

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Kati Metsla

Lsc3 valguga sünteesitud fruktooligosahhariidide puhastamine pärmitöötusega

Bakalaureusetöö

Juhendajad teadur Eerik Jõgi, *MSc*
dotsent Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat



TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Prebiootikumid	6
1.1.1 Probiootikumid, prebiootikumid ja sümbiootikumid	6
1.1.2 Prebiootikumi definitsioon ja selle muutumine ajas	7
1.1.3 Prebiootikumide koostis, leidumine toidus ja üldised omadused.....	7
1.2 Inuliin ja inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidid prebiootikumidena	9
1.2.1 Inuliin, selle leidumine looduses ja toodetavad preparaadid.....	9
1.2.2 Inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidide süntees mikroobsete ensüümidega	11
1.2.3 Inuliini ja inuliini-tüüpi FOS-ide prebiootiline toime	12
1.3 Levaan ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidid prebiootikumidena	13
1.3.1 Levaani-tüüpi fruktooligosahhariidid kui uudsed prebiootikumid.....	13
1.3.2 Levaani ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidide süntees.....	14
1.3.3 Fruktooligosahhariidide puhastamine lisanditest	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1 Töö eesmärgid.....	19
2.2 Materjal ja meetodika.....	19
2.2.1 Kasutatud pärmitüvi	19
2.2.2 Söötmed ja pärmieetkasvatamine	19
2.2.3 FOS-i lahuse töötlemine pärmiga.....	20
2.2.4 Pärmieetmetaboolse aktiivsuse ja elulemuse hindamine	20
2.2.4.1 Värvimine metüüleensinisega	20
2.2.4.2 Värvimine fluorestsentsindiatsetaadiga	20
2.2.4.3 Pärmieetmetaboolse füsioloogilise seisundi hindamine fluorestsentsmikroskoobis.....	21
2.2.5 Muud analüüsimeetodid	21
2.2.5.1 Rakuspensiooni optilise tiheduse mõõtmine.....	21
2.2.5.2 Glükoosi kontsentratsiooni määramine	22
2.2.5.3 Õhukese kihi kromatograafia	22
2.2.5.4 Orgaaniliste hapete ja suhkrute kromatograafiline analüüs	22
2.3 Tulemused ja arutelu	23

2.3.1 FOS-i lahuse puhastamine pärm <i>Saccharomyces cerevisiae</i> invertaasnegatiivse mutandiga	24
2.3.2 Pärim tööt lusel moodustunud lisap roduktid.....	26
2.3.3 <i>S. cerevisiae</i> füsioloogiline seisund staatilisel ja aeroob sel tööt lusel	27
KOKKUVÖTE	30
SUMMARY	32
KIRJANDUSE LOETELU	34
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	42
LISAD	43
LISA 1	43
LISA 2	44
LIHTLITSENTS	45

KASUTATUD LÜHENDID

FDA – fluorestsiiindiatsetaat

FFI – *Functional Food Ingredients*

FOS – fruktooligosahhariid

GOS – galaktooligosahhariid

HPLC – *high-performance liquid chromatography* ehk kõrgsurve vedelikkromatograafia

LAR – lühikese ahelaga rasvhapped

Lsc3 – *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 levaansukraas

MSO – mitteseeduvad oligosahhariidid

PA – polümeerisatsiooniate

pv. – patovar; tüvede grupp, mis nakatab kindlat peremeestaime

TLC – *thin-layer chromatography* ehk õhukese kihi kromatograafia

SISSEJUHATUS

Inimese jämesooles elab tohtul hulgal (kogumass rohkem kui 1 kg) erinevaid baktereid, kes oma elutegevuse tagajärjel avaldavad mõju inimese tervisele. Soolebakterite mõju inimesele võib olla nii positiivne kui negatiivne. Selleks, et parandada peremeesorganismi üldist heaolutunnet ja tervist ning positiivses suunas muuta soole mikrofloora koosseisu ja aktiivsust, tuleks tarvitada toiduks inimese seedesüsteemis mitteseeduvaid oligo- ja polüsahhariide – toiduprebiotikume. Prebiootiliste toidulisandite bioloogilist efekti on seni peamiselt uuritud inuliinil, inuliini-tüüpi FOS-idel (fruktooligosahhariid), GOS-il (galaktooligosahhariid) ja laktuloosil, kuid tänaseks on avastatud, et toiduprebiotikume leidub teisigi. Nii on prebiootiline toime avastatud näiteks meie töörühmas uuritava bakteriaalse päritoluga polüsahhariidil levaanil, mille fruktoosijäägid on peaaheas omavahel seotud β -2,6 glükosiidsidemetega. Levaani ja levaani-tüüpi FOS-e toodetakse sahharoosist bakteriaalse eksoensüümi levaansukraasiga. Ensümaatilisel sünteesil moodustub lisaks levaanile ja FOS-idele ka palju glükoosi, väheses koguses fruktoosi ja reaktsioonis jääb kasutamata ka sahharoosi. Prebiootilise toime uuringuteks on vaja FOS-i lahusest eemaldada mono- ja disahhariidid: glükoos, fruktoos ja sahharoos.

Oma bakalaureusetöö tegin projekti “*Design and application of novel levansucrase catalysts for the production of functional food ingredients (Functional Food Ingredients, FFI)*” SLOMR12215T raames, mille eesmärk on uudsete prebiootikumide süntees levaansukraasiga ja saadud produktide rakenduste otsimine.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli töötada välja sobiv meetodika levaansukraasiga sünteesitud FOS-i segu puhastamiseks. Töös saadud tulemusi kasutati juba FFI projektis ja kasutatakse samalaadses töös ka edaspidi. Töö tehti TÜMRI Geneetika õppetoolis. Sooviksin tänada oma juhendajaid, Tiina Alamäe ja Eerik Jõgi, kes aitasid mind nii töö planeerimisel kui ka koostamisel. Lisaks sooviksin tänada teisi laborikaaslasid, Heiki Vijat Tallinna Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudist ja Katrin Tomsonit Tallinna Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskusest, kes töö valmimisele kaasa aitasid.

Märksõnad: fruktooligosahhariidid, levaan, inuliin, prebiootikumid, probiootikumid, Lsc 3 valk

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Prebiootikumid

1.1.1 Probiootikumid, prebiootikumid ja sünbiootikumid

Probiootikumid on tervete inimeste (ja loomade) soolest isoleeritud elusad mittepatogeensed bakterid (peamiselt bifidobakterid ja laktobatsillid), mille suukaudne manustamine soodustab inimese (ja looma) tervist. 'Probiootiline' tähendab 'elu jaoks' (Gibson jt., 2010). Terminis on liidetud ladinakeelne eessõna 'pro' (jaoks) ja kreeka keelne omadussõna 'βιωτικός', mis on tuletatud nimisõnast 'βίος' (elu) (Hamilton-Miller jt., 2003). Probiootilised bakterid tugevdavad organismi üldist heaolu ja immuunsüsteemi ning vähendavad haigestumise riski (Crittenden ja Playne, 1996; Rivero-Urgell ja Santamaria-Orleans, 2001). Probiootilisi baktereid sisaldavaid jooke on inimesed tarbinud rohkem kui 2000 aastat. Aastal 1907 näitas vene teadlane Metchnikoff, et teatud bakterite manustamine mõjub tervist parandavalt ja pikendab eluiga (Gibson jt., 2010). Eestis on populaarne 'Helluse' piimatoodete sari, mille valmistamisel on kasutatud probiootilist bakterit *Lactobacillus fermentum* ME3 (Mikelsaar ja Zilmer, 2009). Probiootikumid peavad vastama järgnevatele tingimustele:

- 1) manustades peavad nad parandama inimese (looma) tervist;
- 2) nad ei tohi olla patogeensed;
- 3) nad peavad sooles säilitama oma elu- ja metabolismivõime (Gibson jt., 2010).

Alternatiivne meetod stimuleerimaks kasulike soolebakterite paljunemist ja aktiivsust, on kasutada toiduprebiootikume (Gibson jt., 2010). Terminis 'prebiootikum' on liidetud ladinakeelne eessõna 'pre' (enne) ja kreeka keelne omadussõna 'βιωτικός', mis on tuletatud nimisõnast 'βίος' (elu) (Hamilton-Miller jt., 2003; www.memidex.com/prebiotic). Seega on prebiootikumid elu soodustavad ained, mille toime realiseerub läbi peremeesorganismi mikrofloora (mikrobiota). Tõestatud toimega ja juba kasutusel olevate prebiootikumide hulka kuuluvad inuliin, inuliini-tüüpi FOS-id, GOS-id ja laktuloos. Vähem uuritud, kuid suure potentsiaaliga prebiootikumid on laktosukroos, ksülooligosahhariidid, raskesti lagunev tärklis, soja oligosahhariidid, oligopektiin ja -kitiin, beeta-glükaanid (leidub seentes, kaeras ja odras) ning taimsed polüfenoolid (Gibson jt., 2010). Probiootiline toime on tõestatud ka levaani-tüüpi FOS-idel (Porrás-Domínguez jt., 2014). Prebiootikumidest on põhjalikumalt kirjutatud peatükkides 1.1.2 ja 1.1.3.

Preparaate, mis sisaldavad probiootilisi aineid koos probiootiliste mikroobidega, nimetatakse sünbiootikumideks (Mussatto ja Mancilha, 2007).

1.1.2 Prebiootikumi definitsioon ja selle muutumine ajas

Gibson ja Roberfroid defineerisid 1995. aastal prebiootikume kui mitteseeduvaid aineid, mis tänu oma füsioloogilistele omadustele stimuleerivad tervisele kasulike bakterite kasvu ja aktiivsust sooles. Seda mõistet uuendati aastal 2004, defineerides prebiootikume selektiivselt fermenteeritavate ainetena, mis muudavad nii soole mikrofloora koosseisu kui ka aktiivsust, parandades seeläbi peremeesorganismi üldist heaolutunnet ja tervist (Gibson jt., 2004). Aastal 2010 otsustati, et kuna spetsiifiliste ainetega saab ilmselt selektiivselt mõjutada ka teisi inimese (ja loomade) mikroobikooslusi, näiteks nahal, suuõõnes ja suguelundite limaskestadel, oleks vaja eristada soole mikroobikooslust mõjutavaid prebiootikume toiduprebiootikumidena (Gibson jt., 2010). Selles bakalaureusetöös tähistame mõistega 'prebiootikum' just toiduprebiootikume.

1.1.3 Prebiootikumide koostis, leidumine toidus ja üldised omadused

Prebiootikumid on nn elu soodustavad ained. Siiani on prebiootikumidena uuritud ja kasutatud peamiselt oligo- ja polüsahhariide. Prebiootikumid peavad vastama järgmistele tingimustele:

- 1) nad ei tohi laguneda maohappe ega inimese (ja looma) seedeensüümide toimel;
- 2) neavad jõudma lagunemata ja imendumata jämesoolde;
- 3) peavad olema selektiivseks toiduallikaks tervisele kasulikele soolebakteritele, soodustades nende paljunemist ja aktiivsust. See võib omakorda kasulikult mõjuda inimese tervisele ja heaolule (Gibson jt., 2004; Roberfroid jt., 2010).

Nendele tingimustele vastavad kindlasti liisuhkrute hulka kuuluvad inuliin ja selle töötlemisel saadavad FOS-id, GOS-id ja laktuloos (Delzenne ja Roberfroid, 1994; Roberfroid ja Slavin, 2000; Roberfroid, 2007^a; Gibson jt., 2010). Täna on teada, et prebiootilise toimega on ka mõned teist tüüpi ained, näiteks taimsed polüfenoolid, mida leidub nt punaveinis, kakaos ja sojaubades (Bolca jt., 2013).

Oligosahhariidid on suhkrud, kus kaks või enam monosahhariidi (liisuhkru) molekuli on omavahel glükosiidsidemega ühendatud, moodustades kas lineaarse või hargnenud ahela. Näiteks laktuloos, FOS-id ja GOS-id kuuluvad oligosahhariidide hulka. Looma ja inimese organismis on MSO-sid (mitteseeduvad oligosahhariidid) 1) võimalik eraldada taimedest (nt sojaoast); 2) sünteesida ensümaatilistest disahhariididest, nt sahharoosist, laktoosist või maltoosist; 3) saada taimsetest polüsahhariididest nende ensümaatilise või happelise hüdrolüüsiga (Rastall ja Maitin, 2002; Oosterveld jt., 2002; van Laere jt., 2000). MSO-d soodustavad probiootiliste soolebakterite, just bifidobakterite, metaboolset aktiivsust ja kasvu (Crittenden ja Playne, 1996). Inimese genoom kodeerib väga vähe ensüüme polüsahhariidide lagundamiseks. Näiteks suudab inimene lagundada amülaasiga tärklisi. Jämesoolebakterid suudavad seevastu lagundada väga paljusid erinevaid

polüsahhariide (kiudaineid) ning seetõttu stimuleerivad kiudained soolebakterite metabolismi (Koropatkin jt., 2012). Oluline oleks kindlaks teha need kiudained, mis soodustavad just tervisele kasulike (probiootiliste) bakterite paljunemist ja aktiivsust. Praeguse uuringute seisuga loetakse prebiootiliste toiduainete hulka piim, mesi, erinevad puu- ja juurviljad, sibul, küüslauk, banaan, rukis, oder, porrulauk ja sigur (vt Tabel 1; Voragen, 1998). Kõik need toiduained sisaldavad lisaks muudele komponentidele ka prebiootilisi oligo- ja polüsahhariide. Prebiootilisi kiudaineid kasutatakse ka toidulisandina. Nii on inuliini ja inuliini-tüüpi oligosahhariide (vt peatükk 1.2) kasutatud toidus rasva- ja suhkruasendajana. See vähendab toidu kalorsust ning suurendab kiudainete osakaalu (Mendoza jt., 2001).

Prebiootilised oligosahhariidid lahustuvad vees (Crittenden ja Playne, 1996; Voragen, 1998). Nende stabiilsus ja vastupidavus maohappele sõltub suhkrujääkide tüübist oligosahhariidis ja sidemete tüüpidest suhkrujääkide vahel. Reeglina on heksoosidest koosnevad ahelad stabiilsemad kui pentoosidest koosnevad ahelad ja β -sidemed stabiilsemad kui α -sidemed (Voragen, 1998). Üldiselt on MSO-d sahharoosist umbes 0,3-0,6 korda vähem magusad (vt Tabel 2). Oligosahhariidide magusus sõltub nende koostisest, PA-st (polümerisatsiooniate) ning mono- ja disahhariidide sisaldusest preparaadis (Crittenden ja Playne, 1996; Voragen, 1998). Ahela pikenedes oligosahhariidide magusus väheneb (Roberfroid ja Slavin, 2000). Oligosahhariidide energeetiline väärtus on 1,5-2,0 kcal/g, mis on umbes 40-50% seeduvate süsivesikute, nt sahharoosi, omast (Sako jt., 1999).

Peamiselt pakuvad oligosahhariidid huvi tänu oma füsioloogilistele toimetele (Crittenden ja Playne, 1996). Kuna MSO-d ei seedu inimese organismis (Crittenden ja Playne, 1996; Rivero-Urgell ja Santamaria-Orleans, 2001), siis jõuavad nad muundumata kujul jämesoolde ja on toiduks teatud soolebakteritele, sh laktobatsillidele ja bifidobakteritele, kelle arvukuse tõus mõjub inimese tervisele kasulikult, näiteks inhibeerivad nad soolepatogeenide kinnitumist ja tugevdavad immuunsüsteemi (Delzenne ja Roberfroid, 1994; Mussatto ja Mancilha, 2007). Soolles lagundatakse MSO-d bakterite osalusel monosahhariidideks ja lühema ahelaga oligosahhariidideks (Delzenne ja Roberfroid, 1994; Bielecka jt., 2002). Saadud produktid transporditakse bakterirakku ja kääritatakse lühikese ahelaga rasvhapeteks (LAR: atsetaat, laktaat, propionaat ja butüraat), mille tagajärjel alaneb soolesisu pH, mis inhibeerib patogeensete bakterite elutegevust ja omakorda stimuleerib laktobatsillide ja bifidobakterite paljunemist (Mussatto ja Mancilha, 2007). Moodustunud rasvhapetel on ka spetsiifilisi funktsioone ja paljud neist ootavad veel selgitamist. Inimese jämesooles ja väljaheidetes on atsetaadi, propionaadi ja butüraadi molaarsuhted 60:20:20 (den Besten jt., 2013 ja sealsed viited). Seega moodustub sooles kõige enam atsetaati. Atsetaat ja propionaat mõjutavad näiteks nii lipiidide (sh kolesterooli) kui ka glükoosi ainevahetust (Rombeau

ja Kripke, 1990; Roberfroid, 2007^b; den Besten jt., 2013). Atsetaat osaleb näiteks pika ahelaga rasvhapete ja kolesterooli sünteesis ning on kosubstraadiks glutamiini ja glutamaadi sünteesis (Knowles jt., 1974; den Besten jt., 2013). Atsetaat suurendab ka vere voolamist jämesoole limaskestast, tänu millele paraneb soole motoorika (Scheppach, 1994). Ülejäänud atsetaadi metaboliseerivad süda, rasvkude, neerud ja lihased (Knowles jt., 1974). LAR-idel on ka teisi funktsioone. Butüraat (ja vähemal määral ka atsetaat) on energiaallikaks soole epiteelirakkudele, hoides neid funktsionaalsena. Läbi epiteeli toimub ka toitainete, vee, Ca^{2+} ja teiste ionide (Mg^{2+} , Fe^{3+}) imendumine soolest. Mida parem on mineraalide (nt Ca^{2+}) imendumine soolest, seda väiksem on osteoporoosi haigestumise oht. On näidatud, et butüraat kaitseb ka soolevähi eest (Duncan jt., 2004; Bordonaro jt., 2014). Butüraati moodustub sooles ka teistest LAR-ideist. Näiteks ühtede bakterite poolt toodetud piimhapet ja atsetaati saab mõni teine bakter edasi kääritada butüraadiks (Duncan jt., 2004). Toidujäänuste mikroobsel käärimisel moodustuvate rasvhapete edasine katabolism peremeesorganismis annab kuni 15% toiduenergiast (Blaut ja Klaus, 2012).

Seni on kõige enam uuritud inuliini ja inuliini-tüüpi fruktaanide prebiootilisi efekte (Roberfroid, 2005). Põhjuseks on nende ainete kättesaadavus ja mõistlik hind (Lafraya jt., 2011; de Abreu jt., 2013). Selles töös käsitletakse levaani ja levaani-tüüpi fruktaanide sünteesi ja puhastamist. Levaani-tüüpi FOS-e kommertsiaalselt ei toodeta ja müügil olev levaan on väga kallis. Näiteks 1 g *Z. mobilis*'e levaani maksab firmast Sigma-Aldrich ostes 219,5 eurot. Samal ajal kui 100 g sigurijuurest puhastatud inuliini maksab 402 eurot ning daaliajuurest toodetud inuliini 204 eurot (www.sigmaaldrich.com).

1.2 Inuliin ja inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidid prebiootikumidena

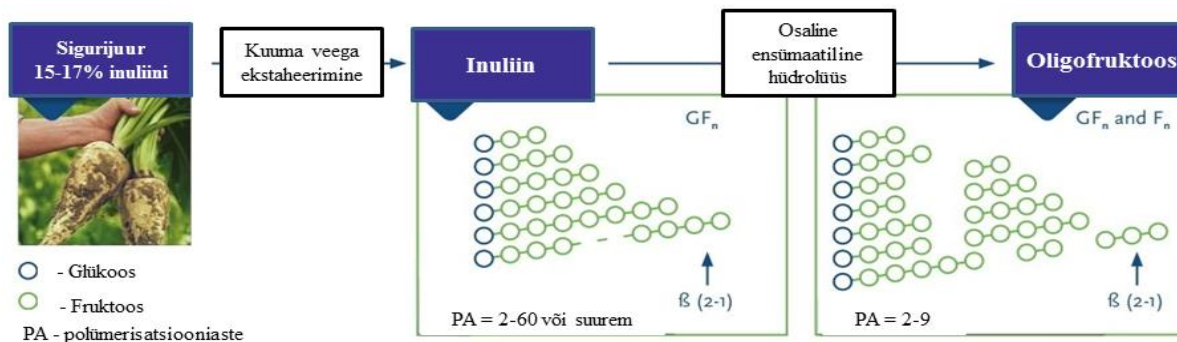
1.2.1 Inuliin, selle leidumine looduses ja toodetavad preparaadid

Inuliin on lineaarne fruktoosijääkidest koosnev polüsahhariid, milles fruktoosi monomeeride vahel on β -2,1 glükosiidside. β -2,1 sidemega fruktaane on võimalik toota bakterite ning seente ja nende ensüümide abil sahharoosist (Mussatto ja Mancilha, 2007). Lihtsam ja odavam on neid siiski ekstraheerida taimedest, näiteks sigurijuurest (*Cichorium intybus*), mugulpäevalillest (*Helianthus tuberosus*) ja Jeruusalemma artišokist ehk maapirnist (*Cynara scolymus*) (Praznik ja Beck, 1985; Hellwege jt., 2000; Banguela ja Hernández, 2006). Inuliini ja inuliini-tüüpi FOS-e (oligofruktoosi) leidub ka nisus (*Triticum*), sibulas (*Allium cepa*), banaanis (*Musa*) ja küüslaugus (*Allium sativum*) (Roberfroid, 2005). Andmeid nende fruktaanide sisalduse kohta toiduainetes on esitatud Tabelis 1.

Tabel 1. Keskmise inuliini ja oligosahhariidide sisaldus toiduainetes kuivaine kohta.

Toiduaine	Inuliin (g/100g)	Oligofruktoos (g/100g)	Allikas
Banaan	0.5	0.5	Moshfegh jt., 1999
Spargel	2.5	2.5	Moshfegh jt., 1999
Sigurijuur	41.6	22.9	Moshfegh jt., 1999
Küüslauk	12.5	5.0	Moshfegh jt., 1999
Jeruusalemma artišok (maapirn)	18.0	13.5	Moshfegh jt., 1999
Porrulauk	6.5	5.2	Moshfegh jt., 1999
Sibul	4.3	4.3	Moshfegh jt., 1999
Nisu	2.5	2.5	Moshfegh jt., 1999
Oder	~1		Voragen, 1998
Rukis	~0.7		Voragen, 1998
Jakoonijuur		22-77	Hermann jt., 1999

Kõige enam kasutatakse inuliinipreparaatide tootmiseks sigurijuurt. Selle kuivkaalust moodustab erineva ahelapikkusega inuliin ~60% (Milala jt., 2009). Inuliin saadakse sigurijuurest kätte kuuma vee ekstraheerides, selle tulemusena saadakse nii GF_n kui ka F_n tüüpi fruktaane, mille PA varieerub vahemikus 2-60. Keskmise fruktaanahela PA sigurist ekstraheeritud produktis on ~10-12 (Roberfroid, 2007^b; vt Joonis 1). Sigurifruktaanide fraktsioonide analüüs on näidanud, et sellest 55% moodustavad oligosahhariidid PA-ga 2-19, 28% PA-ga 20-40 ning 17% PA-ga üle 40 (van Loo jt., 1995).



Joonis 1. Inuliini ja oligosahhariidide eraldamine sigurijuurest. Joonis pärineb veebilehelt www.beneo.com. Lisatud on eestikeelsed selgitused.

Põhiline prebiootiliste preparaatide tootja on firma Beneo, kes toodab neid nii inimestele kui ka loomadele. Preparaatide tootmiseks vajaminev inuliin saadakse sigurijuurest. Beneo inuliini on võimalik kasutada ka rasvaasendajana. Inuliini osalisel hüdrolüüsil saadakse oligofruktoos, mida kasutatakse suhkruasendajana. Inuliinist toodetud oligofruktoosi preparaadid on välja toodud Tabelis 2. Lisaks inuliini ja oligofruktoosi preparaatidele toodab Beneo ka isomaltitooli, palatinoosiTM, riisitärklise ja riisijahu preparaate (vt www.beneo.com).

Tabel 2. Firmas Beneo inuliinist toodetavad oligofruktoosi preparaadid. Tabel pärineb veebilehelt www.beneo.com.

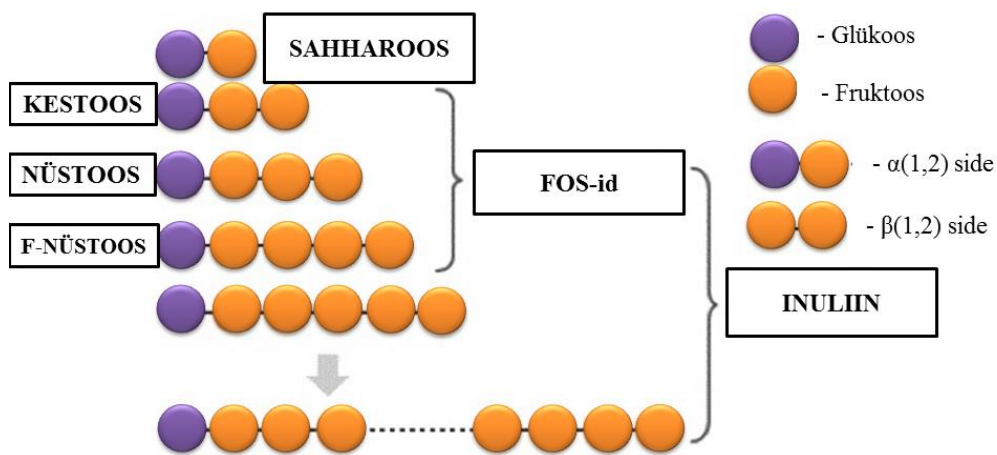
Preparaat	Oligofruktoosi hulk	Magusus võrreldes sahharoosiga	Vedel/pulbriline
Orafti® L60	60%	65%	Vedelik
Orafti® L85	85%	50%	Vedelik
Orafti® L90	90%	40%	Vedelik
Orafti® L95	95%	30%	Vedelik
Orafti® P95	95%	30%	Pulber

Inuliini ja inuliini oligosahhariide on lisatud jogurtisse, keefirisse, suppidesse, kastmetesse, erinevatesse jookidesse, küpsistesse, hommikuhelvestesse, kommidesse ja isegi šokolaadi (www.beneo.com). Aastal 2015 kiitis EFSA heaks inuliini kasutamise inimtoidus kõhukinnisuse leevendamiseks. Vabatahtlikel, kes tarbisid 12 g inuliini päevas, leevenes kõhukinnisus. Soovitatav kiudainete hulk inimtoidus on 25 g päevas, kuid sageli on see väiksem, jäädes 15 grammi juurde päevas. Seetõttu soovitab EFSA kasutada inuliiniga rikastatud toitu või inuliini sisaldavaid preparaate toidulisandina (www.insights.ingredientsnetwork.com).

Eesti polettidelt võib leida näiteks inuliiniga rikastatud Largo ploominektarit ning hommikusöögipulbrit Femisoja Plus (vt Lisa 1). Uudne inuliini-tüüpi FOS-ide allikas on Andide mäestikust pärinev eksootiline jakoon *Smallanthus sonchifolius*, mille juured sisaldavad suures koguses (22-77% kuivkaalust) β -2,1 sidemega FOS-e PA väärtusega 3-10. Jakoonijuure maitse ja tekstuur on kombinatsioon õunast ja arbuusist (Hermann jt., 1999; Ojansivu jt., 2011).

1.2.2 Inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidide süntees mikroobsete ensüümidega

Inuliini-tüüpi FOS-e on võimalik toota ensümaatilisel seente ning bakterite ja nende ensüümide: fruktosüüli transferaaside (EC 2.4.1.9) (Ghazi jt., 2007) ja β -fruktofuranosidaaside (EC 3.2.1.26) (Yanai jt., 2001) abil. Sünteesil kasutatakse substraadina sahharoosi. Näitena võib tuua piimhapestikbakteri *Lactobacillus reuteri* tüve 121 fruktosüüli transferaasi, mis sünteesib nii FOS-e kui ka inuliini (Sangeetha jt., 2005). Tööstuslikuks tootmiseks kasutatakse enim hallitusseente (nt liikide *Aspergillus* ja *Penicillium*) vastavaid ensüüme (Sangeetha jt., 2005; Dominguez jt., 2014). FOS-ide moodustumiseks on vajalik kõrge sahharoosi kontsentratsioon reaktsioonisegus. Produktidena tekivad lühikese ahelaga FOS-id: kestoos, nüstoos ja fruktosüülnüstoos (F-nüstoos) (Dominguez jt., 2014; vt Joonis 2).



Joonis 2. Inuliini ja inuliini-tüüpi FOS-ide koostis. Näidatud on nende fruktaanide ensümaatilise sünteesi substraat (sahharoos) ja produktid ning nendes esinevad erinevad glükosiidsidemed. Joonis pärineb modifitseeritud kujul veebilehelt www.fnsugar.co.jp/eng/inulin.html. Lisatud on eestikeelsed selgitused.

Sünteesi esimeses etapis sahharoos transfruktosüülitakse, st aktseptorina toimivale sahharoosi molekulile lisatakse β -2,1 sideme kaudu fruktoosijääk, mis pärineb teisest reageerivast sahharoosi molekulist. Edaspidi saab moodustunud 1-kestoosi sahharoosist pärinevate fruktoosijääkidega pikendada (Lammens jt., 2009). Seetõttu algavad inuliini ja inuliini-tüüpi FOS-ide ahelad glükoosi molekuliga, on GF_n tüüpi. Lisaks fruktoosijääkide vahelistele β -2,1 sidemetele sisaldub ahelas ka α -1,2 side sahharoosi molekuli glükoosi- ja fruktoosijääkide vahel (Joonis 2).

Ensümaatilise sünteesi käigus moodustunud FOS-id sisaldavad suurel määral monosahhariide – peamiselt glükoosi, sest ahelate pikendamiseks kasutatakse sahharoosis sisalduvat fruktoosi ja glükoos vabaneb kõrvalproduktina. Lisaks sellele võivad ensümaatilisel teel sünteesitud FOS-id sisaldada ka reageerimata sahharoosi. Puhta FOS-i preparaadi saamiseks tuleks lõpp-produkti puhastada glükoosist, fruktoosist ja sahharoosist (Carabin ja Flamm, 1999; Niness, 1999). Inuliini-tüüpi FOS-e on võimalik mono- ja disahhariididest puhastada fermentatsiooni teel (Makras jt., 2005).

1.2.3 Inuliini ja inuliini-tüüpi FOS-ide prebiootiline toime

Võime metaboliseerida inuliini-tüüpi fruktaane on olemas nii bifidobakteritel kui ka laktobatsillidel. Samas võib neil substraatide kasutamise muster olla erinev. Näiteks *L. acidophilus* IBB 801 metaboliseerib ainult oligofruktoosi samal ajal kui *L. paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 lagundab kiiresti nii oligofruktoosi kui ka pikaahelalist inuliini. Kõikidel juhtudel on peamiseks käärimisproduktiks piimhape. Pikaahelalise inuliini või oligofruktoosiga rikastatud inuliini fermenteerimisel moodustub suurel hulgal ka äädikhapet, formiaati (sipelghape) ja etanooli. Hapnikuvabas keskkonnas ja neutraalse pH juures toodavad laktobatsillid võrreldes

bifidobakteritega oluliselt vähem metaboolseid kõrvalprodukte. See võib olla tingitud laktobatsillide võimest lagundada inuliini-tüüpi fruktaane kiiremini kui bifidobakterid (Makras jt., 2005). Inuliini kasutamine on seotud selleks vajalike ensüümide sünteesiga. Näiteks bifidobakterid sünteesivad β -fruktofuranosidaasi, mis suudab lagundada inuliini ja vastavaid FOS-e ekso-aktiivsusega, st ahela otsast (Bujacz jt., 2011). Seega on inuliini-tüüpi FOS-idel bifidogeenne toime – suureneb bifidobakterite arvukus ja metaboolne aktiivsus inimese sooles (Rossi jt., 2005). Gibson jt poolt läbiviidud uuringus selgus, et kui terved täiskasvanud inimesed tarvitavad kahe nädala jooksul 3 korda päevas 5 g inuliini-tüüpi FOS-e, suureneb nende käärsoole bifidobakterite arvukus 6-22% (Gibson jt., 1995). Samas näiteks väga tõhus kiudainete lagundaja jämesooles on *Bacteroides thetaiotaomicron*, kes ei suuda lagundada inuliini. Küll aga kasvab ta inuliinist selle hüdroolüüsiga tehtud FOS-idel (Sonnenburg jt., 2010; Adamberg jt., 2014).

1.3 Levaan ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidid prebiootikumidena

1.3.1 Levaani-tüüpi fruktooligosahhariidid kui uued prebiootikumid

Levaan on fruktoosi biopolümeer, mida toodavad eelkõige bakterid perekondadest *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, *Zymomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus* ja *Streptococcus* (Visnapuu, 2012; Visnapuu jt., 2015). Tänu levaanile on nad võimelised moodustama biokilet ja kinnituma pindadele (nt mullaosakestele (Ben Ammar jt., 2002)). Sünteesitud fruktaanid stabiliseerivad rakumembraane ning aitavad bakteritel toime tulla keskkonnastressiga (Rozen jt., 2001; Song ja Jacques, 1999).

Levaani-tüüpi FOS-ide bioloogilisi efekte on alles väga vähe uuritud, eriti kui võrrelda inuliini-tüüpi substraatide vastavate uuringutega. Samas on mõned tööd, mis näitavad selgelt nende prebiootilist potentsiaali. Näiteks levaani happelisel hüdroolüüsil saadud FOS-idel näidati tõhusamat bifidobaktereid stimuleerivat toimet kui inuliini-tüüpi FOS-idel (Marx jt., 2000). Ka neokestoosil (sisaldab β -2,6 sidet nagu levaangi; vt Joonis 3) on tugev prebiootiline toime. Pärmil *Pfaffia rhodozyma* abil toodetud neokestoos stimuleerib näiteks laktobatsillide ja bifidobakterite kasvu ja paljunemist suuremal määral kui inuliini-tüüpi FOS-i preparaati raftiloos (Lim jt., 2007). Porrás-Domínguez jt (2014) testisid kuue probiootilise bakteritüve kasvu levaanil ja sellest saadud FOS-idel. Nad näitasid, et *L. paracasei*, *B. longum* var. *infantis* 17930 ja *B. longum* kasvasid võrdselt hästi mõlemal substraadil, samas kui *B. bifidum*, *B. longum* var. *infantis* NRRL 4661 ja *B. breve* kasutasid levaanist paremini FOS-e. See värske töö näitab selgelt levaani ja levaani-tüüpi FOS-ide prebiootilist potentsiaali, aga ka erinevusi probiootiliste bakterite vahel levaani polümeeri ja sellest tehtud FOS-ide kasutamises.

Levaansukraasi reaktsiooniprojekte on võimalik tänu nende füüsikalistele omadustele (lahustumine nii vees kui ka õlis, vastupidavus kõrgele temperatuurile ning hapetele/alustele, viskoossus)

kasutatada ka meditsiinis (ravimikapslite materjali ja vereplasma asendajana), toiduainetööstuses (paksendajana ja emulgaatorina) (Bekers jt., 2005; Banguela ja Hernandez, 2006) ja kosmeetikas (põletikuvastane toime ning rakkude paljunemise soodustaja) (Kim jt., 2005). Levaani puhul on kirjeldatud nii vähivastane kui immuunsüsteemi stimuleeriv toime (Esawy jt., 2013) ning rasvumis- ja kasvavastane toime (Yoo jt., 2004).

Levaani-tüüpi FOS-ide tootmine levaanist on majanduslikult kulukas ning seetõttu võiks kaaluda ka teisi alternatiive. Üheks mooduseks oleks kasutada mõnda jämesooles elavat bakterit, kes nõ kohapeal levaani lagundaks, tekitades sellest β -2,6 sidemega FOS-e teistele tervisele kasulikele soolebakteritele. Aastal 2010 näidati, et tavaline jämesoolebakter *B. thetaiotaomicron* kasvab levaanil ja sünteesib rakuvälist endolevanaasi (Sonnenburg jt., 2010). Seega võiks see bakter jämesooles levaani-tüüpi polümeere FOS-ideks lagundada. Moodustuvad produktid võiksid olla selektiivseks toiduks näiteks bifidobakteritele.

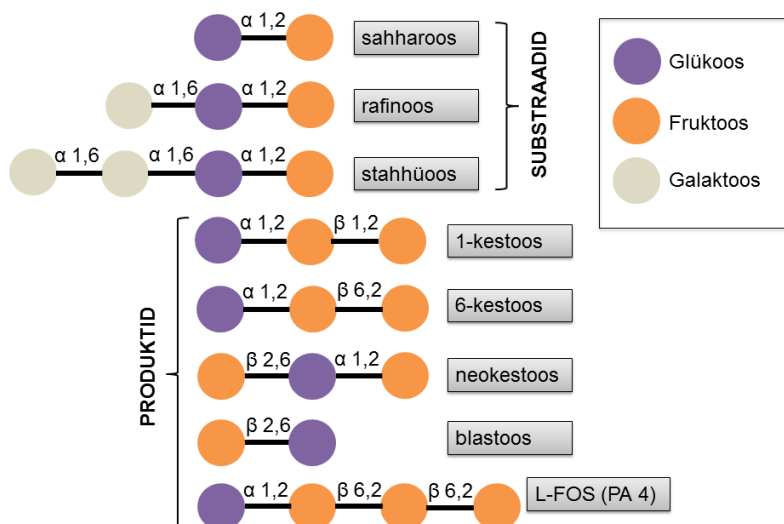
1.3.2 Levaani ja levaani-tüüpi fruktooligosahhariidide süntees

Levaani sünteesimise protsessi on kõige enam uuritud bakteritel *Z. mobilis*, *S. salivarius* ja *B. subtilis* (van Hijum jt., 2001). Levaansukraas (EC 2.4.1.10) kuulub glükosiidi hüdrolaaside perekonda GH68, kuhu on koondatud bakteriaalsed fruktosüültransferaasid, mis viivad läbi nii transfruktosüleerimist kui ka sahharoosi hüdrolüüsi (Lammens jt., 2009). Levaansukraasid kasutavad lisaks sahharoosile substraadina ka rafinoosi ja stahhüoosi (Visnapuu jt., 2008; 2015; Joonis 3). Levaansukraas sünteesib nii FOS-e kui ka kõrgpolümeerset fruktoosist koosnevat levaani, mille peaaegu koosneb β -2,6 glükosiidsidemetega ühendatud fruktoosijääkidest. Fruktoosist koosnevad kõrvalahelad on seotud β -2,1 glükosiidsideme kaudu (Joonis 3; Vijn ja Smeekens, 1999). Joonisel 3 on näidatud levaansukraaside substraadid ning lühikese ahelaga produktid.

Polümerisatsiooniprotsessis toimub uute sidemete süntees, milleks vajalik energia saadakse substraadimolekulis sisalduvate glükosiidsidemete lõhkumisest (Ozimek jt., 2006; Velázquez-Hernández jt., 2009). Levaani PA on enamasti suurem kui inuliinil (Vijn ja Smeekens, 1999). Lsc3 (levaansukraas 3) valguga sünteesitud levaani PA võib olla kuni ~30000 (Aasamets, avaldamata andmed), kusjuures sünteesitud FOS-ide PA on kuni 8-9 (Visnapuu jt., 2015).

Reaktsiooni käigus seotakse esmalt sahharoosist pärit fruktoosijääk levaansukraasi aktiivtsentrisse. Hiljem kantakse see üle aktseptormolekulile, milleks võib olla sahharoos, fruktaanahel, aga ka vesi või glükoos. Kui aktseptoriks osutub vesi, toimub sahharoosi hüdrolüüs (moodustuvad glükoos ja fruktoos), kui glükoos, tekib vahetusreaktsiooni tulemusel tagasi sahharoos. Selleks, et toimuks FOS-ide või levaani süntees, peab aktseptoriks olema kas sahharoos või fruktaanahel (Ozimek jt.,

2006). Reaktsiooni käigus eraldub igast levaansukraasiga reageerinud sahharoosi molekulist üks molekul glükoosi, mis koos teiste fruktosüüli aktseptoritega (sahharoos ja fruktaanid) hakkab konkureerima levaansukraasi aktiivtsentrisse seostumise pärast (Lyness ja Doelle, 1983; Hettwer jt., 1995; Ananthalakshmy ja Gunasekaran, 1999).



Joonis 3. Levaansukraasi polümerisatsiooniprotsessis osalevad substraadid ja sünteesitavad produktid. Joonis pärineb modifitseeritud kujul artiklist Visnapuu jt., 2015. Joonisel ei ole näidatud levaani polümeeri ega kõrvalahela moodustumist. Lisatud on eestikeelsed selgitused.

Levaansukraasidel esineb sahharoosile mõõdukas kuni suhteliselt kõrge afiinsus ($K_m = 6,6\text{--}50\text{ mM}$). *P. syringae* DC3000 pv. tomato levaansukraasidel (Lsc2 ja Lsc3) on sahharoosile keskmine afiinsus ($\sim 20\text{ mM}$) (Hettwer jt., 1995; Yun, 1996; Ozimek jt., 2006; Velázquez-Hernández jt., 2009; Waldherr jt., 2008; Visnapuu jt., 2011; Alamäe jt., 2012). Paljud levaansukraasid, sh ka *P. syringae* pv. tomato Lsc2 ja Lsc3, saavad lisaks sahharoosile kasutada substraadina ka rafinoosi (van Hijum jt., 2004; Trujillo jt., 2004; Visnapuu jt., 2008) ja stahhüoosi (Yanase jt., 2002; Visnapuu jt., 2011; Joonis 3). Lisaks on meie grupis näidatud, et Lsc3 valk saab sünteesiprotsessis aktseptorina kasutada ka ebatavalisi fruktosüüli aktseptoreid, näiteks ksüloosi, fukoosi, ksülobioosi, sorbitooli, arabinoosi jmt molekule (Visnapuu jt., 2011).

Levaansukraasid sünteesivad järgmisi FOS-e: disahhariid blastoosi, trisahhariide 1-kestoosi, 6-kestoosi ja neokestoosi, tetrasahhariidi nüstoosi ja ka pikema ahelaga FOS-e. Tuleb märkida, et levaansukraasiga sünteesitavate FOS-ide hulgas on ka inuliini-tüüpi FOS-e, nt 1-kestoosi (Joonis 3). Kõige lühema ahelaga levaani-tüüpi FOS, mida sünteesivad ka mõnede seente invertaasid, on 6-kestoos (Homann jt., 2007; Bekers jt., 2002; de Abreu jt., 2013; Lafraya jt., 2011; vt Joonis 3).

Keskkonnatingimustega on võimalik mõjutada polümerisatsiooniproduktide saagist. Näiteks levaani sünteesil *Z. mobilis* 113S rakkudega näidati, et soola lisamine käärimiskeskkonda suurendab sünteesitavate FOS-ide hulka. Kui käärimiskeskkond sisaldas 10% sahharoosi, siis suurendas 0,6 M NaCl lisamine FOS-ide saagist 3,5 korda. Kõrgel sahharoosi kontsentratsioonil (65% w/w) hakkasid soolad FOS-i tootmist inhibeerima. Kõrgel sahharoosi kontsentratsioonil võib FOS-i väikese saagikuse põhjuseks olla ka sahharoosi molekuli lõhkumisel vabanev glükoos, mis käitub FOS-i polümerisatsiooniprotsessi inhibiitorina (Sangeetha jt., 2005). Kui vaba glükoosi kontsentratsioon reaktsioonisegus tõuseb 30 mM-ni, siis hakkab see inhibeerima ensüümi polümeriseerivat aktiivsust ning reaktsioon aeglustub (Lyness ja Doelle, 1983; Hettwer jt., 1995; Ananthalakshmy ja Gunasekaran, 1999). Reaktsiooni inhibitsiooni on võimalik vähendada, kui reaktsioonisegusse lisada ensüümi glükoosi oksüdaasi, mis oksüdeerib glükoosi glükoonhappeks (Han jt., 2009).

Ka Lsc3 valgu puhul on näidatud, et tema polümeriseerimisvõimet ja produktide spektrit mõjutab tugevasti substraadi (sahharoosi) kontsentratsioon. Madalal sahharoosi kontsentratsioonil sünteesitakse peamise transfruktosüülimisproduktina levaani ning toimub ka sahharoosi hüdroolüüs. Juba alates 300 mM sahharoosi kontsentratsioonist väheneb levaansukraasi hüdroolüütiline aktiivsus ja polümerisatsiooniproduktina hakkab moodustuma rohkesti FOS-e. Näiteks sünteesib Lsc3 valk toatemperatuuril (23 °C) 1200 mM sahharoosist 3 korda vähem levaani kui 300 mM sahharoosist (Visnapuu jt., 2009).

Kuna levaansukraasid taluvad väga hästi kõrgeid temperatuure, on temperatuuriga võimalik mõjutada levaansukraasi polümeriseerivat aktiivsust. Erinevatest mikroobidest pärit levaansukraaside temperatuurioptimumid jäävad substraadi hüdroolüüsil vahemikku 30-60 °C. Madalamad temperatuurid soodustavad levaansukraasi polümeriseerivat aktiivsust (Chambert ja Petit-Glatron, 1991; Hernández jt., 1995; Hettwer jt., 1995). Kui kasutada polümerisatsioonireaktsioonis substraadina 1200 mM sahharoosi, siis on *P. syringae* pv. tomato Lsc3 polümeriseeriv aktiivsus temperatuuril 60 °C 67% ning temperatuuril 20 °C 80%. Seega mõjutavad reaktsioonisaaduste hulka ja mustrit paljud tegurid, millest temperatuur ja substraadi kontsentratsioon on kõige olulisemad (Visnapuu jt., 2011; 2015). FOS-e on võimalik toota ka levaani ensümaatilise hüdroolüüsi teel. Näiteks on *B. licheniformis* endolevanaasi LevB1 abil toodetud bakteritega sünteesitud levaanist FOS-e (Porrás-Domínguez jt., 2014).

1.3.3 Fruktooligosahhariidide puhastamine lisanditest

Selleks, et oleks võimalik uurida sünteesitud FOS-ide prebiootilist toimet, on vaja nad puhastada segavatest lisanditest. FOS-i siirupi puhastamiseks tuleb sellest eemaldada mono- ja disahhariidid

(glükoos, fruktoos ja sahharoos). Kuna reaktsiooni käigus fruktoosijäägid polümeriseeritakse ning glükoosi molekulid vabanevad reaktsioonisegusse, siis sisaldab FOS-i lahus eriti suures koguses glükoosi. Näiteks selles töös kasutatud FOS-i siirupi glükoosisisaldus on ~300 mg/ml. Sahharoosi ja fruktoosi sisaldus on väiksem: fruktoosi ~70 mg/ml ja sahharoosi ~40 mg/ml (Adamberg jt., 2014). Mono- ja disahhariidide eemaldamiseks FOS-ide lahustest on kirjanduse andmetel kasutatud mitmeid erinevaid meetodeid: nt töötlust aktiivsöe ja/või tseoliidiga ning selektiivset fermentatsiooni pärmiga (Lu jt., 2012).

Tseoliiti on kasutatud toiduainetööstuses ning suhkrute ja valkude puhastamiseks. Kuhn jt (2014^A) kasutasid FOS-ide puhastamiseks NaX tseoliiti ($\text{Na}_2\text{O}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 2.5\text{SiO}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Dalai jt., 1985)), mille poori diameeter on 0,25-0,40 mm. Kasutades elueerimisel statsionaarse faasina tseoliiti ja mobiilse faasina etanooli lahust, on võimalik üksteisest eraldada suure ja väikese molekulmassiga ühendeid. Suure molekulmassiga ühendid (nt FOS-id) ei tungi tseoliidi pooridesse. Väikese molekulmassiga monosahhariidid (glükoos ja fruktoos) mahuvad tseoliidi pooridesse ning elueeruvad etanooliga hiljem. Sahharoosi eraldamiseks FOS-idest peaks tõstma protsessi läbiviimise temperatuuri ning vähendama etanooli kontsentratsiooni eluendis (Kuhn jt., 2014^A).

FOS-ide puhastamiseks monosahhariididest on võimalik statsionaarse faasina kasutakse ka granuleeritud aktiivsütt, mille ühe grammi eripind on 500 kuni 1500 m². Aktiivsöe puhul konkureerivad FOS-id koos eluendiga (etanooliga) samadele seostuskohtadele aktiivsöe pinnal. Selleks, et kolonnimaterjalile absorbeerunud ühendid (eelkõige FOS) väljutada, tuleks vähendada FOS-i ja aktiivsöe vahelist afiinsust. FOS-ide väljutamine sõltub söele seostunud ühendite desorptsioonivõimest kolonni voolutamisel etanooliga selle erinevatel kontsentratsioonidel. On kasutatud ka koadsorbenti (näiteks steariinhapet), et võimendada desorptsiooni ning vältida ühendite tagasisestumist (Kuhn jt., 2014^B). Nii tseoliidi kui ka aktiivsöe kasutamisel on olulisteks parameetriteks kolonni kõrgus, etanooli kontsentratsioon, eluendi voolukiirus ja kolonni sisestatud puhastatava materjali maht (Kuhn jt., 2014^B; Kuhn jt., 2014^A).

FOS-ide puhastamiseks on võimalik kasutada ka mono- ja disahhariidide selektiivset eemaldamist pärmidega. Pärmidega töödeldes tuleks jälgida, et suhkrute kontsentratsioon reaktsioonisegus oleks suhteliselt madal. Kõrge suhkru kontsentratsiooni juures pärm ei fermenteeri, sest kõik ressursid suunatakse osmootse stressi üle elamiseks. Seega tuleb FOS-i lahust (siirupit) pärmidega töötlemiseks lahjendada ning hiljem saadav produkt uuesti kontsentreerida (Lu jt., 2012). Pärmiga töötlemiseks on kasutatud erinevaid pärme, nt *S. cerevisiae*'t ja *Pichia heimii*'t (Sheu jt., 2013; Lu jt., 2012; Adamberg jt., 2014; Yoon jt., 2003; Pan ja Lee, 2005). Eeldatakse, et pärm kasutab ära mono- ja disahhariidid ning FOS-id jäävad alles (Pan ja Lee, 2005). FOS-ide puhastamiseks on

võimalik lahust töödelda ka immobiliseeritud pärmirakkudega. Lu jt (2012) kasutasid FOS-i lahuse puhastamiseks immobiliseeritud *Wickerhamomyces anomala* pärmirakke. See, millisel määral ja kui kiiresti suudab pärm mono- ja disahhariidide metaboliseerida, sõltub kasutatavast pärmist, kasvutingimustest (aeroobne/anaeroobne) ning pärmil elulemusest (Snoek ja Steensma, 2007; Pan ja Lee, 2005; Pratt jt., 2003). Näiteks ei suuda invertaasnegatiivne *S. cerevisiae* metaboliseerida sahharoosi ega FOS-e. Seetõttu jäävad vastava pärmiga töödeldes FOS-i lahusesse alles nii oligosahhariidid kui ka sahharoos (Needleman, 1991; Wang ja Needleman, 1996; Adamberg jt., 2014). See ei tähenda, et sahharoosi eemaldamine FOS-i lahusest oleks pärmide abil teostamatu. Van der Heijden jt (1999) puhastasid sahharoosist ja etanoolist ensümaatilisel sünteesitud etüül- β -D-fruktofuranosiidi pärmiga *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*). *H. polymorpha* on küll invertaasnegatiivne pärm, kuid suudab sahharoosi lagundada rakusisese maltaasiga (Liiv jt., 2001). Katse tulemustest selguski, et lisaks glükoosile ja fruktoosile eemaldati reaktsioonisegust ka sahharoos (van der Heijden jt., 1999).

Glükoosi eemaldamiseks on võimalik kasutada ka ensüümi glükoosi oksüdaas ja kaltsiumkarbonaati. Sellisel juhul konverteerib glükoosi oksüdaas glükoosi glükoonhappeks, mis omakorda sadestatakse reaktsioonisegust välja kaltsiumkarbonaadi abil (Sangeetha jt., 2005).

Kui töödelda FOS-i lahust pärmidega, tuleb silmas pidada, et pärmid mõjutavad oma elutegevuse tulemusel FOS-i lahuse keemilist koostist. Pärmide elutegevuse tulemusel toodetakse etanooli, glütserooli, trehaloosi ja orgaanilisi happeid (Lu jt., 2012).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Meie töörühm töötab SA Archimedese kaudu Euroopa Liidu finantseeriva projekti “*Design and application of novel levansucrase catalysts for the production of functional food ingredients (Functional Food Ingredients, FFI)*” kallal. Projekt sai alguse 2012. aasta lõpus ning näeb ette Lsc3 valguga levaani ja fruktooligosahhariidide ensümaatilist sünteesi, produktide eraldamist, puhastamist, analüüsimist ja saadud produktide kasutusvõimaluste uurimist. Et oleks võimalik uurida levaani-tüüpi fruktooligosahhariidide prebiootilist toimet, tuleb fruktooligosahhariidid puhastada segavatest lisanditest.

Käesolev bakalaureusetöö toimus biotehnoloogia-alase projekti FFI raames ja selles püstitati järgmised eesmärgid:

1. Eraldada sahharoosist Lsc3 valgu abil ensümaatiliselt sünteesitud reaktsiooniproduktid – levaan ja FOS-id;
2. Töötada välja sobiv meetodika FOS-i lahuse puhastamiseks monosahhariididest pagaripärmi invertaasnegatiivse mutandiga;
3. Hinnata aereerimise mõju puhastusprotsessile;
4. Iseloomustada pärmiga töödeldud FOS-i lahuse koostist pärast selle töötlust pärmiga;
5. Hinnata pärmirakkude füsioloogilist seisundit ja elulemust töötluse jooksul.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud pärmitüvi

Töös kasutatav *Saccharomyces cerevisiae* tüve BY4741 invertaasnegatiivne mutant Y02321 (MATa; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YIL162w::kanMX4) on pärit Euroscarf'i kollektsioonist (www.euroscarf.de).

2.2.2 Söötmed ja pärmieetkasvatamine

S. cerevisiae kasvatati rikkal YPD söötmel, mis sisaldas 1% pärmiekstrakti, 2% peptooni ja süsinikuallikana 2% glükoosi. Tardsöötmed geelistati 1,5% agariga. Steriilsetes tingimustes külvati värsked *S. cerevisiae* rakud tardsöötmelt 5 ml-sse YPD vedelsöötmesse ja neid kasvatati loksutil aereerides temperatuuril 30 °C YPD vedelsöötmes ~9 h. Seejärel külvati saadud inokulum steriilsetes tingimustes 50 ml-sse YPD vedelsöötmesse ning kasvatati loksutil aereerides temperatuuril 30 °C üleöö kuni OD₆₀₀ väärtuseni ~10.

2.2.3 FOS-i lahuse töötlemine pärmiga

Ettekasvatatud pärmirakud eraldati söötimest tsentrifuugides (~5000 g; 3 min; 4 °C). Rakud pesti autoklaavitud veega steriilsetes tingimustes ning suspendeeriti 45 ml-s lahuses, mis koosnes 22,5 ml-st autoklaavitud destilleeritud veest ja 22,5 ml-st autoklaavitud kraaniveest. Sellele segule lisati 5 ml FOS-i siirupit, mille üldsuhkruisaldus oli ~500 g/l. Seega lahjenes FOS-i siirup pärmiga töödeldavas lahuses ~10 x. Pärmirakke lisati nii palju, et nende algne kontsentratsioon töödeldavas FOS-i lahuses oleks OD₆₀₀ 10 (~3,1*10⁸ rakku/ml). Pärmitöötlus, mis kestis kokku 24 tundi, viidi läbi nii aereeritud kui ka aereerimata tingimustes. Aeroobsel töötlusel inkubeeriti FOS-i segus suspendeeritud pärmirakke loksutil (180 rpm; 30 °C). Aereerimata protsessis, mida antud töös nimetatakse staatiliseks töötluks, toimus inkubatsioon IKA^R Big Squid magnetsegajal (80 rpm; 30 °C). Töötlemise alguses võeti pärmiga töödeldavast FOS-i segust nullproov ning järgnevalt võeti proove iga 3-6 h tagant, et määrata rakkude füsioloogilist seisundit ja töödeldava proovi suhkrute kontsentratsioone. Proovid võeti steriilsetes tingimustes. Rakud eraldati reaktsioonisegust tsentrifuugides (10000 g; 2 min). Supernatant säilitati sügavkülmas (-20 °C) edasisteks analüüsideks.

2.2.4 Pärmimetaaboolse aktiivsuse ja elulemuse hindamine

FOS-i lahuse pärmitöötluks jooksul eraldatud rakususpensiooni proove säilitati jääs kuni analüüsini. Rakud eraldati reaktsioonisegust tsentrifuugides (10000 g; 2 min). Nende füsioloogilise seisundi hindamiseks värviti neid nii metüleensinisega kui ka FDA-ga (fluorestsüindiatsetaat). Metüleensinise abil hinnati rakkude elulemust ning FDA-ga rakkude metaboolset aktiivsust. Pärmirakkude seisundit vaadeldi ka fluorestsümikroskoobis (vt pt 2.2.4.3).

2.2.4.1 Värvimine metüleensinisega

Erinevatel ajamomentidel võetud jääs hoitud proovidest tehti 10x lahendus autoklaavitud H₂O-s. Pärmirakud värviti metüleensinisega, mille lõpp-kontsentratsioon proovis oli ~0,5%. Värvunud ja värvumata rakud loendati loenduskambris (Neubauer-Improved, Marienfield-Superior, Saksamaa), kasutades mikroskoopi Olympus CX21. Rakud loendati kuivsusüsteemis kogusuurendusel 400 x. Keskmise rakkude arvukuse (rakku/ml) leidmiseks loendati rakud vähemalt 10 ruudus. Pärmirakkude elulemus esitati elusrakkude protsendina.

2.2.4.2 Värvimine fluorestsüindiatsetaadiga

FDA (Sigma-Aldrich) alglahus tehti atsetoonis (2 mg/ml) ning säilitati temperatuuril -20 °C. Töölahuse saamiseks lahjendati seda alglahust puhvris (100 mM MOPS puhver, pH 7,4) 50 korda. *S. cerevisiae* elulemuse hindamiseks tehti erinevatel ajamomentidel võetud proovidest lahjendused

autoklaavitud H₂O-s, et saavutada OD₆₀₀ väärtus ~0,2. 100 µl lahjendatud proovi kanti mikrotiiterplaadile (Greiner Bio-One REF 655209) ning seejärel lisati 100 µl FDA töolahust. FDA lõppkontsentratsioon analüüsitavas proovis oli 20 µg/ml.

Proovi ja FDA töolahusega mikrotiiterplaati inkubeeriti 30 °C termostaadis. Ajapunktides 5, 10 ja 15 minutit mõõdeti proovide fluorestsents spektrofotomeetril (Infinite M200 PRO Tecan; Ex 485/Em 527 nm, integratsiooniaeg 20 ms). Iga proov oli mõõtmisel kolmes korduses. Nende mõõtmiste tulemuste põhjal arvutati keskmine ja standardhälve. Rakkude elulemus (%) määrati vastavalt inkubatsiooniajale kaliibergraafiku alusel. Kaliibergraafiku tegemist on kirjeldatud Lisas 2.

2.2.4.3 Pärmide füsioloogilise seisundi hindamine fluorestsentsmikroskoobis

Et hinnata *S. cerevisiae* rakkude seisundit fluorestsentsmikroskoobis, segati kokku 5 ml autoklaavitud destilleeritud vett, 5 ml autoklaavitud kraanivett ja 1 ml FOS-i siirupit, mille üldsuhkru sisaldus oli ~500 g/l ja sellele lisati steriilselt *S. cerevisiae* pestud rakke, et saavutada samasugune rakkude kontsentratsioon nagu FOS-i lahuse pärmitöötluses (pt. 2.2.3). Segu inkubeeriti staatiliselt temperatuuril 30 °C 24 tundi. Seejärel võeti segust 1,5 ml proovi, seda tsentrifuugiti (5400 g; 2 min), et sadestada rakud ning rakke pesti autoklaavitud veega. Pämirakkudele lisati 100 µl värvilahust: 20 µg/ml FDA; 20 µM PI (propiidiumiodiid) ning neid inkubeeriti 10 min pimedas temperatuuril 30 °C. Seejärel rakud sadestati tsentrifuugides (2 min; 5400 g), pesti autoklaavitud veega ning suspendeeriti 300 µl-s autoklaavitud vees.

Preparaadi valmistamiseks pipeteeriti alusklaasile pestud rakkude suspensiooni ning lasti õhu käes kuivada. Seejärel lisati alusklaasile tilk BacLight™ immersioonõli (Life Technologies) ning kaeti katteklaasiga. Rakke vaadeldi fluorestsentsmikroskoobi Olympus BX41 immersioonsüsteemis kogusuurendusel 1300 x (filter IB (*Interference Blue Filter*); FDA: Ex 495/Em 520 nm; PI: Ex 530/Em 615). Pildistamiseks kasutati tarkvara Cell[^]B (Olympus).

2.2.5 Muud analüüsimeetodid

2.2.5.1 Rakususpensiooni optilise tiheduse mõõtmine

Vastaval ajamomendil võetud proovidest tehti 1,5 ml Eppendorf tuubi 50x lahendus (980 µl autoklaavitud H₂O; 20 µl proovi). Proovi optiline tihedus mõõdeti lainepikkusel 600 nm Ultrospec 3100 PRO UV/VIS spektrofotomeetril (Pharmacia) küveti läbimõõduga 1cm.

2.2.5.2 Glükoosi kontsentratsiooni määramine

Glükoosi sisaldus määrati proovide supernatandist tootja eeskirjade alusel Glucose Liquicolor kitiga (Human GmbH, Saksamaa).

2.2.5.3 Õhukese kihi kromatograafia

Proovide supernatandi monosahhariidide sisalduse hindamiseks viidi läbi TLC (õhukese kihi kromatograafia). 0,5 µl proovi kanti kontsentreeriva tsooniga silikageelplaadi stardijoonele (Silica Gel 60 F₂₅₄, Merck, Saksamaa). Suurusmarkeritena kanti plaadile markerlahust, mis sisaldas 0,5 µl 2% levaani, 25 mM 1-kestoosi (PA 3), nüstoosi (PA 4), 100 mM fruktoosi- ja sahharoosilahust ning 30 mM glükoosilahust. Suhkrud (glükoos, fruktoos, sahharoos jt produktid) ja markerid lahutati TLC plaadil voolutades plaati kaks korda kloroform-äädikhape-vesi (60:70:10 ml) seguga (Stiengele jt., 1999). Enne teistkordset proovi pealekandmist ja voolutamist TLC plaat kuivatati.

Fruktoosi ja glükoosi tuvastamiseks voolutatud plaate värviti reaktiiviga, mille koostis oli järgmine: 1.2 g difenüülamiini (Serva); 1.2 g aniliinhüdrokloriidi (Reachim); 100 ml metanooli (Sigma-Aldrich); 10 ml orto-fosforhapet (Naxo). Töötlusjärgselt kuumutati plaati 120 °C juures kuni suhkrulaikude värvumiseni (~10 minutit). Selle reaktiiviga värvub fruktoosijääke sisaldav produkt oranžiks, sahharoosi sisaldav pruuniks ning glükoosi sisaldav siniseks (Jork jt., 1990).

2.2.5.4 Orgaaniliste hapete ja suhkrute kromatograafiline analüüs

Suhkrute analüüs vedelikkromatograafia abil

Glükoosi, fruktoosi ja FOS-i kontsentratsioonid määrati proovide supernatandist HPLC (kõrgsurve vedelikkromatograafia) analüüsi abil. Analüüsiks kasutati Acquity UPLC süsteemi koos autosampleri ja binaarse pumbaga. Detektorina kasutati ELSD detektorit (*evaporative light scattering detector*) (Waters, Milford, MA, USA). Kolonni, Alltech Prevail Carbohydrate ES column (250 x 4,6 mm; partikli suurus 5 µm) (Grace, Deerfield, IL, USA), kasutati koos sobiva eelkolonniga (Alltech Prevail Carbohydrate ES guard cartridge (7,5 x 4,6 mm)). Mobiilse faasina kasutati vee ja atsetonitriili gradienti (Mardo jt., 2014). Analüüsi tegi H. Vija (KBFI, Tallinn).

Orgaaniliste hapete kromatograafiline analüüs

Orgaaniliste hapete (piimhape, atsetaat, formiaat, propionaat), glütserooli ja etanooli kontsentratsiooni määramiseks kasutati vedelikkromatograafia süsteemi Alliance 2795 (Waters Corp., Milford, MA). Analüüsil kasutati kolonni BioRad HPX-87H (Hercules, CA), mida voolutati isokraatiliselt kiirusel 0,6 ml/min, eluendiks 0,005 M väävelhape, kolonni temperatuur 35 °C.

Detektorina kasutati RI (*refractive index*, murdumisnäitajal) detektorit (Waters 2414). Analüüsi tegi K. Tomson (TFTAK, Tallinn).

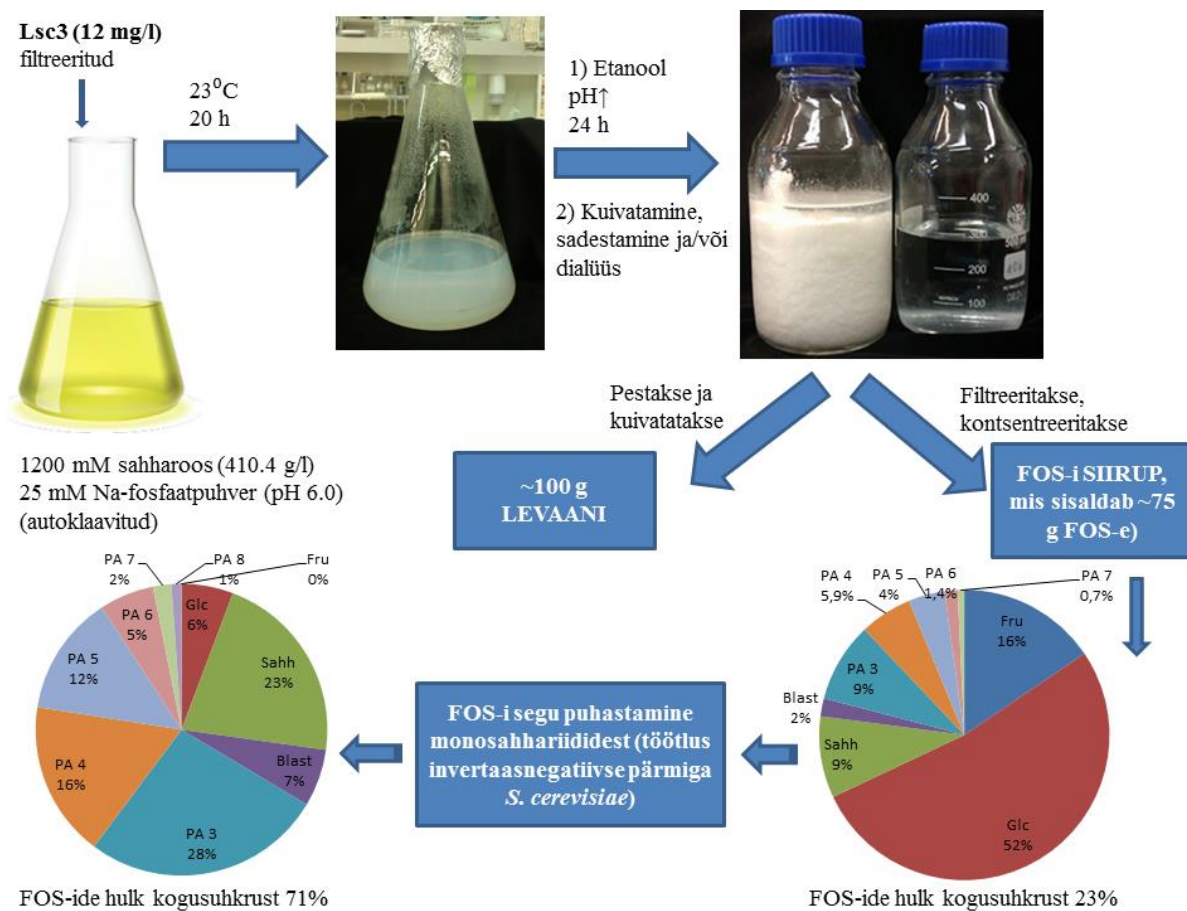
2.3 Tulemused ja arutelu

Meie töögrupis on eelnevalt isoleeritud ja põhjalikumalt uuritud *P. syringae* DC3000 pv. tomato levaansukraase Lsc2 ja Lsc3 (Visnapuu jt., 2008; Visnapuu jt., 2009; Alamäe jt., 2012; Visnapuu jt., 2011; 2015). Projekti FFI (vt sissejuhatust), mille raames valmis ka see töö, üheks eesmärgiks oli kasutada ära Lsc3 valgu võimet sünteesida sahharoosist potentsiaalseid prebiootikume: levaani ja FOS-e, mille prebiootilist toimet ja muid füsioloogilisi efekte oli plaanis uurida koostöös projektipartneritega.

FFI projekti tarbeks toodeti steriilsetes tingimustes Lsc3 valgu abil sahharoosist ensümaatilise sünteesi teel FOS-e ja levaani. 12 mg filtreerimisega steriilitud Lsc3 valku lisati 1 liitrile steriilsele lahusele, mis sisaldas 25 mM Na-fosfaatpuhvrit (pH 6.0) ja 1200 mM sahharoosi (410,4 g/l). Reaktsioonisegu inkubeeriti toatemperatuuril (23 °C) 20 h. Seejärel reaktsioon peatati ensüümi inaktiveerimisega - reaktsioonisegu kuumutamise keeval veevannil 10 min jooksul. Edasisel töötlemisel eraldati reaktsioonisegust levaan ja FOS-id (Joonis 4). Selleks leelistati reaktsioonisegu väärtuseni >pH 8, et soodustada levaani sadenemist, lisades sellele ~6 ml 4M NaOH. Seejärel lisati 2-3 mahtu 96° jääkülma etanooli. Järgneva 24 h jooksul hoiti reaktsioonisegu temperatuuril 5 °C, mille tulemusena sadenes enamus levaanist välja. FOS-ide fraktsioon dekanteeriti ettevaatlikult levaanisademelt ning alles jäänud hägu (sadenemata levaan) eraldati tsentrifuugides (1521 g; 10 min). Isoleeritud levaani pesti 3 korda 70%-lise etanooliga ja kuivatati lüofilisaatoris. Sellisel töötlusel on võimalik 1 l reaktsioonisegust saada ~100 g levaani ning ~75 g FOS-e (Adamberg jt., 2014; Visnapuu jt., 2011; Joonis 4).

Suure osa FOS-i siirupis leiduvatest monosahhariididest moodustab glükoos, mille sisaldus on ~300 mg/ml. See sõltub reaktsioonis kasutatud sahharoosi kogusest ning ka alles jäänud sahharoosi kogusest. Vähem leidub FOS-i siirupis fruktoosi ja sahharoosi (Adamberg jt., 2014). Pärmid on head suhkrute kasutajad (Gancedo, 1998) ning seetõttu on nende abil võimalik puhastada FOS-i siirupit monosahhariididest (Lu jt., 2012; Yoon jt., 2003; Pan ja Lee, 2005; vt Joonis 4). Selleks ei sobi aga iga pärmiliik, kuna monosahhariidid tuleb ära tarvitada, kuid FOS-id peavad alles jääma. Kirjanduses on oligosahhariidide töötlust pärmidega kirjeldatud üpris pealiskaudselt. On näidatud, et protsessi efektiivsus sõltub kasutatavast pärmist, kasvutingimustest (aeroobne/anaeroobne) ning pärmil elulemusest protsessi vältel (Pratt jt., 2003; Pan ja Lee, 2005; Snoek ja Steensma, 2007). Meie otsustasime FOS-i lahuse töötlemiseks kasutada pagaripärmi *S. cerevisiae* invertaasnegatiivset mutanti Euroscarf[®]i kollektsioonist. Invertaasi geen on vaja pärmil inaktiveerida, sest see ensüüm

lagundab ka FOS-e (Needleman, 1991; Wang ja Needleman, 1996). Ka meie eelnevad katsed pagaripärmi invertaasiga näitasid, et invertaasiga inkubeerides lagundati Lsc3 valguga sünteesitud FOS-id fruktoosiks ja glükoosiks (avaldamata andmed).



Joonis 4. Levaani ja FOS-ide sünteesimine sahharoosist Lsc3 valguga, produktide eraldamine ja puhastamine. Joonis on koostatud artikli Adamberg jt., 2014 andmete põhjal.

Selles töös optimeeriti tingimusi, et saavutada monosahhariidide võimalikult täielik eemaldamine FOS-i lahusest invertaasnegatiivse *S. cerevisiae* ga. Lisaks huvitas meid see, kas ja millises hulgas lisab pärmitöötlus FOS-i lahusesse pärmirakkude metaboliite. Vähetähtis pole ka pärmirakkude metaboolne seisund. Soovisime uurida, kuidas mõjutab FOS-i lahus (suhkrisaldus töötlemisel ~50 g/l e 5%) pärmi metaboolset aktiivsust ja elulemust töötamise käigus.

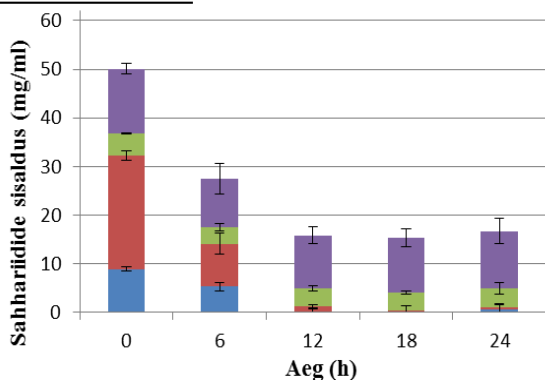
2.3.1 FOS-i lahuse puhastamine pärmi *Saccharomyces cerevisiae* invertaasnegatiivse mutandiga

Selleks, et kontrollida ensümaatilist sünteesitud FOS-i preparaadi prebiootilist toimet, tuleb FOS-i lahus puhastada lisanditest (Lu jt., 2012; Pan ja Lee, 2005). Alles peaksid jääma oligosahhariidid, mis võiksid olla selektiivseks toiduallikaks tervisele kasulikele soolebakteritele, soodustades nende paljunemist ja aktiivsust. Levaani ja FOS-i lahuse eraldamist on kirjeldatud Joonisel 4 ja pt 2.3 alguses.

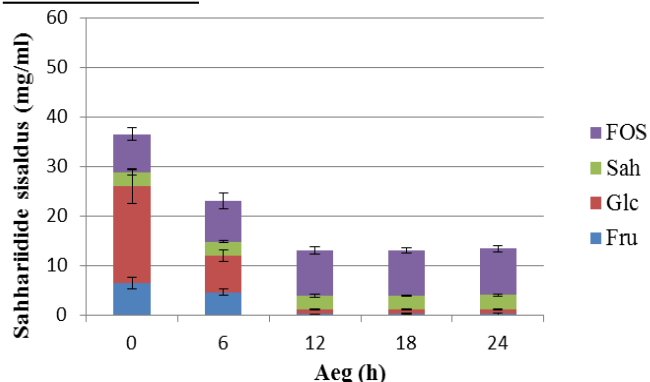
Minu töö põhieesmärgiks oli optimeerida meetodikat FOS-i lahuse puhastamiseks. Selle bakalaureusetöö tulemusi on juba ka teadustöös kasutatud. Nimelt kasutati pärmiga monosahhariididest puhastatud FOS-i lahust FFI projekti raames ilmunud artiklis, milles vaadeldi jämesoolebakteri *Bacteroides thetaiotaomicron* kasvu erinevatel fruktaanidel (Adamberg jt., 2014).

Selle bakalaureusetöö eksperimentides töödeldi FOS-i lahust 24 tunni jooksul kahel moel: 1) aeroobse ja 2) staatilise töötusega. Staatilise töötuse korral rakke ainult segati, et vältida rakkude sadenemist (vt pt 2.2.3). Mõlema töötuse puhul vähenes FOS-i lahuse monosahhariidide sisaldus töötuse lõpuks ~98%. Suhkrute kasutamise kineetika jälgimine näitas, et monosahhariidid (glükoos ja fruktoos) metaboliseeriti nii aeroobse kui ka staatilise töötuse käigus sama kiiresti (12 tunniga). 12 h möödudes oli aeroobsel töötusel glükoosi sisaldus 0,9 mg/ml ning fruktoosi sisaldus 0,1 mg/ml. Staatilisel töötusel oli sama aja möödudes glükoosi sisaldus 1,0 mg/ml ning fruktoosi sisaldus 0,3 mg/ml. Oodatult püsis sahharoosi ja FOS-ide sisaldus pärmitöötuse vältel (24 h) stabiilsena (Joonis 5 ja 6). Kui tahaks FOS-i segust ka sahharoosi eemaldada, siis peaks kasutama mõnda teist invertaasnegatiivset pärmi, näiteks *H. polymorpha*'t, kes kasutab sahharoosi maltaasiga, mis FOS-e ei lagunda (van der Heijden jt, 1999). Ka pagaripärmil on olemas vahendid sahharoosi kasutamiseks ilma invertaasi kasutamata. Näiteks on neil transporter(id) sahharoosi raku transportimiseks ning rakusisene maltaas, mis lagundab lisaks maltoosile ka sahharoosi (Needleman jt., 1978; Viigand ja Alamäe, 2007). Kuid kuna *S. cerevisiae* tüvi BY4741, mille invertaasnegatiivset mutanti selles töös kasutati, ning ka mõned teised selle pärmi tüved ei sünteesi maltaasi tänu defektsele MAL aktivaatorile ja ei kasva seetõttu ka maltoosil (http://wiki.yeastgenome.org/index.php/Commonly_used_strains), siis ei ole sahharoosi lagundamine maltaasiga nende pärmitüvede puhul võimalik.

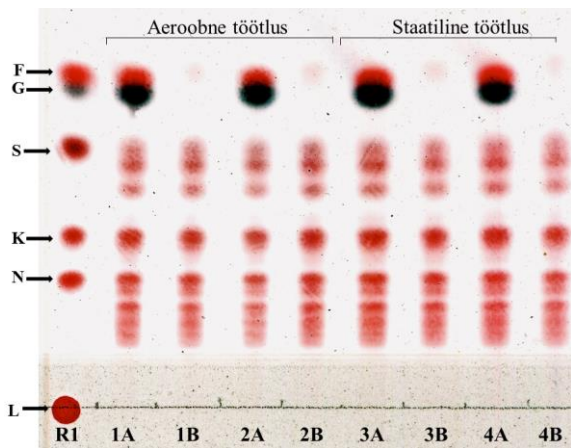
Staatiline töötlus



Aeroobne töötlus



Joonis 5. Monosahhariidide glükoosi ja fruktoosi eemaldamine FOS-i lahusest *S. cerevisiae* invertaasnegatiivse mutandiga. Töötlus toimus temperatuuril 30 °C 24 h staatilistes või aeroobsetes tingimustes. Glükoosi (Glc), fruktoosi (Fru), sahharoosi (Sah) ja FOS-ide kontsentratsioonid (mg/ml) töödeldavas FOS-i lahuses määrati HPLC analüüsil (pt. 2.2.5.4). Joonisel esitatud tulemused ja standardhälbed on esitatud kahe paralleelkatse tulemuste põhjal.



Joonis 6. FOS-i segu lahutamise õhukese kihi kromatograafiaga (TLC). Stardijoonele kanti 0,5 µl proove (1A-4B: aeroobne töötlus 0 h (1A, 2A) ja 24 h (1B, 2B); staatiline töötlus 0 h (3A, 4A) ja 24 h (3B, 4B)). Võrdluseks kanti stardijoonele sama kogus markerit (R1: 100 mM fruktoos (F), 30 mM glükoos (G), 100 mM sahharoos (S), 25 mM 1-kestoos (K), 25 mM nüstoos (N) ja 2% levaan (L). Sahhariidide sisalduse visualiseerimiseks värviti TLC plaati reaktiiviga, mille koostis on esitatud pt 2.2.5.3.

See, millisel määral ja kui kiiresti suudab pärm mono- ja disahhariidide metaboliseerida, sõltub kasutatavast pärmist, kasvutingimustest (aeroobne/anaeroobne) ning pärmil elulemusest (Snoek ja Steensma, 2007; Pan ja Lee, 2005; Pratt jt., 2003). Käesoleva töö katsetes õnnestus FOS-i lahuse monosahhariidide sisaldust oluliselt vähendada (~98%), mille tulemusena suurenes FOS-i sisaldus kogusuhkrust pärast pärmitöötlust ~71%-ni. Enne töötlust oli see palju madalam, 23%.

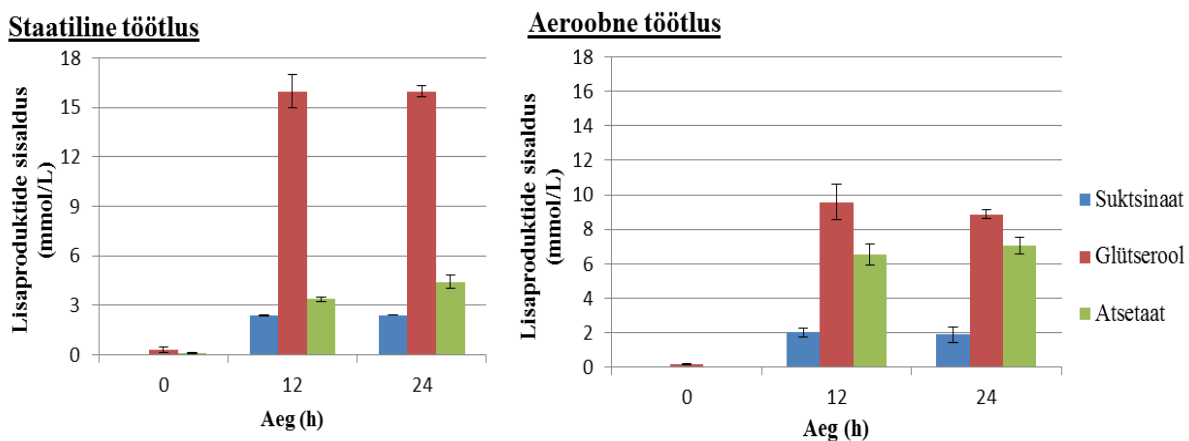
2.3.2 Pärmitöötlusel moodustunud lisaproductid

Pärmid moodustavad fermentatsiooni käigus mitmesuguseidprodukte: etanooli, orgaanilisi happeid ja ka glütserooli (Fernandez-Gracia ja McGregor, 1994). Kuna pagaripärm on etanoolkääritaja, siis kõige enam tekib etanooli. See moodustub atsetaldehyüdi redutseerimisel glükolüüsis moodustunud NADH reoksüdeerimiseks (Dombek ja Ingram, 1987). 24 h möödudes on staatilise töötlemise tulemusena reaktsioonisegu etanooli sisaldus 343 mM ja aeroobsel töötlemisel 292 mM. Etanooli lisandumine FOS-i lahusesse pärmitöötlemisel ei ole takistuseks, sest lahuse hilisemal kontsenteerimisel vaakumis etanool aurustub.

Pärmitöötlemise käigus lisandub FOS-i lahusesse ka glütserooli ja orgaanilisi happeid: suktsinaati ja äädikhapet. Hapniku ligipääsul suureneb fermentatsioonil moodustunud etanooli oksüdeerumine orgaanilisteks hapeteks, mistõttu moodustub orgaanilisi happeid rohkem aeroobse töötlemise korral (suktsinaati 1,9 mM; atsetaati 7,1 mM). Glütserooli moodustub aeroobsel töötlemisel kontsentratsioonis 8,9 mM. Staatilisel töötlemisel moodustub rohkem glütserooli (16,0 mM), suktsinaati moodustub 2,4 mM ja atsetaati 4,4 mM kontsentratsioonis (Joonis 7). Glütserool on peamine osmoprotektor pärmidel ja selle moodustumine aktiveerub kõrge osmootsusega keskkonnas HOG (*high osmolarity glycerol*) raja aktiveerumisel (Blomberg ja Adler, 1992; van Eck jt., 1993). Glütserool moodustub peamiselt pärmitöötlemise algfaasis, kui glükoosi on palju. Sellisel juhul moodustub glükolüüsi käigus fruktoos-1,6-bisfosfaadist dihidroksüatsetoonfosfaat, mille redutseerimisel NADH-ga tekib glütserool. Samuti soodustab glütserooli teket ka rakkude kiire

kasv, sest kiirel kasvul kulub rohkem ATP-d ja rakkudel on vaja suuremal määral reoksüdeerida NADH-d (Mager ja Siderius, 2002; Somsen jt., 2000).

Pärmitöötusel FOS-i lahusele lisanduvate ühendite kontsentratsioonid on piisavalt madalad. Seetõttu ei tohiks ükski tuvastatud ühenditest halvendada töötusel saadud FOS-i preparaate kasutatavust prebiootilise toime uurimisel. Prebiootilist toimet testivates katsetes kasutatud FOS-i lahuse puhul oli orgaanilistest hapetest ainsana katse nullproovis tuvastatav atsetaat (4 mM). Arvame, et see ei muutnud katse tulemust, sest uuriti bakteri *B. thetaiotaomicron* kasvu fruktaanidel ja see bakter moodustab ühe põhiproduktina käärimisel atsetaati (Adamberg jt., 2014). Küll aga mõjutavad lisanduvad ühendid töödeldava lahuse pH-d, muutes FOS-i lahuse happelisemaks (pH 4,5). Vältimaks FOS-ide lagunemist happelises keskkonnas on soovitatav peale pärmitöötlust FOS-i lahus neutraliseerida.



Joonis 7. Lisaproductide moodustumine FOS-i lahuse 24-tunnisel staatilisel ja aeroobsel töötusel *S. cerevisiae* invertaasnegatiivse mutandiga (vt pt. 2.2.3). Orgaaniliste hapete kontsentratsioonid on määratud HPLC-ga (pt 2.2.5.4). Joonisel esitatud tulemused ja standardhälbed on esitatud kahe paralleelkatse tulemuste põhjal.

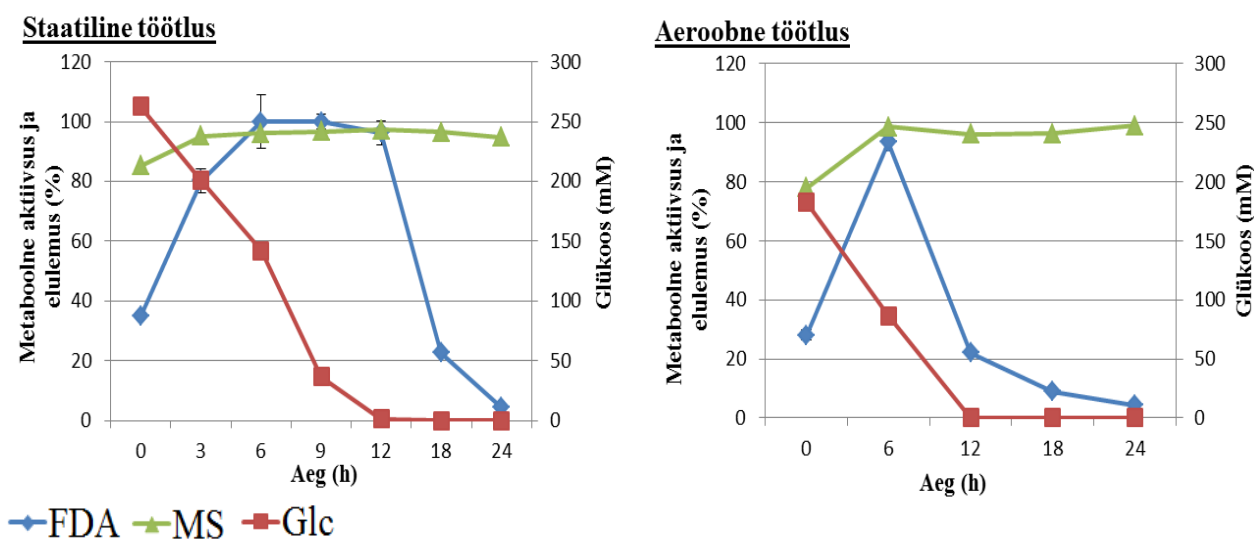
2.3.3 *S. cerevisiae* füsioloogiline seisund staatilisel ja aeroobsel töötusel

Kui pärme kasutada mingi produkti puhastamiseks lisanditest, siis sõltub protsessi tulemus pärmirakkude eluvõimest ja metaboolsest aktiivsusest. Meie katsetes võis rakkude eluvõimet ja metaboolset aktiivsust hakata mõjutama osmootne stress, fermentatsioonil lisanduv etanool jm (Dombek ja Ingram, 1987; Alexandre ja Charpentier, 1998; Pratt jt., 2003; Martínez de Marañon jt., 2001). Meie kasutasime oma katsetes pagaripärmi invertaasnegatiivset mutanti. Invertaas on rakukesta välispinnaga seotud ensüüm ja on arvatud, et invertaasnegatiivsed mutandid võivad olla väiksema stressitaluvusega (Ando jt., 2006). Kui rakud surevad või nende membraanid muutuvad läbilaskvaks, siis võivad rakkudest välja lekkida produktid, mis rikuvad FOS-i preparaadi puhtust.

Minu bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli välja selgitada, kuidas mõjutab pikaajaline inkubeerimine FOS-i lahuses pärmi metaboolset aktiivsust ja elulemust.

Pärmirakkude elulemust on võimalik hinnata rakkude reaktsiooni kaudu metüleensinisega. See värv toimib alternatiivse vesiniku aktseptorina mikroobsetele dehüdrogenaasidele. Metüleensinine valastub kiiresti, kui proovis on rohkesti elusaid mikroobirakke. Surnud mikroobirakud ei valasta metüleensinist ja värvuvad siniseks (Pan ja Lee, 2005).

FOS-i lahuse pärmitöötles on väga oluline ka pärmirakkude metaboolne aktiivsus. Selle hindamiseks värviti rakke FDA-ga. FDA tungib difusiooni teel läbi plasmamembraani pärmirakku ning konverteeritakse seal mittespetsiifiliste esteraaside vahendusel roheliselt fluorestseeruvaks fluoretsiiniks (Clarke jt., 2001). Üldjuhul peaks esteraaside aktiivsus *S. cerevisiae* kasvu jooksul püsima stabiilsena, mistõttu on ensüümi aktiivsuse langus märgiks pärmirakkude metaboolse aktiivsuse vähenemisest (Breeuer jt., 1995). Meie katsed näitasid, et nii aeroobse kui ka staatilise töötlemise tulemusel vähenes pärmirakkude metaboolne aktiivsus katse lõpupoole (12-24 h) (Joonis 8; vt pt 2.2.4.2).



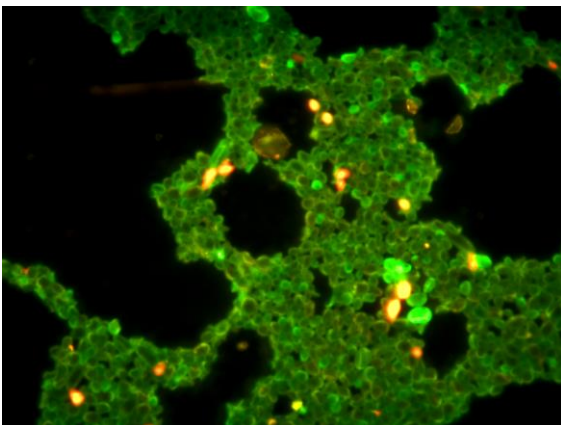
Joonis 8. *S. cerevisiae* elulemus ja metaboolne aktiivsus (%) FOS-i lahuse staatilisel ja aeroobsel töötlemisel 24 h temperatuuril 30 °C (pt. 2.2.3). Rakkude elulemust hinnati metüleensinisega (MS) (pt 2.2.4.1) ja metaboolset aktiivsust FDA-ga värvides (pt. 2.2.4.2). Joonisel on esitatud representatiivsed graafikud kolmest erinevast katsest.

Rakkude metaboolse aktiivsuse vähenemiskõver ei ole staatilise ja aeroobse töötlemise korral ühesugune. Kuna *S. cerevisiae* on paremini kohanenud kasvama anaeroobses (staatilises) keskkonnas (Snoek ja Steensma, 2007), siis püsivad pärmirakud staatilise töötlemise korral pikema perioodi jooksul metaboolset aktiivsed. Katse alguses (0 h proov), mil rakud ei ole veel adapteerunud uue keskkonnaga (FOS-i lahusega), on nende metaboolne aktiivsus madal. Pärmirakud kohanevad uue keskkonnaga suhteliselt kiiresti ning 6-ndaks töötlustunniks on nende

metaboolne aktiivsus taastunud. Pärmirakud on kõige aktiivsemad töötamise esimese 12 h jooksul, mil metaboliseeritakse FOS-i lahusest enamasti glükoosist (vt ka Joonis 5). Peale 12-ndat töötamistundi, mil kasvukeskkonnast saavad otsa kasutatavad suhkrud (glükoos ja fruktoos), jääb invertaasnegatiivne *S. cerevisiae* nälga. Tagajärjeks on pärmiraku metaboolse aktiivsuse kiire vähenemine (Joonis 8).

Elutegevust fermentatsiooniprotsessi vältel mõjutavad mitmed tegurid. Esiteks on fermentatsioonil moodustunud etanool pärmidele toksiline ning on pärmirakkudele üks peamisi stressiallikaid (Dombek ja Ingram, 1987; Alexandre ja Charpentier, 1998). Alexandre ja Charpentier (1998) andmetel hakkab juba 4-6%-line etanooli sisaldus mõjutama pärmide kasvu ja elulemust. Eksponeerides pärmirakke etanooli 10%-lises lahuses 40 minutit, väheneb pärmirakkude elulemus 7-9% võrra. Seega, mida kõrgem on etanooli sisaldus, seda suurem on rakkude suremus (Canetta jt., 2006). Peamiselt mõjutab etanool rakumembraani, muutes seda läbilaskvamaks (Takahashi jt. 2001; Betz jt., 2004; Marza jt., 2002). Etanool põhjustab ka prootonite kontrollimatut liikumist raku, mille tagajärjel häirub H⁺ATPaasi töö ning pH raku sees muutub happelisemaks. Liiga happeline raku sisekeskkond hakkab inhibeerima glükolüüsi (Dombek ja Ingram, 1987). Käesoleva töö eksperimentides kasutati etanooli hästi taluvat pärmi *S. cerevisiae* (Bai jt., 2008) ning etanooli kontsentratsioon reaktsiooniseigus ei ületanud 2%. Seetõttu ei hakanud töötamise käigus tekkinud etanool märkimisväärselt mõjutama *S. cerevisiae* elulemust ega inhibeerima fermentatsiooniprotsessi.

Meie katsed näitasid, et FOS-i lahuse töötlemisel pärmiga väheneb monosahhariidide lõppedes rakkude metaboolne aktiivsus, kuid rakud püsivad töötamise vältel siiski elusad. Seetõttu ei tohiks pärmitöötlus halvendada lõpp-produkti kvaliteeti. Pärmide head füsioloogilist seisundit FOS-i lahuse töötamise lõpul illustreerib Joonis 9.



Joonis 9. Invertaasnegatiivne *S. cerevisiae* peale 24-tunnist staatilist inkubeerimist FOS-i lahuses temperatuuril 30 °C. Pärmirakke värviti FDA ja propiidiiumiodiidi seguga. Metaboolselt aktiivsed elusrakud fluorestseeruvad sellisel töötamisel roheliselt ja surnud rakud punaselt. Foto on tehtud kogusuurendusel 1300 x (vt pt 2.2.4.3).

KOKKUVÕTE

See bakalaureusetöö valmis projekti “*Design and application of novel levansucrase catalysts for the production of functional food ingredients (Functional Food Ingredients, FFI)*” SLOMR12215T raames, mille eesmärk on uudsete prebiootikumide sünteesi levaansukraasiga ja saadud produktide rakenduste otsimine. Seni on prebiootikumidena kasutatud peamiselt taimedest ekstraheeritavat β -2,1 fruktaani (inuliini) ja selle hüdroolüüsiga saadud fruktooligosahhariide. FFI projektis toodetakse ensümaatilise sünteesi teel Lsc 3 valgu abil sahharoosist β -2,6 fruktaane: levaani ja fruktooligosahhariide (FOS-e), mille bioloogilisi efekte, nt prebiootilist toimet kasulikele soolebakteritele, on võrreldes β -2,1 fruktaanidega veel väga vähe uuritud. Selleks, et uurida FOS-i preparaatide prebiootilist toimet, tuleb see puhastada monosahhariidsetest lisanditest. Käesoleva töö eesmärgiks oli viia end kurssi kirjandusega probiootikumide, prebiootikumide ja suhkrusegude puhastamise kohta, töötada välja meetod ensümaatilise sünteesitud FOS-i lahuse puhastamiseks monosahhariididest ja uurida, kuidas mõjutab FOS-i lahuse töötlemine pärmiga rakkude metaboolset aktiivsust ja elulemust töötlemise käigus. Lisaks analüüsiti staatilisel ja aeroobsel töötlemisel moodustunud lisaproductide hulka.

Töö põhitulemused ja järeldused olid järgmised:

1. FOS-i lahuse puhastamiseks kasutati invertaasnegatiivse *S. cerevisiae* tüve, et vältida fruktooligosahhariidide metaboliseerimist.
2. FOS-i lahuse nii staatilisel kui ka aeroobsel töötlemisel kasutati monosahhariidid (glükoos ja fruktoos) ära ~12-ne tunniga. Sahharoosi ja FOS-ide sisaldus püsis eksperimendi vältel (24 h) stabiilsena. Katse lõppedes vähenes FOS-i lahuse monosahhariidide sisaldus ~98%.
3. FOS-i lahuse aeroobsel töötlemisel pärmiga lisandus reaktsioonisegusse peamiselt orgaanilisi happeid (suktsinaati 1,9 mM; atsetaati 7,1 mM) ning glütserooli (8,9 mM).
4. FOS-i lahuse staatilisel töötlemisel lisandus reaktsioonisegusse rohkem glütserooli (16 mM) kui aeroobsel töötlemisel, suktsinaati moodustub ligikaudu sama palju (2,4 mM) kui aeroobsel töötlemisel ja atsetaati umbes poole vähem (4,4 mM) kui aeroobsel töötlemisel. Need kontsentratsioonid on piisavalt madalad ega tohiks segada puhastatud FOS-i preparaatide prebiootilise toime uurimist.
5. Pärmirakud püsivad elusad nii aeroobse kui ka staatilise töötlemise vältel (24 h) – elulemuse määr oli >95%.
6. Monosahhariidide lõppedes väheneb töödeldavas FOS-i lahuses pärmirakkude metaboolne aktiivsus. Staatilisel töötlemisel püsivad pärmirakud aktiivsed ~16 h, aeroobsel töötlemisel ~12 h.

7. Selle töö andmetel võib efektiivseks FOS-ide puhastamiseks soovitada järgmist skeemi: inkubeerida invertaasnegatiivse *S. cerevisiae* rakke ($\sim 3,1 \cdot 10^8$ rakku/ml) ~ 10 x lahjendatud FOS-i lahuses 12 tundi (või kuni glükoos ära kasutatakse) temperatuuril 30 °C. FOS-i lahuse lahjendamiseks soovitame kasutada steriilse kraanivee ja steriilse destilleeritud vee 1:1 segu.

Purification of Lsc3-produced fructooligosaccharides by yeast treatment

Kati Metsla

SUMMARY

Fructooligosaccharides (FOSs) are popular prebiotic compounds used as ingredients in functional foods around the world. These components promote the overall state of well-being and health of humans and reduce the risk of a disease. Prebiotic properties of inulin and inulin-type FOS (β -2,1 linked fructans) have been widely confirmed and they are currently most important components of industrially formulated prebiotic foods. Despite several reports demonstrating potential prebiotic effect of levan-type FOS (β -2,6 linked fructans), the production of these FOS has not reached industrial level.

β -2,6 linked fructans: polymeric levan and short-chain fructooligosaccharides, were synthesized from sucrose using a purified preparation of levansucrase Lsc3 of *P. syringae* pv. tomato. Besides FOS, the resulting product mixture contained low molecular weight sugars: a high concentration of glucose and less fructose and sucrose. In order to investigate the prebiotic potency of levan-type FOS, monosaccharides and sucrose should be removed.

This study was conducted within the project “Design and application of novel levansucrase catalysts for the production of functional food ingredients (Functional Food Ingredients, FFI)” SLOMR12215T.

The aim of this study was to establish a method for purification of the FOS mixture from monosaccharides and use it to produce a FOS preparation for the study of its prebiotic effect. The FOS mixture resulting from precipitation of levan with ethanol, was treated in this work with yeast to remove glucose and fructose. For that, the FOS mixture was diluted 10 x with sterile water distilled water and incubated with an invertase-negative mutant of *S. cerevisiae* in batch under aerobic or static conditions for 24 h. During the treatment, content of saccharides, organic acids and alcohols in the FOS mixture was measured using high-performance liquid chromatography (HPLC). The results indicated that both, static and aerobic treatments reduced the amount of glucose and fructose by ~98% whereas sucrose and FOS were not consumed or degraded. *S. cerevisiae* produced a considerable amount of ethanol, but it evaporates during vacuum concentration of yeast-treated FOS mixture. Despite production of succinate, acetate and glycerol by the yeasts during the treatment, their final concentration in the FOS mixture was low enough not to interfere with application of the preparation for further microbiological studies. Is important to preserve yeast

viability during the FOS mixture treatment to maintain quality of resulting product. Therefore, viability and metabolic activity of yeasts were estimated. It was shown that yeast cells remained alive during the treatment period.

According to this study, we propose following protocol for the purification of enzymatically produced FOS from monosaccharides glucose and fructose. FOS mixture should be diluted with sterile up to total sugar content ~50 g/l and incubated with invertase-negative *S. cerevisiae* (~3,1 cells/ml) under static conditions at 30 °C for 12 hours or until glucose exhaustion.

KIRJANDUSE LOETELU

de Abreu, M., Alvaro-Benito, M., Sanz-Aparicio, J., Plou, F. J., Fernandez-Lobato, M., Alcalde, M. (2013). Synthesis of 6-Kestose using an Efficient β -Fructofuranosidase Engineered by Directed Evolution. *Adv. Synth. Catal.* 355: 1698-1702. doi:10.1002/adsc.201200769.

Adamberg, S., Tomson, K., Vija, H., Puurand, M., Kabanova, N., Visnapuu, T., Jõgi, E., Alamäe, T., Adamberg, K. (2014). Degradation of fructans and production of propionic acid by *Bacteroides thetaiotaomicron* are enhanced by the shortage of amino acids. *Front. Nutr.* 1: 21. doi: 10.3389/fnut.2014.00021.

Alamäe, T., Visnapuu, T., Mardo, K., Mäe, A., Zamfir, A. D. (2012). Levansucrases of *Pseudomonas* bacteria: novel approaches for protein expression, assay of enzymes, fructooligosaccharides and heterooligofructans. *Carbohydr. Chem.* 38: 176-191. doi: 10.1039/9781849734769-00176.

Alexandre, H., Charpentier, C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 20-27.

Ananthalakshmy, V. K., Gunasekaran, P. (1999). Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 42: 291-298.

Ando, A., Tanaka, F., Murata, Y., Takagi, H., Shima, J. (2006). Identification and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6: 249-67.

Bai, F. W., Anderson, W. A., Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* 26: 89-105.

Banguela, A., Hernández, L. (2006). Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnol. Apli.* 23: 202-210.

Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova, L., Danilevics, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process. Biochem.* 38: 701-706.

Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, A., Linde, R. (2005). Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process. Biochem.* 40: 1535-1539.

Ben Ammar, Y., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Minamiura, N. (2002). Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus sp.* TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *J. Biotechnol.* 99: 111-119.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid. Res.* 54: 2325-40. doi 10.1194/jlr.R036012.

Betz, C., Schlenstedt, G., Bailer, S. M. (2004). Asr1p, a novel yeast ring/PHD finger protein, signals alcohol stress to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 279: 28174-28181.

Bielecka, M., Biedrycka, E., Majkowska A., Juskiewicz J., Wróblewska, M. (2002). Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. *Food Res. Int.* 35: 139-144.

- Blaut, M., Klaus, S. (2012). Intestinal microbiota and obesity. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 209: 251-273.
- Blomberg, A., Adler, L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 33: 145-212.
- Bolca, S., van de Wiele, T., Possemiers, S. (2013). Gut metabolites govern health effects of dietary polyphenols. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24: 220-225.
- Bordonaro, M., Venema, K., Putri, A. K., Lazarova, D. L. (2014). Approaches that ascertain the role of dietary compounds in colonic cancer cells. *World J. Gastrointest. Oncol.* 6: 1-10.
- Breeuwer, P., Droccourt, J. L., Bunschoten, N., Zwietering, M. H., Rombouts, F. M., Abee, T. (1995). Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1614-1619.
- Bujacz, A., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., Redzynia, I., Bujacz, G. (2011). Crystal structures of the apo form of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose. *FEBS J.* 278: 1728-1744.
- Canetta, E., Adya, A. K., Walker, G. M. (2006). Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. *FEMS Microbiol. Lett.* 255: 308-315.
- Carabin, I. G., Flamm, W. G. (1999). Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 30: 268-282.
- Chambert, R., Petit-Glatron, M. F. (1991). Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 279: 35-41.
- Clarke, J. M., Gillings, M. R., Altavilla, N., Beattie, A. J. (2001). Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *J. Microbiol. Methods.* 46: 261-267.
- Crittenden, R. G., Playne, M. J. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 353-361.
- Dalai, A. K., Rao, M. S., Gokhale, K. V. G. K. (1985). Synthesis of NaX zeolite using silica from rice husk ash. *Ind. Eng. Chem. Prod. Dev.* 24: 465-468.
- Delzenne, N. M., Roberfroid, M. R. (1994). Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* 27: 1-6.
- Dombek, K. M., Ingram, L. O. (1987). Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1286-1291.
- Dominguez, A. L., Rodrigues, L. R., Lima, N. M., Teixeira, J. A. (2014). An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. *Food Bioprocess Technol.* 7: 324-337.
- Duncan, S. H., Holtrop, G., Lobley, G. E., Calder, A. G., Stewart, C. S., Flint, H. J. (2004). Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br. J. Nutr.* 91: 915-923.
- van Eck, J. H., Prior, B. A., Brandt, E. V. (1993). The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1047-1054.

- Esawy, M. A., Amer, H., Gamal-Eldeen, A. M., Enshasy, H. A. E., Helmy, W. A., Abo-Zeid, M. A., Awad, G. E. (2013). Scaling up, characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation. *Carbohydr. Polymers*. 95: 578-587.
- Fernandez-Gracia, E., McGregor, J. U. (1994). Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. *J. Dairy Sci.* 77: 2934-2939.
- Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 334-361.
- Ghazi, I., Fernández-Arrojo, L., Garcia-Arellano, H., Plou, F. J., Ballesteros, A. (2007). Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *J. Biotechnol.* 128: 204-211.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of *Bifidobacteria* in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 108: 975-982.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., van Loo, J. A., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17: 259-275.
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy E. F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci. Technol. Bulletin: functional foods*. 7: 1-19.
- Hamilton-Miller, J. M. T., Gibson, G. R., Bruck, W. (2003). Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. *Br. J. Nutr.* 90: 845.
- Han, W. C., Byun, S. H., Kim, M. H., Sohn, E. H., Lim, J. D., Um, B. H., Kim, C. H., Kang, S. A., Jang, K. H. (2009). Production of lactosucrose from sucrose and lactose by a levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 1153-1160.
- van der Heijden, A. M., van Hoek, P., Kaliterna, J., van Dijken, J. P., van Rantwijk, F., Pronk, J. T. (1999). Use of the yeast *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) to remove contaminating sugars from ethyl β -D-fructofuranoside produced during sucrose ethanolysis catalysed by invertase. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 82-86.
- Hellwege, E. M., Czapla, S., Jahnke, A., Willmitzer, L., Heyer, A. G. (2000). Trangenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 8699-8704.
- Hermann, M., Freire, I., Pazos, C. 1999. Compositional diversity of the yacon storage root. p. 425-432. In: *Impact on a changing world, Program Report 1997-1998*. International Potato Centre (CIP), Lima, Peru.
- Hernández, L., Arrieta, J., Menéndez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. F., Chambert, R. (1995). Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 309: 113-118.
- Hettwer, U., Gross, M., Rudolph, K. (1995). Purification and properties of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J. Bacteriol.* 177: 2834-2839.
- van Hijum, S. A. F. T., Bonting, K., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2001). Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 323-328.

- van Hijum, S. A. F. T., Szalowska, E., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*. 150: 621-630.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn D., Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis - mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* 407: 189-198.
- Jork, H., Frunk, W., Fischer, Wimmer, H. 1990. Thin-layer chromatography: reagents and detection methods. p. 179. vol. 1a, VCH, Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim (Federal Republic of Germany).
- Kim, K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S., Kim, C. H. (2005). Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J. Cosmet. Sci.* 56: 395-406.
- Knowles, S. E., Jarrett, I. G., Filsell, O. H., Ballard, F. J. (1974). Production and utilization of acetate in mammals. *Biochem. J.* 142: 401-411.
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 323-35. doi: 10.1038/nrmicro2746.
- Kuhn, R. C., Mazutti, M. A., Filho, F. M. (2014^A). Separation and purification of fructooligosaccharides on a zeolite fixed-bed column. *J. Sep. Sci.* 37: 927-933.
- Kuhn, R. C., Mazutti, M. A., Albertini, L. B., Filho, F. M. (2014^B). Evaluation of fructooligosaccharides separation using a fixed-bed column packed with activated charcoal. *N. Biotechnol.* 31: 237-241.
- van Laere, K. M. J., Hartemink, R., Boseveld, M., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. (2000). Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1644-1652.
- Lafraya, A., Sanz-Aparicio, J., Polaina, J., Marin-Navarro, J. (2011). Fructo-Oligosaccharide Synthesis by Mutant Versions of *Saccharomyces cerevisiae* Invertase. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 6148-6157.
- Lammens, W., le Roy, K., Schroeven, L., van Laere, A., Rabijns, A., van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J. Exp. Bot.* 60: 727-740.
- Liiv, L., Pärn, P., Alamäe, T. (2001). Cloning of maltase gene from a *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 222: 293-298.
- Lim, J. S., Lee, J. H., Kang, S. W., Park, S. W., Kim, S. W. (2007). Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase. *European. Food Research. Technol.* 225: 457-462.
- van Loo, J., Coussement, P., de Leenheer, L., Hoebregs, H., Smits, G. (1995) On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 35: 525-552.
- Lu, L., Wu, J., Song, D., Zhao, H., Gu, G., Guo, Y., Lan, J., Xiao, M. (2012). Purification of fructooligosaccharides by immobilized yeast cells and identification of ethyl β -D-fructofuranoside as a novel glycoside formed during the process. *Bioresour. Technol.* 132: 365-369.

- Lyness, E. W., Doelle, H. W. (1983). Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 5: 345-350.
- Mager, W. H., Siderius, M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res.* 2: 251-257.
- Makras, L., van Acker, G., de Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6531-6537.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Elmi, T., Alamäe, T. (2014). Mutational analysis of conserved regions harboring catalytic triad residues of the levansucrase protein encoded by the *lsc-3* gene (*lsc3*) of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 61: 11-22.
- Marza, E., Camougrand, N., Manon, S. (2002). Bax expression protects yeast plasma membrane against ethanol-induced permeabilization. *FEBS Lett.* 521: 47-52.
- Martínez de Marañón, I., Tourdot-Marechal, R., Gervais, P. (2001). Involvement of osmotic cell shrinkage on the proton extrusion rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 241-246.
- Marx, S. P., Winkler, S., Hartmeier, W. (2000). Metabolization of β -(2,6)-linked fructoseoligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 163-169.
- Mendoza, E., Gracia, M. L., Casas, C., Selgas, M. D. (2001). Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat. Sci.* 57: 387-393.
- Mikelsaar, M., Zilmer, M. (2009). *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb. Ecol. Health Dis.* 21: 1-27.
- Milala, J., Grzelak, K., Król, B., Juśkiewicz, J., Zdunczyk, Z. (2009). Composition and properties of chicory extracts rich in fructans and polyphenols. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 59: 35-43.
- Moshfegh, A. J., Friday, J. E., Goldman, J. P., Ahuja, J. K. C. (1999). Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *J. Nutr.* 129: 1407S-1411S.
- Mussatto, S. I., Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydr. Polymers.* 68: 587-597.
- Needleman, R. (1991). Control of maltase synthesis in yeast. *Mol. Microbiol.* 5: 2079-2084.
- Needleman, R. B., Federoff, H. J., Eccleshall, T. R., Buchferer, B., Marmur, J. (1978). Purification and characterization of an alpha-glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochemistry.* 17: 4657-4661.
- Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they? *J. Nutr.* 129: 1402S-1406S.
- Ojansivu, I., Ferreira, C. L., Salminen, S. (2011). Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends Food Sci. Technol.* 22: 40-46.
- Oosterveld, A., Beldman, G., Voragen, A. G. J. (2002). Enzymatic modification of pectic polysaccharides obtained from sugar beet pulp. *Carbohydr. Polymers.* 48: 73-81.
- Ozimek, L. K., Kralj, S., van der Maarel, M. E. C., Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology.* 152: 1187-1196.

- Pan, Y. C., Lee, W. C. (2005). Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnol Bioeng.* 89: 797-804.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., Olvera, C., Munguia, A. L. (2014). Levan-type FOS production using *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process. Biochem.* 49: 783-790.
- Praznik, W., Beck, R. H. F. (1985). Application of gel permeation chromatographic systems to the determination of the molecular weight of inulin. *J. Chromatogr.* 348: 187-197.
- Pratt, P. L., Bryce, J. H., Stewart, G. G. (2003). The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *J. Inst. Brew.* 109: 218-228.
- Rastall, R. A., Maitin, V. (2002). Prebiotics and synbiotics: Towards the next generation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 490-496.
- Rivero-Urgell, M., Santamaria-Orleans, A. (2001). Oligosaccharides: Application in infant food. *Early Hum. Dev.* 65: S43-S52.
- Roberfroid, M. (2007^a). Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.* 137: 830S-837S.
- Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *Br. J. Nutr.* 93: S13-S25.
- Roberfroid, M. B. (2007^b). Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J. Nutr.* 137: 2493S-2502S.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, 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., Neyrinck, A. M., Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104: S1-63.
- Roberfroid, M., Slavin, J. (2000). Nondigestible oligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40: 461-480.
- Rombeau, J. L., Kripke, S. A. (1990). Metabolic and intestinal effects of short-chain fatty acids. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 14: 181S-185S.
- 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. *Appl Environ. Microbiol.* 71: 6150-6158.
- Rozen, R., Bachrach, G., Bronshteyn, M., Gedalia, I., Steinberg, D. (2001). The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 195: 205-210.
- Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int. Dairy J.* 9: 69-80.
- Sangeetha P. T., Ramesh M. N., Prapulla S. G. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 442-457.
- Scheppach, W. (1994). Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut.* 1: 35: S35-S38.
- Sheu D. C., Chang J. Y., Wang C. Y., Wu C. T., Huang C. J. (2013). Continuous production of high-purity fructooligosaccharides and ethanol by immobilized *Aspergillus japonicus* and *Pichia*

heimii. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36: 1745-1751.

Snoek, I. S. I., Steensma, H. Y. (2007). Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 24: 1-10.

Somsen, O. J., Hoeben, M. A., Esgalhado, E., Snoep, J. L., Visser, D., van der Heijden, R. T., Heijnen, J. J., Westerhoff, H. V. (2000). Glucose and the ATP paradox in yeast. *Biochem. J.* 352: 593-599.

Song, D. D., Jacques, N. A. (1999). Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem. J.* 341: 285-291.

Sonnenburg, E. D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S. K., Firbank, S. J., Bolam, D. N., Sonnenburg, J. L. (2010). Specificity of polysaccharide use in intestinal *Bacteroides* species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell*. 141: 1241-1252.

Stiengle, F., Newell, J. W., Neeser, J. R. (1999). Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol.* 181: 6354-6360.

Takahashi, T., Shimoi, H., Ito, K. (2001). Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 370: 35-46.

Trujillo, L. E., Gomez, R., Banguela, A., Soto, M., Arrieta, J. G., Hernández, L. (2004). Catalytic properties of N-glycosylated *Gluconoacetobacter diazotrophicus* levansucrase produced in yeast. *Electron. J. Biotech.* 7: 116-123.

Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M. P., Valdez-Alarcón, J. J. (2009). Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *J. App. Microbiol.* 106: 1763-1778.

Viigand, K., Alamäe, T. (2007). Further study of the *Hansenula polymorpha* MAL locus: characterization of the alpha-glucoside permease encoded by the *HpMAL2* gene. *FEMS Yeast Res.* 7: 1134-1144.

Vijn, I., Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* 120: 351-360.

Visnapuu, T. (2012). Levansucrases encoded in the genome of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: heterologous expression, biochemical characterization, mutational analysis and spectrum of polymerization products. IMCB, University of Tartu.

Visnapuu, T., Mardo, K., Alamäe, T. (2015). Levansucrases of a *Pseudomonas syringae* pathovar as catalysts for the synthesis of potentially prebiotic oligo- and polysaccharides. *N Biotechnol.* doi:10.1016/j.nbt.2015.01.009.

Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A. D., Vigants, A., Alamäe, T. (2011). Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Substrate specificity, polymerizing properties and usage of different acceptors for fructosylation. *J. Biotechnol.* 155: 338-349.

Visnapuu, T., Mäe, A., Alamäe, T. (2008). *Hansenula polymorpha* maltase gene promoter with sigma 70-like elements is feasible for *Escherichia coli*-based biotechnological applications: Expression of three genomic levansucrase genes of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Process. Biochem.* 43: 414-422.

- Visnapuu, T., Zamfir, A. D., Mosoarca, C., Stanescu, M. D., Alamäe T. (2009). Fully automated chip-based negative mode nanoelectrospray mass spectrometry of fructooligosaccharides produced by heterologously expressed levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 23: 1337- 1346.
- Voragen, A. G. J. (1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trens Food Sci. Technol.* 9: 328-335.
- Waldherr, F. W., Meissner, D., Vogel, R. F. (2008). Genetic and functional characterization of *Lactobacillus panis* levansucrase. *Arch. Microbiol.* 190: 497-505.
- Wang, J., Needleman, R. (1996). Removal of a Mig 1p binding site converts a MAL 63 constitutive mutant derived by interchromosomal gene conversion to glucose insensitivity. *Genetics.* 142: 51-63.
- Yanai, K., Nakane, A., Kawate, A., Hirayama, M. (2001). Molecular cloning and characterization of the fructooligosaccharide-producing beta-fructofuranosidase gene from *Aspergillus niger* ATCC 2061 I. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 766-773.
- Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K., Okamoto, K. (2002). Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J. Biochem.* 132: 565-572.
- Yoo, S. H., Yoon, E. J., Cha, J., Lee, H. G. (2004). Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 34: 37-41.
- Yoon, S. H., Mukerjea, R., Robyt, J. F. (2003). Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. *Carbohydr. Res.* 338: 1127-1132.
- Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides - occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microbial. Technol.* 19: 107-117.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

www.beneo.com

<http://www.memidex.com/prebiotic>

<http://www.sigmaaldrich.com/>

<http://insights.ingredientsnetwork.com/beneo-gets-efsa-inulin-approval/>

<http://www.fnsugar.co.jp/eng/inulin.html>

www.euroscarf.de

[http://wiki.yeastgenome.org/index.php/Commonly used strains](http://wiki.yeastgenome.org/index.php/Commonly_used_strains)

www.loodustooode.ee

www.umami.ee

www.prismamarket.ee

www.hellus.tere.eu

www.largo.ee

www.felix.ee

www.enda.jooksu.ee

www.apteekonline.ee

www.n1.ee

LISAD

LISA 1

Inuliini ja oligosahhariididega rikastatud tooted Eesti polettidelt.

Toode	Allikas
Hommikusöögipulber Femisoja Plus	www.loodustode.ee
Agaavi siirup	www.umami.ee
Naturaalne sigurikohv mustikaekstraktiga	www.prismamarket.ee
Hellus rabarberi-kaera jogurt	www.hellus.tere.eu
Hellus metsamarja jogurt	www.hellus.tere.eu
Hellus mustika-banaani jogurt	www.hellus.tere.eu
Helluse maasika jogurt	www.hellus.tere.eu
Helluse õuna-kaera	www.hellus.tere.eu
Helluse õuna-kaera-mee jogurt	www.hellus.tere.eu
Largo ploominektar	www.largo.ee
Felix Voila Võileiva margariin	www.felix.ee
Farmi Basic sarja jogurtid	www.enda.jooksu.ee
La Karnita Green Coffee	www.apteekonline.ee
Yomi oomego-3 närimistabletid	www.apteekonline.ee
Takjaõli	www.apteekonline.ee
Marsimehe vitamiinid	www.nl.ee

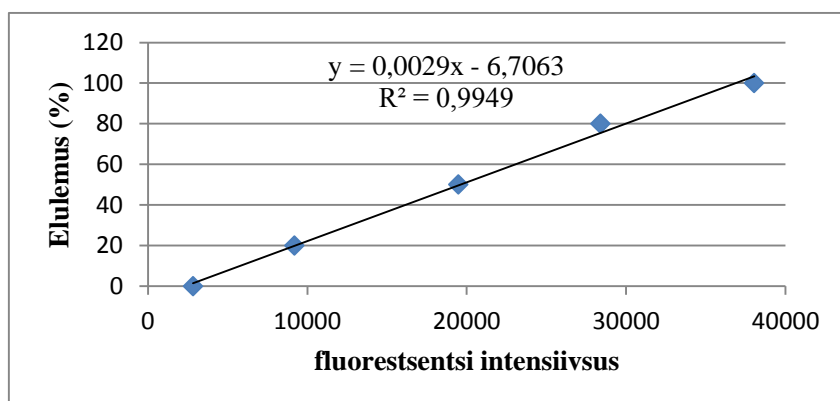
LISA 2

Saccharomyces cerevisiae tüve BY4741 invertaasnegatiivse mutandi Y02321 FDA kaliibergraafiku konstrueerimine

Kaliibergraafiku tegemiseks kasvatati invertaasnegatiivse *S. cerevisiae* rakke üleöö (18h) 5 ml-s 2% YPD vedelsöötmes, kuhu lisati 500 µl (10%) FOS-i siirupit. Kultuuri aereeriti loksutil (180 rpm, 30 °C). Rakud pesti üks kord autoklaavitud kraanivees ning suspendeeriti 5 ml-s autoklaavitud kraanivees.

Üks osa rakke (2 ml) surmati temperatuuril 80 °C Biosan TDB-120 termostaadis 10 min. Teine osa rakke (elusad) hoiti jääl. Seejärel viidi kummagi proovi rakkude tihedus OD_{600nm} väärtuseni ~0,2. Kaliibri moodustamiseks pipeteeriti omavahel vastavas suhtes kokku elusad ja surnud rakud (100:0; 80:20; 50:50; 20:80 ja 0:100). Seejärel kanti igast proovist 100 µl mustale 96-kaevulisele mikrotiiterplaadile (Greiner Bio-One REF 655209) ning seejärel lisati 100 µl FDA töölahust. FDA lõppkontsentratsioon analüüsitavas proovis oli 20 µg/ml.

Proovi ja FDA töölahusega mikrotiiterplaati inkubeeriti 30 °C termostaadis, peale 15 minutulist inkubatsiooni mõõdeti proovide fluorestsents spektrofotomeetriga (Infinite M200 PRO Tecan; Ex 485/Em 527 nm, integratsiooniaeg 20 ms). Iga proov oli mõõtmisel kolmes korduses. Nende mõõtmiste tulemuste põhjal arvutati keskmine.



Kaliibergraafikul on kujutatud *S. cerevisiae* elulemuse (%) ja fluorestsentsi intensiivsuse korrelatsioon (pt. 2.2.4.2).

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kati Metsla (27.11.1992)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Lsc 3 valguga sünteesitud fruktooligosahhariidide puhastamine pärmitöötusega

Mille juhendajad on Eerik Jõgi ja Tiina Alamäe,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015