

**Hyönteiset ihmisen ravintona: kitiinin ravitsemuksellinen merkitys ja vaikutus suolistobakteereiden (*Lactobacillus rhamnosus* GG ja *Escherichia coli* TG) kasvuun**

Otto Selenius

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto  
Biologian laitos  
22.06.2017

Linja: Fysiologian ja genetiikan linja  
Erikoistumisala: Eläinfysiologia

Laajuus: 40 op

Tarkastajat:

1: Mikko Nikinmaa

2: Minna Vainio

Hyväksytty: 25.08.2017

TURUN YLIOPISTO  
Biologian laitos  
Matemaattis- luonnontieteellinen tiedekunta

SELENIUS, OTTO: Hyönteiset ihmisen ravintona: kitiinin ravitsemuksellinen merkitys ja vaikutus suolistobakteereiden (*Lactobacillus rhamnosus* GG ja *Escherichia coli* TG) kasvuun.

Pro gradu -tutkielma, 63 s., 8 liitettä  
Eläinfysiologia  
Toukokuu 2017

---

YK:n elintarvike- ja maatalousjärjestö FAO:n mukaan hyönteiset ovat ihmisen ravinnoksi sopivaa ruokaa, jota voidaan tuottaa kestäväen kehityksen periaatteiden mukaisesti. Hyönteiset sisältävät paljon proteiinia ja vastaavat ravintoarvoiltaan kanaa, kalaa ja muita tuotantoeläimiä. Niiden tuottaminen ruoaksi on nykyistä lihatuotantoa ekologisempaa, säästää energiaa ja maanviljelyyn käytettyjä resursseja, sekä tuottaen vähemmän kasvihuonekaasupäästöjä.

Hyönteisten ulkoinen tukiranka koostuu kitiinistä. Kitiini on myrkytön, selluloosan kaltainen polysakkaridi. Hyönteisruoasta saatava kitiini ja sen hajoamistuotteet, kito-oligosakkaridi ja kitosaani, toimivat ravintokuidun tavoin ja alentavat veren kolesterolia. Pienikokoiset ja vesiliukoiset kito-oligosakkaridi- ja kitosaanipartikkelit voivat toimia ihmiselle ravintona imeytyessään ruoansulatuskanavasta verenkiertoon. Niillä on myös todettu olevan antioksidatiivisia, anti-inflammatorisia, sekä antitumorisia vaikutuksia. Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden on myös todettu ehkäisevän useimpien haitallisten suolistobakteereiden kasvua. Useimpien ruoansulatushäiriöiden ja suoliston tulehdusten taustalla ovat lisääntyneet haitallisten bakteereiden kannat. Haitallisten bakteereiden kasvua voi ehkäistä syömällä ravintoa, joka edesauttaa ihmiselle hyödyllisten maitohappo- ja bifidobakteerien kasvua.

Tässä tutkimuksessa kito-oligosakkaridin havaittiin toimivan prebiotin tavoin edistäen hyödyllisten maitohappobakteerien *Lactobacillus rhamnosus* GG kasvua ja ehkäisten haitallisten kolibakteereiden *Escherichia coli* TG kasvua. Kitiinin havaittiin estävän molempien bakteereiden kasvua.

Jotta hyönteisruoasta saataisiin kaikkia mahdollisia terveysvaikutuksia, elimistön on pystyttävä pilkkomaan kitiiniä kito-oligosakkarideiksi ja kitosaaniksi, tai näitä kitiinin hajoamistuotteita on oltava hyönteisruoassa itsessään. Elimistö voi hajottaa kitiiniä ruoansulatuksen AMCaasi- ja lysosyymientsyymien, tai suolistobakteerien avulla. Hyönteisruoasta saatavan kitiinin terveyttä edistävät vaikutukset riippuvat siitä miten hyvin kitiiniä pystytään ruoansulatuksessa hajottamaan, kuinka paljon hajoamistuotteita syntyy, millaisia bioaktiivisia sivuketjuja niillä on ja miten pitkäketjuisia yhdisteet ovat. Ihmiset joilla tuotetaan kitiiniä hajottamaan kykenevää AMCaasi-entsyymiä vähän, eivät saa syödystä hyönteisateriasta kitiinin kaikkia terveysvaikutuksia ainakaan niin vahvoina, kuin sellaiset ihmiset joilla entsyymiä on paljon.

---

ASIASANAT: kitiini, hyönteissyönti, ruoansulatus, prebiootti, maitohappobakteerit, kolibakteerit

# Sisällys

1 JOHDANTO .....	1
1.1 Kitiinin kemiallinen rakenne ja ominaisuudet.....	5
1.2 Hyönteisten ulkoinen tukiranka koostuu kitiinistä.....	6
1.3 Kitiiniä hajottavat entsyymit ja kitiinin hajoamistuotteiden imeytyminen ruoansulatuksessa .....	8
1.3.1 AMCaasi -entsyymi hajottaa kitiiniä mahalaukussa sekä suolistossa .....	9
1.3.2 Lysotsyymit voivat mahdollisesti hajottaa kitiiniä kitosaaniksi ja kito-oligosakkarideiksi .....	11
1.3.3 Kitotriosidaasin merkityksestä ruoansulatuksessa ei olla varmoja.....	14
1.3.4 Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden imeytyminen .....	14
1.4 Ihmisen symbioottiset suolistobakteerit ja hyönteisruoan vaikutus hyvinvointiimme .....	15
1.5 Tutkimuksen tarkoitus .....	20
2. AINEISTO JA MENETELMÄT .....	20
2.1 Työssä käytetyt bakteerit ja niiden kasvatusta .....	20
2.2 Kitiinin ja kito-oligosakkaridin liuokset.....	21
2.3 Kuoppalevyn valmistus ja luenta.....	23
2.4 Tilastollinen analyysi .....	24
3 TULOKSET .....	25
3.1 Kitiinin ja kito-oligosakkaridin vaikutus <i>Escherichia coli</i> TG kasvuun.....	25
3.2 Kitiinin ja kito-oligosakkaridin vaikutus <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG kasvuun .....	26
4 POHDINTA .....	29
4.1 Miksi hyönteisiä kannattaa syödä? .....	29
4.2 Tutkimuksen koeasetelma .....	30
4.2.1 Natriumhydroksidi .....	32
4.2.2 Spektrofotometri ja absorbanssi.....	33

4.3 Kitiinin ja kito-oligosakkaridin vaikutus suolistobakteereihin .....	34
4.4 Kitiinin sen hajoamistuotteiden fysiologiset vaikutukset ja edellytykset vaikutusten aikaansaannille .....	37
4.5 Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden turvallisuus .....	38
4.6 Kitiinin fysiologisia vaikutuksia on tutkittava lisää .....	39
5 YHTEENVETO .....	41
KIITOKSET .....	42
KIRJALLISUUS .....	44
LIITTEET .....	53

## Käytetyt lyhenteet

FAO	( <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ) YK:n elintarvike- ja maatalousjärjestö
GlcNAc	N-asetyyli-glukosamiini
ADF	( <i>Acid detergent fibre</i> ) Happamissa olosuhteissa liukenevan kuitumaisen yhdisteen määritykseen käytettävä happodetergenttiluku.
KOS	Kito-oligosakkaridi
AMCaasi	( <i>Acidic mammalian chitinase</i> ) Nisäkkäillä ruoansulatuskanavassa toimiva kitinaasientsyymi
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG -bakteerilaji
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> -bakteerilaji
MIC	( <i>Minimum inhibitory concentration</i> ) Pienin mahdollinen pitoisuus, jossa mikrobien kasvua estäviä vaikutuksia ilmenee
kDa	kilodalton
TSA	( <i>Tryptone Soy Agar</i> ) Tryptoni-soija-agar -elatusjauhe
PBS	( <i>Phosphate-buffered saline</i> ) Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
NaOH	Natriumhydroksidi
LDL	( <i>Low density lipoprotein</i> ) Alhaisen tiheyden lipoproteiini

## 1 Johdanto

Hyönteiset (*Insecta*) ovat jo vuosituhansien ajan kuuluneet ihmisen normaaliin ravintoon. Hyönteissyönti on niinkin yleistä, että arvion mukaan hyönteisiä käyttää ravintonaan kaksi miljardia ihmistä ympäri maailman. Hyönteisiä syödään erityisesti Afrikan, Aasian, sekä Keski- ja Etelä-Amerikan kulttuureissa. Länsimaisesta ruokakulttuurista hyönteiset ovat hävinneet, mutta viime vuosina kiinnostus hyönteissyöntiä kohtaan on noussut. Monet ihmiset länsimaissa ovat alkaneet kiinnostumaan hyönteisruoasta sen ravitsemuksellisten arvojen ja ekologisuuden takia.

Tutkimustietoa syötävistä hyönteisistä ja hyönteisruoasta on kerätty jo vuosikymmeniä. Kerättyyn tietoon perustuen Yhdistyneiden kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestö (FAO) onkin ehdottanut 2013 julkaisemassaan hyönteisruokaa käsittelevässä kirjassaan, että yksi kestävän kehityksen mukainen vaihtoehto tulevaisuuden ruokatuotannolle on lisätä vaihtoehtoisten proteiini lähteiden, kuten hyönteisten, osuutta ruoassamme sekä eläinten rehussa (van Huis ym. 2013). Maapallon kasvava väkiluku ja ruokaturvan varmistaminen haastavat meidät etsimään yhä tehokkaampia ruoantuotantokeinoja, sillä esimerkiksi eläinproteiinin kysynnän on arvioitu kasvavan merkittävästi seuraavien vuosikymmenten aikana. Hyönteisruoasta voi todella olla vastaamaan tulevaisuuden ruoantuotannon haasteisiin, sillä niiden kasvattaminen ruoaksi on monin kerroin tehokkaampaa ja vähemmän ympäristöä kuluttavaa, kuin lihakarjan kasvattaminen. Kasvutehokkuus johtuu hyönteisten vaihtolämpöisyydestä, jonka vuoksi ne eivät kuluta energiaa kehonsa lämpimänä pitämiseen.

Hyönteisistä valmistettuja ruokatuotteita on ollut jo muutaman vuoden ajan saatavilla joissakin Euroopan maissa, kuten Belgiassa, Hollannissa ja Iso-Britanniassa, mutta myös Suomesta voi jo ostaa sirkkatuotteita. Kuitenkin Suomen elintarviketurvallisuusvirasto Eviran (2016a) mukaan: ”Tällä hetkellä kokonaisia tai prosessoituja hyönteisiä ei saa tuoda maahan, myydä, markkinoida tai kasvattaa elintarvikkeeksi, ennen kuin kunkin lajin käyttöhistoria EU:ssa on voitu osoittaa tai sille on myönnetty uuselintarvikelupa.” Päätös perustuu EU:n uuselintarvikelakiin (EU 2283/2015), jota ollaan uudistamassa vuonna 2018 sallivammaksi hyönteisten osalta. Kyseinen asetus liittyy elintarvikekäytännön valvomiseen ruokatuotteilla, joilla ei ole ollut merkittävää käyttöä ennen asetuksen voimaan tulemistä 1997. Hyönteisruoka ei siis ole ihmiselle vaarallista. Sillä ei vain ole ollut merkittävää ruokakäyttöä EU:n alueella ennen vuotta 1997 ja siksi hyönteiset ovat vielä tällä hetkellä uuselintarvikelain piirissä.

Hyönteisruoasta puhuttaessa eniten pinnalla ovat yleensä kotisirkat (*Acheta domesticus*) ja jauhopukin (*Tenebrio molitor*) toukat, eli jauhomadot. Sirkat ja toukat ovat tällä hetkellä ruokahyönteisistä suosituimpia ja eniten tutkittuja, mutta syötäviä lajeja on arvioitu olevan noin 2000. Hyönteiset valmistetaan ruoaksi, niin kuin muukin tavallinen eläinperäinen ruoka. Valmistustavasta riippuen hyönteiset voidaan syödä monella eri tavalla, sekä kokonaisina, että jauheena, jolloin niitä voidaan esimerkiksi lisätä muiden elintarvikkeiden sekaan. Lisäksi niistä voidaan myös erotella proteiinit, rasvat ja kitiini erikseen ja käyttää niitä elintarvikkeiden raaka-aineena. Hyönteiset ovat ravitsevaa ruokaa, josta ihminen voi saada riittävästi kaikkia tarvittavia aminohappoja. Ne vastaavat ravinto-arvoiltaan kalaa ja kanaa, sisältäen proteiinin lisäksi runsaasti tyydyttymättömiä rasvahappoja, E- ja B12-vitamiineja, sekä tarpeellisia hivenaineita, kuten rautaa ja sinkkiä (van Huis ym. 2013). Hyönteiset sopivat kaikenlaisen ruoanlaiton raaka-aineiksi ja niitä voi käyttää hyvin monipuolisesti osana terveellistä ruokavaliota.

Hyönteiset sisältävät myös kitiiniä, joka on ominaisuuksiltaan selluloosan, eli kasvien soluseinien tukirakenteiden kaltainen kuitumainen yhdiste. Kitiiniä on kaikkien niveljalkaisten (*Arthropoda*) ulkoisessa tukirangassa ja sitä on myös esimerkiksi katkarapujen kovassa kitiinikuoressa, sekä sienten soluseinämässä, joten sen tiedetään jo olevan turvallinen osa ruokaamme. Tähänastisesta kitiinitutkimuksesta kerätyt faktat on koostettu taulukkoon 1. Useimpien ihmisten on mahdollista hajottaa ja hyödyntää ravinnosta saatua kitiiniä ruoansulatusentsyymiensä avulla ja näin ollen myös hyötyä kitiinin ja sen hajoamistuotteiden fysiologisista vaikutuksista. Esimerkiksi EU:n hyväksymän asetuksen mukaan kitiinin hajoamistuotteen, kitosaanin, vaikutuksista kolesterolitasapainon ylläpitämiseen on riittävää tieteellistä näyttöä (EU 432/2012). Toinen kitiinin hajoamistuote, kito-oligosakkaridi, voi toimia prebioottina, eli ruoasta saatavana yhdisteenä joka edistää hyvien suolistobakteerien kasvua ja ehkäisee haitallisten bakteereiden kasvua. Mikäli hyönteisruoka tulee yleistymään, kitiiniyhdisteillä saattaa tulevaisuudessa olla merkittävä vaikutus tavallisessa ruokavaliossamme. Vaikka kitiini on tunnettu yhdiste, sen ravitsemuksellisia merkityksiä, tai fysiologisia vaikutuksia ihmisen ruoansulatukselle ja suoliston symbioottisille bakteereille, ei ole tutkittu vielä riittävästi.

Ihminen, kuten muutkin nisäkkäät, on ruoansulatukseltaan riippuvainen suoliston symbioottisten bakteereiden hajoustoiminnasta, sillä ihmisen omat ruoansulatusentsyymit eivät pysty hajottamaan kaikkea ruokamassaa. Suolistobakteerit kykenevät hajottamaan esimerkiksi kasviravinnon mukana saatavaa selluloosaa, joten ne

voivat myös vaikuttaa hyönteisravinnosta saatavan kitiinin pilkkoutumiseen ihmiselle hyödynnettävään muotoon. Jokaisella ihmisellä on suolistossaan omanlaisensa yhdistelmä bakteereita, jotka vaikuttavat monin tavoin esimerkiksi toimivaan ruoansulatukseen, paikallisiin suolistotulehduksiin, ravintoaineiden imeytymiseen, K2-vitamiinin tuotantoon ja jopa mielentilaan (Sudo ym. 2004; Boulangé ym. 2016). Terve suolistobakteeriston koostumus voi auttaa joidenkin sairauksien ennaltaehkäisyssä, sekä edistää terveyttä ja hyvinvointia. Onkin tärkeä tietää millaisia vaikutuksia nauttimallamme ruoalla on elimistössämme, sillä ihminen pystyy oman ruokavalionsa avulla vaikuttamaan suolistobakteeristonsa koostumukseen.



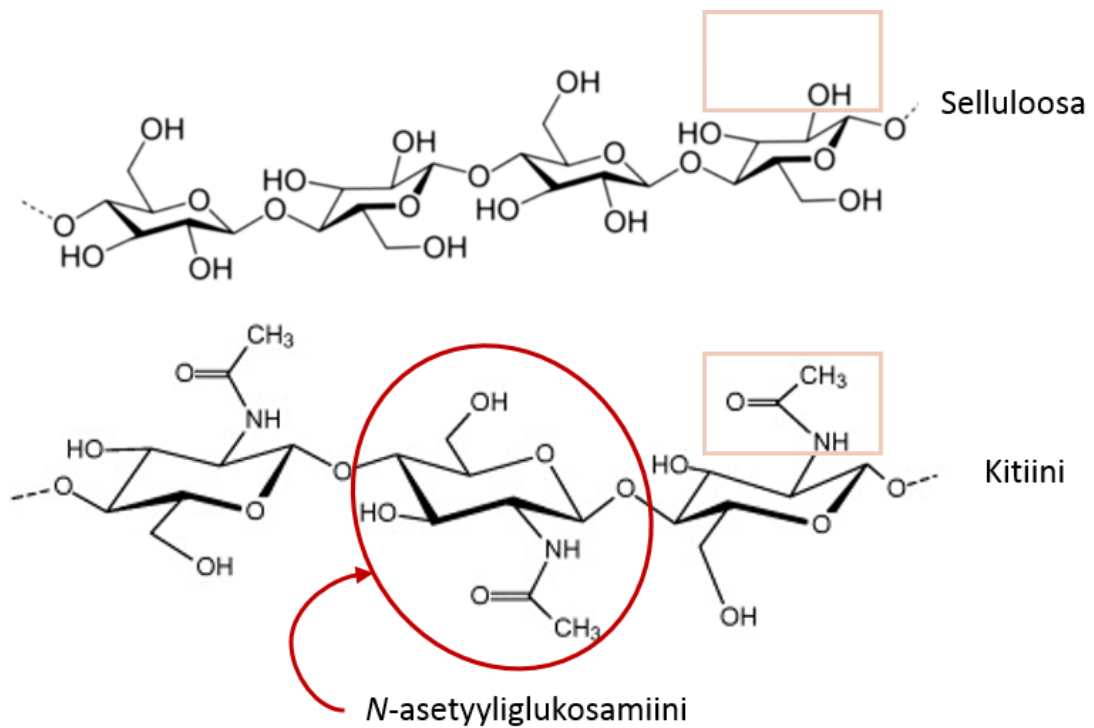
**Taulukko 1. Yhteenveto kitiinistä tiedetyistä faktoista.** Taulukossa on esitetty tiiviisti hyönteisravinnon kannalta oleellimmat asiat mitä kitiinistä tällä hetkellä tiedetään.

Kitiini ei vaikuta merkittävästi muiden ravintoaineiden saatavuuteen hyönteisruoassa.	(Finke 2007)
Hyönteisruoan kautta saatu kitiini ja sen hajoamistuotteet eivät ole myrkyllisiä tai allergisoivia.	(Muzzarelli 2010)
Kitiini ei imeydy elimistöön, ellei sitä hajoteta pienemmiksi yhdisteiksi. Kitiini tai sen hajoamistuotteet voivat vaikuttaa elimistöön esimerkiksi ravintokuidun tavoin, vaikka ne eivät imeytyisikään.	(Goodman 1989; Gibson & Roberfroid 1995; Ormrod ym. 1998; Gibson ym. 2004; Raafat ym. 2008; Aranaz ym. 2009; Muzzarelli ym. 2012; Choi ym. 2012)
Ihmisillä tuotetaan AMCaasi-entsyymiä, joka pystyy pilkkomaan kitiiniä ruoansulatuskanavassa. Tuotetun entsyymin määrät vaihtelevat ihmisestä riippuen.	(Boot ym. 2001; Paoletti ym. 2007; Musumeci & Paoletti 2009)
Ohut- ja paksusuoleissa, sekä monissa muissa ihmisen kudoksissa tuotetaan lysotsyymientsyymiä, joka pystyy deasetyloimaan ja hajottamaan kitiinin sidoksia, muodostaen erimittaisia kitosaani ja kito-oligosakkaridimolekyylejä.	(Hayashi ym. 1969; Geyer 1973; Muzzarelli 1997)
Ruoan, jonka avulla kitosaanin päivittäinen saanti on vähintään 3 grammaa, voidaan sanoa edistävän terveyttä, auttamalla ylläpitämään elimistön normaalia LDL-kolesterolitasa.	(EU 432/2012)
Kito-oligosakkaridit ja kitosaani alentavat veren kolesterolia. Ne myös edistävät hyödyllisten suolistobakteerien kasvua, ja ne ovat siten prebioottien kaltaisia ravinnosta saatavia aineita. Ne ovat anti-inflammatorisia, antioksidatiivisia, ehkäisevät suolistotulehduksia, sekä toimivat haavakudoksen paranemista edistävinä tekijöinä.	(Nishimura ym. 1984; Peluso ym. 1994; Lee ym. 2002; Lee ym. 2008; Nagatani ym. 2008; Tomida ym. 2009; Ribeiro ym. 2009; Yang Eun-Jin ym. 2010; Muzzarelli 2010; Brinchmann ym. 2011; Choi ym. 2012; Benhabiles ym. 2012; Bae ym. 2013; Mateos-Aparicio ym. 2016)
Kito-oligosakkaridit ovat potentiaalisia yhdisteitä diabeteksen ehkäisyssä ja hoidossa.	(Hayashi & Ito 2002; Lee ym. 2003)
Kitiini ja etenkin sen hajoamistuotteet omaavat antibakteerisia vaikutuksia monia haitallisia bakteereja vastaan.	(Tsai & Su 1999; Jeon ym. 2001; Fei Liu ym. 2001; No ym. 2002a; Gerasimenko ym. 2004; Benhabiles ym. 2012)

## 1.1 Kitiinin kemiallinen rakenne ja ominaisuudet

Kitiini on kemiallisesti luokiteltuna lineaaristen *N*-asetyyli-glukosamiiniyksiköiden (GlcNAc) muodostama polysakkaridi, joka voi muodostaa pitkiä ketjuja (Goycoolea ym. 2000). Hyönteiset voivat syntetisoida kitiiniä glukoosista, glukosamiinista, tai GlcNAc:sta. Glukoosia ja glukosamiinia voidaan hyönteisen kutikulan alaisissa kudoksissa muokata uridiini-difosfori-*N*-asetyyli-glukosamiiniksi, josta irtoaa uridiini-difosforiryhmä sen muodostaessa *N*-asetyyli-glukosamiiniketjuja. (Candy & Kilby 1962; Andersen 1979). Asetyyliamiiniryhmiensä avulla kitiini voi muodostaa vetysidoksia itsensä ja muiden aineiden kanssa, mikä tekee kitiinistä todella vahvan yhdisteen (Andersen 1979). Vahvojen sidostensa ansiosta kitiini on ominaisuuksiltaan kuitumainen yhdiste ja siksi se ei liukene helposti veteen tai muihin aineisiin (Goycoolea ym. 2000; Muzzarelli ym. 2012). Ihmisen ruoansulatuksessaan kitiiniä ei pystytä pilkkomaan ilman ruoansulatusentsyymejä tai bakteerien hajotustoimintaa.

Kitiini on selluloosan jälkeen yksi yleisimmistä luonnossa esiintyvistä polysakkarideista. Selluloosa on kaikkien kasvien soluseinissä esiintyvä orgaaninen yhdiste, jota saamme ravinnosta kasvipiperäistä ruokaa syödessämme. Selluloosa vaikuttaa ruoansulatuskanavassa ravintokuituna. Selluloosa ja kitiini ovat molemmat glukoosijohdannaisia ja siten rakenteeltaan hyvin samankaltaisia (kuva 1). Ne molemmat koostuvat samanlaisten linkittyneiden D-glukoosimolekyylien muodostamista ketjuista, poiketen toisistaan vain sivuketjujen eri ryhmissä. Siinä missä selluloosan glukoosiyksiköillä on vain hydroksyyli-ryhmiä, on kitiinin glukoosiyksiköillä hydroksyyli-ryhmä, sekä asetyyli-ryhmä. Samankaltaisen rakenteen vuoksi niillä on samankaltaisia tehtäviä, toimien monissa organismeissa usein rakennetta tukevinä yhdisteinä.



**Kuva 1. Selluloosan ja kitiinin kemiallinen rakenne.** Kitiini koostuu *N*-asetyyliiglukosamiinin (GlcNAc) muodostamista ketjuista, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa glykosididoksien. Perusrakenne on kitiinissä ja selluloosassa sama. Molemmat muodostuvat toisiinsa linkittyneistä glukoosiyksiköistä. Eroavaisuudet yksiköiden rakenteessa kitiinin asetyyliryhmän suhteen on merkitty havainnollistaen vaaleisiin laatikkoihin.

## 1.2 Hyönteisten ulkoinen tukiranka koostuu kitiinistä

Hyönteiset ovat niveljalkaisten pääjaksoon kuuluva luokka. Hyönteiset ovat selkärangattomia eläimiä, joilla on kitiinistä koostuva ulkoinen tukiranka (eksoskeleton), jota voidaan kutsua myös kutikulaksi. Kutikulan tärkein tehtävä on toimia rakenteena, johon hyönteisten lihakset ja sisäelimet voivat kiinnittyä. Lisäksi se suojaa hyönteistä ympäristöltä ja saalistajilta (Andersen 1979). Hyönteisillä on kitiiniä myös sisäisissä rakenteissaan ruoansulatuskanavan seinämien kudoksissa, missä kitiini suojaa hyönteisten ruoansulatuskanavan seinämiä kulumiselta ja muilta mekaanisilta vaurioilta, sekä haitallisilta mikrobeilta, eli patogeeneilta (Gonil & Sajomsang 2012; Alvarenga ym. 2016).

Kutikula on sekoitus eri aineiden yhdistelmiä. Pääosin se koostuu kitiinin muodostamista ketjuista (20 - 50 %), ja kitiiniverkoston sekä typen ja proteiinien matriisista. Kutikulan kitiini on luonnostaan osittain deasetyloitunutta ja sisältää siten myös kitiinin hajoamistuotteita kitosaania ja kito-oligosakkarideja (No & Samuel 1995). Hyönteisten kitiinikuoreissa on myös vettä, lipidejä ja mineraaleja (Andersen 1979; Kramer ym. 1995; Chandran ym. 2016). Mineraalipitoisuudet kutikulassa ovat yleisesti hyvin vähäisiä,

mutta hyönteisravinnon kannalta merkittäviä määriä ovat *Musca autumnalis*- ja *Hermetia illucens*-kärpästen kutikulan sisältämät kalsiumpitoisuudet (Finke 2007). Vaikka kutikulassa ei ole mineraaleja paljon, sisältävät useimmat hyönteiset merkittäviä määriä esimerkiksi rautaa ja sinkkiä, kun ne nautitaan kokonaisina (van Huis ym. 2013).

Kutikulassa on useita proteiineja, joista noin puolet voi olla kitiiniin sitoutuneena. Tämä on tietysti lajikohtaista. Kitiiniin kovalenttisillä sidoksilla kiinnittyneet proteiinit muodostavat kitiinin kanssa glykoproteiinikomplekseja. Kutikulassa proteiineja voi olla kiinnittyneenä myös vetysidoksin, tai muilla sidoksilla ja heikoilla vuorovaikutuksilla. Osa proteiineista ei ole kiinnittyneenä muihin yhdisteisiin ollenkaan (Hackman & Goldberg 1958). Kutikulan proteiineja voidaan syntetisoida kutikulan alapuolisessa pintakerroksessa, eli epidermissä, ja muissa hyönteisen kudoksissa, joista ne kuljetetaan kutikulaan (Andersen 1979). Tutkimuksessaan Yi ym. (2013) laskivat keskimääräisen raakaproteiinipitoisuuden viidelle eri hyönteislajille (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus*, *Blaptica dubaia*) ja saivat tulokseksi, että proteiinipitoisuus vaihteli 19 - 22 %:iin, kutikulan proteiinien tyyppiyhdisteet mukaan laskettuna. Toisessa kokeessa Barker ym. (1998) ryhmineen selvittivät, että vain 5 - 6 % hyönteisten sisältämästä tyypestä on kitiiniin sitoutunutta tyyppiä.

Ramos-Elorduyn ym. (1997) tutkimuksessa analysoitiin 78:aa eri Meksikolaista ravinnoiksi käytettävää hyönteislajia ja niistä saatavan proteiinin määrää. Tässä tutkimuksessa he saivat tulokseksi, että hyönteisproteiinin sulavuus ihmisen ruoansulatuksessa vaihteli 76 - 98 %:n välillä. Luku ei ole sata prosenttia kutikulassa kitiiniin sitoutuneiden proteiinien takia (Gonil & Sajomsang 2012), sillä kitiinin hajottaminen ruoansulatuksessa vaatii ruoansulatuskanavan kitinaasientsyymejä, tai symbioottisten suolistobakteereiden hajotustoimintaa. Finken (2007) tutkimusten mukaan kitiiniin sitoutuneen tyyppien määrä on kuitenkin niin pieni, että arviot raakaproteiinin pitoisuudesta kuvastavat riittävän hyvin useimpien syötäväksi sopivien hyönteisten proteiinipitoisuutta.

Finken (2007) mukaan hyönteiset sisältävät kitiiniä 2,7 - 49,8 mg/kg tuorepainosta mitattuna ja 11,6 - 137,2 mg/kg kuivapainosta mitattuna. Vaihtelua kitiinipitoisuudessa on paljon eri lajien välillä, sillä jokaisella lajilla on omanlaisensa kutikula. Kutikula voi olla lajista ja muodonmuutoksen vaiheista riippuen paksu ja kova, tai ohut ja taipuisa. Siihen miten kova ulkoinen tukiranka on, vaikuttaa se kuinka paksun, eli monikerroksisen, kutikulan hyönteinen muodostaa. Siihen miten kovarakenteinen kutikula on, vaikuttaa lähinnä proteiinien ja kitiinin välinen suhde. Pehmeämpikuorisilla

hyönteisillä on ulkoisessa tukirangassaan suhteessa vähemmän aminohappoja, kuin hyönteisillä jotka omaavat kovan ulkokuoren.

Hyönteisten sisältämän sulatettavissa olevan kuitupitoisen aineen määrää voidaan mitata ADF-pitoisuutena (*acid detergent fibre*), eli happodetergenttilukuna. ADF-pitoisuuden määrittystä on käytetty eläinrehun laadun arvioinnissa, jolloin ADF-pitoisuus kertoo selluloosan ja ligniinin pitoisuuksista. Koska kitiini on lähes samanlainen polysakkaridi selluloosan kanssa, voidaan ADF-määrittelyllä arvioida hyönteisten sisältämää kitiiniä (katso liite 1). Mitä korkeampi ADF-arvo on, sitä vähemmän tuotetta pystytään sulattamaan ruoansulatuksessa, jolloin tuotteesta ei voida hyödyntää kaikkea saatavilla olevaa energiaa (Finke 2007). Sulamaton ja kuitumainen kitiinimassa voi kuitenkin toimia ruoansulatuskanavassa ravintokuidun tavoin ja siten edistää ruoansulatusta ja suoliston terveyttä siinä missä selluloosakin.

Hyönteisten ulkoinen tukiranka kehittyy ja muuttuu hyönteisen kasvun ja kehityksen mukana. Hyönteiset uusivat kutikulansa monta kertaa eri kehitysvaiheissaan. Kehitysvaiheiden määrä ja muoto ovat lajikohtaisia. Hyönteisten kehitys voi olla hyppäyksellistä, kuten jauhopukilla (*Tenebrio molitor*), joka munasta kuoriuduttuaan aloittaa toukkana, mutta käy läpi täydellisen muodonmuutoksen kovakuoriaiseksi saavuttaessaan sukukypsyyden. Kehitys voi olla myös asteittaista, kuten *Acheta domesticus* -kotisirkalla. Saavuttaessaan täysikasvuisuuden se on uusinnut kutikulansa seitsemän kertaa, mutta sen ulkonäkö on koko elinkaaren ajan lähes samanlainen (Clifford ym. 1977).

### 1.3 Kitiiniä hajottavat entsyymit ja kitiinin hajoamistuotteiden imeytyminen ruoansulatuksessa

Ihmisen ruoansulatuskanavassa on entsyymejä, jotka pystyvät hajottamaan kitiiniä. Tällaisia entsyymeitä kutsutaan kitinaaseiksi. Kitinaaseilla on useita rooleja ihmisen elimistössä, joista monet liittyvät immuniteettiin ja tulehdusreaktioiden estämiseen, mutta myös ravinnon pilkkomiseen helpommin sulavampaan muotoon. Kitinaaseiksi ei kuitenkaan luokitella kaikkia kitiiniä pilkkovia entsyymeitä, vaan ainoastaan niitä, jotka pilkkovat kitiinin polysakkaridirakennetta. Ruoansulatusentsyymien lisäksi kitiinin sulatuksessa voivat auttaa myös ihmisen suolistobakteerit, joille kitiini toimii energianlähteenä. Kitiinin hajotus ihmisen ruoansulatuksessa on ihmisen omien entsyymien, sekä suolistobakteereiden hajotustoiminnan yhteistyön tulos. (Boot ym.

2001; Paoletti ym. 2007; Seibold ym. 2009; Musumeci & Paoletti 2009; Benhabiles ym. 2012).

Kun tarkastellaan kitiinin roolia hyönteissyönnissä, on tärkeä huomioida sen toiminta ja vaikutukset ihmisen elimistössä, alkaen ruoansulatuskanavasta. Kitiiniä on pidetty kuitumaisena ja hankalasti liukenevana yhdisteenä, minkä takia pitkään arveltiin ihmisten olevan kykenemättömiä sulattamaan sitä. Nykyään kuitenkin tunnetaan ruoansulatuskanavan kitinaasientsyymejä jotka pystyvät hajottamaan kitiiniä, joten näkemys kitiinin olemuksesta pelkkänä ravintokuituna voidaankin ehkä haastaa (Jolles & Muzzarelli 1999; Shahidi ym. 1999; Borderías ym. 2005; Musumeci & Paoletti 2009).

Kitiiniä voidaan hajottaa pääasiassa kahdella tapaa: pilkkomalla kitiinin pitkien polysakkaridiketjujen glykosididoksia, jolloin muodostuu eripituisia kito-oligosakkarideja (KOS, *chito-oligosachharide*) ja GlcNAc-yksiköitä, tai pilkkomalla kitiinin asetyyliamiiniryhmiä deasetyloimalla niitä. Deasetyloinnin tuloksena voi syntyä kitosaania (Beier & Bertilsson 2013), kitiinin hajoamistuotetta, jolla on useita fysiologisia vaikutuksia elimistöllemme ja suolistobakteereille. Myös kito-oligosakkaridit ovat hyvin bioaktiivisia yhdisteitä, joiden vaikutuksia on tutkittu paljon (Kendra ym. 1989; Tsigos ym. 2000; Qin ym. 2006; Benhabiles ym. 2012; Mateos-Aparicio ym. 2016).

Mitään tarkkaa rajaa kitiinin ja sen hajoamistuotteiden erottamiseksi ei ole määritetty, koska kitiini on luonnostaankin osittain deasetyloitunut ja sen hajoamistuotteet ovat hyvin samakaltaisia yhdisteitä, eroten vain reaktiivisten sivuketjujen määrissä ja polysakkaridiketjujen pituudessa (Rabea ym. 2003; Beier & Bertilsson 2013). Esimerkiksi kitosaaniksi aine määritellään, jos se koostuu pääosin deasetyloituneista GlcNAc-yksiköistä. Kitiinin hajoamistuotteet voidaan luokitella kito-oligosakkarideiksi, jos niiden depolymerisaatioaste on suuri ja molekyylipaino pieni (Mourya ym. 2011). Vaikka tarkkoja rajoja kyseisille yhdisteille ei ole määritelty, kitiini, kitosaani ja kito-oligosakkaridit vaikuttavat eri tavoin elimistössä. Jokaisessa niihin liittyvässä tutkimuksessa on yleensä ilmoitettu tarkasti millaisia kitiinijohdannaisia yhdisteitä on tutkittu tai havaittu tuloksissa.

### 1.3.1 AMCaasi -entsyymi hajottaa kitiiniä mahalaukussa sekä suolistossa

Joillakin ihmisillä on ruoansulatuskanavassaan kitinaasiksi luokiteltua AMCaasi-entsyymiä (*acidic mammalian chitinase*), joka pystyy pilkkomaan kitiiniä. AMCaasilla voi olla joillakin ihmisillä rooli kitiinipitoisen ruoan sulatuksessa (Boot ym. 2001;

Paoletti ym. 2007; Musumeci & Paoletti 2009). AMCaasi pilkkoo kitiinin GlcNAc-yksiköiden välisiä glykosididoksia, joten kitiini pilkkoutuu mahalaukussa AMCaasien toimesta kito-oligomeereiksi, kuten lyhemmiksi GlcNAc-ketjuiksi, sekä kitobiosidiksi (Musumeci & Paoletti 2009).

Bootin ym. (2001) tutkimuksen mukaan AMCaasien todettiin *in vitro* pilkkovan kitiinin kaltaisia molekyyliä, sekä rapujen kitiinistä kuorta, että sienten soluseinien kitiiniä. Hiirillä tehdyissä kokeissa he huomasivat, että hiirten AMCaasilla on korkea yhdistymistäipumus (*affiniteetti*) kitiinille. Lisäksi he todistivat, että hiirten AMCaasi on DNA-sekvensiltään lähes homologinen ihmisen AMCaasille. Näin ollen AMCaasin voitiin olettaa toimivan samalla tavoin sekä hiiressä että ihmisessä.

Paoletti ym. (2007), sekä Musumeci & Paoletti (2009) todistivat, että AMCaasi on joillakin ihmisillä mahahapossa havaittava, ja aktiivisesti toimiva entsyymi. Ensimmäisessä tutkimuksessa AMCaasi oli aktiivinen 25 ihmisestä 20:llä ja jälkimmäisessä kokeessa 48 ihmisestä 43:lla todettiin tuotettavan toimivaa AMCaasi-entsyymiä ruoansulatuskanavassa. Tutkimuksissaan he varmistivat, että ihmisen AMCaasi toimii parhaiten happamassa ympäristössä (~pH 2). Mahalaukussa olosuhteet ovat epiteelisolujen erittämän mahahapon takia hyvin happamat ja optimaaliset AMCaasin toiminnalle. AMCaasia tuotetaan, eli ekspressoidaan, erityisen paljon mahalaukun epiteelin pääsoluissa, mutta ei enää ohutsuolessa (Boot ym. 2005).

Viimeisimmissä AMCaasin toimintaan liittyvissä tutkimuksissa Ohno ym. (2016) todistivat kitiinin olevan hiirillä sekä mahalaukussa, että suolistossa toimiva ruoansulatusentsyymi. Kokeissa AMCaasin todettiin pystyvän hajottamaan kitiiniä (GlcNAc)<sub>2</sub>:ksi (C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>), eli *N*-asetyyli-glukosamiiniksi. Kyseinen yhdiste pystyy imeytymään ruoansulatuskanavasta hiiren elimistöön ja se voi toimia elimistölle hiilen-, typen- ja energianlähteenä. Näiden hiirikokeiden perusteella ei voida vielä sanoa toimiiko AMCaasi ihmisellä samalla tavalla, mutta se että AMCaasi muodostaa lopputuotteenaan pääasiallisesti (GlcNAc)<sub>2</sub>:ta, voi vaikuttaa käsitykseen kitiinin merkityksestä pelkkänä ravintokuituna. Hiirten ja ihmisten ruokavaliot eroavat paljon toisistaan, joten AMCaasin merkitys ruoansulatuksessa voi olla korostuneempi hiirillä kuin ihmisillä.

Näiden tutkimusten mukaan useiden ihmisten on mahdollista sulattaa kitiiniä AMCaasin avulla, mutta vielä ei esimerkiksi tiedetä millaisia määriä AMCaasia täytyy olla, jotta voidaan puhua tehokkaasta kitiinin sulattamisesta ja hyödyntämisestä ruoansulatuksessa. Vanhemmissa AMCaasiensyymien toimintaan liittyvissä tutkimuksissa on myös arvioitu,

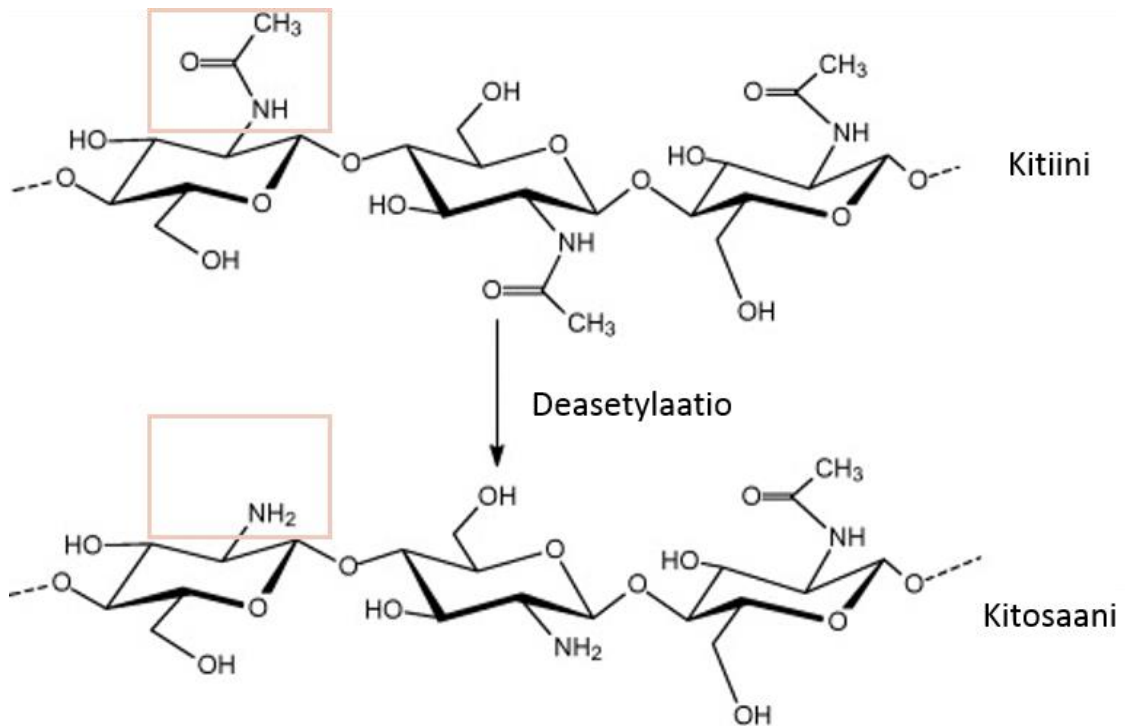
että ihmisen AMCaasin toiminnan tarkoitus liittyisi kitiinin osittaiseen hajottamiseen, niin että muut ruoansulatusentsyymit pääsisivät helpommin hajottamaan sitä. Ihmisillä joilla toimivaa AMCaasia ekspressoituu enemmän, voi olla paremmat mahdollisuudet sulattaa hyönteisruokaa. (Paoletti ym. 2007; Musumeci & Paoletti 2009; Muzzarelli ym. 2012).

### 1.3.2 Lysotsyymit voivat mahdollisesti hajottaa kitiiniä kitosaaniksi ja kito-oligosakkarideiksi

Kitiinin deasetylaation tuloksena syntyy kitosaania ja kito-oligosakkarideja, joilla on terveyttä edistäviä vaikutuksia elimistössä. Lysotsyymi on kaikilla ihmisillä tavattava normaali ruoansulatusentsyymi, joka kykenee kitiinin deasetylaatioon (Pangburn ym. 1982; Muzzarelli 1997). Se ei ole kuitenkaan kitiinin hajotuksessa yhtä tehokas, kuin AMCaasi (Beier & Bertilsson 2013). Tsigosin ym. (2000) mukaan hyönteisistä löydetty deasetylaatioon kykenevät entsyymit voivat muokata kitiinistä kitosaania. Koska ihmiselläkin on kitiinin deasetylaatioon kykeneviä lysotsyymientsyymejä, on mahdollista, että ihmisen ruoansulatuskanavassa muodostuu kitosaania. Toisaalta hyönteisillä kyseiset entsyymit voivat olla erilaisia, kuin ihmisen lysotsyymi, mutta periaatteessa kitosaani on kuitenkin vain sama asia, kuin deasetyloitu kitiini (Beier & Bertilsson 2013).

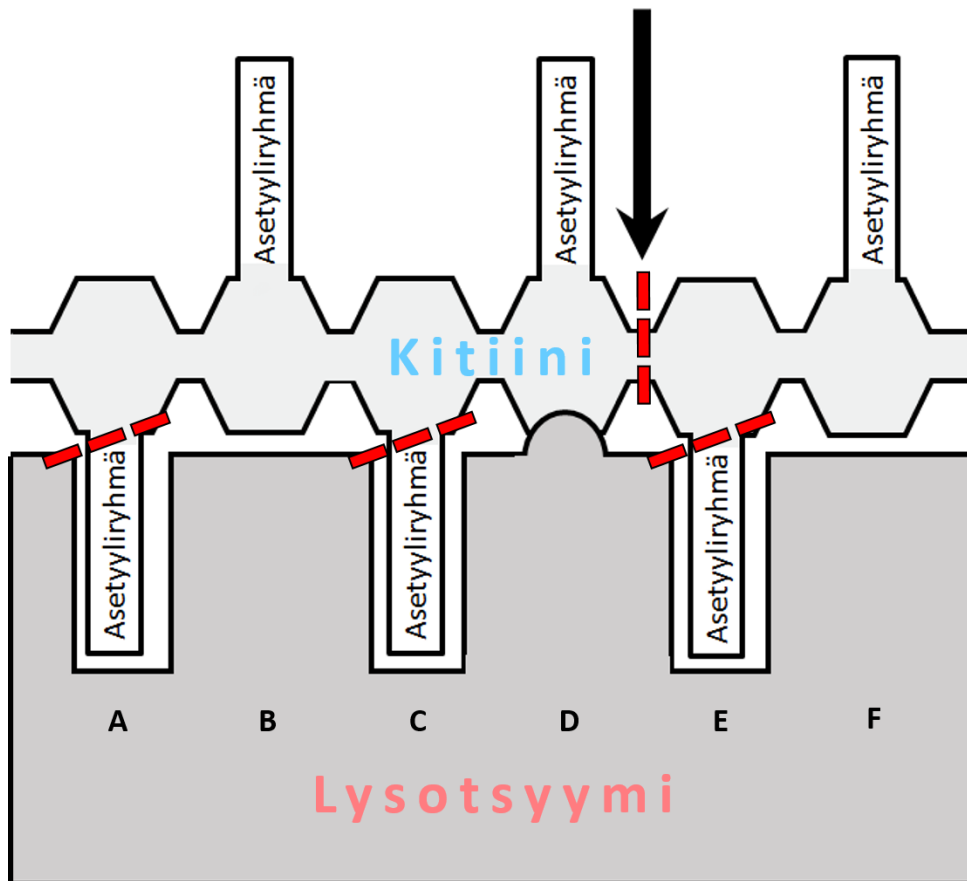
Lysotsyymien tiedetään pystyvän katalysoimaan kitiinin hajotusta deasetylaation ja glykosididosten hajottamisen kautta, ihmisen ohut- ja paksusuoleissa (Hayashi ym. 1969; Geyer 1973; Skujins ym. 1973; Goodman 1989). Lysotsyymi katalysoi kitiinin 2-asetamiiniryhmän deasetylaatiota, jolloin kitiinistä muodostuu kitosaania (kuva 2). Lysotsyymit pilkkovat myös kitiinin GlcNAc-yksiköiden välisiä glykosididoksia AMCaasin tapaan, minkä lopputuloksena syntyy kito-oligosakkarideja.





**Kuva 2. Kitiinin ja kitosaanin kemialliset kaavat.** Kitiini hajoaa kitosaaniksi deasetylaatioissa, kun sen asetyyliryhmiä irrotetaan (vaaleat laatikot). Deasetylaatioaste kuvaa sitä, kuinka suuri osa asetyyliryhmistä on leikkautunut pois. Kuva havainnollistaa, miten samankaltaisia polysakkaridiketjuja kitiini ja kitosaani ovat.

Mitä enemmän kitiinin deasetylaatioaste kasvaa, sitä vähemmän lysosyyymi pystyy katalysoimaan kitiinin glykosididosten hajottamista. Kitiinin ja lysosyymin substraattientsyymikompleksin muodostus pysyy kuitenkin samalla tasolla 50 % deasetylaatioon asti, jonka jälkeen kompleksien muodostuminen vähenee (Hayashi ym. 1969). Eli lysosyyymi ei pysty kovin hyvin sitoutumaan enää sellaisiin kitiiniketjuihin, joita se on jo hajottanut. Tämä on luultavasti seurausta siitä, että katalysoidakseen kitiiniä, lysosyyymiin liittyvän kitiiniketjun on oltava tietyn mittainen (kuusi GlcNAc-yksikköä) (kuva 3) (Pangburn ym. 1982). Voi myös olla, että lysosyymin pilkkoessa kitiiniä, se ei pelkästään deasetyloi, tai hajota glykosididoksia, vaan tekee molempia samaan aikaan. Mikäli lysosyyymi sekä deasetyloi, että pilkkaa glykosididoksia, pitkiä kitosaaniketjuja muodostuu epätodennäköisemmin.



**Kuva 3. Kitiinin kiinnittyminen lysotsyymientsyymiin.** Lysotsyymien kuusi alayksikköä (A-F) kiinnittyvät kitiiniketjun GlcNAc-ryhmiin, muodostaen kitiini-lysotsyymi substraattientsyymikompleksin. Lysotsyymi deasetyloi, eli poistaa asetyyliiryhmiä, kuten kuvassa on punaisella katkoviivalla osoitettu asetyyliiryhmien kohdalla. Lisäksi lysotsyymi leikkaa kitiiniketjun glykosidididoksen nuolen osoittamassa kohdassa. Kuva on muokattu julkaisun (Pangburn ym. 1982) kuvasta.

Lysotsyymientsyymejä on monissa ihmisen kudoksissa, mutta hyönteissyönnin kannalta tärkeimmät kudokset joissa lysotsyymiä ekspressoitetaan, ovat ruoansulatuskanavassa mahalaukun erittämissä rauhasissa, ohutsuolen eri rauhaskudoksissa, sekä suolinukan villusten pinnalla (Klockars & Reitamo 1975; Montero & Erlandsen 1978). Lysotsyymien tiedetään kestävän ruoansulatuskanavan matalia pH-tasoja (Boot ym. 2001), joten ohutsuolen pinnalla olevien lysotsyymien on mahdollista toimia hyönteisruoasta saatavan kitiinin hajotuksessa.

Lysotsyymien tehtävä on puolustaa elimistöä bakteereilta, ja ne pystyvät hajottamaan esimerkiksi Gram-negatiivisten bakteereiden soluseiniä. Gram-negatiivisilla bakteereilla on sisemmän solukalvon ympärillä ohut peptidoglykaanista muodostunut soluseinä, jota ympäröi ulompi solukalvo. Gram-positiivisilla bakteereilla on vain yksi solukalvo, mutta niiden soluseinän peptidoglykaani on paljon paksumpi, kuin gram-negatiivisilla (Silhavy ym. 2010). Antibakteeristen vaikutusten lisäksi lysotsyymien tiedetään auttavan myös

ravinnon pilkkomisessa lehmillä (Dobson ym. 1984), mutta sen roolista ihmisen ruoansulatuksessa kitiinin hajotuksessa, on toistaiseksi vähän tutkittua tietoa.

### 1.3.3 Kitotriosidaasin merkityksestä ruoansulatuksessa ei olla varmoja

Kitotriosidaasi on hyvin samankaltainen kitinaasi AMCaasin kanssa, sekä rakenteeltaan, että toiminnaltaan ja se on myös läheisesti sukua lysotsyymille (Boot ym. 1998). Sitä ekspressoidaan makrofageissa, sekä mahalaukun epiteelissä (Musumeci & Paoletti 2009). Kitotriosidaasin tehtävät ovat ehkä joskus liittyneet ihmisen elimistön puolustukseen kitiiniä sisältäviä organismeja vastaan, mutta yhtäläillä sen voidaan ajatella auttavan kitiinipitoisen hyönteisruoan sulattamisessakin. Vaikka kitotriosidaasi pystyykin hajottamaan ravinnon mukana saatua kitiiniä ruoansulatuskanavassa, sillä ei vaikuta olevan varsinaista roolia ihmisen ruoansulatuksessa (Boot ym. 2001; Cozzarini ym. 2009; Manno ym. 2014).

### 1.3.4 Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden imeytyminen

Hyönteisravinnon mukana saatujen kitiinin, kitosaanin ja kito-oligosakkaridien imeytymiseen vaikuttavat näiden aineiden molekyylipaino (*molecular weight*) ja vesiliukoisuus. Ne imeytyvät sitä helpommin, mitä kevyempiä ja vesiliukoisempia ne ovat. Esimerkiksi lyhytketjuiset pienet kito-sakkaridit imeytyvät ravintona helposti ohutsuolen seinämien läpi verenkertoon (Chae ym. 2005). Hiirillä tehdyssä kokeessa Zeng ym. (2008) totesivat, että kitiinin hajoamistuotteet jotka imeytyivät, kulkeutuivat kaikkiin tutkittuihin kudoksiin. Kitosaanimolekyylit kulkeutuivat esimerkiksi maksaan, munuaisiin, pernaan, sydämeen, keuhkoihin ja kateenkorvaan. He totesivat myös, että näitä kitosaaniyhdisteitä oli hajotettu ruoansulatuskanavassa ennen imeytymistä. Hyönteisruoasta saatavan kitiinin voidaan siis sanoa ainakin hiirillä toimivan ravintona, sillä osa siitä hajotetaan AMCaasin toimesta (GlcNAc)<sub>2</sub>:ksi (Ohno ym. 2016), joka Chaen ym. (2005) ja Zengin ym. (2008) mukaan imeytyy ruoansulatuskanavasta ja kulkeutuu hiirten elimistölle käytettäväksi.

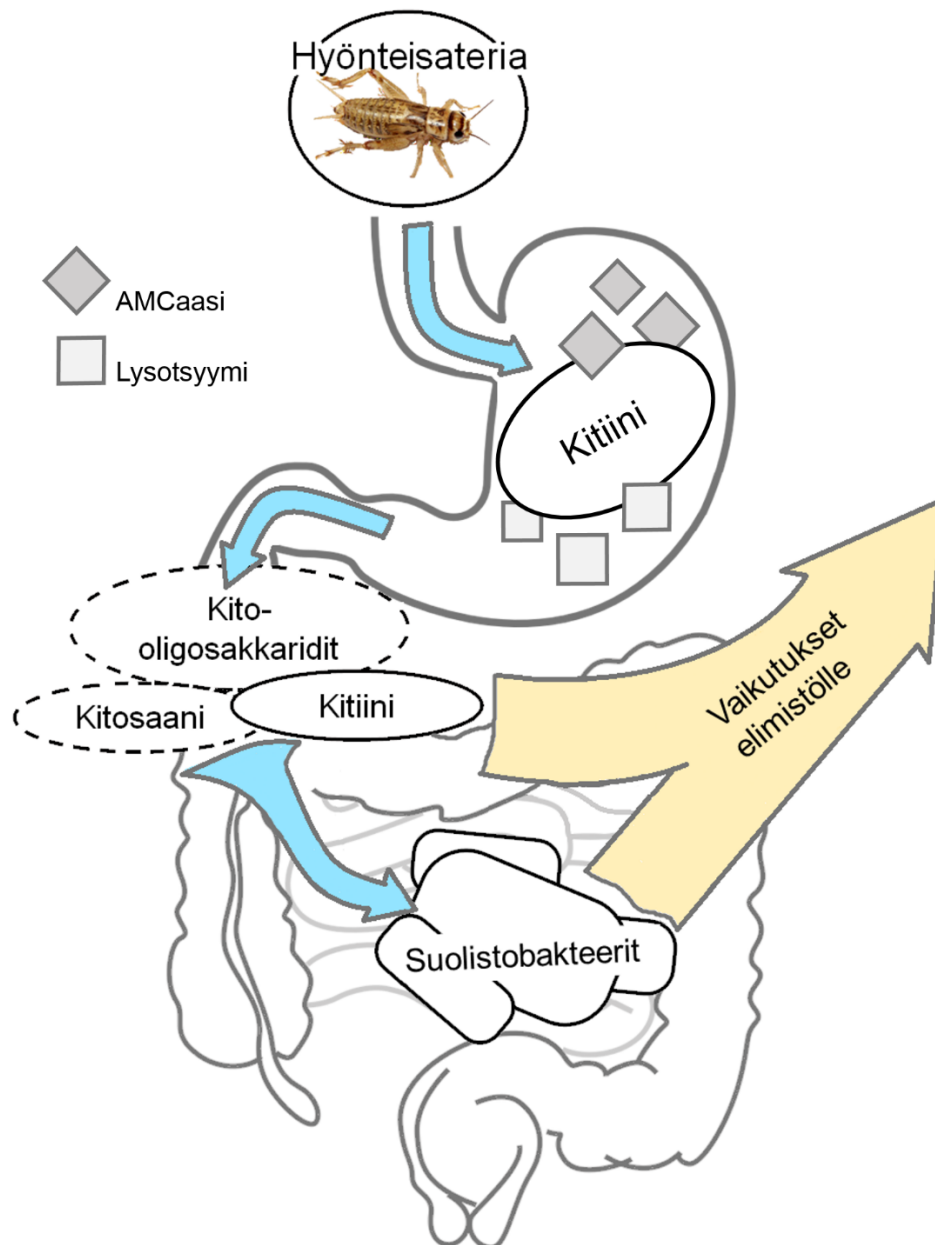
Suurempi molekyylipaino tarkoittaa kitiinin ja sen johdannaisten tapauksessa sitä, että polysakkaridiketjussa on useampia glukosamiini-, tai *N*-asetyyli-glukosamiiniyksiköitä. Pienimolekyylipainoisissa näitä sakkaridiketjun yksiköitä on vähän. Molekyylipaino voi vaihdella valtavasti kitiinin ja sen hajoamistuotteiden oligosakkaridiketjujen pituudesta riippuen. Oligosakkaridiketju voi olla esimerkiksi kaksi yksikköä pitkä, tai koostua

tuhansista linkittyneistä oligosakkarideista. Kitiini-, kitosaani-, ja kito-oligosakkaridiketjuja on luokiteltu eri kokoluokkiin monin eri molekyylipainoin tutkimuksesta riippuen ja tästä johtuen esimerkiksi kitosaanista ja kito-oligosakkaridista voidaan puhua päällekkäin tarkoittaen samanlaisia yhdisteitä, mutta eri molekyylipainoisina (Jeon ym. 2001; Fei Liu ym. 2001; Chae ym. 2005; Fernandes ym. 2008).

Aranazin ym. (2009) mukaan hyönteisruoan mukana nautittu kitiini, jota puolestaan ei hajoteta, ei sellaisenaan imeydy ihmisen ruoansulatuksesta verenkiertoon. Se johtuu siitä, että kitiini liukenee huonosti veteen, koska se on vahvasti linkittynyt polysakkaridi, joka on liian suuri otettavaksi sisään soluihin. Sen takia kitiini, jota ei voida hajottaa ruoansulatusentsyymien, tai suoliston bakteerien toimesta, eritetään ulosteen mukana pois kehosta. Kaikki kitosaani ja kito-oligosakkariditkaan eivät imeydy, vaan yleensä pidempiketjuiset molekyylit eritetään.

#### 1.4 Ihmisen symbioottiset suolistobakteerit ja hyönteisruoan vaikutus hyvinvointiimme

Ihminen, kuten muutkin nisäkkäät, on ruoansulatuksessaan riippuvainen suolistossaan elävistä bakteereista. Vain nämä mutualistiset bakteerit pystyvät hajottamaan kasvien biomassan, erityisesti selluloosan, vahvoja rakenteita sekä muiden sulamattomien ainesten osia, joihin ihmisen omat ruoansulatusentsyymit eivät pysty (White ym. 2014). Ruoansulatuskanavan kitinaasientsyymien lisäksi, myös suolistobakteerien tiedetään pystyvän hajottamaan erilaisia oligosakkarideja, kuten kito-oligosakkarideja sekä selluloosaa että kitiiniä (Lee ym. 2002; Flint ym. 2008). Siksi on tärkeä tietää miten hyönteisruoan mukana nautituksi tullut kitiini vaikuttaa suolistomikrobeihin ja miten suolistomikrobit voivat puolestaan vaikuttaa ihmiseen (kuva 4).



**Kuva 4. Hyönteisruoan sisältämän kitiinin kulkeutuminen ja hajotus ruoansulatuskanavassa sekä vaikutusten ilmeneminen.** Siniset nuolet kuvaavat miten hyönteisruoka kulkeutuu, hajotetaan ja hyödynnetään ruoansulatuskanavassa. Hyönteisruoan kitiini hajoaa ensin mahalaukussa AMCaasin ja lysotsyymin toimesta, josta sen hajoamistuotteet, kito-oligosakkaridit ja kitosaani, sekä hajottamaton kitiini, kulkeutuvat eteenpäin ruoansulatuskanavassa suolistobakteereiden hyödynnettäväksi. Keltainen nuoli osoittaa, että kitiini ja sen hajoamistuotteet voivat saada aikaan vaikutuksia paikallisesti suolistossa, tai muualla elimistössä, mikäli ne imeytyvät, tai ne voivat vaikuttaa suolistobakteereiden toimintaan, jotka puolestaan vaikuttavat ihmiseen.

Ihmisen suolistossa elää runsaasti bakteereita, jotka käyttävät ravinnokseen ruoan pilkkoutumattomia ainesosia, jotka eivät ole ehtineet imeytyä. Nämä suolistobakteerit hajottavat pilkkoutumattomia yhdisteitä hapettomissa olosuhteissa tapahtuvan hajoamisen, sekä oman entsyymitoimintansa avulla, ja käyttävät hajottamisprosessista vapautettua energiaa omaan kasvuunsa. Samalla ne hajottavat ruokamassaa pienemmiksi yhdisteiksi, joista osa voi vielä imeytyä suolistosta ihmisen verenkiertoon hyödynnettäväksi. Hajotustoiminnan seurauksena muodostuu esimerkiksi lyhytketjuisia

rasvahappoja, joita sekä bakteerit, että jotkin ihmisen kudokset voivat käyttää energianlähteenään soluhengityksessä (Eckburg ym. 2005; Macfarlane & Macfarlane 2012).

Koska suolistobakteerit hyödyntävät nauttimaamme ruokamassaa omaan kasvuunsa, ihminen voi vaikuttaa ruokavaliolla tietynlaisten suolistobakteerien kasvun mahdollistamiseen. Ruoka-aineita, jotka edistävät hyvien suolistomikrobien kasvua, kutsutaan prebiooteiksi (Gibson & Roberfroid 1995). Gibson (2004) esitti tutkimuksissaan, että runsaasti erilaisia mikrobeja sisältävä bakteerikanta, voi estää syrjäyttävällä kilpailulla haitallisten patogeenien kiinnittymisen suolen pintaan ja estää niiden lisääntymistä suolistossa. Ihminen voi siis syömällä oikein vaikuttaa siihen, että suolistomikrobikannan tasapaino, eli homeostasia, pysyy yllä ja että tietynlaiset suolistobakteerit pysyvät aktiivisina suolistossa.

Suolistobakteerit voidaan karkeasti yleistäen jakaa terveyttä edistäviin, sekä terveydelle haitallisiin, eli patogeenisiin, bakteereihin (Steer ym. 2000). Jaottelu terveyttä edistäviin ja terveydelle haitallisiin suolistobakteereihin liittyy siihen, millaisia vaikutuksia erilaisilla bakteereilla tiedetään ihmiseen olevan. Tuottavatko ne esimerkiksi haitallisia myrkyjä vai toimivatko ne yhteistyössä elimistön kanssa, niin että niistä ei koidu haittaa ihmiselle. Hyönteisruoasta saatu kitiini ja sen hajoamistuotteet voivat vaikuttaa sekä terveyttä edistävien että terveydelle haitallisten bakteerien kasvuun ja lisääntymiseen.

Hyönteisruokaa nautittaessa paksusuolen bakteereille päätyy sulamattomia kitiinikuoren yhdisteitä. Riippuen ihmisen omista ruoansulatusentsyymeistä, kitiiniä on ehkä voitu jo pilkkoa kito-oligosakkarideiksi ja kitosaaniksi. Voi myös olla, että kaikki kitiini ei ole välttämättä pilkkoutunut, tai sitä ei ole pilkottu vielä lainkaan. Suolistobakteereilla voi siis olla erilaisia kitiiniyhdisteitä sulatettavanaan ja näillä yhdisteillä voi olla erilaisia vaikutuksia suoliston bakteerikantoihin. Vaikutukset riippuvat siitä mitä kitiiniyhdisteitä mitkäkin bakteerit voivat käyttää ravinnokseen ja mitkä yhdisteet estävät, eli inhiboivat, niiden kasvua. Suolistobakteerien hajottaessa imeytymätöntä ruokamassaa, ne tuottavat myös yhdisteitä joilla voi olla positiivisia tai negatiivisia vaikutuksia sekä ihmisen suoliston että muun elimistön toimintaan (Gibson & Roberfroid 1995).

Deasetyloituneiden kito-oligosakkaridien on todettu edistävän *Bifidobacterium bifidumin* sekä joidenkin *Lactobacillus*-bakteerien kantojen kasvua merkittävästi (Lee ym. 2002; Mateos-Aparicio ym. 2016). Nämä mielletään yleensä hyviksi suolistobakteereiksi, sillä ne vahvistavat suoliston vastustuskykyä patogeenejä vastaan. Toivottujen

suolistobakteereiden kasvun edistäminen viittaa vahvasti kito-oligosakkaridin toimintaan prebioottina. Edistämällä hyvien suolistobakteerien kasvua, samalla rajoitetaan haitallisten bakteerien kasvua ja niiden aiheuttamia mahdollisia suolistotulehduksia (Sartor & Mazmanian 2012). Lisäksi *Bifidobacterium*- ja *Lactobacillus*-bakteerit stimuloivat immuunipuolustuksen toimintoja, sekä auttavat ruoka-aineiden hajotuksessa ja imeytymisessä. Bifidobakteerit osallistuvat myös vitamiinien, sekä laktoosin pilkkomiseen tarvittavan laktaasin tuottamiseen. Kitiinipitoisesta ruokavaliosta voi siis ehkä olla apua myös laktoosi-intoleranssiin, sen edistäessä laktoosin hajotukseen kykenevien hyvien suolistobakteereiden kasvua (Austin ym. 1981; Gibson & Roberfroid 1995).

Kitiini ja sen hajoamistuotteet voivat vaikuttaa suolistobakteereihin myös muutenkin kuin niiden energianlähteenä. Esimerkiksi jotkin oligosakkaridit voivat toimia myös patogeenien kiinnittymistä vastustavina tekijöinä, eli niin sanottuina *decoy*-molekyyleinä. Tällöin patogeeniset suolistomikrobit kiinnittyvät suolen seinämän sijasta esimerkiksi kito-oligosakkarideihin, ja kulkeutuvat pois suolistosta ulosteen mukana. Tämän ansiosta suoliston terveyttä edistäville mikrobeille jää enemmän tilaa kasvaa ja jakaantua (Shoaf ym. 2006; Altamimi ym. 2016).

Suolistobakteereiden tiedetään vaikuttavan useiden suolistoperäisten sairauksien taustalla, kuten esimerkiksi ärtyneen suolen oireyhtymän, haavaisen paksusuolentulehduksen ja Crohnin taudin tapauksissa (Carroll ym. 2012; Quigley 2013). Patogeenisten bakteereiden suorista vaikutussuhteista sairauksiin ei vielä tiedetä yhtä paljon kuin terveyttä edistävien bakteerien hyödyistä. Yleensä suolistobakteerien aiheuttamiin sairauksiin liittyvät kuitenkin pienentyneet *Lactobacillus*- ja *Bifidobacterium*-kannat (Steer ym. 2000; Carroll ym. 2012), jolloin patogeeniset bakteerit ovat päässeet lisääntymään suolistossa. Toisaalta vaikutukset terveydelle voivat olla myös suoraa seurausta yleisimpien elimistön ulkopuolisten patogeenien, kuten *E.coli*, *Salmonella*-, *Vibrio cholerae*-, ja *Shigella*-bakteerien, pääsystä ruoansulatuskanavaan, esimerkiksi pilaantuneen ruoan mukana, jolloin ne voivat aiheuttaa maha- ja suolistotulehduksia, sekä ruoansulatusongelmia (Zottola & Smith 1990). Yleisesti hyvänä ennaltaehkäisyinä suolistotauteja vastaan toimii terve ja tasapainoinen suolistobakteerikanta. (Salminen ym. 1995). *Lactobacillus*- ja *Bifidobacterium*-bakteereilla on siis merkittävä ennaltaehkäisevä vaikutus patogeenejä vastaan.

Tutkimuksessaan Benhabiles ym. (2012) testasivat kitiinin, kitosaanin ja kito-oligosakkaridien antimikrobisia vaikutuksia *in vitro* yhteentoista bakteerilajiin.

Tutkittavina lajeina oli Gram-positiivisia bakteereita: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, sekä Gram-negatiivisia bakteereita: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Prevotella melaninogenica*, ja *Bacteroides fragilis*. Tutkimuksen mukaan kito-oligosakkaridit tuhosivat kaikkia edellä mainittuja bakteereita, siinä missä kitosaani esti kaikkien paitsi *Salmonella typhimurium*:in jakaantumista. Kitiinin todettiin puolestaan estävän *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, ja *Bacteroides fragilis*, -bakteereiden jakaantumista. Suurin osa näistä bakteereista on yleensä patogeeniseksi luokiteltu (Elintarviketurvallisuusvirasto Evira 2016b). Poikkeuksena niihin ovat kuitenkin *Bacillus subtilis* ja *Bacteroides fragilis*, jotka ovat hyödyllisiä bakteereja suolistossa, mutta joutuessaan muualle elimistöön ne voivat olla ihmisen terveydelle vaarallisia (Wexler 2007; Cutting 2011).

Suolistobakteereiden vaikutuksia on vaikea tutkia *in vivo* ja niihin liittyvää tutkimusta toteutetaan yleensä simuloitusti. Sen takia suolistossa tapahtuvista vuorovaikutuksista ruoka-aineiden, bakteerien ja elimistön välillä, ei voida vielä saada tarkkaa tietoa. Jaottelu pelkästään patogeenisiin ja terveyttä edistäviin bakteereihin ei anna todellista kuvaa niiden monimutkaisista vuorovaikutussuhteista, sillä vaikutukset voivat olla usein päällekkäisiä. Monet haitallisia myrkyjä erittävät bakteerit voivat samalla esimerkiksi muodostaa ihmisen elimistön energiametabolian alkutuotteita ja siten olla haitaksi ja hyödyksi samaan aikaan. Benhabilesin ym. (2012) mukaan kitiinin ja kito-oligosakkaridien vaikutukset voivat olla lajista riippuen bakteereiden kasvua edistäviä tai estäviä. Siksi monissa tapauksissa syödyn ravinnon suhde suolistobakteereiden aikaansaamille vaikutuksille voikin olla moniulotteinen. Tästä hyvä esimerkki on *Clostridium paraputrificum*, joka on tehokas kitiinin hyödyntäjä. Se tuottaa kitiinin hajotuksen ja oman energia-aineenvaihduntansa sivutuotteena hiilidioksidia, asetaattia ja laktaattia, sekä pieniä määriä propionaattia ja butyraattia (Šimunek ym. 2002). Näiden yhdisteiden tiedetään olevan hyödyllisiä ihmiselle (Louis & Flint 2017), mutta *Clostridium paraputrificum*:in on todettu myös edistävän haitallisten kasvaimien muodostumista suolistossa (Horie ym. 1999). Toisaalta taas kitosaanin on todettu inhiboivan *Clostridia*-bakteereiden kasvua, samalla vähentäen niiden erittämiä haitallisia aineita merkittävästi (Terada ym. 1995).



## 1.5 Tutkimuksen tarkoitus

Tässä Pro gradu -työssä haluttiin tutkia tieteellisin menetelmin hyönteisruoasta saatavan kitiinin, sekä sen mahdollisesti ruoansulatusentsyymien toiminnan seurauksesta syntyvän hajoamistuotteen, kito-oligosakkaridin, vaikutuksia valittuihin suolistomikrobeihin. Työn tarkoituksena oli selvittää miten pieniä pitoisuuksia kitiiniä ja kito-oligosakkarideja on oltava, jotta vaikutuksia bakteereiden kasvuun ilmenee. Tällaiset tutkimukset, joissa määritetään aineen pienin mahdollinen konsentraatio, jossa inhibitorisia vaikutuksia ilmenee (*minimum inhibitory concentration, MIC*), ovat yleisiä tutkimuksia mikrobiologiassa.

Työssä tutkittiin kitiinin ja kito-oligosakkaridien (KOS) vaikutusta laktobasillien (*Lactobacillus rhamnosus* GG) ja kolibakteerien (*Escherichia coli* TG) kasvuun *in vitro*. Ne ovat yleisiä ihmisen suolistobakteereita ja voivat määrällään ja toiminnallaan saada aikaan fysiologisia vasteita ihmisen elimistössä. Kyseiset bakteerilajit valittiin tutkimukseen, koska haluttiin tutkia, ilmenevätkö kitiiniyhdisteiden vaikutukset samalla tavoin ihmisen terveydelle suotuisissa maitohappobakteereissa ja potentiaalisissa patogeeneissa. Koeasetelmaan valittiin *Lactobacillus rhamnosus* GG (*Lactobacillus*) edustamaan ihmisen terveyden kannalta hyödyllisiä suolistobakteereita sen tutkittujen terveyttä edistävien ominaisuuksien vuoksi. Terveydelle haitallisia bakteereita edustamaan valittiin *Escherichia coli* TG (*E.coli*), sillä sen tiedetään olevan esimerkiksi ruokamyrkytysten ja suolistotulehdusten taustalla.

## 2. Aineisto ja menetelmät

### 2.1 Työssä käytetyt bakteerit ja niiden kasvatus

Työssä käytettiin yleisiä bakteerien malliorganismeja *Lactobacillus rhamnosus* GG:tä (ATCC 53103) ja *Escherichia coli* TG:tä, jotka tarjosi käytettäväksi Funktionaalisten elintarvikkeiden kehittämiskeskus (Turku). Pakastetut varastokannat esikasvatettiin agarmaljoilla pesäkkeiksi. Bakteereiden esikasvatusta varten tehtiin valmistajien ohjeiden mukaisesti kasvatusmaljoja tryptoni-soija agarmediumista (Tryptone Soy Agar Broth, CM0129, Oxoid Microbiology Products, Thermo Fischer Scientific Inc. Massachusetts, Yhdysvallat ja MC006, Agar No 2 Bacteriological General Purpose. Lab M, A Neogen Company, Lancashire, Iso-Britannia).

Bakteereiden annettiin kasvaa *E.coli* TG:n tapauksessa 22-26 tuntia Tryptone Soy Agar (TSA) -maljalla 37 °C:ssa, jonka jälkeen muodostuneista pesäkkeistä siirrettiin yksi uudelle samanlaiselle kasvatusmaljalle kasvamaan. *Lactobacillus*-bakteereja esikasvatettiin 4-6 vuorokautta omalla TSA maljallaan +37 °C:ssa, ennen kuin pesäkkeet olivat kasvaneet riittävän suuriksi (0,5 mm) siirrettäväksi uudelle maljalle. Tätä siirtämistä aina uudelle kasvumaljalle jatkettiin koko tutkimuksen keston ajan, jotta tutkittavien yhdisteiden vaikutusten alaisina olivat aina mahdollisimman tuoreet bakteerit.

Näytteisiin käytettävät bakteerit otettiin kasvatusmaljalta aina sinä aamuna kun koemittaukset suoritettiin. Jotta kaikkiin näytteisiin tuli alussa saman verran bakteereita, tehtiin kantaliuos jossa oli haluttu ja tiedetty määrä bakteereja. Viljelymaljalta siirrettiin pesäkkeitä kyvetteihin, joissa oli 1ml PBS-puskuriliuosta (PBS-kantaliuos: NaCl 8,5 g\*l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,21 g\*l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,34 g\*l<sup>-1</sup>, sekä MilliQ-vettä lisätty tilavuuteen 1L asti, pH=7,2). Bakteereita sisältävän kyvetin absorbanssi mitattiin 600 nm aaltopituudella spektrofotometrillä (UV/VIS UV1601 Spectrophotometer. Shimadzu Corporation, Kioto, Japani) ja sen optinen tiheys (OD, *optic density*) säädettiin absorbanssilukemaan 0,250 A, sisältäen 3 x 10<sup>8</sup> bakteeria/ml, siirtämällä bakteereita vähän kerrallaan maljalta kyvetiin. Vaihteluväli absorbanssiluvuissa pidettiin mahdollisimman pienenä, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia, mutta vaihtelua oli 0,238 - 0,258 A väliltä. Jotta bakteereilla oli varmasti tilaa kasvaa lopullisissa näytteissä, bakteerien kantaliuoksesta tehtiin vielä kymmenkertainen laimennos PBS-puskuriliuokseen.

## 2.2 Kitiinin ja kito-oligosakkaridin liuokset

Tutkittavista yhdisteistä, kitiinistä (C7170-100G, Chitin from shrimp shells, *practical grade, powder*, 100g, Poly-(1→4)-β-N-acetyl-D-glucosamine, (C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, Yhdysvallat) ja kito-oligosakkaridista (Chitosan Oligosaccharide, *food grade*, 100g, (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>)<sub>n</sub>, n=2-10, deasetyloatioaste ≥90 %, molekyylipaino ≤1,5 kDa, Bonding Chemical, Texas, Yhdysvallat), valmistettiin kantaliuokset joiden konsentraatio oli 0,05 g/ml. Kito-oligosakkaridin kantaliuos valmistettiin sekoittamalla 0,53 g kito-oligosakkaridijauhetta 10 ml:aan MilliQ-vettä. Kitiini liukenee huonosti veteen, joten jotta se saataisiin liukenemaan, sitä varten täytyi valmistaa 50 % natriumhydroksidi (NaOH) -vesiliuos. Kyseistä liuosta valmistettiin 20 ml, jossa oli 10ml MilliQ-vettä ja 10 g NaOH:ia (30620-1KG-R, Sodium hydroxide, Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, Yhdysvallat). Tähän liuokseen lisättiin 1,06

grammaa kitiinijauhetta ja sekoitettiin hyvin. Kitiinin kantaliuoksen tilavuudeksi tuli 20 ml ja konsentraatioksi 0,05 g/ml ja kito-oligosakkaridin kantaliuoksen tilavuudeksi 10 ml, myöskin konsentraatiossa 0,05 g/ml.

Kitiinistä ja kito-oligosakkaridin kantaliuoksista valmistettiin näyte- ja verrokkiliuokset haluttuihin konsentraatioihin (taulukko 2). Kitiinin kantaliuoksesta valmistettiin kaksi näytettä, konsentraatioilla 0,005 g/ml ja 0,001 g/ml. Kito-oligosakkaridinäytteitä valmistettiin kolme eri konsentraatiota: 0,005 g/ml, 0,001 g/ml ja 0,0005 g/ml. Lisäksi valmistettiin bakteeriverrokki ilman kitiiniä tai kito-oligosakkarideja, jotta tiedettäisiin miten bakteerit kasvavat ilman testattavien aineiden vaikutusta. Kitiini- ja kito-oligosakkaridinäytteisiin, sekä bakteeriverrokkiin lisättiin 0,3 g TSA-jauhetta ja MilliQ-vettä, taulukko 2 mukaisesti, jotta lopputilavuudeksi saatiin 10 ml. Lopputilavuudessa oli otettu myös huomioon 0,1 ml bakteerikantaliuosta, joka lisättiin vasta myöhemmässä työvaiheessa.

Jokaiselle kitiini- ja kito-oligosakkaridinäytteen eri konsentraatiolle sekä bakteeriverrokille valmistettiin niitä vastaavat verrokkiryhmät, joihin ei lisätty bakteereita. Konsentraatiokohtaiset verrokkit valmistettiin, jotta datan käsittelyssä voitiin suorittaa taustavärinkorjaus. Kaikkiin verrokkeihin lisättiin 0,3 g TSA-jauhetta ja MilliQ-vettä, taulukko 2 mukaisesti, jotta lopputilavuudeksi saatiin 10 ml. Lopuksi kaikki näytteet ja verrokkit steriloidtiin autoklaavissa (Autoclave - Steam sterilizer 5050EL, Tuttnauer Europe B.V., Breda, Alankomaat). Steriloinnin jälkeen pulloet suljettiin tiiviisti ja jätettiin yön yli +4 °C:een.

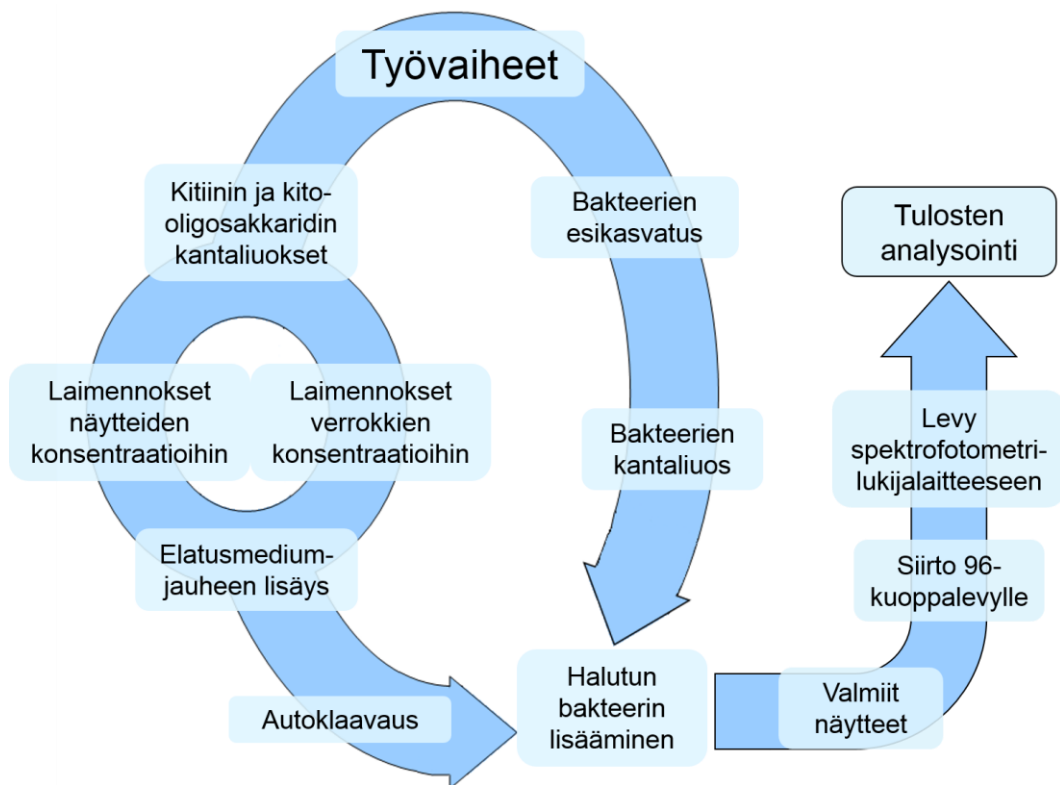
Varsinaisena kokeen suorittamispäivänä kitiini- ja kito-oligosakkaridinäytteisiin sekä bakteeriverrokkiin lisättiin 100µl joko *E.coli*- tai *Lactobacillus*-kantaliuosta taulukko 2 mukaisesti. Yhtenä kokeen suorittamispäivänä testattiin yhtä bakteerityyppiä, yhdellä 96-kuoppalevyllä kerrallaan (kuva 5). Bakteereiden annettiin sekoittua ja levittäytyä kunnolla näytteisiin, kääntelemällä ja ravistelemassa pulloja kevyesti, mutta huolellisesti.

**Taulukko 2. Tiedot valmistetuista näytteistä ja niiden verrokeista.** Yksi rivi kuvastaa yhden näytteen tai verrokin valmistamiseen käytettyjen aineiden ja liuosten määriä. ”Konsentraatio” ja ”Kantaliuosta” -sarakeet kuvastavat kitiinin tai kito-oligosakkaridin määriä joita otettiin kitiini- ja kito-oligosakkaridinäytteisiin tai verrokkeihin. Bakteeriverrokkiin ja tyhjään verrokkiin ei tullut vaikuttavia aineita ollenkaan ja siksi niiden ”Kantaliuosta” -sarakeet ovat tyhjiä. ”Bakteerikantaliuosta” -sarakeesta nähdään että vain näytteisiin ja bakteeriverrokkiin lisättiin bakteereita, joiden kasvua haluttiin tutkia.

Näytetyyppi	Konsentraatio	Kantaliuosta	MilliQ-vettä	TSA-jauhetta	Bakteerikantaliuosta	Tilavuus
Kitiini	0,005 g/ml	1 ml	8,64 ml	0,3 g	0,1 ml	10 ml
	0,001 g/ml	0,2 ml	9,408 ml	0,3 g	0,1 ml	10 ml
Kitiinin verrokkit	0,005 g/ml	1 ml	8,7 ml	0,3 g	-	10 ml
	0,001 g/ml	0,2 ml	9,5 ml	0,3 g	-	10 ml
Kito-oligosakkaridi	0,005 g/ml	1 ml	8,64 ml	0,3 g	0,1 ml	10 ml
	0,001 g/ml	0,2 ml	9,408 ml	0,3 g	0,1 ml	10 ml
	0,0005 g/ml	0,1 ml	9,504 ml	0,3 g	0,1 ml	10 ml
Kito-oligosakkaridin verrokkit	0,005 g/ml	1 ml	8,7 ml	0,3 g	-	10 ml
	0,001 g/ml	0,2 ml	9,5 ml	0,3 g	-	10 ml
	0,0005 g/ml	0,1 ml	9,6 ml	0,3 g	-	10 ml
Bakteeriverrokki	-	-	9,504 ml	0,3 g	0,1 ml	10 ml
Tyhjäverrokki	-	-	9,7 ml	0,3 g	-	10 ml

### 2.3 Kuoppalevyn valmistus ja luenta

Bakteerien lisäämisen jälkeen jokaisesta valmiista näyte- ja verrokkiliuoksesta pipetoitiin 300µl kahdeksaan 96-kuoppalevyn kaivoon. Valmiit *E.coli* -näytelevyt siirrettiin suoraan spektrofotometriin luettavaksi, mutta *Lactobacillus* -näytelevyjä esikasvatettiin vaihtelevia aikoja (4-18 tuntia) niiden hitaamman kasvun takia. Automatisoitu spektrofotometri (Synergy H1, Hybrid Multi-Mode Reader, BioTek Instruments Inc., Vermont, Yhdysvallat) ohjelmoitiin pitämään levyt +37 °C:n lämpötilassa, mitaten jokaisen kaivon absorbanssilukeman 20-26 tunnin ajan 30 minuutin välein 600 nm valon aallonpituudella. Mittaustulokset tulivat Gen5-ohjelmaan (Gen5 Software, ohjelmaversio 3.0, BioTek Instruments Inc., Vermont, Yhdysvallat), josta ne vietiin Excel:iin (Microsoft Excel 2013, ohjelmaversio 15.0.4919.1000, Microsoft Corporation, Washington, Yhdysvallat) käsiteltäväksi. *E.coli* -näytelevyistä tehtiin kolme toistoa ja *Lactobacillus* -näytelevyistä tehtiin neljä toistoa.



**Kuva 5. Kaavakuva työvaiheiden pääkohdista.** Kuva havainnollistaa miten työvaiheet etenivät aluksi itsenäisesti, mutta samaan aikaan kitiinin-, kito-oligosakkaridien-, ja verrokkiliuosten valmistamisen, sekä bakteerien esikasvatuksen kanssa. Tutkittujen aineiden ja bakteerien työvaiheet yhdistyivät vasta bakteerien lisäämisessä näytteisiin, juuri ennen näytteiden siirtämistä 96-kuoppalevyille.

## 2.4 Tilastollinen analyysi

Kerättyä dataa käsiteltiin Excel:issä kuoppalevykohtaisesti. Jokaisen näytteen kahdeksan toistokaivon absorbanssilukemat yhdistettiin yhdeksi keskiarvoksi, aina yhden mittaushetken ajankohdalta. Jokaiselle näytteelle sekä bakteeriverrokkille tehtiin taustavärin korjaus (*background correction*), jossa niistä vähennettiin näytettä vastaavan verrokin (sama konsentraatio kitiiniä, tai kito-oligosakkaridia) absorbanssilukemien keskiarvo näytettä vastaavissa mittausajankohdissa. Absorbanssilukemien keskiarvoista tehtiin bakteerien kasvukäyrät DMFit-ohjelmalla (Baranyi & Marin 2017). DMFit:stä saatiin bakteerien kasvukäyrien kuvaajat, sekä kasvuajankohdan, eksponentiaalisen kasvuvaiheen nopeuden, sekä kasvun huippukohdan arvot.

Tilastollinen analyysi suoritettiin IBM SPSS-ohjelmalla (IBM SPSS statistics 24.0 software, IBM Corp., Armonk, NY, Yhdysvallat). Shapiro-Wilk -testillä tarkasteltiin noudattiko kerätty data normaalijakaumaa. Tilastollisesti merkittävien eroavaisuuksien merkitsevyytensä käytettiin  $p \leq 0,05$ . Yksisuuntaista ANOVA -testiä käytettiin normaalisti jakautuneen datan vertailuun. Koska varianssit eivät olleet yhteneväisiä, Post-

hoc -analyysiin valittiin Games-Howell testi, jolla vertailtiin ryhmien välisiä eroavaisuuksia. Datalle, joka ei noudattanut normaalijakaumaa, suoritettiin vertailu ei-parametrisillä Kruskal-Wallis- ja Mann-Whitney U -testeillä.

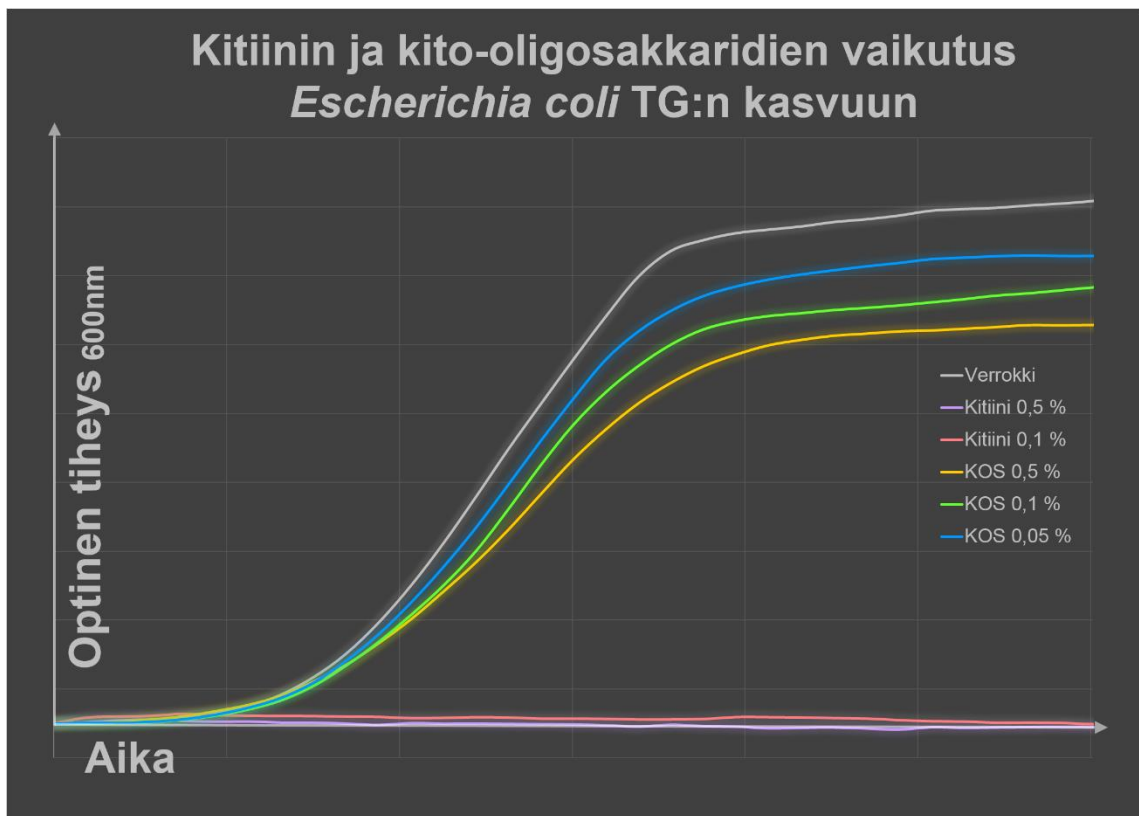
### 3 Tulokset

#### 3.1 Kitiinin ja kito-oligosakkaridin vaikutus *Escherichia coli* TG kasvuun

Kito-oligosakkaridi rajoitti *E.coli*:n populaation kasvua, kun taas kitiini esti sen täysin (kuva 6). Kito-oligosakkaridinäytteissä oli verrokkiin nähden vähemmän kasvua ja se oli hitaampaa. Vaikutuksissa ei ollut eroa kitiinin konsentraatioiden välillä, mutta kitiini erosi selvästi muista näyteryhmistä estäessään *E.coli*:n kasvun kokonaan. Koska kitiininäytteissä kasvua ei havaittu lainkaan, tilastollisessa analyysissä kitiinin muuttujien oletettiin olevan muuttumattomia.

Kito-oligosakkaridin *E.coli*:n kasvua inhiboiva vaikutus oli sitä tehokkaampi, mitä suurempi pitoisuus kito-oligosakkaridia näytteessä oli (taulukko 3). *E.coli*:n lisääntyminen oli nopeinta verrokissa (0,203 n/h, mediaani). Sen kasvunopeuden havaittiin olevan sitä hitaampi, mitä suurempi kito-oligosakkaridipitoisuus näytteessä oli (KOS 0,05 %: 0,178 n/h > KOS 0,1 %: 0,161 n/h > KOS 0,5 %: 0,127 n/h, luvut mediaaneja). Kito-oligosakkaridin 0,5 %:n pitoisuudessa *E.coli* kasvoi keskimäärin lähes 63 % hitaammin verrokkiryhmään verrattuna (KOS 0,5 %: 0,127 n/h, verrokki: 0,203 n/h). Myös kokonaiskasvun määrä jäi pienemmäksi näytteissä, joissa kito-oligosakkaridipitoisuus oli suurempi (KOS 0,5 %: 0,820 n < KOS 0,05 %: 0,869 n, luvut mediaaneja). Kito-oligosakkaridinäytteiden kasvu ei yltänyt suurimmillaankaan siihen, mitä *E.coli*:n verrokkiryhmän kasvu oli pienimmillään (KOS 0,05 % 0,95 n < verrokki 0,96 n) (taulukko 3). Tämä käy ilmi myös mediaanilukuja vertailemalla, joissa kasvun määrä oli suurin verrokissa (1,032 n) ja toiseksi suurin KOS 0,1 %:ssa (0,907 n). Kito-oligosakkaridin ei havaittu merkittävästi vaikuttavan *E.coli*:n kasvun alkamisajankohtaan.

Tilastollisesti merkittäviä eroja verrokin ja kito-oligosakkaridinäytteiden välillä oli erityisesti eksponentiaalisen kasvuvaiheen nopeudessa, sekä kokonaiskasvun määrässä (taulukko 3). Lisäksi näytteiden eri pitoisuuksien välillä tilastollisesti merkittävä ero eksponentiaalisen kasvun nopeudessa oli KOS 0,5 %:n ja KOS 0,05 %:n välillä, KOS 0,5 %:n estäessä *E.coli*:n kasvua tehokkaammin (KOS 0,5 %, 0,127 n/h < KOS 0,05 %, 0,178 n/h).



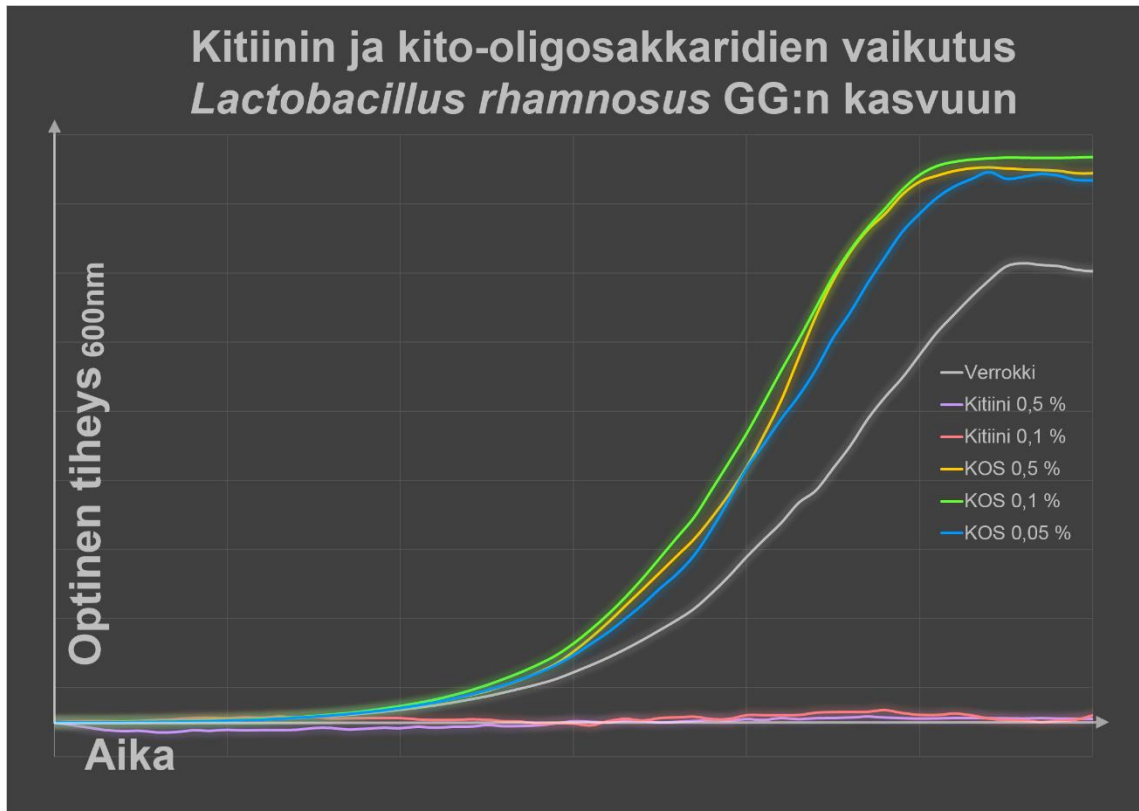
**Kuva 6. Kitiinin ja kito-oligosakkaridien vaikutus *Escherichia coli* TG:n kasvuun ja lisääntymiseen.** Mitä suurempi optinen tiheys on, sitä enemmän näytteessä on bakteereita. Kuva havainnollistaa, miten kitiiniin ja kito-oligosakkaridin (KOS) kaikki pitoisuudet vaikuttavat *E.coli*:n kasvua estävästi. Verrokki on käsittelemätön ryhmä, jossa ei ole kitiiniä ja kito-oligosakkaridia vaikuttamassa *E.coli*:n kasvuun.

### 3.2 Kitiinin ja kito-oligosakkaridin vaikutus *Lactobacillus rhamnosus* GG kasvuun

Kito-oligosakkaridi vaikutti *Lactobacillus*:in populaation kasvua nopeuttaen ja tehostaen, kun taas kitiini puolestaan esti sen kasvun kokonaan (kuva 7). Kito-oligosakkaridinäytteissä oli verrokkiin nähden enemmän kasvua ja se oli nopeampaa. Vaikutuksissa ei ollut eroa kitiinin konsentraatioiden välillä, mutta kitiini erosi selvästi muista näyteryhmistä estäessään *Lactobacillus*:in kasvun kokonaan. Kitiininäytteissä *Lactobacillus*:in ei havaittu kasvavan lainkaan, joten tilastollisessa analyysissä kitiinin muuttujien oletettiin olevan muuttumattomia.

Tilastollisesti merkittävä ero oli eksponentiaalisen kasvuvaiheen nopeudessa kito-oligosakkaridin pitoisuuksien ja verrokin välillä (taulukko 4). Kito-oligosakkaridin *Lactobacillus*:in kasvua edistävä vaikutus oli sitä tehokkaampi, mitä suurempi kito-oligosakkaridipitoisuus näytteessä oli (KOS 0,05 %: 0,073 n/h < KOS 0,1 %: 0,082 n/h < KOS 0,5 %: 0,087 n/h, luvut mediaaneja). Kasvu oli hitainta verrokissa (0,049 n/h, mediaani). Eksponentiaalisen kasvuvaiheen nopeus oli parhaimmillaan lähes kaksinkertainen verrokkiin nähden suuremmissa kito-oligosakkaridipitoisuuksissa (KOS

0,5 %: 0,087 n/h > verrokki: 0,049 n/h, luvut mediaaneja). Myös kokonaiskasvun määrä oli isompi näytteissä, joissa kito-oligosakkaridipitoisuus oli suurempi (verrokki: 0,470 n < KOS 0,05 %: 0,599 n < KOS 0,1 %: 0,667 n < KOS 0,5 %: 0,633 n, luvut mediaaneja). Kasvun alkamisajankohta oli KOS 0,05 %:ssa (17,655 h) jonkin verran aikaisempi, kuin verrokissa (18,069 h), tosin kokonaiskasvun määrässä tai alkamisajankohdassa ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja.



**Kuva 7. Kitinien ja kito-oligosakkaridien vaikutus *Lactobacillus rhamnosus* GG:n kasvuun ja lisääntymiseen.** Mitä suurempi optinen tiheys on, sitä enemmän näytteessä on bakteereita. Kuva havainnollistaa, miten kitiniin eri pitoisuudet vaikuttavat *Lactobacillus*:in kasvua estävästi, mutta kito-oligosakkaridin (KOS) kaikki pitoisuudet edistävät sen kasvua ja lisääntymistä. Verrokki on käsittelemätön ryhmä, jossa ei ole kitiniä ja kito-oligosakkaridia vaikuttamassa *Lactobacillus*:in kasvuun.



**Taulukko 3. Kito-oligosakkaridin vaikutus *Escherichia coli* TG:n lisääntymiseen.** Alkamisajankohta on ilmoitettu tunteina ja kasvun määrä optisena tiheytenä. Kasvunopeus on ilmoitettu optisen tiheyden suhteena ajan funktioon. Kirjaimet a-c kuvastavat verrokki ja kito-oligosakkaridinäytteiden tilastollisesti merkittäviä eroavaisuuksia toistensa suhteen p <0,05 -luottamustasolla. Samalla kirjaimella merkityt näyteryhmät eivät eroa toisistaan tilastollisesti merkittävästi sarakkeen osoittaman ominaisuuden (alkamisajankohta, kasvunopeus tai populaation kokonaiskasvun määrä) suhteen, mutta eri kirjaimella merkityt ryhmät ovat toistensa suhteen erilaisia, jolloin niiden välillä on tilastollisesti merkittävä eroavaisuus.

*Escherichia coli* TG

	Alkamisajankohta (h)			Kasvunopeus (n/h)			Populaation kokonaiskasvun määrä (n)		
	keskiarvo, SD	mediaani	min-max	keskiarvo, SD	mediaani	min-max	keskiarvo, SD	mediaani	min-max
Verrokki	4,97 ± 0,126	4,935	4,70-5,29	0,20 ± 0,004	0,203 <sup>a</sup>	0,20-0,21	1,02 ± 0,022	1,032 <sup>a</sup>	0,96-1,06
KOS 0,05 %	4,91 ± 0,045	4,915	4,81-5,01	0,18 ± 0,006	0,178 <sup>b</sup>	0,16-0,19	0,88 ± 0,027	0,869 <sup>b</sup>	0,83-0,95
KOS 0,1 %	4,84 ± 0,073	4,789	4,72-5,04	0,16 ± 0,006	0,161 <sup>b,c</sup>	0,14-0,17	0,85 ± 0,062	0,907 <sup>b</sup>	0,66-0,92
KOS 0,5 %	4,65 ± 0,068	4,639	4,51-4,80	0,13 ± 0,006	0,127 <sup>c</sup>	0,12-0,15	0,79 ± 0,044	0,820 <sup>b</sup>	0,66-0,86

**Taulukko 4. Kito-oligosakkaridin vaikutus *Lactobacillus rhamnosus* GG:n lisääntymiseen.** Alkamisajankohta on ilmoitettu tunteina ja kasvun määrä optisena tiheytenä. Kasvunopeus on ilmoitettu optisen tiheyden suhteena ajan funktioon. Kirjaimet a-b kuvastavat verrokki ja kito-oligosakkaridinäytteiden tilastollisesti merkittäviä eroavaisuuksia toistensa suhteen p <0,05 -luottamustasolla. Samalla kirjaimella merkityt näyteryhmät eivät eroa toisistaan tilastollisesti merkittävästi sarakkeen osoittaman ominaisuuden (alkamisajankohta, kasvunopeus tai populaation kokonaiskasvun määrä) suhteen, mutta eri kirjaimella merkityt ryhmät ovat toistensa suhteen erilaisia, jolloin niiden välillä on tilastollisesti merkittävä eroavaisuus.

*Lactobacillus rhamnosus* GG

	Alkamisajankohta (h)			Kasvunopeus (n/h)			Populaation kokonaiskasvun määrä (n)		
	keskiarvo, SD	mediaani	min-max	keskiarvo, SD	mediaani	min-max	keskiarvo, SD	mediaani	min-max
Verrokki	17,87 ± 0,719	18,069	16,18-19,15	0,05 ± 0,006	0,049 <sup>a</sup>	0,03-0,06	0,47 ± 0,062	0,470	0,33-0,61
KOS 0,05 %	17,89 ± 0,798	17,655	16,25-20,01	0,07 ± 0,006	0,073 <sup>a,b</sup>	0,06-0,09	0,59 ± 0,063	0,599	0,44-0,72
KOS 0,1 %	17,77 ± 0,543	18,140	16,23-18,59	0,08 ± 0,003	0,082 <sup>b</sup>	0,07-0,09	0,65 ± 0,048	0,667	0,53-0,74
KOS 0,5 %	18,15 ± 0,754	18,403	16,14-19,66	0,09 ± 0,005	0,087 <sup>b</sup>	0,08-0,10	0,62 ± 0,046	0,633	0,49-0,71

## 4 Pohdinta

Maailman väestön lukumäärän on arvioitu saavuttavan 9,15 miljardia vuoteen 2050 mennessä. Väestönkasvun lisäksi kulutustottumukset, etenkin kehittyvissä maissa, tulevat muuttumaan yhä länsimaalaisemmiksi varallisuuden lisääntyessä. Monissa kehitysmaissa ollaan siirtymässä ravinnossa yhä enemmän lihan kulutukseen karjatalouden tuotteiden kysynnän kasvaessa. (Popkin 1993; Alexandratos & Bruinsma 2012). Nykyinen karjatuotanto on ympäristöä kuormittavaa. Tällä hetkellä 14,5 % kaikista ihmisen toiminnasta aiheutuvista kasvihuonekaasupäästöistä johtuu karjatalouden päästöistä. Nautakarjan tuotantoketjujen vaiheet, kuten lihan ja maidon, sekä muiden hyödykkeiden tuotanto, aiheuttavat 65 % kyseisistä karjatalouden päästöistä (Gerber ym. 2013). Päästöjen vähentämisen sekä terveellisemmän ruokavalion vuoksi, uusia ja vähemmän ympäristöä kuluttavia vaihtoehtoja karjataloudelle ja proteiinin saannille on siis syytä etsiä. Tällaisia vaihtoehtoja ovat kasvisruokaan siirtyminen, sekä ympäristöä eniten kuluttavien eläinproteiinilähteiden vaihtaminen ekologisempiin vaihtoehtoihin, kuten hyönteisiin (van Huis ym. 2013; Fogelholm ym. 2014).

### 4.1 Miksi hyönteisiä kannattaa syödä?

Hyönteiset ovat kestävä kehityksen tavoitteiden mukaista ekologista ja ravinteikasta ruokaa (van Huis 2013). Niiden kasvattaminen ihmisen ruoaksi on nautakarjan tuotantoon verrattuna monin kerroin tehokkaampaa. Hyönteisten vaihtolämpöisyyden ansiosta ne eivät hukkaa energiaa itsensä lämpimänä pitämiseen, vaan ne voivat käyttää ravinnosta saamansa energian kasvuunsa. Yhtä tuotettua proteiinikiloa kohti hyönteiset tarvitsevat parhaimmillaan vain 1,7 kiloa rehua, siinä missä sioilla vastaava luku on 5 kg ja nautakarjalla 10 kg (*feed conversion efficiency*). Lisäksi hyönteiset kasvavat syötäväksi 4 - 9 viikossa ja tuottavat tässä ajassa runsaasti jälkeläisiä, kun taas naudoilla kasvamiseen menee vuosia. (Ramos-Elorduy 1997; Smil 2002; van Huis ym. 2013). Myös tarvittavan viljelysmaan ja elintilan käytössä hyönteiset ovat muita tuotantoeläimiä tehokkaampia. Saman tuotetun proteiinimäärän saavuttamiseksi joka jauhomadoista saadaan yhtä hehtaaria kohden, vaatii naudalta kymmenen hehtaaria viljelysmaata ja vastaavasti 2 - 3,5 hehtaaria kanoilta ja sioilta (van Huis ym. 2013).

Oonincx ym. (2011) vertasivat yleisimpien syötävien hyönteisten kasvihuonekaasupäästöjä nautakarjan ja sikatuotannon päästöihin, verraten samalla miten tehokkaasti ne hyödynsivät saamaansa ravintoa kasvuunsa. Kasvihuonekaasupäästöt

suhteutettuna kasvutehokkuuteen yhtä kasvamaansa kiloa (biomassaa) kohden, hyönteiset tuottivat merkittävästi vähemmän kasvihuonekaasupäästöjä kuin siat, ja vain 1 %:n siitä määrästä mitä lehmät tuottavat kasvamaansa kiloa kohden.

Hyönteiset ovat ravitsevaa ruokaa ja vastaavat ravintoarvoiltaan tavanomaista liharavintoa. Esimerkkilajeina jauhomadot sekä kotisirkat sisältävät lihaan verrattavissa olevia määriä rasvaa, proteiinia ja energiaa. Niille syötetystä ravinnosta riippuen hyönteiset voivat sisältää tärkeitä tyydyttymättömiä omega-3- ja omega-6-rasvahappoja, jopa enemmän kuin naudan liha. Lisäksi ne sisältävät myös paljon A-, E-, ja B12-vitamiineja, sekä rautaa ja sinkkiä. Kitiinisen kuorensa ansiosta hyönteiset sisältävät myös merkittäviä määriä ravintokuitua, jota on tavallisesti ajateltu saatavan vain kasviksia syömällä. (Barker ym. 1998; Finke 2002; Oonincx & Dierenfeld 2012; Rumpold & Schlüter 2013).

Tällä hetkellä suurimmat haasteet, joita hyönteisruoan markkinoille saamiseen Suomessa liittyy, ovat tehokasvatusmenetelmien ja kasvatuksen automatisaation kehitys, sekä EU:n uusielintarvikelainsäädäntö, jonka mukaan hyönteisiä ei vielä saa myydä elintarvikkeeksi. Tästä huolimatta monet kotimaisetkin yritykset ja toimijat ovat kehittäneet kasvatusmenetelmiä, sekä tutkineet hyönteisiä ja niiden valmistamista ruoaksi. Vuoden 2018 alussa voimaanastuva EU:n uusielintarvikeasetus (EU 2283/2015) selkeyttää uusien elintarvikkeiden hyväksymismenettelyä, jonka vuoksi tyypillisten ruokahyönteisten hyväksyntää elintarvikkeiksi voidaan odottaa vuosien 2018 ja 2019 kuluessa koko EU:n alueella. Asetuksen voimaan astuttua hyönteisruokia saa siis myydä luvanvaraisesti elintarvikkeina.

## 4.2 Tutkimuksen koeasetelma

Tutkimuksen koeasetelmaa suunniteltaessa haluttiin ottaa kitiinin kanssa toiseksi tutkittavaksi yhdisteeksi kito-oligosakkaridi, sillä ihmisen ruoansulatusentsyymit AMCaasi ja lysotsyymi, sekä suolistobakteerit kykenevät hajottamaan hyönteisruoasta saatua kitiiniä tällaisiksi yhdisteiksi, tai kito-oligosakkaridia läheisesti muistuttaviksi yhdisteiksi (Paoletti ym. 2007; Musumeci & Paoletti 2009; Ohno ym. 2016). Näin ollen hyönteisruoan nauttimisen jälkeen ruoansulatuksessamme olisi kitiiniä ja kito-oligosakkarideja, jotka voisivat vaikuttaa suolistobakteerien toimintaan.

Työssä mitattiin bakteerien lisääntymisen tärkeimpiä vaiheita, joita ovat alkamisajankohta, eksponentiaalisen kasvun vaihe, ja bakteeripopulaation

kokonaiskasvun määrä. Nämä ovat tyypillisimpiä vertailukohtia bakteeritutkimuksille, joissa määritetään inhibitoristen vaikutusten ilmenemiseen tarvittavien konsentraatioiden vähimmäismääriä. Näitä vaiheita vertailemalla voidaan helposti havaita edistääkö, tai estääkö tutkittavan aineen läsnäolo bakteerien lisääntymistä verrokkiryhmään nähden, jossa tutkittavaa ainetta ei ole. Vaikuttavan aineen läsnä ollessa bakteeripopulaation eksponentiaalisen kasvun alkaminen aikaisemmin, tai bakteerien suurempi pitoisuus kasvun loppuvaiheessa, kertovat tyypillisesti siitä, että tutkittava yhdiste edistää bakteereiden kasvua. Vastaavasti kasvua inhiboiva vaikutus ilmenee esimerkiksi kasvun alkamisajankohdan viivästyminenä, tai eksponentiaalisen kasvuvaiheen hitautena. Vahvasti inhiboiva vaikutus ilmenee myös siten, että bakteerit eivät kasva ollenkaan.

Koska vielä ei tiedetä kuinka suuria määriä kito-oligosakkaridia syntyy hajotustoiminnan tuloksena, haluttiin aineiden vaikutusta kokeilla mahdollisimman pieninä pitoisuuksina, jotta voidaan saada viitteitä niiden todellisista vaikutuksista *in vivo*. Pitoisuudet pidettiin pienenä myös siksi, että nautitun hyönteisaterian sisältämästä kitiinistä ja kito-oligosakkaridista päätyy kontaktiin suolistobakteereiden kanssa vain pieniä määriä. Tämän hetkisen tiedon perusteella näyttää, että ihmisen ruoansulatusentsyymit eivät kykene hajottamaan kitiiniä hyvin, joten oletettavasti myös kito-oligosakkarideja syntyy pieniä määriä kyseisen hajotustoiminnan seurauksena. Siksi tässä työssä haluttiin määrittää kitiinin ja kito-oligosakkaridien pienimpiä mahdollisia pitoisuuksia, joissa ne ilmentävät inhibitorisia vaikutuksia bakteereille. Jos inhibitorisia vaikutuksia on jo pienissä pitoisuuksissa, hyönteisruokaa ei tarvitse nauttia suuria määriä prebioottisten-, sekä muiden suolistobakteereiden kautta tapahtuvien terveyttä edistävien vaikutusten aikaansaamiseksi.

Ruoansulatuksessa tapahtuvista kitiininhajotusreaktioista ei tiedetä vielä tarpeeksi, jotta voitaisiin sanoa vastaavatko koeasetelma ja valitut yhdisteet, tai bakteerit todellista tilannetta ruoansulatuksessa. Koska koe suoritettiin *in vitro*, on tulosten tarkastelussa syytä tiedostaa, että kokeen tulos ei edusta luonnollista tilannetta ruoansulatuksessa hyönteisruokaa nautittaessa, vaan tarkastelee eroteltujen muuttujien vuorovaikutusta hallinnoidussa koeympäristössä. Sen takia tutkimukseen ja koeasetelmaan sisältyy muun muassa seuraavia oletuksia ja simulaatioita asioiden ja testattavien kohteiden luonnollisesta tilasta: (1) Käytettyjä mikrobeja ei ollut eristetty ihmisestä, vaan ne olivat olemassa olevia mallikantoja. (2) Koetta ei toteutettu anaerobisissa olosuhteissa, missä suolistobakteerit luonnollisesti elävät. (3) Toteutus tapahtui *in vitro* kasvatusmediumeissa, eikä ruoansulatuskanavan olosuhteita jäljitelty tarkasti. (4) Kitiini

ja kito-oligosakkaridit olivat eristetty äyriäisistä, eikä hyönteisistä. Vaikutukset ovat kuitenkin yleistettävissä myös hyönteisistä saatavaan kitiinin ja kito-oligosakkaridiin, sillä Muzzarellin ym. (2010) mukaan jos kitiiniyhdisteet on eristetty ja puhdistettu, eroa yhdisteiden alkuperän välillä ei ole.

Tämän kaltainen osatekijöiden eristäminen tekee kokeen muuttujien ja niiden vaikutusten havainnoinnista tarkemmin mitattavaa, mutta samalla menetetään tapahtumien luonnollinen tausta ja olosuhteet. Siksi käytetty koeasetelma ei anna absoluuttista totuutta ja kuvaa siitä, miten hyönteisruoan mukana nautituksi tullut kitiini vaikuttaa suolistomikrobien kasvuun *in situ*. Sen sijaan tällä koeasetelmalla pystytään tekemään arvioita millaisia tapahtumia ja vuorovaikutuksia saattaisi olla odotettavissa fysiologisesti. Tämä tutkimus voi toimia pohjatyönä tuleville tarkentaville jatkotutkimuksille.

#### 4.2.1 Natriumhydroksidi

Koska kitiini liukenee huonosti veteen, se täytyi saada laimennossarjoja varten liukenemaan 50 % NaOH-liuoksen avulla (Li ym. 2010). Tällä tavoin mahdollistettiin kitiinin käyttäminen koeasetelman vaatimissa nestemäisissä elatusliuoksissa. Kitiini saatiin liukenemaan NaOH-liuokseen paremmin kuin veteen, vaikka se oli silti edelleen hyvin viskoosissa muodossa. Työssä käytettyjen ohuiden pipettikärkien kanssa ei saatu riittävän tarkasti siirrettyä pieniä määriä viskooseja kitiiniliuoksia, ja siksi kitiinistä ei voitu valmistaa pienempiä näytekonsentraatioita luotettavasti.

Lin ym. (2010) mukaan kitiini ei merkittävästi hajoa tai deasetyloidu vielä 8 % kitiini - 4 % NaOH-liuoksissa, mutta tässä tutkimuksessa käytetyn NaOH-H<sub>2</sub>O-kiitiinin kantaliuoksen NaOH pitoisuus oli huomattavasti suurempi (50 %). NaOH-pitoisuus saattaa olla niin suuri, että se voi ehkä aiheuttaa kitiinin hajoamista ja deasetyloitumista. Kitiinin kantaliuoksissa saattoi siis olla puhtaan kitiinin lisäksi pieniä pitoisuuksia sen hajoamistuotteita, mikä on saattanut vaikuttaa tässä tutkimuksessa saatuihin tuloksiin kitiinin inhibitorisista vaikutuksista. Oletettavasti näytteet sisälsivät enimmäkseen kitiiniä. Näytteiden todellisesta sisällöstä olisi voitu varmistua esimerkiksi korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (*High-performance liquid chromatography, HPLC*), mutta sitä ei pystytty toteuttamaan työhön varatuilla resursseilla. Mikäli kitiininäytteissä ilmenneiden inhibitorisien vaikutusten taustalla olivatkin kitiinin lisäksi jotkin sen hajoamisyhdisteet, niitä ei voitu tässä tutkimuksessa täten määrittää.

Toinen mahdollisesti tuloksiin vaikuttanut virhelähde saattaa olla itse NaOH, sillä se saattaa vahvana emäksenä olla myrkyllistä bakteereille. Näytteiden kantaliuoksissa kitiinin liuottimena toiminut NaOH on siis saattanut estää bakteereiden kasvua merkittävämmiin kuin kitiiniin. Toisaalta lopulliset kitiininäytteet, jotka oli laimennettu 50 %: NaOH-vesi kantaliuoksesta, saattoivat sisältää bakteerien kasvun kannalta merkityksettömän vähän NaOH:ia, niiden ollessa laimennettuja suhtein 1:10 ja 1:50. Näytteissä NaOH-pitoisuus oli siis vain 5 % ja 1 %. Jotta NaOH:in mahdollisesta vaikutuksesta bakteerien kasvuun voidaan varmistua, täytyy lisätä verrokkimittauksia samoissa olosuhteissa kasvatetuista bakteereista ilman kitiiniä 5 %:n ja 1 %:n NaOH-pitoisuuksissa. Näitä verrokkeja ei kuitenkaan pystytty toteuttamaan tässä tutkimuksessa käytetyillä välineillä ja laitteilla.

#### 4.2.2 Spektrofotometri ja absorbanssi

Kun bakteerien määrä lisääntyy kuoppalevyn kaivoissa, liuos sakenee ja läpäisee huonommin valoa. Tämä havaitaan absorbanssiarvojen nousuna. Näin pystytään arvioimaan bakteerien jakautumisen nopeutta, määrää ja eksponentiaalisen lisääntymisen alku- ja loppumiskohtaa, sekä muita mahdollisesti merkittäviä tekijöitä. Bakteerien kasvua voidaan myös mitata laskemalla pesäkkeiden muodostumista kasvatuslevyillä.

Mittaukset ajoitettiin niin, että saatiin tallennettua mitatut arvot bakteerien lisääntymisen aloituskohdasta, huippukohdasta ja eksponentiaalisesta kasvusta näiden väliltä. Kaikista levyistä tehtiin vähintään kolme samanlaista toistoa kokeen tilastollisen laadun takaamiseksi. Mittausten ajoituksessa ei kuitenkaan aina onnistuttu parhaalla mahdollisella tavalla, mikä saattoi aiheuttaa satunnaisvaihtelua tuloksiin.

Spektrofotometri oli ohjelmoitu pitämään yllä +37 °C:n tasaista lämpötilaa, joka parhaiten mahdollistaa yleisimpien bakteerien kasvun. +37 °C:n lämpötila on oleellinen etenkin kun halutaan simuloida lämpötilaa ihmisen sisällä, missä bakteerit luonnollisesti koeasetelman mukaan kasvaisivat. Absorbanssin mittataajuudeksi valittiin 600nm siksi, että se on mikrobiologiassa yleisesti bakteereiden ajalliseen kasvuun käytetty mittaustaajuus. Kyseinen aallonpituus ei esimerkiksi ota häiriötä niin paljon kasvatusmediumeista, jotka ovat usein keltaisen ja oranssin värisiä.

Vaikka mahdollisia häiriöitä mittauksissa vähennettiin taustavärin korjauksella, eli vertailemalla kunkin näytteen arvoja vastaavien verrokkien arvoihin, kitiini ja kito-oligosakkaridit värjäisivät näytteitä vahvasti. Värjäytyneet näytteet olivat

kasvatusmediumin verrokkiin nähden väriltään tummempia etenkin suuremmissa konsentraatioissa. Tämä näytteiden värjäytyvyys saattoi aiheuttaa virheitä absorbanssin mittauksessa taustaväriin korjauksesta huolimatta. Voi myös olla että 600 nm aallonpituus ei pystynyt mittaamaan kasvua ollenkaan tummimmissa kaivoissa. 600 nm on yleisesti käytetty aallonpituus oransseille ja tummankeltaisille kasvatusmedieille, siinä missä kitiinin suurien pitoisuuksien ja sitä vastaavien verrokkien kaivot olivat väriltään lähes tummanruskeita. Näytteiden värjäytyneisyys saattaa siis vaikuttaa tuloksissa esiintyviin kitiinin vaikutuksiin. Värjäytymisen lisäksi kitiiniä sisältävät näytteet ja verrokkit saattoivat muodostaa saostumia kitiinin suuren viskoosiuden takia, mikä voi myös vääristää absorbanssimittausten tuloksia.

#### 4.3 Kitiinin ja kito-oligosakkaridin vaikutus suolistobakteereihin

Kitiini ja kito-oligosakkaridi vaikuttavat eri bakteerilajeihin eri tavoin, mutta yleisesti ne estävät haitallisten bakteereiden, kuten *E.coli*, *S.aureus*, *S.typhimurium*, *Vibrio cholerae* ja *Shigella dysenteriae*, kasvun. Vaikutukset ovat riippuvaisia molekyylipainosta ja kito-oligosakkaridien tapauksessa myös deasetyylaatioasteen määrästä (No ym. 2002; Zheng & Zhu 2003; Raafat ym. 2008; Benhabiles ym. 2012). Estämällä haitallisten bakteereiden kasvua ne voivat myötävaikuttaa ja mahdollistaa hyödyllisten bakteereiden, kuten *Lactobacillus*- ja *Bifidobacterium*-bakteerikantojen kasvuun (Steer ym. 2000). Tasapainoinen suolistomikrobiotan koostumus joka sisältää paljon *Lactobacillus*- ja *Bifido*-bakteereita, eli niin sanottuja ”hyviä” suolistobakteereita, auttaa pitämään patogeenisten bakteereiden kantoja alhaisina ja estää suolistoon liittyviä sairauksia (Zottola & Smith 1990; Salminen ym. 1995; Carroll ym. 2012).

Tässä tutkimuksessa saatujen tulosten mukaan, kito-oligosakkaridi (deasetyylaatioaste  $\geq 90$  %, molekyylipaino  $\leq 1,5$  kDa) edistää *Lactobacillus*:in kasvua pieninäkin pitoisuuksina ja samalla inhiboi *E.coli*:n kasvua. Tutkitun kito-oligosakkaridin voidaan siis sanoa toimivan prebiootin tavoin. Tutkimustulosten mukaan mitä enemmän kito-oligosakkaridia *Lactobacillus*:lla olisi käytettävissään, sitä nopeammin ne kasvaisivat. Prebioottisten vaikutusten kannalta on siis hyvä jos kito-oligosakkaridia saadaan hyönteisravinnosta paljon, tai jos kitiiniä pystytään hajottamaan pieniksi kito-oligosakkarideiksi tehokkaasti ruoansulatuselimistön entsyymien, AMCaasin ja lysosyymin toimesta. Syy *Lactobacillus*:in nopeampaan kasvuun on luultavasti siinä, että se pystyy hyödyntämään kyseistä kito-oligosakkaridia kasvunsa energianlähteenä. (Hock 1940; Okutani & Kitada 1968; Kono ym. 1987; Arbia ym. 2013).

Kitiini esti sekä *Lactobacillus*:in että *E.coli*:n lisääntymisen. *E.coli*:n kasvua estäessään se on hyödyksi ihmisen terveydelle, vähentäen haitallisten bakteereiden kantoja. Toisaalta *Lactobacillus*:in kasvua inhiboidessaan kitiini estää hyvien suolistobakteereiden levittäytymisen. Kitiini voi näin ollen haitata terveyttä edistävien vaikutusten ilmenemistä, sillä hyödyllisten suolistobakteereiden terveyttä edistävä vaikutus perustuu pitkälti patogeeneihin kohdistuvaan syrjäyttävään kilpailuun. Hajottamattoman kitiinin voidaan kuitenkin olettaa toimivan selluloosan tavoin ravintokuituna, jolloin se edistää suoliston terveyttä ja ruoansulatusta. Näiden tulosten valossa kitiinin rooli on siis terveyttä edistävien vaikutusten suhteen ristiriitainen. Tällöin AMCaasin ja lysotsyymiin kyky hajottaa kitiiniä on yhä tärkeämpi hyönteisruoan kokonaisvaltaisten vaikutusten ymmärtämisen kannalta. Vaikka kitiini inhiboi ihmiselle hyödyllistä suolistobakteeria, sen antibakteerisia ominaisuuksia voidaan käyttää hyödyksi elintarviketeollisuudessa esimerkiksi luonnollisena säilöntäaineena (Shahidi ym. 1999; Muzzarelli ym. 2012). Joidenkin kitiinin hajoamistuotteiden on myös tutkitusti todettu pidentävän elintarvikkeiden säilymistä (Dutta ym. 2012).

Kitiinin ja kito-oligosakkaridin inhibitoristen vaikutusten syiksi Je & Kim (2006) oletivat niiden kyvyn hajottaa bakteereiden solukalvoja. Päästessään kosketuksiin bakteereiden solukalvojen kanssa, kitiinin ja kito-oligosakkaridin vapaat aminoryhmät voivat aiheuttaa muutoksia solukalvojen koostumukseen ja hajottaa sen. Raafat ym. (2008) taas ehdottivat, että pienet vesiliukoiset kito-oligosakkaridit pystyvät kulkeutumaan solukalvojen läpi bakteereihin ja aiheuttamaan niiden soluaineenvaihdunnassa häiriöitä, jotka johtavat bakteerin kuolemaan.

Samankaltaisia tuloksia kitiinin ja kito-oligosakkaridin inhiboivasta vaikutuksesta *E.coli*:in ovat saaneet muutkin tutkijat. Esimerkiksi Fernandes ym. (2008) mukaan *E.coli*:n lisääntymistä ehkäiseviä vaikutuksia ilmeni KOS-konsentraation ollessa 0,25 %, KOS:n molekyylipainojen ollessa kokoluokaltaan alle 5 kDa ja 3 kDa. Myös Jeonin ym. (2001) mukaan vähimmäiskonsentraatio, jossa inhibitorisia vaikutuksia *E.coli*:in ilmeni, oli KOS:lle 0,06 %:n ja 0,12 %:n väliltä, KOS:n molekyylipainon ollessa 24 kDa - 7kDa väliltä. Toisaalta heidän tutkimustensa mukaan kyseiset KOS-yhdisteet inhiboivat voimakkaasti myös *Lactobacillus*:in kasvua 0,1 % - 0,03 %:n pitoisuuksina, mikä poikkeaa tässä tutkimuksessa saaduista tuloksista. Heidän käyttämänsä KOS-yhdisteet olivat kuitenkin molekyylipainoltaan suurempia verrattuna tässä tutkimuksessa käytettyyn kito-oligosakkaridiin (1,5 kDa), joten vaikutuksissa voi ilmetä eroja. Jeonin tutkimuksissa todettiinkin, että kito-oligosakkaridit olivat tehokkaampia estämään



patogeenien kasvua kuin hyödyllisten bakteerien kasvua. Heidän mukaansa inhibitoristen vaikutusten aikaansaamiseksi KOS-yhdisteiden molekyylipaino oli oltava yli 10 kDa.

Benhabilesin ym. (2012) tutkimuksen mukaan kito-oligosakkaridien pienin mahdollinen inhibitorisia vaikutuksia aikaansaava pitoisuus *E.coli*:lle oli alle 0,003 %. Heidän tutkimuksissaan ei ilmoitettu KOS-yhdisteiden molekyylipainoja, mutta voidaan olettaa että ne olivat alle 12 kDa, sillä heidän raportoimansa työtavan mukaan KOS-yhdisteet valmistettiin kitosaanista, joka oli molekyylipainoltaan 12 kDa. Ei voida siis olla varmoja miten hyvin tulokset ovat verrattavissa tässä työssä käytettyyn kito-oligosakkaridiin. Merkittävää heidän tuloksissaan oli se, että haitallisten bakteereiden (kuten *E.coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Shigella*, *Vibrio*, ja *P. aeruginosa*) kasvua inhiboivat vaikutukset olivat samanlaisia sekä *N*-asetyyli-kito-oligosakkaridilla, että deasetyloidulla kito-oligosakkaridilla, jota tässäkin työssä käytettiin. *N*-asetyyli-kito-oligosakkaridi oli Ohnon ym. (2016) tutkimusten mukaan juuri se yhdiste, jota AMCaasin todettiin kitiinistä hajottavan hiirten ruoansulatuskanavassa. Mikäli vaikutukset ovat ihmisillä samankaltaiset kuin hiirillä, voidaan sanoa, että hyönteisruoan mukana nautittu kitiini hajoo AMCaasin toimesta kito-oligosakkarideiksi, jotka voivat toimia prebiootin tavoin. Tällöin lysosyymin katalysoimaa kitiinin deasetylaatioprosessia, ei tarvitse välttämättä tapahtua, jotta kito-oligosakkaridit voisivat vaikuttaa prebiootin tavoin.

Kitiinin ja kito-oligosakkaridin vaadittavia vähimmäiskonsentraatioita inhibitoristen vaikutusten aikaansaamiseksi ei saavutettu tässä tutkimuksessa, niiden ollessa pienimmillään 0,1 % kitiinillä, ja 0,05 % kito-oligosakkaridilla. Muissa tutkimuksissa on raportoitu vähimmäiskonsentraatioita inhibitoristen vaikutusten aikaansaamiseksi pienimmillään kitiinillä 0,01 %:n ja kito-oligosakkaridilla 0,003 %:n konsentraatioissa (Jeon ym. 2001; Fernandes ym. 2008; Benhabiles ym. 2012). Benhabilesin ym. (2012) tutkimuksessa kitiinin pienin mahdollinen inhibitorisia vaikutuksia aikaansaava pitoisuus *E.coli*:lle oli 0,01 %, kitiinin ollessa 338 kDa molekyylipainoltaan. Tässä tutkimuksessa pienimmässä kitiinin pitoisuudessa 0,1 %:ssa ei havaittu kasvua *E.coli*:n näytteissä. Sen takia Benhabilesin ym. tutkimusten kymmenkertaisesti pienempi kitiinipitoisuus on luultavasti lähempänä todellista pienintä mahdollista inhibitorisia vaikutuksia aikaansaavaa konsentraatiota. Vastaavasti Raut ym. (2016) tutkimuksissa ei saavutettu 0,1 % kitiinikonsentraatiolla inhibitoristen vaikutusten aikaansaamiseksi vaadittua vähimmäispitoisuutta. Sen sijaan 0,1 % kitiinikonsentraation todettiin inhiboivan *E.coli*:n lisääntymistä, vähentäen todellista kasvua vain 18,18 % käsittelemättömään verrokkiryhmään verrattuna. Heidän työnsä tulos poikkeaa merkittävästi tässä työssä

saaduista tuloksista, joiden mukaan 0,1 % kitiinikonsentraatio esti *E.coli*:n kasvun täysin. Yksi syy näin suureen eroon tutkimustuloksissa saattaisi olla tässä työssä käytetyn NaOH:in vaikutus, joka saattaa olla käytetyissä pitoisuuksissa haitallinen bakteerien kasvun kannalta. Toisaalta tässä työssä tehdyssä tutkimuksessa, kuten Benhabilesin ym. ja Raut'n ym. tutkimuksissakaan, käytetystä kitiinistä ei ollut valmistajalta saatavissa tietoa molekyyllipainosta, joten tuloksia ei voi varmasti vertailla keskenään.

#### 4.4 Kitiinin sen hajoamistuotteiden fysiologiset vaikutukset ja edellytykset vaikutusten aikaansaannille

Kitiini, kitosaani ja kito-oligosakkaridit voivat alentaa veren kolesterolipitoisuutta toimiessaan ravintokuidun tavoin (Goodman 1989; Shahidi ym. 1999; Gallaher ym. 2000; Ylitalo ym. 2002; Liao ym. 2007; Choi ym. 2012). EU:n komissio on hyväksynyt kitosaanin saantiin liittyvän terveysväitteen, jonka mukaan ruoan jonka avulla kitosaanin päivittäinen saanti on vähintään 3 grammaa, voidaan sanoa edistävän terveyttä, auttamalla ylläpitämään elimistön normaalia LDL-kolesterolitasoa (*low density lipoprotein*) (EU 432/2012 2012). Kolesterolia alentava vaikutus perustuu näiden yhdisteiden kykyyn sitoa itseensä sappinestettä, jonka muodostamiseen tarvitaan kolesterolia. Kitiiniin, kitosaaniin tai kito-oligosakkarideihin sitoutunut sappineste kulkeutuu ulosteen mukana pois elimistöstä, kun sulamattomat yhdisteet eritetään. Elimistön täytyy korvata menetettyä sappinestettä käyttämällä omia kolesterolivarastojaan, jolloin elimistön kolesterolitaso laskee (Kanauchi ym. 1995; Ylitalo ym. 2002). Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden kolesterolia alentavia vaikutuksia on käsitelty tarkemmin liitteessä 2.

Kitiinin hajoamistuotteet, jotka ovat riittävän pieniä yhdisteitä imeytyäkseen, ovat elimistön hyödynnettävissä olevaa ravintoa (Chae ym. 2005; Zeng ym. 2008). Näillä hajoamistuotteilla on lisäksi immuniteettia tehostavia ja allergiareaktioita vähentäviä vaikutuksia. Ne myös parantavat elimistön puolustuskykyä tulehduksia ja patogeenejä vastaan (Reese ym. 2007; van Huis ym. 2013; Bae ym. 2013)(katso liite 3). Leen ym. (2008) ja Muzzarellin (2010) mukaan myös kitiinin vaikutukset edistävät hyvien suolistobakteereiden kasvua, ehkäisevät suoliston tulehduksia ja vaikuttavat patogeenien inhiboinnissa antibioottien tavoin. Näitä terveyttä edistäviä vaikutuksia on havaittu myös tutkimuksissa joissa tuotantoeläimille on syötetty kitiinipitoista ravintoa (katso liite 4). Kitiinillä ja sen hajoamistuotteilla onkin potentiaalia toimia lääketieteellisissä sovelluksissa, esimerkiksi joidenkin sairauksien hoidossa ja ehkäisemisessä (katso liite 5).

Jotta kaikki kitiinin potentiaaliset vaikutukset on mahdollista saada elimistön käyttöön, täytyy kitiiniä pystyä hajottamaan AMCaasin, ja deasetyloimaan etenkin lysotsyymien toimesta. Vaikutukset riippuvat siitä, pystyykö henkilö hajottamaan kitiiniä ja kuinka paljon kitiiniä hajotetaan. Hajotuksen edellytyksinä ovat, riittävät määrät toimivia kitinaasientsyymeitä sekä suolistobakteerien kitiinin hajotustoiminta. Lysotsyymillä on tärkeä merkitys kitiinin deasetylaatiossa, joka mahdollistaa kitosaanin ja kito-oligosakkaridien muodostumisen. Kaikki nämä asiat vaikuttavat siihen, muodostuuko ruoansulatuksessa kito-oligosakkarideja ja kitosaania, jotka voivat imeytyä ja vaikuttaa eri kudoksissa ja elimissä. Koska ihmisillä voidaan tuottaa eri määriä kitiinin hajotukseen kykeneviä entsyymejä, hyönteissyönnin kautta saatavien kitiinin ja sen hajoamistuotteiden vaikutuksia ei voida yksiselitteisesti yleistää koskemaan kaikkia ihmisiä. (Paoletti ym. 2007; Musumeci & Paoletti 2009; Muzzarelli ym. 2012). Ihmiset joilla on vähemmän toimivaa AMCaasi-entsyymiä, eivät siis saa pelkästä raa'asta kitiinistä (syöty hyönteisateria) kaikkia vaikutuksia ainakaan niin vahvoina, kuin sellaiset ihmiset joilla entsyymiä on paljon. Toisaalta jos kitiiniä ei pilkota, vaikutus pelkkänä ravintokuitunakin voi olla ihmisen terveyttä edistävää. Tämän hetkiseen tutkimustietoon pohjautuva hypoteesi AMCaasin kyvystä hajottaa kitiiniä on esitetty liitteessä 6.

Tutkimuksissa, joissa on kerrottu kitiinin tai kitosaanin vaikuttavan jollain tapaa suun kautta nautittuna, voi kyse olla myös kito-oligosakkaridien vaikutuksesta, sillä kitiiniä tai kitosaania on voitu hajottaa ruoansulatuskanavan entsyymien tai suolistobakteereiden toimesta. Sen lisäksi myös kitiinin ja sen hajoamistuotteiden luonnollinen deasetylaatiaoaste vaikuttavat siihen, saadaanko hyönteisruoasta kitosaania ja kito-oligosakkarideja tarpeeksi, jotta terveyttä edistäviä vaikutuksia ilmenee. Koska kitosaania ja kito-oligosakkarideja voi jo luonnollisestikin esiintyä hyönteisissä itsessään (No & Samuel 1995), elimistö pääsee hyödyntämään niitä, jos nämä kitiinin hajoamistuotteet nautitaan hyönteisruoan mukana. Hyönteisravinnosta sellaisenaan saatavat kitosaani- ja kito-oligosakkaridihdisteet vaikuttavat ruoansulatuskanavassa ja voivat altistua vielä entsyymien tai suolistobakteereiden hajotustoiminnalle (Zeng ym. 2008; Aam ym. 2010; Beier & Bertilsson 2013).

#### 4.5 Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden turvallisuus

Artikkeleissa joissa on tutkittu kitiinin ja sen hajoamistuotteiden elintarviketurvallisuutta on todettu, ettei kitosaani ole vaaraksi ihmisille tai eläimille. Kitosaani tai sen hajoamistuotteet eivät ole myrkyllisiä, karsinogeenisiä, tai immunogeenisiä (Wang ym.

2009; Shen ym. 2009). Kokeellisissa altistuksissa kitiinille ja kitosaanille, tai niiden hajoamistuotteille, ei niiden ole havaittu aiheuttavan allergioita tai muita sairauksia. (Muzzarelli 2010).

Vaikka kitiini ei ole allergeeni, toistaiseksi ihmisten jotka ovat allergisia äyriäisille, voidaan olettaa olevan allergisia myös hyönteisille. Äyriäisissä allergisoiva proteiini on niiden lihaskudoksen tropomyosiini, joka on samankaltainen proteiini myös hyönteisissä. Jos kitiini on eristetty ja puhdistettu hyvin, tropomyosiiniä ei kuitenkaan löydy allergiaa aiheuttavia määriä eläinperäisestä kitiinistä (Muzzarelli 2010).

#### 4.6 Kitiinin fysiologisia vaikutuksia on tutkittava lisää

Kasvava kiinnostus hyönteisruokaa kohtaan, sekä elintarvikekäytön sallivat EU:n asetukset viittaavat siihen, että hyönteisruoka tulee yleistymään Suomessa ja muualla Euroopassa. Vaikka hyönteisiä syö jo nyt noin kaksi miljardia ihmistä ympäri maailman, on meidän varmistettava että ruokaturvallisuus on taattu myös hyönteisruoan tehotuotantomenetelmiin siirtyessämme. Hyönteisistä ei vielä tunneta kaikkia syötäväksi sopivia lajeja, eikä varsinaista jalostustyötä parhaiden ravinnoksi kasvatettavien lajien suhteen ole tehty. Syötäväksi sopivien hyönteisten lajikirjosta voitaisiin etsiä kitiinin kaltaisia terveyttä edistäviä bioaktiivisia yhdisteitä tukemaan terveellisiä ruokavaliota. Jotta saisimme parasta mahdollista hyönteisravintoa, olisi tärkeää tutkia kokonaisvaltaisesti ruokahyönteisten kasvutehokkuutta, ravintosisältöä, ja terveysvaikutteita, sekä erityisesti vaikutusten ilmenemistä.

Hyönteisten ottaminen osaksi ruokavaliota avaa uusia kiinnostavia tutkimuskysymyksiä. Mannon ym. (2014) mukaan kitinaasientsyymien teho saattaa olla heikentynyt niillä ihmisillä, joilla hyönteisruoka ei ole ollut perinteinen osa ruokakulttuuria. Voisiko entsyymitoiminta aktivoitua toimimaan tehokkaammin, jos hyönteiset otettaisiin osaksi ruokavaliota? Entä millaisia vaikutuksia ilmenisi esimerkiksi ruoansulatuksen ja ihmisen terveyden suhteen? Esimerkiksi van Huis (2013) oli tutkimuksessaan ehdottanut aktiivisten kitinaasientsyymien, sekä hyönteisten sisältämän kitiinin toimivan suojana patogeenejä ja loisia vastaan, vähentäen myös allergioita ruokakulttuureissa joissa hyönteiset ovat osana normaalia ravitsemusta. Hyönteisravinnon kautta voitaisiin siis saada merkittäviä terveysvaikutuksia kitiinin ja sen hajoamistuotteiden luontaisista antibiootin kaltaisista vaikutuksista. Erilaisten syömistottumusten vaikutusta kitiininhajotuskykyyn ruoansulatuselimistössä tulee tutkia lisää, sillä tämän hetkiset

tutkimukset ihmisen kyvystä hajottaa kitiiniä ovat otannaltaan pieniä eivätkä edusta ihmisten erilaisia ruokatottumuksia kattavasti.

Kitiinin fysiologisiin vaikutuksiin ja sen ruoansulatuksessa tapahtuvaan hajotukseen keskittyviä tutkimuksia on vähän. Kitiinin vaikutusten tutkiminen *in vivo* on ymmärrettävästi hankalampaa, kuin muunlainen kitiinin ja sen hajoamistuotteiden ominaisuuksien määrittely. Useimmissa tutkimuksissa onkin keskitytty kitiinin ja kitosaanin eristämiseen ja niiden lääke-, sekä muuhun hyötykäyttöön tähtääviin sovelluksiin. Liitteessä 7. on esitetty mahdollinen koeasetelma kitiinin vaikutusten tutkimisesta *in vivo*.

Erilaisten valmistustapojen vaikutusta hyönteisruokatuotteiden ravintoaine- ja kitiinipitoisuuksiin ei vielä tunneta. On esimerkiksi tutkittava, miten kuumentaminen, keittämien tai jauhaminen vaikuttavat hyönteisten kitiinikuoreen. Hajoaako kitiini jo jonkinasteisesti tällaisissa käsittelyissä ja onko sitä helpompi sulattaa tämän jälkeen? Jos kitiinin todetaan hajoavan ja jopa deasetyloituvan ruoan valmistusprosesseissa, niin tällöin hyönteisruokatuotteessa olevat kitosaani ja kito-oligosakkaridit voivat vaikuttaa ihmisen elimistössä. Lisäksi, vaikka kitiinin ja sen hajoamistuotteiden ei ole todettu olevan myrkyllisiä, on syytä varmistua, onko olemassa ihmisille haitallista kitiinin määrää jonka hyönteisruoasta voi saada.

Koska AMCaasin tiedetään hajottavan kitiiniä (Paoletti ym. 2007; Musumeci & Paoletti 2009), aikaisempien ravitsemukseen liittyvien kitiinitutkimusten oletuksia ja tuloksia täytyy arvioida uudestaan. Vaikka kaikkia kitiiniä hajottamaan pystyvien entsyymien ominaisuuksia ja vaikutuksia ei vielä tunneta, tarvitaan uutta tutkimusta jossa tarkastellaan kitiiniä ruoansulatuksessa hajoavana yhdisteenä niillä ihmisillä, joilla AMCaasin on havaittu aktiivisesti toimivan. Tällöin tärkeitä tutkimuskysymyksiä ovat esimerkiksi: mitä kitiinille tapahtuu ruoansulatuselimistön eri osissa, mitkä entsyymit ovat vaikuttamassa reaktioihin, sekä minkälaisia lopputuotteita syntyy ja kuinka paljon? Myös deasetylaatio ihmisen ruoansulatuskanavassa on vähän tutkittu aihe kitiinin hajoamiseen liittyvässä tutkimuksessa (Dommett ym. 2005). Siksi tulee myös selvittää, mitkä kaikki entsyymit voivat osallistua kitiinin deasetylaatioon ja mikä on tällöin sen deasetylaatioaste? Deasetyloidun kitiinin hajoamistuotteiden vaikutuksia tulee tarkastella myös erikseen ihmisen elimistölle ja suolistomikrobeille.

Kaikkia kitiinin hajottamiseen pystyviä ihmisen suolistobakteereita tai niiden kitinolyyttisiä entsyymeitä ei ole vielä tunnistettu. Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden

mahdollisen prebioottistatuksen vahvistamiseksi on tehtävä kattava tutkimus kitiinijohdannaisten vaikutuksista suolistomikrobeihin (Vernazza ym. 2005; Dušková ym. 2011). Lisää tutkimusta tarvittaisiin myös kitiinin hajoamistuotteiden ja suolistobakteerien vuorovaikutuksista ja näiden vaikutusten merkityksestä ihmisen terveydelle. Yhteenvedo kitiinin hajotuksen jatkotutkimuksien tärkeimmistä aiheista on esitetty liitteessä 8.

Jatkotutkimuksissa tulee erityisesti kiinnittää huomiota seikkoihin, joiden avulla useampia tutkimuksia on helpompi vertailla keskenään. Esimerkiksi se, että kitiinin, kitosaanin ja kito-oligosakkaridien, sekä kito-oligomeerien välillä ei ole selkeitä rajoja, voi johtaa epätarkkaan raportointiin ja siten vaikuttaa julkaistun tutkimukseen luotettavuuteen. Esimerkiksi kito-oligosakkaridien ketjujen pituudella on paljon merkitystä yhdisteiden fysiologisiin vaikutuksiin.

Lopuksi ehkä tärkein jatkotutkimuksen kohde on mekanismit, joilla kitiini ja sen hajoamistuotteet vaikuttavat elimistöömme. On selvítettävä, mitkä reseptorit aistivat kitiinin hajoamistuotteita ja missä kudoksissa ne sijaitsevat. On tärkeä tietää millaisia signalointireittejä kitiini, kitosaani ja kito-oligosakkaridit aktivoivat soluissa ja miten ne vaikuttavat solujen ja elimistön toimintaan. Kartoittamalla kitiinin ja sen hajoamistuotteiden aikaansaamien vasteiden taustalla olevia mekanismeja, pystytään arvioimaan tarkemmin niiden vaikutuksia ihmisen terveydelle.

## 5 Yhteenvedo

Tulevaisuuden ruoantuotannon tulee olla kestävä kehityksen edellytysten mukaista. Jotta jatkossakin saisimme tuotettua maailman alati kasvavalle väestölle riittävän ravinteikasta ruokaa ilman ilmastonmuutoksen kiihdyttämistä, on ihmisten siirryttävä ympäristöä vähemmän kuluttavampiin proteiinin lähteisiin. YK:n elintarvike- ja maatalousjärjestö FAO:n mukaan hyönteissyönnin avulla voitaisiin edistää kestävä kehityksen tavoitteiden mukaista ruokatuotantoa ja ravitsemusta. Erinomaisen kasvu- ja lisääntymistehokkuutensa ansiosta hyönteiset ovat muita tuotantoeläimiä ekologisempia tuottaa. Nykyiseen lihatuotantoon verrattuna hyönteisten tuottaminen ruoaksi säästäisi energiaa ja vähentäisi kasvihuonekaasupäästöjä sekä kasvatukseen tarvittavan veden ja viljelysmaapinta-alan käyttöä.

Hyönteiset sisältävät rasvaa, proteiineja ja energiaa muihin tuotantoeläimiin verrattavia määriä. Ne sisältävät myös tärkeitä hivenaineita ja vitamiineja sekä kitiiniä, jonka

ansiosta hyönteisruoka on ainut eläinproteiinin lähde josta saa myös ravintokuitua. Hyönteisruoan kautta saatava kitiini ja sen hajoamistuotteet vaikuttavat elimistössä ihmisen terveyttä edistäen. Ne esimerkiksi alentavat veren kolesterolia ja ovat antioksidatiivisia sekä anti-inflammatorisia. Lisäksi ne toimivat myös prebiootteina edistäen hyödyllisten suolistomikrobien kasvua ja vastaavasti ehkäisten haitallisten suolistomikrobien kasvua. Monet suoliston ja ruoansulatuksen ongelmat johtuvat haitallisten suolistobakteerikantojen lisääntyneistä määristä. Näitä haittoja voidaan ehkäistä nauttimalla ravintoa, joka edistää hyödyllisten suolistobakteereiden, kuten maitohappo- ja bifidobakteereiden kasvua.

Saadaksemme nauttimastamme kitiinistä kaikkia mahdollisia terveyttä edistäviä vaikutuksia, täytyy elimistön pystyä hajottamaan kitiiniä riittävän suuriksi määriksi kitosana, kito-oligosakkarideja ja *N*-asetyyli-kito-oligosakkarideja. Vaikutukset ilmenevät myös jos näitä kitiinin hajoamistuotteita saadaan jo hyönteisravinnosta itsestään. Pilkkoutuakseen ruoansulatuskanavassa kitiini tarvitsee AMCaasin, lysosyymin ja suolistobakteereiden hajotustoimintaa. Vaikka kitiiniä ei hajotettaisikaan riittäviä määriä entsyymien tai suolistobakteereiden toimesta, se voi hajottamattomanakin toimia ravintokuituna ja siten edistää suoliston toimintaa ja ihmisen terveyttä. Myös kito-oligosakkaridi- ja kitosaanipartikkelit voivat toimia ravintokuituna ja auttaa ylläpitämään elimistön normaalia kolesterolitasapainoa. Pienikokoiset ja vesiliukoiset kitiinin hajoamistuotteet voivat imeytyä ruoansulatuksesta verenkiertoon ja toimia ravintona.

Se millaisia vasteita kitiini ja sen hajoamistuotteet elimistössämme aiheuttavat riippuu siitä, missä kudoksessa ne vaikuttavat, mikä vaikuttava yhdiste on kyseessä (kitiini, kitosaani, kito-oligosakkaridit), miten pitkäketjuinen tai deasetyloitunut molekyyli on kyseessä, sekä siitä kuinka paljon vaikuttavaa yhdistettä on. Imeytyvillä yhdisteillä saattaa olla erilaisia vaikutuksia elimistössä kuin imeytymättömillä. Molemmissa tapauksissa vaikutukset voivat kuitenkin olla elimistölle merkittävällä tavalla hyödyllisiä.

Tässä tutkimuksessa kito-oligosakkaridin havaittiin toimivan prebiootin tavoin, edistäen maitohappobakteeri *Lactobacillus rhamnosus* GG:n kasvua ja ehkäisten kolibakteeri *Escherichia coli* TG:n kasvua. Hyönteisruoan mukana nautittu kito-oligosakkaridi voi siis auttaa ylläpitämään tasapainoista ja ihmisen terveyden kannalta suotuisaa suolistobakteerikantaa. Kitiinin puolestaan havaittiin estävän sekä maitohappobakteerien että kolibakteerien kasvua. Tutkimus tuo uutta tietoa kitiiniyhdisteiden antibakteerisista vaikutuksista, mitä voidaan soveltaa hyönteisravintoon liittyvissä tutkimuksissa tai elintarviketeollisuuden sovelluksissa.

## Kiitokset

Haluan kiittää dosentti Tomi Strengiä hyvästä ohjauksesta, tohtori Carlos Gómez-Gallegoa ymmärtämisestä kielimuurista huolimatta, professori Seppo Salmista ja Turun Yliopiston Funktionaalisten elintarvikkeiden kehittämiskeskusta työn mahdollistamisesta, sekä erityisesti Jaakko Korpelaa kaikesta avusta ja upeasta mahdollisuudesta olla osana Hyönteiset ruokaketjussa -projektia. Iso kiitos myös perheelleni sekä Tuulille kaikesta saamastani tuesta.



## Kirjallisuus

Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sørli M, Vårum KM, ja Eijssink VGH. 2010. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Marine Drugs* 8, 1482-1517.

Altamimi M, Abdelhay O, ja Rastall RA. 2016. Effect of oligosaccharides on the adhesion of gut bacteria to human HT-29 cells. *Anaerobe* 39, 136-142.

Alvarenga ESL, Mansur JF, Justi SA, Figueira-Mansur J, dos Santos VM, Lopez SG, Masuda H, Lara FA, Melo ACA, ja Moreira MF. 2016. Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 69, 61-70.

Andersen S. 1979. Biochemistry of Insect Cuticle. *Annu. Rev. Entomol.* 24, 29-61.

Apata DF. 2009. Antibiotic Resistance in Poultry. *International Journal of Poultry Science* 8, 404.

Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, Galed G, ja Heras A. 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology* 3, 203-230.

Arbia W, Arbia L, Adour L, ja Amra A. 2013. Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods - A Review. *Food Technology & Biotechnology* 51, 12-25.

Austin P, Brine C, Castle J, ja Zikakis J. 1981. Chitin: New facets of research. *Science* 212, 749-753.

Bae M, Shin HS, Kim E, Kim J, ja Shon D. 2013. Oral administration of chitin and chitosan prevents peanut-induced anaphylaxis in a murine food allergy model. *Int. J. Biol. Macromol.* 61, 164-168.

József Baranyi & Daniel Marin. DMFit. <http://browser.combase.cc/DMFit.aspx> Päivitetty 2017 03/2017 Avattu 2017 03/20

Barker D, Fitzpatrick MP, ja Dierenfeld ES. 1998. Nutrient composition of selected whole invertebrates. *Zoo Biol.* 17, 123-134.

Beier S & Bertilsson S. 2013. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology* 4, 149.

Benhabiles MS, Salah R, Lounici H, Drouiche N, Goosen MFA, ja Mameri N. 2012. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocoll.* 29, 48-56.

Boot RG, Blommaert EFC, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, Place A, ja Aerts JMFG. 2001. Identification of a Novel Acidic Mammalian Chitinase Distinct from Chitotriosidase. *J. Biol. Chem.* 276, 6770-6778.

Boot RG, Bussink AP, Verhoek M, de Boer PAJ, Moorman AFM, ja Aerts JMFG. 2005. Marked Differences in Tissue-specific Expression of Chitinases in Mouse and Man. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 53, 1283-1292.

Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Blik J, de Meulemeester TMAMO, Mannens MMAM, ja Aerts JMFG. 1998. The Human Chitotriosidase Gene: Nature of inherited enzyme deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 273, 25680-25685.

Borderías AJ, Sánchez-Alonso I, ja Pérez-Mateos M. 2005. New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 458-465.

Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, ja Dumas M. 2016. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine* 8, 42.

Brinchmann BC, Bayat M, Brogger T, Muttuvelu DV, Tjønneland A, ja Sigsgaard T. 2011. A possible role of chitin in the pathogenesis of asthma and allergy. *Ann. Agric. Environ. Med.* 18, 7-12.

Bueter CL, Lee CK, Wang JP, Ostroff GR, Specht CA, ja Levitz SM. 2014. Spectrum and Mechanisms of Inflammasome Activation by Chitosan. *The Journal of Immunology* 192, 5943-5951.

Bueter CL, Specht CA, ja Levitz SM. 2013. Innate Sensing of Chitin and Chitosan. *PLoS Pathog* 9, e1003080.

Candy DJ & Kilby BA. 1962. Studies on Chitin Synthesis in the Desert Locust. *J. Exp. Biol.* 39, 129-140.

Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, ja Ringel Y. 2012. Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 521-+.

Chae SY, Jang M, ja Nah J. 2005. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. *J. Controlled Release* 102, 383-394.

Chandran R, Williams L, Hung A, Nowlin K, ja LaJeunesse D. 2016. SEM characterization of anatomical variation in chitin organization in insect and arthropod cuticles. *Micron* 82, 74-85.

Choi CR, Kim EK, Kim YS, Je JY, An SH, Lee JD, Wang JH, Ki SS, Jeon BT, Moon SH, ja Park PJ. 2012. Chitooligosaccharides decreases plasma lipid levels in healthy men. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 63, 103-106.

Clifford CW, Roe RM, ja Woodring JP. 1977. Rearing Methods for Obtaining House Crickets, *Acheta domesticus*, of Known Age, Sex, and Instar. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70, 69-74.

Cozzarini E, Bellin M, Norberto L, Polese L, Musumeci S, Lanfranchi G, ja Paoletti MG. 2009. CHIT1 and AMCase expression in human gastric mucosa: Correlation with inflammation and *Helicobacter pylori* infection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 1119-1126.

Cutting SM. 2011. Bacillus probiotics. *Food Microbiol.* 28, 214-220.

Dobson DE, Prager EM, ja Wilson AC. 1984. Stomach lysosomes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 259, 11607-11616.

Dommett R, Zilbauer M, George JT, ja Bajaj-Elliott M. 2005. Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. *Mol. Immunol.* 42, 903-912.

Duřková J, Tishchenko G, Ponomareva E, Šimůnek J, Koppová I, Skálová T, Štěpánková A, ja Yumin D. 2011. Chitinolytic enzymes from bacterium inhabiting human gastrointestinal tract -

critical parameters of protein isolation from anaerobic culture. *Acta Biochimica Polonica* 58, 261-263.

Dutta J, Tripathi S, ja Dutta PK. 2012. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Revista De Agaroquimica Y Tecnologia De Alimentos* 18, 3-34.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, ja Relman DA. 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308, 1635-1638.

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. Hyönteiset elintarvikkeina. <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/valmistus-ja-myynti/yhteiset-koostumusvaatimukset/uuselintarvikkeet/hyonteiset-elintarvikkeina/> Päivitetty 2016a 5/13 Avattu 2017 6/6

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. Ruokamyrkytyksiä aiheuttavia bakteereja. <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/> Päivitetty 2016b 3/31 Avattu 2017 4/3

EU 2283/2015. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EU) 2015/2283 uusielintarvikkeista. 2015 L 327/22, *Euroopan unionin virallinen lehti*. Strasbourg.

EU 432/2012. Komission asetus (EU) 432/2012 muiden kuin sairauden riskin vähentämiseen ja lasten kehitykseen ja terveyteen viittaavien elintarvikkeita koskevien sallittujen terveystuotteiden luettelosta. 2012 L 136/1, *Euroopan unionin virallinen lehti*. Bryssel.

EU 76/2011. Komission päätös *Aspergillus nigeristä* saatavan kitiiniglukaanin markkinoille saattamisen sallimisesta elintarvikkeiden uutena ainesosana Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) No 258/97 mukaisesti (2011/76/EU). 2011 L 29/34, *Euroopan unionin virallinen lehti*. Bryssel.

Fei Liu X, Lin Guan Y, Zhi Yang D, Li Z, ja De Yao K. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci* 79, 1324-1335.

Fernandes JC, Tavaría FK, Soares JC, Ramos ÓS, João Monteiro M, Pintado ME, ja Xavier Malcata F. 2008. Antimicrobial effects of chitosans and chitoooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiol.* 25, 922-928.

Finke MD. 2007. Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biol.* 26, 105-115.

Finke MD. 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol.* 21, 269-285.

Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, ja White BA. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Micro* 6, 121-131.

Fogelholm M, Hakala P, Kara R, Kiuru S, Kurppa S, Kuusipalo H, Laitinen J, Marniemi A, Misikangas M, Roos Eym. 2014 Terveyttä ruoasta - Suomalaiset ravitsemussuosittelut 2014.

Gallaher CM, Munion J, Hesslink R, Wise J, ja Gallaher DD. 2000. Cholesterol Reduction by Glucomannan and Chitosan Is Mediated by Changes in Cholesterol Absorption and Bile Acid and Fat Excretion in Rats. *The Journal of Nutrition* 130, 2753-2759.

- Geyer G. 1973. Lysozyme in Paneth cell secretions. *Acta Histochem.* 45, 126-132.
- Gibson GR & Roberfroid MB. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition* 125, 1401-1412.
- Gibson G, Probert H, Van Loo J, Rastall R, ja Roberfroid M. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17, 259-275.
- Gonil P & Sajomsang W. 2012. Applications of magnetic resonance spectroscopy to chitin from insect cuticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 514-522.
- Goodman WG. 1989. Chitin. a magic bullet? *The Food Insects Newsletters* 2, 1-6-7.
- Gorbach VI, Krasikova IN, Luk'yanov PA, Loenko YN, Solov'eva TF, Ovodov YS, Deev VV, ja Pimenov AA. 1994. New glycolipids (chitooligosaccharide derivatives) possessing immunostimulating and antitumor activities. *Carbohydr. Res.* 260, 73-82.
- Goycoolea FM, Argüelles-Monal W, Peniche C, ja Higuera-Ciapara I. 2000. Chitin and chitosan. *Developments in Food Science* 41, 265-308.
- Hackman RH & Goldberg M. 1958. Proteins of the larval cuticle of *Agrianome spinicollis* (Coleoptera). *J. Insect Physiol.* 2, 221-231.
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, ja Javed S. 2012. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 5, 21-29.
- Hayashi K, Fujimoto N, Kugimiya M, ja Funatsu M. 1969. The Enzyme-Substrate Complex of Lysozyme with Chitin Derivatives. *Journal of Biochemistry* 65, 401-405.
- Hayashi K & Ito M. 2002. Antidiabetic Action of Low Molecular Weight Chitosan in Genetically Obese Diabetic KK-A<sup>y</sup> Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25, 188-192.
- Hock CW. 1940. Decomposition of Chitin by Marine Bacteria. *Biol. Bull.* 79, 199-206.
- Horie H, Kanazawa K, Okada M, Narushima S, Itoh K, ja Terada A. 1999. Effects of intestinal bacteria on the development of colonic neoplasm: an experimental study. *Eur. J. Cancer Prev.* 8, 237-245.
- Je J & Kim S. 2006. Chitosan Derivatives Killed Bacteria by Disrupting the Outer and Inner Membrane. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6629-6633.
- Jeon Y, Park P, ja Kim S. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr. Polym.* 44, 71-76.
- Jolles P & Muzzarelli RAA. (1999). Chitin and chitinases (Basel: Birkhäuser).
- Kanauchi O, Deuchi K, Imasato Y, Shizukuishi M, ja Kobayashi E. 1995. Mechanism for the inhibition of fat digestion by chitosan and for the synergistic effect of ascorbate. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59, 786-790.
- Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A, ja Mizoguchi E. 2007. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J. Med.* 56, 21-27.

- Kendra DF, Christian D, ja Hadwiger LA. 1989. Chitosan oligomers from *Fusarium solani*/pea interactions, chitinase/ $\beta$ -glucanase digestion of sporelings and from fungal wall chitin actively inhibit fungal growth and enhance disease resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35, 215-230.
- Khempaka S, Chitsatchapong C, ja Molee W. 2011. Effect of chitin and protein constituents in shrimp head meal on growth performance, nutrient digestibility, intestinal microbial populations, volatile fatty acids, and ammonia production in broilers. *The Journal of Applied Poultry Research* 20, 1-11.
- Kim HM, Hong SH, Yoo SJ, Baek KS, Jeon YJ, ja Choung SY. 2006. Differential effects of chitooligosaccharides on serum cytokine levels in aged subjects. *J. Med. Food* 9, 427-430.
- Klockars M & Reitamo S. 1975. Tissue distribution of lysozyme in man. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 23, 932-940.
- Kogiso M, Nishiyama A, Shinohara T, Nakamura M, Mizoguchi E, Misawa Y, Guinet E, Nouri-Shirazi M, Dorey CK, Henriksen RA, ja Shibata Y. 2011. Chitin particles induce size-dependent but carbohydrate-independent innate eosinophilia. *Journal of Leukocyte Biology* 90, 167-176.
- Kono M, Takashi M, ja Chiaki S. 1987. Effect of chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. *Nihon-Suisan-Gakkai-Shi* 53, 125-129.
- Kramer KJ, Hopkins TL, ja Schaefer J. 1995. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 1067-1080.
- Lee CG, Da Silva CA, Lee J, Hartl D, ja Elias JA. 2008. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 684-689.
- Lee HW, Park YS, Choi JW, Yi SY, ja Shin WS. 2003. Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1100-1103.
- Lee H, Park Y, Jung J, ja Shin W. 2002. Chitosan oligosaccharides, dp 2–8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe* 8, 319-324.
- Li G, Du Y, Tao Y, Liu Y, Li S, Hu X, ja Yang J. 2010. Dilute solution properties of four natural chitin in NaOH/urea aqueous system. *Carbohydr. Polym.* 80, 970-976.
- Liao F, Shieh M, Chang N, ja Chien Y. 2007. Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients. *Nutr. Res.* 27, 146-151.
- Louis P & Flint HJ. 2017. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* 19, 29-41.
- Luo Y, Deng L, Deng Q, ja Wen L. 2016 In press. Comparative study of the chitooligosaccharides effect on the proliferation inhibition and radiosensitization of three types of human gastric cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*
- Macfarlane GT & Macfarlane S. 2012. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *J. AOAC Int.* 95, 50-60.
- Manno N, Sherratt S, Boaretto F, Coico FM, Camus CE, Campos CJ, Musumeci S, Battisti A, Quinnell RJ, León JM, *ym.* 2014. High prevalence of chitotriosidase deficiency in Peruvian

- Amerindians exposed to chitin-bearing food and enteroparasites. *Carbohydr. Polym.* 113, 607-614.
- Mateos-Aparicio I, Mengibar M, ja Heras A. 2016. Effect of chito-oligosaccharides over human faecal microbiota during fermentation in batch cultures. *Carbohydr. Polym.* 137, 617-624.
- Montero C & Erlandsen SL. 1978. Immunocytochemical and histochemical studies on intestinal epithelial cells producing both lysozyme and mucosubstance. *Anat. Rec.* 190, 127-141.
- Mourya VK, Inamdar NN, ja Choudhari YM. 2011. Chitoooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications. *Polymer Science Series A* 53, 583-612.
- Muanprasat C, Wongkrasant P, Satitsri S, Moonwiriyaakit A, Pongkorpsakol P, Mattaveewong T, Pichyangkura R, ja Chatsudthipong V. 2015. Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: Mechanism of action and potential applications in intestinal disorders. *Biochem. Pharmacol.* 96, 225-236.
- Musumeci, S., and Paoletti, M.G. (2009). Role of chitinases in human stomach for chitin digestion: AMCase in the gastric digestion of chitin and chit in gastric pathologies. In Binomium Chitin-Chitinase: Recent Issues, Musumeci, S., and Paoletti, M.G. eds. (New York: Nova Biomedical Books), pp. 339-358.
- Muzzarelli ARA. 1997. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 53, 131-140.
- Muzzarelli RAA. 2010. Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers. *Marine Drugs* 8, 292-312.
- Muzzarelli RAA, Boudrant J, Meyer D, Manno N, DeMarchis M, ja Paoletti MG. 2012. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydr. Polym.* 87, 995-1012.
- Nagatani K, Chen CC, Kawada M, Arihiro A, Iweala OI, Matharu KS, Nagler CR, ja Mizoguchi E. 2008. 739 Oral Chitin Administration Ameliorates Chronic Colitis in TCR $\alpha$  Knockout Mice By Upregulating IFN $\gamma$ -Production and Downregulating Chitinase 3-Like-1 Expression in Mucosal Tissues. *Gastroenterology* 134, A-106.
- Nam KS, Kim MK, ja Shon YH. 2007. Inhibition of proinflammatory cytokine-induced invasiveness of HT-29 cells by chitosan oligosaccharide. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 2042-2045.
- Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Saiki I, Tokura S, ja Azuma I. 1984. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* 2, 93-99.
- No HK & Samuel P. 1995. Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan—A Review. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 4, 27-52.
- No HK, Young Park N, Ho Lee S, ja Meyers SP. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 65-72.
- Ohno M, Kimura M, Miyazaki H, Okawa K, Onuki R, Nemoto C, Tabata E, Wakita S, Kashimura A, Sakaguchi M, *ym.* 2016. Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system. *Scientific Reports* 6, 37756.

- Okutani K & Kitada H. 1968. Studies on Chitin-decomposing Bacteria Present in the Digestive Tract of Aquatic Animals-III; Formation of Organic Acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 34, 1141-1146.
- Oonincx DGAB & Dierenfeld ES. 2012. An Investigation Into the Chemical Composition of Alternative Invertebrate Prey. *Zoo Biol.* 31, 40-54.
- Oonincx DGAB, van Itterbeeck J, Heetkamp MJW, van dB, van Loon, Joop J. A., ja van Huis A. 2011. An Exploration on Greenhouse Gas and Ammonia Production by Insect Species Suitable for Animal or Human Consumption. *Plos One* 5, e14445.
- Ormrod DJ, Holmes CC, ja Miller TE. 1998. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 138, 329-334.
- Pae H, Seo W, Kim N, Oh G, Kim G, Kim Y, Kwak H, Yun Y, Jun C, ja Chung H. 2001. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. *Leuk. Res.* 25, 339-346.
- Pangburn SH, Trescony PV, ja Heller J. 1982. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials* 3, 105-108.
- Paoletti MG, Norberto L, Damini R, ja Musumeci S. 2007. Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin. *Annals of Nutrition and Metabolism* 51, 244.
- Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santin M, Ambrosio L, Calabro D, Avallone B, ja Balsamo G. 1994. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 15, 1215-1220.
- Popkin BM. 1993. Nutritional patterns and transitions. *Population & Development Review* 19, 138-157.
- Qin C, Li H, Xiao Q, Liu Y, Zhu J, ja Du Y. 2006. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydr. Polym.* 63, 367-374.
- Quigley EMM. 2013. Gut Bacteria in Health and Disease. *Gastroenterology & Hepatology* 9, 560-569.
- Raafat D, von Bargen K, Haas A, ja Sahl H. 2008. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3764-3773.
- Rabea EI, Badawy ME-, Stevens CV, Smagghe G, ja Steurbaut W. 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules* 4, 1457-1465.
- Ramos-Elorduy J. 1997. Insects: A sustainable source of food? - *Ecology of Food and Nutrition* 36, 247.
- Raut AV, Satvekar RK, Rohiwal SS, Tiwari AP, Gnanamani A, Pushpavanam S, Nanaware SG, ja Pawar SH. 2016. In vitro biocompatibility and antimicrobial activity of chitin monomer obtain from hollow fiber membrane. *Designed Monomers and Polymers* 19, 445-455.
- Reese TA, Liang H, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, ja Locksley RM. 2007. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 447, 92-96.

- Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges JP, Pires E, Chaves P, ja Correia IJ. 2009. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen.* 17, 817-824.
- Ringø E, Zhou Z, Olsen RE, ja Song SK. 2012. Use of chitin and krill in aquaculture - the effect on gut microbiota and the immune system: a review. *Aquaculture Nutrition* 18, 117-131.
- Rumpold BA & Schlüter OK. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research* 57, 802-823.
- Salminen S, Isolauri E, ja Onnela T. 1995. Gut Flora in Normal and Disordered States. *Chemotherapy* 41, 5-15.
- Sartor RB & Mazmanian SK. 2012. Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol Suppl* 1, 15-21.
- Seibold MA, Reese TA, Choudhry S, Salam MT, Beckman K, Eng C, Atakilit A, Meade K, Lenoir M, Watson HG, *ym*. 2009. Differential Enzymatic Activity of Common Haplotypic Versions of the Human Acidic Mammalian Chitinase Protein. *Journal of Biological Chemistry* 284, 19650-19658.
- Shahidi F, Arachchi JKV, ja Jeon Y. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 37-51.
- Shen K, Chen M, Chan H, Jeng J, ja Wang Y. 2009. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1864-1871.
- Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, ja Hutkins RW. 2006. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic Escherichia coli to tissue culture cells. *Infect. Immun.* 74, 6920-6928.
- Silhavy TJ, Kahne D, ja Walker S. 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a000414.
- Šimunek J, Kopečný J, Hodrová B, ja Bartonová H. 2002. Identification and characterization of Clostridium paraputrificum, a chitinolytic bacterium of human digestive tract. *Folia Microbiol.* 47, 559-564.
- Skujins J, Pukite A, ja McLaren AD. 1973. Adsorption and reactions of chitinase and lysozyme on chitin. *Mol. Cell. Biochem.* 2, 221-228.
- Smil V. 2002. Worldwide transformation of diets, burdens of meat production and opportunities for novel food proteins. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 305-311.
- Steer T, Carpenter H, Tuohy K, ja Gibson G. 2000. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 13, 229-254.
- Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu X, Kubo C, ja Koga Y. 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol. (Lond. )* 558, 263-275.
- Terada A, Hara H, Sato D, Higashi T, Nakayama S, Tsuji K, Sakamoto K, Ishioka E, Maezaki Y, Tsugita T, Takekawa T, ja Mitsuoka T. 1995. Effect of Dietary Chitosan on Faecal Microbiota and Faecal Metabolites of Humans. *Microbial Ecology in Health and Disease* 8, 15-21.



- Tomida H, Fujii T, Furutani N, Michihara A, Yasufuku T, Akasaki K, Maruyama T, Otagiri M, Gebicki JM, ja Anraku M. 2009. Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. *Carbohydr. Res.* 344, 1690-1696.
- Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, ja Bouriotis V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 18, 305-312.
- van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, ja Vantomme P. (2013). Edible insects. Future prospects for food and feed security (Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations).
- van Huis A. 2013. Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 563-583.
- Vernazza CL, Gibson GR, ja Rastall RA. 2005. In vitro fermentation of chitosan derivatives by mixed cultures of human faecal bacteria. *Carbohydr. Polym.* 60, 539-545.
- Wang M, Xie Y, Zheng Q, ja Yao S. 2009. A Novel, Potential Microflora-Activated Carrier for a Colon-Specific Drug Delivery System and Its Characteristics. *Ind Eng Chem Res* 48, 5276-5284.
- Wexler HM. 2007. Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 593-621.
- White BA, Lamed R, Bayer EA, ja Flint HJ. 2014. Biomass Utilization by Gut Microbiomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 279-296.
- Yang Eun-Jin, Kim Jong-Gwan, Kim Ji-Young, Seong K, Nam L, ja Hyun Chang-Gu. 2010. Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW 264.7 cells. *Open Life Sciences* 5, 95-102.
- Yi L, Lakemond CMM, Sagis LMC, Eisner-Schadler V, van Huis A, ja van Boekel MAJS. 2013. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chem.* 141, 3341-3348.
- Ylitalo R, Lehtinen S, Wuolijoki E, Ylitalo P, ja Lehtimäki T. 2002. Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittelforschung* 52, 1-7.
- Zeng L, Qin C, Wang W, Chi W, ja Li W. 2008. Absorption and distribution of chitosan in mice after oral administration. *Carbohydr. Polym.* 71, 435-440.
- Zheng L & Zhu J. 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr. Polym.* 54, 527-530.
- Zottola E & Smith L. 1990. The Microbiology of Foodborne Disease Outbreaks - an Update. *J. Food Saf.* 11, 13-29.

## Liitteet

### Liite 1. Hyönteisten kitiinipitoisuus

Alla on lueteltu muutamien syötäväksi sopivien hyönteisten sisältämiä ADF-pitoisuuksia (mg/g), sekä sen perusteella laskettuja arvioita kyseisten hyönteisten kitiinipitoisuudesta (mg/kg) (Finke 2002; Finke 2007). Lisäksi, jos oletetaan että kitiinin määrä ei muutu kun kokonaisista hyönteisistä valmistetaan hyönteisruokatuote, selvennyksen vuoksi on myös ilmoitettu kitiinin osuus 100 gramman ruokatuotteessa (g/100g).

- Aikuiset kotisirkat (*Acheta domestica*) ADF: 26 mg/g.  
Kitiiniä: 21,5 mg/kg. Tuotteessa kitiiniä: 2,15 g/100g
- Jauhopukin toukat (*Tenebrio molitor*) ADF: 23 mg/g.  
Kitiiniä: 19,6 mg/kg. Tuotteessa kitiiniä: 1,96 g/100g
- Isovahakoisan toukat (*Galleria mellonella*) ADF: 21 mg/g.  
Kitiiniä: 15,8 mg/kg. Tuotteessa kitiiniä: 1,58 g/100g
- Mulperiperhosen, eli silkkiperhosen toukat (*Bombyx mori*) ADF: 9 mg/g.  
Kitiiniä: 8,4 mg/kg. Tuotteessa kitiiniä: 0,84 g/100g

## Liite 2. Kitiinin kolesterolia alentava vaikutus

Kito-oligosakkaridien, kitosaanin ja kitiinin on todettu alentavan veren kokonaiskolesterolipitoisuutta ja laskevan LDL-kolesterolin määrää. Ne sitovat itseensä kolesterolia sisältävää sappinestettä ennen poistumistaan ulosteen mukana elimistöstä (Goodman 1989; Gallaher ym. 2000; Ylitalo ym. 2002; Choi ym. 2012). Kolesterolia alentava vaikutus riippuu kitiiniyhdisteiden pituudesta (monestako toisiinsa linkittyneestä GlcNac- yksiköstä ne koostuvat) ja niiden sisältämistä varauksellisista ryhmistä (Chae ym. 2005; Borderías ym. 2005)

Tutkimuksessaan Choi ym. (2012) kokeilivat kito-oligosakkaridien vaikutusta ihmiseen suun kautta nautittuna, kuuden viikon ajan, kaksi kerta päivässä 0,5 gramman annoksina ennen ruokailua. He tulivat siihen tulokseen, että kito-oligosakkaridit voivat toimia ravintolisänä ja auttaa veren kolesterolin hallinnassa, sillä kito-oligosakkaridien nauttiminen ruokailun yhteydessä alensi merkittävästi veren kolesterolipitoisuutta. Koehenkilöiden kokonaiskolesterolipitoisuuden mitattu perustaso oli ennen tutkimusta 139,58 mg/dl ( $\pm$  28,59 SD), mutta kito-oligosakkaridien vaikutuksesta se laski tasolle 93,47 mg/dl ( $\pm$  25,91 SD).

Myös kitosaanin on todettu alentavan kolesterolia. Liao ym. (2007) huomasivat kitosaanin alentavan veren kolesterolipitoisuutta tutkimuksessaan, jossa he antoivat koehenkilöille kitosaania kahdeksan viikon ajan. Sekä vesiliukoinen, että veteen liukenematon kitosaani alensivat veren kolesterolipitoisuuksia. Lisäksi tutkijat totesivat, että nautitulla kitosaanilla ei ollut vaikutusta kalsiumin, magnesiumin ja raudan saantiin, vaan niiden tasot pysyivät normaaleina. Myös Ormrodin ym. (1998) hiirillä tehdyssä kokeessa tutkijat ehdottivat, että kitosaani on ravinnosta saatava aine, jolla voi olla valtimonkovettumatautia ehkäiseviä vaikutuksia.

### Liite 3. Kitiinin vaikutus immunitettiin

Kitiinin, kitosaanin ja kito-oligosakkaridien on todettu omaavan ominaisuuksia, jotka voivat tehostaa ihmisen immunitteettivasteita, (Goodman 1989; Reese ym. 2007; Lee ym. 2008; Muzzarelli 2010; van Huis ym. 2013). Kitiinin GlcNAc-yksiköt ja kito-oligosakkaridit omaavat anti-inflammatorisia ominaisuuksia, sekä terveyttä edistäviä soluvälitteistä immunitteettia tehostavia vaikutuksia (Nishimura ym. 1984; Yang Eun-Jin ym. 2010).

Kito-oligosakkaridien on todettu olevan tehokkaita esimerkiksi kroonisen paksusuolen tulehdustaudin (*chronic colitis*) hoidossa, sekä paksusuolen syövän ehkäisemisessä. Hyönteissyönnin kannalta oleellista on, että vaikutukset ilmenivät myös kun kito-oligosakkaridia oli nautittu suun kautta (Kim ym. 2006; Nagatani ym. 2008; Hamid ym. 2012; Muanprasat ym. 2015). Kitosaanin GlcNAc-yksiköiden todettiin myös stimuloivan vatsakalvon makrofageja tuottamaan typpioksidia, jolla voi olla merkittävä vaikutus syöpäsolujen tuhoamiseen, sekä haavakudosten korjaamiseen liittyen (Peluso ym. 1994). Ribeiron ym. (2009) tutkimuksessa tutkijat loivat uudenlaisen kitosaanigeelin, jonka he totesivat olevan potentiaalinen aine haavakudoksen paranemisen edistämiseen.

Kitiinin ja sen johdannaisten aineiden aiheuttamat mahdolliset immuunivasteet riippuvat lähinnä siitä, miten suuria molekyyliä ne ovat (Kogiso ym. 2011). Suurikokoisten kitosaanimolekyylien (>70  $\mu\text{m}$ ) ei ole todettu juurikaan vaikuttavan immuunivasteeseen, mutta keskikokoiset (40-70  $\mu\text{m}$ ) stimuloivat tulehdusreaktioita. Pienikokoisten kitosaanimolekyylien (<40  $\mu\text{m}$ , yleensä 2-10  $\mu\text{m}$ ) on puolestaan havaittu saavan aikaan anti-inflammatorisia vasteita. Se miten paljon kitiiniä pystytään hajottamaan ruoansulatuksessa saattaa siis vaikuttaa immuunipuolustukseenkin. Voi myös olla että kitiinin hajotusprosessit ovat osa ihmisen luonnollista immunitteettia. Tutkimuksesta riippuen kitiinin vaikutuksia tutkittaessa on painotettu molekyylipainon, koon, depolymerisaation ja deasetylaation merkitystä havaittaviin vaikutuksiin (Kawada ym. 2007; Lee ym. 2008; Bueter ym. 2013; Bueter ym. 2014).

Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden vaikutuksesta immuunireaktioihin on paljon ristiriitaistakin tutkimusta. Joidenkin tutkijoiden mielestä kitiini ja sen johdannaiset saavat aikaan elimistön puolustusreaktioiden aktivoitumista, tulehdusreaktioita ja yliherkkyysoireita. Kaikki tutkimukset tulehdusreaktioista eivät kuitenkaan liity nimenomaan ravinnosta saatavan kitiinin ja sen hajoamistuotteiden aikaansaamiin vaikutuksiin (Brinchmann ym. 2011).

#### Liite 4. Kitiini tuotantoeläinten rehussa

Kitiinin vaikutuksia tuotantoeläimiin on myös tutkittu. Tutkimusten perusteella kitiinin ja sen hajoamistuotteiden vaikutukset tuotantoeläimiin ovat hyvin samankaltaisia kuin ihmisiinkin. Shahidin ym. (1999) tutkimuksessa rehuun lisätty kitiini edisti *Bifidobacterium*-lajien kasvua kanojen suolistossa, estäen muiden haitallisten suolistomikrobien kasvua. Tutkimuksessaan Khempaka ym. (2011) totesivat kanoille syötetyn kitiiniä sisältävän katkarapuravintolisän edistävän suolistomikrobi *Lactobacillus*:ten kasvua. Samalla kanojen suoliston *E. coli* -kannat pienenevät ja niiden ulosteesta löytyi vähemmän *Salmonella*:a. Koska kitiinin on huomattu mahdollisesti edistävän kanoilla immuunipuolustuksen toimintaa, se voi olla hyvä vaihtoehto tuotantoeläimille annettaville antibiooteille (van Huis 2013). Näin voidaan ehkäistä ja vähentää antibiooteille resistenttien bakteerikantojen muodostumista (Apata 2009).

Myös useiden kalalajien on todettu hyötyvän kitiinistä, sen tehostaessa makrofagien, neutrofiilien, ja lysosyymien toimintaa, sekä immuunipuolustuksen komplementtijärjestelmää ja lisäten vastustuskykyä taudeille (Ringø ym. 2012). Kitiinin todettiin myös lisäävän kalojen kasvua tutkimuksessa, jossa Kono ym. (1987) ruokkivat kaloja kitiinipitoisella rehulla. Vertailun kohteena oli kolme japanilaista kalalajia, joista määritettiin myös kitinaasientsyymien aktiivisuutta. Tutkijat huomasivat, että 10 % kitiiniä sisältävää rehua syöneet kalat kasvoivat eniten. Kasvun todettiin olevan suhteellista riippuen kalojen ruoansulatuskanavan kitinaasientsyymien aktiivisuudesta.

## Liite 5. Kitiinin mahdollisuudet lääkekäytössä ja lääketieteellisyydessä

Kitiinistä ja sen hajoamistuotteista on muokkaamalla tehty jo pitkään yhdisteitä, joilla on antitumorisia ja immuniteettia vahvistavia vaikutuksia. Kito-oligosakkaridit sopivat hyvin lääketieteellisiin sovelluksiin niiden fysiologisten ominaisuuksien, kuten vesiliukoisuuden, helpon imeytyvyyden ja vähäisen myrkyllisyyden takia.

### *Diabeteksen hoito*

Rotilla tehdyssä ruokintakokeessa todettiin, että kito-oligosakkarideilla on mahdollisesti glukoositoleranssia ja insuliinin eritystä parantavia vaikutuksia, mitkä voivat auttaa diabeteksen hoidossa (Lee ym. 2003). Erityisesti pienimolekyylipainoisista kitosaaneista saattaa olla hyötyä 2-tyyppin diabeteksen hoidossa (Hayashi & Ito 2002).

### *Antioksidatiivisuus*

Kitosaanin on todettu olevan erinomainen antioksidantti. Varsinkin molekyylipainoltaan pienet kitosaanit ovat osoittautuneet tehokkaiksi happiradikaalien estäjiksi (Tomida ym. 2009).

### *Astma ja Th2-välitteiset allergiat*

Pienten kitiinipartikkelien on todettu vähentävän Th2-välitteisiä allergiareaktioita hiirillä tehdyissä kokeissa. Useimmiten näissä kokeissa on testattu kitiinin anti-inflammatorista vaikutusta hengitysteitse, mutta pienillä kitiinipartikkeleilla voi olla kiinnostavia lääkevaikutuksia muuallakin kehossa tulehdusten estäjinä. Pienet kitiinipartikkelit voivat ehkä olla tulevaisuudessa astman, sekä muiden Th2-välitteisten inflammaatioiden hoitoon soveltuvia aineita. (Muzzarelli 2010; Brinchmann ym. 2011)

Kitiini saattaa ehkäistä pähkinäallergiasta johtuvia anafylaktisia reaktioita. Baen ym. (2013) kokeessa pähkinäallergisia hiiriä ruokittiin kitiini- ja kitosaanipitoisella ruokavaliolla viikkoja ennen pähkinäaltistusta. Pähkinäaltistuksen jälkeen tarkkailtiin hiirten anafylaktisten oireiden määrää, sekä pähkinäspesifisen Ig-vasta-aineen, sekä Th1-, ja Th2-sytokiinien eritystä. Tuloksia verrattiin hiiriin, joilla oli normaaliruokavalio. Tulokseksi tutkijat saivat, että kitiini ja kitosaani näyttävät vähentävän pähkinästä saadun allergiareaktion vaikutuksia. Etenkin  $\beta$ -kitosaania saaneet hiiret tuottivat pähkinälle spesifisiä Ig-vasta-aineita 47 % vähemmän altistuttuaan pähkinälle.

## *Vaikutukset syöpäsoluihin*

Eräissä kokeissa tutkijat muokkasivat kito-oligosakkarideista uudenlaisia glykolipidejä, joiden todettiin tuhoavan syöpäsoluja ja lisäävän syöpää sairastavien hiirten keskimääräistä elinikää 140 - 180 % (Gorbach ym. 1994). Myös Nam ym. (2007) ehdottivat tutkimuksensa perusteella, että kito-oligosakkarideilla voi olla merkittävä rooli paksusuolen syöpää ehkäisevien aineiden kehittämisessä. Kito-oligosakkaridien todettiin myös inhiboivan kolmea eri syöpäsolulinjaa, jotka useimmin on liitetty mahan alueen syöpiin (Luo ym. 2016 In press). Näiden lisäksi kito-oligosakkaridien todettiin inhiboivan myös leukemiaan liittyviä solulinjoja (Pae ym. 2001).

Kito-oligosakkaridien todettiin myös *in vitro* ja *in vivo* -kokeissa potentiaalisesti ehkäisevän syöpäkasvaimien muodostumista keuhko- ja maksasyöpään liittyvissä solulinjoissa (Shen ym. 2009). Kyseisessä tutkimuksessa kito-oligosakkaridit oli eristetty sienikitiinistä, mutta hyvin eristetyssä ja puhdistetussa kito-oligosakkaridituotteessa kitiinin alkuperä ei enää vaikuta aineen ominaisuuksiin (Muzzarelli 2010). EU on myöntänyt uuselintarvikeluvan kitiini-glukaanille, jota on eristetty *Aspergillus niger* sienistä (EU 76/2011).

Liite 6. Hypoteesi hyönteissyönnin mahdollisista terveystaikutuksista, sekä sen kriittinen tarkastelu nykyisen tutkimuksen valossa

Toistaiseksi ei tiedetä millaisia määriä hyönteisruokaa pitäisi nauttia, jotta saataisiin tarpeeksi kitiiniä, jota sitä voitaisiin hajottaa riittäviä määriä kito-oligosakkarideiksi ja kitosaaniksi, jotka mahdollistavat terveyttä edistävät vaikutukset. Esimerkiksi määrät joilla kito-oligosakkaridien on todettu alentavan veren kolesterolia, olivat niinkin pieniä annoksia kuin 1 gramma päivässä, joten oletettavasti kitiiniä (hyönteisruokaa) ei tarvitse kovin suuria määriä nauttia, jotta ruoansulatuselimistön entsyymit saavat hajotettua kitiiniä tarpeeksi vaikutusten aikaansaamiseksi.

Tähän mennessä julkaistujen hyönteissyöntiä koskevien tutkimusten pohjalta voidaan kokeilla muodostaa hypoteesi ja testata sitä. Hypoteesi: Syömällä 100 grammaa kokonaisia sirkkoja (*Acheta domesticus*) päivässä, ihminen tulee nauttineeksi 2,15 grammaa kitiiniä. Se hajoaa  $x > 1$  grammaa kito-oligosakkarideiksi ja kitosaaniksi, joilla on jo tutkitusti kolesterolia alentavia vaikutuksia niinkin pieninä määrinä.

Musumecin ja Paolettin (2009) tutkimuksessa testattiin AMCaasin vaikutusta *in vitro* kärpästen siipiin, jotka simuloivat kitiinipitoista ruokaa. He olivat vakuuttuneita siitä, että siipien osittainen hajoaminen johtui vain AMCaasin vaikutuksesta, eikä muiden entsyymien toiminnasta. Vaikka potentiaalinen kitiinin hajotusmekanismi heidän tutkimuksen mukaan löytyi 43/48 tutkituista ihmisistä, vielä ei osata sanoa, mikä on riittävä määrä AMCaasia kitiinin varsinaiseen sulatukseen ruoansulatuskanavassa.

He inkuboivat kitiiniä AMCaasin kanssa simuloidussa mahalaukun nesteessä ja mittasivat kitiinin hajoamistuotteiden, *N*-asetyyli-glukosamiinin (GlcNAc), pitoisuuksia inkuboinnin jälkeen. Lopussa mitatun GlcNAc:n pitoisuus oli hyvin matala. Tulos ei ollut yllättävä, sillä kitiininhajotuksen päätuotteet ovat erilaisten kito-oligomeerien yhdistelmiä, joissa on eripituisia polysakkaridiketjuja (GlcNAc<sub>n</sub>, jossa  $n > 2$  ja kitobiosidi  $n = 2$ ). Näin ollen muodostuneita hajoamistuotteita saattaa olla paljon enemmänkin, mutta koska niitä ei mitattu, voi arvio AMCaasin toiminnan aktiivisuudesta olla aliarvioitu. Tarkastellessaan tuloksia mikroskoopilla tutkijat huomasivat, että AMCaasin merkittävimmät vaikutukset olivat lähinnä siipien vaurioittaminen ja pehmittäminen. Tästä tutkijat ehdottivat, että AMCaasin tehtävä saattaisi olla lähinnä kitiinikuoren läpäiseminen, jotta muut ruoansulatusentsyymit voivat päästä hajottamaan hyönteisen sisältöä.



Paoletti ym. (2007) tutkimuksessa tulokset AMCaasin aktiivisuudesta mitattiin vain yhden hajoamistuotteen, 4-metyyliβ-D-glukosaminidiferyyli-beta-D-N,N'-diasetyylikitobioosin muodostumisena, nanomooleina millilitraa kohden tunnissa (nmol/ml/h). Parhaiten kitiiniä sulattavien koehenkilöiden keskiarvo oli 16,147 nmol/ml/h. Jos tämä muutetaan milligrammoiksi ja lasketaan mukaan arvio siitä, että mahanestettä olisi mahalaukussa noin 100 ml, ja kuviteltu hyönteisruoka on mahalaukussa AMCaasin hajotettavana noin 2,5 tuntia, saadaan tulokseksi 3,75 mg mitattua kitiinin hajoamistuotetta (4-metyyliβ-D-glukosaminidiferyyli-beta-D-N,N'-diasetyylikitobioosi). Tämä laskutoimitus edustaa vain kyseisen hajoamistuotteen muodostunutta määrää mahalaukussa AMCaasin toimesta, kärpästen siipien ollessa kitiinipitoisen ravinnon lähde. Eli sitä ei voida yleistää edustamaan kaikkia mahdollisia yhdisteitä, joita AMCaasi saattaa muodostaa kitiiniä hajottaessaan.

Tämän kuvitteellisen kokeen tulos ei riitä vahvistamaan hypoteesia siitä, että syömällä hyönteisiä voitaisiin saada kito-oligosakkaridien ja kitosaanin terveysvaikutuksia, sillä 3,75 mg ei ole lähellä tarvittavaa 1 grammaa vaikuttavia kitiinin hajoamistuotteita. On kuitenkin tärkeitä huomioida, että viitteinä käytetyissä tutkimuksissa AMCaasin aktiivisuutta oli mitattu eri lopputuotteilla ja hyvin yksipuolisesti. Kitiinin hajoamistuotteita on kuitenkin monia erilaisia molekyylipainon ja deasetylaation suhteen. Paoletti ym. (Paoletti ym. 2007) tutkimuksista ei esimerkiksi voida varmasti sanoa muodostuiko hajotustoiminnan tuloksena kitosaania tai kito-oligosakkarideja. Kärpästen siivistä ei myöskään ollut analysoitu sitä, että sisältävätkö ne jo itsessään jotakin kitiinin hajoamistuotteita.

Mahdollisia virhelähteitä näissä tutkimuksissa ja laskuissa saattaa olla esimerkiksi pieni otoskoko, joka ei edusta kaikkia ihmisiä, tai riittävästi erilaisia ihmisiä maantieteellisesti erilaisilta alueilta. Tämä on syytä huomioida, sillä koehenkilöinä oli vain Italialaisia pienehköltä alueelta. Tutkimuksia ei myöskään ollut toteutettu *in vivo* vaan mahalaukun olosuhteita oli simuloitu *in vitro*. Samalla sivuutettiin kitiinin mahdollisen hajoamisen tutkiminen ohutsuolessa, sekä paksusuolessa. Lisäksi on syytä muistaa, että tutkimuksessa tarkasteltiin vain AMCaasin toimintaa ja siten esimerkiksi lysotsyymien tärkeä rooli kitiinin deasetylaatioissa jäi tutkimatta. Tutkimuksissa ei myöskään otettu huomioon kitiinin hajoamistuotteiden koko skaalaa, vaan AMCaasin aktiivisuudesta kertovaksi yhdisteeksi oli valittu vain yksi mahdollinen hajoamistuote, jonka pitoisuus liuoksessa ei edusta kaikkia hajotustoiminnan seurauksena muodostuvia yhdisteitä. Lopuksi voitaneen sanoa, että pelkät raat kärpäsen siivet eivät edusta hyvin kaikkea

hyönteisruokaa, ja lisätutkimusta juuri hyönteisruoan valmistustavan vaikutuksesta kitiniin hajoamiseen tarvitaan. Esimerkiksi, olisiko AMCaasi-aktiivisuus suurempi, jos mitattaisiin kaiken kokoisia kitiniin hajoamistuotteita ja hyönteisravintona olisi vaikka jollain tapaa jauhetut hyönteiset?

## Liite 7. Kitiinin hajoaminen ruoansulatuksessa: *In vivo* -tutkimusasetelma

Mikäli hyönteisruoan mukana saatavan kitiinin hajoamista haluttaisiin tutkia *in vivo*, olisi aloitettava valmistamalla standardoituja hyönteisruoka-annoksia, jotka olisi valmistettu jollain yksinkertaisella menetelmällä, ja joiden vaikutuksia on helppo tutkia. Tällaiset annokset voivat olla esimerkiksi 100 gramman annoksia homogenisoitua heinäsiirikkamassaa. Näistä annoksista tulisi laskea kaikki energiaravintoainepitoisuudet, kitiini-, kitosaani-, kito-oligosakkaridi- ja kito-oligomeeripitoisuudet, sekä kaikki muut merkittävät ravintoainepitoisuudet. Näin ollen tiedettäisiin tarkasti miten paljon mitäkin aineita koehenkilöt saavat hyönteisruoka-annoksesta. Olennaista on tietää, millaisia määriä kitiinin eri hajoamistuotteita valmiit hyönteisruoka-annokset sisältävät, sillä jos niitä esiintyy merkittäviä määriä jo luonnostaan deasetyloituneena ja hajonneena, ovat vaikutukset elimistölle myös lukuisampia.

Nauttimisen jälkeen on analysoitava koehenkilöiden ulostenäytteitä ja tarkasteltava mitä aineita on hajotettu ja mitä on imeytynyt, sekä kuinka suuria määriä. Tämän lisäksi koehenkilöiden yleistä terveydentilaa ja elintoimintoja olisi seurattava ennen ja jälkeen hyönteisruoan nauttimisen. Näin saadaan kokonaiskuva siitä, onko hyönteisruoka vaikuttanut jotenkin. Näin voidaan myös saada viitteitä siitä, mitä vaikuttavia yhdisteitä taustalla ehkä on. Jos esimerkiksi ulostenäytteistä löytyy kitosaania suurempia määriä, kuin itse hyönteisruokatuotteessa oli, voidaan arvioida kitosaania muodostuvan mahdollisesti hajotustoiminnan tuloksena. Saatujen tulosten perusteella voidaan arvioida esimerkiksi missä suhteessa kitiiniä tulee pilkkoa, jotta terveysvaikutukset pystytään niin sanotusti maksimoimaan, ja paljonko kitiiniä tulee tässä tapauksessa ruoasta saada.

Tulosten perusteella pystyttäisiin tutkimaan esimerkiksi sitä, kuinka paljon kitiiniä pystyvät hajottamaan ihmiset, joilla AMCaasia ei muodostu elimistössä paljon. Jos kitiini ei juurikaan pilkkoudu, niin kitiinin hajoamistuotteiden imeytymistäkään ei voi tapahtua, olettaen että sen hajoamistuotteita ei sisälly hyönteisruokatuotteeseen itseensä. Tällaiset kokeet eivät kuitenkaan vielä anna kovin hyvää kokonaiskuvaa siitä, missä kitiinin hajotusta tapahtuu, tai mitkä yhdisteet saavat aikaan mitäkin vaikutuksia.

## Liite 8. Kitiinin jatkotutkimuksen tärkeimpiä aiheita

Kitiinin jatkotutkimukseen liittyviä kysymyksiä ja pohdintoja on koottu kuvaan 8.

<b>Millaisia kitiiniyhdisteitä hyönteisruoka sisältää?</b>	Tuoreiden hyönteisten sisältämien eri kitiiniyhdisteiden tarkkojen pitoisuuksien määrittäminen	Valmistustavan vaikutukset	Miten hyönteisten jauhaminen tai kuivatus vaikuttavat kitiinin sulatettavuuteen?  Pehmeekö kitiini helpommin sulatettavissa olevaan muotoon kuumennettaessa tai keitettyäessä?  Muodostuuko ruoan valmistuksen yhteydessä joitakin hyödyllisiä kitiinin hajoamistuotteita?
		Erot kitiinin sulatettavuudessa eri hyönteisten erilaisten kitiinikuorten, sekä erilaisten kitiinipitoisten rakenteiden välillä	
<b>Mitä kitiinille tapahtuu elimistössä? In vivo –tutkimusta</b>	Vuorovaikutus suolistomikrobiotian kanssa	Prebioottistatus on testattava	
	Elimistön aistimismekanismit kitiinille ja sen hajoamistuotteille	Mitkä kaikki entsyymit osallistuvat kitiinin hajottamiseen? Millaisia olosuhteita vaaditaan kitiinin hajottamiseen?  Mitkä reseptorit tunnistavat kitiinin ja sen hajoamistuotteet? Mitä signaalintireittejä kitiinijohdannaiset molekyylit aktivoivat elimistössä?	
	Mitä kitiinille tapahtuu ruoansulatuskanavan eri osissa?	Mitä tapahtuu kito-oligosakkarideille, jotka voivat imeytyä? Missä päin kehoa ne vaikuttavat ja miten?	
<b>Mitä vaikutuksia havaitaan?</b>	AMCaasiaktiivisuus kitiinin hajotuksessa	Ihmisten väliset erot kitiinin hajotuskyvyssä	Onko hyönteisten lisäämisellä ruokavalioon vaikutusta AMCaasiaktiivisuuteen?
	Onko kitiini ravintokuitu vai hajoaako se hyödyllisiksi yhdisteiksi?	Onko kitiini tehokas ravintokuitu?	
	Nautitun kitiinin määrän merkitys ilmenevissä vaikutuksissa	Paljonko hyönteisruokaa täytyy syödä, jotta terveysvaikutukset näkyvät?	Paljonko ravinnosta saatua kitiiniä pystytään hajottamaan? • Kuinka paljon hajoamistuotteita muodostuu?
	Miten paljon ja millaisissa yhdistelmissä kitiiniä ja sen hajoamistuotteita tulee nauttia, jotta mahdolliset terveysvaikutukset voidaan niin sanotusti maksimoida?		
	Voiko kitiiniä saada liikaa? Mitkä ovat sen vaikutukset tällöin?		

**Kuva 8. Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden jatkotutkimuksen tärkeimpiä tutkimuskysymyksiä.** Joitakin jo tutkittuja aiheita on mainittu kuvassa uudestaan siksi, että niitä on tutkittu liian tai liian suppeasti