin (*bicinchoninic acid*, BCA) avulla (Kopf-Bolanz ym. 2012, Rinaldi ym. 2014, Fang ym. 2016). BCA-analyysissä on sama periaate, kuin Bradford-analyysissä. Kaikkia yllämainittuja analyysimenetelmiä varten on saatavilla kaupallisia tuotteita (ThermoFisher Scientific 2018).

Proteiinien kvantitatiivisen määrittämisen jälkeen näytteen proteiinit ja peptidit erotellaan niiden elektroforeettisen liikkuvuuden avulla, johon vaikuttaa muun muassa peptidien pituus ja molekyylipaino, jolloin saadaan määritettyä niiden peptidiprofiilit kullakin ajan hetkellä (Kopf-Bolanz ym. 2012, Fang ym. 2016). Erottelussa hyödynnetään natrium-dodekyyli-sulfaatti-polyakryyliamidi-geelelektroforeesi (SDS-PAGE) -menetelmää, joka kykenee erottamaan yli 5 kDa suuremmat proteiinit ja peptidit (Kopf-Bolanz ym. 2012). SDS-PAGE:lla pystytään tarkkailemaan tunnettujen proteiinien proteolyysin etenemistä ruuansulatusta jäljittelevässä mallissa (Bouzerzour ym. 2012). Näytteet käsitellään SDS:llä, jonka vaikutuksesta proteiinien kolmiulotteinen rakenne suoristuu, jolloin proteiinin rakenne ei vaikuta sen liikkuvuuteen polyakryyliamidigeelillä (Hames 1998). Näytteet asetetaan geelille muotoiltuihin kaivoihin yhdessä molekyylipainomarkkereiden kanssa, minkä jälkeen näytteiden elektroforeesiajo,

värjäys hyödyntäen esimerkiksi Coomassie blue -väriainetta ja pesu suoritetaan standardiohjeiden mukaisesti (Bouzerzour ym. 2012, Rinaldi ym. 2014).

3.3.2 Peptidit ja aminohapot

Ruuansulatusta jäljittelevässä mallissa ruuansulatuksen edetessä tutkitut proteiinit pilkkoutuvat lyhyemmiksi peptidiketjuiksi ja vapaiksi aminohapoiksi. Peptidien kokoa ja sen muutoksia tarkkailemalla voidaan selvittää proteiinien hydrolyysin etenemistä kussakin ruuansulatuksen vaiheessa (Kopf-Bolanz ym. 2012). Edellä esiteltyä SDS-PAGE-menetelmää voi hyödyntää yli 5 kDa suurempien peptidien erottelukseen, mutta tätä pienempien peptidien ja aminohappojen havaitsemiseen vaaditaan tarkemmat erotusmenetelmät.

Paljon hyödynnetty menetelmä on korkean erotuskyvyn nestekromatografia (*high performance liquid chromatography*, HPLC), jota voidaan hyödyntää sekä peptidien, että aminohappojen analysoinnissa (Kopf-Bolanz ym. 2012). SDS-PAGE:lla tehdyn erottelun jälkeen kiinnostuksen kohteena olevat proteiinivyöhykkeet leikataan irti polyakryyliamidigeelistä, minkä jälkeen geelipalat pestään ja niille tehdään yön yli kestävä digestio trypsiini-entsyymillä. Digestion jälkeen peptidit erotellaan HPLC:n avulla. HPLC-menetelmästä on useita variaatioita riippuen kolonnissa käytetystä stationaarifaasista (Hanai 1999). Sen laatu määräytyy sen mukaan, onko kyseessä esimerkiksi normaalifaasi-HPLC (*normal-phase*) vai käänteisfaasi-HPLC (*reversed-phase*). HPLC:n kyky erotella peptidit ja aminohapot toisistaan perustuu niiden vuorovaikutukseen kiinteän faasin ja liikkuvan nestemäisen faasin, kuten asetonitriili-liuoksen välillä, kun näyte kulkee kolonnin läpi korkean paineen vaikutuksesta.

Peptidien pituuden määrittämiseksi ja aminohappojen analysoimiseksi hyödynnetään myös nestekromatografi-massaspektrometri (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) yhdistelmätekniikkaa (Kopf-Bolanz ym. 2012, Egger ym. 2016). LC-MS yhdistää nestekromatografian, joka ensin erottelee näytteen peptidit ja aminohapot toisistaan ja massaspektrometrin, jolla voidaan analysoida yksittäisten peptidien ja aminohappojen massa ja kemiallinen rakenne. Näin saadut peptidit voidaan tunnistaa ja niiden pituus analysoida.

Kuten liitteestä 2 voidaan havaita, on proteiinien hydrolyysiaste yksi paljon tutkituista parametreista. Hydrolyysiasteella (DH%) tarkoitetaan sitä osuutta (h) kaikista peptidisidoksista (h_{tot}), jotka ovat hajotettu hydrolyysin aikana (Rutherford 2010). Hydrolyysiasteen määrittämiseksi on olemassa muutama eri menetelmä, joista yksi on spektrofotometrinen o-ftaaliaaldehydi (*o-phthaldialdehyde*, OPA) -menetelmä. OPA reagoi aminohappojen kanssa,

jolloin muodostuu fluoresoiva OPA-aminohappojohdannainen. Proteolyysin aikana peptidisidosten hajotessa vapautuvat primaariset amiiniryhmät, jotka reagoivat OPA:n kanssa. Reaktion jälkeen mitataan näytteen absorbanssi spektrofotometrillä, minkä jälkeen tuloksia verrataan valittuun standardiin (Kopf-Bolanz ym. 2012, Luo ym. 2015, Rui ym. 2016).

4. *IN VITRO* – *IN VIVO* -KORRELAATIO

Food and Drug Administration:in eli FDA:n määritelmän mukaan *in vitro* – *in vivo* -korrelaatiolla (*In vitro – in vivo correlation*, IVIVC) tarkoitetaan matemaattista mallia, joka kuvaa *in vitro* -mallien ominaisuuksien, kuten esimerkiksi lääkeaineen liukenemisen tai vapautumisen, suhdetta vastaaviin *in vivo* -ominaisuuksiin esimerkiksi plasman lääkeainekonsentraatioon tai imeytyneen lääkeaineen määrään (Food and Drug Administration 1997). Ruoansulatusmallien *in vitro* ja *in vivo* -tutkimusaineiston välinen yhtenevyys on tärkeä määrittää, mutta vain muutamat tutkimukset ovat arvioineet ruokanäytteillä tehtyjen kokeiden IVIVC-korrelaatiota (Hur ym. 2011). Farmakokinetiikassa sen sijaan muun muassa tekoälyllä varustettuja matemaattisia korrelaatiomalleja, kuten artificial neural network- eli ANN-IVIVC hyödynnetään huomattavasti enemmän (Dowell ym. 1999, Fatouros ym. 2008). Tekoälyn avulla voidaan yhä paremmin havaita *in vitro* ja *in vivo* -tutkimusaineiston välillä olevat suhteet ja tarkastella useampia muuttujia yhtä aikaa, kuin perinteisillä lineaarisilla malleilla (Dowell ym. 1999).

4.1 *In vivo* -tutkimuksen peruseriaatteen

Proteiinien imeytymisen käsittelevissä *in vivo* -tutkimuksissa on hyödynnetty erilaisia menetelmiä. Liitteessä 3 on esitelty tutkimuskohtaisesti, millaisia menetelmiä ja mallieläimiä *in vivo* -tutkimuksissa voidaan hyödyntää. Tyypillisimpiä mallieläimiä, joita käytetään ihmisen ruoansulatuksen tutkimiseksi ovat rotat ja siat, mutta myös ihmiset (Liite 3). Tutkimusmenetelmien vaiheet voidaan näennäisesti jakaa kolmeen osaan. Aluksi mallieläimille annetaan tutkittua ruokanäytettä, jossa on tunnettu määrä proteiinia. Ruoan antotapa voi vaihdella tutkimusten välillä. Suurimmassa osassa tutkimuksista eläimen on annettu syödä tarjottu testiateria vapaasti (Rozan ym. 1997, Bouzerzour ym. 2012, Le Feunteun ym. 2014, Barbé ym. 2014). Eräissä tutkimuksissa kuitenkin injektointiin joko tutkittavaa β -laktoglobuliinia tai kontrollina toiminutta NaCl-liuosta (0,9 %) suoraan rotan mahaan 40 minuuttia ennen eläimen lopettamista (Kitabatake ja Kinekawa 1998a).

Tämän jälkeen eläimistä kerätään näytteet. Näytteiden keruu voi tapahtua keräämällä näyte esimerkiksi sian mahaportin suulta kanyylin avulla halutuissa aikapisteissä (Le Feunteun ym. 2014, Barbé ym. 2014). Näytettä kerättiin, kunnes saatiin haluttu 40 ml tai kunnes näytteenottoaika oli kestänyt 10 minuutin maksimiajan. Tämän jälkeen näytteet punnittiin ja niihin lisättiin proteaasi-inhibiittoria, minkä jälkeen näytteet homogenoitiin. Lopuksi näytteet vielä jäädytettiin nestemäisellä tyypellä. Sioilta voitiin kerätä myös verinäytteet tietyissä aikapisteissä ennen ja jälkeen testiaterian nauttimisen, minkä jälkeen verinäytteen supernatantista määritettiin aminohappokonsentraatio ionivaihtokromatografian avulla (Le Feunteun ym. 2014). Näytteiden keruu voi tapahtua myös teurastamalla eläin tietyssä aikapisteessä tutkimusaterian nauttimisen jälkeen (Bouzerzour ym. 2012, Bohn ym. 2017). Tällöin näytteet voidaan kerätä useasta kohtaa ruoansulatuskanavaa, kuten mahasta, pohjukaissuolesta, jejunumista ja ilmeumista. Näytteisiin lisättiin proteaasi-inhibiittoria proteiinien hajoamisreaktioiden pysäyttämiseksi näytteissä.

Viimeisenä suoritetaan halutut analyysit kerätyille näytteille. Analyysimenetelmät valitaan tutkimuksen kiinnostuksen kohteena olevien parametrien mukaan. Tutkimukset hyödyntävät pitkälti samoja metabolomiikan menetelmiä kuin *in vitro* -tutkimuksissa on hyödynnetty (Liite 2). Tämä mahdollistaa IVIV-korrelaatioiden tekemisen tutkimuksista saadun aineiston välillä (Bohn ym. 2017). Muita tapoja määrittää proteiinien imeytymistä on esimerkiksi merkitä ruokanäytteen proteiinit esimerkiksi tyypin ^{15}N -isotoopilla, jolloin on mahdollista erottaa elimistön endogeeninen tyyppi ruoan tyypestä ja seurata merkkiainetyypin hyödynnettävyyttä elimistön eri pooleissa (Boutrou ym. 2013). Muita isotooppeja, joita voidaan hyödyntää aminohappojen merkitsemisessä ovat muun muassa ^{14}C ja ^{13}C , joita käytetään IAAO-menetelmässä (*indicator amino acid oxidation*) (Elango ym. 2012). Perinteisempiä menetelmiä ovat esimerkiksi PER eli proteiinien tehokkuussuhde määrittäminen, jossa proteiinien imeytyvyyttä arvioidaan suhteuttamalla rottien painonnousu (g) nautittuun proteiinin määrään (g) (Rozan ym. 1997, Kitabatake ja Kinekawa 1998b). Tutkimuskohtaiset analyysimenetelmät on esitelty tarkemmin liitteessä 3.

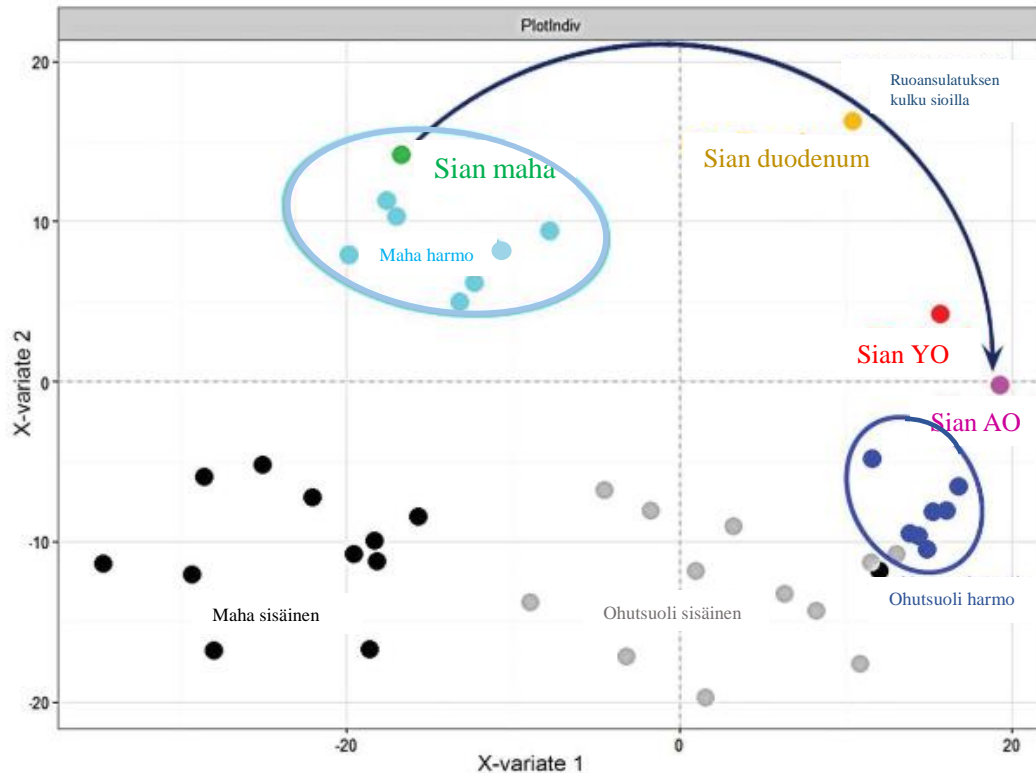
4.2 Proteiinien imeytymisen *in vitro* ja *in vivo* -tutkimuksen aineiston korrelaatio

Ruokanäytteillä tehtyjen kokeiden IVIVC-määrittäysten tekeminen on ollut hyvin vähäistä. Tämä pitää paikkansa myös proteiinien imeytymistä tutkivissa kokeissa. Tyypillistä on, että *in vitro* -mallilla saatuja tuloksia verrataan kirjallisuudesta löytyviin, ihmisillä tehdyissä kokeissa saatuihin tuloksiin (Kopf-Bolanz ym. 2012, Minekus ym. 2014). Joitakin korrelaatio

määrittämiä on kuitenkin tehty. Hyvä IVIV-korrelaatio ($R^2 = 0,914$) on saatu esimerkiksi alfalfaproteiinkonsentraateilla tehdyissä imeytymistutkimuksissa (Bohn ym. 2017). Tutkimuksen *in vivo* -koe tuotettiin rotilla ja *in vitro* -mallissa käytettiin joko pepsiini-pankreatiini tai pepsiini-trypsiini entsyymiyhdistelmää. Kohtalaisen hyvän IVIV-korrelaation sai myös Rozan ym. (1997) tutkiessaan rapsisiemenjauhon, lupiinin ja soijapavun proteiinien imeytymistä. Näiden proteiinien todellista sulavuutta (*true digestibility*, TD) arvioitiin rotilla (Liite 3). Tulos korreloi tilastollisesti merkitsevästi *in vitro* -mallilla saadun hydrolyysiasteen kanssa ($R^2 = 0,663$, $p < 0,001$) ja typen imeytymisen (*nitrogen digestibility*) kanssa ($R^2 = 0,776$, $p < 0,001$). Samassa tutkimuksessa ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota rotilla määritetyn PER-arvon ja *in vitro* hydrolyysiasteen ja typen imeytymisen välillä.

Eräissä tutkimuksissa verrattiin sioilla tehdyn *in vivo* -kokeen ja staattisen *in vitro* -mallin avulla saatuja tuloksia kunkin aminohapon kohdalla erikseen (Cho ja Kim 2011). Tutkimuksessa havaittiin, että tuloksien korrelaatioissa oli eroja eri aminohappojen imeytyvyysien välillä. Kaikkien aminohappojen imeytyvyys *in vitro* oli suurempi kuin imeytyvyys *in vivo* ($p < 0,05$). Raakaproteiinin IVIV-korrelaation ($R^2 = 0,76$) oli voimakkaampi, kuin välttämättömien ($R^2 = 0,71$) ja ei-välttämättömien aminohappojen ($R^2 = 0,50$). Yksittäisistä aminohapoista glysiinillä ($R^2 = 0,89$), isoleusiinilla ($R^2 = 0,85$) ja treoniinilla ($R^2 = 0,83$) oli vahva korrelaatio. Vastaavasti proliinin ($R^2 = 0,24$) ja tyrosiinin ($R^2 = 0,35$) imeytymisen IVIVC oli hyvin heikko.

INFOGEST-verkoston yksi päämäärä on yhdenvertaistaa staattisen *in vitro* -mallin protokolla. Laboratorioiden sisäisten menetelmien ja harmonoidun menetelmän välisen vertailun lisäksi tehtiin *in vivo* -koe hyödyntäen samoja analyysimenetelmiä ja ruokamatriisia kuin *in vitro* -malleilla (Egger ym. 2016, Bohn ym. 2017). *In vivo* -tutkimuksen menetelmä on esitelty tarkemmin liitteessä 3. Mallieläiminä käytettiin sikoja. Näiden eri *in vitro* -mallien ja *in vivo* -tutkimuksen samanlaisuutta arvioitiin peptidiprofiilianalyysien kannalta osittaisen pienimmän neliösumman (*partial least square*, PLS) menetelmän avulla (Bohn ym. 2017). Sioilla saaduista tuloksista laskettiin keskiarvo kunkin näytteen kohdalta; maha-, duodenum- ja ylempi ja alempi ohutsuolinäyte. Nämä keskiarvot on merkitty kuvaan 2.



Kuva 2. Osittainen pienimmän neliösumman analyysi harmonoidun (Kuvassa: harmo) ja laboratorioiden sisäisten (Kuvassa: sisäinen) *in vitro* -mallien peptidiprofiileista verrattuna *in vivo* -tutkimuksen profiileihin. YO = ylempi ohutsuoli, AO = alempi ohutsuoli (Muokattu Bohn ym. 2017)

Kuvasta 2 voidaan havaita, että harmonoidulla menetelmällä tuotetun mahalaukkuvaiheen näytteet ryhmittyvät lähelle sikojen mahanäytteen keskiarvoa. Harmonoidun menetelmän ohutsuolivaiheen näytteet ovat keskenään samassa ryhmässä, mutta sijoittuvat sikojen alemmasta ohutsuolesta otettujen näytteiden keskiarvon alapuolelle. Tämä viittaa siihen, että *in vitro* -mallissa ruokänäyte hydrolysoituu pidemmälle kuin *in vivo* -olosuhteissa. Huomattavaa on myös laboratorioiden sisäisten menetelmien tulosten hajanaisuus ja poikkeavuus *in vivo* -kokeen tuloksista.

5. POHDINTA

Tämän kandidaatin tutkielman tavoitteena oli käydä läpi erilaisia ruoansulatuskanavaa jäljitteleviä *in vitro* -malleja, esitellä niiden perustoimintaperiaatteet ja tarkastella, kuinka niitä on hyödynnetty proteiinien imeytymisen tutkimisessa. Tämän lisäksi tutkielmassa esiteltiin lyhyesti proteiinien imeytymisen tutkimisessa käytettyjä *in vivo* -menetelmiä ja verrattiin,

kuinka *in vitro* -malleilla saatu tutkimusaineisto korreloi *in vivo* -tutkimuksissa saadun aineiston kanssa.

In vitro -ruoansulatusmalleja hyödynnetään paljon arvioimaan ruoan komponenttien käyttäytymistä ruoansulatuskanavassa. *In vitro* -malleilla on joitakin selviä vahvuuksia verrattaessa *in vivo* -kokeisiin. *In vitro* -mallit ovat suhteellisen edullisia verrattuna ihmisillä tehtyihin ravitsemustutkimuksiin, joita edelleen pidetään niin sanotusti kultaisena standardina, kun halutaan selvittää ravitsemukseen liittyviä kysymyksiä (Hur ym. 2011, Bohn ym. 2017). *In vitro* -mallit ovat myös nopeampia ja vähemmän työläitä menetelmiä eikä niihin sisälly *in vivo* -menetelmiin liittyviä eettisiä rajoitteita (Minekus ym. 2014). Erityisesti staattisten *in vitro* -mallien helppous mahdollistaa suurten näytemäärien käsittelyn ja useamman rinnakkaisnäytteen. Ne ovat myös helposti toistettavissa ja mallien sisäisiä olosuhteita on mahdollista säädellä tarkasti. *In vivo* -kokeissa olosuhteiden tarkka säätely on haastavaa, mikä johtaa suureen tutkimusten sisäiseen ja väliseen vaihteluun. Tämän vuoksi tarvitaan suurempi määrä toistoja ja suuri määrä koe-eläimiä tai koehenkilöitä, jotta saavutettaisiin riittävä tilastollinen voima.

Yksi *in vivo* -kokeiden haasteista on selvittää proteiinien todellinen sulavuus, joka on huomattavasti haastavampaa kuin näennäisen sulavuuden selvittäminen (Cho ja Kim 2011, Bohn ym. 2017). Osa käytetyistä menetelmistä mittaa proteiinien imeytymistä epäsuorasti tekemällä kvantitatiivisen määrityksen ruoansulatuksen jälkeen jäljelle jääneen typen määrästä (Liite 3). Tähän tyypeen sisältyy myös elimistön endogeeninen typpi ruokanäytteiden imeytymättömän typen lisäksi. Yhdeksi *in vitro* -mallien vahvuuksista voisi lukea sen, että niiden endogeenisen typen erityis on vähäistä. Näin ollen niillä saatujen tulosten tulisi olla verrattavissa todelliseen sulavuuteen nimenomaan proteiineilla.

In vitro -mallit vaikuttaisivat olevan käyttökelpoisia työkaluja kuvaamaan proteiinien imeytymistä ruoansulatuskanavassa myös IVIV-korrelaatioiden perusteella, joilla on saatu kohtalaisen vahvoja tuloksia (Rozan ym. 1997, Cho ja Kim 2011, Bohn ym. 2017). Erityisesti harmonoidun protokollan mukaan tehty *in vitro* -koe paransi IVIV-korrelaatiota (Kuva 2). On kuitenkin huomioitava, että IVIVC-määrityksiä on tehty suhteellisen vähän proteiinien imeytymistä käsittelevistä tutkimuksista. Lisää vaadittaisiin *in vitro* -mallien tulosten parempaa validoimista varten. Tämän vuoksi malleilla saatujen tulosten kykyyn kuvata proteiinien imeytymistä *in vivo*, tulee suhtautua varauksella.

Ruoansulatuskanavan mallintamisessa on olemassa lisäksi lukuisia haasteita ja rajoitteita, joiden vuoksi *in vitro* -mallit eivät luultavasti tule täysin korvaamaan eläin- ja ihmiskokeita. Merkittävä *in vitro* -mallien heikkous on niiden keskinäinen vertailtavuus, jota heikentää käytettyjen menetelmien vaihtelevuus tutkimusryhmien välillä (Minekus ym. 2014, Egger ym. 2016, Bohn ym. 2017). Tämä koskee erityisesti staattisia *in vitro* -malleja. Kuvasta 2 voidaan havaita, että laboratorioden välisten menetelmien tulokset ovat hyvin hajanaisia johtuen luultavasti juuri eroista menetelmien välillä. Lisäksi ne poikkeavat *in vivo* -tutkimuksessa saaduista tuloksista (Kuva 2). Vertailtavuutta on pyritty parantamaan kansainvälisessä yhteisymmärryksessä luodulla harmonoidulla menetelmällä (Minekus ym. 2014). Menetelmä on kuitenkin julkaistu ja validoitu vasta vuonna 2014, joten vielä ei ole saatavilla runsaasti tutkimuksia proteiinien imeytymisestä, joissa tätä menetelmää olisi hyödynnetty.

Haasteita ruoansulatusjärjestelmän mallintamiseen tuo myös se, että joitakin ihmisen ruoansulatuskanavan entsyymeitä tai niiden analogeja ei ole saatavilla kaupallisesti. Esimerkiksi mahalaukun lipaasia ei ole ohjeistettu käyttämään harmonoidussa *in vitro* -mallissa (Kuva 1). Käyttöä ei suositella, koska mahalaukun lipaasia ei ole kaupallisesti saatavilla (Minekus ym. 2014). Jotkut kaupallisesti löydettävät vaihtoehdot, kuten sienilipaasit (*fungaal lipases*), joita tuotetaan muun muassa *Aspergillus niger* ja *Penicillium roquefortii* -sienien avulla (Singh ja Mukhopadhyay 2012), ovat aktiivisuudeltaan ja ominaisuuksiltaan erilaisia ihmisen mahalaukun lipaasiin verrattuna (Zentler-Munro ym. 1992). Jotkut mallit, kuten dynaaminen moniosainen *in vitro* -malli TNO gastrointestinal tract model (TIM), kuitenkin sisältää lipaasin lisäyksen mahalaukkuvaiheessa (Blanquet-Diot ym. 2009).

Yksi merkittävä heikkous *in vitro* -mallien kyvyssä ennustaa proteiinien imeytymistä on ruoansulatuksen viimeisen vaiheen puuttuminen malleista. Vain harva malli ottaa huomioon ruokanäytteen imeytymisen suolistosta verenkiertoon sulatuksen lopuksi (Liite 1). Pelkkien vapaiden aminohappojen analysointi näytteestä eri riitä määrittämään proteiinin imeytymistä ruoansulatuskanavasta (Minekus ym. 2014). *In vitro* -malleihin tulisi lisätä vaihe, jossa hyödynnettäisiin ohutsuolen nukkapinnalla olevia peptidaaseja. Aminohappojen imeytymistä enterosyyttien kautta verenkiertoon voisi tutkia integroimalla esimerkiksi Caco-2-solumallin *in vitro* -suolistomalleihin (Kopf-Bolanz ym. 2012, Minekus ym. 2014). Yksikään tämän kirjallisuuskatsauksen käsittelemistä tutkimuksista ei ollut yhdistänyt solumalleja ruoansulatusmalleihin.

Muita haasteita, joita ihmisen ruoansulatuksen mallinnukseen liittyy, on erilaisten dynaamisten vuorovaikutusten jäljittely. Proteiinien imeytymistä on tutkittu myös dynaamisilla malleilla.

Esimerkiksi Luo ym. (2015) kehittämä U-stomacher pyrki mallintamaan mahalaukun peristalttisia liikkeitä muoviruiskujen ja niiden sisällä liikkuvan männän avulla. Tämä ei kuitenkaan anna todellista kuvaa mahalaukun aaltoliikkeistä, joten menetelmä ei ole verrattavissa *in vivo* -tilanteeseen.

Maapallon ihmispopulaatio kasvaa jatkuvasti ja riittävän ruoan tuottaminen kaikille nykyisessä mittakaavassa ei ole mahdollista (Aiking 2014). Proteiinien kannalta mahdollisimman kestävä vaihtoehto olisi vähentää eläinperäisten proteiinien käyttöä, sillä niiden tuotanto on kasviperäisiä proteiineja paljon tehottomampaa. Muun muassa tämän vuoksi, kiinnostus kasviproteiineja kohtaan on kasvussa. *In vitro* -malleja hyödynnetään erilaisten kasviperäisten proteiinien lähteiden imeytymisen tutkimiseen ja niillä voidaan selvittää, millaisilla eri menetelmillä proteiinien imeytymiseen voidaan vaikuttaa (Xing ym. 2016). Tätä tietoa voisi hyödyntää tehokkaammin imeytyvien kasviproteiininlähteiden kehittäessä.

Monissa länsimaissa väestö vanhenee ja kiinnostusta on herättänyt myös erikoisryhmille, kuten vanhuksille, lapsille ja sairaille kohdennetut elintarvikkeet (Guerra ym. 2012, Luo ym. 2015). Tähän yhtenä ratkaisuna voisi olla ikäkohtaisten ruoansulatuskanavien mallintaminen, jolla voitaisiin tarkastella iän vaikutusta ruoan ja proteiinien imeytymiseen ruoasta. Pienten lasten ruoansulatuskanavan mallinnukseen on käytetty esimerkiksi porsaita tutkittaessa äidinmaidonkorvikkeen proteiinien imeytymistä ja bioaktiivisten yhdisteiden vapautumista (Bouzerzour ym. 2012). *In vitro* -mallien olosuhteiden säätely on helpompaa kuin *in vivo*, joten niillä voisi olla mahdollista saada tarkempaa tietoa ruoansulatuskanavan muutoksien vaikutuksista proteiinien imeytymiseen.

6. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän tutkielman käsittelemän kirjallisuuden valossa voidaan todeta, että proteiinien imeytymistä on erityisesti viime vuosina tutkittu runsaasti hyödyntämällä erilaisia *in vitro* -malleja (Taulukko 1), joista suurin osa on staattisia (Hur ym. 2011). Eniten malleja on hyödynnetty proteiinien hydrolyysin etenemisen, hajoamisen ja peptidiprofiilien tarkastelussa (Liite 2). Tämä tutkielma onnistui käsittelemään laajasti erilaisia ja eritasoisia *in vitro* -malleja ja niiden hyödynnettävyyttä proteiinien imeytymisen tutkimisessa.

In vitro -mallit ovat käyttökelpoinen työkalu proteiinien imeytymisen tutkimisessa ja näyttäisi siltä, että niillä voidaan ennustaa suhteellisen hyvin proteiinien käyttäytymistä *in vivo*. Erityisesti silloin, kun ruokanäytteenä toimii yksinkertainen proteiiniliuos (Bohn ym. 2017).

Lisää tutkimusta kuitenkin tarvittaisiin *in vitro* -mallien kyvystä ennustaa monimutkaisempien ateriakokonaisuuksien imeytymistä elimistöstä.

Ruoansulatusjärjestelmän mallintamisessa on tullut esille myös lukuisia haasteita. Erityisesti dynaamisten olosuhteiden mallintaminen on haastavaa ja kaikkien niiden huomioiminen yhdessä mallissa on liian kunnianhimoinen tavoite (Guerra ym. 2012). Tämän tutkielman pohjalta voidaankin suositella lisätutkimusta proteiinien imeytymisestä *in vitro* -malleilla, jotka huomioivat mahdollisimman hyvin suoliston dynaamiset olosuhteet. Tutkimustulosten paremman keskinäisen vertailtavuuden vuoksi olisi myös tarpeen tehdä tutkimuksia hyödyntäen uutta harmonoitua menetelmää ja pyrkiä mahdollisuuksien mukaan integroimaan suolistosolumalleja ruoansulatusmalleihin. Lopuksi olisi tärkeää lisätä myös IIVC määrityksiä *in vitro* -malleilla saadun tutkimusaineiston ja *in vivo* -kokeiden aineiston välillä.

LÄHTEET

Abdel-Aal E-M. Effects of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two in vitro digestion methods. *LWT - Food Science and Technology* 2008;41:1282-1288.

Abrams D, Metcalf D, Hojjatie M. Determination of kjeldahl nitrogen in fertilizers by AOAC official methods 978.02: effect of copper sulfate as a catalyst. *Journal of AOAC International* 2014;97:764.

Agrawal KR, Lucas PW, Prinz JF, Bruce IC. Mechanical properties of foods responsible for resisting food breakdown in the human mouth. *Archives of Oral Biology* 1997;42:1-9.

Aiking H. Protein production: Planet, profit plus people? *American Journal of Clinical Nutrition* 2014;100:489S.

Barbé F, Feunteun SL, Rémond D, Ménard O, Jardin J, Gwénaele H, Laroche B, Dupont D. Tracking the in vivo release of bioactive peptides in the gut during digestion: Mass spectrometry peptidomic characterization of effluents collected in the gut of dairy matrix fed mini-pigs. *Food Research International* 2014;63:147-156.

Biehler E, Hoffmann L, Krause E, Bohn T. Divalent Minerals Decrease Micellarization and Uptake of Carotenoids and Digestion Products into Caco-2 Cells. *J Nutr* 2011;141:1769-1776.

Blanquet-Diot S, Soufi M, Rambeau M, Rock E, Alric M. Digestive Stability of Xanthophylls Exceeds That of Carotenes As Studied in a Dynamic in Vitro Gastrointestinal System. *J Nutr* 2009;139:876-883.

Bohn T, Carriere F, Day L, Deglaire A, Egger L, Freitas D, Golding M, Le Feunteun S, Macierzanka A, Menard O, Miralles B, Moscovici A, Portmann R, Recio I, Rémond D, Santé-Lhoutelier V, Wooster TJ, Lesmes U, Mackie AR, Dupont D. Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2017;1-23.

Bojsen-Møller KN, Jacobsen SH, Dirksen C, Jørgensen NB, Reitelseder S, Jensen JB, Kristiansen VB, Holst JJ, van Hall G, Madsbad S. Accelerated protein digestion and amino acid absorption after Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Clin Nutr* 2015;102:600-607.

Boutrou R, Gaudichon C, Dupont D, Jardin J, Airinei G, Marsset-Baglieri A, Benamouzig R, Tomé D, Leonil J. Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2013;97:1314-1323.

Bouzerzour K, Morgan F, Cuinet I, Bonhomme C, Jardin J, Le Huërou-Luron I, Dupont D. In vivo digestion of infant formula in piglets: protein digestion kinetics and release of bioactive peptides. *British Journal of Nutrition* 2012;108:1-10.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.

Chen J, Gaikwad V, Holmes M, Murray B, Povey M, Wang Y, Zhang Y. Development of a simple model device for in vitro gastric digestion investigation. *Food & Function* 2011;2:174-182.

Cho JH, Kim IH. Evaluation of the Apparent Ileal Digestibility (AID) of Protein and Amino Acids in Nursery Diets by In vitro and In vivo Methods. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2011;24:1007-1010.

Coles LT, Moughan PJ, Darragh AJ. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology* 2005;123-124:421-444.

Do AB, Williams K, Toomer OT. In vitro digestibility and immunoreactivity of bovine milk proteins. *Food Chemistry* 2016;190:581-587.

Dowell JA, Hussain A, Devane J, Young D. Artificial Neural Networks Applied to the In Vitro-In Vivo Correlation of an Extended-Release Formulation: Initial Trials and Experience. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999;88:154-160.

Egger L, Ménard O, Delgado-Andrade C, Alvito P, Assunção R, Balance S, Barberá R, Brodkorb A, Cattenoz T, Clemente A, Comi I, Dupont D, Garcia-Llatas G, Lagarda MJ, Le Feunteun S, JanssenDuijghuijsen L, Karakaya S, Lesmes U, Mackie AR, Martins C, Meynier A, Miralles B, Murray BS, Pihlanto A, Picariello G, Santos CN, Simsek S, Recio I, Rigby N, Rioux L, Stoffers H, Tavares A, Tavares L, Turgeon S, Ulleberg EK, Vegarud GE, Vergères G, Portmann R. The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International* 2016;88:217-225.

Elango R, Levesque C, Ball RO, Pencharz PB. Available versus digestible amino acids - new stable isotope methods. *British Journal of Nutrition* 2012;108:S314.

Engelen L, Fontijn-Tekamp A, Bilt Avd. The influence of product and oral characteristics on swallowing. *Archives of Oral Biology* 2005;50:739-746.

Fang X, Rioux L, Labrie S, Turgeon SL. Commercial cheeses with different texture have different disintegration and protein/peptide release rates during simulated in vitro digestion. *International Dairy Journal* 2016;56:169-178.

Fatouros DG, Nielsen FS, Douroumis D, Hadjileontiadis LJ, Mullertz A. In vitro–in vivo correlations of self-emulsifying drug delivery systems combining the dynamic lipolysis model and neuro-fuzzy networks. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008;69:887-898.

Fontijn-Tekamp FA, Slagter AP, Van 'T Hof, M A, Witter DJ, Kalk W, Jansen JA. Biting and chewing in overdentures, full dentures, and natural dentitions. *Journal of Dental Research* 2000;79:1519-1524.

Food and Drug Administration 1997, *Guidance for Industry: Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations*.

- Gad SC, Strauss S. *In vitro* toxicology. New York: CRC Press 2000.
- Gatellier P, Santé-Lhoutellier V. Digestion study of proteins from cooked meat using an enzymatic microreactor. *Meat Science* 2009;81:405-409.
- Guerra A, Denis S, le Goff O, Sicardi V, François O, Yao A, Garrait G, Manzi AP, Beyssac E, Alric M, Blanquet-Diot S. Development and validation of a new dynamic computer-controlled model of the human stomach and small intestine. *Biotechnology and bioengineering* 2016;113:1325-1335.
- Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology* 2012;30:591-600.
- Hames BD. *Gel electrophoresis of proteins : a practical approach*. Oxford ; New York: Oxford University Press 1998.
- Hanai T. *HPLC : a practical guide*. Cambridge: RSC 1999.
- Hasjim J, Lavau GC, Gidley MJ, Gilbert RG. In vivo and in vitro starch digestion: are current in vitro techniques adequate? *Biomacromolecules* 2010;11:3600.
- Hirschowitz BI. Pepsinogen. *Postgraduate Medical Journal* 1984;60:743-750.
- Hoebler C, Karinthe A, Chiron H, Champ M, Barry J. Bioavailability of starch in bread rich in amylose: metabolic responses in healthy subjects and starch structure. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:360.
- Hoebler C, Lecannu G, Belleville C, Devaux M-, Popineau Y, Barry J-. Development of an in vitro system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2002;53:389-402.
- Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry* 2011;125:1-12.
- Kitabatake N, Kinekawa Y. Digestibility of Bovine Milk Whey Protein and β -Lactoglobulin in Vitro and in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998a;46:4917-4923.
- Kitabatake N, Kinekawa Y. Digestibility of Bovine Milk Whey Protein and β -Lactoglobulin in Vitro and in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998b;46:4917-4923.
- Kong F, Singh RP. A Model Stomach System to Investigate Disintegration Kinetics of Solid Foods during Gastric Digestion. *Journal of Food Science* 2008;73:E210.
- Kong F, Singh RP. A Human Gastric Simulator (HGS) to Study Food Digestion in Human Stomach. *Journal of Food Science* 2010;75:E635.
- Kopf-Bolanz KA, Schwander F, Gijs M, Vergères G, Portmann R, Egger L. Validation of an in vitro digestive system for studying macronutrient decomposition in humans. *J Nutr* 2012;142:245-250.

Larsson K, Cavonius L, Alminger M, Undeland I. Oxidation of cod liver oil during gastrointestinal in vitro digestion. *Journal of agricultural and food chemistry* 2012;60:7556.

Le Feunteun S, Barbé F, Rémond D, Ménard O, Le Gouar Y, Dupont D, Laroche B. Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig In Vivo Data. *Food and Bioprocess Technology* 2014;7:1099-1113.

Lucas PW, Ow RKK, Ritchie GM, Chew CL, Keng SB. Relationship Between Jaw Movement and Food Breakdown in Human Mastication. *Journal of Dental Research* 1986;65:400-404.

Luo Q, Boom RM, Janssen AEM. Digestion of protein and protein gels in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology* 2015;63:161-168.

Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol* 2005;99:287-296.

Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carrière F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Egger L, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Feunteun SL, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie A, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Recio I, Santos CN, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MSJ, Weitschies W, Brodkorb A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct* 2014;5:1113-1124.

Mun S, Decker EA, McClements DJ. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International* 2007;40:770-781.

Nunes A, Correia I, Barros A, Delgadillo I. Sequential in vitro pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples. *Journal of agricultural and food chemistry* 2004;52:2052-2058.

Nunes K. Consumer interest in protein remains high. *Food Business News* 2014. http://www.foodbusinessnews.net/articles/news_home/Consumer_Trends/2014/06/Consumer_interest_in_protein_r.aspx?ID=%7B8BFA54BC-76DC-4525-B13B-B120E5D3FD4D%7D&cck=1 (luettu Jan 17, 2018).

Oomen AG, Rompelberg CJM, Bruil MA, Dobbe CJG, Pereboom, D. P. K. H, Sips, A. J. A. M. Development of an In Vitro Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003;44:281.

Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *Journal of agricultural and food chemistry* 2006;54:8749-8755.

Rinaldi L, Gauthier SF, Britten M, Turgeon SL. In vitro gastrointestinal digestion of liquid and semi-liquid dairy matrixes. *LWT - Food Science and Technology* 2014;57:99-105.

Rozan P, Lamghari R, Linder M, Villaume C, Fanni J, Parmentier M, Mejean L. In Vivo and In Vitro Digestibility of Soybean, Lupine, and Rapeseed Meal Proteins after Various Technological Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997;44:1762-1769.

Rui X, Xing G, Zhang Q, Zare F, Li W, Dong M. Protein bioaccessibility of soymilk and soymilk curd prepared with two *Lactobacillus plantarum* strains as assessed by in vitro gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2016;38:155-159.

Rutherford SM. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in Hydrolysates: a review. *Journal of AOAC International* 2010;93:1515.

Santé-Lhoutellier V, Engel E, Aubry L, Gatellier P. Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. *Meat Science* 2008;79:777-783.

Singh AK, Mukhopadhyay M. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Appl Biochem Biotechnol* 2012;166:486-520.

ThermoFisher Scientific. Colorimetric Protein Assays 2018. <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/colorimetric-protein-assays.html> (luettu Mar 30, 2018).

Versantvoort CHM, Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJM, Sips, Adriëne J A M. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology* 2005;43:31-40.

Voutilainen E, Mutanen M. Energiaravintoaineet, ravintokuitu ja alkoholi . Kirjassa: Aro A, Uusitupa M, Mutanen M, toim. Ravitsemustiede. Helsinki: Duodecim 2012, s. 34-75.

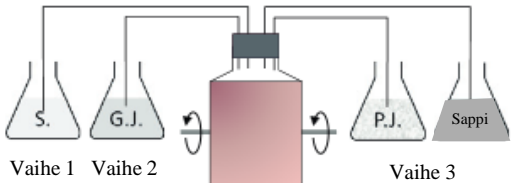
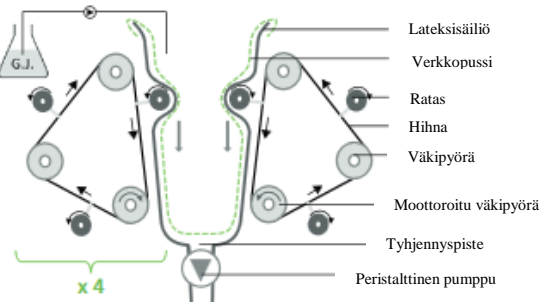
Weaver K, Kelley C. Trypsin : Structure, Biosynthesis and Functions. New York: Nova Science Publishers, Inc 2012.

Xing G, Rui X, Jiang M, Xiao Y, Guan Y, Wang D, Dong M. In vitro gastrointestinal digestion study of a novel bio-tofu with special emphasis on the impact of microbial transglutaminase. *PeerJ* 2016;4:e2754.

Zentler-Munro PL, Assoufi BA, Balasubramanian K, Cornell S, Benoliel D, Northfield TC, Hodson ME. Therapeutic potential and clinical efficacy of acid-resistant fungal lipase in the treatment of pancreatic steatorrhoea due to cystic fibrosis. *Pancreas* 1992;7:311-319.

LIITTEET

Liite 1. Kaavakuvat tyypillisistä *in vitro* -malleista ja niiden huomioimat ruoansulatuskanavan ominaisuudet. Ominaisuudet, jotka on otettu mallissa huomioon, on merkitty + -merkillä. (Muokattu Guerra ym. 2012)

<i>In vitro</i> -malli	Kaavakuva	Kehon lämpötila	Mahalaukun pH:n lasku	Suolen pH:n kontrollointi	Mahalaukun tyhjiennys	Suolen läpikulku	Eritetyt ruoansulatusnesteet	Ruokasulan sekoitus	Suolen mikrobisto	Imeytyminen suolistosta	Lähde
Staattinen yksiosainen malli		+	-	-	-	-	Sylkineste (S) Mahaneste (GJ) Haimaneste (PJ) Sappineste	Pyöröravistelijä	-	-	(Oomen ym. 2003)
Dynaaminen yksiosainen malli		+	+	NA ¹	+	NA	Sylkineste (sekoitettuna ruokaan) Mahaneste (GJ) + HCl	Mekaaninen ajolaite (<i>mechanical driving device</i>)	NA	NA	(Kong ja Singh 2010)

(Jatkuu)

Dynaaminen kaksiosainen malli		+ + + + -	Sappineste HCl	Magneettinen sekoittaja	- -	(Mainville ym. 2005)
Dynaaminen moniosainen malli		+ + + + +	Sylkineste (sekoitettuna ruokaan) Mahaneste (GJ) Haimaneste (PJ) Sappineste Elektrolyytit HCl NaHCO ₃	Veden paine	- +	(Guerra ym. 2012)

1. Not applicable = ei soveltuva

Liite 2. Kokoomataulukko proteiinien imeytymistä tarkastelevien tutkimusten pääparametreista, analyysimenetelmistä ja tärkeimmistä tuloksista.

Tutkitut parametrit	Ruokanäyte	Analyysimenetelmät	Päätulokset	Lähde
Makronutrienttien hajoaminen	Täysmaito	SDS-PAGE ³ BCA ⁴ käänteisfaasi- HPLC ⁵ ekskluusio-HPLC ⁵ LC-MS ⁶	Kaikki proteiinit β -laktoglobuliinia lukuun ottamatta hajosivat pienemmiksi peptideiksi jo mahalaukkuvaiheen aikana. Ruoansulatuksen päätyttyä 54 % maidon kokonaisproteiineista oli hajonnut vapaiksi AA ¹ ja di- ja tripeptideiksi. HPLC ⁵ paljasti, että vapaiden AA ¹ :n osuus oli 10 %, joista EAA ² 94 %. LC-MS ⁶ /MS mitattuna suurin osa peptideista oli 6 AA ¹ pitkiä.	(Kopf-Bolanz ym. 2012)
Proteiinien/peptidien vapautuminen ja juustojen matriisin hajoaminen	Juustot (n=5)	BCA ⁴ SDS-PAGE ³	Aistittavilta rakenteiltaan erilaiset juustot erosivat toisistaan matriisin hajoamisessa ja proteiinien vapautumisessa mahalaukkuvaiheen aikana. Elastinen rakenne näyttäisi estävän proteiinien vapautumista matriisista ja rajoittavan entsyymien vaikutusta matriisissa. Rakenne näyttäisi myös vaikuttavan proteiinien vapautumisnopeuteen. Ohutsuolivaiheen aikana eroja proteiinien vapautumisessa ei havaittu.	(Fang ym. 2016)
Ruokamatriisin vaikutus proteiinien imeytymiseen ja hajoamiseen	Maito Jogurtti	BCA ⁴ SDS-PAGE ³ GC ⁷	Liukoisten proteiinien määrä jogurtissa oli oraalisen ja mahalaukkuvaiheen aikana pienempi kuin maidossa, mutta ohutsuolivaiheessa eroa ei havaittu. Lämpökäsittely näyttäisi vaikuttavan SDS-PAGE ³ :lla saatuihin proteiiniprofiileihin; kaseiinit, β -LG ¹⁰ ja α -laktalbumiini hajosivat helpommin korkeammassa lämpötilassa käsitellyissä matriiseissa. Suurin osa vapaista AA ¹ :ta vapautui ohutsuolivaiheen aikana ja vain noin 0,4 % oraalisen vaiheen aikana. Matriisien välillä ei ollut merkittäviä eroja vapaiden AA ¹ :n määrissä. Matriisien vapauttamien AA ¹ :n laadussa eri ollut eroa matriisien välillä, mutta matriisin sisällä ero oli merkitsevä (p<0,05).	(Rinaldi ym. 2014)
Stabiilien kokonaisproteiinien imeytyminen, immunoreaktiivisuus ja allergeenisuus	Rasvaton maitojauhe + kaseiini + β -laktoglobuliini	SDS-PAGE ³ Immunoblotting-analyysi	Maidon tunnettujen allergeeniproteiinien β -LG ¹⁰ :in ja kaseiinien denaturaatio ja pilkkoutuminen vähensi niiden immunoreaktiivisuutta huomattavasti mahalaukkuvaiheen aikana. Osa niistä kuitenkin pysyi stabiileina ja immunoreaktiivisina ohutsuolivaiheen aikana.	(Do ym. 2016)
Proteolyysi ja peptidiprofiili	Naudanliha	Absorbanssin jatkuva mittaaminen	Lihan pidentynyt kypsennysaika vaikutti absorbanssin maksimiarvoon (A_{\max}) alentavasti. A_{\max} kuvaa proteiinien proteolyysiasetta eli lihan kypsennyksellä on negatiivinen vaikutus proteiinien hajoamiseen. Yli 30 min kypsennysajalla oli myös ruoansulatusprosessia hidastava vaikutus. Ohutsuolivaiheen aikana absorbanssin muutokset viittaavat siihen, että 1 kDa kokoiset peptidit poistuvat suolesta nopeammin kuin niitä muodostuu pankreatiinin hydrolyysin seurauksena.	(Gatellier ja Santé-Lhoutellier 2009)

(Jatkuu)

Tutkitut parametrit	Ruokanäyte	Analyysimenetelmät	Päätulokset	Lähde
Hydrolyysiaste, peptidiprofiili	Proteiiniliuokset Proteiinigeelit	OPA ⁸ SEC ⁹	Proteiinigeelistä vapautui vähemmän vapaita AA ¹ kuin vastaavan määrän proteiinia sisältävästä proteiiniliuoksesta. Vapaiden AA ¹ :n määrä kasvoi lineaarisesti ruoansulatuksen edetessä. Ilman pepsiiniä tuotetussa mahalaukkuvaiheessa vapaiden AA ¹ :n määrä oli hyvin pieni. Dynaaminen malli tuotti paljon suuremman määrän vapaita AA ¹ ryhmiä kuin staattinen malli. Geelin mikrorakenne näyttäisi myös haittaavan proteiinien imeytymistä hidastamalla hydrolyysiä.	(Luo ym. 2015)
Liukoisten proteiinien määrä, hydrolyysiaste, proteiinien imeytymisnopeus	Soijamaito Tofu	Bradford OPA ⁸ SDS-PAGE ³	Soijamaidon liukoisten proteiinien määrä oli suurempi kuin tofuilla, mutta maitojen liukoisuus laski maha- ja ohutsuolivaiheiden aikana. Tofuilla liukoisuus nousi merkitsevästi ($p < 0,05$) mahalaukkuvaiheen aikana verrattuna oraaliseen ja ohutsuolivaiheisiin. Tofuilla oli pienempi hydrolyysiaste ja niiden hydrolyysi tapahtui nopeasti mahalaukkuvaiheen aikana ja ohutsuolivaiheen aikana hydrolyysiaste nousi vain vähän. Maidoilla hydrolyysi tapahtui tasaisesti nousten eri vaiheiden aikana. Tofuilla havaittiin myös hitaampi proteiinien imeytymisnopeus ja osa proteiinifraktioista oli edelleen havaittavissa SDS-PAGE ³ :lla ohutsuolivaiheen loppuun.	(Rui ym. 2016)
Liukoisten proteiinien määrä, hydrolyysiaste, vapaiden AA ¹ määrä	Biotofu (sis. lehmänmaito + soijamaito)	Bradford SDS-PAGE ³ OPA ⁸ Automaattinen AA ¹ -analysointilaitteisto	Liukoisten proteiinien määrä poikkesi mikrobiperäistä transglutaminaasia (<i>microbial transglutaminase</i> , MTGase ¹¹) sisältävän ja sisältämättömän biotofunäytteen välillä. MTGase ¹¹ :a sisältävällä näytteellä oli alhaisempi proteiinien liukoisuus ja imeytyminen. MTGase ¹¹ :a sisältävä näyte myös hydrolysoitui heikommin. Merkitsevä ($p < 0,05$) ero havaittiin sekä mahalaukku- että ohutsuolivaiheiden lopussa. Näytteiden välillä oli eroja vapaiden AA ¹ :n määrässä; valiinia ja leusiinia lukuun ottamatta MTGase ¹¹ :a sisältämätön biotofu sisälsi enemmän vapautuneita AA ¹ ohutsuolivaiheen päätyttyä.	(Xing ym. 2016)

Tutkitut parametrit	Ruokanäyte	Analyysimenetelmät	Päätulokset	Lähde
Hydrolyysiaste, peptidiprofiili, vapaiden AA ¹ vapautumisaste	Rasvaton maitojauhe	LC-MS ⁶ HPLC ⁵ SDS-PAGE ³	Sekä laboratorioden sisäisillä menetelmillä ja harmonoidulla menetelmällä havaittiin, että β-LG ¹⁰ oli kokonainen mahalaukkuvaiheen jälkeen. α-LA ¹² ei ollut havaittavissa millään menetelmällä mahalaukkuvaiheen jälkeen. Laboratorioden sisäisten menetelmien tulokset β-LG ¹⁰ hydrolysoitumisesta ohutsuolessa vaihtelivat täysin hydrolysoituneesta kokonaiseen proteiiniin. Peptidiprofiileissa menetelmien välinen korrelaatio oli mahalaukkuvaiheen loppuksi lähes yhtä hyvä; sisäiset 84 ± 6 % ja harmonoitu 79 ± 7 %. Ohutsuolivaiheen korrelaatioissa oli taas selvä ero; sisäiset 48 ± 16 % ja harmonoitu 64 ± 8 %. Havaittiin myös, että AA ¹ :t vapautuivat pääasiassa ohutsuolessa. Harmonoidulla menetelmällä tehdyissä rinnakkaisissa kokeissa oli kuitenkin eroja vapautuneiden AA ¹ :n kokonaismäärissä; 88 % ensimmäisessä ja 60 % toisessa kokeessa.	(Egger ym. 2016)

1. AA = aminohappo, 2. EAA = välttämättömät aminohapot, 3. SDS-PAGE = Natrium-dodekyyli-sulfaatti-polyakryyliamidi-geelielektroforeesi, 4. BCA = Bisinkoniinihappoanalyysi, 5. HPLC = korkean erotuskyvyn nestekromatografi, 6. LC-MS = nestekromatografi-massaspektrometri, 7. GC = kaasukromatografi, 8. OPA = o-ftaalialdehydi, 9. SEC = eksklusiokromatografi (*size exclusion chromatography*), 10 β-LG = β-laktoglobuliini, 11. MTGase = mikrobiperäinen transglutaminaasi, 12. α-LA = α-laktalbumiini

Liite 3. Kokoomataulukko proteiinien imeytymisen *in vivo* -tutkimuksista.

Mallieläin	Ruokanäyte	Menetelmä	Lähde
Rotta, uros	Rapsisienjauho Soijapapu Lupiini	Rottien ulosteesta määritettiin AD ¹ ja TD ² -arvot. AD ¹ :n määrittämisessä käytettiin ulosteindeksi (<i>fecal index</i>) menetelmää. Mittaamalla ulostenäytteiden kuivapainot ja typpipitoisuudet Kjeldahl-menetelmällä saatiin määritettyä ulosteen typpipitoisuus, joka vähennettiin nautitun typen määrästä, jolloin saatiin näytteen AD ¹ -arvo. Lopullinen TD ² -arvo saatiin laskennallisesti ottamalla erotus rottien nauttiman typen ja ulosteen kokonaistypen ja endogeenisen typen välillä. Endogeeninen typpi määritettiin mittaamalla proteiinivapaata ruokaa nauttineiden rottien ulosteen typpimäärä. Tämän lisäksi määritettiin myös PER ⁵ -arvo. PER ⁵ = painonnousu (g)/nautittu proteiini (g).	(Roazan ym. 1997)
Rotta, uros	β-LG ³	Kuumennettu ja kuumentamaton β-LG ³ -liuos ruiskutettiin rottien mahaan. 40 min jälkeen mahasta ja suolesta otettiin näytepalat, jotka analysoitiin SDS-PAGE ⁴ :lla ja Western blotting-menetelmällä. Rotille (n= 3 x 8) myös syötettiin β-LG ³ -liuoksia 30 päivän ajan. Kontrolliryhmä sai proteiinivapaata liuosta. Nautitut tilavuudet kirjattiin ylös ja rotat punnittiin päivittäin klo. 9-10 välillä. Painon muutoksen ja syötetyn proteiinin määrän avulla määritettiin laskennallisesti PER ⁵ ja NPR ⁶ -arvot. NPR ⁶ = (painonnousu (g) – kontrolliryhmän painonnousu (g)) / nautittu proteiini (g).	(Kitabatake ja Kinekawa 1998b)
Porsas	Äidinmaidonkorvike	Porsaat (n=18) teurastettiin niiden oltua äidinmaidonkorvikeruokinnassa 26 päivää. Teurastus tapahtui 30, 90 ja 210 min kuluttua viimeisestä ateriasta. Ruoansulatuskanava poistettiin ja näytteet kerättiin mahasta, jejunumista 2,5 m ja 4-6 m kohdalta ja ileumista. Näytteistä mitattiin maidon β-LG ³ ja α-LA ⁶ ja kaseiinien hydrolyysiaste inhibitio ELISA ⁷ :n, SDS-PAGE ⁴ :n, immunoblotting-menetelmällä ja massaspektrometrin avulla.	(Bouzerzour ym. 2012)
Ihminen	Proteiinisupplementtijuoma (sis. kaseiinit ja heraproteiinit)	Koehenkilöiltä (n=16) kerättiin näytteitä proksimaalisesta jejunumista nenämahaletkun avulla 6 h ajan ja 30 min välein testiaterian nauttimisesta. Testiaterian maidon proteiinit merkittiin ¹⁵ N -isotoopilla. Kerättyjen näytteiden kokonaistyppipitoisuus määritettiin Euro Elemental Analyzer 3000; EuroVector, typpianalysaattorilla (<i>elemental nitrogen analyzer</i>). Näytteistä määritettiin ¹⁵ N: ¹⁴ N isotooppien suhde isotooppisuhde-massaspektrometrillä, minkä jälkeen eksogeenisen typen määrä määritettiin kokonaistypen virtausnopeuden, ruokasulanäytteen APE ⁸ -arvon ja testiaterian APE ⁸ -arvon suhteen avulla. Peptidit tunnistettiin tandemi massaspektrometrillä.	(Boutrou ym. 2013)

(Jatkuu)

Mallieläin	Ruokanäyte	Menetelmä	Lähde
Minisika, naaras	Rasvaton maitojauhe eri matriiseissa (n=6)	Kuudelle minisialle syötettiin saman verran proteiinia kullekin eri matriisissa. Näytteet kerättiin kanyyllillä, joka oli kolme viikkoa ennen koetta asetettu porsaiden mahaportin suulle. Näytteet kerättiin 30 min ennen ruoan nauttimista ja 7 h ajan kahdeksassa eri aikapisteessä ruoan nauttimisesta. Näytteistä otettiin kuivapaino ja kromikonsentraatio. Sioilta otettiin myös verinäytteet ennen ja jälkeen ruoan nauttimisen yhteensä 10 eri aikapisteessä. Verestä määritettiin AA ⁹ -konsentraatio ioninvaihto-kromatografilla.	(Le Feunteun ym. 2014)
Minisika, naaras	Rasvaton maitojauhe eri matriiseissa (n=6)	Kuusi maitotuotematriisia annettiin kullekin minisialle (n=4) satunnaisessa järjestyksessä. Eri näytteiden välissä oli aina 2 päivän tauko. Näytteet kerättiin kanyyllillä, joka oli kolme viikkoa ennen koetta asetettu porsaiden mahaportin suulle. Näytteet kerättiin 30 min ennen ruoan nauttimista ja 5 h ajan seitsemässä eri aikapisteessä ruoan nauttimisesta. Näytteiden reaktiot pysäytettiin proteaasi-inhibiittorilla, minkä jälkeen ne jäädettiin nestemäisellä tyypellä. Näytteiden proteiiniprofiili määritettiin SDS-PAGE ⁴ :lla. Peptidien tunnistus tapahtui tandemi massaspektrometrillä yhdistettynä nestekromatografiin.	(Barbé ym. 2014)
Sika	Rasvaton maitojauhe	Sioille (n=8) annettiin maitojauhetta kolme kertaa ennen teurastusta: 6, 3 ja 1,5 h. Näytteet kerättiin neljästä eri kohtaa ruoansulatuskanavaa; mahasta, duodenumista ja ylemmästä ja alemmasta osaa ohutsuolta. Proteiinien hajoaminen, peptidien muodostuminen ja syntyneet vapaat AA:t analysoitiin SDS-PAGE ⁴ :n, LC-MS ¹⁰ :n ja HPLC ¹¹ :n avulla.	(Bohn ym. 2017)

1. AD = näennäinen sulavuus (*apparent digestibility*), 2. TD = todellinen sulavuus (*true digestibility*), 3. β -LG = β -laktoglobuliini, 4. SDS-PAGE = Natrium-dodekyyli-sulfaatti-polyakryyliamidi-geelielektroforeesi, 5. PER = proteiinien tehokkuussuhde (*protein efficiency ratio*), 6. NPR = nettoproteiinisuhde (*net protein ratio*), 6. α -LA = α -laktalbumiini, 7. ELISA = entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys, 8. APE = (*atom percent excess*), 9. AA = aminohappo, 10. LC-MS = nestekromatografi-massaspektrometri, 11. = korkean erotuskyvyn nestekromatografi