



(19) EESTI VABARIIK
PATENDIAMET

(11) EE 200800027 A

(51) Int.Cl.
C12N 1/20 (2009.01)
A23L 1/30 (2009.01)

(12) PATENDITAOTLUS

| | |
|---|---|
| <p>(21) Patenditaotluse number: P200800027</p> <p>(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev: 13.05.2008</p> <p>(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev: 15.12.2009</p> <p>(83) Bioloogilise aine, sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed: DSM 21379, 16.04.2008, DSMZ</p> | <p>(71) Patenditaotleja: OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskus Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE</p> <p>(72) Leiutise autorid: Marika Mikelsaar Jakobsoni 11-4, 51005 Tartu, EE Epp Songisepp Tähe 105-7, 50107 Tartu, EE Imbi Smidt Voika küla, Nõo vald, 61601 Tartu maakond, EE Jelena Stsepetova Mõisavahe 2-8, 50707 Tartu, EE Pirje Hütt Ropka 6-33, 50110 Tartu, EE Mihkel Zilmer Puusepa 37, 50406 Tartu, EE Kai Truusalu Tehase 15-10, 50107 Tartu, EE Kalle Kilk Suur-Kaar 21-3, 50404 Tartu, EE</p> <p>(74) Patendivolinik: Sirje Kahu Patendibüroo Ustervall OÜ Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE</p> |
|---|---|

(54) **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 valmistamiseks**

(57) Leiutis käsitleb mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kui probiootikut, selle funktsionaalseid omadusi, seda sisaldavat toiduainet (nt juustu) ja kompositsiooni ning nimetatud mikroorganismi kasutamist rakulist immuunsust tõstva ravimi valmistamiseks. *L. plantarum* Inducia toodab ornitiinist ja glutamaadist polüamiine, arginiinist lämmastikmonooksiidi (NO), omab antioksidantset aktiivsust ning tõstab toodetud polüamiinide, lämmastikmonooksiidi ja antioksidantsete ühendite abil soole limaskesta barjäärifunktsiooni, suurendab immunotsüütide arvu veres ning indutseerib tsütokiinide 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 valmistamiseks

TEHNIKAVALDKOND

Leiutis kuulub biotehnoloogia valdkonda ning leiab kasutamist toiduainetööstuses ja meditsiinis. Täpsemalt käsitleb leiutis probiootilist laktobatsilli Inducia DSM 21379, mis toodab polüamiine, lämmastikmonooksiidi ja on antioksidantse 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 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 väärtuste sisaldab lisakomponente (sh. probiootikuid), mis mõjustavad kasulikult organismi mingeid funktsioone või vähendavad teatud haiguste riski. Probiootikud on elusad mikroorganismid, mis optimaalsetes teaduslikult tõestatud annustes seedetrakti viiduna on kasulikud tervisele. Kõige sagedamini on probiootikud kasutusel funktsionaalse toiduna. Probiootikume tarvitatakse kas toidu komponentidena (jogurtid, kreemid, kohupiimad) 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 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 21st century. Clin Inf. Dis., 2007; 45: S85-S88). Kõigi nende haiguste põhjuseks on organismi mitmesuguste füsioloogiliste funktsioonide 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 vähenemisenä stressile, kusjuures esiplaanile tõuseb immuunsüsteemi normaalse vastuse nõrgenemine. See avaldub eeskätt nii kehas ringlevate loomulike kaitserakkude (leukotsüüdid, makrofaagid, lümfotsüüdid, trombotsüüdid) hulga ja 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.
- 15 Soole limaskesta läbilaskvus suureneb sageli kroonilise põletiku foonil. See on aluseks autoallergilistele haigustele ja mikroobide translokatsiooni tõttu sooleinfektsioonide 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) 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 klostriidide tekitatud butüraadil on oluline roll limaskesta barjäärfunktsiooni tugevdamises, samuti on kiudainete rikka dieedi soodsat mõju jämesoole mikroobidele kirjeldatud mitmetes 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).
- 25 Soole limaskesta seisundi tugevdamises on lisaks lühikese ahelaga rasvhapetele hakatud tähelepanu omistama ka polüamiinidele. Polüamiinid on lineaarsed alifaatsed molekulid, milles aminorühmad asuvad piki nende struktuuri. Nende hulka kuuluvad putrestsiin, spermidiin ja spermiin (Larqué, M., Sabater-Molina, S. Zamora E. Biological significance
- 30

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 hüperemia-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 apoptoosi, vältides epiteeli hüperproliferaatsiooni ning algselt 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 pharmacokinetic/biotransformation of ingested putrescine in humans. *Gut*, 1997; 41: A63). Uriinis on võimalik leida rohkesti putrestsiini, spermidiini ja spermiini metaboliite atsetüleeritud või oksüdeeritud vormidena (Seiler N Catabolism of polyamines. *Amino Acids* 2004; 26: 217-233). Putrestsiini loetakse toksiliseks kontsentratsiooniga 2000 mg/kg kohta, kuid putrestsiin ja

- kadaveriin võivad suurendada türamiini ja histamiini toksilist efekti. Seepärast loetakse summarseks polüamiinide toksilisuseks > 300 mg/kg toidu kohta (Larqué, M., Sabater-Molina, S. Zamora E. Biological significance of dietary polyamines. Nutrition 2007; 23(1): 87-95).
- 5 Epiteelirakkude kahjustuse korral peetakse soole mikrofloora poolset polüamiinide tekitamist üheks kompensatoorseks mehhanismiks, mille abil on võimalik modifitseerida immuunvastust ja reguleerida apoptoosi. Putrestsiini 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 dekarboksülatsiooni 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). Teistpidi, *Lactobacillus acidophilus* tüved kasutavad näiteks putrestsiini
- 15 ja vähendavad rooja halba lõhna (WO 2008/019887, BASF AG). Jaapani patenditaotlus JP2006191808 (Toyota Motor Corporation) kirjeldab enterobakterite abil putrestsiini tootmise tehnoloogiat. Probi AB Eesti patent EE03597 kirjeldab farmatseutilist kompositsiooni, 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 limaskestast *in vivo*. Patendis pole näidatud, millised arginiini baasil tekkinud lõhustamisproduktid *L. plantarum* poolt (putrestsiin, kadaveriin, türamiin, NO või antioksidantsuse suurendamine) on vastutavad saadud efekti eest. Eeltooduga on tihedasti seotud teine Probi AB patent EE04097, mis käsitleb *L. plantarum*
- 25 299v ja 299 tüvesid, millel on kolonisatsioonivõime limaskestale tänu mannoos-spetsiifilisele adhesiinile. Ka selles patendis ei kirjeldata nimetatud *L. plantarum* tüvede polüamiinide ega NO tootmise võimet. Ometi on arginiini kõrgete dooside (3,4 g/päevas) manustamise puhul täheldatud olulist NO tõusu võrreldes väiksemate (3,2 g/päevas) doosidega (Jablakad A. Checinski P., Krauss H., Mickerbe M. Astcef J. The influence 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, 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, Kubes P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol.* 1993; 265 (1 Pt 1):G189–G195).
- USA patenditaotlus US20060078595 (Friesland Brands B.V.) käsitleb meetodit vastsündinutel soole limaskesta barjääri liigse läbilaskvuse vältimiseks glutamaadi ja selle prekursorite ning polüamiinide spermiini, spermidiini, putrestsiini abil mitmesuguste sündroomide puhul (alatoitus, allergia, sepsis, bakterite translokatsioon, endotokseemia, 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, 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.
- Eesti patenditaotlus 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 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 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 allasurumist kirjeldasid Matsumoto kaasautoritega (Matsumoto M, Ohisshi 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 ülemäärane allasurumine võib osutada 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 soovitusel polüamiinide rikka funktsionaalse toidu tarvitamiseks eakatel inimestel vastuolulised. Samas on aga selge, et erinevatel piimhappebakteritel, sh. laktobatsillide liikidel ja tüvedel on pro- ja 25 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 kompositsiooni tarbimist võimalik kindlaks teha uriinis ja mis samaaegselt soodustaks immuunrakkude adaptiivset aktivatsiooni tsentraalse 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 induktioonil 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 üleproduktiooni. Nimetatud seostatakse südame-veresoonte haiguste, artriidi, tüüp 2 diabeedi, vähi, periodontaalse haiguse, kahheksia ja organismi funktsioonide 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., Holzappel, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. The Procaryots. 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 plantarum* isolates from Feta cheese throughout ripening. *J. Appl. Microbiology* 2000, 88: 1056-1064). *Lactobacillus plantarum* on võimeline oma ainevahetust ümber kōlastama vastavalt keskkonnatingimustele.

Lactobacillus plantarum on saadaval probiootikumidena nii probiootiliste toitudena kui ka toidulisandina (näiteks *Lactobacillus plantarum* 299v DSM 9843, Probi AB, Rootsi, mis on saadaval Skånemejerier'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 autoimmuunse haiguse tsöliaakia puhul, kuid autorid ei kirjelda nende toimemehhanisme. Korea patenditaotlused 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 osutada 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 kaitseb juustumaatriks valgu- ja rasvarikka konsistentsi tõttu probiootilist mikroobitüve teekonnal läbi seedetrakti paremini kui teised piimapõhised tooted (jogurt, keefir). Antimikroobset ja antioksidantset 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 mikroorganismi *Streptomyces* perekonnast transglutaminaasi tekitamiseks ja meetodit, millega on võimalik näiteks putrestsiini viia sisse kaseiini juustu valmistamisel. Euroopa patendis EP1064857B1 (Snow Brand Milk Products Co Ltd., 2004) kirjeldatakse meetodit ühendite sh putrestsiini saamiseks laktobatsillide, propioonibakterite ja bifidobakterite abil Gouda juustu piimast ultrafiltratsiooni teel. Need meetodid kujutavad endast kas polümerisatsiooni reaktsiooni putrestsiini inkorporeerimiseks kaseiini või vastupidi - ultrafiltratsiooniga kättesaamiseks juba piimas toodetust, erinedes käesolevas leiutises esitatud meetodist laktobatsillide toimel juustupiimas tekkivast putrestsiinist, mis jääb püsima juustu 30 päevase valmimistsükli järel. Kirjeldatud on juustus esinevaid mittestarter laktobatsille (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus curvatus*), mis on võimalised pärast süsivesikute ärakasutamist saada vajalikku energiat ornitiinist (piima kaseiinist vabanenud arginiinist saadakse ornitiin), 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 mikroobikultuuris NO-d ja lisaks ka toiduaines füsioloogiliselt arvestatavas hulgas polüamiine, kusjuures viimaseid oleks pärast seda tüve sisaldava fermenteeritud toiduaine (juust) või

kompositsiooni tarbimist võimalik kindlaks teha uriinis ja mis oleks võimeline polüamiinide kaudu reguleerima seedekulga epiteelirakkude apoptoosi ja tõstma limaskestas lümfifolliiklite ja veres monotsüütide arvukust, reguleeriks limaskesta seisundit NO ja antioksidantsete ühenditega ning soodustaks immuunrakkude, eeskätt makrofaagide aktivatsiooni tsentraalse interleukiin 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 kompositsiooni ning nimetatud mikroorganismi kasutamist rakulist immuunsust tõstva ravimi valmistamiseks. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 toodab ornitiinist ja glutamaadist polüamiine, arginiinist lämmastikmonooksiidi (NO), omab antioksidantset aktiivsust ning tõstab toodetud polüamiinide, lämmastikmonooksiidi ja antioksidantsete ühenditega soole limaskesta barjäärifunktsiooni, 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} fosfaatpuhvrts 0,04% tioglükoolhappega, 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 agarsöötmele kultiveerimist 37°C juures mikroaeroobses keskkonnas (CO₂/O₂/N₂: 10/5/85) on mikroobipesad 2-2,5 mm läbimõõduga, valged, kumerad, läikivad ja korrapärase äärisega.
- Tüve optimaalne kasvutemperatuur on 37°C; paljuneb ka 15°C ja 45°C juures. Optimaalse kasvukeskkonna pH on 6,5.
- 10 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 on katalaas- ja oksüdaasnegatiivne, fakultatiivselt heterofermentatiivne, ei hüdrolüüsi aminohape arginiini ja ei produtseeri glükoosi fermentatsioonil gaasi.
- Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 identifitseeriti API 50CHL System (bioMérieux, Prantsusmaa) test-kiti alusel kui *Lactobacillus plantarum* (kattuvus
- 15 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 fermentatsiooniprofiil API CHL 50 alusel on alljärgnev. Tüvi fermenteerib: riboosi, galaktoosi, D-glükoosi, D-fruktoosi, D-mannoosi, mannitooli, D-raffinoosi, sorbitooli, α-metüül-D-mannosiidi, α-metüül-D-glükosiidi, N-atsetüül-glükoosamiini, amügdaliini, arbutiini, eskuliini, salitsiini, tsellobioosi, maltoosi, laktoosi, melibioosi, sahharoosi, trehhaloosi, meletsitoosi, β-gentibioosi, D-turanoosi, glükonaati ja vähesel määral tärklisi.
- Tüvi ei fermenteeri: glütserooli, eritrooli, D-arabinoosi, L-arabinoosi, D-ksüloosi, L-ksüloosi, adonitooli, β metüül-ksülosiidi, L-sorboosi, ramnoosi, dultsitooli, inositooli, inuliini, glükogeeni, ksülitooli, D-lüksoosi, D-tagatoosi, D-fukoosi, L-fukoosi, D-arabitolooli, L-arabitolooli, 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, α -glükosidaas, β -glükosidaas aktiivsust ja atsetoini tekitamise võimet. Tüvi omab nõrka esteraasi (C4), esteraasi (C8), tsüstiini arüülamidaasi, β -galactosidase ja N-atsetüül- β -glükoosaminidaasi aktiivsust.

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

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

DNA eraldati *Lactobacillus* isolaatidest lüsoosüümi (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 μ l mahuga ruumalas, mis sisaldas 1 x *Taq* polümeraasi puhvrit (Fermentas, Leedu), 1.5U *Taq* DNA polümeraasi (Fermentas, Leedu), 0.5 μ M praimereid (16S-1500F and 23S-32R; DNA Technology AS), 200 μ M dNTP (desoksünukleotiidtrifosfaatide) segu (Amersham Pharmacia Biotech, Saksamaa), 2 mM $MgCl_2$ ja 2 μ l uuritavat DNA-d.

PCR produkt restrikteeriti kasutades *Taq* I restriktiooniensüümi (Fermentas, Leedu).

PCR produkt eraldati 2% agarosgeelis 1x TBE puhvril 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.

Pulssvälja-geel-elektroforees (*Pulsfield-gel-electrophoresis profile*) (PFGE)

25 **Metoodika:** Laktobatsillide DNA uurimiseks pulssvälja-geel-elektroforeesiga (PFGE) kasvatati laktobatsilli tüved 37°C juures 24 tundi MRS söötmes ning väljakasvanud mikroobirakke pesti SE puhvril (75mM NaCl, 25mM EDTA, pH=7,4), bakterisuspensiooni optiline tihedus reguleeriti (OD_{600} ligikaudu 1,5). Bakteriraku seina lõhustamine toimus EC puhvril (50mM EDTA (pH 8,5), 0,5% Na-laurüülsarkosiini, 0,2% Na-deoksükolaat, 2mg/ml lüsoosüümi, 10U mutanolüsiini) ning seejärel töödeldi proteinaas K (1mg/ml) sisaldava puhvriga (100 mM EDTA–1% sarkosüül–0,2%

30

deoxycholate, pH 8,0). Lüüsitud "punnid" pesti TE puhvril 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 restriksiooni 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 murdepunktidele.

10

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

| Antibiootikum | MIK* (µg/ml) | MIK* (µg/ml) | Referentsväärtused e. epidemioloogiline- MIK (µg/ml)-murdepunkt resistentsusele |
|-------------------|---|--|--|
| | <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 |
| Tsiprofloksatsiin | 32 | 32 | 4 |

*MIK - minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

15 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tüvel ei esinenud resistentsust uuritud antibiootikumide suhtes. Täheledatai tsiprofloksatsiini 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 antud mikroobi kasutamisel probiootikumina ei ole eeldatav antibiootikumresistentsuse geenide horisontaalne levik teistele mikroobidele.

Antimikroobne aktiivsus

Lactobacillus plantarum Inducia avaldab MRS agarsöötmele antagonistlikku toimet mitmete enteropatogeenide suhtes (Tabel 2).

Tabel 2. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 antimikroobne aktiivsus modifitseeritud MRS agarsöötmele (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 |

Lactobacillus plantarum Inducia antimikroobne DSM 21379 aktiivsus oli *in vitro* triipkatses (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 Funktsionaalsed 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 agarsöötmele

10% CO₂ keskkonnas, tehti suspensioon 0,9% NaCl lahusesse tihedusega 10⁹ mikroobi/ml McFarlandi järgi, saadud suspensioonist 1,0 ml külvati 9,0 ml MRS vedelsöötmesse. Määrati metaboliitide hulk mmol/l, kasutati kapillaarkoloni HP-INNOWax (15 m × 0,25 mm; 0,15 µm). Koloni 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-HPO2 tüüpi elektroode. Elektroodid viidi 500 µl 24t MRS puljongis 10 (Oxoid, Ühendkuningriik) kasvanud rakukultuuri. ISO-HPO2 elektroodide signaale registreeriti paralleelselt 5-7 minutit ja arutati keskmine signaalitugevus antud aja jooksul. Iga eksperimentaalne punkt mõõdeti 4 sõltumatu paralleeliga ja iga paralleel mõõdeti kaks korda. Kontsentratsioonide hindamiseks koostati standardkõverad, mille põhjal arutati signaali tugevuse sõltuvus vesinik peroksiidi kontsentratsioonist.

15

Tabel 3. Äädikhappe, piimhappe ja merivaikhappe kontsentratsioon (mmol/l) MRS söötmes *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 mikroaeroobsel kultiveerimisel 24 ja 48t jooksul ja H₂O₂ kontsentratsioon (µg/ml) tervetel rakkudel ja rakulüsaadis

| | Äädikhape (mmol/l) | | Piimhape (mmol/l) | | Merivaikhape (mmol/l) | | H ₂ O ₂ (µg/ml) |
|--|--------------------|------|-------------------|-------|-----------------------|------|---------------------------------------|
| | 24 t | 48 t | 24 t | 48 t | 24 t | 48 t | Terved rakud |
| <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 tekitab suurtes hulkades, rohkem kui kontrolltüvi piimhapet, äädikhapet ja H₂O₂, mis on olulised jämesoole limaskesta troofikaks.

***Lactobacillus plantarum* Inducia totaalne antioksidantne 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 OD₆₀₀ 1.1 juures 10⁹ mikroobirakku/ml. Totaalset antioksidantset aktiivsust (TAA) määrati 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 antioksidatiivset staatust (TAS)

10 kommertsiaalse kiti abil (TAS, Radox Laboratories Ltd., Ühendkuningriik).

Tabel 4. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 totaalne antioksidantsus (TAA) ja totaalne antioksidatiivne 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 |

15

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 keskmine 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 kontsentratsioonist.

25

Tabel 5. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 lämmastikmonooksiidi NO kontsentratsioonid (μM)

| Tüve number | NO kontsentratsioon (μM) |
|---|---------------------------------------|
| <i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 | $2,7 \pm 1,2$ |
| <i>L. plantarum</i> DSM 21380 | $2,6 \pm 0,8$ |
| <i>L. coprophilus</i> | $2,1 \pm 1,1$ |
| <i>L. plantarum</i> | $2,1 \pm 0,9$ |
| <i>L. paracasei ssp paracasei</i> tüvi nr 1 | $1,3 \pm 0,8$ |
| <i>L. paracasei ssp paracasei</i> tüvi nr 2 | $1,8 \pm 0,9$ |
| <i>L. paracasei ssp paracasei</i> tüvi nr 3 | $2,8 \pm 1,6$ |
| <i>L. buchneri</i> | $2,0 \pm 1,1$ |

5

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

Metoodika: Mikroobitüved suspendeeriti füsioloogilises lahuses McFarlandi standardi järgi 10^9 mikroobi/ml ja 0,5 ml külvati dekarboksülatsioonisöötmesse (á 4,5 ml) ning 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 μl söötimest GC analüüsiks modifitseeritud Nakovich meetodil (Nakovich, L. Analysis of biogenic amines by GC/FID and GC/MS. Thesis, Virginia polytechnic institute, USA. 2003) GC analüüs teostati gaaskromatograafia HP 6890 Series GC System, kasutati kapillaarkolooni HP-5 19091J-413 (30 m \times 0,32 mm; 0,25 μm). Kolooni temperatuuri programm 160°C 1 min, 20°C/min 280°C 15 min; detektor (FID) 300°C.

20

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

| Proov | Polüamiinid (µg/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

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

10

JOONISTE LOETELU

15

Joonis Fig.1. Tüve molekulaarne identifitseerimine 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 näpupaljed võrreldes *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* dekarboksülatsioonisöötmetest (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 Joonis Fig. 5. Laktobatsillide liigid Pearson UMPAG klasteranalüüsil *L. plantarum* Inducia DSM 21379 grupis.

Katseisikud nr 3, 6, 9, 11, 14,15, 19 ja 20.

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 regressioon mudeliga jäi seos pidama ($R^2=0,405$, $R^2 \text{ adj} = 0,338$, $p=0,035$).

20

LEIUTISE TEOSTAMISE NÄITED

25 **Näide 1. Toiduaines *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 vajaliku (optimaalse) koguse saavutamine**

Katse Eesti Juustuga

30 **Metoodika:** Mikroorganismi *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 lisati Piimandusühistu E-Piim Eesti juustu tegemiseks kasutatavale juustupiimale, mis seejärel 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 | 8×10^8 | 4×10^8 | 10^{10} | 2×10^8 | 3×10^8 | 2×10^8 |
| Laktobatsillid | 5×10^8 | 2×10^8 | 10^{10} | 10^5 | - | 3×10^3 |
| <i>L. plantarum</i> | 5×10^8 | 2×10^8 | 10^{10} | - | - | 3×10^3 |
| Kokid | 3×10^8 | 2×10^8 | 10^9 | 2×10^8 | 3×10^8 | 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 pealmisest kihist derivatiseeriti GC analüüsiks modifitseeritud Nakovich meetodil (Nakovich, 2003) Tartu Ülikooli Mikrobioloogia Instituudis.

GC analüüs teostati gaaskromatograafia HP 6890 Series GC System, kasutati kapillaarkoloni HP-5 19091J-413 (30 m × 0,32 mm; 0,25 µm). Koloni temperatuuri programm 160°C 1 min, 20°C/min 280°C 15 min; detektor (FID) 350°C (Joonis Fig. 4).

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

Lactobacillus plantarum Inducia DSM 21379 kuulub fakultatiivselt heterofermentatiivsesse gruppi ja seetõttu oli türamiini keskmine sisaldus juustudes oluliselt madalam, kui seda täheldatakse OHEL grupi tüvedel, seevastu oli putrestsiini 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 | 3x10 ⁸ | 4,83 | 20,28 | 0 | 2x10 ⁷ |
| Kontrolljuust, 1. katse | - | 2,31 | 1,82 | 0 | - |
| <i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379, 2. katse | 3,3x10 ⁷ | 13,57 | 24,67 | 0 | 2x10 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 2007; 23(1): 87-95). Toksiliseks loetakse türamiini sisaldust 1000-8000 mg/kg. Putrestsiini 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 sisaldava juustu tarbimisel saab inimene ca 3 mg putrestsiini. Seega 70 kg inimesel on sel juhul tegemist kontsentratsiooniga kuni 50 µg/kg kohta, mis ei avalda kindlasti toksilist toimet.

15 **Näide 3. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava toiduainega seedekulgla limaskestast kaitsevõime suurendamine**

- Loomkatses NIH liini hiirtega manustati hiirtele rühmad juustusid 30 päeva vältel (lisanditeta kontrolljuust, *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 tüve 2x10⁸ mikroobirakku/g sisaldav juust).
- 20 Juustu manustati hiirtele öösel (hiirte normaalne ärkveloleku aeg) 4,4g/ühe hiire kohta, 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 kaaluuive 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) |
|------------------|---|---|
| Rooja proovid | | |
| 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 suurenes laktobatsillide üldhulk oluliselt nii peen- kui jämesooles.

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

Elundeis (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 difuusseteks kogumikeks.

15 Jämesooles pöörati peatähelepanu hulgaliselt karikrakke sisaldavale pinnaepiteelile ja lümfaatilise 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 | Hüpereemia 6/10* | ii | Lümfifolliiklid 6/10* | Lümfifolliiklid 8/10* |
| Kontrolljuustu söönud loomad | Hüpereemia 3/10* | Hüpereemia 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 hüperemeiat ning tõstis oluliselt hiirte peen- ja jämesooles lümfaatiliste kaitsefolliiklite (immunotsüüdid) hulka võrreldes kontrollrühma hiirtega. Nimetatud tulemused viitavad maksafunktsioonide ja seedekulga limaskesta kaitsevõime aktiveerumisele.

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

10

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

15

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

20

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

25

Enne test-juustu manustamist 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.

30

Katsetus toimus kaksikpime *cross-over* randomiseeritud uuringuna. Juustu 3-nädalast 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 esinenud
5 negatiivseid nähte. Pärast juustukatse lõppu ei olnud süsteemsed põletiku markerid
(ultrasensitiivne C-reaktiivne valk ja leukotsüütide üldarv) oluliselt suurenenud, need
püsisid normi piires.

Lactobacillus plantarum Inducia DSM 21379 sisaldusega probiootilise juustu tarbimine
(Tabel 11) ei muutnud ka valgeverepildis (leukogramm) rakkude protsentuaalset
10 vahet, samuti ei tõusunud IgE antikehade kui olulise allergia markeri hulk võrreldes
katse-eelse perioodiga.

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

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

electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns *Environmental Microbiology* 2002; 4 (11), 634-643) (Joonis Fig.5).

Tulemused

- 5 *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldusega juustu tarbimine muutis isikute roojas laktobatsillide bändide profiili 5 uuritul 12 uuritust. Need muutused püsisid 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.

15

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 suurenes sooles oluliselt Peyer naastude e. lümfifolliiiklite sisaldus. Neis folliiiklites toimub immuunsüsteemi komponentide eneste vaheline interaktsioon. TH1 tüüpi lümfotsüütide aktiveerimisel bakterite vastu omavad olulist rolli proinflammatoorsed tsütokiinid, sh. IL-6 induktsioon, nende kaudu aktiveeritakse tagasiulatuvalt ka makrofaagid, s.o. veres monotsüüdid. Samas toodavad vere monotsüüdid ise ka IL-6
- 25 Rakulise immuunsuse osatähtsuse tõusuga on seletatav ka normi piiresse jääv 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 väärtused | Normi väärtused ja mõõduühikud |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------|---------------------------------|
| Ultrasensitiivne C-reaktiivne valk | 1,9 ± 1,6 | 3,3 ± 2,7 | 1,0 | < 5 mg/L |
| Leukotsüütide üldarv x10 ⁹ | 6,3 ± 1,7 | 6,9 ± 1,6 | 0,116 | 4 – 10 x 10 ⁹ /L |
| Lümfotsüüdid | 2,3 ± 0,5 | 2,2 ± 0,4 | 0,878 | 0,8 -2,9 x 10 ⁹ /L |
| Monotsüüdid | 0,55 ± 0,17 | 0,64 ± 0,15 | 0,032 | 0,15 -0,75 x 10 ⁹ /L |
| Tsütokiin IL-6 | 2,7 ± 1,0 | 3,8 ± 1,7 | 0,020 | < 3,4 ng/L |
| Antikehad IgA | 2,5 ± 0,9 | 2,3 ± 0,8 | 0,009 | 0.7-4.0 g/L |
| Antikehad IgM | 1,3 ± 0,5 | 1,3 ± 0,5 | 0,776 | 0,4-2,3 g/L |
| Antikehad IgG | 12,9 ± 3,2 | 12,4 ± 3,0 | 0,017 | 7,0-16 g/L |
| Antikehad IgE | 19,6 ± 21,2 | 21,4 ± 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 taastusperioodi efektiivsuse hindamiseks kasutati hommikust uriini ja gaaskromatograafilist meetodit.

Metoodika: Uriiniproovid derivatiseeriti propüülkloroformadiga 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 x0,25 mm; 0,25 µm).
 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 hommikusel 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> väärtused paaris <i>t</i> -test BL1 vs PRO / BL2 vs PL |
|-------|---|---|---|---|---|
| | BL1 keskmine sthälve vahemik (mediaan) ± | PRO keskmine sthälve vahemik (mediaan) ± | BL2 keskmine sthälve vahemik (mediaan) ± | PL keskmine sthälve 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-atsetüülputrestsiin (*N-acetylputrescine*),

DAP – 1,3-diaminopropaan (*1.3-diaminopropane*), acSpd – N8-atsetüülspermidiin (*N 8-acetylspermidine*), Cad – kadaveriin (*cadaverine*); His – histamiin (*histamine*), Tyr – türamiin (*tyramine*).

Polüamiinide (putrestsiini, atsetüülputrestsiini ja atsetüülspermidiini) sisaldus uriinis suurenes pärast *L. plantarum* Inducia sisaldava probiootilise juustu tarbimist. Selgus, et 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, atsetüülpermidiini ja spermiini sisaldus, samuti biogeensete amiinide histamiini ja türamiini sisaldus isikute uriinis vastavaks normaalväärtustele.

- 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, suurenes 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. Teistpidi 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 korreleeruvast makrofaagide (monotsüüdid) hulgas, milliseid saab sel juhul pidada aktiveeritud makrofaagideks. Nimetatud koos H₂O₂-ga on väga oluline organismi kaitses võõrakkude (mikroobid, vähirakud) vastu.

20 Soolestikus *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 toimetel esinevad putrestsiini füsioloogilised doosid teoreetiliselt soodustavad soole limaskesta katva epiteeli uuenemist ja vanade rakkude apoptoosi, mis väldib epiteeli hüperproliferaatsiooni. Nende mehhanismidega kindlustatakse ka soole limaskesta barjäärifunktsioon 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 lümfifolliiklite (rakulise immuunsuse kandjate arvukuse tõusuga) parandab soole limaskesta barjäärefekti ja toetab organismi immunoloogilisi kaitsefunktsioone.

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

5 Kliinilise katse (*cross-over* randomiseeritud platseeboga kontrollitud kaksikpime katse, kliinilise katse registreerimise rahvusvaheline number ISRCTN68198472) eesmärgiks oli hinnata *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava 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 ± 9,3 a). Võimaliku varjatud diabeedi väljalülitamiseks määrati glükoosi ja glükohemoglobiini (HbA1c) vereseerumist.

10 Test-jogurt sisaldas tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 (5×10^6 - 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 tarvitasid katseisikud 3 nädalat kontrolljogurtit.

15 Päevane doos oli 10^8 - 5×10^9 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 Immuunsüsteemi humoraalsete parameetrite tõus on kooskõlas kolme nädala pikkuse *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldusega juustu manustamisel saadud eelpoolkirjeldatud tulemustega.

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

| | Probiootiline jogurt | | kontrolljogurt | | P väärtused BL1 vs PRO / BL2 vs PL |
|--------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|
| | BL1 | PRO | | PL | |
| INF γ | 2,9 \pm 4,3 | 3,8 \pm 4,2 | 3,7 \pm 3,6 | 1,9 \pm 1,8 | 0,084 / 0,107 |
| TNF α | 4,6 \pm 3,2 | 5,0 \pm 2,6 | 4,0 \pm 1,4 | 3,8 \pm 1,2 | 0,225 / 0,376 |
| VEGF | 158,8 \pm 15,8 | 157, \pm 120,4 | 152,2 \pm 106,8 | 163,0 \pm 157,7 | 0,465 / 0,841 |
| MCP | 218,4 \pm 98,1 | 251,3 \pm 145,1 | 256,2 \pm 142,2 | 230,8 \pm 116,7 | 0,016 / 0,156 |
| EGF | 54,8 \pm 57,6 | 53,4 \pm 38,4 | 53,2 \pm 56,5 | 52,0 \pm 45,1 | 0,679 / 0,353 |

VEGF - veresoonte endoteeli kasvufaktor

- 5 MCP - monotsüütide kemotaktiivne proteiin

EGF – epidermaalne kasvufaktor

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

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

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

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

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

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

Put – putrestsiin (*putrescine*), acPut – N-atsetüülputrestsiin (*N-acetylputrescine*), DAP – 1,3-diaminopropaan (*1.3-diaminopropane*), acSpd – N8-atsetüülspermiidiin (*N 8-acetylspermidine*), Cad – kadaveriin (*cadaverin*), Tyr –türamiin (*tyramine*).

5

10

PATENDINÕUDLUS

1. Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kui organismi loomulikku kaitsevõimet tõstev probiootik, mis toodab ornitiinist ja glutamaadist polüamiine, arginiinist lämmastik monooksiidi, omab antioksidantset 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.

1/6

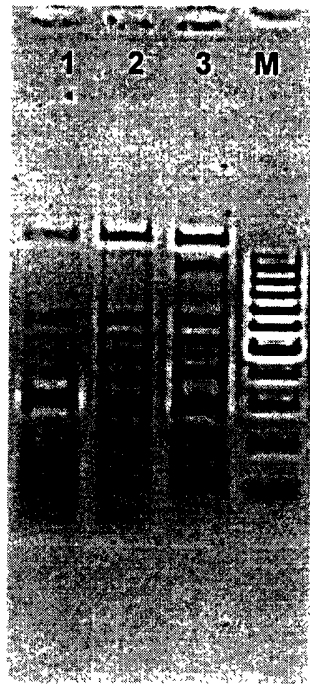


Fig.1

2/6

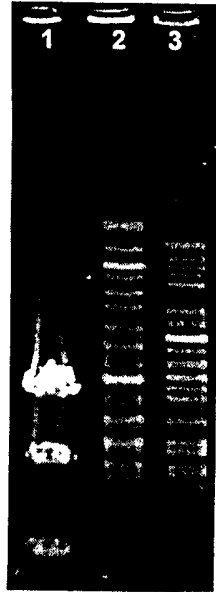
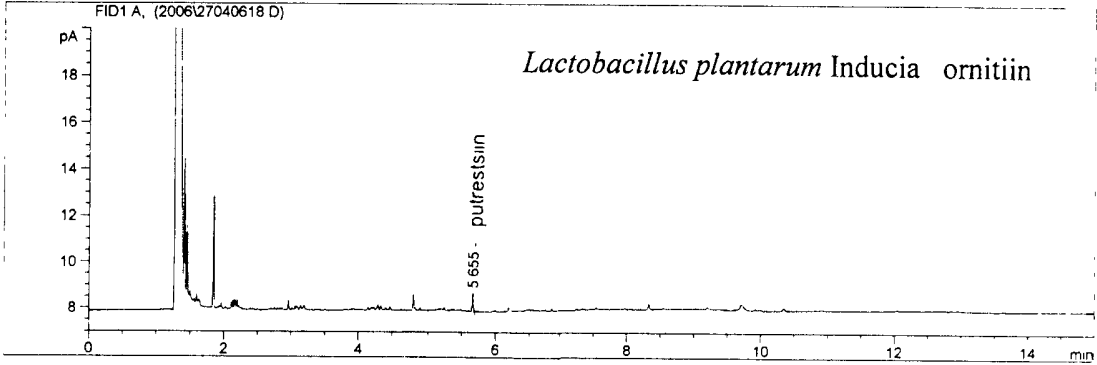


Fig.2

3/6

(a)



(b)

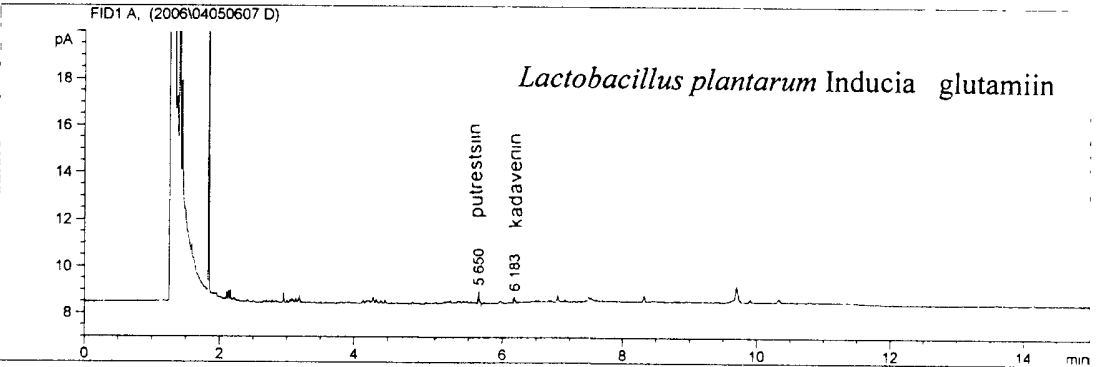


Fig.3

4/6

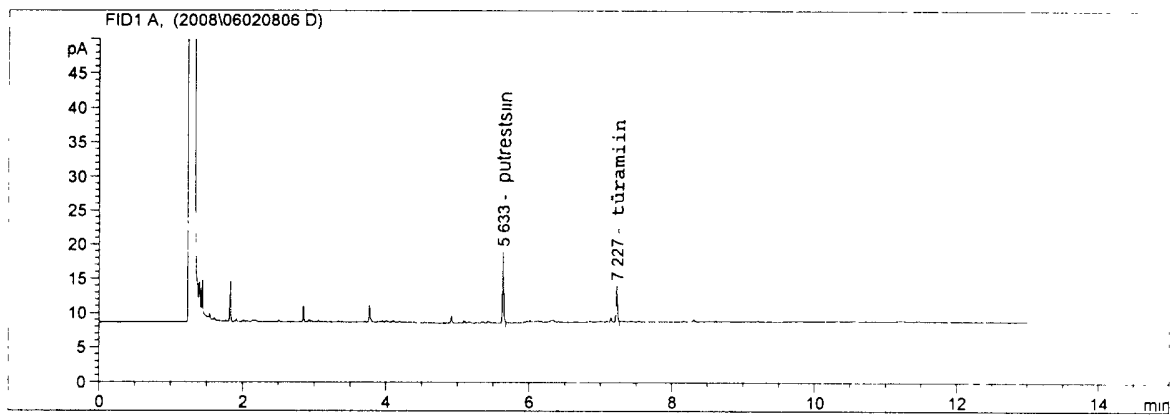


Fig.4

5/6

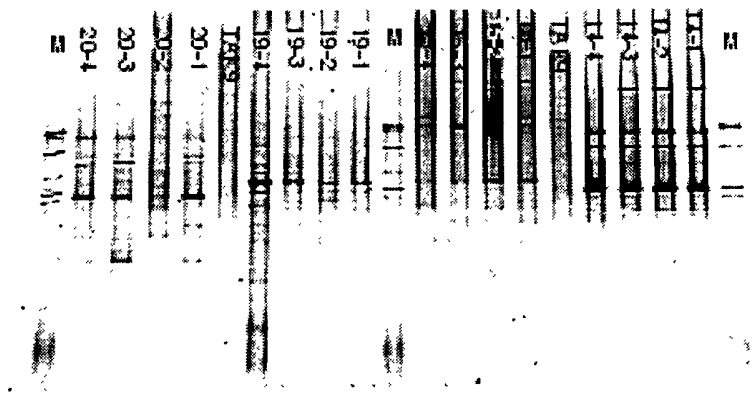
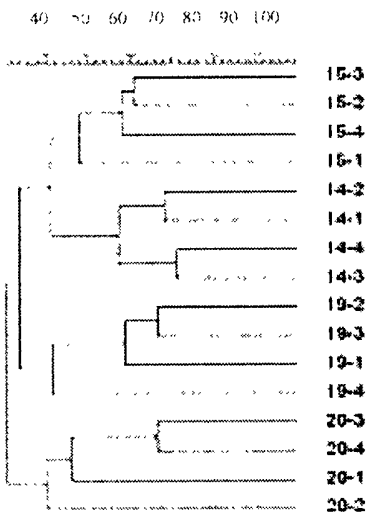
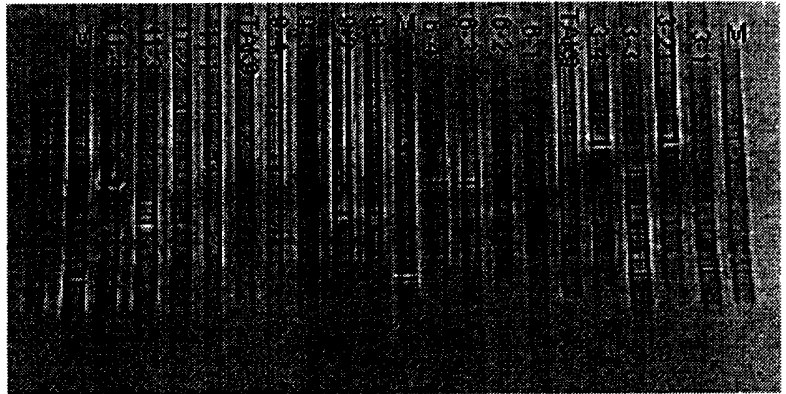
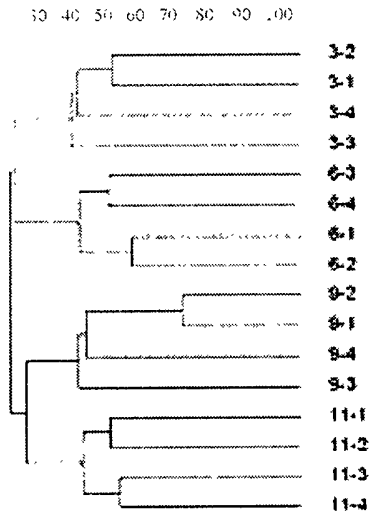


Fig. 5

6/6

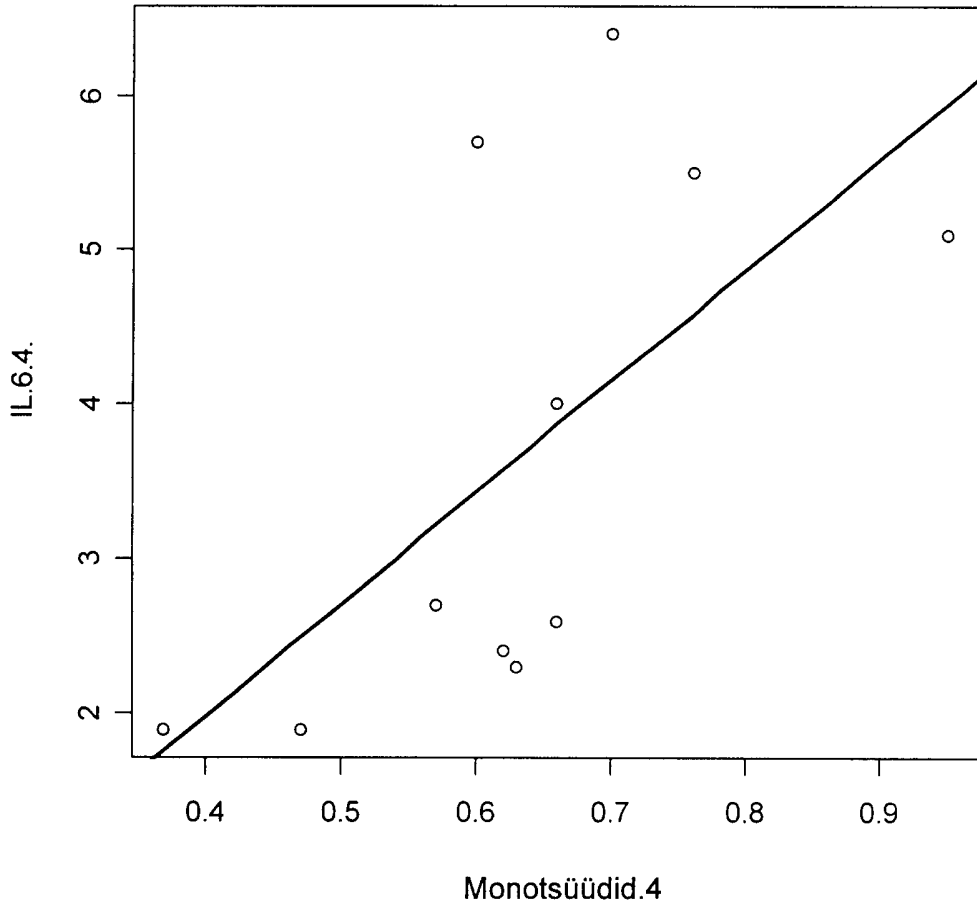


Fig.6