**(12) PATENDIKIRJELDUS**

(21) Patenditaotluse number:	<b>P200800026</b>	(73) Patendiomanik:
(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev:	<b>13.05.2008</b>	<b>OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskus Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE</b>
(24) Patendi kehtivuse alguse kuupäev:	<b>13.05.2008</b>	(72) Leiutise autorid:
(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev:	<b>15.12.2009</b>	<b>Epp Songisepp Tähe 105-7, 50107 Tartu, EE</b>
(45) Patendikirjelduse avaldamise kuupäev:	<b>16.08.2010</b>	<b>Marika Mikelsaar Jakobsoni 11-4, 51005 Tartu, EE</b>
(83) Bioloogilise aine sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed:	<b>DSM 21380 16.04.2008 DSMZ</b>	<b>Merle Rätsep Alasi 31-49, 50109 Tartu, EE</b>
		<b>Mihkel Zilmer Puusepa 37, 50406 Tartu, EE</b>
		<b>Pirje Hütt Ropka 6-33, 50110 Tartu, EE</b>
		<b>Meeme Utt Mõisavahe 15-9, 51707 Tartu, EE</b>
		<b>Kersti Zilmer Puusepa 37, 50406 Tartu, EE</b>
		<b>Janne Üksti Vabaduse pst 2-22, 51004 Tartu, EE</b>
		<b>Siiri Kõljalg Elva 6, 50404 Tartu, EE</b>
		(74) Patendivolinik:
		<b>Sirje Kahu Patendibüroo Usterval OÜ Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE</b>

**(54) Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 ja selle kasutamine antimikroobse ning vererõhku alandava probiootikuna ning ravimi valmistamiseks ning toiduaine realiseerimisaja pikendamiseks ja toiduaines kontamineerivatemikroorganismide allasurumiseks, tüve sisaldav toiduaine ja kompositsoon**

**(57) Leitus käsitleb mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 kui antimikroobset ning vererõhku langetavat probiootikut, nimetatud mikroorganismi sisalda vaid toiduaineid (piimatooteid, näiteks fermenteeritud tooted või juust) ja kompositsooni ning nimetatud mikroorganismi kasutamist vererõhu alandamiseks. Leitus käsitleb ka meetodit toiduainetes mittestarter-laktobatsillide toime allasurumiseks ja meetodit toiduaine realiseerimisaja pikendamiseks *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 abil**

**(57) The present invention relates to a microorganism *Lactobacillus plantarum* strain Tensia DSM 21380 as antimicrobial and antihypertensive probiotic, food products (dairy products e.g. fermented milk products or cheese) and composition comprising the named microorganism and application of said microorganism for lowering blood pressure. The present invention also relates to a method for suppressing non-starter lactobacilli in food products and method for prolongation of products' shelf-life by *Lactobacillus plantarum* strain Tensia DSM 21380**

Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 ja selle kasutamine antimikroobse ning vererõhku alandava probiootikuna ning ravimi valmistamiseks ning toiduaine realiseerimisaja pikendamiseks ja toiduaines kontamineerivate mikroorganismide allasurumiseks, tüve sisaldav toiduaine ja kompositsoon

5

10

#### TEHNIKAVALDKOND

Leiutis käsitleb uut mikroorganismi ja selle kasutamist. Leiutis kuulub biotehnoloogia valdkonda ja leiab kasutamist toiduainetetööstuses ja meditsiinis. Täpsemalt käsitleb leiutis probiootilist antimikroobset ja vererõhku alandavat mikroorganismi tüve 15 *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380. Leiutist saab kasutada funktsionaalse toidu koostises, näiteks juustus ja vererõhku alandava ravimi valmistamisel.

#### TEHNIKA TASE

Laktobatsille on laialdaselt kasutatud fermenteeritud toodete valmistamiseks, mida on 20 tarbitud sajandeid. Viimastel kümnenditel on laktobatsillid laialdasel kasutusel kui probiootikud. Probiootikud on elusad inimpäritolu mikroorganismid, mis optimaalsetes annustes organismi viiduna on kasulikud tervisele. Kõige sagedamini on probiootikud kasutusel funktsionaalse toidu loomiseks. Funktsionaalne toit on toiduaine, mis peale toiteliste väärustute omab looduslikke lisakomponente (sh. probiootikuid või 25 prebiootikuid), mis kasulikult mõjustavad organismi mingeid funktsioone või vähendavad haiguste riski. Probiootikume tarvitatakse kas toidu komponentidena (jogurtid, kreemid, kohupiimad) või mitte-toiduainetena (lüofiliseeritud mikroobikultuurid).

Euroopa riikides on kasutusel mitmeid terviseväidetega varustatud probiootikume.

#### Antimikroobsed probiootikumid

30 Patenditaolustes on kirjeldatud antimikroobseid probiootikume, mis on suunatud oportunistlike patogeenide ja toiduga levivate patogeenide vastu, näiteks *Salmonella* vastu. Patenditaoluses WO2008/039531 (Little Columet Holdings KKC) kirjeldatakse

*Lactobacillus acidophilus, L. bulgaricus, L. casei, L. paracasei, L. fermentum, L. plantarum, L. rhamnosus, L. salivarius, Bifidobacterium bifidum, B. infantis, B. animalis subsp. lactis, B. longum, Streptococcus thermophilus, Enterococcus faecalis ja E. faecium* tüvede kasutamist, mis suukaudse manustamise korral võivad alandada *Campylobacter jejuni, E. coli, S. aureus, Vibrio cholera, Bacteroides sp, Clostridium sp., Klebsiella sp, Listeria sp, Proteus sp, Salmonella sp, Shigella sp ja Veillonella sp* koguseid seedekulglas.

Patenditaotluses WO2008/016214 (Bioneer Corporation) on kirjeldatud tüve *Lactobacillus gasseri* BNR17, millel on antimikroobne aktiivsus *E. coli, S. aureus, S. typhimurium, B. cereus, L. monocytogenes ja P. mirabilis* suhtes.

Asjatundjale on teada, et näiteks juustus on probleemiks mittestarter-laktobatsillid (*non starter lactobacilli*, NSLAB), mis kerkivad esile pärast juuretisbakterite toime lakkamist juustu valmimise käigus. Nad põhjustavad tootes mittevajalikku proteolüüsi, mitmesuguste ebasoovitavate maitseühendite teket ja juustu kvaliteedi langust.

NSLAB osakaalu juustu valmimisprotsessides pole soovitud määral õnnestunud mõjustada pH regulaatorite, antioksüdantide ja konservantidega (NaCl). Tulemusi pole andnud ka mitmesuguseid antimikroobseid ühendeid (piimhapet ja äädikhapet, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tekitavate antimikroobsete mikroobide, sh. probiootiliste laktobatsillide lisamine. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tekitavaid probiootilisi laktobatsille on kirjeldatud mitme autori poolt (Ouwehand, A.C. Westerlund, Antimicrobial components of lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Eds. Salminen, S; Wright, A., Ouwehand, A.C. 2004, pp 375-395, New York, Marcel Dekker; Hütt, P Shchepetova, J., Lõivukene, K., Kullisaar, T., Mikelsaar, M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. J. Appl. Microbiol., 2006, 100, 1324-1332).

Inimorganismist päinevad ja taimsel materjalil leiduvad laktobatsillid kohanevad halvasti nende jaoks atüüpilises juustukeskkonnas, mida iseloomustab valgu- ja rasvarikkus ning süsivesikute vähesus. Seetõttu on olemas vaid üksikuid probiootilisi laktobatsille sisaldavaid juuste (Gardiner, G, Ross, R. P. Collins, J. H, Fitzgerald, G, Stanton. C. Development of a probiotic cheddar cheese containing human derived *Lactobacillus paracasei* strains, Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64., 6: 2192–2199;

Ross, R P, Fitzgerald, G F, Collins, J K, O'sullivan, G C, Stanton, C G. Process for the manufacture of probiotic cheese, US Patent 6872411, patentitaotlus WO 99/62348 A1), milles leiduvad probiootilised bakterid säilitavad paljunemisvõime, mis on eelduseks nende füsioloogilis-biokeemiliste omaduste ilmnemisele. Juustust, mis väidetavalt sisaldas probiootilist bakterit LGG, polnud uurijatel seda võimalik leida (Coeuret V Probiotic lactobacilli from feed or cheese origin: enumeration, identification, properties and specific use. Thesis de Doctoral de Univ. De Caen Basse Normandie, France 2004; Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Gueguen M, Vernon Jp. Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusin mainly on cheeses and other dairy products Lait, 2003, 269-306).

Toiduseoseliste infektsionide vältimiseks kasutatakse toitudesse ja organismi selliste probiootiliste laktobatsillide viimist, millel on tugev antagonistlik aktiivsus patogeenide vastu. Elusate laktobatsillide (LB) bakteriotsiinide sünteesivõime on oluliseks eelduseks teiste lähedaste Gram positiivsete, aga ka Gram negatiivsete bakterite, kaasa arvatud toidu patogeenide kasvu allasurumisel või nende hävitamisel. Bakteriotsiinid parandavad produkti kvaliteeti ja pikendavad selle kasutusaega. Selliste antimikroobsete ühendite loomulik süntees LB poolt produktis või ka sünteetiliste analoogide lisamine on oluline toodetes, mille tootmisprotsessis kasutatakse madalamaid temperatuure ja soola kontsentratsioone, näiteks toorjuustude valmistamisel, seda eriti sooja kliimaga maades (Lindgren and Dobrogosz Antimicrobial compounds, including bacteriocins produced by LAB increase the self life of the product, FEMS Microbiol Rew 1990, 87 149-164).  
 Bozast isoleeritud *L. plantarum* ja *L. fermentum* tüvedel kirjeldatakse võimet tekitada gram-positiivsete mikroobide kasvu inhibeeriva toimega bakteriotsiine, mis on antimikroobse toimega peptiidid või valgud (Mollendorff J.W., Todorov, S. D., Dicks, L.:M:T. Comparison of Bacteriocins Produced by Lactic-Acid Bacteria Isolated from Boza, a Cereal-Based Fermented Beverage from the Balkan Peninsula Current Microbiol. 2006, 53; 209-216). Mitmetele *L. plantarum* tüvedele on iseloomulik plantaritsiinide olemasolu. Alaklassi IIa kuuluvad toidupatogeene hävitavad bakteriotsiinid, alaklassi IIb kuuluvad dipeptiidsed laiatoimelised bakteriotsiinid: plantaritsiin EF ja plantaritsiin JK, samuti ka plantaritsiin S (Maldonado A., Ruiz-Barba JL, Floriano B, Jimenez-Diaz R., Int J Food Microbiol. 2002, 77(1-2):117-124. "The locus responsible for production of

plantaricin S, a class IIb bacteriocin, produced by *L. plantarum* LPCO10, is widely distributed among wild-type *L. plantarum* strains isolated from olive fermentation<sup>6</sup>). Näiteks tuntud on *L. plantarum* tüvede LP RJ1 ja LPRJL2 kasutamine plantaritsiin S tootjana aedviljade fermenteerimisel (WO02/05665, WO0060948, Consejo Superior de 5 Investigaciones Cientificas). Viimatinimetatud plantaritsiinid kuuluvad kolitsiinidega sarnaste antimikroobsete ühendite hulka, mille põhiliseks ründeobjektiks on nende enda liigi- ja perekonna kaaslased (Heinaru A, Tallmeister E. Shigellade ja colibakterite tundlikkus kolitsiinidele seoses episoomse resistentsusega ja kolitsinogeensusega või dissotsiaatsiooniga S-R vormideks. Geneetika, 1971, 7, 5, 113-122 (vene k.)). Seetõttu on 10 nad väga paljutõotavad ebasoovitavate mittestarter laktobatsillide allasurujatena.

Plantaritsiinide teket reguleerib rida geene, millest osad esinevad alati, teised juhuslikult. Seetõttu täheldatakse plantaritsiinide produktsiooni intensiivsuses fenotüüpilisi erinevusi. 15 *Lactobacillus plantarum* tüvel 11 kirjeldati bakteriotsiini produktsioniga seotud genoomset lookust. Kaks nendest geenide operonidest, *plnEFI* and *plnJKLR*, sisaldavad geenipaare *plnEF* ja *plnJK*, mis kodeerivad kahte väikest katatoonset bakteriotsiini-laadset peptidi kahekordsete glütsiini-tüüpi liiderjärjestustega (Diep, D. B., Havarstein, L. S. & Nes, I. F. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in 20 *Lactobacillus plantarum* C11. *J Bacteriol* 1996, 178, 4472–4483). Ei ole teada *L. plantarum* tüvesid, millel oleks plantaritsiini geenide EF ja JK täiskomplekt ja mis toimiksid NSLAB allasurujatena.

#### Vererõhku alandavad probiootikud

Üha rohkem inimesi kannatab metaboolse sündroomi all, mille sümpтомite hulka kuuluvad ülekaal, rasvumine, vere glükoosisisalduse, vererõhu ja mitmete teiste 25 ateroskleroosi riskimarkerite tõus. Sellest lähtudes ei ole väga rasvarikkad toidud (sh juustud) probleemi-vabad, sest nad võivad soodustada ateroskleroosi, põletiku ja II tüüpi diabeedi riski tõusu ja/või lipiidide peroksüdatsiooni (Raff M., Tholstrup T., Basu S., Nonboe P., Sorensen MT, Straarup EM. 138.509-514. A diet rich in conjugated linoleic acid and butter increases lipid peroxidation but does not affect atherosclerotic, 30 inflammatory, or diabetic risk markers in healthy young men American Society for Nutrition J. Nutr. 2008, 138:509-514).

Konjugeeritud linoolhape (CLA – *conjugated linoleic acid*) tähistab 18-süsikulise linoolhappe (LA, *cis*-9, *cis*-12-18:2) isomeeride rühma. CLA moodustub looduslikult biohüdrogeenimise ja oksüdatsiooni protsessides. CLA tekib linoolhappe bakteriaalse dehüdrogeenimise käigus mäletsejate vatsas, samuti piimanäärmetes vaktseenhappe konversiooni teel. Konjugeeritud linoolhappel on optimaalsetes annustes kindlaks tehtud tervisele kasulikud omadused, nagu antimikroobne, anti-tumorigeenne, rasvumisevastane, anti-aterogeenne ja anti-diabeetiline ning teatud anti-allergiline toime. Ka antihüpertensiivset toimet on näidatud mitmetes töödes (Inoue K., Okada F., Ito R., Kato S., Sasaki S., Nakajima S., Uno A., Saijo Y., Sata F., Yoshimura Y., Kishi R. and Nakazawa H., Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004), pp. 1204–1207). See aga ei tähenda, et suuri CLA koguseid sisaldav toit võiks olla probleemideta. Nii on näidatud, et CLA liigrikas toit (5g CLA päevas) viib lipiidide peroksüdatsiooni (LPO) suurenemisele, mida on näidatud 8-isoprostaglandiinide F<sub>2</sub> sisalduse 83% tõusuna (Raff M., Tholstrup T., Basu S., Nonboe P., Sorensen MT, Straarup EM. 138:509-514. A diet rich in conjugated linoleic acid and butter increases lipid peroxidation but does not affect atherosclerotic, inflammatory, or diabetic risk markers in healthy young men American Society for Nutrition J. Nutr. 2008, 138:509-514). Parimaks lahenduseks oleks aga sellise laktobatsilli tüve kasutamine, millel oleks üheaegselt nii toote CLA-ga mõõdukas rikastamisvõime kui ka füsioloogiliselt oluline antioksüdantne potentsiaal. Füsioloogiliselt olulise antioksüdantsusega LB viimine neisse toiduainetesse sest antioksüdantsus hoiaks LPO suurenemise kontrolli all ja võimaldaks rasvarikaste toitude, nagu juustude biosobivust tõsta, korrigeerides LPO suurenemist samaaegse 25 antioksüdantse mõjustusega. Tartu Ülikooli patendis EE04580 ja artiklites (Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. Int. J. Food Microbiol., 2002, 72, 215-224; Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K.. Vihalemm, T., Zilmer, M. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. Br. J. Nutr., 2003, 90, 449-456; Truusalu, K. Naaber, P., Kullisaar, T., Tamm, H., Mikelsaar, R-H., Zilmer, K., Rehema, A., Zilmer, M., Mikelsaar, M. The influence of antibacterial and antioxidative probiotic lactobacilli on

gut mucosa in a mouse model of *Salmonella* infection. Microbial Ecology in Health and Disease 2004, 16:4, 180-187) kirjeldatud *Lactobacillus fermentum* ME-3 omab märkimisväärset füsioloogilist antioksüdantset aktiivsust.

Polüamiinide sisaldus inimeste veres ja eritus uriiniga muutub erinevate polüamiinide sisaldavate toitude tarbimise järel, aga on ka tihedas seoses organismi mikroflooras leiduvate polüamiinide tekijate hulgaga, nagu *E. coli* ja mõned anaeroobid (Marino M. Maifreni M, Moret S., Rondinini G. The capacity of *Enterobacteriaceae* sp. to produce biogenic amines in cheese. Letters of Microbiology, 2000, 31, 169-173). Mitmed toiduained sisaldavad suhteliselt kõrgetes kogustes polüamiini, näiteks märkimisväärseid koguseid putrestiini leitakse apelsinidest 1330 µg/100g (Larqué E., Sabater-Molina M., Zamora S. Biological significance of dietary polyamines. Nutrition, 2007, 23, 87-95). Pole aga kirjeldatud selliseid laktobatsillide tüvesid, mis toodaksid mõõdukalt CLAd ja polüamiini ning omaksid samaaegselt füsioloogiliselt olulist antioksüdatiivset potentsiaali.

15

Vererõhu regulatsioonis osalevad ka mitmed veresoonte seinte jäikust moduleerivad ja nende kitsenemist/laienemist põhjustavad faktorid nagu lämmastik monooksiid (NO), peroksüdeeritud lipiidid (LPO), oksüdeeritud madala tihedusega lipiidid (ox-LDL), glutatiooni süsteemi red-oks komponendid GSSG/GSH. Seejuures on LPO, ox-LDL, GSSG/GSH taseme tõus aterogeenne riskifaktor. Atsetüülitud spermidiini ainevahetus annab lisavõimalusi vasodilatoorseks (vererõhku alandavaks) toimeks atsetüülitud vormide ja polüamiinsete tavavormide kaudu (Myung CS, Blankenship JW, Meerdink DJ. A mechanism of vasodilatory action of polyamines and acetylpolyamines: possible involvement of their Ca<sup>2+</sup> antagonistic properties, J Pharm Pharmacol. 2000, 52:695-707).

Piimas leiduvail peptiididel on kirjeldatud vererõhku langetavat toimet angiotensiin konverteeritava ensüümi I (ACE) inhibeerimise kaudu (Meisel, H. & Bocklemann, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. In: Proceedings of the sixth symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. 19-23 September. Veldhoven (W. N. Konings, O. P. Kuipers, and J. Huis in't Veld., eds.) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. 1999, pp. 207-215 (1999)).

- Lämmastikmonooksiid (NO) kuulub bioaktiivsete ühendite hulka, millel on mitmeid positiivseid toimeid nagu antibakteriaalne toime ja põletikuvastane toime, vererõhu langetamine (Janeway, CA, Travers, P, Walport, M, Shlomchik, MJ. 2005.
- 5 Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York, NY: Garland Science Publishing). NO võib vererõhku korrigeerida erinevate toimeradade kaudu nagu veresoonte silelihaste lõõgastamine, ACE inhibeerimine, endogeensete kaitsemehhanismide (nagu *preconditioning*) avaldumise soodustamine (Jones SP, Bolli R The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40: 16–10 23).
- Käesoleval ajal on teada vähe probiootilisi mikroorganisme, mis soodustavad või endogeenselt toodavad NO-d. Organismis lämmastikmonooksiidi tootmist soodustavad piimhappebaktereid kirjeldatakse Valio Ltd patenditaatlustes EE00200230A ja
- 15 EE200200231. EE00200230A käitleb laktobatsilli tüve *L. helveticus* LBK-16H, DSM 13137, millel on proteolüütiline aktiivsus ning mis produtseerib di- ja tripeptiide. Neid laktobatsillaarse fermentatsiooniga kaseiinist saadud di- ja tripeptiide kontsentreerides nanofiltratsiooniga ja lisades toiduainetele, sh. fermenteritud piimatoodetele, on saadud antihüpertensiivseid peptiide sisaldaav toiduaine. Patenditaatluses EE200200231
- 20 kirjeldatakse, et *L. helveticus* LBK-16H, DSM 13137 on lisaks di- ja tripeptiidele tootmisele võimeline soodustama lämmastik monooksiidi tekitamist kahes rakuliinis (hiire ja inimese enterotsüüdid). Tüvi aitab kaasa vererõhu langetamisele peptiidide ja NO tekitamise kaudu. Patenditaatluse autorid märgivad, et bakterirakud üksikasjalikult ei produtseerinud (lk.13, rida 8-9).
- 25 USA patent US7183108 (Compagnie Gervais Danone, 2007) on kirjeldatud, et *Lactobacillus casei* on põletikuvastane toime NO tootmise suurendamise tõttu (NO-d toodavad proinflammatoorsete tsütotiinide poolt aktiveeritud enterotsüüdid), ja ka vastupidi - NO tootmise vähenemise tõttu kui enterotsüüdid on aktiveeritud proinflammatoorsete tsütotiinide ja bakteriaalsete lipopolüsahhariidide poolt.
- 30 Korhonen *et al.* 2001 (Korhonen K, Reijonen TM, Remes K, Malmström K, Klaukka T, Korppi M. Reasons for and costs of hospitalization for pediatric asthma: A prospective 1-year follow-up in a population-based setting. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12:331-338)

on näidanud, et *Lactobacillus rhamnosus* GG võib suurendada NO tootmist soolestiku epiteelirakkude või proinflammatoorsete tsütokiinide poolt ja viidanud, et *Lactobacillus rhamnosus* GG kasulikud omadused võivad olla seoses NO-ga.

Euroopa patentis EP0951290 (Laboratories Standa S.A., 2002) kirjeldatakse NO-d 5 tootvaid propioonibaktereid kompositsooni valmistamiseks, mis toodab NO-d seedekulglas, ilmselt enterotsüütides. Samas on märgitud *Lactobacillus farciminis*, kuid välistavalt, sest katsetulemused näitasid, et tema poolt toodetava NO kogus ei olnud märkimisväärne. USA patentis US7294337 (Institut National de la Recherche Agronomique, 2007) on näidatud, et *L.farciminis* siiski toodab seedekulglas sellises 10 koguses NO-d, mis on piisav ravitoime saavutamiseks, täpsemalt põletikuvastaseks toimeks ja peritoneumi venitusest tekitatud valu alla surumiseks.

Ühes urimuses on näidatud, et *L.fermentum* tüvi LF1 oli võimeline MRS puljongist ilma organismi rakkude abita tootma NO-d aeroobsetes tingimustes. Nende autorite poolt testitud *L. plantarum* DSM9843 (LP2) ei olnud selleks võimeline erinevalt meie *L. 15 plantarum* Tensia tüvest (J.Xu, W.Verstraete. Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli. Appl. Microbiol.Biotechnol., 2001, 56:504-507). Sellise omadusega tüve viimine probiootikumina inimese organismi võimaldaks kasutada seda vererõhu korrigeerimiseks tänu NO tekitamise võimele ja NO toimeradadele vererõhu korrigeerimises (vt eespool).

20 Probiootiliste laktobatsillide valikut piirab peale puuduliku elutsemisvõime toidutoodetes ka veel vähene ellujäämus mao ja kaksteistsõrmiksoole kuhu saabub sapp, läbimisel. Seetõttu otsitakse probiootikute jaoks selliseid laktobatsille, mis pärast ülemise seedetrakti osa läbimist oleksid eluvõimelised jämesooles. Rahvusvahelises 25 patenditaatluses WO 91/05850 Tartu Ülikool jt, 1989) kirjeldatakse *L. plantarum* 38 tüve, mis on kasulik mikrofloora korrigeerimiseks jämesoole düsbakteriooside korral. Euroopa patentis EP0554418 B1 (Probi AB, 1998) kirjeldatakse *L. plantarum* 299 (DSM 6595) tüve head kolonisatsioonivõimet soolestikus ja selle kasutamist fermenteeritud kaerajoogis kirurgiliste sooleinfektsioonide vastu. Rahvusvahelises 30 patenditaatluses WO2007/003917 A1 (Matforsk AS jt, 2006) kirjeldatakse *Lactobacillus plantarum* DSM 16997 (DSM 17320) tüvede ja nendest pärineva tüve *L. pentosus* (DSM17321) kasutamist juuretisbakterina lihatoodetes. Autorite järgi toimivad need

- mikroobid ka probiootikuna inimese mikrofloora tasakaalu parandamiseks, surudes alla soolestikus mittesoovitavaid haigusttekitavaid baktereid, samuti kommensaalset *Escherichia coli*'t, mille tõestuseks esitatakse selle tüve ja patogenidega tehtud *in vitro* katsete tulemused. Seevastu *in vivo* (katseloomadel) patogenide allasurumise tõestust ei 5 esitata. Samuti ei esitata tõestusi mittestarter laktobatsillide (NSLAB) allasurumise kohta, kuigi vörreldakse nende elulemust vorstitoodetes madala pH juures. Ilma tõestusteta (oletamisi) omistatakse tüvele immuunsüsteemi stimuleerimist, sepsise tekke vähendamist kirurgilise ravi järel, ja patsiendi hea tervise saavutamist nimetatud tüvede organismi viimise järgse mõjustusena.
- 10 Patent EE04097 B1 (Probi AB, 2003) kirjeldab *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) kasutamist kuseteede infektsionide raviks, kusjuures see tüvi on võimeline oma mannoos-spetsiifilise adhesiini tõttu kinnituma inimese soolestiku limaskestale ja võistlema kahjulike kuseteede patogenidega kinnistumise osas. Kõgil neil tüvedel on omavahel ja käesoleva leiutise objektiks olevast tüvest *Lactobacillus plantarum* Tensia 15 eristuv kromosoomi profiil, mida on võimalik määrata REA (restriktiooni ensüümi tüüp) järgi.

#### LEIUTISE OLEMUS

- Leiutis käsitleb uut isoleeritud mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Tensia 20 DSM 21380 ja selle kasutamist antimikroobse ning vererõhku langetava probiootikuna ning vererõhku alandava ravimi valmistamiseks, toiduaine realiseerimisaja pikendamiseks ja toiduaines kontamineerivate mikroorganismide allasurumiseks, aga ka nimetatud mikroorganismi sisaldavaid toiduaineid (piimatooteid, näiteks fermenteeritud tooted, juust jt) ja kompositsiooni.
- 25 *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 kui antimikroobne probiootik tekitab antimikroobseid ühendeid – piimhapet, äädikhapet, CLA-d, NO-d ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –d ning omab plantaritsiini geenide EF ja JK komplekti II b klassi plantaritsiini kui antimikroobse ühendi tootmiseks. *In vitro* surub *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 oma metaboliitide toimel alla nii NSLAB kui enteropatogeene. Tüvel on paljunemisvõime ka 30 madalatel temperatuuridel ja süsivesikute vaeses tootes (nt juust), muutudes laktobatsillide hulgas domineerivaks.

Lisaks antimikroobsusele on *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 ka antihüperfooniline antioksüdatiivne probiootik, mis toimib sellisena tänu NO, CLA tekitamisele ja antioksüdantsusele, *in vitro* tekitab vähestes hulkades polüamiine türamiini ja putrestiini ning prevaleerib vabatahtlike sooleflooras pärast *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldava juustu kolmenädalast tarbimist, kus katsealuste soolkanali laktoflooras oli täheldatav *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 hea kolonisatsioonivõime, esinedes feetseses bakterioloogiliselt ja DGGE profili alusel. *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 suurendab putrestiini ja atsetüleeritud spermidiini ringkäiku organismis, langetades nii süstoolset kui diastoolset vererõhku.

10

### **TÜVE KIRJELDUS**

Leituse objektiks olev *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 tüvi isoleeriti terve lapse roojast Eesti-Rootsi laste mikrofloora võrdleva uuringu käigus. Mikroorganismi tüvi *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 isoleeriti, külvates terve 1 a. vanuse lapse rooja lahjendusi ( $10^{-2}$ - $10^{-7}$  fosfaatpuhvr 0,04% tioglükoolhappega, pH 7,2). Lahjendused külvati värskelt valmistatud MRS agarsöötmele (Oxoid) ja kultiveeriti 37°C juures mikraeroobses keskkonnas. Leituse objektiks olev tüvi isoleeriti *Lactobacillus sp* iseloomuliku pesa- ja rakumorfoloogia alusel. Järgnes provisoorne ja seejärel täpsem identifikatsioon, mida järgnevalt kirjeldatakse.

Mikroobitüve pärinemine terve lapse seedetraktist tõestab selle GRAS (*generally recognised as safe*) staatust ehk mikroobitüvi on inimesele ohutu ja sobib suukaudselt manustamiseks.

*Lactobacillus plantarum* Tensia tüvi deponeeriti kultuurikollektsionis Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH numbri DSM 21380 all 16.04.2008.

Kultuur-morfoloogilised tunnused on määratud MRS agar ja puljongsöötmes (OXOID) kasvatamise järgselt. *Lactobacillus plantarum* Tensia on korrapärase kujuga eosteta keskmise jämeduse ja pikkusega Gram-positiivne pulkbakter, mille üksikrakud asetsevad üksikult, paariti või paralleelsele ahelatena.

### **Füsioloogilis-biokeemilised tunnused**

Mikroobitüve kultiveerimiseks sobib MRS puljong 24-48 tundi mikroaeroobses keskkonnas, mille järel ilmneb puljongis ühtlaselt hägune kasv. Pärast 48 tunnist MRS agarsöötmel kultiveerimist 37°C juures mikroaeroobses keskkonnas (CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>: 10/5/85) on mikroobipesad 2-2,5 mm läbimõõduga, valged, kumerad, läikivad ja korrapärase äärisega.

5 Tüve optimaalne kasvutemperatuur on 37°C; tüvi paljuneb ka 15°C ja 45°C juures. Optimaalse kasvukeskkonna pH on 6,5.

10 *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 tüvi on katalaas- ja oksüdaasnegaativne, fakultatiivselt heterofermentatiivne, ei hüdrolüüsí arginiini ja ei produtseeri glükoosi fermentatsioonil gaasi.

15 *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 identifitseeriti biokeemilise aktiivsuse alusel API 50CHL System (bioMérieux, Prantsusmaa) test-kiti abil kui *Lactobacillus plantarum* (Kattuvus tüüpüvega: *excellent*, ID %99,9, T index -0,86. Võrdlus referentstüvega *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 kinnitas API 50CHL abil eelnevalt tehtud identifikatsiooni.)

20 *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 süsivesikute fermentatsioniprofil API CHL 50 alusel on alljärgnev. Tüvi fermenteerib: riboosi, L-arabinoosi, galaktoosi, D-glükoosi, D-fruktoosi, D-mannoosi, mannitooli, D-rafinoosi, α metüül-D-mannosiidi, α metüül-D-glükosiidi, N atsetüül-glükoosamiini, amügdaliini, arbutiini, eskuliini, salitsiini, tsellobioosi, maltoosi, laktoosi, melibioosi, D- arabinoosi, sahharoosi, trehhaloosi, meletsitoosi, β-gentibioosi, D-turanoosi, glükonaati ja vähesel määral tärklist.

25 API ZYM (bioMérieux, Prantsusmaa) test-kiti alusel omab *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 leutsiin arüülamidaasi, happelise fosfataasi, α- glükosidaas, β - glükosidaas aktiivsust ja atsetoini tekitamise võimet. Tüvi omab nõrka valiin arüülamidaasi, naftool-AS-BI-fosfohüdrolaasi, esteraasi (C4), esteraasi (C8), tsüstiini arüülamidaasi, β-galaktosidaasi ja N-atsetüül- β-glukosaminidaasi aktiivsust.

*Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 molekulaarne identifikatsioon toimus ITS-PCR (*Internal-Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction*) abil võrdluses referentstüvega *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 (Joonis Fig.1).

- 5   **Metoodika:** Tüve identifikatsioon toimus ITS-PCR (*Internal-Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction*) abil võrdluses referentstüvega *L. plantarum* ATCC 14917. DNA eraldati *Lactobacillus* isolaatidest lüsosüumi (Serva, Sweden; 20 mg/ml), mutanolüsiini (Sigma; 0,5 mg/ml) ja proteinaas K lahuse abil (Fermentas, Leedu; 14,6 mg/ml). DNA amplifitseeriti 1 x *Taq* polümeraasi puhvris, mis sisaldas 1,5U *Taq* DNA 10 polümeraasi (Fermentas, Leedu), 0,5 μM praimereid (16S-1500F and 23S-32R; DNA Technology AS), 200 μM dNTP (desoksünukleotiidtrifosfaatide) segu (Amersham Pharmacia Biotech, Saksamaa), 2 mM MgCl<sub>2</sub> ja 2 μl uuritavat DNA-d.

PCR produkt restriktseeriti kasutades *Taq* I restriktionsüumi (Fermentas, Leedu).

- 15   PCR produkt eraldati 2% agarosgeelis 1x TBE puhvris pingel 100 V. Produktid visualiseeriti UV valguses ja võrreldi referentstüvega *L. plantarum* ATCC 14917.

*Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 molekulaarsed näpujäljad võrreldes *L. plantarum* kontrolltüvega määrati pulssvälda-geel-elektroforeesi meetodil (Joonis Fig. 2).

- 20   **Metoodika:** Laktobatsillide DNA uurimiseks pulssvälda-geel-elektroforeesiga (PFGE) kasvatati laktobatsilli tüved 37°C juures 24 tundi MRS söötmes ning väljakasvanud mikroobirakke pesti SE puhvris (75mM NaCl, 25mM EDTA, pH=7.4), bakterisuspensiooni optiline tihedus reguleeriti (OD<sub>600</sub> ligikaudu 1,5). Bakteriraku seina lõhustamine toimus EC puhvris (50mM EDTA (pH 8.5), 0,5% Na-laurüülsarkosiini, 0,2% Na-deoksükolaat, 2mg/ml lüsosüumi, 10U mutanolüsiini) ning seejärel töödeldi proteinaas K (1mg/ml) sisaldaava puhvriga (100 mM EDTA–1% sarcosyl–0.2% deoxycholate, pH 8,0). Lüüsitud “punnid” pesti TE puhvris ja lõigati 2 mm lõigud, mis restriktseeriti ensüümiga 50U Not I (Bio-Rad) üleöö. Geel pandi elektroforeesi aparaati (CHEF-DR II; Bio-Rad) 22 tunniks 14°C juures. Elektroforeesi tulemusena saadud laktobatsillide restriktionsüoni muster pildistati UV illuminaatoris.

### Resistentsus antibiootikumidele

**Metoodika:** *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 antibakteriaalset tundlikkust antibiootikumidele testiti E-testi abil (AB Biodisk, Solna).

Minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon määrati vastavalt Euroopa Komisjoni (EUC)

5 soovitatud epidemioloogilistele murdepunktidele.

**Tabel 1.** *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 antibakteriaalne tundlikkus

Antibiootikum	MIK* ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MIK* ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Referentsväärтused e. epidemioloogiline—MIK ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) murdepunkt resistentsusele
	<i>L.plantarum</i> Tensia DSM 21380	Kontrolltüvi <i>L.plantarum</i> DSM 21379	
Ampitsilliin	0,25	0,19	4
Gentamütsiin	1,5	1	64
Streptomütsiin	16	6	64
Erütromütsiin	0,19	0,25	4
Klindamütsiin	0,032	0,016	2
Tetratsükliin	8	6	32
Kloramfenikool	2	2	8
Tsiprofloxatsiin	32	32	4
Kinupristiin/ dalfopristiin	1	1	4

\*minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

*Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 tüvel ei esinenud resistentsust uuritud

10 antibiootikumide suhtes. Tsiprofloxatsiini osas täheldati kõrgemat MIK, milliseid liigispetsiifilisi tüvesid on kirjeldatud varemgi. Seega on tõenäoliselt tegemist nn. metsikut tüüpi tüvega (Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Vael C, Klare I, Romond M-B., Entenza J M, Moreillon P, D. Wind R, Knol J, Wiertz E, Pot B., Vaughan E. E, Kahlmeter G, Goossens H. Biosafety assessment of probiotics used for 15 human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. Trends in Food Science & Technology 2008; 19: 102e114) ja antud mikroobi kasutamisel probiootikumina ei ole eeldatav antibiootikumresistentsuse geenide horisontaalne levik teistele mikroobidele.

## Funktionsaalsed omadused

### Metaboliitide profiil

**Metoodika:** Metaboliitide profiil on kindlaks tehtud gaaskromatograafiliselt (Hewlett-

5 Packard mudel 6890) mikroaeroobses kasvukeskkonnas inkubeerimisel 24 ja 48 t järel (Tabel 2). Laktobatsille kasvatati 48 t MRS agarsöötmel 10% CO<sub>2</sub> keskkonnas, tehti suspensioon 0,9% NaCl lahusesse tihedusega 10<sup>9</sup> mikroobi/ml McFarlandi järgi, saadud suspensioonist 1,0 ml külvati 9,0 ml MRS vedelsöötmesse. Määratati metaboliitide hulk mmol/l, kasutati kapillaarkolonni HP-INNOWax (15 m × 0,25 mm; 0,15 µm). Kolonni 10 temperatuuri programm 60°C 1 min, 20°C/min 120°C 10 min; detektor (FID) 350°C.

Vesinikperoksiidi mõõtmised viidi läbi elavate rakkudega. Kasutati elektrokeemilist mõõtmist Apollo 4000 vaba radikaalide analüsaatoriga (WPI, Berlin, Saksamaa) rakendades ISO-HPO<sub>2</sub> ja ISO-NOP tüüpi elektroode. Elektroodid viidi 500 µl 24 t MRS puljongis (Oxoid, U.K.) kasvanud rakukultuuri. ISO-HPO<sub>2</sub> elektroodide signaale 15 registreeriti paraleelselt 5-7 minutit ja arvutati keskmise signaalitugevuse antud aja jooksul. Iga eksperimentaalne punkt mõõdeti 4 sõltumatu paralleeliga ja iga paralleel mõõdeti kaks korda. Konsentratsioonide hindamiseks koostati standardkõverad, mille põhjal arvutati signaali tugevuse sõltuvus vesinik peroksiidi konsentratsioonist.

20 **Tabel 2.** Äädikhappe, piimhappe ja merivaikhappe konsentratsioon (mmol/l) MRS söötmes *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 mikroaeroobsel kultiveerimisel 24 ja 48 t jooksul ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentratsioon (µg/ml) tervetel rakkudel ja rakulüsaadis

<i>L. plantarum</i>	Äädikhape (mmol/l)		Piimhape (mmol/l)		Merivaik-hape (mmol/l)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µg/ml) Terved rakud 24 t
	24 t	48 t	24 t	48 t	24 t	48 t	
Tensia DSM 21380	1,4	1,7	112,2	129,2	0,6	0,6	196,4 ± 128,8
DSM 21379	2,1	2,4	133,3	186,6	0,6	0,6	288,9 ± 175,8

25 *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 tekitab märkimisväärsest kõrgetes hulkades piimhabet, äädikhabet ja rohkesti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, viimast Apollo signaalide järgi siiski vähem kui kontrolltüvi.

### **Antimikroobne aktiivsus patogeenidele ja mittestarter laktobatsillidele**

*Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 avaldab *in vitro* MRS agarsöötmel antagonistlikku toimet mittestarter laktobatsillide ja mitmete enteropatogeenide suhtes (Tabel 3), mis võimaldab tüve kasutada toiduainete realiseerimisaja pikendamiseks.

5

**Tabel 3.** *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 antimikroobne aktiivsus patogeenidele ja mittestarter laktobatsillidele modifitseeritud MRS agarsöötmel (patogeeni kasvupidurdus mm)

Patogeen	Kasvupidurdustsoon (mm)
Mitte-starter laktobatsillid (NSLAB)	8,6 ± 4,07
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 51774	25,1 ± 1,7
<i>Yersinia enterocolitica</i> (kliiniline tüvi)	13,5 ± 1,7
<i>Salmonella enteritidis</i>	25,2 ± 1,5
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	22,8 ± 0,1
<i>Shigella sonnei</i>	25,1 ± 1,6
<i>Escherichia coli</i>	29,8 ± 3,7
<i>Enterobacter sakazakii</i>	18,5 ± 3,6
<i>Campylobacter jejuni</i>	12,9 ± 5,2

10 *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 antimikroobne aktiivsus oli *in vitro* triipkates (surmatud rakud ja nende eritatud metaboliitide toime) suurim *E. coli* suhtes, millele järgnesid *Salmonella* sp., *Shigella* ja *Listeria* pidurduse aktiivsus, madalaim aktiivsus oli *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 tüvel teiste laktobatsillide (NSLAB) suhtes.

15

### ***Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 antimikroobne aktiivsus 4°C juures psührofiilsete patogeenide suhtes**

20 Lisajuuretisena kasutatavate laktobatsillide tüvede puhul on oluline hinnata antimikroobset aktiivsust psührofiilsete toidutekkeliste patogeenide suhtes ka 4°C juures (s.o. toidu säilitustemperatuuril).

**Metoodika:** Laktobatsilli antimikroobsete omaduste hindamiseks kasutati joonkülvitehnikat (Hutt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against enteric- and uropathogens. *J Appl Microbiol.* 2006; 100(6):1324-32).

- 5 Patogeenide inhibitsiooni määramiseks mõõdeti kasuvaba tsoon millimeetrites. Analoogselt Hütt jt. (2006) järgi arvutati kasutatud valimi tulemuste põhjal aritmeetiline keskmne ning standardviga ja sellest lähtuvalt hinnati tüvede antagonistlikku aktiivsust (mm) järgnevalt: 4°C juures – nõrk <14,6; keskmne 14,6-21,4; tugev>21,4. Kõiki katseid korrati paralleelselt vähemalt kolm korda.

10

**Tabel 3A.** *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 antagonistlik aktiivsus (mm) joonkülvi meetodil 4°C juures inkubeerimisel 3 nädalat

Patogeen	<i>L. plantarum</i> Tensia (DSM 21380)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	18,8±1,0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 51774	18,5±3,0
<i>Y. enterocolitica</i> (kliiniline tüvi)	19,0±2,9

Inhibitsioonitsoon (mm-s): nõrk <14,6; keskmne 14,6-21,4; tugev>21,4

15

*L. plantarum* Tensia (DSM 21380) metaboliidid suudavad 4°C juures pidurdada psührofiilsete *L. monocytogenes* ja *Y. enterocolitica* elutegevust.

- 20 **Kasvukeskkonna ja inkubatsioonitemperatuuri mõju *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 antimiroobsetele omadustele**

**Metoodika:**

- 25 Kasvukeskkonna ja temperatuuri mõju hindamiseks *L. plantarum* Tensia DSM 21380 antimikroobsete komponentide tootmisele kasutati erinevaid inkubatsioonitemperatuure (15°C; 30°C ja 37°C) ning erinevaid kasvukeskkondi (MRS puljong ja standardiseeritud juustupiim). Inkubatsioonitemperatuuril 30°C ja 37°C kasvatati laktobatsilli 20-22 tundi

ning inkubatsioonitempertuuril 15°C kasvatati laktobatsille 30 päeva (juustumudel) Antagonistlikku aktiivsust määrati kümne päevaste intervallidega.

Paralleelselt tehti katsed naturaalse supernatandiga (pH vahemikus 3,65-3,85) ja neutraliseeritud supernatandiga (pH vahemikus 6,0±0,15), et välistada orgaaniliste hapete mõju. Antimikroobset aktiivsust hinnati tilkdifusioontestiga (*agar drop diffusion test*) (Jimenez-Diaz R., Rios-Sanchez R.M., Desmazeaud M., Ruiz-Barba J.L. and Piard J.-C. (1993) Plantaricins S and T, Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPC010 Isolated from a Green Olive Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1416-1424) *Listeria monocytogenes* ATCC 51774 ja ATCC 13932 suhtes.

10

**Tabel 3B.** Erinevate inkubatsioonitemperatuuride (30°C ja 37°C) ja supernatandi pH (naturaalne: pH 3,65...3,85 ja neutraliseeritud: pH 6,0±0,15) mõju MRS puljongis kasvatatud *L. plantarum* Tensia supernatandi antagonistlikule aktiivsusele *Listeria monocytogenes* suhtes (patogeeni kasvu inhibitsioonitsoon millimeetrites)

Tüvi	30°C		37°C	
	naturaalne	neutraalne	naturaalne	neutraalne
<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380	5,1±1,4 <sup>#</sup>	3,7±2,6 <sup>#</sup>	5,4±0,5 <sup>\$</sup>	4,2±2,0 <sup>\$</sup>
<i>L. plantarum</i> DSM 21379	1,1±2,1	1,1±2,1	1,4±2,2	1,4±2,3

15

<sup>#</sup>p=0,03; <sup>\$</sup>p=0,04

Piimas 20-22 tundi 30°C ja 37°C juures kasvanud *L. plantarum* Tensia DSM 21380 supernatant ei omanud antagonistlikku toimet testitud *L. monocytogenes* tüvede suhtes.

20

Laktobatsillide poolt toodetud bakteriotsiinide toime on tugevam hoppelisemas keskkonnas, kuna sel juhul toimivad sünergiliselt kõik mikroobi toodetud erinevad antimikroobsed ühendid. Optimaalseks bakteriotsiinide toimimise vahemikuks loetakse pH 5,0...7,0 (Atrih A., Rekhif N., Moir A.J.G., Lebrihi A. and Lefebvre G. (2001) Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Intern. Journal of Food Microbiol.* **68**, 93-104; Mezaini A., Chihib N.-E., Bouras A.D., Nedjar-Arroume, N. and

Hornez, J.P. (2009) Antibacterial Activity of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from an Algerian Dairy Product. *J. of Environ. And Public Health.* 1-6).

MRS puljongis kasvatatud *L. plantarum* Tensia DSM 21380 supernatandi antimikroobne aktiivsus sõltus pH väärustest - naturaalse supernatandi (pH 3,65...3,85) antimikroobne 5 aktiivsus oli testitud listeeria tüvede suhtes oluliselt parem kui neutraliseeritud supernatandil (Tabel 3B).

MRS puljongis kasvanud *L. plantarum* Tensia DSM 21380 supernatandi antagonistlik aktiivsus sõltus tüve inkubatsioonitemperatuurist olles tugevam 37°C juures (Tabel 3B).

10 **Tabel 3C.** Madala inkubatsioonitemperatuuri (15°C) ja erineva kasvukeskkonna (MRS ja piim) mõju *L. plantarum* Tensia supernatandi listeeriavastasele antimikroobsele aktiivsusele 30 päeva jooksul MRS puljongis ja piimas inkubeerimisel (patogeeni kasvu inhibitsioonitsoon millimeetrites)

Tüvi	MRS			Piim		
	10. päev	20. päev	30. päev	10. päev	20. päev	30. päev
<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380	5,6±0,8	5,8±1,3	7,1±1,4	0	3,0±2,3	6,0±0,7
<i>L. plantarum</i> DSM 21379	0	0,6±1,1	1,9±2,6	0	2,2±2,8	0

15 15°C juures MRS puljongis kasvanud *L. plantarum* Tensia DSM 21380 supernatant omas antagonistliku aktiivsust alates esimesest mõõtmisest (10. inkubatsioonipäev).

Piimast eraldatud *L. plantarum* Tensia DSM 21380 supernatandil tähdeldati listeeriavastast antagonistlikku aktiivsust alates 20. inkubatsioonipäevast ning supernatandi antimikroobsed omadused säilisid ning tugevnesid mõnevõrra inkubatsiooniperioodi 20 lõpuks. Piimas kasvanud tüvelt eraldatud supernatandi antimikroobsed omadused olid oluliselt nõrgemad ( $p<0,01$ ) võrreldes MRS puljongis kasvanud laktobatsillide supernatandiga.

#### ***Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 bakteriotsiini geenid**

**Metoodika:** *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 bakteriootsiini geenide määramise aluseks oli *Lactobacillus plantarum* WCFS1 geenid *plnE*, *plnF* *plnJ* ja *plnK*. Nimetatud geenid kodeerivad bakteriootsiinide prekursorpeptiide (*Lactobacillus plantarum* WCFS1 genoomi annotatsioon – Kleerebezem *et al* 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Feb 18; 100 (4): 1990-5). PCR praimerid disainiti programmiga Primer Express®. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 annoteeritud genoom laeti alla NCBI genome browser'st (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>).

Disainitud praimerid tähistati E1F, E1R, F1F, F1R, J1F, J1R, K2F, K2R (vt. Järjestuse loetelu) ja nende kasutamisel PCR-reaktsioonis saadi positiivne signaal kõikide eelpoolnimetatud järjestuste puhul. Testimisel kasutati positiivse kontrollina *L. plantarum* BAA-793 NCIMB 8826 ja negatiivse kontrollina tüve *L. plantarum* DSM 21379.

**Tabel 4.** Amplifitseeritud PCR produktide olemasolu *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 genoomses DNA-s bakteriootsiinigeenidele *plnE*, *plnF*, *plnJ* ja *plnK* spetsiifiliste praimerite kasutamisel.

	Geenid			
	<i>plnE</i>	<i>plnF</i>	<i>plnJ</i>	<i>plnK</i>
<i>L. plantarum</i> BAA-793 (NCIMB 8826)	+	+	+	+
<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380	+	+	+	+
<i>L. plantarum</i> DSM 21379	+	+	-	-

*L. plantarum* Tensia DSM 21380 antagonistlike toimete põhjustajateks on koos teiste antimikroobsete ühenditega ka eelpoolnimetatud geenide produktid s.o. antimikroobsed peptiidid. Peptiidid E ja F ning J ja K peavad olema ekspresseeritud üheaegselt, kuna maksimaalne toime saavutatakse mõlema peptiidi koostoimel.

#### Konjugeeritud linoolhappe tekkitamine *L. plantarum* Tensia DSM 21380 poolt

**Metoodika:** Määramisi tehti MRS söötmes (de Mann-Rogosa-Sharpe, Oxoid, UK) ja lõssi söötmes spektrofotomeetrilise analüüsiga

MRS söötmes 39,9 mg/l (mõõdukas)

Lõssis 19,2 mg/l (mõõdukas)

Juustus	$3,0 \pm 0,3$ mg/g
---------	--------------------

**Lämmastikmonooksiidi (NO) tekitamine *L. plantarum* Tensia DSM 21380 poolt**

**Metoodika 1.** Lämmastikmonooksiidi mõõtmised viidi läbi elavate rakkudega. Kasutati

5 elektrokeemilist mõõtmist Apollo 4000 vaba radikaalide analüsaatoriga (WPI, Berlin, Saksamaa) rakendades ISO-NOP tüüpi elektroode. Elektroodid viidi 500  $\mu\text{l}$  24t MRS puljongis (Oxoid, U.K.) kasvanud rakukultuuri. ISO-NOP elektroodide signaale registreeriti 5-7 minutit ja arvutati keskmise signaalitugevuse antud aja jooksul. Iga eksperimentaalne punkt mõõdeti 4 sõltumatu paralleeliga ja iga paralleel mõõdeti kaks 10 korda. Konsentratsioonide hindamiseks koostati standardkõverad, mille põhjal arvutati signaali tugevuse sõltuvus lämmastikoksiidi konsentratsioonist.

**Tabel 5 A.** *L. plantarum* Tensia DSM 21380 tekitatud NO konsentratsioonid ( $\mu\text{M}$ )

Tüve number	NO konsentratsioon ( $\mu\text{M}$ )
<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380	$2,6 \pm 0,8$
<i>L. plantarum</i> DSM 21379	$2,7 \pm 1,2$
<i>L. coprophilus</i>	$2,1 \pm 1,1$
<i>L. plantarum</i>	$2,1 \pm 0,9$
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> tüvi nr 1	$1,3 \pm 0,8$
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> tüvi nr 2	$1,8 \pm 0,9$
<i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> tüvi nr 3	$2,8 \pm 1,6$
<i>L. buchneri</i>	$2,0 \pm 1,1$

15 *L. plantarum* Tensia DSM 21380 oli üks parimaid NO tekitajaid võrreldes 8 teise *Lactobacillus* sp tüvega.

**Metoodika 2.** Lämmastikmonooksiidi produktsiooni mõõdeti 24t vanustel mikroobirakkudel, mida oli inkubeeritud 10ml MRS puljongis, mis sisaldas 3 või 30 mg 20  $\text{NaNO}_3$

Mõõtmisi teostati Apollo 4000 vaba radikaalide analüsaatoriga nagu eelpool kirjeldatud.

**Tabel 5B.**

Tüvi	NaNO <sub>3</sub> kontsentratsioon	NO kontsentratsioon ( $\mu$ M) MRS puljongis
<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380	MRS puljong	0.0 ± 0.0
	MRS puljong	-0.1 ± 0.0
	3 mg NaNO <sub>3</sub>	4.5 ± 0.9
	30 mg NaNO <sub>3</sub>	11.0 ± 2.2
<i>L. plantarum</i> DSM 21379	MRS puljong	0.7 ± 0.4
	3 mg NaNO <sub>3</sub>	4.1 ± 5.3
	30 mg NaNO <sub>3</sub>	5.4 ± 6.0

*L. plantarum* Tensia DSM 21380 poolt tekitatav NO hulk on sõltuv NaNO<sub>3</sub> kontsentratsioonist söötmes.

Lubatud NaNO<sub>3</sub> hulk soolatud tootedes või konservides on 300 mg/kg ja juustu puhul

5 150 mg/kg (<http://www.riigiteataja.ee/ert/act.jsp?id=12937247>).

#### ***Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 antioksüdantne aktiivsus**

**Metoodika:** TAA ja TAS määramiseks laktobatsillide tüvede mikroobirakkidel *L. plantarum* Tensia DSM 21380 inkubeeriti MRS puljongis (Oxoid, U.K.) 24 t 37°C

10 juures. Mikroobirakke tsentrifugiti temperatuuril 4°C 1500 pööret/min 10 min jooksul, pesti isotoonilise soolalausega (4°C) ja supendeeriti 1,15% KCl (Sigma, USA). Suspensiooni tiheduseks oli OD<sub>600</sub> 1,1 juures 10<sup>9</sup> mikroobirakku/ml. Totaalset antioksüdantset aktiivsust (TAA) määrati linoleenhappe testi (LA-test) abil (Kullisaar, T, Songisepp, Mikelsaar M, Zilmer, K, Vihalemm, T, Zilmer, M. *British J of Nutrition*.

15 Antioxidant probiotic fermented milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human. 2003, 90, 2, 449-456) ja totaalset antioksüdatiivset staatus (TAS) kommersiaalse kiti abil (TAS, Randox Laboratories Ltd.,UK) (Tabel 6).

**Tabel 6.** *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 totaalne antioksüdantsus (TAA) ja

20 totaalne antioksüdatiivne staatus (TAS)

Tüve nr.	TAA (%)	TAS (mmol/l)
<i>L. plantarum</i> DSM 21380	22±5	0,05±0,02
<i>L. plantarum</i> DSM 21379	26±1,2	0,13±0,04

TAA ja TAS näitajad olid *L. plantarum* Tensia DSM 21380 puhul mõnevõrra madalamad kui *L. plantarum* DSM 21379-puhul. Võrreldes antioksüdantse tüve *L.*

*fermentum* ME-3 (DSM14241) näitajatega, olid saadud väärtsused madalamad (ME-3, TAA: 29±0,7; TAS: 0,16±0,03).

***In vitro* polüamiinide tekitamine *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 poolt**

- 5 **Metoodika:** Mikroobitüved suspendeeriti füsioloogilises lahuses McFarlandi standardi järgi  $10^9$  mikroobi/ml ja 0,5 ml külvati dekarboksülatsooniöötmesse (á 4,5 ml) ning inkubeeriti 37°C juures 4 ööpäeva (Bover-Cid, jt., 1999).  
 BA määramiseks derivatiseeriti 200 µl söötmest GC analüüsiks modifitseeritud Nakovichi meetodil (Nakovich, L. Analysis of biogenic amines by GC/FID and GC/MS. Thesis, Virginia polytechnic institute, USA. 2003).  
 GC analüüs teostati gaaskromatograafiga HP 6890 Series GC System, kasutati kapillaarkolonni HP-5 19091J-413 (30 m ×0,32 mm; 0,25 µm). Kolonni temperatuuri programm 160°C 1 min, 20°C/min 280°C 15 min; detektor (FID) 300°C.

- 15 Tabel 7. Polüamiinide kontsentratsioon *in vitro* dekarboksülatsooniöötmost  
 (Arena, M. E., Manca de Nadra, M. C. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. J. Applied Microbiology 2001, 90, 158-162.)

Proov	Polüamiinid (µg/ml) ja biogeensed amiinid								
	Arginiin		Glutamiin		Lüsiin		Ornitiin		Histi-diin
	Put-rest-siin.	Kada-veriin	Put-rest-siin	Kada-veriin	Put-rest-siin	Kada-veriin	Put-rest-siin	Kada-veriin	Hista-miin
<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380	0	0	0	0	0	0,3	0,5	0,6	0
<i>L. plantarum</i> DSM 21379	0	0,4	1,2	0,5	0	0,4	1,9	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 700336	18,4	1,7	12,3	18,4	1,8	240	1599,3	3,5	105,1

*L. plantarum* Tensia DSM 21380 tekitas ornitiinist madalates hulkades polüamiin putrestsiini. Biogeensetest amiinidest leiti kadaveriini jälgvi. Histamiini ei tekitatud.

Joonis Fig.1. *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 molekulaarne identifikatsioon ITS-PCR abil

1. *L. plantarum* DSM 21379
2. *L. plantarum* Tensia DSM 21380
- 5 3. *L. plantarum* CRL 972 (ATCC 14917)
- M- 100bp marker (Fermentas)

Joonis Fig.2. *L. plantarum* Tensia DSM 21380 tüve näpujaljed võrreldes *L. plantarum* kontrolltüvega (Pulsefield-gel-electrophoresis profile, PFGE abil).

1. Lambda Ladder PFG Marker (New England Bio Labs Inc.)
- 10 2. *L. plantarum* Tensia DSM 21380
3. *L. plantarum* DSM 21379 (kontroll)

15 Joonis Fig.3. *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisalduse määramine juustus DGGE meetodil. DGGE geelelektorforeesipilt katsejuustude (probiootilised juustud, kontrolljuust, prebiootiline juust mikroflorast.

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| 1. Juust nr 529                   | 9. juust nr 9-2                                    |
| 2. Kontrolljuust                  | 10. <i>L. plantarum</i> DSM 21379                  |
| 3. Juust nr 5                     | 11. <i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380 sisaldaav |
| 4. <i>L. plantarum</i> tüvi nr. 1 | juust  |
| 5. Juust nr 9-1                   | 12. <i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380           |
| 6. <i>L. plantarum</i> DSM 21379  | puhaskultuur                                       |
| 7. Juust nr 19                    | 13. Juust nr 4                                     |
| 8. <i>L. plantarum</i> tüvi nr. 1 | 14. Juust nr 12                                    |
|                                   | 15. <i>L. paracasei</i> tüvi nr 1                  |
|                                   | 16. <i>L. plantarum</i> DSM 21379                  |

Joonised Fig.4a, 4b, 4c. Laktobatsillide liigid Pearson UPMAG klasteranalüüs *L. plantarum* Tensia DSM 21380 grupis.

- 20 Joonis Fig.5. Süstoolse vererõhu langus (mõjutuse lõpp võrreldes katse alguse süstoolse vererõhu näitajaga)
  - (a) on seotud positiivselt laktobatsillide hulga minimaalse tõusuga *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega probiootilise juustu tarbimise järel (FISH) ( $r=0,615$ ,  $p=0,044$ ,  $n=11$ );

(b) on seotud putrestiini sisalduse tõusuga katseisikute uriinis *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega juustu tarbimise järel võrreldes katse algusega ( $r=0,631$ ,  $p=0,037$ ,  $n=11$ ).

## 5 LEIUTISE TEOSTAMISE NÄITED

### Näide 1. Toiduaines NSLAB mikroobide allasurumine

#### Katse Eesti Juustuga

**Metoodika:** Mikroorganismi *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 lisati Piimandusühistu E-Piim Eesti juustu tegemiseks kasutatavale juustupiimale (külvideoos  $3 \times 10^8$  PMÜ/juustutegu), mis seejärel laabiti (25 min). Tekkinud juustutera lõigati (25 min), järelsoojendati ( $34^\circ\text{C}$  15 min), kuivatati (25 min), pressiti, nõrutati (1 t), soolati soolivees ( $12^\circ\text{C}$ ; 20% soola; pH 4,7) 20 t, nõrutati ja kuivatati (8 t), kiletati ja valmitati  $12^\circ\text{C}$  juures minimaalselt 4 nädalat.

15 **Tabel 8.** Laktobatsillide sisaldus *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega juustus 28.valmimispäeval

<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380 sisaldav juust	Kontroll-juust pH 5,1	<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380 sisaldusega juust (manustatud vabatahtlikele)			Kontrolljuust		
		3. päev	28. päev	3 kuud	3. päev	28. päev	3 kuud
Lakto-batsillid	$10^9$	$9 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^7$	Ei leitud	$10^8$
<i>L. plantarum</i>	$10^9$	$2 \times 10^3$	$6 \times 10^5$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^7$	Ei leitud	Ei leitud
<i>L. casei</i>	Ei leitud	$8 \times 10^5$	Ei leitud	Ei leitud	Ei leitud	Ei leitud	Ei leitud
<i>L. buchneri</i>	Ei leitud	$10^5$	Ei leitud	Ei leitud	Ei leitud	Ei leitud	Ei leitud
OHOL	Ei leitud	Ei leitud	Ei leitud	Ei leitud	Ei leitud	$2 \times 10^3$	Ei leitud

28. päevaks pärast valmistamist suurenes *L. plantarum*'i hulk 10 tuhat korda võrreldes kontroll-juustuga. Kui kontrolljuustus leiti homofermentatiivsete laktobatsillide, *L. casei* ja *L. buchneri* tüvesid, siis *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega valmistatud juustus neid ei leitud. Seega omas tüvi *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 juustus teisi laktobatsille (NSLAB) tugevalt pidurdavat toimet ja võimet suruda alla

kontamineerivaid mikroobe toiduainetes. Nimetatud mikroobideks võivad olla ka toiduainesse pärast selle valmistamist sattunud patogeenid. Seetõttu saab *L. plantarum* Tensia DSM 21380 lisamisega pikendada toiduaine realiseerimisaega.

- 5 ***L. plantarum* Tensia DSM21380 antimikroobne aktiivsus *Listeria monocytogenes* suhtes juustu keskkonnas**

Uuringu eesmärgiks oli hinnata *L. plantarum* Tensia DSM21380 antimikroobset aktiivsust *Listeria monocytogenes* suhtes juustukeskkonnas.

10

**Meetod:**

Valmistati kuus laboratoorset Edam-tüüpi katsejuustu. Kaks kontrolljuustu sisaldasid tüve *L. planatrum* Tensia DSM21380. Kaks juustu sisaldas patogeeni *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 ja kaks juustu sisaldasid nii *L. plantarum* Tensia DSM21380 kui *Listeria*

15 *monocytogenes*. Pastöriseeritud juustupiim inokuleeriti 1% juustujuuretisega C92 (CSK Food Enrichment, Holland) ja test-mikroobidega, laabiti 32°C juures (juustulaap FROMASE 2200 TL granulate). Juustutera lõigati, soojendati (37-38°C), kuivatati, pressiti, nõrutati ja soolati, kiletati ja valmitati 15°C juures 30 päeva. TENSIA tihedus juustutoorikus oli  $10^5$  PMÜ/g ja *L. monocytogenes*  $10^4$  PMÜ/g.

20 Mikrobioloogilisteks analüüsideks võeti proovid aseptiliselt juustubloki keskelt. Juustuproovile lisati 0.9 % NaCl lahust (1:9), homogeniseeriti blenderis (Minimix, Interscience, Prantsusmaa), valmistati lajhenduste rida ja 0.1 ml igast lajhendusest külvati MRS söötmele laktobatsillide hulga määramiseks. *Listeria monocytogenes* hulga hindamiseks kasutati listeeria kromogeenset agarsöödet (Oxoid, Inglismaa) 25 eelrikastusmeetodil.

**Katsejuustudes sisalduvate lühikese ahelaga rasvhapete hulga hindamine**

Juustuproovidele (10 g) lisati 10 ml destilleeritud vett, homogeniseeriti blenderis,

ekstraheeriti või esterdati. Gaaskromatograafiga (HP 6890 Series GC System) määrati

30 kvantitatiivselt äädikhappe, propioonhappe, võihappe, palderjanhappe, kaproonhappe, piimhappe ja merivaikhappe sisaldus. Kasutati kapillaarkolonni HP-INNOWax (15 m

×0,25 mm; 0,15 µm). Kolonni temperatuuri programm I 60°C 1 min, 20°C/min 120°C 10 min ja II 80°C 1 min, 25°C/min 120°C 8 min; detektor (FID) 250°C.

Juustude pH mõõtmiseks kasutati digitaalset pH-meetrit E6115 (Evikon OÜ, Eesti).

5 pH mõõdeti juustutüki kolmest kohast.

Juustu valmimise jooksul tõusis *L. plantarum* Tensia DSM21380 hulk 2 log võrra.

Kontrolljuustus ei täheldatud *L. monocytogenes* hulgas olulisi muutusi. Test-juustus, mis sisaldas *Listeria monocytogenes* ja *L. plantarum* Tensia DSM21380, langes *L.*

10 *monocytogenes* arvukus väga madalate väärusteni s.t. 2,4 log<sub>10</sub> 1 g juustu kohta (Tabel 8A).

**Tabel 8A.** *Listeria monocytogenes* elulemus (PMÜ log10/g) katsejuustudes valmitamise

15 jooksul

Lisand katsejuustus	<i>L. monocytogenes</i> hulk PMÜ log10/g			
	0. päev	10. päev	20. päev	30. päev
<i>L. plantarum</i> Tensia DSM21380 +	3,2±0,3	2,9±0,2	2,6±0,9	2,4±0,6
<i>L. monocytogenes</i>				
<i>L. monocytogenes</i>	4,2±0,6	4,0±0,9	4,8±2,2	4,2±0,2

*L. plantarum* Tensia DSM21380 lisamine soodustas merivaikhappe hulga suurenemist juustude küpsemise käigus (Tabel 8B).

*L. plantarum* Tensia DSM21380 + *L. monocytogenes* sisaldusega juustus ilmnes

20 positiivne seos laktobatsillide hulga ning äädik- ja merivaikhappe vahel ning negatiivne seos listeeria hulga ja piimhappe hulga vahel.

**Tabel 8B.** Lühikese ahelaga rasvhapete sisaldus (g/kg) ja pH ning *L. plantarum* Tensia

25 DSM21380 ja *L. monocytogenes* ATCC 13932 hulk 30 päeva valmitatud laboratoorsetes katsejuustude

Määratud parameetrid		<i>L. plantarum</i> Tensia DSM21380 sisaldusega juust	<i>L. plantarum</i> Tensia DSM21380 + <i>L. monocytogenes</i> sisaldusega juust	<i>L. monocytogenes</i> sisaldusega juust
Lühikese ahelaga rasvhapped g/kg	Äädikhape	0,38±0,01	0,3±0,06	0,22±0,18
	Propioonhape	0,11±0,00	0,11±0,00	0,03±0,06
	Võihape	0,09±0,09	0,03±0,01	0,02±0,00
	Kaproonhape	0,05±0,04	0,03±0,01	0,02±0,01
	Piimhape	15,37±0,58	14,34±0,88	14,14±2,38
	Merivaikhape	0,93±0,20	0,88±0,37	0,36±0,11
Lisatud mikroobide elulemus $\log_{10}/\text{g}$ ja pH	<i>L. plantarum</i> Tensia DSM21380	7,7±0,1	7,8±0,00	-
	<i>L. monocytogenes</i>	-	2,4±0,6	4,2±0,2
	pH	4,9±0,3	4,8±0,4	4,8±0,2

Laktobatsilli antimikroobse aktiivsuse määramisel agarsöötmel laboratoorselt ei puutunud uuritav laktobatsilli tüvi otseselt kokku testmikroobina kasutatava patogeeni või mittestarter laktobatsilliga, mille suhtes tema antagonistlikku toimet uuriti. Patogeeni 5 kasvupidurduse näol registreeritud antimikroobne toime põhines *L. plantarum* Tensia DSM21380 poolt kasvamise ajal agarsöötmesse difundeeruvatel metaboliitidel (s.h. mitmesugustel orgaanilistel hapetel k.a. äädik-, piim- ja merivaikhape).

Toiduaines, sh piimatoodetes (juust) pärssivad toorpimast pärit mittestarter laktobatsillide ja/või patogeenide ja/või teise kontamineerivate mikroobide elutegevust nii laktobatsilli 10 metaboliidid, kui ka otsene kontakt probiootilise laktobatsilli tüvega. Otsene kontakt sihtmikroobiga võib stimuleerida orgaanilistest hapetest tekitatud madalamatel pH väärustustel teiste antimikroobsete ühendite (bakteriotsiinid) sünteesi (Aasen I.M., Moretro T., Katla T., Axelsson L. and Storro I. (2000) Influence of complex nutrients, temperture and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol.* 15 *Biotechnol.* **53**, 159-166.)

*L. plantarum* Tensia DSM21380 lühikese ahelaga rasvhapete profiil ja antimikroobse aktiivsuse olemasolu aitab tüvel toidukeskkonnas alla suruda *Listeria* sp. Antimikroobsete omadust säilimine juustu maatriksis tagab võimalike toidupatogeenide allasurumise *L. plantarum* Tensia poolt.

***Lactobacillus plantarum* Tensia sisalduse määramine juustus DGGE meetodil**

**Metoodika:** Bakteriaalne DNA isoleeriti juustudest QIAamp DNA Mini Kitiga (QIAGEN), amplifitseeriti praimeritega 968-GC-f (GGGAACGCGAAGAACCTTA-GC), 1401-r (CGGTGTGTACAAGACCC).

- 5 PCR produkt eraldati 30-60% akrüülamidi sisaldusega DGGE gellelektorforeesi käigus, kasutades Dcode<sup>TM</sup> System tehnikat (Bio-Rad, Hercules, California) (Joonis Fig. 3).

**Biogeensete amiinide sisaldus *L. plantarum* Tensia DSM 21380 lisandiga juustus**

**Metoodika:** Juustuproovid ekstraheeriti (10g juustule lisati 20 ml 50% metanooli

- 10 vesilahust ja inkubeeriti 45°C juures 1 tund jahutati 30°C, tsentrifuugiti) ja 200µl pealmisest kihist derivatiseeriti GC analüüsiks modifitseeritud Nakovichi meetodil (Nakovich, L. 2003 Analysis of biogenic amines by GC/FID and GC/MS) Tartu Ülikooli Mikrobioloogia Instituudis. GC analüüs teostati gaaskromatograafiga HP 6890 Series GC System, kasutati kapillaarkolonni HP-5 19091J-413 (30 m × 0,32 mm; 0,25 µm). Kolonni 15 temperatuuri programm 160°C 1 min, 20°C/min 280°C 15 min; detektor (FID) 350°C.

**Tabel 9.** Biogeensed amiinid ja polüamiinid *L. plantarum* Tensia DSM 21380 lisandiga juustu tööstuslikes proovipartiides

Proov	Juustu sisestatud tüvede iduarv (PMÜ/g) vahetult pärast valmistamist (3.-4. päev)	Amiinid (mg/kg)			<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380 iduarv laagerdunud juustus
		Türamiin	Putrest-siin	Kada-veriin	
<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380, 1. katse	$6,5 \times 10^8$	0,69	1,32	0	$10^6$
Kontrolljuust, 1. katse	-	2,31	1,82	0	-
<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380, 2.katse	$4,5 \times 10^6$	2,65	7,46	0	$6 \times 10^8$
Kontrolljuust, 2. katse		5,64	1,84	0	$10^7$
<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380, 3.katse	$2 \times 10^6$	5,49	7,29	0	$10^8$
Kontrolljuust, 3.katse	-	0	0	0	-

*L. plantarum* Tensia DSM 21380 tootis türamiini väärustuses 0,69-5,49 ja putrestsiini madalates väärustuses (1,32-7,46) mg/kg juustu kohta.

5 **Näide 2. *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 ohutuskatse NIH liini hiirtega**

Toote aktsepteerimiseks Veterinaar- ja Toiduameti poolt on vajalik testida probiootiliste tüvede ja neid sisaldavate toodete ohutust.

**Metoodika:** Loomkatses NIH liini hiirtega manustati 3 hiirterühmale erinevaid juustusid 10 30 päeva vältel (lisanditeta kontrolljuust, *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega juust). Hiirte üldseisund oli hea, juustusöömine suurendas ühtlaselt hirite kaalu, karvkate ja seedetegevus olid muutusteta. Lahangul laktobatsillide ega mikrofloora teiste bakterite translokatsiooni verre ja organitesse ei täheldatud. Elundeis (maksas ja pörnas) ei esinenud muutusi, mis kinnitas *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 15 tüve ohutust.

**Näide 3. *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega juustu toime tervete vabatahtlike vere kliinilistele näitajatele ja seedekulgla mikrofloorale**

20 Kliinilises katsetuses (randomiseeritud, kaksikpime, platseebokatse) tervetel vabatahtlikel uuriti antimikroobsete omadustega *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega Eesti juustu ohutust tarbijale ja toimet seedekulgla mikrofloorale (kliinilise katse registreerimise rahvusvaheline number ISRCTN38739209).

**Inimesed ja meetodid:** Uuritavasse rühma kuulusid tervisekaebuseta vabatahtlikud 25 naised ja mehed (M/N 5/7) vanuses 21-43 eluaastat. Võimaliku varjatud diabeedi väljalülitamiseks määratati glükoosi ja glükohemoglobiin (HbA1c) vereseerumist.

Test-juustud sisaldasid tüve *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 iduarvuga  $5 \times 10^8$  mikroobirakku/g juustu kohta. Enne test-juustu manustamist vabatahtlikele inkubeeriti juustu nimetatud mikroorganismiga 30 päeva jooksul 12°C juures. 30 Kontrolljuustuna kasutati sama ajal valmistatud ilma probiootiliste lisanditeta Eesti juustu. Katse viidi läbi kaksikpime cross-over randomiseeritud uuringuna. Alustati 3 nädalast juustu tarvitamist test-juustuga. Järgnes kahe nädala pikkune vaheperiood

(*washout*), pärast seda tarvitasiid katseisikud 3 nädalat kontrolljuustu. Päevane tarbitav juustukogus oli 50g.

**Tabel 10.** Vabatahtlike kliinilised näitajad pärast *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega probiootiliste juustude tarvitamist

	<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380 sisaldusega probiootiline juust		Kontrolljuust		<i>P</i> väärtsused
	Enne	Pärast	Enne	Pärast	
Kehamassi indeks, ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$24,1 \pm 3,6$	$24,2 \pm 3,6$	$23,8 \pm 3,5$	$23,9 \pm 3,6$	0,625/0,399
Süstoolne vererõhk (mm Hg)	$112,9 \pm 10,4$	$107,1 \pm 10,4$	$110,3 \pm 8,3$	$109,3 \pm 9,4$	0,016/0,655
Diastoolne vererõhk (mm Hg)	$78,8 \pm 7,1$	$74,3 \pm 8,8$	$74,8 \pm 5,2$	$75,7 \pm 8,3$	0,021/0,668

kehamassi indeks ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ):  $19\text{-}25 \text{ kg}/\text{m}^2$  – normaalne,  $26\text{-}30 \text{ kg}/\text{m}^2$  – ülekaal,

üle 30 – rasvumine

*L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega juustu kolme nädala jooksul söönud isikuteil (10  $(5 \times 10^8$  mikroobirakku/g  $\times$  50 g) täheldati pärast katse lõppu vererõhu (süstoolne ja diastoolne) langust, kuigi kehamassi indeks ei muutunud.

#### ***Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 mõju seedekulgla mikroflorale**

**Metoodika:** Rooja mikrofloora kvantitatiivseks analüüsiks ja laktobatsillide liikide määramiseks kasutati TÜ mikrobioloogia instituudis välja töötatud metodikaid (Mikelsaar ME, Väljaots ME, Lenzner AA. Anaerobe Inhalts- und Wandmikroflora des Magen-Darm-Kanals. Die Nahrung, 1984, 23, 6/7, 727-733; Sepp E., Julge K., Vasar M., Naaber P., Björksten B., Mikelsaar M. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. Acta Paediatrica, 1997, 86, 956-961.)

**Tabel 11.** Laktobatsillide hulgad vabatahtlike katsealuste rooja proovides ( $\log_{10}$  mikroobirakku /g roojas)

	<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380 sisaldusega		Kontroll-juust		<i>P</i> väärused paired t-test  BL1 vs PRO/ BL2 vs PL
	BL1 keskmne ± sthalve vahemik (mediaan)	PRO keskm ± sthalve vahemik (mediaan)	BL2 keskm ± sthalve vahemik (mediaan)	PL keskm ± sthalve vahemik (mediaan)	
LB koguhulk <i>kultiveerimine</i>	5,1 ± 1,9 0 – 6,3 (5,9)	6,7 ± 1,0 4,9 – 8,6 (6,7)	5,7 ± 1,4 4,0 – 8,6 (5,3)	ei määratud	0,025 /
LB koguhulk <i>FISH</i>	8,4 ± 0,1 8,1 – 8,6 (8,4)	8,4 ± 0,3 7,9 – 9,1 (8,3)	8,4 ± 0,3 8,0 – 8,8 (8,3)	8,3 ± 0,3 7,6 – 9,0 (8,2)	0,748 / 0,244
<i>L. plantarum</i> * vahemik/ mediaan prevalents	0 – 5,3 (0) 3 / 12	0 – 8,6 (5,9) 10 / 12	0 – 4,3 (0) 2 / 12	ei määratud	0,006 / ND

Täheldati laktobatsillide üldhulga suurenemist ja *L. plantarum*\* kui liigi osakaalu tõusu ( $p=0,006$ ) laktoflooras.

**Tabel 12.** *L. plantarum*'i kui liigi esinemissagedus uuritavate roojas katseperioodi

5 alguses (BL1), probiootilise juustu söömise järgselt (PRO) ja taastusperioodis (BL 2)

Grupp	BL 1	PRO	BL 2
Grupp 1 (n=12)	3 / 12	10 / 12	2 / 12
Grupp 2 (n=12)	2 / 12	3 / 12	4 / 12

Suurenes ka *L. plantarumi* kui liigi esinemissagedus (*Fischer exact test*, 3/12 vs 10/12,  $p=0,006$ ) *L. plantarum* Tensia DSM 21380 grupi korral.

Seega *L. plantarum* Tensia DSM 21380 osutab inimese seedekulgla mikrofloore

10 soodsat toimet, tõstes kasulike laktobatsillide hulka sooles.

Tuleb märkida, et suurendades fakultatiivselt hetero-fermentatiivsete laktobatsillide (FHEL) hulka  $4,7 \pm 1,3$  vs.  $5,7 \pm 1,3$ ,  $p=0,029$ ), kuhu probiootiline *L. plantarum* Tensia DSM 21380 ise kuulub, suurendas ta ka ootamatult obligaatselt homofermentatiivsete laktobatsillide (OHOL) hulka soolestikus ( $4,6 \pm 1,1$  vs.  $5,7 \pm 1,5$ ,  $p=0,014$ ). Seega aitab *L.*

15 *plantarum* Tensia DSM 21380 oluliselt kaasa laktofloora stabilisatsioonile seedekulglas.

#### **Vabatahtlike isikute seedekulgla laktobatsillide hulgad molekulaarsel meetodil** (fluorescent *in situ* hybridization, FISH)

**Metoodika:** Rooja proovid lahjendati 1/10 PBS lahuses. Bakterirakud fikseeriti 4%

20 formaldehüüdilahusega, hoiti 4°C. FISH teostati Harmsen meetodi järgi Lab 158 sondiga

märgistatud Cy 3 värviga. Märgistatud mikroobirakud loendati fluoresentsmikroskoopiliselt.

Tulemused on esitatud tabelis 11 koos bakterioloogia andmetega. Laktobatsillide hulgad oluliselt ei muutunud FISH meetodil, mis registreerib ka surnud laktobatsillide rakke.

5

**L. plantarum Tensia DSM 21380 sisaldavat juustu söönud isikute rooja laktobatsillide profiil DGGE analüüsil**

**Metoodika:** PCR produkt eraldati 30-60% akrüülamiidiga DGGE geelektorfooresiga, kasutades Dcode<sup>TM</sup> System tehnikat (Bio-Rad, Hercules, California). Saadud geelid

10 analüüsiti BioNumerics 2.5 (Applied Maths, Belgia) programmiga Pearsoni korrelatsiooni alusel (Heilig HG, Zoetendaal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans, ADL, de Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus* ssp. and other Lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 114-123). Geeli fotod (Joonised Fig. 4a, 4b, 4c) 15 näitavad laktofloora 16S rDNA amplifitseerimise alusel isiku roojas esinevate tähtsamate laktobatsillide profiili.

Kasutades UMPAG arvuti programmi, oli võimalik leida sarnasuse maatriksid erinevate geelide vahel, s.o. selgitada, kas esineb olulisi muutusi (>20%) üksikute geelide, s.o. erinevate määramisperioodide vahel.

20

**Tabel 13.** *L. plantarum* Tensia DSM 21380 gruvi laktofloora muutumine katse jooksul

Inimene	0. päev	21. päev	35. päev	56. päev
1				
2				
4				
5				
7				
8				
10				
12				
16				
17				
18				
21				

Tabelist 13 on näha, et *L. plantarum* Tensia DSM 21380 grupis muutus 21. päeval isikutele omane laktofloora muster 10 inimesel 12-st ( $p<0,05$ ). Samalaadse tulemuse juurde jõudsime *L. plantarum* kolonisatsiooni muutuste jälgimisel ka bakterioloogiliselt. Kahe nädala möödudes püsis muutus 4 isikul.

5

#### Polüamiinide ja biogeensete amiinide sisaldus vabatahtlike uriinis

Biogeensete amiinide määramiseks enne ja pärast *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldaava toiduaine söömist ja taatusperioodi efektiivsuse hindamiseks kasutati hommikust uriini ja gaaskromatograafilist meetodit.

- 10 **Metoodika:** Uriiniproovid derivatiseeriti propüülkloroformaadiga gaaskromatograafiliseks analüüsiks modifitseeritud Uglandi meetodi järgi (Ugland HG; Krough M, Rasmussen KE: Aqueous alkylchloroformate derivatization and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography. *J Chromatography B Biomed Sci Appl* 1997;701:29-38).
- 15 GC analüüs teostati GC Hewlett-Packard HP mudel 6890 (Hewlett Packard, Avondale, PA, USA), kasutati kapillaarkolonni HP-5 19091J-433 (30 m  $\times$ 0,25 mm; 0,25  $\mu\text{m}$ ). Kolonni temperatuuri programm 150°C 1 min, 20°C/min 280°C 5 min; detektor (FID) 250°C. Biogeensete amiinide kontsentratsioonid arvutati nmol/mol kreatiniini kohta.
- 20 **Tabel 14.** Polüamiinide sisaldus *L. plantarum* Tensia DSM 21380 juustu tarvitajate hommikuses uriinis (nmol/mol kreatiniini kohta)

	Probiootiline juust <i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380 lisandiga		Kontroll-juust		<i>P</i> väärused
	BL1 keskmene $\pm$ sthalve vahemik (mediaan)	PRO keskmene $\pm$ sthalve vahemik (mediaan)	BL2 keskmene $\pm$ sthalve vahemik (mediaan)	PL keskmene $\pm$ sthalve vahemik (mediaan)	
Put	0,110 $\pm$ 0,139 0 – 0,467 (0,046)	0,090 $\pm$ 0,120 0 – 0,396 (0,041)	0,073 $\pm$ 0,110 0 – 0,384 (0,037)	0,027 $\pm$ 0,024 0 – 0,055 (0,037)	0,496 / 0,275
acPut	0,607 $\pm$ 0,558 0 – 2,159 (0,478)	0,567 $\pm$ 0,431 0,191 – 1,758 (0,430)	0,817 $\pm$ 1,027 0,091 – 3,916 (0,550)	0,573 $\pm$ 0,391 0,82 – 1,403 (0,486)	0,510 / 0,677
DAP	0,148 $\pm$ 0,125 0 – 0,344 (0,159)	0,056 $\pm$ 0,084 0 – 0,205 (0)	0,090 $\pm$ 0,163 0 – 0,432 (0)	0,061 $\pm$ 0,099 0 – 0,246 (0)	0,016 / 0,844
acSpd	0,181 $\pm$ 0,137 0 – 0,428 (0,144)	0,227 $\pm$ 0,142 0,053 – 0,493 (0,182)	0,197 $\pm$ 0,148 0,039 – 0,495 (0,195)	0,258 $\pm$ 0,221 0,041 – 0,686 (0,186)	0,016 / 0,244
Cad	0,012 $\pm$ 0,026 0 – 0,084 (0)	0,038 $\pm$ 0,062 0 – 0,156 (0)	0,041 $\pm$ 0,077 0 – 0,248 (0)	0,015 $\pm$ 0,037 0 – 0,123 (0)	0,125 / 0.

BL1- katseperioodi alguses, PRO -probiootilise juustu söömise järgselt, BL 2- taastusperiood

Put – putrestsiin (*putrescine*), acPut – N-atsetüülputrestsiin (*N-acetylputrescine*), DAP – 1,3-diaminopropaan (*1,3-diaminopropane*), acSpd – N8-atsetüülspermidiin (*N 8-acetylspermidine*), Cad – kadaveriin (*cadaverin*)

Katseisikute uriinis suurenemine *L.plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega probiootilise juustu tarvitamisel atsetüleeritud spermidiini sisaldus, mis näitab polüamiinide metabolismi intensiivistumist veres ja kudedes. DAP sisaldus uriinis aga vähenes.

10

### **Korrelatsioonid**

Leiti, et süstoolse vererõhu langus on seotud laktobatsillide hulga suurenemisega ning putrestsiini sisalduse suurenemisega uriinis (joonis Fig.5).

15

## **OHUTUS**

Pärast juustukatse lõppu ei olnud inimeste olulised süsteemsed põletiku markerid (ultrasensiivne C-reaktiivne valk ja leukotsüütide üldarv) suurenenedud ja olid normipiires (Tabel 15). Ka ei esinenud muutusi IgE kui allergia puhul olulise markeri osas.

Probiootilise juustu tarvitamine ei muutnud ka valgeverepildis (leukogramm) rakkude protsentuaalset vahekorda võrreldes katseeelse perioodiga.

**Tabel 15.** Põletiku näitajad katse alg- ja lõpp-perioodis

	Probiootiline juust <i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380 sisaldusega		Kontroll-juust		P väärused	Normi väärused
	enne	pärast	enne	pärast		
Ultrasensiivne C-reaktiivne valk, mg/L	1,1 ± 0,6	1,0 ± 0,3	1,4 ± 0,9	1,6 ± 1,3	0,3 / 0,9	< 5 mg/L
Leukotsüütide üldarv x10 <sup>9</sup> /L	5,2 ± 0,8	5,6 ± 1,3	5,1 ± 1,1	5,5 ± 1,1	0,6 / 0,14	4 - 10 x 10 <sup>9</sup> /L

*L. plantarum* Tensia DSM 21380 lisandiga probiootilise juustu tarvitamine ei põhjustanud inimestel abdominaalseid vaevusi (kõhuvalu, kõhupuhitus, täiskõhutunne) ega ka kehamassi indeksi tõusu, samuti ei mõjutanud glükoosi ja lipiidide taset veres.

- 5 Seega võib väita, et *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldav juust ei kutsu tervetel isikutel esile ei põletikureaktsioone, üldist allergilist sensibilisatsiooni ega kahjusta oluliste organite tööd.

**Tabel 15 A.** Vabatahtlike isikute vere biokeemilised näitajad peale *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega probiootiliste juustude tarvitamist

	Probiootiline juust		Kontroll-juust		<i>P</i> väärused (BL1 vs BL2, PRO vs PL) }
	BL1	PRO	BL2	PL	
Glükoos mmol/l	4.5 ± 0.7 2.8 – 5.5 (4.5)	4.6 ± 0.5 3.6 – 5.5 (4.5)	4.6 ± 0.6 3.9 – 6.0 (4.5)	4.7 ± 0.5 3.8 – 5.9 (4.8)	0.922 / 0.289 (1.0, 0.48)
Üld- koleste- rool, mmol/l	4.6 ± 0.9 3.2 – 6.6 (4.55)	4.6 ± 1.1 3.1 – 7.2 (4.4)	4.2 ± 0.6 3.1 – 5.1 (4.1)	4.5 ± 0.9 2.8 – 6.3 (4.4)	0.828 / 0.102 ( <b>0.003</b> , 0.671)
HDL- koleste- rool, mmol/l	1.7 ± 0.5 1.0 – 2.6 (1.7)	1.7 ± 0.3 1.1 – 2.3 (1.6)	1.6 ± 0.4 0.9 – 2.3 (1.7)	1.7 ± 0.4 1.2 – 2.5 (1.6)	0.628 / 0.433 (0.444, 0.623)
LDL- koleste- rool, mmol/l	2.7 ± 0.8 1.4 – 4.3 (2.7)	2.8 ± 1.1 1.5 – 5.7 (2.5)	2.6 ± 0.7 1.5 – 3.7 (2.4)	2.6 ± 0.7 1.2 – 4.3 (2.5)	0.296 / 0.827 (0.336, 0.271)
Tri- glütse- riidid, mmol/l	1.0 ± 0.6 0.5 – 2.8 (0.8)	1.0 ± 0.5 0.4 – 2.1 (1.0)	0.9 ± 0.4 0.5 – 1.8 (0.8)	1.2 ± 0.7 0.5 – 2.6 (0.9)	0.978 / 0.140 (0.306, 0.428)

- 10 BL1 - katseperioodi alguses, PRO - probiootilise juustu söömise järgselt, BL 2-taastusperiood

*L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldava juustu söömine ei põhjustanud ebasoovitavaid muutusi glükoosi sisalduses vereseerumis ega ka lipiidide metabolismi näitajates (Tabel

15 A). Üldkolesterooli ja kolesterooli fraktsioonide (HDL-, LDL-kolesterol ja triglütseriidid) väärtsused jäid normi piiresse.

**Näide 4. *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega juustu toime eakate**

**5 tervete vabatahtlike vere kliinilistele näitajatele**

Kliinilises katsetuses (randomiseeritud, kaksikpime, platseebokatse) eakatel tervetel vabatahtlikel uuriti *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega juustu ohutust tarbijale ja toimet vere kliinilistele näitajatele (kliinilise katse registreerimise rahvusvaheline number ISRCTN45791894).

10

**Inimesed ja meetodid:** Uuritavasse rühma kuulusid tervisekaebuseta eakad vabatahtlikud naised ja mehed (M/N 2/19) vanuses 61 – 84 eluaastat. Võimaliku varjatud diabeedi väljalülitamiseks määratigi glükoosi ja glükohemoglobiin (HbA1c) vereseerumist.

15

Test-juustud sisaldasid tüve *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 iduarvuga 2x $10^7$  mikroobirakku/g juustu kohta. Enne test-juustu manustamist vabatahtlikele inkubeeriti juustu nimetatud mikroorganismiga 30 päeva jooksul 12°C juures. Kontrolljuustuna kasutati sama ajal valmistatud ilma probiootiliste lisanditeta Eesti juustu. Katse viidi läbi kaksikpime cross-over randomiseeritud uuringuna. Alustati 3 nädalast juustu tarvitamist test-juustuga. Järgnes kahe nädala pikkune vaheperiood (washout), pärast seda tarvitasiid katseisikud 3 nädalat kontrolljuustu. Päevane tarbitav juustukogus oli 50g.

20

**Tabel 16.** Vabatahtlike vanade isikute kliinilised näitajad pärast *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega probiootiliste juustude tarvitamist

	<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380 sisaldusega probiootiline juust		Kontrolljuust		<i>P</i> väärtsused
	Enne	Pärast	Enne	Pärast	
Kehamassi indeks, (kg/m <sup>2</sup> )	27,6 ± 4,1	27,5 ± 4,2	27,5 ± 4,0	27,6 ± 4,2	0,723 / 0,793
Süstoolne vererõhk (mm Hg)	138,1 ± 16,6	132,2 ± 16,2	138,7 ± 21,4	135,2 ± 21,1	<b>0,038</b> / 0,185
Diastoolne vererõhk (mm Hg)	77,2 ± 7,7	73,1 ± 8,0	76,4 ± 8,9	74,8 ± 9,2	<b>0,004</b> / 0,246

Kehamassi indeks ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ): 19-25  $\text{kg}/\text{m}^2$  – normaalne, 26-30  $\text{kg}/\text{m}^2$  – ülekaal, üle 30 – rasvumine

5 *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega juustu kolme nädala jooksul söönud eakatel isikutel ( $2 \times 10^7$  mikroobirakku/g x 50 g) tähdeldati pärast katse lõppu vererõhu (süstoolne ja diastoolne) langust. Samas ei suurenenud suhteliselt rasvarikka juustu tarvitamise järel vanade inimeste kehamassi indeks (Tabel 16).

## OHUTUS

10

*L. plantarum* Tensia DSM 21380 lisandiga probiootilise juustu tarvitamine ei põhjustanud eakatel inimestel abdominaalseid vaevusi (kõhuvalu, kõhupuhitus, täiskõhutunne).

15 Pärast juustukatse lõppu ei olnud uuritavatel inimestel süsteemse põletiku olulised markerid (ultrasensiitivne C-reaktiivne valk ja leukotsüütide üldarv) suurenenud ja püsisisid normi piires (Tabel 17).

**Tabel 17.** Vabatahtlike vanade isikute vere põletiku näitajad katse alg- ja lõpp-perioodis

	Probiootiline juust <i>L. plantarum</i> DSM 21380 sisaldusega		Kontroll-juust		P väärused	Normi väärused
	enne	pärast	enne	pärast		
Ultrasensiitivne C-reaktiivne valk, mg/L	0,13/0,81	0,13/0,81	0,13/0,81	0,13/0,81	0,13/ 0,81	< 5 mg/L
Leukotsüütide üldarv $\times 10^9/\text{L}$	$5,1 \pm 1,3$	$4,9 \pm 1,3$	$5,0 \pm 1,0$	$5,0 \pm 1,6$	0,33/ 0,33	$4 - 10 \times 10^9/\text{L}$

20 Kõrvalekaldeid normist ei tähdeldatud ka olulise allergia markeri IgE ega ka neeru ja maksa tööd iseloomustavate markerite (seerumi kreatiniin, albumiin, alaniini transaminaas (ALAT), aspartaadi transaminaas (ASAT)) osas.

Võrreldes vereseerumis üldkolesteroli hulka probiootilise ja platseebo perioodi lõpus, tähdeldati olulist langust *L. plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldava juustu söömisel. 25 Ebasoovitava muutusena suurendas probiootilise juustu tarvitamine glükoosi sisaldust

vereseerumis 0,3 ühiku võrra, kuid võrreldes platseebo perioodiga polnud see muutus statistiliselt oluline (Tabel 18).

**Tabel 18.** Vabatahtlike vanade isikute vere biokeemilised näitajad pärast *L. plantarum*

5 Tensia DSM 21380 sisaldusega probiootiliste juustude tarvitamist

	Probiootiline juust		Kontroll-juust		<i>P</i> vääritud (BL1 vs BL2, PRO vs PL)
	BL1	PRO	BL2	PL	
Glükoos, mmol/l	5,1 ± 0,5	5,4 ± 0,5	5,3 ± 0,5	5,4 ± 0,4	0,036 / 0,144 (0,212; 0,757)
Üldkolesterol, mmol/l	5,7 ± 0,8	5,6 ± 0,8	5,9 ± 0,9	5,7 ± 0,8	0,343 / 0,198 (0,044; 0,087)
HDL-kolesterol, mmol/l	1,7 ± 0,4	1,6 ± 0,4	1,7 ± 0,4	1,7 ± 0,5	0,411 / 0,514 (0,073; 0,118)
LDL-kolesterol, mmol/l	3,9 ± 0,8	3,8 ± 0,7	4,1 ± 0,9	3,8 ± 0,7	0,557 / 0,052 (0,075; 0,9187)
Triglütseriidid, mmol/l	1,1 ± 0,6	1,1 ± 0,6	1,2 ± 0,5	1,1 ± 0,5	0,380 / 0,394 (0,411; 0,097)

BL1 - katseperioodi alguses, PRO - probiootilise juustu söömise järgselt, BL 2-taastusperiood

10 Seega võib väita, et *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisalda juust ei kutsu tervisekaebuseta eakatel isikutel esile ei põletikureaktsioone, üldist allergilist sensibilisatsiooni ega kahjusta oluliste organite tööd.

**Näide 5. *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldaava jogurti toime tervete 15 vabatahtlike vereseerumi näitajatele ja seedemikrofloreale**

Kliinilise katse (*cross-over* randomiseeritud platseeboga kontrollitud kaksikpime katse) eesmärgiks oli hinnata *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldaava jogurti ohutust ja toimet tervete vabatahtlike seedetrakti mikrofloreale (kliinilise katse 20 registreerimise rahvusvaheline number ISRCTN68198472).

**Inimesed ja meetodid:** osalejateks olid 25 tervet mõlemast soost vabatahtliku isikut (M/N 9/16;  $31,4 \pm 10,0$  a). Võimaliku varjatud diabeedi väljalülitamiseks määratiti glükoosi ja glükohemoglobiini (HbA1c) vereseerumist.

Test-jogurt sisaldas tüve *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 ( $5 \times 10^6$ - $10^7$

5 mikroobirakku/ml). Ilma probiootilise lisandita jogurt oli kontrolliks.

Alustati 3 nädalast jogurti tarvitamist test-jogurtiga. Järgnes kahe nädala pikkune vaheperiood (*washout*), pärast seda tarvitasiid katseisikud 3 nädalat kontrolljogurtit. Päevane doos oli  $10^8$ - $5 \times 10^9$  mikroobirakku).

## 10 OHUTUS

Pärast katse lõppu ei olnud inimeste olulised süsteemsed põletiku markerid (ultrasensiivne C-reaktiivne valk ja leukotsüütide üldarv) muutunud ja olid normi piires (Tabel 19). Kõrvalekaldeid ei tähdeldatud allergia puhul olulise markeri IgE osas.

## 15 Tabel 19. Põletikumarkerid katse eel ja lõpus

	<i>L. plantarum</i> Tensia DSM 21380 sisaldusega probiootiline jogurt		Kontrolljogurt		P väärtsused Algvääratus vs. probiootiline/ algvääratus vs. kontrolljogurt	Stand- ard väärts- sed
	enne	pärast	enne	pärast		
U-CRP, mg/L	$0,7 \pm 1,0$	$1,1 \pm 1,3$	$1,2 \pm 1,5$	$1,2 \pm 1,4$	0.782 / 0.306	< 5 mg/L
Leukotsüütide üldhulk $\times 10^9/L$	$5,8 \pm 1,2$	$6,2 \pm 1,3$	$6,0 \pm 1,4$	$6,2 \pm 1,2$	0.101 / 0.411	$4 - 10 \times 10^9/L$

Kolme nädala pikkune probiootilise jogurti manustamine ei mõjutanud lipiidide metabolismi näitajaaid negatiivselt (Tabel 20). Üldkolesteroli ja kolesteroli fraktsioonide (HDL-, LDL -kolesterol ja triglütseriidid) väärtsused jäid normi piiresse.

Table 20. Tervete vabatahtlike vereseerumi biokeemilised näitajad pärast *L. plantarum*

25 Tensia DSM 21380 jogurti söömist.

	Probiootiline jogurt		Kontrolljogurt		<i>P</i> väärtsused (BL1 vs BL2, PRO vs PL)
	BL1	PRO	BL2	PL	
Glükoos, mmol/l	5,1 ± 0,5	5,4 ± 0,5	5,3 ± 0,5	5,4 ± 0,4	0,036 / 0,144 (0,212, 0,757)
Üldkolesterol, mmol/l	4,7 ± 0,7	4,8 ± 0,7	5,0 ± 0,6	4,7 ± 0,6	0,315 / 0,020 (0,018, 0,271)
HDL-kolesterol, mmol/l	5,0 ± 1,1	5,0 ± 1,2	5,1 ± 1,4	5,0 ± 1,0	0,808 / 0,411 (0,676, 0,411)
LDL-kolesterol, mmol/l	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,4	1,6 ± 0,4	1,6 ± 0,4	0,158 / 0,432 (0,412, 0,747)
Triglütseriidid, mmol/l	3,1 ± 1,1	3,2 ± 1,0	3,2 ± 1,2	3,1 ± 1,0	0,396 / 0,230 (0,449; 0,170)

BL1 - katseperioodi alguses, PRO - probiootilise juustu söömise järgselt, BL 2-taastusperiood

Pärast probiootilise jogurti manustamist täheldati mõningast vereseerumi glükoosi 5 vääruste tõusu (väärtsuselt 5,1 väärtsuseni 5,4  $p= 0.036$ ), mis aga siiski jäid normi piiresse (3,3 – 5,5 mmol/l). Seega võib väita, et *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 sisaldusega jogurt ei kutsu tervetel isikutel esile ei süsteemseid põletikureaktsioone, üldist allergilist sensibilisatsiooni ega kahjusta oluliste organite tööd.

## PATENDINÕUDLUS

1. Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380, mis tekitab konjugeeritud linoohapet (CLA), vesinikperoksiidi ( $H_2O_2$ ), lämmastikmonooksiidi (NO) ja mis omab antioksüdantsust ning plantaritsiini tekitamiseks vajalikke plnE, plnF, plnJ, plnK geene.
2. Mikroorganism vastavalt nõudluspunktile 1 luofiliseeritud kujul.
3. Nõudluspunktile 1-2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine antimikroobse ja vererõhku alandava probiootikuna.
4. Nõudluspunktile 1-2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine soolestiku laktobatsillide seas domineeriva hulga saavutamiseks.
5. Nõudluspunktile 1-2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine organismis polüamiinide ringkäigu suurendamiseks.
6. Nõudluspunktile 1-2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine vererõhku alandava ravimi valmistamiseks.
7. Nõudluspunktile 1-2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine toiduaine realiseerimisaja pikendamiseks.
8. Nõudluspunktile 1-2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine toiduainetes kontamineerivate mikroobide allasurumiseks.
9. Mikroorganismi tüve kasutamine vastavalt nõudluspunktile 8, kus nimetatud mikroobid on toorpiimast pärit mittestarter-laktobatsillid ja/või patogeenid ja/või toiduainesse pärast selle valmistamist sattunud patogeenid.
10. Mikroorganismi tüve kasutamine vastavalt nõudluspunktile 8, kusjuures toiduaineeks on piimatoode.
11. Mikroorganismi tüve kasutamine vastavalt nõudluspunktile 10, kusjuures piimatooteks on fermenteeritud piimatoode, juust, kodujuust, kohupiim, jogurt, jäätis, või, määrdajuust.
12. Nõudluspunktile 1 -2 vastavat mikroorganismi tüve sisaldav toiduaine.
13. Toiduaine vastavalt nõudluspunktile 12, milleks on piimatoode.
14. Toiduaine vastavalt nõudluspunktile 13, milleks on fermenteeritud piimatoode, juust, kodujuust, kohupiim, jogurt, jäätis, või, määrdajuust.
15. Nõudluspunktile 1 -2 vastavat mikroorganismi tüve sisaldav kompositsioon.

1 / 7

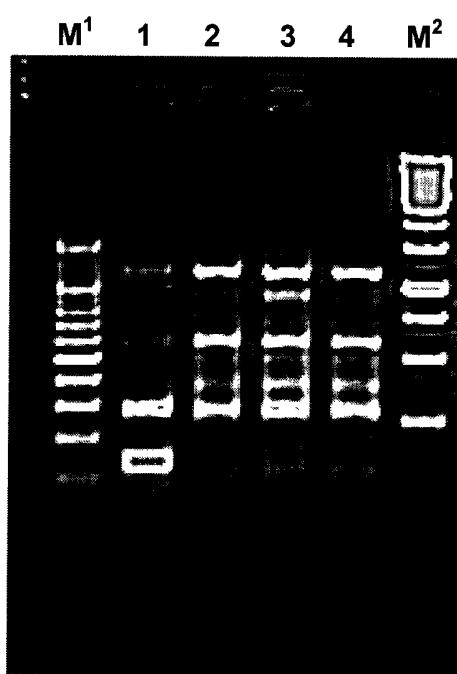


Fig.1

2 / 7

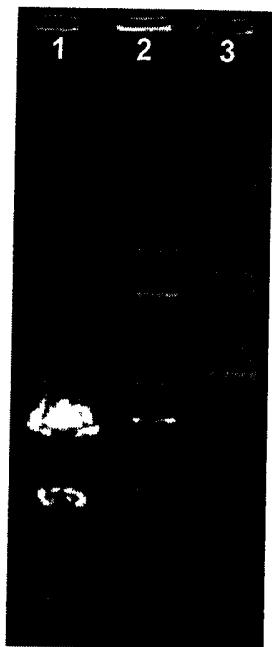
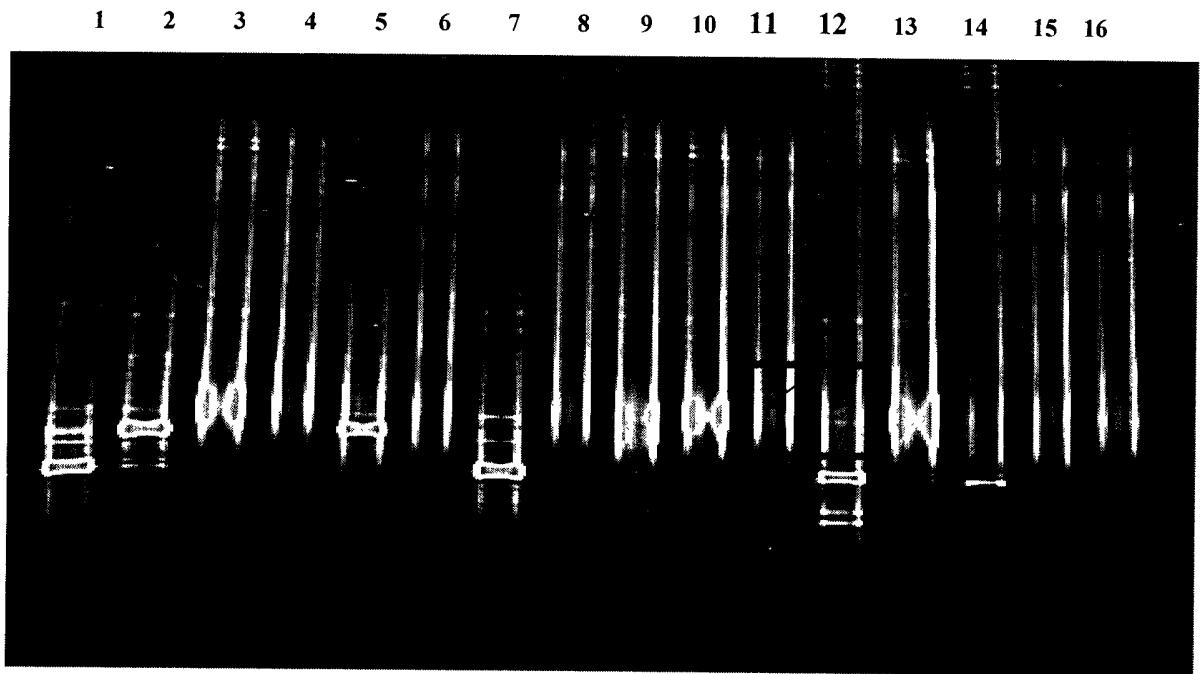


Fig.2

**3 / 7**



**Fig. 3**

4 / 7

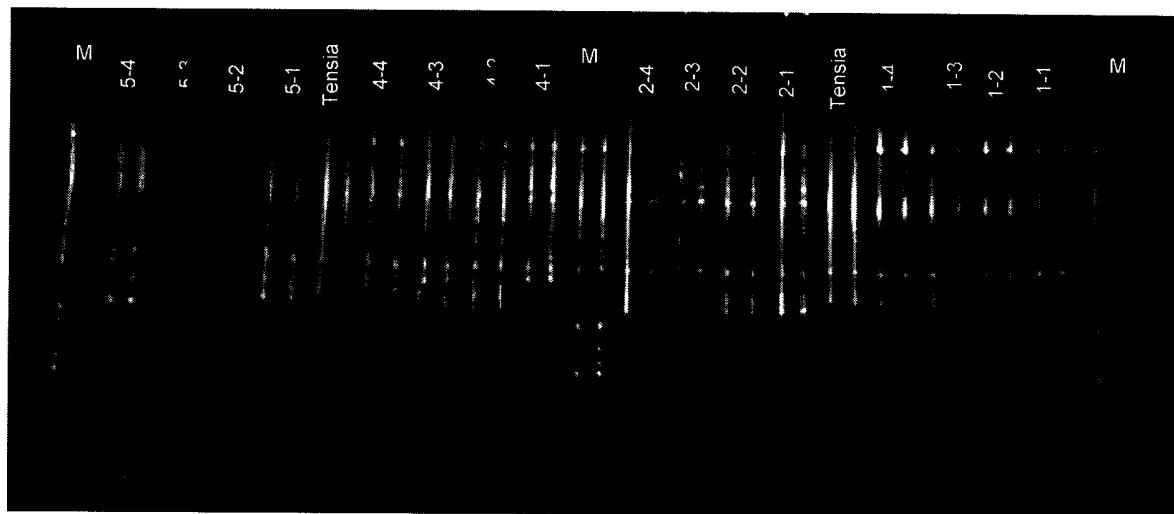
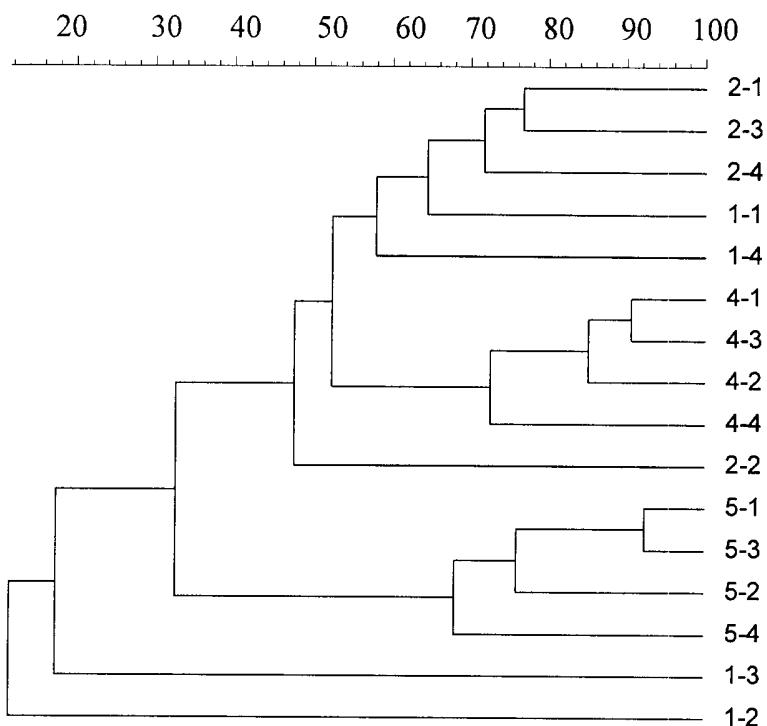


Fig. 4a

5 / 7

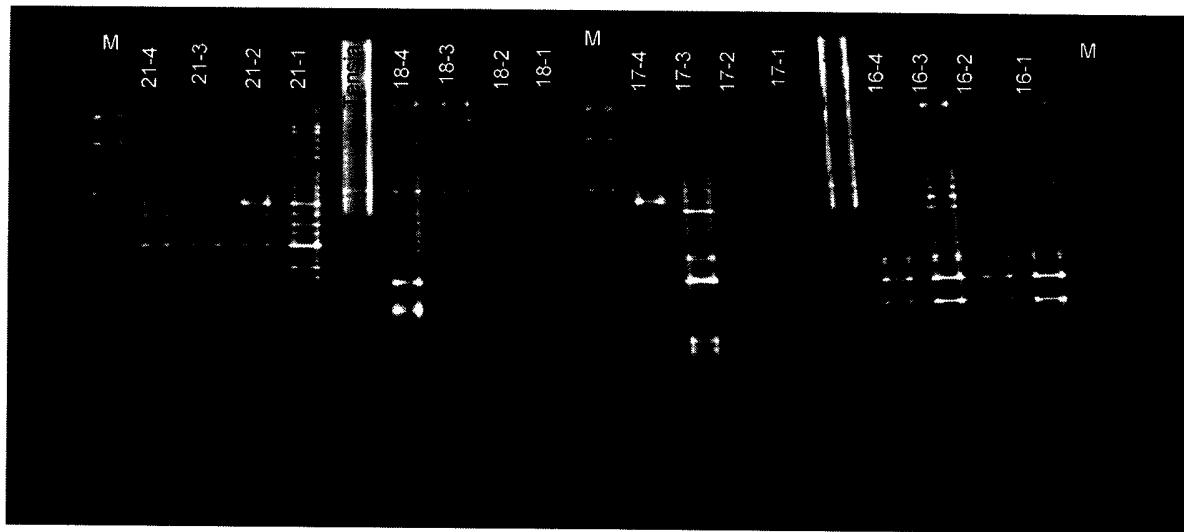
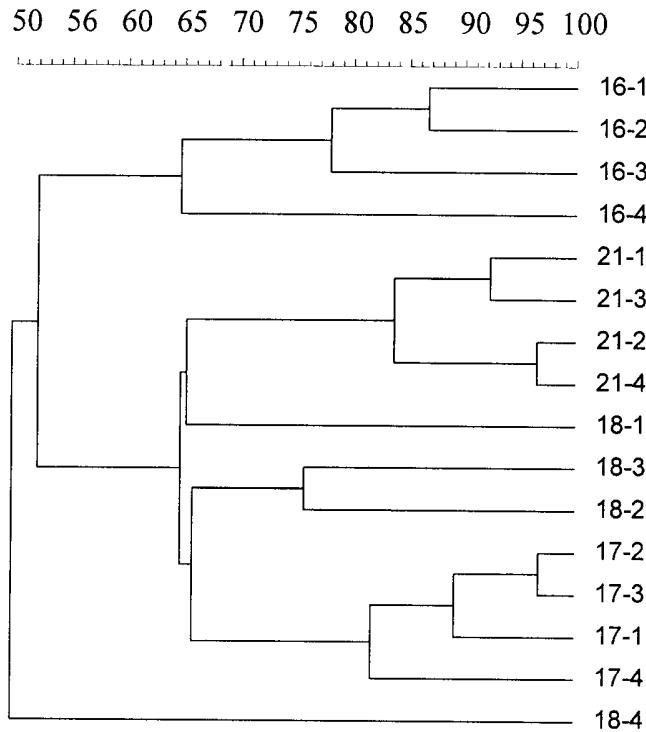


Fig. 4b

6 / 7

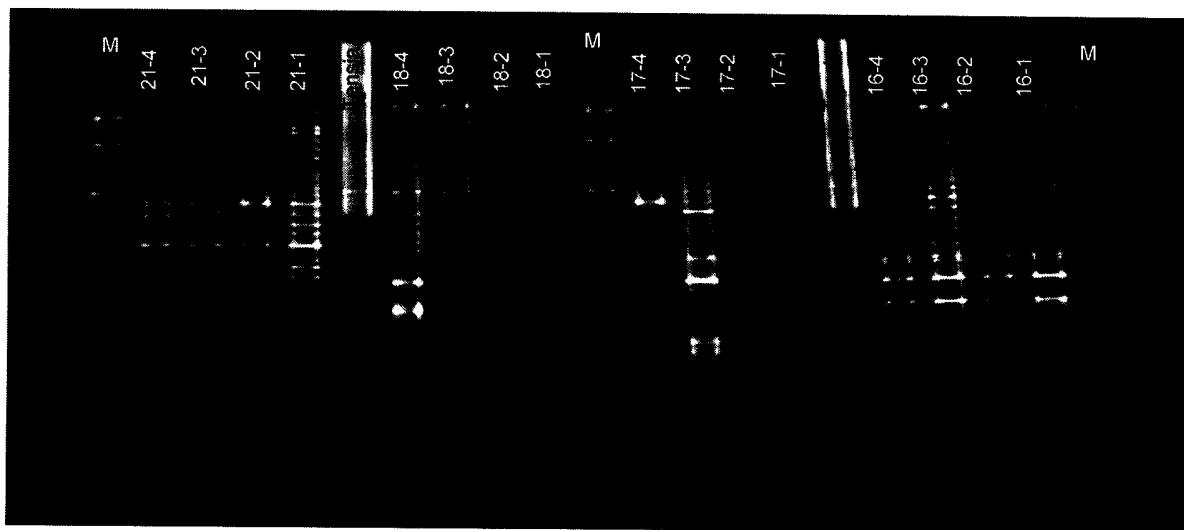
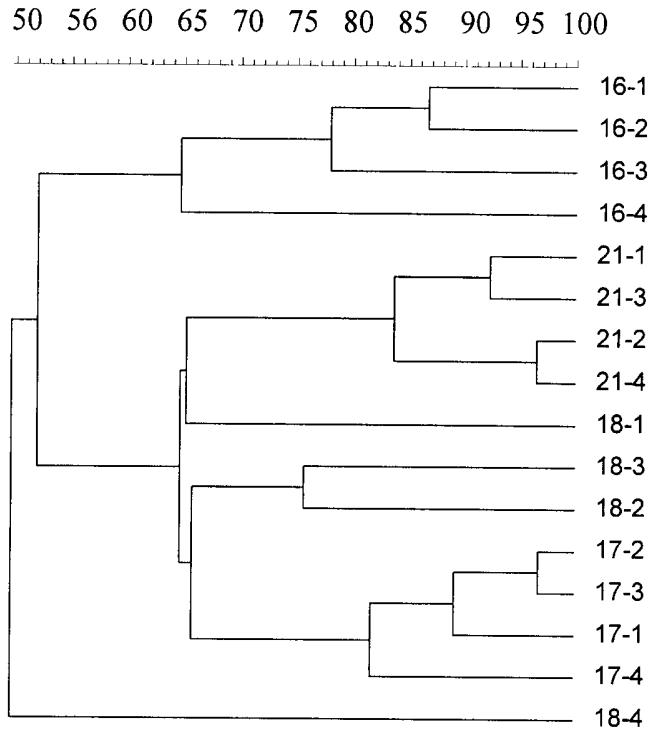


Fig. 4c

7 / 7

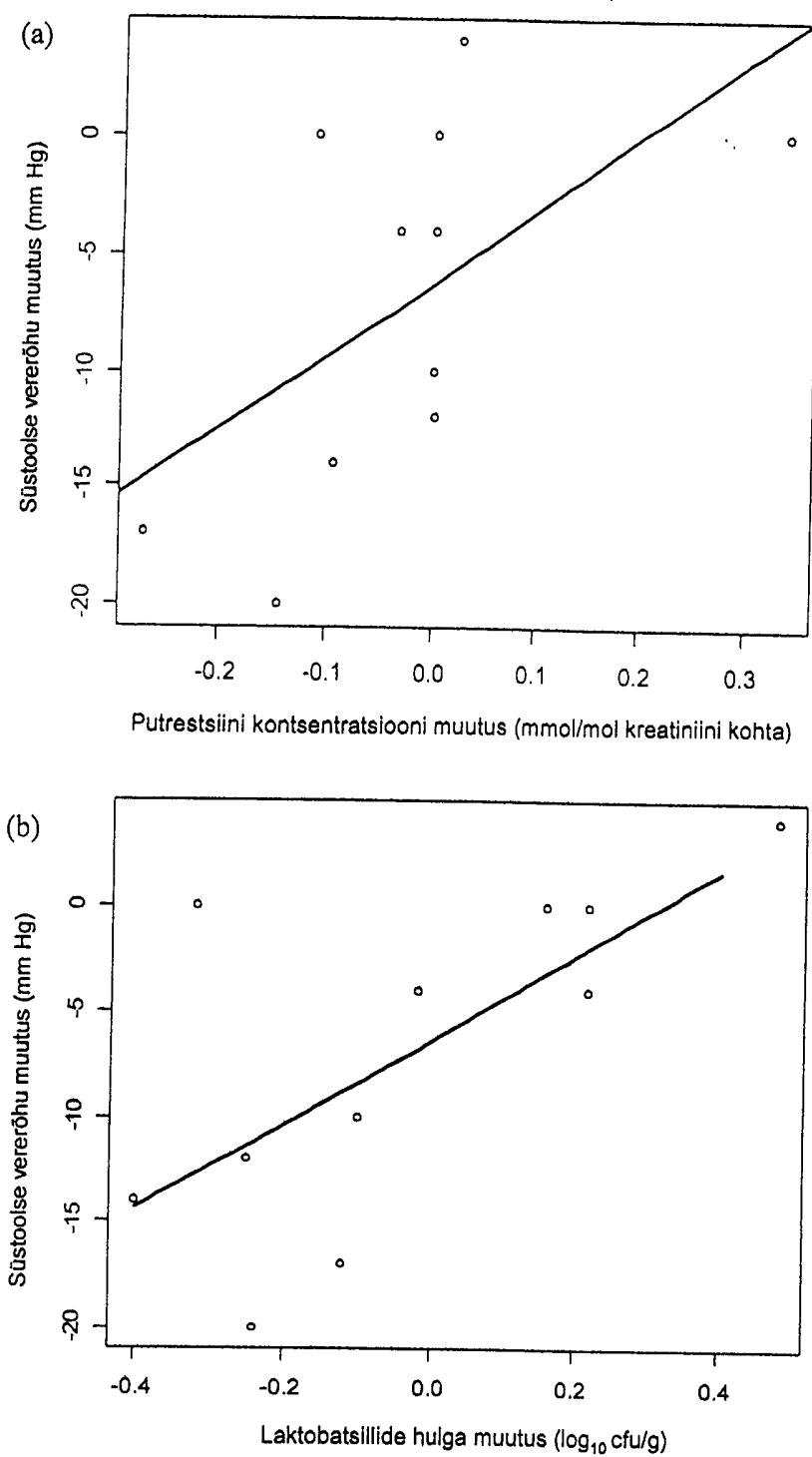


Fig.5

**JÄRJESTUSE LOETELU**

<110> OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskus

<120> Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus plantarum* Tensia DSM 21380 kui antimikroobne ning vererõhku alandav probiootik, seda sisaldav toiduaine ja kompositsoon ning mikroorganismi kasutamine vererõhku langetava ravimi valmistamiseks ning meetod toiduaines mittestarter-laktobatsillide toime allasurumiseks

<160> 8

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> *Lactobacillus plantarum*

<223> tähistus E1F

<400> 1

ATCGGCAGGCCAACAG

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> *Lactobacillus plantarum*

<223> tähistus E1R

<400> 2

GCGTGACCGTGAATTAAATGC

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> *Lactobacillus plantarum*

<223> tähistus F1F

<400> 3

GACAGCGCTAATGACCCAATC

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> *Lactobacillus plantarum*

<223> tähistus F1R

<400> 4

GCGTGACCGTGAATTAAATGC

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> *Lactobacillus plantarum*

<223> tähistus J1F

<400> 5

CCCAACAACCCCGTTCAAC

<210> 6  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus plantarum*  
<223> tähistus J1R  
<400> 6  
TGCTACAGTAAAGGGAGAGGTATGAC

<210> 7  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus plantarum*  
<223> tähistus K2F  
<400> 7  
ACTTATTATAATCCCTTGAACCACCAA

<210> 8  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus plantarum*  
<223> tähistus K2R  
<400> 8  
GCTGACGCTGAAAAGAATATTCTG