Tanniinirakenteen vaikutus liukenemattomien tanniini–proteiini-kompleksien muodostumiseen ja pysyvyyteen

Mimosa Sillanpää
Pro Gradu -tutkielma
Luonnonyhdistekemia
Kemian laitos
Turun yliopisto
Lokakuu 2020

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO
Kemian laitos
SILLANPÄÄ, MIMOSA: Tanniinirakenteen vaikutus liukenemattomien tanniini–proteiini-kompleksien muodostumiseen ja pysyvyyteen
Pro Gradu -tutkielma, 49 s., 7 liitettä
Kemia
Lokakuu 2020

Tanniinien yksi tunnetuimmista ominaisuuksista on niiden kyky sitoutua proteiineihin ja muihin makromolekyyleihin. Aiemmat tutkimukset ovat liittäneet kyseisen ominaisuuden myös tanniinien moniin hyötyihin märehtijöiden ravintoon lisättynä; tanniinien on havaittu mm. vähentävän märehtijöiden metaanipäästöjä ja parantavan niiden kasviproteiinien hyötykäyttöä. Lisäksi tanniinit voivat toimia luonnollisina loislääkkeinä.

Tanniinien ja proteiinien muodostamia komplekseja on tutkittu paljon, mutta näiden kompleksien pysyvyydestä eri pH-olosuhteissa on hyvin vähän tietoa. Tässä tutkimuksessa selvitettiin rakenteen vaikutusta puhdistettujen proantosyanidiinifraktioiden ja proteiinin muodostamien liukenemattomien kompleksien pysyvyyteen pH:n funktiona. Lisäksi tutkittiin proantosyanidiinien ja hydrolysoituvien tanniinien kombinatorisia vaikutuksia niiden proteiininsaostuskapasiteettiin.

Proantosyanidiinien keskimääräinen polymerisaatioaste vaikutti eniten tanniini–proteiini-kompleksien pysyvyyteen; suuremman polymerisaatioasteen proantosyanidiinit muodostivat proteiinien kanssa pysyvimpiä komplekseja. Myös proantosyanidiinien galloyloitumisasteen sekä polymeerin prosyanidiiniyksiköiden määrää kasvattamalla saatiin parannettua proteiinikompleksien pysyvyyttä. Kombinatorinen vaikutus oli tanniiniseoksilla yleisesti additiivinen, mutta hydrolysoituvilla tanniineilla erityisesti avoketjuisen polyolin omaava rakenne sekä proantosyanidiineilla rakenteeseen kiinnittyneet galloyyliryhmät kasvattivat kombinatorista vaikutusta. Synerginen vaikutus oli korkein alhaisilla tanniinikonsentraatioilla.

Asiasanat: *proantosyanidiini*, *hydrolysoituva tanniini*, *proteiininsaostus*, *pH*, *tanniini–proteiini-kompleksin pysyvyys*, *kombinatorinen vaikutus*

Sisällys

Käytetyt lyhenteet 1
1. Johdanto 3
1.1. Tanniinit ja niiden rakenne 3
1.2. Proteiinit ja niiden rakenne 6
1.3. Tanniinien vuorovaikutukset 6
1.3.1. Vuorovaikutukset proteiinien kanssa 6
1.3.2. Tanniini–proteiini-kompleksien pysyvyys 10
1.3.3. Tanniiniseosten kombinatorinen vaikutus proteiininsaostukseen 16
1.4. Työn tarkoitus 18
2. Materiaalit ja menetelmät 19
2.1. Käytetyt reagenssit ja liuottimet 19
2.1.1. 12,5 ja 50 mM pH 5 -puskuriliuosten valmistus 19
2.1.2. Proteiiniliuosten valmistus 20
2.1.3. Sitraattifosfaattipuskuriliuokset 20
2.2. Käytetyt näytteet 20
2.3. Proantosyanidiini–proteiini-kompleksien uudelleenliukenemisanalyysit 23
2.4. Kombinatoriset proteiininsaostusanalyysit 24
3. Tulokset ja niiden tarkastelu 25
3.1. Uudelleenliukenemisanalyysit 25
3.2. Kombinatoriset analyysit 32
4. Johtopäätökset 37
5. Viiteluettelo 39
Liitteet 50

Käytetyt lyhenteet

BSA	Bovine serum albumin
	Naudan seerumin albumiini
DAD	Diode array detector
	Diodirividetektori
EC_{50}	Half maximal effective concentration
	50 % vaikuttava pitoisuus
ESI	Electrospray ionization
	Sähkösumutusionisaatio
ET	Ellagitannin
	Ellagitanniini
FT	Phlorotannin
	Florotanniini
GT	Gallotannin
	Gallotanniini
HHDP	Hexahydroxydiphenoyl
	Heksahydroksidifenoyyli
HT	Hydrolyzable tannin
	Hydrolysoituva tanniini
LC	Liquid chromatography
	Nestekromatografia
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
	Matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio
mDP	Mean degree of polymerization
	Keskimääräinen polymerisaatioaste
MS/MS	Tandem mass spectrometry
	Tandemmassaspektrometria
NHTP	Nonahydroxytriphenoyl
	Nonahydroksitrifenoyyli
PA	Proanthocyanidin
	Proantosyanidiini
PC	Procyanidin
	Prosyanidiini

PD	Prodelphinidin
	Prodelfinidiini
PGG	Pentagalloylglucose
	Pentagalloyyliglukoosi
pI	Isoelectric point
	Isoelektrinen piste
PPC	Protein precipitation capacity
	Proteiininsaostuskapasiteetti
PRP	Proline-rich protein
	Proliinirikas proteiini
TOF-MS	Time of flight mass spectrometry
	Lentoaikamassaspektrometria
UHPLC	Ultra high performance liquid chromatography
	Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia

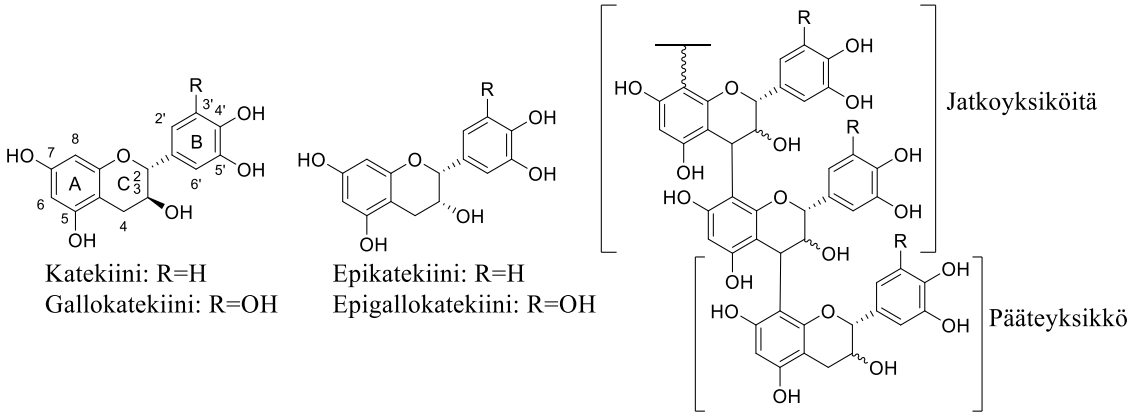
1. Johdanto

1.1. Tanniinit ja niiden rakenne

Tanniinit ovat kasvien tuottamia erikoistuneita metaboliitteja, joilla on monia kasville hyödyllisiä ominaisuuksia. Näistä ominaisuuksista tunnetuin on niiden kyky toimia kasvin puolustuksena kasvinsyöjiä vastaan.[1–3] Tanniinikirjo ja -pitoisuudet vaihtelevat suuresti kasvilajien ja jopa -yksilöiden välillä, riippuen muun muassa vuodenajasta ja kasvupaikasta.[4,5] Pitoisuudet voivat muuttua myös lyhyen ajan sisällä, esimerkiksi puissa hyönteisten lehtien syönnin on todettu indusoivan puolustusyhdisteiden synteesiä vahingoittuneisiin ja ympäröiviin lehtiin.[2] Vaikka tanniinit ovatkin kasvien puolustusyhdisteitä, niillä on osoitettu olevan terveyttä edistäviä vaikutuksia niin ihmisille kuin eläimillekin.[6–8] Hyödyt aiheuttavat biologiset aktiivisuudet on liitetty muun muassa tanniinien kykyyn saostaa proteiineja (engl. protein precipitation capacity, PPC) ja oksidatiiviseen aktiivisuuteen.[6,7,9,10]

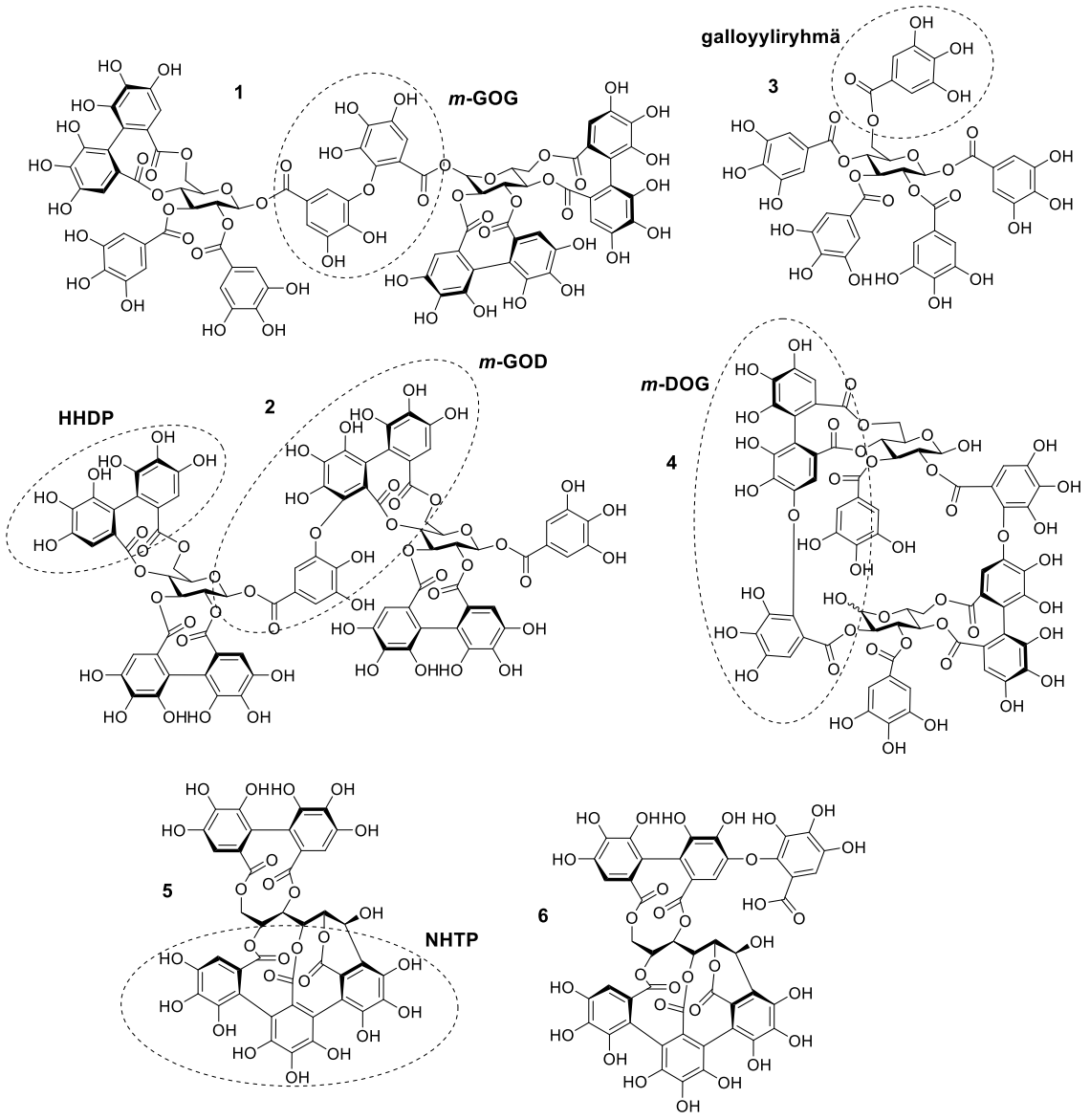
Tanniinit jaetaan rakenteensa puolesta kolmeen luokkaan: proantosyanidiineihin (engl. proanthocyanidin, PA), hydrolysoituviin tanniineihin (engl. hydrolyzable tannin, HT) sekä florotanniineihin (engl. phlorotannin, FT).[6,11] Puu- ja ruohovartisissa kasveissa esiintyviä tanniineja ovat PA:t ja HT:t, kun taas FT:t ovat yleisimpiä vedenalaisissa kasveissa.[6,11,12] Tanniineista yleisimpiä ovat PA:t, ja ne koostuvat kahdesta tai useammasta flavan-3-oli-yksiköstä.[3,13,14] Tavallisimpia flavan-3-oli-yksiköitä ovat (epi)katekiinit sekä (epi)gallokatekiinit (Kuva 1). Pelkästään katekiini- ja epikatekiiniyksiköistä koostuvia PA:ja kutsutaan prosyanidiineiksi (engl. procyanidin, PC), kun taas gallokatekiini- ja epigallokatekiiniyksiköitä sisältävät oligo- tai polymeerit ovat prodelfinidiinejä (engl. prodelphinidin, PD). Katekiini- ja gallokatekiiniyksiköiden C2- ja C3-hiilten konformaatio on (2R, 3S) eli *trans* ja epikatekiini- ja epigallokatekiiniyksiköiden (2R, 3R) eli *cis*.[13] Yleisimmät PA:t koostuvat kuitenkin sekä (epi)katekiini että (epi)gallokatekiiniyksiköistä. Proantosyanidiiniseosten kohdalla puhutaan usein PC- tai PD-rikkaista PA:ista tai tarkemmin seosten PC/PD-suhteesta.[13] Yleisimmät sitoutumistyypit PC- ja PD-monomeeriyksiköiden välillä ovat $C_4 \rightarrow C_6$ ja $C_4 \rightarrow C_8$ (Kuva 1). Näin kahden hiilen välityksellä sitoutuneita PA:ja kutsutaan B-tyypin PA:ksi, kun taas A-tyypin PA:sta löytyy edellä mainittujen C-C-sidosten lisäksi vähintään yksi $C_2 \rightarrow O_7$ tai $C_2 \rightarrow O_5$ -eetterisidos.[3,15] Lisäksi PA:ihin voi olla myös sitoutunut yksi tai useampi galloyyliryhmä.[15,16] Proantosyanidiineja on tutkittu paljon varsinkin proteiininsaostuskapasiteettinsa osalta, mutta niiden eluoituminen kromatografisena

kumpuna, johtuen isomeerien suuresta määrästä, hankaloittaa niiden puhdistamista.[17] Lyhyempiä PA-oligomeerejä on saatu puhdistettua kasvimateriaalista, mutta pidempien polymeerien eristäminen yksittäisiksi yhdisteiksi on osoittautunut haasteelliseksi.[17,18]



Kuva 1. (Epi)katekiinin ja (epi)gallokatekiinin rakenteet sekä esimerkki $C_4 \rightarrow C_8$ -sidoksella näistä yksiköistä koostuvan proantosyanidiinin rakenteesta.

Hydrolysoituvat tanniinit ovat toiseksi yleisin tanniiniluokka, ja ne ovat rakenteellisesti monimuotoisimpia näistä kolmesta luokasta. Ne jaetaan kolmeen kategoriaan: yksinkertaisiin galloyylijohdannaisiin, gallotanniineihin (engl. gallotannin, GT) ja ellagitanniineihin (engl. ellagitannin, ET).[5,6,19] Yksinkertaisissa galloyylijohdannaisissa on 1–5 galloyyliryhmää sitoutuneina esterisidoksilla polyoliin, joka on yleensä β-D-glukoosi tai kviinihappo. Gallotanniineissa polyoliin sitoutuvat galloyyliryhmät muodostavat digalloyyliryhmiä. Tämä johtaa siihen, että niissä on yleensä kuusi galloyyliryhmää tai enemmän, vaikka poikkeuksiakin on.[5,20] Ellagitanniineissa vähintään kaksi galloyyliryhmää ovat kiinnittyneet toisiinsa C-C-sidoksella ja muodostaneet heksahydroksidifenoyyliryhmän (engl. hexahydroxydiphenoyl group, HHDP), joka hydrolyysi ssä lohkeaa molekyylistä ellagihappona. Ellagitanniineissa sokeriryhmä voi olla myös asyklisessä muodossa, jolloin yhdistettä kutsutaan C-glykosidiseksi tai avoketjuisiksi ET:ksi. Tällöin HHDP-ryhmä voi muodostaa C-C-sidoksen vielä kolmannenkin galloyyliryhmän kanssa, ja muodostunutta ryhmää kutsutaan nonahydroksitrifenoyyliryhmäksi (engl. nonahydroxytriphenoyl group, NHTP).[6,7] Kuvassa 2 on esitetty esimerkkirakenteet yksinkertaisesta galloyylijohdannaisesta (yhdiste **3**) ja erilaisista ellagitanniineista (yhdisteet **1**, **2** ja **4**–**6**).



Kuva 2. Työssä käytettyjen hydrolysoituvien tanniinien rakenteet: gemiini A (**1**), sanguiini H-6 (**2**), pentagalloyyliglukoosi (**3**), oenotheiini B (**4**), veskalagiini (**5**) ja veskavaloniinihappo (**6**). *m*-GOG = dehydrodigalloyyliryhmä, HHDP = hexahydroksidifenoyyliryhmä, *m*-GOD = sanguisorbyyliryhmä, *m*-DOG = valoneoyyliryhmä, NHTP = nonadehydroksitrifenoyyliryhmä.

Myös HT:t voivat muodostaa oligomeerejä.[11,19,20] Tällöin yhdisteet luokitellaan viiteen luokkaan sen mukaan, miten monomeeriyksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa.[19–21] Luokat ovat i) GOG, ii) DOG, iii) GOD, iv) $D(OG)_2$ ja v) C–C-sidoksella kiinnittyneet C-glykosidiset oligomeeriset ET:t.[21] Luokkien nimeäminen määräytyy HT:n rakennuspalikoiden mukaisesti happisillalla (O) sitoutuneisiin galloyyli (G) tai HHDP (D) -ryhmiin. Esimerkiksi DOG-tyyppisen oligomeerin monomeeriyksiköt ovat kiinnittyneet toisiinsa niin, että monomeerin HHDP-ryhmä muodostaa happisillan toisen monomeerin galloyyliryhmään. DOG:ssa HHDP toimii hapen luovuttajana, kun taas GOD:ssa happisillan hapen luovuttaa galloyyliryhmä. Happisilta voidaan muodostaa joko

meta- tai *para*-asemasta toisen monomeerin *orto*-asemaan[20,21], jonka vuoksi sidosluokan eteen liitetään joko *m*- tai *p*-lyhenne tarkentamaan yhdisteen rakennetta (yhdisteet **1** ja **4**, Kuva 2).

1.2. Proteiinit ja niiden rakenne

Proteiinit ovat makromolekyylejä, jotka koostuvat yhteensä 20 erilaisesta aminohaposta. Aminohapot ovat kiinnittyneinä toisiinsa planaarisin peptidisidoksin ja tätä kiinnittymisjärjestystä kutsutaan proteiinin primaarirakenteeksi. Proteiinit laskostuvat vielä tämän jälkeen sekundaari-, tertiaari- ja kvaternaarikenteisiin, joiden takia niiden kolmiulotteinen rakenne on spesifinen. Ne voidaan kvaternaarisen rakenteensa puolesta jakaa kahteen eri luokkaan: kuitumaisiin ja globulaarisiin proteiineihin.[22] Kuitumaiset proteiinit ovat kolmiulotteiselta rakenteeltaan yksinkertaisia ja ne ovat pidempiä ja kestävämpiä globulaarisiin proteiineihin verrattuna. Ne toimivat rakenteellisissa osissa; esimerkiksi hiusten keratiini ja lihasten myobrosiini ovat kuitumaisia proteiineja.[22] Globulaariset proteiinit ovat nimensä mukaisesti kolmiulotteiselta rakenteeltaan pallomaisia ja koostuvat useasta eri sekundaarirakenteisesta polypeptidiketjusta - esimerkiksi useimmat entsyymit ovat globulaarisia proteiineja.

Proteiinin isoelektrinen piste (engl. isoelectric point, pI) on se pH-arvo, jossa proteiinin nettovaraus on nolla.[22,23] Isoelektrinen piste on tyypillinen molekyyleille, joilla on selkeä hapan ja emäksinen osa. Yksinkertaisimmillaan aminohapon pI voidaan laskea sen pK_a-arvojen keskiarvona. Jos ympäröivä pH on alempi kuin proteiinin pI, molekyylillä on positiivinen varaus ja jos pH on pI:tä korkeampi, varaus on negatiivinen.[22] On havaittu, että tanniinin affiniteetti proteiiniin on suurin liuoksen pH:n ollessa lähellä proteiinin pI:tä.[24–26] Tämä voi johtua siitä, että varaukseton makromolekyyli on paremmin käytettävissä vetysidosten muodostukseen.[25] Lisäksi tässä pH:ssa proteiinien väliset elektrostaattiset repulsiovoimat ovat vähäiset[25], proteiinin liukoisuus on alimmillaan ja molekyylien väliset tanniini–proteiini-sidokset ovat helpommin muodostettavissa.[23,27]

1.3. Tanniinien vuorovaikutukset

1.3.1. Vuorovaikutukset proteiinien kanssa

Tanniinien sitoutumista proteiineihin on pidetty yhtenä syynä tanniinien moniin terveyshyötyihin niin ihmisillä kuin eläimilläkin.[6,8,28,29] Tanniinit toimivat myös ravinnosta saatavina antioksidantteina[30], ja tämä ominaisuus on liitetty tanniinirikkaiden ravintojen, esimerkiksi marjojen, terveyshyötyihin. Tanniinit voivat aiheuttaa syöjälleen

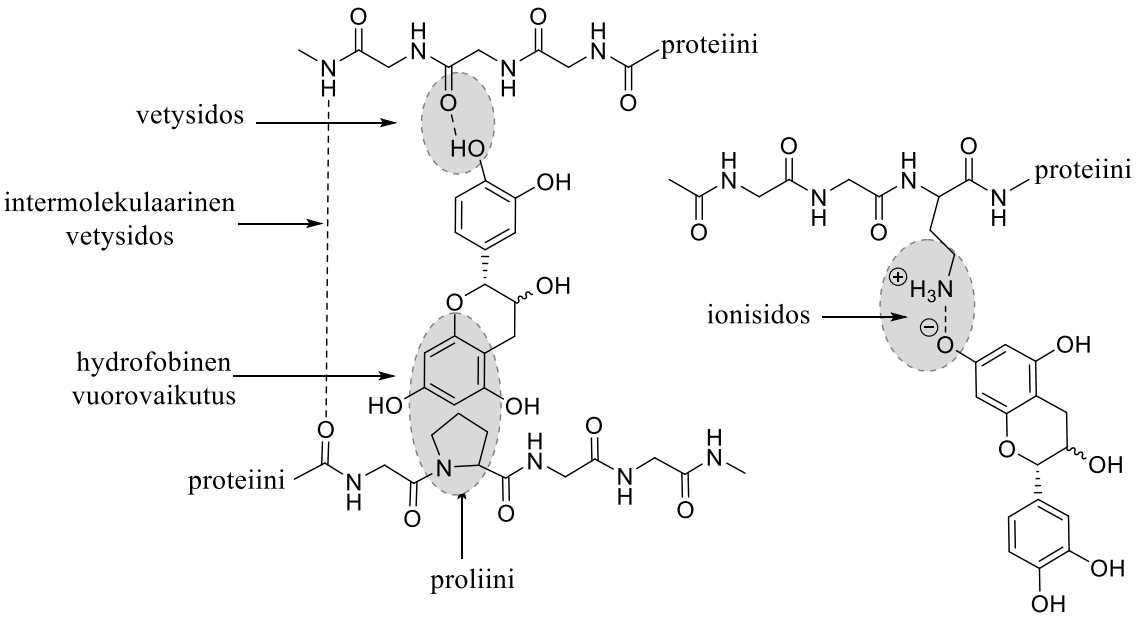
myös oksidatiivista stressiä joko hapettuessaan korkeassa pH:ssa tai entsymaattisen aktiivisuuden vaikutuksena, jolloin saatu terveysvaikutus onkin negatiivinen.[5,10]

Tanniinien terveysvaikutuksiin sekä kasvien puolustusyhdisteinä toimimiseen on liitetty niiden kyky muodostaa liukoisia ja liukenemattomia komplekseja proteiinien kanssa.[5,6] Tästä syystä PPC:ta on myös tutkittu tanniineilla eniten, vaikka tanniinien tunnettuihin ominaisuuksiin kuuluu myös oksidatiivinen aktiivisuus, joka on keskeinen kasvien puolustautumisessa hyönteisiä vastaan.[3,10] Tanniini–proteiini-kompleksien muodostuminen tunnetaan molekulaarisella tasolla melko hyvin; tunnemme yleisesti kompleksinmuodostuksessa vallitsevat sidostyypit, liukenemattomien kompleksien muodostumisprosessin, sekä miten väliaineen ominaisuudet vaikuttavat PPC:een. Proantosyanidiineilla korkea keskimääräinen polymerisaatioaste (engl. mean degree of polymerization, mDP), suuri PD-monomeerien määrä (eli PD-rikas yhdiste) sekä rakenteeseen kiinnittyneet galloyyliryhmät kasvattavat PPC:tä.[16,18,31–33] Hydrolysoituvilla tanniineilla suurempi molekyylipaino, notkea rakenne ja galloyyliryhmien määrän kasvattaminen vaikuttavat positiivisesti yhdisteen PPC:hen, kun taas polyolin avoketjuisuus vähentää yhdisteen proteiiniaffiniteettia.[7,34] Molemmilla tanniinityypeillä tanniinikonsentraation kasvattaminen nostaa havaittua proteiiniaffiniteettia, mikäli proteiinia on vielä vapaana liuoksessa.[35–37]

Tanniinin ja proteiinin väliset sidokset voivat olla joko ei-kovalenttisia tai kovalenttisia, eli vastaavasti sitoutuminen on tai ei ole reversiibeli. Lisäksi tanniini voi joko sitoutua proteiiniin ei-spesifisesti sen pinnalle, tai vuorovaikutus voi olla spesifinen, jolloin tanniini sitoutuu proteiinin rakenteessa olevaan kolmiulotteiseen ”taskuun”.[25,35,38–40] Vuorovaikutuksen luonteeseen vaikuttavat tanniinin ja proteiinin rakenteiden lisäksi muun muassa tanniinin ja proteiinin konsentraatiot sekä ympäröivän väliaineen ominaisuudet kuten ionivoimakkuus, lämpötila ja varsinkin liuoksen pH.[41] Muodostuneet tanniini–proteiini-kompleksit voivat olla liukoisia tai liukenemattomia.[25,40,42] Kompleksinmuodostusmekanismia on myös tutkittu jonkin verran, ja yhden teorian mukaan liukenemattomien tanniini–proteiinien-kompleksien muodostus tapahtuisi kolmessa osassa.[43–45] Ensin tanniinit käyttäytyvät monihampaisten ligandien tavoin ja kiinnittyvät useampaan sitoutumiskohtaan, saaden proteiinin kiertymään niiden ympärille. Kelatoituminen tiivistää kompleksia ja kasvattaa samalla sen proteiiniaffiniteettia liuoksessa vielä vapaana olevaan proteiiniin. Tässä vaiheessa kompleksit ovat vielä liukoisia. Liukenemattomien tanniini–proteiini-kompleksien muodostuminen alkaa, kun kelatoituneet kompleksit muodostavat uusia sidoksia liuoksen toisten proteiinien sekä kompleksien kanssa.[46] Kolmannessa vaiheessa muodostuneet

kompleksit aggregoituvat vielä enemmän, muodostaen saostumia.[43] Varsinkin PA:en on havaittu saostavan proteiineja muodostamalla vetysidoksia kompleksien välillä, kun taas pentagalloyyliglukoosi (engl. pentagalloylglucose, PGG), saostaa proteiinia muodostamalla hydrofobisen kerroksen proteiinin ympärille, johtaen saostuman muodostumiseen.[45,47,48]

Ei-kovalenttiset sidokset tanniinien ja proteiinien välillä ovat yleensä hydrofobisia vuorovaikutuksia, vetysidoksia ja dispersiovoimia, kun taas ionisidokset ovat harvinaisempia (Kuva 3).[10,39,49] Vetysidokset ovat vallitsevia ei-kovalenttisia vuorovaikutuksia ympäröivän pH:n ollessa lähellä proteiinin pI:tä.[10] Sidostyyppien esiintymisestä erityyppisillä tanniineilla on kuitenkin esitetty ristiriitaista tietoa, ja rakenteellisia ominaisuuksia ei ole liitetty aukottomasti vallitsevien sidostyyppien esiintymiseen.[9] On esitetty että HT:t, kuten esimerkiksi PGG, suosivat hydrofobisia vuorovaikutuksia proteiiniin sitoutuessaan[9,47,50], kun taas PA–proteiini-komplekseissa vetysidokset olisivat pääosassa.[25,50] Tanniinit saostavat esimerkiksi proliinirikkaita proteiineja (engl. proline-rich protein, PRP) hyvin, sillä niiden pyrrolidiinirenkaasta ja karboksyyliryhmästä koostuva rakenne mahdollistaa useamman vetysidoksen muodostumisen.[25,37] Lisäksi pyrrolidiinirenkaat mahdollistavat hydrofobisten vuorovaikutusten syntymisen fenolisten renkaiden kanssa.[43,51] Ionisidokset muodostuvat emäksisissä oloissa (pH > 9) fenolisen renkaan ionisoituessa.[10,30,52] Korkean tarvittavan pH:n vuoksi ionisidosten muodostuminen tanniinien ja proteiinien välillä nisäkkäiden ruoansulatuksessa on harvinaisempaa, mutta esimerkiksi hyönteisten suoliston pH:n on todettu olevan tarpeeksi korkea ionisidosten muodostumiselle.[10]



Kuva 3. Tanniinien ja proteiinien väliset ei-kovalenttiset vuorovaikutukset. Mukailtu lähteestä Asano et al. 1982.[49]

Sekä tanniinin että proteiinin rakenteet vaikuttavat siihen, kuinka hyvin ne muodostavat kompleksin toistensa kanssa. Molemmilla rakenteen avoimuus ja notkeus parantavat kompleksinmuodostusta.[35,36] Esimerkiksi löysemmin pakkautunut globulaarinen proteiini lehmän seerumin albumiini (engl. bovine serum albumin, BSA) sitoutuu tanniineihin voimakkaammin kuin tiukemmin pakkautunut myoglobiini. Vastaavasti kuitumainen gelatiini sitoutuu tanniineihin kymmeniä kertoja voimakkaammin kuin BSA.[25,34,53] Avoin ja notkea rakenne mahdollistaa sen, että kompleksoituvat molekyylit pääsevät lähemmäs toisiaan ja kiinnittyvät toisiinsa voimakkaammin, sillä steeriset esteet ovat pienemmät ja kompleksinmuodostus on energisesti kannattavampaa.[32,34,54] Lisäksi, koska liukenemattomien tanniini–proteiini-kompleksien muodostuksessa kelatoituneet kompleksit muodostavat proteiinien välisiä sidoksia, tanniinin rakenteen notkeus helpottaa näiden ristiinsitoutumista. Suuri koko on myös sitoutumisen kannalta suotuisaa, sillä se tarjoaa enemmän paikkoja sitoutua.[25,54]

Myös väliaine vaikuttaa tanniini–proteiini-sidosten syntymiseen. Kuten aikaisemmin todettiin, pH:n vaikutus tanniini–proteiini-vuorovaikutuksiin on suuri. Proteiinin pI:n läheisyydessä kompleksinmuodostus on voimakkain ja laskee nopeasti siirryttäessä yli 0,5 yksikköä pI:stä.[25,26] Liuoksen pH voi myös vaikuttaa muodostuvien vetysidosten määrään, sillä pH:n ylittäessä fenolisen hydroksyyliryhmän pK_a:n (eli pH > 9) rakenteen hydroksyyliryhmät voivat hapettua ja tanniinien ja proteiinien välisten

vetysidosten muodostuminen vähenee.[3,24] Myös liuottimen valinta voi vaikuttaa PPC:een, sillä vetysidoksia muodostavat liuottimet voivat kilpailla sitoutumispaikoista ja samalla inhiboida tanniini-proteiini-vuorovaikutusten syntyä.[25] Myös väliaineen lämpötila ja ionivahvuus vaikuttavat tanniinien proteiiniaffiniteettiin.[53] Oh et al.[53] kuitenkin huomasivat näitä ominaisuuksia tutkiessaan, että eri proteiineilla tulokset poikkesivat toisistaan.[53] Esimerkiksi BSA:lla ionivahvuudella ja lämpötilalla ei ollut paljoa vaikutusta PA:n PPC:een, kun taas gelatiinilla ja poly-L-proliinilla lämpötilaa ja ionivahvuutta nostettaessa myös PPC kasvoi. Myös tanniinin rakenne vaikuttaa tähän: lämpötilan muutos vaikutti HT:en proteiininsaostukseen BSA:lla, mutta PA–BSA-kompleksien muodostuminen oli lämpötilasta riippumaton.[50] Väliaineen vaikutukset riippuvat siis käytetystä tanniinista ja proteiinista sekä niiden välisistä sidostyypeistä.

1.3.2. Tanniini–proteiini-kompleksien pysyvyys

Tanniini–proteiini-kompleksin pysyvyydellä arvioidaan sitä, että kuinka vaikea on saada jo muodostunut kompleksi hajoamaan, eli kuinka stabiili kompleksi on. Komplekseista pysyvämpiä ovat kovalenttisilla sidoksilla muodostuneet tanniini–proteiini-kompleksit, mutta ei-kovalenttisilla sidoksilla muodostuneiden kompleksien reversiibeli luonne on yhdistetty moniin tanniinien terveysvaikutuksiin.[42,55] Esimerkiksi märehtijöillä tanniinien on osoitettu mm. vähentävän metaanipäästöjä sekä parantavan niiden maidontuotantoa.[8,29,56–60] Maidontuotantoa parantavan vaikutuksen uskotaan johtuvan nimenomaan kompleksien reversiibelistä luonteesta, jolloin tanniini voisi sitoutua märehtijän ravinnosta saamaan proteiiniin, suojaten proteiinia pötsifermentaatiolta, ja tämän jälkeen vapauttaa proteiinin. Muodostunut kompleksi ei saa olla liian pysyvä, sillä silloin ravinnosta saatu proteiini ei vapaudu kompleksista märehtijän hyötykäyttöön ruoansulatuselimistön myöhemmissä osissa fysiologisten olosuhteiden muutoksen vaikutuksesta.[61] Tanniineja voidaan käyttää myös luonnollisina ruoan säilöntäaineina, jolloin niiden ja proteiinien muodostamien kompleksien pysyvyyden ymmärtäminen on tärkeää esimerkiksi proteiinien biologisen saatavuuden sekä mahdollisten hajoamistuotteiden vuoksi.[62,63]

Vaikka eri tanniinien rakenteellisia ominaisuuksia on liitetty niiden kykyyn saostaa proteiineja, muodostuneiden kompleksien pysyvyyttä ja pysyvyyteen vaikuttavia rakenteellisia ominaisuuksia on tutkittu vain vähän. Kompleksinmuodostukseen osallistuvien vuorovaikutusmekanismien tunteminen on kuitenkin tärkeää kompleksin pysyvyyden kannalta, sillä eri sidostyypit ovat alttiita erilaisille olosuhteiden muutoksille.[53] Aikaisemmin todettiin PA:en ja HT:en sitoutuvan proteiiniin eri

mekanismeilla[24,25,47] ja tämä vaikuttaa näiden tanniinien muodostamien kompleksien pysyvyyteen erilaisissa olosuhteissa. Esimerkiksi väliaineen ionivahvuuden on havaittu vaikuttavan HT:en vuorovaikutuksiin proteiinien kanssa enemmän kuin PA–proteiini-vuorovaikutuksiin.[24]

Korkeassa pH:ssa (eli pH:n ollessa suurempi kuin 9) tanniinien fenoliset ryhmät ovat alttiita hapettumisreaktioille, jolloin muodostuneet kinonit voivat sitoutua proteiineihin pysyvimmillä ioni- tai kovalenttisilla sidoksilla sekä useamman tanniini–proteiini-kompleksin ristiinsitoutumisella.[42,62] Matalammalla pH-alueella ioni- ja kovalenttisten sidosten muodostuminen on vähäisempää, jolloin kompleksin pysyvyys saavutetaan suuremmalla määrällä ei-kovalenttisia sidoksia kuten vetysidoksilla, hydrofobisilla vuorovaikutuksilla ja ristiinsitoutumisella. Vetysidosten on osoitettu vaikuttavan eniten ei-kovalenttisten proteiini–ligandi-kompleksien pysyvyyteen, vaikka kompleksien lopullisen pysyvyyden määrää osallistuvien ei-kovalenttisten sidosten kokonaissumma.[39,51,64,65] Vuorovaikutukset ovat korkeimmillaan kyseessä olevan proteiinin pI:n läheisyydessä, jolloin proteiinin liukoisuus on alimmillaan ja kompleksinmuodostus, varsinkin liukenemattoman sellaisen, tapahtuu herkimmin.[9,66] PA:en ja HT:en erot vuorovaikutuksissa näkyvät myös kompleksin stabiilisuudessa ympäröivän liuoksen pH:n muuttuessa.[67]

Yleisesti ottaen saman pitoisuuden PA:a ja HT:a verrattaessa PA:t sitoutuvat proteiineihin voimakkaammin kuin HT:t, ja syntyneet PA–proteiini-kompleksit ovat myös pysyvämpiä.[65,67] Muodostumista ja pysyvyyttä molempia parantavat suurempi tanniinin määrä proteiiniin nähden sekä tanniinin suurempi molekyylipaino, kun taas HT:lla ominaisuudet erosivat toisistaan rakenteen notkeuden ja galloyyliryhmien kiinnittymisen puolesta (Taulukko 1).[33,42] Ihmisen syljessä esiintyvän IB5-proteiinin kanssa kompleksoiduilla flavan-3-oli-monomeereillä ja -dimeereillä rakenteen (epi)gallokatekiiniyksiköiden sekä galloyyliryhmien on osoitettu parantavan tanniini–PRP-kompleksin pysyvyyttä (Kuva 4).[33] Myös suurempi tanniinin määrä ja koko parantavat tanniini–proteiini-kompleksin pysyvyyttä kasvattamalla yksittäisen proteiinimolekyylin pinnalle sitoutuneen tanniinin määrää ja samalla mahdollistamalla useamman sidospaikan kompleksien väliselle ristiinsitoutumiselle.[42,68] Lisäksi tanniinien vuorovaikutuksiin proteiinien kanssa vaikuttavat esimerkiksi väliaineen pH, jonka ollessa korkea helposti hapettuvat tanniinit pystyivät muodostamaan pysyvämpiä komplekseja kuin huonosti hapettuvat tanniinit.[42] Tämä tarkoittaisi sitä, että korkeassa pH:ssa paremmin hapettuvat HT:t muodostaisivat pysyvämpiä komplekseja kuin PA:t. Tanniini–proteiini-kompleksin pysyvyyttä parantamalla voidaan siis vähentää kompleksin

hajoamista väliaineen ominaisuuksien kuten lämpötilan[69], pH:n[67] ja ionivahvuuden sekä sähkökentän muuttuessa.[42,68]

Taulukko 1. Vertailu tanniinin konsentraation, rakenteellisten ominaisuuksien ja oksidatiivisen aktiivisuuden vaikutuksesta tanniini–proteiini-kompleksin pysyvyyteen ja sen muodostukseen. PA = proantosyanidiini, HT = hydrolysoituva tanniini. Koostettu lähteistä Prigent et al. 2009[54], Canon et al. 2009[68] ja 2010[33], Harbertson et al. 2014[18], Engström et al. 2016[42] ja Engström et al. 2019[36].

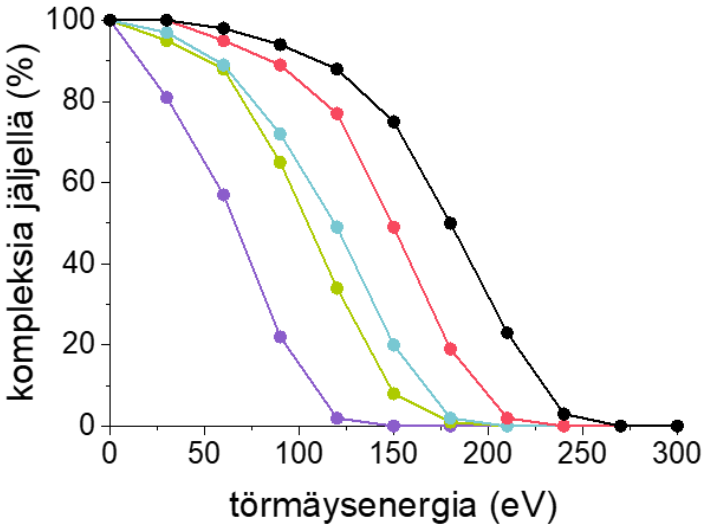
	Vaikutus kompleksin pysyvyyteen		Vaikutus kompleksin muodostukseen	
	PA	HT	PA	HT
konsentraatio	+	+	+	+
koko	+	+	+	+
rakenteellinen notkeus	-	-	+	+
prodelfinidiiniyksiköt	+	*	+	*
prosyanidiiniyksiköt	+	*	-	*
galloyyliryhmät	+	-	+	+
oksidatiivinen aktiivisuus	**	+	-	-

* Ei esiinny tanniiniluokan rakenteessa.

** Ei ole tutkittu.

Tanniini–proteiini-kompleksien pysyvyyttä on tutkittu esimerkiksi tarkastelemalla niiden entsymaattista toimintaa inhiboivaa vaikutusta ympäröivän väliaineen olosuhteita muuttamalla.[65,67] Tutkimusten menetelmät perustuivat siihen, että mitä suurempi entsymaattinen vaikutus oli havaittavissa, sitä enemmän entsyymi–tanniini-kompleksia oli saatu reversiibelisti uudelleenliukenemaan. Menetelmä havaitsee sekä liukoiset että liukenemattomat kompleksit, mutta ei niiden kompleksien uudelleenliukenemista, joissa tanniini on sitoutuessaan pysyvästi muuttanut proteiinin rakennetta. Komplekseista entsyymiä on saatu vapautettua mm. pH-muutoksella sekä neutraalien ja kationisten liuottimien sekä polyvinyylipyrrolidiinin, polyvinyylialkoholin sekä suuren molekyylipainon polyetyleeniglykolin (n. 20 000 Da) käsittelyillä.[65,67] Tanniinin ja proteiinin kompleksinmuodostukseen voivat vaikuttaa tanniinista ja proteiinin rakenteesta riippuen eri määrä useamman tyyppisiä ei-kovalenttisia sidoksia, joten myös näiden sidosten reversiibeli luonne on yksilöllinen.[46,65,69] Esimerkiksi sekundaariset

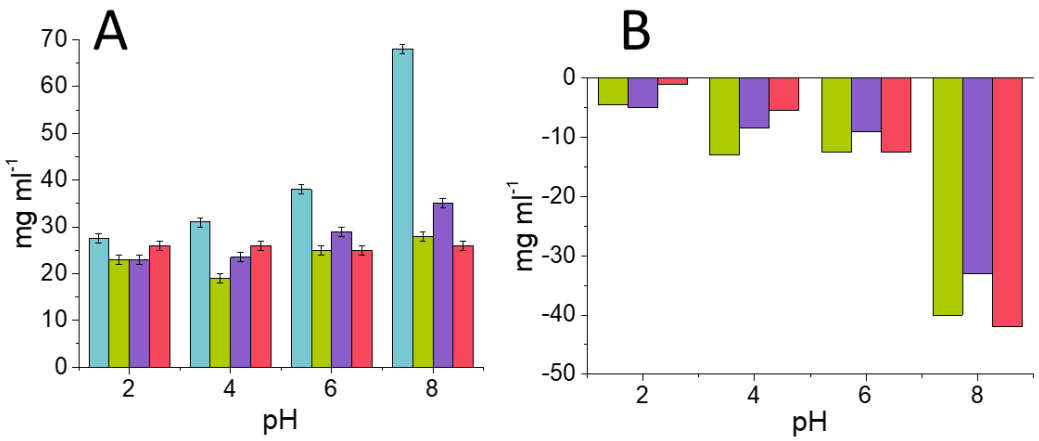
vetysidokset parantavat PGG:n ja synteettisen PRP:n muodostamien kompleksien pysyvyyttä, vaikka hydrofobiset vuorovaikutukset pyrrolidiinirenkaan kanssa ovat kompleksinmuodostuksessa pääosassa.[37,51] Proantosyanidiinifraktioiden muodostamien kompleksien on osoitettu olevan pysyvämpiä kuin HT-seosten ja proteiinin muodostamat kompleksit.[65] Pidemmissä PA-polymeereissä voikin olla enemmän sitoutumispaikkoja tanniinin ja proteiinin välisille sekundaarisille vetysidoksille. Myös proteiinin rakenne vaikuttaa kompleksien pysyvyyteen, esimerkiksi syljen PRP:en rakenteessa usein toistuvat aminohapposekvenssit parantavat kompleksin pysyvyyttä mahdollistamalla useamman ristiinsidoksen muodostumisen.[51,65]



Kuva 4. Tanniini–proteiini-kompleksien pysyvyyttä voidaan tutkia myös tarkastelemalla kompleksin suhteellista määrää tandemmassaspektrometriassa käytetyn törmäysenergian funktiona. Törmäysenergian on tarkoitus hajottaa muodostunut kompleksi törmäyskammiossa (engl. collision-induced dissociation, CID), joten mitä suurempi määrä kompleksia on jäljellä törmäysenergian kasvaessa, sitä parempi sen pysyvyys on. Proteiinina oli ihmisen syljen proliinirikas proteiini. B2-3'-*O*-gallaatti (musta), B2 (pun.), epigallokatekiini-3-*O*-gallaatti (sin.), epikatekiini-3-*O*-gallaatti (vihr.) ja epigallokatekiini (viol.) B2 = dimeerinen proantosyanidiini. Mukailtu lähteestä Canon et al. 2010.[33]

Koska pH:lla on merkittävä vaikutus tanniini–proteiini-kompleksien muodostukseen[26,70], Dentinho ja Bessa[67] vertailivat pihkakistuksen (*Cistus ladanifer* L.), viiniköynnöksen siementen (*Vitis vinifera* L.) sekä kebratsopuun (*Schinopsis quebracho-colorado* Schlecht) PA:den ja soijarouheen (*Glycine max*) proteiinin sekä kuitujen muodostamien kompleksien stabiilisuutta eri pH-arvoissa. Soijarouheen proteiinin pI on 4,2–4,6. Käytetyt pH-arvot olivat 2, 4, 6 ja 8. Proteiinin hajoamista mitattiin liuenneen typen määrää tarkastelemalla, sillä sitä pidetään hyvänä määreenä mittaamaan

pötsifermentaation määrää.[57] Alimmalla pH-arvolla typen liukoisuus oli parhaimmillaan, eikä tanniinikäsittelyllä saatu aikaan proteiinia suojaavaa kompleksinmuodostusta. Kun pH:ta kasvatettiin, suurempi määrä tanniinia sitoutui proteiiniin kaikkien näytteiden kohdalla, laskien liuenneen typen määrää (Kuva 5). Kaikki käytetyt tanniinit pystyivät muodostamaan proteiinin kanssa komplekseja pH:ssa 6–8, ja pH:ssa 2 nämä kompleksit olivat liuenneena lähtöaineikseen. Näytteiden välillä oli eroja, esimerkiksi pihkakistuksen kohdalla pH:n kasvattaminen sai aikaan selvemmän reaktion kuin esimerkiksi kebratsopuun. Kebratsopuun kokonaisfenoli- ja PA-pitoisuudet olivat suuremmat kuin pihkakistuksen, mutta pihkakistus taas on PA-rikkaampi. HT-rikkaan kebratsopuun havaittiin estävän proteiinin hajoamista huonoiten pH:n kasvaessa kuudesta kahdeksaan verrattuna PA-rikkaampiin pihkakistukseen ja viiniköynnökseen.



Kuva 5. Proteiinin yksi hajoamistuotteista on väliaineeseen liuennut typpi. Proteiiniin kiinnittyneen tanniinin on todettu suojaavan proteiinia hajoamiselta, joten tanniini–proteiini-kompleksien muodostumista ja pysyvyyttä pH:n suhteen voidaan tarkastella mittaamalla liuenneen typen pitoisuutta eri pH-arvoissa. (A) Tanniinikäsitellystä proteiinista liuenneen typen pitoisuus pH:n funktiona sekä (B) erot liuenneen typen pitoisuudessa kontrollinäytteen sekä tanniinikäsiteltyjen näytteiden välillä eri pH-arvoilla; kontrollinäyte (sin.), viiniköynnös (vihr.), kebratsopuu (viol.) ja pihkakistus (pun.). Mukailtu lähteestä Dentinho & Bessa, 2016.[67]

pH-alueella 4–6 PA:t vaikuttavat muodostavan pysyvämpiä komplekseja proteiinien kanssa kuin HT:t.[42,65,71] Tästä korkeammilla pH-arvoilla helpommin hapettuvien yhdisteiden, eli HT:en, on osoitettu muodostavan pysyvämpiä komplekseja, johtuen vallitsevien vuorovaikutusten muuttuessa ei-kovalenttisesta kovalenttiseen pH:n kasvaessa.[42] Engström et al.[42] tutkivat pH:n ja oksidatiivisten olosuhteiden sekä tanniinirakenteen vaikutusta liukoisten tanniini–proteiini-kompleksien pysyvyyteen. Kompleksien muodostumisen ja pysyvyyden määrittämiseen käytettiin geelielektroforeesia sekä matriisiavusteista laserdesorptioionisaatio

lentoaikamassaspektrometriaa (engl. matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF).

He liittivät tanniinien oksidatiivisen aktiivisuuden parempaan pysyvyyteen ja voimakkaampaan tanniini–proteiini-kompleksin muodostumiseen neutraalissa ja emäksisessä pH:ssa.[42] Muodostuneet kompleksit olivat tarpeeksi pysyviä kestämään sähkökentän muutoksen ja ionisaation (MALDI-TOF) aiheuttaman ärsykkeen. Hyvin hapettuvien yhdisteiden muodostamien kompleksien stabiilisuus parani pH:n noustessa. Huonommin hapettuvat yhdisteet taas pystyivät muodostamaan pysyvämpiä komplekseja happamammissa olosuhteissa (pH 5). Saadut tulokset osoittivat, että paremmin hapettuvien yhdisteiden kohdalla suurempi määrä tanniinia pystyi kiinnittymään yhteen BSA-molekyyliin korkeammassa pH:ssa. Pysyvimmissä tanniini–proteiini-komplekseissa oli siis kiinni useampi tanniinimolekyyli yhtä BSA-molekyyliä kohden, ja tanniini–proteiini-kompleksin pysyvyyden onkin myös muissa tutkimuksissa havaittu paranevan proteiiniin kiinnittyneiden tanniinimolekyylien määrän kasvaessa.[51,68]

Oksidatiivisen aktiivisuuden lisäksi tanniini–proteiini-kompleksien ominaisuuksiin vaikuttivat muun muassa tanniinin koko sekä rakenteen notkeus.[42] Esimerkiksi pH:ssa 6,7 veskalagiinin ja veskavaloniinihapon (yhdisteet **5** ja **6**, Kuva 2) muodostamien tanniini–proteiini-kompleksien pysyvyydessä havaittiin eroja, vaikka tanniinit eroavat rakenteeltaan vain yhdellä gallushapolla. Veskavaloniinihapon rakenteellista notkeutta lisäävän gallushapon todettiin laskevan kompleksin pysyvyyttä. Samanlaisia eroja pysyvyydessä havaittiin myös oenotheiini A:n ja oenotheiini B:n (yhdiste **4**, Kuva 2) välillä. Jäykemmän oenotheiini B:n muodostamat kompleksit olivat pysyvämpiä kuin notkeamman oenotheiini A:n, vaikka jälkimmäisen on todettu sitoutuvan voimakkaammin proteiineihin.[35] Engström et al.[42] epäilivätkin, että oenotheiini A muodostaisi sekä pysyviä että labiileja komplekseja proteiinin kanssa. Sama havaittiin myös veskavaloniinihapon kohdalla.

Tanniinikäsiteltyjen proteiinien on tutkittu myös olevan vähemmän alttiita lämpötilan aiheuttamalle denaturoimiselle, johtuen muodostuneiden tanniini–proteiini-kompleksien pysyvyydestä lämpötilan funktiona.[54,68,69,72] Esimerkiksi lisättäessä teestä uutettuja flavan-3-oli-monomeerejä ja -dimeerejä rasvattomaan maitoon, maidon lämpöstabiilisuus kasvoi.[72] Tanniinikäsittelyllä on siis mahdollista parantaa ravinnosta saatavien proteiinien stabiilisuutta esimerkiksi elintarviketeollisuudessa esiintyvän lämpökäsittelyn aikana, jonka yksi ongelmista on juuri globulaaristen proteiinien denaturaatio ja saostuminen.[73] Tanniinit pystyvät myös vähentämään ihmisen ruoansulatuselimistön entsyymien denaturaatiota lämpötilan funktiona, mutta samalla

inhiboivat entsymaattista aktiivisuutta kiinnittymällä niiden aktiivisiin keskuksiin ja/tai muuttamalla proteiinin muotoa sitoutumisen yhteydessä.[69]

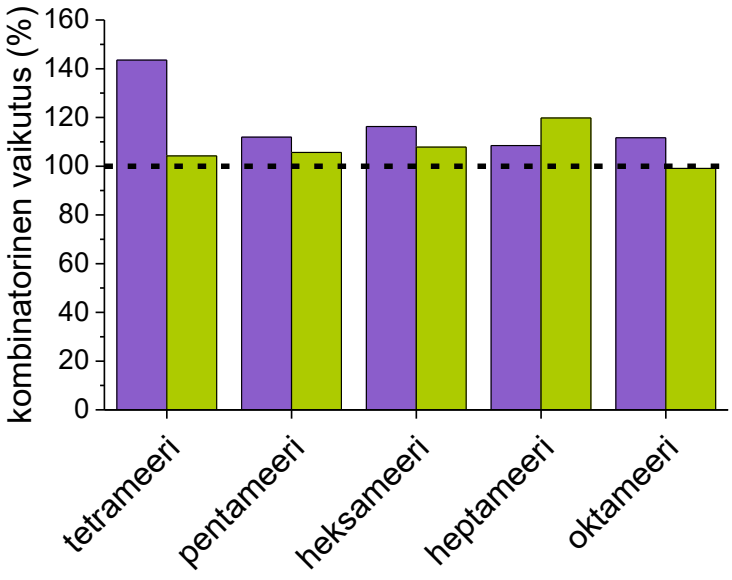
1.3.3. Tanniiniseosten kombinatorinen vaikutus proteiininsaostukseen

Eri tanniinien PPC:ä on tutkittu paljon ja yhdisteiden puhdistusmenetelmien kehittyminen on mahdollistanut rakenteellisten ominaisuuksien yhdistämisen bioaktiivisuuteen.[17,18,35] Vaikka tiettyjä rakenteellisia ominaisuuksia on liitetty PPC:een, näiden ominaisuuksien systemaattista yhteisvaikutusta puhdistettujen tanniinien seoksilla on tutkittu hyvin vähän. Puhdistamattomilla tanniiniseoksilla yhteisvaikutusta tanniini–proteiini-kompleksien muodostumiseen on kuitenkin tutkittu märehtijöillä, ja tulokset viittasivatkin synergiseen vaikutukseen esimerkiksi metaanipäästöjen alentamisessa.[18,32,58,74–78] Hydrolysoituvien tanniinien puhdistus yksittäisiksi yhdisteiksi on mahdollista, joten niiden kohdalla on voitu tarkasti tutkia rakenteellisten ominaisuuksien vaikutusta tanniini–proteiini-kompleksien muodostukseen.[5] Suuren mDP:n PA:t eluoituvat kuitenkin kromatografisina kumpuina, minkä takia suuria yksittäisiä PA-polymeerejä on ollut tähän mennessä vaikea puhdistaa. Kirjallisuudessa mainitut oligo- ja polymeeriset PA:t ovatkin todellisuudessa lähes aina PA-seoksia.[15,79] Parhaimmillaan on pystytty puhdistamaan oktameerisia PA:ja[80] ja PA-kumpua on voitu jakaa pienempiin osiin.[17] Yhdisteiden puhtauden kannalta HT:ta pystyttäisiin siis paremmin tutkimaan niiden kombinatoristen vaikutusten osalta, kun taas PA:lla tutkimus tapahtuisi joko käyttämällä pieniä puhtaita oligomeerejä tai puhdistettuja suuremman mDP:n polymeeriseoksia. Tanniiniseosten ominaisuuksien tutkimiseen olisi hyvä saada puhdistettua sekoitettavat tanniinit mahdollisimman hyvin, jotta korrelaatio seoksen PPC:n ja rakenteellisten ominaisuuksien välillä olisi selvä.[59]

Vaikka tanniinien kombinatorista vaikutusta on tutkittu vain vähän, niiden yhteisvaikutusta on esiintynyt eniten sekoitettaessa hyvin ja huonosti proteiinia saostavaa tanniinia,[18] ja vaikutus on liitetty proteiinin laskostumisen muutokseen tanniinin sitoutuessa siihen.[9,26,39,69] Myös tanniinin rakenne voi muuttua proteiiniin sitoutuessa.[40] Proteiinin mahdolliseen laskostumisen muutokseen vaikuttavat itse proteiinin rakenne, käytettävä tanniini sekä vallitsevat olosuhteet. On esimerkiksi havaittu, että globulaariset proteiinit denaturoituvat irreversiibelisti kromatografisissa olosuhteissa[81], kun taas proteiinin laskostumisen muutos vältettiin muuttamalla olosuhteita vähemmän kompleksien välistä ristiinsitoutumista ja proteiinin saostumista suosivaksi.[39] Voimakkaammin proteiiniin sitoutuva tanniini voisi sitoutuessaan muuttaa proteiinin muotoa niin, että uusia sitoutumispaikkoja paljastuisi huonommin proteiinia saostavalle

tanniinille.[18,54] Tämän jälkeen pienemmän proteiiniaffiniteetin tanniini voisi kiinnittyä ei-kovalenttisesti paljastuneisiin sitoutumispaikkoihin. Tällöin havaittu kombinatorinen vaikutus olisi suurempi kuin jos tanniinit sitoutuisivat proteiiniin erikseen. Eri tanniinien on myös havaittu inhiboivan toisten tanniinien ominaisuuksia seoksissa, jolloin tanniiniseosten yhteisvaikutus voi olla tarkastellun ominaisuuden kannalta myös negatiivinen.[30,82]

Puhdistetuilla PA:lla yhteisvaikutus PPC:een on yleisesti havaittu olevan additiivinen, mutta pienemmän mDP:n PA:ta lisättäessä suuremman mDP:n puhdistettuun PA:iin on havaittu synergistä vaikutusta (Kuva 6).[18] Yhteisvaikutus saattaa johtua siitä, että pienempi tanniini pystyy käyttämään hyväksi myös ne sitoutumispaikat, joihin suurempi tanniini ei steeristen esteiden vuoksi pääse sitoutumaan. Toinen vaihtoehto havaitulle kombinatoriselle vaikutukselle on edellä mainittu proteiinin laskostumisen muutos. Kyseistä vaikutusta on havaittu etenkin pienimmillä tanniini–proteiini-moolisuhteilla.[18,54,76] Myös PA-seoksen prosyanidiiniyksiköiden on havaittu edesauttavan uusien vuorovaikutusten syntyä tanniinien ja proteiinien välillä.[32,74]

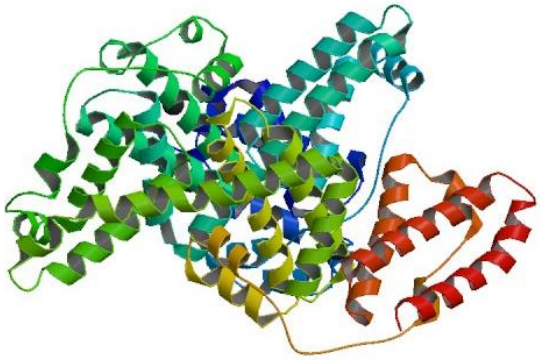


Kuva 6. Puhdistettujen proantosyanidiinien kombinatorinen vaikutus proteiininsaostukseen lisättäessä 500 µg (viol.) ja 1000 µg (vihr.) trimeeristä prosyanidiinia. 100 % kombinatorinen vaikutus on additiivinen ja yli 100 % vaikutus on synerginen, eli proteiininsaostus on odotettua suurempi. Mukailtu lähteestä Harbertson et al. 2014.[18]

1.4. Työn tarkoitus

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia PA–proteiini-kompleksien muodostumista, niiden pysyvyyttä pH:n funktiona sekä PA:en ja HT:en kombinatorisia vaikutuksia proteiinikompleksien muodostumiseen. Näiden tanniinien PPC:ta ja rakenteellisia ominaisuuksia, kuten mDP:tä, PC/PD-suhdetta ja galloyyliryhmien määrää (PA:t) sekä kokoa ja polyolin avoketjuisuutta (HT:t) verrattiin systemaattisesti saatuun dataan. Saatua tietoa voitaisiin soveltaa lisäämällä märehtijöiden rehuun tanniineja, jolloin optimaalisesti pystyttäisiin parantamaan maidontuotantoa suojaamalla lehmien ravinnosta saatuja proteiineja märehtimisprosessissa hajoamiselta muodostamalla tanniini–proteiini-komplekseja, jotka uudelleenliukenisivat myöhemmin ruoansulatuskanavassa. Uudelleenliuenneista komplekseista vapautuneet tanniinit voisivat sen jälkeen toimia luonnollisena matolääkkeenä lehmien suoliston haitallisia loisia vastaan, tarjoten vaihtoehtoisen lääkitsemiskeinon eläimille. Hydrolysoituvien tanniinien uudelleenliukenemista on tutkittu jo aikaisemmin[83], mutta PA:lle tällaista systemaattista rakenteellista tarkastelua ei ole vielä tehty. Tanniineilla on aikaisemmin havaittu olevan kombinatorista vaikutusta niiden muodostamien seosten bioaktiivisuuteen, mutta kombinatorista yhteisvaikutusta ei ole suoraan linkitetty rakenteellisiin ominaisuuksiin. Luonnossa tanniinit esiintyvät seoksina, joten biologisen aktiivisuuden kannalta rakenteellisen yhteisvaikutuksen tunteminen on tärkeää tanniinien hyötykäyttöön valjastamisessa.

Malliproteiinina työssä käytettiin BSA:ta, joka on tanniinianalytiikassa usein käytetty globulaarinen kuljetusproteiini (Kuva 7).[35,42,45] BSA:ta käytetään sen saatavuuden lisäksi myös siksi, että se on muodoltaan saman tyyppinen proteiini kuin lehtimateriaalin yleisin proteiini, ribuloosi-1,5-bisfosfaattikarboksylaasi eli rubisco.[45] Käytetyt PA:t oli puhdistettu semipreparatiivisesti ja edustivat laajaa kirjoa sekä mDP:n että PC/PD-suhteen osalta. HT:t oli valittu pääosin niiden PPC:n ja rakenteellisen monimuotoisuuden perusteella.



Kuva 7. Globulaarisen lehmänseerumin albumiinin kolmiulotteinen rakenne (PDB ID: 3V03).

2. Materiaalit ja menetelmät

2.1. Käytetyt reagenssit ja liuottimet

Yhdisteiden semipreparatiiviseen puhdistamiseen käytettiin LC-MS-laatuista asetonitriiliä (VWR Chemicals, USA) ja 0,1 % muurahaishappoa (VWR Chemicals, EC, Ranska). BSA-puskuriliuosten valmistukseen käytettiin puhtaudeltaan > 99 % BioXltra L-askorbiinihappoa (Sigma-Aldrich Co., USA) sekä Aa-laatuista etikkahappoa (100 %, VWR Chemicals, EC, Ranska). Työssä käytetty BSA oli Cohn Fraction V -jauhetta (66 kDa), joka oli puhdistettu agaroosigeelielektroforeesilla (> 96 %, Sigma-Aldrich Co., USA). Uudelleenliukenemisanalyyseissä käytettyjen pH-puskureiden kantaliuosten valmistukseen käytettiin sitraattihappoa (> 99 %, Merck KGaA, Saksa) ja kidevedellistä natriumvetyfosfaattia (> 98 %, Merck KGaA, Saksa). Näytteiden liuottamiseen ja laimennussarjojen valmistamiseen käytettiin Aa-laatuista etanolia (> 99,5 %, ALTIA Oyj, Suomi). Kaikki työssä käytetty vesi oli ultrapuhdasta vettä, joka oli puhdistettu Millipore Synergy -laitteistolla (Merck KGaA, Saksa).

2.1.1. 12,5 ja 50 mM pH 5 -puskuriliuosten valmistus

12,5 mM pH 5 -puskuriliuos valmistettiin sekoittamalla 800 ml:aan ultrapuhdasta vettä 2,65 mg askorbiinihappoa ja lisäämällä sen jälkeen 0,71 ml 100 % etikkahappoa liuokseen. Tämän jälkeen liuoksen pH säädettiin pH 5:een lisäämällä tipoittain tarvittava määrä 0,5 M NaOH -liuosta. Liuos siirrettiin 1 l mittapulloon ja täytettiin ultrapuhtaalla vedellä merkkiin. 50 mM puskuriliuos valmistettiin kuten edellä, mutta kaikkien lisättävien reagenssien määrä kerrottiin neljällä ja pH säädettiin käyttämällä 2 M NaOH-liuosta.

2.1.2. Proteiiniliuosten valmistus

Työssä käytettiin kahta erilaista 200 µM BSA -liuosta, joiden erona oli käytetyn pH 5 puskurin molaarisuus (12,5 tai 50 mM). 200 µM BSA -liuos valmistettiin punnitsemalla 2,66 g BSA:ta mittapulloon, jonka jälkeen mittapullo täytettiin merkkiin pH 5 -puskurilla (kohta 2.1.1). Tämän jälkeen liuos siirrettiin lasipulloon ja sitä säilytettiin kylmähuoneessa (+ 4 °C). Liuos otettiin huoneenlämpöön aina tuntia ennen analyysejä, jonka aikana sitä sekoitettiin magneettisekoittajalla.

2.1.3. Sitraattifosfaattipuskuriliuokset

Uudelleenliukenemisanalyysejä varten valmistettiin sitraattifosfaattipuskureita viidessä eri pH:ssa siten, että lopulliset pH:t olivat kuoppalevyllä 3, 4, 5, 6 ja 7. Puskureita varten valmistettiin kantaliuokset 0,1 M sitraattihappo (A) ja kidevedellinen natriumvetyfosfaatti ($Na_2HPO_4 \cdot 7H2O$) (B). Sitraattihappoa punnittiin 19,21 g ja kidevedellistä natriumvetyfosfaattia 53,65 g, jonka jälkeen ne liuotettiin litran mittapulloissa ja mittapullot täytettiin merkkiin. Tämän jälkeen sitraattifosfaattipuskurit valmistettiin taulukon 2 mukaan, jonka jälkeen puskurit laimennettiin ultrapuhtaalla vedellä neljäsosaan ja niiden pH säädettiin 1 M suolahapolla haluttuun arvoon.

Taulukko 2. Uudelleenliukenemisanalyyseissä käytettyjen sitraattifosfaattipuskurien valmistus. Kantaliuokset olivat 0,1 M sitraattihappo (A) ja kidevedellinen natriumvetysulfaatti (B). Puskurit laimennettiin vedellä neljäsosaan ennen pH:n säätöä.

Lopullinen pH	pH ennen säätöä	Kantaliuos A (ml)	Kantaliuos B (ml)
3,0	3,2	44,6	5,4
4,0	4,3	30,7	19,3
5,0	5,3	24,3	25,7
6,0	6,4	17,9	32,1
7,0	7,5	6,5	43,6

2.2. Käytetyt näytteet

Työssä käytetyt 40 PA-fraktiota oli aikaisemmin puhdistettu kahdeksan PA-rikkaan kasvin (Taulukko 3) uutteista käyttäen Sephadex LH-20 kromatografiaa sekä PA:en fraktiointiin kehitettyä semipreparatiivista nestekromatografiamenetelmää (LC, engl. liquid chromatography).[17] Jokaisen näytteen kromatografinen PA-kumpu jaettiin pinta-alan mukaan viiteen yhtä suureen osaan TargetLynx -ohjelmalla (V4.1 SCN876 SCN 917 © 2012 Waters Inc.) ja saadut fraktiot yhdistettiin tämän mukaisesti.

Puhdistettujen PA-fraktioiden kvantitatiiviset ominaisuudet (Taulukko 3) määritettiin Acquity UPLC -laitteistolla (Waters Corp., Milford, MA, USA), joka oli yhdistetty Xevo TQ kolmoiskvadrupolimassaspektrometriin (Waters Corp., Milford, MA, USA). Näytteet ionisoitiin sähkösumutusionisaatiolla (engl. electrospray ionization, ESI). Käytetty kolonni oli Waters Acquity UPLC BEH fenyylikolonni (1,7 µm; 2,1 × 100 mm). Analyyseissä ajoliuoksina olivat asetonitriili (A) ja 0,1 % muurahaishapon vesiliuos (B) ja gradientti oli seuraavanlainen: 0–0,5 min A: 0,1 % (isokraattinen gradientti); 0,5–5,0 min A: 0,1–30 % (lineaarinen gradientti); 5,0–8,0 min A: 30–40 % (lineaarinen gradientti) ja 8,0–11,5 min kolonnin pesu ja stabilointi. Eluentin virtausnopeus oli 0,50 ml/min ja näytteiden injektiotilavuus 5 µl. Kapillaarijännitteen arvona käytettiin 3,4 kV ja ionilähteen lämpötila oli 150 °C. Haihdutus- ja suojakaasuna käytettiin typpeä ja niiden virtausnopeudet olivat 1000 l/h. Näytteet analysoitiin aiemmin kehitetyllä MRM-menetelmällä (Engström et al.).[84] Uudelleenliukenemisanalyyseihin käytettiin kaikkia 40 PA-fraktioita ja kombinatorisiin analyyseihin valittiin kromatografisen kummun fraktiot 1, 2 ja 5 vastaavasti näytteistä 1676, 1734 ja 1591/1592. Kaikki tanniininäytteet liuotettiin 10 % etanoli-vesi-liuokseen (v/v) ennen analysointia.

Taulukko 3. Yhdistettyjen semipreparatiivisten proantosyanidiinifraktioiden alkuperäiset kasvilajit sekä kvantitatiivisesta UPLC-DAD-QqQ-MS/MS-datasta saadut fraktioiden prodelfinidiiniosuus (PD-%), keskimääräinen polymerisaatioaste (mDP), keskimääräinen molekyylipaino (keskim. Da) sekä niiden proteiininsaostuskyvystä kertova arvo (engl. effective concentration, EC_{50}). Mitä pienempi EC_{50}-arvo on, sitä paremmin fraktio saostaa proteiinia.

Alkuperä	**Näyte**	**PD-%**	**mDP**	**keskim. Da**	**EC_{50} (mmol/l)**
Rhododendron dichroanthum Diels.	1676 FR 1	33,9	7,1	2096,1	0,22
	1676 FR 2	18,2	7,9	2313,3	0,19
	1676 FR 3	13,4	9,0	2620,3	0,18
	1676 FR 4	10,8	10,8	3141,4	0,16
	1676 FR 5	13,8	11,8	3421,9	0,16
Valkoapila (*Trifolium repens*)	1628 FR 1	98,4	12,9	3928,9	0,11
	1628 FR 2	97,9	17,7	5388,1	0,07
	1628 FR 3	96,4	20,8	6323,8	0,08
	1628 FR 4	95,4	21,2	6444,5	0,08
	1628 FR 5	94,4	23,2	7035,6	0,08
Kiiltolehtipaju (*Salix phylicifolia*)	1636 FR 1	84,6	15,4	4635,9	0,11
	1636 FR 2	77,8	23,4	7028,7	0,06
	1636 FR 3	73,8	26,6	7988,2	0,06
	1636 FR 4	73,7	27,5	8248,4	0,07
	1636 FR 5	72,5	26,3	7895,6	0,08

Alkuperä	Näyte	PD-%	mDP	keskim. Da	EC_{50} (mmol/l)
Taikinamarja (*Ribes alpinum*)	1591_1592 FR 1	98,0	17,6	5353,5	0,08
	1591_1592 FR 2	97,0	24,2	7361,9	0,06
	1591_1592 FR 3	96,0	28,0	8501,2	0,05
	1591_1592 FR 4	95,0	31,5	9554,3	0,05
	1591_1592 FR 5	93,6	29,6	8962,2	0,06
Lehtikuusi (*Larix* sp)	605 FR 1	95,9	20,4	6195,4	0,07
	605 FR 2	93,7	24,9	7557,9	0,05
	605 FR 3	91,4	27,7	8389,7	0,05
	605 FR 4	87,1	28,5	8594,8	0,05
	605 FR 5	82,4	27,6	8322,2	0,07
Männyn kuori (*Pinus sylvestris*)	1734 FR 1	1,1	8,3	2391,8	0,21
	1734 FR 2	1,2	12,1	3488,0	0,13
	1734 FR 3	1,2	13,4	3866,2	0,13
	1734 FR 4	1,3	13,7	3945,2	0,15
	1734 FR 5	1,4	13,8	3968,4	0,15
Metsäapila (*Trifolium medium*)	1589 FR 1	1,1	9,2	2660,6	0,18
	1589 FR 2	1,0	13,3	3831,3	0,11
	1589 FR 3	1,0	16,5	4759,3	0,10
	1589 FR 4	1,2	17,3	4974,0	0,11
	1589 FR 5	1,6	16,8	4840,6	0,12
Mänty, neulaset (*Pinus sylvestris*)	1639 FR 1	85,9	12,6	3811,0	0,14
	1639 FR 2	75,8	15,6	4670,6	0,11
	1639 FR 3	73,0	16,9	5066,9	0,10
	1639 FR 4	77,1	18,9	5684,8	0,10
	1639 FR 5	74,7	19,2	5764,5	0,10

Lisäksi työssä käytettiin kombinatorisiin analyyseihin kuutta eri puhdistettua HT:a, jotka on lueteltu taulukossa 4. Hydrolysoituvien tanniinien rakenteet on esitetty kuvassa 2.

Taulukko 4. Työssä käytetyt hydrolysoituvat tanniinit sekä niiden keskimääräiset molekyylipainot, puhtaudet ja alkuperäkasvit.

	Hydrolysoituva tanniini	Molekyyli-paino (Da)	Puhtaus (%)*	Alkuperä
1	Gemiini A	1872,2	98,2	Kyläkellukka (*Geum urbanum*)
2	Sanguiini H-6	1870,2	92,6	Vadelma (*Rubus idaeus*)
3	Pentagalloyyliglukoosi	940,1	99,8	Kaupallinen parkkihappo
4	Oenotheiini B	1568,2	98,2	Maitohorsma (*E. angustifolium*)
5	Veskalagiini	934,1	94,1	Rantakukka (*Lythrum salicaria*)
6	Veskavaloniinihappo	1102,1	95,6	Metsätammi (*Quercus robur*)

* Puhtaus määritettiin UPLC-DAD:lla aallonpituusalueella 280 nm (Engström et al. 2019[36]).

2.3. Proantosyanidiini–proteiini-kompleksien uudelleenliukenemisanalyysit

Proantosyanidiini–BSA-kompleksien pysyvyyttä mitattiin kuoppalevylukijalla (Labsystems Multiskan Ascent 414 nm) turbidometristä menetelmää käyttäen. Aallonpituuksilla 370 ja 414 nm mitattiin muodostuvan liukenemattoman tanniini–proteiini-kompleksin absorbanssia 16 minuutin ajan 30 sekunnin välein. Kuoppalevyohjelmaan kuuluivat minuutin ravistelu ennen ohjelman alkua sekä 10 s ravistelu ennen jokaista mittauspistettä. Analyysit koostuivat kahdesta osasta: ensimmäisessä vaiheessa muodostui PA–BSA-kompleksi, joka seuraavassa vaiheessa uudelleenliuotettiin käyttämällä sitraattifosfaattipuskureita viidessä eri pH:ssa. Käytetty 200 µM BSA -liuos oli valmistettu 12 ,5 mM pH 5 -puskuriliuokseen.

Yhteensä 40 PA-fraktiota analysoitiin konsentraatioissa 0,05; 0,1 ja 0,2 mM siten, että jokaisesta konsentraatiosta analysoitiin yksi taustanäyte, kolme PA–BSA-taustakompleksia ja kolme uudelleenliuotettua PA–BSA-kompleksia viidessä eri pH puskurissa. Ensimmäisessä mittauksessa lisättiin kuoppalevylle 100 µl PA-näytettä ja 100 µl 10 % etanolia (taustanäytteet) tai BSA:ta (kompleksi- ja uudelleenliuotetut näytteet). Toisessa mittauksessa sekä taustanäytteisiin että PA–BSA-kompleksinäytteisiin lisättiin 100 µl 10 % etanolia ja uudelleenliuotettuihin PA–BSA-kompleksinäytteisiin lisättiin 100 µl puskuriliuosta.

Uudelleenliukenemisanalyysien jälkeen jokaiselle fraktiolle laskettiin pH-puskurin lisäämisen vaikutus verrattuna taustakompleksiin kolmessa eri konsentraatiossa (0,2; 0,1 ja 0,05 mM) ja saaduista arvoista tehtiin kuvaajat Origin2016-ohjelmalla (© OriginLab

Corporation, USA) niin, että y-akselilla oli PA–BSA-kompleksin määrä (%) liuoksessa pH:n funktiona. Kuvaajille sovitettiin gaussin käyrän mukaiset suorat ja suorista laskettiin pH-arvot, jossa PA–BSA-kompleksia oli uudelleenliukenemisen jälkeen jäljellä 50 % (pH_{50}) (Kuva 8 ja liitteet 1–7).

2.4. Kombinatoriset proteiininsaostusanalyysit

Hydrolysoituvien tanniinien seosten (HT+HT) kombinatorista vaikutusta tarkasteltiin mittaamalla ensin jokaisen yksittäisen puhdasaineen liukenemattoman kompleksin muodostus viidessä eri konsentraatiossa (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ja 1,0 mM) ja sen jälkeen pipetoimalla 50 µl kahta eri puhdasainetta kuoppalevylle niin, että titrattavan puhdasaineen konsentraatio oli 0,6 mM ja titraavan (eli jokaista analyysiä varten 5 eri HT:a) konsentraatioalue oli edellä mainittu 0,2–1,0 mM. Yhdisteitä **1** ja **2** jouduttiin liian suurten absorbanssien vuoksi titraamaan konsentraatiossa 0,2 mM. Rinnakkaisia näytteitä oli kolme jokaista konsentraatiota ja seosta kohden. Analyyseissä käytettiin proteiiniliuoksena BSA:ta, joka oli tehty 50 mM pH 5 -puskuriliuokseen ja mittauksiin käytettiin samaa kuoppalevylukijaa samoilla aallonpituuksilla kuin kohdassa 2.3. Absorbanssia mitattiin 30 s välein 30 minuutin ajan ja ohjelmaan kuului minuutin ravistelu ennen mittauksen alkua sekä 10 s ravistelu ennen jokaista mittauspistettä. Ennen BSA:n pipetointia kuoppalevylle levyä ravisteltiin minuutin ajan puhdasaineiden sekoittumisen varmistamiseksi.

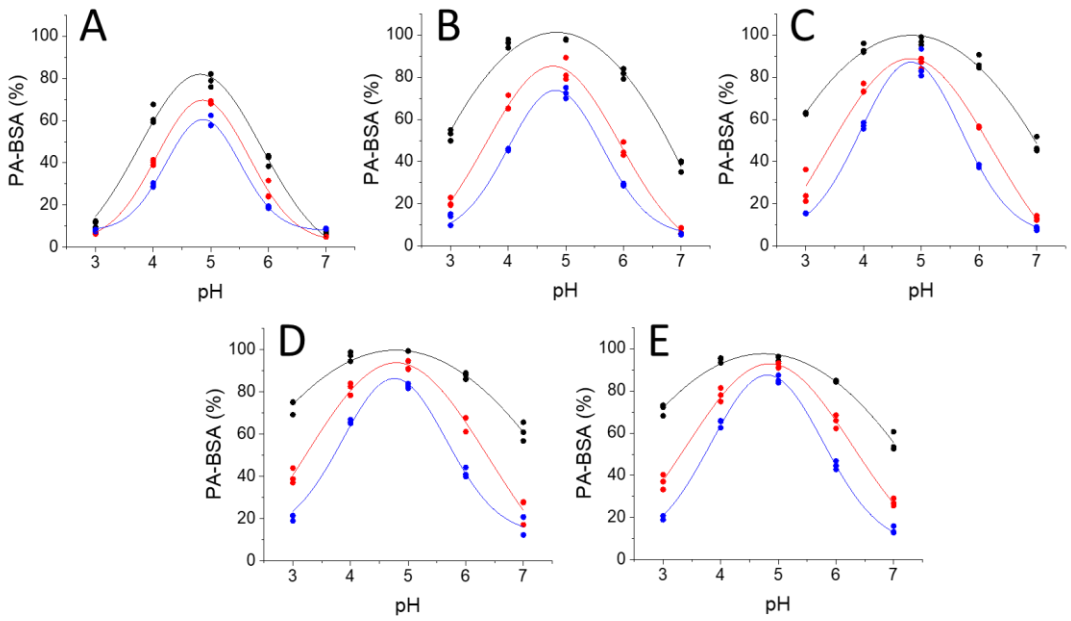
Lisäksi analysoitiin tanniiniyhdistelmät HT+PA, PA+PA ja PA+HT. HT+PA-yhdistelmät mitattiin titraamalla yhdisteitä **3**–**6** kolmella eri PA-fraktiolla 1676 FR 1, 1734 FR 2 ja 1591/1592 FR 5. Titrattavan HT:n pitoisuus pidettiin vakiona 0,2 mM:ssa ja PA:n pitoisuudet olivat 0,05; 0,1 ja 0,2 mM. Proantosyanidiineja titrattaessa niiden pitoisuus pidettiin 0,1 mM:ssa ja titraavat PA:t olivat pitoisuuksissa 0,05–0,2 mM ja HT:t 0,2–1,0 mM. Analyysit suoritettiin samalla tavalla kuin HT+HT-yhdistelmien kanssa.

Saaduista tuloksista laskettiin seosten teoreettinen absorbanssi summaamalla puhdasaineiden antamat vasteet samassa pitoisuudessa kuin ne olivat seoksessa, ottaen huomioon tanniinikonsentraation laimenemisen seoksessa. Tanniiniseosten proteiininsaostuksen oletettiin siis olevan additiivinen. Saatuja teoreettisia vasteita verrattiin tämän jälkeen seosten mitattuihin absorbanssiarvoihin.

3. Tulokset ja niiden tarkastelu

3.1. Uudelleenliukenemisanalyysit

Uudelleenliukenemisanalyysien Origin-kuvaajista nähdään näytteiden väliset erot niiden BSA:n kanssa muodostamien kompleksien pysyvyydessä. Erot korostuivat etenkin korkeimmassa konsentraatiossa (0,2 mM), jossa pH_{50}-arvoa ei saatu PA-kummun loppupään fraktioilla määritettyä käytetyllä pH-haarukalla (Kuva 8). Tämä osoittaa, että mitä suurempi moolisuhde tanniinin ja proteiinin välillä on, sitä vaikeampi kompleksi on saada uudelleenliukenemaan. Kuvasta 8 nähdään myös, että kuvaajien maksimit ovat hieman pH 5:n vasemmalla puolella, lähellä BSA:n pI:tä pH:ssa 4,9.[25] Tässä pH:ssa affiniteetti proteiinin ja tanniinin välillä on korkein.



Kuva 8. Uudelleenliukenemisanalyyseistä saadut kuvaajat näytteen 1636 semipreparatiivisesti erotelluista fraktioista 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) ja 5 (E). Kuvaajat näyttävät jäljellä olevan liukenemattoman proantosyanidiini–proteiini-kompleksin määrän (%) pH:n funktiona tanniinikonsentraatioissa 0,2 mM (musta), 0,1 mM (pun.) ja 0,05 mM (sin.). Moolisuhteet tanniinin ja proteiinin välillä olivat vastaavasti 1:1, 1:2 ja 1:4.

Taulukossa 5 on lueteltu kaikkien fraktioiden ja BSA:n muodostamien kompleksien uudelleenliukenemiseen vaaditut pH_{50}-arvot. Joidenkin fraktioiden kohdalla tanniinipitoisuudessa 0,2 mM, eli tanniini–proteiini-moolisuhteella 1:1, muodostuneen kompleksin pysyvyys oli niin korkea, ettei pH_{50}-arvoa saavutettu. Suuremman pitoisuuden on osoitettu parantavan tanniinien proteiininsaostuskykyä sekä tanniini–proteiini-kompleksien pysyvyyttä esimerkiksi tanniinien välisillä ristiinsitoutumisilla.[35,68] pH_{50}-arvoja ei saatu laskettua niillä PA-fraktioilla, joiden oli

aikaisemmin todettu muodostavan parhaiten liukenemattomia komplekseja BSA:n kanssa (Taulukko 3). Erityisesti PA-kummun myöhemmän retentioajan fraktioilla 4 ja 5, joiden mDP:t olivat korkeat, muodostuneet kompleksit olivat hyvin pysyviä.

Seuraavaksi pH_{50}-arvoja verrattiin PA-fraktioiden eri ominaisuuksiin. Kuvasta 9A nähdään pH_{50}-arvon ja näytteen keskimääräisen polymerisoitumisasteen eli mDP:n välinen korrelaatio. Siitä nähdään, että mitä suurempi näytteen mDP on, sitä pysyvämmin näytteen PA:t sitoutuvat proteiiniin ja sitä suurempi pH-muutos tarvitaan kompleksin uudelleenliukenemiseksi. Tutkimuksessa ei pystytty suoraan vertaamaan PC/PD-suhteen vaikutusta muodostuneen kompleksin pysyvyyteen, sillä PD-rikkaat näytteet olivat suurimmaksi osaksi korkeamman mDP:n näytteitä kuin PC-rikkaat fraktiot. Kuitenkin mDP-alueella 12–17 havaittiin pientä jakaumaa PC- ja PD-rikkaiden näytteiden välillä siten, että PC-rikkaiden proantosyanidiinien muodostamien kompleksien uudelleenliukenemiseen vaadittiin hieman suurempi pH:n muutos kuin PD-rikkaiden (Kuva 9B). Proantosyanidiininäytteessä 1676 oli kiinnittyneinä galloyyliryhmiä, joten myös galloyloitumisen vaikutusta verrattiin toiseen samansuuruisen mDP:n yhdisteeseen (Kuva 9C). Vaikkakin vaikutus ei ollut niin suuri kuin mDP:n, huomattiin galloyloitumisen hieman kasvattavan uudelleenliukenemiseen tarvittavaa pH:n muutosta.

Tanniini–proteiini-kompleksin muodostus ja uudelleenliukeneminen myötäilivät toisiaan niin, että BSA:n kanssa parhaiten liukenemattomia komplekseja muodostavat PA-fraktiot olivat myös niitä, joilla tarvittiin suurempi pH-muutos PA–BSA-kompleksin uudelleenliukenemiseksi (Kuva 10). Tämä voitiin päätellä myös tanniini–proteiini-moolisuhteen sekä mDP:n vaikutuksesta pH_{50}-arvoon, sillä mitä suurempi näytteen mDP oli, sitä kauempana pH_{50}-arvo oli proteiinin isoelektrisestä pisteestä (4,9). Moolisuhde vaikuttaa kompleksin pysyvyyteen niin, että suurempi tanniinin määrä mahdollistaa useamman kompleksin välisen ristiinsidoksen muodostumisen, jolloin sekä liukenemattoman tanniini–proteiini-kompleksien määrä että kompleksien pysyvyys kasvaa. Suurempi mDP taas mahdollistaa useamman sitoutumispaikan proteiinille ja pidemmän molekyylin vapaa ”häntä” pystyy sitoutumaan proteiiniin heikoilla vuorovaikutuksilla Karonen et al.[34] ellagitanniineilla esittämällä tavalla, johtaen sekä voimakkaampaan proteiininsaostuskykyyn että parempaan kompleksin pysyvyyteen. PA:en galloyloitumisasteen on myös todettu parantavan niiden proteiininsaostuskykyä[31], ja tämä edelleen tukee johtopäätöstä, että mitä voimakkaammin tanniini saostaa proteiineja, sitä pysyvämpi muodostunut kompleksi on.

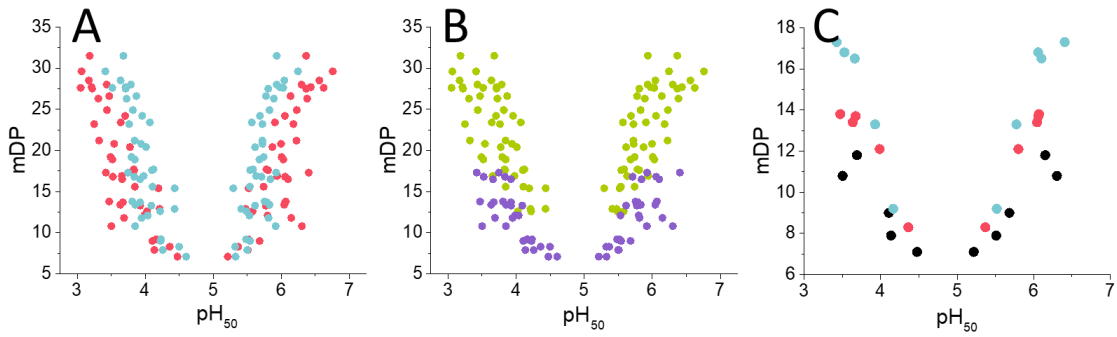
Taulukko 5. Proantosyanidiinifraktioiden pH-arvot, joissa proantosyanidiini–proteiini-kompleksia oli jäljellä 50 %. Korkeimmalla tanniini–proteiini-moolisuhteella (1:1) tanniinikonsentraatiossa 0,2 mM affiniteetti tanniinin ja proteiinin välillä oli niin korkea, ettei kaikkien fraktioiden pH_{50}-arvoa tällä moolisuhteella saavutettu. Affiniteetti oli korkeimmillaan proteiinin isoelektrisessä pisteessä (4,9), joten pH_{50}-arvot on laskettu tämän maksimin molemmin puolin. Tulosten luottamusvälit jokaista pH_{50}-arvoa kohden (pH1 < pH 4,9 ja pH2 > pH 4,9) on laskettu niin, että yläindeksi ”a” tarkoittaa luottamusvälin alarajaa ja ”b” ylärajaa. Kaikkia luottamusväliarvoja ei saatu laskettua.

	0,2 mM		**95 % luottamusvälit**				**0,1 mM**		**95 % luottamusvälit**				**0,05 mM**		**95 % luottamusvälit**			
Näyte	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**pH1[a]**	**pH1[b]**	**pH2[a]**	**pH2[b]**	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**pH1[a]**	**pH1[b]**	**pH2[a]**	**pH2[b]**	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**pH1[a]**	**pH1[b]**	**pH2[a]**	**pH2[b]**
1676 FR 1	4,20	5,38	4,15	4,26	5,32	5,44	4,47	5,22	4,43	4,52	5,18	5,25	4,60	5,33	4,53	4,68	5,25	5,40
1676 FR 2	3,94	5,72	3,88	3,99	5,66	5,77	4,13	5,51	4,10	4,17	5,46	5,56	4,26	5,50	4,22	4,30	5,45	5,55
1676 FR 3	3,81	6,03	3,76	3,86	5,97	6,08	4,11	5,68	4,07	4,14	5,65	5,71	4,23	5,54	4,19	4,26	5,51	5,58
1676 FR 4	3,12	6,77	3,03	3,22	6,65	6,86	3,50	6,30	3,41	3,59	6,20	6,40	3,85	5,92	3,79	3,91	5,86	5,98
1676 FR 5	3,02	6,92					3,69	6,15	3,57	3,80	6,04	6,27	3,95	5,81	3,90	3,99	5,77	5,85
1628 FR 1	3,89	5,79	3,80	3,98	5,70	5,88	4,21	5,48	4,16	4,27	5,42	5,53	4,43	5,41	4,39	4,48	5,37	5,45
1628 FR 2	3,30	6,40	3,21	3,39	6,29	6,51	3,83	5,78	3,75	3,90	5,71	5,86	4,12	5,59	4,07	4,17	5,54	5,64
1628 FR 3	3,05	6,71		3,14		6,80	3,54	6,00	3,45	3,64	5,90	6,10	3,94	5,73	3,90	3,98	5,68	5,77
1628 FR 4		6,95					3,32	6,22	3,22	3,42	6,12	6,33	3,84	5,72	3,77	3,92	5,65	5,80
1628 FR 5		6,92					3,25	6,18	3,20	3,30	6,12	6,24	3,76	5,72	3,70	3,82	5,66	5,79

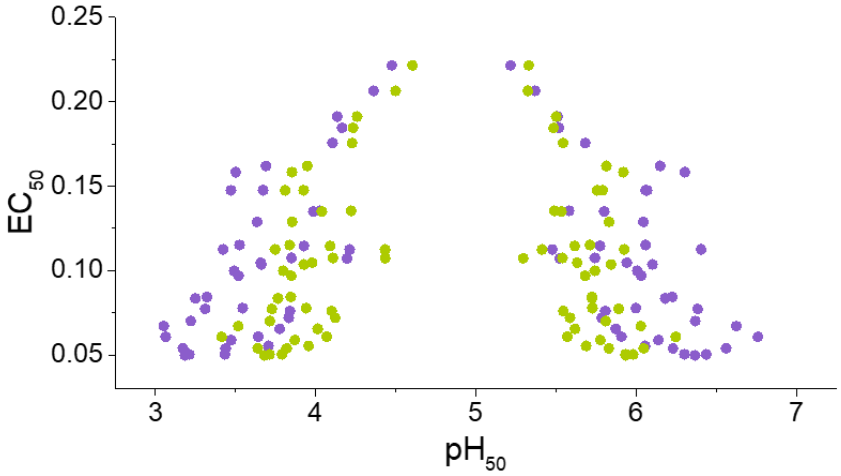
	0,2 mM		95 % luottamusvälit				0,1 mM		95 % luottamusvälit				0,05 mM		95 % luottamusvälit			
Näyte	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**$pH1^a$**	**$pH1^b$**	**$pH2^a$**	**$pH2^b$**	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**$pH1^a$**	**$pH1^b$**	**$pH2^a$**	**$pH2^b$**	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**$pH1^a$**	**$pH1^b$**	**$pH2^a$**	**$pH2^b$**
1636 FR 1	3,80	5,83	3,71	3,89	5,74	5,92	4,20	5,52	4,15	4,24	5,47	5,57	4,43	5,29	4,39	4,48	5,25	5,33
1636 FR 2		6,77			6,66	6,85	3,64	5,91	3,56	3,72	5,83	5,99	4,07	5,57	4,02	4,12	5,52	5,62
1636 FR 3		6,97					3,47	6,14	3,38	3,56	6,03	6,25	3,87	5,78	3,80	3,93	5,71	5,85
1636 FR 4							3,22	6,37	3,12	3,32	6,25	6,48	3,71	5,81	3,63	3,79	5,73	5,89
1636 FR 5							3,31	6,38	3,24	3,39	6,30	6,47	3,73	5,89	3,68	3,77	5,84	5,94
1591/1592 FR 1			3,31	3,65	5,99	6,37	3,84	5,81	3,75	3,93	5,71	5,90	4,10	5,54	4,06	4,14	5,50	5,59
1591/1592 FR 2	3,00	6,86	3,08			6,93	3,71	6,05	3,60	3,81	5,95	6,17	3,96	5,69	3,89	4,02	5,62	5,75
1591/1592 FR 3							3,43	6,30	3,32	3,54	6,16	6,44	3,79	5,93	3,69	3,88	5,83	6,04
1591/1592 FR 4							3,18	6,37	3,06	3,31	6,21	6,51	3,68	5,93	3,60	3,76	5,85	6,02
1591/1592 FR 5							3,06	6,76	3,06			6,90	3,41	6,25	3,33	3,49	6,14	6,35
605 FR 1	3,17	6,60	3,08	3,26	6,47	6,70	3,77	5,87	3,70	3,84	5,79	5,95	4,01	5,62	3,97	4,05	5,57	5,66
605 FR 2							3,44	6,23	3,33	3,54	6,10	6,35	3,82	5,83	3,75	3,88	5,76	5,90
605 FR 3							3,21	6,44	3,16	3,27	6,36	6,50	3,71	5,98	3,66	3,76	5,93	6,04

	0,2 mM		95 % luottamusvälit				0,1 mM		95 % luottamusvälit				0,05 mM		95 % luottamusvälit			
Näyte	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**pH1[a]**	**pH1[b]**	**pH2[a]**	**pH2[b]**	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**pH1[a]**	**pH1[b]**	**pH2[a]**	**pH2[b]**	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**pH1[a]**	**pH1[b]**	**pH2[a]**	**pH2[b]**
605 FR 4							3,17	6,56	3,08	3,26	6,44	6,66	3,64	6,05	3,58	3,70	5,99	6,11
605 FR 5							3,05	6,62		3,12		6,69	3,52	6,03	3,46	3,57	5,97	6,09
1734 FR 1	4,10	5,52	4,08	4,13	5,50	5,55	4,36	5,37	4,33	4,40	5,33	5,41	4,50	5,32	4,43	4,58	5,25	5,40
1734 FR 2	3,63	6,15	3,55	3,70	6,07	6,23	3,99	5,80	3,94	4,03	5,76	5,84	4,04	5,53	3,99	4,08	5,49	5,58
1734 FR 3	3,18	6,37	3,03	3,33	6,20	6,52	3,63	6,04	3,52	3,75	5,92	6,17	3,85	5,83	3,80	3,90	5,77	5,89
1734 FR 4	3,22	6,69	3,12	3,34	6,56	6,79	3,67	6,06	3,55	3,78	5,94	6,18	3,92	5,79	3,83	4,02	5,70	5,89
1734 FR 5		6,61			6,54	6,66	3,47	6,07	3,42	3,52	6,02	6,12	3,81	5,76	3,75	3,87	5,69	5,82
1589 FR 1	3,85	5,86	3,79	3,91	5,80	5,93	4,16	5,52	4,13	4,20	5,48	5,55	4,23	5,48	4,20	4,27	5,45	5,52
1589 FR 2	3,42	6,25	3,30	3,53	6,11	6,39	3,93	5,77	3,88	3,96	5,73	5,81	4,09	5,62	4,06	4,12	5,59	5,65
1589 FR 3	3,04	6,68		3,13		6,77	3,66	6,10	3,59	3,73	6,03	6,18	3,93	5,84	3,88	3,97	5,79	5,89
1589 FR 4		6,77			6,66	6,85	3,42	6,40	3,28	3,56	6,25	6,55	3,75	5,92	3,70	3,80	5,87	5,97
1589 FR 5		6,69				6,78	3,53	6,06	3,47	3,58	6,00	6,11	3,84	5,71	3,79	3,88	5,66	5,76
1639 FR 1	3,73	5,84	3,68	3,78	5,79	5,90	4,03	5,58	4,00	4,06	5,55	5,61	4,22	5,49	4,19	4,25	5,46	5,52

	0,2 mM		95 % luottamusvälit				0,1 mM		95 % luottamusvälit				0,05 mM		95 % luottamusvälit			
Näyte	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**$pH1^a$**	**$pH1^b$**	**$pH2^a$**	**$pH2^b$**	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**$pH1^a$**	**$pH1^b$**	**$pH2^a$**	**$pH2^b$**	**pH_{50} (<4,9)**	**pH_{50} (>4,9)**	**$pH1^a$**	**$pH1^b$**	**$pH2^a$**	**$pH2^b$**
1639 FR 2	3,38	6,20	3,31	3,45	6,12	6,28	3,85	5,74	3,81	3,89	5,70	5,78	4,11	5,54	4,09	4,13	5,51	5,56
1639 FR 3	3,16	6,42	3,07	3,25	6,30	6,52	3,66	5,94	3,63	3,68	5,91	5,97	3,98	5,63	3,95	4,01	5,60	5,66
1639 FR 4		6,69			3,01	6,76	3,52	6,03	3,46	3,57	5,97	6,09	3,85	5,68	3,82	3,87	5,65	5,71
1639 FR 5		6,65			6,60	6,70	3,49	6,01	3,42	3,56	5,93	6,08	3,80	5,74	3,77	3,83	5,71	5,77



Kuva 9. pH-arvoja, joissa tanniini–proteiini-kompleksia oli jäljellä 50 % (pH_{50}) verrattiin proantosyanidiinifraktioiden rakenteellisiin ominaisuuksiin. (A) polymerisaatioasteen (mDP) ja pH_{50}-arvon korrelaatio tanniini–proteiini-moolisuhteilla 1:2 (pun.) ja 1:4 (sin.). (B) prodelfinidiini- (vihr.) ja prosyanidiinirikkaiden (viol.) fraktioiden jakautuminen näytesetin sisällä. (C) galloyyliryhmien vaikutus pH_{50}-arvoon näytteellä 1676 (musta) verrattuna samansuuruisten mDP:n näytteisiin 1734 (pun.) ja 1589 (sin.).



Kuva 10. Proantosyanidiininäytteiden aikaisemmin määritetyn proteiininsaostuskyvyn (engl. effective concentration, EC_{50}) korrelaatio prosyanidiini–BSA-kompleksin pysyvyydestä kertovaan arvoon (pH_{50}) tanniini–proteiini-moolisuhteilla 1:2 (viol.) ja 1:4 (vihr.). Mitä pienempi EC_{50}-arvo on, sitä paremmin näyte saostaa proteiinia ja mitä kauempana pH_{50}-arvo on BSA:n isoelektrisestä pisteestä (4,9), sitä parempi kompleksin pysyvyys on.

Saatujen tulosten perusteella korkealla mDP:llä, korkealla tanniini–proteiini-moolisuhteella ja PA:en galloyyliryhmillä oli selkeä PA–BSA-kompleksien pysyvyyttä kasvattava vaikutus, kun taas tutkituilla PA-fraktioilla PC/PD-suhteen vaikutus liukenemattomien kompleksien pysyvyyteen oli pienempi. Virtanen et al.[83] tarkastelivat vastaavasti hydrolysoituvien tanniinien muodostamien proteiinikompleksien uudelleenliukenemista. Tutkimuksessa käytetyt HT–BSA-moolisuhteet olivat 2:1–5:1 ja pH-alue oli 5,25–6,75. Tässä työssä tutkitut PA–BSA-kompleksit olivat vähemmän

alttiita uudelleenliukenemiselle pH:n muuttuessa, vaikka käytetyt tanniini–proteiini-moolisuhteet olivat pienemmät kuin Virtanen et al.[83] tekemässä tutkimuksessa. Tulokset viittaavat siihen, että pH:n ollessa hapan tai neutraali PA:t pystyvät muodostamaan proteiinien kanssa pH-olosuhteiden muutosta paremmin kestäviä komplekseja kuin HT:t.[42,65,83] Erot pysyvyydessä voivat johtua näiden tanniinien eri sitoutumistavoista, sillä HT:en in aikaisemmin todettu suosivan hydrofobisia vuorovaikutuksia, kun taas PA:lla vetysidokset tanniinin ja proteiinin välillä ovat yleisempiä.[25,47]

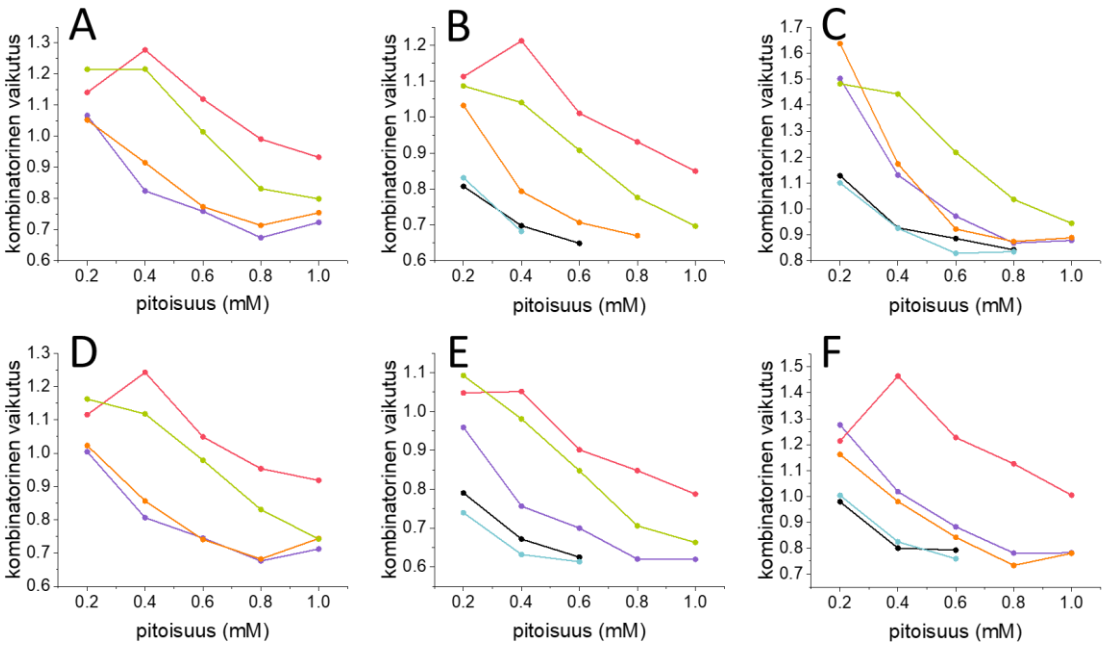
Tutkimuksessa käytetyn proteiinin pI oli 4,9 ja pH_{50}-arvo saavutettiin pidemmillä polymeereillä vasta 1,5–2 pH-yksikön muutoksella. Runsaimman kasviproteiinin rubiscon pI:n on arvioitu olevan noin kuusi.[85] Tarpeeksi pitkät PA-ketjut voisivat siis muodostaa märehtijöiden ravinnosta saatujen proteiinien kanssa komplekseja, jotka suojaisivat proteiineja hajoamiselta pötsin ja verkkomahan alueella (pH 6–7). Tämän jälkeen tanniini–proteiini-kompleksit uudelleenliukenisivat myöhemmin ruoansulatuskanavassa (pH on satakerran ja juoksutusmahan alueella 2–5 ja suolistossa 7–8). Uudelleenliuenneet PA:t pystyisivät tämän jälkeen toimimaan luonnollisena lisänä jo käytössä oleville loislääkkeille.[29]

3.2. Kombinatoriset analyysit

Kombinatorisissa analyyseissä tutkittiin eri HT:en (Kuva 2, Taulukko 4) ja PA:en (Taulukko 3) seosten kykyä muodostaa liukenemattomia komplekseja BSA:n kanssa. Teoreettisesti laskettuja absorbanssiarvoja verrattiin mitattuihin absorbansseihin, jolloin saatiin kombinatorisesta vaikutuksesta kertova arvo. Jos arvo oli yksi, ei kombinatorista vaikutusta ollut. Arvon ollessa yli yksi havaittiin synerginen vaikutus ja jos arvo oli alle yksi, kombinatorinen vaikutus oli antagoninen.

Käytetyt HT:t valittiin siten, että mukana oli heikkoja proteiinin saostajia (avoketjuiset ET:t veskalagiini ja veskavaloniinihappo), hyviä proteiinin saostajia (oenotheiini ja PGG) sekä erittäin hyviä proteiinin saostajia (ET-dimeerit gemiini A ja sanguiini H-6). Tarkasteltaessa HT-yhdistelmien (HT+HT, Kuva 11) kombinatorista vaikutusta HT–BSA-kompleksien muodostukseen havaittiin, että avoketjuisilla ET:lla synerginen vaikutus oli suurimmillaan 0,4 mM konsentraatiossa titrattuna, kun taas muilla yhdisteillä kombinatorinen vaikutus laski konsentraation noustessa. Avoketjuisia yhdisteitä titrattaessa positiivinen kombinatorinen vaikutus oli suurempi muihin HT+HT-yhdistelmiin verrattuna. Tuloksia tarkasteltaessa on hyvä pitää mielessä, että alhaisilla konsentraatioilla teoreettinen vaste voi olla epätarkka, kun taas liian suurilla

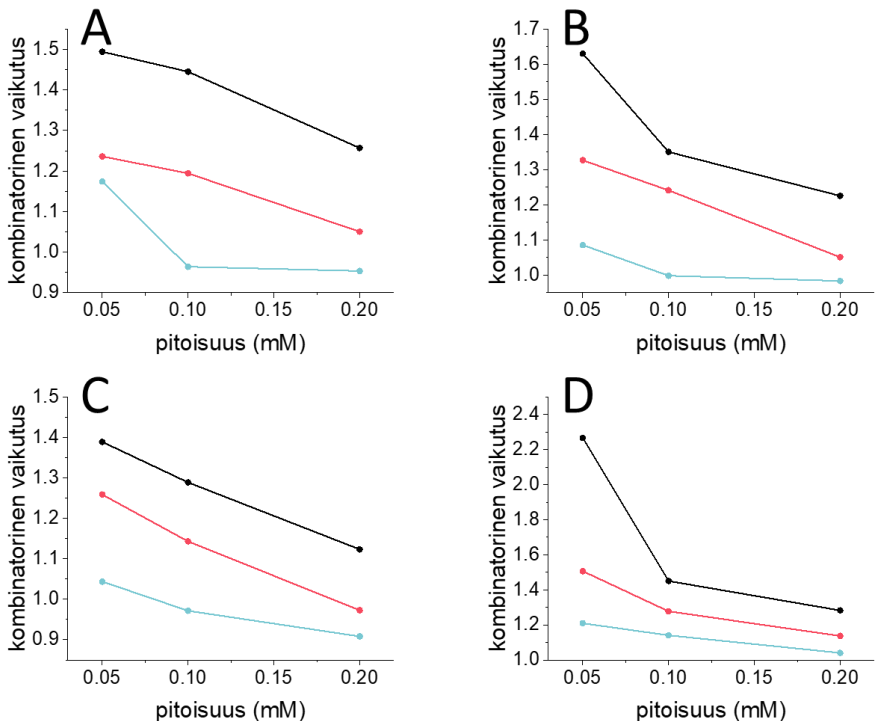
konsentraatioilla havaittu kombinatorinen vaikutus voi saturoitua mitattujen absorbanssien kasvaessa liian suureksi.



Kuva 11. Hydrolysoituvien tanniinien yhdistelmien kombinatoristen vaikutusten vertailu eri pitoisuuksissa. Titrattavina yhdisteinä olivat gemiini A (A), pentagalloyyliglukoosi (B), veskalagiini (C), sanguiini H-6 (D), oenotheiini B (E) ja veskavaloniinihappo (F). Titraavina yhdisteinä olivat gemiini A (musta), pentagalloyyliglukoosi (viol.), veskalagiini (pun.), sanguiini H-6 (sin.), oenotheiini B (orans.) ja veskavaloniinihappo (vihr.). Titrattavan yhdisteen pitoisuus pidettiin vakiona.

Testattaviin HT+PA-yhdistelmiin (Kuva 12) valittiin kolme PA-fraktiota, joista yksi oli PD-rikas suuren mDP:n fraktio (1591/1592), yksi PC-rikas (1734) ja yksi fraktio sisälsi galloyloituja PA:ta ja sen PC/PD-arvo oli noin yksi (1676). HT+PA- ja PA+HT-yhdistelmillä kombinatorisissa vaikutuksissa havaittiin selkeitä eroja huolimatta niiden kanssa yhdistetystä HT:sta. Proantosyanidiinifraktio 1676 sai aikaan selvästi paremman kombinatorisen vaikutuksen kuin fraktio 1591/1592, jonka laskettu kombinatorinen vaikutus oli noin yksi kaikissa käytetyissä konsentraatioissa. Fraktion 1734 kombinatorinen vaikutus oli jokaisella HT:lla edellisten PA-fraktion väliltä. Proantosyanidiinifraktioiden kombinatorinen vaikutus näyttäisi laskevan niiden mDP:n kasvaessa ja PA:en galloyyliryhmät näyttäisivät hieman kasvattavan kombinatorista vaikutusta. Lisäksi avoketjuisten ET:en yhdistelmillä kombinatoriset vasteet olivat jälleen kerran yhdistelmistä suurimmat, vastaten HT+HT-yhdistelmien kohdalla havaittua trendiä. HT+PA-yhdistelmien kombinatorisissa testeissä oli käytettävä pienempiä tanniinikonsentraatioita kuin HT+HT-yhdistelmillä PA:en korkeamman PPC:n vuoksi, joten tulokset eivät ole täysin verrattavissa toisiinsa. HT+PA-

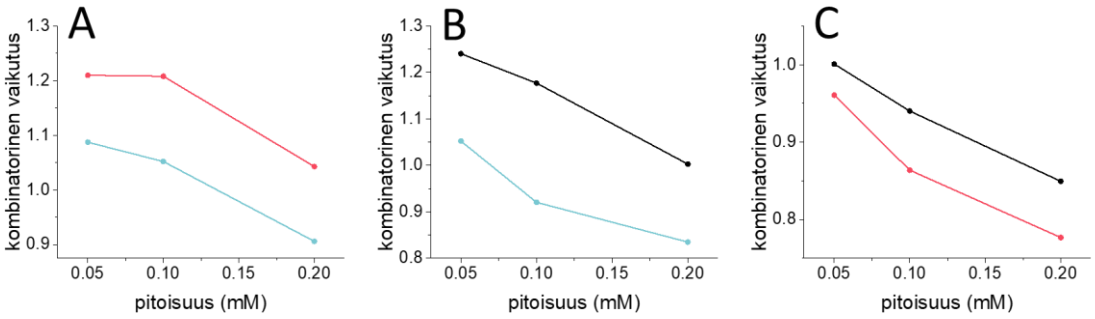
yhdistelmissä titrattavan HT:n pitoisuus pidettiin 0,2 mM:ssa, kun taas HT+HT-yhdistelmillä se oli 0,6 mM käytetyillä tanniineilla.



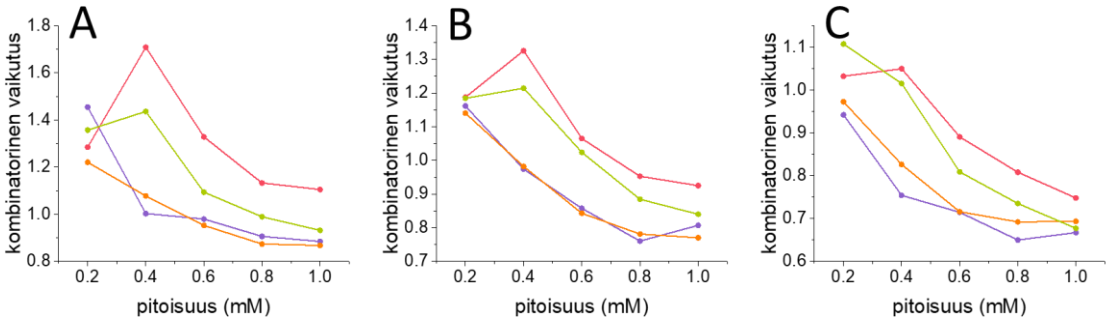
Kuva 12. Pentagalloyyliglukoosin (A), veskalagiinin (B), oenotheiini B:n (C) ja veskavaloniinihapon (D) titraus proantosyanidiinifraktioilla 1676 (musta), 1734 (pun.) ja 1591/1592 (sin.). Hydrolysoitavien tanniinien pitoisuudet olivat 0,2 mM.

Testattaessa PA+PA-seosten kombinatorista vaikutusta yhdisteltiin aikaisemmin mainittuja PA-fraktioita (Kuva 13). Proantosyanidiinien synerginen vaikutus oli selvästi alhaisempi kuin HT:lla, eli y-akselin arvo oli noin yksi kaikilla yhdistelmillä. Samankaltaisuuksia havaittiin HT+PA- ja PA+PA-yhdistelmien välillä: PA-fraktioiden järjestys kombinatorisissa vaikutuksissa parhaimmasta huonoimpaan oli 1676, 1734 ja 1591/1592. Järjestys vastasi fraktioiden kasvavaa mDP:tä.

Analysoitaessa PA+HT-yhdistelmiä, aiemmin käytettyjä PA:ta titrattiin PGG:llä, oenotheiini B:llä, veskalagiinilla ja veskavaloniinihapolla (Kuva 14). Yhdistelmillä havaittiin yhdenmukaisuutta HT+HT-yhdistelmien kanssa: avoketjuiset ET:t eli veskalagiini ja veskavaloniinihappo antoivat suurimmat absorbanssivasteet. Samankaltaisuutta havaittiin myös HT+PA-yhdistelmiin vertaillessa, sillä galloyloituneen PA-fraktion 1676 (Kuva 14A) kombinatorinen vaikutus oli suurin kolmesta käytetystä PA-fraktiosta, kun taas fraktion 1591/1592 kombinatorinen vaikutus oli pienimmälläkin tanniini–proteiini-moolisuhteella lähellä yhtä.



Kuva 13. Proantosyanidiinien yhdistelmien kombinatoriset analyysit. Titrattavina proantosyanidiinifraktioina olivat 1676 (A), 1734 (B) ja 1591/1592 (C). Titraavina fraktioina olivat 1676 (musta), 1734 (pun.) ja 1591/1592 (sin.). Kuvaajat esittävät kombinatorisen vaikutuksen pitoisuuden funktiona. Titratun fraktion pitoisuus pidettiin vakiona pitoisuudessa 0,1 mM.

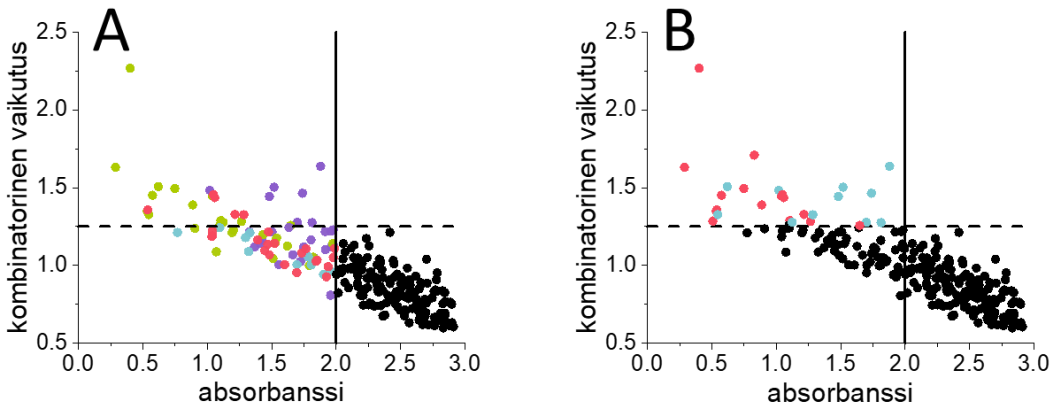


Kuva 14. Proantosyanidiinifraktioiden 1676 (A), 1734 (B) ja 1591/1592 (C) titraus pentagalloyyliglukoosilla (viol.), oenotheiini B:llä (orans.), veskalagiinilla (pun.) ja veskavaloniinihapolla (vihr.). Kuvaajissa on esitetty fraktioiden kombinatorinen vaikutus hydrolysoituvien tanniinien pitoisuuden funktiona. Titrattavan tanniinin pitoisuus pidettiin vakiona pitoisuudessa 0,1 mM.

Kuten kuvissa 11–14 nähdään, kombinatorisessa vaikutuksessa havaittiin selvä lasku tanniinikonsentraation noustessa. Tämä voi johtua siitä, että tanniinikonsentraation kasvaessa vapaita sitoutumispaikkoja proteiinin pinnalla ei ole enää käytettävissä, jolloin kombinatorinen vaikutus vähenee. Toinen mahdollinen syy on, ettei mitattu absorbanssi kasva, kun tietty saostuneen kompleksin pitoisuus on saavutettu, jolloin kombinatorinen vaikutus pienenee. Toisessa tutkimuksessa kävi ilmi, että absorbanssivasteen noustessa yli kahden ei tanniinikonsentraation kasvattaminen enää kasvattanut mitattua absorbanssia kyseisellä proteiinipitoisuudella.

Saatuja tuloksia tarkasteltiin myös vertaamalla seoksen mitattua absorbanssia laskettuun kombinatoriseen vasteeseen (Kuva 15). Selvän synergisen kombinatorisen vaikutuksen raja oli 1,25. Yhdistelmiä tanniiniryhmittäin vertailemalla (Kuva 15A) havaittiin, että HT:en titraaminen PA:lla (HT+PA) antoi parhaan kombinatorisen vasteen, kun taas PA+PA-yhdistelmillä vaste oli alhaisin. HT+HT- ja PA+HT-yhdistelmillä ei

havaittu selkeitä eroja niiden antamissa kombinatorisissa vasteissa. Tehty vertailu antoi samanlaisia tuloksia kuin vertailu kombinatorisen vasteen ja titraavan tanniinin pitoisuuden välillä, eli positiivista vaikutusta havaittiin avoketjuisten ellagitanniinien veskalagiinin ja veskavaloniinihapon ja/tai galloyloituneen pienen mDP:n PA-fraktion 1676 yhdistelmillä (Kuva 15B).



Kuva 15. Tanniiniyhdistelmien kombinatorista vaikutusta verrattiin mitattuun absorbanssiin. Alle 2 absorbanssivasteen tuloksia pidettiin luotettavina ja rajana synergiselle kombinatoriselle vaikutukselle pidettiin arvoa 1,25. (A) Eri tanniiniluokkien kombinatorista vastetta vertailtiin; HT+HT (viol.), HT+PA (vihr.), PA+PA (sin.) ja PA+HT (pun.). (B) PA-fraktion 1676 (pun.) ja/tai avoketjuisten ellagitanniinien (sin.) yhdistelmät antoivat hyvät kombinatoriset vasteet. HT = hydrolysoituva tanniini, PA = proantosyanidiini.

Harbetson et al.[18] tutkivat PA:en kombinatorista vaikutusta niiden PPC:hen, ja havaitsivat vaikutuksen olevan yleisesti additiivinen ja kombinatorisen vaikutuksen kasvavan, kun PA-pitoisuus sekä molekyylikoko pieneni. Pitoisuuden pienentämisen vaikutus voi selittyä esimerkiksi proteiinin vapaiden sitoutumispaikkojen määrällä; isompi tanniini sitoutuu voimakkaammin proteiiniin, mutta ei pysty steeristen esteiden takia käyttämään hyväkseen kaikkia sitoutumispaikkoja, jolloin pienempi PA pystyy sitoutumaan niihin. Toinen vaihtoehto kombinatoriselle vaikutukselle voisi olla se, että suurempi ja voimakkaammin sitoutuva PA muuttaisi proteiinin kolmiulotteista rakennetta ja samalla paljastaisi uusia sitoutumispaikkoja, joihin pienemmän proteiiniaffiniteetin tanniini pystyisi sitoutumaan.[18]

Edellä mainitut tulokset tukivat tässä työssä tehtyjä havaintoja PA-puolelta, sillä suurimman mDP:n PA:ta tanniiniseokseen lisäämällä ei havaittu synergistä kombinatorista vastetta, kun taas polymeerikokoa pienentämällä kombinatorinen vaste oli suurempi. Myös tanniinin pitoisuuden pienentyessä havaittiin suurempi kombinatorinen vaste molemmissa tutkimuksissa. Harbetson et al.[18] tutkivat vain polymeerikoon

vaikutusta PA-seosten PPC:een, mutta tässä työssä tarkasteltiin pienellä mittakaavalla myös galloyloituneiden PA:den yhteisvaikutusta tanniini–proteiini-kompleksin muodostukseen. Proantosyanidiinin galloyloitumisasteen kasvattamisen havaittiin parantavan kombinatorista vaikutusta näiden yhdisteiden seoksissa.

Työssä käytetty kuoppalevymenetelmä soveltui liukenemattomien tanniini–proteiini-kompleksien tutkimiseen, sillä muodostuneet kompleksit pystyttiin havaitsemaan valkeana sakkana, jonka absorbanssia mitattiin. Kuten aikaisemmin mainittiin, käytetyn analyysimenetelmän detektiokyky ei kuitenkaan soveltunut parhaalla mahdollisella tavalla kombinatorisille analyyseille. Tämä paljastui toisen tutkimuksen ohessa, jossa havaittiin absorbanssivasteen pysyvän tietyn rajan jälkeen samansuuruisena tanniinikonsentraatiota nostettaessa. Tämä raja oli 1,5–2 ja sen takia osa tässä tutkimuksessa saadusta datasta jouduttiin rajaamaan pois. Proteiinin konsentraatio pidettiin tutkimuksessa vakiona, jolloin havaitut tulokset voivat johtua siitä, että hyvin proteiineja saostavat näytteet olivat jo pienemmillä pitoisuuksilla saostaneet lähes kaiken vapaana olevan BSA:n, jonka jälkeen tanniinikonsentraation kasvattaminen ei enää kasvattanut mitattua absorbanssia.

4. Johtopäätökset

Uudelleenliukenemisanalyyseistä saadut tulokset osoittivat pH:n vaikuttavan PA–proteiini-kompleksien pysyvyyteen. Liukenematon PA-proteiini-kompleksi uudelleenliukeni liuoksen pH:n siirtyessä kauemmas proteiinin pI:stä. Proantosyanidiineilla suurin muodostuneen kompleksin pysyvyyteen vaikuttava rakenteellinen ominaisuus oli PA-seoksen mDP. Lisäksi PA-rakenteeseen liittyneillä galloyyliryhmillä sekä suuremmalla prosyanidiiniosuudella havaittiin pieni proteiinikompleksin pysyvyyttä parantava vaikutus.

Uudelleenliukenemisanalyyseistä saadut tulokset vahvistavat hypoteesia, että märehtijöiden ravinnosta saatavat tanniinit voisivat ensin kompleksoitua kasviproteiinien kanssa, suojaten niitä märehtimisprosessissa hajoamiselta ja siten parantaa proteiinien hyötykäyttöä. Tämän jälkeen kompleksit uudelleenliukenisivat myöhemmin märehtijän ruoansulatuskanavassa. Vapautuneet tanniinit voisivat tällöin toimia esimerkiksi luonnollisina loislääkkeinä haitallisia loisia vastaan. Seuraava askel tanniinien hyötykäyttöön valjastamisessa olisikin niiden loislääkkeen kaltaisten vaikutusten yhdistäminen saatuun tietoon tanniini–proteiini-kompleksien pysyvyydestä. Tämän jälkeen selvitettäisiin, miten saatua tietoa voidaan hyödyntää maataloudessa.

Kombinatoriset analyysit osoittivat, että tanniiniseoksilla oli yleisesti additiivinen vaikutus niiden proteiininsaostuskykyyn, mutta tietyillä yhdistelmillä saatiin aikaan suurempi kombinatorinen vaikutus. Avoketjuisten ellagitanniinien sekä galloyloituneen proantosyanidiinin seokset kasvattivat seoksen proteiininsaostuskykyä kaikkein eniten. Näiden tanniinien proteiininsaostus oli puhdasaineina keskimääräistä huonompi, mutta tanniiniseoksina ne voivat sitoutua proteiinin niihin sitoutumispaikkoihin, joihin voimakkaammin sitoutuva tanniini ei esimerkiksi steeristen esteiden takia pysty sitoutumaan. Suurin vaikutus havaittiin pienimmillä tanniini–proteiini-moolisuhteilla.

Tieto yksittäisten tanniinien rakenteellisten ominaisuuksien vaikutuksesta niiden bioaktiivisuuteen on lisääntynyt viime vuosien aikana puhdistus- ja analyysimenetelmien kehittyessä. Tähän asti onkin keskitytty vertailemaan yksittäisten tanniinirakenteiden eroja esimerkiksi niiden PPC:ssä. Tarkkaa tietoa tanniiniseosten yhteisvaikutuksesta bioaktiivisuuteen ei kuitenkaan vielä ole, ja tämä olisikin seuraava mielenkiintoinen tutkimusaihe. Tanniinien valjastamisessa hyötykäyttöön tanniiniseosten vaikutusmekanismin tunteminen on tärkeää, sillä harva kasvi tuottaa vain yhtä tanniinia, vaan luonnontuotteissa kyse on aina seoksista. Yhteisvaikutuksen tuntemisesta olisi hyötyä myös optimoinnissa, jolloin esimerkiksi märehtijöiden ruokavalioon lisättävien kasvien tanniinikoostumuksella olisi positiivinen kombinatorinen vaikutus pelkän additiivisen vaikutuksen sijaan.

Tässä työssä verrattiin kombinatorista vaikutusta melko pienellä tanniiniotannalla, ja käytetyt PA-näytteet olivat jo itsessään seoksia. Suhteellisen helposti puhdistettavien hydrolysoituvien tanniinien kohdalla seuraava askel olisi selvittää suuremmalla tanniinien lukumäärällä rakenteellisia vaikutuksia menetelmällä, joka pystyisi havaitsemaan herkemmin vapaan tanniinin tai proteiinin määrän. Proantosyanidiinien kohdalla ei olla vielä päästy samaan puhtausasteeseen kuin hydrolysoituvissa tanniineissa, joten tällä saralla voidaan joko keskittyä pienemmän mDP:n puhdasaineisiin[80] tai suuremman mDP:n puhdistettuihin PA-seoksiin[17].

5. Viiteluettelo

(1) Feeny, P. Plant Apparency and Chemical Defense. In *Biochemical Interaction Between Plants and Insects*; Springer US, **1976**; pp 1–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2646-5_1.

(2) Haukioja, E. Induction of Defenses in Trees. *Annu. Rev. Entomol.* **1990**, *36*, 25–42. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.36.1.25.

(3) Barbehenn, R. V.; Peter Constabel, C. Tannins in Plant-Herbivore Interactions. *Phytochemistry*. Pergamon September 1, **2011**, pp 1551–1565. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040.

(4) Feeny, P. P.; Bostock, H. Seasonal Changes in the Tannin Content of Oak Leaves. *Phytochemistry* **1968**, *7*, 871–880. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84845-1.

(5) Salminen, J.-P.; Karonen, M. Chemical Ecology of Tannins and Other Phenolics: We Need a Change in Approach. *Funct. Ecol.* **2011**, *25*, 325–338. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01826.x.

(6) Haslam, E. *Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action*; **1996**; Vol. 59. https://doi.org/10.1021/np960040+.

(7) Engström, M. T.; Karonen, M.; Ahern, J. R.; Baert, N.; Payré, B.; Hoste, H.; Salminen, J.-P. Chemical Structures of Plant Hydrolyzable Tannins Reveal Their in Vitro Activity against Egg Hatching and Motility of *Haemonchus Contortus* Nematodes. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 840–851. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05691.

(8) Mueller-Harvey, I. Unravelling the Conundrum of Tannins in Animal Nutrition and Health. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*; John Wiley & Sons, Ltd, **2006**; Vol. 86, pp 2010–2037. https://doi.org/10.1002/jsfa.2577.

(9) Hagerman, A. E. Fifty Years of Polyphenol-Protein Complexes. In *Recent Advances in Polyphenol Research, Volume 3*; Wiley-Blackwell, **2012**; Vol. 3, pp 71–97. https://doi.org/10.1002/9781118299753.ch3.

(10) Appel, H. M. Phenolics in Ecological Interactions: The Importance of Oxidation.

J. Chem. Ecol. **1993**, *19*, 1521–1552. https://doi.org/10.1007/BF00984895.

(11) Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 586–621. https://doi.org/10.1002/anie.201000044.

(12) Steinberg, P. D.; Van Altena, I. Tolerance of Marine Invertebrate Herbivores to Brown Algal Phlorotannins in Temperate Australasia. *Ecol. Monogr.* **1992**, *62*, 189–222. https://doi.org/10.2307/2937093.

(13) Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and Tannin-like Compounds - Nature, Occurrence, Dietary Intake and Effects on Nutrition and Health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. John Wiley & Sons, Ltd May 15, **2000**, pp 1094–1117. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1.

(14) Hemingway, R. W.; Karchesy, J. J. *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*, 1st ed.; Branham, S. J., Ed.; Plenum Press: New York, **1989**.

(15) Karonen, M.; Loponen, J.; Ossipov, V.; Pihlaja, K. Analysis of Procyanidins in Pine Bark with Reversed-Phase and Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *522*, 105–112. https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.06.041.

(16) Brossaud, F.; Cheynier, V.; Noble, A. C. Bitterness and Astringency of Grape and Wine Polyphenols. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2001**, *7*, 33–39. https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00191.x.

(17) Leppä, M. M.; Karonen, M.; Tähtinen, P.; Engström, M. T.; Salminen, J.-P. Isolation of Chemically Well-Defined Semipreparative Liquid Chromatography Fractions from Complex Mixtures of Proanthocyanidin Oligomers and Polymers. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1576*, 67–79. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.034.

(18) Harbertson, J. F.; Kilmister, R. L.; Kelm, M. A.; Downey, M. O. Impact of Condensed Tannin Size as Individual and Mixed Polymers on Bovine Serum Albumin Precipitation. *Food Chem.* **2014**, *160*, 16–21. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.026.

(19) Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T. Oligomeric Hydrolyzable Tannins, a New Class of Plant Polyphenols. *Heterocycles*. April 1, **1990**, pp 1195–1218. https://doi.org/10.3987/REV-89-SR5.

(20) Quideau, S. *Chemistry and Biology of Ellagitannins: An Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols*; World Scientific Publishing Co., **2009**. https://doi.org/10.1142/6795.

(21) Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T. Classification of Oligomeric Hydrolysable Tannins and Specificity of Their Occurrence in Plants. *Phytochemistry*. **1993**, pp 507–521. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95129-X.

(22) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th ed.; W. H. Freeman and Company; MacMillan Higher Education, **2017**.

(23) Golovanov, A. P.; Hautbergue, G. M.; Wilson, S. A.; Lian, L. Y. A Simple Method for Improving Protein Solubility and Long-Term Stability. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8933–8939. https://doi.org/10.1021/ja049297h.

(24) Hagerman, A. E.; Butler, L. G. Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 809–812. https://doi.org/10.1021/jf60218a027.

(25) Hagerman, A. E.; Butler, L. G. The Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interactions. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 4444–4497.

(26) Oh, H.; Hoff, J. E. PH Dependence of Complex Formation Between Condensed Tannins and Proteins. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 1267–1269. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb14059.x.

(27) Ozdal, T.; Capanoglu, E.; Altay, F. A Review on Protein-Phenolic Interactions and Associated Changes. *Food Research International*. Elsevier May 1, **2013**, pp 954–970. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009.

(28) Zeller, W. E. Activity, Purification, and Analysis of Condensed Tannins: Current State of Affairs and Future Endeavors. *Crop Sci.* **2019**, *59*, 886–904. https://doi.org/10.2135/cropsci2018.05.0323.

(29) Mueller-Harvey, I.; Bee, G.; Dohme-Meier, F.; Hoste, H.; Karonen, M.; Kölliker,

R.; Lüscher, A.; Niderkorn, V.; Pellikaan, W. F.; Salminen, J. P.; et al. Benefits of Condensed Tannins in Forage Legumes Fed to Ruminants: Importance of Structure, Concentration, and Diet Composition. *Crop Science*. **2018**, pp 861–885. https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0369.

(30) Barbehenn, R. V.; Jones, C. P.; Karonen, M.; Salminen, J.-P. Tannin Composition Affects the Oxidative Activities of Tree Leaves. *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32*, 2235–2251. https://doi.org/10.1007/s10886-006-9142-8.

(31) Ricardo-da-Silva, J. M.; Cheynier, V.; Souquet, J.-M.; Moutounet, M.; Cabanis, J.-C.; Bourzeix, M. Interaction of Grape Seed Procyanidins with Various Proteins in Relation to Wine Fining. *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *57*, 111–125. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740570113.

(32) Poncet-Legrand, C.; Gautier, C.; Cheynier, V.; Imberty, A. Interactions between Flavan-3-Ols and Poly(L-Proline) Studied by Isothermal Titration Calorimetry: Effect of the Tannin Structure. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9235–9240. https://doi.org/10.1021/jf071297o.

(33) Canon, F.; Giuliani, A.; Paté, F.; Sarni-Manchado, P. Ability of a Salivary Intrinsically Unstructured Protein to Bind Different Tannin Targets Revealed by Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 815–822. https://doi.org/10.1007/s00216-010-3997-9.

(34) Karonen, M.; Oraviita, M.; Mueller-Harvey, I.; Salminen, J.-P.; Green, R. J. Ellagitannins with Glucopyranose Cores Have Higher Affinities to Proteins than Acyclic Ellagitannins by Isothermal Titration Calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 12730–12740. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04353.

(35) Karonen, M.; Oraviita, M.; Mueller-Harvey, I.; Salminen, J.-P.; Green, R. J. Binding of an Oligomeric Ellagitannin Series to Bovine Serum Albumin (BSA): Analysis by Isothermal Titration Calorimetry (ITC). *J. Agric. Food Chem* **2015**, *63*, 9. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04843.

(36) Engström, M. T.; Arvola, J.; Nenonen, S.; Virtanen, V. T. J.; Leppä, M. M.; Tähtinen, P.; Salminen, J. P. Structural Features of Hydrolyzable Tannins Determine Their Ability to Form Insoluble Complexes with Bovine Serum Albumin. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 6798–6808.

https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02188.

(37) Baron, G.; Altomare, A.; Fumagalli, L.; Rumio, C.; Carini, M.; Vistoli, G.; Aldini, G. Development of a Direct ESI-MS Method for Measuring the Tannin Precipitation Effect of Proline-Rich Peptides and in Silico Studies on the Proline Role in Tannin-Protein Interactions. *Fitoterapia* **2019**, *136*, 104163. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.05.002.

(38) Deaville, E. R.; Green, R. J.; Mueller-Harvey, I.; Willoughby, I.; Frazier, R. A. Hydrolyzable Tannin Structures Influence Relative Globular and Random Coil Protein Binding Strengths. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4554–4561. https://doi.org/10.1021/jf063770o.

(39) Maiti, T. K.; Ghosh, K. S.; Dasgupta, S. Interaction of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate with Human Serum Albumin: Fluorescence, Fourier Transform Infrared, Circular Dichroism, and Docking Studies. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2006**, *64*, 355–362. https://doi.org/10.1002/prot.20995.

(40) Asquith, T. N.; Butler, L. G. Interactions of Condensed Tannins with Selected Proteins. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1591–1593. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81214-5.

(41) Le Bourvellec, C.; Renard, C. M. G. C. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, *52*, 213–248. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499808.

(42) Engström, M. T.; Sun, X.; Suber, M. P.; Li, M.; Salminen, J.-P.; Hagerman, A. E. The Oxidative Activity of Ellagitannins Dictates Their Tendency To Form Highly Stabilized Complexes with Bovine Serum Albumin at Increased PH. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 8994–9003. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01571.

(43) Jöbstl, E.; O'Connell, J.; Fairclough, J. P. A.; Williamson, M. P. Molecular Model for Astringency Produced by Polyphenol/Protein Interactions. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 942–949. https://doi.org/10.1021/bm0345110.

(44) Charlton, A. J.; Baxter, N. J.; Khan, M. L.; Moir, A. J. G.; Haslam, E.; Davies, A. P.; Williamson, M. P. Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *J. Agric.*

Food Chem. **2002**, *50*, 1593–1601. https://doi.org/10.1021/jf010897z.

(45) Dobreva, M. A.; Frazier, R. A.; Mueller-Harvey, I.; Clifton, L. A.; Gea, A.; Green, R. J. Binding of Pentagalloyl Glucose to Two Globular Proteins Occurs via Multiple Surface Sites. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 710–715. https://doi.org/10.1021/bm101341s.

(46) Kilmister, R. L.; Faulkner, P.; Downey, M. O.; Darby, S. J.; Falconer, R. J. The Complexity of Condensed Tannin Binding to Bovine Serum Albumin - An Isothermal Titration Calorimetry Study. *Food Chem.* **2016**, *190*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.144.

(47) Hagerman, A. E.; Rice, M. E.; Ritchard, N. T. Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin16 (4→8) Catechin (Procyanidin). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2590–2595. https://doi.org/10.1021/jf971097k.

(48) Gyémánt, G.; Zajácz, Á.; Bécsi, B.; Ragunath, C.; Ramasubbu, N.; Erdodi, F.; Batta, G.; Kandra, L. Evidence for Pentagalloyl Glucose Binding to Human Salivary α-Amylase through Aromatic Amino Acid Residues. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2009**, *1794*, 291–296. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.012.

(49) Asano, K.; Shinagawa, K.; Hashimoto, N. Characterization of Haze-Forming Proteins of Beer and Their Roles in Chill Haze Formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1982**, *40*. https://doi.org/10.1094/asbcj-40-0147.

(50) Thomas Hofmann, †; Arne Glabasnia, †; Bernd Schwarz, †; Kimberly N. Wisman, ‡; Kelly A. Gangwer, ‡ and; Ann E. Hagerman*, ‡. Protein Binding and Astringent Taste of a Polymeric Procyanidin, 1,2,3,4,6-Penta-O-Galloyl-β-d-Glucopyranose, Castalagin, and Grandinin. **2006**. https://doi.org/10.1021/JF062272C.

(51) Murray, N. J.; Williamson, M. P.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Study of the Interaction between Salivary Proline-rich Proteins and a Polyphenol by 1H-NMR Spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 923–935. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18574.x.

(52) Moilanen, J.; Salminen, J. P. Ecologically Neglected Tannins and Their Biologically Relevant Activity: Chemical Structures of Plant Ellagitannins Reveal Their in Vitro Oxidative Activity at High PH. *Chemoecology* **2008**, *18*, 73–83. https://doi.org/10.1007/s00049-007-0395-7.

(53) Oh, H.; Hoff, J. E.; Armstrong, G. S.; Haff, L. A. Hydrophobic Interaction in Tannin-Protein Complexes. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 394–398. https://doi.org/10.1021/jf60228a020.

(54) Prigent, S. V. E.; Voragen, A. G. J.; van Koningsveld, G. A.; Baron, A.; Renard, C. M. G. C.; Gruppen, H. Interactions between Globular Proteins and Procyanidins of Different Degrees of Polymerization. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 5843–5853. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2261.

(55) Baert, N.; Pellikaan, W. F.; Karonen, M.; Salminen, J.-P. A Study of the Structure-Activity Relationship of Oligomeric Ellagitannins on Ruminal Fermentation in Vitro. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 8041–8052. https://doi.org/10.3168/JDS.2016-11069.

(56) Buccioni, A.; Serra, A.; Minieri, S.; Mannelli, F.; Cappucci, A.; Benvenuti, D.; Rapaccini, S.; Conte, G.; Mele, M. Milk Production, Composition, and Milk Fatty Acid Profile from Grazing Sheep Fed Diets Supplemented with Chestnut Tannin Extract and Extruded Linseed. *Small Rumin. Res.* **2015**, *130*, 200–207. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.07.021.

(57) Bach, A.; Calsamiglia, S.; Stern, M. D. Nitrogen Metabolism in the Rumen. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, E9–E21. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73133-7.

(58) Aboagye, I. A.; Oba, M.; Castillo, A. R.; Koenig, K. M.; Iwaasa, A. D.; Beauchemin, K. A. Effects of Hydrolyzable Tannin with or without Condensed Tannin on Methane Emissions, Nitrogen Use, and Performance of Beef Cattle Fed a High-Forage Diet. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 5276–5286. https://doi.org/10.1093/jas/sky352.

(59) Novobilský, A.; Stringano, E.; Hayot Carbonero, C.; Smith, L. M. J.; Enemark, H. L.; Mueller-Harvey, I.; Thamsborg, S. M. In Vitro Effects of Extracts and Purified Tannins of Sainfoin (Onobrychis Viciifolia) against Two Cattle

Nematodes. *Vet. Parasitol.* **2013**, *196*, 532–537. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.024.

(60) Vasta, V.; Daghio, M.; Cappucci, A.; Buccioni, A.; Serra, A.; Viti, C.; Mele, M. Invited Review: Plant Polyphenols and Rumen Microbiota Responsible for Fatty Acid Biohydrogenation, Fiber Digestion, and Methane Emission: Experimental Evidence and Methodological Approaches. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*. https://doi.org/10.3168/jds.2018-14985.

(61) Quijada, J.; Drake, C.; Gaudin, E.; El-Korso, R.; Hoste, H.; Mueller-Harvey, I. Condensed Tannin Changes along the Digestive Tract in Lambs Fed with Sainfoin Pellets or Hazelnut Skins. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 2136–2142. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05538.

(62) Quan, T. H.; Benjakul, S.; Sae-leaw, T.; Balange, A. K.; Maqsood, S. Protein–Polyphenol Conjugates: Antioxidant Property, Functionalities and Their Applications. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd September 1, **2019**, pp 507–517. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.049.

(63) Liu, F.; Ma, C.; Gao, Y.; McClements, D. J. Food-Grade Covalent Complexes and Their Application as Nutraceutical Delivery Systems: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16*, 76–95. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12229.

(64) Majewski, M.; Ruiz-Carmona, S.; Barril, X. An Investigation of Structural Stability in Protein-Ligand Complexes Reveals the Balance between Order and Disorder. *Commun. Chem.* **2019**, *2*, 1–8. https://doi.org/10.1038/s42004-019-0205-5.

(65) Goldstein, J. L.; Swain, T. The Inhibition of Enzymes by Tannins. *Phytochemistry* **1965**, *4*, 185–192. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86162-2.

(66) Hagerman, A. E. Tannin—Protein Interactions. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I*; **1992**; pp 236–247. https://doi.org/10.1021/bk-1992-0506.ch019.

(67) Dentinho, M.; Bessa, R. Effect of Tannin Source and PH on Stability of Tannin-

Protein Complexes. *Rev. Ciências Agrárias* **2016**, *39*, 114–121. https://doi.org/10.19084/rca15062.

(68) Canon, F.; Paté, F.; Meudec, E.; Marlin, T.; Cheynier, V.; Giuliani, A.; Sarni-Manchado, P. Characterization, Stoichiometry, and Stability of Salivary Protein-Tannin Complexes by ESI-MS and ESI-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 2535–2545. https://doi.org/10.1007/s00216-009-3180-3.

(69) Barrett, A.; Ndou, T.; Hughey, C. A.; Straut, C.; Howell, A.; Dai, Z.; Kaletunc, G. Inhibition of α-Amylase and Glucoamylase by Tannins Extracted from Cocoa, Pomegranates, Cranberries, and Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1477–1486. https://doi.org/10.1021/jf304876g.

(70) McManus, J. P.; Davis, K. G.; Beart, J. E.; Gaffney, S. H.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenol Interactions. Part 1. Introduction; Some Observations on the Reversible Complexation of Polyphenols with Proteins and Polysaccharides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1985**, *0*, 1429–1438. https://doi.org/10.1039/p29850001429.

(71) Dentinho, M. T. P.; Moreira, O. C.; Pereira, M. S.; Bessa, R. J. B. The Use of a Tannin Crude Extract from Cistus Ladanifer L. to Protect Soya-Bean Protein from Degradation in the Rumen. *Animal* **2007**, *1*, 645–650. https://doi.org/10.1017/S1751731107689745.

(72) O'Connell, J. E.; Fox, P. F. Effects of Phenolic Compounds on the Heat Stability of Milk and Concentrated Milk. *J. Dairy Res.* **1999**, *66*, 399–407. https://doi.org/10.1017/S0022029999003593.

(73) Liu, G.; Zhong, Q. Glycation of Whey Protein to Provide Steric Hindrance against Thermal Aggregation. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9754–9762. https://doi.org/10.1021/jf302883b.

(74) Simon, C.; Barathieu, K.; Laguerre, M.; Schmitter, J. M.; Fouquet, E.; Pianet, I.; Dufourc, E. J. Three-Dimensional Structure and Dynamics of Wine Tannin-Saliva Protein Complexes. A Multitechnique Approach. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10385–10395. https://doi.org/10.1021/bi034354p.

(75) Frazier, R. A.; Papadopoulou, A.; Mueller-Harvey, I.; Kissoon, D.; Green, R. J.

Probing Protein-Tannin Interactions by Isothermal Titration Microcalorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5189–5195. https://doi.org/10.1021/jf021179v.

(76) Cheong, K. T. W.; Htay, K.; Tan, R. H. C.; Lim, M. Identifying Combinatorial Growth Inhibitory Effects of Various Plant Extracts on Leukemia Cells through Systematic Experimental Design. *Am. J. Plant Sci.* **2012**, *03*, 1390–1398. https://doi.org/10.4236/ajps.2012.310168.

(77) Díaz Carrasco, J. M.; Cabral, C.; Redondo, L. M.; Pin Viso, N. D.; Colombatto, D.; Farber, M. D.; Fernández Miyakawa, M. E. Impact of Chestnut and Quebracho Tannins on Rumen Microbiota of Bovines. *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/9610810.

(78) Bhatta, R.; Uyeno, Y.; Tajima, K.; Takenaka, A.; Yabumoto, Y.; Nonaka, I.; Enishi, O.; Kurihara, M. Difference in the Nature of Tannins on in Vitro Ruminal Methane and Volatile Fatty Acid Production and on Methanogenic Archaea and Protozoal Populations. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 5512–5522. https://doi.org/10.3168/jds.2008-1441.

(79) Engström, M. T.; Pälijärvi, M.; Fryganas, C.; Grabber, J. H.; Mueller-Harvey, I.; Salminen, J. P. Rapid Qualitative and Quantitative Analyses of Proanthocyanidin Oligomers and Polymers by UPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3390–3399. https://doi.org/10.1021/jf500745y.

(80) Kelm, M. A.; Johnson, J. C.; Robbins, R. J.; Hammerstone, J. F.; Schmitz, H. H. High-Performance Liquid Chromatography Separation and Purification of Cacao (Theobroma Cacao L.) Procyanidins According to Degree of Polymerization Using a Diol Stationary Phase. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1571–1576. https://doi.org/10.1021/jf0525941.

(81) Kawamoto, H.; Nakatsubo, F.; Murakami, K. Quantitative Determination of Tannin and Protein in the Precipitates by High-Performance Liquid Chromatography. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1503–1505. https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00451-C.

(82) Lisonbee, L. D.; Villalba, J. J.; Provenza, F. D. Effects of Tannin on Selection by Sheep of Forages Containing Alkaloids, Tannins and Saponins. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 2668–2677. https://doi.org/10.1002/jsfa.3772.

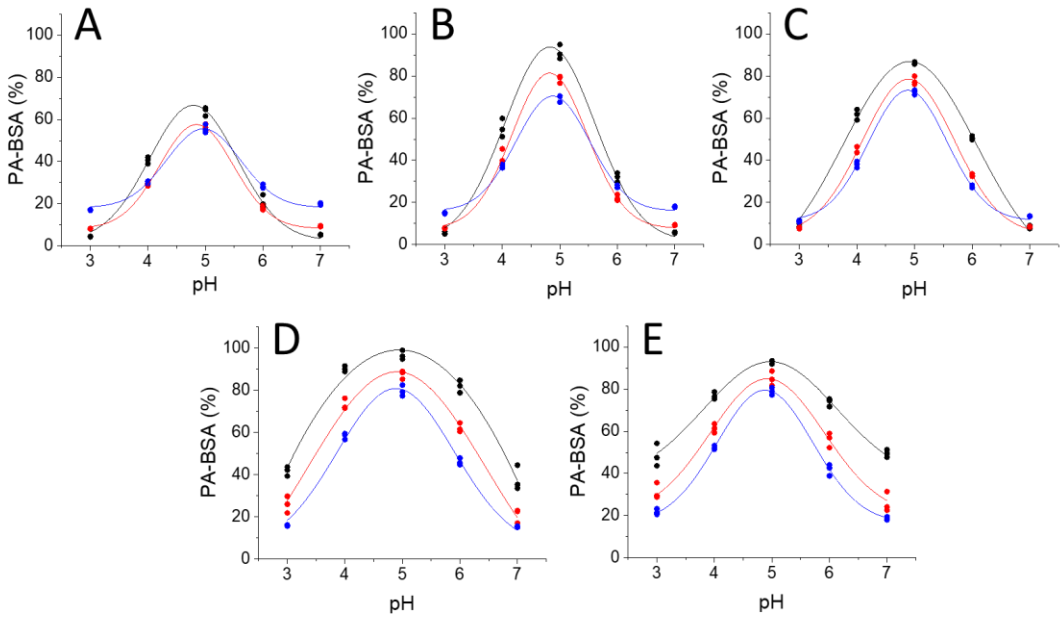
(83) Virtanen, V. Tanniinien Ja Proteiinien Muodostamien Kompleksien Pysyvyys, Turun yliopisto, **2019**.

(84) Engström, M. T.; Pälijärvi, M.; Salminen, J. P. Rapid Fingerprint Analysis of Plant Extracts for Ellagitannins, Gallic Acid, and Quinic Acid Derivatives and Quercetin-, Kaempferol- and Myricetin-Based Flavonol Glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 4068–4079. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00595.

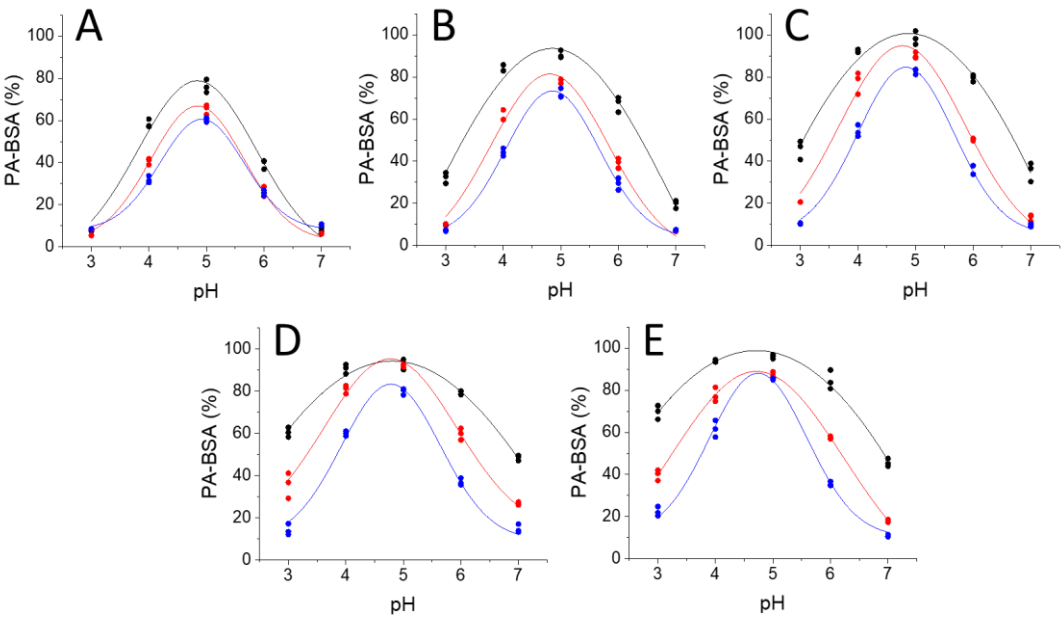
(85) Libouga, D. G.; Aguié-Béghin, V.; Douillard, R. Thermal Denaturation and Gelation of Rubisco: Effects of PH and Ions. *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *19*, 271–277. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(96)01137-3.

Liitteet

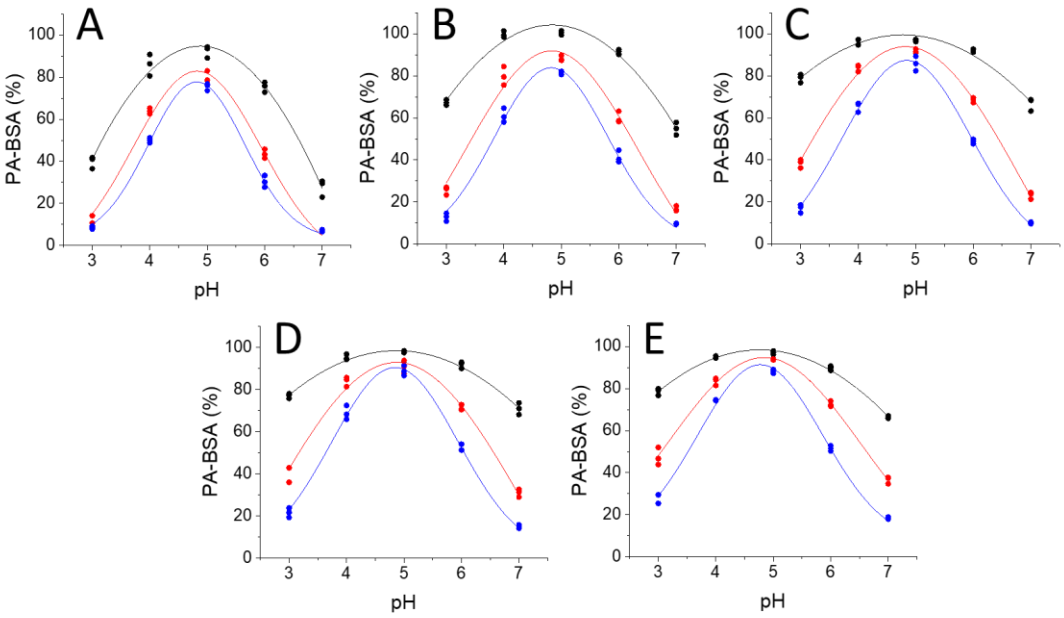
Liite 1. Uudelleenliukenemisanalyyseistä saadut kuvaajat näytteen 1676 kromatografisen kummin semipreparatiivisesti erotelluista fraktioista 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) ja 5 (E). Kuvaajat näyttävät jäljellä olevan proantosyanidiini–proteiini-kompleksin määrän (%) pH:n funktiona tanniinikonsentraatioissa 0,2 mM (musta), 0,1 mM (pun.) ja 0,05 mM (sin.). Moolisuhteet tanniinin ja proteiinin välillä olivat vastaavasti 1:1, 1:2 ja 1:4.



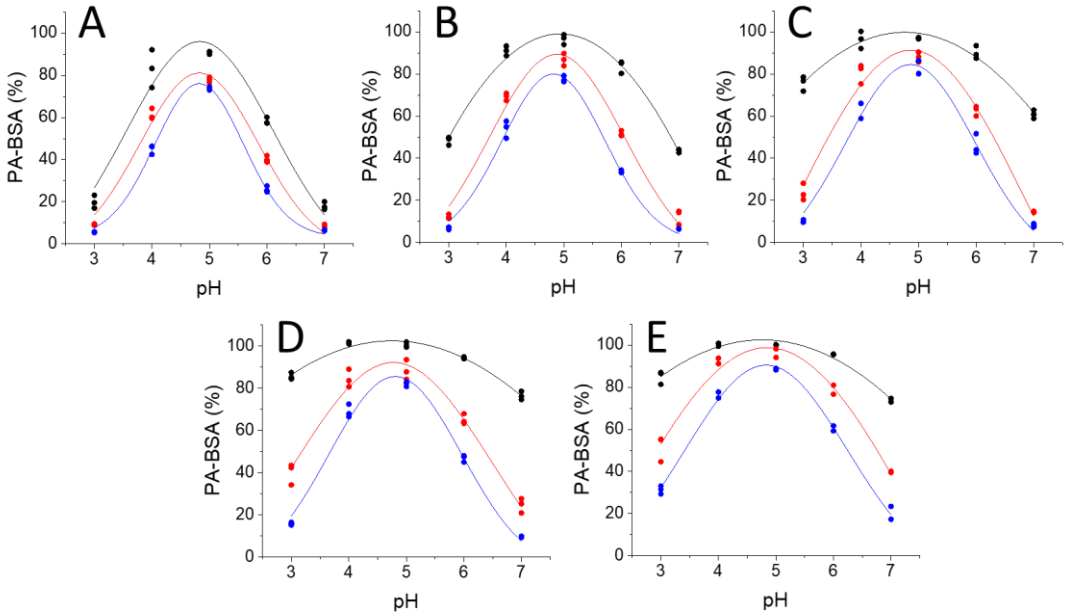
Liite 2. Uudelleenliukenemisanalyyseistä saadut kuvaajat näytteen 1628 kromatografisen kummun semipreparatiivisesti erotelluista fraktioista 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) ja 5 (E). Kuvaajat näyttävät jäljellä olevan proantosyanidiini–BSA-kompleksin määrän (%) pH:n funktiona tanniinikonsentraatioissa 0,2 mM (musta), 0,1 mM (pun.) ja 0,05 mM (sin.). Moolisuhteet tanniinin ja proteiinin välillä olivat vastaavasti 1:1, 1:2 ja 1:4.



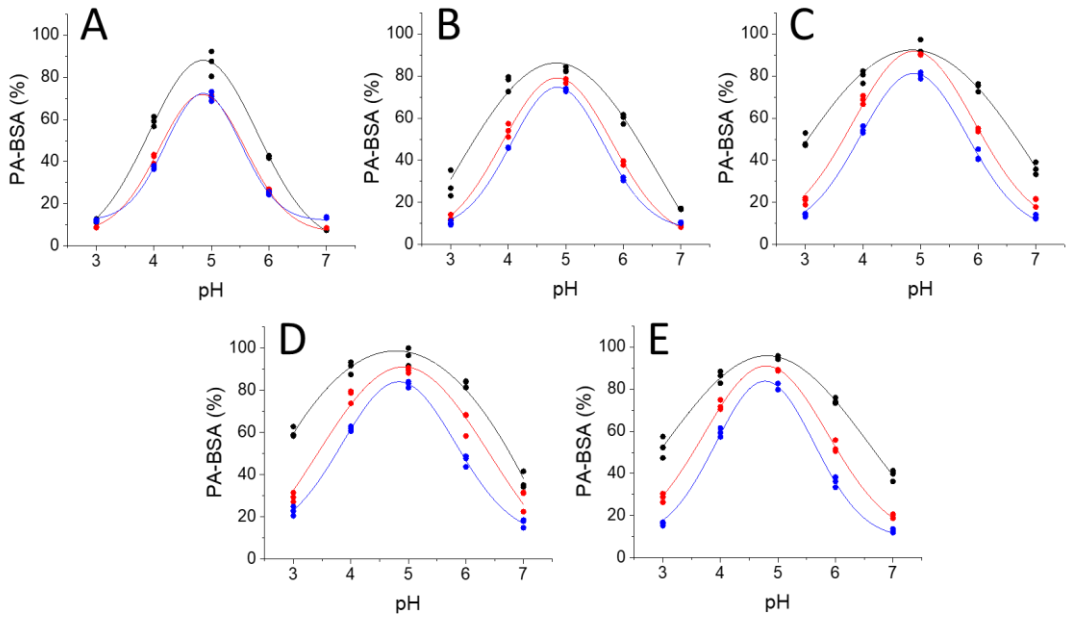
Liite 4. Uudelleenliukenemisanalyyseistä saadut kuvaajat näytteen 605 kromatografisen kummun semipreparatiivisesti erotelluista fraktioista 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) ja 5 (E). Kuvaajat näyttävät jäljellä olevan proantosyanidiini–BSA-kompleksin määrän (%) pH:n funktiona tanniinikonsentraatioissa 0,2 mM (musta), 0,1 mM (pun.) ja 0,05 mM (sin.). Moolisuhteet tanniinin ja proteiinin välillä olivat vastaavasti 1:1, 1:2 ja 1:4.



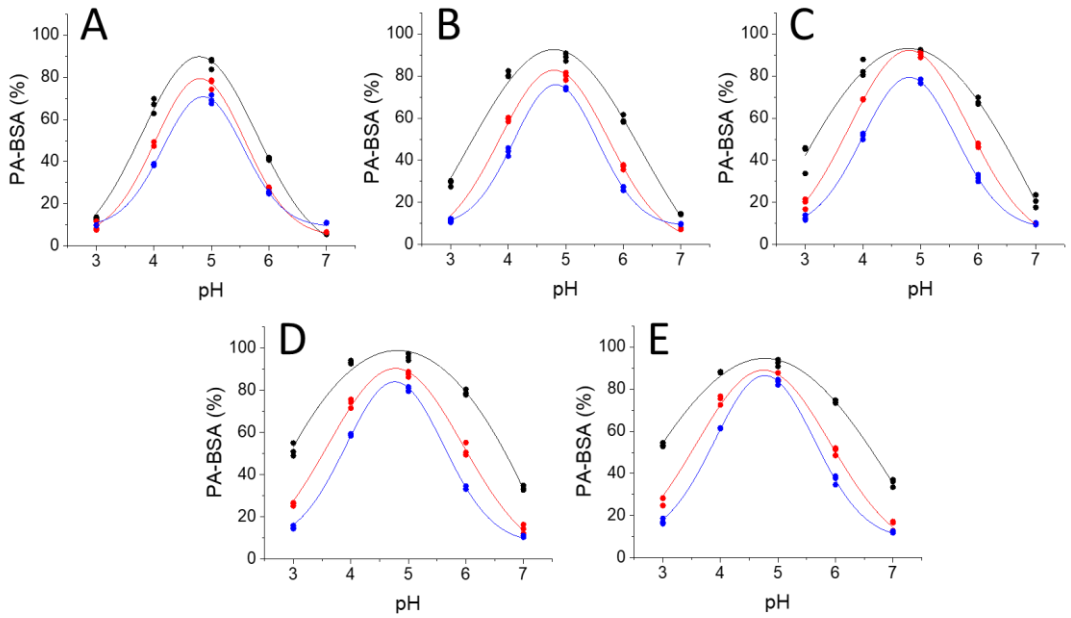
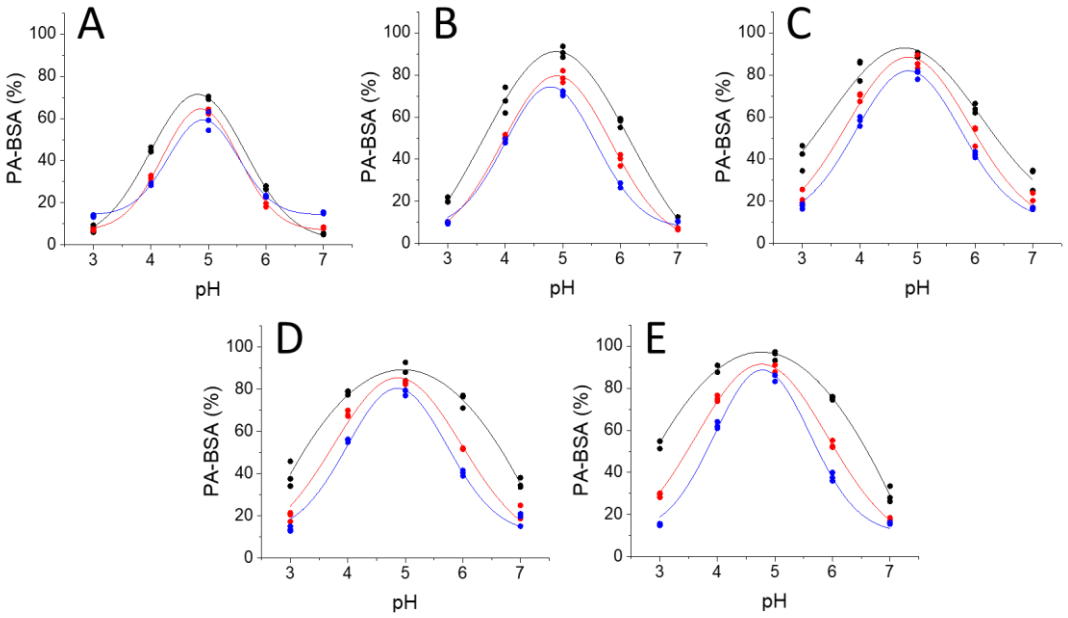
Liite 3. Uudelleenliukenemisanalyyseistä saadut kuvaajat näytteen 1591/1592 kromatografisen kummin semipreparatiivisesti erotelluista fraktioista 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) ja 5 (E). Kuvaajat näyttävät jäljellä olevan proantosyanidiini–BSA-kompleksin määrän (%) pH:n funktiona tanniinikonsentraatioissa 0,2 mM (musta), 0,1 mM (pun.) ja 0,05 mM (sin.). Moolisuhteet tanniinin ja proteiinin välillä olivat vastaavasti 1:1, 1:2 ja 1:4.



Liite 6. Uudelleenliukenemisanalyyseistä saadut kuvaajat näytteen 1589 kromatografisen kummun semipreparatiivisesti erotelluista fraktioista 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) ja 5 (E). Kuvaajat näyttävät jäljellä olevan proantosyanidiini–BSA-kompleksin määrän (%) pH:n funktiona tanniinikonsentraatioissa 0,2 mM (musta), 0,1 mM (pun.) ja 0,05 mM (sin.). Moolisuhteet tanniinin ja proteiinin välillä olivat vastaavasti 1:1, 1:2 ja 1:4.



Liite 5. Uudelleenliukenemisanalyyseistä saadut kuvaajat näytteen 1639 kromatografisen kummun semipreparatiivisesti erotelluista fraktioista 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) ja 5 (E). Kuvaajat näyttävät jäljellä olevan proantosyanidiini–BSA-kompleksin määrän (%) pH:n funktiona tanniinikonsentraatioissa 0,2 mM (musta), 0,1 mM (pun.) ja 0,05 mM (sin.). Moolisuhteet tanniinin ja proteiinin välillä olivat vastaavasti 1:1, 1:2 ja 1:4.



Liite 7. Uudelleenliukenemisanalyyseistä saadut kuvaajat näytteen 1734 kromatografisen kummun semipreparatiivisesti erotelluista fraktioista 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) ja 5 (E). Kuvaajat näyttävät jäljellä olevan proantosyanidiini–BSA-kompleksin määrän (%) pH:n funktiona tanniinikonsentraatioissa 0,2 mM (musta), 0,1 mM (pun.) ja 0,05 mM (sin.). Moolisuhteet tanniinin ja proteiinin välillä olivat vastaavasti 1:1, 1:2 ja 1:4.