

ELINTARVIKETURVALLISUUDEN ARVIOINTI AMESIN
TESTISOVELLUKSILLA

Sulkula Katarina
Kandidaatin tutkielma
Ravitsemustiede
Lääketieteen laitos
Terveystieteiden tiedekunta
Itä-Suomen yliopisto
Maaliskuu 2021

Itä-Suomen yliopisto, Terveystieteiden tiedekunta
Kansanterveystieteen ja kliinisen ravitsemustieteen yksikkö
Ravitsemustiede
SULKULA KATARINA LK.: Elintarviketurvallisuuden arviointi Amesin testisovelluksilla
Kandidaatin tutkielma, 27 sivua
Ohjaaja: TtM Kati Riekkinen
Maaliskuu 2021

Avainsanat: elintarviketurvallisuus, genotoksisuus, mutageeninen, Amesin testi

ELINTARVIKETURVALLISUUDEN ARVIOINTI AMESIN TESTISOVELLUKSILLA

Amesin testi eli bakteerien käänteismutaatiomääritys on kemiallisten yhdisteiden genotoksisuuden arvioinnissa käytettävä testausmenetelmä. Testi perustuu *Salmonella* ja *Escherichia coli* -bakteerien kantoihin, joilla on perimässään mutaatio välttämätöntä aminohappoa koodaavassa geenissä. Altistuminen mutageeniselle yhdisteelle voi saada aikaan käänteismutaation, jonka myötä bakteerit pystyvät lisääntymään aminohappoa sisältämättömällä kasvualustalla. Testi on osa elintarvikkeissa käytettävien lisäaineiden turvallisuuden arviointia. Alkuperäisen Amesin testin rinnalle on myöhemmin kehitetty samaa metodologiaa hyödyntäviä pienoiskokoisia testisovelluksia, joilla voidaan tutkia yhtäaikaisesti useita eri näytteitä pienemmällä näytemäärillä.

Tämän tutkielman tavoitteena oli selvittää Amesin testin käyttöä osana elintarvikkeiden turvallisuuden arviointia. Lisäksi tavoitteena oli vertailla testimenetelmän eri sovelluksia ja niiden käyttötarkoituksia, sekä kartoittaa viimeisimpiä tutkimustuloksia testin käyttämisestä eri elintarvikeryhmillä ja arvioida tulosten perusteella testin käyttökelpoisuutta elintarviketurvallisuuden varmistamisessa.

Johtopäätöksenä voidaan todeta, että Amesin testi on yhä laajasti käytössä eri elintarvikeryhmien turvallisuuden arvioinnissa. Testi on käyttökelpoinen menetelmä osana elintarvikkeiden turvallisuuden arviointia. Pienoisokoisiin testisovelluksiin liittyy kuitenkin haasteita, minkä takia virallisessa ohjeistuksessa alkuperäinen testimenetelmä on vielä toistaiseksi ainut sallittu menetelmä. Uudemmat testisovellukset soveltuvat kuitenkin hyvin yhdisteen alustavaan genotoksisuuden arvioimiseen ja pienten näytemäärien nopeaan testaukseen esimerkiksi teollisuudessa.

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO.....	4
2. ELINTARVIKETURVALLISUUS JA LAINSÄÄDÄNTÖ	5
2.1 Lisäaineiden turvallisuuden arviointi.....	5
2.2 Genotoksisuuden arviointi	6
3. AMESIN TESTI.....	7
3.1 Bakterikannat	9
3.2 Metabolinen aktivaatio	9
4. AMESIN TESTIN SOVELLUKSET	10
4.1 Mini-Ames	10
4.2 Mikro-Ames.....	11
4.3 Ames II	12
5. AMESIN TESTI ELINTARVIKETURVALLISUUDEN ARVIOINNISSA.....	13
5.1 Amesin testi lisäaineiden turvallisuuden arvioinnissa	13
5.2 Amesin testi muiden elintarvikkeiden turvallisuuden arvioinnissa	16
6. POHDINTA.....	21
7. JOHTOPÄÄTÖKSET	22
LÄHTEET	24

1. JOHDANTO

Amesin testi eli bakteerien käänteismutaatiomääritys on kemiallisten yhdisteiden genotoksisuuden arvioinnissa käytettävä testausmenetelmä (Zeiger 2019). Testimenetelmän esitteli Bruce Ames tutkimusryhmineen ensimmäisen kerran jo vuonna 1973, mutta menetelmä on kehittynyt nykyiseen malliinsa vaiheittain vuosien saatossa (Ames ym. 1973, Zeiger 2019). Testi on edelleen hyvin yleisesti ja laajasti käytetty menetelmä elintarviketurvallisuuden arvioinnissa ja testiä käytetään monipuolisesti erilaisten elintarvikkeiden alustavissa genotoksisuuden testauksissa. Alkuperäisen Amesin testin rinnalle on myöhemmin kehitetty samaa metodologiaa hyödyntäviä pienoiskokoisia testisovelluksia, joilla voidaan tutkia yhtäaikaaisesti useita eri näytteitä pienemmällä näyttemäärillä (Pant ym. 2016).

Uusia lisäaineita ja elintarvikkeita tuodaan markkinoille jatkuvasti, ja niiden turvallisuuden arvioiminen on erityisen tärkeää kuluttajien kannalta. Vastuu elintarvikkeiden turvallisuuden varmistamisesta on niitä valmistavilla ja käsittelevillä toimijoilla (Ruokavirasto 2018). Siten elintarvikkeiden turvallisuuden arvioiminen on myös niitä valmistavien yritysten etu. Kuluttajien kasvanut tietoisuus lisäaineiden mahdollisista haittavaikutuksista on lisännyt luonnollisempien vaihtoehtojen kysyntää ja kehitystä (Erickson ja Doyle 2017). Korvaavia yhdisteitä pyritään valmistamaan erityisesti kasviperäisistä raaka-aineista, sillä kasviperäisiä aineita pidetään usein turvallisempana vaihtoehtona. Kuitenkin myös useilla kasveista peräisin olevilla yhdisteillä voi olla monia haitallisia vaikutuksia ihmisten terveydelle ja siksi myös niiden turvallisuutta on tärkeä arvioida. Mutageenisuus on yksi eniten huolta herättävistä toksikologista vaikutuksista ihmisten terveydelle, ja siksi mutageenisuutta arvioidaankin laajasti säätelyyn perustuvilla testausmenetelmillä (Benigni ja Bossa 2008). Amesin testi on yksi yleisimmin käytetyistä säätelyn alaisista mutageenisuutta arvioivista testimenetelmistä.

Tämän tutkielman tavoitteena oli selvittää Amesin testin käyttöä osana elintarvikkeiden turvallisuuden arviointia. Lisäksi tavoitteena oli kuvata ja vertailla testausmenetelmän eri sovelluksia ja niiden käyttötarkoituksia. Tutkielman tavoitteena oli myös kartoittaa viimeisimpiä tutkimuksia Amesin testin käyttämisestä eri elintarvikeryhmillä ja arvioida tulosten perusteella testin käyttökelpoisuutta elintarviketurvallisuuden arvioinnissa.

2. ELINTARVIKETURVALLISUUS JA LAINSÄÄDÄNTÖ

Elintarvikkeilla tarkoitetaan pakattuja tai pakkaamattomia syötäväksi, juotavaksi tai muulla tavoin ihmisten nautittavaksi tarkoitettuja tuotteita, valmisteita tai niiden ainesosia tai raaka-aineita (Elintarvikelaki 23/2006). Elintarviketurvallisuuskäytäntöjen avulla pyritään minimoimaan elintarvikkeista aiheutuvien haitallisten aineiden altistus ihmisille (Ruokavirasto 2020). Elintarvikkeissa olevat vaaratekijät voivat olla kemiallisia, mikrobiologisia tai fyysikaalisia. Elintarvikkeiden turvallisuus kuluttajille pyritään varmistamaan valvomalla elintarvikkeiden valmistusta, käsittelyä, pakkaamista, kuljettamista ja varastointia (Ruokavirasto 2018). Valvonta koostuu elintarviketoimijoiden omavalvonnasta sekä viranomaisvalvonnasta. Viranomaisvalvonnalla varmistetaan, että elintarvikkeiden valmistajat ja elintarvikkeet noudattavat elintarvikelainsäädännön vaatimuksia. Suomessa vaatimukset perustuvat sekä Euroopan unionin (EU) että kansalliseen lainsäädäntöön.

Elintarvikkeita, joita Euroopan unionin alueella ei ole merkittävässä määrin käytetty ihmisravinnoksi ennen 15.5.1997 voimaan astunutta asetusta, kutsutaan uuselintarvikkeiksi (novel food) (Regulation (EU) 2015/2283). Uuselintarvikkeiksi voidaan laskea esimerkiksi uusilla innovatiivisilla prosessointimenetelmillä tuotettuja elintarvikkeita tai sellaisia elintarvikkeita, joita on perinteisesti käytetty EU:n ulkopuolella. Uuselintarvikkeiden sääätely perustuu uuselintarvikelakiin. Lain mukaan uuselintarvikkeiden tulee olla turvallisia kuluttajalle, eikä niiden pakkausmerkinnät saa harhaanjohtaa kuluttajaa.

2.1 Lisäaineiden turvallisuuden arviointi

Lisäaineet ovat elintarvikkeisiin tarkoituksella lisättyjä aineita, joilla halutaan parantaa tuotteen ominaisuuksia, kuten säilyvyyttä, koostumusta tai makua (Ruokavirasto 2019). Elintarvikepakkauksissa lisäaineet tulee ilmoittaa käyttötarkoituksesta kertovan ryhmänimen lisäksi joko aineen nimellä tai E-koodilla. E-koodi kertoo lisäaineen olevan Euroopan unionissa turvalliseksi arvioitu käytettäväksi elintarvikkeissa. Lisäaineina saa käyttää vain perusteellisen turvallisuusarvioinnin läpikäyneitä aineita, jotka on hyväksytty lisäaineiksi. EU:ssa lisäaineiden turvallisuutta arvioi Euroopan elintarviketurvallisuusvirasto EFSA (European Food Safety Authority) (Ruokavirasto 2019).

EFSA on laatinut lisäaineiden turvallisuuden arviointiin ohjeistuksen, joka yhdistää tietovaatimukset sekä sovelletun riskinarviointia ohjaavan viitekehysten (EFSA 2012).

Ohjeistus sisältää neljä osiota: aineen kemia ja spesifikaatiot, voimassa olevat luvat ja arvioinnit, ehdotetut käytöt ja altistumisen arviointi, sekä toksikologiset tutkimukset. Lisäaineiden turvallisuuden arviointi perustuu tiedossa olevaan tai laskennallisesti määritettyyn ihmisen keskimääräiseen altistumiseen lisäaineelle. Arvioinnin perusteella määritetään kullekin lisäaineelle ADI (Acceptable Daily Intake) -arvo. Sillä tarkoitetaan hyväksyttävää enimmäismäärää, jolle ihminen voi altistua päivittäin ilman terveydellisiä haittoja (Ruokavirasto 2019). Lisäaineiden kemiallisen turvallisuuden arvioinnissa käytetään Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestö OECD:n (Organisation for Economic Co-operation and Development) laatiman ohjeistuksen mukaisia kemikaalien testausmenetelmiä (EFSA 2012).

2.2 Genotoksisuuden arviointi

Genotoksisuudella viitataan yhdisteen kykyyn aiheuttaa vaurioita solun geneettiseen materiaaliin (EFSA 2011). Genotoksiinit ovat perimälle myrkyllisiä, mutta eivät aina aiheuta mutaatioita. Mikäli genotoksisen aineen vaurio johtaa pysyvään muutokseen perimässä, on kyseessä mutaatio ja genotoksinen aine luokitellaan mutageeniksi. Mutageenit ovat yhdisteitä, jotka aiheuttavat soluissa mutaatioita. Ne voivat sitoutua suoraan DNA:n rakenteeseen tai vaikuttaa epäsuorasti esimerkiksi vaikuttamalla DNA:n replikaatiossa tarvittavien entsyymien toimintaan. Kaikki mutageenit ovat genotoksisia, mutta genotoksiset yhdisteet eivät välttämättä ole mutageeneja (EFSA 2011).

Genotoksisuuden arviointi kuuluu toksikologisiin tutkimuksiin, jotka ovat osa EFSA:n laatimaa elintarvikkeissa käytettävien lisäaineiden turvallisuuden arvioinnin ohjeistusta (EFSA 2011). Arvioinnissa käytetään porrastetun testauksen periaatetta, jonka ensimmäiseen tasoon kuuluvat testit ovat pakollisia kaikkien elintarvikelisiä lisäaineiden testauksessa. Ensimmäiseen tasoon kuuluu *in vitro* tehtävä testipatteristo. Ensimmäinen testi on bakteerien käänteismutaatiomääritys eli Amesin testi. Toinen *in vitro* tehtävistä testeistä on nimeltään nisäkässolun mikrotumakoe, jolla voidaan havaita genotoksisia muutoksia nisäkässoluissa (EFSA 2011).

Mikäli ensimmäisen tason tulos on positiivinen, arvioinnissa jatketaan *in vivo* tehtäviin testeihin, joilla määritetään, onko lisäaine haitallinen *in vivo* olosuhteissa (EFSA 2012). Testeihin kuuluvat *in vivo* mikrotumakoe, *in vivo* komeettatesti sekä siirtogeeninen jyrksijätesti, jotka tulisi tehdä askeleittain. Se tarkoittaa, että mikäli ensimmäisen testin tulos on positiivinen,

ei seuraaviin testeihin edetä. Jos tason kaksi tulos on positiivinen, yhdisteen katsotaan olevan genotoksinen, eikä yhdistettä hyväksytä lisäaineeksi. Mikäli testin tulos on selvästi negatiivinen, yhdisteen katsotaan olevan turvallinen. On kuitenkin mahdollista, että tasolla kaksi saadaan negatiivinen tulos, vaikka yhdisteellä olisikin genotoksista potentiaalia.

3. AMESIN TESTI

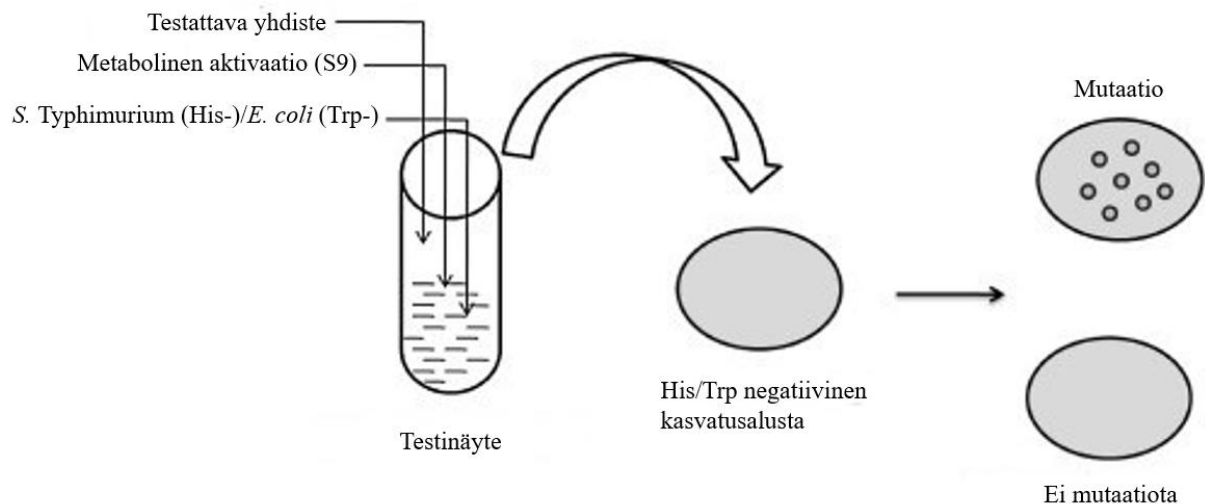
Amesin testi eli bakteerien käänteismutaatiomääritys on nopea, edullinen ja helposti toteutettava keino kartoittaa elintarvikkeissa käytettävien yhdisteiden mutageenistä potentiaalia ja tunnistaa etenkin pistemutaatioita aiheuttavia kemikaaleja tai yhdisteitä (Zeiger 2019). Amesin testin kehittäjä Bruce Ames julkaisi alkuperäisen tutkimusartikkelin testimenetelmästä jo vuonna 1973 (Ames ym. 1973), mutta testi on yhä käytössä ja osana elintarvikkeissa käytettävien lisäaineiden ja muiden yhdisteiden turvallisuuden arviointia. Alkuperäinen testimenetelmä on kuitenkin asteittain kehittynyt vuosien saatossa nykyiseen OECD:n ohjeistuksen mukaiseen muotoonsa (Zeiger 2019).

Amesin testi perustuu *Salmonella Typhimurium* ja *Escherichia coli* -bakteereiden kantoihin, joilla on perimässään mutaatio joko histidiiniä (*S. Typhimurium*) tai tryptofaania (*E. coli*) koodaavassa geenissä (OECD 2020). Mutaation takia bakteerit eivät kykene itse tuottamaan kyseistä aminohappoa, vaan lisääntyäkseen niiden kasvualustan tulee sisältää sitä. Testissä bakteerit altistetaan eri pitoisuuksille testattavaa yhdistettä joko metabolisen aktivaatiotekijän läsnä ollessa tai ilman sitä, ja viljellään agarmaljoilla, jotka sisältävät vain muutamaan solunjakautumiseen vaadittavan määrän histidiiniä tai tryptofaania.

Testattavat yhdisteet voivat aiheuttaa bakteerisoluiissa kahdentyyppisiä mutaatioita (OECD 2020). Emäsparin substituutioita aiheuttavat mutageenit aiheuttavat emäsosien muutoksia DNA:ssa. Amesin testissä tämä muutos voi tapahtua alkuperäisen mutaation kohdassa, tai vaihtoehtoisesti toisessa kohtaa bakteerin genomia. Lukukehysmutageenit puolestaan aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin lisäyksen tai poiston DNA:ssa, mikä saa aikaan lukukehysmuutoksen RNA:ssa. Jos testattava yhdiste aiheuttaa bakteerissa pistemutaation eli yhden nukleotidin emäksen muutoksen, joko addition tai deletion riippuen bakteerikannasta, se muuttaa mutatoituneen geenin takaisin toimivaa entsyymiä koodaavaksi geeniksi. Tämän seurauksena bakteeri pystyy itse tuottamaan välttämätöntä aminohappoa ja lisääntymään maljalla. Testattava yhdiste on mutageeninen, mikäli altistus yhdisteelle saa aikaan minkä tahansa testikannan pesäkkeiden lisääntymisen. Bakteereilla tapahtuu myös

spontaaneja käänteismutaatioita, minkä takia testissä tuloksia verrataan kontrollimaljoihin, joilla ei ole mutaatioita aiheuttavia yhdisteitä (OECD 2020).

Testin tuloksen lukemiseksi bakteeripesäkkeet lasketaan maljoilta ja saatua tulosta verrataan kontrollimaljoilla spontaaneiden käänteismutaatioiden aiheuttamaan pesäkkeiden lisääntymiseen (OECD 2020). Yleisesti ottaen positiiviseen tulokseen vaaditaan vähintään kaksinkertainen pesäkkeiden määrä kontrollimaljojen pesäkkeiden keskiarvoon verrattuna. Alla kuvassa 1 on esitetty havainnollistava kaaviokuva Amesin testin toimintaperiaatteesta.



Kuva 1. Yksinkertaistettu kaavio Amesin testistä eli bakteerien käänteismutaatiomäärityksestä (muokattu Jain ym. 2018).

Amesin testi voidaan toteuttaa usealla eri menetelmällä mutta kaksi niistä on käytetyimpiä (OECD 2020). Standardimenetelmässä bakteeri-testiyhdiste -suspensiot viljellään suoraan kasvatusalustan sisältävään agarmaljaan. Toisessa, esi-inkubointimenetelmässä suspensio esi-inkuboidaan, jonka jälkeen se maljataan. Molemmissa menetelmissä maljoilla olevat pesäkkeet lasketaan 2-3 päivän inkuboinnin jälkeen. Tiettyjen yhdisteiden kohdalla esi-inkubointimenetelmällä voidaan mutageenisuus havaita paremmin. Tällaisia yhdisteitä ovat esimerkiksi lyhytketjuiset alifaattiset nitrosoamiinit, kaksiarvoiset metallit, aldehydit, atsoväriaineet sekä diatsoyhdisteet, pyrollitsidiinialkaloidit, allyyliyhdisteet ja nitroyhdisteet (OECD 2020).

3.1 Bakteerikannat

OECD:n ohjeistuksen mukaisessa Amesin testimenetelmässä käytettävät bakterikannat ovat *Salmonella* Typhimurium -bakteerin kannat TA1535, TA1537, TA97, TA97a, TA98, TA100 ja TA102 (OECD 2020). Lisäksi *Escherichia coli* -bakteerin kantoja WP2 uvrA ja WP2 uvrA (pKM101) voidaan käyttää tunnistamaan tiettyjä hapettavia mutageeneja, verkkosidoksia muodostavia aineita ja hydratsiineja, joita *S. Typhimurium* -bakteerin kantojen avulla ei välttämättä havaita. *E. coli* -kantojen tavoin *Salmonella* -kannalla TA102 on primäärisessä mutaatiokohdassa adeniini-tyymiini emäspari, joten myös sitä voidaan vaihtoehtoisesti käyttää edellä mainittujen mutageenien tunnistamiseen (OECD 2020).

Jokaisella testin eri bakterikannalla on perimässään eri mutaatio välttämätöntä aminohappoa koodaavassa geenissä (Zeiger 2019). Testikannoilla on myös useita ominaisuuksia, joiden ansiosta ne havaitsevat herkemmin mutaatioita (OECD 2020). Sellaisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi herkästi reagoivat DNA-sekvenssit mutaatioiden palautumiskohdissa, solujen läpäisevyyden lisääntyminen suurille molekyyille ja DNA:n korjausjärjestelmien eliminointi tai virhealttiiden DNA-korjausprosessien tehostus. Kaikissa eri kannoissa tapahtuu mutaatioita vain yhden tietyn emäsparin kohdalla, joten käytettäessä kaikkia kantoja, kaikki emäsparimuutokset voivat olla edustettuina yhdessä testissä (Pant ym. 2016). *Salmonella* -kantoja TA97a, TA98 ja TA1537 käytetään erityisesti lukukehysmutaatioiden havaitsemiseen.

OECD:n (2020) virallisen ohjeistuksen mukaan Amesin testissä tulisi käyttää ainakin viittä määritettyä bakterikantaa, mutta niitä voidaan yhdistellä eri tavoin. Ohjeistuksessa suositeltava yhdistelmä kannoista on:

1. *S. Typhimurium* TA1535, ja
2. *S. Typhimurium* TA1537 tai TA97 tai TA97a, ja
3. *S. Typhimurium* TA98, ja
4. *S. Typhimurium* TA100, ja
5. *E. coli* WP2 uvrA, tai *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), tai *S. Typhimurium* TA102.

3.2 Metabolinen aktivaatio

Amesin testissä käytettävät bakterisolut eroavat huomattavasti nisäkässoluista esimerkiksi metabolian ja kromosomien rakenteen sekä DNA:n korjausmekanismien osalta (OECD 2020).

Siksi testimenetelmässä vaaditaan eksogeenisen metabolisen aktivaation läsnäoloa. Useimmiten testissä käytetään jyrksijöiden maksasta eristettyä post-mitokondriaalista fraktiota S9, joka sisältää entsyymejä aktivoivia aineita. Testissä bakteerit tulisi altistaa tutkittavalle yhdisteelle sekä metabolisen aktivaation läsnä ollessa että sen puuttuessa. Käytettävät S9 konsentraatiot vaihtelevat viiden ja 30 prosentin välillä eri luokkiin kuuluvien kemikaalien välillä. Esimerkiksi atsoväriaineille ja diatsoyhdisteille rajoittavien aktivaatiosysteemien käyttö voi olla tarkoituksenmukaista (OECD 2020).

On kuitenkin huomioitava, että *in vitro* käytettävät metaboliset aktivaattorit eivät täysin vastaa nisäkässoluissa *in vivo* tapahtuvia reaktioita (OECD 2020). Amesin testi ei siten anna suoraa tietoa yhdisteiden potentiaalisesta muta- tai karsinogeenisuudesta ihmissoluissa.

4. AMESIN TESTIN SOVELLUKSET

Alkuperäisen, standardoidun Amesin testin rinnalle on kehitetty pienoiskokoisia versioita vastaamaan erityisesti teollisuuden tarpeita ja niitä käytetäänkin ensisijaisesti esiseulontatarkoituksiin ennustamaan virallisessa testauksessa käytettävän, standardi-Ames -testin tulosta (Proudlock ja Evans 2016). Pienemmillä testiversioilla voidaan testata enemmän näytteitä lyhyemmässä ajassa ja testiin tarvittavat näytemäärät ovat vähäisempiä (Flamand ym. 2001). Miniatyyriversioiden heikkoutena on kuitenkin mahdottomuus käsitellä kaikkia standardoidussa Amesin testissä käytettäviä bakteerikantoja. Haasteita esiintyy etenkin käytettäessä bakteerikantoja, joilla spontaaneja käänteismutaatioita tapahtuu hitaasti. Testin pienoiversiot eroavat standardoidusta testistä lähinnä maljakoon ja Ames II -testisovellus myös käytettävien bakteerikantojen osalta (Pant ym. 2016). Uudemmissa pienoiskokoisissa testeissä voidaan käyttää joko kiinteää kasvatusalustaa, tai testaus voi tapahtua nestemäisessä faasissa, kuten Ames II -testiversiossa.

4.1 Mini-Ames

Mini-Ames -testisovelluksessa käytetään standardi-Ames -testissä käytettävien 100 mm maljojen sijaan 6-kuoppalevyä (Flamand ym. 2001). Muutoin testimenetelmä on vastaava kuin alkuperäisessä testissä, mutta se mahdollistaa huomattavasti pienempien reagenssimäärien käytön, sekä kaikkien kuuden *S. Typhimurium* -testikannan käytön yhtäaikaaisesti samalla alustalla. Mini-Ames -menetelmä vaatii 80 % vähemmän testireagensseja kuin standardi-Ames

ja samaan testaukseen voidaan sisällyttää jopa kolme eri yhdistettä testattavaksi kaikilla kuudella kannalla.

Mini-Ames kehitettiin välimalliksi 24-kuoppalevytestille ja standarditestille, koska isommat testialustat sopivat paremmin kantojen TA1535 ja TA1537 käyttöön (Pant ym. 2016). Kyseisillä kannoilla käänteismutaatiopesäkkeiden määrä kontrollimaljoilla on alhainen, mikä hankaloittaa testin tulosten tulkintaa. Tutkimukset ovat osoittaneet Mini-Amesin omaavan korkean yhdenmukaisuuden alkuperäisen Amesin testin tulosten kanssa (Flamand ym. 2001, Pant ym. 2016).

4.2 Mikro-Ames

Mikro-Ames määrittäminen tapahtuu 24-kuoppalevyillä, ja se vaatii 20 kertaa vähemmän testauksessa käytettäviä yhdisteitä kuin alkuperäinen Amesin testi (Proudlock ja Evans 2016). Toisin kuin standardi-Ames ja Mini-Ames -testeissä, Mikro-Ames -menetelmässä testattava yhdiste lisätään kuoppalevyn kuopassa olevaan pohja-agarin, jonka päälle lisätään testikannan ja S9-fraktion sisältävä pinta-agar. Muutoin testimenetelmä on standardimenetelmää vastaava ja käytettävät testikannat samat. Testissä voidaan käyttää esi-inkubointimenetelmää, jolloin esi-inkubointi tapahtuu primäärilevyllä, jonka kustakin kuopasta siirretään sekundäärilevyille kolme rinnakkaista testinäytettä.

Koska Mikro-Amesissa käytetään 20 kertaa pienempää bakteeripopulaatiota yhdessä kuopassa, sen herkkyys on standardi-Amesia alhaisempi, eli se havaitsee yleisesti ottaen vain vahvempia mutageeneja tai vaatii suurempia pitoisuuksia mutageenistä yhdistettä osoittaakseen vasteen (Proudlock ja Evans 2016). Mikro-Ames toimii Mini-Amesia huonommin myös kantojen TA1537 ja TA1535 kanssa, sillä kyseisillä kannoilla kontrollimaljojen pesäkemäärä voi jäädä jopa nolnaan, jolloin vertailua kontrolliin ei voida tehdä (Pant ym. 2016). Kannan TA1537 sijasta voidaan kuitenkin käyttää kantaa TA97a, jolloin myös pienemmillä maljoilla saadaan suurempi kontrollipesäkkeiden ilmaantuvuus. Kanta TA1535 kuitenkin vaaditaan OECD:n ohjeistuksen mukaisessa määrittämisessä, joten sen korvaaminen ei ole mahdollista. Kontrollimaljojen määrää voidaan kuitenkin nostaa 12:een, jolloin saadaan mitattavissa oleva, toistettava arvo kuoppaa kohti.

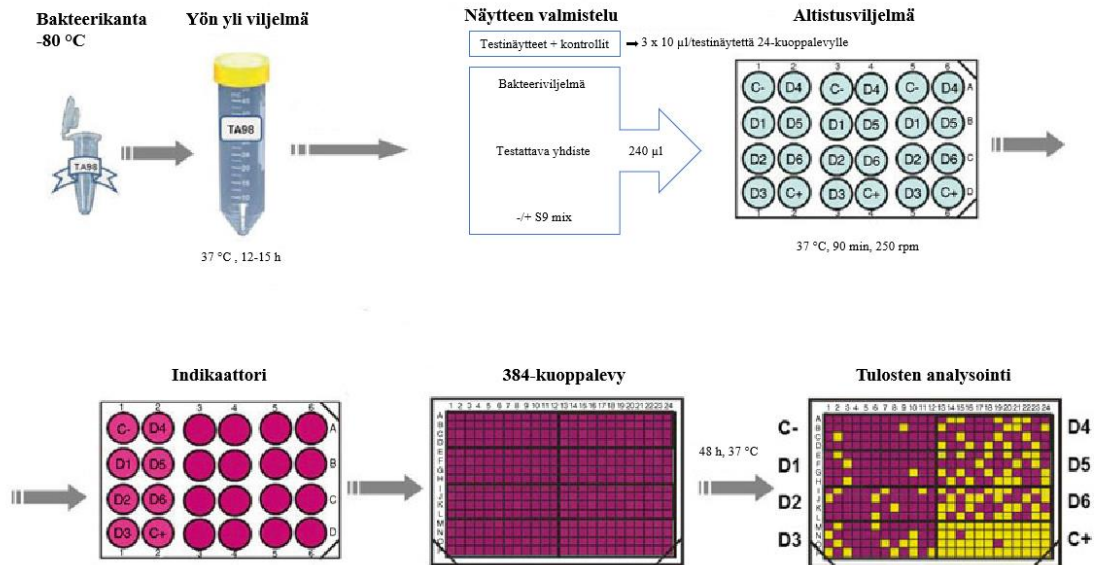
Tutkimuksessa, jossa testattiin 13 eri kemikaalia, havaittiin Mikro-Ames -testin kyky tunnistaa mutageenisia yhdisteitä olevan vastaava kuin standardi-Amesin (Pant ym. 2016). Lisäksi testin herkkyys oli standardi-Amesia vastaava, annoskohtaisen korrelaation ollessa 93,3 %.

4.3 Ames II

Ames II on toisen sukupolven bakteerien käänteismutaatiomääritystesti, joka on suunniteltu erityisesti esiseulontatarkoitukseen (Pant ym. 2016). Testialustana käytetään 384-kuoppalevyä. Kuvassa 2 on esitetty kaavio Ames II -testimenetelmästä. Testi mahdollistaa testauksen hyvin pienillä määrillä testattavaa ainetta. Toisin kuin useimmat muut testisovellukset, Ames II testaus tapahtuu nestemäisellä kasvatusalustalla. Myös tulosten lukeminen poikkeaa alkuperäisestä testistä, sillä se perustuu värimuutokseen violetista keltaiseksi, joka aiheutuu pH:n laskusta metabolisten prosessien seurauksena. Lisäksi Ames II -testissä käytettävät bakteerikannat eroavat alkuperäisistä (Kamber ym. 2009). Testikannat ovat TA700x-sarjan kannat TA7000-TA7006, joilla jokaisella on eri emäsparin kattava mutaatio histidiiniä koodaavassa geenissä. Niiden avulla voidaan havaita emäsparimuutoksia, mutta ei kehysiiirtymiä. Siksi rinnakkain käytetään myös TA98-kantaa.

Ames II -testin etuja ovat kustannustehokkuus, hyvä herkkyys sekä sopivuus pienille näytemäärille (Pant ym. 2016). Lisäksi testi vähentää työn määrää ja aikaa, käytettävien reagenssien määrää sekä myös jätteen määrää. Myös tulosten lukeminen on helpompaa ja nopeampaa kuin muissa testiversioissa ja aiheuttaa vähemmän tulkintavirheitä (Spiliotopoulos ja Koelbert 2020). Testisovelluksen huonona puolena voidaan kuitenkin pitää sitä, että siinä käytettävät bakteerikannat eroavat alkuperäisestä, standardoidusta testistä (Flamand ym. 2001). Siten testin yhteneväisyys alkuperäisen testin kanssa on kyseenalainen. Lisäksi testi rajoittaa muiden kuin vesiliukoisten yhdisteiden testaamista.

Suurimmassa osassa Ames II -testin luotettavuutta arvioivista tutkimuksista Ames II tunnisti mutageenit yhtä hyvin kuin standardi-Ames (Spiliotopoulos ja Koelbert 2020). Yhdysvaltain hallituksen alaisen National Toxicology Program (NTP) -tietokannan tuloksissa vastaavuus testien välillä oli jopa 96,3 %. Ottamalla huomioon myös muualta kuin NTP-tietokannasta löytyvät tutkimukset, tulosten keskiarvon mukaan standardi-Amesin ja Ames II -testin vastaavuus on 95,8 %. Lisäksi Ames II -testin spesifisyys on erittäin korkea, yli 90 %. Herkkyyden arviointia puolestaan heikentää vähäinen mutageenisten testituotteiden datan määrä.



Kuva 2. Ames II -testimenetelmä (muokattu Flückiger-Isler ja Kamber 2014).

5. AMESIN TESTI ELINTARVIKETURVALLISUUDEN ARVIOINNISSA

Tässä kirjallisuuskatsauksessa tarkasteltiin viimeisen kymmenen vuoden ajalta 16:sta tutkimusta, joissa Amesin testiä oli käytetty eri elintarvikekäyttöön tarkoitettujen aineiden turvallisuuden arvioinnissa. Tutkimuksissa Amesin testiä oli käytetty lisäaineiden ja muiden elintarvikkeiden mutageenisuuden arvioinnissa.

5.1 Amesin testi lisäaineiden turvallisuuden arvioinnissa

Tutkimustuloksia Amesin testin käytöstä lisäaineiden mutageenisuuden arvioinnissa on esitetty taulukossa 1. Tutkielmaan valituissa tutkimuksissa Amesin testiä oli käytetty kahden eri makeutusaineen turvallisuuden arvioinnissa. Aspartaamin mutageenisuutta oli tutkittu käyttäen neljää *Salmonella* -kantaa TA98, TA100, TA1535 ja TA1537, sekä *E. coli* -kantaa WP2 uvrA (Otabe ym. 2019). Tutkimuksessa käytettiin esi-inkubointimenetelmää ja näytteet tutkittiin ilman metabolista aktivaatiota ja sen läsnä ollessa. Aspartaamin ei havaittu olevan mutageeninen millään tutkitulla testikannalla Toisessa tutkimuksessa Amesin testillä oli selvitetty makeutusaineena käytettävän advantaamin mutageenistä potentiaalia käyttäen neljää *Salmonella* -kantaa TA98, TA100, TA1535 ja TA1537, sekä *E. coli* -kantaa WP2 uvrA

(pKM101) (Otabe ym. 2011). Tutkimuksessa käytettiin esi-inkubointimenetelmää ja näytteet tutkittiin sekä ilman metabolista aktivaatiota että sen läsnä ollessa. Myöskään advantaamin ei havaittu olevan mutageeninen millään tutkitulla testikannalla

Makeutusaineiden lisäksi Amesin testillä oli tutkittu elintarvikearomeina käytettävien yhdisteiden mutageenisuutta. Di Sotto ym. (2013) tutkivat beta-karyofylleenin genotoksisuutta käyttäen kolmea eri bakteerikantaa TA98, TA100 ja WP2 uvrA. Beta-karyofylleeni kuuluu yhdisteisiin, joiden riskinarviointia varten EFSA pyysi lisäselvitystä vuonna 2012 ja sen turvallisuusarviointi on vielä kesken. Amesin testi tehtiin sekä ilman metabolista aktivaatiota että sen kanssa, mutta beta-karyofylleenin ei havaittu olevan mutageeninen millään testatulla kannalla. Toisessa tutkimuksessa oli selvitetty elintarvikearomeina käytettävien karvakrolin ja tymolin mutageenisuutta (Llana-Ruiz-Cabello ym. 2014). EFSA ei ole hyväksynyt karvakrolia ja tymolia lisäaineiksi, mutta ne ovat Euroopan neuvoston, Elintarvike- ja lääkeviraston (FDA) sekä Elintarvike- ja maatalousjärjestön / Maailman terveysjärjestön (FAO/WHO) elintarvikelisiä aineiden asiantuntijakomitean (JECFA) rekisteröimiä aromeja ja elintarvikkeita. Tutkimuksessa Amesin testi tehtiin käyttäen standardimenetelmää ja viittä eri *Salmonella* -kantaa TA97a, TA98, TA100, TA102 ja TA104. Testi tehtiin sekä ilman metabolista aktivaatiota että sen läsnä ollessa. Tutkimuksessa havaittiin karvakrolilla olevan mutageenistä potentiaalia kannoilla TA97a ja TA98, mutta tymolin ei havaittu olevan mutageeninen yhdelläkään testatulla kannalla.

Jia ym. (2015) tutkivat bambusta valmistetun, elintarvikeväriaineena käytettävän kasviperäisen lääkehiilen mutageenisuutta. Amesin testi tehtiin käyttäen standardimenetelmää metabolisen aktivaation läsnä ollessa ja ilman sitä. Tutkimuksessa käytettiin neljää eri *Salmonella* -kantaa TA97, TA98, TA100 ja TA102. Bambusta peräisin olevan lääkehiilen ei havaittu Amesin testissä olevan mutageeninen millään testatulla bakteerikannalla. Hobbs ym. (2012) puolestaan selvittivät emulgointi-, stabilointi- ja sakeuttamisaineena käytettävän gum ghatin genotoksisuutta. Tutkimuksessa Amesin testi tehtiin käyttäen esi-inkubointimenetelmää ja viittä eri bakteerikantaa (TA97a, TA98, TA100, TA1535 ja WP2 uvrA (pKM101)) sekä metabolisen aktivaation läsnä ollessa että ilman sitä. Tutkimuksessa gum ghatilla ei havaittu olevan mutageenistä potentiaalia Amesin testissä.

Taulukko 1. Lisäaineiden mutageenisuuden arviointi Amesin testillä.

Viite	Lisäaine	Käyttötarkoitus	Testikannat	Metabolinen aktivaatio	Testimenetelmä	Tulos
Otabe ym. 2019	Aspartaami	Makeutusaine	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 uvrA	-S9/+S9	Esi-inkubointi	–
Jia ym. 2015	Kasviperäinen lääkehiili	Väriaine	TA97, TA98, TA100, TA102	-S9/+S9	Standardi	–
Llana-Ruiz-Cabello ym. 2014	Karvakroli Tymoli	Aromi Aromi	TA97a, TA98, TA100, TA102, TA104	-S9/+S9	Standardi	Karvakroli + Tymoli –
Di Sotto ym. 2013	Beta-karyofylleeni	Aromi	TA98, TA100, WP2 uvrA	-S9/+S9	Ei saatavilla	–
Hobbs ym. 2012	Gum ghatti	Emulgointi-, stabilointi- ja sakeuttamisaine	TA97a, TA98, TA100, TA1535, WP2 uvrA (pKM101)	-S9/+S9	Esi-inkubointi	–
Otabe ym. 2011	Advantaami	Makeutusaine	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 uvrA (pKM101)	-S9/+S9	Esi-inkubointi	–

(–) = negatiivinen; (+) = positiivinen

5.2 Amesin testi muiden elintarvikkeiden turvallisuuden arvioinnissa

Kuluttajien lisääntynyt tietoisuus elintarvikkeiden sisältämien lisäaineiden mahdollisista haittavaikutuksista on lisännyt luonnollisempien lisäaineiden kysyntää (Erickson ja Doyle 2017). Perinteisille synteettisille lisäaineille kehitetään uusia, luonnollisista raaka-aineista eristettyjä vaihtoehtoisia yhdisteitä, joilla on samankaltaisia vaikutuksia elintarvikkeen ominaisuuksiin. Useita nykyisinkin elintarvikkeissa käytettäviä lisäaineita esiintyy myös luonnossa, kuten happamuudensäätöaineena käytettävä askorbiinihappo, tuttavallisemmin C-vitamiini. Uuselintarvikkeiden turvallisuudesta on kuitenkin varmistuttava ennen niiden käyttöönottoa (Regulation (EU) 2015/2283). Luonnosta peräisin olevien, erityisesti kasvipäristä aineiden saatetaan ajatella olevan turvallisempia, mutta näin ei aina ole (Schoepfer ym. 2007). Esimerkiksi joillakin kasveista peräisin olevilla flavonoideilla on osoitettu olevan mutageenisia vaikutuksia suurilla pitoisuuksilla (Skibola ja Smith 2000).

Elintarvikelisiä lisäaineiden lisäksi Amesin testiä oli tutkielmaan valituissa tutkimuksissa käytetty luonnollisista raaka-aineista peräisin olevien yhdisteiden ja muiden elintarvikkeiden mutageenisuuden arvioinnissa (taulukko 2). Rodríguez-Sánchez ym. (2019) tutkivat Amesin testillä avokadon siemenistä eristetyn Avosafe[®] -ekstraktin turvallisuutta. Yhdisteellä on antimikrobisia ominaisuuksia ja se onkin herättänyt kiinnostusta mahdollisena synteettisten lisäaineiden korvaajana. Tutkimuksessa Amesin testi tehtiin standardimenetelmällä käyttäen viittä eri testikantaa (TA98, TA100, TA1535, TA1537 ja WP2 uvrA (pKM101)) sekä metabolisen aktivaation läsnä ollessa että ilman sitä. Avosafe[®] -ekstraktilla ei tutkimuksessa havaittu olevan mutageenistä potentiaalia millään testikannalla. Fraser ym. (2018) puolestaan tutkivat *Pichia Pastoris* -sienen avulla tuotetun soijan leghemoglobiinin mutageenisuutta. Kyseisen proteiinin avulla saadaan lihaa muistuttava maku kasvipäristäisiin lihankorvikkeisiin. Amesin testi tehtiin käyttäen viittä bakteerikantaa sekä standardi- että esi-inkubointimenetelmällä. Testit tehtiin ilman metabolista aktivaatiota ja sen kanssa. Tutkimuksessa soijan leghemoglobiini -proteiinin ei havaittu olevan mutageeninen millään testikannalla kummallakaan menetelmällä.

López-Rios ym. (2018) tutkivat Amesin testillä merileväuutetta ja granaattiomenan siemenistä eristettyä öljyä sisältävän Xanthigen[®] -painonhallintavalmisteen genotoksisuutta. Testi tehtiin standardimenetelmällä käyttäen neljää *Salmonella* -kantaa TA98, TA100, TA1535 ja TA1537, sekä *E. coli* -kantaa WP2 uvrA sekä metabolisen aktivaattorin kanssa ja ilman. Testin tulosten perusteella Xanthigen[®] -valmisteella ei havaittu olevan mutageenistä potentiaalia. Samalla

testimenetelmällä ja bakteerikannoilla tutkittiin myös kiinanloisikka -sienestä (*Cordyceps sinensis*) valmistettua ClearTaste -nimistä makumodulaattoria (Soni ja Langan 2018). Myöskään ClearTasten ei havaittu olevan mutageeninen yhdelläkään testatuista kannoista. Honda ym. (2017) tutkivat tomaatista eristetyn, bioaktiivisempaa Z-isomeeria sisältävän lykopeeni uutteen mutageenisuutta käyttäen samoja edellä mainittuja testikantoja, mutta esi-inkubointimenetelmällä. Myöskään lykopeeni uute ei osoittanut mutageenistä potentiaalia millään testatulla kannalla. Nitteranon ym. (2014) tutkivat ritarinkukasta (*Hippeastrum reticulatum*) eristetyn pigmentti uutteen mutageenisuutta Amesin testillä käyttäen kahta *Salmonella* -kanta TA98 ja TA100. Tutkimuksessa käytettiin standardimenetelmää ja testit tehtiin sekä metabolisen aktivaation läsnä ollessa että ilman sitä. Yhdisteellä ei havaittu mutageenisuutta kummallakaan testatulla bakteerikannalla. Tutkimuksessa havaittiin myös käänteismutaatiopesäkkeiden määrän olevan pienempi metabolisen aktivaation läsnä ollessa. Resende ym. (2012) tutkivat kymmenen flavonoidin mutageenisuutta Amesin testillä. Testissä käytettiin kolmea *Salmonella* -kanta TA98, TA100 ja TA102 ja esi-inkubointimenetelmää. Tutkimuksessa merkittävin mutageenisuus havaittiin kversetiinillä, jonka testituloksena oli negatiivinen ainoastaan kannalla TA102 ilman metabolista aktivaatiota. Myös kemferoli ja galangiini olivat selvästi mutageenisia kannalla TA98 metabolisen aktivaation läsnä ollessa. Lisäksi fisetiini, luteoliini ja flavoni osoittivat merkkejä mutageenisuudesta kannalla TA102.

Amesin testillä oli tutkielmaan valituissa tutkimuksissa testattu myös Suomessa myytävien elintarvikkeiden mutageenistä potentiaalia. Omoruyi ym. (2020) tutkivat Suomessa myytävien prosessoitujen liha- ja kalavalmisteiden mutageenisuutta käyttäen standardimenetelmää ja *Salmonella* -kantoja TA98 ja TA100. Tutkituista tuotteista savustetun kalavalmisteen havaittiin olevan mutageeninen molemmilla bakteerikannoilla sekä ilman metabolista aktivaatiota että sen läsnä ollessa. Tuloksia voidaan kuitenkin pienen otoskoon perusteella pitää enemmänkin indikoivina. Myös Omoruyi ja Pohjanvirta (2014) tutkivat Suomessa myytävien prosessoitujen elintarvikkeiden ja valmisruokien mutageenisuutta käyttäen samoja edellä mainittuja testikantoja ja standardimenetelmää. Lisäksi näytteille, joilla havaittiin mutageenistä potentiaalia, tehtiin erillinen testi käyttäen niin sanottua treat-and-wash -menetelmää, jossa S9-bakteeri-testinäyte -yhdistelmiä esi-inkuboitiin 90 minuutin ajan ennen maljausta. Tutkimuksessa havaittiin mutageenistä potentiaalia yhdeksällä 20:stä tutkitusta elintarvikenäytteestä (savustettu kana, hunajapaahdettu kana, grillattu kalkkunaleikkele, kylmäsavustettu naudanliha, paistettu kala, salami, juustohampurilainen, hampurilainen naudanlihapihvillä ja kananugetit). Osa näytteiden testituloksista oli positiivisia myös ilman metabolista aktivaatiota, osoittaen selvää mutageenisuutta. Liu ym. (2017) puolestaan tutkivat

Amesin testillä viiden eri kansainvälisen kahvilaketjun myymän Americano-kahvin mutageenisuutta. Amesin testi tehtiin standardimenetelmällä käyttäen kolmea *Salmonella* -kanta TA98, TA100 ja TA1535 sekä metabolisen aktivaation kanssa että ilman sitä. Yksikään testatuista kahvinäytteistä ei osoittanut mutageenistä potentiaalia millään testatulla kannalla.

Taulukko 2. Elintarvikkeiden mutageenisuuden arviointi Amesin testillä.

Viite	Elintarvike	Testikannat	Metabolinen aktivaatio	Testimenetelmä	Tulos
Omoruyi ym. 2020	Prosessoidut liha- ja kalavalmisteet	TA98, TA100	-S9/+S9	Standardi	Savustettu kala +
Rodríguez-Sánchez ym. 2019	Avosafe® -ekstrakti avokadon siemenistä	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 uvrA (pKM101)	-S9/+S9	Standardi	–
Fraser ym. 2018	Soijan leghemoglobiini - proteiini	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 uvrA	-S9/+S9	Standardi, esi-inkubointi	–
López-Rios ym. 2018	Xanthigen® - painonhallintavalmiste	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 uvrA	-S9/+S9	Standardi	–
Soni ja Langan 2018	ClearTaste - makumodulaattori	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 uvrA	-S9/+S9	Standardi	–
Honda ym. 2017	Tomaatista eristetty lykopeeniute	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 uvrA	-S9/+S9	Esi-inkubointi	–
Liu ym. 2017	Americano-kahvi	TA98, TA100, TA1535	-S9/+S9	Standardi	–

(jatkuu)

Taulukko 2, jatkuu.

Viite	Elintarvike	Testikannat	Metabolinen aktivaatio	Testimenetelmä	Tulos
Nitteranon ym. 2014	Ritarinkukasta eristetty pigmenttiuute	TA98, TA100	-S9/+S9	Standardi	–
Omoruyi ja Pohjanvirta 2014	Prosessoidut elintarvikkeet ja valmisruoat	TA98, TA100	-S9/+S9	Standardi, treat-and-wash -menetelmä	Savustettu kana + Hunajapaahdettu kana + Grillattu kalkkunaleikkele + Kylmäsavustettu naudanliha + Paistettu kala + Salami + Juustohampurilainen + Naudanlihahampurilainen + Kananugetit +
Resende ym. 2012	Kversetiini Kemferoli Luteoliini Fisetiini Krysiini Galangiini Flavoni 3-hydroksiflavoni 5-hydroksiflavoni 7-hydroksiflavoni	TA98, TA100, TA102	-S9/+S9	Esi-inkubointi	Kversetiini + Kemferoli + Galangiini +

(–) = negatiivinen; (+) = positiivinen

6. POHDINTA

Amesin testi on säilynyt alkuperäisessä muodossaan olennaisena osana elintarvikkeissa käytettävien aineiden turvallisuuden arviointia jo lähes 50 vuotta (Zeiger 2019). Tutkimusmenetelmien ja teknologian kehityksen myötä voisi olettaa uudempien menetelmien jo korvanneen testin, mutta niin ei ole kuitenkaan tapahtunut. Vaikka alkuperäisen testimuodon rinnalle onkin kehitetty uusia, nopeampia testisovelluksia, alkuperäinen testi vaaditaan edelleen elintarvikkeissa käytettävien aineiden turvallisuusarvioinnissa. Kirjallisuuden perusteella pienoiskokoiset Mini-Ames, Mikro-Ames ja Ames II -testisovellukset ovat standardimenetelmään verrattuna melko luotettavia ja käyttökelpoisia etenkin seulontavaiheen testauksissa teollisuudessa (Flamand ym. 2001, Pant ym. 2016, Spiliotopoulos ja Koelbert 2020). Koska alkuperäinen testi yhä vaaditaan elintarvikkeissa käytettävien lisäaineiden turvallisuuden arvioinnissa, ei eri testisovelluksia hyödyntäviä tutkimuksia elintarvikkeiden turvallisuuden arvioinnista juurikaan löydy. Amesin testin etuja ovat etenkin nopeus, edullisuus sekä menetelmän yksinkertaisuus, mikä mahdollistaa helposti toistettavan testauksen kaikissa laboratorioissa maailmanlaajuisesti (Zeiger 2019). Nämä syyt ovat olennaisesti vaikuttaneet siihen, että testi on yhä käytössä elintarvikkeiden turvallisuuden arvioinnissa.

Kirjallisuudessa Amesin testausmenetelmät vaihtelivat eri tutkimusten välillä. Eniten vaihtelua oli käytettyjen bakteerikantojen määrässä. Useimmissa tutkimuksissa testaus oli tehty käyttäen viittä eri kantaa OECD:n ohjeistuksen mukaisesti. Yhdessä tutkimuksessa oli käytetty neljää kantaa (Jia ym. 2015) ja kolmessa kolmea kantaa (Resende ym. 2012, Di Sotto ym. 2013, Liu ym. 2017). Kolmessa tutkimuksessa oli käytetty ainoastaan kahta bakteerikantaa (Nitteranon ym. 2014, Omoruyi ja Pohjanvirta 2014, Omoruyi ym. 2020). Viiden kannan käyttäminen standardimenetelmää käyttäen on työlästä, mikä voi selittää sitä, että testauksessa käytetään usein vain 2-4:ä bakteerikantaa (Proudlock ja Evans 2016). Kaikissa tutkimuksissa kantoja ei myöskään ollut käytetty OECD:n voimassa olevan ohjeistuksen mukaan, vaikka kantoja olikin viisi (Llana-Ruiz-Cabello ym. 2014). Tämä johtui siitä, että testi oli tehty noudattaen OECD:n vanhaa ohjeistusta. Kaikissa tutkielmassa käsitellyissä tutkimuksissa testit oli kuitenkin tehty ohjeistuksen mukaisesti sekä ilman metabolista aktivaatiota että sen kanssa.

Useissa tutkimuksissa, joissa tietyn elintarvikekäyttöön suunnatun yhdisteen genotoksista potentiaalia tutkittiin Amesin testillä, oli OECD:n virallisesta ohjeistuksesta poiketen käytetty alle viittä eri bakteerikantaa. Alustavissa tutkimuksissa pienemmän kantamäärän käyttö voi olla

perusteltua esimerkiksi resurssien säästämiseksi, mikäli tarkoitus on alustavasti kartoittaa aineen ominaisuuksia ja turvallisuutta. Testi on kuitenkin suunniteltu tehtäväksi käyttäen ainakin viittä eri bakteerikantaa eri mutaatioiden tunnistamiseksi, joten testin luotettavuuden parantamiseksi olisi viiden bakteerikannan käyttö suotavaa. Lisäksi virallisissa toksikologisissa tutkimuksissa viiden kannan käyttö vaaditaan, joten niiden käyttö jo tutkimusten alkuvaiheessa voisi helpottaa myöhemmän vaiheen testausta.

Tutkielmaan valituissa lisäaineiden mutageenisuutta selvittävässä tutkimuksessa vain aromina käytettävällä karvakrolilla havaittiin Amesin testissä mutageenistä potentiaalia (Llana-Ruiz-Cabello ym. 2014). Muiden kuin lisäaineiden turvallisuutta arvioivissa tutkimuksissa havaittiin kuitenkin useita mutageenisia elintarvikkeita. Etenkin useat Suomessa myytävät liha- ja kalavalmisteet sekä muut prosessoidut elintarvikkeet osoittivat tutkimuksissa vahvaa mutageenisuutta (Omoruyi ja Pohjanvirta 2014, Omoruyi ym. 2020). Tulosten perusteella voidaankin sanoa, että myös erilaisilla tuotantoprosesseilla valmistettujen elintarvikkeiden turvallisuutta tulisi arvioida enemmän. Lisäksi eräiden flavonoidien havaittiin olevan mutageenisia (Resende ym. 2012). Erilaisten ravintolisinä käytettävien, kasviperäisiä ainesosia sisältävien valmisteiden turvallisuudesta tulisi myös varmistua ennen niiden tuomista markkinoille ja kuluttajien saataville.

Vaikka Amesin testituloksen perusteella tutkittava yhdiste ei olisi genotoksinen, se ei välttämättä tarkoita, ettei kyseinen yhdiste olisi ihmissolussa mutageeninen. Esimerkiksi tärkkelyspitoisten elintarvikkeiden prosessoinnissa syntyvän mutageenisen akryyliamidin on useissa tutkimuksissa havaittu olevan ei-mutageeninen Amesin testissä (Dearfield ym. 1995). Usein lisäaineiden turvallisuuden arvioinnissa tehdäänkin *in vitro* testien lisäksi *in vivo* testejä, jotta saadaan parempi käsitys yhdisteen genotoksisuudesta elimistössä. Amesin testistä saadaan kuitenkin harvoin vääriä positiivisia tuloksia, joten positiivinen tulos testistä riittää yleensä määrittelemään yhdisteen genotoksiseksi (Zeiger 2019). Siten testiä voidaan pitää melko luotettavana ensimmäisen vaiheen testimenetelmänä genotoksisten yhdisteiden tunnistamiseen *in vitro* olosuhteissa, etenkin turvallisuusarvioinnin alkuvaiheessa.

7. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän tutkielman käsittelemän kirjallisuuden pohjalta voidaan todeta, että Amesin testi on yhä laajasti käytössä eri elintarvikeryhmien turvallisuuden arvioinnissa. Amesin testi on toimiva ja

käyttökelpoinen testimenetelmä lisäaineiden ja muiden elintarvikkeiden turvallisuuden arvioinnissa, mutta myös muita testausmenetelmiä tarvitaan varmistamaan elintarvikkeiden turvallisuus etenkin *in vivo* olosuhteissa. Testin etuja ovat helppous, nopeus ja hyvä kyky tunnistaa genotoksiset yhdisteet. Pienois kokoisten Amesin testimenetelmien haasteena on vähän spontaaneja käänteismutaatioita ilmentävien bakteerikantojen käyttö, sillä se hankaloittaa tulosten tulkintaa. Lisäksi Ames II -testisovelluksessa hyödynnetään OECD:n ohjeistuksesta poikkeavia bakteerikantoja, joten tuloksia ei voida täysin verrata standardimenetelmään. Amesin testin eri sovellukset vastaavat kuitenkin luotettavuudeltaan melko hyvin standardimenetelmää ja soveltuvat hyvin etenkin pienten näytämäärien nopeaan testaukseen.

LÄHTEET

Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2281-2285.

Benigni R, Bossa C. Structure alerts for carcinogenicity, and the *Salmonella* assay system: A novel insight through the chemical relational databases technology. *Mutat Res* 2008;659(3):248-261.

Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Sega GA, Brusick DJ. Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat Res* 1995;330(1-2):71-99.

Di Sotto A, Maffei F, Hrelia P, Castelli F, Sarpietro MG, Mazzanti G. Genotoxicity assessment of β -caryophyllene oxide. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013;66(3):264-268.

EFSA. Guidance for submission for food additive evaluations, *EFSA Journal* 2012;10(7):2760.

EFSA. Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment, *EFSA Journal* 2011;9(9):2379.

Elintarvikelaki 23/2006.

Erickson MC, Doyle MP. The Challenges of Eliminating or Substituting Antimicrobial Preservatives in Foods. *Annu Rev Food Sci Technol* 2017;8(1):371-390.

Flamand N, Meunier J, Meunier P, Agapakis-Caussé C. Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in a prescreening assay for point mutagenesis assessment. *Toxicol In Vitro* 2001;15(2):105-114.

Flückiger-Isler S, Kamber M. The Ames II and Ames MPF Penta I Assay: A Liquid Microplate Format Modification of the Classic Ames Test. Kirjassa: Sierra LM, Gaivão I. Genotoxicity and DNA Repair. New York: Humana Press 2014, s. 23-41.

Fraser RZ, Shitut M, Agrawal P, Mendes O, Klapholz S. Safety Evaluation of Soy Leghemoglobin Protein Preparation Derived From *Pichia Pastoris*, Intended for Use as a Flavor Catalyst in Plant-Based Meat. *Int J Toxicol* 2018;37(3):241-262.

Hobbs CA, Swartz C, Maronpot R, Davis J, Recio L, Hayashi S. Evaluation of the genotoxicity of the food additive, gum ghatti. *Food Chem Toxicol* 2012;50(3-4):854-860.

Honda M, Higashiura T, Fukaya T. Safety assessment of a natural tomato oleoresin containing high amounts of Z-isomers of lycopene prepared with supercritical carbon dioxide. *J Sci Food Agric* 2017;97(3):1027-1033.

Jain AK, Singh D, Dubey K, Maurya R, Mittal S, Pandey AK. Models and Methods for In vitro Toxicity. Kirjassa: Dhawan A, Kwon S. *In Vitro Toxicology*. Amsterdam: Elsevier Inc 2018, s. 45-65.

Jia Z, Zhong Y, Yan J, Lu Y, Song Y, Chen J ym. Safety assessment of dietary bamboo charcoal powder: A 90-day subchronic oral toxicity and mutagenicity studies. *Food Chem Toxicol* 2015;75:50-57.

Kamber M, Flückiger-Isler S, Engelhardt G, Jaeckh R, Zeiger E. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis* 2009;24(4):359-366.

Liu Z, Chen P, Wang J, Kuo T. Assessment of Cellular Mutagenicity of Americano Coffees from Popular Coffee Chains. *J Food Prot* 2017;80(9):1489-1495.

Llana-Ruiz-Cabello M, Maisanaba S, Puerto M, Prieto AI, Pichardo S, Jos Á ym. Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames *Salmonella* test and alkaline, Endo III- and FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2. *Food Chem Toxicol* 2014;72:122-128.

López-Rios L, Vega T, Chirino R, Jung JC, Davis B, Pérez-Machín R ym. Toxicological assessment of Xanthigen[®] nutraceutical extract combination: Mutagenicity, genotoxicity and oral toxicity. *Toxicol Rep* 2018;5:1021-1031.

Nitteranon V, Kittiwongwattana C, Vuttipongchaikij S, Sakulkoo J, Sriyakkoat M, Chokratin P ym. Evaluations of the mutagenicity of a pigment extract from bulb culture of *Hippeastrum reticulatum*. *Food Chem Toxicol* 2014;69:237-243.

OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing 2020.

Omoruyi IM, Hokkanen M, Pohjanvirta R. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Select Commercially Processed Meat and Fish Products in Finland and the Mutagenic Potential of These Food Items. *Polycyclic Aromatic Compounds* 2020;40(4):927-933.

Omoruyi IM, Pohjanvirta R. Genotoxicity of Processed food items and ready-to-eat snacks in Finland. *Food Chem* 2014;162:206-214.

Otabe A, Fujieda T, Masuyama T. In vitro and in vivo assessment of the mutagenic activity of N-[N-[3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) propyl]- α -aspartyl]-L-phenylalanine 1-methyl ester, monohydrate (advantame). *Food Chem Toxicol* 2011;49:S30-S34.

Otabe A, Ohta F, Takumi A, Lynch B. Mutagenicity and genotoxicity studies of aspartame. *Regul Toxicol Pharmacol* 2019;103:345-351.

Pant K, Bruce S, Sly J ym. Bacterial mutagenicity assays: Vehicle and positive control results from the standard Ames assay, the 6- and 24- well miniaturized plate incorporation assays and the Ames IITM assay. *Environ Mol Mutagen* 2016;57(6):483-496.

Proudlock R, Evans K. The micro-Ames test: A direct comparison of the performance and sensitivities of the standard and 24-well plate versions of the bacterial mutation test. *Environ Mol Mutagen* 2016;57(9):687-705.

Regulation (EU) 2015/2283 Of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods.

Resende FA, Vilegas W, Campaner dos Santos L, Varanda EA. Mutagenicity of Flavonoids Assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test. *Molecules* 2012;17(5):5255-5268.

Rodríguez-Sánchez DG, Pacheco A, Villarreal-Lara R, Ramos-González MR, Ramos-Parra PA, Granados-Principal S ym. Chemical Profile and Safety Assessment of a Food-Grade Acetogenin-Enriched Antimicrobial Extract from Avocado Seed. *Molecules* 2019;24(13):2354.

Ruokavirasto, *Elintarviketurvallisuus Suomessa 2019*, Ruokaviraston julkaisuja 2/2020.

Ruokavirasto, Elintarvikkeiden lisäaineet. Muokattu 20.12.2019.
<https://www.ruokavirasto.fi/yritykset/elintarvikeala/valmistus/yhteiset-koostumusvaatimukset/elintarvikeparanteet/lisaaineet/>.

Ruokavirasto, Elintarviketurvallisuus: valvonta. Muokattu 10.12.2018.
<https://www.ruokavirasto.fi/tietoa-meista/mika-on-ruokavirasto/elintarviketurvallisuuden-varmistaminen/valvontajarjestelyt/elintarvikkeet-valvonta/>.

Schoepfer AM, Engel A, Fattinger K, Marbet UA, Criblez D, Reichen J ym. Herbal does not mean innocuous: Ten cases of severe hepatotoxicity associated with dietary supplements from Herbalife® products. *J Hepatol* 2007;47(4):521-526.

Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 2000;29(3-4):375-383.

Soni BK, Langan JP. Mutagenicity and genotoxicity of ClearTaste. *Toxicol Rep* 2018;5:196-206.

Spiliotopoulos D, Koelbert C. Assessment of the miniaturized liquid Ames microplate format (MPF™) for a selection of the test items from the recommended list of genotoxic and non-genotoxic chemicals. *Mutat Res* 2020;856-857:503218.

Zeiger E. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutat Res* 2019;841:43-48.