

TALLINNA REALKOOL

SOFIA MARLENE HAUG

136.A, REAAL-PROGRAMMEERIMISE ÕPPESUUND

POLÜSAHHARIIDSE LEVAANI MÕJU HINDAMINE VALITUD BAKTERILIIDIDE KASVULE NING TEKKINUD PRODUKTIDE ANALÜÜS

JUHENDAJAD MARTIN SAAR JA PHD TRIINU VISNAPUU

SISSEJUHATUS

Fruktaanid on looduses esinevad fruktoosijääkidest koosnevad polüsahhariidid, mis võivad erineda sidemetüübi, molekulmassi ning hargnemiste osakaalu poolest. Lähtudes fruktoosijääkide vahel olevast sidemetüübist saab fruktaanid jagada kolme suuremasse rühma: inuliinid, levaanid ja segatüüpi fruktaanid.

Kuna mitmed tähtsad põllukultuurid sisaldavad fruktoosist koosnevaid polümeere, siis ei puudu fruktaanid ka meie toidulaualt. Näiteks on neid leitud kaerast, sibulast, nisust ja sparglist. Sellele vaatamata on need polüsahhariidid suhteliselt vähetuntud ja -uuritud. Tänapäeval nähakse fruktaanides suurt potentsiaali just funktsionaalsete toidu komponentidena ja tervisetoodetena. Lisaks võimalikele kasutusalaadele toidus, on fruktaanidel muidki potentsiaalseid kasutusvõimalusi näiteks nanotehnoloogias, kosmeetikas ja meditsiinis. Need biopolümeerid on valdavalt ilma maitseta, vees suhteliselt hästi lahustuvad, inimestele ja ka loomadele seedumatud. Avastused bioloogias näitavad, et bakteritele ja ka taimedele on fruktaanid väga tähtsad varuainena, tagavad parema kaitse kuivamise ja muude stressitingimuste vastu.

Inimesed elavad sümbioosis soolestikus toimetavate bakteritega ning on tõestatud, et inuliini-tüüpi fruktaanid on prebiootiliste omadustega ehk stimuleerivad selektiivselt kasulike (probiootiliste) bakterite kasvu. Hetkel ainus Euroopa Liidus lubatud prebiootikum on taimne inuliin. Levaanide kohta on aga tunduvalt vähem teavet. Levaane ei ole võimalik olnud tööstuslikus mahus toota ja seetõttu ka erinevateks eksperimentideks kasutada.

Soolestiku mikroobikoosluse uurimine ja prebiootikumide kasutamine soovitatavate bakterirühmade stimuleerimiseks on teaduses väga populaarne uurimisvaldkond. Otsitakse

erinevate kasulike omadustega ning võimalikult lihtsalt või odavalt kättesaadavaid prebiootikume. Seetõttu on suurt tähelepanu pööratud mikroorganismidele, kuna neil on olemas väga efektiivsed ja stabiilsed ensüümid, mis sünteesivad lihtsatest sahhariididest nagu sahharoos fruktaane. Selle valdkonnaga tegeleb Tartu Ülikooli bakteri- ja pärmivalkude uurimiserühm, kelle juures ma oma uurimistööd tegin. Töögrupis on eraldatud bakterist *Pseudomonas syringae* DC3000 ensüüm, mis on väga stabiilne ning toodab tõhusalt nii polüfruktaani, levaani, kui ka lühema ahelapikkusega oligosahhariide. Seega saab selle ensüümi abil edukalt toota levaani ning kasutada seda levaani-tüüpi oligosahhariidide sünteesi lähtematerjalina, et testida levaani prebiootilist potentsiaali.

Uurimistöö eesmärk oli hinnata levaani ja levaanist tehtud oligosahhariidide mõju valitud probiootiliste ja potentsiaalselt patogeensete bakterite elutegevusele ning määrata, kas ja millised produktid levaani lagundamisel tekivad.

Töös esitasin järgmised uurimisküsimused:

- 1) milline bakterite sööde sobib levaani mõju hindamiseks erinevate bakteriliikide korral;
- 2) kas ja kuidas mõjutavad erineva ahelapikkusega levaanid probiootiliste ja potentsiaalselt patogeensete bakterite kasvu ja kasvudünaamikat ning -kiirust;
- 3) millised reaktsiooniproduktid tekivad, kui valitud bakterid kasvavad levaani või levaani-FOS-e sisaldavas söötmes?

Töö alguses püstitati järgmised hüpoteesid: i) kõige sobivam sööde bakteritele levaani mõju hindamiseks on MRS sööde; ii) levaani-tüüpi fruktaanid soodustavad probiootiliste bakterite kasvu, kuid ei avalda mõju potentsiaalselt tõvestavatele bakteritele; iii) bakterid lagundavad fruktaane endo-aktiivsusega ensüümidega ning seetõttu tekib reaktsioonis erinevate ahelapikkusega sahhariide. Testiti 3 erineva MRS söötme retsepti, et leida valitud bakteritüvedele sobivaim. Bakteritüvede kasvuerinevuste testimiseks erinevatel sahhariididel tehti tilkkülvi katse. Kasvu täpsemaks analüüsimiseks koostati iga bakteritüve kasvu kohta iga erineva sahhariidiga minimaalsöötmes kasvukõver. Sahhariide määrati õhukese kihi kromatograafiaga.

Siinne uurimistöö on jaotatud kolmeks osaks. Esimeses osas antakse ülevaade teemakohasest kirjandusest ja selgitatakse teema aktuaalsust. Teine osa on omakorda jaotatud kaheks: kasutatud materjalid ja meetodid. Esmalt kirjeldatakse töös kasutatud vahendeid: söötmeid, bakteritüvesid ja sahhariide. Sellele järgneb ülevaade töö käigus kasutatud meetodikast. Kolmandas osas esitatakse katsete tulemused ja andmete analüüs ning tehakse järeldused.

Täna oma juhendajat Triinu Visnapuud, kes andis mulle võimaluse sellel teemal oma uurimistöö kirjutada ning kes oli suureks abiks nii töö praktilises kui ka kirjalikus osas.

SISUKORD

SISSEJUHATUS	1
Kasutatud lühendid	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Fruktaanid ja nende esinemine looduses	6
1.2. Bakteriaalsed fruktaanid	9
1.3. Fruktaanide potentsiaalsed kasutusala	10
1.4. Varasemad uurimistööd levaanide või levaani-tüüpi frukto-oligosahhariidide kasutamise kohta bakterite kasvusubstraatidena	12
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	15
2.1. Materjalid	15
2.1.1 Sahhariidid	15
2.1.2. Mikrobioloogilised söötmed ja bakterite kasvutingimused	15
2.1.3. Bakteritüved	17
2.2. Metoodika	18
2.2.1. Sobiva MRS söötme valimine bakteritüvedele	18
2.2.2. Kasvuerinevuste testimine MRS tardsöötme tilkkülvi meetodiga	18
2.2.3. Kasvukõverate koostamine	19
2.2.4. Sahhariidide määramine õhukese kihi kromatograafia (TLC) abil	21
3. TULEMUSED JA ARUTELU	23
3.1. Bakteritüved ja neile sobiva MRS söötme valimine	23
3.2. Bakteritüvede kasvuerinevuste testimine tilkkülvi meetodiga	26
3.2. Bakterite kasvu hindamine minimaalsöötmes kõverate abil	27
3.4. Sahhariidide kindlakstegemine erinevatel ajapunktidel	31
KOKKUVÕTE	36
RESÜMEE	38
ABSTRACT	39
KASUTATUD MATERJALID	40

Lisa 1. Tilkkülvi katse skeem	45
Lisa 2. Tilkkülvi katse tulemused MRS söötmetel	46
Lisa 3. <i>Ba. subtilis</i> 'e rakud levaani minimaalsöötmes	49
LISA 4. Kinnitusleht	50

Kasutatud lühendid

C-allikas – süsinikuallikas

Da – dalton, molekulmassi ühik

EPS – eksopolüsahhariid

FOS – frukto-oligosahhariid

FT – fruktosüüli transferaas

GH – glükosiidi hüdrolaas

IFOS – levaani-tüüpi frukto-oligosahhariidid

Lsc3 – *Pseudomonas syringae* DC3000 levaansukraas

M9 – minimaalsööde M9 mineraalide segu baasil

MRS – piimhappebakterite sööde (De Man, Rogosa ja Sharpe'i sööde)

Orafti® P95 – taimset oligofruktoosi sisaldav preparaat firmalt BENEIO GmbH (Belgia), kasutusel funktsionaalse toidu komponendi ja prebiootikumina

PA – polümerisatsiooniasend

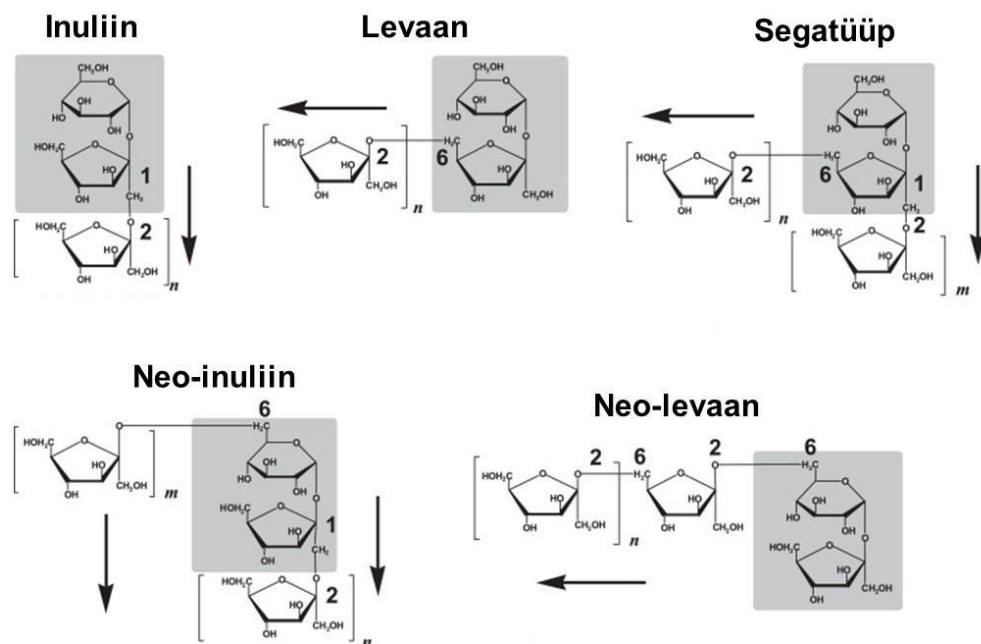
Tween 80 – mitteioonse surfaktant polüsorbaat 80

TLC – õhukese kihi kromatograafia (ingl k *thin layer chromatography*)

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Fruktaanid ja nende esinemine looduses

Polüsahhariidid on maakeral väga levinud ühendid, mis koosnevad erinevatest suhkrujääkidest. Fruktaanid on valdavalt fruktoosi monomeeridest koosnevad polümeerid, mis moodustavad suure süsivesikute rühma ning on oma päritolu ja omaduste poolest üsna mitmekesised. Fruktaanidel, mida sünteesitakse eelkõige sahharoosist, võib olla erinev glükosiidsideme tüüp monomeeride vahel, polümerisatsiooniaste (PA) ning molekuli hargnemisaste (Visnapuu, 2012, lk 13). Sõltuvalt sidemetüübist fruktoosi monomeeride vahel ja glükoosijäägi paiknemisest ahelas jagatakse fruktaanide polümeerid viide rühma – levaanid, neo-levaanid, inuliinid, neo-inuliinid ja segatüüpi fruktaanid (joonis 1). Põhiliselt leidub looduses levaani- ja inuliini-tüüpi suhkruid. Neo-suhkruid esineb harva ja looduses on vähe ensüüme, mis neid sünteesida suudavad. Sellised ensüüme esineb eelkõige hallitusseente hulgas (Aasamets, 2016, lk 14–15).



Joonis 1. Inuliini-tüüpi, levaani-tüüpi, neo-inuliini, neo-levaani ja segatüüpi fruktaanide struktuurid. Numbritega on näidatud sideme tüüp fruktoosijääkide vahel (sideme moodustav süsinik). Tumedal taustal on fruktaani ahela alguspunktiks olev sahharoos, mis on fruktaanide sünteesil esimene aktseptormolekul, millele hakatakse omakorda fruktoosijääke liitma. Nool näitab ahela pikenemise suunda. Nurksulud ja allindeksina märgitud m ja n tähistavad ahela korduvaid motiive (fruktoosijääke), mille arv ei ole märgitud. (modifitseeritud artiklist Benklebia, 2013)

Esimene etapp polüsahhariidse fruktaani sünteesil on frukoosijäägi ülekanne doonormolekulilt, näiteks sahharoosilt, aktseptor- ehk vastuvõtja-molekulile, mis esimeses etapis on samuti sahharoos. Kui fruktoosijääk liidetakse β -2,6 sidemega, moodustub selles etapis 6-kestoos. Inuliini tekkel on fruktaani eellasmolekuliks 1-kestoos, neo-levaanil ja neo-inuliinil neokestoos, mis omakorda toimivad aktseptoritena ja mida edasi pikendatakse (joonis 1). Kestoosid on trisahhariidid, mis koosnevad ühest glükoosijäägist ning kahest fruktoosijäägist. Neid jagatakse erinevatesse rühmadesse selle järgi, millise süsiniku kaudu monomeerid omavahel liitunud on (Ritsema, Smeekens, 2003). Levaani põhiahelas on fruktoosi monomeerid ühendatud β -2,6 sidemega, seevastu inuliini põhiahelas on fruktoosi monomeeride vahel β -2,1 side. Molekuli hargnemine toimub vastavalt kas β -2,1 või β -2,6 glükosiidsidemete kaudu (Hettwer *et al.*, 1995).

Inuliin ja levaan erinevad lisaks sidemetüübile ka ahelapikkuse ja molekulmassi poolest. Inuliini PA on suhteliselt madal. Näiteks siguri (*Cichorium intybus*) juurtest ja maapirnide mugulatest (mugul-päevalill või topinambur, *Helianthus tuberosus*) eraldatud inuliini PA on 10–30. Korvõieliste taimede hulgas on suurima PA-ga inuliin (PA kuni 200) eraldatud artišokist (*Cynara scolymus*) (Banguela, Hernández, 2006). Levaani polümerisatsiooniaste on enamasti palju suurem kui inuliinil ja see sõltub ka konkreetsest ensüümist, millega see sünteesiti, ja ka rakendatud reaktsioonitingimustest. Levaani molekulmass võib olla enam kui 1×10^6 daltonit (Da) (Vijn, Smeekens, 1999). *Pseudomonas syringae* DC3000, mis võib nakatada tomatit ja *Arabidopsis thaliana*'t, levaansukraasi Lsc3 sünteesitud levaani keskmine PA, määratuna glükoosi ja fruktoosi sisalduse järgi happeliselt hüdrolüüsitud levaanis, oli vähemalt 100 (Visnapuu *et al.*, 2008). Molekulmassi määramine kromatograafilise meetodiga andis polümeerse levaani puhul tulemuseks $4,7 \times 10^6$ Da (Mardo *et al.*, 2017). Väiksema molekulmassiga fruktaanid (nt kestoosid) on magusa maitsega, aga pikemad fruktaaniahelad seovad vett ja moodustavad rasvalaadse tekstuuriga emulsiooni, millel on neutraalne maitse (Vijn, Smeekens, 1999).

Neo-levaan ja neo-inuliin moodustuvad neokestoosist, milles glükoosi monomeer asub kahe fruktoosi monomeeri vahel (joonis 1) (Van den Ende, 2013). Kui ühes fruktaanis on esindatud nii β -2,6 kui β -2,1 sidemega põhiahelad, siis kutsutakse neid segatüüpi fruktaanideks (Ritsema, Smeekens, 2003). Glükoosijäägi paiknemise järgi ahelas saab segatüüpi fruktaane jagada omakorda kahte rühma: kui glükoos asub nii ahela otsas kui ka selle sees, on tegu agaviiniga, kui glükoosijääk paikneb ainult ahela alguses, siis graminaaniga (Carranza *et al.*, 2015). Fruktaanide tootmiseks vajalikke ensüüme, fruktosüüli transferaase (FT), leidub taimedes, bakterites ning seentes. Alles hiljuti avastati, et FT-id on aktiivsed ka arhedel (Kirtel *et al.*, 2019). Need ensüümid kuuluvad glükosiidi hüdrolaaside (GH-de) hulka, kus on nii sahhariide hüdrolüüsivaid ensüüme (nt invertaasid ja fuktaani eksohüdrolaasid) kui ka transfruktosüüliiva

aktiivsusega valke. Nende ensüümide hulka kuuluvad taimede ja mikroorganismide FT-id, mis sünteesivad erinevaid inuliini- ja levaani-tüüpi oligosahhariide ning polümeere. Bakteritel piisab polümeersete fruktaanide sünteesiks ainult ühest ensüümist: levaani toodab levaansukraas ning inuliini inulosukraas. Taimed seevastu vajavad fruktaanide sünteesiks vähemalt kaht erinevat ensüümi (Visnapuu, 2012, lk 13). Selleks, et toota mitut erinevat tüüpi fruktaane, kasutavad taimed nelja erinevat FT-d. Kõik taimsed FT-aktiivsusega ensüümid kuuluvad GH 32 perekonda. Huvitav teooria väidab, et taimede fruktosüüli transferaasid on välja arenenud vakuooli invertaasidest. Neile tekkis sahharoosirikas keskkonnas võime kasutada sahharoosi nii fruktoosijäägi doonori kui ka akseptorina ning tekkinud oligosahhariide edasi pikendada. See on seletatav faktiga, et taimedes algab fruktaanide süntees vakuoolis, kus sahharoos muudetakse 1-kestoosiks ja glükoosiks (Banguela, Hernández, 2006).

Taimed kasutavad levaani eelkõige varuainena, kogudes neid vakuoolidesse. Need lagundatakse kasvuperioodi lõppfaasis, et toota seemnetesse vajalikke süsivesikuid. Polüsahhariidide osalust taime kaitsemehhanismides pole siiani täpselt kirjeldatud, aga arvatakse, et fruktaanid kaitsevad taimerakke, seostudes membraani lipiidse osaga ja aktiveerivad ka vastupanuvõimet taime haigustele jt stressitingimustele (Tarkowski *et al.*, 2019). Levaani kiht muudab rakumembraani valgulistele struktuuridele vähem läbitavaks ning kaitseb kuivamise eest (Vereyken *et al.*, 2001). Arvatakse, et fruktaanid suurendavad taimede põua- ja külmataluvust ning võimendavad antioksidantide toimet. Huvitaval kombel sisaldavad peaaegu kõik taimeliigid fruktaane hüdrolüüsivaid ensüüme sõltumata nende võimest ise fruktaane toota. See võib olla osa taime kaitsemehhanismist patogeenide vastu ja suurendada taime kohastumust (Tarkowski *et al.*, 2019).

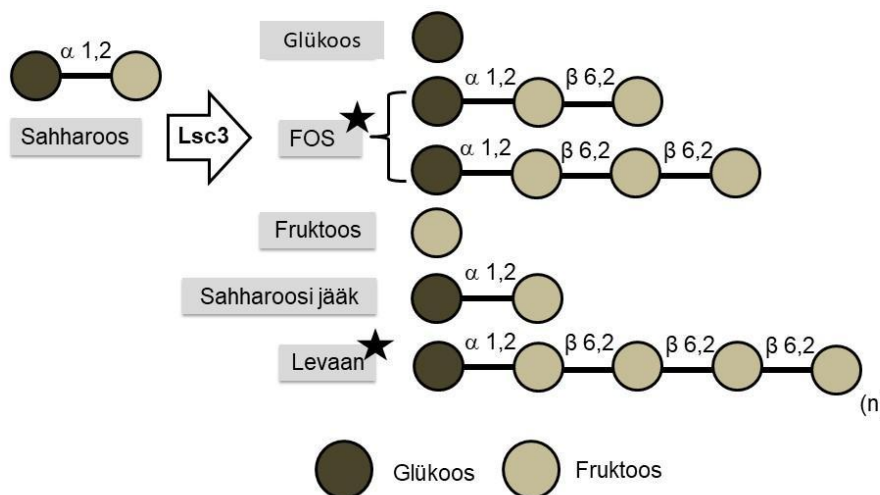
Fruktaane sisaldavad taimed on üsna levinud. Ligi 15% õistaimedest toodavad fruktaane varuaineteks. Erinevalt bakteritest võivad taimed toota mitmeid erineva struktuuriga fruktaane. Inuliini sisaldavad väga paljud astrilaadsete seltsi (*Asterales*) kuuluvad liigid näiteks sigur, artišokk, maapirn ja daalia. Neo-inuliini tootvaid liike on eelkõige liilialiste (*Liliceae*) sugukonnas (nt küüslauk, sibul, spargel). Levaani-tüüpi fruktaanid on rohkem levinud üheiduleheliste taimede seas. Lineaarseid levaane ehk fleiine toodavad eelkõige kõrrelised (*Poaceae*). Taimed võivad korraga toota mitut tüüpi fruktaane, kuid bakterite hulgas on ainult mõni üksik liik, mis suudab korraga toota nii levaani kui inuliini (Vijn, Smeekens, 1999). Nagu nimest võib oletada, leidub segatüüpi fruktaane, agaviine, agaavilistes (*Agavaceae*) ning seetõttu vähesel määral ka agaavimahlast tehtud jookides (Santiago-García, López, 2014). Graminaane sisaldavad mitmed majanduslikult tähtsad teraviljad nagu nisu, kaer ja oder (Banguela, Hernández, 2006).

Seentest on leitud mitmeid GH 32 perekonna FT-e ja β -fruktofuranosidaase, mis on võimalised fruktoosijääki üle kandma, aga spetsiifilisi levaansukraase neil ei ole leitud. Hallitusseened perekondadest *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ning *Aureobasidium* toodavad peamiselt β -2,1 sidemega lühikese ahelaga frukto-oligosahhariide (FOS) nagu näiteks 1-kestoos (PA 3), nüstoos (PA 4) and 1-fruktoosülnüstoos (PA 5) (Visnapuu, 2012, lk 13–17).

1.2. Bakteriaalsed fruktaanid

Vastavast teaduskirjandusest on teada, et mitmed bakterirühmad sünteesivad ja ka kasutavad levaani-tüüpi fruktaane. Palju vähem on avastatud liike, kes on võimalised tootma inuliini-tüüpi fruktaane. Seetõttu on bakteriaalsed fruktaanid tihti defineeritud kui levaanid. Polüsahhariidi sünteesiks vajalikke ensüüme, levaansukraase, on mitmetel bakterirühmadel nagu pseudomonaadid, batsillid, äädikhappebakterid, piimhappebakterid. Inuliini tootmiseks vajaliku inulosukraasi on leitud ainult piimhappebakterite perekondadest *Lactobacillus*, *Streptococcus* ja *Leuconostoc* (Visnapuu, 2012, lk 18). Bakterites on fruktaanid kas suhteliselt korrapäraselt kinnitunud bakteri rakuseina küljes, moodustades kapsli, või on bakteri välispinnal nõrgalt kinnitunud eksopolüsahhariidide (EPS) kiht. Levaanist koosnev EPS-si kiht, seob vett ja annab levaani tootvate bakterite kolooniatele sahharoosi sisaldaval söötmel läikiva ja limase välimuse. EPS-id mängivad suurt rolli sümbioosis, taimepatogeneesis ja kaitsevad baktereid kuivuse ja muude stresside eest. On leitud, et bakteriaalsetel taimepatogeenidel moodustab rakuväline levaan kaitsva kihi taime eritatavate kaitsemolekulide vastu (Ullrich, 2009, lk 213–222). Bakteriaalsete levaanide molekulmass jääb tavaliselt vahemikku 2×10^6 kuni 1×10^8 Da. Molekuli suurust ja ka hargnemiste osakaalu mõjutavad lisaks ensüümi omadustele ka keskkonnatingimused näiteks sahharoosisisaldus, temperatuur, esinevad ioonid ning lahustid. Elektronmikroskoopia abil on kindlaks tehtud, et levaani molekul vesilahuses on kerajas, moodustades nanosuuruses kerakesi, mis viitab sellele, et ahelaid sünteesitakse pidevalt ja sarnase kiirusega (Seinbüchel, Rhee, 2005, lk 339). Levaanide sünteesiks saab kasutada ka rakuvabasid süsteeme. Sellisel juhul ei teki produkt mikroorganismide elutegevuse käigus, vaid piisab substraadile (sahharoosile) vastava ensüümi (levaansukraasi) lisamisest (joonis 2). On aga kindlaks tehtud, et sellisel viisil toodetud levaanil on palju varieeruvam pikkus, kui elusrakkudega toodetud molekulil (Aasamets, 2013, lk 8).

Levaansukraasid on rakuvälised stabiilsed ensüümid, mis kuuluvad GH perekonda 68. See perekond koondab bakteriaalseid FT-e (levaansukraase, inulosukraase, β -fruktofuranosidaase), mis sünteesivad β -sidemega fruktaane ehk fruktoosijääkidest koosnevaid oligo- ja polüsahhariide (joonis 2).



Joonis 2. Levaansukraasi (Lsc3) reaktsioonis tekkivad produktid. Substraadina kasutatakse sahharoosi, mille käigus võib toimuda substraadi hüdrolüüs (vabanevad

monosahhariidid glükoos ja fruktoos) või ahela pikendamine (sünteesitakse oligo- ja polüfruktaani). Molekulides esinevad sidemetüübid ja monomeerid on skeemil tähistatud. Tärniga on tähistatud potentsiaalsed prebiootikumid. (modifitseeritud artiklist Adamberg *et al.*, 2018).

Kui substraati on vähe, siis toimub eelistatult sahharoosi hüdrolüüs ja vabanevad fruktoos ning glükoos. Kõrgemal substraadi kontsentratsioonil on eelistatud fruktoosijäägi ülekanne sahharoosile või reaktsioonis juba tekkinud oligo- või polüfruktaanidele. Kui pikendamise etappe on piisavalt palju, siis on tulemuseks kõrge PA-ga levaani molekul. Igas reaktsioonitsükli vabaneb üks glükoosi molekul ning see on põhiline reaktsiooni jääkprodukt, mis levaani puhastamise käigus eemaldatakse. Reaktsiooni käigus võib sõltuvalt tingimustest osa sahharoosi ka reageerimata jääda (joonis 2) (Visnapuu *et al.*, 2011; Visnapuu *et al.*, 2015).

1.3. Fruktaanide potentsiaalsed kasutusalad

Viimastel aastakümnetel on järjest suuremat tähelepanu pälvinud fruktaanide kasutamine prebiootikumidena. Prebiootikum on defineeritud kui inimesele seedumatu ja teatud soolemikroobidele sobiv toidukomponent, mis mõjutab soole mikroobikooslust ning selle kaudu on sellel positiivne mõju peremeesorganismi tervisele (Gibson *et al.*, 2017). On tõestatud, et inuliini-tüüpi fruktaanidel on sellised omadused. Euroopa Liit on kinnitanud sigurist pärineva inuliini prebiootilise toimega ainete nimekirja (Gibson *et al.*, 2017). Inimese seedeensüümid ei suuda β -sidemeid lagundada ja need on vastupidavad ka maohappele (Bekers *et al.*, 2005; Mardo *et al.*, 2017). Seetõttu jõuavad need lagunemata kujul jämesoolde ja on seal sobivaks toiduks paljudele kasulikuks peetavatele bakteritele, näiteks laktobatsillidele ja bifidobakteritele. Kuigi levaani-tüüpi fruktaanide prebiootilist toimet on nende halvema

kättesaadavuse tõttu vähem uuritud, on näidatud, et β -2,6 sidemega fruktaanidel võib olla isegi suurem prebiootiline efekt kui inuliini-tüüpi fruktaanidel (Marx *et al.*, 2000).

Kui probiootilised bakterid kasutavad prebiootikume, sh fruktaane, tekib segu lühikeste ahelatega rasvhapetest (äädikhape ehk atsetaat, propioonhape, võihape ehk butüraat ja piimhape ehk laktaat), mis alandavad soolestiku pH-d ning toetavad sooleepiteeli rakkude tööd (Adamberg *et al.*, 2018). Mitmetele patogeensetele liikidele happeline keskkond ei sobi ning seetõttu väheneb nende hulk inimese organismis. Lisaks suurendavad lühikese ahelaga rasvhapped soolestikus mutsiinide ehk soolelima eritust. On näidatud, et madalama PA-ga fruktaanide tarbimine vähendab soolestikus vähitekke riski. Lisaks on tõestatud, et probiootiliste bakterite suurem arvukus inimese soolestikus alandab vere kolesterooli ja -suhkru taset, suurendab mineraalainete (nt Mg ja Ca) imendumist ning stimuleerib immuunsussüsteemi (Franco-Robles, Lopez, 2014). Lisaks sünteesivad soolebakterid mitmeid vitamiine. Nendest tiamiin (B_1), folaat (B_9), biotiin (B_8), riboflaviin (B_2), kobalamiin (B_{12}) ja pantoteenhape (B_5) on vees lahustuvad ning neid omastavad inimesed peamiselt toidust. Samas toodab soole mikrobiota poole inimese päevasest menakinooni (K_2) vajadusest (Morowitz *et al.*, 2012).

Fruktaane ei lisata toidu sisse ainult prebiootiliste omaduste pärast. Viimasel ajal on populaarsust kogunud ka nende ainete kasutamise uurimine toidu tekstuuri parandajatena ning rasva asendajatena. Seejuures on järjest rohkem hakatud tähelepanu pöörama levaanile tema unikaalsete omaduste tõttu. Lahustuvus nii vees kui õlis, madal viskoossus nii suure molekulmassiga ja hargnenud polümeeri kohta, vastupidavus sooladele, pindaktiivsetele ainetele, kõrgele temperatuurile, alustele ja nõrgematele hapetele ja hea vee sidumise võime (Banguela, Hernandez, 2006) võimaldab seda kasutada näiteks stabilisaatorina, paksendajana, emulgaatorina ning kapslimaterjalina. Praegu kasutatakse toidu lisaainena eelkõige taimset inuliini, kuna see on praegusel hetkel fruktaanidest kõige odavam, sest siguri juurtes on seda kuivkaalus ligi 70%. Inuliini kõige olulisemad omadused toiduainetööstuse kontekstis on neutraalne maitse, seedumatusest tingitud madal energiasisaldus (1 kcal 1 g kohta), vee sidumine ja tekstuuri loomine, stabiilsus. Siiski on levaanil mitmeid eeliseid. See on inuliinist paremini lahustuv ja mõnevõrra vastupidavam hapetele. Seega võib levaan inuliini mitmes valdkonnas asendada (Steinbüchel, Rhee, 2005, lk 307–310).

Katsed on näidanud, et levaani saaks kasutada ka nanoosakeste katematerjalina meditsiinis ja biotehnoloogias. Järjest enam kasutatakse toidulisandites ja ravimites mineraalainete nanoosakesi, mitte nende lahustuvaid sooli. On tõestatud, et nanoosakeste kasutamine vähendab näiteks seleeni, koobaltit ja rauda sisaldavate toidulisandite ja ravimite toksilisust ning nende negatiivseid mõjusid seedeelunditele. Levaan sobib selliste osakeste katematerjaliks,

kuna väldib nende kokkukleepumist ja on lisaks toksilisust vähendav ning prebiootiliste omadustega (Bondarenko *et al.*, 2016).

Fruktaanidele on välja pakutud ka teisi kasutusviise nii meditsiinis kui ka kosmeetikas. Levaani lahust saaks kasutada vereplasma asendajana. On täheldatud ka levaani kasvajaid pärssivat ja immuunsussüsteemi tugevdavat toimet. Väga suur potentsiaal on levaanil kosmeetikas. Nahale on tal vett siduv ning niisutav ja kaitsev toime ning see mõjub leevendavalt nahaärrituste korral (Visnapuu, 2012, lk 30–31). Levaani saab kasutada ka juuksehooldustoodetes. On leitud, et see hoiab ära juuksekarva kutikula lagunemise ning seeläbi aitab vähendada juuksekahjustusi (Öner *et al.*, 2016).

1.4. Varasemad uurimistööd levaanide või levaani-tüüpi frukto-oligosahhariidide kasutamise kohta bakterite kasvusubstraadina

Levaani-tüüpi fruktaanide mõju bakterite kasvule ja metabolismile pole veel väga põhjalikult uuritud. Järgnevalt on esitatud kolme teadusartikli kokkuvõtted, mis praeguse töö praktilise osaga tihedamalt haakuvad ning loovad teoreetilise tausta töö eksperimentide jaoks.

Esimene teaduslik artikkel, kus tõestati, et probiootilised bakterid on võimelised β -2,6 sidemega frukto-oligosahhariide (FOS-e) efektiivselt energiaallikana kasutama, ilmus 2000. aastal (Marx *et al.*, 2000). Selles töös testiti kasvu 4 bifidobakteri tüve puhul: *Bifidomacterium (Bi) adolescentis*, *Bi. breve*, *Bi. longum*, *Bi. pseudocatenulatum*. Bifidobakterid on ühed esimestest tõestatud probiootilise toimega bakteritest ning on tänapäeval enim tuntud ja kasutatud probiootikumid. Bakterite kasvusubstraadina kasutati bakterist *Zymomonas mobilis* pärinevat pikaahelalist levaani ning sellest happelise hüdroolüüsiga saadud oligosahhariidide segu. Võrdlusena kasvatati baktereid ka fruktoosil, mis on levaani laguprodukt. Katseliselt tõestati, et kõik testitud tüved suudavad lühema ahelaga levaani-tüüpi FOS-e lagundada ja nendel kasvada. Levaani polümeeri oli võimeline kasutama ainult *Bi. adolescentis*. Kuna väga sarnased katsetulemused on varem saadud ka inuliini-tüüpi fruktaanidega, ei ole bifidobakteritele fruktaanide lagundamisel piirav tegur mitte niivõrd sideme tüüp, vaid pigem ahelapikkus. Kasvu käigus tekkinud hapete analüüsil avastati, et levaaniga söötmes oli lühikese ahelaga rasvhapete kontsentratsioon kõikidel tüvedel suurem kui fruktoosiga söötmes kasvatades. Peamised tekkinud happed olid äädikhape, piimhape ning metaanhape (sipelghape). Hapete kontsentratsioonide suhe erines eri tüvedel märkimisväärselt – näiteks oli äädikhappe ja piimhappe suhe *Bi. adolescentis*'el 3 : 1, *Bi. breve*'l aga 76 : 1. Leiti, et levaanide fermentatsioonil tekib peaaesjalikult äädikhape ja teisi happeid võrdlemisi vähe (Marx *et al.*, 2000). Lisaks tõestati β -2,6 sidemega sahhariidide

vastupidavus inimese seedeensüümidele. Levaani ja FOS-e inkubeeriti 26 tundi erinevate inimese seedesüsteemi amülaaside (sülje α -amülaas, pankrease α -amülaas, amüloglükosidaas) ning proteaasidega (pepsiin, pankreatiin, trüpsiin). Katse lõpuks lagunes ainult kuni 20% sahhariidide algsest kogusest. Näidati, et pikema ahelaga levaani-tüüpi molekulid on ensüümidele võrreldes väiksema PA-ga fruktaanidega vastupidavamad (Marx *et al.*, 2000).

Erinevatel bakteritel on levaanide lagundamiseks erinevad lähenemisviisid: levaani ahelat saab lagundada otsast vabastades fruktoosijääke ükshaaval (ekso-aktiivsus) või ahela keskelt vabastades reaktsioonis FOS-e (endo-aktiivsus). Levaani lagundavat ekso-aktiivsusega ensüümi nimetatakse ekso-levanaasiks ja endo-ensüümi endo-levanaasiks. Kui levaani ahela kesksed glükosiidsidemed lõhutakse, siis tekib segu erinevate ahelapikkustega FOS-idest. 2014. aastal avaldati töö, kus kasutati levaani lagundamiseks uudset ensüümi, endo-levanaasi, et FOS-e sünteesida (Porras-Domínguez *et al.*, 2014). Endo-levanaas on olemas bakteril *Bacillus (Ba) licheniformis*, kust levanaasi kodeeriv geen isoleeriti ja ensüüm toodeti kasutades *Escherichia coli* laboritüve. Looduslikult *E. coli* levaani ei lagunda ning sahharoosil, mis on levaani substraat, ega levaanil kasvada ei suuda (Porras-Domínguez *et al.*, 2014; Visnapuu *et al.*, 2015). Puhastatud levaani lagundamise uurimiseks kasutati kolmest erinevast bakteritüvest – *Ba. subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides* tüvi NRRL B-512F ja ATCC 8293 – saadud levaani. Leiti, et levaani lagunemise protsess endo-levanaasi toimel on väga kiire – sobival tingimustel on kogu polüsahhariid reageerinud juba 30 minutiga. Produktide analüüsil leiti, et vabanenud fruktoosi monomeeride kontsentratsioon oli FOS-ide sisaldusest mitukümmend korda väiksem, mis on iseloomulik just endo-aktiivsusega levanaasile (Porras-Domínguez *et al.*, 2014).

Levaane ja endo-levanaasi reaktsioonis saadud FOS-e kasutati probiootilise bakteritüve kasvu hindamiseks. Selleks kasutati erinevaid bifidobakterite ja laktobatsillide tüvesid: *Bi. longum*, *Bi. longum* var. *infantis*, *Bi. breve*, *Bi. bifidum* ja *Lactobacillus (Lb) paracasei*. Kasvatati esialgu MRS vedelsöötmes, mis sisaldas 0,5% fruktoosi. Iga tüve kasvatati võrdlusena kahes söötmes, millest üks sisaldas 0,5% levaani ja teine 0,5% levaani-tüüpi FOS-e. Baktereid kasvatati anaeroobses keskkonnas loksutil temperatuuril 37 °C 24 tundi ning iga 2 h järel võeti söötimest proov ning mõõdeti selle optiline tihedus. Optilise tiheduse muutumise põhjal arvutati iga tüve kasvukiirus mõlemas söötmes ning kasvu koguulatus (graafiku alune pindala). Lisaks mõõdeti samadel ajapunktidel söötme pH-d. Selgus, et kõik valitud probiootilised bakterid kasvasid mõlemal substraadil hästi. Lisaks langes kõikide söötmete pH, kuna tekkisid lühikese ahelaga rasvhapped. See kinnitas, et levaani-tüüpi fruktaanidel võiksid olla prebiootilised omadused. Kasvuulatuste võrdlemisel selgus, et levaani FOS-idel kasvasid bakterid kiiremini kui polümeersel levaanil. Selle põhjuseks peetakse levaani FOS-ide paremat lahustuvust vees, mille tõttu on bakteritel lihtsam neid ka rakku transportida (Porras-Domínguez *et al.*, 2014). Arvatakse,

et laktobatsillid ja bifidobakterid saavad polümeerseid fruktaane kasutada enamasti teiste soolebakteritega abiga, kes need molekulid väiksemateks oligosahhariidideks teevad (Adamberg *et al.*, 2015).

Eesti teadlaste 2015. aastal avaldatud uurimistöös uuriti levaani mõju inimese mikrobiotale (Adamberg *et al.*, 2015). Selleks koostati 11 inimeselt kogutud fekaalproovide kogum ning määrati seal bakterite koosseis. Bakterite kogumit inkubeeriti anaeroobselt *P. syringae* DC3000 levaani sisaldavas aminohapeterikkas M20 söötmes. Katse käigus määrati söötme koostise muutust ja tehti kindlaks proovides erinevaid mikroobirühmasid. Leiti, et levaani sisaldavas söötmes oli bakterite kasv kiirem ning nende biomass suurenes märgatavalt rohkem kui ilma levaanita söötmes. Kõige märgatavamalt suurenes levaani toimet perekondade *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus* ja *Ruminococcus* osakaal. Lisaks määrati tõus võrreldes algse kogumiga suurem arvukuse ka bakterirühmades *Faecalibacterium*, *Erysipelotrichaceae* ja *Eubacterium* kui keskkonda oli lisatud levaani (Adamberg *et al.*, 2015).

Tekkinud metaboliitide analüüsil leiti, et levaani kääritamisel fekaalikooslusega tekkisid äädikhape, piimhape, võihape, propaanhape, merevaikhape ning süsihappegaas. Eelkõige toodeti äädikhapet. Koosluse muutumisest võis järeldada, et suhkrute fermentatsioon ja pH mängivad olulist rolli soole mikroobikoosluse kujunemises. Arvatavasti muudavad levaanist tekkinud lühikese ahelaga rasvhapped keskkonna patogeensetele bakteritele vähem sobivaks ning on peremeesorganismile tähtsaks energiaallikaks (Adamberg *et al.*, 2015).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Materjalid

2.1.1 Sahhariidid

Töös on kasutatud 8 erinevat sahhariidi (või segu) bakterite võimalike kasvusubstraatidena: glükoos, fruktoos, *P. syringae* DC3000 Lsc3 ensüümiga sünteesitud levaan, levaani-tüüpi FOS-id (IFOS), daalia inuliin, inuliini-tüüpi oligosahhariidide segu Orafti® P95, palatinoos (isomaltuloos). Glükoos on kuuesüsinikuline monosahhariid, mis on paljudele bakteritele kõige eelistatum süsinikuallikas (C-allikas), kuna seda on lihtne rakku transportida. Fruktoos ehk puuviljasuhkur on samuti enamasti bakteritele lihtsasti omastatav monosahhariid (Inman, 2011). Töös kasutati D-glükoosi (tootja Carl Roth GmbH, Saksamaa) ja D-fruktoosi (Sigma-Aldrich, Saksamaa). Bakteriaalne levaan molekulmassiga ligi $4,7 \times 10^6$ Da (Mardo *et al.*, 2017) toodeti sahharoosist Tartu Ülikooli bakteri- ja pärmivalkude uurimisrühmas (T. Visnapuu), meetodiga, mida kasutati artiklis Adamberg *et al.* 2015. Sünteesiks kasutati *P. syringae* DC3000 pärinevat kõrge aktiivsusega levaansukraasi Lsc3. Levaani FOS-ide segu, mis sisaldas levaani-tüüpi frukto-oligosahhariide (IFOS) valdavalt PA-ga 2-8, aga mitte fruktoosi, oli saadud eelmainitud levaani töötlemisel *Bacteroides thetaiotaomicron*'i endo-levanaasiga (Mardo *et al.*, 2017; Ernits *et al.*, 2019a) ja järgneval puhastamisel pärmirakkudega (Jõgi *et al.*, 2015). Inuliin, mille keskmine molekulmass on tootja andmetel 5×10^3 Da pärines daalia mugulast (Sigma-Aldrich, Saksamaa). Taimse inuliini oligosahhariide (PA 2-8) sisaldav preparaat Orafti® P95 ja palatinoos (Palatinose™) olid firmalt BENEEO GmbH (Belgia). Orafti® P95 on tõestatud prebiootiliste omadustega sahhariidide segu, mida saab funktsionaalse toidu komponendina lisada näiteks küpsetistesse, piimatoodetesse ning maiustustesse suhkru asendamiseks ja kiudainete sisalduse tõstmiseks (BENEEO Orafti). Palatinoos ehk isomaltuloos on sahharoosi analoog, kus glükoosi- ja fruktoosijääk on ühendatud α -1,6 sidemega. Seda soovitatakse uudse suhkruasendajana tänu magusale maitsele ja madalale glükeemilisele indeksile ja potentsiaalse prebiootikumina (BENEEO Orafti).

2.1.2. Mikrobioloogilised söötmed ja bakterite kasvutingimused

Töös kasutati kahte tüüpi söödet, et testida bakterite kasvu erinevatel tingimustel: visuaalselt kasvuerinevuste hindamiseks substraatidel kasutati MRS (De Man, Rogosa ja Sharpe'i sööde) tardsöödet ning kasvukõverate koostamisel kasutati vedelat M9 baseeruvat minimaalsöödet,

kuhu oli ainukese C-allikana lisatud erinevaid suhkruid. Kõikide sahhariidide lõppkontsentratsioonid söötmetes olid 5 g/l (0,5%), kui ei ole märgitud teisiti. Kõiki bakteritüvesid kasvatati 30 °C.

Esimese etapina testiti kolme MRS söötme retsepti, et leida valitud bakteritüvedele (vt ptk 2.1.3.) sobivaim sööde, et tagada võimalikult paljude valitud tüvede kasv. Algselt on MRS sööde välja töötatud spetsiifiliselt laktobatsillide kasvatamiseks, kuid sellel saavad kasvada teisedki bakteriliigid. See sisaldab ammoniumtsitraati ning naatriumatsetaati, et alla suruda mitmete teiste mikroorganismide kasvu. Lisaks sellele on söötmes polüsorbaat 80 (Tween 80), mis muudab kasvuks vajalikud rasvhapped *Lactobacillus*'tele kättesaadavamaks. (Cosmo Bio Company, Jaapan). Testiti kolme MRS söötme retsepti:

- Sigma-Aldrichi modifitseerimata MRS 69966 (komponentide lõppkontsentratsioonid, g/l): peptoon (10), lihaekstrakt (8), pärmiekstrakt (4), glükoos (20), K_2HPO_4 (2), Na-atsetaat (5), triammoonium tsitraat (2), $MgSO_4 \times 7H_2O$ (0,2), $MnSO_4 \times H_2O$ (0,05).
- Modifitseeritud MRS (Suitso, 2004, lk 21) (g/l): pärmiekstrakt (5), trüptoon (10), aju infusioon (10), glükoos (20), Tween 80 (1), K_2HPO_4 (2), NH_4Cl (2), Na-tsitraat (2), $MgSO_4 \times 7H_2O$ (0,2), $MnSO_4 \times H_2O$ (0,05).
- MRS sööde (Goh et al., 2006) (g/l): peptoon (5), lihaekstrakt (5), pärmiekstrakt (2,5), glükoos (20), Tween 80 (1), K_2HPO_4 (5), Na-atsetaat (5), amooniumtsitraat (2), $MgSO_4 \times 7H_2O$ (0,1), $MnSO_4 \times H_2O$ (0,05).

Kõikide tardsöötmete valmistamiseks lisati 20 g/l agarit (LabM, UK). Söötmed steriliseeriti autoklaavimise teel 115 °C 15 min. Tardsöötmed valati steriilsetes tingimustes 20 ml kaupa steriilsetesse plastikust Petri tassidesse ja lasti tahkuda.

Tilkkülvi katse jaoks kasutati modifitseeritud MRS söödett (põhineb retseptil Suitso, 2004), kuhu glükoosi asemel oli lisatud 5 g/l (0,5%) erinevaid suhkruid. Kontrolliks kasutati ilma sahhariidita MRS söödett, kuhu suhkrulahuse asemel lisati steriilset destilleeritud vett. Kokku valmistati 400 ml MRS baassöödett (kokku 20 tardsöödett), millele lisati varem autoklaavitud glükoosi, fruktoosi, levaani, IFOS-e, inuliini, Orafit® P95 või palatinoosi 4% lahust (2,5 ml 20 ml söötme kohta). Tilkkülvi katse jaoks eelkasvatati 5 ml modifitseeritud MRS söötmes, mis sisaldas 5 g/l glükoosi. Kultuure kasvatati loksutil (välja arvatud *Lb. rhamnosus* ja *Lc. lactis*, mida ei aereeritud) 30 °C 20 h.

Bakterite kasvukõverate koostamiseks kasutati 1 × M9 vedelsöödett (minimaalsööde), kuhu oli ainukese C-allikana lisatud glükoosi, fruktoosi, levaani, IFOS-e või inuliini. Minimaalsööde on defineeritud, kui kindlat C- ja energiaallikat sisaldav sööde, et uurida bakteri kasvu ainult valitud sahhariidil, kuna teisi süsinikuallikaid söötmes ei ole (Heinaru, Vedler, 2011, lk 23). Katses

kasutatud minimaalsööde valmistati M9 mineraalainete segu baasil (10 x), mis sisaldas (g/l) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (75,2), KH_2PO_4 (30), NaCl (5) NH_4Cl (5). Aminohapete allikana kasutati CAA segu (*casaminoacids*, kaseiini hüdroüsaat, 2 g/l), trüptofaani (0,01 g/l) ja L-leutsiini (0,01 g/l) ning lisati mikroelementide segu ja filtreeritud B_1 vitamiini (0,1 g/l) lahust. Kasvukõverate jaoks eelkasvatati bakteritüved 5 ml 5 g/l glükoosi sisaldavas minimaalsöötmes 30 °C 16 h.

Katsed viidi läbi vedelkultuuris mahuga 10 ml Erlenmeyer'i kolbides (3 tüve) või katseklaasides, *Lb. rhamnosus*'e puhul. *Ba. subtilis*'e, *E. coli* ja *Lactococcus (Lc) lactis*'e puhul aereeriti kultuure loksutil (160 pööret/min), *Lb rhamnosus*'t kasvatati staatilise kultuurina ilma aereerimata. C-allikata kontrolli korral kasutati sahharidi asemel steriilset destilleeritud vett.

2.1.3. Bakteritüved

Töös kasutatud bakteritüved on hoiustatud Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis –80 °C ja pärinevad erinevatest kultuurikollektsioonidest: ATCC (*American Type Culture Collection*, USA), DSM (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen*. Saksamaa), CELMS (*Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains*, Eesti). Tähistuses on kasutatud stiili, kus bakteri liiginimele järgneb töös kasutatud tüve andmebaasitähis.

Selle töö eesmärk oli kasutada võimalikult mitmekesisest bakteriliikide valimit, kuhu kuulus nii probiootilisi tüvesid, potenciaalsete patogeenide mittevirulentseid variante (serotüübid) kui ka keskkonnabaktereid. Töös kasutati järgmisi bakteritüvesid:

Lactococcus lactis (DSM 20175), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactobacillus delbrueckii* alamliik *lactis* (DSM 20073), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (DSM 22644), *Pseudomonas mendocina* PC10 (CELMS EEUT PC10), *Bacillus cereus* (ATCC 1178), *Bacillus subtilis* 168 (DSM), *Escherichia coli* (looduslik isolaat; CELMS EEUT EY), *Enterococcus (Ec.) faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* serotüüp 4e (ATCC 19118), *Listeria innocua* serotüüp 6a (ATCC 33090), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* alamliik *aureus* (ATCC 6538), metitsilliin-resistentne *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 43300).

Söötmed valmistati ja puhaskultuuridega töötati ainult steriilsetes tingimustes UV kiirgusega töödeldud laminaarkapis kasutades steriilseid töövahendeid, aseptilisi külviviise ja nõuetekohaseid isikukaitsevahendeid nagu nitriilkindad ja pindade puhastamine 70% etanooliga.

2.2. Metoodika

Järgnevas peatükis ja joonisel 3 on esitatud katseskeem ja põhilised eksperimendid ning nende tingimused.



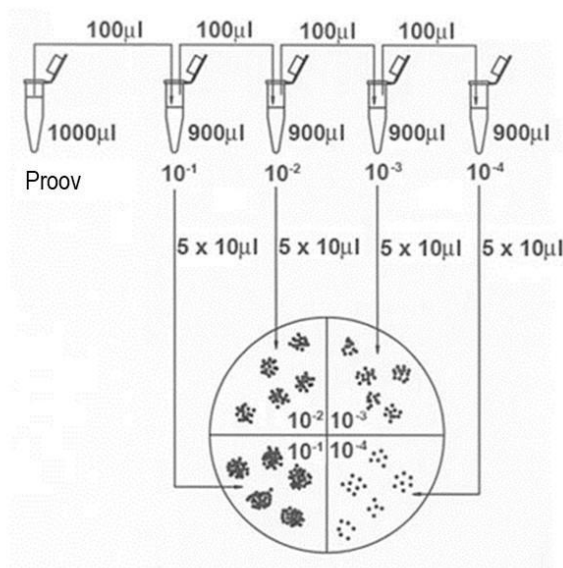
Joonis 3. Ülevaatlik katsemetoodika skeem. Sinisel taustal on näidatud erinevad läbi viidud eksperimendid.

2.2.1. Sobiva MRS söötme valimine bakteritüvedele

Bakteritüved eelkasvatati LB + 2% glükoosiga sisaldavas söötmes 20 h 30 °C. Sealt külvati rakud steriilse külviaasaga joonkülvil meetodil MRS söötmega tassidele. Kõiki 14 bakteritüve, mis on toodud peatükis 2.1.3., kasvatati 3 erineval MRS tardsöötmel (vt ptk 2.1.2) ning hinnati bakteritüvede kasvu visuaalselt. Tasse inkubeeriti 30 °C ja kasvu hinnati 24 ja 48 tunni järel rakkude kasvu intensiivsuse järgi külvijoonel ja kolooniate kasvu alusel.

2.2.2. Kasvuerinevuste testimine MRS tardsöötmel tilkkülvil meetodiga

Selleks, et visuaalselt võrrelda bakteritüvede kasvu erinevatel substraatidel viidi MRS söötmetel läbi nn tilkkülvil katse. Selle abil saab suhteliselt väikese söötmete hulgaga testida mitmeid tüvesid, et leida erisusi ühe bakteritüve kasvus erinevatel substraatidel. Kolooniate arvu järgi erinevates lahjendustes on võimalik võrrelda bakterite kasvu. Mida lahjem on bakterirakkude suspensioon, seda vähem rakke külvatakse söötmele ja seda tõenäolisem on üksikute kolooniate teke. Mida rohkem on aga katse lõppedes suuremate lahjendustega tilkades kolooniaid, seda sobivam on sööde bakterile (joonis 4).



Joonis 4. Tilkkülvi meetodika põhimõtteline skeem. Kõigepealt tehakse algproovist (bakterikultuur) 10-kordsete lahjenduste rida, võttes 100 µl proovi ja 900 µl lahjendusvett (füsioloogiline lahus) ning külvatakse saadud segud väikeste tilkadena tardsöötmele. (Cunningham *et al.*, 2008)

8 bakteritüve (*Lb. rhamnosus*, *Lc. lactis*, *Ba. subtilis*, *E. coli*, *Ec. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*) eelkasvatati LB + 5 g/l glükoosiga 5 ml vedelsöötmes 30 °C 20 h. Bakterikultuuride optilist tihedust mõõdeti spektrofotomeetriliselt (Ultrospec 3100pro, Amersham Biosciences) lainepikkusel 600 nm 1 ml plastikküvettides. Kultuurid viidi esmalt kõik sama optilise tiheduseni (OD) 0,5 kasutades steriilset füsioloogilist lahust (0,9% NaCl). Seejärel tehti kõigist 1×10 , 1×10^2 , 1×10^3 ja 1×10^4 kordsed lahjendused (maht 1 ml) steriilsetesse 1,5 ml Eppendorfi tuubidesse. Enne iga lahjenduse tegemist ja enne iga väljakülvi segati proove korralikult Vortex-segajal. Iga substraadiga (5 g/l) modifitseeritud MRS söötmele (Suitso, 2004) külvati 5 µl suurune tilk kõikide bakterite kõiki lahjendusi. Ühele tassile mahutati 4 erinevat tüve (lisa 1). Kontrollina kasutati ilma sahhariidita MRS söödet. Tasse inkubeeriti 30 °C 24 tundi ning seejärel võrreldi bakterikoloonia kasvu erinevatel substraatidel (lisa 2).

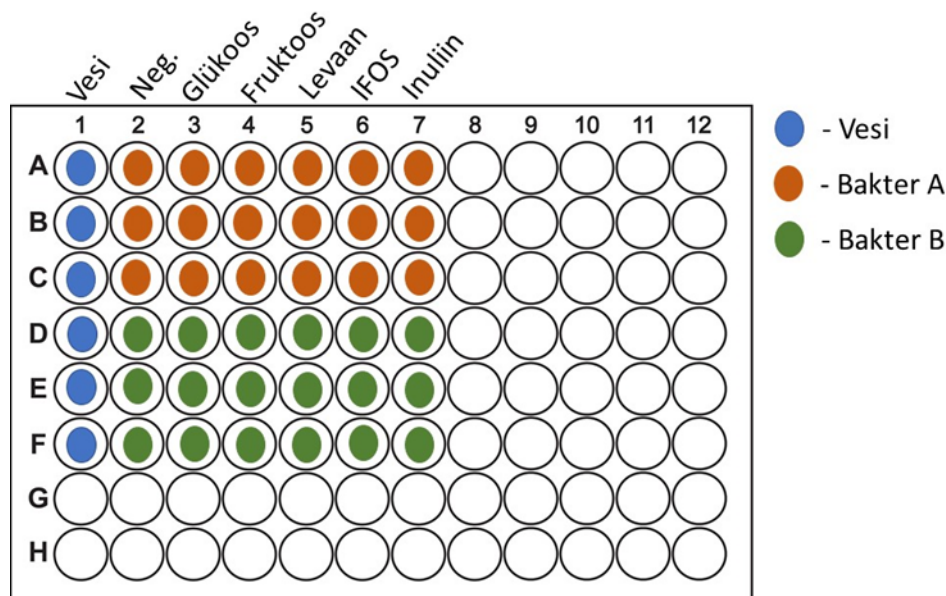
2.2.3. Kasvukõverate koostamine

Selleks, et uurida erinevate substraatide mõju bakteri kasvule täpsemalt, kasutati kasvukõverat: graafikut, mis näitab bakterirakkude arvukuse muutumist ajas. Muutusi rakkude arvukuses on kõige parem hinnata optilise tiheduse muutumise kaudu. Seda meetodit saab kasutada ainult vedelsöötmete puhul, kuna sel juhul saab eeldada, et rakud on võimalikult ühtlaselt jaotunud. Bakterisöötmed ei ole üldjuhul hägusad ning kui bakterite kasvu toimele tekib hägu, siis on seda võimalik spektrofotomeetriliselt mõõta. Kui baktereid ei ole söötmes liiga palju või liiga vähe, siis

on söötme optiline tihedus võrdelises sõltuvuses bakterirakkude arvuga. Teades, et optiline tihedus on võrdelises sõltuvuses bakterirakkude arvuga on spektrofotomeetri abil saadud admetest võimalik koostada kasvuköver (Sutton, 2011).

Katses kasutati nelja tüve: *E. coli*, *Ba. subtilis*, *Lc. lactis* ja *Lb. rhamnosus*. Nendest kolme esimest kasvatati kolvis loksutil. *L. rhamnosus* aga hapnikku ei talu ning seetõttu kasvatati seda katseklaasis ilma loksutamiset. Kasvutemperatuur oli 30 °C. Rakud eelkasvatati 5 g/l glükoosi sisaldavas M9 söötmes (vt ptk 2.1.2) ja kultuuride OD-d mõõdeti spektrofotomeetriga 1 ml plastikküvetis lainepikkusel 600 nm. Kultuuride OD₆₀₀ olid vastavalt: 1,55; 0,98; 0,16; 0,04. *E. coli*, *Ba. subtilis*'e rakke külvati 10 ml söötmesse algtihedusega 0,05 (vastavalt 320 µl ja 510 µl) ja aeglasema kasvuga *Lc. Lactis*'t ja *Lb. rhamnosus*'t 700 µl, et mitte söötme mahtu liigselt muuta.

Substraatidena kasutati glükoosi, fruktoosi, levaani, IFOS-e ja inuliini. Lisaks tehti negatiivne kontroll, milles suhkrulahus asendati destilleeritud veega. Seega kokku kasutati katses 6 erinevat söötmevarianti. Töös mõõdeti optilist tihedust plastikust 96 kannukesega mikrotiiterplaadil (Greiner Bio-one, Saksamaa) (skeem esitatud Joonisel 5) kasutades Infinite M200 PRO mikroplaadilugejat (Tecan, Šveits) ja tootjapoolset tarkvara Tecan i-control. Sellega on võimalik määrata korraga mitme erineva proovi optilist tihedust.



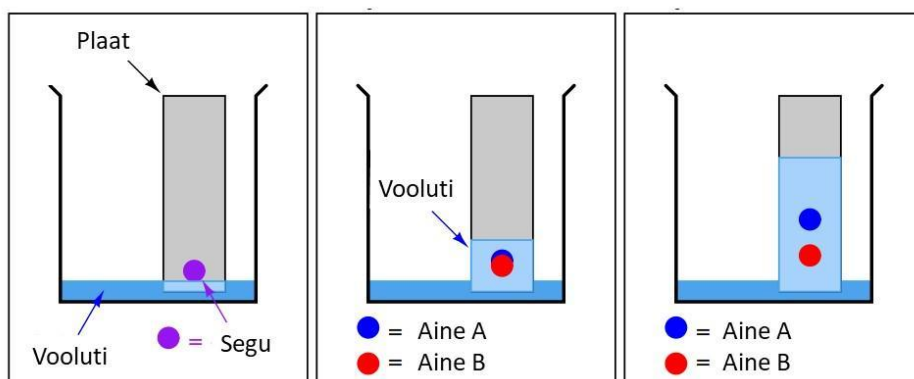
Joonis 5. Mikrotiiterplaadi skeem, kus on näidatud kontrollide ja kultuuride asukohad. (modifitseeritud Aksamitiene, 2012)

Erinevatel ajapunktidel võeti igast kultuurist steriilselt 600 µl proov, mis jaotati mikrotiiterplaadil 3 kannu vahel (3 kordust, igaüks 200 µl), et tulemused oleksid usaldusväärsemad. Lõplikuks

ajapunktile vastavaks OD-ks arvutati tulemuste aritmeetiline keskmine. Lisaks täideti igal mõõtmisel 6 kannu destilleeritud veega spektrofotomeetri nullimiseks. Kuna *Ba. subtilis* ja *E. coli* on kiirekasvulised ning *Lc. lactis* ja *Lb. rhamnosus* aeglasema kasvuga, mõõdeti tüvede OD-sid erinevatel ajapunktidel. *B. subtilis*'e ja *E. coli* puhul olid ajapunktid 2,4, 4,3, 6,2, 22,0 ja 47,2 tundi pärast sissekülvi. *Lb. rhamnosus*'el ja *Lc. lactis*'el olid need vastavalt 5,3, 22,3, 26,6, 47,3 ja 93,7 tundi. Seega mõõdeti korraga (1 plaadil) 2 erineva tüve (joonisel 5 tähistatud A ja B) söötmete komplekti OD ühel ajapunktil nii, et iga substraadi kohta oli 3 kannu (joonis 5). Lisaks mõõdeti kontrolliks levaani 5 g/l lahuse OD, sest levaani lahus on kergelt piimjas ja seetõttu on söötme OD on teistest oluliselt kõrgem. Hiljem lahutati saadud tulemus tüvede ajapunktidel saadud OD-st.

2.2.4. Sahhariidide määramine õhukese kihi kromatograafia (TLC) abil

Õhukese kihi kromatograafiaga (*thin layer chromatography*, TLC) on võimalik lahutada erineva suurusega molekule. Seetõttu sobib see meetod väga hästi erinevate ahelapikkustega sahhariidide kindlakstegemiseks. TLC puhul toimub segu komponentide lahutamine õhukese silikageeli plaadi abil. Silikageel on hüdraaditud ränidioksiid ($\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$), mis on väga poorne tahke aine ning ülimalt hügrokoopne. Väiksemad molekulid näiteks monosahhariidid läbivad voolutis liikudes silikageeli poore hõlpsamalt kui suured molekulid ning seetõttu liiguvad esimesed plaadis kiiremini edasi ning jõuavad kaugemale. Samas suured molekulid (nt polüsahhariidid) ei pääse pooridest läbi ning ei liigu seetõttu plaadis edasi. Segu, mille komponente tahetakse lahutada, kantakse silikageeli plaadi ühte serva, nn stardijoonele. Uuritavad ained kannab vooluti, mis on varieeruva koostisega vedelike segu. Plaat asetatakse ühe servaga voolutisse (uuritav proov ei tohi vedeliku sisse sattuda) ning see hakkab kapillaarsuse toimel mööda plaati edasi liikuma (joonis 6). Sellega koos liiguvad läbi silikageeli ka uuritava segu komponendid ning need eralduvad teineteisest vastavalt molekulmassile, monomeeride koostisele aga ka sidemetüübile. Väikseimad molekulid liiguvad stardijoonest kõige kaugemale ja suurimad jäävad sellele pidama. Sahhariidide nähtavaks tegemiseks kasutatakse ilmutit. Kui uuritav aine reageerib ilmutiga, tekib värvunud saadus, mida on silikageelil võimalik eristada (Clark, 2007).



Joonis 6. Õhukese kihi kromatograafia skeem. Näidatud on põhilised komponendid ja segu lahutamise põhimõte. (modifitseeritud Instrumentation Tools)

Suhkruid sisaldavas minimaalsöötmes kasvanud bakterite proovid (ptk 2.2.3.) koguti kõikide ajapunktide kohta peale kultuuri OD mõõtmist Eppendorfi tuubidesse ja rakud eraldati söötimest tsentrifuugimisega (1 min 13 000 pööret/min) kasutades Eppendorfi tuubitsentrifuugi. Proove säilitati $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, et vältida võimalikku suhkrute lagunemist enne analüüsi. Kõigist proovidest kanti $0,5\text{ }\mu\text{l}$ TLC plaadi eelnevalt hariliku pliatsiga tähistatud stardijoonele (kontsentreeriva tsooniga silikageel 60, Merck, Saksamaa). Kontrollina kasutati sama kontsentratsiooniga (5 g/l) levaani, IFOS-ide ja inuliini lahust. Selleks, et TLC plaadil oleks võimalik sahhariide ning nende ahelate pikkusi määrata, kasutati varem valmis segatud markersuhkrute segusid (T. Visnapuu). Marker 1 koostises olid fruktoos (lõppkontsentratsioon 30 mM), sahharoos (30 mM), 1-kestoos (10 mM), nüstoos (10 mM), levaan (8 g/l). Marker 2: glükoos (30 mM), maltoos (30 mM), maltotrioo (10 mM), stahhüoos (trisahhariid: galaktoos, glükoos, fruktoos; 6 mM). Markereid kanti plaadile samuti $0,5\text{ }\mu\text{l}$.

TLC plaatide voolutamine ja ilmutamine tehti tõmbkapis ja kasutati nitriilkindaid. Voolutina kasutati kloroformi, äädikhappe ja vee segu, kus ainete ruumalade suhted on vastavalt 6 : 7 : 1 (Mardo *et al.*, 2017). TLC plaati voolutati 2 korda seda vahepeal fooniga kuivatades, et tagada suhkrute parem lahutamine. Plaat kuivatati fooniga tõmbekapis. Ilmutina kasutati metanooli baasil aniliini reaktiivi (10,9 g/l difenüülamiin, 10,9 g/l aniliinhüdrokloriid, 910 ml metanool, 90 ml *ortho*-fosforhappe) (Ernits *et al.*, 2019a). Aniliin reageerib sahhariididega ning moodustuvad värvilised ühendid. Plaati pritsiti aniliini reaktiiviga, kuivatati ja seejärel kuumutati seda alumiiniumfooliumi sisse pakituna 10 minutit $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fruktoos ja FOS-id muutuvad oranžikaks, glükoos ja teised glükoosi sisaldavad oligosahhariidid sinakaks, sahharoos jt nii glükoosi- kui ka fruktoosijääke sisaldavad oligosahhariidid pruuniks.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

Polüfruktaansel levaanil ja ka levaani-tüüpi oligosahhariididel on spetsiifiliste ja sobivate omaduste tõttu suur potentsiaal nii tervise- kui ka kosmeetikatoodetes ja tehnoloogilistes lahendustes (vt ptk 1.2.) (Öner *et al.*, 2016). Samas on levaani toimete kohta erinevatele bakterirühmadele ja kasvuvõimele suhteliselt vähe teada, seda põhiliselt levaani vähese kättesaadavuse ja kõrge hinna tõttu. Levaani tööstuslikus skaalas põhimõtteliselt ei toodeta. Näiteks 1 g *Erwinia herbicola* levaani (tootekood: L8647) maksab firmast Sigma-Aldrich ostes 336 eurot (Sigma-Aldrich). Tartu Ülikooli bakteri- ja pärmivalkude uurimiserühmas töötatakse välja sobivat meetodit, et senisest efektiivsemalt levaani ja IFOS-e toota eesmärgiga nende ainete kasutusvõimalusi edasi uurida (Ernits *et al.*, 2019b).

Levaani ja IFOS-e kui kasvusubstraati on seni testitud mõne valitud probiootilise tüvega laktobatsillide ja bifidobakterite hulgast (Marx *et al.*, 2000; Porras-Domínguez *et al.*, 2014). Tulemused on paljulubavad, sest mitmed liigid perekondadest *Bifidobacterium* ja *Lactobacillus* kasvavad levaanil ja IFOS-idel ning kasutavad neid fruktaane C-allikatena. Lisaks on levaani mõju uuritud tervete inimeste ning normaalkaalus ning ülekaaluliste laste fekaalikooslustele (Adamberg *et al.*, 2005) ja soolestiku mudelsüsteemis (Liu *et al.*, 2020). Tulemused kinnitavad, et levaani-tüüpi sahhariididel on eripärane soodustav mõju bakteritele rühmadest *Bifidobacteria* ja *Eubacterium*. Tuleb aga tähele panna, et need eksperimendid on tehtud anaeroobses keskkonnas ja söötmes, mis sobib spetsiifiliselt soolestiku bakteritele (Adamberg *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2020). Paljud näiteks nahal ja limaskestadel ning keskkonnas elavad bakterid, kes loodusliku ja ka erinevates toodetes potentsiaalselt leiduva levaaniga võiksid kokku puutuda, kasvavad aeroobselt hapniku juuresolekul, kuid sobivaid kasvutingimusi levaani mõju testimiseks sellistel bakteritel välja töötatud ei ole. Seega võeti selle töö üheks eesmärgiks testida erinevaid söötmeid ja kasvutingimusi, mis võiksid sobida mitmetele erinevatele bakterirühmadele levaanil ja IFOS-idel kasvu hindamiseks.

3.1. Bakteritüved ja neile sobiva MRS söötme valimine

14 bakteriüve, mille kasvu hinnati kolmel erineva koostisega MRS söötmel, saadi töögrupi säilitustüvede hulgast (T. Visnapuu ja T. Alamäe). Testitud tüvedeks olid järgmised bakterid (ptk 2.1.3.): *Lc. lactis*, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. delbrueckii*, *P. aeruginosa* PAO1, *P. mendocina* PC10, *Ba. cereus*, *Ba. subtilis* 168, *E. coli*, *Ec. faecalis*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, metitsilliin-resistentne *S. aureus* (MRSA). Bakterid valiti nende mitmekesise päritolu,

leviku, kuuluvuse ja omaduste tõttu. Valikus oli nii probiootilisi tüvesid (laktokokk ja laktobatsillid) jt inimese mikrofloorasse kuuluvaid baktereid (streptokokid, enterokokk, soolekepike), keskkonnabaktereid (batsillid, pseudomonased), ja ka võimalikke patogeene (listeeriad, MRSA, *P. aeruginosa*).

Piimhappebakterid *Lc. lactis*, *Lb. rhamnosus* ja *Lb. delbrueckii* on võimelised lagundama laktoosi piimhappeks ning seetõttu kasutatakse mitut neist hapendatud piimatoodete ning juustu valmistamisel. Laboratoorselt on piimhappebaktereid kõikidest valitud tüvedest kõige raskem kasvatada. Neil on erilised nõudmised söötme koostise osas (vajavad vitamiine ja kasvufaktoreid) ning suhteliselt aeglane kasvukiirus. *Lc. lactis* on üks enimkasutatavaid baktereid toiduainetööstuses. Kasvukeskkonna suhtes on ta väga nõudlik ja ta ei ela inimkudedel. Looduses kasvab taimsel materjalil, eelkõige kõrrelistel. Seetõttu arvatakse, et see tüvi võiks olla võimeline teiste taimsete polüsahhariidide kõrval lagundama ka fruktaane (Siezen *et al.*, 2007). *Lb. rhamnosus* elab lisaks fermenteeritud toiduainetele ka inimese pinnal, kaitseb meie keha patogeensete mikroobide eest ja kuulub soole mikrofloora koosseisu. Seda tüve kasutatakse meditsiinis mitmete kõhuhaiguste raviks. On teada, et see tüvi on võimeline lagundama inimesele seedumatuid polüsahhariide, kaasaarvatud inuliini (Souza Oliveira *et al.*, 2012). Kuna *Lb. rhamnosus* ei talu hapnikurikast keskkonda, siis kasvasime seda tüve vedelkultuuris ilma aereerimata. *Lb. delbrueckii*l on väga lai substraatide spekter, mida ta on võimeline toiduks kasutama. Lisaks laktoosile, glükoosile, fruktoosile ja mannoosile suudab see bakter lagundada galaktoosi, sahharoosi, mannoosi, trehaloosi. Tüvi eelistab kasvada anaeroobses keskkonnas. *L. delbrueckii* alamliik *lactis*'t on leitud ainult piimast (Penetrante, 2010). Sõltuvalt eelmainitud tüvede omadustest on olemas tõenäosus, et need tüved võiksid fruktaane lagundada. Ka *Ba. subtilis*'t peetakse probiootiliseks bakteriks (Jensen *et al.*, 2016).

MRS sööde on algselt töötatud välja laktobatsillide selektiivseks kasvatamiseks. Seetõttu sisaldab see teiste liikide elutegevust pärssivaid komponente ning *Lactobacillus*'te kasvu soodustavaid koostisosi, nt naatriumatsetaat, mis on tuntud ka toiduainetööstuses kasutatava lisaaine E262 nime all. See pärsib mitmete bakterite kasvu (Sallam, 2007). Kuna laktobatsillid on valitud tüvedest kõige nõudlikumad söötmekomponentide suhtes, siis testiti kõigi bakterite kasvu just sellel söötmel. Kasutati kolme erineva retsepti järgi valmistatud MRS tardsöödet glükoosiga (ptk 2.1.2.) ja külvati kõik tüved joonkülvil meetodil söötmetele. Kasvu jälgiti 2 päeva jooksul ja hinnati 3 palli skaalas kasvu intensiivsust. Tulemused on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. 14 bakteriliigi kasv erinevatel MRS söötmetel. Kasvu intensiivsus on märgitud numbritega: 0 – kasv puudub (punane); 1 – üksikud kolooniad külvijoonel (oranž); 2 – tugev kasv külvijoonel, kolooniad eristamatud (roheline).

Tüvi	Modifitseeritud MRS (Suitso)		MRS (Goh <i>et al.</i>)		MRS (Sigma-Aldrich)	
	14 h	48 h	14 h	48 h	14 h	48 h
<i>Lb. delbrueckii</i>	0	1	0	1	0	1
<i>Lb. rhamnosus</i>	1	1	0	1	1	2
<i>Lc. lactis</i>	1	2	1	2	1	2
<i>P. aeruginosa</i>	2	2	1	2	1	2
<i>P. mendocina</i>	1	2	0	0	0	0
<i>Ba. cereus</i>	1	2	1	2	2	2
<i>Ba. subtilis</i>	1	2	0	1	0	0
<i>E. coli</i>	1	2	1	2	1	2
<i>Ec. faecalis</i>	1	2	1	2	1	2
<i>L. innocua</i>	1	2	1	2	1	2
<i>L. monocytogenes</i>	0	2	0	1	1	2
<i>S. epidermidis</i>	1	2	1	2	1	2
<i>S. aureus</i>	2	2	1	2	1	2
MRSA	2	2	1	2	1	2

Sobiva MRS söötme valimise katse tulemustest selgus, et selles töös kasutatavatele bakteritele sobis kõige paremini modifitseeritud MRS söötme retsept (tabel 1). Esimese 24 tunniga ei olnud kolooniaid näha ainult 2 tüve puhul, 9 tüvel olid nähtaval üksikud kolooniad ning 3 tüve kasv oli tugev. Goh *et al.* (2006) söötmel ei olnud esimese 24 tunniga nähtavaid kolooniaid moodustanud 5 tüve ning ülejäänute puhul oli kasv pigem nõrk. Sigma Aldrichi söötmel suutis ainult *Ba. cereus* esimese 24 tunniga väga hästi kasvada. 48 tunniga olid modifitseeritud MRS-il kasvanud väga hästi enamik tüvedest ning aeglasekasvulised ja hapnikutundlikumad laktobatsillid piirdusid vähese kasvuga. Goh *et al.* söötmel olid 48 tunniga kasvanud mingil määral üles 13 tüve, aga mitte *P. mendocina*. Sigma-Aldrichi retseptiga söötmel kasvasid 48 tunniga enamik tüvesid, aga kasvu ei olnud kasvu märgata *P. mendocina* ja *Ba. subtilis*'e.

Tulemustest järeldub, et valitud tüvedele on kasvuks kõige sobivam modifitseeritud MRS sööde, mida kasutati järgneva katse tegemiseks. Erinevate tüvede kasvu võrreldes on näha, et kõige aeglasemini kasvavad piimhappebakterid. Seda võib seletada nende tüvede väiksema hapnikutaluvusega. Sellest lähtuvalt kasvatatakse edasistes katsetes *Lb. rhamnosus*'t katseklaasis, mitte kolvis, kuna seal on hapnikul söötmele väiksem ligipääs, ning ilma

aereerimata. Kuna *Lb. delbrueckii* kasvas testitud tingimustel väga halvasti, siis seda järgnevas kasetes ei kasutatud.

Kaks retsepti (Sigma-Aldrich ja Goh *et al.*, 2006) sisaldasid naatrumatsetaati, mis ilmselt pärssis mitme bakteritüve, eriti keskkonnabakterite *P. mendocina* ja *Ba. subtilis*'e kasvu. Ühes söötme variandis (Suitso, 2004) asendas seda naatriumsitraat, mis on mitmetele bakteritele palju sobivam ja kasutatav ka võimaliku C-allikana. Kahes retseptis (Suitso, 2004 ja Goh *et al.*, 2006) sisalduv Tween 80 on pindaktiivne aine, mis muudab rakkudele toitained kergemini omastatavaks, ning tulemustest selgub, et lisaks laktobatsillidele toimis see aine ka teistele bakteritele ning kasvu oluliselt ei mõjutanud.

3.2. Bakteritüvede kasvuerinevuste testimine tilkkülvi meetodiga

Esimese katse tulemuste põhjal valiti välja 8 huvipakkuvat tüve, millega tehti kasvuerinevuste testimine modifitseeritud MRS söötmel tilkkülvi meetodiga (vt ptk 2.2.2.). Piimhappebakteritest kasutati *Lb. rhamnosus*'t ja *Lc. lactis*'t, keskkonnabakteritest *Ba. subtilis*'t. Soolebakteritest *E. coli*'t ja *Ec. faecalis*'t, nahal leiduvatest bakteritest kasutati *S. aureus*'t ning potentsiaalsetest patogeenidest *P. aeruginosa*'t ja *L. monocytogenes*'t.

Selle katses uuriti 7 erinevat substraati: glükoos, fruktoos, levaan, levaani FOS-id, inuliin, palatinoos ja Orafit®P95. Sahhariidide iseloomustus on toodud peatükis 2.1.1. Tüved kasvatati ning lahjendati steriilses füsioloogilises lahuses 10-kordsete lahjenduste reana (10^0 – 10^{-4}) ning külvati tilkadena erinevaid sahhariide (5 g/l) sisaldavatele söötmetele. Negatiivse kontrollina kasutati ilma sahhariidita MRS söödet. Katse tulemusena saadud söötmetasside pildid on esitatud lisas 2. Katse tulemustest kõige suuremas välja külvatud lahjenduses koostati tabel 2.

Tabel 2. 8 bakteriliigi kasv erineva sahhariidiga MRS söötmel 1×10^4 korda lahjendatud variandis. 0 – kasv puudub (punane); 1 – üksikud/väiksed kolooniad külvialal (oranž); 2 – tugev kasv külvialal (kollane), 3 – väga tugev kasv, kolooniad eristamatud (roheline) – MRS sööde ilma sahhariidita.

Tüvi	-	Glükoo s	Frukto s	Levaa n	IFOS	Inuliin	Palatinoo s	P95
<i>Lb. rhamnosus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lc. lactis</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>P. aeruginosa</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Ba. subtilis</i>	0	1	0	0	1	1	0	2
<i>E. coli</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Ec. faecalis</i>	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>L. monocytogenes</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>S. aureus</i>	1	1	0	1	1	2	0	1

Kõik tüved kasvasid testitud söötmel ja substraatidel väga hästi (lisa 2), kuid *Ba. subtilis* ja *S. aureus* kõige suuremast lahjendusest tehtud külvis enam peaaegu et ei kasvanud. Ka piimhappebakterid kasvasid suhteliselt hästi kõikidel söötmel ning enamikel tüvedel suuri kasvuerinevusi ei ilmnunud (tabel 2, lisa 2). *Ba. subtilis* kasvas lisaks glükoosiga söötmele ka IFOS-e, inuliini ja Orafti®P95 sisaldaval söötmel, mis viitab sellele, et see tüvi kasutab fruktaane. *Ba. subtilis* on looduses levinud mulla ülemistes kihtides ning mäletsejate ja ka inimese soolesikus (Jensen *et al.*, 2016). On tehtud kindlaks, et tal on levaansukraas levaani sünteesiks ja levanaas fruktaanide lagundamiseks. *B. subtilis* kasutab levaani EPS-ina, mis võimaldab rakkudel omavahel kokku kleepuda. Looduses on see bakteril vajalik biofilmi tekkeks, mullaosakestele kinnitumiseks ja toksiliste ainete sidumiseks (Ben Ammar *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2016). Levaani sisaldavas vedelsöötmes on moodustab *B. subtilis* rakukobaraid, mida nägin ka selle töö raames (lisa 3). Kollaselt pigmenteerunud *S. aureus*, mida leidub näiteks inimese nahal ja ülemistes hingamisteedes andis samamoodi kasvuerinevusi. Huvitaval kombel soodustas inulin *S. aureuse* kasvu. Kuna *S. aureus* moodustab rakkude kobaraid, siis võivad kasvuerinevused osaliselt selle tõttu tekkida, sest rakususpensiooni segamisel ja lahjendamisel tekkinud väiksemad ebatäpsused võimenduvad (Missiakas, Schneewind, 2013). Et mainitud tüvede puhul eksperimentidist lõplik järeldus teha, siis võiks katset korrata, et välistada võimalikud pipeteerimise vead.

Huvitav oli ka see, et ka ilma sahhariidi lisamiseta kasvasid tüved kästi. See võiks olla seletatav sellega, et kasutatud MRS sööde sisaldab mitmeid erinevaid komponente, mis võivad olla bakteritele C- ja energiaallikaks. Selleks võib olla näiteks naatriumtsitraat, aga ka aminohapped trüptoonist ja lipiidid aju infusioonist (vt ptk 2.1.2.). Seega saab teha järelduse, et laktobatsillide puhul standardne C-allika kasutamise testimise sööde MRS ei sobi suure bakteritüvede valimi korral sahhariididel kasvu testimiseks. Vajalik oleks kasutada pigem toitainete poolest vaesemat söödet. Edasistes eksperimentides kasvu detailsemaks uurimiseks kasutati seetõttu M9 segul baseeruvat minimaalsöödet.

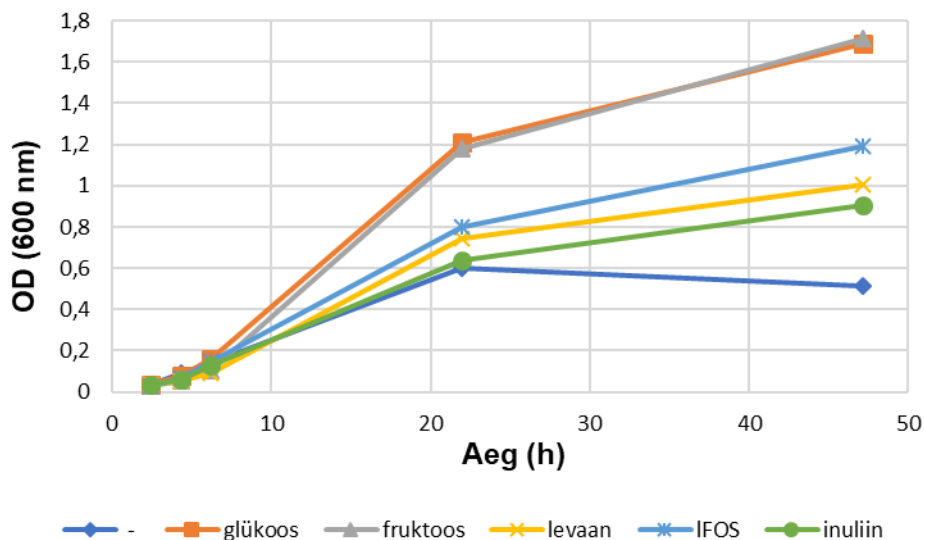
3.2. Bakterite kasvu hindamine minimaalsöötmes kõverate abil

Järgnevalt valiti 4 tüve, mille puhul testiti kasvu minimaalsöötmes, kus ainukeseks C-allikaks oli üks järgnevatest sahhariididest: glükoos, fruktoos, levaan, IFOS-id, inuliin. Glükoosi kasutati positiivse kontrollina, kuna seda kasutavad kõik testitud tüved. Fruktoos on fruktaanide momomeer ning levanaasi reaktsioonis tekkiv produkt ning seetõttu antud töö kontekstis huvitav. Katsesse võeti ka kõik inuliini- ja levaani-tüüpi fruktaanid, millel bakterite kasvu uurimine oli selle töö eesmärk. Negatiivse kontrollina kasutati minimaalsöödet ilma sahhariidi lisamiseta.

Töö raames koostati minimaalsöötmes kasvukõverad *Ba. subtilis*-le, kes kirjanduse andmetel peaks fruktaane lagundama tänu oma levanaassele aktiivsusele (Porrás-Domínguez *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2016), *E. coli*-le, kes vastavalt teabele levaani lagundada ei suuda (levanaas-negatiivne) ja kahele huvipakkuvale probiootilisele bakterile – *Lb. rhamnosus* ja *Lc. lactis*. Eelnevalt oli teada, et need tüved suudavad kasvada glükoosi sisaldavas M9 minimaalsöötmes (T. Visnapuu).

Bakteritüved kasvatati kõigepealt 5 ml 5 g/l glükoosiga M9 minimaalsöötmes ning seejärel külvati erinevate sahhariididega M9 söötmega kolbidesse, et saada kasvukõver. Rakke kasvatati 30 °C ja mõõdeti erinevatel ajapunktidel (2,4–93,7 h) mikrotiiterplaatidel spektrofotomeetriliselt kultuuride OD-d (ptk 2.2.3.).

Ba. subtilis-e kasvukõverad on esitatud joonisel 7. Eeldustele vastavalt toimus kõige kiirem kasv ning saavutati kõige kõrgem OD, mis vastab suurele rakkude arvukusele, glükoosi või fruktoosiga söötmes kasvades. Kuna tegemist on monosahhariididega, siis on neid kõikidest siin kasutatavatest substraatidest kõige lihtsam rakku transportida.



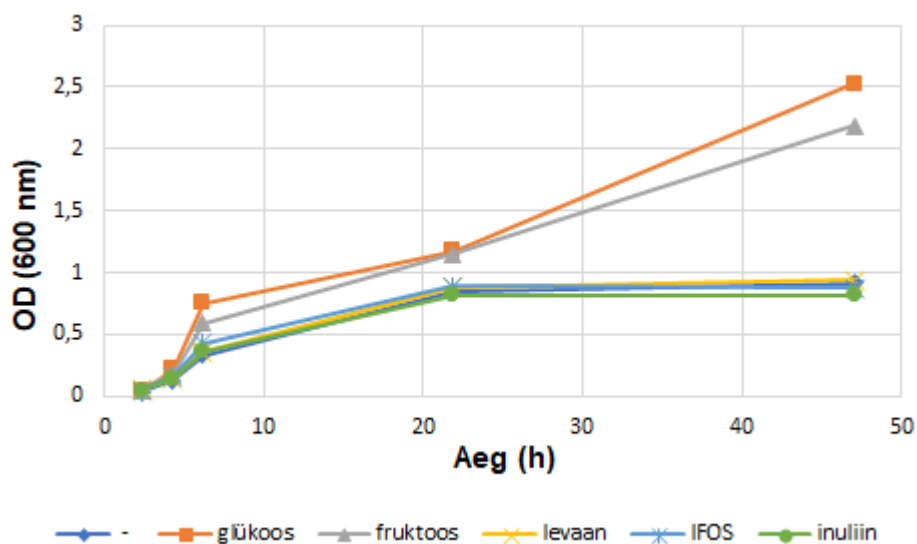
Joonis 7. *Ba. subtilis*-e kasv M9 minimaalsöötmes glükoosil, fruktoosil, levaanil, IFOS-idel ja inuliinil. - ilma sahhariidita M9 minimaalsööde. Esitatud on lainepikkusel 600 nm mikrotiiterplaadil mõõdetud optilise tiheduse (OD) väärtuste aritmeetilised keskmised erinevatel ajapunktidel.

Fruktaanidest kasvas *Ba. subtilis* kõige paremini levaani FOS-idel, mis tagas kõige kõrgema rakkude arvukuse. Üsna sarnase dünaamika ja OD-ga kasvasid rakud ka levaanil ning inuliinil. Seega leiab kinnitust see, et *B. subtilis* kasutab C-allikana fruktaane. β -2,6 sidemega suhkruid kasutas *Ba. subtilis* mõnevõrra efektiivsemalt saavutades kiiremini kõrgema OD väärtuse, mis viitab sellele, et vaatamata levaani tunduvalt suuremale molekulmassile ($4,7 \times 10^6$ Da) võrreldes

inuliiniga (5×10^3 Da), on kasv levaanil kiire (joonis 7). Seega viitaks sellele, et β -2,6 sidemega lühemad sahhariidid ja ka hargnenud polümeer on mõnevõrra eelistatumad substraadid. Tulemusi kinnitas ka söötmes pH hindamine indikaatorribadega. Nimelt kui sahhariide kasutati, siis sööde hapestus. Kui *Ba. subtilis* oli 47,2 h kasvanud glükoosil ja fruktoosil, siis söötme pH oli langenud 6,7-le, samas oli fruktaane sisaldavate kasvukeskkondade pH ligi 7,0 ning kontrollisöötmes 7,3.

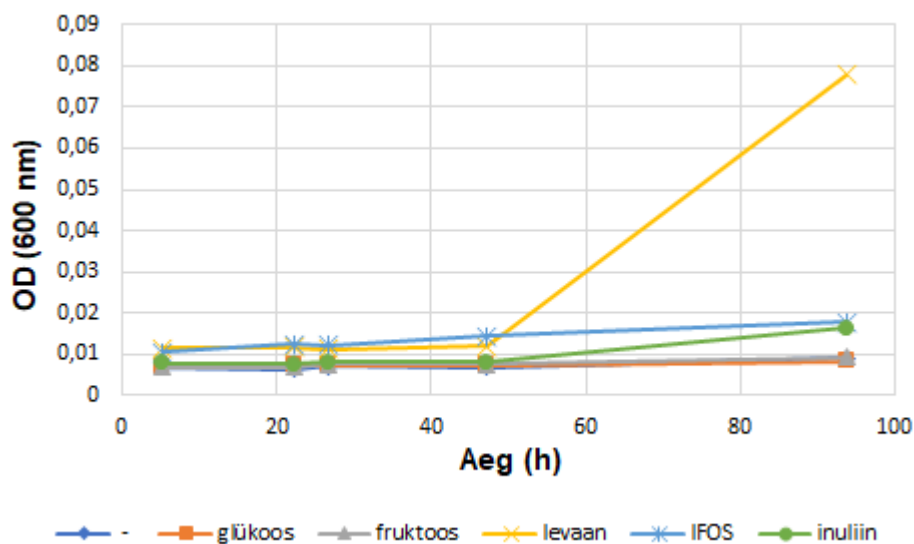
Kasv esines ka negatiivses kontrollis, mille söötmesse ei lisatud ühtegi substraati. Arvatavasti oli selleks oli eelkasvatusest bakterite külvamisel kaasa tulnud glükoos, mida ei olnud eelneva kasvu jooksul täiesti ära kasutatud. Kuna seda sattus keskkonda väga vähe, siis kasutasid rakud glükoosi esimese ööpäeva jooksul ära. Seda teooriat kinnitas ka edasine produktide TLC analüüs (vt ptk 3.4.). Et edaspidi taolist sahhariidi ülekannet vältida on võimalik rakud enne kasvukõvera jaoks edasikülvamist söötimest tsentrifuugida ja steriilse füsioloogilise lahusega pesta.

Sarnaselt *Ba. subtilise*-le oli ka *E. coli* puhul kasv kõige intensiivsem monosahhariididel ja glükoos oli kõige sobivam C-allikas (joonis 8). Levaanil, I-FOS-idel ja inuliinil oli kultuuri OD samasugune, nagu ilma C-allika lisamiseta kontrollkatses. Seega *E. coli* neid sahhariide C-allikana ei kasuta nagu viitavad ka kirjanduse andmed (Porrás-Domínguez *et al.*, 2014). OD suurenemine katse vältel on seletatav eelkasvatusest kaasa tulnud glükoosiga. Kuna kasvukõverad fruktaanidel ühtivad negatiivse kontrolli kasvukõveraga, siis peale glükoosi ära kasutamist teisi C-allikaid kasutusele ei võetud (joonis 8). pH määramine söötimest 47 h proovis viitas samale tulemusele, sest ainult glükoosi ja fruktoosi puhul oli pH langenud (pH 6,7), kui kõikides teistes söötmetes oli pH 7,0 ümbruses.



Joonis 8. *E. coli* kasv M9 minimaalsöötmes glükoosil, fruktoosil, levaanil, IFOS-idel ja inuliinil. - ilma sahhariidita M9 minimaalsööde. Esitatud on lainepikkusel 600 nm mikrotiiterplaadil mõõdetud optilise tiheduse (OD) väärtuste aritmeetilised keskmised erinevatel ajapunktidel.

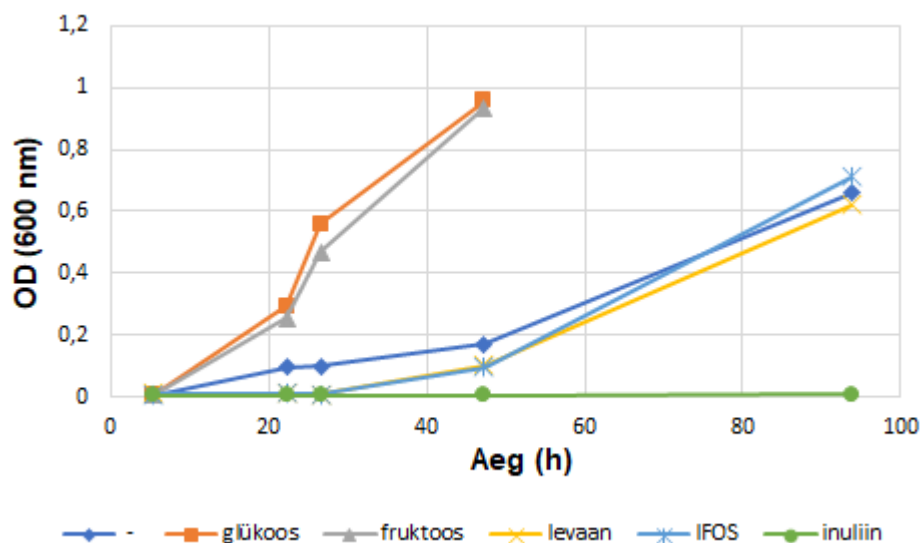
Lc. lactis oli valitud bakteritest kõige aeglasema kasvuga. Kuna on teada, et *Lc. lactis* on toitainete suhtes väga nõudlik (Siezen *et al.*, 2007), siis toimus uuritud ajaperioodi vältel minimaalsöötmes ainult väga nõrk kasv (joonis 9). Kontrollisöötmes, glükoosil ja fruktoosil ei toimunud märkimisväärset kasvu. Nende proovide OD jäi katse lõpus alla 0,02 (mikrotiiterplaadil 200 µl mahus). Natuke paremini, kuid siiski väga aeglaselt paljunesid rakud levaanil (joonis 9), mis näitab, et looduslikud polüfuktaanid võiksid soodustada laktokokkide kasvu. Märgatav rakkude paljunemine algas alles 48 tundi pärast katse algust. pH-d *Lc. lactis*'e puhul ei määratud, sest kasv oli väga aeglane, et pH erinevusi registreerida. Ilmselt antud minimaalsöötme retseptist puudub mõni *Lc. lactis*'ele vajalik komponent. Et kinnitada katse tulemust, tuleks leida laktokokkidele sobivam minimaalsöötme retsept ning katset korrata ka ilma aereerimata kultuuris, et välistada hapniku pärssiv toime *Lc. lactis*'e kasvule.



Joonis 9. *Lc. lactis*'e kasv M9 minimaalsöötmes glükoosil, fruktoosil, levaanil, IFOS-idel ja inuliinil. - ilma sahhariidita M9 minimaalsööde. Esitatud on lainepikkusel 600 nm mikrotiiterplaadil mõõdetud optilise tiheduse (OD) väärtuste aritmeetilised keskmised erinevatel ajapunktidel.

Lb. rhamnosus kasvas kõige intensiivsemalt glükoosil ja fruktoosil (joonis 10). Seetõttu lõpetati nende substraatidega katse varem (viimane punkt 47,3 h). Levaanidel ja IFOS-idel oli kasv aeglane ning ei olnud võimalik neil substraatidel saadud kasvukõveraid eristada ilma sahhariidita variandist. Inuliini puhul kasvu üldsegi ei toimunud, mis on mõneti vastuolus kirjanduses toodud andmetega (Souza Oliveira *et al.*, 2012). Ajapunktidel võetud proovidest tehtud TLC analüüsil

aga selgus, et eelkasvatusest pärinev glükoos sai levaani ja IFOS-idega söötmes otsa juba enne 47 h proovipunkti (vt ka joonis 13). Seega oli edasine *Lb. rhamnosus*'e rakkude kasv levanil ja levaani FOS-idel võimalik, millele viitavad ka kirjanduse andmed. Seda toetavad ka pH mõõtmised kasvusöötmes 93,7 h ajapunktil, mille puhul oli kontrollvariandi pH 7,3, monosahhariidide puhul oli toimunud efektiivne hapestumine (pH 5,5) ning fruktaanidel pH veidi langenud (pH 6,7). Siiski tuleks järgnevatiks katseteks leida laktobatsillidele veidi sobivamad tingimused ja kasutada ilma sahhariidita sissekülvi, et tagada usaldusväärsemad tulemused.



Joonis 10. *Lb. rhamnosus*'e kasv M9 minimaalsöötmes glükoosil, fruktoosil, levanil, IFOS-idel ja inuliinil. - ilma sahhariidita M9 minimaalsööde. Esitatud on lainepikkusel 600 nm mikrotiiterplaadil mõõdetud optilise tiheduse (OD) väärtuste aritmeetilised keskmised erinevatel ajapunktidel.

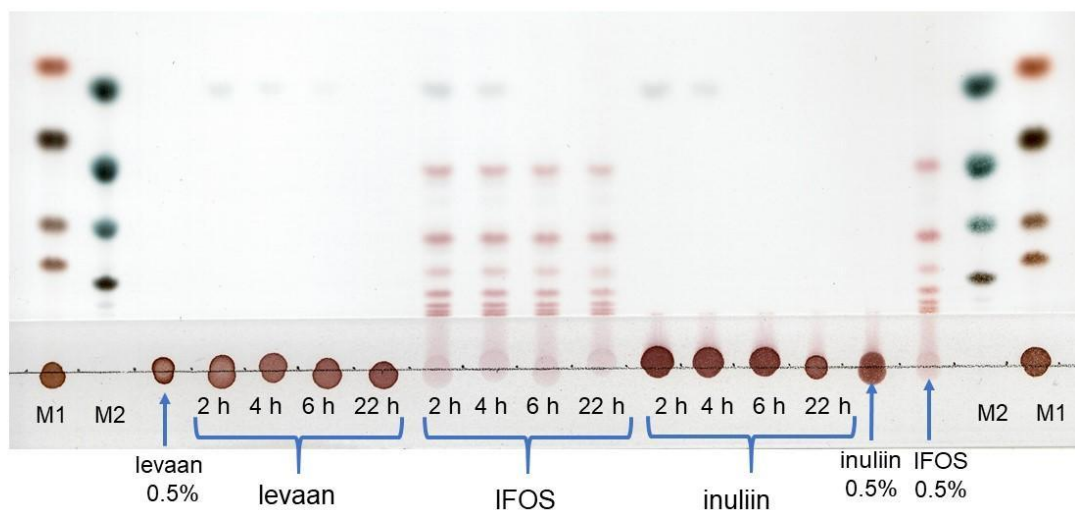
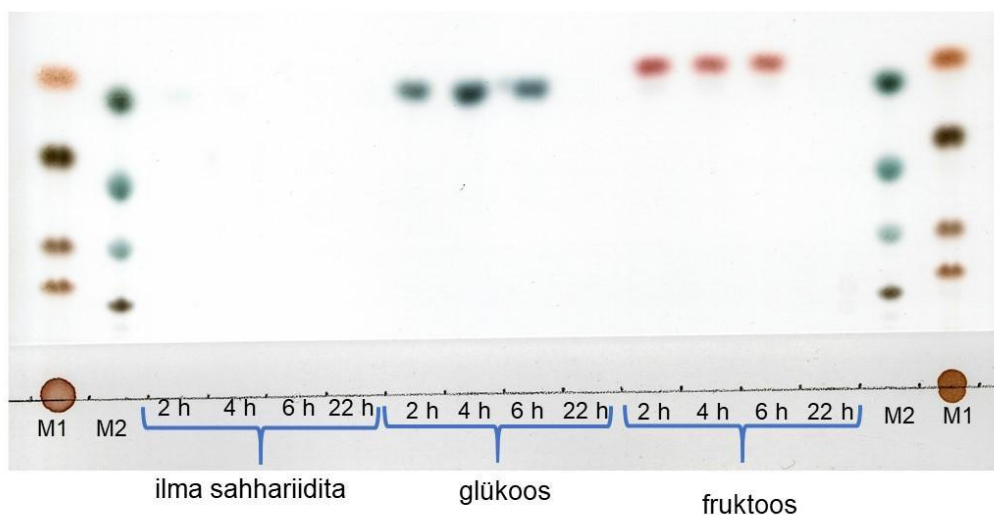
Saadud kasvukõverate alusel võib järeldada, et *Ba. subtilis* kasutab kasvusubstraadina fruktaane ning *E. coli* mitte. Prebiootilistele laktobatsillidele ja laktokokkidele tuleks leida sobivamad kasvutingimused, et kinnitada saadud tulemusi, mis viitavad sellele, et *Lc. lactis* on võimeline levanil kasutama ja *Lb. rhamnosus* suudab kasvada levanil-tüüpi fruktaanidel, aga mitte inuliinil.

3.4. Sahhariidide kindlakstegemine erinevatel ajapunktidel

Selleks, et uurida, kas ja millised sahhariidid bakteritüvede kasvu käigus ära kasutatakse ja kas ning millised sahhariidid neist tekivad, analüüsiti kasvusöödet TLC-ga.

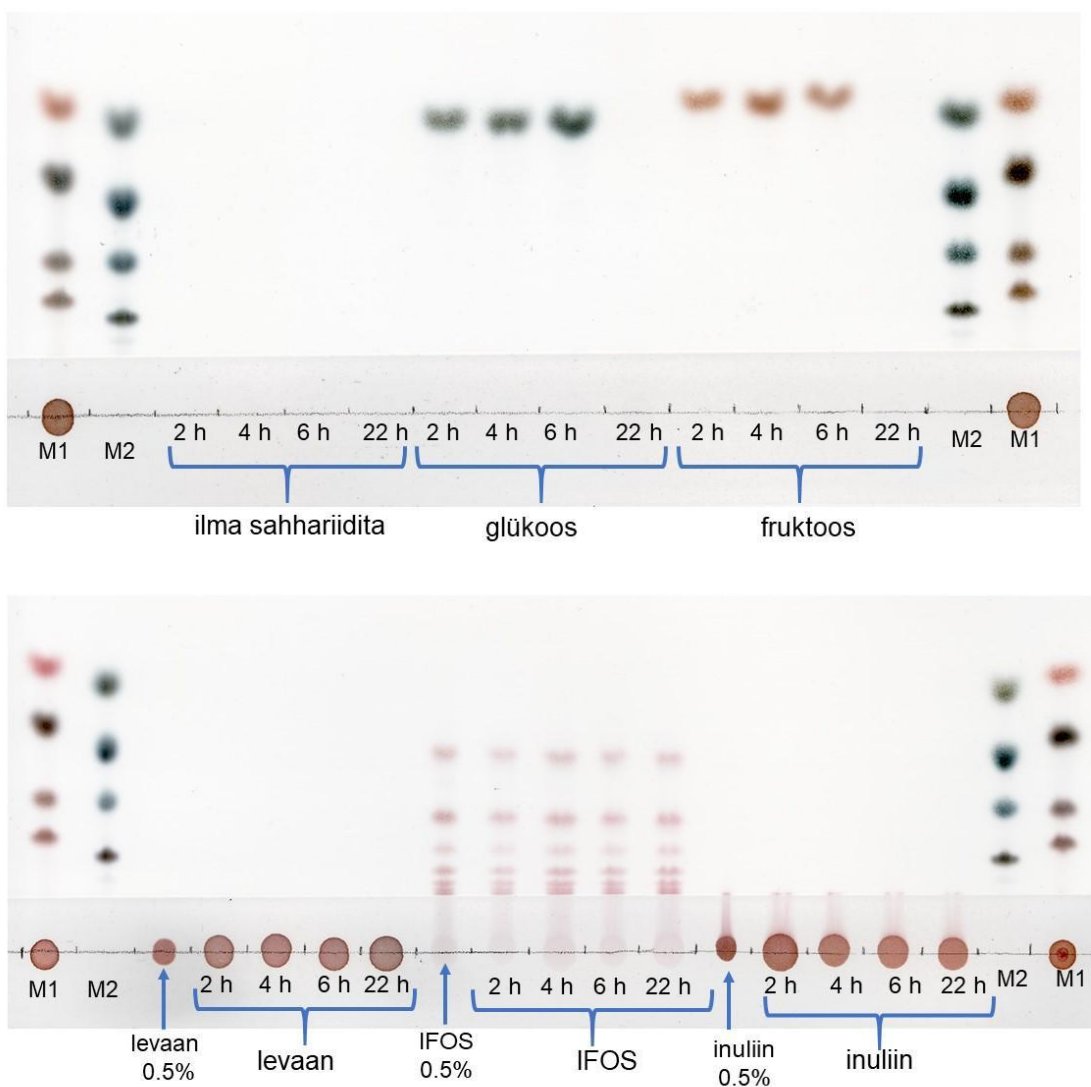
Ba. subtilis'e kasvusöödet analüüsides selgus, et ka ilma lisatud sahhariidita variandis oli varasemates ajapunktides glükoosi näha (joonis 11). See kinnitab kasvukõverate analüüsil saadud tulemust, et kontrollsööde ei ole täielikult C-allika vaba. Eelkasvatusest tuli koos külvatavate bakteritega kaasa ka väikeses koguses glükoosi, mida bakterid toiduks kasutasid.

Kuna järgnevate ajapunktide proovides glükoosi enam näha ei ole, siis kasutas *Ba. subtilis* selle esimese 4 h jooksul ära. Glükoosil ja fruktoosil kasvades kasutas tüvi need monosahhariidid 22 h jooksul täielikult ära. Levaaniga variandis on esimesel kolmel ajapunktil samuti näha glükoosi. Kuna glükoos on bakteritele palju kergemini omastatav energiaallikas kui polüsahhariid, siis oli see neile ka esmaseks C-allikaks. Peale 6 h glükoosi enam näha ei ole ning siis pidid bakterid elutegevuseks levaani kasutama hakkama, et kasvukõveral näidatud kasv saavutada (joonis 7). Kuna levaanist ei ole tekkinud FOS-e, siis suure tõenäosusega on *Ba. subtilis*'el aktiivsed eksoensüümid (joonis 11). Sama kehtib ka inuliini puhul, milles oligosahhariidide teket ei registreeritud. Ka IFOS-e said bakterid hakata kasutama peale glükoosi ammendumist. Ilmselt toimub fruktaanide kasutamine aeglaselt, sest märkimisväärselt ühtegi kindla pikkusega FOS-i sisaldus ei langenud. Et saada täpsemaid tulemusi *Ba. subtilis*'e kasvudünaamika ja substraatide eelistuse kohta, võiks varieerida substraadi kontsentratsioone ja ajapunkte, et registreerida selgemini fruktaanide hulga muutused.



Joonis 11. Sahhariidide analüüs *B. subtilis*'e kasvukõvera punktides TLC-ga. Ülemine paneel: ilma sahhariidita kontroll, glükoos, fruktoos. Alumine paneel: levaan, IFOS, inuliin. Marker 1 (M1): ülevalt fruktoos (PA 1), sahharoos (PA 2), 1-kestoos (PA 3), nüstoos (PA 4), levaan; Marker 2 (M2): ülevalt glükoos (PA 1), maltoos (PA 2), maltotriios (PA 3), stahhüoos (PA4). Markersuhktutena on kasutataud ka 0,5% levaani, inuliini ja IFOS-ide lahust.

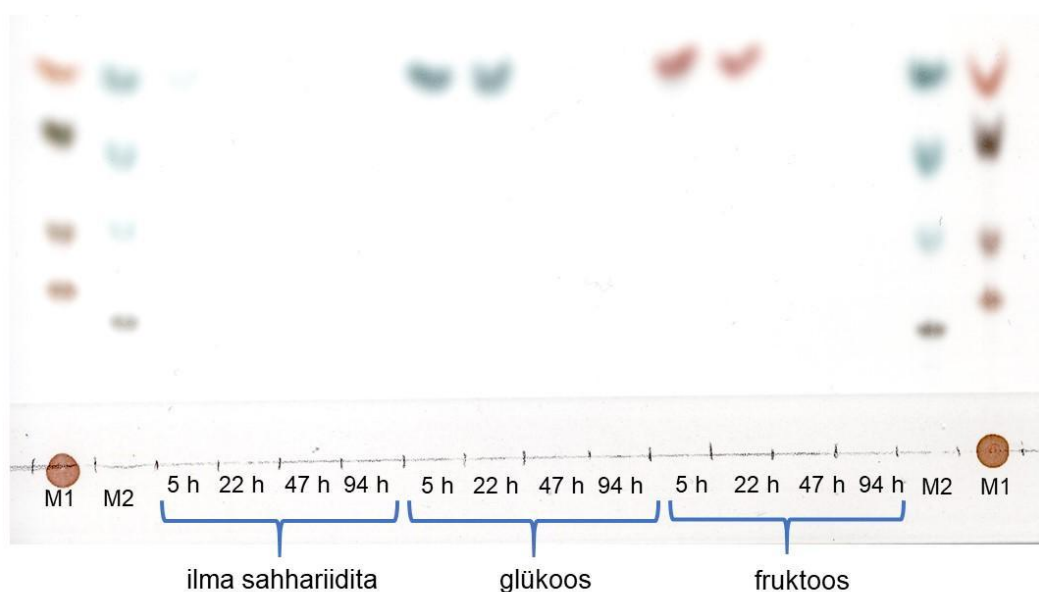
E. coli puhul tuli eelsöötmetest kaasa kõige vähem glükoosi, sest *E. coli* rakkudel oli kõige suurem algne OD ja seetõttu ka väiksem külvimäär (vt ptk 2.2.3.). Esimeseks ajapunktiks (2 h peale sissekülvi) oli kogu glükoos ära tarbitud (joonis 12). Glükoos ja fruktoos kasutati kasvukeskonnast ära 22. tunniks. Üheski fruktaanide proovis ei ole näha lisandunud mono- ega oligosahhariide, mis näitab seda, et bakteritüve kasvu käigus ei tekkinud lühemaahelalisi suhkruid (joonis 12).

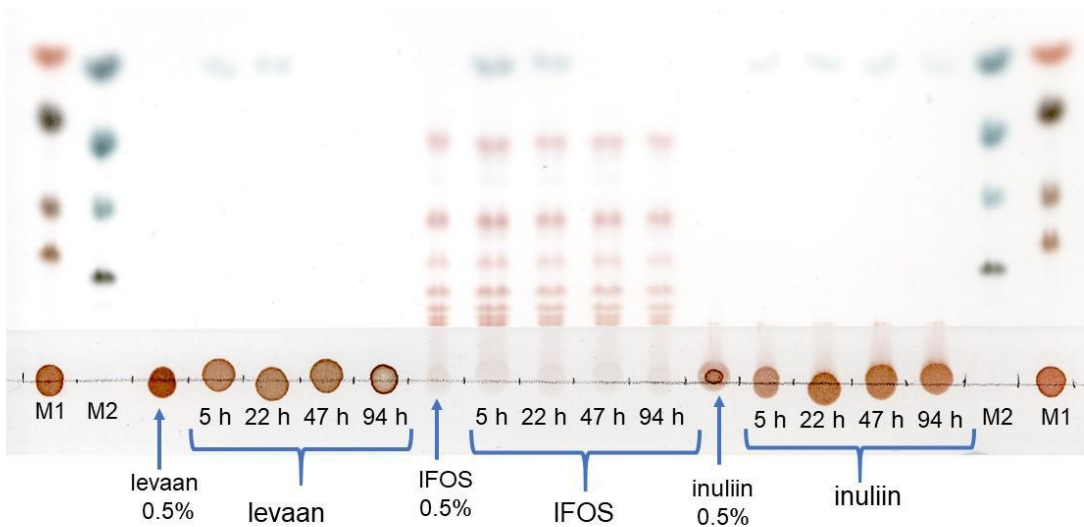


Joonis 12. Sahhariidide analüüs *E. coli* kasvukõvera punktides TLC-ga. Ülemine paneel: ilma sahhariidita kontroll, glükoos, fruktoos. Alumine paneel: levaan, IFOS, inuliin. Marker 1 (M1): ülevalt fruktoos (PA 1), sahharoos (PA 2), 1-kestoos (PA 3), nüstoos (PA 4), levaan; Marker 2 (M2): ülevalt glükoos (PA 1), maltoos (PA 2), maltotriios (PA 3), stahhüoos (PA4).

(M2): ülevalt glükoos (PA 1), maltoos (PA 2), maltotrioos (PA 3), stahhüoos (PA4). Markersuhktutena on kasutatud ka 0,5% levaani, inuliini ja IFOS-ide lahust.

Lb. rhamnosus'e kontrollsöötmes on samuti näha glükoosi (joonis 13), mis üldiselt on 47 h jooksul ära kasutatud. Järgnev kasv sai seega toimuda fruktaanide toimetel. Inuliini puhul polnud näha kasvu ei kasvukõvera puhul ega glükoosi ka vähenemist söötmes TLC analüüsil, mis viitab probleemidele rakkude elumuse osa või veaga külvamisel. Levaani ja IFOS-ga söötmetest kasutati glükoosi ära kolmandaks esitatud ajapunktiks (47 h). Kuigi levaani-tüüpi fruktaane ei ole suure intensiivsusega kasutatud, siis võib aimata sahhariidide laikude heledamat värvust 93,7 h ajapunktis (joonis 13), mis peegeldab sahhariidide mõnevõrra vähenenud kontsentratsiooni. See kinnitab, et *Lb. rhamnosuse* rakud kasutasid levaani ja IFOS-e C-allikana. Tulemuste kinnitamiseks tuleks katset korrata ning kasvuaega veelgi pikendada.





Joonis 13. Sahhariidide analüüs *L. rhamnosus*'e kasvukõvera punktides TLC-ga. Ülemine paneel: ilma sahhariidita kontroll, glükoos, fruktoos. Alumine paneel: levaan, IFOS, inuliin. Marker 1 (M1): ülevalt fruktoos (PA 1), sahharoos (PA 2), 1-kestoos (PA 3), nüstoos (PA 4), levaan; Marker 2 (M2): ülevalt glükoos (PA 1), maltoos (PA 2), maltotrioos (PA 3), stahhüoos (PA4). Markersuhktutena on kasutatud ka 0,5% levaani, inuliini ja IFOS-ide lahust.

Lc. lactis'e proove ei analüüsitud, sest kasv oli katseperioodil liiga aeglane, et sahhariidide hulgas muutusi registreerida. TLC analüüsid kinnitasid, et eelkasvatusest lisandus söötmesse glükoosi, kuid see tarbiti enamikul juhtudel väga kiiresti. Edasine kasv *Ba. subtilis*'el ja *Lb. rhamnosus*'el võimalik vaid fruktaanide kasutuselevõtuga, mis oli siiski aeglane. Kuna oligosahhariide bakterite kasvu käigus levaanist ega inuliinist söötmesse ei vabanenud, siis on arvatavasti tegu eksoensüümidega, mis vabastavad fruktoosi, mis kohe bakterite rakkudesse transporditakse.

KOKKUVÕTE

Prebiootikumid on inimestele seedumatud ained, mida kasutavad selektiivselt kasuliku toimega ehk probiootilised soolemikroobid. Prebiootikumidel on positiivne mõju peremeesorganismi tervisele. Kuna nõudlus nende ainete järele kasvab, siis otsitakse uusi võimalikke prebiootilisi komponente ning uudseid viise nende tootmist odavamaks ja lihtsaks muuta. Üheks potentsiaalseks uueks prebiootikumiks on polüfruktaan levaan ja sama sidemetüübiga oligosahhariidid, mis on bakteriaalse päritoluga. Väga efektiivselt saab levaani toota aktiivse ja stabiilse *Pseudomonas syringae* DC3000 levaansukraasi Lsc3 abil. Levaanide kasutusvõimalusi ja toimeid on seni suhteliselt vähe uuritud, kuid on näidatud levaani suurt potentsiaali mitmete probiootiliste tüvede kasvu stimuleerimisel, ning ainele on välja pakutud ka kasutusalasid meditsiinis, nanotehnoloogias, kosmeetika- ja toiduainetööstus. Sobivaid meetodeid erinevate bakteriliikide fruktaanidel kasvupotentsiaali kindlaks määramiseks on aga väga vähe välja töötatud.

Selles töös testiti erinevate meetodikate sobivust aeroobsete bakterite sahhariididest sõltuva kasvu määramiseks ja analüüsiti levaani, levaani-tüüpi oligosahhariidide ja inuliini mõju valitud probiootilistele tüvedele, potentsiaalsetele patogeensete bakterite ja keskkonnabakterite kasvule. Töö alguses püstitati kolm hüpoteesi: i) kõige sobivam sööde bakteritele levaani mõju hindamiseks on MRS sööde; ii) levaani-tüüpi fruktaanid soodustavad probiootiliste bakterite kasvu, kuid ei avalda mõju potentsiaalselt tõvestavatele bakteritele; iii) bakterid lagundavad fruktaane endo-aktiivsusega ensüümidega ning seetõttu tekib reaktsioonis erinevate ahelapikkusega sahhariide. Hüpoteeside kontrollimiseks testiti 14 erineva bakteritüve kasvu kolmel erineval MRS söötmel ja hinnati 8 valitud tüve kasvu tilkkülvi meetodikat kasutades erinevaid sahhariide (glükoos, fruktoos, levaan, levaani FOS-id, inuliin, Orafit®P95, palatinoos) sisaldaval sobivaimal MRS tardsöötmel. Koostati 4 bakteri (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*) kasvukõverad minimaalsöötmetes, kuhu ainukese süsinikuallikana oli lisatud erinevaid fruktaane. Selleks, et teha kindlaks, kas ja millise mehhanismiga fruktaane lagundatakse (ekso-või endoaktiivsus) analüüsiti bakterite kasvu vältel võetud proovidest söötme koostist õhukese kihi kromatograafia (TLC) abil.

Katsete käigus selgitati välja, et sobivaim MRS sööde laia bakteriliikide valimi kasvatamiseks on modifitseeritud MRS sööde, mis sisaldab naatriumtsitraati. Hüpotees, et MRS sööde sobib fruktaanidel bakterite kasvu hindamiseks, ei pidanud paika, sest märkimisväärsed kasvuerinevusi bakteriliikide vahel levaanil, FOS-idel ja inuliinil kasvatades ei ilmnenud. MRS sööde oli liiga toitainerikas, et hinnata erinevate sahhariidide mõju bakterite kasvule.

Fruktaanide kasutamise edasiseks uurimiseks kasvatati 4 bakteritüve minimaalsöötmes ning mõõdeti kasvuperioodi vältel kultuuride optilisi tihedusi ning analüüsiti sahhariidide sisaldust. Leidis kinnitust hüpotees, et fruktaanidel, eelkõige levaanil ja IFOS-idel, kasvasid probiootilised bakterid. *Lb. rhamnosus*'e ja *Lc. lactis*'e kasv oli väga aeglane, mis viitab kasutatud mõnevõrra ebasobivatele kasvutingimustele. *E. coli*, mida peetakse ka potentsiaalseks patogeeniks, fruktaanidel ei kasvanud. Bakterite kasvu käigus polüfrukraane sisaldaval söötmel ei tekkinud FOS-e, mis näitab seda, et suure tõenäosusega on antud tüvedel ekso-aktiivsusega ensüümid, mis levaani lagundavad ahela otsast fruktoosijääke eraldades. Seega kolmandat hüpoteesi töö tulemused ei kinnitanud. Tekkinud monosahhariidid transporditakse koheselt rakku, sest monosahhariidide teket katsete käigus ei täheldatud.

Töö tulemused viitavad sellele, et bakteriaalsed fruktaanid nagu levaan ja IFOS-id stimuleerivad probiootilise toimega bakterite kasvu. Siinses töös saadud tulemusi on võimalik edaspidi kasutada levaani mõju hindamisel erinevatele bakteriliikidele, et uurida selle potentsiaalse prebiootikumi omadusi ja toimeid.

RESÜMEE

Prebiootikumid on inimestele seedumatud ained, mida kasutavad probiootilised soolemikroobid ning millel on positiivne mõju peremeesorganismi tervisele. Kuna nõudlus nende ainete järele kasvab, siis otsitakse uusi võimalikke prebiootilisi komponente. Üheks potentsiaalseks prebiootikumiks on fruktoosi jääkidest koosnev polüsahhariid levaan. Levaanide kasutusvõimalusi ja toimeid on seni suhteliselt vähe uuritud, kuid on näidatud aine suurt potentsiaali probiootiliste tüvede kasvu stimuleerimisel. Levaanile on välja pakutud kasutusalasid meditsiinis, nanotehnoloogias, kosmeetika- ja toiduainetööstus. Sobivaid meetodeid erinevate bakteriliikide fruktaanidel kasvupotentsiaali kindlaks määramiseks on aga vähe välja töötatud.

Siinse töö eesmärk oli hinnata levaani ja levaani-tüüpi oligosahhariidide mõju valitud probiootiliste ja potentsiaalselt patogeensete bakterite kasvule ning analüüsida tekkivaid reaktsiooniprodukte. Töös püstitati kolm hüpoteesi: i) kõige sobivam sööde bakteritele levaani mõju hindamiseks on MRS sööde; ii) levaani-tüüpi fruktaanid soodustavad probiootiliste bakterite kasvu, kuid ei avalda mõju potentsiaalselt tõvestavatele bakteritele; iii) bakterid lagundavad fruktaane endo-aktiivsusega ensüümidega vabastades oligosahhariide. Testiti 14 erineva bakteritüve kasvu kolmel erineval MRS söötmel ja hinnati 8 valitud tüve kasvu tilkkülvi meetodikat kasutades erinevaid sahhariide sisaldaval sobivaimal MRS tardsöötmel. Koostati 4 bakteri kasvukõverad minimaalsöötmes, kuhu oli ainukese süsinikuallikana lisatud erinevaid fruktaane. Reaktsiooniproduktide määramiseks analüüsiti bakterite kasvu vältel võetud proovidest söötme koostist õhukese kihi kromatograafia abil.

Töös tehti kindlaks, et sobivaim sööde laia bakteriliikide valimi kasvatamiseks on modifitseeritud MRS sööde, mis sisaldab naatriumtsitraati. Hüpotees, et MRS sööde sobib fruktaanidel bakterite kasvu hindamiseks, ei pidanud paika, sest märkimisväärsed kasvuerinevusi bakteriliikide vahel erinevatel sahhariididel kasvatades ei ilmnenu. Leidis kinnitust hüpotees, et fruktaanidel, eelkõige levaanil ja levaani-frukto-oligosahhariididel, kasvasid probiootilised bakterid. Kolmandat hüpoteesi töö tulemused ei kinnitanud, kuna bakterite kasvu käigus polüfrukraane sisaldaval söötmel ei tekkinud oligosahhariide. Töö tulemused viitavad sellele, et bakteriaalsed fruktaanid nagu levaan ja levaani-tüüpi oligosahhariidid stimuleerivad probiootilise toimega bakterite kasvu. Siinses töös saadud tulemusi on võimalik edaspidi kasutada levaani mõju hindamisel erinevatele bakteriliikidele, et uurida selle potentsiaalse prebiootikumi omadusi ja toimeid.

ABSTRACT

Evaluation of the effect of polysaccharidic levan on chosen bacterial strains and detection of reaction products

Prebiotics are indigestible compounds to humans that are selectively metabolized by beneficial gut bacteria (probiotics) and bring positive health effects to the host. The demand for such substances is constantly growing in the society and the search for new prebiotic compounds has escalated. One of the potential prebiotics is polyfructan levan. There are only a few studies on applications and effects of levan, but it has been shown that levan promotes the growth of some probiotic bacterial strains. In addition, it has been proposed that levan could be implemented in medicine, nanotechnology, cosmetics and food technology. However, the development of feasible methods to assess the growth potential of different bacterial strains on levans have not been sufficient.

The aim of the study was to assess the effect of levan and levan-type oligosaccharides on growth of selected probiotic and potentially pathogenic bacteria and analyse the reaction products. Three hypotheses were set: i) the MRS medium is the most suitable for assessing the influence of levan on growth of various bacterial species; ii) levans promote the growth of probiotic bacteria, but have no effect on potentially pathogenic strains; iii) bacteria degrade levans with endo-acting enzymes with the release of fructo-oligosaccharides. The growth of 14 bacteria strains was tested on three different MRS media. The growth of 8 chosen bacterial species was assessed by drop-plate method on the suitable MRS medium with the addition of different saccharides. 4 bacterial strains were grown in a liquid minimal medium where the only carbon source was levan or levan oligosaccharides and their growth curves were recorded. To determine the reaction products, samples from the growth medium were analyzed using thin layer chromatography method.

It was found that the most suitable medium to grow a broad range of bacterial strains is modified MRS with sodium citrate. However, MRS medium has too much other nutrients for the assessment of levan's influence on bacterial growth. Hypotheses stating that probiotic bacteria can grow on levan was confirmed. No oligosaccharides were produced during the growth of bacteria on levan and exo-acting activity was proposed. The results of the study suggest that levan promotes the growth of probiotic bacteria. The obtained information can be further used to evaluate better the effect of levan on different bacteria strains and to investigate the properties and impacts of this potential prebiotic.

KASUTATUD MATERJALID

Aasamets, A. 2013. Levaansukraas Lsc3 polümeriseerijana: reaktsioonitingimuste optimeerimine soovitud produktide sünteesiks [bakalaureuse töö]. Tartu: Tartu Ülikool.

Aasamets, A. 2016. Levaani ja fruktooligosahhariidide süntees *Pseudomonas syringae* pv. tomato levaansukraasiga Lsc3 [magistritöö]. Tartu: Tartu Ülikool.

Adamberg, K., Antonsson, M., Vogensen, F. K., Nielsen, E. W., Kask, S., Moller, P. L., Ardo, Y. 2005. Fermentation of carbohydrates from cheese sources by non-starter lactic acid bacteria isolated from semi-hard Danish cheese. *International Dairy Journal*, 15, lk 873–882.

Adamberg, K., Tomson, K., Talve, T., Pudova, K., Puurand, M., Visnapuu, T., Alamäe, T., Adamberg, S. 2015. Levan Enhances Associated Growth of Bacteroides, Escherichia, Streptococcus and Faecalibacterium in Fecal Microbiota. *PloS One*, 1371, lk 1–18.

American Type Culture Collection. Bacteria. Kättesaadav: https://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Bacteria.aspx. (18.02.2020).

Aksamitiene, E. 2012 Multi-well Tissue Culture Plates. Kättesaadav: <http://www.cellsignet.com/media/templ.html>. (12.01.2020).

Banguela, A., Hernández L. 2006. Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnología Aplicada*, 23, lk 202–210.

Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, A., Linde, R. 2005. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, 40, lk 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. Kättesaadav: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165602001608?via%3Dihub>. (11.01.2020).

BENEO Orafiti. Improved digestive health with Functional Fibres. Kättesaadav: <https://www.beneo.com/ingredients/human-nutrition/functional-fibres>. (18.09.2019).

BENEO Orafiti. Oligofructose: A 100% natural sugar replacer. Kättesaadav: <https://www.beneo.com/Ingredients/Human-Nutrition/Functional-Fibres/Oligofructose>. (16.02.2020).

BENEO orafiti. Palatinose: a better alternative to common sugars. Kättesaadav: <https://www.beneo.com/ingredients/human-nutrition/functional-carbohydrates/palatinose>. (17.02.2020).

Benkeblia, N. 2013. Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. *Journal of Chromatography A*, 1313, lk 54–61.

Bondarenko, O. M., Ivask, A., Kahru, A., Vija, H., Titma, T., Visnapuu, M., Joost, U., Pudova, K., Adamberg, S., Visnapuu, T., Alamäe T. 2016. Bacterial polysaccharide levan as stabilizing, non-toxic and functional coating material for microelement-nanoparticles. *Elsevier Carbohydrate Polymers*, 136, lk 1–9.

Carranza, C. O., Fernandez, A. A., Bustillo Armendáriz, G. R., López-Munguía, A. 2015. Processing of Fructans and Oligosaccharides from Agave Plants. Kättesaadav: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124046993000159>. (13.02.2020).

Clark, J. 2007. *Thin Layer Chromatography*. Kättesaadav: <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/thinlayer.html>. (28.10.2019).

Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains. *EEMB catalogue of CELMS*. Kättesaadav: http://eemb.ut.ee/celms/main_list.php (18.02.2020).

Cosmo Bio Company. MRS Agar. Kättesaadav: https://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/RML_/454051.20110418.pdf (18.09.2019).

Cunningham, A. B., Lennox, J. E., Ross, R. J. 2008. Drop Plate Method for Counting Biofilm Cells - Instructions for Students. Kättesaadav: http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public_version/contents/appendices/appendix002/pages/page007.html. (11.01.2020).

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen. Microorganisms. Kättesaadav: <https://www.dsmz.de/services/microorganisms>. (18.02.2020).

Ernits, K., Eek, P., Lukk, T., Alamäe, T. 2019a. First crystal structure of an endo-levanase – the BT1760 from a human gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron*. Kättesaadav: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-44785-0#citeas>. (18.02.2020).

Ernits, K., Visnapuu, T., Alamäe, T. 2019b. Tavalisest lauasuhrust saab teha uudseid tervisele kasulikke kiudaineid. Kättesaadav: novaator.err.ee/1004645/tavalisest-lauasuhrust-saab-teha-uudseid-tervisele-kasulikke-kiudaineid. (18.02.2020).

Franco-Robles, E., López, M. G. 2014. Implication of Fructans in Health: Immunomodulatory and Antioxidant Mechanisms. Kättesaadav: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/289267/>. (20.09.2019).

Gibson, G. R., Hutkins R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., Reid, G. 2017. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, lk 491–502.

Heinaru, E., Vedler, E. 2011. Praktilisi töid mikrobioloogiast. Tartu: AS Atlex.

Hettwer, U., Gross, M., Rudolph, K. 1995. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Journal of Bacteriology*, 177, lk 2834–2839.

Inman M. 2011. How bacteria turn fiber into food. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3243711/>. (15.02.2020).

Instrumentation Tools. Thin-Layer Chromatography: Manual Method. Kättesaadav: <https://instrumentationtools.com/thin-layer-chromatography-manual-method/>. (11.01.2020).

Jensen, S., Diemer, M., Lundmark, M., Larsen, F., Blennow, A., Mogensen, H., Nielsen, T. 2016. Levanase from *Bacillus subtilis* hydrolyses β -2,6 fructosyl bonds in bacterial levans and in grass fructans. Kättesaadav: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016300071>. (19.09.2019).

Jõgi, E., Metsla, K., Visnapuu, T., Aasamets, A., Vija, H., Alamäe, T. 2015. Synthesis and purification of functional fructans. Proceedings of the 11th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience. 11th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, 7-9 October, Prague, Czech Republic. Ed. Rapkova, R; Copikova, J; Šarka, E. Czech Chemical Society, 5–9.

Kirtel, O., Lescrinier, E., Van den Ende, W., Öner, E. T. 2019. Discovery of fructans in Archaea. *Elsevier Carbonhydrate Polymers*, 220, lk 149–156.

Liu, C., Kolida, S., Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. 2020. An evaluation of the prebiotic potential of microbial levans from *Erwinia* sp. 10119. *Journal of Functional Foods*, 64, 103668.

Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Aasamets, A., Viigand, K., Alamäe, T. 2017. A Highly Active Endo-Levanase BT1760 of a Dominant Mammalian Gut Commensal *Bacteroides*

thetaitaomicron Cleaves Not Only Various Bacterial Levans, but Also Levan of Timothy Grass. *PLoS ONE*, 12(1), lk 1–25.

Marx, S. P., Winkler, S., Hartmeier, W. 2000. Metabolization of $\beta(2,6)$ -linked fructoseoligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 182, lk 163–169.

Missiakas, D.M., Schneewind, O. 2013. Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6211185/>. (17.02.2020).

Morowitz, M., Carlisle, E., Alverdy, J. 2012. Contributions of Intestinal Bacteria to Nutrition and Metabolism in the Critically Ill. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144392/>. (22.09.2019).

Penetrante, M. 2010. *Lactobacillus delbrueckii*. Kättesaadav: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_delbrueckii. (02.01.2020).

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, lk 783–790.

Ritsema, T., Smeekens, S. 2003. Fructans: Beneficial for Plants and Humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, lk 223–230.

Sallam, K. I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 5, lk 566–575.

Santiago-García, P. A., López, M. G. 2014. Agavins from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* affect food intake, body weight gain and satiety-related hormones (GLP-1 and ghrelin) in mice. *Food Function*, 12, lk 3311–3319.

Seinbüchel, A., Rhee, S. K. 2005. Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Weinheim: WILEY-VCH, lk 307–310.

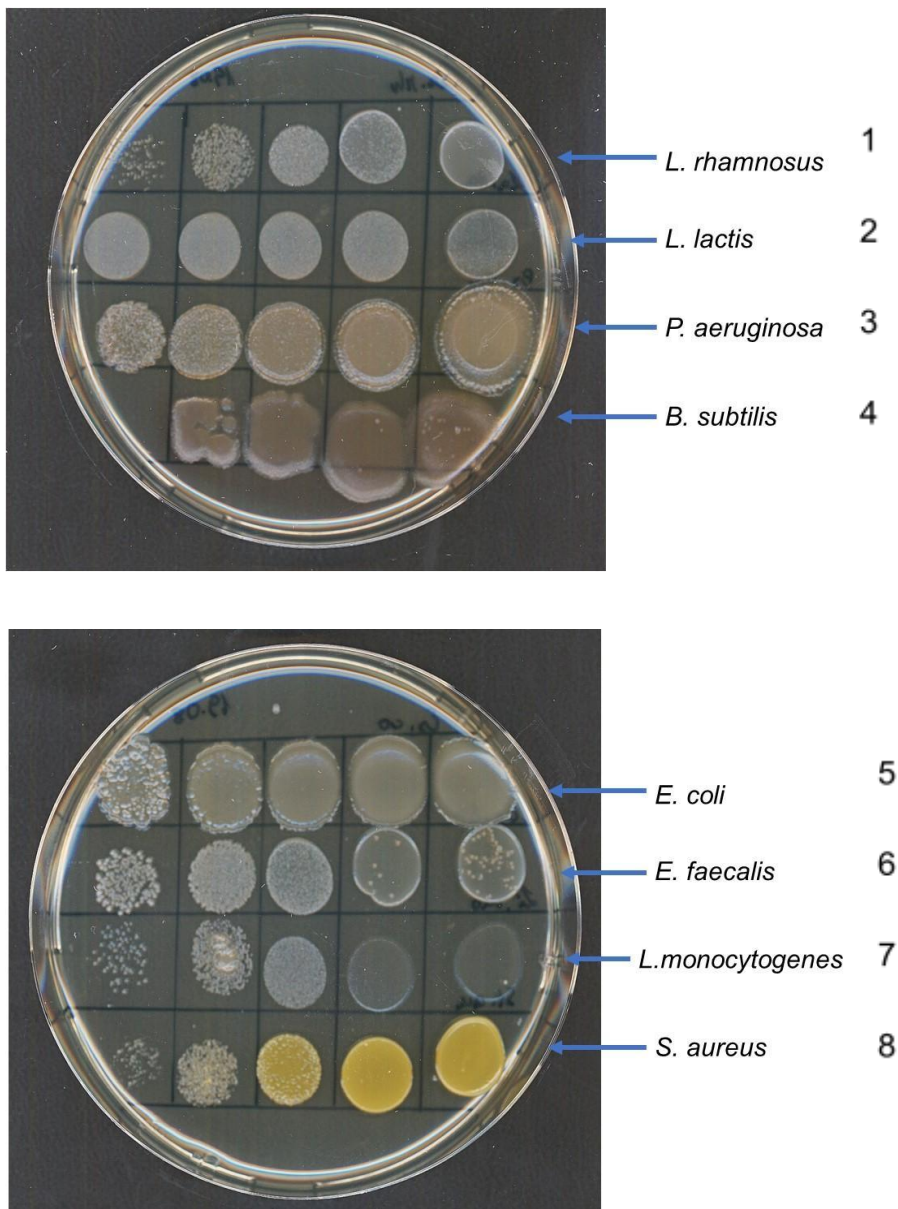
Sezien, R., Starrenburg, M., Boekhorst, J. Renckens, B., Molenaar, D., van Hylckama Vlieg, J. 2007. Genome-Scale Genotype-Phenotype Matching of Two *Lactococcus lactis* Isolates from Plants Identifies Mechanisms of Adaptation to the Plant Niche. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2223259/>. (19.09.2019).

Sigma-Aldrich tootekataloog. Kättesaadav:

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l8647?lang=en®ion=EE&cm_sp=Insite-_prodRecCold_xviews-_prodRecCold101. (17.02.2020).

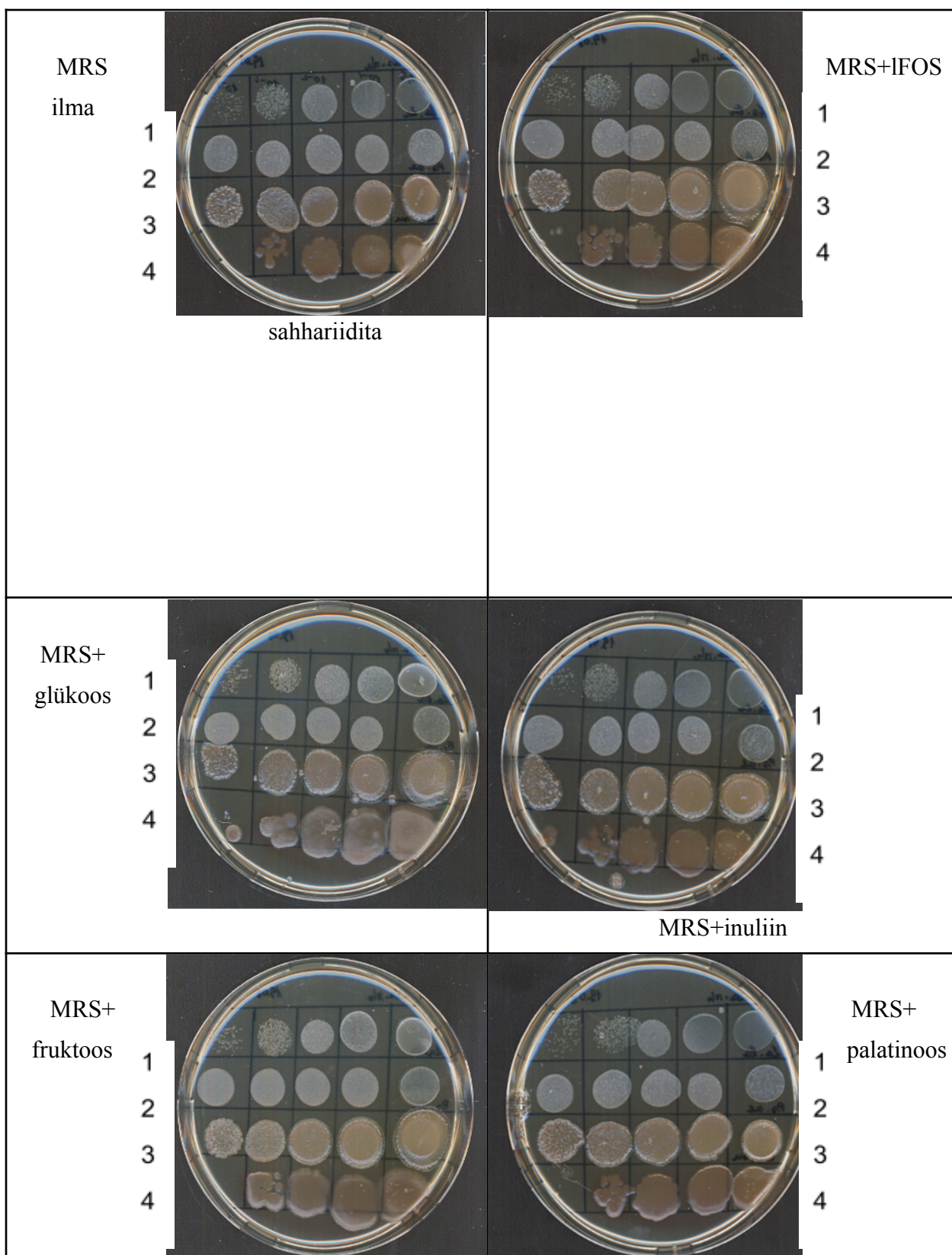
- Souza Oliveira, R., P., Perego, P., Nogueira de Oliveira, M., Converti, A. 2012. Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT*, 47, lk 358–363.
- Suitsu I. 2004. *Bacillus coagulans* SIM-7 võrdlus kahe laktobatsilli tüvega piimhappe tootmisel [magistritöö]. Tartu: Tartu Ülikool.
- Sutton, S. 2011. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Journal of Validation Technology*, 17, lk 46–49.
- Tarkowski, Ł., Van de Poel, B., Höfte, M., Van den Ende, W. 2019. Sweet Immunity: Inulin Boosts Resistance of Lettuce (*Lactuca sativa*) against Grey Mold (*Botrytis cinerea*) in an Ethylene-Dependent Manner. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, lk 1052.
- Ullrich, M. 2009. Bacterial Polysaccharides. Norfolk: Caister Academic Press.
- Van den Ende, W. 2013. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Frontiers in Plant Science*, 4, lk 247.
- Vereyken, I. J., Chupin, V., Demel, R. A., Smeekens, S. C. M., Kruijff, B. 2001. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. Kättesaadav: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273600003631?via%3Dihub>. (23.09.2019).
- Vijn, I., Smeekens, S. 1999. Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate? *Plant Physiology*, 120, lk 351–359.
- Visnapuu, T., Ernits, K., 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. *Journal of Biotechnology*, 155, lk 338–349.
- 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 [dokoritöö]. Tartu: Tartu Ülikool.
- Visnapuu, T., Mardo, K., Alamäe, T. 2015. Levansucrases of a *Pseudomonas syringae* pathovar as catalysts for the synthesis of potentially prebiotic oligo- and polysaccharides. *New Biotechnology*, 32, lk 597–605.
- Öner, E. T., Hernández, L., Combie, J. 2016. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, 34, lk 827–844.

Lisa 1. Tilkkülvi katse skeem

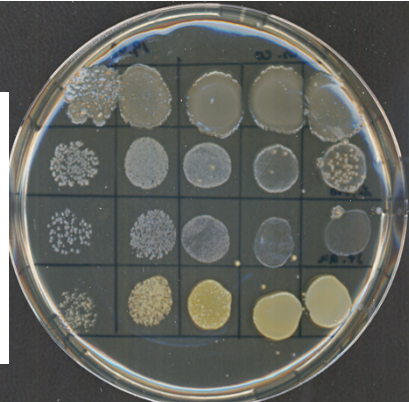
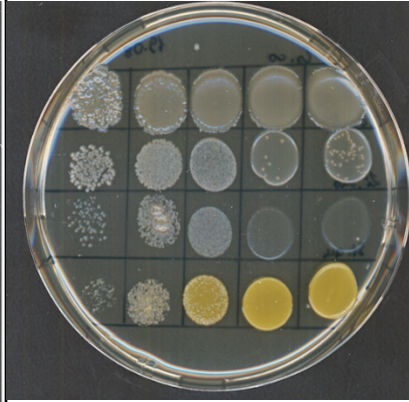


Näidatud on tilkkülvi meetodiga külvatud bakterikultuuride lahjendused (lahjendusrida paremalt: lahjendamata, 10 x, 100 x, 1000 x ja 10000 x lahjendatud) ning numbriga tähistatud tüvede järjestus söötmetassil. Sama tüvede järjestust on kasutatud lisa 2 joonisel.

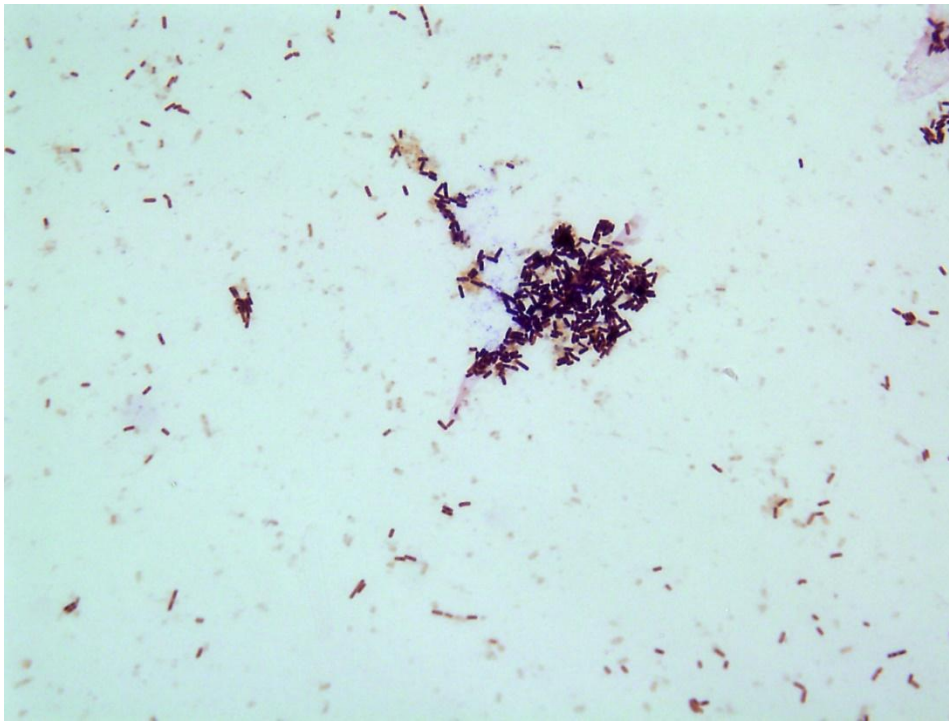
Lisa 2. Tilkkülvi katse tulemused MRS söötmetel



MRS+ levaan 1 2 3 4		MRS+ P95 1 2 3 4	
MRS ilma 5 6 7 8 sahhariidita		MRS+IFOS 5 6 7 8	
MRS+ glükoos 5 6 7 8		MRS+ inuliin 5 6 7 8	
MRS+ fruktoos 5 6 7			

		MRS+ palatinoos		
		5		
		6		
		7		
		8		
MRS +leaan			MRS+P95	
	5			
	6			
	7			
8				
		5		
		6		
		7		
		8		

Lisa 3. *Ba. subtilis*'e rakud levaani minimaalsöötmes



B. subtilis'e rakud võeti levaaniga minimaalsöötimest 47,2 h proovist, pipeteeriti mikroskoobi alusklaasile, värviti 1% metüleensinisega, ja vaadeldi valgusmikroskoobis suurendusega 1000 x.

LISA 4. Kinnitusleht

Uurimistöö autorina kinnitan, et

- koostasin uurimistöö iseseisvalt ning kõigile töös kasutatud teiste autorite töödele ja andmeallikatele on viidatud;
- uurimistöö vastab Tallinna Reaalkooli uurimistöö juhendile;
- olen teadlik, et uurimistööd ei edastata teistele tulu teenimise eesmärgil ega jagata teadlikult plagieerimiseks.

.....

kuupäev/nimi/allkiri

Juhendajana kinnitan, et uurimistöö vastab nõuetele ja lubatakse kaitsmisele.

Juhendaja

.....

kuupäev/nimi/allkiri