

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Uue sümbiootilise toote arendamine maapirnist

Magistritöö
30 EAP

Emma Johanna Sova

Juhendajad:
Elin Org, PhD
Viia Kõiv

TARTU 2020

INFOLEHT

Uue sümbiootilise toote arendamine maapirnist

Tänapäeval ei saa paljud inimesed oma igapäevasesst menüüst kätte piisavas koguses kiudaineid ega kasulikke baktereid. Samas on tõusmas tarbija teadlikkus tervise ning mikrobioomi olulisuse osas. Üha enam otsitakse tervislikke ja funktsionaalseid alternatiive tavapärastele snäkkidele. Käesoleva töö eesmärgiks oli ühe sellise funktsionaalse, sümbiootilise toote väljaarendamine maapirnist. Selleks uuriti potentsiaalseid probiootilisi bakteritüvesid, nende probiootilisi omadusi ning leiti parim viis nendega maapirniviiilude hapendamiseks ja sümbiootiliste maapirnikrõpsude valmistamiseks.

Märksõnad: sümbiootikum, probiootikum, prebiootikum, maapirn, topinambur, fermenteerimine

CERCS kood: B236 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Developing a new synbiotic product from Jerusalem artichoke

Nowadays, many people do not consume enough dietary fiber and beneficial bacteria from their everyday foods. At the same time, consumer's knowledge about health and microbiome is rising. More and more people are looking for healthier and functional options for snacks. The aim of this study was to develop such a new functional synbiotic product from Jerusalem artichoke. Potential probiotic bacterial strains were studied and evaluated for their probiotic properties. A good method for fermenting Jerusalem artichoke slices with selected probiotic Lactic Acid Bacteria and technology for synbiotic chips production was developed.

Keywords: synbiotic, probiotic, prebiotic, topinambur, Jerusalem artichoke, fermenting

CERCS code: B236 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Inimese soolestiku mikrobioomi kooslus	8
1.1.1. Peensoole mikrobioom	10
1.1.2. Jämesoole mikrobioom	10
1.2. Soolestiku mikrobioomi olulisus, funktsioonid	11
1.2.1. Mikroobide poolt toodetud kasulikud ühendid	11
1.2.2. Kaitse patogeenide eest	13
1.3. Düsbioos	14
1.4. Probiotikumid	15
1.4.1. Perekond <i>Lactobacillus</i>	17
1.5. Toitumise seos mikrobioomiga	20
1.5.1. Kiudained	21
1.5.2. Inuliin – prebiotikum maapirnis	24
1.6. Sünbiootikumid ja turg	26
2. EKSPERIMENTAALOSA	28
2.1. Töö eesmärgid	28
2.2. Materjal ja metoodika	28
2.2.1. Kasutatud söötmed	28
2.2.2. Tüvede puhastamine ja identifitseerimine	29
2.2.3. Maapirni kääritamine	30

2.2.4.	Suhkrute hulga hindamine	30
2.2.5.	Maapirniviiilude külmuivatamine	31
2.2.6.	Bakterite elumus maapirnikrõpsudel	31
2.2.7.	Antibiootikumide resistentsuse määramine (MIC)	31
2.2.8.	Sapisoolade ja mao pH taluvus.....	32
2.2.9.	β -galaktosidaasne aktiivsus	33
2.2.10.	Proteaasi tootmine.....	34
2.2.11.	Eksopoliüsahhariidide tootmine	34
3.	TULEMUSED JA ARUTELU	35
3.1.	Kääritamiseks sobivate tüvede identifitseerimine	36
3.2.	Fermeneteeritud maapirnikõrpsude tegemine.....	37
3.2.1.	Kääritamine	37
3.2.2.	Maapirnis olevate suhkrute lagundamine	40
3.2.3.	Bakterite arvukus külmuivatatud kõrpsudes.....	44
3.3.	Tüvede turvalisus – tundlikkus antibiootikumidele	45
3.4.	Madala pH ja sapisoolade taluvus	48
3.5.	Probiotilised omadused	50
3.5.1.	β -galaktosidaasne aktiivsus.....	51
3.5.2.	Proteaasne aktiivsus	52
3.5.3.	Eksopoliüsahhariidid.....	52
	KOKKUVÕTE	54
	RESUME.....	55
	TÄNUSÕNAD	57
	KASUTATUD KIRJANDUS	58

KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	70
KASUTATUD PILDID	70
LIHTLITSENTS.....	71

KASUTATUD LÜHENDID

CFU – kolooniat moodustav ühik (ingl *Colony Forming Unit*)

EFSA – Euroopa Toiduohutus Amet (ingl *European Food Safety Authority*)

EPS - eksopolüsahhariidid

FOS – fruktooligosahhariidid

GABA – γ -aminovõihape (ingl *γ -Aminobutyric acid*)

GOS – galaktooligosahhariidid

IBD – põletikulise soole haigus (ingl *Inflammatory Bowel Disease*)

KMI – kehamassi indeks

MIC – minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (ingl *Minimum Inhibitory Concentration*)

MÜ – Milleri ühik

ONPG – orto-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiid

OTU – operatsiooniline taksonoomiline ühik (ingl *Operational Taxonomic Unit*)

PA – polümerisatsiooni aste

QPS - kvalifitseeritult turvaliseks peetav (ingl *Qualified Presumption of Safety*)

SCFA – lühikese ahelaga rasvhapped (ingl *Short Chain Fatty Acids*)

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

SISSEJUHATUS

Tasakaalus ja mitmekesine mikrobiom on väga oluline inimese tervise tagamiseks. Oluline roll mikrobiomi mõjutamises on inimese enda käes – palju sõltub elustiilist, eriti toitumisharjumustest. Suurem osa lääne elustiiliga inimestest ei tarbi piisavalt puu- ja juurvilju ega hapendatud toite ning ei saa seetõttu toidust kätte vajalikku kogust tervislikku mikrobiomi soodustavaid kiudaineid ja kasulikke baktereid.

Üheks seda probleemi lahendavaks viisiks võiks olla funktsionaalsed toidud, mis oleksid maitssvad ja tarbijale meelepärased, sisaldaksid piisavalt palju prebiootikume ning ka mikrobiomi täiendavaid probiootikume. Antud töös on tehtud uuringuid ühe sellise toote tarvis – sümbiootilised, laktobatsillidega fermenteeritud ning külmuivatatud maapirnikrõpsud. Tarbijate terviseteadlikkus on viimasel ajal palju kasvanud ning nõuded toidule on tõusnud. Seda peegeldavad ka turul levivad juurviljadest ja marjadest valmistatud krõpsud, mida peetakse tihti tervislikumaks variandiks. Käesolevas töös arendatud maapirnikrõpsud võiksid olla tarbijatele meelepärased, kuna on sarnased populaarsetele kartulikrõpsudele, ent on tervise seisukohalt tarbijale palju kasulikumad.

Käesolevas töös on kirjeldatud inimese mikrobiomi olemust ja olulisust, toidu ja mikrobiomi vahelisi seoseid ning on antud üldine ülevaade probiootikumidest ja prebiootikumidest. Eksperimentaalne osa hõlmab endas sümbiootilise toote valmistamise jaoks vajalike bakteritüvede leidmist ja nende probiootiliste omaduste uurimist ning toote valmistamise väljatöötamist.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Esimesed elusorganismid Maal olid bakterid ning kõik hulkraksed organismid on evolutsioneerunud nendega külg külje kõrval (Mojzsis et al., 1996). Seega pole imekspandav, et bakterid on suunanud ka inimese evolutsioonilist arengut ning miljonite aastate jooksul kooseksisteerimise tulemusena oleme üksteisele hädavajalikud (Ochman et al., 2010). Viimased hinnangud näitavad, et inimrakkude ja bakterirakkude suhe meie kehas on üsna 1:1 (Sender et al., 2016). Neil bakteritel on kokku tohutult palju rohkem geene kui inimesel endal, mis tagabki mikrobioomi suure geneetilise mitmekesisuse ja metaboolse võimekuse (Tierney et al., 2019). Mikrobioomi mõju ja lausa vajalikkust inimesele oleme hakanud tõeliselt uurima ja mõistma alles viimasel ajal.

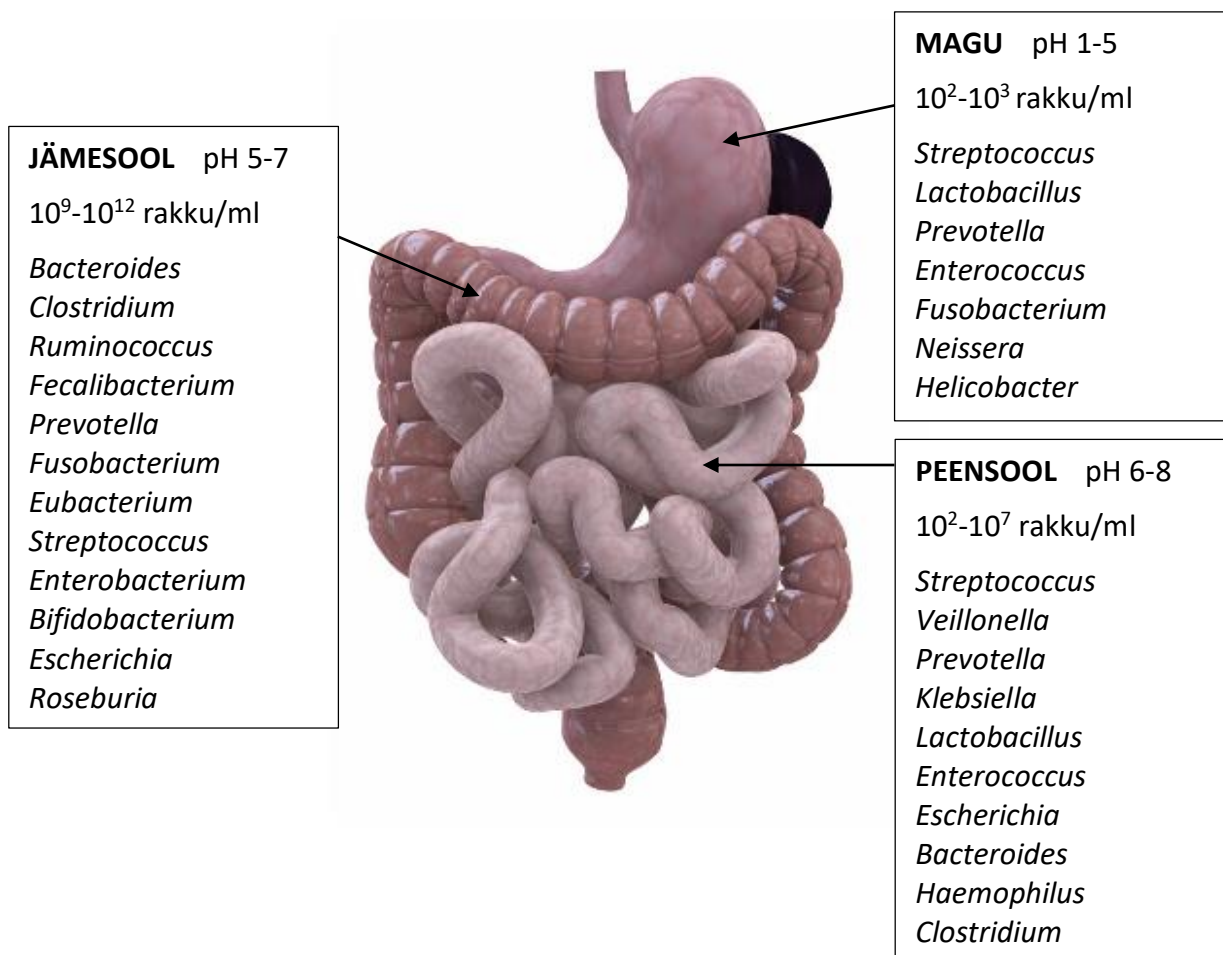
Inimesega tihedalt seotud mirkoorganismide mõistete nimetused on sageli segased ning nende kasutus võib varieeruda teadlaste vahel. Inimesega sümbioosis, mutualismis või kommensialismis elavaid mikroorganisme (bakterid, viirused, arhed, seened, mikroskoopilised eukarüoodid ja faagid) nimetatakse inimese mikrobiootaks ning mikrobioomi all mõeldakse tavaliselt uuritavate mikroorganismide kooslust koos nende geneetilise materjali ehk genoomiga (Lederberg ja McCray, 2001; Marchesi ja Ravel, 2015). Lisaks inimese terviklikule keha mikrobioomile eristatakse ka erinevate kehaosade mikrobiome eraldi, näiteks naha, suu, soolestiku või tupe mikrobioomi, mis on oma koosluses väga erinevad (Huttenhower et al., 2012). Samuti on inimeste mikrobiomid omavahel võrreldes väga erinevad ehk igal ühel on unikaalne mikroobide kooslus (Huttenhower et al., 2012; Tierney et al., 2019).

1.1. Inimese soolestiku mikrobioomi kooslus

Baktereid elab kõikides seedetrakti osades (suuõõnest pärasooleni), kuid nende taksonoomiline koosseis ning arvukus sellel teljel varieerub. Väga oluliseks mikrobioomi määrajaks on inimese soolestiku füsioloogia: madal pH maos, sapisoolad, antimikroobsed peptiidid (nt defensiinid, lüsoosüüm), anaeroobne keskkond, soole läbikäimise kiirus (Bevins & Salzman, 2011; Donaldson et al., 2015). Keskmiselt resideerub terve täiskasvanud inimese soolestikus $3,8 \cdot 10^{13}$ bakterit (Sender et al., 2016). Mikroobide hulk on väiksem seedetrakti alguses ning tõuseb soole edenedes, mis tähendab, et lõviosa neist elab jämesooles (joonis 1). On teada, et inimese soolestiku kõige arvukamad elanikud on *Firmicutes* ja *Bacteroidetes* hõimkonna bakterid ning

järgnevad *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* ja *Verrucomicrobia* hõimkondade esindajad (Huttenhower et al., 2012; Vasapolli et al., 2019).

Inimestel on väga individuaalse koosseisuga mikrobioomid, kuigi leidub ka liike, mis esinevad pea igaühel (Huttenhower et al., 2012; Qin et al., 2010). Inimestevahelise erinevuse põhjustab mikrobioomi koosseisu sõltuvus paljudest teguritest nagu geneetika, sugu, vanus, kaal, päritolu, toitumis- ja liikumisharjumused, stressitase, haigused ja ravimite, eriti antibootikumide tarvitamine (Allen et al., 2018; Blekhman et al., 2015; David et al., 2014; De Palma et al., 2014; Dominianni et al., 2015; Greenhalgh et al., 2016; Ianiro et al., 2016; Sonnenburg et al., 2016; Yatsunenکو et al., 2012). Keskkonnast tulenevaid tegureid peetakse kaalukamateks mikrobioomi mõjutajateks (Rothschild et al., 2018). Inimese soolestikust on kokku suudetud kultiveerida ligi



Joonis 1 Inimese soolestiku mikrobioomi kooslused: maos, peensooles ja jämesooles elavate bakterite perekonnad. Bakterite arvukus erinevates seedetrakti osades on esitatud rakku milliliitri kohta (rakku/ml). Joonis on koostatud Mowat ja Agace (2014), Jandhyala et al. (2015), Aidy, van den Bogert ja Kleerebezem (2015) ja Sundin et al. (2017) põhjal. Soolestku pilt pärineb veebilehelt loveyourgut.com (<http://loveyourgut.com/wp-content/uploads/digestive-system.jpg>)

1000 erinevat bakteriliiki, kuid suur osa on ilmselt veel teadamata (Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014).

1.1.1. Peensoole mikrobioom

Peensool koosneb kaksteisörmiksoolest (duodeenum), tühissoolest (jejuunum) ja niudesoolest (iileum) ning on seedekulglä osa, kus toimub peamine toidust saadavate süsivesikute, aminohapete, rasvade, vitamiinide lagundamine ja imendumine (Sundin et al., 2017). Peensooles on kergelt aeroobne keskkond ja iseloomulik mikroobide kooslus, mille tihedus on 10^2 - 10^7 rakku/g (joonis 1) (Aidy et al., 2015). Bakterite tihedust mõjutavad peensoole eritatavad nõred (nt sapp) ning üldine kiire läbivool (Donaldson et al., 2015). Peensooles elavad aeroobid ja fakultatiivsed anaeroobid, kes tarvitavad inimese toidust pärinevaid lihtsamaid süsivesikuid või teiste bakterite poolt tekkivaid ainevahetusjääke (nt piimhape) (Zoetendal et al., 2012). Sealsed bakterid kuuluvad taksonitesse *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Haemophilus* ja *Lactobacillus* (Sundin et al., 2017). Kuigi niudeslool on osa peensoolest, on selle bakteriaalne kooslus juba sarnane jämesoolega (Vasapolli et al., 2019).

1.1.2. Jämesoole mikrobioom

Jämesool koosneb umbsoolest, käärsoolest (koolon) ning pärasoolest. Seal toimub peamine vee ning mineraalide imendumine inimese organismi. Samuti jõuavad sinna kõik inimese poolt seedimatud toidujäägid (Statovci et al., 2017). Jämesooles elab valdav osa kogu inimkehas elutsevatest mikroobidest. 1 milliliitris leidub 10^9 - 10^{12} rakku ning kogu jämesooles on ligikaudu $3,8 \cdot 10^{13}$ bakterit (joonis 1) (Mowat & Agace, 2014; Sender et al., 2016). Kõrgelt esindatud on klassid *Clostridia* ja *Bacteroidia* ning sugukonnad *Lachnospiraceae* ja *Bacteroidaceae*. Perekondade tasemel leidub kõige rohkem *Bacteroides* liike, aga on ka nt perekondade *Fecalibacterium* ja *Ruminococcus* liike (Vasapolli et al., 2019). Kuna lihtsamad suhkrud imenduvad või tarvitatakse ära peensooles, toituvad jämesoole mikroobid peamiselt peremehe toidust pärinevatest polüsahhariididest või glükosüleeritud limakihist (mutsiinist) (Cockburn & Koropatkin, 2016; Donaldson et al., 2015). Seevastu soole keskel asuvas valendikus elavad anaeroobsed bakterid. Kuna soolesisu liikumine on aeglane, on selles soole osas soodustatud keerukamate polüsahhariidide fermenteerimine energia saamiseks (Tropini et al., 2017). Fermenteeritakse toiduosakesi (peamiselt kiudaineid), mis pole inimese peensooles lagundatud ja/või imendunud.

1.2. Soolestiku mikrobioomi olulisus, funktsioonid

Inimese soolestikus elutsevad mitmed triljonid bakterid moodustavad keerulise ökosüsteemi ning mõjutavad igapäevaselt meie tervist erinevates aspektides. Mikrobioom aitab metaboliseerida toitaineid ja ksenobiootikume, võidelda potentsiaalsete haigustekitajatega, suunata immuunsüsteemi ja soolebarjääri arengut ning toimimist, toota vitamiine ning hormone ja erinevaid signaalmolekule (Jandhyala et al., 2015)

1.2.1. Mikroobide poolt toodetud kasulikud ühendid

Jämesooles resideeruvate mikroobide kiudainete fermenteerimise peamiseks saaduseks on lühikese ahelaga rasvhapped (SCFA – ingl *Short Chain Fatty Acids*), peamiselt atsetaat (etaanhape ehk äädikhape), propionaat (propioonhape) ja butüraat (butaanhape ehk võihape) (Cummings et al., 1987). Lühikese ahelaga rasvhappeid tekib kõige rohkem umbsooles ja käärsoole esimeses pooles ning nende kontsentratsioon langeb alanevas käärsooles. Butüraat metaboliseeritakse valdavas osas jämesooles, sest see on oluline energiaallikas kolonotsüütidele ning aitab hoida ka seedekulglä seinu tervena ja bakterite jaoks läbimatuna (Koh et al., 2016). Atesetaat ja propionaat ning ka mingil määral butüraat ületavad soolebarjääri ning kantakse värativeeni kaudu maksa. Suur hulk SCFA-d kasutatakse ära maksas, tootmaks ketokehasid või atsetüül-CoA-d. Siiski jõuab pool maksas olevast atsetaadist ja 10% propionaadist ka perifeersesse verre. Butüraadi kontsentratsioonid perifeerses veres ja ajus on tavaliselt madalad (Stilling et al., 2016).

On leitud, et lühikese ahelaga rasvhapetel on tõenäoliselt väga laiatoimeline mõju inimese füsioloogiale, kuna nende retseptoreid leidub suurel hulgal erinevate kudede rakkudel (soole epiteeli-, immuun-, närvi-, lihas-, rasva-, maksa- jm rakud) (Koh et al., 2016). Seega pole imekspandav, et neil metaboliitidel on leitud inimkehas mitmeid rolle ja kasulikke omadusi. SCFA mõju on nähtud glükoosi homöostaasile, maksas toimuvale glükoneogeneesile ja lipogeneesile ning rakkude insuliini tundlikkusele. Need molekulid aitavad tõsta leptiini ning peptiid YY taset ja vähendada seeläbi söögiisu (Koh et al., 2016). SCFA osalevad ka immuunvastuste ning põletikuliste reaktsioonide regulatsioonis. Immuunrakkudel on mitmeid nende metaboliitide retseptoreid ning on näidatud, et SCFA-d võivad suunata T-rakkude arengut. SCFA-d võivad mõjutada ka geenide avaldumist, kuna toimivad kui histoonide deatsetülaaside inhibiitorid ning

suruvad seeläbi maha transkriptsiooni (Koh et al., 2016; Stilling et al., 2016). Hiirte peal on näidatud SCFA olulist rolli aju mikroglia rakkude küpsemises ja toimimises (Erny et al., 2015).

Atesetaati toodavad enamik soolemikroobe, nt *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Ruminococcus* liigid. Propionaadi tasemesse panustavad näiteks perekondade *Bacteroides*, *Veillonella*, *Dialister*, *Roseburia*, *Ruminococcus* bakterid. Butüraadi tootjad on perekondade *Fecalibacterium*, *Roseburia*, *Eubacterium* ja *Coprococcus* liigid (Koh et al., 2016). Lisaks toimub soolestiku mikroobide vahel pidev rist-toitumine ehk ühtede bakterite poolt toodetud metaboliidid võivad olla teistele toiduks. Nii on näiteks laktaadiga, mis on mõnede mikroobide kiudainete kääritamisel tekkiv metaboliit ning mida teised suudavad edasi töödelda SCFA-ks, peamiselt butüraadiks ja propionaadiks (Bourriaud et al., 2005; Koh et al., 2016). Seega võiks ka laktaati tootvate probiootikumide (nt laktobatsillid) tarvitamine toetada SCFA-de tootmist soolestikus ning see omakorda parandada tervist.

Mikrobiom toodab ka teisi kasulikke ühendeid ja vajalikke vitamiine, näiteks vitamiin K ja mitmed B grupi vitamiinid (B1, B12, B7, B9, B5, B3, B9) (Kau et al., 2011; LeBlanc et al., 2013; Yatsunenko et al., 2012). Osadel inimese normaalses mikrobiomis olevatel bakteritel on tuvastatud võime toota γ -aminovõihapet (GABA) (Barrett et al., 2012). See on inimkehas oluline inhibeeriva toimega neurotransmitter, mille retseptoreid leidub hulgaliselt ajus aga ka seedetraktis (Auteri et al., 2015; Petroff, 2002). Seedekulglas reguleerib GABA enteerse närvisüsteemi rakke stimuleerides või inhibeerides seedekulgla motoorset ja erituslikku aktiivsust ning mõjutab immuunsüsteemi tööd, surudes alla immuunrakkude paljunemist ning põletikku tekitavate tsütokiinide aktiivsust (Auteri et al., 2015). Bakterite poolt toodetud GABA võib jõuda uitnärvi ja vereringe kaudu ka ajju (Boonstra et al., 2015). Hiirte pealt on näidatud, et GABA-t tootvad probiootilised tüved vähendavad loomade depressioonilaadset käitumist (Yunes et al., 2019). Saledatelt inimestel pärit fekaalse transplantatsiooni saanud ülekaalulistel meestel tõusis ka GABA kontsentratsioon vereplasmas (Kootte et al., 2017). Järelikult sõltub GABA hulk inimkehas mingil määral ka mikrobiomist ning seega võib GABA manustamine või GABA tootvate probiootikumide tarvitamine leevendada ärevus- ja unehäireid, depressiooni, reguleerida vererõhku, tugevdada immuunsüsteemi ning aidata võitluses ülekaalulisusega (Cui et al., 2020). GABA immuunsüsteemi mõjutav ja põletikuvastane toime võib aidata leevendada põletikulisi seedesüsteemi haiguseid nagu näiteks põletikuline soole haigus (IBD – ingl *Inflammatory Bowel*

Disease) (Auteri et al., 2015). Kõige efektiivsemad probiootilised GABA tootjad on *Lactobacillus brevis* tüved (Q. Wu & Shah, 2017). Lisaks eelmainitud ühenditele on soolestiku mikrobiom oluline erinevate neurotransmitterite nagu serotoniin ja selle eellasmolekulid, dopamiin, noradrenaliin, histamiin tootmises (Strandwitz, 2018).

Lisaks kiudainetele osaleb soolestiku mikrobiom ka paljude teiste soolestikku jõudvate ühendite, näiteks ksenobiootikumide (ravimid, kemikaalid, saasteained) ja toidust pärit ühendite (valgud, lipiidid, taimsed polüfenoolid), lagundamisel või ümbertöötlemisel. Bakterid võivad mõjutada ühendite toksilisust, bioloogilist aktiivsust ning kehale kättesaadavust (Koppel et al., 2017). Näiteks töötlevad mikroobid ümber toidus (taimedes) sisalduvaid polüfenoole, muutes need inaktiivsest vormist aktiivsesse. Ümbertöödeldud molekulid võivad olla antimikroobsete, antiviraalsete ja antiparasiidsete omadustega. *Lactobacillus plantarum* ja *Lactobacillus casei* töötlevad antotsüaniide, mis muidu on väga madala bioaktiivsusega, ent modifitseeritult toimivad antioksidantidena ja soodustavad ka laktobatsillide kasvu. Teisi polüfenoolseid ühendeid töötlevad nt *Bifidobacterium* ja *Eubacterium* liigid (Marín et al., 2015).

1.2.2. Kaitse patogeenide eest

Normaalne, väljakujunenud mikrobiom on üpris püsiv kooslus (Donaldson et al., 2015). See omadus aitab kaasa ka kõikvõimalike patogeenide kolonisatsiooni takistamisele. Soolestikus käib pidev bakteritevaheline võitlus eksisteerimise ja ellujäämise nimel. Ka soolestikku sattunud patogeenid peavad sealse kohaliku mikrobiomiga võistleva toitainete ja elupaiga eest (Pickard et al., 2017). Paljud tavalisse mikrobiomi kooslusesse kuuluvad bakterid toodavad ka erinevaid bakteriotsiine ja/või keskkonda hapestavaid metaboliite (nt SCFA), mis võivad konkurendi tappa või tema kasvu inhibeerida. Kõik meetmed raskendavad patogeensel mikroobil elujõuliseks jäämist (Pickard et al., 2017). Üheks võimalikuks viisiks patogeenide vastases kaitses nähakse mikrobiomi omadust suunata lühikese ahelaga rasvhapete kaudu peremehe rakke vähendama soole hapnikusisaldust, takistades niimoodi aeroobsete bakterite kasvu (nt *Salmonella*) (Rivera-Chávez et al., 2016). Mikrobiom stimuleerib inimese soole epiteelrakke tootma kaitsvat limakihti ning aitab hoida sooleseina tervena. Lisaks kõigele on mikrobiomil juba inimese sünnist saati oluline roll suunata immuunrakkude ja -süsteemi arengut ning toimimist (Pickard et al., 2017). On leitud, et steriilsete hiirte immuunsüsteem on alaarenenud ja defektne, mida on aga fekaalse mikrobiomi transplantatsiooniga võimalik muuta (Ahern & Maloy, 2020). Kommensiaalse

mikrobioomi olulisust võitluses patogeenidega on eriti selgelt näha peale antibiootikumikuuri. Antibiootikumid hävitavad sageli ka suure osa kasulikest bakteritest ning avavad seega nišše ja võimalusi haigustekitajatele (Kim et al., 2017).

1.3. Düsbioos

Soolestiku mikrobioomi normaalse koosseisu tasakaalu märkimisväärselt muutust teistsuguseks nimetatakse düsbioosiks või düsbakterioosiks. See võib tähendada, et kooslusesse lisandub patogeen või kasvab oportunistliku patogeeni arvukus märgatavalt. Teine võimalus on, et kasulikud bakterid kaovad või nende arvukus väheneb märkimisväärselt (Wilkins et al., 2019). Arvatakse, et need muutused inimese mikrobioomis on seotud või võivad lausa põhjustada erinevaid haiguseid, sealhulgas ärritunud soole sündroomi, Chroni tõve, haavandilist koliiti, südameveresoonkonna haiguseid, diabeeti, jämesoole vähki, astmat ja erinevad allergiad (Gagnière et al., 2016; Hadjivasilis et al., 2019; McKenzie et al., 2017; Nishida et al., 2018; Wilkins et al., 2019). Kuid see, kas düsbioos on mingi haiguse põhjus, tagajärg või kombinatsioon mõlemast, ei ole veel selge (McBurney et al., 2019).

Üks tervises seisund, milles düsbioos korduvalt kinnitust on saanud, on liigne kehakaal (Crovesy et al., 2020). Ülekaalulisus ja rasvumine on maailmas leviv pandeemia ning see on eelsoodumus ka teiste haiguste tekkeks (südameveresoonkonna haigused, diabeet, maksahaigused, mõningad vähitüübid) (The World Health Organisation, 2020). Ülemaailmselt on 39% täiskasvanud ülekaalulised või rasvunud (KMI ≥ 25) ning eestlaste seas on liigne kehakaal 60,4% inimestel (Ritchie & Roser, 2020). On näidatud, et nii ülekaalulistel hiirtel kui ka inimestel on sageli muutunud *Firmicutes/Bacteroidetes* suhe *Firmicutes* hõimkonna bakterite kasuks (Crovesy et al., 2020). Selle hõimkonna mikroobidel on rohkem süsivesikute metabolismile keskendunud ensüüme ning arvatakse, et tänu sellele on inimesel toidust saadav energiasaagis suurem (Ibrahim & Anishetty, 2012). Üldiselt kasulike soolebakteritena tuntud laktobatsillid kuuluvad samuti *Firmicutes* hõimkonda hulka, kuid näiteks *L. plantarum* ja *L. paracasei* on ülekaaluliste mikrobioomis sageli vähenenud (Crovesy et al., 2020). Mikrobioomi düsbioosist välja toomist ehk normaalse mikroobide koosluse taastamist nähakse ühe lülina mitmete haiguste, ka ülekaalulisuse, ravis. Peamised meetodid selleks on hetkel probiootikumide, prebiootikumide või nende kombinatsiooni (sünbiootikumide) manustamine (Gagliardi et al., 2018).

1.4. Probiootikumid

Probiootikumideks nimetatakse elusaid mikroorganisme, kellel piisavas koguses manustatuna on inimese tervisele kasulik mõju (C. Hill et al., 2014). Probiootikumidel on positiivset mõju leitud antibiootikumidest põhjustatud kõhulahtisuse, IBD, kõrge kolesterooli, kõrgvererõhu ja diabeedi ravis (Hempel et al., 2012; Ruan et al., 2015; Shen et al., 2014; Sun & Buys, 2016; Wang et al., 2018). Samuti võivad probiootikumid aidata vähendada vastsündinute nekrotiseeriva koliidi puhul (Alfaleh & Anabrees, 2014). Siiaamaani on probiootikumid peamiselt bifidobakterid ja laktobatsillid, mõned *Streptococci* ja *Bacillus* liigid, üksikud bakteritüved teistest perekondadest ning pärm *Saccharomyces boulardii* (Dixit et al., 2016). Praegu kasutusel olevad probiootilised bakteritüved on sageli isoleeritud fermenteeritud toitudest, nagu näiteks jogurt, hapukapsad, või inimesest (soolestikust, rinnapiimast, väljaheidetest) (Fontana et al., 2013).

Ajalooliselt olid kääritatud toidud oluline osa inimeste toidulauast, kuna see oli hea moodus söögi pikemaks säilitamiseks (Tamang et al., 2020). Samuti rikastati nende toitude söömisega soolestiku mikrobiomi kasulike bakteritega. Tänapäeval on tavaline probiootikumide tarvitamine toidulisandina kapslite või pulbrina, kuid üha enam lisatakse ka teatud toitudesse teadlikult probiootilisi tüvesid ning tagatakse nende organismide piisav hulk manustatavas söögis. Näiteks on mitmed jogurtid (Activia ja Actimel, Danone; Hellus, Tere) spetsiaalselt valmistatud tõestatud probiootikumidega ning neil on pakendil kirjas kui palju ning millist bakteriliiki ja tüve see sisaldab. Bakterite piisavaks hulga probiootilises tootes peetakse 10^8 - 10^9 rakku portsjoni (tavaliselt 100g või 1 kapsel) kohta (C. Hill et al., 2014; Vinderola et al., 2019). Kuigi lõviosa probiootikume sisaldavas turust on funktsionaalsete toitude ja jookide käes, siis probiootikute definitsioon ei tähenda ainult inimesele valmistatud suukaudselt tarbitavat toodet (kapslid, toidained) (C. Hill et al., 2014). Üha populaarsemaks on muutumas probiootikumide integreerimine kosmeetikatoodetesse ning probiootikume tehakse ka lemmik- ja taluloomadele (Dixit et al., 2016).

Enamikel probiootilistel bakteriliikidel on Euroopa Liidus kvalifitseeritult turvaliseks peetav ehk QPS (ingl *Qualified Presumption of Safety*) staatus (Koutsoumanis et al., 2020). See tähendab, et need bakteriliigid on piisavalt põhjalikult teadlaste poolt läbi uuritud ja laialdaselt kasutusel ning ei tohiks tarvitamisel komplikatsioone põhjustada. Siiski tuleb teha kindlaks, et tüvel, mida

soovitakse kasutada, ei ole omandatud antibiootikumi resistentsuse geene, et vältida resistentsuse levimist horisontaalse geeniülekanega (Koutsoumanis et al., 2020). Ka käesoleva töö eksperimentaalses osas uuritud ja kasutatud bakterid on liikidest, millele on antud QPS staatus: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis* (Koutsoumanis et al., 2020).

Probiotikumid, mille eesmärk on jõuda peensoolde või jämesoolde, peavad olema vastupidavad madalale pH-le, sapisooladele ja teistele seedeensüümidele ning antimikroobsetele ühenditele. Probiotiliste tüvede puhul võib vastupidavust aidata tõsta eksopolüsahhariidide (EPS) kiht (Castro-Bravo et al., 2018). EPS-d on α - ja β -glükosiidsidemetega seotud monosahhariididest või nende derivaatidest moodustunud biopolümeerid, mis sekreteeritakse raku pinnale, moodustades kapsli või limakihi (Oleksy & Klewicka, 2018). Bakteriaalsetel EPS-del on leitud kasulikke omadusi ka inimesele. Erinevate bakterite ja tüvede EPS-l on näidatud näiteks vähkkasvajaid takistavaid, antioksüdatiivseid ja immuunsüsteemi moduleerivaid omadusi; kolesterooli, kõrget vererõhku ja vere glükoosi reguleerivaid omadusi ning kaitset patogeensete mikroobide kinnitumise eest (Bleau et al., 2010; Castro-Bravo et al., 2018; Chen et al., 2019; Deepak et al., 2016; London et al., 2014; Maeda et al., 2004; Zhang et al., 2013). EPS võib mõjutada bakteri soolestikku kinnitumist ja püsijäämist nii negatiivselt kui positiivselt. Need võivad blokeerida sooleseinale kinnitumiseks vajalike valke (adhesiine) või aidata moodustada mikrokolooniaid (Lebeer et al., 2008). EPS võib olla ka lagundatav mõnede soole mikrobioomi liikmete poolt ja mõjutada seega mikrobioomi koosseisu (Salazar et al., 2016).

Spetsiifilised tervisealased väited, mis mingile probiotikumile omistatakse (nt sünnitusjärgse depressiooni vähendamine) on enamasti kindlale tüvele eriomased (C. Hill et al., 2014; Slykerman et al., 2017). See tähendab, et isegi samast liigist teine tüvi ei pruugi manustades avaldada tervisele samasugust kasulikku efekti. Siiski tundub, et on ka üldiseid kasulikke mõjusid, mis kehtivad valdavalt kõikide uuritud probiotikumide kohta. Need on SCFA tootmine, patogeensete koloniseerimise takistamine, häiritud mikrobioomi tasakaalustamine, soole epiteelirakkude uuendamise soodustamine, soolesisu liikumise reguleerimine. Sageli aitavad probiotikumid kaasa ka vitamiinide sünteesis, ensümaatilises aktiivsuses, sapisoolade metabolismis ning soolebarjääri tugevdamises. Need efektid on levinud pigem liigiülesest. Neuroloogilised, immunoloogilised, endokrinoloogilised efektid ning kindlate eriliste bioaktiivsete ühendite tootmine on haruldasem

ja tüvespetsiifilisem ning neid efekte ei saa üldistada kõikidele probiootikumidele (C. Hill et al., 2014). Üks võimalikke panuseid probiootiliste bakterite poolt on ensüümi β -galaktosidaas tootmine, mis aitab lagundada piimatoodetes leiduvat laktoosi. Suurel osal täiskasvanud inimkonnast on endal selle ensüümi aktiivsus puudu või puudulik ning neil võib laktoos tekitada erinevaid seedehäireid nagu puhitus ja kõhulahtisus (Fassio et al., 2018). Bakteritel võib olla ka teisi ensüüme, mis aitavad inimese toidu seedimisele kaasa. Näiteks on teraviljades leiduvad gluteenivalgud lagundatavad inimese seedeensüümide poolt ainult teatud osas, sest neil puudub piisav spetsiifilisus neis valkudes olevate proliinirikaste järjestuste lõikamiseks (Chander et al., 2018). Poolikult lagundatud gluteen mõjub aga põletikku tekitavalt. Tsöliaakia ja gluteenitalumatus on haigused, mis on põhjustatud gluteeni osaliselt lagundatud peptiididest (Caminero et al., 2016; Chander et al., 2018). Inimese mikrobioomi koosseisu kuuluvatel bakteritel ja osadel probiootikumidel on leitud võime lagundada gluteenivalke veelgi väiksemateks juppideks, mis põletikku ei tekita (Caminero et al., 2016; Chander et al., 2018). On leitud ka, et tsöliaakiaga patsientidel on vähenenud *Bifidobacterium* ja *Lactobacillus* bakterite osakaal mikrobioomis (Chander et al., 2018).

1.4.1. Perekond *Lactobacillus*

Piimhappebakterite perekond *Lactobacillus* kuulub *Firmicutes* hõimkonda, *Bacilli* klassi, *Lactobacilliales* seltsi ja *Lactobacillaceae* sugukonda. Selle perekonna bakterid on Gram-positiivsed fakultatiivsed anaeroobid, enamasti liikumatud ja piklikud pulgad, mis võivad moodustada ahelaid, ei moodusta spoore ning on suhkruid kääritava metabolismiga. Metabolismi lõpp-produkt on laktaat, lisaks võib olla veel atsetaat, etanool, CO₂, metaanhape või suksinaat. Kuna nad ise toodavad hapet, on nad ka happelisele keskkonnale hästi vastupidavad. Laktobatsillid on fakultatiivsed anaeroobid ning optimaalne kasvutemperatuur on tavaliselt 30-40°C. Neid leidub piimatoodetes, teraviljatoodetes, liha ja kalatoodetes, õlles, veinis, puuviljadel, hapendatud köögiviljades, haputaignas, aga ka vees, mullas ja reovees. Laktobatsillid on osa suu, seedetrakti ja tupe normaalsest mikrobioomist ning nad ei ole patogeensed (Hammes & Hertel, 2015). Laktobatsille on rohkem peensooles kui jämesooles, kuna seal on rohkem lihtsamaid suhkruid mida nad eelistavad (Heeney et al., 2018). Hetkel on tuvastatud üle 230 *Lactobacillus* liigi (Parte, 2018).

Perekonna *Lactobacillus* esindajad on ühed populaarsemad ja uuritumad probiootikumid ning neil on leitud kasulik mõju mitmete haiguste, muuhulgas nt kõhulahtisuse ja soolevähi vastu (Di Cerbo et al., 2016; Dixit et al., 2016). On leitud, et *Lactobacillus* perekonna bakterid võivad aidata leevendada gluteeni toksilisi mõjusid (Caminero et al., 2016). Järgnevalt on käsitletud kolme *Lactobacillus* perekonna bakteri liiki, kelle tüvesid on uuritud ja kasutatud antud magistritöö eksperimentaalses osas.

Lactobacillus plantarum

Lactobacillus plantarum on fakultatiivne heterofermentatiivne bakter ehk ta võib käärimise lõpp-produktina toota ainult piimhapet (laktaati) või lisaks ka äädikhapet, etanooli, sipelghapet (metaanhapet) (Hammes & Hertel, 2015). Nagu nimigi ütleb, on ta sageli isoleeritud taimedelt või hapendatud köögiviljadelt, kuid lisaks ka piimatoodetest, lihast, veinist, inimese seedetraktist ja tupest (Seddik et al., 2017). Seega on antud liik väga mitmekülgne ning suuteline hakkama saama erinevates elupaikades. *L. plantarum* kääritab üsna suurt hulka süsivesikuid: glükoos, galaktoos, fruktoos, mannoos, riboos, arabinoos, mannitool, sorbitool, N-glükoosamiin, amügdaliin, arbutiin, eskuliin, salitsiin, tsellobioos, maltoos, melibioos, sahharoos, trehhaloos, melesitoos, rafinoos, gentiobioos, turanoos. Laktoosi, tsellobioosi, ksüloosi kääritamise võimes võivad tüved erineda (Hammes & Hertel, 2015; Reimer et al., 2018). Ka inuliini lagundamise osas võivad tüved varieeruda. Kuigi suurem enamus seda polüsahhariidi lagundada ei suuda, leidub ka neid, kel see võime on olemas. Suuresti sõltub see tüve isoleerimise kohast (Buntin et al., 2017).

Paljudel *L. plantarum* tüvedel on täheldatud bakteriotsiinide tootmise võimet, mõni toodab lausa mitut erinevat (Seddik et al., 2017). Bakteriotsiinid on antimikroobsed valgulised molekulid, mis takistavad teatud bakterite kasvu. Bakteriotsiinid aitavad probiootikumil soolestikku koloniseerida ja patogeene hävitada (Dobson et al., 2012). Nende ühendite antimikroobset toimet on näidatud mitmete inimesele ohtikute bakterite vastu, muuhulgas *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ja *Salmonella* liigid (Seddik et al., 2017).

Mitmed *Lactobacillus plantarum* tüved on tunnustatud probiootiliseks ning ka laialdaselt kasutusel. Loomulikult varieeruvad tüvede vahel efektid inimesele, ent üldiselt aitavad need alandada vere kolesterooli taset, leevendada ärritunud soole sündroomi ja põletikulise soole

haiguste (Chroni tõvi, haavandiline koliit) vaegusi, leevendada antibiootikumide kasutamisest tekkivaid vaegusi (kõhulahtisus) ning vähendada *Clostridium difficile* nakkust (Seddik et al., 2017).

Lactobacillus paracasei

Lactobacillus paracasei on samuti fakultatiivne heterofermentatiivne bakter (Hammes & Hertel, 2015). Ta kääritab riboosi, galaktoosi, glükoosi, fruktoosi, mannoosi, mannitooli, N-asetüülglükoosamiini, arabinoosi, eskuliini, salitsiini, tsellobioosi, laktoosi, trehhaloosi, meletsitoosi, turanoosi ja tagatoosi. Tüved varieeruvad sahharoosi, maltoosi ja gentibioosi kasutamise võime poolest (Hammes & Hertel, 2015; Reimer et al., 2018). Inuliini ja oligofruktoosi fermenteerimise võime on tüvespetsiifiline, ent kirjanduses korduvalt kinnitust leidnud (Boger et al., 2018; Makras et al., 2005; Tsujikawa et al., 2013)

Lactobacillus paracasei on esindatud probiootikumide turul erinevate tüvedega. Näiteks on Itaalias populaarne Enterolactis® toodete sari (SOFAR S.p.A), mis sisaldab baktereid *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 (kommertsiaalne nimi *L. casei* DG). Sellel tüvel on näidatud võimet mõjutada butüraadi taset soolestikus, vähendada mõne ja tõsta teiste *Clostridium* hõimkonna bakterite hulka, leevendada *Helicobacter pylori* infektsiooni ravi kõrvalnähtusid ning seda kasutatakse nii haavandilise koliidi ja peensoole bakteriaalset ülekasvu korral (Balzaretto et al., 2017; Ferrario et al., 2014). Veel on turul tüved kommertsiaalse nimega L. CASEI 431® (Chr. Hansen A/S), mis liigiliselt on siiski identifitseeritud kui *L. paracasei*, *L. paracasei* subsp *paracasei* F19 ning *L. paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 (chr-hansen.com; Chiang & Pan, 2012; Kerry et al., 2018). Tüvel NTU 101 on täheldatud positiivset mõju immuunsüsteemile, allergiate esinemisele, kõrgele kolesteroolile, kõrgele vererõhule ning ülekaalulisusele (Chiang & Pan, 2012). *L. paracasei*’le äärmiselt sarnased ja lähedased liigid *Lactobacillus casei* ja *Lactobacillus rhamnosus* on väga populaarsed probiootikumid (D. Hill et al., 2018). Need kolm liiki on segase taksonoomilise määratluse ajalooga ja on olukordi, kus algselt teatud liiki määratud bakter on hiljem ümber nimetatud (nt tüvi *L. casei* 431).

Lactobacillus brevis

Erinevalt eelmistest liikidest on *Lactobacillus brevis* obligatoorse heterofermentatiivse käärimistüübiga. Tema käärimisproduktideks on piimhape, äädikhape, etanool ja CO₂ (Hammes & Hertel, 2015). *L. brevis* toodab hapet arabinoosist, riboosist, D-ksüloosist, glükoosist,

maltoosist, melibioosist ja melesitoosist. Tüvede galaktoosi, eskuliini, rafinoosi, sahharoosi, fruktoosi kääritamisevõime varieerub ning inuliini *L. brevis* kasutada ei suuda (Hammes & Hertel, 2015; Reimer et al., 2018).

L. brevis'e üheks oluliseks probiootiliseks omaduseks on selle kõrge GABA tootmise võime, millel omakorda on inimkehas mitmeid eelnevalt mainitud olulisi rolle (Q. Wu & Shah, 2017). Lisaks on näidatud mõnel tüvel põletiku- ja periodontiidi vastast võimet (Fang et al., 2018; Riccia et al., 2007).

1.5. Toitumise seos mikrobioomiga

Toitumise rolli soolestiku mikrobioomi kujunemisel on uuritud pikalt ja palju. Erinevusi pikaajalises dieedis ja toitumisharjumustes peetakse üheks inimeste mikrobioomi individuaalsuse põhjustajaks. On näidatud, et mikrobioomi koosseis muutub kiirelt kui muuta toidusedelit. Siiski ei ole lühiajaline toitumise muutus piisav, et uue koosseisuga mikrobioom säiliks, vaid see läheb kiiresti tagasi oma tavalisse olekusse (G. D. Wu et al., 2011).

Toidu ja toitainete roll on tähtis juba sünnist saati, mil laps hakkab saama emapiima. Väikelapse mikrobioom on rikastunud piimas olevate suhkrute lagundamiseks kohastunud bakteritega ning on näidatud, et rinnapiimas sisalduvad inimese piima-oligosahhariidid toetavad imikule kasulike bifidobakterite kasvu (Bäckhed et al., 2015; Zivkovic et al., 2011). Lisaks leidub rinnapiimas endas baktereid (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacteria*, *Enterococcus*) (Doare et al., 2018). Seega on rinnapiim vajalik lapse algse mikrobioomi kujunemisele, mis toetab oluliselt ka tema immuunsüsteemi arengut. See kõik on eriti oluline, kuna lapseas kogetud häired mikrobioomis peegelduvad täiskasvanuea mikroobikoosluses (Gensollen et al., 2016). Näiteks on leitud seos antibiootikumide kasutamisega lapseas ning ärritunud soole sündroomi, Chroni tõve, ülekaalu ja tüüp II diabeedi suurenenud riskiga (Azad et al., 2014; Boursi et al., 2015; Kronman et al., 2012; Virta et al., 2012).

Lääne tüüpi dieeti iseloomustab kõrge sahharoosi, (töödeldud) punase liha, küllastunud rasvade ja piimatoodete osakaal ning vähesed kiudained (puu- ja köögiviljad, täisteratooted) (Barbaresko et al., 2013). Selline toidusedel on eriti omane inimestele, kes elavad Ameerika Ühendriikides, Euroopla riikides ning teistes kõrgelt industrialiseerunud riikides. Globaliseerumise tõttu on läänepärane toidulaud üha levinum ka mujal maailmas (Murakami et al., 2018; R. Zhang et al.,

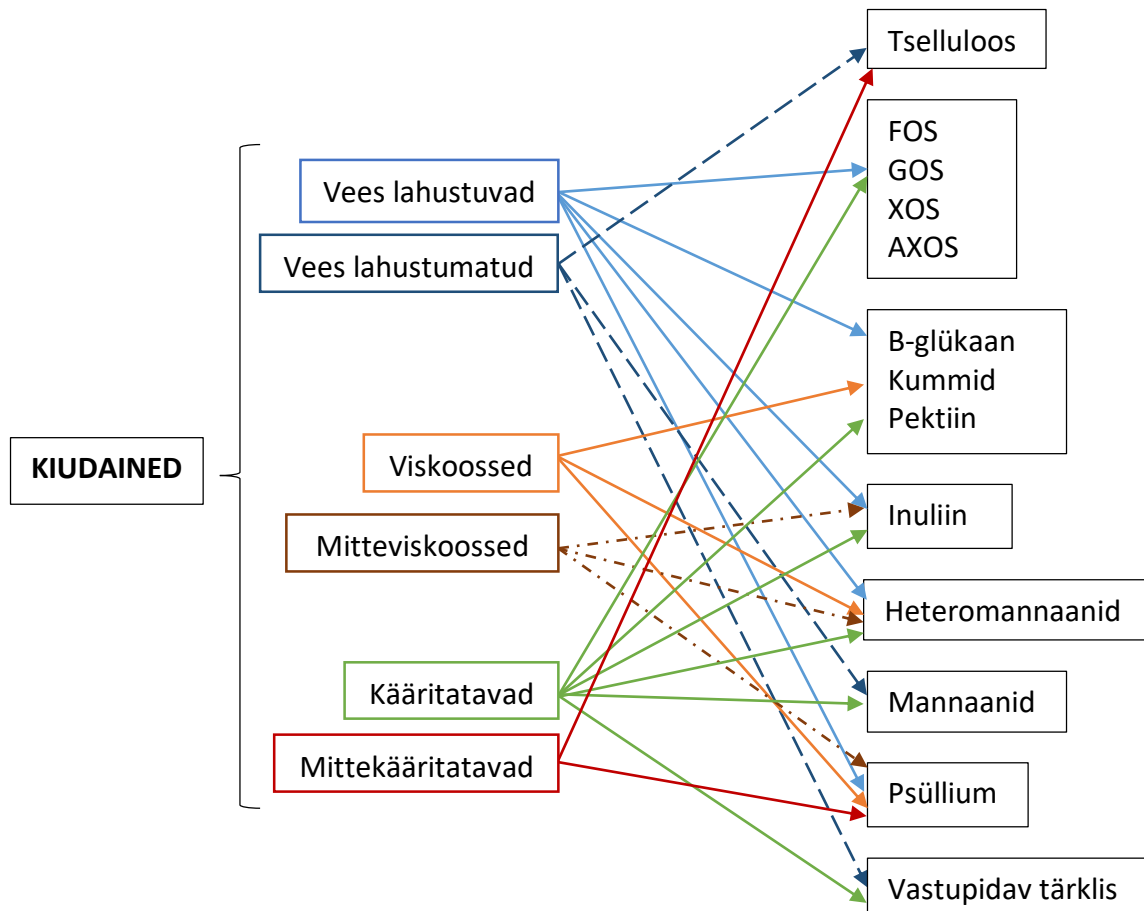
2015). Sellise dieediga seostatakse mikrobioomi vähenenud mitmekesisust, mis võib olla põhjuseks mitmete Lääne ühiskonnas märkimisväärselt sagenenud haiguste nagu ülekaalulisus, südameveresoonehaigused, diabeet, IBD levimisega (Sonnenburg et al., 2016; Statovci et al., 2017).

1.5.1. Kiudained

Üheks oluliseimaks komponendiks menüüs, mis mõjutab otseselt mikrobioomi koosseisu ja varieeruvust, peetakse kiudaineid. Kiudained on defineeritud kui süsivesikute polümeerid, mis koosnevad 10 või rohkemast ühikust, mida ei hüdrolüüsita peensooles inimese päritolu ensüümide poolt (Codex Alimentarius Committee, 2017).

Euroopa Toiduohutusameti järgi kuuluvad kiudainete hulka mittetähtsusetatud polüsahhariidid (nt tselluloos, hemitselluloosid, pektiinid, kummid [ksantaankummi, garkummi, β -glükaan]), vastupidavad oligosahhariidid (nt fruktooligosahhariidid [FOS] ja galaktooligosahhariidid [GOS]), vastupidav tärklis (*resistant starch*) ning ligniin kui nad koosnevad kolmest või rohkemast monomeerist (European Food Safety Authority, 2010). Kiudaineid jagatakse vastavalt nende erinevatele omadustele, mis tulenevad nende suuruselt ja ehitusest. Nendeks omadusteks on vees lahustumise võime, viskoossus ning jämesooles fermenteeritavus (joonis 2). Vees lahustuvad on näiteks pektiin, β -glükaan, erinevad kummid, inuliin, vastupidavad oligosahhariidid (FOS, GOS, vastupidavad dekstriinid). Vees ei lahustu tselluloos, psüllium ja vastupidav tärklis. Viskoossed on pektiin ning erinevad kummid ja psüllium. Bakterid fermenteerivad oligosahhariide, β -glükaani, pektiini, kummisid, inuliini ning resistentset tärklist (O'Grady et al., 2019; Stephen et al., 2017). Üldiselt on lahustuvad kiudained sooles kiiremini fermenteeritavad kui mitte-lahustuvad. Kääritatavatel kiudainetel on otsene mõju jämesoole mikrobioomi koosseisule.

Mittekääritatavatel on oluline roll mahuainena toidukördi massi suurendamises ning toidumassi edasiliikumise kiirendamisel (Stephen et al., 2017).



Joonis 2 Kiudainete omadused – vees lahustuvus, viskoossus ning mikrobioomi poolt kääritatavus. FOS - fruktologisahhariidid; GOS – galaktooligosahhariidid; XOS – ksülooligosahhariidid; AXOS - arabino-ksülooligosahhariidid. Joonis on pärit O’Grady, O’Connor ja Shanahan (2019) artiklist ning on modifitseeritud ja täiendatud. Täiendused Stephen et al., (2017) alusel.

Keskmiselt tarbivad Euroopa mehed 15-25g kiudaineid päevas (g/p) ning naised 14-21 g/p. Põhja-Ameerikas (USA ja Kanada) on kiudainete tarbimine veelgi väiksem: naistel 14-16g/p ja meestel 16-20g/p. Üldiselt on kogu arenenud maailmas kiudainete sisaldus toidus madalam kui soovituslik. Nii Euroopa riikide kui USA riiklikud soovitused on meestele päevas 30-35g ning naistel 25-32 g kiudaineid (Stephen et al., 2017). Kui võrrelda keskmise eestlase nädalast toidupüramiidi soovituslikuga, võib samuti väita, et ei saada piisavalt kiudaineid – juur- ja puuviljade ning täisteratoodete osakaal on väike (Tervise Arengu Instituut). Seevastu tarvitavad inimesed väheindustrialiseeritud paikades, kelle söögilaua leidub rohkelt taimset päritolu toitaineid,

kordades rohkem kiudaineid, näiteks põlismaalased Tansaaniast, Burkina Fasost, Malawist ja Venetsueelast (Filippo et al., 2010; Schnorr et al., 2014; Yatsunenko et al., 2012).

Madalat kiudainete tarbimist seostatakse ka suurenenud kehakaaluga, mis, on kujunenud ülemaailmseks probleemiks. Ameeriklaste seas läbiviidud suuremahuline uuring, kus osales 120 877 inimest, näitas selgelt negatiivset seost aeglase kaalutõusu ja kiudainete söömise hulga vahel (Mozaffarian et al., 2011). Ka Ühendkuningriikide naiste seas tehtud uuring näitas, et kõrgem kiudainete sisaldus igapäevamenüüs vähendab pikaajalise kaalutõusu tõenäosust ning tõstab mikrobioomi mitmekesisust (Menni et al., 2017).

Võrreldes lääneliku toitumistüübiga inimestega, on traditsioonilisemal kiudaineterikkal toidulolevatel rahvastel oluliselt rikkam ja mitmekesisem mikrobioom. Seda nii liigiliselt koosseisult kui ka metabooselt võimekuselt. Lääne inimestel, kelle toit on rasva-, valgu- ja lihtsate süsivesikute rikas, on mikrobioomis aktiivsemad glutamiini ja ka teiste aminohapete lagundamisega seotud geenid ning neil on 200-400 OTU-t (operatsiooniline taksonoomiline ühik; ingl *Operational Taxonomic Unit*) vähem kui põlismaalastel. Samuti on kõrgelt esindatud lihtsate suhkrute lagundamiseks vajalikud ensüümid. Vastupidiselt on Malawi ja Venetsueela põlismaalastel ülesreguleeritud glutamiini süntetaasi ning α -amülaasi geenid, kuna nende toidulaud koosneb suures osas maisist ning sisaldab vähem valku. (Yatsunenko et al., 2012).

Hiirte pealt tehtud katsed näitasid, et kiudainetevaesel toidul olevate hiirte mikrobioom vaesus mõne põlvkonna jooksul. Ühe põlvkonna jooksul toimunud muutusi oli veel võimalik tagasi pöörata ja algne mitmekesisus taastada, ent pärast mitut põlvkonda oli mikrobioom lõplikult mõned liigid kaotanud (Sonnenburg et al., 2016). Sarnast muutust näitasid inimeste peal Vangay jt. (2018). Kohalike Tai maapiirkondades elavate inimeste soolestiku mikrobiomid on palju mitmekesisemad ning leidub oluliselt rohkem *Prevotella* perekonna baktereid kui sealt USA-sse immigrerinud inimestel. Kolides ümber Ameerika Ühendriikidesse ja võtteks üha rohkem omaks läänelikke toitumisharjumui, väheneb *Prevotella* osakaal ning suureneb *Bacteroides* perekonna esindajate hulk. Oluline on ka, et koos *Prevotella* olulise vähenemisega kaovad ensüümid, mis on vajalikud keeruliste taimsete süsivesikute (kiudainete) lagundamiseks. USA-sse immigrerinud inimestel on need ensüümid asendunud lihtsamate suhkrute lagundamiseks vajalike ensüümidega. Siiski, ka selles töös nenditi, et toit on ainult üks osa võrrandist ning rolli mängib kindlasti ka muu muutunud elustiil ja keskkond.

Paljud kiudaned on ka prebiootikumid, ehk ained, mida kasutavad peremehe mikroorganismid ning millel seeläbi on kasulik mõju peremehe tervisele. Need on üldiselt polüsahhariidid, mida inimese enda seedeensüümid ei suuda lagundada ning mis seetõttu jõuavad tervena jämesoolde, kus need on kääritamise substraadiks sealsele mikroobikooslusele. Prebiootikumiks nimetatud aine kasulikkus inimese tervisele peab olema tõestatud (Gibson et al., 2017). See kasu võib tähendada tervisele soodsate bakterite arvukuse kasvu (bifidobakterid, laktobatsillid) või mingite bakterite metaboliitide, nt lühikese ahelaga rasvhapete hulga tõusu. Prebiootikumide positiivset mõju on näidatud ülekaalulisuse, tüüp 2 diabeedi, IBD, ärritunud soole sündroomi, allergiate, kõhulahtisuse, kõhukinnisuse, kaltsiumi ning teiste mineraalide parema imendumise ning täiskõhutunde puhul (Gibson et al., 2017).

Prebiootikumid on mitmed oligosahhariidid (nt FOS, GOS, ksülooligosahhariidid, inimese piima oligosahhariidid), laktuloos, resistentne tärklis, inuliin (joonis 2). FOS ja inuliin on neist ilmselt enimkasutatud (Markowiak & Ślizewska, 2017). Prebiootikumid võivad olla loomulik osa taimsest toidust või lisatud komponent mingile toidule. Näiteks lisatakse imikute piimaasendajatele sageli GOS-e või FOS-e, et simuleerida rinnapiimas leiduvate oligosahhariidide mõju lapsele (Vandenplas et al., 2015).

1.5.2. Inuliin – prebiootikum maapirnis

Fruktaanide hulka kuuluv inuliin on taimedes esinev polüsahhariid, mis koosneb $\beta(2-1)$ -glükosiidsidemetega seotud fruktoosi monomeeridest. Inuliini molekuli otsmiseks monomeeriks on sageli glükoos, mis on esimese fruktoosijäägiga seotud $\alpha(1-2)$ -sidemega (Ahmed & Rashid, 2019). Inuliin on levinud säilitus-polüsahhariid korvõieliste taimede (*Asteraceae*) sugukonnas. Selles osas uurituimad ning suurima inuliini tootlikusega on sigur (*Cichorium intybus* L.) ning maapirn, kes talletavad inuliini oma juuremugulatesse (Ahmed & Rashid, 2019).

Maapirn ehk topinambur või mugul-päevalill (*Helianthus tuberosum* L.; ingl *Jerusalem artichoke*) on Põhja-Ameerikast pärit korvõeline taim, mis on sisse toodud paljudesse paikadesse, sealhulgas Eestisse. Topinambur kasvab kuni 3 meetri kõrguseks ning sellel on ilusad kollased õied, mis on sarnased harilikule päevalillele, kuid väiksemad (Encyclopaedia Britannica, 2018). Taim moodustab mahlaseid mugulad, mis meenutavad kujult veidi ingverit ning on erilised oma kõrge inuliini sisalduse poolest. Need sisaldavad 17-20% inuliini, mineraale nagu raud, kaltsium,

kaalium ja naatrium, vitamiine A ja C ning väga vähe rasva ja tärklisi (Ahmed & Rashid, 2019; Szewczyk et al., 2019). Kuivkaalust on inuliini lausa 55-65% (Kocsis et al., 2007).



Joonis 3 Maapirni mugulad. Autor: Devon, *depositphotos.com*

Topinamburis oleva inuliini polümeerisatsioonaste (PA) jääb vahemikku 2-60 ehk molekul koosneb 2-60 fruktoosi monomeerist (Ahmed & Rashid, 2019). Molekulid, mille PA on ≥ 10 nimetatakse fruktooligosahhariidideks (FOS) ehk oligofruktoosiks ja sellest suurema PA-ga inuliiniks (Niness, 1999). Maapirni kasvatamisel inuliini eesmärgil on oluline aeg, millal mugulad üles võetakse. Nimelt on sügisel võetud mugulate inuliini sisaldus kõrgem. Kui maa külmub, lagundatakse inuliini väiksemateks süsivesikuteks, tõuseb FOS-ide, sahharoosi, fruktoosi ja glükoosi hulk mugulas ning väheneb pikemate inuliini molekulide hulk (Kocsis et al., 2007; Krivorotova & Sereikaite, 2014).

Inuliinil ja FOS-idel on tunnustatud prebiootiline efekt, kuna inimese seedeensüümid ei suuda neid lagundada, kuid need on fermenteeritavad osade soolestiku mikroobioomi liikide poolt. On näidatud, et nii inuliin kui ka lühemad fruktaanid tõstavad bifidobakterite arvukust seedetraktis (Roberfroid et al., 2010). FOS-ide kasutamine substraadina ei ole enamusele bifidobakteritele probleem, ent suurema polümeeri lagundamise võime neil üldiselt puudub. Ilmselt saavutatakse inuliini bifidogeenne tulemus risttoitumise kaudu, kus teised mikroobioomi koosseisu kuuluvad bakterid lagundavad polüsahhariidi väiksemateks suhkruteks (FOS-deks), mis on siis omakorda bifidobakteritele substraadiks (Rossi et al., 2005). Rossi *et al.*, (2005) andmetel on peamiseks inuliini käärmisporduktiks butüraat ning FOS puhul atsetaat ja laktaat. Laktobatsillid on kasutavad lihtsamaid suhkruid ning lühemaid polümeere. Paljud neist ei suuda tarvitada inuliini, kuid mingil määral kasutavad FOS-e. Samas leidub ka liike, kellele on avastatud inuliini lagundamise võime,

nt mõningad *L. paracasei* tüved (Goh & Klaenhammer, 2015). Ka *L. plantarum* seast on leitud inuliini hüdrolüüsivaid tüvesid (Buntin et al., 2017).

Kokkuvõttes võiks suurem kiudainete tarbimine aidata rikastada inimeste mikrobiomi, aidata kaasa üleliigsest kaalust lahtisaamisele ning leevendada mitmeid haiguseid.

1.6. Sünbiootikumid ja turg

Toodet, mis ühendab endas probiootikumid ja nende poolt kasutatavad prebiootikumid, nimetatakse sünbiootikumiks (Kolida & Gibson, 2011). Sünbiootikumide kasulikkus tuleneb probiootikumide ja prebiootikumide kasulikkuste ühendamisest. Prebiootiline komponent on probiootikumidele toiduks ning soodustab nende paljunemist sooles. Seega ei pruugi olla vajalik suur probiootikumide hulk algses tootes (Kolida & Gibson, 2011). Ka arvatakse, et prebiootikum aitab kaitsta baktereid soolestikus olevate keskkonnategurite eest. Samuti võib sünbiootikumis olev prebiootikum olla kääritatav teiste sooles olevate kasulike bakterite poolt (Markowiak & Ślizewska, 2017). Sünbiootikum on osutunud tõhusamaks kui ainult pro- või prebiootikum näiteks haavandilise koliidi ja ärritunud soole sündroomi puhul (Başturk et al., 2016; Fujimori et al., 2009). Kõige levinumad pro- ja prebiootilised kombinatsioonid on *Lactobacillus* ja/või *Bifidobacterium* tüved koos inuliini ja/või FOS-ga (Markowiak & Ślizewska, 2017).

Snäkkide, eriti soolaste snäkkide turg on maailmas üha kasvamas. Müügil on suur valik erinevaid kartulikrõpse, mis on enamasti fitüüritud ning sisaldavad suures koguses rasva ja soola. Kartulikrõpsude kõrvale on turule tulnud ka mitmeid juurviljadest, näiteks peedist ja kaalikast, toodetud krõpse, mida tarbijad võivad tervislikumaks valikuks pidada (*taluturg.ee*). Ent ka need on enamasti kõrge rasva ja soola sisaldusega. Eestis leidub müügil ka väherasvaseid krõpse, mis on valmistatud kuivatades või külmuivatades, näiteks mitmed marjasnähid (*taluturg.ee*). Seega on näha trendi üha tervislikemate alternatiivsete snäkkide poole, millele annab hoogu tarbijate kasvav terviseteadlikkus (Martucci, 2018). Fermenteeritud toodete turg piirdub Eestis hapendatud juurviljadega (kapsas, kurk) ning piimatoodetega (nt jogurtid, keefirid). Hapukapsad sisaldavad nii häid baktereid kui ka üpris palju kiudaineid (2,5%) ning jogurtitele võidakse lisada ka prebiootilisi ühendeid (Wennberg et al., 2002). Näiteks on lisatud Tere Helluse sarja jogurtijookidele inuliini (<https://www.tere.eu/tooted/joogijogurt/hellus-metsamarja-jogurtijook>). Siiski pole endas probiootilisi baktereid ja prebiootilisi kiudaineid ühendavaid tooteid

ilmunud snäkkide turule, kuigi tarbijate teadlikkus probiootikumide kasulikust mõjust on kasvamas. Sünbiootiline toode võiks olla ka funktsionaalne toit, mis sisaldab endas sageli inimeste menüüs nappivaid kiudaineid ning kasulikke baktereid, mis aitavad taastada ja hoida normaalset mikrobiomi.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli iseloomustada 5 bakteritüve, mida saaks kasutada sümbiootilise toote tegemiseks maapirnist ning välja töötada sobiv meetod selle toote valmistamiseks.

Töös püstitati järgnevad eesmärgid:

1. Puhastada ja identifitseerida toote tootmiseks kõlblikud tüved
2. Töötada välja parim viis maapirni kääritamiseks välja valitud *Lactobacillus* tüvedega
3. Hinnata valitud *Lactobacillus* tüvede võimet kääritada maapirnis olevaid polüsahhariide
4. Iseloomustada kasutatavate *Lactobacillus* tüvede antibiootikumide tundlikkust
5. Teha kindlaks kasutatavate *Lactobacillus* tüvede võime ellu jääda madala pH juures ja sapisoolade juuresolekul (inimese seedetraktis)
6. Iseloomustada kasutatavate *Lactobacillus* tüvede potentsiaalseid probiootilisi omadusi (β -galaktosidaasi aktiivsus, proteaasi olemasolu, eksopolüsahhariidide tootmist)
7. Teha kindlaks kasutatavate *Lactobacillus* tüvede ellujäämisvõime peale külmuivatust

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud söötmed

Käesolevas töös kasutati järgnevaid söötmeid:

- MRS (De Man, Rogosa ja Sharpe) vedelsööde (VWR Chemicals)
- MRS agarsööde (VWR Chemicals)
- LB (Luria-Bertani) vedelsööde, millele oli lisatud 1% või 4% steriilset piima (0,1% rasva, Alma)
- LB vedelsööde, millele oli lisatud 0,2% laktoosi (ITW Reagents)
- LB agarsööde, millele oli lisatud 1% või 3% steriilset piima (0,1% rasva, Alma)
- Eelsööde: 0,3% pärmieskrakt, 100mM K_2HPO_4 - KH_2PO_4 puhver (pH 6,2), 2% steriliseeritud melass (ca 50% sahharoos; Agromix), steriilne (autoklaavitud) kraanivesi

- LSM (*Lactobacillus Selection Medium*) vedelsööde: 90% ISO-sensitest vedelsööde (Oxoid), 10% MRS vedelsööde (VWE Chemicals) (Klare et al., 2005)
- LSM agarsööde: 90% ISO-sensitest sööde, 10% MRS sööde, 2% agar-agar

2.2.2. Tüvede puhastamine ja identifitseerimine

Esimeses võimalike kasutatavate tüvede valikus oli 13 tundmatut bakterit, mille oli isoleerinud Viia Kõiv erinevatelt kääritatud juurviljadelt ning ühe tüve oli isoleerinud Marju Vahter (Kõiv et al., 2019). Kõikide tüvede kultuurid puhastati järjestikuste ümberkülvidega MRS agartassidel. Liikide identifitseerimiseks amplifitseeriti uuritavate tüvede 16S rRNA geeni V4 regioon. Selleks kasvatati tüved esmalt kaks päeva LB (Luria-Bertani) agarsöötmel (37°C), valiti üksikloonia, mille DNA amplifitseeriti PCR meetodiga kasutades praimereid F534ad ja R783ad (tabel 1) (Kõiv et al., 2019). PCR viidi läbi vastavalt standardprotokollile, mahus 25µl, kasutades polümeraasi Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, USA) ning 2µl bakteriaalset DNA-d. DNA amplifitseerimiseks kasutatud PCR programm on toodud tabelis 2. Amplifitseeritud DNA sekveneeriti. Sekveneerimine viidi läbi Eesti Biokeskuse Tuumiklaboris Sangeri meetodil (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer või Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer). Kõiki järjestusi võrreldi andmebaasides olevate järjestustega, kasutades BLAST programmi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabel 1 DNA amplifitseerimiseks kasutatud praimerid.

Pärisuunaline praimer F534ad	3'-CCAGACTCCTACGGGAGGCAG-5'
Vastassuunaline praimer R783ad	3'-ACCMGGGTATCTAATCCKG-5'

Tabel 2 DNA amplifitseerimiseks kasutatud PCR programm. 2. - 4. sammu korrati 30 tsüklit.

	Temperatuur	Aeg
1.	95°C	5 min
2.	95°C	45 s
3.	50°C	45 s
4.	72°C	45 s
5.	72°C	10 min

2.2.3. Maapirni kääritamine

Kääritamiseks kasvatati baktereid eelnevalt kirjeldatud eelsöötmes 24 tundi (*L. plantarum*) või 48 tundi (*L. brevis* ja *L. paracasei*) temperatuuril 37°C. Kraaniveega pestud ning harjaga puhastatud maapirnid viilutati õhukeselt köögikombainiga. Klaasist koonilisse kolbi (maht 100ml) kaaluti 30g viilutatud maapirni ning lisati 30ml steriilset NaCl vett (lõppkontsentratsioon 2,5%) nii, et kõik viilud oleksid veega kaetud. Inokulum oli 1000x lahjendus eelkasvatatud tüvedest ehk 60µl. Mitme tüve segu korral oli kogumaht alati 60µl ning igat tüve lisati võrdses mahus. Segu inkubeeriti 48 tundi 25°C, 30°C või nende kahe temperatuuri kombinatsioonis (24 tundi 25°C + 24 tundi 30°C). Samuti varieeriti segu aereerimist ehk lokustamise kiirust loksutil (aeglane ehk 100rpm/kiire ehk 160rpm/väga kiire ehk 200-220rpm) või kasvatati aereerimata soojakapis.

Ajapunktides 0 tundi, 24 tundi ja 48 tundi tehti väljakülvid vedelikus olevates bakteritest (MRS agartass ja LB+1% piim agartass), et hinnata nende hulka, mõõdeti indikaatorribaga pH (vahemik 0,0-6,0; Sigma Aldrich) ning hinnati lõhna meeldivust.

2.2.4. Suhkrute hulga hindamine

Õhukese kihi kromatograafia (TLC)

Selleks, et näha, milliseid maapirnis olevaid suhkruid bakterid kääritavad ning millised suhkrud tekivad ja on alles peale kääritamise lõpetamist, tehti õhukese kihi kromatograafia (TLC). Selleks võeti 1,5ml eppendorfi tuubi täis 24 tundi ja 48 tundi kääritatud ja külmkuivatatud maaprinide proovid, lisati 1ml ddH₂O, segati 1 min ning inkubeeriti toatemperatuuril 1 tund. Seejärel proovid segati taas ning tsentrifuugiti (10 000rpm, 2min). TLC plaadile (*TLC Silica gel 60 20x2,5 cm*, Merck Millipore) kanti markerit (fruktoos, sahharoos, 1-kestoos, nüstoos, levaan) ja igat proovi 0,5µl ning voolutati voolutuslahusega, mis koosnes kloroformist, äädikhapest ja veest (mahusuhted:60:10:10) (Stingele et al., 1999). Suhkrute ilmutamiseks kasutati aniliini reaktiivi [1,2g difenüülamiini (Sigma-Aldrich), 1,2g aniliinhüdrokloriidi (Acros Organics), 100ml metanooli (Sigma-Aldrich), 10ml orto-fosforhapet (Naxo)] ning seejärel kuumutamist temperatuuril 110°C 10min (Jork et al., 1990).

Kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC)

Analüüsimaks täpsemalt kääritatud ja külmuivatatud proovides olevate FOS-ide kompositsiooni tehti HPLC analüüs. 1,5 ml eppendorfi tuub täideti külmuivatatud maapirnikrõpsudega, lisati peale 1ml ddH₂O, segati ning lasti seista toatemperatuuril 3 tundi. Seejärel proovid segati taas ning tsentrifuugiti (10000rpm, 3min). Proovist eemaldati supernatant, tsentrifuugiti ning eemaldati veelkord supernatant. Saadud puhastatud segu lahjendati 5 korda ning saadeti HPLC analüüsi tegemiseks. HPLC analüüsi viis läbi Heiki Vija Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudist.

2.2.5. Maapirnivilude külmuivatamine

Peale 24 tundi ja 48 tundi kääritamist võeti maapirnivilude proovid, mis külmutati -80°C ja seejärel külmuivatati (LABCONCO FreeZone 4,5L -105°C, Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituut).

2.2.6. Bakterite elumus maapirnikrõpsudel

Kääritatud ja lüofiliseeritud maapirnikrõpsudel(s) olevate bakterite elumuse hindamiseks kaaluti 2ml eppendorfi tuubi ca 0,1g kõrpse. Need purustati peeneks jahuks steriilse klaaspulga ja pintsettide abiga ning lisati 1ml või 2ml steriilset ddH₂O vett. Seejärel segati segu 1min ning külvati erinevates lahjendustes MRS ja LB+1% piim tardsöötmetele. Tasse inkubeeriti temperatuuril 37°C 48 tundi, seejärel loeti kolooniad ning arvutati CFU 1g krõpsude kohta.

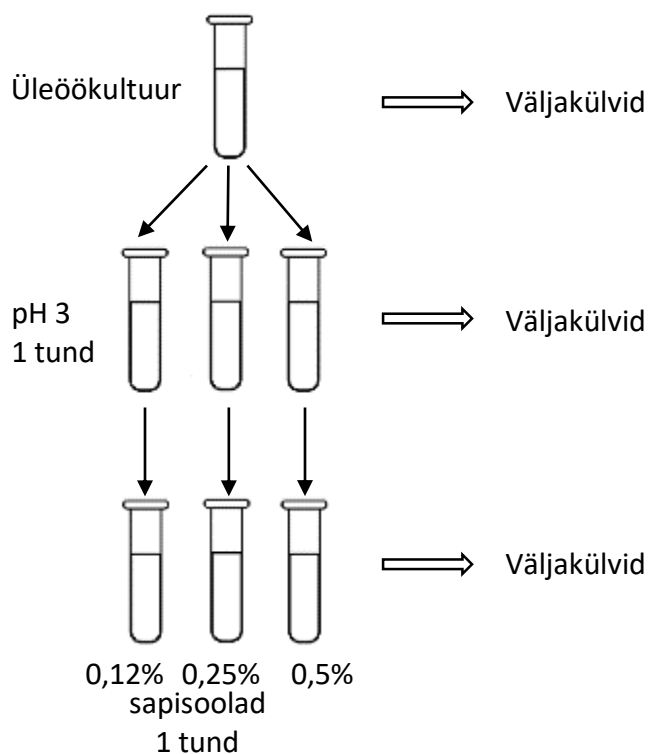
2.2.7. Antibiootikumide resistentsuse määramine (MIC)

Uuritavate bakterite taluvust testiti 9-le antibiootikumile (European Food Safety Authority, 2012). Kõikidest pulberkujul antibiootikumidest tehti põhilahus (5120 µg/ml), millest omakorda tehti vastavad lahjendused LSM söötmesse (Klare et al., 2005). Kasutatud antibiootikumid ja nende kontsentratsioonid olid: ampitsilliin 0,03 – 16 µg/ml (Roth), vankomütsiin 0,25 - 56 µg/ml (Amresco), gentamütsiin 0,25 – 256 µg/ml (AlfaAesar), kanamütsiin 0,25 – 256 µg/ml (ITW Reagents), streptomütsiin 0,25 – 256 µg/ml (Flucka), erüthromütsiin 0,03 – 16 µg/ml (Amresco), klindamütsiin 0,03 – 16 µg/ml (Sigma-Aldrich), tetratsükliin 0,25 – 256 µg/ml (ITW Reagents) ja kloramfenikol 0,25 – 256 µg/ml (ITW Reagents). Piimhappebakterite tüved kasvatati üleöö MRS vedelsöötmes (*L. plantarum* tüved 30°, *L. brevis* ja *L. paracasei* 37°C) ning kontrolltüveks olev *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 LB söötmes (37°C). Üleöö kultuur lahjendati steriilse ddH₂O veega 1:4. Antibiootikumide resistentsus määrati minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni testiga (MIC). Katse viidi läbi mikrotiiterplaatidel, kus ühte

kaevukesse pandi 150µl antibiootikumi lahjendust ning inokuleeriti 3µl lahjendatud üleöö kultuuriga. Mikrotiiterplaate inkubeeriti 48 tundi 37°C ning seejärel mõõdeti kultuuri tihedus mikrotiiterplaadi kaevukestes lainepikkusel 600nm (OD₆₀₀) (Sunrise, TECAN) ning hinnati palja silmaga vaadates. MIC väärtuseks võeti kõrgeim antibiootikumi kontsentratsioon, kus oli veel kasv detekteeritav. Seda võrreldi EFSA poolt soovitatavate piirväärtustega (European Food Safety Authority, 2012).

2.2.8. Sapisoolade ja mao pH taluvus

Seedesüsteemis esineva madala pH ja sapisoolade taluvuse testimiseks viidi läbi katse, mis oli inspireeritud Fuochi *et al.*, (2015) meetodist. Rakke kasvatati üleöö 5ml MRS söötmes ja tsentrifuugiti (20min, 3000rpm), eemaldati supernatant ning rakud võeti üles 5ml steriilses ddH₂O vees, tehti järjestikused lahjendused, mis külvati MRS agartassile. Üleöö kultuur külvati kolmes korduses LSM söötmesse (pH 3), lõppmahus 5ml ning inkubeeriti 1 tund temperatuuril 37°C (Heidolph Inkubator 1000) aeglaselt loksutades (60rpm; Heidolph Unimax 1010), et simuleerida liikumist soolestikus. Järgnevalt võeti igast proovist 1ml väljakülvide tarbeks LSM agartassidele, tsentrifuugiti proovid taas (20min, 3000rpm) ja eemaldati supernatant. Seejärel võeti rakud üles LSM söötmetes (pH 6), mis sisaldasid erinevat kontsentratsiooni sapisooli (Sigma-Aldrich): 0,12%, 0,25% ja 0,5%. Neid proove inkubeeriti samuti 1 tund temperatuuril 37°C aeglaselt loksutades (60rpm). Peale inkubeerimist tehti proovidest lahjenduste read ning väljakülvid LSM agartassidele. Kõiki väljakülve kasvatati 48 tundi temperatuuril 37°C, misjärel loeti kokku kolooniad ning arvutati CFU/ml. Meetodi skeem on esitatud joonisel 4.



Joonis 4 Madala pH ja sapisoolade taluvuse testimise skeem. Kõik tüved kasvatati üleöö MRS vedelsöötmes ning külvati seejärel LSM vedelsöötmesse, pH 3 ja inkubeeriti 1 tund (37°C, 60rpm). Seejärel külvati rakud ümber sapisooli (0,12%/0,25%/0,5%) sisaldavasse LSM vedelsöötmesse ning inkubeeriti 1 tund (37°C, 60rpm). Nii üleöökultuurist, pH 3 juures inkubeeritud proovidest kui ka erinevate sapisoolade sisaldusega söötmetes inkubeeritud proovidest tehti väljakülvid LSM agartassidele, millelt peale 48 tundi inkubeerimist (37°C) loeti kolooniad ning arvutati CFU/ml.

2.2.9. β -galatosidaasne aktiivsus

β -galatosidaasi aktiivsus määrati Milleri meetodiga, mida modifitseeriti (Miller, 1972). Tüved kasvatati MRS vedelsöötmes (37°C) üleöö ning külvati seejärel 100x lahjendusena LB+4% piim ja LB+0,2% laktoos söötmetesse, inkubeeriti 24 tundi temperatuuril 37°C. Rakkude tiheduse määramiseks võeti 1ml kultuuri, inkubeeriti jääl 20min, seejärel tsentrifuugiti (6000rpm, 10min) ning eemaldati supernatant. Rakkudele lisati 1ml külma Z-puhvrit (pH 7) (0,06M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,04M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01M KCl, 0,05M b-merkaptotetanool, 0,01M MgSO_4 , 0,005% SDS) ning mõõdeti optiline tihedus lainepikkusel 600nm (OD_{600} ; Ultrospec 7000, Biochrom). Ensüümi aktiivsuse kindlakstegemiseks võeti 0,5ml Z-puhvris rakke ning lisati neile veel 0,5ml Z-puhvrit ja 100 μl kloroformi (Lach-Ner). Rakud segati vortexil ning inkubeeriti 5min temperatuuril 37°C. Seejärel lisati 200 μl ONPG (orto-nitorfenüül- β -D-galatopüranosiid) lahust (4 mg/ml, Sigma-Aldrich), segati ning inkubeeriti 37°C juures kuni kollase värvuse tekkeni. Reaktsioon peatati 0,5ml Na_2CO_3 lisamisega. Võeti aega ONPG lisamisest kuni reaktsiooni peatamiseni. Mõõdeti kollase värvuse saavutanud lahuse optiline tihedus lainepikkusel 420nm (OD_{420}) ja

550nm (OD₅₅₀). Lõpetuseks arvutati β-galatosidaasi aktiivus Milleri ühikutes (MÜ) valemi järgi (v - kasutatud kultuuri maht; t - aeg).

$$1000 * \frac{OD_{420} - (1,75 * OD_{550})}{OD_{600} * v * t}$$

2.2.10. Proteaasi tootmine

Uuritavate bakteritüvede proteaasi tootmise võimet hinnati peale tüvede kasvatamist 48 tundi temperatuuril 37°C LB-agarsöötmel, mis sisaldas 3% steriilset piima. Tüvesid hinnati koloonia ümber tekkinud lüüsilaigu suuruse järgi ning hinnati kas proteaasne võime on olemas või mitte (+/-).

2.2.11. Eksopolüsahhariidide tootmine

Bakteritüvede eksopolüsahhariidide tootmise võimet hinnati silma järgi peale tüvede kasvatamist MRS tassil 30°C juures 48 tundi. Tüvede polüsahhariidide tootmise võimekust võrreldi omavahel.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

Inimese kehal ja keha sees elav mikroobide kooslus - mikrobiom - hõlmab endas nii baktereid, arhesid, viiruseid, seeni ja teisi mikroskoopilisi päristuumseid organisme, ent valdavalt peetakse mikrobiomist rääkides silmas bakterite kooslust. Eriti palju on uuritud seedetraktis olevat mikrobiomi. Teame, et suuremas osas on inimese seedetraktis elavad bakterid meile kasulikud ning nende hävitamine või tasakaalust välja viimine (näiteks antibiootikumidega) põhjustab tervisehäireid.

Oluline osa mikrobiomi kujunemisel ja säilimisel on seotud toitumisega. See, mida peremees sööb, on toiduks tema mikroobidele. Fermenteeritud toidud on paljudes maades pikalt traditsioonilisel toidulaual olnud ja nende kaudu on ka inimeste soolestiku mikrobiom täiendust saanud (Tamang et al., 2020). Teine oluline osa inimese toitumise ja tema mikrobiomi vahel on toidus sisalduvad kiudained, mille lagundamiseks vajalikke ensüüme inimesele pole, ent mida bakterid meelsasti käärivad ja energia saamiseks tarbivad (Codex Alimentarius Committee, 2017). Kiudaineid leidub rohkelt erinevates puu-, juur, tera- ja kaunviljades. Kahjuks sisaldab keskmise tänapäeva Lääne ühiskonnas elava inimese menüü üpris vähe taimset toitu ning on lihtsate süsivesikute-, valgu- ja rasvarikas (Barbaresko et al., 2013). Ka kääritatud toite ei tarvitata tänapäeval eriti palju. Seetõttu otsitakse uusi meetodeid, et oma mikrobiomi ja selle kaudu tervist turgutada. Probiootikumid on elusad mikroobid, kes mõjuvad inimese tervisele kasulikult ning neid saab tarvitada mitmel eri viisil, näiteks kapslitena või toidu (nt jogurti) sees (C. Hill et al., 2014). Prebiootikumid on (kiud)ained, mida inimese mikroorganismid suudavad selektiivselt kasutada (enamasti kääritada), mis seetõttu soodustavad nende bakterite kasvu ning millel seeläbi on inimese tervisele kasulik mõju (Gibson et al., 2017).

Suur osa toitudest, mis sisaldavad elusaid mikroobe, on valmistatud piimast: jogurtid, keefir, hapupiim. Mitte-piimatoodetest on Eesti turul hapukapsas, hapukurk, kimtši. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli teha arendustööd uut tüüpi sümbiootilise toote tarbeks – uurida potentsiaalseid bakteritüvesid, nende sobivust probiootikumideks ning leida hea meetod nendega maapirniviilude kääritamiseks. Valmis lõpp-produkt on kääritatud ja seejärel külmuivatatud maaprinikrõpsud. Maapirni mugulad sobivad hästi antud toote valmistamiseks, kuna sisaldavad loomulikult väga kõrges kontsentratsioonis (55-65% kuivkaalust) inuliini ja FOS-e,

mis on hästi tõestatud prebiootikumid (Ahmed & Rashid, 2019; Kocsis et al., 2007). Lisaks on maapirni kasvatamine lihtne ja soodne.

3.1. Kääritamiseks sobivate tüvede identifitseerimine

TÜ Tehnoloogiainstituudi teadlane Viia Kõiv oli eelnevalt isoleerinud erinevatelt juurviljadelt valiku mikroobe, kes olid määratlemata. Nende seas oli baktereid nii kääritatud maapirni mugulatelt kui ka nt

porgandilt (Kõiv et al., 2019). Lisaks võeti valikusse tüvi MK, mille isoleeris Marju Vahter toidupoest ostetud lehtnaerilt (vt tabel 3). Algses valikus oli 13 erinevat bakteritüve. Need kõik puhastati ja identifitseeriti 16S rRNA V4 regiooni järjestamisega ning sekveneerimisel saadud järjestusi võrreldi andmebaasides olevate järjestustega BLAST programmi abil. DNA amplifitseerimiseks kasvatati baktereid LB söötmel, kuna seal ei tekita rakud niivõrd palju eksopolüsahhariide, mis segavad PCR reaktsiooni. Algsest tüvede valikust jäeti kõrvale 8 bakteritüve, kas nende kehvade kasvuomaduste tõttu (N=6) või osutusid need ebasobivateks liikideks (*Sphingomonas* spp, *Rhizobium* spp, *Agrobacterium* spp; N=2), kuna on harilikud mullabakterid, keda ei saa kääritamisel kasutada. Lõpuks jäi edasiseks tööks kasutusse 5 tüve 3 erinevast liigist (N=5). Oluline on märkida ka, et kõik need 3 liiki (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*) on probiootikumidena laialt kasutuses (D. Hill et al., 2018; Seddik et al., 2017). Seega võib üldised kasulikud omadused, mis pole tüvest sõltuvad vaid liigiülesed, mitte tüvest sõltuvad, ka antud töös kasutatud tüvedele üle kanda (C. Hill et al., 2014). Edasiseks tööks välja valitud tüved, nende liigiline kuuluvus ja isoleerimise paik on välja toodud tabelis 3.

Tabel 3 Töös kasutatud tüved, nende liigiline kuuluvus ja päritolu. Tüvede liigid tehti kindlaks 16S rRNA geeni V4 regiooni amplifitseerimise ja sekveneerimisega.

Tüvi	Liik	Tüve päritolu
5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	maapirn, Valga maakond Tõlliste vald
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	maapirn, Valga maakond Tõlliste vald
MK	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pekingi lehtnaeris (<i>napa cabbage</i> , <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>), RIMI
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	maapirn, Valga maakond Tõlliste vald
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	porgand, Harjumaa, Saue vald

3.2. Fermenteeritud maapirnikõrpsude tegemine

3.2.1. Kääritamine

Kääritatud toidud on olnud traditsiooniliselt olulisel kohal toidulaual, kuna selline toidu töötlemise viis oli hea võimalus toidu kauemaks säilitamiseks. Fermenteerivad mikroorganismid viivad toidusegu pH piisavalt madalale, et seal ei saaks kasvada patogeensed ja toitu riknema ajavad bakterid. Tavaliselt toimub see spontaanse käärimise kaudu, ehk laktobatsillid ja teised fermenteerimise eest vastutavad bakterid leiduvad juba loomulikult toiduainetel (nt kapsas) (Tamang et al., 2020). Sama idee oli aluseks ka maapirni viilude kääritamisel: lisada maapirniviiiludele fermenteerivaid probiootilisi baktereid, et pH läheks kääritamissegu kiirelt alla ning pärsiks nõnda ebasobivate mikroobide kasvu, kes võiksid toote hoopis riknema panna.

Maapirniviiilude kääritamiseks katsetati erinevaid võimalusi (kääritamise temperatuur ja aeg), võttes arvesse ka seda, milline meetod võiks olla tööstuslikus mahus kõige optimaalsem. Tootmisprotsessis võib suure mahu madalamal temperatuuril kääritamine tulla oluliselt soodsam. Seetõttu katsetati kuidas kääritavad antud tüved maapirniviiile 25°C ja 30°C juures. Tulemusena leiti, et pH langeb kiiremini kõrgema temperatuuri juures fermenteerides. Laktobatsillid kasvavad

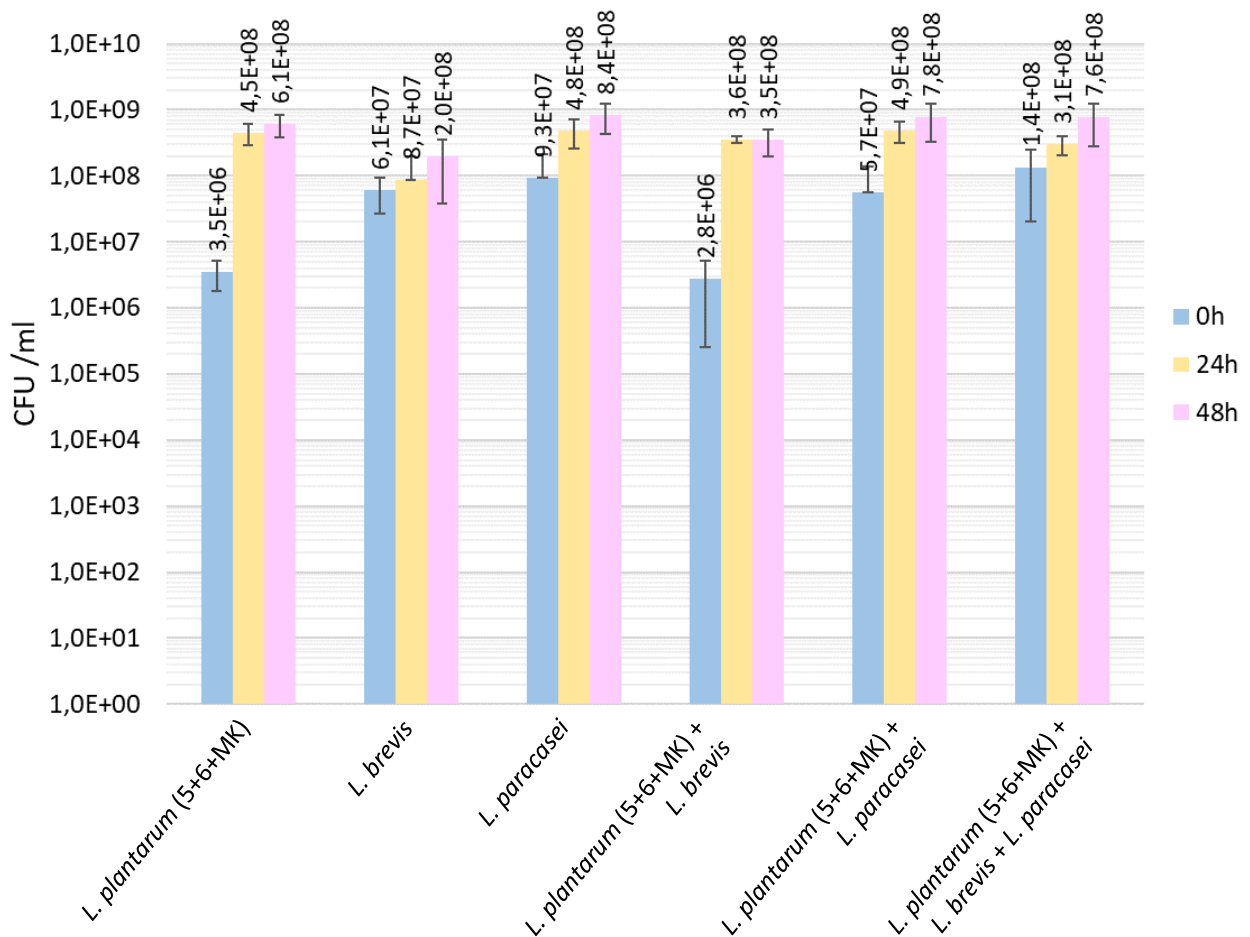
edukamalt temperatuuridel 30-37°C ning toodavad seetõttu kõrgema temperatuuri juures ka rohkem piimhapet (Hammes & Hertel, 2015). Keskmiselt langes 30°C juures kääritades (24 tundi) pH algselt 6,5 ühikult 4 peale ning jäi sinna pidama ka 48 tunniks. Madalamal temperatuuril (25°C) langes 24 tunni möödudes pH 5 juurde ning järgneva 24 tunni möödudes pH 4 juurde.

Järgmisena hinnati millist mõju omab fermenteeritava massi aereerimine ehk loksutamise kiirus. Käärimise ajal aereerimist prooviti, kuna on teada, et mõningad laktobatsillid toodavad hapniku juuresolekul äädikhapet (Vinderola et al., 2019). Kuna kaubanduses pakutakse äädikamaitsetisi kartulikrõpse, siis kaaluti võimalust ka välja arendada äädikamaitsetisi maapirnikrõpse, mis võiksid tarbijale meeldida. Katsetati kääritamist ilma aereerimata, väikese loksutamisega (100rpm), kiire loksutamisega (160rpm) ja väga kiire loksutamisega (200-220rpm). Erinevad loksutamiskiirused mõjutasid bakterite arvukust, kuid suurema aereerimisega kasvasid oluliselt kiiremini ka soovimatud aeroobsed mikroobid, kelle kolooniaid esines aereeritud proovide väljakülvi tassidel oluliselt rohkem. Näiteks oli kiiresti loksutatud proovide väljakülvides sagedasti pärmi *Wickerhamomyces anomalus* kolooniaid (määranud Viia Kõiv MALDI-TOF MS meetodiga). Lisaks lõhnasid aereeritult kääritatud proovid teisiti kui aereerimata proovid. Hapnikurikkamalt kasvatatud proovid olid magusama, siidrisema lõhnaga ning vahel isegi ebameeldiva lõhnaga. Võimalik, et magusam lõhn tekib siis, kui maapirni mugulatega kaasa tulevad aeroobsed mikroobid saavad kasvueelise ning lisatud *Lactobacillus* bakterite ees, kes on fakultatiivsed aeroobid ning ilmselt ei kasva nii kiiresti ega jõua maapirnis olevate mikroobide kasvu alla suruda. Maapirnid kasvavad mulla all ning on seega kaetud mulla väga mitmekülgse ja varieeruva mikroobikooslusega. On paratamatu, et mingi osa sellest kooslusest jääb ka kääritatavatele mugulatele. Teised praegu turul olevad hapendatud köögiviljad (kapsas, kurk) kasvavad maa peal ja ei pruugi seega nii paljude erinevate mikroobidega kaetud olla. Seetõttu on maapirni kääritamisel suurem risk ja võimalus lõpptulemuse kõikumiseks ja toote riknemiseks. Kuigi paaril korral õnnestus saada ka äädika lõhna, ei olnud tulemused ühtlased ning varieeruvus oli suur. Ka see oli üks põhjus, miks otsustati aereerimisest loobuda. Aereerimata soojakapis fermenteeritud maapirnid lõhnavad rohkem hapu juurika järele ja ei ole üldiselt magusa lõhnaga. Kuna temperatuuril 30°C aereerimata fermenteerides olid kõige stabiilsemad tulemused ja kõrvalekaldeid vähe, otsustati lõpuks selle meetodi kasuks.

Tabelis 4 on näidatud, kuidas muutub pH kääritades maapirni viile 2,5% soolvees soojakapis (30°C). pH langeb kiiresti madalale esimese ööpäevaga (24 tundi) ning püsib seal ka 48 tunnini. Seda kõikide tüvede ja ka nende erinevate kombinatsioonide puhul. Ka tõuseb bakterite arvukus juba 24 tunniga üpris kõrgele – 6 tüve segu puhul $3,1 \times 10^8$ (joonis 5). Peale 48 tundi fermenteerimist tõusis CFU/ml 10^9 lähedale. Kuigi kääritamissegusse tehti alati 1000x lahjendus, kõikus algne CFU/ml kohta proovide vahel üpris palju. Ilmselt tulenes varieeruvus tüvede eelkasvatusest. Seega oleks kindlasti vaja välja töötada täpne starterkultuuri kasvatamise meetod, mis oleks odav, efektiivne ning tagaks igale kääritamisele sama algkultuuri ja lõpptulemuse. Siiski on joonisel 5 näha, et ka madala algse bakterikontsentratsiooniga saavutatakse 48 tunniks kõrge bakterite arvukus. Näiteks kolme *L. plantarum* tüve segu puhul oli algne rakkude hulk keskmiselt $3,5 \times 10^6$ CFU/ml, mis tõusis peale kahte päeva fermenteerimist $6,1 \times 10^8$ CFU/ml. Seega näib antud kääritamismeetod hästi toimivat.

Tabel 4 pH muutus maapirni viilude kääritamisel (2,5% soola, 30°C, aereerimata) erinevate *Lactobacillus* tüvedega ja nende kombinatsioonidega ajapunktidel 0, 24 ja 48 tundi (h).

KASUTATUD TÜVED	pH		
	0h	24h	48h
<i>L. plantarum</i> (6+5+MK)	6	4	4
<i>L. brevis</i>	6	4,5	4
<i>L. paracasei</i>	6	4,5	4
<i>L. plantarum</i> (6+5+MK) + <i>L. brevis</i>	6	4	4
<i>L. plantarum</i> (6+5+MK) + <i>L. paracasei</i>	6	4	4
<i>L. plantarum</i> (6+5+MK) + <i>L. brevis</i> + <i>L. paracasei</i>	6	4	4



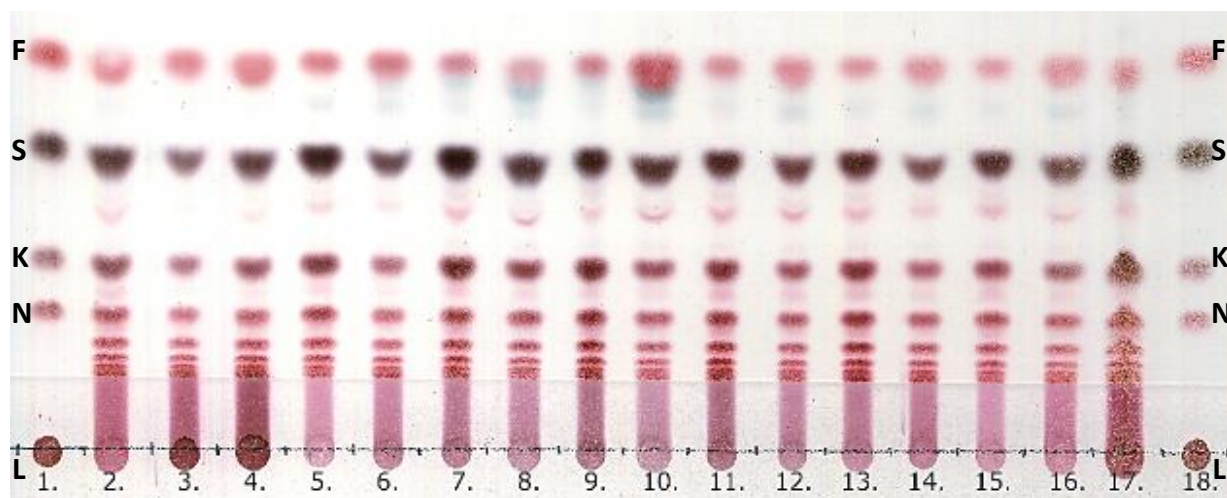
Joonis 5 *Lactobacillus* tüvede (*L. plantarum* 5, *L. plantarum* 6, *L. plantarum* MK, *L. brevis*, *L. paracasei* ja kombinatsioonid) CFU/ml maapirniviilude kääritamisel (2,5% NaCl, 30°C, aereerimata), kääritamisvedelikust. Tulemused on esitatud logaritmilisel skaalal. Sinine - 0h (tundi); kollane – 24h; roosa – 48h.

3.2.2. Maapirnis olevate suhkrute lagundamine

Selleks, et teada saada, millised süsivesikuid uuritavad laktobatsillid maaprini kääritamiseks kasutavad, kasutati TLC meetodit ning HPLC analüüsi. Maapirnis on palju inuliini ja fruktooligosahhariide. Inuliin on polüsahhariid, mis koosneb fruktoosi monomeeridest, mille alguses on sageli ka üks glükoosi jääk (Ahmed & Rashid, 2019). FOS-id on väiksemad polümeerid, mis saadakse inuliini lagundamisel. Seega koosnevad ka need fruktoosi monomeeridest ning esimeseks monomeeriks võib, aga ei pruugi olla, glükoosi jääk (Ahmed & Rashid, 2019).

TLC meetodiga liiguvad väiksemad suhkrud plaadil kiiremini ning suurema polümerisatsiooniastmega aeglasemalt. Pikad polüsahhariidid nagu inuliin (ja markeris olev levan)

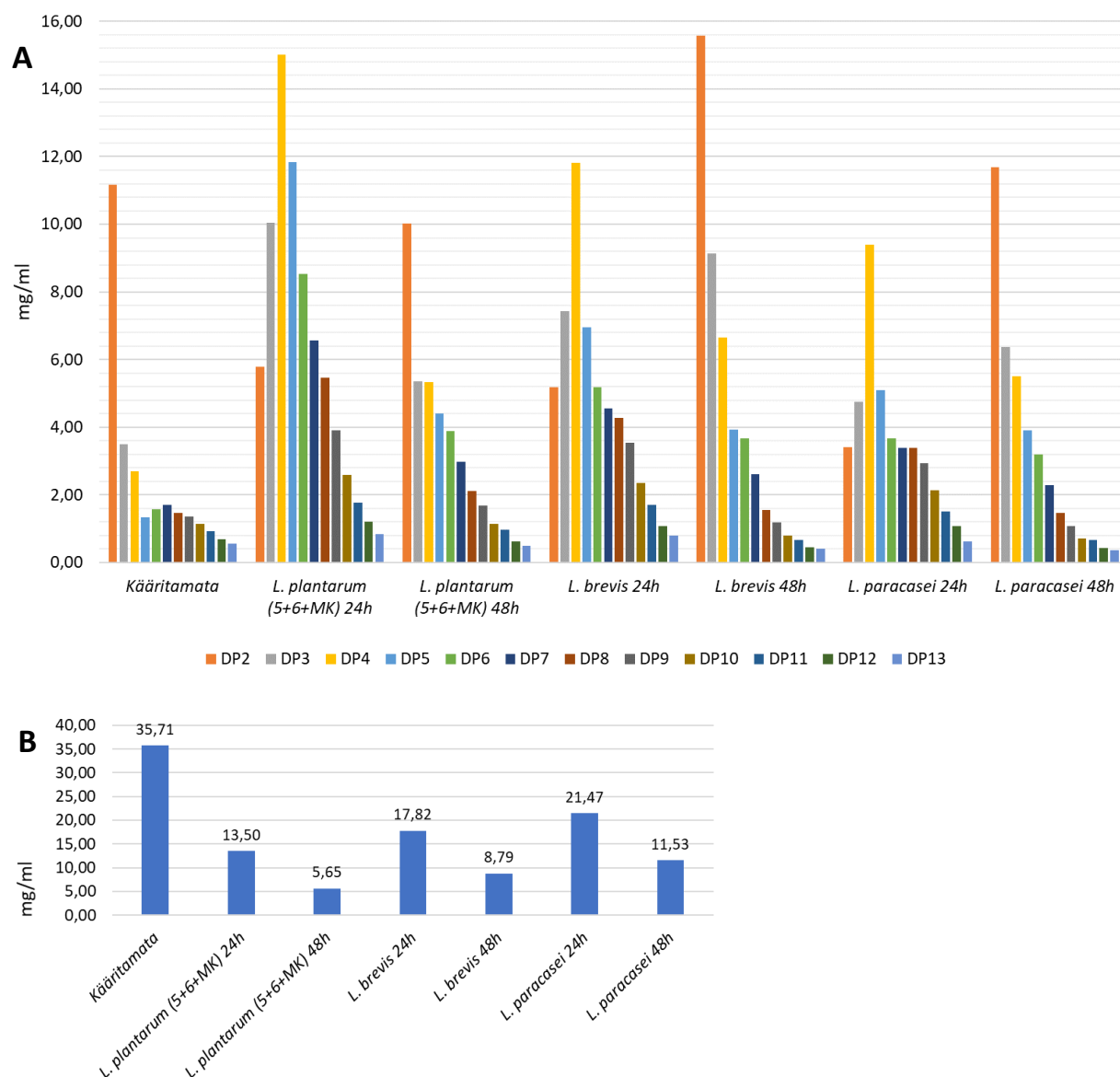
ei liigu stardijoonelt. Markeriks on erineva polümerisatsiooni astmega sukrute segu (fruktoos – PA1; sahharoos- PA2; 1-kestoos – PA3; nüstoos – PA4; levaan). TLC plaat on värvitud aniliini rektiiviga, mistõttu furktoosi sisaldavad suhkrud värvuvad punaseks ning glükoosi sisaldavad siniseks. Saadud TLC pilt on esitatud joonisel 6. Jooniselt on näha, et kääritamata maapirnis (rada 17) leidub nii mono- kui disahhariide, erineva pikkusega FOS-e ja inuliini nagu kinnitab ka kirjandus (Ahmed & Rashid, 2019). Seega, isegi kui bakteritel endal puuduvad inuliini või FOS-ide lagundamiseks vajalikud ensüümid, siis on maapirnis kääritatavaid suhkruid ka neile. TLC pildilt on näha ka, et ka 48 tundi kääritades jääb alles lagundamata inuliini, mis pole stardijoonelt liikunud (rajad 2-4, 6, 8, 10, 12, 14, 16). Kuigi TLC pilt annab aimu inuliini ja FOS-de sisaldusest maapirnis ja nende kasutamisest bakterite poolt, ei saa selle põhjal midagi kvantitatiivset järeldada.



- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1. Marker | 10. <i>L. paracasei</i> 48h |
| 2. <i>L. plantarum</i> 6 48h | 11. <i>L. plantarum</i> 6+5+MK+ <i>L. brevis</i> 24h |
| 3. <i>L. plantarum</i> 5 48h | 12. <i>L. plantarum</i> 6+5+MK+ <i>L. brevis</i> 48h |
| 4. <i>L. plantarum</i> MK 48h | 13. <i>L. plantarum</i> 6+5+MK+ <i>L. paracasei</i> 24h |
| 5. <i>L. plantarum</i> 6+5+MK 24h | 14. <i>L. plantarum</i> 6+5+MK+ <i>L. paracasei</i> 48h |
| 6. <i>L. plantarum</i> 6+5+MK 48h | 15. <i>L. plantarum</i> 6+5+MK+ <i>L. brevis</i> + <i>L. paracasei</i> 24h |
| 7. <i>L. brevis</i> 24h | 16. <i>L. plantarum</i> 6+5+MK+ <i>L. brevis</i> + <i>L. paracasei</i> 48h |
| 8. <i>L. brevis</i> 48h | 17. Kääritamata maapirn |
| 9. <i>L. paracasei</i> 24h | 18. Marker |

Joonis 6 TLC kääritatud maapirni ekstraktidest. Rajad 1. ja 18. on markersuhkrud F – fruktoos (PA1); S - sahharoos (PA2); K - 1-kestoos (PA3); N – nüstoos (PA4); L - levaan. Rajad 2. – 16. on käesolevas töös uuritavate tüvedega kääritatud maapirnid, 24 või 48 tundi (h). 16. rajal on kääritamata maapirn.

HPLC analüüsiga sai määrata kvantitatiivselt monosahhariide ning polüsahhariide, mis koosnesid maksimaalselt 13 monomeerist (PA 13). Suuremaid molekule ehk inuliini määrata ei saanud (joonis 7A). Analüüs näitas, et kääritamata maapirnis on algselt rohkem fruktoosi (35,7 mg/ml), mille hulk väheneb fermenteerides oluliselt esimese 24 tunniga ning veelgi 48. tunniks (joonis 7B). Samuti on maapirnis algselt palju disahhariide (DP2; 11,2 mg/ml) võrreldes pikemate FOS-idega (joonis 7A). Need disahhariidid võivad olla kas sahharoos või inulobioos, mis koosneb kahest $\beta(2-1)$ glükosiidsidemega seotud fruktoosi jäägist (National Center for Biotechnology Information,



Joonis 7 A - HPLC analüüsiga mõõdetud FOS-ide kontsentratsioonid (mg/ml) kääritamata maapirnis ja uuritud bakteritega 24 tundi (h) või 48 tundi kääritatud maapirni proovides. Mõõdetud on FOS-d polümerisatsiooniastmega (PA) 2 – 13. **B** – HPLC analüüsiga mõõdetud fruktoosi kontsentratsioon (mg/ml) kääritamata maapirnis ja uuritud bakteritega 24 tundi ja 48 tundi kääritatud maapirni proovides.

2020). DP3 on 3,5 mg/ml ning DP4 2,7 mg/ml. Neist pikemaid FOS-e (DP5-13) on kääritamata maapirnis kõiki vähem kui 2 mg/ml. *L. plantarum* tüved kasutavad esimese 24 tunniga ära suure hulga fruktoosi ja kahest monomeerist koosnevad suhkrud. Juurde tekib erinevas pikkuses FOS-e, eriti lühemaid FOS-e (DP3-5) (joonis 7A). DP4 hulk tõuseb eriti kõrgele - 15 mg/ml. Lühemaid FOS-e tekib pikemate FOS-ide ja inuliini lagundamisest ning pikemaid FOS-e inuliini lagundamisest. 48 tunniks on tekkinud FOS-id taas ära kasutatud ning DP2 molekulide hulk on tõusnud.

L. brevis näib käituvat sarnaselt *L. plantarum* tüvedele – kõige suuremaks tõuseb 24 tunniga DP4 FOS kontsentratsioon (11,8 mg/ml). 48 tunni lõpuks on selle hulk langenud ning väga palju on tekkinud DP2 – 15,6 mg/ml. Ka erinevalt *L. plantarum* tüvede ja *L. paracasei*'ga kasvab *L. brevis*'ga 48 tundi kääritatud maapirni proovis DP3 FOS hulk. Seletuseks võib olla, et DP2 molekulid on suure tõenäosusega sahharoos, mida kõik *L. brevis* tüved kasutada ei suuda (Hammes & Hertel, 2015). Seetõttu ongi näha fruktoosi eelistamist pikematele FOS-dele ning DP2 kuhjumist. Varasemalt on *L. brevis*'l on näidatud FOS-ide lagundamise, ent mitte inuliini lagundamise võimet (Kariyawasam et al., 2020).

L. paracasei tõstab 24 tunniga samuti kõikide FOS-ide hulka, ent eriti kasvab DP4 polümeeride hulk ning vähem DP3 ja DP5 hulk võrreldes *L. plantarum*'i ja *L. brevis*'ga. Mitme *L. paracasei* tüve puhul on teada, et neil on rakuväline ekso-aktiivsusega inulinaas, ehk ensüüm lagundab inuliini molekule otsast, vabastades fuktoosi või lühemaid FOS-e (Boger et al., 2018). *L. paracasei* näib eelistavat pikemaid inuliini ahelaid lühematele (Boger et al., 2018). Kirjanduse andmeil leidub *L. paracasei* seas mitmeid inuliini lagundavaid tüvesid (Boger et al., 2018; Makras et al., 2005; Tsujikawa et al., 2013).

Kokkuvõtteks saab öelda, et uuritavad laktobatsillid sobivad kokku sümbiootikumiks koos maapirniga ja selles leiduva inuliini ning fruktooligosahhaiididega. Maapirnis olevad prebiootikumid on nende tüvede poolt kasutatavad. Eriti hästi võibki toimida just erinevate tüvede kombinatsioon, kus tüved komplementeerivad üksteist ning saab toimuda ka rist-toitumine (Boger et al., 2018). Peale kääritamist jääb alles ka inuliini, mis võiks jõuda inimese jämesoolde ning olla sealse mikroobide populatsiooni poolt kääritatav ning nende metaboliidid saavad toiduks teistele soolebakteritele (Rossi et al., 2005).

3.2.3. Bakterite arvukus külmuivatatud krõpsudes

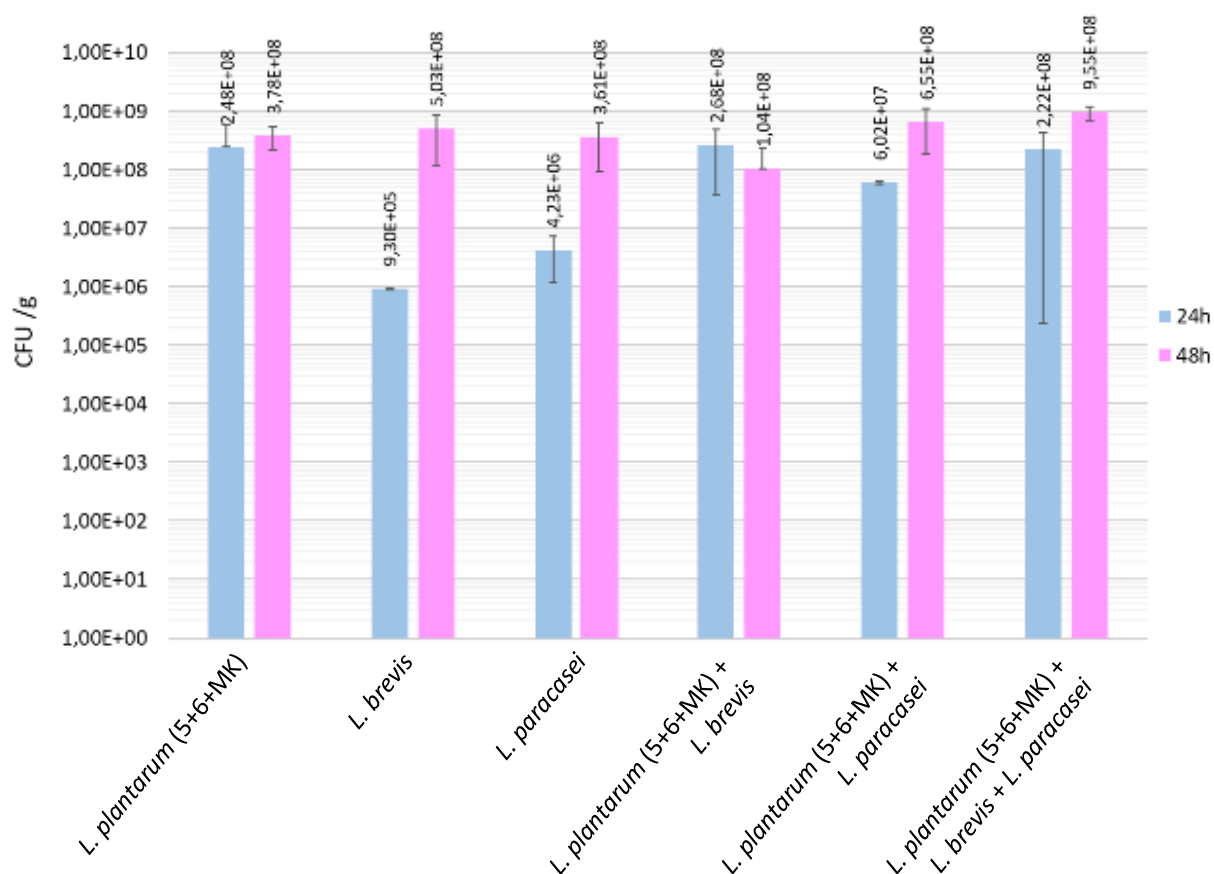
Fermenteeritud maapirniivilud lüofiliseeriti ehk külmuivatati toote parema säilimise ja tarbijale meelepärasema, mugavama kogemuse jaoks. Külmuivatamine on meetod, kus külmutatud substraadist eemaldatakse vesi vaakumi abil. Kuigi see on üks tõhusamaid bakterirakkude kuivatamise ja säilitamise meetodeid, hukkub ka külmuivatamismeetodiga alati mingi hulk rakke (Broeckx et al., 2016).

Probiotikumide mõiste ütleb, et neid tuleb manustada „piisavas koguses“, kuid ei defineeri seda täpsemalt. See on mõistetav, sest inimese tervisele efekti omav rakkude arv võib erineda vastavalt bakteri liigile, tüvele ning sihtmärgile (nt suu vs jämesool). Tavaliselt on selleks piisavaks koguseks 10^8 - 10^9 kolooniat moodustavat ühikut ühe portsjoni kohta (C. Hill et al., 2014; Vinderola et al., 2019). Et seda nõude täitmist kontrollida ja näha, kui hästi bakterid lüofiliseerimise üle elasid, kaaluti ca 0,1g krõpse, purustati peeneks jahuks, segati veega ning tehti väljakülvid MRS agarsöötmele. Saadud CFU arvutati ümber CFU 1g kohta (CFU/g). Saadud tulemused on esitatud joonisel 8. Jooniselt on näha, et ka külmuivatatud maapirnikrõpsudel säilib kõrge eluvõimeliste bakterite arvukus – 6 tüve seguga 48 tundi kääritatud krõpsudel on CFU $9,6 \times 10^8$ ühe grammi kohta. Mikroobide head ellujäämist võis toetada maapirnis olevad inuliin, FOS-d ja mono- ning disahhariidid (Broeckx et al., 2016). Üksikute tüvede kaupa jäävad nii *L. plantarum* kolme tüve segu, *L. brevis* kui ka *L. paracasei* peale 48 tundi kääritamist ning külmuivatamist ellu hulgas $3,7 - 5 \times 10^8$ CFU/g. 24 tundi fermenteeritud krõpsudel on bakterite hulk madalam, ent on siiski kõikide tüvede segu korral keskmiselt $2,2 \times 10^8$. Ainult *L. plantarum* tüvede korral on 24 tundi ja 48 tundi kääritatud tootel bakterite arvukus ligikaudu sama. Ainult *L. brevis*’t või *L. paracasei*’t sisaldavate krõpsude bakterite hulk on 24 tundi fermenteeritud krõpsudel madalam, vastavalt $9,5 \times 10^5$ ja $4,2 \times 10^6$ CFU/g. Üldiselt antakse bakterite arv tootes portsjoni või doosi, mitte grammi kohta. Ilmselt ei sööks ka ükski tarbija 1 grammi jagu krõpse. Seega oleks 20g krõpsude (ehk ühe portsjoni) kohta ka suurem probiotikumide doos – $1,9 \times 10^{10}$ CFU.

Võrreldes jooniseid 5 ja 8 on näha, et külmuivatatud krõpsudel on bakterite arvukus sama suur kui enne kuivatamist. Enne kuivatamist oli 48 tundi 6 tüve seguga kääritatud proovides $7,6 \times 10^8$ ning peale kuivatamist $9,6 \times 10^8$ CFU/g. Tegelikuses on külmuivatamisega osa rakke siiski hukkunud, kuid sama arvukus saamise põhjuseks võib olla kahe katse rakkude arvu mõõtmise

erinev meetod. Nimelt võeti kääritamisel proov kääritamisvedelikust, aga mitte maapirni viiludest. Peale külmuivatamist võeti proovid valmistatud krõpsude purust, mille märgkaal (maht) oli enne kuivatamist suurem kui vedelikust võetud proovidel. Maapriniviilude kaal väheneb külmuivatamisega ca 5 korda.

Bakterite arvukust krõpsudelt määrati maksimaalselt nädal peale külmuivatamist. Aja möödudes ja krõpse hoiustades võib see oluliselt langeda, sõltuvalt ka hoiustamistingimustest (Broeckx et al., 2016). Seega oleks kindlasti vaja määrata krõpsudelt CFU/g kohta nt peale 3, 6 ja 12 kuud toote hoiustamist. See aitaks määrata ka toote parim enne kuupäeva.



Joonis 8 CFU/g külmuivatatud fermenteeritud maapirnikrõpsudelt. Maaprin on fermenteeritud erinevate latobatsillide tüvedega ja nende kombinatsioonidega (*L. plantarum* 5, *L. plantarum* 6, *L. plantarum* MK, *L. brevis*, *L. paracasei*). Tulbad näitavad CFU 1 grammi kohta logaritmilisel skaalal. Sinine – 24 tundi (h) kääritatud ja seejärel lüofiliseeritud maapirn; roosa – 48 tundi kääritatud ja lüofiliseeritud maapirn.

3.3. Tüvede turvalisus – tundlikkus antibiootikumidele

Ka kõigi QPS staatusega mikroobide kasutamiseks kas toidutööstuses või probiootiliste toidulisanditena, on EFSA poolt nõutud antibiootikumidele tundlikkuse testimine minimaalse

inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) testiga (European Food Safety Authority, 2012). See on vajalik, et välistada antibiootikumide resistentsusgeenide leviku võimalus fermenteeritud toiduga või toidulisanditega. Kuigi probiootikumide enda puhul pole antibiootikumile vastupidamine probleem, sest nad ei ole patogeensed, võivad probiootilised bakterid olla reservuaariks antibiootikumide resistentsusgeenidele. Need geenid võivad soolekeskkonnas üle kanduda ka patogeenidele või oportunistlikele patogeenidele (Campedelli et al., 2019). EFSA nõuab *Lactobacillus* perekonna liikidele 9 antimikroobse ühendi testimist: ampitsilliin, vankomütsiin, gentamütsiin, kanamütsiin, streptomütsiin, erütromütsiin, klindamütsiin, tetratsükliin ja klooramfenikool (European Food Safety Authority, 2012). Käesolevas töös kasutatud tüvede MIC väärtused on esitatud tabelites 5 ja 6.

Tabel 5 *Lactobacillus plantarum* erinevate tüvede minimaalsete inhibeerivate kontsentratsioonide (MIC) väärtused 9 antibiootikumi kohta. Piirväärtused on EFSA määrtuste põhjal (European Food Safety Authority, 2012).

Antibiootikum (µg/ml)	<i>L. plantarum</i> 5	<i>L. plantarum</i> 6	<i>L. plantarum</i> MK	Piirväärtus
Ampitsilliin	0,06	0,5	0,125-0,25	2
Vankomütsiin	>256	>256	>256	Testimine pole nõutud
Gentamütsiin	4-8	4-8	2	16
Kanamütsiin	32-64	64	16-32	64
Streptomütsiin	16-32	32-64	8	Testimine pole nõutud
Erütromütsiin	0,5	1	0,125-1	1
Klindamütsiin	0,125	0,03	2	2
Tetratsükliin	64-128	64-128	64-128	32
Klooramfenikool	8	8	8	8

Tabelis 5 on välja toodud MIC väärtused kolme *Lactobacillus plantarum*i kohta erinevatel antibiootikumidel. Seitsme antibiootikumi puhul üheksast jääb kõikide *L. plantarum*'i tüvede taluvusepiir madalamaks kui on määratud piirväärtus, ehk nad on antibiootikumile tundlikud. Vankomütsiin ei toimi ühelegi *L. plantarum* tüvele ega ka *L. brevis* ja *L. paracasei* tüvedele (tabelid 5 ja 6). Paljudel laktobatsillidel on selle vastu omane resistentsus. Nimelt on nende

peptidoglükaani oligopeptiidides otsmise D-alaniini asemel D-laktaat või D-seriin. See takistab vankomütsiini seondumist ja bakter on antibiootikumile tundetu (Gueimonde et al., 2013). Murettekitav on kõigi kolme *L. plantarum* resistentsus tetratsükliini vastu: kõigil on MIC 64-128 µg/ml, mis on kaks kuni neli korda kõrgem lubatud piirväärtusest (tabel 5). Tetratsükliini puhul on leitud laktobatsillidel mitmeid resistentsusgeene, mis võivad paikneda nii plasmiidil, transposoonides ja ka genoomis. Sageli esineb mitu tetratsükliini resistentsusgeeni koos (Gueimonde et al., 2013). Sarnaselt *L. plantarum*'le on ka *L. brevis* tetratsükliini vastu resistentne ning teiste testitud antimikroobsete ühendite (va vankomütsiin) suhtes tundlik (tabel 6). *L. paracasei* on tundlik tetratsükliinile, ent näib olevat resistentne kanamütsiinile. Samas tasub tähele panna, et EFSA poolt määratud piirväärtused on juba 8 aastat vanad ning selle ajaga on oluliselt rohkem rõhku pandud laktobatsillide ja teiste probiootiliste liikide testimisele. Näiteks töös, kus testiti 182 *Lactobacillus* tüve 16 antibiootikumil ning leiti, et neist 88% ei mahtunud EFSA piirnormidesse (Campedelli et al., 2019). Samuti leiti, et paljudel juhtudel ei olnud antibiootikumiresistentsus seletatav resistentsusgeeniga. Sel juhul võibki tegu olla mikroobi omapäraga või ei ole resistentsusgeenide kohta piisavalt uurimusi ja andmeid andmebaasides. *L. paracasei* kanamütsiini resistentsus võib samuti olla üks selline juhtum. Nimelt on suur enamus *Lactobacillus* liikidest sisemiselt resistentsed aminoglükosiididele, mille hulka kuulub ka kanamütsiin. Eelpool mainitud töös uuritud *L. paracasei* tüvi ning mitmed teised temaga samas rühmas (*L. casei-maniotivorans* grupp) olevad bakterid olid kanamütsiini suhtes resistentsed, ent neist ei leitud ühtegi resistentsusgeeni. Sarnane tulemus said Danielsen ja Wind (2003), kes soovitasid kõik laktobatsillid kanamütsiinile resistentseks lugeda. Tetratsükliini piirnormiks soovitasid nad *L. plantarum*ile 64 (µg/ml), mis on kõrgem praegusest väärtusest. Seda toetab ka, et Campedelli ja kollegid (2019) ei tuvastanud samuti *L. plantarum*'s ega teistel sama grupi bakteritel tetratsükliini resistentsuse geene.

Et kindlaks teha, kas antud bakterite antibiootikumide resistentsused on omandatud või omased ning kas neid tüvesid on ohutu kasutada probiootikumidena, peaks järgmine samm olema kogu nende genoomi järjestamine. See on nõutud samm ka EFSA juhistes (European Food Safety Authority, 2012). Sekveneerimisega saaks teada, millised resistentsust tagavad geenid bakteritel on ning kus need asuvad (genoomis, plasmiidis või transposoonides), kui need üldse esinevad. Kui

geene ei leidu, on suur võimalus, et mikroobid on iseloomulikult resistentsed ning ka ohutud kasutada probiootikumidena ja toiduainetööstuses.

Tabel 6 *Lactobacillus brevis* ja *Lactobacillus paracasei* tüvede minimaalsete inhibeerivate kontsentratsioonide (MIC) väärtused 9 antibiootikumi kohta. Piirväärtused on EFSA määrtuste põhjal (European Food Safety Authority, 2012).

Antibiootikum (µg/ml)	<i>Lactobacillus brevis</i>	Piirväärtus	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Piirväärtus
Ampitsilliin	0,5	2	0,25	4
Vankomütsiin	>256	Testimine pole nõutud	>256	Testimine pole nõutud
Gentamütsiin	1-4	16	4-8	32
Kanamütsiin	8-16	32	128	64
Streptomütsiin	4-8	64	16	16
Erütromütsiin	0,03-0,06	1	0,125	1
Klindamütsiin	>0,03	1	0,06-0,125	1
Tetratsükliin	8-16	8	1	8
Klooramfenikool	2-4	4	4	4

3.4. Madala pH ja sapisoolade taluvus

Oraalselt manustatavate probiootiliste bakterite puhul, kes on määratud elama peen- või jämesooles, on oluline, et nad elaksid üle inimese seedetraktis olevad takistused nagu madal pH maos ning kaksteistsõrmiksoolde erituv sapp. Inimese mao pH kõigub vahemikus 1-5 ühikut, olles kõrgem peale söömist ning madalam pikemate söömispauside ajal (Cook et al., 2012). Inimese sapi ühed peamised koostisosad on sapphapped, mis sünteesitakse maksas kolesteroolist ning konjugeeritakse tauriini või glütsiininga (Di Ciaula et al., 2017). Konjugeeritud sapphappeid nimetatakse ka sapisooladeks. Sapisoolade sisaldus seedetraktis on inimesti üpris varieeruv, ent on peale söömist keskmiselt 4 mg/ml ehk 0,4% (Van Deest et al., 1968). Sapphappedel on oluline roll aidata lagundada ja imenduda toidus olevatel rasvadel ning rasvlahustuvatel vitamiinidel. Seetõttu on ka peale rasvasemat sööki sapisoolade hulk soolestikus kõrgem. Sapisoolade kontsentratsioon on kõrge kogu peensooles, kuid suurem osa imendub vereringesse niudesoole lõpuosas. Jämesooles on sapisoolade kontsentratsioon madal (Di Ciaula et al., 2017).

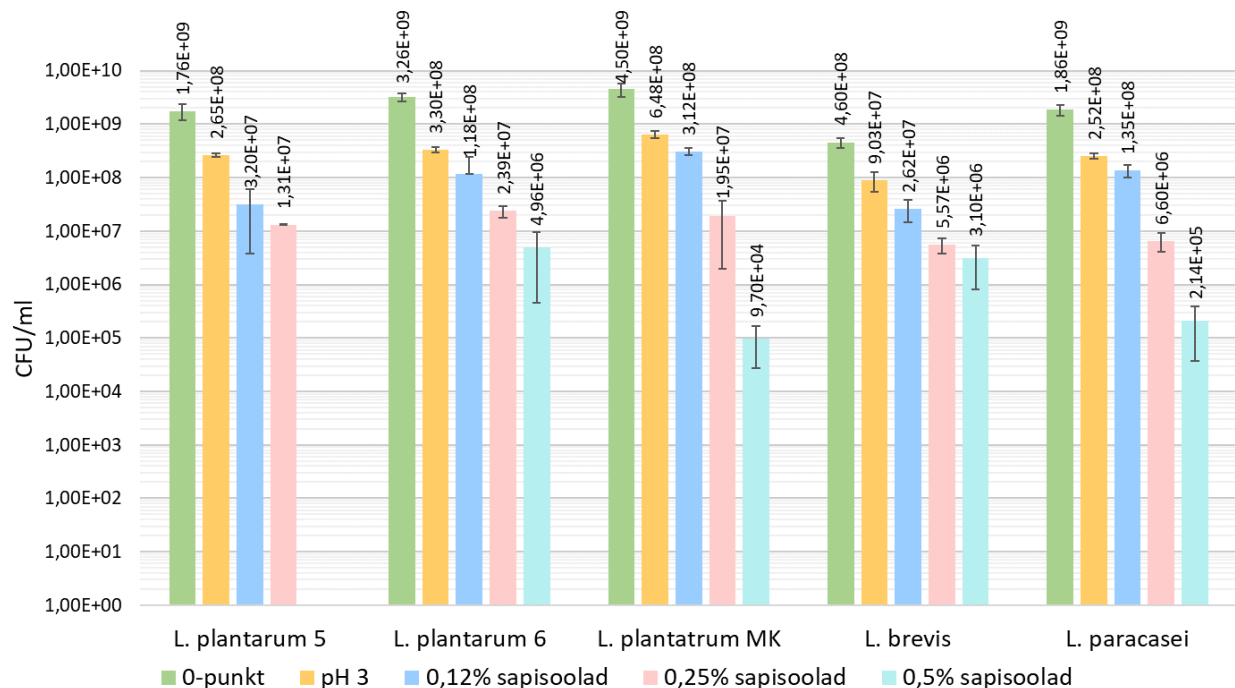
Selleks et teada saada, kas uuritavad tüved suudavad elada üle teekonna läbi happelise mao ja sapisoolade ning seega sobida probiootikumideks, inkubeeriti neid tund aega pH 3 happesusega söötmes ning seejärel tund aega sapisooli sisaldavas söötmes, et simuleerida bakterite liikumist seedetraktis (joonis 4). Sapisooli oli kolmes erinevas kontsentratsioonis: 0,12%, 0,25% ja 0,5%. Joonisel 9 on väljatoodud ellu jäänud bakterite CFU/ml erinevate tüvede kohta erinevatel tingimustel. Nagu näha, elavad kõik kasutatud tüved pH 3 keskkonna üle, mis ei ole ka üllatav, kuna tegu on piimhappebakteritega, kes oma elutegevusega ka ise hapestavad keskkonda ning seetõttu on neil meetmed madala pH-ga hakkamasaamiseks. Madalamaid kontsentratsioone sapisooli (0,12% ja 0,25%) taluvad kõik tüved. 0,12% sapisoolade juures inkubeerides on *L. plantarum* tüvede 6 ja MK ning *L. paracasei* tüve elumus ligikaudu 10^8 CFU/ml ning *L. plantarum* 5 ja *L. brevis* ligi 10 korda väiksem. 0,25% sapisoolade sisaldusega on *L. plantarum* 5 CFU/ml üpris sama mis 0,12% juures. *L. plantarum* 6 ja MK puhul on see ligikaudu 10^7 CFU/ml, mis on 10x vähem kui 0,12% sapisoolade juures. *L. brevis* jääb ellu 0,25% sapisooladega keskkonnas $5,6 \times 10^6$ CFU/ml ning *L. paracasei* peaaegu sama palju.

Kõrgeim testitud sapisoolade kontsentratsioon, 0,5%, mõjus bakteritele kõige letaalsemalt. Kõigi kolme *L. plantarum* tüve puhul olid tulemused erinevad. Nimelt ei kasvanud väljakülvi tassidel üles ühtegi tüve 5 kolooniat, seega mõjub suurem sapisoolade hulk sellele bakteritüvele hävitavalt. Tüvi MK elumus oli neist kolmest keskmise (5×10^4 CFU/ml) ning tüvi 6 kannatab kõigist testitud bakteritüvedest sapisooli kõige paremini. Tema arvukus pärast katset oli 5×10^6 CFU/ml. *L. brevis* näib samuti hästi sapisoolade stressiga hakkama saavat, jäädes ainult natukene *L. plantarum* 6 alla ($3,1 \times 10^6$ CFU/ml). *L. paracasei* tüve baktereid jääb peale 0,5% sapisoolade töötlust ellu $2,2 \times 10^5$ CFU/ml, mis on keskmine tulemus, olles kõrgem kui tüvi MK ning jäädes alla tüvedele 6 ja *L. brevis*. Üldiselt võib järeldada, et kõik kasutatud tüvedest taluvad madalat pH-d edukalt ning enamus ka sapisooli. Siiski tuleb arvesse võtta, et antud katse ei ole päris võrdväärne inimese soolestikus toimuvaga, kus toit ja bakterid võivad olla nii maos kui peensooles rohkem kui 1 tund ning peavad seetõttu kannatama madalat pH-d ja sapisoolasid pikemat aega. Samuti võib bakterite elumust mõjutada suhkrurikas toidumaatriks, mis on nendega koos seedekulglas, ent mis antud katses puudus. Raku sisekeskkonna hapestumise vältimiseks pumpavad laktobatsillid prootoneid välja F-ATPaas pumbaga. Happelises keskkonnas toodavad bakterid ka neid pumpasid juurde. Kui keskkonnas on suhkrut, millest toota ATP-d ja millega omakorda hoida

pumbad töös, siis on probiootikumide ellujäämus madala pH juures parem (Corcoran et al., 2005). Seega võiks koos FOS-ide ja inuliinirikka maapirniga olla mao pH talumine edukam. On ka teada, et peale söömist on mao pH kõrgem. Seega võiks arvata, et baktereid jõuab maapirnikrõpse süües piisav kogus ka peen- ja jämesoolde. Selle kindlakstegemiseks oleks vaja teha edasisi uuringuid inimeste peal.

3.5. Probiootilised omadused

Kõikide kasutatud tüvedel hinnati kolme omadust, mis võivad probiootikumina kasutades olla kasulikud. Need olid β -galatosidaasne aktiivsus, proteaasne aktiivsus ning eksopolüsahhriidide tootmine. Kaks esimest on ensümaatilised omadused, mis võiksid panustada inimese

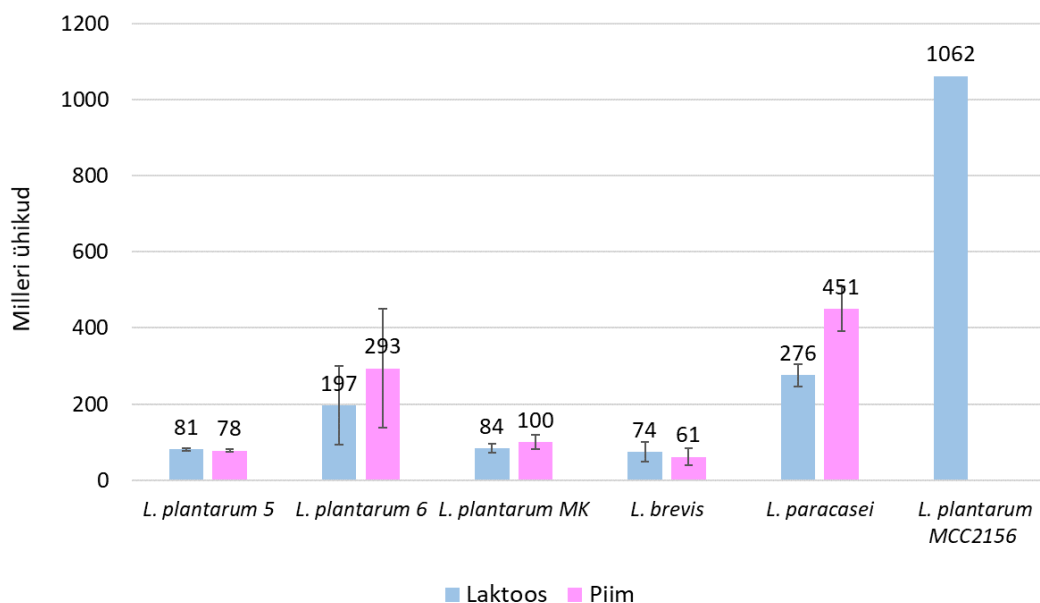


Joonis 9 Madala pH ja sapisoolade taluvus viiel uuritud *Lactobacillus* tüvel. Üleöö kultuure kasvatati 1 tund pH 3 vedelsöötmes (60rpm, 37°C) ning seejärel 1 tund erinevate sapisoolade kontsentratsioonidega vedelsöötmetes (60rpm, 37°C). Peale igat kasvatust tehti väljakülvid agarsöötmetele ning arvutati CFU/ml. Tulemused on esitatud logaritmilisel skaalal.

ensümaatilisse võimekusse. β -galatosidaas on ensüüm, mis lõhustab laktoosis olevat glükosiidsidet ning see oleks abiks inimestele, kellel esineb laktoosi talumatus. Proteaas võiks aidata lagundada toidus esinevaid valke, mida inimene lagundada ei suuda ning täiendada proteaassetet aktiivsust. Lisaks tasuks tulevikus uurida teisi potentsiaalseid probiootilisi omadusi nagu näiteks bakteriotsiinide ja GABA tootmine ning patogeenide kolonisatsiooni takistamine.

3.5.1. β -galaktosidaasne aktiivsus

β -galaktosidaasi aktiivsust uuriti 24 tundi 0,2% laktoosi või 4% piima sisaldavas söötmes kasvanud rakkude peal Milleri testiga, kus substraadiks oli ONPG (4 mg/ml). Katses hinnati ensüümi aktiivsust kollase värvi tekkimise kiirusega ja tulemused avaldati Milleri ühikutes (MÜ). Joonisel 10 on esitatud kõigi viie tüve β -galaktosidaasi aktiivsus. Võrdluseks on toodud kirjandusest pärit β -galaktosidaasi aktiivsuse hinnang turul olevale *L. plantarum* MCC2156 probiootikumile (Gobinath & Prapulla, 2015). Seejuures tuleb arvestada ka käesoleva töö ja võrdluses oleva töö veidi erinevaid meetodeid. Nimelt on *L. plantarum* MCC2156 β -galaktosidaasi aktiivsus mõõdetud 2% laktoosi juures kasvanud rakkudel.



Joonis 10 Viie uuritud *Lactobacillus* tüve β -galaktosidaasi aktiivsus Milleri ühikutes. Ensüümi aktiivsust mõõdeti 0,2% laktoosi sisaldavas söötmes (sinine) ja 4% piima sisaldavas söötmes (roosa) kasvanud bakteritest. Võrdluseks on kommersiaalne *L. plantarum* MCC2156 tüvi, mille ensüümi aktiivsus on mõõdetud 2% laktoosi sisaldavas söötmes (Gobinath ja Prapulla, 2015)

Käesolevas töös uuritud tüvedest oli kõige aktiivsem β -galaktosidaas *L. paracasei*’l. Laktoosi sisaldavas söötmes kasvades oli selle aktiivsus 276 MÜ ja piimaga 451 MÜ. *L. plantarum* 6 β -galaktosidaasi aktiivsus oli laktoosiga keskmiselt 293 MÜ ja piimaga 197 MÜ. Teistel kolmel tüvel oli aktiivsus üpris madal olles ≤ 100 MÜ. Seega võib öelda, et uuritavatest tüvedest kaks võivad teatud määral olla abiks inimesele laktoosi seedimisel, kuid ei ole kindlasti parimad β -galaktosidaasi tootjad. Samas ei ole kõrge β -galaktosidaasi aktiivsus probiootikumidele

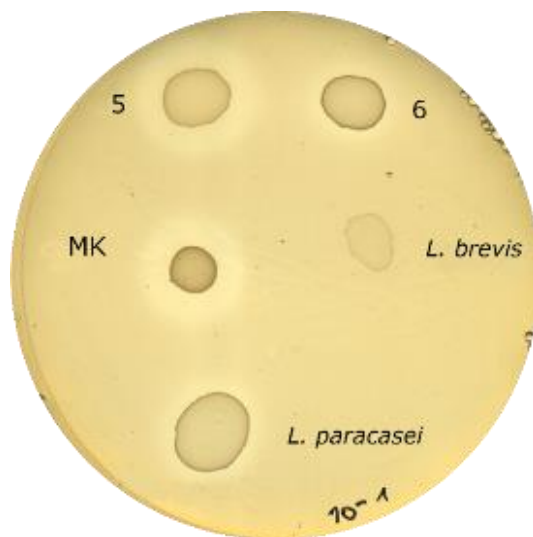
eelduseks. Johnson *et al.*, (2015) uurisid 10 turul müüdava probiootikumi β -galaktosidaasi aktiivsust ning leidsid, et see varieerub tooteti väga palju. Kõige kõrgem leitud aktiivsus laktoosiga indutseerides oli 1120 MÜ, kuid mõnel tüvel ensüümi aktiivsus pea puudus. Järelikult on ka praegu turul tooteid, mis ei aita laktoosi lagundada.

3.5.2. Proteaasne aktiivsus

Proteaasset aktiivsust testiti LB agaril, mis sisaldas 3% piima. Tüvesid hinnati tassil tekkiva halo järgi, kas neil on proteaasne aktiivsus või mitte (joonis 11). Selgus, et kõigil kolmel *L. plantarum* tüvel ja *L. paracasei*’l on proteaasne aktiivsus olemas, ent *L. brevis*’l näib see üldse puuduvat. Seega võib eriti *L. plantarum* tüvede kasutamine sünbiootilises tootes aidata tarbijal ka muudest toitudest pärinevate valkude seedimisega. Näiteks on leitud, et *Lactobacillus* tüved, nende seas mitmed *L. paracasei* tüved, võivad aidata lagundada peensooles gluteeni ning seeläbi vähendada gluteenitalumatutel ebameeldivaid sümptomeid (Francavilla *et al.*, 2017). Ka Caminero *et al.*, (2016) näitasid, et inimese peensoolest pärit laktobatsillid muudavad immuunogeensed gluteenipeptiidid ohututeks.

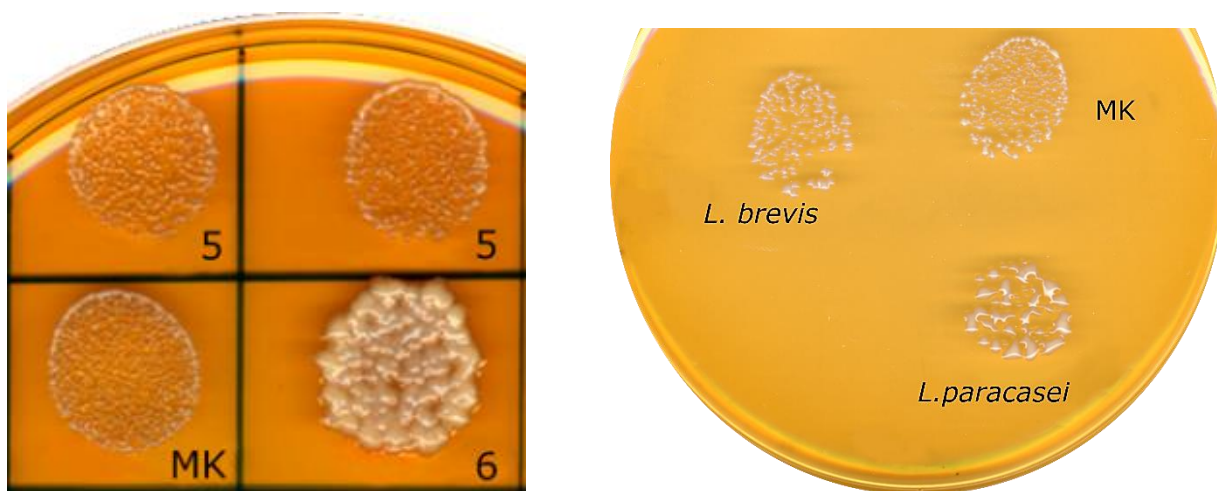
3.5.3. Eksopolüsahhariidid

Probiootilised bakterid peavad jääma ellu mao madala pH ning teiste seedenõrede juures. Nende paremat ellujäämist võib toetada baktereid ümbritsev eksopolüsahhariidide kiht (Castro-Bravo *et al.*, 2018).



Joonis 11 Proteaasne aktiivsus (halo ümber bakterikülvi) viiel uuritud tüvel. Tüvesid kasvatati LB agarsöötmel, mis sisaldas 3% piima, inkubeeriti 48h temperatuuril 30°C. 5 – *L. plantarum* 5; 6 – *L. plantarum* 6; MK – *L. plantarum* MK;

Käesolevas töös kasvatati rakke MRS agarsöötmel 48 tundi ning seejärel hinnati tüvede eksopolüsahhariidide tootmist silma järgi. Nagu näha joonisel 12, toodavad kõik uuritud laktobatsillid eksopolüsahhariide. Tüved *L. plantarum* 5 ja MK ning *L. brevis* ümbritseb üsna sarnase hulga polüsahhariidide kiht. *L. paracasei* toodab eelpoolmainitustest veidi rohkem EPS-e ning *L. plantarum* 6 EPS tootlikkus on silmnähtavalt oluliselt suurem. Tüve 6 suur EPS kiht on ilmselt ka põhjus, miks ta suutis kõige paremini taluda kõrges kontsentratsioonis sapisooli (joonis 9). Samas ei näi EPS kaitsvat *L. paracasei*'t sapi eest. Tema elumus on madalam kui tüvel 6 ning sarnane tüvele MK. Samuti on *L. brevis*'e elumus 0,5% sapisoolade juures parem, kuigi tema EPS kiht on väiksem kui *L. paracasei*'l. Samuti ei näi suurem EPS kiht pakkuvat paremat vastupidavust antibiootikumide vastu – tüvi 6 ei ole resistentsem kui teised tüved (tabelid 6 ja 5).



Joonis 12 Kasutatud tüvede ekso-polüsahhariidide tootmine. Tüvesid kasvatati MRS agarsöötmel 48 tundi temperatuuril 30°C. 5 – *L. plantarum* 5; 6 – *L. plantarum* 6; MK – *L. plantarum* MK

Seega ei saa ainult EPS kihi olemasolust ja paksusest järeldada tüve paremat vastupidavust stressoritele. EPS ehitused ja omadused on väga tüvespetsiifilised (Lee et al., 2016). Seetõttu peaks tegema täiendavaid katseid EPS rolli kohta antud tüvede elumuse toetamisel. Kindlasti peaks uurima ka, kas rohkem EPS tootvad tüved (nt *L. plantarum* 6 ja *L. paracasei*) jäävad seedetrakti paremini püsima võiv takistavad polüsahhariidid nende kinnitumist.

KOKKUVÕTE

Tänapäeva Lääne ühiskondades tarbitav toit on üldiselt kiudainete vaene, mis võib põhjustada erinevaid terviseprobleeme. Samuti on sellise toitumise tulemusena sageli inimeste soolestiku mikrobiom vaesunud. Teisest küljest on inimesed üha terviseteadlikumad ning teadvustatakse ka mikrobiomi olulisust ja probiootikumide kasulikkust. Seetõttu on tõusmas nõudlus erinevate tervislike funktsionaalsete toitude järele.

Käesolevas töö eesmärk oli arendada välja uus tervislik sümbiootiline toode, mis põhineb inuliini ja fruktooligosahhariidide (FOS), tõestatud prebiootikumide rikkal maapirnil. Töö põhitulemused on järgmised:

1. 13-st varem hapendatud juurviljadelt isoleeritud bakteritüvest valiti välja 5 maapirnivilude kääritamiseks sobivat *Lactobacillus* perekonna tüve: kolm *L. plantarum* tüve ning üks *L. brevis* ja üks *L. paracasei* tüvi.
2. Parim meetod maapirnivilude kääritamiseks väljavalitud 5 tüvega leiti olevat 2,5% soolvees aereerimata inkubeerimine temperatuuril 30°C 48 tundi. Selle meetodiga tõuseb kasutatavate *Lactobacillus* tüvede arvukus piisavalt kõrgeks, ent kõrvaliste bakterite arvukus mitte. Uuritavad tüved kasutavad edukalt ka maapirnis olevaid fruktooligosahhariide ja/või inuliini ning sobivad seega antud sümbiootilise toote valmistamiseks.
3. Hapendamiseks kasutatavad 5 *Lactobacillus* tüve jäävad piisavas koguses ellu peale fermenteeritud maapirnivilude külmuivatamist. Samuti taluvad tüved madalat pH-d ning suuremas osas ka sapisooli.
4. Uuritavatel tüvedel esineb potentsiaalseid probiootilisi omadusi nagu eksopolüsahhariidide tootmine, proteaasne ning β -galaktosidaasne aktiivsus.

Kokkuvõttes võib öelda, et viie probiootilise *Lactobacillus* perekonna bakteritüvega fermenteeritud inuliini ja FOS-de rikkad maapirnikrõpsud võiksid osutada efektiivsemaks kui ainult pro- või prebiootikumide kasutamine. Mitme erineva bakteritüve kasutamine tootes võimaldab täiustada toote probiootilisi omadusi ning loodusliku prebiootikumi (inuliin ja FOS) sisaldus maapirnis võiks kasulikult mõjuda nii kasutatud bakteritüvedele kui ka kogu soolestiku mikrobiomi mitmekesisusele.

RESUME

Development of a new synbiotic product

Emma Johanna Sova

The diets and lifestyles in Westernized countries are very different of those in less developed countries. Western diet is rich in dairy, simple sugars, protein and saturated fats and low in fruits and vegetables, hence also low in dietary fibre. Dietary fibre, especially certain types of it called prebiotics, are important to nourish and keep the balance of the human gut microbiome. Our gastrointestinal tract microbiome helps in metabolizing several compounds of our food and provides numerous health benefits. As consumers are getting more health conscious there is more demand for healthy, functional foods. Also, more and more people acknowledge the importance of the microbiome, especially the gut microbiome.

The aim of this thesis was to develop a new synbiotic product. The product is made by cutting topinambur into slices, fermented them with probiotic lactobacilli and then freeze-drying them, the end product being synbiotic chips. Topinambur is naturally very high in inulin and fructo-oligosaccharides which are both well researched prebiotics. The probiotic bacteria were found by identifying 13 bacterial strains, isolated from vegetables. From these 13 strains, 5 lactobacilli were used in following experiments, latter being 3 strains of *L. plantarum* and one strain of both *L. brevis* and *L. paracasei*. The best method for fermenting topinambur slices with these bacteria was found: it needed to have reproducible results, with minimal growth of unwanted bacteria and being as cost efficient as possible. The best method found was fermenting at 30°C for 48 hours without shaking, with 2,5% of NaCl.

The five bacterial strains were also tested for antibiotic susceptibility to 9 different antibiotics. The five strains used were susceptible to most antibiotics, except for tetracycline to which 4 strains were resistant and kanamycin, to which *L. paracasei* showed resistance. It is also important to verify that probiotic strains can indeed survive passing through the gastrointestinal tract. For this, survivability of the five strains was tested in acidic conditions (pH 3) and different concentrations of bile salts. None of the strains were affected by low pH levels, while all of them also tolerated low concentrations of bile salts and four strains tolerating the highest tested concentrations. The exo-polysaccharide layer produced by the bacteria might help in protecting them from the low

pH levels and bile salts. This is supported by the fact that *L. plantarum* strain 6 had the thickest layer of exo-polysaccharides and survived in the highest of numbers. All bacteria survived freeze-drying of the fermented topinambur in adequate numbers and for coculture of all of the 5 strains the survival was $9,6 \times 10^8$ CFU/ml. All of the strains were tested for the ability to produce β -galactosidase, an enzyme that hydrolyses lactose. No strain showed an exceptionally high β -galactosidase activity, while *L. paracasei* showed to have the highest of the five strains. For a synbiotic product it is also important that the prebiotic compound supports the growth and survival of the probiotic compound e.g bacteria. The TLC and HPLC assays showed that all strains could ferment the FOS and/or inulin present in topinambur. This supports that the studied strains and topinambur work well together as a synbiotic.

From this data it can be concluded that the inulin rich topinambur and used *Lactobacillus* strains make a good synbiotic product. The product, being fermented topinambur chips, may also be more beneficial than just using probiotics or prebiotics alone. Also, it might be beneficial to use several probiotic strains in one product as they may complement each other. Prebiotics in the product can be beneficial to the probiotic bacteria used in this study as well as the general diversity of the gut microbiota.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Viia Kõivu ja Elin Orgi, kes andsid mulle võimaluse nõnda põnevas ja kasulikus projektis kaasa lüüa. Samuti tänan Triinu Visnapuud ning Kaarel ja Signe Adambergi, kes kõik aitasid oma nõu ja jõuga selle töö valmimisele kaasa.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ahern, P. P., & Maloy, K. J. (2020). Understanding immune–microbiota interactions in the intestine. *Immunology*, 159(1), 4–14.
- Ahmed, W., & Rashid, S. (2019). Functional and therapeutic potential of inulin: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(1), 1–13.
- Aidy, S. E., van den Bogert, B., & Kleerebezem, M. (2015). The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 14–20.
- Alfaleh, K., & Anabrees, J. (2014). Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2014(4).
- Allen, J. M., Mailing, L. J., Niemiro, G. M., Moore, R., Cook, M. D., White, B. A., Holscher, H. D., & Woods, J. A. (2018). Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 50(4), 747–757.
- Auteri, M., Zizzo, M. G., & Serio, R. (2015). GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: From motility to inflammation. *Pharmacological Research*, 93, 11–21.
- Azad, M. B., Bridgman, S. L., Becker, A. B., & Kozyrskyj, A. L. (2014). Pediatric original article infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *International Journal of Obesity*, 38(10), 1290–1298.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., ... Jun, W. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host and Microbe*, 17(5), 690–703.
- Balzaretti, S., Taverniti, V., Guglielmetti, S., Fiore, W., Minuzzo, M., Ngo, H. N., Ngere, J. B., Sadiq, S., Humphreys, P. N., & Laws, A. P. (2017). A Novel Rhamnose-Rich Hetero-exopolysaccharide Isolated from *Lactobacillus paracasei* DG Activates THP-1 Human Monocytic Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3), e02702-16.
- Barbaresko, J., Koch, M., Schulze, M. B., & Nöthlings, U. (2013). Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation : a systematic literature review. *Nutrition Reviews*, 71(8), 511–527.
- Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 411–417.
- Başturk, A., Artan, R., & Yilmaz, A. (2016). Efficacy of synbiotic, probiotic, and prebiotic treatments for irritable bowel syndrome in children: A randomized controlled trial. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 27(5), 439–443.
- Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 356–368.
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J. P., Lacroix, M., Van Calsteren, M. R., Millette, M., Savard, R., & Lamontagne, L. (2010). Intermediate chains of exopolysaccharides from

- Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 666–675.
- Blekhman, R., Goodrich, J. K., Huang, K., Sun, Q., Bukowski, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Keinan, A., Ley, R. E., Gevers, D., & Clark, A. G. (2015). Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology*, 16(1), 1–12.
- Boger, M. C. L., van Bueren, A. L., & Dijkhuizen, L. (2018). Cross-Feeding among Probiotic Bacterial Strains on Prebiotic Inulin Involves the Extracellular exo-Inulinase of *Lactobacillus paracasei* Strain W20. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(21), 1–16.
- Boonstra, E., de Kleijn, R., Colzato, L. S., Alkemade, A., Forstmann, B. U., & Nieuwenhuis, S. (2015). Neurotransmitters as food supplements: The effects of GABA on brain and behavior. *Frontiers in Psychology*, 6(OCT), 6–11.
- Bourriaud, C., Robins, R. J., Martin, L., Kozlowski, F., Tenailleau, E., Cherbut, C., & Michel, C. (2005). *Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident*. 201–212.
- Boursi, B., Mamtani, R., Haynes, K., & Yang, Y.-X. (2015). The effect of past antibiotic exposure on diabetes risk. *European Journal of Endocrinology*, 172(6), 639–648.
- Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J. J., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 303–318.
- Buntin, N., Hongpattarakere, T., Ritari, J., Douillard, F. P., Paulin, L., Boeren, S., Shetty, S. A., & de Vos, W. M. (2017). An inducible operon is involved in inulin utilization in *Lactobacillus plantarum* strains, as revealed by comparative proteogenomics and metabolic profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(2), 1–13.
- Caminero, A., Galipeau, H. J., McCarville, J. L., Johnston, C. W., Bernier, S. P., Russell, A. K., Jury, J., Herran, A. R., Casqueiro, J., Tye-Din, J. A., Surette, M. G., Magarvey, N. A., Schuppan, D., & Verdu, E. F. (2016). Duodenal Bacteria From Patients With Celiac Disease and Healthy Subjects Distinctly Affect Gluten Breakdown and Immunogenicity. *Gastroenterology*, 151(4), 670–683.
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill, C., & O'Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1), 1–21.
- Castro-Bravo, N., Wells, J. M., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. (2018). Interactions of surface exopolysaccharides from bifidobacterium and lactobacillus within the intestinal environment. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–15.
- Chander, A. M., Yadav, H., Jain, S., Bhadada, S. K., & Dhawan, D. K. (2018). *Cross-Talk Between Gluten , Intestinal Microbiota and Intestinal Mucosa in Celiac Disease: Recent Advances and Basis of Autoimmunity*. 9, 1–16.
- Chen, Y. C., Wu, Y. J., & Hu, C. Y. (2019). Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 575–582.

- Chiang, S. S., & Pan, T. M. (2012). Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 903–916.
- Cockburn, D. W., & Koropatkin, N. M. (2016). Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease. *Journal of Molecular Biology*, 428(16), 3230–3252.
- Codex Alimentarius Committee. (2017). *Codex alimentarius: Guidelines on nutrition labelling CAC/GL 2-1985*. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 56–67.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005). Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3060–3067.
- Crovesy, L., Masterson, D., & Rosado, E. L. (2020). Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *European Journal of Clinical Nutrition*.
- Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S., & Qu, X. (2020). *Production of Gamma-Aminobutyric Acid from Lactic Acid Bacteria : A Systematic Review*. 1–21.
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P. E., & Macfarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221–1227.
- Danielsen, M., & Wind, A. (2003). *Susceptibility of Lactobacillus spp . to antimicrobial agents*. 82, 1–11.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563.
- De Palma, G., Collins, S. M., Bercik, P., & Verdu, E. F. (2014). The microbiota-gut-brain axis in gastrointestinal disorders: Stressed bugs, stressed brain or both? *Journal of Physiology*, 592(14), 2989–2997.
- Deepak, V., Ramachandran, S., Balahmar, R. M., Pandian, S. R. K., Sivasubramaniam, S. D., Nellaiah, H., & Sundar, K. (2016). In vitro evaluation of anticancer properties of exopolysaccharides from *Lactobacillus acidophilus* in colon cancer cell lines. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 52(2), 163–173.
- Di Cerbo, A., Palmieri, B., Aponte, M., Morales-Medina, J. C., & Iannitti, T. (2016). Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *Journal of Clinical Pathology*, 69(3), 187–203.
- Di Ciaula, A., Garruti, G., Baccetto, R. L., Molina-Molina, E., Bonfrate, L., Wang, D. Q. H., & Portincasa, P. (2017). Bile acid physiology. *Annals of Hepatology*, 16, s4–s14.
- Dixit, Y., Wagle, A., & Vakil, B. (2016). Patents in the Field of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics: A

Review. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene*, 01(02), 1–13.

- Doare, K. Le, Holder, B., Bassett, A., & Pannaraj, P. S. (2018). Mother's Milk: A purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB).
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). *Bacteriocin Production : a Probiotic Trait ?* 1–6.
- Dominianni, C., Sinha, R., Goedert, J. J., Pei, Z., Yang, L., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2015). Sex, body mass index, and dietary fiber intake influence the human gut microbiome. *PLoS ONE*, 10(4), 1–14.
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 1, pp. 20–32). Nature Publishing Group.
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A. L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mähliköiv, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermöhlen, O., Chun, E., Garrett, W. S., McCoy, K. D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I., & Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, 18(7), 965–977.
- European Food Safety Authority. (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal*, 8(3), 1462.
- European Food Safety Authority. (2012). *Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance 2*. 10(6), 1–10.
- Fang, F., Xu, J., Li, Q., Xia, X., & Du, G. (2018). Characterization of a *Lactobacillus brevis* strain with potential oral probiotic properties. *BMC Microbiology*, 18(1), 221.
- Fassio, F., Facioni, M. S., & Guagnini, F. (2018). Lactose maldigestion, malabsorption, and intolerance: a comprehensive review with a focus on current management and future perspectives. *Nutrients*, 10(11), 1–12.
- Ferrario, C., Taverniti, V., Milani, C., Fiore, W., Laureati, M., De Noni, I., Stuknyte, M., Chouaia, B., Riso, P., & Guglielmetti, S. (2014). Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *The Journal of Nutrition*, 144(11), 1787–1796.
- Filippo, C. De, Cavalieri, D., Di, M., Ramazzotti, M., & Baptiste, J. (2010). *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. 107(33), 14691–14696.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(SUPPL. 2).
- Francavilla, R., De Angelis, M., Rizzello, C. G., Cavallo, N., Dal Bello, F., & Gobbetti, M. (2017). Selected probiotic lactobacilli have the capacity to hydrolyze gluten peptides during simulated gastrointestinal digestion. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14), 1–12.
- Fujimori, S., Gudis, K., Mitsui, K., Seo, T., Yonezawa, M., Tanaka, S., Tatsuguchi, A., & Sakamoto,

- C. (2009). A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis. *Nutrition*, 25(5), 520–525.
- Fuochi, V., Petronio, G. P., Lissandrello, E., & Furneri, P. M. (2015). Evaluation of resistance to low pH and bile salts of human *Lactobacillus* spp. isolates. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 28(3), 426–433.
- Gagliardi, A., Totino, V., Cacciotti, F., Iebba, V., Neroni, B., Bonfiglio, G., Trancassini, M., Passariello, C., Pantanella, F., & Schippa, S. (2018). Rebuilding the gut microbiota ecosystem. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(8).
- Gagnière, J., Raisch, J., Veziant, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., Bringer, M. A., Pezet, D., & Bonnet, M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(2), 501–518.
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., Blumberg, R. S., & Medical, H. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285), 539–544.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491–502.
- Gobinath, D., & Prapulla, S. G. (2015). Transgalactosylating β -galactosidase from probiotic *Lactobacillus plantarum* MCC2156: production and permeabilization for use as whole cell biocatalyst. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 6003–6009.
- Goh, Y. J., & Klaenhammer, T. R. (2015). Genetic Mechanisms of Prebiotic Oligosaccharide Metabolism in Probiotic Microbes. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 137–156.
- Greenhalgh, K., Meyer, K. M., Aagaard, K. M., & Wilmes, P. (2016). The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environmental Microbiology*, 18(7), 2103–2116.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4(JUL), 1–6.
- Hadjivasilis, A., Tsioutis, C., Michalinos, A., & Ntourakis, D. (2019). New insights into irritable bowel syndrome: from pathophysiology to treatment. *Annals of Gastroenterology*, 32(6), 554–564.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2015). *Lactobacillus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Vol. 55).
- Heeney, D. D., Gareau, M. G., & Marco, M. L. (2018). Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 140–147.
- Hempel, S., Newberry, S. J., Maher, A. R., Wang, Z., Miles, J. N. V., Shanman, R., Johnsen, B., & Shekelle, P. G. (2012). Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated

- Diarrhea: A Systematic Review and Meta-analysis. *Jama*, 307(18), 1959–1969.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514.
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The Lactobacillus casei group: History and health related applications. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 1–12.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214.
- Ianiro, G., Tilg, H., & Gasbarrini, A. (2016). Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: Between good and evil. *Gut*, 65(11), 1906–1915.
- Ibrahim, M., & Anishetty, S. (2012). A meta-metabolome network of carbohydrate metabolism: Interactions between gut microbiota and host. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 428(2), 278–284.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8836–8847.
- Johnson, D. N., Aljaloud, S. O., Rabin, G., & A, I. S. (2015). Determining B-Galactosidase Activity of Commercially Available Probiotic Supplements. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 05(04), 4–6.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., & Wimmer, H. (1990). *Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents I. Volume 1a Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods*. Wiley–VCH Verlag GmbH.
- Kariyawasam, M. M., Yang, S. J., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2020). Probiotic Properties of Lactobacillus brevis KU200019 and Synergistic Activity with Fructooligosaccharides in Antagonistic Activity against Foodborne Pathogens. *Food Science of Animal Resources*, 40(2), 297–310.
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., & Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474(7351), 327–336.
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 927–939.
- Kim, S., Covington, A., & Pamer, E. G. (2017). The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological Reviews*, 279(1), 90–105.
- Klare, I., Konstabel, C., Mu, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H., & Witte, W. (2005). *Evaluation of New Broth Media for Microdilution Antibiotic Susceptibility Testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci, and Bifidobacteria*. 71(12), 8982–8986.
- Kocsis, L., Liebhard, P., & Praznik, W. (2007). Effect of seasonal changes on content and profile of

- soluble carbohydrates in tubers of different varieties of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9401–9408.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332–1345.
- Kõiv, V., Arbo, K., Maiväli, Ü., Kisand, V., Roosaare, M., Remm, M., & Tenson, T. (2019). Endophytic bacterial communities in peels and pulp of five root vegetables. *PLoS ONE*, 14(1), 1–17.
- Kolida, S., & Gibson, G. R. (2011). Synbiotics in Health and Disease. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2(1), 373–393.
- Kootte, R. S., Levin, E., Salojärvi, J., Smits, L. P., Hartstra, A. V., Udayappan, S. D., Hermes, G., Bouter, K. E., Koopen, A. M., Holst, J. J., Knop, F. K., Blaak, E. E., Zhao, J., Smidt, H., Harms, A. C., Hankemeijer, T., Bergman, J. J. G. H. M., Romijn, H. A., Schaap, F. G., ... Nieuwdorp, M. (2017). Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metabolism*, 26(4), 611–619.e6.
- Koppel, N., Rekdal, V. M., & Balskus, E. P. (2017). Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*, 356(6344), 1246–1257.
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Maradona, M. P., ... Herman, L. (2020). Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017–2019). *EFSA Journal*, 18(2).
- Krivorotova, T., & Sereikaite, J. (2014). Seasonal changes of carbohydrates composition in the tubers of Jerusalem artichoke. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(1), 79–83.
- Kronman, M. P., Zaoutis, T. E., Haynes, K., Feng, R., & Coffin, S. E. (2012). Antibiotic exposure and IBD development among children: A population-based cohort study. *Pediatrics*, 130(4).
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2008). Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728–764.
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 160–168.
- Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001). 'Ome Sweet 'Omics --A genealogical treasury of words. *The Scientist*, 15(7), 8–8.
- Lee, I. C., Caggianiello, G., van Swam, I. I., Taverne, N., Meijerink, M., Bron, P. A., Spano, G., & Kleerebezem, M. (2016). Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on Lactobacillus plantarum-host interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3959–3970.
- London, L. E., Kumar, A. H., Wall, R., Casey, P. G., O'Sullivan, O., Shanahan, F., Hill, C., Cotter, P. D., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Caplice, N. M., & Stanton, C. (2014). Exopolysaccharide-Producing Probiotic Lactobacilli Reduce Serum Cholesterol and Modify Enteric Microbiota in

- ApoE-Deficient Mice. *The Journal of Nutrition*, 144(12), 1956–1962.
- Maeda, H., Zhu, X., & Mitsuoka, T. (2004). Effects of an Exopolysaccharide (Kefiran) from *Lactobacillus kefirifaciens* on Blood Glucose in KKAY Mice and Constipation in SD Rats Induced by a Low-Fiber Diet. *Bioscience and Microflora*, 23(4), 149–153.
- Makras, L., Van Acker, G., & De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6531–6537.
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 1–3.
- Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. *BioMed Research International*, 2015.
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9).
- McBurney, M. I., Davis, C., Fraser, C. M., Schneeman, B. O., Huttenhower, C., Verbeke, K., Walter, J., & Latulippe, M. E. (2019). Establishing What Constitutes a Healthy Human Gut Microbiome: State of the Science, Regulatory Considerations, and Future Directions. *The Journal of Nutrition*.
- McKenzie, C., Tan, J., Macia, L., & Mackay, C. R. (2017). The nutrition-gut microbiome-physiology axis and allergic diseases. *Immunological Reviews*, 278(1), 277–295.
- Menni, C., Jackson, M. A., Pallister, T., Steves, C. J., Spector, T. D., & Valdes, A. M. (2017). Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. *International Journal of Obesity*, 41(7), 1099–1105.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mojzsis, S. J., Arrhenius, G., McKeegan, K. D., Harrison, T. M., Nutman, A. P., & Friend, C. R. L. (1996). Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago. *Nature*, 384(6604), 55–59.
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 667–685).
- Mozaffarian, D., Ho, A., Rimm, E. B., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2011). Changes in Diet and Lifestyle and Long-Term Weight Gain in Women and Men. *The New England Journal of Medicine*, 364(25), 2392–2404.
- Murakami, K., Livingstone, M. B. E., & Sasaki, S. (2018). Thirteen-Year Trends in Dietary Patterns among Japanese Adults in the National Health and Nutrition. *Nutrients*, 10, 994.
- Niness, K. R. (1999). Inulin and Oligofructose: What Are They? *J. Nutr*, 129(7), 1418–1423.
- Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 11(1), 1–10.
- O’Grady, J., O’Connor, E. M., & Shanahan, F. (2019). Review article: dietary fibre in the era of microbiome science. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 49(5), 506–515.

- Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C. H., Ndjango, J. B. N., Peeters, M., Hahn, B. H., & Hugenholtz, P. (2010). Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biology*, 8(11), 3–10.
- Oleksy, M., & Klewicka, E. (2018). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(3), 450–462.
- Parte, A. C. (2018). LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 1825–1829.
- Petroff, O. A. C. (2002). GABA and Glutamate in the Human Brain. *The Neuroscientist*, 8(6), 562–573.
- Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R., & Núñez, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological Reviews*, 279(1), 70–89.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Consortium, M. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65.
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 996–1047.
- Reimer, L. C., Vetschinnova, A., Carbasse, J. S., Söhngen, C., Gleim, D., Ebeling, C., & Overmann, J. (2018). BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D631–D636.
- Riccia, D. N. D., Bizzini, F., Perilli, M. G., Polimeni, A., Trinchieri, V., Amicosante, G., & Cifone, M. G. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Diseases*, 13(4), 376–385.
- Rivera-Chávez, F., Zhang, L. F., Faber, F., Lopez, C. A., Byndloss, M. X., Olsan, E. E., Xu, G., Velazquez, E. M., Lebrilla, C. B., Winter, S. E., & Bäuml, A. J. (2016). Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella. *Cell Host & Microbe*, 19(4), 443–454.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyle, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.-J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., ... Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(S2), S1–S63.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., & Matteuzzi, D. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: A comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6150–6158.
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., Costea, P. I., Godneva, A., Kalka, I. N., Bar, N., Shilo, S., Lador, D., Vila, A. V., Zmora, N., Pevsner-Fischer, M., Israeli, D., Kosower, N., Malka, G., Wolf, B. C., ... Segal, E. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, 555(7695), 210–215.

- Ruan, Y., Sun, J., He, J., Chen, F., Chen, R., & Chen, H. (2015). Effect of probiotics on glycemic control: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *PLoS ONE*, 10(7), 1–15.
- Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2016). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1440–1453.
- Schnorr, S. L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., Turrioni, S., Biagi, E., Peano, C., Severgnini, M., Fiori, J., Gotti, R., De Bellis, G., Luiselli, D., Brigidi, P., Mabulla, A., Marlowe, F., Henry, A. G., & Crittenden, A. N. (2014). Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nature Communications*, 5, 1–12.
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., & Fliss, I. (2017). Lactobacillus plantarum and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9, 111–122.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*, 14(8), e1002533.
- Shen, J., Zuo, Z. X., & Mao, A. P. (2014). Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(1), 21–35.
- Slykerman, R. F., Hood, F., Wickens, K., Thompson, J. M. D., Barthow, C., Murphy, R., Kang, J., Rowden, J., Stone, P., Crane, J., Stanley, T., Abels, P., Purdie, G., Maude, R., & Mitchell, E. A. (2017). Effect of Lactobacillus rhamnosus HN001 in Pregnancy on Postpartum Symptoms of Depression and Anxiety: A Randomised Double-blind Placebo-controlled Trial. *EBioMedicine*, 24, 159–165.
- Sonnenburg, E. D., Amits, S. A., Tikhnov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinction in the gut microbiota compounds over generations. *Nature*, 14(529), 212–215.
- Statovci, D., Aguilera, M., MacSharry, J., & Melgar, S. (2017). The impact of western diet and nutrients on the microbiota and immune response at mucosal interfaces. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8).
- Stephen, A. M., Champ, M. M. J., Cloran, S. J., Fleith, M., Van Lieshout, L., Mejbourn, H., & Burley, V. J. (2017). Dietary fibre in Europe: Current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. *Nutrition Research Reviews*, 30(2), 149–190.
- Stilling, R. M., van de Wouw, M., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochemistry International*, 99, 110–132.
- Stingle, F., Newell, J. W., & Neeser, J. R. (1999). Unraveling the function of glycosyltransferases in Streptococcus thermophilus Sfi6. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6354–6360.
- Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research*, 1693, 128–133.

- Sun, J., & Buys, N. J. (2016). Glucose- and glycaemic factor-lowering effects of probiotics on diabetes: A meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *British Journal of Nutrition*, 115(7), 1167–1177.
- Sundin, O. H., Mendoza-Ladd, A., Zeng, M., Diaz-Arévalo, D., Morales, E., Fagan, B. M., Ordoñez, J., Velez, P., Antony, N., & McCallum, R. W. (2017). The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC Microbiology*, 17(1), 1–17.
- Szewczyk, A., Zagaja, M., Bryda, J., Kosikowska, U., Stępień-Pyśniak, D., Winiarczyk, S., & Andres-Mach, M. (2019). Topinambur - New possibilities for use in a supplementation diet. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26(1), 24–28.
- Tamang, J. P., Cotter, P. D., Endo, A., Han, N. S., Kort, R., Liu, S. Q., Mayo, B., Westerik, N., & Hutkins, R. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 184–217.
- Tierney, B. T., Yang, Z., Lubber, J. M., Beaudin, M., Wibowo, M. C., Baek, C., Mehlenbacher, E., Patel, C. J., & Kostic, A. D. (2019). The Landscape of Genetic Content in the Gut and Oral Human Microbiome. *Cell Host and Microbe*, 26(2), 283-295.e8.
- Tropini, C., Earle, K. A., Huang, K. C., & Sonnenburg, J. L. (2017). The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function. *Cell Host and Microbe*, 21(4), 433–442.
- Tsujikawa, Y., Nomoto, R., & Osawa, R. (2013). Difference in Degradation Patterns on Inulin-type Fructans among Strains of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus paracasei*. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 32(4), 157–165.
- Van Deest, B. W., Fordtran, J. S., Morawski, S. G., & Wilson, J. D. (1968). Bile salt and micellar fat concentration in proximal small bowel contents of ileectomy patients. *Journal of Clinical Investigation*, 47(6), 1314–1324.
- Vandenplas, Y., Zakharova, I., & Dmitrieva, Y. (2015). Oligosaccharides in infant formula: More evidence to validate the role of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 113(9), 1339–1344.
- Vangay, P., Johnson, A. J., Ward, T. L., Al-Ghalith, G. A., Shields-Cutler, R. R., Hillmann, B. M., Lucas, S. K., Beura, L. K., Thompson, E. A., Till, L. M., Batres, R., Paw, B., Pergament, S. L., Saenyakul, P., Xiong, M., Kim, A. D., Kim, G., Masopust, D., Martens, E. C., ... Knights, D. (2018). US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome. *Cell*, 175(4), 962-972.e10.
- Vasapolli, R., Schütte, K., Schulz, C., Vital, M., Schomburg, D., Pieper, D. H., Vilchez-Vargas, R., & Malfertheiner, P. (2019). Analysis of Transcriptionally Active Bacteria Throughout the Gastrointestinal Tract of Healthy Individuals. *Gastroenterology*, 157(4), 1081-1092.e3.
- Vinderola, G., Ouwerhand, A., Salminen, S., & von Wright, A. (2019). *Lactic Acid Bacteria* (5th Editio). Boca Raton.
- Virta, L., Auvinen, A., Helenius, H., Huovinen, P., & Kolho, K. L. (2012). Association of repeated exposure to antibiotics with the development of pediatric crohn's disease - A nationwide, register-based Finnish case-control study. *American Journal of Epidemiology*, 175(8), 775–784.
- Wang, L., Guo, M.-J., Gao, Q., Yang, J.-F., Yang, L., Pang, X.-L., & Jiang, X.-J. (2018). The effects of

- probiotics on total cholesterol: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*, 97(5).
- Wennberg, M., Engqvist, G., & Nyman, M. (2002). Effects of harvest time and storage on dietary fibre components in various cultivars of white cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(12), 1405–1411.
- Wilkins, L. J., Monga, M., & Miller, A. W. (2019). Defining Dysbiosis for a Cluster of Chronic Diseases. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., & Li, H. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*, 334(October), 105–109.
- Wu, Q., & Shah, N. P. (2017). High γ -aminobutyric acid production from lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactobacillus brevis* as a functional dairy starter. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3661–3672.
- Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227.
- Yunes, R. A., Poluektova, E. U., Vasileva, E. V., Odorskaya, M. V., Marsova, M. V., Kovalev, G. I., & Danilenko, V. N. (2019). A Multi-strain Potential Probiotic Formulation of GABA-Producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with Antidepressant Effects. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., & Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54(1), 270–275.
- Zhang, R., Wang, Z., Fei, Y., Zhou, B., Zheng, S., Wang, L., Huang, L., Jiang, S., Liu, Z., Jiang, J., & Yu, Y. (2015). The Difference in Nutrient Intakes between Chinese and Mediterranean, Japanese and American Diets. *Nutrients*, 7, 4661–4688.
- Zivkovic, A. M., German, J. B., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2011). Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4653–4658.
- Zoetendal, E. G., Raes, J., Van Den Bogert, B., Arumugam, M., Booijink, C. C., Troost, F. J., Bork, P., Wels, M., De Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2012). The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME Journal*, 6(7), 1415–1426.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Chr. Hansen koduleht chr-hansen.com (vaadatud 05.04.2020)

Encyclopaedia Britannica (2018). Jerusalem artichoke

<https://www.britannica.com/plant/Jerusalem-artichoke> (vaadatud: 09.04.2020).

Martucci, L. (2018). Healthy Eating Trends in Europe. Nutfruit Magazine

<https://www.nutfruit.org/industry/publications/inc-magazine/articles/detail/healthy-eating-trends-in-europe> (vaadatud 19.05.2020)

National Center for Biotechnology Information. (2020). Inulobiose, CID=439552. PubChem Database <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Inulobiose> (vaadatud 31.05.2020)

Ritchie, H., & Roser, M. (2020). Obesity., OurWorldInData.org

<https://ourworldindata.org/obesity> (vaadatud 31.03.2020)

Taluturg Tü koduleht taluturg.ee (vaadatud: 25.05.2020)

Tere AS koduleht <https://www.tere.eu/tooted/joogijogurt/hellus-metsamarja-jogurtijook> (vaadatud 19.05.2020)

Tervise Arnegu Instituut. Kuidas tervislikult toituda

<https://toitumine.ee/kuidas-tervislikult-toituda> (vaadatud: 30.03.2020).

The World Health Organisation (2020). Obesity and overweight <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (vaadatud: 15.03.2020)

KASUTATUD PILDID:

Maapirni mugulad. Devon (2017), Fresh Jerusalem artichoke, depositphotos.com (salvestatud: 09.06.2020)

Soolestik. <http://loveyourgut.com/wp-content/uploads/digestive-system.jpg> (salvestatud: 15.05.2020)

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Emma Johanna Sova,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Uue sümbiootilise toote arendamine maapirnist

mille juhendajad on Elin Org (PhD) ja Viia Kõiv,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **20.06.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Emma Johanna Sova

11.06.2020