

(12) **PATENDIKIRJELDUS**(21) Patenditaotluse number: **P202000014**(22) Patenditaotluse esitamise
kuupäev: **18.09.2020**(24) Patendi kehtivuse
alguse kuupäev: **18.09.2020**(43) Patenditaotluse
avaldamise kuupäev: **18.04.2022**(45) Patendikirjelduse
avaldamise kuupäev: **15.06.2022**(83) Bioloogilise aine, sh mikroorganismi tüve
deponeerimise andmed:**DSM 32372, 23.09.2016, DSMZ**

(73) Patendiomanik:

BioCC OÜ
Fr. R. Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE

(72) Leiutise autorid:

Pille Palumaa
Lai 55, Järva-Jaani,
73301 Järva maakond, EE**Tanel Kaart**
Sõbra 40, 50106 Tartu, EE**Kristiina Märs**
Ringtee 31, Tõrvandi,
61715 Tartu maakond, EE**Meelis Ots**
A.H. Tammsaare 5-13, 51006 Tartu, EE**Eve Rihma**
A.H. Tammsaare 8-58, 51006 Tartu, EE**Jaan Vihalemm**
Vanemuise 64-24, 50410 Tartu, EE**Epp Songisepp**
Tähe 105-7, 50107 Tartu, Tartu maakond, EE**Liina Kuus**
Rehetare tee 1-15, Soinaste küla, Kambja
vald, 61709 Tartu maakond, EE**Heili Sadam**
Helmika 1, Tila küla, Tartu vald,
60532 Tartu maakond, EE

(74) Patendivolinik:

Sirje Kahu
Patendibüroo Ustervall OÜ
Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE(54) **Mikroorganismi tüvi *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest kui antimikroobne ja antioksidatiivne probiootikum**

(57) Mikroorganismi tüvi *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest deponeerimisnumbriga DSM 32372 on uus antimikroobne ja antioksidatiivne probiootikum. Coccobest inhibeerib enteropatoogenide *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *S. aureus*, *E. faecalis* ja *C. sakazakii* kasvu, kuid ei inhibeeri soolestiku loomuliku mikrobiota laktobatsille. Tüve antimikroobseid omadusi soodustavad proteolüütilise aktiivsusega periplasmaatilise peptidoglükanaani hüdrolaasid. Coccobesti kasutatakse zootehnilise söödalisandina põllumajandus- ja loomakasvatuse seadepäraseks nakkustõve vältimiseks ning kõhulahtisuse ennetamiseks ja vähendamiseks. Coccobestil on kõrge aktiivsusega antioksidatiivne kaitsesüsteem, tõstes glutatiooni redoksaktiivsust ning vähendades oksüdatiivset stressi rakkudes. Seetõttu leiab Coccobest kasutust inimeste probiootilise toidulisandina või funktsionaalse toiduna seedekulga bakteriaalsetesse infektsioonidesse nakatumise vältimiseks ning oksüdatiivse stressi ennetamiseks ja vähendamiseks. Lisaks on Coccobesti tüvi kasutatav juuretiseks kõõviljude fermenteerimisel.

(57) The microorganism strain *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest with a deposit number DSM 32372 is a new antimicrobial and antioxidant probiotic. Coccobest inhibits the growth of the enteropathogens *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *S. aureus*, *E. faecalis* and *C. sakazakii*, but does not inhibit lactobacilli of natural intestinal microbiota. The strain's antimicrobial properties are enhanced by periplasmic peptidoglycan hydrolases with proteolytic activity. Coccobest is used as a zootechnical feed additive to prevent bacterial infections in the gastrointestinal tract of farm animals and pets and to prevent and reduce diarrhea. Coccobest has a highly active antioxidant defense system, increasing the redox activity of glutathione and reducing oxidative stress in cells. Therefore, Coccobest is used as a food supplement or functional food for humans to prevent bacterial infections of the gastrointestinal tract and to prevent and reduce oxidative stress. In addition, Coccobest is used as a starter culture in fermentation of vegetables.

MIKROORGANISMI TÜVI *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* TAK 589 COCCOBEST KUI ANTIMIKROOBNE JA ANTIOKSÜDATIIVNE PROBIOOTIKUM

TEHNIKAVALDKOND

Käesolev leiutis kuulub biotehnoloogia valdkonda. Leiutisekohane probiootiline
5 piimhappebakter leiab kasutust organismi loomuliku kaitsevõime tõstmiseks ning mitmesuguste haiguste ennetamiseks ja leevendamiseks.

TEHNIKA TASE

Probiootikumid on ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsiooni (FAO) ja Maailma
Terviseorganisatsioon (WHO) määratletud kui elavad mikroorganismid, mis piisavas koguses
10 manustatuna – toidulisandina või funktsionaalses toidus – mõjutavad soodustavalt seedetrakti mikrobioloogilist tasakaalu ning on seeläbi kasulikud peremeesorganismi tervisele. Funktsionaalne toit või kompositsioon sisaldab tervist soodsalt mõjutavaid või haigusriske vähendavaid lisakomponente või bioloogiliselt aktiivseid preparaate, sh probiootikume.

Liikide ja isendite seas märkimisväärselt eristuvad soolestiku mikrobiota ning pere-
15 meesorganismi vahelised vastastikmõjud muutuvad sõltuvalt geneetilistest ja keskkondlikest teguritest ning haigustest. Soolestiku mikrobiota tasakaalu soovitud suunas mõjutades on võimalik soodustada vastupanuvõimet immuun-, psüühika- ja metaboolsetele haigustele ning nende allumist ravimitele. Probiootikumide manustamine soodustab soolestiku mikrobiota kolonisatsiooniresistentsust ning vastupanuvõimet stressile ja enterogeensetele infektsioonidele
20 (Sassone-Corsi et al., 2015. How Beneficial Microbes Cooperate with Immunity To Provide Colonization Resistance to Pathogens. J Immunol. 194: 40814087).

Enamik probiootikumidest on piimhappebakterid ehk piimhappekääritajad. Nende hulka kuulub ka tetraade moodustavate homofermentatiivsete pediokokkide perekond – nad on kohastunud elutegevuseks laias pH, temperatuuri ja osmootse rõhu vahemikus ning seetõttu
25 võimalised koloniseerima seedetrakti.

Inimestele ning loomadele manustamiseks sobivate probiootikumide selekteerimisel lähtutakse ohutuse, funktsionaalsuse ja tehnoloogilisuse kriteeriumitest (FAO/WHO, 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed, 2011.
30 Technical guidance: Tolerance and efficacy studies in target animals. EFSA J. 9:2175).

Ohutuse aspektist on oluline välistada antibiootikumiresistentsed, patogeensed või nakkushaigusega seostatud bakteritüved. Seejuures on isoleeritud tüve päritolust olulisem funktsionaalsus ehk soolestiku kolonisatsiooni võime ning bioloogiline aktiivsus (Saarela et al., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol. 84:197215). Tehnoloogiliste kriteeriumite alla kuuluvad probiootilise tüve bioloogilise aktiivsuse ning sensorsete omaduste püsimine tootmis- ja säilitamisprotsesside käigus, seejuures peab olema tagatud probiootikumide elujõulisus pärast seedekulgla läbimist.

Antibiootikumide manustamisest loomadel tekkivad probleemid

Vabas looduses sündinud loomad omandavad soolestiku mikrobiota oma emalt. Kaasaegsed loomakasvatuse meetodid ei lase aga emasloomal järglastega piisavalt koos viibida ning seetõttu ei pruugi noore looma soolestiku mikrobiota piisavalt kiiresti või täielikult välja areneda. See ei paku vastündinud loomale piisavat kaitset patogeene vastu ning füüsilise ja emotsionaalse keskkonna muutusest – emast lahutamisel või võõrutamisel – tekkiv stress muudab noore looma organismi infektsioonidele eriti tundlikuks (Corcionivoschi et al., 2010. The Effect of Probiotics on Animal Health. A review. J Anim Sci Biotechnol. 43:1).

Infektsioonide ennetamiseks, aga ka kasvu stimuleerimiseks on loomakasvatustes aastakümneid levinud antibiootikumide manustamine. Selle tagajärjel on loodusliku valiku ning geneetiliste mutatsioonide koosmõjul oluliselt suurenenud antibiootikumiresistentsete patogeene väljaselekteerumine ja resistentsusgeenide horisontaalne levik farmiloomade vahel ning farmimaadelt põhjavette (FAO, 2016. Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation by Y.S. Bajagai et al. FAO Animal Production and Health Paper No. 179. Rome; Chee-Sanford et al., 2001. Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities. Appl Environ Microbiol. 67:1494–1502).

Antibiootikumiresistentsete patogeene levik farmiloomade seas kujutab endast ohtu ka inimeste tervisele, levides mööda toiduahelat ning põhjustades tõsiseid haiguspuhanguid – 90ndatel aastatel aset leidnud haiguspuhangud Taanis ja USA-s olid otseselt seotud vastavalt multiresistentse *Salmonella enterica* serovari Typhimurium DT104 levikuga sealihase ja kinoloonide suhtes resistentse *Campylobacter jejuni* levikuga linnulihas (Molbak et al., 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *S. enterica* Typhimurium DT104. N Engl J Med. 341:1420–1425; Smith et al., 1999. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992–1998 Investigation team. N Engl J Med. 340:1525–1532).

Probiootikumide manustamine veterinaarmeditsiinis

Vastavalt Euroopa Parlamendi ja Nõukogu (EÜ) määrusele nr 1831/2003 on Euroopa Liidus alates 2006. aastast keelatud loomasööta lisada antibiootikume haigusi (sh seede-infektsioone) ennetavatel ning kasvu stimuleerivatel eesmärkidel. Sama määruse raames klassifitseeritakse

5 probiootikume kui seedefloora tasakaalustajad eri loomaliikidele mõeldud zootehnilistes söödalisandites.

Probiootilised söödalisandid vähendavad kolibakterite arvukust vasikate soolestikus ja sellest põhjustatud kõhulahtisust ning suurendavad vasikate söömust, stimuleerides kasvu ja vähendades suremust (Wallace ja Newbold, 1995. Bacteriology in Animal Feed and Animal

10 Feeding. VCH Verlagsgesellschaft mbH). Lisaks soodustavad probiootikumid soolestiku kolonisatsiooniresistentsust (Jatkauskas ja Vrotniakien, 2010. Effects of probiotic dietary supplementation on diarrhoea patterns, faecal microbiota and performance of early weaned calves. Vet Med Praha. 55:494–503).

Probiootikumid on efektiivsemad vasika sünnijärgse arengu varases staadiumis (7.-10. päev), mil haigusnähud avalduvad tihedamalt ning tüsistused võivad olla tõsisemad (Kawakami et al.

15 2010. Feeding of Lactic Acid Bacteria and Yeast on Growth and Diarrhea of Holstein Calves. J Anim Vet Adv. 9:1112–1114). Seetõttu on oluline võimalikult varakult peale looma sündi pärssida patogeenide levikut soolestikus.

Pediokokkide manustamine probiootikumidena põllumajandusloomadele

20 Euroopa Liidus kvalifitseerunud seedefloora stabiliseerijate hulka kuulub põrsaste ja kanade kaaluiibe suurendamiseks manustatav *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M (Komisjoni rakendusmäärus (EL) nr 413/2013, 6. mai 2013).

Kõnealuse tüve manustamine põrsastele esimese 42 elupäeva jooksul mõjub positiivselt nende juurdekasvule ning kaitseb peensoole limaskesta, soodustades põrsaste kolonisatsiooniresistentsust ning vastupanuvõimet stressile võõrutusperioodil (Di Giancamillo et al., 2008.

25 Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study. Histol. Histopathol. 23:651–664).

Kanadele manustades mõjutas *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M soodustavalt

30 munade kaalu, koore paksust, sööda efektiivsust, munakollase rasvhappelist koostist ja kolesteroolisisaldust ning vähendas praakmunade arvukust (Mikulski et al., 2012. Effects of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* supplementation on performance, nutrient

digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. Poultry Science, 91:2691–2700).

Mõnele *Pediococcus acidilactici* probiootilistele tüvele on omistatud võime reguleerida valguliste signaalmolekulide sünteesi, leevendades seeläbi põletikulist reaktsiooni organismis.

- 5 Korea rahvustoidust isoleeritud *Pediococcus acidilactici* LDTM 5201 manustamine inhibeerib IL-8 tsütokiinide transkriptsiooni, mis indutseerivad põletikulist reaktsiooni infektsiooni-piirkonnas. Seejuures võimendab sama tüvi IL-10 tsütokiinide, põletikuvastase reaktsiooni mediaatorite transkriptsiooni organismis, manustatuna fermenteeritud piimatoodetes või söödalisisandina (KR 20180117761, Seoul National University R&DB Foundation, 2018).
- 10 Sarnane põletikulise reaktsiooni kujunemist inhibeeriv toime avaldub *Pediococcus acidilactici* NRRL B-50517 manustamisel, mille tulemusel võimendub organismis IL-10 tsütokiinide ja M2 makrofaagide ning väheneb tsütokiinide IL-6 ja IL-23 transkriptsioon organismis (US 201916266397, Imagilin Technology LLC, 2019).

- 15 *Pediococcus acidilactici* leiab rakendust ka mitmest probiootilisest bakteriliigist koosnevas kompositsioonis – see sisaldab täiendavaid seedetegevust mõjutavaid komponente nagu inuliini, adsorbente ning soolemotoorika inhibiitoreid – vasikate kõhulahtisuse vähendamiseks ja ennetamiseks (EP 20110711323, Technische Universität München, 2011).

Pediokokkide kasutamine taimse materjali fermenteerimisel

- Hapendamine on üheks lihtsaimaks köögiviljade säilitamise viisiks. Peenestatud köögiviljale keedusoola lisamine soodustab mahla eraldumist, mis on arenevale mikrobiootale toitekeskkonnaks. Hapendamine nõuab anaeroobseid tingimusi, vältimaks ebasoovitava mikrobiota vohamist, vead köögiviljade hapendamise tehnoloogias ning köögiviljade looduslikus mikrobiotas esinevate mikroobiliikide domineerimise mõjul võib lõpp-produkt jääda pehmeks, limaseks või esineda värvimuutusi (Pudnir ja Jain, 2010. Changes in microflora of sauerkraut during fermentation and storage. World J Dairy Food Sci 5:221–225).
- 25 Juuretisekultuuride kasutamist köögivilja hapendamisel limiteerivad mitmed tegurid – köögiviljade indigeenne mikrofloora, 1-2% keedusoolakontsentratsioon, temperatuuride kõikumine. Lisaks ei tohi juuretis negatiivselt mõjutada lõpp-produkti sensoorseid omadusi.

- Köögiviljade hapendamisel on domineerivateks piimhappebakterite liikideks *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* ja *Lactobacillus plantarum* (Applications of Biotechnology to Traditional Fermented foods. 1992. Report of an ad hoc panel of the board on science and technology for international development. National Academy
- 30

Press, Washington, D.C.; Plengvidhya et al. 2007. DNA Fingerprinting of Lactic Acid Bacteria in Sauerkraut Fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 73:7697–7702).

Seejuures on teada, et *Pediococcus acidilactici* IOB701 ning teiste probiootiliste tüvede abil fermenteeritud funktsionaalse toidu – valmistatud sojaubadest, kollajuurest ja rosinapuu viljadest – manustamine leevendab alkoholi tarbimisest tingitud järelnähtusid ning toetab maksa elutegevust alkoholi lagundamisel, vähendades muuhulgas maksakahjustuse riske (CN 201910930726, Tianjin Chuangyuan Biotechnology Co., LTD, 2019).

Eeltoodust nähtub, et on uuritud ja kasutatud mitmeid eri omadustega *Pediococcus acidilactici* tüvesid. Siiski ei ole sama liigi eritüved identsete omadustega, kuna neil esinevad geneetilistest variatsioonidest tingitud liigisisised erinevused ehk tüvespetsiifilised omadused.

Eri keskkondadest – silost, roojast, piimast ning fermenteeritud köögiviljadest ja mahladest – isoleeritud pediokokkide tüvespetsiifiline tundlikkus antibiootikumide suhtes varieerub tugevalt (Singla et al., 2018. Antibiotic susceptibility profile of *Pediococcus* spp. from diverse sources. 3 Biotech. 8:489). Näiteks on mitme *Pediococcus acidilactici* tüve testimisel leitud laiapõhjalist resistentsust levinud antibiootikumide vastu (Daniels et al., 2007. Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial agents. J Appl Microbiol. 102:384–389). Seega võivad lähedalt suguluses olevad probiootilised bakteritüved erineda nii genotüübi, fenotüübi kui funktsionaalsuse poolest (Barros et al., 2001. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pediococcus* Strains Isolated from Human Clinical Sources. J. Clin. Microbiol. 39:1241–1246).

Probiootikumide konkreetse tüvespetsiifilise omaduse ilmnemise peamiseks eelduseks on seda põhjustavate geenide olemasolu mikroobirakus (Marteau, 2011. Evidence of Probiotic Strain Specificity Makes Extrapolation of Results Impossible From a Strain to Another, Even From the Same Species. Annals of Gastroenterology & Hepatology).

Seega on olemas vajadus *Pediococcus acidilactici* tüve järgi, millel oleksid soovitud omadused, ja mis sobiks kasutamiseks nii inim- kui loomatoidus ning taimse materjali fermenteerimiseks.

LEIUTISE OLEMUS

Käesolev leiutis käsitleb isoleeritud bakteritüve *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest, seda tüve lüofiliseeritud kujul, nimetatud tüve sisaldavat kompositsiooni ning tüve kasutamist probiootilise toidu- või joogilisandina, põllumajandus- ja lemmikloomade zootehnilise söödalisandina ning inimeste funktsionaalse toidu või joogi lisandina. Leiutise eesmärgiks on pakkuda välja uus probiootiline bakteritüvi, mille antimikroobne ja antioksidatiivne toime

sobib seedetrakti mikrobiota korrigeerimiseks ja stabiliseerimiseks ning seeläbi bakteriaalsetesse infektsioonidesse nakatumise vältimiseks ja oksüdatiivse stressi ennetamiseks ja/või vähendamiseks organismis. Lisaks on *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest sobilik kasutamiseks tehnoloogilise juuretise taimse materjali fermenteerimisel.

- 5 *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest sobib lüofiliseeritud mikroobikultuuri kujul toidulisandina manustamiseks ning funktsionaalse toidu valmistamiseks inimestele ja/või põllumajandus- ja lemmikloomadele (sh kalad ja linnud). *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest sisaldava kompositsiooni teisteks koostisosadeks võivad olla täispiimaasendajad, piim, starterkultuur, jõusöödad, eelsegud ja muud komponendid.

- 10 Leiutisekohane tüvi on kasutatav inimeste, põllumajandus- ja lemmikloomade seedekulga bakteriaalsetesse infektsioonidesse nakatumise vältimiseks ja seeläbi kõhulahtisuse ennetamiseks ja/või vähendamiseks. Eelnimetatud bakteriaalseid infektsioone põhjustavateks mikroobideks on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Shigella sonnei*, *Enterococcus faecalis*
15 ja *Cronobacter sakazakii*.

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobest antibakteriaalseid ning antioksidatiivseid omadusi saab kasutada ohutult mitmes biotehnoloogiavaldkonnas, sealhulgas taimse materjali fermenteerimisel või inimeste probiootilistes toidulisandites.

- Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest on deponeeritud mikroorganismide
20 patendiekspertiisiks deponeerimise rahvusvahelise tunnustamise Budapesti lepingu kohaselt Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-s registreerimisnumbriga DSM 32372 (23.09.2016).

Morfoloogilised tunnused

- Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest tüvi isoleeriti terve vasika roojaproovist
25 seedetrakti mikrobiota uuringu käigus, külvates vasika rooja lahjendusi (10^{-2} - 10^{-7}) füsioloogilises lahuses (0,9% NaCl) ning teostati väljakülvid de Man-Rogosa-Shape (MRS) agarile (OXOID, UK), mida inkubeeriti termostaadis IG 150 (Jouan, Prantsusmaa) mikroaeroobses keskkonnas (10/5/85 CO₂/O₂/N₂) 48 tundi 37 °C juures. Väljakasvanud mikroobipesasid kirjeldati, loendati ning määrati mikroobide üldhulk. *Pediococcus acidilactici*
30 TAK 589 Coccobest on Gram-positiivne kokk, mille rakud asetsevad paariti või tetraadidena.

Füsioloogilis-biokeemilised tunnused

- Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest kultiveerimiseks sobib inkubeerimine MRS-puljongis 24-48 tundi mikroaeroobses keskkonnas, mille järel ilmneb ühtlaselt hägune kasv. Pärast 48 tunnist MRS-agarsöötmel kultiveerimist 37 °C juures mikroaeroobses keskkonnas (10/5/85 CO₂/O₂/N₂) on mikroobipesad 1,5-2,5 mm läbimõelduga, hallikasvalged, kumerad, korrapärase äärisega. Tüve optimaalne kasvutemperatuur on 37-45 °C; tüvi paljuneb ka 7 °C ja 15 °C juures. Optimaalse kasvukeskkonna pH on 6,5.

- TAK 589 Coccobest tüvi identifitseeriti kui *Pediococcus acidilactici* biokeemilise aktiivsuse alusel, kasutades süsivesikute fermentatsiooniprofiili API CHL 50 (bioMérieux, Prantsusmaa) ning massispektromeetrit Maldi Biotyper (Bruker Daltonik, Saksamaa). Tüvi fermenteerib: L-arabinoosi, riboosi, D-ksüloos, D-galaktoosi, D-glükoosi, D-fruktoosi, D-mannoosi, L-ramnoosi, N-atsetüülglükosamiini, amigdaliini, arbutiini, eskuliini, salitsiini, tsellobioosi, D-trehhaloosi, gentibioosi, tagatoosi, naatriumglükonaati.

Genoomsed ja molekulaarsed tunnused

- Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest genoomi täissekveneerimisel (Omega Bioservices, USA) saadud lugemitest sorteeriti välja DNA lõigud vastavalt Phredi kvaliteediskoorile (< 20) ning pikkusele (< 40 bp), kasutades PRINSEQi veebitarkvara (Schmieder ja Edwards, 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics, 27:863–864.). Kvaliteedikontrolli läbinud lugemitest genoomi täielikuks assambleerimiseks ning annoteerimiseks kasutati RAST-serveril baseeruvat PATRICi tarkvara (Brettin et al., 2015. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. Sci Rep. 5:8365). Saadud tulemuste põhjal määrati *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest genoomi nukleotiidsed struktuur ning tuvastati 1947 valku kodeerivat DNA-järjestust (tabel 1).

- Tabel 1. TAK 589 Coccobest nukleotiidsed tunnused

Tunnus	Väärtus
Genoomi pikkus (bp)	1 979 519
Kontiigid	1
GC osakaal (%)	42
CDS	1 947
tRNA	53
rRNA	5

Genoomi annoteerimisel leitud 1947 valku kodeerivat järjestust joondati COG-serveril põhineva andmebaasi ortoloogsete geenide vastu (Tatusov, 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. Nucleic Acids Res. 28:33–36), 1677 järjestust liigitati vastavalt funktsioonile 19 suuremasse kategooriasse (tabel 2).

5 Tabel 2. TAK 589 Coccobest kodeerivate järjestuse klassifikatsioon

OG klass	Nimi	Arv	Osakaal (%)
C	Energia tootmine ja konversioon	76	4,53
D	Rakutsüklite kontroll ja mitoos	17	1,01
E	Aminohapete metabolism ja transport	91	5,43
F	Nukleotiidide metabolism ja transport	87	5,19
G	Süsivesikute metabolism ja transport	218	13,0
H	Koensüümide metabolism ja transport	38	2,27
I	Lipiide metabolism ja transport	42	2,50
J	Translatsioon, ribosoomide struktuur ja biosüntees	140	8,35
K	Transkriptsioon	154	9,18
L	Replikatsioon, rekombinatsioon ja vigade korrigeerimine	98	5,84
M	Rakuseina ja membraani biosüntees	99	5,90
N	Raku liikuvus	3	0,18
O	Post-translatsiooniline modifitseerimine, valkude transport ja chaperonid	48	2,86
P	Anorgaaniliste ionide transport ja metabolism	65	3,88
Q	Metaboliitide viosüntees ja transport	17	1,01
S	Funktsioon teadmata	361	21,5
T	Signaaliülekanne	46	2,74
U	Rakusisene ringlus, sekretsioon ja vesiikulite transport	20	1,19
V	Kaitsemehhanism	57	3,40
Kokku		1 677	

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobest genoomis tuvastati periplasmaatilise peptidoglükaani hüdrolaasi (PGH) geenijärjestused, mille proteolüütilise aktiivsusega ensüümsaidid inhibeerivad laia spektriga mikroorganismide kasvu *in vitro* (Sharma et al., 2016. Prediction of peptidoglycan hydrolases – a new class of antibacterial proteins. BMC Genomics. 17:1; García-Cano et al., 2011. Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. J Appl Microbiol. 111: 607–615).

10 Tuvastatud PGH (GenBank AKD44141.1) järjestus joondati NCBI konserveerunud domeenide andmebaasi vastu ning tuvastati kaks varasemate uuringute käigus kindlaks määratud aktiivsaiti. Esimene neist kuulub peptidoglükaankihti ära tundvate valkude perekonda – mis on

15 võimalised rakuväliselt peptidoglükaani hüdrolyüsima, lõhkudes rakukesta amiidide vahelisi sidemeid. Teine aktiivsait kuulub analoogse toimega glükoosaminidaaside super-perekonda

(Marchler-Bauer et al., 2016. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45:D200–D203).

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobest sisaldab seega vähemalt kahte lüütilise aktiivsusega saitidega ensüümi, mis soodustavad kõnealuse tüve antibakteriaalset aktiivsust.

- 5 Kirjeldatud PGH-ensüümidele omistatud mikroorganismide kasvu inhibeerivat toimet on demonstreeritud *in vitro* ning käesoleva leiutise antimikroobseid omadusi *in vivo*. Mõlemal juhul on demonstreeritud antibakteriaalse toime kandumist mitme levinud patogeeni vastu, sh *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ja *Escherichia coli*.

- 10 Tundlikkus antibiootikumidele

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobest antibakteriaalset tundlikkust antibiootikumidele testiti vastavalt ISO 10932 standardile VetMICTM plaatide abil (SVE, Rootsi). Minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon määrati vastavalt Euroopa Toiduohutusameti (EFSA) soovitatud epidemioloogilistele murdepunktidele ja võrreldi teiste loomset päritolu pediokokkidega BioCC kultuurikollektsioonist (Tabel 3). Mikroobitüvi loetakse tundlikuks, kui selle kasv inhibeerub võrdse või madalamal kontsentratsioonil konkreetse antimikroobse ühendi murdepunktist ($S \leq x$ mg/L). Mikroobitüvi loetakse resistentseks, kui selle kasv inhibeerub kõrgemal kontsentratsioonil konkreetse antimikroobse ühendi murdepunktist ($R > x$ mg/L).

- 20 *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti tüvel ei esinenud resistentsust uuritud antibiootikumide suhtes. Seda võib käsitleda suure ohutuse kriteeriumina mitmete *P. acidilactici* tüvede ees, mille testimise käigus on leitud laiapõhjalist resistentsust levinud antibiootikumide vastu (Daniels et al., 2007. Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial agents. *J Appl Microbiol.* 102: 384–389).

- 25 Tabel 3. TAK 589 Coccobest antibakteriaalne tundlikkus võrreldes kahe pediokokiga

Antibiootikum	Referents (mg/L)	Murdepunkt ^a (mg/L)		
		TAK 589	TAK 551	TAK 569
Ampitsilliin	4	1	1	1
Gentamütsiin	16	2	4	2
Kanamütsiin	64	32	128	64
Streptomütsiin	64	8	64	32
Erütromütsiin	1	0,03	0,25	0,25
Klindamütsiin	1	0,03	0,06	0,12
Tetratsükliin	8	2	64	32
Kloramfenikool	4	1	8	8

^a Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal, 2012. 10(6):2740

Antibakteriaalsed omadused

P. acidilactici eri tüvede antimikroobne mõju patogeenide vastu võib oluliselt varieeruda. Näiteks on demonstreeritud QC38 tüve puhul nõrka inhibeerivat toimet *E. coli* ja *S. enterica* serovari Typhimuriumi vastu ning keskmist inhibeerivat toimet *S. aureus* kasvule (Morales-Estrada et al. 2016. Partial Characterization of Bacteriocin Produced by Halotolerant *Pediococcus acidilactici* Strain QC38 Isolated from Traditional Cotija Cheese. Pol J Microbiol. 65: 279-285). Samas on käesoleva leiutise tüve allasuruv toime nimetatud patogeenide vastu tugev.

In vivo uuringute tulemuste põhjal inhibeerib *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest patogeensete mikroorganismide kasvu. Nimetatud enteropatogeenideks on *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ja *Cronobacter sakazakii* (Näide 1).

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobesti antimikroobsete omaduste hindamiseks patogeenide vastu kasutati joonkülvitehnikat (Hütt et al., 2006. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. J Appl Microbiol. 100:1324-32). Sihtmikroobide inhibitsiooni määramiseks mõõdeti kasvuvaba tsoon millimeetrites, arvutati kasutatud valimi tulemuste põhjal aritmeetiline keskmine ning standardviga ja sellest lähtuvalt hinnati tüvede antagonistlikku aktiivsust.

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobesti tüvel avaldusid tugevad antagonistlikud omadused valitud patogeenide suhtes peale 24 ja 48 tundi inkubeerimist, kuid tüvi ei suru alla soolestiku loomuliku mikrobiota kooslusesse kuuluvaid laktobatsille (tabel 4; 5).

Tabel 4. TAK 589 Coccobest antibakteriaalne aktiivsus^a

Patogeen	Kasvupidurdustsoon (mm)	
	Mikroaeroobne keskkond	Anaeroobne keskkond
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 51774	13,9 ± 0,4	7,3 ± 0,6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14,0 ± 1,0	6,1 ± 0,5
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	13,2 ± 1,0	5,5 ± 0,5
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	12,5 ± 0,9	5,9 ± 0,6
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	13,5 ± 0,4	7,0 ± 0,5
<i>Escherichia coli</i> DSM 1576	11,2 ± 1,0	6,1 ± 0,8
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 51329	14,5 ± 0,9	6,0 ± 0,8

^a Modifitseeritud MRS-agarsöötmele mikroaeroobses (10% CO₂) ja anaeroobses (5/90/5 CO₂/O₂/N₂) keskkonnas peale 24 tundi inkubeerimist.

Kasvupidurdustsoon mikroaeroobses keskkonnas: nõrk <9,9; keskmine 10,0-12,9; tugev >13 (mm).

Kasvupidurdustsoon anaeroobses keskkonnas: nõrk <4,9; keskmine 5,0-5,9; tugev >6 (mm).

5 Tabel 5. TAK 589 Coccobesti antibakteriaalne aktiivsus^b

Patogeen	Kasvupidurdustsoon (mm)	
	Mikroaeroobne Keskond	Anaeroobne keskkond
<i>Lactobacillus</i> spp.	2,90 ± 0,4	4,70 ± 0,9
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 51774	34,0 ± 0,1	20,8 ± 1,0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	27,2 ± 2,5	18,3 ± 0,5
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	23,3 ± 1,1	20,3 ± 0,5
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	21,9 ± 1,5	20,5 ± 0,6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16,9 ± 2,5	19,8 ± 0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	23,1 ± 1,4	20,5 ± 0,6
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 51329	23,3 ± 1,0	22,0 ± 0,8

^b Modifitseeritud MRS-agarsöötmele mikroaeroobses (10% CO₂) ja anaeroobses (5/90/5 CO₂/O₂/N₂) keskkonnas peale 48 tundi inkubeerimist.

Kasvupidurdustsoon mikroaeroobses keskkonnas: nõrk <9,9; keskmine 10,0-12,9; tugev >13 (mm).

Kasvupidurdustsoon anaeroobses keskkonnas: nõrk <7,9; keskmine 8,0-12,9; tugev >13 (mm).

10 Antioksidatiivsed omadused

Oksüdatiivset stressi organismis põhjustavad vabaradikaalseid ahelreaktsioone soodustavad faktorid ehk oksüdatiivsed stressorid. Kestev kontrollimatu oksüdatiivsete stressorite teke ja mõju põhjustab lipiidide, valkude, nukleiinhapete ja süsivesikute oksü-kahjustusi, olles paljude haiguste (infarkt, insult, ateroskleroos, vähk) üheks põhjuseks. Oksüdatiivsete stressorite hulka kuuluvad muuhulgas ka hapniku reaktiivsed vormid, mille kuhjumine on üks peamine rakukahjustuste põhjus.

Antioksidandid on ensüümid või ained, mis juba väga madalas kontsentratsioonis on suutelised takistama või likvideerima oksüdatiivsete stressorite teket ning ahelreaktsioone. Organismis töötavad nii spetsiifilised antioksidantsed ensüümid kui antioksidantsed ühendid (nt glutatioon). Lisaks omastatakse antioksidantseid ühendeid toidust. Saastatud ja stressirohkes keskkonnas vajab antioksidantne kaitse lisatuge. Antioksidante eraldub vereringlusesse ka soolestikus elutsevate probiootikumide elutegevuse käigus.

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobesti genoomis tuvastati antioksidatiivse toimega ensüümide ning transkriptsioonifaktorite geenijärjestused, nende seas NADH peroksidaas (EC

1.11.1.1), vesinikperoksiidi stressi regulaator (PerP), tioredoksiin (Trx), tioredoksiini reduktaas (EC 1.8.1.9), glutatiooni reduktaas (EC 1.8.1.7), tiooli peroksidaas (EC 1.11.1.15), metioniinsulfoksiidi reduktaasid A ja B (EC 1.8.4.11 ja EC 1.8.4.12), koensüüm A disulfiidi reduktaas (EC 1.8.1.1), mangaani katalaas (EC 1.11.1.6) jms.

- 5 Tuvastatud antioksidatiivsete ensüümide mõju hindamiseks viidi läbi *in vitro* katsed võrdluses teiste loomset päritolu pediokokkidega BioCC kultuurikollektsioonist (tabel 6).

Selleks kasvatati *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti tüve MRS-puljongis 24 tundi ja tsentrifuugiti 5 minutit 10000 x G 4 °C juures, eemaldati supernatant ning suspendeeriti 1 ml MQ-vees. Suspensiooni tiheduseks oli OD₆₀₀ 1,1 juures 10⁹ bakterirakku milliliitris. Lüsaatide
10 saamiseks lisati suspensioonile SDS-i (CAS# 151-21-3) sisaldavat lüüsimispuhvrit (Qiagen, Holland) ning bakterirakud purustati mehaaniliselt toatemperatuuril 15 minuti jooksul.

TAA (ingl *Total antioxidant activity*) määramine viidi läbi kommertsiaalse kitiga (Cayman Chemicals, USA). Meetod põhineb ABTSi (CAS# 28752-68-3) oksüdeerimisel methümoglobiinide poolt ning seda inhibeervate antioksidantide kvantifitseerimisel proovis.
15 Proovide ning standardite neelduvus mõõdeti Synergy HTX spektrofotomeetriga (BioTek, USA) lainepikkusel 750 nm.

Oksüdeeritud (GSSG) ja redutseeritud (GSH) glutatiooni määramine viidi läbi kolorimeetrilise kitiga (Invitrogen, USA). Valkude eemaldamiseks lüsaadist töödeldi proove 5% bensoehappega (CAS# 97-05-2). Oksüdeeritud glutatiooni kvantifitseerimiseks blokeeriti vaba glutatioon ja
20 teised tioolid 2-vinüülpüridiiniga (CAS# 100-69-6). Proovide ja standardite neelduvus mõõdeti Synergy HTX spektrofotomeetriga lainepikkusel 405 nm.

Vesinikperoksiidi määramine viidi läbi kolorimeetrilise kitiga (Thermo Scientific, USA). Meetod põhineb Mohri soola (CAS# 24389-93-3) oksüdeerimisel vesinikperoksiidi poolt sorbitooli (CAS# 50-70-4) vahendusel. Oksüdeerunud Mohri soolad seonduvad proovis
25 sisalduva ksüleenooliga (CAS# 1611-35-4). Proovide ja standardite neelduvus mõõdeti Synergy HTX spektrofotomeetriga lainepikkusel 595 nm.

Tulemustest avaldub madal vesinikperoksiidi sisaldus *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti tüve proovides nii elusrakkude ning rakuvabas keskkonnas (tabel 6). H₂O₂ on prekursoriks aktiivsete radikaalide tekkel organismis, difundeerudes läbi raku struktuuride,
30 olles happelises keskkonnas tugev oksüdeerija.

Rakuvabas keskkonnas määratud redutseeritud glutatiooni tase oli suurim *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest tüve puhul, olles üks oluliseim hapniku reaktiivsete vormide

püüdja. Glutatiooni redoksaktiivsus, autoooksüdatsiooni inhibeeriv aktiivsus ning võime säilitatada redutseeritud vormi on tähtsaim redokspuhver rakkudes. Muutused glutatiooni vormide vahel mõjutavad otseselt raku antioksidatiivset aktiivsust (Smirnova ja Oktyabrsky, 2005. Glutathione in Bacteria. Biokhimiya 70:1199-211). Seejuures on GSSG/GSH suhe – oksüdatiivse stressi indikaator rakus – madalaim *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti tüve puhul, võrreldes teiste loomset päritolu pediokokkidega BioCC kultuurikollektsioonist.

Lisaks sellele on määratud totaalne antioksidatiivne aktiivsus kõrgeim *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest rakulüsaadis (tabel 6)

10 Tabel 6. TAK 589 Coccobest antioksidatiivsus võrreldes pediokokkidega

		TAK 589	TAK 551	TAK 569
Terved rakud	TAA ^a (mM)	1,59	2,90	1,54
	H ₂ O ₂ (µg/mL)	161	269	152
Lüsaat	TAA (mM)	0,18	0,01	0,02
	H ₂ O ₂ (µg/mL)	131	140	137
	GSH ^b (µM)	8,05	7,38	7,66
	GSSG ^c (µM)	3,05	3,78	3,95
	GSSG/GSH ^d	0,38	0,51	0,52

^a TAA – totaalne antioksidatiivne aktiivsus

^b GSH – redutseeritud glutatioon

^c GSSG – oksüdeeritud glutatioon

^d GSSG/GSH – glutatiooni redokssuhe

15 Bioloogilise aktiivsuse säilimine

Vasikate täispiimaasendaja (TPA-pulbrist) piimajoogi valmistamisel lahustatakse see veega temperatuuril 40-50 °C, mistõttu on oluline probiootilise tüve võime säilitada bioloogiline aktiivsus kõrgematel temperatuuridel.

Selle demonstreerimiseks viidi läbi katse lüofiliseeritud *Pediococcus acidilactici* TAK 589

20 Coccobesti kultuuriga lahustatuna petilahuses, mida kuumutati vastavalt 20 minuti vältel kuni 85 °C juures. Peale kuumutamist teostati koheselt väljakülvid MRS-agarile ning inkubeeriti neid 48 tunni vältel 37 °C juures, seejärel mikroobipesad loendati. Katse käigus selgus, et *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti arvukus 10-20 minutit 60 °C juures kuumutades ei muutu ning 70 °C juures langeb ühe logaritmi võrra (joonis fig 1).

Lisaks toidu töötlemisel kasutatavale temperatuurile on probiootilise piimhappebakteri tüve säilitamise seisukohalt vajalik bioloogilise aktiivsuse tagamine pikema ajaperioodi jooksul eri temperatuuridel. *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti kultuuri säilivuskatsel kasutatud lüofiliseeritud pulbri kujul 36 kuu vältel (tabel 7)

5 Tabel 7. TAK 589 Coccobest bioloogilise aktiivsuse säilivuse katse^a

Tingimused (°C)	Bakterite arvukus (PMÜ/g)							
	0 proov	2 nädalat	1 kuu	3 kuud	6 kuud	12 kuud	24 kuud	36 kuud
+37 ± 1	2,1x10 ¹⁰	1,1x10 ¹⁰	1,5x10 ¹⁰	-	-	-	-	-
+25 ± 1	2,1x10 ¹⁰	1,8x10 ¹⁰	2,3x10 ¹⁰	1,2x10 ¹⁰	8,2x10 ⁹	-	-	-
+4 ± 2	2,1x10 ¹⁰	-	2,1x10 ¹⁰	1,5x10 ¹⁰	3,7x10 ¹⁰	1,0x10 ¹⁰	1,4x10 ¹⁰	-
-18 ± 3	2,1x10 ¹⁰	-	-	-	2,6x10 ¹⁰	1,9x10 ¹⁰	1,8x10 ¹⁰	4,4x10 ¹⁰

^a ISO 15214:1998 standardi järgi (modifikatsioonidega)

Lisaks testiti *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti tüve bioloogilist aktiivsust mao happelises keskkonnas ning kokkupuutel sapphappega. Selleks kasvatati tüve MRS-puljongis mikroaeroobses keskkonnas (10/5/85 CO₂/O₂/N₂) 24 tundi 37 °C juures. Seejuures valmistati sapphappe ja maomahla resistentsuse määramiseks veel kolm MRS-puljongit: esimesele lisati 3 g/L sapiiekstrakti (Sigma, USA), teisele 1M HCl-lahust kuni keskkonna pH-väärtuseni 3 ning kolmandale 3 g/L pepsiini (EC 3.4.23.1; Sigma, USA) ning 1M HCL lahust kuni keskkonna pH-väärtuseni 2. Modifitseeritud MRS-puljongitele lisati ettekasvatatud bakterikultuuri ning inkubeeriti neid 37 °C juures mikroaeroobses keskkonnas.

15 *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti tüve ellujäävust demonstreeriti iga tunni järel väljakülvi tehes (tabel 8).

Tabel 8. TAK 589 Coccobest sapphappe ja happelise keskkonna resistentsuse katse

Tingimused	Bakterite arvukus (PMÜ/g)				
	0 proov	1 tund	2 tundi	3 tundi	4 tundi
MRS + sapphappe 0,3% (n = 3)	1,93 x 10 ⁹ ± 0,16	1,93 x 10 ⁹ ± 0,16	1,97 x 10 ⁹ ± 0,16	1,93 x 10 ⁹ ± 0,12	2,07 x 10 ⁹ ± 0,11
MRS + HCl → pH 3 (n = 2)	2,75 x 10 ⁸ ± 0,07	1,5 x 10 ⁸ ± 0,28	1,04 x 10 ⁸ ± 0,08	9,2 x 10 ⁷ ± 0,57	8,7 x 10 ⁷ ± 0,14
MRS + HCL + pepsiin → pH 2 (n = 3)	1,63 x 10 ⁹ ± 0,11	4,37 x 10 ⁴ ± 0,38	1,8 x 10 ² ± 0,18	1,83 x 10 ² ± 0,33	1,73 x 10 ² ± 0,19
Kontroll	2,0 x 10 ⁹	2,0 x 10 ⁹	2,2 x 10 ⁹	2,2 x 10 ⁹	2,2 x 10 ⁹

Soolestiku kolonisatsiooni võime

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobesti võimekust läbida seedetrakti demonstreeriti 32 Eesti holsteini tõugu lehmvasikaga läbiviidud katse (Näide 3) osana. Vastsündinud vasikad jaotati katse- ja kontrollrühmadesse ning toideti 4-16. elupäevani kuue liitri kohaliku farmi piima ja täispiimaasendajast valmistatud piimajoogiseguga. Katserühma vasikatele antud TPA-piimajoogile lisati probiootilist bakteritüve *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest. Seejuures koguti esimese ja teise elunädala lõpus vasikatelt kinnastatud käega otse pärasoolest steriilsesse topsi roojaproov, mida säilitati temperatuuril -20 °C ning hiljem -80 °C.

Vasikatelt kogutud roojaproovidest määrati *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti olemasolu qPCR meetodil, kasutades tüvespetsiifilisi praimereid ja geeniproovi (*probe*). Roojaproovidest DNA eraldamine viidi läbi *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Saksamaa) protokoll järgi. DNA kontsentratsiooni kontrolliti *Synergy HTX* spektrofoto-meetriga (BioTek, USA). *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti tüve määramiseks valmistati iga vasika DNA-proovist alikvoot kontsentratsiooniga 10 ng/μl ning lõppruumalaga 35 μl. DNA amplifitseerimiseks disainiti tüvespetsiifilised praimerid ja *TaqMan* diagnostiline geeniproov bakteri elutegevuseks hädavajaliku geeni – biotiini biosünteesi ahelasse kuuluv transportervalk BioY (WP_002832434.1) – järjestuse piirkonda, mis on *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest tüvespetsiifiline (tabel 9).

Tabel 9. Tüvespetsiifiliste praimerite ja *TaqMan* geeniproovi molekulaarsed tunnused

Oligo-nukleotiid	5'→3'	Tm ^a (C°)	GC (%)	Hairpin ^b (ΔG)	Dimer ^c (ΔG)
<i>Forward</i>	TTTAAGGCAGTACTTGCAAACG	61,8	40,9	-2,9	-10.94
<i>TaqMan</i>	TCCGCTTTAGTGGCGTTGATAGGACGA	70,3	51,9	-3,05	-6.75
<i>Reverse</i>	GGGAGCTGGTCTTGACTAAAT	61,7	47,6	-0,32	-6.34

Oligonukleotiidid on disainitud tarkvaraga *PrimerQuest Tool* (Integrated DNA Technologies, USA)

^a Nukleiinhappe dupleksi stabiilsust peegeldav sulamistemperatuur

^b Sisemiste komplementaarsete lõikude paardumine iseendaga

^c Sisemiste komplementaarsete lõikude paardumine dimeerideks

qPCR reaktsiooniks kulunud 2 μl DNA alikvooti (~ 20 ng) kuivatati *Dry-down* meetodil ehk mikroplaadile pipeteeritud DNA kuivas üleöö steriilsetes tingimustes. Seejärel lisati 20 μl eelnevalt valmis segatud reaktsioonisegu iga proovi kohta. Plaadile kanti kaks nullproovi, kontrollimaks analüüsi puhtust ja võimalikku valepositiivsust. Reaktsioonisegu ühes proovis sisaldas järgmisi komponente:

- 4 µl *PrimeTime® Mini qPCR Assay* (Integrated DNA Technologies, USA)
- 4 µl *5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix* (Solis BioDyne, Eesti)
- 12 µl MQ deioniseeritud H₂O

qPCR reaktsiooni läbiviimiseks kasutati reaalaja termotsüklerit *QuantStudio 5* (Thermo Fisher Scientific, USA). PCR plaadi lugemiseks ja tulemuste analüüsimiseks kasutati tarkvara *QuantStudio Design and Analysis Software* (Thermo Fisher Scientific, USA). qPCR-reaktsiooni tingimused olid järgmised:

Polümeraasi aktivatsioon	95 °C	10 min	} 35 tsükli
Denaturatsioon	95 °C	15 sek	
Seondumine/elongatsioon	60 °C	50 sek	
Inaktivatsioon	-	2 min	

Vasikate kogutud roojaproovidest *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti määramine toimus *TaqMan* tüvespetsiifilise geeniproovi poolt tekitatava fluorestsentskiirguse abil. PCR-i käigus seonduvad praimerid ja geeniproovid tüvespetsiifiliselt, paardudes või mittepaardudes kindla järjestusega. Geeniproov on seotud 5' otsast fluorofooriga ning 3' otsast kustutava fluorofooriga (ingl *quencher*). *Quencher* on aktiivne vaid seni, kuni asub fluorofoori läheduses. Uue DNA-ahela sünteesimisel vabaneb geeniproovi 5' otsast fluorofoor. Iga uue tsükliga vabaneb fluorofoori proportsionaalselt amplikonide arvuga. Tulemuseks on üha tugevam fluorestsentskiirgus, mille abil on võimalik määrata tüvespetsiifiliste amplikonide hulka reaktsioonisegus. Lävitsükkel fikseeritakse fluorestsentskiirguse läviväärtuse ületamisel. Diagnostilise geeniproovi spetsiifilisust *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti tüve suhtes hinnati genoomset DNA-d ning reaktsioonisegu sisaldavas kontrollproovis.

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobesti tüve olemasolu määrati katserühma vasikate roojaproovides I ja II elunädalal vastavalt üheksas proovis 10-st ning seitsmes proovis 11-st (tabel 10). Kontrollrühma vasikate roojaproovides määrati tüve olemasolu ühes proovis I ja II elunädalal vastavalt 13 ning 7 proovist. Seega saab väita, et *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest on võimeline edukalt koloniseerima vasikate soolestiku.

Tabel 10. Tüvespetsiifilise praimeriga qPCR-reaktsiooni tulemused

Liik		Tüvi	Isolatsiooni päritolu	C_t^a
<i>Pediococcus acidilactici</i>		TAK 589	Vasika roe	18,6

Vasikate valim		Roojaproovid ^b		C_t	
				$\bar{x}^c$	M_e^d
Katserühm	I elunädal	9/10		31,8	32,3
	II elunädal	7/11		33,2	33,1
Kontrollrühm	I elunädal	1/13		34,5	
	II elunädal	1/7		33,6	

^a Lävitsükkel, millal reaktsiooni fluorestseeruv signaal ületab läviväärtuse^b Amplifitseeritud/kõikide proovide arv valimis^{c,d} Tulemuste aritmeetiline keskmine ja mediaan

5 JOONISTE LOETELU

Joonis fig 1. *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti elulemus log10 süsteemis peti lahuses kõrgetel temperatuuridel inkubeerides 10 minuti ja 20 minuti vältel.

Joonis fig 2. Pidurdus anaeroobses keskkonnas. *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti antimikroobne aktiivsus patogeenidele võrreldes soolestikust isoleeritud *Pediococcus* spp. kontrolltüvedega.

Modifitseeritud MRS-agarsöötmeel joonkülvil meetodil anaeroobses (5/90/5 CO₂/O₂/N₂) keskkonnas peale 24 tundi inkubeerimist (sihtmikroobi kasvupidurdus mm).

Joonis fig 3. Pidurdus mikroaeroobses keskkonnas. *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti antimikroobne aktiivsus patogeenidele, võrreldes soolestikust isoleeritud *Pediococcus* spp. kontrolltüvedega.

Modifitseeritud MRS-agarsöötmeel joonkülvil meetodil mikroaeroobses (10% CO₂) keskkonnas peale 24 tundi inkubeerimist (sihtmikroobi kasvupidurdus mm).

LEIUTISE TEOSTAMISE NÄITED

Näide 1. Antagonistlik toime patogeensetele mikroorganismidele

20 Eesmärk: Testida *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti antagonistlike omadusi enamlevinud patogeensete mikroorganismide vastu.

Metoodika: *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti antagonistlike omaduste hindamiseks patogeene vastu kasutati joonkülvitehnikat, mille käigus mõõdeti TAK 589 Coccobesti ja *Pediococcus* spp. kontrolltüvede põhjustatud patogeeni kasvuinhibitsiooni tsooni millimeetrites (Hütt et al. 2006. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. J Appl Microbiol. 100: 1324-32).

Pediococcus spp. tüvede antagonistliku aktiivsuse avaldumist erinevates keskkondades hinnati kaheksa patogeeni tüve vastu: *Listeria monocytogenes* ATCC 51774; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; *Shigella sonnei* ATCC 25931; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ja *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobesti kasvatati eelnevalt termostaadis IG 150 (Jouan, Prantsusmaa) 24 tundi MRS-söötmes (Oxoid, U.K) mikroaeroobses (10% CO₂) keskkonnas 37 °C juures. Patogeenseid tüvesid kasvatati 24 tundi veriagaril aeroobses keskkonnas 37 °C juures. Antimikroobsete omaduste hindamiseks külvati 20 µl 24 tunni vanust viite erinevat pediokokikultuuri modifitseeritud MRS agarsöötme (ei sisalda triammooniumtsitraati C₆H₁₇O₇N₃ ning naatriumatsetaati C₂H₃O₂Na) keskjoonele ning kasvatati 24 tundi paralleelselt mikro- ja anaeroobses (5/90/5 CO₂/O₂/N₂) keskkonnas 37 °C juures. Testitavad patogeene tüved külvati kahe vastassuunalise ristipidise külvina ning inkubeeriti 24 tundi mikro- või anaeroobses keskkonnas 37 °C juures. Patogeene inhibitsiooni määramiseks mõõdeti kasvuvaba tsoon. Võrdlusena kasutati BioCC kultuurikollektsiooni kuuluvaid soolestikust isoleeritud *Pediococcus* spp. kontrolltüvesid.

Tulemused: *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest inhibeeris kõige tugevamini patogeene kasvu mikro- ja anaeroobses keskkonnas, teiste tüvede toime jäi keskpäraseks või nõrgaks (Joonis fig 2; fig 3).

Näide 2. Manustamise mõju vasikatele (katse 1)

Eesmärk: Uurida *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti mõju vasikate soolestiku mikrobiotale ning kõhulahtisuste esinemisele.

Metoodika: Katse viidi läbi 8 Eesti holsteini tõugu pullvasikaga. Vastsündinud vasikad jaotati katse- ja kontrollrühma (mõlemas rühmas n=4). Katserühma vasikatele manustati lüofiliseeritud pulbrist valmistatud vesilahusena *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti päevase doosina 1x10¹⁰ PMÜ vasikate 1.-5. elupäevani. Seejuures koguti vasikatelt

roojaproovid 2.-5. elupäeval ning täiendavalt veel 8. elupäeval järelmõju hindamiseks. Roojaproovid koguti kinnastatud käega otse pärasoolest steriilsesse topsi, mida säilitati temperatuuril -20 °C ning hiljem -80 °C. Proovidest määrati laktobatsillide üldhulk, *E.coli* ja coli-laadsete mikroobide arvukus. Lisaks hinnati kõhulahtisuste esinemist ning tervise üldnäitajaid vastavalt tervise hindamise kriteeriumitele (University of Wisconsin-Madison, School of Veterinary Medicine, Calf Health Scoring Chart and Calf Health Scoring Criteria).

Tulemused: Kontrollgrupis esines kõhulahtisusega proove seitsmel korral 16-st (44%) ja katsegrupis kolmel korral 16-st (19%). *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti manustamine vähendas *E. coli* arvukust katserühma roojaproovides viiendaks elupäevaks 1,6 logaritmi võrra ning kaheksandaks päevaks 2,5 logaritmi võrra. Coli-laadsete mikroobide arvukus vähenes katserühma roojaproovides viiendaks päevaks 0,3 logaritmi võrra ning kaheksandaks 0,8 logaritmi võrra. Samas ei vähenenud katserühma roojaproovides laktobatsillide arvukus.

Näide 3. Manustamise mõju vasikatele (katse 2)

Eesmärk: Uurida *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest mõju vasikate soolestiku enterobakteriaalsele mikrobiotale ning kõhulahtisuste esinemisele.

Metoodika: Katse viidi läbi 32 Eesti holsteini tõugu lehmvasikaga. Vastündinud vasikad jaotati katse- ja kontrollrühmadesse (mõlemas rühmas n=16) ning joodeti esimesel kolmel elupäeval ternespiimaga. Peale kolmandat elupäeva kuni 16. elupäevani joodeti vasikaid kohaliku farmi piima ja täispiimaasendajast valmistatud piimajoogiseguga, mida valmistati TPA-pulbrist (20% rasv, 22% valk, 47,6% laktoos ja 16,4% kaseiin) arvestusega 140 g 890 ml sooja vee (40 °C) kohta. Alates 17. elupäevast joodeti vasikaid ainult TPA piimajoogiga. Katserühma vasikate TPA-piimajoogile lisati alates kolmandast elupäevast *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest ($1,2-3,2 \times 10^7$ PMÜ/ml).

4.-10. elupäevani joodeti vasikatele 6 liitrit TPA-piimajooki päevas ning edaspidi kuni võõrutamiseni (~70. elupäeval) 8 liitrit päevast. Katse käigus registreeriti veterinaari poolt igapäevaselt vasikate rooja konsistents vastavalt rooja hindamise kriteeriumile (University of Wisconsin-Madison, School of Veterinary Medicine, Calf Health Scoring Chart and Calf Health Scoring Criteria). Katse- ja kontrollrühma vahel puudus erinevus vasikate sünnimasside ning Ig sisalduse vahel (tabel 11). Seejuures koguti vasikatelt roojaproovid 2., 7., 18. ning 30. elupäeval kinnastatud käega otse pärasoolest steriilsesse topsi, mida säilitati temperatuuril -

20 °C ning hiljem -80 °C. Proovidest määrati *E. coli*, coli-laasete mikroobide ja enterobakterite üldarv vastavalt ISO standarditele.

Tabel 11. Katse- ja kontrollrühma vasikate sünnijärgsed tervisenäitajad

	Katsegrupp (n = 16)	Kontrollgrupp (n = 18)	p-väärtus
Sünniaeg	4.03. – 11.05.2015	6.03. – 10.05.2015	-
Sünnimass, kg	42,9 ± 3,37	42,6 ± 3,54	0,843
Ig sisaldus, g/l	34,8 ± 5,47	35,4 ± 10,2	0,838

Tulemused: Ajavahemikus 15.-56. elupäev esines kõhulahtisus vaid ühel katserühma vasikal 16-st (6,3%) ning seitsmel kontrollrühma vasikal 16-st (43,8%). Seejuures suri kontrollrühmas kaks vasikat.

Pediococcus acidilactici TAK 589 Coccobesti manustamine vähendas *E. coli* arvukust katserühma roojaproovides 30. elupäevaks ühe logaritmi võrra. Coli-laadsete mikroobide ning enterobakterite arvukus vähenes katserühma roojaproovides 30. elupäevaks vastavalt 1,1 ja 1,3 logaritmi võrra.

Seejuures *E. coli* arvukus kontrollrühma roojaproovides suurenes 30. elupäevaks 0,5 logaritmi võrra. Coli-laadsete mikroobide ning enterobakterite arvukus kontrollühma roojaproovides suurenesid 30. elupäevaks 0,4 logaritmi võrra.

Näide 4. Kõögivilja hapendamine tüvega TAK 589 Coccobest (katse 1)

Eesmärk: Testida *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti sobivust kõögivilja, nt sügisese valge peakapsa *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba* hapendamisel.

Metoodika: kapsas riiviti köögikombainiga peenteks ribadeks, lisati keedusool (1,7%) ning segati hoolikalt. Seejärel segati kapsale juurde 24 tunni vanust *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti tüvekultuuri lõpptihedusega 10^7 PMÜ/g. Kapsaid hapendati 9 päeva 18 °C juures. Kontrolliks valiti spontaanselt käärinud kapsas. Fermenteerimise 2., 5. ja 9. päeval mõõdeti kapsamahlade pH-d.

Tulemused: *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest lisamine aitas kapsa käärimist kiirendada. Ribastatud kapsamassi algne pH oli 5,60. Võrreldes spontaanse käärimisega langes ribastatud kapsamassi pH kiiremini (Tabel 12). pH kiire langus aitab maha suruda kapsa

soovimatut indigeenset mikrofloorat, sh lima tekitavaid piimhappebaktereid (n. *Leuconostoc mesenteroides*).

Tabel 12. Ribastatud kapsamassi pH langus käärimisaja jooksul

Kapsamass	pH katsepäeval			
	1.	2.	5.	9.
Kontroll	5,60	5,15	3,82	3,80
TAK 589	5,60	4,65	3,67	3,71

- 5 Mõlema proovi puhul oli fermenteeritud kapsas defektideta välimusega, maitset hapukas ning krõmpsuva tekstuuriga. *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest sobib kasutamiseks fermenteerimisel tehnoloogilise juuretisena kapsa hapendamise suunamiseks.

Näide 5. Kõõgivilja hapendamine tüvega TAK 589 Coccobest (katse 2)

Eesmärk: Testida *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti sobivust kõõgivilja, nt avamaakurkide *Cucumis sativus* L. hapendamisel.

- 10 Metoodika: Eesti avamaakurkide hapendamiseks valmistati lahus, mis sisaldas 1 supilusikatäir keedusoola ja 1 supilusikatäit suhkrut 1 L vee kohta. 24 tunni vanust *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti kultuuri lisati lahusele lõpptihedusega 10^7 PMÜ/g. Kurke (4-5 kurki, vedelikku 400 ml) hapendati 30 kraadi juures 24 tunni jooksul. Käärimise lõpus mõõdeti pH-d ja seejärel jahutati kurgid temperatuurini 4 °C.

- 15 Tulemused: Käärimise lõpus oli spontaanselt käärinud kurkide pH 4,34. *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti abil kääritatud kurkide pH oli 3,85.

Nii kontrollkurgid kui *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti abil hapendatud kurgid olid defektideta välimusega. Maitset hapukad. *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobesti abil hapendatud kurkidel puudus spontaanselt käärinud kurkide kibe järelmaitse. Seega sobib

- 20 *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest kasutamiseks tehnoloogilise juuretisena hapendamise suunamiseks kurkide hapendamisel.

PATENDINÕUDLUS

1. Isoleeritud probiootiline mikroorganism *Pediococcus acidilactici* TAK 589 Coccobest DSM 32372.
2. Mikroorganism vastavalt punktile 1 lüofiliseeritud kujul.
- 5 3. Kompositsioon, mis sisaldab punktile 1 või 2 vastavat mikroorganismi.
4. Mistahes punktile 1-2 vastava mikroorganismi kasutamine probiootilise toidu- ja joogilisandina.
5. Mistahes punktile 1-2 vastava mikroorganismi kasutamine zootehnilise söödalisandina põllumajandus- ja lemmikloomade seedekulgl bakteriaalsetesse infektsioonidesse
10 nakatumise vältimiseks ning kõhulahtisuse ennetamiseks ja/või vähendamiseks.
6. Mistahes punktile 1-2 vastava mikroorganismi kasutamine funktsionaalse toidu või joogi lisandina inimeste seedekulgl bakteriaalsetesse infektsioonidesse nakatumise vältimiseks ning oksüdatiivse stressi ennetamiseks ja/või vähendamiseks.
7. Mistahes punktile 1-2 vastava mikroorganismi kasutamine vastavalt punktile 5 või 6,
15 kus bakteriaalseid infektsioone põhjustavateks mikroobideks on *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ja *Cronobacter sakazakii*.
8. Mistahes punktile 1-2 vastava mikroorganismi kasutamine tehnoloogilise juuretisena
20 köögivilja fermenteerimisel.

1/3

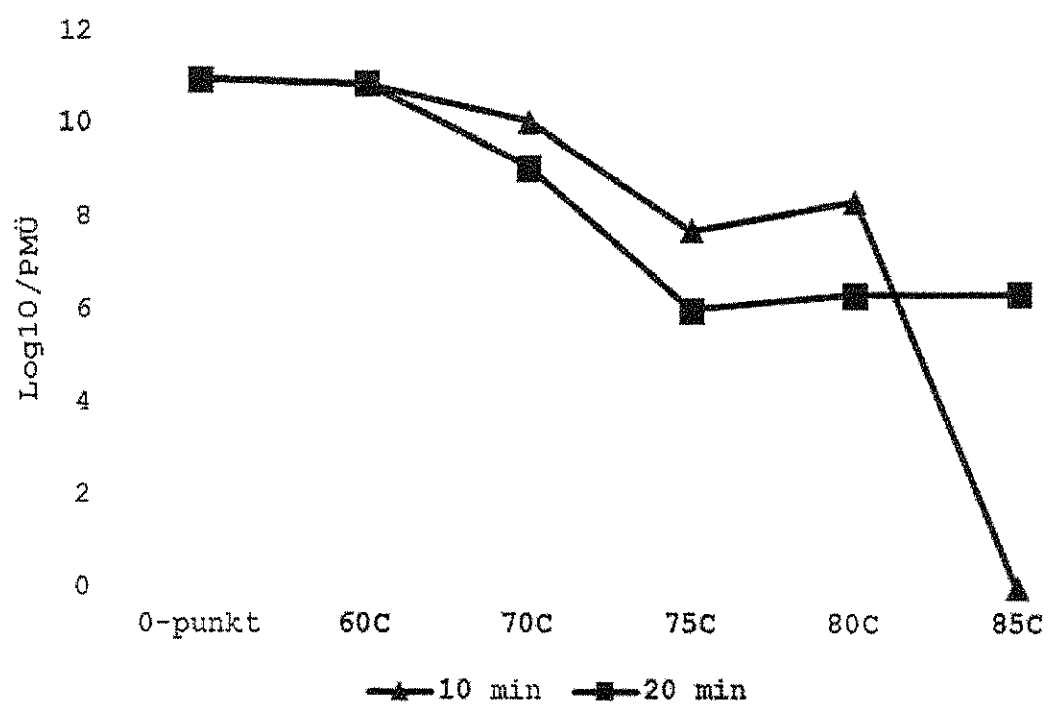


FIG 1

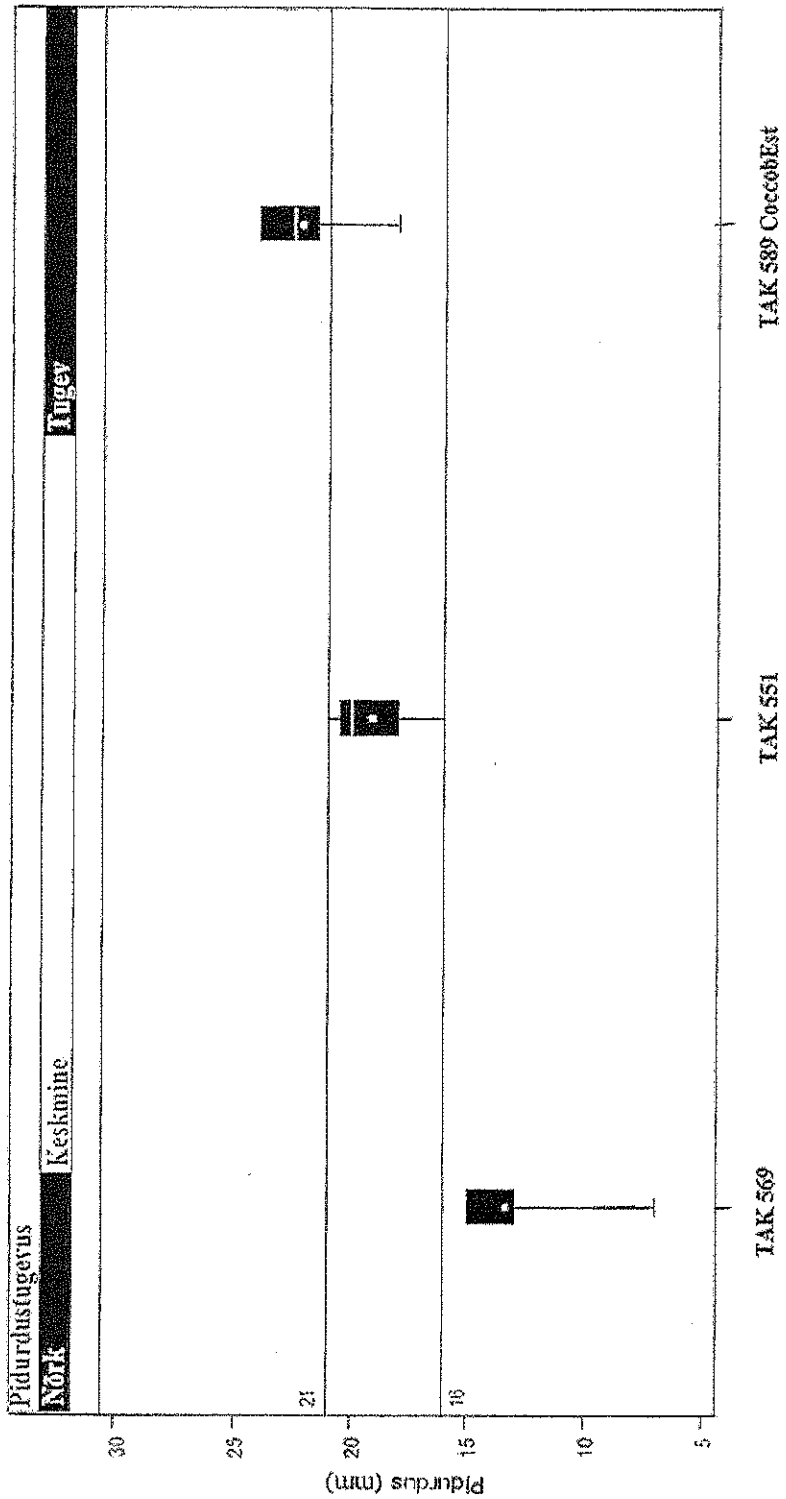


FIG 2

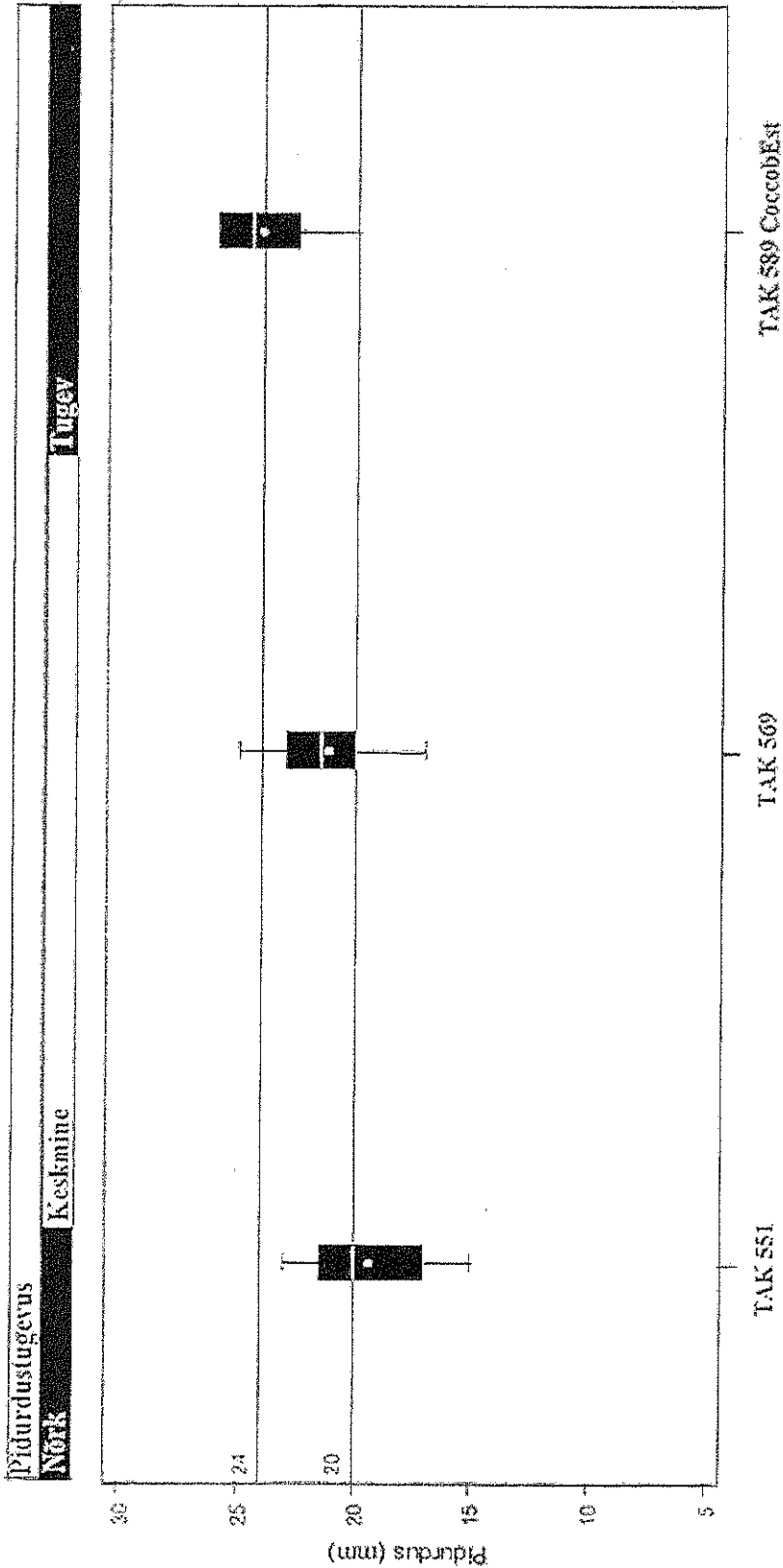


FIG 3