



## **Kiudainerikka õunasmuuti mõju soolebakterite ainevahetusele**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Rebeka Ojasaar

Juhendajad: Kaarel Adamberg, vanemteadur, PhD

Signe Adamberg, vanemteadur, PhD

Õppekava: Toidu- ja biotehnoloogia

## **Autorideklaratsioon**

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Rebeka Ojasaar

Allkirjastatud digitaalselt 30.05.2023

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Kaarel Adamberg

Allkirjastatud digitaalselt 30.05.2023

Juhendaja: Signe Adamberg

Allkirjastatud digitaalselt 30.05.2023

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Katrin Laos

# Sisukord

Sissejuhatus.....	6
1 Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1 Seedetrakti mikrobiota.....	7
1.2 Soolemikrobiota kujunemine .....	7
1.2.1 Soolemikrobiota muutused elu jooksul .....	7
1.2.2 Erinevused indiviidide vahel.....	8
1.3 Olulised soolebakterid .....	9
1.4 Toidu mõju soolestiku mikrobiotale.....	10
1.4.1 Kiudainete roll soolestiku mikrobiota funktsioonis .....	11
1.4.2 Kiudainete jaotamine ja omadused .....	11
1.4.3 Kiudainete vajadus ning allikad.....	12
1.4.4 Kiudainete fermentatsiooniproduktid .....	13
2 Töö eesmärgid .....	14
3 Meetodid .....	15
3.1 Toitumisuuring.....	15
3.2 Fekaaliproovide kogumine ja proovide ettevalmistus analüüsiks .....	16
3.3 Sekveneerimisanalüüsid .....	16
3.4 Metaboliitide ja pH analüüs .....	16
3.5 Statistiline analüüs.....	17
4 Tulemused .....	18
4.1 Väljaheiteproovide mikroobne koostis ja pH baasperioodil .....	18
4.2 Smuuti mõju bakterikooslustele.....	19
4.3 Seosed bakterite, metaboliitide ning pH vahel .....	21
5 Arutelu.....	24
5.1 Kiudainete mõju soolemikrobiotale .....	24
5.2 Kiudainete mõju fekaalsele pH-le ja orgaaniliste hapete sisaldusele .....	25
5.3 Seosed soolebakterite, pH ja orgaaniliste hapete vahel .....	25
6 Järeldused.....	27
Kokkuvõte .....	28
Tänuavaldused .....	29
Kasutatud kirjandus .....	30

## Annotatsioon

Tasakaalus soolemikrobiota on oluline inimese tervisele. Bakterikooslust mõjutab suurel määral toit ning selles sisalduvad kiudained. Selle bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida kõrge kiudainete sisaldusega smuuti mõju soolemikrobiota koostisele, väljaheite orgaaniliste hapete muustrile ja pH-le. Selleks analüüsiti 28 kiudaineid vähetarbiva inimese fekaaliproove kiudainerikka (11,6 g kiudaineid päevas) ning kontrollsmuuti (4,6 g kiudaineid päevas) tarbimisel 3-nädala pikkusel perioodil. Samuti analüüsiti nende näitajate omavahelisi seoseid ning muutusi võrreldes uuringule eelnenud baasperioodi andmetega. Selgus, et kiudainerikka smuuti tarbimise tulemusel tõusis kiudainete lagundajate ja happeid tootvate bakterite osakaal mikrobiotas (*Roseburia*, *Lachnospira*, *Faecalibacterium*) ning vähenes valkude metabolismiga seotud ning haigustega seostatud perekonna osakaal (*Ruminococcus torques* group, *Alistipes*, *Shigella*, *Escherichia*, *Colidextribacter*, *Dorea*). Samuti nähti, et nendel, kellel uuringu alguses oli kõrge fekaalne pH (pH > 7,7), toimus kiudainerikka smuuti tarbimisel oluline pH langus ning atsetaadi, butüraadi ning propionaadi sisalduse tõus fekaaliproovides. Hapete sisaldus proovides oli tugevalt seotud pH-ga, kasvades pH alanemisel. Kõrgem atsetaadi ning butüraadi tootlus oli seotud *Roseburia* osakaalu tõusuga. Tööst järeldus, et kiudainete sisalduse tõstmine menüüs omas mõju soole mikrobikooslusele, soole luumeni pH-le ning hapete tootlusele. Selles töös analüüsiti bakterikooslust perekonna tasandil ning leiti, et tervist toetavate või haigusi soodustavate bakterite osakaalu muutuse täpsemaks kaardistamiseks tuleks analüüsida tulemusi liigi tasandil.

## **Abstract**

In this bachelor's thesis, faecal samples obtained from a nutrition study were analyzed with the aim of finding out how the changes of the gut microbiota composition, the pattern of organic acids and the pH changes as a result of increasing the amount of dietary fiber. The study showed that consumption of the pectin-enriched smoothie for three weeks increased the proportions of fiber-degrading and organic acid-producing bacterial genera (*Roseburia*, *Lachnospira*, *Faecalibacterium*). At the same time, the proportions of several protein-metabolizing and disease-associated bacteria decreased (*Ruminococcus torques* group, *Alistipes*, *Shigella*, *Escherichia*, *Colidextribacter*, *Dorea*).

The cross-feeding patterns also confirmed the bacterial data. The increase in the proportion of *Phascolarctobacterium* bacterial genera increased with higher fiber consumption, although these taxa metabolize succinate but do not degrade dietary fibers. The observed effect could be explained by increased proportion of fiber-degrading and succinate-producing *Bacteroides* species.

A fiber-rich diet is associated with lower (acidic) luminal pH and an increased production of organic acids by gut microbiota. In the high faecal pH group (pH > 7,7), significant drop of faecal pH was seen along with the increase of acetate, propionate and butyrate concentrations caused by fiber-rich smoothie. On the other hand, the luminal pH has a significant effect on bacterial metabolism and production of organic acids. It was observed that a decrease in pH favors the growth of acid-producing bacteria. The yield of organic acids depends on the bacterial community and in turn affects it, supporting the growth of some bacteria and inhibiting others. Increase in acetate and butyrate content in the samples was positively correlated with *Roseburia*, which has an important role for human health. The increase in acetate concentration had an inhibitory effect on *Barnesiella* and that of butyrate on *Escherichia-Shigella*.

## Sissejuhatus

Inimese soolemikrobiota mängib olulist rolli peremeesorganismi tervises ning mikrobiota muutused on sageli seotud erinevate haigustega. Kogu inimese organismi koloniseerivatest bakteritest ligi 95 % elab jämesooles ning nende koguarv on hinnanguliselt  $3,9 \times 10^{13}$  (Sender et al., 2016). Soolemikrobiom kodeerib üle 3 miljoni geeni, mistõttu seisneb bakterite funktsioon oluliselt nende toodetud metaboliitides, mis panustavad inimese tervisesse, mõjutades ainevahetuse, immuunsüsteemi ja aju tööd (Fan & Pedersen, 2021; Rinninella et al., 2019). Soolebakterite kooslus on individuaalne ning pidevas dünaamilises muutumises. Mikrobiota sõltub mitmetest teguritest nagu toitumine, vanus, kehamassiindeks, geneetiline taust, elustiil ja ravimite tarbimine (Rinninella et al., 2019).

Selleks, et hoida soolekooslus tasakaalus ja toetada selle ainevahetust, on oluline roll dieedil ning eriti toidust saadud kiudainetel. Inimesele mitteseeduvad toitained jõuavad jämesoolde, kus soolebakterid neid lagundavad ning toodavad vastavalt substraadile erinevaid metaboliite. Inimese organismis täidavad erinevaid funktsioone kiudainete bakteriaalse fermentatsiooni produktid, neist tuntumad on lühikese ahelaga rasvhapped atsetaat, butüraat ja propionaat. Nende hapete kõrgem tootlus jämesooles on iseloomulik põletikuliste haiguste puudumisele, kiiremale soole läbikäigule, paremale glükoosi ning lipiidide metabolismile ja normaalkaalule (Al Bander et al., 2020).

Kaasaegne lääneühiskonna toit on kiudainevaene, rafineeritud ning rikas loomsetest valkudest ja rasvadest. Eesti 2015. aasta toidumissoovitustes on soovituslikuks kiudainete tarbimiskoguseks täiskasvanud naistele vähemalt 25 g ja meestele vähemalt 35 g päevas (Pitsi, et al., 2017). Euroopas on aga kiudainete keskmine tarbimine madalam, olles meestel vahemikus 18-24 g ning naistel 16-20 g (Stephen et al., 2017). Kiudainevaesed dieeti on seostatud mikroobikoosluse mitmekesisuse vähenemisega ning põletikuliste haiguste esinemise tõusuga. Kuna aina rohkem leitakse korrelatsioone haiguste ning soolebakterite vahel, siis on oluline uurida, kuidas kiudainete sisalduse tõstmiseks dieedis on võimalik mõjutada mikrobiotat ning bakterite ainevahetust.

Antud töös uuriti reaalseid fekaaliproovide mikroobseid kooslusi, orgaaniliste hapete sisaldust ja pH-d eesmärgiga leida nendevahelisi korrelatsioone. Samuti uuriti seda, kuidas menüü rikastamine kiudainetega neid näitajaid mõjutab. Fekaaliproovid olid pärit toitumisuuringust, milles osalejad tarbisid uuringuperioodil kiudainetega rikastatud smuutit ja teisel perioodil kontrollsmuutit, mis sisaldas samaväärse koguse tärklist.

# 1 Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Seedetrakti mikrobiota

Igal inimesel on unikaalne soolestiku mikrobioloogiline profiil, millel on mitmeid olulisi funktsioone. Nende hulka kuulub roll peremeesorganismi ainevahetuses, soolestiku limaskestast struktuurse integreerituse tagamises, antimikroobses kaitses, närvisignaalide regulatsioonis, immuunsüsteemi töös ning ravimite toimes (Fan & Pedersen, 2021; Jandhyala et al., 2015).

Soolestiku mikrobiota ehk seedetrakti koloniseerivate mikroorganismide populatsiooni kuuluvad bakterid, arhed, bakteriofaagid, eukarüootsed viirused ning seened (Fan & Pedersen, 2021), millest 90 % moodustavad Firmicutes ja Bacteroidetes hõimkondade bakterid (Rinninella et al., 2019). Kõige rohkem mikroobe asustab inimese käärsoolt, mida on hinnanguliselt  $3,9 \times 10^{13}$  ning nende suhe inimese enda rakkudes on ligikaudu 1 (Sender et al., 2016). Selline bakterirakkude rohkus on oluline, sest soolestiku mikrobiom kodeerib üle 3 miljoni geeni, mis toodavad tuhandeid peremeesorganismi tervisele olulisi metaboliite (Rinninella et al., 2019).

Soolekooslusest sõltuvalt on ülalmainitud funktsioonid eubioosi ehk makroorganismi ja mikrofloora vahelise normaalse vahekorra korral tagatud või nende tasakaaluhäire ehk düsbioosi korral häiritud. Kuigi unikaalse mikrobiokoosluse kujunemine sõltub paljudest teguritest terve inimese eluea jooksul, on toitumisel olulisim roll optimaalse koosluse säilitamisel.

## 1.2 Soolemikrobiota kujunemine

Inimese soolemikrobiota ja bakterigeenide rikkus muutuvad elu jooksul dünaamiliselt ning koosluse areng saab alguse sündimisel. Imikueas toimuvad soolekooslustes kõige kiiremad ja suuremad muutused. Mikrobiota kujunemist mõjutavad vanus, keskkonnategurid ning antibiootikumide tarbimine. Täiskasvanueas on soolekooslused kõige stabiilsemad ning hakkavad taas muutuma kõrgemas eas immuunsüsteemi nõrgenemise tõttu (Rinninella et al., 2019; Fan & Pedersen, 2021). Seedesüsteemi erinevates osades on erinev mikrobiokooslus. Indiviidide kooslused erinevad sõltuvalt nende kehamassiindeksist, füüsilisest koormusest, elustiilist, kultuurist ja toitumisharjumustest ja teistest teguritest (Rinninella et al., 2019).

### 1.2.1 Soolemikrobiota muutused elu jooksul

Inimese loode on ema ihus steriilne ning mikrobiota areng saab alguse sünnitusel, mil imik puutub kokku ema naha, vaginaalse ning fekaalse mikrobiotaga ja keskkonna mikrobiotaga. Millised bakterikultuurid soolestikku koloniseerima hakkavad, sõltub otseselt sünnitusviisist (enneaegne, ajaline või keisrilõike teel), ning vastsündinu toitmisest (rinnapiim vs imikupiimasegud). Enneaegsena sündinud imiku soolestiku bakterikooslus on ajaliselt sündinu mikrobiotast vaesem vähem arenenud organite, ravimite, haiglakeskkonna ning ema ihuga vähese kokkupuute tõttu. Vaginaalse sünnituse tulemusel sarnaneb vastsündinud soolestiku mikrobiota mitmekesisema vaginaalse bakterikooslusega, aga keisrilõikega sündinud imiku puhul rohkem haiglakeskkonna ning ema naha mikrobiotaga. Pärast sündimist hakkab imiku soolestiku mikrobiokooslust kujundama

peamiselt toit ning keskkonnategurid ja antibiootikumid, mis mõjuvad liigirikkust pärssivalt. (Rinninella et al., 2019)

Hinnanguliselt kolmandaks eluaastaks saavutab lapse soolestiku mikrobiota täiskasvanud inimesele sarnase koosluse, milles domineerivad Firmikuutide (sh *Lachnospiraceae* ja *Ruminococcaceae*), Bacteroidetes (*Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, ja *Rikenellaceae*) ja Aktinobakterite (*Bifidobacteriaceae* and *Coriobacteriaceae*) hõimkonnad. Eakatel inimestel, kelle toitumine on muutunud ühekülgsemaks ning kelle immuunsüsteem ja seedimine on nõrgenenud, hakkab bakterikoosluste mitmekülgsus alanema. Bakterikoosluse vaesemaks muutumine, eriti bifidobakterite osakaalu vähenemine, aga omakorda nõrgestab seedesüsteemi ning ka immuunsüsteemi funktsioneerimist. (Rinninella et al., 2019)

### 1.2.2 Erinevused indiviidide vahel

Täiskasvanud inimese mikrobiota koostis on unikaalne ning indiviidide vahelised erinevused sõltuvad mitmest tegurist. Soolestikku koloniseerivate mikroorganismide varieeruvuse kirjeldamiseks ja kategoriseerimise lihtsustamiseks võib kasutada enterotüüpe. Sõltuvalt mikrobioomis domineerivatest perekondadest, loodi 2011 aastal kontseptsioon kolmest enterotüübist: *Bacteroides* (enterotüüp 1), *Prevotella* (enterotüüp 2) ja *Ruminococcus* (enterotüüp 3) (Cheng & Ning, 2019). Selleks analüüsi 33 fekaaliproovi erinevatest populatsioonidest ja leiti, et neid proove saab jaotada kolmeks teineteisest eristuvaks klastriks nendes sisalduvate diskrimineerivate perekondade alusel (Arumugam et al., 2011). Hiljem tehtud uuringud näitavad aga, et erinevaid meetodeid kasutades ning populatsioone analüüsid on enterotüüpide arv varieeruv ning enterotüüp 3 osakaal mikrobioomiproovides on väike (Cheng & Ning, 2019).

Enterotüübid sõltuvad soolestiku mikroobikooslusest, mis on pidevas muutumises. Kuigi lühiajalised muutused toitumises, elustiilis, antibiootikumide tarbimises või keskkonnas ei ole piisavad, et muuta enterotüüpi, võivad pikaajalised ja järjepidevad muutused nendes tegurites muuta mikrobioomis domineerivaid perekondi ning läbi selle ka enterotüüpi (Cheng & Ning, 2019).

Kehamassiindeksi põhjal tehtud mikrobioomiuuringud on näidanud, et ala- ja ülekaaluliste soolestiku mikroobikooslus erineb normaalkaaluliste omast. Ülekaaluliste mikrobiotas on suurenenud Firmicutes ja vähenenud Bacteroidetes hõimkonna tase ning suurenenud lühikese ahelaga rasvhapete (SCFA) tootlus, mis viitab suuremale substraadi tarbimisele ja energiatootlusele fermentatsioonil. Alakaalulistes on SCFA tootlus ning firmikuutide tase aga alanenud võrreldes tavakaalus olevate inimestega. (Rinninella et al., 2019)

Mikroobikoosluse varieerumist mõjutab ka peremeesorganismi geneetiline taust. Goodrich et al. tehtud uuringus inimese geenide ning soolemikrobiota vahelistest seostest leiti, et identsetel kaksikutel on korrelatsioon taksonite arvukuse vahel tugevam kui kahemunakaksikutel. Lisaks leiti, et kõige enam pärilik oli *Christensenellaceae* perekond ning keskkonnategurid kujundavad peamiselt Bacteroidetes hõimkonda, olles sarnased kaksikutel vaid juhul kui ka toitumine oli sarnane. (Goodrich et al., 2014)



Geneetilisest taustast enam mõjutavad mikrobiota kujunemist keskkonnatingimused ning toitumisharjumused. Industrialiseerimine ning antibiootikumide tarbimine on viinud soolemikrobiota mitmekesisuse märkimisväärse vähenemiseni. Seda kinnitab Amazonase vihmametsas elava Yanomami põlisrahva soolestiku mikrobiota kõrge mitmekesisus võrreldes lääneriikidega (Makki et al., 2018). See-eest on nähtud, et antibiootikumidest suurem mõju on toitumisel, kuna piirkondades, kus on piiratud ligipääs antibiootikumidele, aga kus toitutakse mitterafineeritud toidust, on mikrobiota mitmekülgsem kui industrialiseerunud lääneriikides (Makki et al., 2018).

### 1.3 Olulised soolebakterid

Inimese soolebakteritest domineerivad Firmicutes ja Bacteroidetes hõimkonnad (Rinninella et al., 2019), millest omakorda omavad suuremat rolli erinevad perekonnad, mille osakaal erineb indiviiditi. Olenemata neist erinevustest võib koosluste funktsioneerimine ja panus inimese tervisele olla võrreldav. Firmicutes hõimkonnast on olulised esindajad *Faecalibacterium*, *Roseburia* ja *Blautia* perekonnad. Bacteroidetes hõimkonnast domineerivad peamiselt *Prevotella* või *Bacteroides* perekonnad.

Firmicutes hõimkonda kuuluva *Faecalibacteriumi* perekonna ainus seni kirjeldatud liik *F. prausnitzii* on üks arvukamaid baktereid inimese soolestikus, moodustades keskmiselt 5 % fekaali mikrobiotast (Parsaei et al., 2021). *F. prausnitzii* on atsetaati tarbiv butüraaditootja, kes omab olulist rolli immunomodulatsioonis, tootes põletikuvastaseid bioaktiivseid aineid, mistõttu on *F. prausnitzii* osakaalu vähenemist seostatud mitmete põletikuliste haigustega (Parsaei et al., 2021). *F. prausnitzii* kasvu toetav pH vahemik on pH 5,7-6,7, rangelt anaeroobne keskkond ning madal sapisoolade kontsentratsioon, alla 0,5 % wt/vol (Lopez-Siles et al., 2017). Kasutades butüraadi tootmisel substraadina atsetaati, sõltub *F. prausnitzii* teistest atsetaati tootvatest bakteritest nagu *Bacteroides*, esinedes seetõttu nendega sageli soolestikus koos (Lopez-Siles et al., 2017).

*Roseburia* on Firmicutes hõimkonda kuuluv perekond, millest on kõige enam kirjeldatud viite liiki (*Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis*, *Roseburia inulinivorans*, *Roseburia faecis*, ja *Roseburia cecicola*), millest *R. intestinalis* koos *F. prausnitzii*-ga on inimese soolestikus kõige arvukamad butüraaditootjad kiudainete fermentatsioonis (Kai et al., 2021). *Roseburia* perekonna bakterid on aga kõik võimelised tootma nii butüraati kui ka atsetaati ja propionaati (Kai et al., 2021). *R. intestinalis* on üks arvukamaid baktereid seedetrakti mikrobiotas, moodustades 0,9-5 % kogu populatsioonist. See on oluline bakter ainevahetuse reguleerimises, immuunsüsteemi aktiveerimises ning soolebarjääri säilitamises (Kai et al., 2021). *Roseburia* vajab kasvuks ning butüraadi tootmiseks happelisemat pH-d (pH 5,5-6,7) (Ilhan et al., 2017).

*Blautia*, eelnevalt arvatud *Ruminococcus* liikide hulka, on perekond Firmicutes hõimkonnas ning Lachnospiracea sugukonnas, mida kirjeldati esimest korda 2008. aastal ning mille liigiline mitmekesisus on siiani suures osas teadmata (Maturana & Cárdenas, 2021). *Blautia* liigid on ühed arvukamad inimese sooles, moodustades 2-8 % kogu soolestiku mikrobiotast ning kuuludes 10 arvukama perekonna hulka (Maturana & Cárdenas, 2021). Erinevad *Blautia* liigid on võimelised kasutama energiaallikana inimese poolt seedumatuid süsivesikuid, suhkruid ning gaase (H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) ja

tootma atsetaati (Liu et al., s.a.). Optimaalsed tingimused *Blautia* kasvuks on 37°C ning pH 7,0 (Liu et al., s.a.). *Blautia* funktsioon peremeesorganismi tervises pole täielikult selge, aga peamine tähtsus seisneb *Blautia* probiootilistes omadustes ning tema osakaalu vähenemist on seostatud mitmete tervisehäirete ja haigustega nagu diabeet, rasvumine ja pärasoolevähk (Liu et al., s.a.).

*Prevotella* on Bacteroidetes hõimkonda kuuluv perekond, mille suurim teadaolev esindaja on *Prevotella copri* (Yeoh et al., 2022). *P. copri* esineb hinnanguliselt 95,4 % mitte-lääneliku elustiiliga (värskete puu- ja köögiviljaderikka toitumisega) inimeste soolestikus ning 29,6 % lääneliku elustiiliga (rafineeritud toidu, loomsete valkude ja lipiidide rikka toitumisega) inimeste soolestikus (Tett et al., 2019). Bacteroidetes hõimkonnast on indiviidide soole mikrobiotas *Prevotella* ning *Bacteroides* perekonnad omavahel negatiivses korrelatsioonis, olles domineeritud esimese poolt kiudaineterikka dieedi puhul, *Bacteroidese* poolt aga loomsete valkude ja lipiidide rikka dieedi puhul (Precup & Vodnar, 2019). Kuigi *Prevotella* arvukus on seotud tervisliku eluviisiga, on leitud, et osadel liikidel on tervist toetav mõju ning osadel kahjustav. Positiivset mõju on leitud südame ja veresoonekonna haiguste ennetamisel ja glükoosi metabolismi parandamisel, aga negatiivset mõju põletikuliste haiguste soodustamisel (Precup & Vodnar, 2019). *Prevotella* positiivne mõju seisneb ka võimel lagundada kiudaineid väiksemateks molekulideks ning propionaadi tootmises, millel on oluline roll lipiidide metabolismis ning rasvumise ennetamises (Precup & Vodnar, 2019). Tõenäoliselt sõltub bakterite tervisele kasulik osakaal kogu koosluse profiilist ja kõik suured äärmused viitavad düsbioosile.

Bacteroidetes hõimkonna teine domineeriv perekond on *Bacteroides*, millel on oluline roll kõrgmolekulaarsete polüsahhariide lagundamisel väiksemateks molekulideks, mida teised bakterid saavad energiaallikana kasutada ning nendest peremeesorganismi tervisele olulisi metaboliite toota (Cheng et al., 2022). *Bacteroidese* poolt toodetud peamisteks metaboliitideks on atsetaat ning suksinaat (Ikeyama et al., 2020). *Bacteroides* perekonna peamisteks esindajateks on *B. vulgatus*, *B. caccae*, *B. uniformis* and *B. thetaiotaomicron* (Cheng et al., 2022). Sõltuvalt pikaajalistest toitumisharjumustest domineerib Bacteroidetes hõimkonnast inimese soolestikus kas *Bactroides* või *Prevotella* ning sellest sõltuvalt on mikrobiota võime kiudaineid fermenteerida ning metaboliite toota erinev. Mikrobiota, kus domineerib *Prevotella*, on SCFA-de ning eriti propionaadi tootlus suurem, viidates kiudainete rikkale dieedile ning suuremale kiudainete lagundamise võimele (Chen et al., 2017).

#### 1.4 Toidu mõju soolestiku mikrobiotale

Soolestiku mikrobikooslust määravatest teguritest on toitumine kõige lihtsam vahend mikrobiota mõjutamiseks tervislikul eesmärgil. Olenevalt sellest, millises koguses tarbitakse loomseid valke ja rasvu võrreldes süsivesikute ja taimsete toitudega, kujunevad ka enterotüübid. Industrialiseerunud ja linnastunud populatsioonis, kus tarbitakse rohkem loomseid valke ja lihtsuhkruid, on valdavaks enterotüübiks pigem *Bacteroides* ning mitte-industrialiseerunud maapiirkonnas, kus tarbitakse rohkem taimset toitu ja kiudaineid, on valdavaks enterotüübiks pigem *Prevotella* (Makki et al., 2018). De Filippo et al. võrdlev uuring Burkina Faso maapiirkonna ning Itaalia linnapiirkonna lastega näitas, et toitumisharjumuste erinevuse tõttu nendes piirkondades domineeris Burkina Faso laste soolemikrobiotas Bacteroidetes hõimkond, sh suurenenud *Prevotella* ning *Xylanibacter*

osakaaluga, kui Itaalia lastes domineeris Firmicutes hõimkond (De Filippo et al., 2017). Maapiirkonna laste fekaaliproovides oli ka suurem lühikese ahelaga rasvhapete sisaldus, viidates sellele, et nende mikrobiota oli kohastunud lagundama kiudaineid, kui linnapiirkonna laste mikrobiota pigem lipiide ja loomseid valke.

Wu et al. analüüsis pikaajaliste toitumismustrite mõju soolestiku mikrobiota enterotüüpidele. Selleks, et võrrelda pika- ja lühiajaliste toitumismustrite mõju, viidi läbi ristlõikeuuring ning sekkumisuuring. Ristlõikeuuringus võrreldi 98 indiviidi fekaaliproovide mikrobioomi andmeid *recall* ning toidu tarbimise sagedusküsimustiku andmetega ning sekkumisuuringus uuriti 10 indiviidi mikrobioomiandmeid kontrollitud toitumisega 10 päeva jooksul. Tulemustest selgus, et ristlõikeuuringus määras indiviidide enterotüübi pikaajalised toitumisharjumused ning kuigi sekkumisuuringus olid mikrobioomi muutused kiired, esinedes juba 24h jooksul, siis nende ulatus polnud piisav enterotüübi täielikuks muutmiseks. (Wu et al., 2011)

### **1.4.1 Kiudainete roll soolestiku mikrobiota funktsioonis**

Soolestiku mikrobiota mitmekesisus ning funktsionaalsus sõltuvad suurel määral sellest, millised toidukomponendid jõuavad edasiseks fermentatsiooniks jämesoolde. Kiudained on toitained, mida inimese enda ensüümid ei suuda lagundada, aga mille jaoks on olemas ensüümid soolestikku koloniseerivatel bakteritel. Soolebakterid toodavad kiudainetest peremeesorganismile kasulikke ühendeid, mis on soole epiteelirakkudele täiendavaks energiaallikaks ning langetavad soolesisu pH-d, aktiveerivad immuunsüsteemi ja on seotud söögiisu vähendamise ning glükoosi ainevahetusega (Fan & Pedersen, 2021). Lääneriikide industrialiseerumisega laialt kasutusele tulnud rafineeritud ning kiudainete ja mikrotoitainetevaene toit on aga põhjustanud olulist soolestiku mikrobiota liigilise mitmekesisuse vähenemist ning on seotud mitmete krooniliste haigusseisunditega nagu põletikuline soolehaigus, rasvumine, II tüüpi diabeet ja metaboolne sündroom (Cronin et al., 2021). Seetõttu on kiudainerikka toidu tarbimisel oluline roll organismi ning eelkõige sooletervise tagamisel.

### **1.4.2 Kiudainete jaotamine ja omadused**

Codex Alimentariuse põhjal on kiudained peensooles mitteseeduvad erineva polümerisatsiooniastmega süsivesikud, mis koosnevad kolmest või enamast monomeerist ning mille üheks või enamaks omaduseks on suurendada väljaheite mahtu, kiirendada seedimist, stimuleerida jämesooles fermentatsiooni, vähendada vere üld- ja/või LDL-kolesterooli sisaldust või reguleerida söömisjärgset glükoosi ja/või insuliini kõikumisi veres (Motarjemi, 1991).

Kiudained jaotuvad sõltuvalt nende omadustest polüsahhariidideks (mitte-tärgliselised polüsahhariidid ( $\geq 10$  monomeeri), resistentsed tärgliselised ( $\geq 10$  monomeeri), resistentsed oligosahhariidid (3-9 monomeeri) või vees lahustuvateks ja lahustumatuteks kiudaineteks (Makki et al., 2018). Kiudained eristuvad veel sõltuvalt viskoossuse astmest seedetraktis, fermentatsioonikiirusest ja toodetud SCFA profiilist ning väljaheite mahu suurendamise määra (Stephen et al., 2017). Sõltuvalt kiudaine struktuurist, koostisest ning veeslahustuvusest on neil ka

erinevad funktsioonid inimese kehas ning nende degradeerimiseks ja fermenteerimiseks spetsiifilised bakterid (Adamberg et al., 2018).

Vees lahustuvaid kiudaineid fermenteeritakse soolebakterite poolt, tootes nendest erinevaid organismile vajalikke ühendeid, ning olenevalt fermentatsiooni ulatustest panustavad nad ka väljaheite mahu suurendamisesse allesjäänud kiudainete ning suurenenud mikroobide massi kaudu (Makki et al., 2018; Pitsi, *et al.*, 2017). Vees lahustuvusest tulenevalt on kasutusele võetud ka termin mikrobiotale kättesaadavad süsivesikud (inglise keeles *microbiota-accessible carbohydrate* ehk MAC), kust on välja arvatud lahustumatud kiudained (Cronin et al., 2021). Vees lahustuvate kiudainete hulka kuuluvad resistentsed oligosahhariidid (nt inuliin, oligofruktoos ja -galaktoos) ning sõltuvalt monomeeride arvust ning polümeeri ahela struktuurist ja koostisest mitte-tähtsused polüsahhariidid (nt pektiinid, psüllium,  $\beta$ -glükaan, guarakummi) (Stephen et al., 2017). Enamus veelahustuvatest mitte-tähtsused oligosahhariididest võivad soolestikus moodustada geeljaid struktuure ning vähendada difusiooni, aeglustades glükoosi ja lipiidide imendumist ning ensümaatilist hüdrolyüsi ning vähendades söömisjärgset veresuhkru ning vere lipiidide kiiret tõusu või kõikumist (Makki et al., 2018).

Vees lahustumatud kiudained omavad väljaheite mahtu suurendavat efekti, olles ahela struktuuri poolest väheste hargnemistega ning moodustades energiliselt soodsaimaid kristallilisi struktuure molekulide vahel võrreldes lahustunud olekuga, mistõttu on fermentatsioon keeruline ning kiudained väljuvad soolestikust väljaheite kaudu peamiselt muutumatul kujul (Dhingra et al., 2012). Väljaheite massi suurenemisega väheneb kõhukinnisus ning käärsoolevähi tekke risk (Pitsi, *et al.*, 2017). Vees lahustumatud kiudained on resistentsed tähtsused ning teatud hulk mitte-tähtsused polüsahhariidid (nt ligniin, tselluloos, osa hemitselluloose) (Stephen et al., 2017).

### 1.4.3 Kiudainete vajadus ning allikad

Eesti 2015. aasta toitumissoovitustes on soovituslikuks kiudainete päevaseks tarbimiskoguseks täiskasvanutele naistele vähemalt 25 g ja meestele vähemalt 35 g ehk ligikaudu 13 g 1000 kcal kohta (Pitsi, *et al.*, 2017). Alates üheaastastele lastele on ligikaudselt arvatav vanus + 7 g päevas ning alates kaheaastastele lastele on soovituslikuks päevaseks tarbimiskoguseks 8-13 g 1000 kcal kohta (Pitsi, *et al.*, 2017). Päevasest koguenergiast peaksid kiudained moodustama 3 %E (Pitsi, *et al.*, 2017). Keskmine industrialiseerinud ühiskonna kodanik tarbib aga päevas kiudaineid soovituslikust kogusest vähem. Euroopas on meeste keskmine kiudainete päevane tarbimiskogus vahemikus 18-24 g ning naistel 16-20 g (Stephen et al., 2017).

Looduslikult sisaldub kiudaineid teraviljatoodetes, millest enim täisteratoodetes, puu- ja köögiviljades, millest enim kaunviljades, ning marjades (Pitsi, *et al.*, 2017). Tavapärasel lääneühiskonna dieedis on kiudainete peamisteks allikateks teraviljad või teraviljatooted (32-49%), seejärel puuviljad (8-23 %), köögiviljad (12-21 %) ja kartulid (6-19 %) (Stephen et al., 2017). Euroopa Liidu määruse nr 1924/2006 kohaselt saab toiduainet nimetada kiudaine allikaks, kui see sisaldab vähemalt 3 g kiudaineid 100 g kohta või 1,5 g kiudaineid 100 kcal kohta ning suure

kiudainesisaldusega toiduaineks, kui see sisaldab vähemalt 6 g kiudaineid 100 g kohta või 3 g kiudaineid 100 kcal kohta.

Teatud kiudained ei sisaldu kõigis kiudainerikastes toitudes. Resistentset tärklis leidub ainult tärkliserikastes toiduainetes nagu tera-, kaun- ning mugulviljades ja toorestes puuviljades, pektiini peamiselt puuviljades ning ka köögiviljades ja marjades,  $\beta$ -glükaani ning arabinoksülaani teraviljades nagu kaer ja oder (Makki et al., 2018; Pitsi, et al., 2017). Kiudaineid sisaldavates toiduainetes on üldjuhul kolmandik kiudainetest vees lahustuvad ning kaks kolmandikku lahustumatud (Lattimer & Haub, 2010). Näiteks kaeras on kiudaineid 10,3 g/100g, millest 6,5 g on lahustumatud ning 3,8 g lahustuvad kiudained, toretes valgetes ubades on kiudaineid 17,7 g/100g, millest 13,4 g on lahustumatud ning 4,3 g lahustuvad kiudained ja kiivis on kiudaineid 3,39 g/100g, millest 2,61 g on lahustumatud ning 0,8 g lahustuvad kiudained (Dhingra et al., 2012).

#### **1.4.4 Kiudainete fermentatsiooniproduktid**

Peamisteks kiudainete bakteriaalse fermentatsiooni produktideks on lühikese ahelaga rasvhapped äädikhape (ioonina atsetaat), propaanhape (propionaat) ning võihape (butüraat) (Makki et al., 2018). Tänu nende orgaaniliste hapete tootmisele alaneb jämesoole pH, mis inhibeerib kantserogeensete sapisoolade metaboliitide teket (Pitsi, et al., 2017) ning tõuseb soole epiteeli lima ning antimikroobsete peptiidide tootlus, toetades immuunsüsteemi funktsioneerimist (Makki et al., 2018).

Lühikese ahelaga rasvhapetel on erinevad funktsioonid ning neid toodavad või kasutavad substraadina erinevad bakterid. Butüraat on jämesoole epiteelirakkude peamiseks energiaallikaks ning omab tähtsat rolli soolestiku tervise tagamisel ning kolorektaalvähi ja koliidi ennetamisel, osaledes rakujagunemise ja apoptoosi reguleerimises ning ka antimikroobsete peptiidide tootmise indutseerimises (LaBouyer et al., 2022; Pitsi, et al., 2017). SCFA-d leiduvad peamiselt jämesooles, aga neid sisaldub ka perifeerses vereringes ja maos, kus nad käituvad signaalimolekulidena ning osalevad erinevates bioloogilistes protsessides (Makki et al., 2018). Butüraat, atsetaat ning propionaat võivad käituda signaalimolekulidena, seostudes G-valguga seotud retseptoritega, et aktiveerida suuremat energiakasutust, alanenud söögiisu ning tõsta glükoosi metabolismi ja insuliini sekretsiooni (Fan & Pedersen, 2021). Butüraat aktiveerib hapnikutarbimist, tagades anaeroobsetele bakteritele optimaalse kasvukeskkonna seedetrakti luumenis (Fan & Pedersen, 2021).

Kiudainete fermentatsiooni ulatus võib varieeruda sõltuvalt soolestiku mikrobioloogilisest koostisest, kiudainete tüübist ja keskkonnatingimustest, mistõttu võib muutuda SCFA-de tootmiskiirus ning kogus (LaBouyer et al., 2022). Lisaks mängib rolli rist-toitumise (*cross-feeding*) mehhanism, mille käigus ühe metaboliidi tootjad toituvad ise teisest metaboliidist, näiteks butüraati tootvad bakterid on atsetaadi tarbijad, mistõttu toimub ühe metaboliidi muundamine teiseks (LaBouyer et al., 2022). Mõõtes väljaheites sisalduvat SCFA-de kontsentratsiooni, on võimalik hinnata tasakaalu tootmishulga ning imendumiskiiruse vahel ning soole läbimise aja mõju imendumisele (LaBouyer et al., 2022).

## 2 Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö eesmärgid olid järgmised:

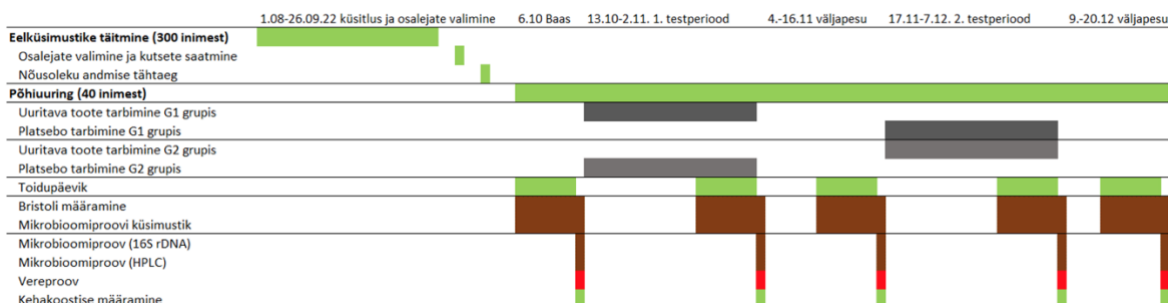
- Kiudainerikka smuuti toitumisuuringu fekaaliproovide ettevalmistus analüüsiks, pH määramine.
- Bakterikoosluste ja orgaaniliste hapete andmete analüüsimine ja seoste leidmine bakterite ja metaboliitide vahel.
- Bakterikoosluste, metaboliitide ning pH muutumise kaardistamine fekaaliproovides kiudainetega rikastatud smuuti tarbimisel.

## 3 Meetodid

### 3.1 Toitumisuuring

Toitumisuuring viidi läbi TFTAK-i projektina 2022 aastal (PRIA projekt Number: 616219790087). Antud bakalaureusetöös analüüsiti uuringuproove. Uuring algas uuritavate kaasamisega toitumisuuringusse kriteeriumite alusel, milleks kandideerijad täitsid ära eelküsimumstiku antropomeetriliste näitajate (kehamass, pikkus jm), tervisliku seisundi (haiguste olemasolu, seedetalitlust iseloomustavad näitajad jm) ja liikumis- ning söömisharjumuste kohta. Inimeste kaasamisel oli olulisteks välistuskriteeriumiteks, et viimase kolme kuu jooksul ei ole tarbitud antibiootikume, ei ole viibitud troopilistes maades ning uuritav ei esinda toitumisäärmusi ega ole äärmuslikul dieedil nagu keto- või paleodieedil. Eesmärgiks oli kaasata inimesi, kellel on seedetalitusega probleeme ning kellel on väljaheite Bristol skoor < 3, et kaardistada kiudaineterikka toidu mõju seedetalitusele. Uuringusse kaasati 41 inimest vanusevahemikus 23-52 (keskmine vanus 36,7). Metaboliitide analüüsis kasutatavaid fekaaliproove andis 28 inimest.

Uuringus anti juhusliku jaotuse alusel (*randomized cross-over design*) kaheks võrdse suurusega grupiks jaotunud osalejatele vahelduvate perioodidega kiudainerikast osaliselt hüdrolüüsitud õunapressijäägiga rikastatud smuutit, nn testsmuutit (400 g smuutit päevas, milles sisaldus 11,6 g kiudaineid) ning tärglisepõhist platseebosmuutit (400 g smuutit päevas, milles sisaldus 4,8 g kiudaineid). Esimeses grupis sõid uuritavad esimesel perioodil testtoodet ja teisel platseebotoodet ning teises uuringugrupis vastupidi. Joonisel 1 on näha toitumisuuringu skeem.



Joonis 1. Toitumisuuringu skeem. Kõigepealt täitsid toitumisuuringusse kaasatud inimesed ühe nädala jooksul toidupäevikut ja seedetalitluse küsimustikku, mis lõppes vere- ja mikrobioomiproovide andmisega. Algsete söömisharjumuste kaardistamise nädalale järgnes 3-nädala pikkune 1. uuringuperiood, mille jooksul uuringugrupp 1 tarbis igapäevasele toidule lisaks kiudainerikast testtoodet ja uuringugrupp 2 platseebotoodet nii, et päevane kaloraaz ei muutunud. Perioodi lõpus analüüsiti uuesti ära ühe nädala toitumine ning viimasel päeva võeti mikrobioomi- ja vereproovid. Kahe uuringuperioodi vahel oli 2-nädala pikkune väljapesuperiood, mille ajal uuritavad ei söönud ei testtoodet ega platseebotoodet. Perioodi lõpus võeti samad proovid, mis esimese perioodi lõpus. Uuringu 2. perioodi ülesehitus oli sama mis esimesel perioodil, kuid uuringugrupp 1 tarbis sel ajal platseebotoodet ja grupp 2 testtoodet. (Joonise autor: Kaarel Adamberg)

### 3.2 Fekaaliproovide kogumine ja proovide ettevalmistus analüüsiks

Uuringus osalejad pidid iga perioodi lõpus tooma TFTAK laborisse roojaproovi, mille võtmiseks kasutati lusikaga roojatopsi. Proovid hoiustati kuni üleandmiseni külmakehaga karbis (Sarstedt, Saksamaa), laboris hoiustati proove -80 °C juures kuni proovide ettevalmistamiseni DNA ja metaboliitide analüüsiks. Proovide ettevalmistus viidi läbi anaeroobses kambris Concept 500 (Baker Ruskinn UK), kus fekaaliproovid sulatati ning jaotati osadeks. Metaboliitide ja pH analüüsiks võeti ligikaudu 0,2 g ning sekveneerimisanalüüsiks võeti ligikaudu 0,1 g proovi. Säilituskultuuri saamiseks lisati allesjäänud proovile puhverlahust (fosfaat-puhverdatud füsioloogiline lahus (PBS) + 5 % dimetüülsulfoksiid (DMSO), 1-10 ml proovi kohta) ning hoiustati -80 °C juures.

### 3.3 Sekveneerimisanalüüsid

Mikrobioota koostis määrati 16S rRNA piirkonna sekveneerimisega TFTAK laboris. Proovidest ekstraheeriti DNA ja teostati PCR 16S rRNA geenide V4 hüpervarieeruvate piirkondade amplifitseerimiseks kasutades universaalsed praimerid: F515 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' and R806 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'. Raamatukogud valmistati Nextera XT DNA Library Preparation Kit v2 (Illumina) abil ning need kvantifitseeriti Qubit™ dsDNA HS Assay Kit abil (kvantifitseerimisvahemik 0,2–100 ng; Thermo Fisher Scientific) vastavalt tootja juhiste. Liidetud raamatukogud järjestati Illumina MiSeq 2x250 v2 platvormi abil. Amplifitseeritud piirkond oli 390–410 aluspaari pikk ja keskmine identifitseeritud järjestuste arv proovi kohta 16597. DNA järjestuse andmeid analüüsiti programmi BION-meta abil ([www.box.com/bion](http://www.box.com/bion)) vastavalt autorite juhiste.

### 3.4 Metaboliitide ja pH analüüs

Metaboliitide ja pH määramiseks sulatati fekaaliproov ja jaotati osadeks. Ligikaudu 0,2 g proovi lahjendati destilleeritud veega viis korda, tsentrifugeeriti 1000 g/ 2 – 3 min ja määrati supernatandi pH pH-meetriga Mettler Toledo, MP125 (Šveits), kasutades elektroodi InLab Pro (Mettler Toledo, Šveits). pH-meetrit kalibreeriti puhvritega pH 4,01 ja 7,0.

Metaboliitide (orgaanilised happed, etanool, suhkrud) analüüsiks filtreeriti 5x lahjendatud ja fuugitud proov läbi 3 kDa filtri vastavalt tootja juhendile (cut-off filtrid Amicon Ultra 3K (Millipore, UK)). Proove säilitati kuni analüüsimiseni -20 C juures.

Metaboliitide määramine HPLC-ga viidi läbi TFTAK laboris. Orgaaniliste hapete (atsetaat, propionaat, butüraat, formiaat, laktaat, suktsinaat, valeraat, isobutüraat ja isovaleraat) andmed saadi kõrgsurve-vedelikkromatograafia (HPLC; Alliance 2795 systems; Waters), kasutades isokraatset elueerimist 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga, voolukiirusel 0,5 ml/min. Ainete lahutamiseks kasutati BioRad HPX87H kolonni (Hercules, USA) temperatuuril 35°C. Ainete identifitseerimiseks ja kvantifitseerimiseks kasutati refraktiivindeksi- (RI; mudel 2414, Waters) detektorit. Detekteerimispiir oli 0,1 mM. Piikide analüüsiks kasutati Empower tarkvara (Waters), kasutades kvantifitseerimiseks välist standardit (standardid olid olemas kõikidele ülal mainitud ühenditele).



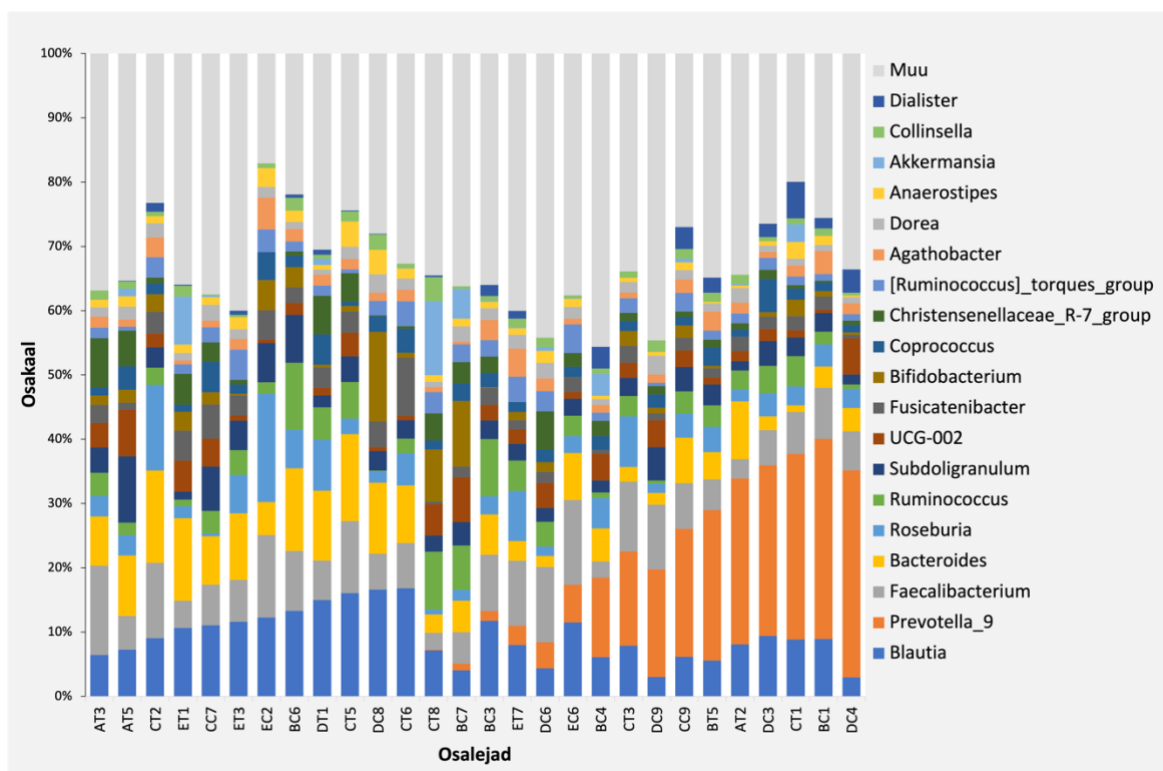
### 3.5 Statistiline analüüs

Andmeanalüüs viidi läbi programmis Excel. Andmeanalüüsiks kasutati metaboliitide andmeid ning bakterite andmetest sorteeriti välja osakaalud, mis olid suuremad kui määramisviga ( $<0,0005$ ). Andmete vähendamiseks valiti analüüsimiseks enamlevinud ja suurema osakaaluga perekonnad. Pektiiniga rikastatud smuuti mõju uurimiseks võrreldi pH, hapete ja bakterite muutuseid enne ja peale smuuti tarbimist. Statistilise olulisuse määramiseks võrreldi bakterite ja hapete sisaldust enne ja peale smuuti tarbimist, kasutades paari t-testi. Oluliste muutuste selekteerimisel bakteriperekondade osakaalus arvestati sellega, et perekonna osakaal koosluses pidi olema suurem kui 0,1 %. pH ja hapete vaheliste seoste leidmiseks leiti *spearmani* korrelatsioonid väärtusega, mis olid suuremad kui 0,3. Statistiliselt oluliseks korrelatsiooniks loeti väärtused, mille puhul  $p < 0,05$ .

## 4 Tulemused

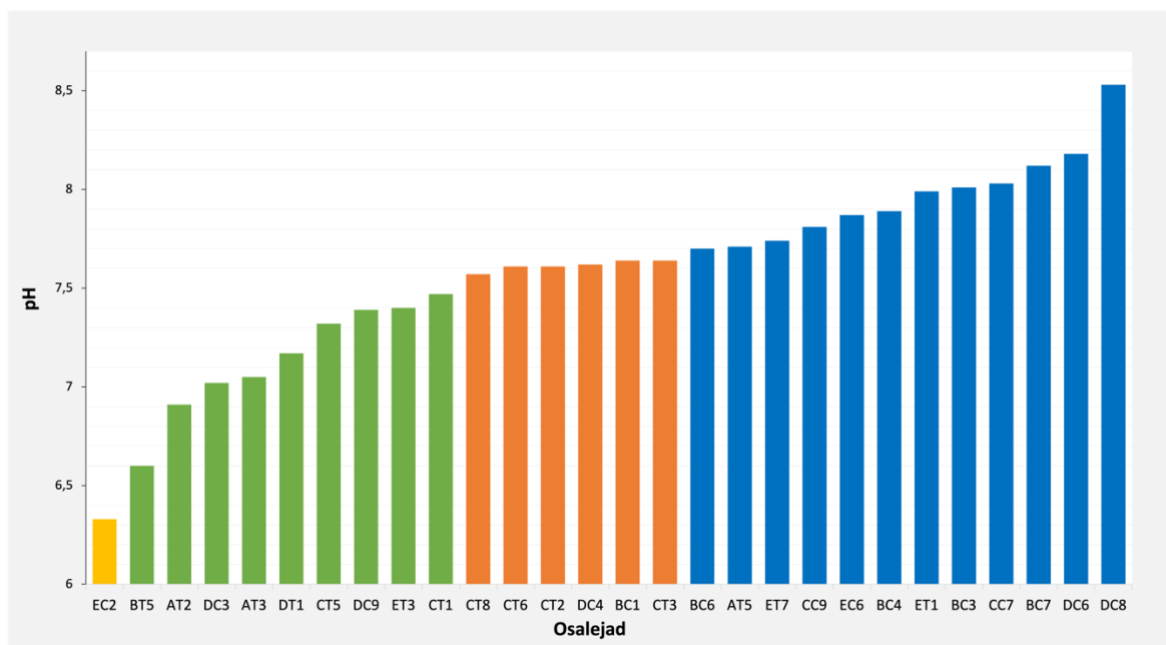
### 4.1 Väljaheiteproovide mikroobne koostis ja pH baasperioodil

Uuringus osalejate fekaaliproovide mikrobiomianalüüs näitas individuaalset soolekooslust. 28 osaleja proovidest tuvastati kokku 109 taksonit, mille osakaal koosluses oli suurem kui 0,1 %. Proovides domineeriva osakaaluga taksoniteks olid *Prevotella 9*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Christensenellaceae R-7 group*, *Akkermansia*, *Dialister* ning igas proovis esinenud domineerivateks taksoniteks olid *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia*, *Subdoligranulum*, *UCG-002*, *Fusicatenibacter*, *Coprococcus*, *Ruminococcus torques group*, *Agathobacter*, *Dorea*, *Anaerostipes* ja *Collinsella* (joonis 2). Keskmiselt moodustasid 20 kõige arvukamat bakteriperekonda liiki 79% kõigist järjestustest. Individuaalseid proove saab eristada domineerivate perekondade järgi, milleks oli *Blautia*, *Prevotella 9*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia* või *Akkermansia*. Kuigi 19 domineerivast perekonnast 14 kuuluvad Firmicutes hõimkonda, oli Bacteroidetes hõimkonda kuuluv *Prevotella 9* kõige enamates proovides suurima osakaaluga perekond. Bacteroidetes hõimkonnast esinevad kõigis proovides veel *Bacteroides* perekonna liigid, mille osakaal on suurim vaid proovis CT2 (joonis 2). Firmicutes hõimkonnast on kõige enam esinev ja suurima osakaaluga perekond *Blautia*, seejärel *Faecalibacterium*. Proovis EC2 (joonis 2) oli domineerivaks Verrucomicrobia hõimkonnast pärinev *Akkermansia* perekond.



Joonis 2. Bakterite perekondade jaotus 28 analüüsitud väljaheiteproovis baasperioodil, millest 19 arvukamat on toodud välja nimeliselt. Perekondade esinemisjärjekord tulpades on sama, mis legendil.

Baasperiodi fekaaliproovides määrati pH ning hinnati, kas pH oli kõrge (>7,7), vahemikus 7,5 – 7,7, neutraalne (vahemikus 6,5-7,5) või madal (<6,5). Joonisel 3 on näha, et vaid ühe proovi pH (märgitud kollasega) oli madal, 9 proovil (märgitud rohelisega) neutraalne, 6 proovil vahemikus 7,5 – 7,7 (märgitud oranžiga) ning 12 proovil (märgitud sinisega) kõrge. Nendest madalaim tulemus oli 6,3, kõrgeim 8,5 ning tulemuste mediaan oli 7,6.

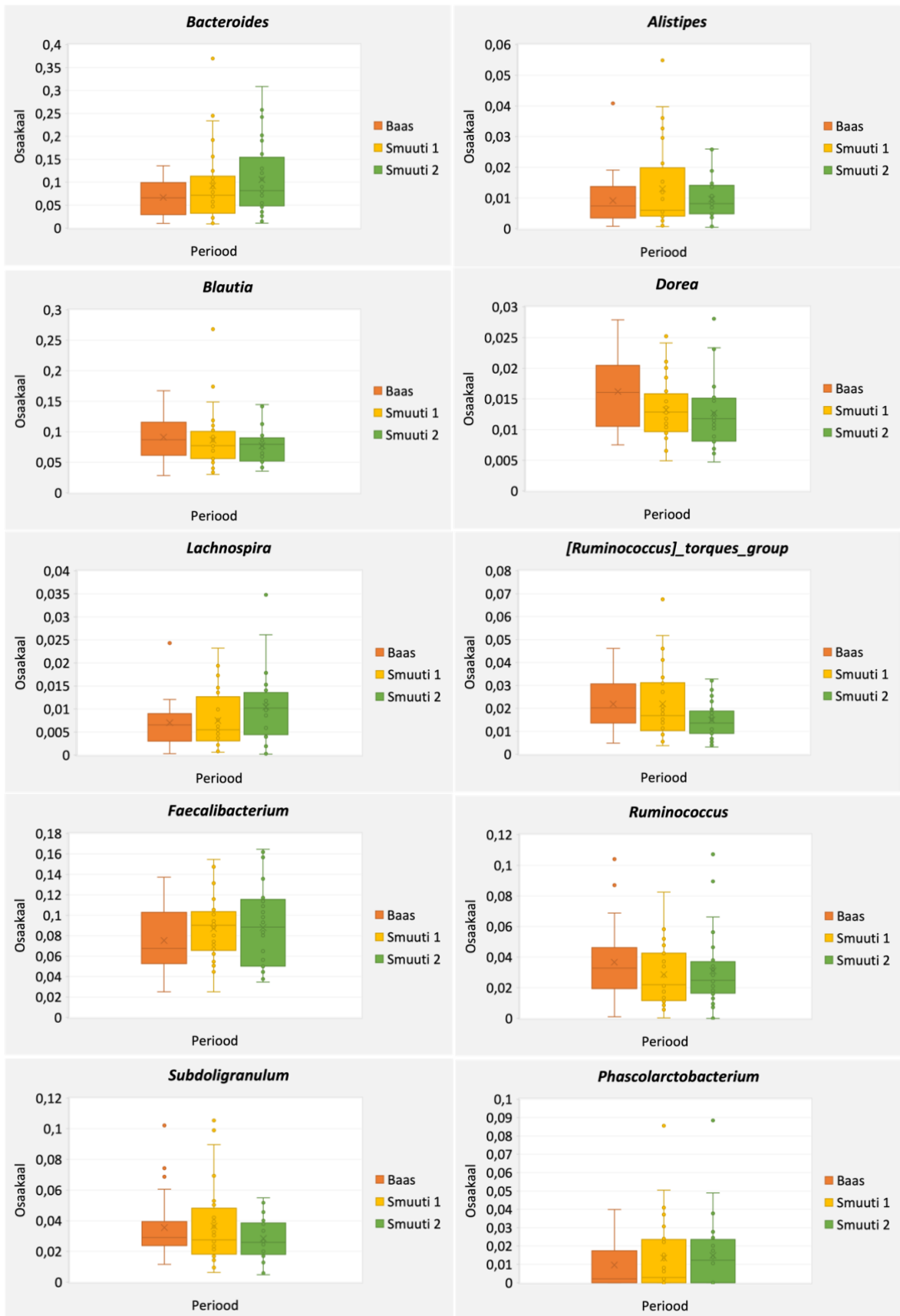


Joonis 3. Fekaaliproovide (n = 28) pH uuringu alguses. Kollasega on märgitud proov, mille pH < 6,5 ning rohelisega proovid vahemikus 6,5-7,5, oranžiga proovid vahemikus pH 7,5-7,7 ning sinisega proovid, mille pH > 7,7.

## 4.2 Smuuti mõju bakterikooslustele

Joonisel 4 on toodud 10 suurima osakaaluga bakterite perekonda, mille osakaaludes nähti perioodide vahel olulisi muutusi.

Võrreldes baasperiodiga toimusid tärgliserikka platseebosmuuti tarbimisel olulised muutused perekondade *Bacteroides*, *Alistipes*, *Dorea*, *Faecalibacterium* ja *Ruminococcus* osakaaludes. Kõigi nende bakterite hulgad muutusid samas suunas kui kiudainerikka smuuti tarbimise perioodil. Erandiks oli perekond *Alistipes*, mille puhul platseebosmuuti tõstis bakterite osakaalu, aga kiudainerikka smuuti mitte. Kiudainerikka smuuti tarbimisel suurenes fekaaliproovides perekondadesse *Bacteroides*, *Lachnospira*, *Faecalibacterium* ning *Phascolarctobacterium* kuuluvate bakterite osakaal. Kiudainerikka smuuti tarbimise tulemusel vähenes aga perekondadesse *Alistipes*, *Blautia*, *Dorea*, *Ruminococcus torques*, *Ruminococcus* ja *Subdoligranulum* kuuluvate bakterite osakaal soolekooslustes.

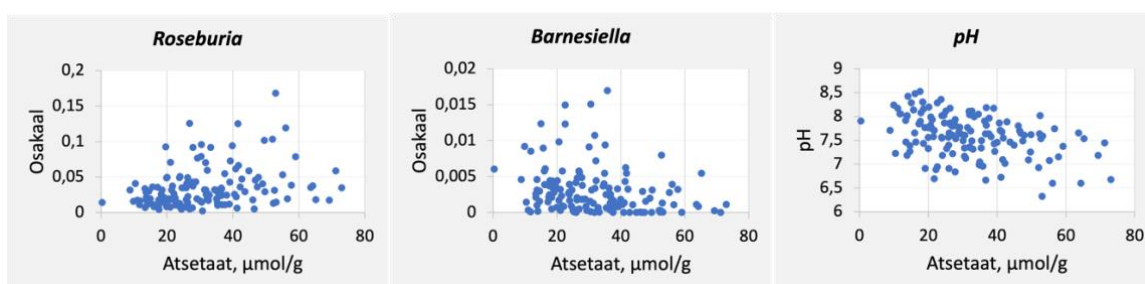


Joonis 4. Bakterite perekonnad, mille osakaalus väljahiteproovides toimus olulisi muutusi smuuti tarbimisel (igal perioodil oli proovide arv 28). Oranžiga on märgitud osakaal baasperioodil,

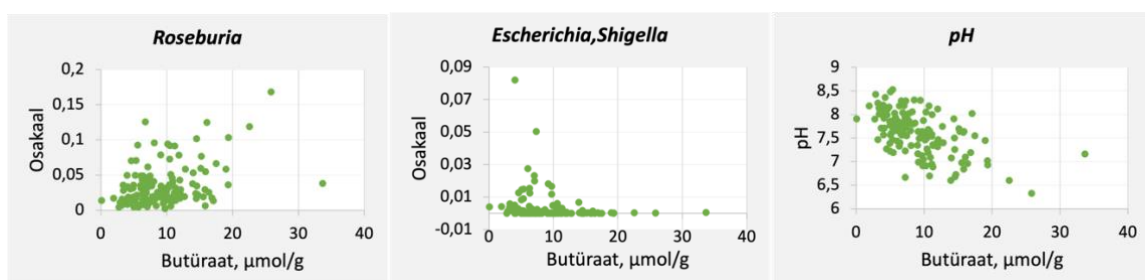
kollasega on märgitud osakaal pärast 3-nädalast platseebosmuuti tarbimist (400 g smuutit päevas, mis sisaldas 4,8 g kiudaineid) rohelisega on märgitud osakaal pärast 3-nädalast pektiinirikka smuuti tarbimist (400 g smuutit päevas, mis sisaldas 11,6 g kiudaineid).

### 4.3 Seosed bakterite, metaboliitide ning pH vahel

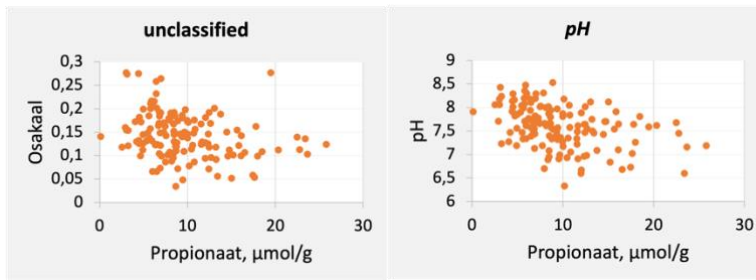
Joonistel 5-8 on välja toodud olulised korrelatsioonid ( $p < 0,05$ ) orgaaniliste hapete, pH ning valitud bakterite vahel. Atsetaadi hulk fekaaliproovides korreleerus positiivselt *Roseburia* osakaaluga ( $r = 0,320$ ), negatiivselt *Barnesiella* osakaaluga ( $r = -0,303$ ) ning pH-ga ( $r = -0,398$ ) (joonis 5). Butüraadi hulk korreleerus positiivselt *Roseburia* osakaaluga ( $r = 0,325$ ) ning negatiivselt *Escherichia-Shigella* osakaaluga ( $r = -0,301$ ) ja pH-ga ( $r = -0,546$ ) (joonis 6). Propionaadi hulk korreleerus negatiivselt *unclassified* bakteriperekondade osakaaluga ( $r = -0,310$ ) ning pH-ga ( $r = -0,433$ ) (joonis 7). Fekaaliproovide pH korreleerus positiivselt *Colidextribacter* ( $r = 0,308$ ) ja *Asteroleplasma* ( $r = 0,339$ ) perekonna bakterite osakaaluga (joonis 8). Seega toetab happelisem keskkond *Roseburia*, kuid inhibeerib *Barnesiella* ja *Escherichia/Shigella* kasvu. Kõrgem hapete sisaldus korreleerus madalama pH-ga, kõige tugevam oli seos butüraadi korral. pH korrelatsioon butüraadiga oli  $r = -0,546$ , propionaadiga  $r = -0,433$  ning atsetaadiga  $r = -0,40$  (joonised 5 – 8).



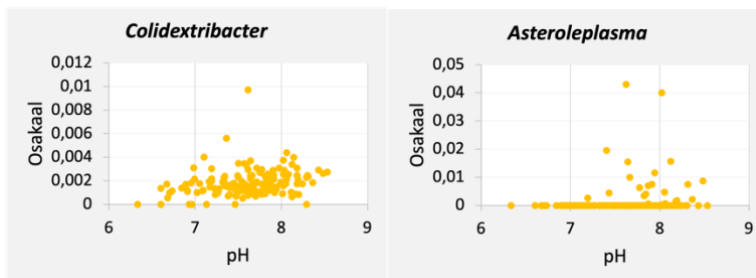
Joonis 5. Korrelatsioonid väljaheiteproovide atsetaadisisalduse ning *Roseburia* ja *Barnesiella* osakaalude ja pH vahel ( $n=140$ ). *Roseburia*:  $r = 0,320$ ,  $p < 0,001$ ; *Barnesiella*:  $r = -0,303$ ,  $p < 0,001$ ; pH:  $r = -0,398$ ,  $p < 0,001$ .



Joonis 6. Korrelatsioonid väljaheiteproovide butüraadisisalduse ning *Roseburia* ja *Escherichia-Shigella* osakaalude ja pH vahel ( $n=140$ ). *Roseburia*:  $r = 0,325$ ,  $p < 0,001$ ; *Escherichia-Shigella*:  $r = -0,302$ ,  $p < 0,001$ ; pH:  $r = -0,546$ ;  $p < 0,001$ .

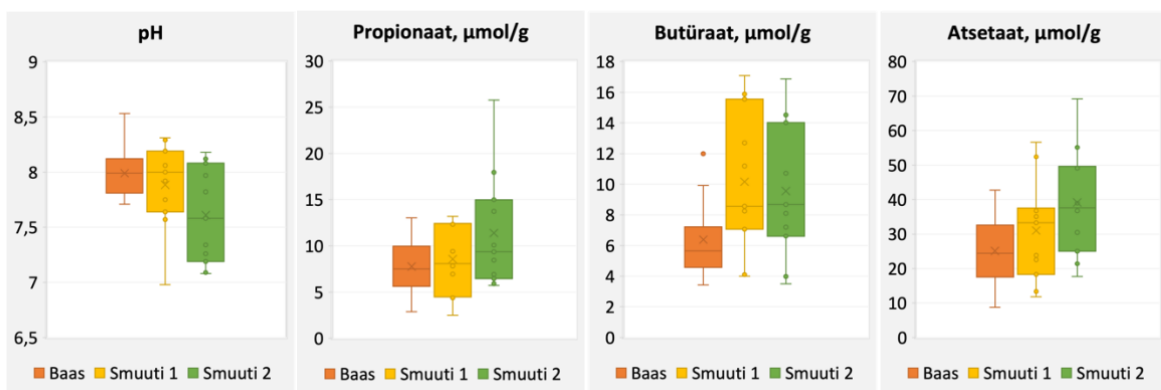


Joonis 7. Korrelatsioonid väljaheiteproovide propionaadisalduse ning unclassified bakteriperekondade osakaalude ja pH vahel (n=140). Unclassified:  $r = -0,310$ ,  $p < 0,001$ ; pH:  $r = -0,433$ ,  $p < 0,001$ .

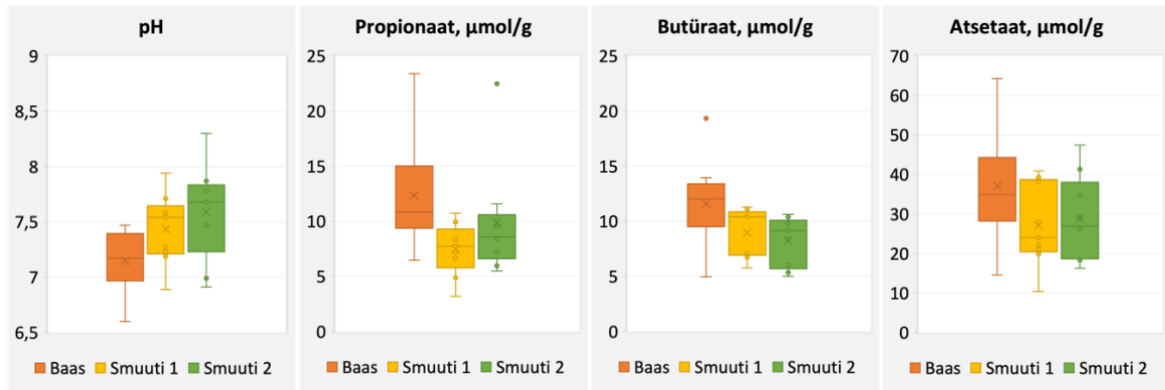


Joonis 8. Korrelatsioonid väljaheiteproovide pH ning Colidextribacter ja Asteroleplasma osakaalude vahel (n=140). Colidextribacter:  $r = 0,308$ ,  $p < 0,001$ ; Asteroleplasma:  $r = 0,339$ ,  $p < 0,001$ .

Hapete ja pH muutuste täpsemaks analüüsiks jaotati uuritavad baasperiоди fekaalse pH alusel gruppidesse. Eeldati, et algselt kõrge pH-ga uuritavatel on selgemalt näha kiudainerikka smuuti tarbimise mõju väljaheite pH-le ja hapete sisaldusele, mis ei ilmne nii selgelt normaalvahemikus pH puhul. Seetõttu võrreldi pH ja hapete muutust osalejate vahel, kelle baasproovi fekaalne pH oli suurem kui 7,7 nende osalejatega, kelle baasproovi pH oli vahemikus 6,5-7,5. Nende kahe grupi pH ning hapete muutused smuuti tarbimisel on toodud joonistel 9 ja 10. Kõrge pH-ga grupis toimusid muutused pH alanemise (keskmiselt kuni pH 7,6) ning kõigi kolme happe sisalduse tõusu suunas (joonis 9). Normaalse pH-ga grupis toimus smuuti tarbimise tulemusel pH tõus keskmiselt kuni 7,6-ni ning butüraadi sisalduse langus keskmiselt kuni 8,3 µmol/g-ni (joonis 10). Langes ka atsetaadi ning propionaadi sisaldus, aga need muutused polnud statistiliselt olulised. Nii hapete sisaldused kui ka pH-d kahe grupi vahel ühtlustusid kiudainete tarbimise tulemusena.



Joonis 9. Fekaaliproovide pH, atsetaadi, butüraadi ning propionaadi sisalduste muutused smuuti tarbimisel uuritavatel, kelle baasperiodi fekaaliproovi pH oli kõrgem kui 7,7 ( $n = 11$ ). Smuuti 1 proovid võeti pärast 3-nädalast platseebosmuuti tarbimist (400 g smuutit päevas, mis sisaldas 4,8 g kiudaineid). Smuuti 2 proovid võeti pärast 3-nädalast pektiinirikka smuuti tarbimist (400 g smuutit päevas, mis sisaldas 11,6 g kiudaineid). pH: (baas vs smuuti 2)  $p = 0,018$ ; atsetaat: (baas vs smuuti 2)  $p = 0,014$ ; butüraat: (baas vs smuuti 2)  $p = 0,024$ ; propionaat: (baas vs smuuti 2)  $p = 0,024$ .



Joonis 10. Fekaaliproovide pH, atsetaadi, butüraadi ning propionaadi sisalduste muutused smuuti tarbimisel uuritavatel, kelle baasperiodi fekaaliproovi pH oli vahemikus 6,5-7,5 ( $n = 9$ ). Smuuti 1 proovid võeti pärast 3-nädalast platseebosmuuti tarbimist (400 g smuutit päevas, mis sisaldas 4,8 g kiudaineid). Smuuti 2 proovid võeti pärast 3-nädalast pektiinirikka smuuti tarbimist (400 g smuutit päevas, mis sisaldas 11,6 g kiudaineid). pH: (baas vs smuuti 2)  $p = 0,035$ ; atsetaat: (baas vs smuuti 2)  $p = 0,13$ ; butüraat: (baas vs smuuti 2)  $p = 0,055$ ; propionaat: (baas vs smuuti 2)  $p = 0,3$ .

## 5 Arutelu

Soolebakterite kooslus on oluline inimese tervisele, mõjutades ainevahetust, immuunsüsteemi ja isegi aju tööd (Fan & Pedersen, 2021). Seedumatute kiudainete lagundajatena toodavad bakterid paljusid olulisi ainevahetusprodukte, millest enim uuritud on lühikese ahelaga rasvhapped (SCFA). On näidatud, et SCFA kõrgem osakaal sooles on iseloomulik madalama põletikuliste haiguste esinemissagedusele, kiiremale soole läbikäigule, paremale glükoosi ning lipiidide metabolismile ja normaalkaalule (Al Bander et al., 2020). Soolemikrobiota võime lagundada kiudaineid ning toodetud hapete hulk sõltuvad bakteriaalsest koostisest, mis on otseselt seotud toiduga, peamiselt kiudainete sisaldusega selles. Seetõttu on kiudainete sisalduse tõstmine toidus võtmetegur parema sooletervise tagamisel. Antud töös analüüsiti väljaheiteproovide bakterikooslusi, orgaaniliste hapete sisaldusi ja pH-d, et selgitada, kuidas mõjutab jämesoole kooslusi ja nende ainevahetust kiudainerikka smuuti tarbimine kolme nädalal jooksul.

### 5.1 Kiudainete mõju soolemikrobiotale

Kiudainete sisalduse tõstmine menüüs muutis fekaaliproovide bakterikooslust juba kolme nädalaga. Pektiinirikka smuuti tarbimisel suurenesid oluliselt perekondadesse *Bacteroides*, *Lachnospira*, *Faecalibacterium* ning *Phascolarctobacterium* kuuluvate bakterite osakaalud (joonis 4). *Lachnospira* ning *Faecalibacterium* perekondade osakaalu tõus võib tuleneda pektiini lagundavate liikide *Lachnospira pectinoschiza* ning *F. prausnitzii* kasvust (Bang et al., 2018; Flint et al., 2012). Pektiini lagundamist läbiviivad ensüümid on ka mitmed perekonna *Bacteroides* esindajatel (Flint et al., 2012). Fermentatsioonil toodetud atsetaat on substraadiks butüraati tootvatele bakteritele, mistõttu võib *Faecalibacteriumi* osakaalu veelgi suureneda kasutades atsetaati energiaallikana. Kuna *Bacteroides* võib süsivesikutest toota suktsinaati, siis võib vastava happe tarbijana olla *Phascolarctobacteriumi* osakaalu tõus seotud *Bacteroidese* kasvuga (Wu et al., 2017). See on oluline tulemus, sest suktsinaadi akumulatsioon soolestikus tekitab kõhulahtisust, aga *Phascolarctobacterium* kasutab seda substraadina, et toota peremeesorganismi tervist toetavat propionaati (Ikeyama et al., 2020).

Smuuti tarbimise tulemusel vähenes fekaaliproovides perekondadesse *Alistipes*, *Blautia*, *Dorea*, *Ruminococcus torques* group, *Ruminococcus* ja *Subdoligranulum* kuuluvate bakterite osakaal (joonis 4). Bang et al., (2018) *in vitro* katsetes uuriti pektiini mõju soolemikrobiotale ning leiti, et pektiini fermentatsiooni tulemusel vähenes oluliselt *Blautia* ning *Ruminococcuse* osakaal, aga tõusis *Dorea* osakaal. Bolte et al., (2021) uurisid seost pikaajaliste toitumisharjumuste ja soolestiku mikrobiota vahel ning leidsid, et madala kiudainesisaldusega ning loomsete valkude ja rasvade rikka toitumisega on seotud *Blautia*, *Ruminococcuse* ja *Alistipes* bakterite osakaalu tõus. Perekonna *Dorea* liigid, millel võivad olla substraadist ning liigist sõltuvalt põletikku soodustavad või alandavad omadused, toodavad gaase, mida *Blautia* tarbib (Shahi et al., 2017). Seetõttu võis *Blautia* osakaalu langemine smuutiuringus olla mõjutatud kiudaineid mittelagundava *Dorea* vähenemisest.

Selles töös nähtud olulise osakaalu vähenemisega bakteritest on *Alistipes*, *Blautia*, *Dorea* ning *Ruminococcus torques* group liike seostatud erinevate põletikuliste haigustega (Liu et al., s.a ; Parker et al., 2020; Vinelli et al., 2022). Samas perekonnas võib aga olla nii haiguste arengut soodustavaid



kui ka haigusi ennetavaid liike. Näiteks on atsetaati tootvate *Blautia* liikide osakaalu vähenemist sooles näidatud ülekaalu korral, kuid osakaalu kasvu võrreldes tervete inimestega põletikuliste soolehaiguse korral (Liu et al., s.a.). Selleks, et teha järeltõlge smuuti mõjust haigusi soodustavate bakterite osakaalu langemisele, tuleks analüüsida tulemusi liigi tasemel, aga meie töö andmed on piiritletud perekonna tasemega.

## 5.2 Kiudainete mõju fekaalsele pH-le ja orgaaniliste hapete sisaldusele

pH-d kui lihtsalt ja kiirelt mõõdetavat parameetrit on soolemikrobioomi uuringutes vähe kasutatud. Samas annab see infot toitumise, mikroobikoosluse, ainevahetuse ja laiemalt sooletervise kohta. Pidevalt kõrged (aluselised) pH näidud korreleeruvad pöördvõrdeliselt fekaalis sisalduvate SCFA-de ja butüraadi kogusega ning viitavad vajadusele muuta toitumist (LaBouyer et al., 2022). LaBouyer et al. (2022) analüüsisid fekaalse pH ning hapete vahelisi seoseid ning leidsid, et kõrge pH-ga proovides oli suurem valkude metabolismiproduktide (iso-butüraadi ja iso-valeraadi) osakaal, mis on iseloomulik kiudainevaesele ja loomsete valkude rikkale dieedile. Madalama pH-ga proovid, mis on seotud kiudainerikka toitumisega, sisaldasid suuremas koguses SCFA-sid, millest eriti oluliselt tõusis butüraadi sisaldus. See-eest toimus aga SCFA-de osakaalu tõusuga atsetaadi osakaalu vähenemine, mis võib olla seotud atsetaadi kui substraadi kasutamisega butüraadi tootmiseks. Atsetaadil ning propionaadil aga puudus pH-ga oluline korrelatsioon. Viidatud uuringu tulemused langevad üldiselt kokku ka meie uuringus nähtud muutustega. Tugev korrelatsioon pH ning butüraadi vahel ( $r = -0,546$ ) (joonis 6), aga ka pH ning propionaadi ( $r = -0,433$ ) (joonis 7) ja atsetaadi vahel ( $r = -0,398$ ) (joonis 5), tähendab kõigi kolme happe kõrgemaid sisaldusi madalama pH juures.

Summaarses hapete koguses ega happesuses ei toimunud statistiliselt olulisi muutusi kiudainerikka smuuti tarbimisel võrreldes baasperiodiga. Olulisi muutusi nähti aga siis, kui andmeid vaadeldi eraldi kahes grupis, millest esimese moodustavad kõrge baasproovi pH-ga ( $\text{pH} > 7,7$ ) ning teise normaalvahemikus baasproovi pH-ga ( $\text{pH} 6,5-7,5$ ) osalejad. Kõrge pH-ga grupi proovide pH langes ning atsetaadi, propionaadi ning butüraadi sisaldus neis tõusis smuutiperioodi lõpuks (joonis 9). Normaalvahemikus pH-ga grupis sama smuuti tarbimisel pH tõusis ning butüraadi sisaldus langes (joonis 10). Normaalse pH grupi tulemustest võib oletada, et võrdlemisi suures koguses (400 g/päevas) pektiinirikka smuuti tarbimise ajal vähenes muude kiudainerikaste toitade tarbimine ning seetõttu toimus pH tõus. Samas jäi pH selles grupis normaalsesse vahemikku ja butüraadisaldus jäi siiski kõrgemaks kui esimeses grupis. Seega näitavad tulemused, et pektiinirikkal smuutil oli oluline mõju soolesisu pH-le ning hapete tootlusele.

## 5.3 Seosed soolebakterite, pH ja orgaaniliste hapete vahel

Bakteritest korreleerusid pH-ga *Colidextribacter* ning *Asteroleplasma* (joonis 8), mille osakaal oli suurem kõrgema pH juures. Nendest on *Colidextribacter* seostatud põletikku põhjustavate metaboliitide tootmisega (Kang et al., 2022). Raba et al. (2021) *in vitro* katsetes leiti, et pH-l üle 7,5 suurenes valke metaboliseerivate bakterite osakaal (*Clostridium*, *Escherichia*) ning vähenes butüraadi tootjate osakaal (*Faecalibacterium*, *Blautia*, *Lachnospira*). Kuigi käesolevas toitumisuuringus ei leitud olulisi korrelatsioone pH ning oluliste SCFA-de tootjate vahel, näitasid

saadud tulemused, et kõrgema pH juures tõuseb potentsiaalselt põletikku põhjustavate bakterite osakaal.

Meie uuringus nähti ka olulisi seoseid SCFA-de ning bakterite vahel. Leiti positiivne korrelatsioon olulise butüraaditootja *Roseburia* ja atsetaadi ning butüraadi sisalduste vahel kiudainerikka smuuti tarbimise tulemusena (joonised 5 ja 6). Seost *Roseburia* osakaalu tõusu ning kiudainerikka toidu tarbimisega on nähtud ka varasemates uuringutes (Adamberg et al., 2020; LaBouyer et al., 2022). Atsetaadi sisalduse tõus oli aga negatiivses korrelatsioonis *Barnesiellaga* (joonis 5) ning butüraat negatiivses korrelatsioonis *Escherichia-Schigellaga* (joonis 6). Kõrgema pH juures tõusis valke metaboliseerivate *Escherichia* grupi bakterite osakaal ka *in vitro* katsetes fekaalikoolsusega (Raba et al. 2021), kui arvestada sellega, et SCFA-de tõus on negatiivses korrelatsioonis pH-ga. Need tulemused näitavad, et kiudainete suuremal tarbimisel kasvab butüraati tootvate bakterite osakaal soolestikus ning alaneb valke metaboliseerivate bakterite osakaal. Propionaadi puhul oli olulist korrelatsiooni näha ainult *unclassified* perekonna bakteritega (joonis 7), mis ei võimalda teha järeldusi mõju kohta konkreetsetele bakteritele.

Kokkuvõtteks võib öelda, et soolebakterite koosluse ja happesuse vahelised seosed on keerulised ja tihti ei ole näha tugevaid, statistiliselt olulisi seoseid kahe parameetri vahel. Mikroobide ainevahetus on reeglina mitme-etapiline. Mikroobikooslused püüavad säilitada tasakaalu, et olulised funktsioonid saaksid täidetud. See tähendab, et bakterikooslus võib muutuda teatud vahemikus nii, et ainevahetusprotsessid põhimetaboliitide osas ei muutu. Samas nähti ka teatud bakterite ja metaboliitide muutuste vahel olulisi seoseid. Samuti näidati ära, et toiduainete mõju uurimisel on oluline fekaalse pH väärtus ja hapete kontsentratsioonid enne uuringu alustamist, et näidata, kas uue toiduainega saab kooslust mõjutada või mitte. Samuti tuleb inimuuringutes arvestada sellega, et kiudainete mõju on indiviuaalne, et osad inimesed ehk nende soolekooslused reageerivad kiudainetele (nn *responders*) ja teised mitte (*non-responders*).

## 6 Järeldused

Pektiinirikka smuuti tarbimine

- tõstab oluliselt kiudaineid lagundavate ning orgaanilisi happeid tootvate bakteriperekondade osakaalu (*Roseburia*, *Lachnospira*, *Faecalibacterium*),
- vähendab valkude metabolismiga seotud ning domineerivaks muutumise korral mitmete haigustega seostatud bakterite osakaalu (*Ruminococcus torques* group, *Alistipes*, *Shigella*, *Escherichia*, *Colidextribacter*, *Dorea*),
- kõrge fekaalse baas-pH korral langetab pH-d sooles läbi atsetaadi, butüraadi ning propionaadi tootmise soolekoosluse poolt.

## Kokkuvõte

Selles bakalaureusetöös analüüsi toitumisuuringust saadud fekaaliproove eesmärgiga välja selgitada, kuidas muutub soolemikrobiota koostis, orgaaniliste hapete muster ja pH kiudainete hulga tõstmisel menüüs. Uurides kiudainetega rikastatud smuuti tarbimise mõju uuritavate fekaaliproovide mikroobsele kooslustele jäeldus, et pektiinirikka smuuti tarbimine tõstis oluliselt kiudaineid lagundavate ning orgaanilisi happeid tootvate bakteriperekondade osakaalu (*Roseburia*, *Lachnospira*, *Faecalibacterium*). Samal ajal vähenes valkude metabolismiga seotud ning domineerivaks muutumise korral mitmete haigustega seostatud bakterite osakaal (*Ruminococcus torques group*, *Alistipes*, *Shigella*, *Escherichia*, *Colidextribacter*, *Dorea*).

Bakterikoosluses nähti muutusi, mis põhinesid bakterite vahelisel rist-toitumisel. Kiudainete suuremal tarbimisel tõusis oluliselt *Phascolarctobacteriumi* bakterite osakaalu tõus, kuigi tegu pole kiudainete vaid suksinaadi tarbijaga. Kiudainete mõju võis *Phascolarctobacteriumile* aga mõjuda läbi suksinaati tootva *Bacteroidese*, mille osakaal tõusis oluliselt kiudainerikka smuuti tarbimisel.

Kiudainerikas dieet on seotud soole luumeni pH alanemise ning orgaaniliste hapete tootluse tõusuga. Inimestel, kellel uuringusse sisenedes oli fekaaliproovide pH kõrge (pH > 7,7) nägime pektiinirikka smuuti tarbimise tulemusena olulist pH langust ning atsetaadi, butüraadi ning propionaadi sisalduse tõusu fekaaliproovides. Soolevalendiku pH omab olulist mõju orgaaniliste hapete tootlusele. Analüüsidest toitumisuuringu fekaaliproovide pH ning hapete sisalduse suhet nähti, et pH alanemine soodustab happeid tootvate bakterite kasvu. Orgaaniliste hapete tootlus sõltub bakterite kooslusest ning omakorda mõjutab seda, toetades osade bakterite kasvu ning mõjudes teistele inhibeerivalt. Atsetaadi ning butüraadi sisalduse tõus proovides korreleerus positiivselt inimese tervise jaoks olulist rolli omava *Roseburiaga*. Atsetaadi tootluse tõus mõjus inhibeerivalt *Barnesiellale* ning butüraat *Escherichia-Shigellale*.

## Tänuavaldused

Soovin südamest tänada oma juhendajaid, Kaarel ja Signe Adambergi. Tänu teie abile ja tarkusele julgesin sellel teemal lõputöö kirjutada. Olite minuga kannatlikud ja suurepärased juhendajad nii eksperimentaalses osas, kui ka töö kirjutamisel. Tänu Kaarelile ja Signele sain ka sama uuringu raames laboripraktika läbitud.

Tänu kuulub ka Grete Toomingale, kes aitas mind proovide ettevalmistamisega ning kellega koos töö hästi edenes.

Samuti tänan ka Tallinna Tehnikaülikooli ning TFTA-i, kelle laborites sai uuring tehtud ning et sain osa võtta TFTA-i uuringuprojektist.

## Kasutatud kirjandus

- Adamberg, K., Jaagura, M., Aaspõllu, A., Nurk, E., & Adamberg, S. (2020). The composition of faecal microbiota is related to the amount and variety of dietary fibres. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 71(7), 845–855. <https://doi.org/10.1080/09637486.2020.1727864>
- Adamberg, K., Kolk, K., Jaagura, M., Vilu, R., & Adamberg, S. (2018). The composition and metabolism of faecal microbiota is specifically modulated by different dietary polysaccharides and mucin: An isothermal microcalorimetry study. *Beneficial Microbes*, 9(1), 21–34. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0198>
- Al Bander, Z., Nitert, M. D., Mousa, A., & Naderpoor, N. (2020). The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(20), 7618. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207618>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Bang, S.-J., Kim, G., Lim, M. Y., Song, E.-J., Jung, D.-H., Kum, J.-S., Nam, Y.-D., Park, C.-S., & Seo, D.-H. (2018). The influence of in vitro pectin fermentation on the human fecal microbiome. *AMB Express*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0629-9>
- Cheng, J., Hu, J., Geng, F., & Nie, S. (2022). Bacteroides utilization for dietary polysaccharides and their beneficial effects on gut health. *Food Science and Human Wellness*, 11(5), 1101–1110. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.04.002>
- Cheng, M., & Ning, K. (2019). Stereotypes About Enterotype: The Old and New Ideas. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 17(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.02.004>
- Chen, T., Long, W., Zhang, C., Liu, S., Zhao, L., & Hamaker, B. R. (2017). Fiber-utilizing capacity varies in Prevotella- versus Bacteroides-dominated gut microbiota. *Scientific Reports*, 7, 2594. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02995-4>
- Cronin, P., Joyce, S. A., O'Toole, P. W., & O'Connor, E. M. (2021). Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients*, 13(5), 1655. <https://doi.org/10.3390/nu13051655>
- De Filippo, C., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Albanese, D., Pieraccini, G., Banci, E., Miglietta, F., Cavalieri, D., & Lionetti, P. (2017). Diet, environments, and gut microbiota. A preliminary investigation in children living in rural and Urban Burkina Faso and Italy. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT). Scopus. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01979>
- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., & Patil, R. T. (2012). Dietary fibre in foods: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(3), 255–266. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0365-5>
- Euroopa Parlamendi ja Nõukogu Määrus (EÜ) Nr 1924/2006 20. Detsember 2006, Toidu Kohta Esitatavate Toitumis- Ja Tervisealaste Väidete Kohta. *Euroopa Liidu Teataja*, 31 Dets. 2006, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1924&from=HU> (avatud mai 2023).
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- 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. <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>

- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, *159*(4), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
- Ikeyama, N., Murakami, T., Toyoda, A., Mori, H., Iino, T., Ohkuma, M., & Sakamoto, M. (2020). Microbial interaction between the succinate-utilizing bacterium *Phascolarctobacterium faecium* and the gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron*. *MicrobiologyOpen*, *9*(10), e11111. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1111>
- Ilhan, Z. E., Marcus, A. K., Kang, D.-W., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2017). PH-Mediated Microbial and Metabolic Interactions in Fecal Enrichment Cultures. *mSphere*, *2*(3), e00047-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00047-17>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *21*(29), 8787. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Kai, N., Ma, K., Luo, W., Shen, Z., Yang, Z., Xiao, M., Tong, T., Yang, Y., & Wang, X. (2021). *Roseburia intestinalis*: A Beneficial Gut Organism From the Discoveries in Genus and Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.757718>
- Kang, G.-U., Park, S., Jung, Y., Jee, J. J., Kim, M.-S., Lee, S., Lee, D.-W., Shin, J.-H., & Koh, H. (2022). Exploration of Potential Gut Microbiota-Derived Biomarkers to Predict the Success of Fecal Microbiota Transplantation in Ulcerative Colitis: A Prospective Cohort in Korea. *Gut and Liver*, *16*(5), 775–785. <https://doi.org/10.5009/gnl210369>
- LaBouyer, M., Holtrop, G., Horgan, G., Gratz, S., Belenguer, A., Smith, N., . . . Scott, K. (2022). Higher total faecal short-chain fatty acid concentrations correlate with increasing proportions of butyrate and decreasing proportions of branched-chain fatty acids across multiple human studies. *Gut Microbiome*, *3*, E2. doi:10.1017/gmb.2022.1
- Lattimer, J. M., & Haub, M. D. (2010). Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients*, *2*(12), 1266–1289. <https://doi.org/10.3390/nu2121266>
- Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (s.a.). *Blautia*—A new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes*, *13*(1), 1875796. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>
- Lopez-Siles, M., Duncan, S. H., Garcia-Gil, L. J., & Martinez-Medina, M. (2017). *Faecalibacterium prausnitzii*: From microbiology to diagnostics and prognostics. *The ISME Journal*, *11*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.176>
- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, *23*(6), 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>
- Maturana, J. L., & Cárdenas, J. P. (2021). Insights on the Evolutionary Genomics of the *Blautia* Genus: Potential New Species and Genetic Content Among Lineages. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.660920>
- Motarjemi, Y. (1991). Codex Committee on nutrition and foods for special dietary uses. *Food Control*, *2*(3), 185. [https://doi.org/10.1016/0956-7135\(91\)90089-F](https://doi.org/10.1016/0956-7135(91)90089-F)

- Parsaei, M., Sarafraz, N., Moaddab, S. Y., & Ebrahimzadeh Leylabadlo, H. (2021). The importance of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health and diseases. *New Microbes and New Infections*, 43, 100928. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2021.100928>
- Pitsi, *et al.* Eesti toitumis- ja liikumissoovitused 2015. Tervise Arengu Instituut. Tallinn, 2017
- Precup, G., & Vodnar, D.-C. (2019). Gut *Prevotella* as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: A comprehensive literature review. *British Journal of Nutrition*, 122(2), 131–140. <https://doi.org/10.1017/S0007114519000680>
- Raba, G., Adamberg, S., & Adamberg, K. (2021). Acidic pH enhances butyrate production from pectin by faecal microbiota. *FEMS Microbiology Letters*, 368(7), fnab042. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab042>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164(3), 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
- Shahi, S. K., Freedman, S. N., & Mangalam, A. K. (2017). Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play. *Gut Microbes*, 8(6), 607–615. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1349041>
- Stephen, A. M., Champ, M. M.-J., Cloran, S. J., Fleith, M., van Lieshout, L., Mejbörn, H., & Burley, V. J. (2017). Dietary fibre in Europe: Current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. *Nutrition Research Reviews*, 30(2), 149–190. <https://doi.org/10.1017/S095442241700004X>
- Tett, A., Huang, K. D., Asnicar, F., Fehlner-Peach, H., Pasolli, E., Karcher, N., Armanini, F., Manghi, P., Bonham, K., Zolfo, M., De Filippis, F., Magnabosco, C., Bonneau, R., Lusingu, J., Amuasi, J., Reinhard, K., Rattei, T., Boulund, F., Engstrand, L., ... Segata, N. (2019). The *Prevotella copri* Complex Comprises Four Distinct Clades Underrepresented in Westernized Populations. *Cell Host & Microbe*, 26(5), 666-679.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.018>
- Vinelli, V., Biscotti, P., Martini, D., Del Bo', C., Marino, M., Meroño, T., Nikoloudaki, O., Calabrese, F. M., Turrone, S., Taverniti, V., Unión Caballero, A., Andrés-Lacueva, C., Porrini, M., Gobetti, M., De Angelis, M., Brigidi, P., Pinart, M., Nimptsch, K., Guglielmetti, S., & Riso, P. (2022). Effects of Dietary Fibers on Short-Chain Fatty Acids and Gut Microbiota Composition in Healthy Adults: A Systematic Review. *Nutrients*, 14(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/nu14132559>
- Wu, F., Guo, X., Zhang, J., Zhang, M., Ou, Z., & Peng, Y. (2017). *Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(4), 3122–3126. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4878>
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science (New York, N.y.)*, 334(6052), 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>



Yeoh, Y. K., Sun, Y., Ip, L. Y. T., Wang, L., Chan, F. K. L., Miao, Y., & Ng, S. C. (2022). Prevotella species in the human gut is primarily comprised of Prevotella copri, Prevotella stercorea and related lineages. *Scientific Reports*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12721-4>

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina **Rebeka Ojasaar**,

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
**Kiudainerikka õunasmuuti mõju soolebakterite ainevahetusele,**

mille juhendajad on **Kaarel Adamberg ja Signe Adamberg**,

- 1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

---

30.05.2023

---

<sup>1</sup> Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud üks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.