



(11) EE 05341 B1

(51) Int.Cl.  
*C12N 1/20 (2010.01)*  
*A23L 1/30 (2010.01)*

## (12) PATENDIKIRJELDUS

(21) Patenditaotluse number:	P200800027	(73) Patendiomanik:
(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev:	13.05.2008	<b>OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskus</b> <b>Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE</b>
(24) Patendi kehtivuse alguse kuupäev:	13.05.2008	(72) Leiutise autorid:
(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev:	15.12.2009	<b>Marika Mikelsaar</b> <b>Jakobsoni 11-4, 51005 Tartu, EE</b>
(45) Patendikirjelduse avaldamise kuupäev:	16.08.2010	<b>Epp Songisepp</b> <b>Tähe 105-7, 50107 Tartu, EE</b>
(83) Biotehnoloogilise aine, sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed:	DSM 21379 16.04.2008 DSMZ	<b>Imbi Smidt</b> <b>Voika küla, Nõo vald,</b> <b>61601 Tartu maakond, EE</b>
		<b>Jelena Stsepetova</b> <b>Mõisavahе 2-8, 50707 Tartu, EE</b>
		<b>Pirje Hütt</b> <b>Ropka 6-33, 50110 Tartu, EE</b>
		<b>Mihkel Zilmer</b> <b>Puusepa 37, 50406 Tartu, EE</b>
		<b>Kai Truuusalu</b> <b>Tehase 15-10, 50107 Tartu, EE</b>
		<b>Kalle Kilk</b> <b>Suur-Kaar 21-3, 50404 Tartu, EE</b>
		(74) Patendivolinik:
		<b>Sirje Kahu</b> <b>Patendibüroo Usterval OÜ</b> <b>Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE</b>

(54) Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kui organismi loomulikku kaitsevõimet tõstev probiootik, seda sisaldav toiduaine ja kompositsoon ning mikroorganismi kasutamine rakulist immuunsust tõstva ravimi valmistamiseks

(57) Leiutis käsitleb mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kui probiootikut, selle funktsionaalseid omadusi, seda sisaldavat toiduainet (nt juustu) ja kompositsooni ning nimetatud mikroorganismi kasutamist rakulist immuunsust tõstva ravimi valmistamiseks. *L. plantarum* Inducia toodab ornitiinist ja glutamaadist polüamiini, argininist lämmastikmonooksiidi (NO), omab antioksüdantset aktiivsust ning tõstab toodetud polüamiiniide, lämmastikmonooksiidi ja antioksüdantsete ühendite abil soole limaskesta barjaärfunktsiooni, suurendab immunotsüütide arvu veres ning indutseerib tsütookiinde teket organismi loomuliku kaitsevõime tõstmiseks

(57) The present invention relates to a microorganism *Lactobacillus plantarum* strain Inducia DSM 21379 as probiotic, its functional properties, food product (e.g. cheese) and composition comprising said microorganism and application of said microorganism for production of medicine for enhancing cellular immunity. *L. plantarum* Inducia produces polyamines from ornithine and glutamate, nitric mono-oxide (NO) from arginine, possesses antioxidative activity and with produced polyamines, nitric mono-oxide and antioxidative compounds improves the intestinal barrier function, increases number of immunocytes in blood and induces cytokine production for enhancement of organisms' natural defense.

Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kui organismi loomulikku kaitsevõimet tõstev probiootik, seda sisaldav toiduaine ja kompositsioon ning mikroorganismi kasutamine rakulist immuunsust tõstva ravimi 5 valmistamiseks

#### TEHNIKAVALDKOND

Leiutis kuulub biotehnoloogia valdkonda ning leiab kasutamist toiduainetööstuses ja meditsiinis. Täpsemalt käsitleb leiutis probiootilist laktobatsilli Inducia DSM 21379, mis 10 toodab polüamiine, lämmastikmonooksiidi ja on antioksüdantse toimega, millega suurendab seedekulgla limaskesta barjäärfunktsiooni, soole limaskestas ja veres rakulist immuunsust ja indutseerib proinflammatoorseid tsütokiine. Leiutist saab kasutada funktsionaalse toidu koostises, näiteks piimatoodetes ja ravimis organismi loomuliku kaitsevõime tõstmiseks soole limaskesta barjäärfunktsiooni suurendamise ja soole 15 limaskesta ning vere rakulise immuunsuse tõstmise kaudu.

#### TEHNIKA TASE

Viimastel aastakümnetel on laktobatsille laialdaselt kasutatud funktsionaalse toidu koostises probiootikutena. Funktsionaalne toit on toiduaine, mis peale toiteliste väärustute 20 sisaldab lisakomponente (sh. probiootikuid), mis mõjustavad kasulikult organismi mingeid funktsioone või vähendavad teatud haiguste riski. Probiootikud on elusad mikroorganismid, mis optimaalsetes teaduslikult töestatud annustes seedetrakti viiduna on kasulikud tervisele. Kõige sagedamini on probiootikud kasutusel funktsionaalse toiduna. Probiootikume tarvitatakse kas toidu komponentidena (jogurtid, kreemid, kohupiimad) 25 või mitte-toiduainetena (lüofiliseeritud mikroobikultuurid). Probiootikume kasutatakse sageli organismi kaitsevõime suurendamiseks.

Organismi loomuliku kaitsevõime suurendamine on muutunud aktuaalseks seoses elanikkonna vananemisega ja immuunpuudulikkusest põhjustatud haigustega (HIV infektsioon, kudede transplantatsiooniga indutseeritud immuunsuppressioon). Eakatel 30 täheldatakse sagedamini infektsioonhaigusi, ainevahetuse häirumisi ning kasvajalisi protsesse (Hebuterne X., Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora).

- Curr. Opin. Clin. Nutr Metab Care, 2003; 6 (1):49-54; Wenzel, R.P., Health care – associated infections. Major issues in early years of 21<sup>st</sup> century. Clin Inf. Dis., 2007; 45: S85-S88). Kõigi nende haiguste põhjuseks on organismi mitmesuguste füsioloogiliste funktsionide võimekuse langus (Timiras, P.S. Physiology of aging: standards for age-related functional competence In: Comprehensive Human Physiology. Greger, R (edt)/ Windhorst, U (edt) Springer Verlag, 1996; pp 2391-2405). Vananemist on käsitletud vastupanuvõime vähenemisena stressile, kusjuures esiplaanile tõuseb immuunsüsteemi normaalse vastuse nõrgenemine. See avaldub eeskätt nii kehas ringlevate loomulike kaitserakkude (leukotsüüdid, makrofaagid, lümfotsüüdid, trombotsüüdid) hulga ja 5 fagotüütide aktiivsuse vähenemises (Hebuterne X., Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora. Curr. Opin. Clin. Nutr Metab Care, 2003; 6 (1):49-54; Fang H., Intestinal microbiota of the elderly. In: Gastrointestinal Microbiology: The Intestinal Microbiota of Elderly Edited by A. Ouwehand and E. Vaughan 2006; pp 75-91) kui ka limaskestade barjäärfunktsiooni languses.
- 10 Soole limaskesta läbilaskvus suureneb sageli kroonilise põletiku foonil. See on aluseks autoallergilistele haigustele ja mikroobide translokatsiooni tõttu sooleinfektsionide generaliseerumisele. Limaskesta terviklikkuses mängivad olulist rolli mikroobide ainevahetusproduktid, näiteks lühikese ahelaga rasvhapped (*short chain fatty acids SCFA*), mida toodavad jämesooles piimhappe bakterid kiudainete (taimset päritolu ained) 15 rikka dieedi puhul (Roy CC, Kien CL, Bouthillier L., Levy E. Short chain fatty acids: ready for prime time? Nutr.Clin. Pract., 2006; 21:351-366). Eubakterite ja klostriiidide tekitatud butüraadil on oluline roll limaskesta barjäärfunktsiooni tugevdamises, samuti on kiudainete rikka dieedi soodsat mõju jämesoole mikroobidele kirjeldatud mitmetes 20 uurimustes (O'Keefe SJD. Nutrition and colonic health: the critical role of the microbiota. There is strong evidence for the ability of diet to influence the colonic microbiota and cancer risk as measured by epithelial proliferation rate. Current Opin Gastroenterol., 2008; 24: 51-58).
- Soole limaskesta seisundi tugevdamises on lisaks lühikese ahelaga rasvhapetele hakatud tähelepanu omistama ka polüamiinidele. Polüamiinid on lineaarsed alifaatsed molekulid, 25 milles aminorühmad asuvad piki nende struktuuri. Nende hulka kuuluvad putrestsiin, spermidiin ja spertiin (Larqué, M., Sabater-Molina, S. Zamora E. Biological significance

of dietary polyamines. Nutrition 2007; 23(1): 87-95). Polüamiine toodetakse aminohapete, ornitiini ja arginiini dekarboksüleerimiseteel. Ornitiinist tekib putrestsiin otse, arginiinist tekib esmalt agmantiin ja selle kaudu putrestsiin (Halaris A, Plietz, Agmatine: metabolic pathway and spectrum of activity in brain. CNS Drugs, 2007; 21: 885-90). Diamiini oksüdaas metaboliseerib putrestsiini gamma-aminovõihappeks, mis on oluline molekul närvirakkude metabolismis.

Arginiin on lisaks ka lämmastikmonooksiidi (NO) allikaks. Süsteem NOS-NO võib omada hüpereemia-sõltuvat kaitset stress-indutseeritud seedekanali limaskesta kahjustuste kaitsemehhanismides (Brzozowski T., Brzozowski, Konturek P., C., Sliwowski Z., Drozdowicz D., Burnat G., Pajdo R., Pawlik M., Bielanski W., Kato I., Kuwahara A., Konturek S. J. and Pawlik W.W. Gastroprotective action of orexin-A against stress-induced gastric damage is mediated by endogenous prostaglandins, sensory afferent neuropeptides and nitric oxide. Regul Pept 2008, 148, 6-20).

Polüamiinide füsioloogiline toime on suunatud rakkude kasvule ja diferentseerumisele, immuunrakkudele ja põletiku vastuse reguleerimisele, samuti on nad antiallergilise toimega, stimuleerivad proteiinide sünteesi, stabiliseerivad nukleiinhapete struktuuri ja kontrollivad ensüümide aktiivsust. Polüamiinid vähendavad seedetraktis haavandite teket ja parandavad soole limaskesta seisundit, mistõttu väheneb limaskesta permeaabelsus makromolekulidele. Polüamiinidel on võime indutseerida apoptosi, vältides epiteeli hüperproliferatsiooni ning algsest tekkivate vähirakkude hävitamiseks (Moinard C, Cynober L, De Bandt JP Polyamines: metabolism and implications in human disease. Clin Nutr., 2005; 24: 184-197). Polüamiinid tekivad endogeenselt või omastatakse neid aktiivselt toidust. Just eakatel inimestel on oluline saada toidus lisaks polüamiine, mille sisaldus on Neil vähenenud. Soolestikku sattunud putrestsiinist jõuab ainult 20% verre, millega kaasneb konverteeritud atsetüleeritud putrestsiini tõus, kuid enamik putrestsiinist läheb ainevahetusse enterotsüütides ja maksas (Milovic V, Odera G, Murphy GM, Dowling RH Jejunal putrescine absorption and the pharmakokinetic/biotransformation of ingested putrescine in humans. Gut, 1997; 41: A63). Uriinis on võimalik leida rohkesti putrestsiini, spermidiamiini ja spermiini metaboliite atsetüleeritud või oksüdeeritud vormidena (Seiler N Catabolism of polyamines. Amino Acids 2004; 26: 217-233). Putrestsiini loetakse toksiliseks kontsentratsioonis 2000 mg/kg kohta, kuid putrestsiin ja

kadaveriin võivad suurendada türamiini ja histamiini toksilist efekti. Seepärast loetakse summarseks polüamiinide toksilisuseks  $> 300 \text{ mg/kg}$  toidu kohta (Larqué, M., Sabater-Molina, S. Zamora E. Biological significance of dietary polyamines. Nutrition 2007; 23(1): 87-95).

- 5 Epitelirakkude kahjustuse korral peetakse soole mikrofloora poolset polüamiinide tekitamist üheks kompensatoorseks mehhanismiks, mille abil on võimalik modifitseerida immuunvastust ja reguleerida apoptoosi. Putrestiini toodavad mitmed anaeroobid, *Escherichia coli* ja laktobatsillid. Jämesoole algosas moodustavad laktobatsillid olulise osa mikrofloorast (Marteau, P., Pochart, P., Dore, J., Bera-Maillet, C., Bernalier, A. and 10 Corthier, G. Comparative study of bacterial groups within the cecal and fecal microbiota. Appl. Env. Microbiol. 2001; 67, 4939-4942). Laktobatsillid tekitavad polüamiine aminohapete dekarboksülatsooni teel, eeskätt soolesisaldise kõrge pH korral (Lonvaud-Funel A, Biogenic amines in wine: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Letters, 2001, 199: 9-13). Teistpäri, *Lactobacillus acidophilus* tüved kasutavad näiteks putrestiini 15 ja vähendavad rooja halba lõhna (WO 2008/019887, BASF AG).
- Jaapani patentitaotlus JP2006191808 (Toyota Motor Corporation) kirjeldab enterobakterite abil putrestiini tootmise tehnoloogiat. Probi AB Eesti patent EE03597 kirjeldab farmatseutilist kompositsooni, mis sisaldab erinevaid *L. plantarum* tüvesid 299 ja 299v koos arginiiniga soole mikroobide translokatsiooni vältimiseks maksakahjustuse 20 korral. Neil *L. plantarum* tüvedel on üle 70% REA sarnasus *L. plantarum* 299 tüvega ja võime koloniseerida inimese soole limaskesta *in vivo*. Patentis pole näidatud, millised arginiini baasil tekkinud lõhustamisproduktid *L. plantarum* poolt (putrestiin, kadaveriin, türamiin, NO või antioksüdantsuse suurendamine) on vastutavad saadud efekti eest. Eeltooduga on tihedasti seotud teine Probi AB patent EE04097, mis käsitteb *L. plantarum* 25 299v ja 299 tüvesid, millel on kolonatsioonivõime limaskestale tänu mannoos-spetsiifilisele adhesiinile. Ka selles patentis ei kirjeldata nimetatud *L. plantarum* tüvede polüamiinide ega NO tootmisse võimet. Ometi on arginiini kõrgete dooside (3,4 g/päevas) manustamise puhul tähdeldatud NO tõusu vörreldes väiksemate (3,2 g/päevas) doosidega (Jablakad A. Checinski P., Krauss H., Mickerbe M. Astcef J. The innfulence of 30 2 different doses of L-arginine oral supplementation on nitric oxide (N=9 concentration and total antioxidant status (TAS) in atherosclerotic patients. Clinical Research, 2004).

- On näidatud, et *Lactobacillus rhamnosus* GG võib suurendada NO tootmist soolestiku epiteelirakkude või proinflammatoorsete tsütokiinide poolt ja viidatud, et *Lactobacillus rhamnosus* GG kasulikud omadused võivad olla seoses NO tootmisega makrofaagisest ja epiteelirakkudest (Korhonen K, Reijonen TM, Remes K, Malmström K, Klaukka T,
- 5 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 näidatud, et NO kaitseb limaskesta kahjustuse ja suurenenud permeaabelsuse eest, mis tekib reperfusiooni järel (Payne D, Kubas P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol.* 1993; 265 (1 Pt 10):G189–G195).
- USA patentitaotlus US20060078595 (Friesland Brands B.V.) käsitleb meetodit vastsündinutel soole limaskesta barjääri liigse läbilaskvuse välimiseks glutamaadi ja selle prekursorite ning polüamiinide spertiini, spermidiini, putrestiini abil mitmesuguste sündroomide puhul (alatoitlus, allergia, sepsis, bakterite translokatsioon, endotokseemia, 15 viirus diarröa). Glutamaadi allikaks on *Lactobacillus Reuteri* (BIOGAIA).
- Vähe on kirjeldatud eakatele inimestele mõeldud probiootikume. Neil eakatel inimestel, kes tarbisid regulaarselt probiootikume, olid seedekulglas kasulike laktobatsillide hulgad oluliselt suuremad, kui neil, kes probiootikume ei tarbinud (Soovares, P., Salusaar L,
- 20 Kolk H, Sepp E, Kullisaar T, Vihalemm T, Zilmer M, Mikelsaar M. Kas soole laktobatsillide hulk ja söömisharjumused mõjutavad ateroskleroosi riski eakatel isikutel? *Eesti Arst*, 2007; 9: 704). Samas on eakatele inimestele mõeldud probiootikud sageli suunatud krooniliste põletike vähendamisele, kasutades immuunsuppressor-bakterite ja IL-10 indutseerijate (bifidobakterid, *Lactobacillus acidophilus*) abi. Näiteks Valio Ltd.
- 25 Eesti patentitaotlus EE200300351 käsitleb bakterite kombinatsiooni (*L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* DSM LC705 7061, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. Shermani DSM7067 ja *Bifidobacterium infantis* DSM13642) koos galaktooligosahhariidiga (GOS) üldise tervisliku seisundi parandamiseks ja immuunsüsteemi stimuleerimiseks. Pole toodud andmeid, milliseid immuunsüsteemi komponente millega stimuleeritakse, kuid
- 30 autorite teadusartiklist nähtub, et parimad TNF-alfa ja IL-6 stimuleerijad olid *Lactobacillus* GG tüvi ja veel üks *L. rhamnosus* tüvi E509 (Miettinen M., Vupio-Varkila

J, Varkila K. Production of TNF-alpha and interleukin -6 and interleukin -10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection&Immunity*, 1996, 64: 5403-5405).

- Polüamiin spermiinil on põletikku vähendav toime. On näidatud, et spermiini lisamisel 5 inimese monotsüütide kultuurile, mida oli stimuleeritud lipopolüsahhariidiga, pidurdas see efektiivselt TNF, IL-1, IL-6 jt. proinflammatoorsete tsütokiinide teket (Zang M, Caragine T. Wong H et al. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism, that restrains the immune response. *J. Exp. Med.*, 1997, 185: 1759-1768). Proinflammatoorsete tsütokiinide 10 allasurumist kirjeldasid Matsumoto kaasautoritega (Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y Impact of LKM512 yoghurt on improvement of intestinal environment of the elderly. *FEMS immunol. Medical Microbiol.*, 2001; 31:181-186). Proinflammatoorsete tsütokiinide ülemääärane allasurumine võib osutuda kahjulikuks, sest vähendab lümfotsüütide ja loomulike killerite aktivatsiooni, mis toimivad vähirakkude vastu. 15 *Bifidobacterium lactis* LKM512 jogurti manustamisel eakatele inimestele vähenes põletiku ägeda faasi vastus glükoproteiin haptoglobuliini näol, mida indutseeritakse IL-1, IL-6 ja TNF-alfa poolt, kuid kaasnes sooleepiteeli mutageensuse langus probiootikumi toimel. Seejuures parandavad polüamiinid epiteelirakkude apoptoosi võimet, et vältida hüperproliferatsiooni, olulist eeldust jämesoole vähi tekkeks (Hamilton-Miller JMT, 20 Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgrad. Med.*, 2004; 80:447-451; Gill HS, Darragh AJ, Cross M. Optimizing immunity and gut function in the elderly. *J. Nutr. Health Aging* 2001, 5:, 60-91). Selliste efektide tõttu on soovitused polüamiinide 25 rikka funktsionaalse toidu tarvitamiseks eakatel inimestel vastuolulised. Samas on aga selge, et erinevatel piimhappebakteritel, sh. laktobatsillide liikidel ja tüvedel on pro- ja anti-inflammatoorsete tsütokiinide tekitamise ja mittespetsiifilist rakulist immuunvastust stimuleerimisvõimed erinevad. Seni pole kirjeldatud aga sellist laktobatsilli liiki/ tüve, mis toodaks füsioloogiliselt arvestatavas hulgas polüamiine, mida oleks pärast seda tüve sisaldava kompositsooni tarbimist võimalik kindlaks teha uriinis ja mis samaaegselt soodustaks immuunrakkude adaptiivset aktivatsiooni tsentraalsele interleukiin IL-6 abil. 30 Proinflammatoorse tsütokiini IL-6 teket on kirjeldatud 24h stimulatsiooni järel *Bifidobacterium animalis* ja *Lactobacillus rhamnosus* erinevatel tüvedel (Miettinen M.,

- Vuopio-Varkila J, Varkila K. Production of human Tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection@Immunity*, 1996, 64:5403-5408). IL-6 induksioonil on oluline jälgida põletiku markereid, nagu leukotsüütide (WBC) arvu ja C-reaktiivse proteiini sisaldust vereseerumis (Kiecolt-Glaser JK, Preacher Kj, MacCallum RC et al. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6, PNAS, 2003; 100:9090-9095) et vältida IL-6 üleproduksiooni. Nimetatut seostatakse südame-veresoontehaiguste, artriidi, tüüp 2 diabeedi, vähi, periodontaalse haiguse, kahheksia ja organismi funktsionide langusega (Rose-John S., J. Scheller, G. Elson, and S. A. Jones. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer J. Leukoc. Biol., August 1, 2006; 80 (2): 227 - 236).
- Lactobacillus plantarum* on laktobatsillide perekonna laialt levinud esindaja. Seda liiki leidub nii fermenteeritud taimsel materjalil (hapukapsas, kurgid, silo), fermenteeritud piima/lihatoodetes (juust, salaamivorst) kui ka inimese seedetraktis (Bottazzi, V. Other fermented dairy products. Food and feed production with microorganisms. Biotechnology. Verlag Chemie, Weinheim, Ed. Reed G. 1983, 5: 315–364; Hammes, W. P., Weiss, N., Holzapfel, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. The Prokaryots. Springer - Werlag, Heidelberg, New York, Eds. Balows A., Trüpes H. S., Drowkin M., Schleifer K-H., 1992; 2: 1535–1594; Xanthopoulos, V., Hatzikamari, M., Adamidis, T., Tsakalidou, E., Tzanteakis, N., Litopoulou-Tzanteaki, E. Heterogeneity of *Lactobacillus plantrum* isolates from Feta cheese throughout ripening. J.Appl. Microbiology 2000, 88: 1056-1064). *Lactobacillus plantarum* on võimeline oma ainevahetust ümber kõlastama vastavalt keskkonnatingimustele.
- Lactobacillus plantarum* on saadaval probiootikumidena nii probiootiliste toitudena kui ka toidulisandina (näiteks *Lactobacillus plantarum* 299v DSM 9843, Probi AB, Roots, mis on saadaval Skänemejerier'i ProViva probiootilise toidusarjana Rootsis või kuuludes ühe bakterina preparaat VSL#3 (VSL Pharmaceuticals, Inc. USA) koostisse. WO2007/108764 (Probac AB) kirjeldab *Lactobacillus plantarum* tüvesid, mis on võimelised suurendama immuuntolerantsi autoimmunse haiguse tsöliaakia puhul, kuid autorid ei kirjelda nende toimemehhanisme. Korea patentitaotlused KR20020072913 ja KR20050080630 kirjeldavad laktobatsillide segu, kuhu kuulub ka *Lactobacillus*

*plantarum*, mille tsütoplasma vähemalt üks fraktsioon või tüvi ise on võimeline inhibeerima mao- ja soolevähi rakuliine.

Juustul probiootikumide kandjana on mitmeid vastuolulisi aspekte. Inimpäritolu laktobatsillide sobitamine pika valmimisajaga ja teistest piimapõhistest toodetest erinevasse toidukeskkonda võib osutuda keeruliseks (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; Madkor, S., A., Tong, P.S., El Soda, M. Ripening of Cheddar cheese with attenuated adjunct cultures of *Lactobacilli*. J. Dairy Sci. 1999; 1684-1691). Samas aga 5 kaitseb juustumaatriks valgu- ja rasvarikka konsistentsi tõttu probiootilist mikroobitüve teekonnal läbi seedetrakti paremini kui teised piimapõhisid tooted (jogurt, keefir). Antimikroobset ja antioksüdantset probiootilist juustu on saadud *Lactobacillus fermentum* ME-3 (DSM 14241) abil (Eesti patent EE04580, Venemaa patent RU2284354 ja USA patent US7244424. USA patent US6190879 kirjeldab mikroorgasnismi *Streptomyces* 10 perekonnast transglutaminaasi tekkitamiseks ja meetodit, millega on võimalik näiteks putrestsiini viia sisse kaseiini juustu valmistamisel. Euroopa patentis EP1064857B1 (Snow Brand Milk Products Co Ltd., 2004) kirjeldatakse meetodit ühendite sh putrestsiini saamiseks laktobatsillide, propioonibakterite ja bifidobakterite abil Gouda juustu piimast 15 ultrfiltratsiooni teel. Need meetodid kujutavad endast kas polümerisatsiooni reaktsiooni putrestsiini inkorporeerimiseks kaseiini või vastupidi - ultrafiltratsiooniga kättesaamiseks juba piimas toodetust, erinedes käesolevas leiutises esitatud meetodist laktobatsillide 20 toimel juustupiimas tekkivast putrestsiinist, mis jäab püsima juustu 30 päevase valmimistsükli järel. Kirjeldatud on juustus esinevaid mittestarter laktobatsille (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus curvatus*), mis on võimelised pärast süsivesikute 25 ärakasutamist saama vajalikku energiat orniiniist (piima kaseiinist vabanenud arginiinist saadakse orniini), et oma hulka suurendada (Laht T-M, Kask S, Elias P., Adamberg K, Paalme T. Role of arginine in the development of secondary microflora in Swiss-type cheese. Int. Dairy Journal, 2002, 12: 831-840).

Seega pole senini kirjeldatud sellist laktobatsilli liiki/tüve, mis toodaks mikroobi- 30 kultuuris NO-d ja lisaks ka toiduaines füsioloogiliselt arvestatavas hulgas polüamiine, kusjuures viimaseid oleks pärast seda tüve sisaldava fermenteeritud toiduaine (juust) või

kompositiooni tarbimist võimalik kindlaks teha uriinis ja mis oleks võimeline polüamiinide kaudu reguleerima seedekulgla epiteelirakkude apoptoosi ja tõstma limaskestas lümfifoliiklite ja veres monotsüütide arvukust, reguleeriks limaskesta seisundit NO ja antioksüdantsete ühenditega ning soodustaks immuunrakkude, eeskätt makrofaagide aktivatsiooni tsentraalse interleukiini IL-6 abil.

#### LEIUTISE OLEMUS

Leiutis käsitleb isoleeritud mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kui probiootikut, selle funktsionaalseid omadusi, seda sisaldavat toiduainet (nt juustu) ja kompositiooni ning nimetatud mikroorganismi kasutamist rakulist immuunsust tõstva ravimi valmistamiseks. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 toodab ornitiinist ja glutamaadist polüamiine, arginiinist lämmastikmonooksiidi (NO), omab antioksüdantset aktiivsust ning tõstab toodetud polüamiinide, lämmastikmonooksiidi ja antioksüdantsete ühenditega soole limaskesta barjäär funktsiooni, suurendab immunotsüütide arvu veres ning indutseerib tsütokiinide teket organismi loomuliku kaitsevõime tõstmiseks.

Leiutise objektiks olev *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tüvi isoleeriti terve lapse fekaali proovist Eesti-Rootsi laste mikrofloora võrdleva uuringu käigus. Mikroorganismi *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tüvi isoleeriti, külvates terve 1 a. vanuse lapse rooja lahjendusi ( $10^{-2}$ - $10^{-7}$  fospaatpuhvis 0,04% tioglükoohappega, pH 7,2). Lahjendused külvati värskelt valmistatud MRS agarsöötmele (Oxoid) ja kultiveeriti 37°C juures mikroaeroobses keskkonnas. Leiutise 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, s.t. et mikroobitüvi on tervisele ohutu ja seda võib suukaudselt manustada.

**Kultuur-morfoloogilised tunnused** on määratud MRS agar ja puljongsöötmes (OXOID) kasvatamise järgselt. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 on korrapärase kujuga eosteta keskmise jämeduse ja pikkusega Gram-positiivne pulkbakter, mille üksikrakud asetsevad üksikult, paariti või paralleelsete 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 5 agarsöötmel kultiveerimist  $37^{\circ}\text{C}$  juures mikroaeroobses keskkonnas ( $\text{CO}_2/\text{O}_2/\text{N}_2$ : 10/5/85) on mikroobipesad 2-2,5 mm läbimõõduga, valged, kumerad, läikivad ja korrapärase äärisega.
- Tüve optimaalne kasvutemperatuur on  $37^{\circ}\text{C}$ ; paljuneb ka  $15^{\circ}\text{C}$  ja  $45^{\circ}\text{C}$  juures. Optimaalse kasvukeskkonna pH on 6,5.
- 10 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 on katalaas- ja oksüdaasnegaatiivne, fakultatiivselt heterofermentatiivne, ei hüdrolüüs aminohape arginiini ja ei produtseeri glükoosi fermentatsioonil gaasi.
- 15 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 identifitseeriti API 50CHL System (bioMérieux, Prantsusmaa) test-kiti alusel kui *Lactobacillus plantarum* (kattuvus tüüpüvega: excellent, ID %-99.9, T index -0.81) ja molekulaarne identifikatsioon ITS-PCR (*Internal-Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction*) abil. Võrdlus referentstüvega *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 kinnitas API 50CHL abil eelnevalt tehtud identifikatsiooni.
- 20 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 süsivesikute fermentatsioniprofil API CHL 50 alusel on alljärgnev. Tüvi fermenteerib: riboosi, galaktoosi, D-glükoosi, D-fruktoosi, D-mannoosi, mannitooli, D-raffinoosi, sorbitooli,  $\alpha$ -metüül-D-mannosiidi,  $\alpha$ -metüül-D-glükosiidi, N-atsetüül-glükoosamiini, amügdaliini, arbutiini, eskuliini, saltsiini, tsellobioosi, maltoosi, laktoosi, melibioosi, sahharoosi, trehhaloosi, meletsitoosi,  $\beta$ -gentibioosi, D-turanoosi, glükonaati ja vähesel määral tärklist.
- 25 Tüvi ei fermenteerib: glütserooli, eritrooli, D-arabinoosi, L-arabinoosi, D-ksüloosi, L-ksüloosi, adonitooli,  $\beta$  metüül-ksüloosiidi, L-sorboosi, ramnoosi, dultsitooli, inositooli, inuliini, glükogeeni, ksülitooli, D-lüksoosi, D-tagatoosi, D-fukoosi, L-fukoosi, D-arabitooli, L-arabitooli, 2 keto-glükonaati, 5 keto-glükonaati.
- 30 API ZYM (bioMérieux, Prantsusmaa) testkiti alusel omab *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 leutsiin arüülamidaasi, valiin arüülamidaasi, happelise fosfataasi,

naftool-AS-BI-fosfohüdrolaasi,  $\alpha$ -glükosidaas,  $\beta$ -glükosidaas aktiivsust ja atsetoini tekitamise võimet. Tüvi omab nõrka esteraasi (C4), esteraasi (C8), tsüstiini arüülamidaasi,  $\beta$ -galactosidase ja N-atsetüül-  $\beta$ -glükoosaminidaasi aktiivsust.

5 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 molekulaarne identifikatsioon toimus ITS-PCR (*Internal-Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction*) abil võrdluses referentstüvega *L. plantarum* ATCC 14917 (Joonis Fig.1).

Meetod. Tüve identifikatsioon toimus ITS-PCR (*Internal-Transcribed Spacer Polymerase Chain Reaction*) abil võrdluses referentstüvega *L. plantarum* ATCC 14917.

10 DNA eraldati *Lactobacillus* isolaatidest lüsosüumi (Serva, Rootsi; 20 mg/ml), mutanolüsiini (Sigma; 0.5 mg/ml) ja proteinaas K lahuse abil (Fermentas, Leedu; 14.6 mg/ml).

DNA amplifitseeriti 50  $\mu$ l mahuga ruumalas, mis sisaldas 1 x *Taq* polümeraasi puhvrit (Fermentas, Leedu), 1.5U *Taq* DNA polümeraasi (Fermentas, Leedu), 0.5  $\mu$ M praimereid (16S-1500F and 23S-32R; DNA Technology AS), 200  $\mu$ M dNTP 15 (desoksünukleotiid trifosfaatide) segu (Amersham Pharmacia Biotech, Saksamaa), 2 mM MgCl<sub>2</sub> ja 2  $\mu$ l uuritavat DNA-d.

PCR produkt restriktiivne kasutades *Taq* I restriktiooniensüumi (Fermentas, Leedu).

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

20

*Lactobacillus plantarum* Inducia deponeeriti kultuurikollektsioonis Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH numbri DSM 21379 all 16.04.2008.

#### Pulssvälda-geel-elektroforees (*Pulsfield-gel-electrophoresis profile*) (PFGE)

25 **Metoodika:** Laktobatsillide DNA uurimiseks pulssvälda-geel-elektroforeesiga (PFGE) kasvatati laktobatsilli tüved 37°C juures 24 tundi MRS söötmes ning väljakasvanud mikroobirakke pesti SE puhbris (75mM NaCl, 25mM EDTA, pH=7,4), bakterisuspensiooni optiline tihedus reguleeriti (OD<sub>600</sub> ligikaudu 1,5). Bakteriraku seina lõhestamine toimus EC puhbris (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% sarkosüül-0,2%

deoxycholate, pH 8,0). Lüüsitud "punnid" pesti TE puhvris ja lõigati 2 mm lõigud, mis restrikteeriti ensüümiga 50U Not I (Bio-Rad) üleöö. Geel pandi elektroforeesi aparaati (CHEF-DR II; Bio-Rad) 22 tunniks 14°C juurde. Elektroforeesi tulemusena saadud laktobatsillide restriktiooni muster pildistati UV illuminaatoris (Joonis Fig.2).

5

### Resistentsus antibiootikumidele

**Metoodika:** *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 antibakteriaalne tundlikkust antibiootikumidele testiti E-testi abil (AB Biodisk, Solna). Minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon määrati vastavalt Euroopa Komisjoni (EUC) soovitatud epidemioloogilistele murdepunktidtele.

Tabel 1. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 antibakteriaalne tundlikkus

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

\*MIK - minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

- 15 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tüvel ei esinenud resistentsust uuritud antibiootikumide suhtes. Täheldati tsiproflopsatsiini kõrgemat MIK, milliseid liigispetsiifiliselt resistentseid *Lactobacillus plantarum* tüvesid on ennegi kirjeldatud. 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 human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. Trends in Food Science & Technology 2008; 19: 102e114), mille tõttu 5 antud mikroobi kasutamisel probiootikumina ei ole eeldatav antibiootikumresistentsuse geenide horisontaalne levik teistele mikroobidele.

### **Antimikroobne aktiivsus**

10 *Lactobacillus plantarum* Inducia avaldab MRS agarsöötmel antagonistlikku toimet mitmete enteropatogeenide suhtes (Tabel 2).

Tabel 2. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 antimikroobne aktiivsus modifitseeritud MRS agarsöötmel (patogeeni kasvupidurdus mm)

Mikroob	Kasvupidurdustsoon (mm)
Mittestarter laktobatsillid (NSLAB)	2,67±3,4
<i>Listeria monocytogenes</i>	22,7 ± 2,4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	11,2±2,7
<i>Salmonella enteritidis</i>	22,1 ± 1,9
<i>S. typhimurium</i>	20,8 ± 2,8
<i>Shigella sonnei</i>	24.,0 ± 0,1
<i>Escherichia coli</i>	23,0 ± 1,4
<i>Enterobacter sakazakii</i>	18,1 ±1,8
<i>Campylobacter jejuni</i>	12,0 ± 7,6

15 *Lactobacillus plantarum* Inducia antimikroobne DSM 21379 aktiivsus oli *in vitro* triip-katses (surmatud rakud ja nende eritatud metaboliitide toime) suurim *E. coli* suhtes, millele järgnesid *Salmonella* sp., *Shigella* ja *Listeria* pidurduse aktiivsus, madalaim aktiivsus oli tüvel teiste laktobatsillide (NSLAB) suhtes.

20 **Funktionaalsed omadused**

#### **Metaboliitide profiil**

*Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 metaboliitide profiil tehti kindlaks gaaskromatograafiliselt (Hewlett-Packard mudel 6890) mikroaeroobses kasvukeskkonnas inkubeerimisel 24 ja 48t järel (Tabel 3). Laktobatsille kasvatati 48t MRS agarsöötmel

- 10% CO<sub>2</sub> keskkonas, 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. Määratigi metaboliitide hulk mmol/l, kasutati kapillaarkolonni HP-INNOWax (15 m × 0,25 mm; 0,15 µm). Kolonni temperatuuri programm 60°C 1 min,
- 5 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> tüüpi elektroode. Elektroodid viidi 500 µl 24t MRS puljongsis (Oxoid, Ühendkuningriik) kasvanud rakukultuuri. ISO-HPO<sub>2</sub> elektroodide signaal registreeriti paralleelselt 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.

15

Tabel 3. Äädikhappe, piimhappe ja merivaikhappe konsentratsioon (mmol/l) MRS söötmes *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 mikraeroobsel kultiveerimisel 24 ja 48t jooksul ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentratsioon (µg/ml) tervetel rakkudel ja rakulüsaadis

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

- 20 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tekitas suurtes hulkades, rohkem kui kontrolltüvi piimhapet, äädikhapet ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mis on olulised jämesoole limaskesta troofikaks.

#### ***Lactobacillus plantarum* Inducia totaalne antioksüdantne aktiivsus**

**Metoodika:** TAA ja TAS määramiseks laktobatsillide tüvede mikroobirakkudel *L. plantarum* Inducia inkubeeriti MRS puljongis (Oxoid, Ühendkuningriik) 24 t 37°C juures. Mikroobirakke tsentrifuugiti temperatuuril 4°C 1500 pööret/min 10 min jooksul, pesti isotoonilise soolalausega (4°C) ja suspendeeriti 1,15% KCl (Sigma, USA).

5 Suspensiooni tiheduseks oli OD<sub>600</sub> 1.1 juures 10<sup>9</sup> mikroobirakku/ml. Totaalset antioksüdantset aktiivsust (TAA) määratati linoleenhappe testi (LA-test) abil (Kullisaar, T, Songisepp, Mikelsaar M, Zilmer, K, Vihalemm, T, Zilmer, M. *British J of Nutrition*. Antioxidant probiotic fermented milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human. 2003, 90, 2,449-456.) ja totaalset antioksüdatiivset staatust (TAS) 10 kommertsiaalse kiti abil (TAS, Randox Laboratories Ltd., Ühendkuningriik).

Tabel 4. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 totaalne antioksüdantsus (TAA) ja totaalne antioksüdatiivne staatus (TAS)

Tüve nr.	TAA (%)	TAS (mmol/l)
<i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379	26±1,2	0.13±0,04
<i>L. plantarum</i> DSM 21380	22±5	0.05±0,02

#### Lämmastikmonooksiidi (NO) tekitamine

**Metoodika:** Lämmastikmonooksiidi mõõtmised viidi läbi elavate rakkudega. Kasutati elektrokeemilist mõõtmist Apollo 4000 vaba radikaalide analüsaatoriga (WPI, Berlin, Saksamaa) rakendades ISO-NOP tüüpi elektroode. Elektroodid viidi 500 µl 24t MRS puljongis (Oxoid, Ühendkuningriik) kasvanud rakukultuuri. ISO-NOP elektroodide signaale registreeriti paralleelselt 5-7 minutit ja arvutati keskmne signaalitugevus antud aja jooksul. Iga eksperimentaalne punkt mõõdeti 4 sõltumatu paralleeliga ja iga paralleeli mõõdeti kaks korda. Kontsentratsioonide hindamiseks koostati standardkõverad, mille põhjal arvutati signaali tugevuse sõltuvus lämmastikoksiidi kontsentraatsioonist.

Tabel 5. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 lämmastikmonooksiidi NO kontsentratsioonid ( $\mu\text{M}$ )

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

5

***In vitro* polüamiinide tekkitamine *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 poolt**

**Metoodika:** Mikroobitüved suspendeeriti füsioloogilises lahuses McFarlandi standardi järgi  $10^9$  mikroobi/ml ja 0,5 ml külvati dekarboksülatsooniisöötmesse (ä 4,5 ml) ning

10 inkubeeriti 37°C juures 4 ööpäeva (Bover-Cid, S., and Holzapfel W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int J food Microbiol 1999; 53, (1); 33-41(9) Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria).

BA määramiseks derivatiseeriti 200  $\mu\text{l}$  söötmest GC analüüsiks modifitseeritud Nakovich 15 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  $\mu\text{m}$ ). Kolonni temperatuuri programm 160°C 1 min, 20°C/min 280°C 15 min; detektor (FID) 300°C.

Tabel 6. Polüamiinide tekitamine *in vitro* dekarboksüatsioonisöötimest (Arena, M.E. and Manca de Nadra, M. C. Biogenic amine production by *Lactobacillus* J Appl Microbiol, 2001; 90; 158-162)

Proov	Polüamiinid ( $\mu\text{g/ml}$ ) ja biogeensed amiinid								
	arginiin		glutamiin		lüsiin		ornitiin		histidiin
	Put*	Cad.	Put.	Cad.	Put.	Cad.	Put.	Cad.	His.
<i>L.plantarum</i> Inducia DSM 21379	0	0,4	1,2	0,5	0	0,4	1,9	0	0
<i>L.plantarum</i> DSM 21380	0	0	0	0	0	0,3	0,5	0,6	0

5

\*Put- putrestsiin, Cad – kadaveriin, His – histamiin

10 *Lactobacillus plantarum* Inducial DSM 21379 tüvel oli võime tekitada kadaveriini arginiinist, putrestiini nii glutamiinist kui ornitiinist, kuid kontrolltüvel madalamates hulkades ainult ornitiinist (Joonis Fig.3). Kadaveriini jälgvi leiti nii kontrolltüve kui *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 puhul. Histamiini ei tekinud (Tabel 6).

#### JOONISTE LOETELU

15

Joonis Fig.1. Tüve molekulaarne identifikatsioon ITS-PCR abil

1. *L. plantarum* Inducia DSM 21379
2. *L. plantarum* DSM 21380
3. *L. plantarum* CRL 972 (ATCC 14917)

20 M- 100bp marker (Fermentas)

Joonis Fig. 2. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 tüve näpujaljad vörreldes *L. plantarum* kontrolltüvega (Pulsefield-gel-electrophoresis profile, PFGE abil).

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

25

Joonis Fig.3. Polüamiinide tekitamine *L. plantarum* Inducia DSM 21379 poolt *in vitro* dekarboksülatsoonisöötimest (Arena, M.E. and Manca de Nadra, M. C. Biogenic amine production by *Lactobacillus* J Appl Microbiol, 2001; 90: 158-162) (a) ornitiinist (b) glutamiinist.

5

Joonis Fig. 4. Juustus polüamiinide tekitamine *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tüve abil (määratud Nakovich, L. Analysis of biogenic amines by GC/FID and GC/MS. Thesis, Virginia Polytechnic Institute, USA. 2003 alusel).

10 Joonised Fig. 5a, 5b, 5c. Laktobatsillide liigid Pearson UMPAG klasteranalüüsил *L. plantarum* Inducia DSM 21379 grupis.

Katseiskud nr 3, 6, 9, 11, 14, 15, 19, 20, 22, 23, 24 ja 25.

Neli proovi: katse eel (1), vahetult pärast probiootilise juustu manustamist (2), pärast *wash-out* perioodi (3) ja pärast kontroll-juustu söömist (4).

15

Joonis Fig. 6. IL-6 ja vere monotsüüdid

Võrreldes viimase (IV proovi) IL-6 ja monotsüütide vahelist seost ilmnes positiivne korrelatsioon -  $r=0,653$ ,  $p=0,029$ ,  $n=11$ . Lineaarse regresioon mudeliga jäi seos pidama ( $R^2 = 0,405$ ,  $R^2 \text{ adj} = 0,338$ ,  $= 0,035$ ).

20

## LEIUTISE TEOSTAMISE NÄITED

### Näide 1. Toiduaines *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 vajaliku

25 (optimaalse) koguse saavutamine

#### Katse Eesti Juustuga

**Metoodika:** Mikroorganismi *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 lisati

Piimandusühistu E-Piim Eesti juustu tegemiseks kasutatavale juustupiimale, mis seejärel

30 laabiti (25 min). Tekkinud juustutera lõigati (25 min), järelsoojendati (34°C 15 min), kuivatati (25 min), pressiti, nõrutati (1 h), soolati soolvees (12°C; 20% soola; pH 4,7) 20 t, nõrutati ja kuivatati (8 t), kiletati ja valmitati 12°C juures minimaalselt 4 nädalat.

Tabel 7. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 abil tekitatud juustu mikrofloora muutuste dünaamika

Uuring	<i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 sisaldusega probiootiline juust			Kontrolljuust		
	14. päev	21. päev	30. päev	14. päev	21. päev	30. päev
üldarv	$8 \times 10^8$	$4 \times 10^8$	$10^{10}$	$2 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$2 \times 10^8$
Laktobatsillid	$5 \times 10^8$	$2 \times 10^8$	$10^{10}$	$10^5$	-	$3 \times 10^3$
<i>L. plantarum</i>	$5 \times 10^8$	$2 \times 10^8$	$10^{10}$	-	-	$3 \times 10^3$
Kokid	$3 \times 10^8$	$2 \times 10^8$	$10^9$	$2 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$10^8$
Eostega pulkbakter	-	-	$10^3$	-	$10^7$	$10^8$
<i>L. casei</i>	-	-	-	$10^5$	.	-

5

**Näide 2. Toiduaines polüamiinide tekitamine *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 abil**

Metoodika: Juustuproovid ekstraheeriti (10g juustule lisati 20 ml 50% metanooli vesilahust ja inkubeeriti 45°C juures 1 tund jahutati 30°C, tsentrifuugiti) ja 200µl

10 pealmisest kihist derivatiseeriti GC analüüsiks modifitseeritud Nakovich meetodil (Nakovich, 2003) 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 temperatuuri programm 160°C 1 min, 20°C/min 280°C 15 min; detektor (FID) 350°C (Joonis Fig. 4).

15 Sellega seostus putrestiini ja türamiini teke, mis kontrolljuustuga võrreldes oli erinevates juustupartiides putrestiini osas 3-11 korda ja türamiini osas 2-5 korda suurenenedud.

*Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kuulub fakultatiivselt heterofermentatiivsesse gruppi ja seetõttu oli türamiini keskmne sisaldus juustudes oluliselt madalam, kui seda täheldatakse OHEL gruupi tüvedel, seevastu oli putrestiini sisaldus kõrgem.

Tabel 8. Biogeensed amiinid ja polüamiinid *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 lisandiga test-juustudes

Proov	Juustu sisestatud tüvede iduarv (PMÜ/g) vahetult pärast valmistamist (3.-4. päev)	Amiinid (mg/kg)			<i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 iduarv laagerdunud juustus
		Tyr.	Put.	Cad.	
<i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379, 1. katse	$3 \times 10^8$	4,83	20,28	0	$2 \times 10^7$
Kontrolljuust, 1. katse	-	2,31	1,82	0	-
<i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379, 2. katse	$3,3 \times 10^7$	13,57	24,67	0	$2 \times 10^6$
Kontrolljuust, 2. katse	-	2,63	6,64	0	-

Türamiini lubatud sisaldus toidus, näiteks juustus on 200 mg/kg (Karovicova and Kohajdova. Biogenic amines in food. Chem pap. 2005; 59 (1); 70-79; Larqué, M., Sabater-Molina, S. Zamora E. Biological significance of dietary polyamines. Nutrition

5 2007; 23(1): 87-95). Toksiliseks loetakse türamiini sisaldust 1000-8000 mg/kg. Putrestiini loetakse toksiliseks, kui seda leitakse organismis 2000 mg/kg kehakaalu kohta ja polüamiinide summaarseks toksilisuseks loetakse > 300 mg/kg toidu kohta (Larqué, M., Sabater-Molina, S. Zamora E. Biological significance of dietary polyamines. Nutrition 2007; 23(1): 87-95).

10 100 g *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldaava juustu tarbimisel saab inimene ca 3 mg putrestiini. Seega 70 kg inimesel on sel juhul tegemist kontsentratsiooniga kuni 50 µg/kg kohta, mis ei avalda kindlasti toksilist toimet.

### Näide 3. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldaava toiduaineega seedekulgla limaskesta kaitsevõime suurendamine

15 Loomkatses NIH liini hiirtega manustati hiirtele rühmad juustusid 30 päeva välitel (lisanditeta kontrolljuust, *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tüve  $2 \times 10^8$  mikroobirakku/g sisaldav juust).

Juustu manustati hiirtele öösel (hiirte normaalne ärkveloleku aeg) 4,4g/ühe hiire kohta,

20 päeval *ad libitum* tavaline granuleeritud toit. Söödud juustu hulk oli 3,5–4,2 g/öö jooksul. Hiirte üldseisund oli hea, karvkate ja seedetegevus olid muutusteta. Juustusöömine suurendas hiirte kaalu: kaal katse alguses oli 22,9-29,8g ja katse lõpus oli positiivne kaaluiive 2-6,1 g. Hiired surmati tservikaalse dislokatsiooniga katse 30. päeval. Lahangul

ei leitud laktobatsillide ega mikrofloora teiste bakterite translokatsiooni verre ja organitesse.

Tabel 9. Laktobatsillide üldhulgad roojas, peen- ja jämesooles

Uuritav materjal	Kontrollrühm (manustati <i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 lisandita juustu)	Uuritav rühm (manustati tüve <i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 sisaldavat juustu)
0. päev	6,7	7,6
10. päev	8,0	8,3
15. päev	7,0	8,0
Peensool	3,0-7,1 / 5,95*	6,3-7,7 / 6,95*
Jämesool	4,4-7,3 / 6,65*	6,9-7,8 / 7,45*

5 \* Student t-test p= 0,001

Külvidega peen- ja jämesoolest leiti et *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tüve saanud hiirtel suurennes laktobatsillide üldhulk oluliselt nii peen- kui jämesooles.

Maksast, põrnast, peen- ja jämesoolest võetud koetükid fikseeriti formaliinis ja sisestati 10 parafiini. Mikrotoomi abil lõigatud koelõigud värviti hematoksüliin-eosiiniga.

Elundenis (maksas ja põrnas) ei esinenud morfoloogilisi muutusi, mis kinnitas *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 ohutust.

Peensooles hinnati hattude suurust ja kuju, karik- ja Panethi rakkude hulka ning lümfotsüütide koondumist folliikliteks ning difusseteks kogumikeks.

15 Jämesooles pöörati peatähelepanu hulgaliselt karikrakke sisaldavale pinnaepiteelile ja lümfatilise koe iseärasustele limaskesta sidekoelistes piirkondades.

Tabel 10. Hiirte elundite patomorfoloogiline hinnang pärast *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava juustu manustamist

Hiire grupp	Maks	Põrn	Peensool	Jämesool
<i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 sisaldavat juustu söönud loomad	Hüpereemias 6/10*	ii	Lümfifolliiklid 6/10*	Lümfifolliiklid 8/10*
Kontrolljuustu söönud loomad	Hüpereemias 3/10*	Hüpereemias 1/10	Lümfifolliiklid 3/10*	Lümfifolliiklid 4/10*

20 \* p<0,05

*Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava juustu tarbimine 1 kuu jooksul suurendas maksa hüpereemiat ning tõstis oluliselt hirte peen- ja jämesooles lümfatiliste kaitsefolliiklite (immunotsüüdid) hulka võrreldes kontrollrühma hirtega. Nimetatud tulemused viitavad maksafunktsioonide ja seedekulgla limaskesta kaitsevõime 5 aktiveerumisele.

**Näide 4. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldavat toiduainet manustanud tervete vabatahtlike inimeste vere kliiniliste näitajate uurimine ja seedekulgla mikroflooras *Lactobacillus plantarum* osakaalu suurendamine**

10

Kliiniliste katsetuste käigus uuriti tervetel vabatahtikel putrestiini, NO ja antioksüdantseid ühendeid tootva *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava toiduaine (Eesti juustu) 1) ohutust tarbijale; 2) vere rakulistele ja humoraalsetele näitajatele; 3) toimet seedekulgla mikrofloorale; 4) uriini metaboliitidele, selleks et leida 15 võimalikke tervistavaid efekte.

Uuritavasse rühma kuulusid tervisekaebusteta vabatahtlikud naised ja mehed (M/N 4/ 8) vanuses 20-48 eluaastat. Võimaliku varjatud diabeedi väljalülitamiseks määriti glükoosi ja glükohemoglobiin (HbA1c) vereseerumist. Katse oli planeeritud kaksikpime *cross-over* 20 randomiseeritud uuringuna. Alustati 3 nädalast juustu tarbimist test-juustuga. Järgnes kahe nädala pikkune *wash-out* periood, pärast seda tarbisid katseisikud kontrolljuustu 3 nädalat.

30 päevased test-juustud sisaldasid tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 iduarvuga  $6 \times 10^7$  mikroobirakku/g juustu kohta.

25 Enne test-juustu manustumist vabatahtlikele lasti juustul valmida koos *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tüvega 30 päeva jooksul 12°C juures. Kontroll-juustuna kasutati samal ajal valmistatud *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 lisandita Edam tüüpi Eesti juustu.

Katsetus toimus kaksikpime *cross-over* randomiseeritud uuringuna. Juustu 3-nädalast 30 tarbimist alustati test-juustuga. Järgnes kahe nädala pikkune *wash-out* periood, pärast seda tarbisid katseisikud kontrolljuustu 3 nädalat. Päevane tarbitav juustukogus oli 50g.

## Tulemused

### 1) Ohutus

Katsealused ei kaevanud ebamugavustunde ega valu üle seedekulglas, ei esinenu 5 negatiivseid nähte. Pärast juustukatse lõppu ei olnud süsteemsed põletiku markerid (ultrasensitiivne C-reaktiivne valk ja leukotsüütide üldarv) oluliselt suurenenedud, need püsisisid normi piires.

10 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldusega probiootilise juustu tarbimine vahekorda, samuti ei tõusunud IgE antikehade kui olulise allergia markeri hulk vörreldes katse-eelse perioodiga.

15 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldusega probiootilise juustu manustumine ei kahjustanud organismi neeru- ja maksa funksiooni, funksiooni näitajad (ASAT, ALAT albumiin, seerumi kreatiniin).

Seega võib väita, et *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldusega probiootiline juust ei kutsu tervetel isikutel esile ei põletikureaktsioone, üldist allergilist sensibilisatsiooni ega kahjusta oluliste organite tööd.

## Seedekulgla mikrofloora

20 **Metoodika:** Bakteriaalne DNA isoleeriti faecese proovidest QIAamp DNA Stool Kitiga (QIAGEN), amplifitseeriti primeritega Uni-515-GC-rev (ATCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-GC), Lab-159-f (GGAACACAGA/GTGCTAATACCG) (Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans, ADL, de Vos WM, /et al./ Molecular diversity of */Lactobacillus/* ssp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 25 16S ribosomal DNA. /Appl Environ Microbiol /2002; 68: 114-123). PCR produkt eraldati 30 – 60 % akrüüli miidiga DGGE geelelektorfooresiga, kasutades Dcode™ System tehnikat (Bio-Rad, Hercules, California). Saadud geelid analüüsiti BioNumerics 2.5 (Applied Maths, Belgium) programmiga Pearsoni korrelatsiooni alusel (Fromin, N.; Hamelin, J.; Tarnawski, S.; Roesti, D.; Jourdain-Miserez, K.; Forestier, N.; Teyssier-Cuvelle, S.; Gillet, F.; Aragno, M.; Rossi, P. Statistical analysis of denaturing gel

electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns Environmental Microbiology 2002; 4 (11), 634-643) (Joonised Fig.5a, 5b, 5c).

### **Tulemused**

- 5 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldusega juustu tarbimine muutis isikute roojas laktobatsillide bändide profili 5 uuritul 12 uuritust. Need muutused püsivad viiest vabatahtlikust kolmel isikul isegi kaks näDALAT pärast juustu tarbimise lõpetamist. Seega *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldusega juustu söömine mõjustab inimese seedekulgla laktobatsillide liigilist koostist, erinevaks algsest.

10

### **3) Vere rakulised ja humoraalsed näitajad**

Selgus, et *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 abil valmistatud juust indutseerib katsealustel tsütokiin IL-6 tõusu, mis osutab rakulise immuunsuse stimulatsioonile. Seda leidu kinnitab ka katsetuse lõpp-perioodis vere monotsüütide arvu suurenemine (p=0,015), kusjuures vere vormelementide näitajad jäid normi piiresse.

Võrreldes IL-6 ja monotsüütide vahelist seost pärast juustu söömise lõpetamist ilmnes positiivne korrelatsioon ( $r=0,653$ ,  $p=0,029$ ,  $n=11$ ). Lineaarse regressioon mudeliga jäi seos pidama, kui võeti arvesse vabatahtlike vanust ja sugu ( $R^2 = 0,405$ ,  $R^2 \text{ adj} = 0,338$ ,  $= 0,035$ ) (Joonis Fig. 6).

- 20 Vere rakulise immuunsuse näitajate suurenemine on vastavuses eeltoodud katseloomadel saadud tulemustega, kus *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 manustamisel suurenedes sooles oluliselt Peyer naastude e. lümfifoliiklite sisaldus. Neis foliiklites toimub immuunsüsteemi komponentide eneste vaheline interaktsioon. TH1 tüüpi lümfotsüütide aktiveerimisel bakterite vastu omavad olulist rolli proinflammatoorsed 25 tsütokiinid, sh. IL-6 induktsioon, nende kaudu aktiveeritakse tagasiulatuvalt ka makrofaagid, s.o. veres monotsüüdid. Samas toodavad vere monotsüüdid ise ka IL-6 Rakulise immuunsuse osatähtsuse tõusuga on seletatav ka normi piiresse jäav humoraalse vastuse suppressioon, s.o. antikehade tootmise (IgA, IgG) mõningane vähenemine, mis jäi normi piiresse.

30

Tabel 11. Vere immunoloogilised näitajad *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldusega probiootilise juustu tarbimisel

Immuunsuse näitajad	Juustukatse algus	Juustukatse lõpp *	P väärtsused	Normi väärtsused ja mõõduühikud
Ultrasensitiivne C-reaktiivne valk	$1,9 \pm 1,6$	$3,3 \pm 2,7$	1,0	< 5 mg/L
Leukotsüütide üldarv $\times 10^9$	$6,3 \pm 1,7$	$6,9 \pm 1,6$	0,116	$4 - 10 \times 10^9/L$
Lümfotsüüdid	$2,3 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,4$	0,878	$0,8 - 2,9 \times 10^9/L$
Monotsüüdid	$0,55 \pm 0,17$	$0,64 \pm 0,15$	0,032	$0,15 - 0,75 \times 10^9/L$
Tsütokiin IL-6	$2,7 \pm 1,0$	$3,8 \pm 1,7$	0,020	< 3,4 ng/L
Antikehad IgA	$2,5 \pm 0,9$	$2,3 \pm 0,8$	0,009	0.7-4.0 g/L
Antikehad IgM	$1,3 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,5$	0,776	0,4-2,3 g/L
Antikehad IgG	$12,9 \pm 3,2$	$12,4 \pm 3,0$	0,017	7,0-16 g/L
Antikehad IgE	$19,6 \pm 21,2$	$21,4 \pm 25,9$	0,232	< 85 kU/L

\* I vs IV proov

#### 4) Uriini metaboliidid

5 Biogeensete amiinide määramiseks enne ja pärast probiootikumi tarbimist ja sellele järgnenud taatusperioodi efektiivsuse hindamiseks kasutati hommikust uriini ja gaaskromatograafilist meetodit.

10 **Metoodika:** Uriiniproovid derivatiseeriti propüülkloroformaadiga gaaskromatograafiliseks analüüsiks modifitseeritud Uglandi meetodi järgi (Ugland, H.G., Krogh, M. and Rasmussen, K.E. Aqueous alkylchloroformate derivatization and solid-phase microextraction: Determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. B* 1997, 701, pp. 29–38).

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  $\mu$ m).  
15 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.

Tabel 12. Polüamiinide ja biogeensete amiinide sisaldus probiootilise juustu tarvitajate hommikuses uriinis (nmol/mol kreatiniini kohta)

	Probiootiline juust (sisaldas <i>L.plantarum</i> Inducia DSM 21379)		Kontrolljuust (ilma <i>Lactobacillus plantarum</i> Inducia DSM 21379)		<i>P</i> väärised paaris t-test BL1 vs PRO / BL2 vs PL
	BL1 keskmne stħälve vahemik (mediaan)	PRO keskmne stħälve vahemik (mediaan))	BL2 keskmne stħälve vahemik (mediaan)	PL keskmne stħälve vahemik (mediaan)	
Put	0,064 ± 0,072 0 – 0,191 (0,030)	0,082 ± 0,058 0 – 0,191 (0,077)	0,043 ± 0,044 0 – 0,126 (0,033)	0,044 ± 0,060 0 – 0,216 (0,031)	0,432 / 0,432
acPut	0,606 ± 0,559 0,151 – 2,104 (0,435)	1,087 ± 1,451 0,307 – 5,049 (0,447)	0,796 ± 0,689 0,068 – 2,167 (0,600)	0,635 ± 0,291 0,154 – 1,219 (0,594)	0,021 / 0,850
DAP	0,079 ± 0,092 0 – 0,249 (0,055)	0,059 ± 0,089 0 – 0,216 (0)	0,056 ± 0,089 0 – 0,253 (0)	0,117 ± 0,142 0 – 0,418 (0,055)	0,411 / 0,195
acSpd	0,251 ± 0,227 0 – 0,813 (0,232)	0,384 ± 0,198 0,043 – 0,686 (0,384)	0,354 ± 0,210 0,085 – 0,668 (0,304)	0,425 ± 0,260 0,065 – 0,831 (0,396)	0,089 / 0,464
Cad	0,066 ± 0,123 0 – 0,364 (0)	0,069 ± 0,162 0 – 0,569 (0)	0,067 ± 0,093 0 – 0,293 (0,016)	0,044 ± 0,085 0 – 0,228 (0)	1,0 / 0,540
His	0,231 ± 0,226 0 – 0,595 (0,156)	0,387 ± 0,524 0 – 1,401 (0,122)	0,211 ± 0,364 0 – 1,229 (0)	0,478 ± 0,684 0 – 2,093 (0,235)	0,910 / 0,250
Tyr	0,153 ± 0,161 0 – 0,476 (0,102)	0,101 ± 0,132 0 – 0,427 (0,050)	0,093 ± 0,096 0 – 0,257 (0,093)	0,212 ± 0,285 0 – 1,035 (0,179)	0,167 / 0,149

Put – putrestsiin (*putrescine*), acPut – N-atsetülpotrestsiin (*N-acetylputrescine*),

DAP – 1,3-diaminopropaan (*1,3-diaminopropane*), acSpd – N8-atsetüülspermidiin (*N 8-acetylspermidine*), Cad – kadaveriin (*cadaverine*); His – histamiin (*histamine*), Tyr –

5 türamiin (*tyramine*).

Polüamiinide (putrestsiini, atsetülpotrestsiini ja atsetüülspermidiini) sisaldus uriinis suurennes pärast *L. plantarum* Inducia sisaldava probiootilise juustu tarbimist. Selgus, et 10 atsetüleeritud putrestsiini ja atsetüleeritud spermidiini sisalduse vahel oli oluline korrelatsioon ( $R= 0,383$   $p< 0,01$ ,  $n=48$ ) vabatahtlike uriinis.

Seejuures jäid kõigi polüamiinide sh. putrestsiini, atsetüülspermidiini ja spermiini sisaldus, samuti biogeensete amiinide histamiini ja türamiini sisaldus isikute uriinis vastavaks normaalväärustele.

- 5    *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tüvel oli oluline võime tekitada putrestsiini *in vitro* katsetes, samuti juustus. Kui inimesed olid tarbinud *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldavat probiootilist juustu, suurennes nende uriinis atsetüleeritud putrestsiini sisaldus.

Atsetüleeritud putrestsiin kujutab endast organismis detoksifitseeritud ühendit, mille sisalduse tõus kinnitab *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 poolt putrestsiini tootmist katsealuste seedekulglas või juustuga saadud lisahulkade imendumist ja kasutamist metabolismis. Teistpäri näitab see ka organismi kohastumisreaktsiooni edukust üleliigse putrestsiini eritamiseks atsetüleeritud kujul uriiniga.

15    *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 toodetud putrestsiini immunostimuleeriv toime leidis kinnitust vere IL-6 tsütokiini sisaldusega korreleeruvas makrofaagide (monotsüüdid) hulgas, milliseid saab sel juhul pidada aktiveeritud makrofaagideks. Nimetus koos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga on väga oluline organismi kaitses võõrrakkude (mikroobid, vähirakud) vastu.

20    Soolestikus *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 toimel esinevad putrestsiini füsioloogilised doosid teoreetiliselt soodustavad soole limaskesta katva epiteeli uuenemist ja vanade rakkude apoptoosi, mis väldib epiteeli hüperproliferatsiooni. Nende mehanismidega kindlustatakse ka soole limaskesta barjärfunktsioon mikroobide ja võõrallergeenide läbimineku vastu.

- 25    *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava probiootiliste juustu tarbimine reguleerib IL-6 kaudu vere monotsüütide arvukust ja aktiivsust, mis koos katseloomadel näidatud seedekulgla limaskesta lümfifoliiklite (rakulise immuunsuse kandjate arvukuse tõusuga) parandab soole limaskesta barjäärefekti ja toetab organismi imuunoloogilisi kaitsefunktsioone.

**Näide 5. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldavat jogurtit manustanud tervete vabatahtlike isikute kliniliste verenäitajate uurimine**

Klinilise katse (*cross-over* randomiseeritud platseeboga kontrollitud kaksikpime katse,

- 5 klinilise katse registreerimise rahvusvaheline number ISRCTN68198472) eesmärgiks oli hinnata *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldaava jogurti ohutust ja toimet tervete vabatahtlike seedetrakti mikrofloorale.

**Inimesed ja meetodid:** osalejateks olid 27 tervet mõlemast soost vabatahtliku isikut (M/N 10/17;  $29,2 \pm 9,3$  a). Võimaliku varjatud diabeedi väljalülitamiseks määratati 10 glükoosi ja glükohemoglobiin (HbA1c) vereseerumist.

Test-jogurt sisaldas tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 ( $5 \times 10^6$ - $10^7$  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.

- 15 Päevane doos oli  $10^8$ - $5 \times 10^9$  mikroobirakku).

**Vereseerumi humoraalse ja rakulise immuunsuse parameetrid**

- 20 Leiti, et *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldusega jogurt indutseeris vabatahtlike vereseerumis monotsüütide kemotaktiivset proteiini (MCP,  $p=0,016$ ), mis viitab immunsüsteemi humoraalse osa stimulatsioonile. Antud leid korreleerus positiivselt IL 10 ( $r = 0,583$ ;  $p = 0,009$ ) tõusuga.

- 25 Immunsüsteemi humoraalsete parameetrite tõus on kooskõlas kolme nädala pikkuse *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldusega juustu manustamisel saadud eelpoolkirjeldatud tulemustega.

Tabel 13 Tsütotiinide sisaldus (pg/ml) vabatahtlike vereseerumis katse jooksul

	Probiootiline jogurt		kontrolljogurt		<i>P</i> väärised BL1 vs PRO / BL2 vs PL
	BL1	PRO		PL	
INF $\gamma$	2,9 ± 4,3	3,8 ± 4,2	3,7 ± 3,6	1,9 ± 1,8	0,084 / 0,107
TNF $\alpha$	4,6 ± 3,2	5,0 ± 2,6	4,0 ± 1,4	3,8 ± 1,2	0,225 / 0,376
VEGF	158,8 ± 15,8	157, ± 120,4	152,2 ± 106,8	163,0 ± 157,7	0,465 / 0,841
MCP	218,4 ± 98,1	251,3 ± 145,1	256,2 ± 142,2	230,8 ± 116,7	<b>0,016</b> / 0,156
EGF	54,8 ± 57,6	53,4 ± 38,4	53,2 ± 56,5	52,0 ± 45,1	0,679 / 0,353

VEGF - veresoonte endoteeli kasvufaktor

5 MCP - monotsüütide kemotaktiivne proteiin

EGF – epidermaalne kasvufaktor

Seega aktiveeris Inducia sisaldusega jogurti manustumine monotsüütide kemotaktiivse proteiini, mis tõendab immuunse suurenenud aktiivsust.

10 Pärast *Lactobacillus plantarum* Inducia sisaldusega jogurti manustamist tõusis patsientide hommikuses uriinis atsetülpulputrestsiini hulk.

Atsetülpulputrestsiini hulga tõus korreleerus ( $r= 0,439$   $p = 0,037$ ) spermidiamiini hulga tõusuga vabatahtlike hommikuses uriinis. Antud tulemused on kooskõlas probiootilise juustu kliinilise katse tulemustega.

15 Samas jäid nii polüamiinide sh. putrestsiini ja atsetülpulputrestsiini kui ka biogeensete amiinide kontsentratsioon uriinis normi piiridesse.

**Tabel 14.** Polüamiinide ja biogeensete amiinide sisaldus probiootilise jogurti tarvitajate hommikuses uriinis (nmol/mol kreatiniini kohta)

	Probiootiline jogurt		kontrolljogurt		<i>P</i> väärised BL1 vs PRO / BL2 vs PL
	BL1	PRO	BL2	PL	
Put	0,084 ± 0,170	0,032 ± 0,060	0,033 ± 0,039	0,029 ± 0,036	0,069 / 0,776
acPut	0,275 ± 0,231	1,015 ± 1,816	0,349 ± 0,240	0,538 ± 0,719	0,002 / 0,160
DAP	0	0,038 ± 0,109	0,005 ± 0,017	0,064 ± 0,200	0,181 / 0,059
Spd	0,168 ± 0,081	0,221 ± 0,147	0,188 ± 0,117	0,64 ± 0,269	0,218 / 0,377
Cad	0	0	0 ± 0,001	0,001 ± 0,005	NA / 1,0
Tyr	0		0	0	NA

30

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

5

10

### **PATENDINÕUDLUS**

1. Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kui organismi loomulikku kaitsevõimet tõstev probiootik, mis toodab orniiniist ja glutamaadist polüamiine, arginiinist lämmastik monooksiidi, omab antioksüdantset aktiivsust ning suurendab soole limaskesta barjäärfunktsiooni, tõstab rakulist immuunsust soole limaskestas ja veres ja indutseerib adaptiivselt proinflammatoorseid tsütokiine.
2. Mikroorganism vastavalt punktile 1 lüofiliseeritud kujul.
3. Punktile 1-2 vastavat mikroorganismi tüve sisaldav kompositsioon.
4. Punktile 1-2 vastavat mikroorganismi tüve sisaldav toiduaine.
5. Toiduaine vastavalt punktile 4, milleks on piimatooted.
6. Toiduaine vastavalt punktile 5, milleks on fermenteeritud piimatooted.
7. Toiduaine vastavalt punktile 6, milleks on juust.
8. Punktile 1-2 vastava mikroorganismi tüve kasutamine rakulist immuunsust tõstva ravimi valmistamiseks.

1 / 8

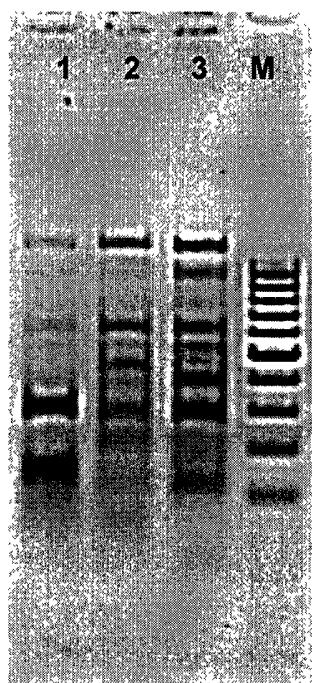


Fig.1

2 / 8



Fig.2

3 / 8

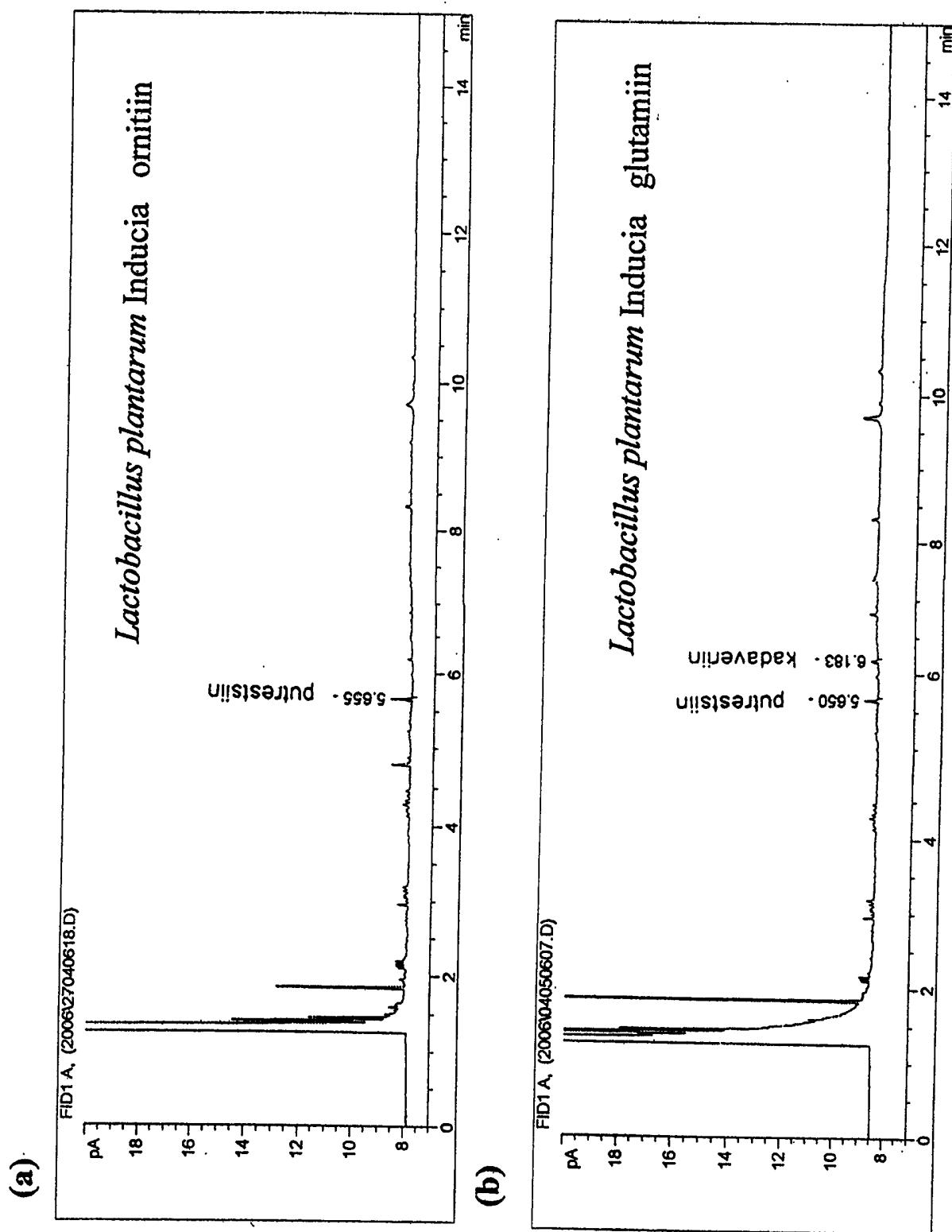


Fig. 3

4 / 8

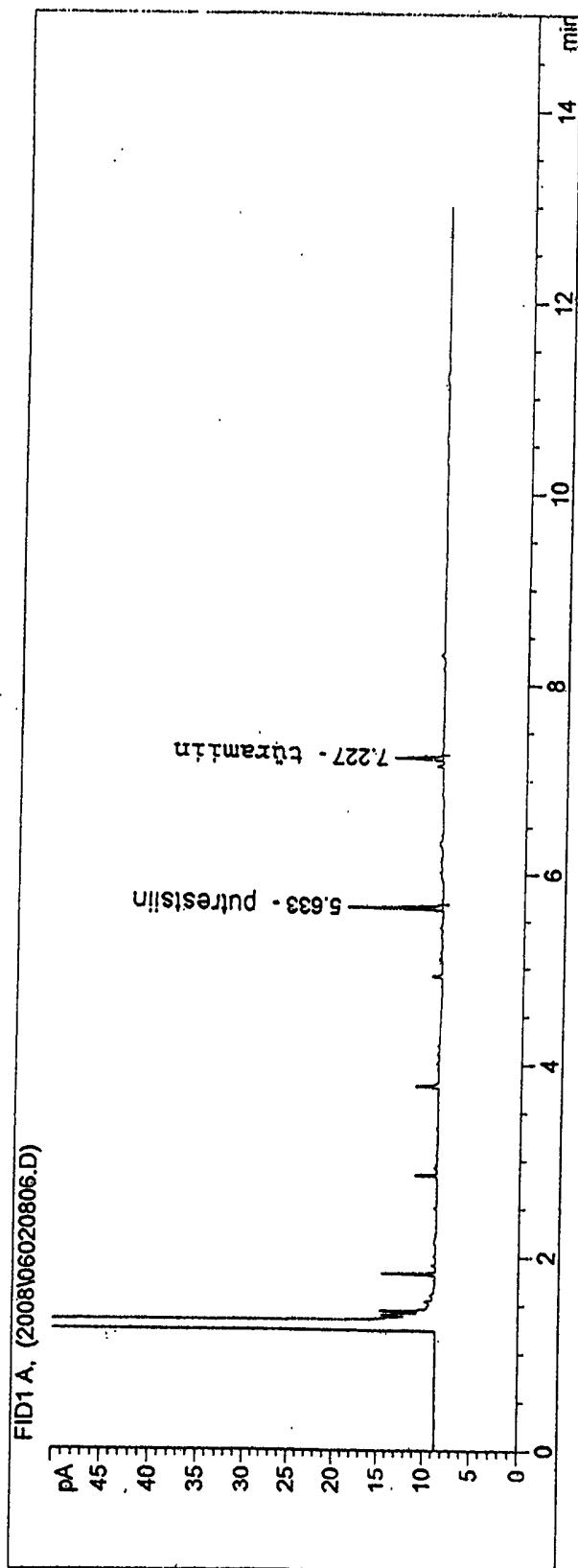


Fig. 4

5 / 8

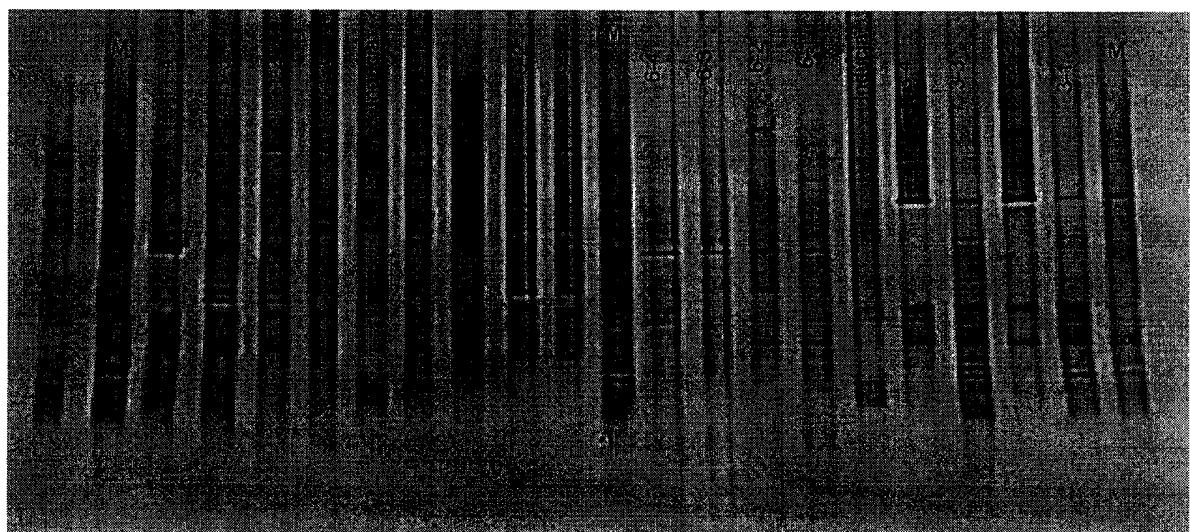
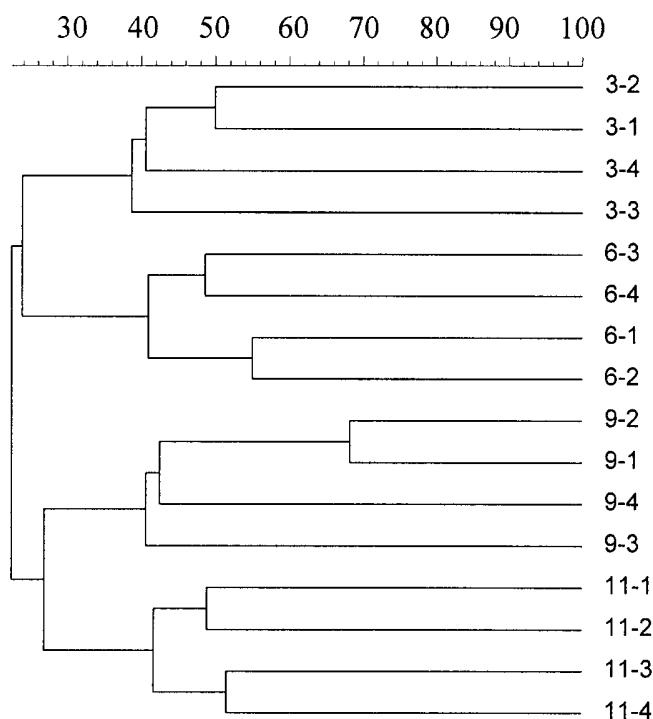


Fig. 5a

6 / 8

40 50 60 70 80 90 100

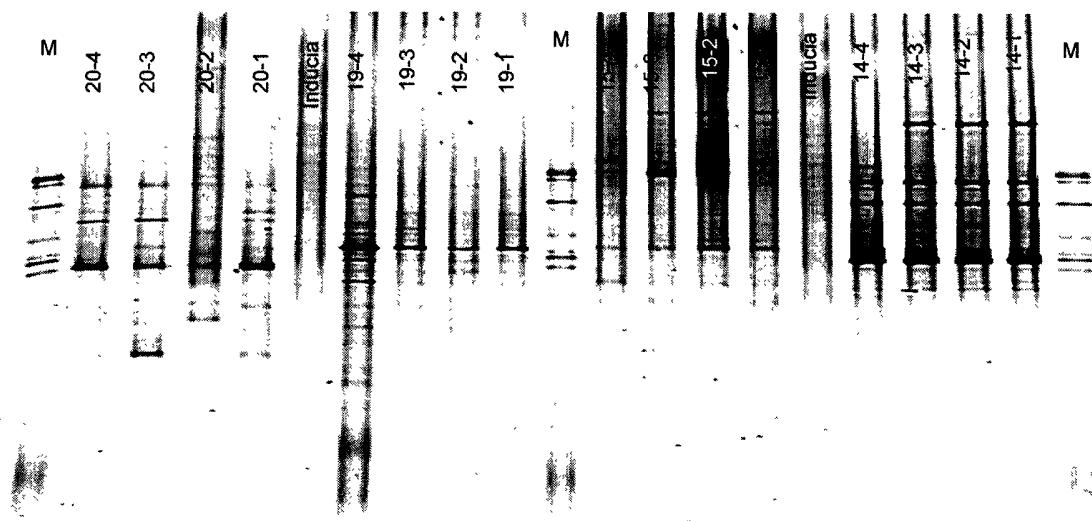
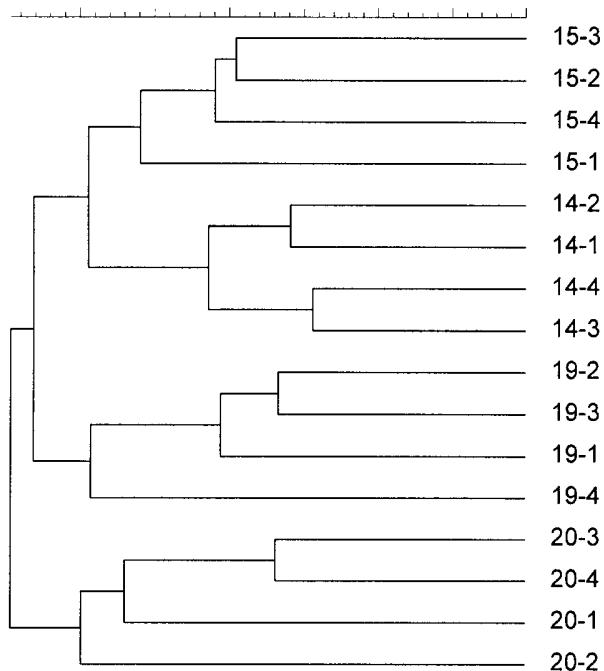


Fig. 5b

7 / 8

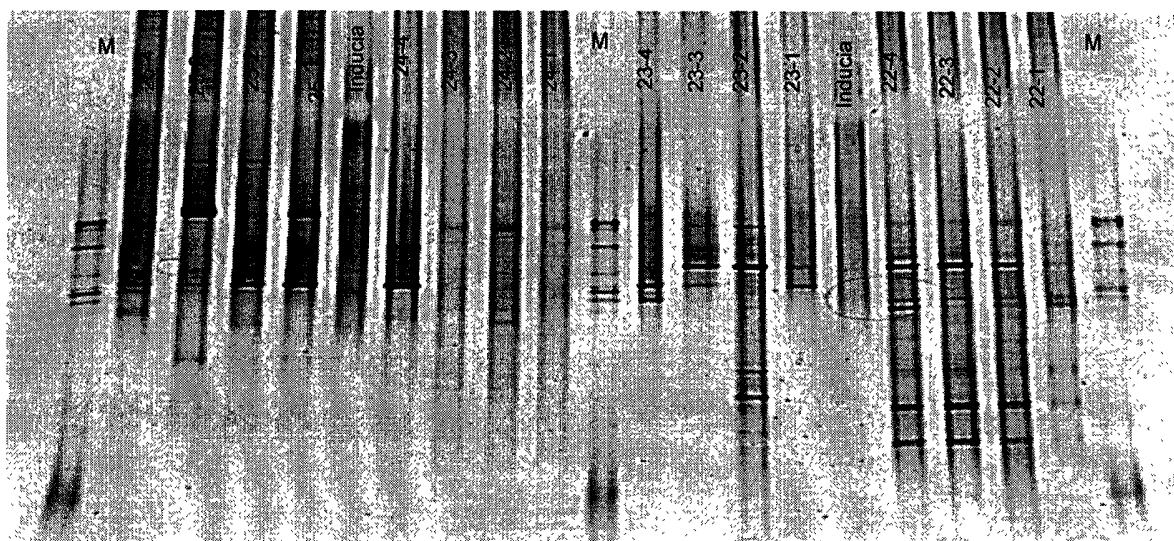
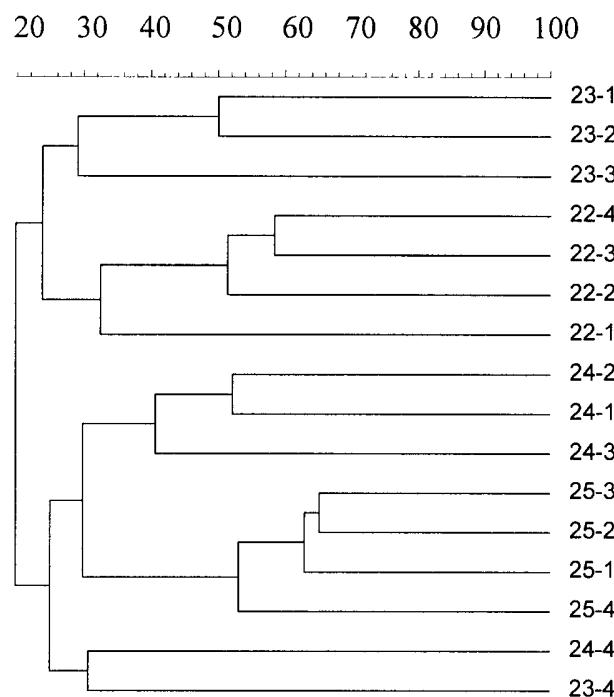


Fig. 5c

8 / 8

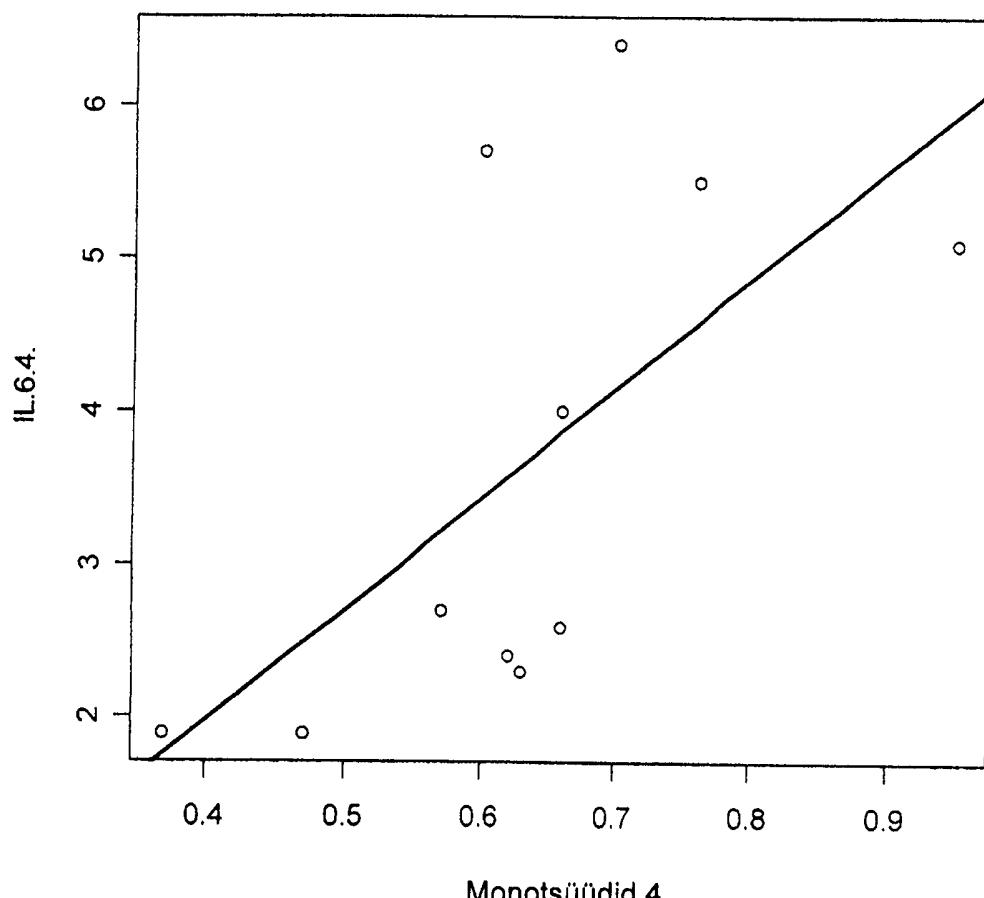


Fig. 6