

**TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL**  
TOIDUAINETE INSTITUUT  
TOIDUTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

**PROBIOOTILISTE LAKTOBATSILLIDE JA  
BIFIDOBAKTERITE KASV INULIINI-TÜÜPI  
FRUKTOOLIGOSAHHARIIDIDEL**

**Magistritöö**

**Maris Kimmel**

Juhendaja:

Signe Adamberg, Toidutehnoloogia õppetool, vanemteadur

Toidutehnoloogia ja tootearenduse KATM02/11

2014

**TALLINN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY**

DEPARTMENT OF FOOD PROCESSING

CHAIR OF FOOD TECHNOLOGY

**GROWTH OF PROBIOTIC LACTOBACILLI AND  
BIFIDOBACTERIA ON PREBIOTIC FRUCTO-  
OLIGOSACCHARIDES**

**Master thesis**

**Maris Kimmel**

Supervisor:

Signe Adamberg, Chair of Food Technology, Senior Research Scientist

Food Engineering and Product Development KATM02/11

2014

2

Deklareerin, et käesolev bakalaureusetöö, mis on minu iseseisva töö tulemus, on esitatud Tallinna Tehnikaülikooli bakalaureusekraadi taotlemiseks ja et selle alusel ei ole varem taotletud akadeemilist kraadi.

Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud või (avaldamata tööde korral) toodud autorlus välja põhitekstis.

.....

Maris Kimmel

# SISUKORD

LÜHENDID .....	6
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	8
1.1 Soolestiku mikrofloora ja probiootikumid .....	8
1.1.1 Probiootikumid.....	10
1.1.2 Kooslused vs puhaskultuurid .....	11
1.1.3 <i>Lactobacillus</i> .....	12
1.1.4 <i>Bifidobacterium</i> .....	13
1.2 Kiudained inimese toidus ja prebiootikumid .....	14
1.2.1 Prebiootikumid .....	15
1.2.2 Inuliin ja fruktooligosahhariidid.....	16
1.3 Sünbiootikumid .....	17
2. EKSPERIMETAALNE OSA.....	18
2.1 Materjalid ja meetodid .....	18
2.1.1 Tüved.....	18
2.1.2 Substraadid, söötmed ja kasvutingimused .....	18
2.1.3 Katsed oligosahhariididega .....	20
2.1.4 Analüütilised meetodid .....	21
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	25
3.1 PCR ja geelelektroforees .....	25
3.2 Kuivkaal .....	26
3.3 Kasvukõverad ja pH-kõverad.....	27
3.4 Bakterite kasv ja ainevahetus inuliini-tüüpi FOS-del .....	28
3.4.1 Katseklaasikatsed .....	28
3.3.2 Mikrokalorimeetri katse .....	36

KOKKUVÕTE.....	39
RESUME.....	40
KASUTATUD KIRJANDUS .....	41

## LÜHENDID

B46, *B. breve* B46 – *Bifidobacterium breve* B46

EFSA – European Food Safety Authority, Euroopa Toiduohutusamet

F44, *L. plantarum* F44 - *Lactobacillus plantarum* F44

F8, *L. paracasei* F8 - *Lactobacillus paracasei* F8

FAO – Food and Agriculture Organization, Toidu ja Põllumajadusorganisatsioon

FOS – fructooligosaccharides, fruktooligosahhariidid

FOSin – inulin-type fructooligosaccharide, inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidid

FOSin (HSI) – inulin-type fructooligosaccharide (High Solubility Inulin), inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidid (kõrge lahustuvusega inuliin)

GOS – galaktooligosaccharides, galaktooligosahhariidid

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography – Kõrgsurvevedelikkromatograafia

IDF – International Dairy Federation, Rahvusvaheline Piimaliit

IMC – Isothermal Microcalorimetry – Isotermiline mikrokalorimeetria

WHO – World Health Organization, Maailma Tervishoiu Organisatsioon

## SISSEJUHATUS

Toitumine mõjutab inimese enesetunnet, tuju, tervist ja üldist elukvaliteeti. Inimorganism ei suuda ise seedida ja omastada kõiki vajalikke toitaineid, seega vajab ta soolestiku bakterite abi, kellel on vajalikud ensüümid keeruliste sahhariidide lagundamiseks.

Kui soolestiku mikrofloora tasakaal on häirunud, on probiootikumide ja prebiootikumide manustamisel tõestatud positiivne mõju tervisele. Veelgi efektiivsem võib olla nende koos manustamine, mida nimetatakse sünbiootiliseks lähenemiseks.

Peamised kasutatavad probiootilised tüved kuuluvad perekondadesse *Lactobacillus* ja *Bifidobacterium*, kelle elutegevuse ja metabolismi käigus toodetakse inimorganismile kasulikke ühendeid. Prebiootilised substraadid, mida probiootilised bakterid fermenteerivad on peamiselt madala seeduvusega süsivesikud, mida leidub naturaalselt toidus. Neli kasutatavamat tõestatud mõjuga prebiootikumi on inuliin, FOS, GOS ja sünteetiline laktuloos.

Uuritakse erinevaid kombinatsioone probiootikumidest ja prebiootikumidest, et leida parimaid lahendusi inimese tervise parandamiseks.

Antud töö eesmärgiks oli

- uurida *Lactobacillus plantarum* F44, *Lactobacillus paracasei* F8 ja *Bifidobacterium breve* B46 kasvu ja ainevahetust kahel erineval inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidil võrdluses glükoosiga
- määrata inuliini-tüüpi FOS-ide tarbimise ulatus nende tüvede poolt ja ainevahetusproduktid
- uurida *L. plantarum* F8 ja *B. breve* B46 segakultuuri dünaamikat inuliini-tüüpi FOS-iga söötmes

Magistritöö on valminud Biotehnoloogia projekti „Funktsionaalse toidulisandid“ (ERF projekti No. 3.2.0701.12-0041) raames Tallinna Tehnikaülikoolis ja Toidu-ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskuses.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Soolestiku mikrofloora ja probiootikumid

Peale enda genoomi, sisaldab inimene ka geneetilist materjali mikroorganismidelt, kes elutsevad meie soolestikus ja teistes organites (Fang, Evans, 2013). Inimese mikrobioomi uuringud on näidanud meie keha pinnal ja sees mitmekesist mikrobioloogilist elustikku. Mikrobioloogilistest ökosüsteemidest kõige suurem prokarüootide rakkude tihedus on inimese soolestikus, kust võib leida lausa  $10^{11}$  rakku grammi soole sisu kohta (Whitman *et al*, 1998).

rRNA järjestusel põhinevad meetodid on võimaldanud kindlaks määrata inimese soolestiku mikroobe. Tervete inimeste soolestiku limaskestadelt ja fekaalidest leitud bakteritest kuulub üle 90% hõimkondadesse *Firmicutes* või *Bacteroidetes*. Väiksemas koguses on leitud baktereid hõimkondadest *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* ja *Verromicrobia* (Eckburg *et al*, 2005). rRNA järjestusel põhinevate meetodite kõrval on keeruliste mikrobioloogiliste süsteemide tuvastamiseks hea alternatiiv metagenoomi järjestamine (Riesenfeld *et al*, 2004).

Peale bakterite on inimese soolestikust leitud arhebaktereid, kes kuuluvad peamiselt fülotüüpi *Methanobrevibacter smithii* (Eckburg *et al*, 2005). Veel on leitud arhebaktereid perekondadest *Methanosphaera*, *Thermogymnomonas*, *Thermoplasma* (hõimkond *Euryarchaeota*) ja perekonnast *Nitrososphaera* (hõimkond *Thaumarchaeota*) (Hoffmann *et al*, 2013). Samuti on tuvastatud viiruseid ja eukarüootseid organisme, kellest enamik on pärmid (Reyes *et al*, 2010).

Inimese soolestiku bakterite liigid varieeruvad. Kuigi on leitud põhilisi liike, mis eksisteerivad iga täiskasvanud inimese soolestikus nagu *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* ja *Bacteroides univormis* (Qin *et al*, 2009), erineb ka nende arvukus indiviidide vahel suurel määral, mistõttu kontseptsioon n.ö soolestiku mikrobioomi tuumikbakteritest on üsna ebatõenäoline (Lozupone *et al*, 2012)

Individuaalse mikroobikoosluse määravad mitmed faktorid: vanus, keskkond, geneetika ja toitumine (Lozupone *et al*, 2012). Varasemad uuringud on näidanud anaeroobide ja bifidobakterite liikide vähenemist ning enterobakterite liikide arvukuse suurenemist vanusega.



Uuemad uuringud, mis põhinevad molekulaarsetel meetoditel näitavad vanurites soolestiku mikrofloora liikide suuremat mitmekesisust (Tiihonen et al, 2010). Uuring, mis võrdles väljaheidetest isoleeritud baktereid tervetes noortes täiskasvanutes ja vanurites, leidis vanurites *Bacteroidese* liikide suurema mitmekesisuse, kuid bifidobakterite liike oli neis vähem (Hopkins, Macfarlane, 2002).

Toitumisel on väga suur mõju soolestiku mikrofloora koosseisule ja metabolismile. Määravaks on teiste faktorite hulgas erinevate toitainete – rasvad, süsivesikud, valgud – kogus ja tüüp. Toitumine mõjutab soolestiku mikrobioloogilist koosseisu sünnist saati (Scott *et al*, 2013). Imikutel, kes toituvad emapiimast, on domineerivateks bifidobakterid, kuid neil, kellele antakse imikutoite, on soolestiku mikrofloora mitmekesisem, sisaldades suuremal hulgal fakultatiivseid anaeroobe, klostriide ja bakteroide. Kahe aasta jooksul peale sündi muutub liikide mitmekesisus ja populatsioonide profiil sarnaseks täiskasvanu omaga (Foxy-Orenstein, Chey, 2012).

Imetajate genoom ei kodeeri enamikku ensüümidest, mida oleks vaja, et lagundada taimede struktuuri moodustavaid polüsahhariide, aga imetajate soolestiku bakteritel on väga suur arv geene, mis kodeerivad ensüüme nagu glükosiidi hüdrolaasid, polüsahhariidide lüaasid ja süsivesikute esteraasid, mis võimaldavad lagundada keerulisi sahhariide ja toota nendest energiat. Kuigi soolestiku mikroorganismide elutegevuse käigus tekkiv energia moodustab vaid väikese osa kogu energiavajadusest, on sealsetel mikroobidel suur mõju tervisele ning soolestiku bakterite koosseisu ja elutegevust mõjutab suuresti just süsivesikute sisaldus toidus (Flint et al, 2012).

Peamised süsivesikud, mis on kättesaadavad soolestiku bakteritele on seedeensüümide toimel mittelagunev tärklis, mittetärkliselised polüsahhariidid ja oligosahhariidid (Flint *et al*, 2012). Nende keeruliste polüsahhariidide fermentatsioonil tekivad lühikeseahelalised rasvhapped (SCFA) ja nõrgad happed atsetaat, propionaat ja võihape. Võihape on soolestiku epiteelrakkudele peamiseks energiaressursiks, propionaat viiakse maksa, kus seda kasutatakse glükogeeniks ja atsetaati kasutatakse lipogeeniks (Scott *et al*, 2008). Taimelise metabolismil võivad tekkida ka fütokemikaalid, millel on potentsiaalne põletikuvastane ja antioksüdatiivne mõju (Russell *et al*, 2008)

Mikroobid fermenteerivad peale süsivesikute rasvu ja proteiine, mille tulemusena võivad tekkida kahjulikud ühendid nagu nitrosamiinid. Peale selle metaboliseerivad soolestiku mikroorganismid endogeenseid substraate nagu peremeesorganismi ensüümid, soolestiku

surnud rakud ja glükosüleeritud proteiinid (limaskestast mutsiin). Nende ühendite metaboliseerimine aitab bakteritel ellu jääda, kui toiduga saadavaid substraate ei ole piisavas koguses (Scott *et al*, 2013).

Soolestiku mikrofloora manipulatsioon probiootikumidega on võimalus parandada patsientide olukorda, kellel on haiguseid, mis tulenevad sellest, et soolestiku mikrofloora tasakaal on häirunud (Foxy-Orenstein, Chey, 2012).

### 1.1.1 Probiootikumid

Probiootikumid on WHO definitsiooni järgi elusad mikroorganismid, mis manustatuna piisavas koguses, mõjuvad peremeesorganismi tervisele kasulikult (FAO/WHO, 2002). Probiootikume ei saaks pidada leiutiseks, sest selliste funktsioonidega mikroobid on olnud juba kaua aega osa traditsioonilisest toidust nagu jogurt ja eri tüüpi juustud (Amara, 2012). Inimesed on teinud aastakümneid fermenteeritud toitu ning erinevad bakterid on olnud osa sellest protsessist. Peale bakterite kasutatakse probiootikumidena ka hallitusi ja pärmseeni (Amara, 2012; Amara, Shibl, 2013).

Probiootikumid peavad olema inimesele ohutud ja vastama EFSA QPS (Qualified Presumption of Safety) staatusele, mis põhineb neljal punktil: identiteedi määramine, info/teadmised, võimalik patogeensus ja lõppkasutus (EFSA, 2007). Selleks, et tüve nimetada probiootiliseks, peavad olema täidetud (tõestatud) paljud kriteeriumid nagu ohutus tarbijale ja kasulik toime. Iga tüvi peab olema kontrollitud *in vivo* katsetes. Testitakse nende stabiilsust tootmisel ja hoiustamisel, genotüübi ja fenotüübi stabiilsust, süsivesikute ja valkude lõhustamise mustreid, vastupidavust hapetele ja sapile, ellujäävust ja kasvu, vastupidavust antibiootikumidele, tuntud soolestiku patogeensete inhibeerimist, antimikroobsete ühendite tootmist ja immunogeensust (Tuomola *et al*, 2001).

Enamik inimorganismist isoleeritud kasulikest bakteritest kuuluvad piimhappebakterite hulka, millest tuntumad on *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp. Samuti kasutatakse tüvesid liikidest *Escherichia coli*, *Bacillus* spp. ja *Streptococcus* spp (Mikelsaar *et al*, 2011).

Perekonnast *Lactobacillus* on probiootikumina kasutusel liigid: *L. acidophilus*, *L. sporogenes*, *L. plantarum*, *L. rhamnosum*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *lactis*, *cellobiosus*, *brevis*, *casei*, *faracinis*, *paracasei*, *gasseri*, *crispatus*. *Bifidobacteriumi* hulgast võiks välja tuua: *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *thermophilum*, *breve*, *lactis*, *animalis*. Veel on olulised liigid *Streptococcus*: *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. alivarius*, *S. intermedius*, *S. thermophilus*, *S. diacetylactis*; *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Enterococcus faecium*. Seentest ja hallitustest on kasutusel: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pintolopesii*. Seoses uurimustööga antud vallas, uueneb see nimekiri pidevalt (Amara, Shibl, 2013).

Probiootikumid parandavad inimese tervist, toetades peremeesorganismi füsioloogilist aktiivsust või vähendades haiguste riski. Probiootilised bakterid aitavad seedida organismile vajalikke toitaineid, osalevad seedesüsteemi epiteelirakkude valmimises, mõjutavad füsioloogilisi parameetreid, inhibeerivad inimesele kahjulikke mikroobe ja stimuleerivad immuunsüsteemi (Mikelsaar et al, 2011).

Eksogeenne manustamine on üks viis parandada patsientide olukorda, kellel on probleeme soolestikuga. Leitud on näiteks positiivne mõju patsientidele, kellel on ärritunud soole sündroom (IBS). Samuti on probiootikumid efektiivsed diarröa ennetamises ja ravis (Foxy-Orenstein, Chey, 2012). Parim ja odavam viis selleks on igapäevaselt tarbida probiootikume toiduga. Neid saab tarbida ka tablettidena või muudes sobivates vormides (Amara, Shibl, 2013).

### 1.1.2 Kooslused vs puhaskultuurid

Probiootikumide mõju on uuritud ka in vivo ehk inimkatsetes, võrdlevalt ühe liigi ühest tüvest, sama liigi mitmest tüvest ja mitmeliigiliste kombinatsioonide puhul, et võrrelda nende funktsionaalset toimet. Kombineeritud kultuurid võivad sisaldada baktereid, kes aitavad kaasa üksteise elutegevusele ja metabolismile ning selle tagajärjena võimendavad kasulikke efekte peremehe tervisele. On analüüsitud kombinatsioone erinevatest tüvedest perekondadest *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* ja *Propionibacterium*. (Timmerman et al, 2004).

### 1.1.3 *Lactobacillus*

Hõimkonda *Firmicutes* kuuluv perekond *Lactobacillus* hõlmab suurt rühma piimhappebakteritest (Ljungh, Wadström, 2009), kes on Gram-positiivsed kokobatsillid või pulgakujulised bakterid, kes ei moodusta spore (Hammes, Vogel, 1995).

Piimhappebakteritel on võime fermenteerida mitmesuguseid süsivesikuid nagu laktoos, glükoos, maltoos, fruktoos, ning nendega sarnaseid ühendeid, kusjuures peamine produkt on piimhape. Toodetud happe põhiline mõju on keskkonna pH alandamine, mis inhibeerib teiste organismide kasvu. Laktobatsillidel on hea kohanemisvõime erinevates keskkonnatingimustes ning võime muuta oma ainevahetust vastavalt oludele. (Ljungh, Wadström, 2009).

Laktobatsillid saab suhkrute fermentatsiooni järgi jagada kolme peamisesse gruppi: obligatoorsed homofermentatiivsed, fakultatiivsed homofermentatiivsed ja obligatoorsed heterofermentatiivsed laktobatsillid. Glükoosi fermentatsioon toimub kahe peamise raja järgi: Embden-Meyerhoff-Parnas rada või pentoosfosfaadi rada. . Glükolüüsirada kasutavad homofermentatiivsed piimhappebakterid, kus ühest molekulist glükoosist toodetakse 2 mooli piimhapet ja 2 ATP molekuli energiat. Heterofermentatiivsed bakterid kasutavad pentoosfosfaadi rada, kus toodetakse ühe glükoosi molekuli kohta 1 mool piimhapet 1 mool etanooli ja 1 mool süsihappegaasi ning 1 ATP molekul energiat (Ljungh, Wadström, 2009).

Mitmeid *Lactobacilluse* liike kasutatakse probiootikumina. Laktobatsillid toodavad bakteriotsiine, lühikese ahelaga rasvhappeid, vitamiine ja ensüüme, võistlevad patogeenidega retseptorite ja toidu pärast (Ljungh, Wadström, 2009). Immunoloogiliselt mõjutab peremehe organismi piimhappebakterite põletikuvastane, immunostimuleeriv toime, mis aitab kaasa ka homöostaasi loomisele (Ljungh, Wadström, 2009). Laktobatsillid ja teised piimhappebakterid võivad aidata kaasa laktoosi seedimisele laktoositalumatusega indiviididel, vähendavad kõhukinnisust, aitavad võidelda infektsioonide vastu ja leevendada ärritunud soole sündroomi (Manning, Gibson, 2004).

#### 1.1.4 *Bifidobacterium*

Bifidobakterid on Gram-positiivsed, pulgakujulised, sealjuures tihti hargnenud, anaeroobsed ja liikumatud bakterid (McClanahan, 2013).

Bifidobakteritel on lai valik ensüüme süsivesikute fermenteerimiseks. 6,5% nende geenidest on seotud süsivesikute metabolismiga (Flint *et al*, 2012). *B. longum* subsp *longum* geenidest on 8% seotud süsivesikute metabolismiga. Bifidobakterites on identifitseeritud kahte tüüpi  $\beta$ -fruktofuranosidaase: need, mis on aktiivsemad  $\beta(2,1)$  glükoos-fruktoos sidemete lõhkumisel, vabastades ainult terminaalseid glükoosijääke, ja need, kes on aktiivsemad  $\beta(2,1)$  fruktoos-fruktoos sidemete lõhkumisel (Flint *et al*, 2012).

Palju on uuritud inuliini ja inuliini-tüüpi fruktaanide tarbimist bifidobakterite poolt. Katses, kus testiti 55 bifidobakteri tüve, oli ainult 5 tüve võimelised kasvama pikaahelalistel inuliini molekulidel. Kõik kontrollitud tüved kasvasid hästi FOS-del (Flint *et al*, 2012).

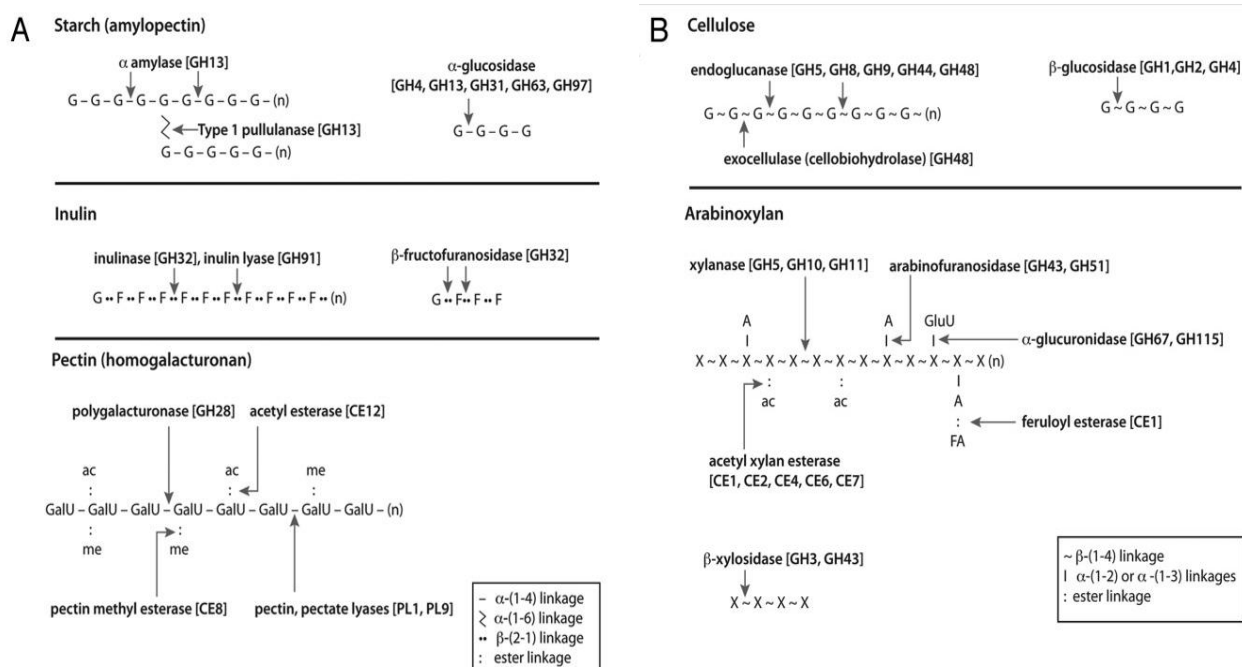
On leitud, et bifidobakterite ja teiste liikide vahel toimub ka nn rist-toitumine. Näiteks võib tuua rist-toitumise võihapet tootvate bakterite ja bifidobakterite vahel, kus viimased vabastavad oligo- ja monosahhariide keerukatest substraatidest (Flint *et al*, 2012; Belenguer *et al*, 2006). Sellisel juhul bifidobakterite toodavad süsivesikutest piimhapet ja see fermenteeritakse teiste liikide poolt võihappeks ja süsihappegaasiks.

Bifidobakterid lagundavad väga efektiivselt kõrge amüloosisisaldusega tärklisi. Ensüümide toimele mittealluva tärklise (resistentne tärklis) ja pullulaani lagundamine on seotud kindlate liikidega nagu *B. breve* ja *B. adolescentis*. On leitud, et *B. brevel* on suur raku pinnale ankurdatud ensüüm, mis sisaldab eraldiseisvaid  $\alpha(1,4)$  amülaasi ja tüüp 1 pullulanaasi domeeni koos mitmete süsivesikuid siduvate molekulidega (Flint *et al*, 2012).

## 1.2 Kiudained inimese toidus ja prebiootikumid

Taimse toiduga saab inimese organism palju kiudaineid, mille moodustavad peamiselt mittetärkliselised süsivesikud ja ligniin (Turner, Lupton, 2011). Umbes 20-60 g seedeensüümide poolt mõjutamata süsivesikuid jõuab päevas jämesoolde. Peamise osa moodustavad ensüümide toimele mittealluv tärklis (*resistant starch* RS), taimede rakuseina polüsahhariidid ja mitteseeduvad oligosahhariidid, kuigi ka mõnede di- ja monosahhariidide (nt suhkuralkoholide) seedimine ja imendumine on piiratud (Flint et al, 2012). Imetajad ei tooda ensüüme, mis kiudained peensooles monomeerideks hüdrolyüsiks, kuid soolestikus (jämesooles) elavatel bakteritel on vajalikud ensüümid kiudainete fermentatsiooniks, seega on soolestiku mikroflooral oluline roll meie toidu seedimisel (Turner, Lupton, 2011).

Kõikides eluvormidest on leitud 130 perekonda glükosiidide hüdrolaase, 22 polüsahhariidide lüaase ja 16 süsivesikute esteraase, millest suur osa kodeeritakse mikroorganismide genoomides (Flint et al, 2012; Cantarel et al, 2009). Need sisaldavad katalüütilisi domeene, mis lagundavad taimede strukturealseid polüsahhariide (tselluloos,  $\beta$ -glükaan, ksülaan, mannaan ja pektiin), varusüivesikuid ja limaskesta glükaane (Joonis 1) (Flint et al, 2012).



Joonis 1. Toiduga saadavad süsivesikud ja mikroorganismide süsivesikuid lagundavate ensüümide aktiivsused. GH – glükosiidi hüdrolaasid, PL – polüsahhariidi lüaas, CE – süsivesikute esteraas, G – glükoos, F – fruktoos, X – ksüloos, A – arabiin, GalU – galakturoonhape, GluU – glukuroonhape (Flint et al, 2012)

Lisades ükskõik millist mitteseeduvat, kuid fermenteeritavad süsivesikut toidule, tõuseb soolestiku mikroorganismide fermentatiivne aktiivsus, mille tulemuseks on happe tootmine. See vähendab pH-d, mis omakorda mõjutab mikrofloora koosseisu ja mikrobioloogiliste metaboliitide tasakaalu (Flint *et al*, 2012).

Süsivesikute fermentatsioonil tekkivate lühikeseahelaliste rasvhapete kontsentratsiooni tõus suurendab teatud mineraalide nagu kaltsiumi lahustuvust ning parandab kaltsiumit-siduvate proteiinide imendumist ja ekspressiooni (Flint *et al*, 2012; Duncan *et al*, 2009). Soolestiku mikroorganismid võivad mõjutada peremeesorganismi peptiidide ja hormoonide ekspressiooni tootes lühikeseahelalisi rasvhappeid, mis mõjutab organismi energia metabolismi ja söögiisu (Flint *et al* 2012; Sleeth *et al*, 2010). Propionaat tõstab küllastustunnet ja parandab glükoosi homöostaasi (Flint *et al*, 2012,; Arora *et al*, 2011). Või happel on põletikuvastased ja vähivastased efektid, kuid see osaleb ka teistes organismi funktsioonide regulatsioonides (Flint *et al*, 2012; Canani *et al*, 2011).

Keerulised toiduga saadavad süsivesikud vähendavad potentsiaalselt kahjulike metaboliitide taset, mis tulenevad proteolüütilisest aktiivsusest jämesooles (Flint *et al*, 2012, Russel *et al*, 2011). In vitro uuring näitas, et kui fruktaane lisati kasvusöötmesse, siis see stimuleeris sahharolüütilist fermentatsiooni ning langetas toksiliste peptiidide fermentatsioonil tekkivate metaboliitide taset (Flint *et al*, 2012; De Preter *et al* , 2010).

### 1.2.1 Prebiootikumid

Prebiootikumid on defineeritud kui „mitteseeduvad toidukomponendid, mis toovad kasu peremeesorganismile, stimuleerides teatud soolestikubakterite kasvu ja aktiivsust“ (Gibson, Roberfroid, 1995). 2004 aastal uuendati seda definitsiooni: prebiootikumid on „selektiivselt fermenteeritavad komponendid, mis kutsuvad esile teatud muudatusi soolestiku mikrofloora koostises ja/või aktiivsuses, mille tagajärjeks on kasulik mõju peremeesorganismi tervisele ja heaolule“ (Gibson *et al*, 2004).

Mitte kõik kiudained pole prebiootikumid. Et klassifitseerida mitteseeduvaid süsivesikuid prebiootikumiks on vaja täita järgnevad tingimused: vastupidavus mao happele ja imetajate ensüümidele; substraadiks soolestiku bakterite fermentatsiooniks; võime tõsta kasulike mikroorganismide elujõulisust ja aktiivsust (Rastall, Gibson, 2006).

Praegu kasutatavad prebiootikumid on peamiselt madala seeduvusega süsivesikud, mida leidub naturaalselt toidus (Flint *et al*, 2012). Ainult nelja maailmas turustatava prebiootikumi mõju on piisavalt toetatud inimkatse tulemustega. Need on fruktaanid – inuliin, FOS, GOS ja sünteetiline disahhariid laktuloos (Rastall, 2010). Peale nende kasutatakse veel laktosukroosi, isomaltooligosahhariide, sojaoa oligosahhariide, ksülooligosahhariide, gentio-oligosahhariide. Uuritakse erinevaid taime rakukesta polüsahhariide kui potentsiaalseid prebiootikume nt arabinogalakto-oligosahhariide, ramnogalakturono-oligosahhariide ja galakturono-oligosahhariide (Rastall, Maitin, 2002).

Prebiootilised oligosahhariidid on suhkrute kombinatsioonid, millel on erinev polümeerisatsiooniaste. Prebiootilisi oligosahhariide saab toota kolmel erineval meetodil: eraldamisel taimedest, mikrobioloogilisel sünteesil või ensümaatilisel teel ja polüsahhariidide ensümaatilisel degradatsioonil (Wang, 2009).

### 1.2.2 Inuliin ja fruktooligosahhariidid

Inuliin ja fruktooligosahhariidid täidavad kõiki eelpoolt nimetatud nõudeid prebiootikumidele. Inuliin on polüsahhariid üldvalemiga  $\text{Glu } \alpha 1-2[\beta \text{ Fru } 1-2]_n$ , kus  $n > 10$  (Rastall, 2010). Inuliini-tüüpi fruktaanid on lineaarsed polümeerid, mis koosnevad  $\beta(2,1)$ -seotud fruktoosijääkidest, terminaalsete glükoosijääkidega (Flint *et al*, 2012). Inuliini leidub palju sibulas, küüslaugus, sparglis, porrus, nisus ja artišokis, kõige rohkem aga siguris. Struktuurilt on inuliiniga sarnased frukto-oligosahhariidid (FOS), millel on väiksem molekulmass/polümeerisatsiooniaste. Frukto-oligosahhariide saadakse kas inuliinist hüdrolüüsi teel või sünteetiliselt sukroosist (Rastall, 2010).

Inuliinist hüdrolüüsitud FOS on üldvalemiga  $\text{Glu } \alpha 1-2[\beta \text{ Fru } 1-2]_n$ , kus  $n=2-9$ . Sukroosistsaadud FOS-d on segu kolmest oligosahhariidist 1-kestoos (Glu-Fru2), 1-nüstoos (Glu-Fru3), and 1F- $\beta$ -fruktofuranosüülnüstoos (Glu-Fru4) ja nende väikse molekulmassi tõttu kutsutakse neid tavaliselt lühikeseahelalisteks FOS-deks (sc-FOSs) (Rastall, 2010).

Katsed, kus fekaalseid koosluseid inkubeeriti inuliini, FOS-de, tärklise, polüdekstroosi, fruktoosi ja pektiiniga 12 tundi (Rastall, 2010; Wang, Gibson, 1993), näitasid, et kõige rohkem suurenes bifidobakterite arvukus FOS-de ja inuliini puhul, mis näitas nende



prebiootilist iseloomu. Hilisemad katsed on tõestanud bifidobakterite arvukuse kasvu FOS-de abil (Rastall, 2010).

Bakteriaalne fruktaanide lagundamine vajab  $\beta$ -fruktofuranosidaase. Erinevad bakterite  $\beta$ -fruktofuransidaasid lõikavad  $\beta(2,1)$  sidemeid sukroosis, FOS-des ja inuliinis, vabastades monomeerseid fruktoosi molekule, mis transporditakse rakku (Flint et al, 2012; Warchol *et al*, 2002).

### 1.3 Sünbiootikumid

Kui prebiootikume kasutatakse koos probiootikumidega, nimetatakse seda sünbiootiliseks lähenemiseks (Flint *et al*, 2012).

Sünbiootilises lähenemises valitakse prebiootikum, mis stimuleeriks spetsiifiliselt valitud probiootilise bakteri ellujäävust ja kasvu peremeesorganismis (Kolida, Gibson, 2011) Sünbiootikumid on näidanud võimendatud kasulikku mõju võrreldes prebiootikumide ja probiootikumide eraldi manustamisega. Näiteks vanurites, kellele anti segu, mis sisaldas probiootilisi baktereid *B. bifidum* ja *B. lactis* koos inuliini ja FOS seguga, leiti, et prebiootikumid parandasid bifidobakterite eluvõimet ja suurendasid soolestikus leiduvate bifidobakterite arvukust (Flint et al, 2012; Bartosch *et al*, 2005).

## 2. EKSPERIMETAALNE OSA

### 2.1 Materjalid ja meetodid

#### 2.1.1 Tüved

Magistritöös kasutati järgmisi bakteritüvesid, mis olid saadud Lundi Ülikoolist (Rootsi), LMG – Culture collection of Lund University and Bacteria Collection of BCCM/LMG

- *Lactobacillus plantarum* F44 (LMG P-26120)
- *Lactobacillus paracasei* F8 (LMG P-26118)
- *Bifidobacterium breve* B46 (LMG P-26117)

#### Säilituskultuuride valmistamine

Petri tassilt eraldatud kolooniad külvati vedelsöötmesse ning inkubeeriti 37°C juures ööpäeva. Seejärel pipeteeriti kultuur steriilsesse tuubi ja tseentrifuugiti 10 minutit 10000 RPM ning eemaldati supernatant. Põhjas olev bakterimass suspendeeriti 0,5 ml MRS vedelsöötmes, mis sisaldas 50% glütserooli. Tuubid asetati sügavkülma -20 °C juurde.

#### 2.1.2 Substraadid, söötmed ja kasvutingimused

##### Substraadid

- Inuliini-tüüpi FOS, HSI (keskmise DP <10, koostises ~12% glükoos, fruktoos, sukroos), Orafti, Tienen, Belgia
- Inuliini-tüüpi FOS (koostises ~5% glükoos, fruktoos, sukroos) , Orafti, Tienen, Belgia
- Glükoos võrdluseks

##### Füsioloogiline lahus

Füsioloogiline lahus, mida kasutati lahjenduste tegemiseks ja bakterirakkude pesemiseks valmistati järgnevatest komponentidest: NaCl (Sigma Aldrich, Taani) – 8,5 g/L; Bakteriaalne

pepton (LABM, Lancashire, UK) – 1 g/L. Komponentid kaaluti tehnilistel kaaludel, lisati vajalik kogus destilleeritud vett ning autoklaaviti (autoklaav D-150 Systec, Šveits) 121 °C juures 3 minutit.

### Modifitseeritud MRS vedelsööde

Biomassi ettevalmistamiseks kasvatati kultuure modifitseeritud MRS söötmes, mille koostis oli järgmine: glükoos – 10 g/L, pärmiekstrakt – 3 g/L, NH<sub>4</sub>-citraat – 2 g/L, Tween 80 – 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0,2 g/L, MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O – 0,2 g/L, Cys-HCl 0,5 g/l – lisati vahetult enne katse läbiviimist söötmetesse, kus kasvatati bifidobaktereid, 1M puhverlahus K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,8 ml/100 ml, 1M puhverlahus KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3,2 ml/100 ml.

Puhverlahuseid kasutati söötme pH viimiseks MRS (LABM, UK) sarnase pH juurde (pH 6,4+/-0,2).

Söötme komponendid kaaluti analüütilistel kaaludel (Mettler Toledo), seejärel lisati automaatpipetiga puhverlahused ja vastav kogus destilleeritud vett, segati täieliku lahustumiseni magnetsegajal (MSH Basic, Yellow Line) ning autoklaaviti 121 °C juures 3 min.

### Sööde oligosahhariidide tarbimise määramiseks

Oligosahhariidide tarbimise määramiseks katseklaasides ja mikrokalorimeetria abil valmistati sööde järgmise koostisega: trüpton - 2,5 g/l, pärmiekstrakt 1,25 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M puhverlahus– 1,8 ml/100 ml, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M puhverlahus – 3,2 ml/100 ml, MgSO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O – 0,1 g/l, Tween 0,25 g/l, Cys-HCl 0,5 g/l – lisati vahetult enne katse läbiviimist söötmetesse, kus kasvatati bifidobaktereid. Mikrokalorimeetri katses kasutati kaaliumfosfaate vastavalt: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 6 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 5 g/L.

Süsinikuallikat lisati söötmesse kontsentratsioonis 2,5 g/l.

Ained kaaluti tehnilistel kaaludel, puhverlahused lisati automaatpipeti abil. Pärast destilleeritud vee lisamist segati lahus magnetsegaja abil (MSH Basic, Yellow Line) täieliku lahustumise saavutamiseks. Järgnevalt söötmed autoklaaviti (autoklaav D-150 Systec, Šveits) 121 °C juures 3 min.

Substraat lahustati deioniseeritud vees ning saadud 5% lahus filtreeriti steriilsete filtrite abil (0,2 µm, FP 30/0,2 CA-S, Whatman). Filtreeritud lahus lisati autoklaavitud söötmele.

### Modifitseeritud MRS agarsööde

Mikroorganismide kolooniate loendamiseks kasvatati kultuure eelnevalt välja toodud baaskoostisega tardsöötmele, millesse oli lisatud 1,2 % agarit (LABM, UK).

## 2.1.3 Katsed oligosahhariididega

### *Katseklaasikatsed*

Tüvede iseloomustamiseks kasvatati neid modifitseeritud MRS vedelsöötmes ning mõõdeti OD ja pH iga tunni järel (esimesed 10 t) ja 24. tunnil.

Kultuuride ettevalmistamiseks külvati säilituskultuurist 5 ml modifitseeritud MRS vedelsöötmesse külviaasatäis kultuuri ning inkubeeriti 37°C juures 24 h. Laktobatsille inkubeeriti aeroobsetes tingimustes, bifidobaktereid kasvatati anaeroobsetes purkides, hapniku elimineerimiseks keskkonnast lisati purki anaeroobne ümbrik (Oxoid, UK). Üles kasvanud kultuuridest tehti teine ümberkülv (1 %) 5 ml söötmesse ning inkubeeriti 24 h 37°C juures. Saadud kultuuri kasutati katsetes inokulumina (külvimaterjalina). Rakke külvati edasi kaks korda, et aktiveerida külmas säilinud bakterirakud enne katset ning ühtlustada katsetingimused.

Inokulumi valmistamiseks tsentrifuugiti kasvanud bakterirakud 5 ml söötimest põhja (1 min, 13 500 RPM) ning valati vana sööde pealt ära, järgnevalt suspendeeriti rakud 5 ml füsioloogilises lahuses. Töö teostati aseptiliselt laminaari all.

50 ml tsentrifuugitopsidesse, milles oli 40 ml baassöödet, lisati frukto-oligosahhariidi või glükoosi 5% lahus nii, et süsinikuallika lõppkontsentratsioon söötmes oleks 2,5 g/L, kontrollsöötmesse lisati substraadi asemel samasugune kogus steriilset vett. Järgnevalt külvati söötmetesse 1% inokulumi (400 mikrolitrit 40 milliliitrisse) ning jagati see 5 ml kaupa steriilsetesse katseklaasidesse, mis asetati 37°C juurde.

Igas kontrollpunktis võeti 37°C juurest katseklaasid uuritavate proovidega ning mõõdeti söötme OD ja pH katse alguses, 24 tunnil, 48 tunnil ning 120 tunnil. Kõik katsed teostati kahes paralleelis.

Katse algusest ja lõpust võeti proovid suhkrute ja orgaaniliste hapete määramiseks HPLC-ga ja katse lõpust võeti proovid tüvede puhtuse kontrolliks PCR-ga.

### *Mikrokalorimeetri katsed*

Ettevalmistus katseks teostati sarnaselt katseklaasikatsetega. Substraadina kasutati selles katses ainult FOSin. 3 ml söödet koos substraadi ja bakteritega (puhas ja segakultuurid) pipeteeriti aseptiliselt (laminaari all) 3.3 ml mahuga kalorimeetri ampulli. Ampullid suleti hermeetiliselt ning inkubeeriti 37 °C juures isotermilises mikrokalorimeetris TAM III (TA Instruments, Delaware, US), mis salvestas automaatselt soojusvood bakterite kasvul. Katse alguses ja lõpus võeti proovid HPLC, pH ja OD mõõtmiste jaoks.

## **2.1.4 Analüütilised meetodid**

### *pH mõõtmine*

Kultuuride pH määrati pH-meetriga (Mettler Toledo MP125 pH Meter).

### *OD mõõtmine*

OD mõõtmiseks kasutati OD-meetrit (WPA biowave CO8000 Cell Density Meter). Mõõtmised teostati spetsiaalsetes küvettides. Enne mõõtmist segati proove Vortexil. Võrdluseks kasutati destilleeritud vett, mille OD = 0,00.

## *Mikrobioloogilised analüüsid*

Bakterite arv söötmes määrati väljakülvi meetodiga. Külvideks lahjendati proovid vastavalt IDF-standardile ja külvati agarsöötmele. Laktobatsillidega Petri tasse inkubeeriti 37 °C juures 48 h. Bifidobakteritega Petri tasse inkubeeriti 37 °C juures 72 h anaeroobsetes tingimustes. Arvutati kolooniaid moodustavate ühikute arv 1ml proovi kohta.

## *Kuivkaalu määramine*

Kuivkaalu, optilise tiheduse ja rakkude arvu vaheliste korrelatsioonikoefitsientide leidmiseks määrati iga tüve biomassi kuivkaalud.

Kuivkaal määrati neljas korduses (2 otse ja 2 kaks korda lahjendatud kultuurist) kasutades mikrofiltreid (S-Pak<sup>TM</sup> Membrane Filters white gridded 0,45 µm Ø 47mm/ Millipore Glass Fiber Filters without binder APFF 0,7 µm Ø 47mm) järgnevalt :

1. Filtrid märgistati ja kuivatati 105°C ahjus 1 h
2. Filtritelt lasti eksikaatoris jahtuda  $\geq 1$ h
3. Jahtunud filtrid kaaluti analüütilistel kaaludel (Mettler Toledo) täpsusega 0,01 mg
4. Võeti vajaminev arv 15 ml tsentrifuugi tuube ja kaaluti need koos korgiga analüütilistel kaaludel (Mettler Toledo) täpsusega  $\geq 0.1$ mg
5. 15 ml analüüsitavat proovi (bakterite biomass koos söötmega) pipeteeriti automaatpipeti abil eelnevalt kaalutud 15 ml tsentrifuugitopsidesse ja kaaluti uuesti analüütilistel kaaludel () täpsusega  $>0.1$ mg. Tsentrifugimisel võis topside kaalu erinevus olla  $<0.1$  g.
6. Proove tsentrifugiti 11 500 rpm 1 min
7. Seati üles filtratsioonisüsteem (Millipore, Saksamaa), mis ühendati vaakumpumbaga (Welch Rietschle Thomas 2515)
8. Tsentrifugitud proov kanti täielikult filtrile ja pesti veega,

9. Filtrid koos biomassiga kuivatati kuivatuskapis 105 °C juures 24 h

10. Filtritelt lasti eksikaatoris jahtuda ning kaaluti analüütilistel kaaludel (Mettler Toledo) täpsusega 0.01 mg. Saadud andmete põhjal arvutati bakterite kuivkaalud.

### *Kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC)*

HPLC analüüs viidi läbi vedelikkromatograafia Alliance 2795 (Waters Corp., Milford, MA, USA), kolonn BioRad HPX-87H (Hercules, CA), isokraatses režiimis voolutiga 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> voolukiirusel 0.6 mL/min 35°C juures. Ained detekteeriti ja kvantifitseeriti murdumisnäitaja (RI, 410 nm, peamiselt suhkrud) ja neeldumise (UV-detektor, orgaanilised happed) järgi. Ühte proovi süstiti masinasse 20 µl ja voolutati 25 min. Standardainetena kasutati analüütilise puhtusega aineid, standardite koostis on välja toodud lisa 1 (LISA 1).

Ühendite identifitseerimiseks ja kvantifitseerimiseks kasutati võrdlust standarditega. Tuvastatavad produktid olid: glükoos, fruktoos, laktaat, formiaat, atsetaat, sahharoos, suktsinaat, etanool.

### Proovi ettevalmistus

Kromatograafiliseks analüüsiks proovid sulatati ja tsentrifuugiti bakterid põhja. Supernatandist sadestati valgud 10% sulfosalitsüülhappega vahekorras 1ml proovi + 0.25ml sulfosalitsüülhapet. Vajadusel lahjendati proove deioniseeritud veega, et ainete kontsentratsioonid jääksid standarditega samasse vahemikku.

### Tulemuste arvutamine

Orgaaniliste hapete ja suhkrute kontsentratsioonid arvutati piikide kõrguse või pindala põhjal, võrreldes standardite põhjal tehtud kalibratsioonikõveratega.

Tulemused analüüsiti programMis Empower Pro (Waters, USA).

### *PCR ja geelelektroforees*

Kultuuride puhtuse hindamiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR)

### Proovide ettevalmistus

1. Võeti 1 ml üleöö kasvanud puhaskultuuri eppendorfi tuubi.
2. Tsentrifugeeriti 10 minutit (10000 RPM).
3. Eemaldati supernatant.
4. Lisati põhja fuugitud bakterimassile 200 µl TE puhverlahust ja suspendeeriti rakud põhjast üles.

PCR reaktsioon sisaldas: 3 µl MMix (Solis Biodyne, Eesti), 3 µl (GTG5) praimer (5`

-GTGGTGGTGGTGGTG-3`), 8 µl deioniseeritud vesi, 1 µl DNA

Igasse tuubi pipeteeriti 14 µL valmisegu ning lisati 1 µL DNA-d. Tuubid asetati Eppendorf Master Cycler PCR-masinasse ning analüüs viidi läbi kasutades praimeri seondumiseks nn. touchdown PCR-i, mille puhul praimeri seondumise temperatuur on alguses kõrgem ja langeb iga kahe tsükli tagant. Amplifitseerimiseks kasutati programmi: 95 C° – 15 min, 30 tsükli: 94 C° – 30 s, 45 C° – 60 s, 65 C° - 8 min, edasi 65 C° – 16 min, 4 C° – 10 min

### Geelelektroforees:

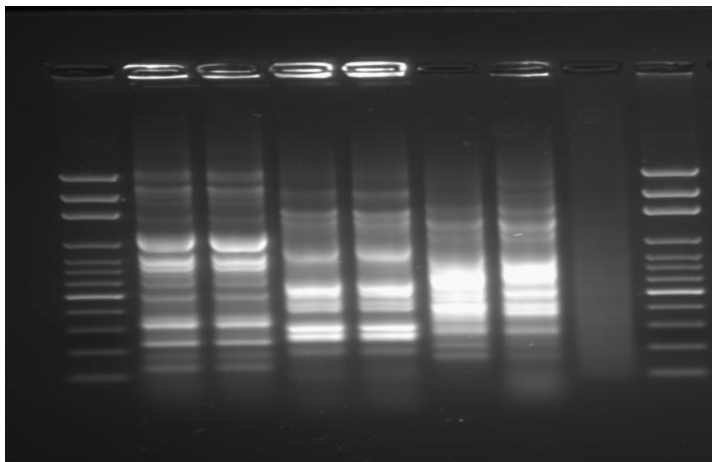
Amplifitseeritud DNA fragmendid lahutati 1,5 % agarosgeelis. Geelile kanti 5µl proovi. Külgedele kanti markerina 3 µL 100bp suurusmarkerit (SolisBiodyne, Eesti). Lahutamine toimus 110 V juures 60 minutit. Geel pildistati kasutades ImageQuant Healthcare 400 süsteemi.



### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1 PCR ja geelelektroforees

PCR-ga andsid kasutatud puhaskultuurid geelil selgelt erinevad mustrid, mille põhjal kontrolliti ka hiljem katsetes saadud tulemusi. Mustrid on toodud joonisel 1.



Joonis 1. Marker radadel 1 ja 9, radadel 2 ja 3 *Lb. plantarum* F44, 4 ja 5 *Lb. paracasei* F8, 6 ja 7 *B. breve* B46, 8. rajal negatiivne kontroll

## 3.2 Kuivkaal

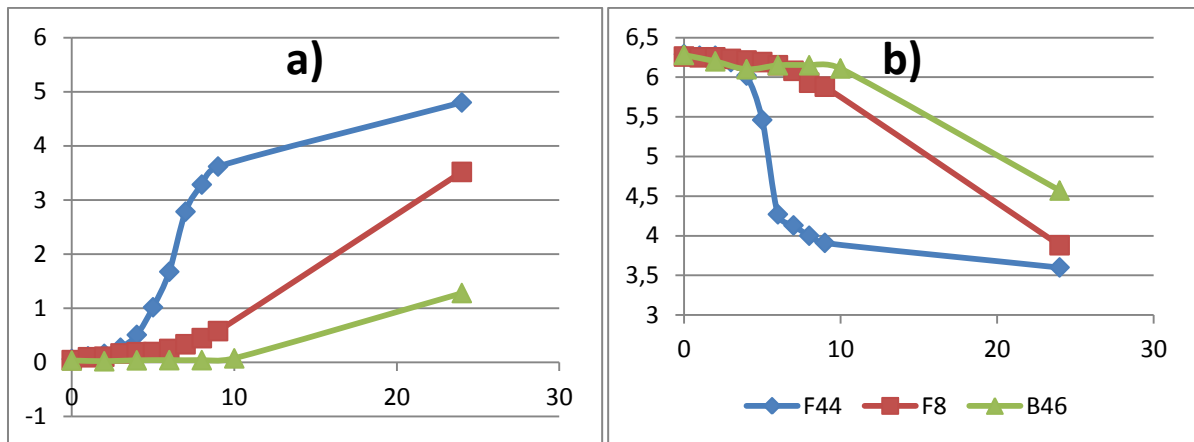
Bakterite kuivkaalu määramise tulemused on esitatud tabelis 1. Andmetest saab leida ühe keskmise bakteri kuivmassi. Meie andmete põhjal on kõige suurema massiga *B. breve* rakud ja kõige väiksema massiga *L. paracasei* F8 rakud, vastavalt  $1,22 \times 10^{-11}$  ja  $7,77 \times 10^{-12}$  grammi.

Tabel 1. *L. plantarum* F44, *L. paracasei* F8 ja *B. breve* 46 kuivkaal, optiline tihedus (OD) ja rakkude arv

	Biomassi mass (g/L)	OD	cfu/ml	Arvutatud ühe bakteri mass (g)	OD/DW	DW/OD
F44	1,1	4,80	$6,12 \times 10^8$	$1,8 \times 10^{-12}$	4,363636	0,229167
F8	0,8	3,52	$1,03 \times 10^8$	$7,77 \times 10^{-12}$	4,395833	0,227488
B46	0,235	1,28	$1,9 \times 10^7$	$1,22 \times 10^{-11}$	5,446809	0,183594

Kirjanduse andmetel on määratud näiteks *E. coli* ühe bakteriraku mass, mis on suurusjärgus  $9,5 \times 10^{-13}$  (Neidhardt, 1996). Kuna *E. coli* on antud katses uuritud tüvedest väiksem, tundub katse tulemus tõenäoline.

### 3.3 Kasvukõverad ja pH-kõverad



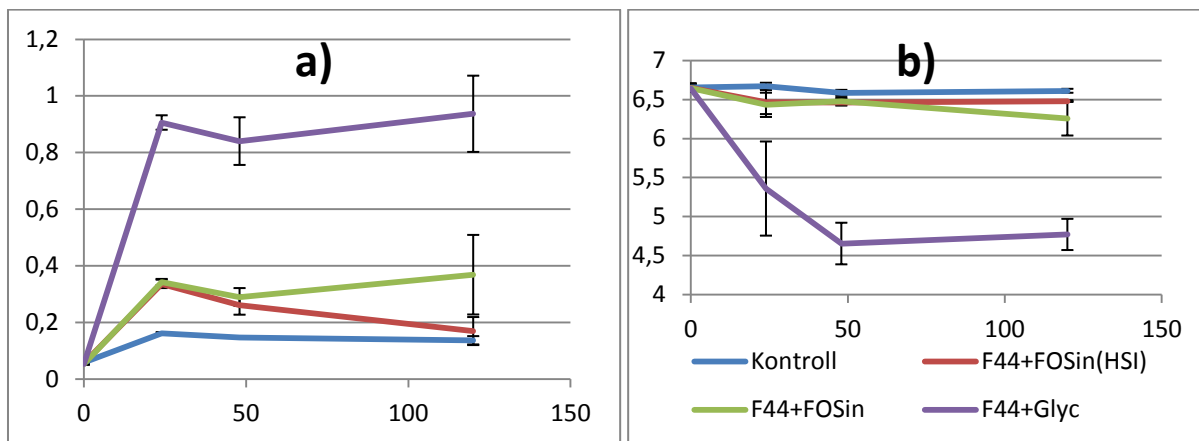
Joonis 2 . a) *L. plantarum* F44, *L. paracasei* F8 ja *B. breve* 46 optilise tiheduse (OD) muutus kasvul MRS söötmes 37 C juures 24 tunni jooksul b) *L. plantarum* F44, *L. paracasei* F8 ja *B. breve* 46 pH muutus kasvul MRS söötmes 37 C juures 24 tunni jooksul

Jooniselt 2 on näha, et kõige lühem lag-faas (<5 t) on tüvel *L. plantarum* F44, kõige hiljem algab *B. breve* 46 kasv. pH muutus on vastupidine OD muutusega, st, OD kasvades pH langeb, kuna bakterite elutegevuse käigus tekib happeid. Kui *L. plantarum* kultuur jõuab 24 tunniga stacionaarsesse faasi, siis teiste tüvede jaoks tundub see aeg neil tingimustel (külvl 1%) olema liiga lühike, eriti bifidobakterite puhul ja kultuur ei ole veel maksimaalset tihedust (minimaalset pH-d) saavutanud. Kuna katse lõpus on võetud vaid üks punkt, siis ei saa seda päris kindlalt väita, kuid ka hilisemad katsed kinnitavad seda. Lahenduseks oleks olnud suuremad külvinormid või pikem inkubeerimise aeg.

## 3.4 Bakterite kasv ja ainevahetus inuliini-tüüpi FOS-del

### 3.4.1 Katseklaasikatsed

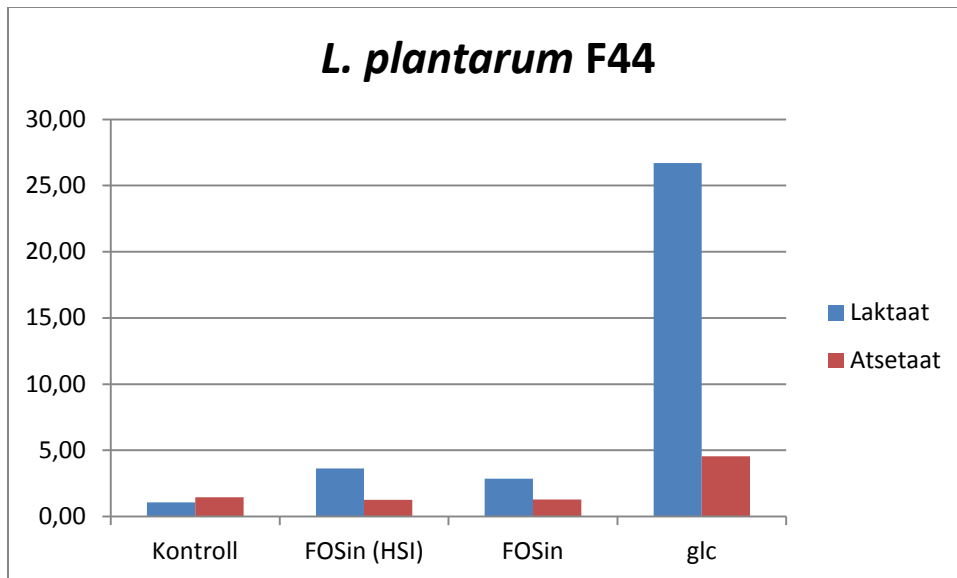
#### *L. plantarum* F44



Joonis 3. a) OD muutus *L. plantarum* F44 kasvul inuliini FOS-idega söötmetes, kolme katse keskmised, b) *L. plantarum* F44 kolme katse keskmised pH muutused. Kontrollkultuuris on substraadi asemel lisatud vett, glükoos on võrdlus-substraat.

Jooniselt 3a on näha optilise tiheduse järsku tõusu 24 tunni vältel glükoosi tarbimisel, palju vähem tõuseb OD inuliini-tüüpi FOS-ide puhul. Kontroll bakteri kasvul ilma suhkruta söötmes näitab väikest OD tõusu. OD muutused on korrelatsioonis pH muutustega. Jooniselt 3b võib näha suurt pH langust glükoosiga söötmes 48 tunnini, misjärel pH jääb stabiilseks. Inuliini-tüüpi FOS-dega söötmetes langeb pH 24 tunni jooksul väga vähesel määral, misjärel jääb stabiilseks.

HPLC tulemuste põhjal leiti *L. plantarum* F44 toodetud orgaanilised happed, mis on toodud joonisel 4.

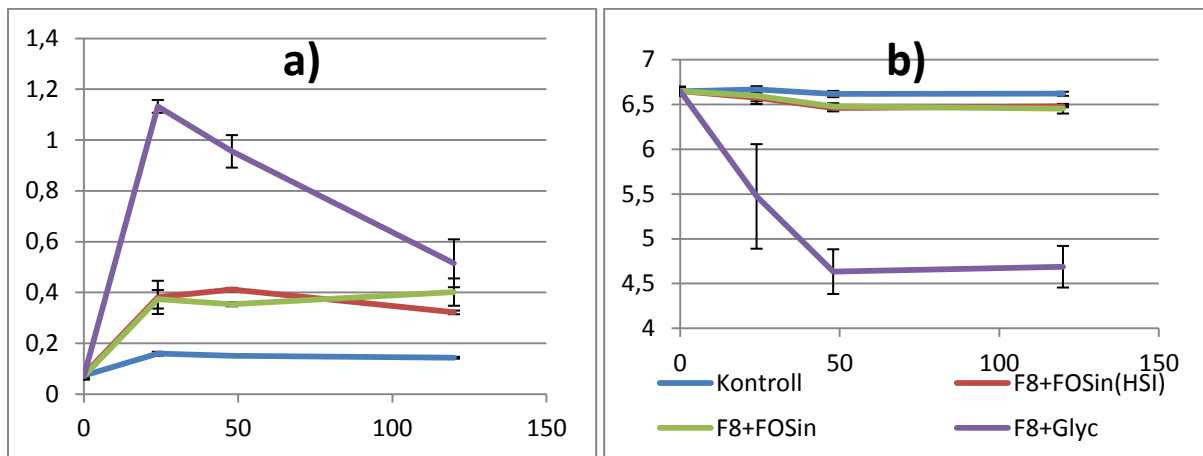


Joonis 4. Laktaadi ja atsetaadi kontsentratsioonid (mM) *L. plantarum* F44 kultuuris katse lõpus (120 t), substraatidega katsetest on lahutatud kontrollproovi laktaadi ja atsetaadi kogused

Joonis 4 näitab suurt orgaaniliste hapete laktaadi ja atsetaadi produtseerimist glükoosiga söötmes. Inuliini-tüüpi FOS-dega söötmes tekkis laktaati ja atsetaati vähe, sarnaselt ilma suhkrulisandita (kontroll) proovidega, mis näitab, et F44 antud substraate arvatavasti ei metaboliseerinud. Mõnevõrra kõrgem hapete sisaldus on näha HSI-ga söötmes, milles vabade suhkrute (glc, fru, suc) sisaldus on 12% võrreldes FOSin preparaadiga (vabu suhkruid vastavalt 5%).

Katses, kus uuriti 13 tüve *L. plantarumi* FOS fermentatsiooni (sisaldas 5% fruktoosi, sukroosi ja glükoosi), leiti et kaheksa neist olid võimelised fermenteerima FOS-i vähemal või rohkemal määral (Cebeci, Gürakan, 2003). Meie katsed näitasid, et *L. plantarum* F44 inuliini-tüüpi FOS-e ei fermenteerinud.

## *L. paracasei* F8

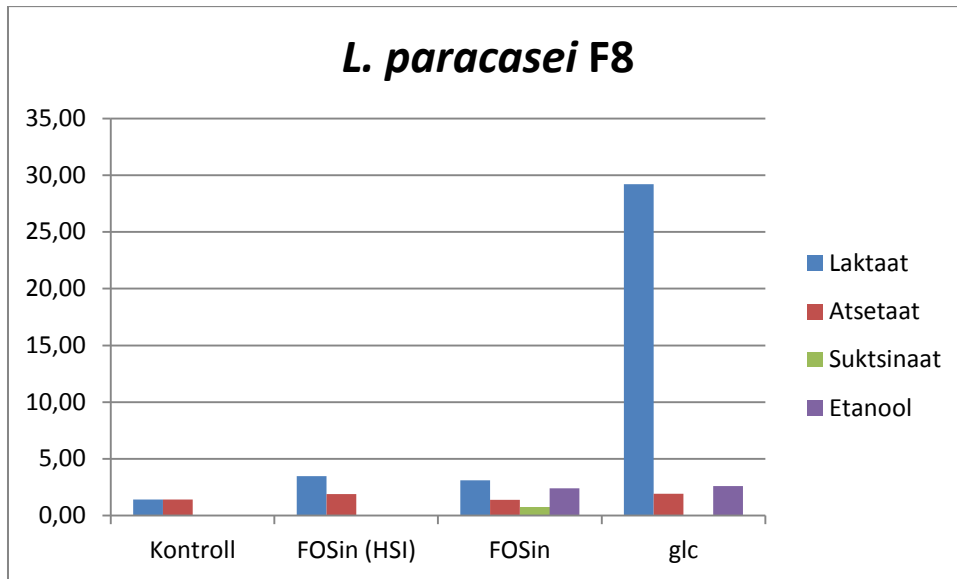


Joonis 5. a) OD muutus *L. paracasei* F8 kasvatades inuliini FOS-idega söötmetes, kolme katse keskmised, b) *L. paracasei* F8 kolme katse keskmised pH muutused. Kontrollkultuuris on substraadi asemel lisatud vett, glükoos on võrdlus-substraat.

Jooniselt 5a võib näha, et glükoosiga võrreldes tõuseb OD inuliini-tüüpi FOS-de tarbimisel palju vähem. Peale 24 tundi hakkab OD glükoosiga söötmes järsult langema, kuid FOS-dega proovides jääb stabiilseks.

pH muutub vastupidiselt OD-le. Jooniselt 5b võib näha suurt pH langust glükoosiga söötmes 48 tunnini, misjärel pH jääb stabiilseks. Mõlema inuliini-tüüpi FOS-iga söötmes langeb pH sarnaselt: 48 tunni jooksul väga vähesel määral, misjärel jääb stabiilseks.

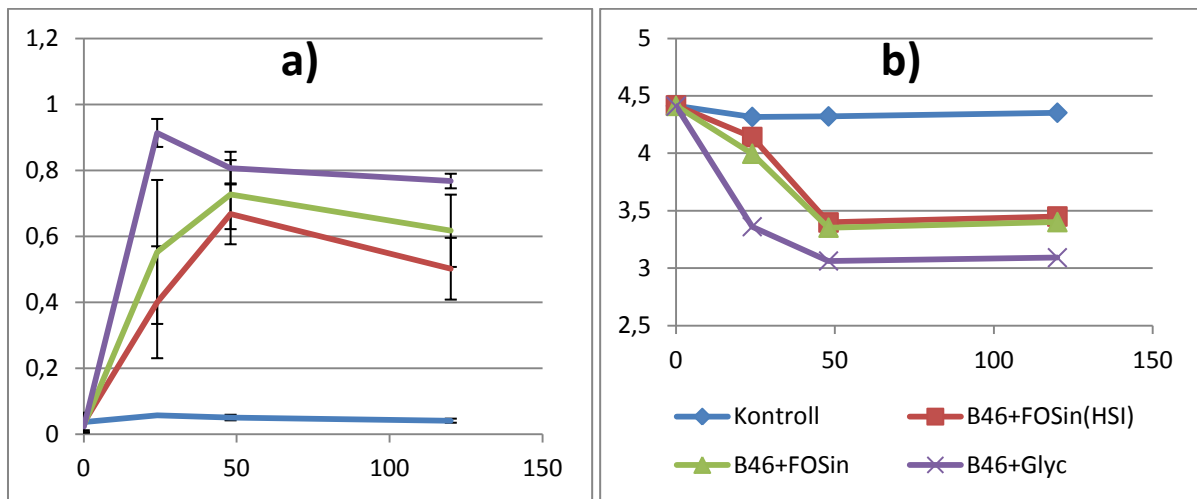
HPLC tulemuste põhjal leiti *L. paracasei* F8 toodetud orgaanilised happed, mis on toodud joonisel 6.



Joonis 6. Laktaadi ja atsetaadi kontsentratsioonid (mM) *L. paracasei* F8 kasvusöötmes katse lõpus (120 t), substraatidega katsetest on lahutatud kontrollproovi laktaadi ja atsetaadi kogused

Joonis 6 näitab glükoosiga proovides suurt laktaadi produtseerimist. Nii inuliini-tüüpi FOS-dega söötmes kui kontrollproovis laktaati ja atsetaati eriti ei tekkinud, mistõttu võib järeldada, et *L. paracasei* F8 antud substrate ei metaboliseerinud. Peale laktaadi ja atsetaadi leiti FOSin ja glc proovides vähesel määral suktsinaati ja etanooli, mis ei ole kooskõlas eelnevate katsetega ja võib viidata kultuuri saastumisele.

## *B. breve* B46



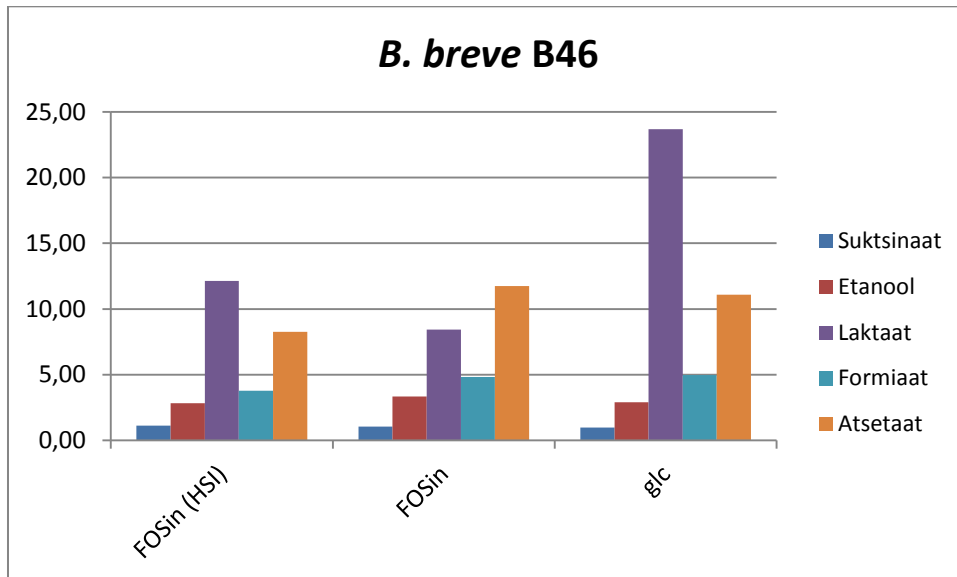
Joonis 7. a) OD muutus *B. breve* B46 kasvul inuliini FOS-idega söötmetes, kahe katse keskmised, b) *B. breve* B46 kahe katse keskmised pH muutused. Kontrollkultuuris on substraadi asemel lisatud vett, glükoos on võrdlus-substraat.

Jooniselt 7a võib näha, et kõige kõrgem OD tõus saavutatakse glükoosiga söötmes. Erinevalt laktobatsillidest esineb märgatav biomassi (OD) kasv ka inuliini-tüüpi FOS-dega söötmetes, mis näitab, et B46 suudab neid oligosahhariide fermenteerida. Glükoosiga söötmes lõpeb kasv 24. tunniks, FOS-dega söötmes 48. tunniks. FOS-dega söötmes proovides 24 tunni möödudes OD langeb. Inuliini-tüüpi FOS-dega proovides OD tõuseb 48 tunni vältel ning seejärel langeb.

Jooniselt 7b võib näha suurimat pH langust glükoosiga proovides 48 tunni jooksul, misjärel pH jääb stabiilseks. Inuliini-tüüpi FOS-dega proovides langeb 48 tunni jooksul pH vähem, kuid üsna suurel määral, misjärel pH püsib katse lõpuni stabiilsena.



HPLC tulemuste põhjal leiti *B. breve* B46 toodetud orgaanilised happed, mis on toodud joonisel 9.



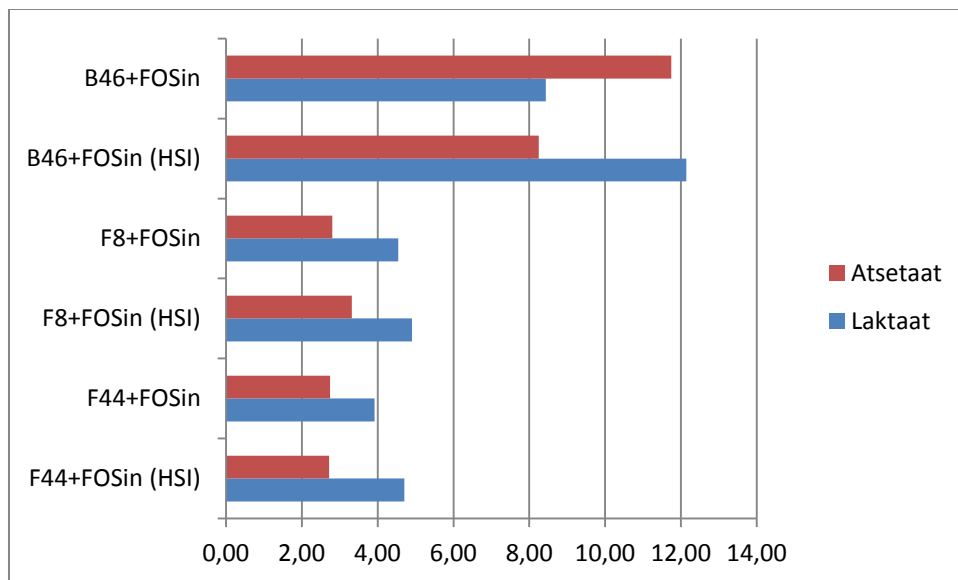
Joonis 9. Laktaadi ja atsetaadi kontsentratsioonid (mM) *B. breve* B46 kasvusöötmes katse lõpus (120 t)

Jooniselt 9 on näha, et erinevalt F44 ja F8-st, toodab B46 fermentatsiooni käigus ka vähesel määral suksinaati, formiaati ja etanooli. Kõige rohkem tekib metabolismil laktaati ja atsetaati. Kõrgeimat laktaadi (~24 mM) ja formiaadi teket võib tuvastada glükoosiga söötmes. Atsetaati (~12 mM) tekkis kõige rohkem FOSin metaboliseerimisel. Suksinaati, etanooli ja formiaati on tekkinud kõikides proovides sarnases koguses.

Võrreldes erinevaid inuliini-tüüpi FOS-dega proove, on näha, et FOSin proovides on tekkinud rohkem atsetaati kui FOSin HSI proovides. Laktaati on tekkinud jällegi rohkem FOSin HSI proovides. FOSin proovides on tekkinud natuke rohkem etanooli ja formiaati.

Katses, kus uuriti mitmete bifidobakterite tüvede probiootiliste substraatide fermentatsiooni, leiti, et *B. breve* B46 fermenteeris FOS-i (6.8% glükoosi, fruktoosi ja sukroosi, Orafiti Tienen, Belgia), kuid väiksemal määral, kui glükoosi (Kondepudi et al, 2012). Lisaks on uuritud teist *B. breve* tüve, kes samuti fermenteerib FOS-e (Palframan, 2003).

HPLC tulemuste põhjal sai võrrelda kolme bakteri poolt toodetud laktaadi ja atsetaadi koguseid inuliini-tüüpi FOS-dega proovides, mis on toodud joonisel 9.

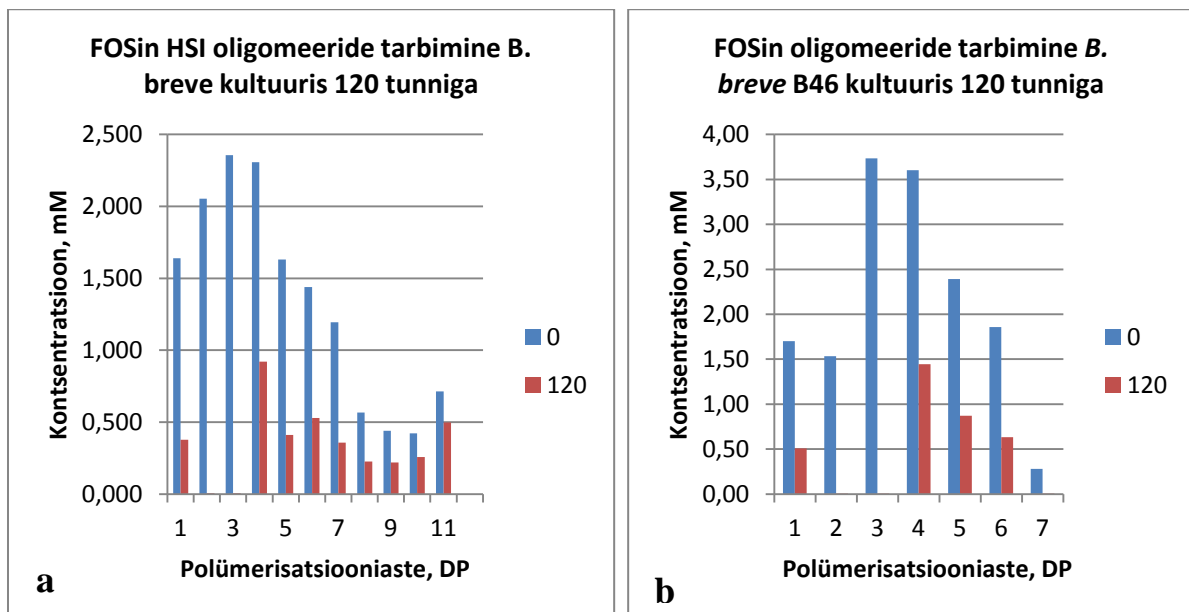


Joonis 9. F44, F8 ja B46 fermentatsiooniproduktid laktaat ja atsetaat

Jooniselt 9 on näha, et kõige rohkem laktaati ja atsetaati tekkis B46 metabolismil mõlema inuliini-tüüpi FOS-iga proovides, millest võib järeldada, et *B. breve* B46 fermenteeris antud substraati. Palju väiksemas koguses tekkis atsetaati ja laktaati F44 ja F8 metabolismil. Kuna inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidid sisaldasid vabu suhkruid ja söötmes kasutatud pärmiekstrakt väheses koguses seotud suhkruid, siis happed F44 ja F8 metabolismil on arvatavasti tekkinud nende suhkrute fermentatsioonil ning *L. plantarum* F44 ja *L. paracasei* F8 töös kasutatud substraate ei fermenteeri.

## B. breve B46 FOSin ja FOSin HSI oligomeeride tarbimine

Kuna eelnevatest andmetest (pH, OD, metabolismi produktid) selgus, et *B. breve* B46 metaboliseeris mõlemat inuliini-tüüpi FOS-i preparaati, siis analüüsiti inuliini-tüüpi FOS-de tarbimist oligomeeride kaupa. Tulemused on toodud joonisel 10. Vastavad analüüsid teostas Heiki Vija Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudist.

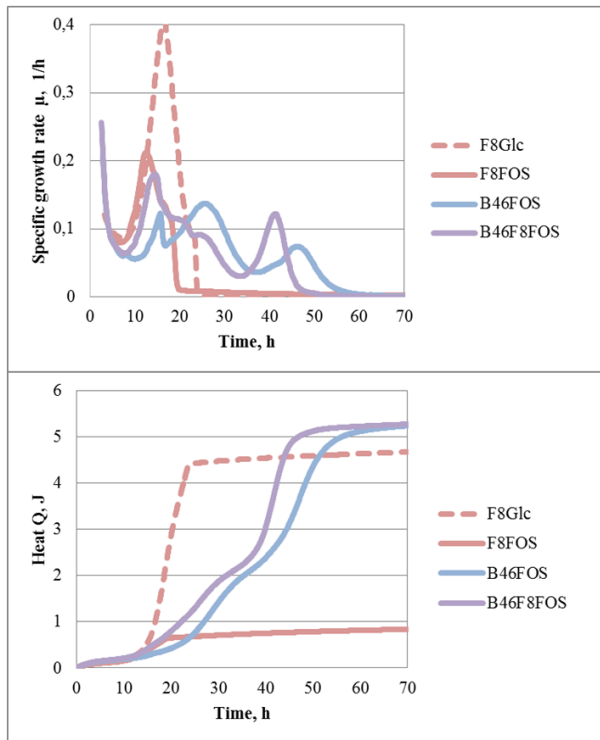


Joonis 10. a) HSI oligomeeride tarbimine *B. breve* B46 kultuuris 120 tunniga, b) FOSin tarbimine *B. breve* B46 kasvul 120 tunniga

Jooniselt 10 on näha, et *B. breve* B46 tarbis ära erineva polümerisatsioonastmega FOSin ja FOSin HSI oligomeerid. 120 tunni jooksul tarbiti mõlema substraadi puhul lõpuni ära oligomeerid, mis koosnesid kahest või kolmest suhkrujäägist.

### 3.3.2 Mikrokalorimeetri katse

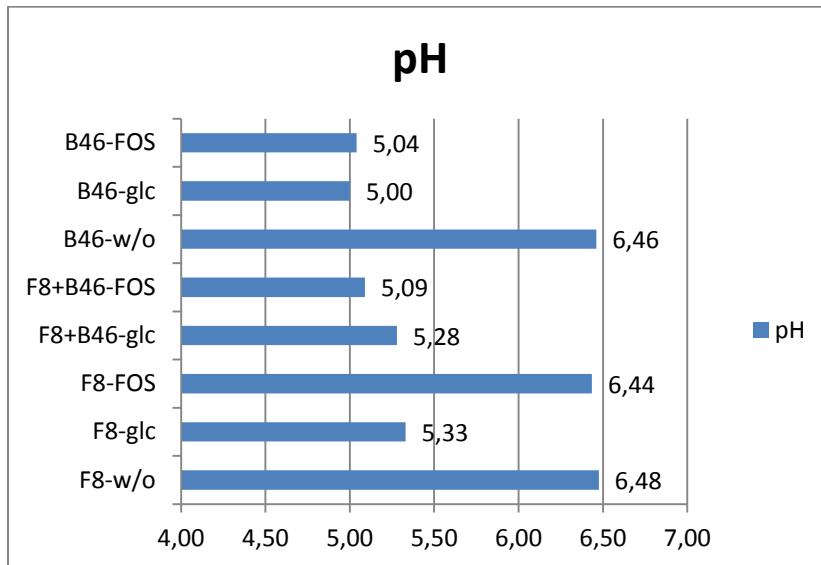
Mikrokalorimeetri katses salvestati soojuste eraldumine bakterite kasvatamisel. Iga substraadi ja tüve kombinatsioon annab iseloomuliku soojusgraafiku aja. Joonisel 11 on toodud *B. breve* B46 ja *L. paracasei* F8 kasvatamisel erikiirused ja soojuste kõverad puhas- ja segakultuuris FOSin söötmes.



Joonis 11. *L. paracasei* F8 ja *B. breve* B46 kasvatamisel erikiirused ja soojuste kõverad puhas- ja segakultuuris FOSin söötmes

## pH sega- ja puhaskultuurides

IMC katse lõpus mõõdeti proovide pH, tulemused on toodud joonisel 12.

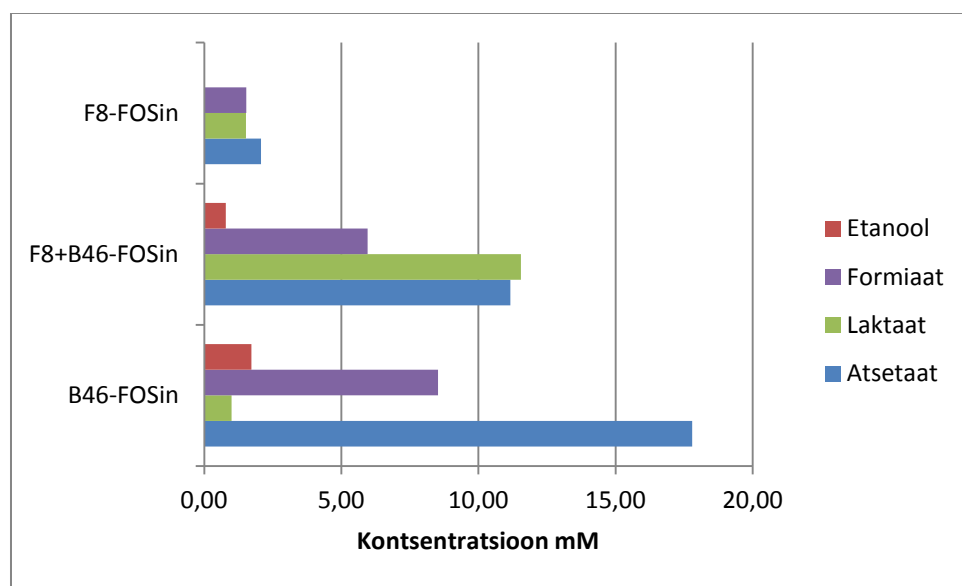


Joonis 12. pH katse lõpus (120-144 tundi) *L. paracasei* F8 ja *B. breve* B46 segakultuurides ja puhaskultuurides

Jooniselt 12 on näha, et FOSin söötmes on pH segakultuuris katse lõpuks oluliselt madalam kui *L. paracasei* F8 puhaskultuuris, kuid natuke kõrgem kui *B. breve* B46 puhaskultuuris. Glükoosiga proovides on segakultuuris näha kõrgemat pH-d kui *B. breve* B46 puhaskultuuris kuid madalamat kui *L. paracasei* F8 puhaskultuuris.

### L. paracasei F8 ja B. breve B46 metabolismiproduktid puhas- ja segakultuurides

L. paracasei F8 ja B. breve B46 segakultuuride katse FOSin söötmes viidi läbi ainult kalorimeetris. Proove analüüsiti HPLC abil, et leida tekkinud orgaaniliste hapete kogused. Tulemused on toodud joonisel 13.



Joonis 13. *L. paracasei* F8 ja *B. breve* B46 metabolismiproduktid puhas- ja segakultuurides FOSin söötmes

Jooniselt 13 on näha, et segakultuuris tekkis palju suurem kogus laktaati kui puhaskultuurides. Samuti tekkis segakultuuris märkimisväärne kogus atsetaati ja formiaati ning väike kogus etanooli. Produktide muster on kombinatsioon puhaskultuuride omast, kus laktobatsillide tüüpiline ainevahetussaadus on piimhape ja bifidobakteritel äädikhape ja sipelghape. Kuna *L. paracasei* F8 FOSin ise ei fermenteeri ja piimhappe tootmine on iseloomulik just laktobatsillidele, võib oletada, et segakultuuris *B. breve* 'ga saab kasvada ka *L. paracasei*.

## KOKKUVÕTE

Probiotikumide ja prebiootikumide tarbimisel on positiivne mõju inimese seedimisele ja tervisele. Uuritakse erinevate tüvede puhaskultuure ja segakultuure ning prebiootiliste substraatide variante, et leida kombinatsioone, millel oleks parim võimalik kasulik efekt tervisele.

Antud töös uuriti *Lactobacillus plantarum* F44, *Lactobacillus paracasei* F8 ja *Bifidobacterium breve* B46 kasvu ja ainevahetust kahel erineval inuliini-tüüpi fruktooligosahhariidil võrdluses glükoosiga. Leiti, et kõik tüved fermenteerisid paremini glükoosi. FOS-e fermenteeris *B. breve* B46, *L. plantarum* F44 ja *L. paracasei* F8 inuliini-tüüpi FOS-e ei fermenteerinud ja seega ei ole otstarbekas neid tüvesid antud substraadi puhul kasutada. Kahe erineva inuliini-tüüpi FOS-i tulemused üksteisest palju ei erinenud.

*B. breve* B46 FOSin ja FOSin HSI metaboliseerimisel tekkis laktaati ja atsetaati ning lisaks etanooli, suktsinaati ja formiaati. Hapete produktsioon kinnitab, et *B. breve* B46 tarbib antud substraate. FOSin ja FOSin HSI koosnesid erineva pikkusega oligomeeridest, millest *B. breve* B46 tarbis 120 tunni jooksul täielikult ära kahest ja kolmest suhkrujäägist oligomeerid.

Uurides *L. plantarum* F8 ja *B. breve* B46 segakultuuri dünaamikat inuliini-tüüpi FOS-iga söötmes, leiti, et segakultuuris tekkis märkimisväärne kogus laktaati, atsetaati ja formiaati, kusjuures atsetaati ja formiaati tekkis rohkem kui glükoosiga proovides. Katse tulemus näitab, et antud bakterite tüved aitavad kaasa üksteise elutegevusele ja metabolismile, mis annab aluse potentsiaalse sümbiootikumi välja arendamiseks.

## RESUME

Consuming probiotics and prebiotics has a positive effect on human health. Investigations are carried out to find combinations of cultures and new improved substrates in order to get the most benefit.

The aim of this study was to investigate: 1. the growth and metabolism of three probiotic strains *Lactobacillus plantarum* F44, *Lactobacillus paracasei* F8 and *Bifidobacterium breve* B46 on two different types of inulin-type FOS in comparison with glucose, 2. to investigate *L. paracasei* F8 *B. breve* B46 mixed culture dynamics in broth with inulin-type FOS.

In order to investigate these matters, in vitro studies were carried out in test tubes and using IMC method. Growth was detected by OD, pH and plate counts. Dry weight analysis was carried out to find correlations between DW, OD and cfu. Metabolism products organic acids and sugars were detected by HPLC. The purity of cultures was controlled with PCR.

The results showed that *B. breve* B46 fermented FOSin and FOSin HSI. That was shown by changes in OD and acid production in cultures. *L. plantarum* F44 and *L. paracasei* F8 did not metabolise inulin-type fructooligosaccharides. *B. breve* B46 fermented oligomers with different DP, preferring the ones with DP of two and three. In culture containing *B. breve* B46 and *L. paracasei* F8, large quantities of lactate, acetate and formate was produced during growth in broth with FOSin indicating the symbiotic potential of these two strains together with FOSin.



## KASUTATUD KIRJANDUS

Amara A.A., Shibl A., 2013. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. Saudi Pharmaceutical Journal

Arora T., Sharma R., Frost G., 2011. Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? Appetite 56, 511-5

Bartosch S., Woodmansey E.J., Paterson J.C.M., McMurdo M.E.T., Macfarlane G.T., 2005. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis* and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. Clin Infect Dis 40,28-37

Belenguer A., Duncan S.H., Calder A.G., Holtrop G., Louis P., Lobley G.E., et al, 2006. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. Appl Environ Microbiol 72, 3593-9

Canani R.B., Costanzo M.D., Leone L., Pedata M., Meli R., Calignano A., 2011. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. World J Gastroenterol 17, 1519-28

Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Res 37, 233-8

Cebeci, A., Gürakan, C., 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiology 20, 511-518

De Preter V., Falony G., Windey K., Hamer H.M., De Vuyst L., Verbeke K., 2010. The prebiotic, oligofructoseenriched inulin modulates the faecal metabolite profile: an in vitro analysis. *Mol Nutr Food Res* 54, 1791-801

Duncan S.H., Louis P., Thomson J.M., Flint H.J., 2009. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 11, 2112-22

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S., R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308, 1635

EFSA, 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal* 587, 1-16

Fang, S., Evans, R. M., 2013. Wealth management in the gut. *Nature* 500, 538-539

Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P., Forano, E., 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 3:4, 289-306

Foxx-orenstein, A.E., Chey, W.D., 2012. Manipulation of the Gut Microbiota as a Novel Treatment Strategy for Gastrointestinal Disorders. *Am J Gastroenterol Suppl* 1, 41-46

Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J., Rastall, R.A., & Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17, 259–275

Gibson G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 125, 1401-1412

Hammes, W.P., Vogel, R. *The Genus Lactobacillus in The Lactic Acid Bacteria Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria.* London: Blackie Academic, 1995

Hoffmann C., Dollive S., Grunberg S., Chen J., Li H., Wu G.D., Lewis J.D., Bushman F.D., 2013. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One* 8(6)

Hopkins, M.J., Macfarlane, G.T., 2002. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *J. Med. Microbiol.* 51, 448–454

Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Working Group. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada: Joint FAO/WHO; 2002

Kolida, S., Gibson, G.R., 2011. Synbiotics in health and disease. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2, 373-93

Kondepudi, K.K., Ambalama, P., Nilssona, I., Wadströma, T., Ljungha, Å., 2012. Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 18, 489-497

Ljungh, A., Wadström, T. *Lactobacillus molecular biology: from genomics to probiotics.* Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. 5-18, 39-41

Lozupone, C. A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220-230

Manning, T. S., Gibson, G. R., 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 18, 287–298

McClanahan, C. Probiotics and human health. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/probiotics-and-human.html> külastatud 26.11.2013

Mikelsaar, M., Lazar, V., Onderdonk, A., Donelli, G., 2011. Do probiotic preparations for humans really have efficacy? *Microbial Ecology in Health and Disease* 22

Neidhardt F.C. *et al.* *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Vol 1. Washington: ASM Press 1996, 14

Palframan, R.J., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2003. Carbohydrate Preferences of *Bifidobacterium* Species Isolated from the Human Gut. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 4, 71-75.

Qin, J. et al, 2009. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65

Rastall, B., Gibson, G. *Prebiotics: Development and application.* England: John Wiley & Sons, 2006

Rastall, R.A., 2010. Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annu Rev Food Sci Technol.* 1, 305-39

Rastall, R.A., Maitin, V., 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Opin Biotechnol.* 13, 490-6.

Russell W.R., Gratz S.W., Duncan S.H., Holtrop G., Ince J., Scobbie L., et al, 2011. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am J Clin Nutr* 93, 1062-72

Russell, W.R., Scobbie, L., Chesson, A., Richardson, A.J., Stewart, C.S., Duncan, S.H. *et al*, 2008. Anti-inflammatory implications of the microbial transformation of dietary phenolic compounds. *Nutrition and Cancer* 60, 636-642

Scott K.P., Grata, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H., 2013. The influence of diet on gut microbiota. *Pharmacological research* 69, 52-60

Scott K.P., Duncan, S.H., Flint, H.J., 2008. Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutrition Bulletin* 33, 201-211

Sleeth M.L., Thompson E.L., Ford H.E., Zac-Varghese S.E., Frost G., 2010. Free fatty acid receptor 2 and nutrient sensing: a proposed role for fibre, fermentable carbohydrates and short-chain fatty acids in appetite regulation. *Nutr Res Rev* 23,135-45

Tiihonen K., Ouwehand A.C., Rautonen N., 2010. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing res Rev* 9, 107-116

Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics - A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* 96, 219– 233

Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E., Salminen S., 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 73, 393-398

Turner, N.D., Lupton, J.R., 2011. Dietary Fiber. *Adv Nutr* 2, 151-152

Wang X., Gibson G.R., 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 75,373-80

Wang, Y., 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International.* 42, 8–12

Warchol M., Perrin S., Grill J.P., Schneider F., 2002. Characterization of a purified beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Lett Appl Microbiol* 35, 462-467

Whitman, E.B., Coleman, D.C., Wiebe, W. J., 1998. Procaryotes – the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6578–6583

**HPLC analüüsil kasutatud standardid**

	Molaarmass	Kasutatud aine	Tootja	Kaalutud aine molaarsus standardis (mmol/L)
Glükoos	180,16	D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, Saksamaa	20,9
Fruktoos	180,16	D-(-)-Fructose	Merck, Saksamaa	20,5
Laktaat	112,06	Sodium L-lactate	Sigma-Aldrich, Saksamaa	39,1
Formiaat	46,03	Formic acid	BDH Laboratory Supplies, Inglismaa	79,5
Atsetaat	60,05	Acetic acid	Sigma-Aldrich, Saksamaa	80,4
Sahharoos	342,3	Sucrose	Sigma-Aldrich, Saksamaa	10,1
Suktsinaat	162,05	Disodium Salt Hexahydrate	Sigma-Aldrich, Saksamaa	30,3
Glütserool	92,09	Glütserool, analüüsipuhtusega	Venemaa	29,8
Etanool	46,07	Absolut ethanol (99,5-99,7 vol%)	Berner Oy, Soome	161,0