



EESTI VABARIIK  
PATENDIAMET

(11) **EE 201100012 A**

(12) **PATENDITAOTLUS**

(51) Int.Cl.  
C12N 1/20 (2012.01)  
A61K 35/74 (2012.01)  
A23C 9/123 (2012.01)  
A23C 9/13 (2012.01)  
A23C 21/02 (2012.01)  
A23C 21/08 (2012.01)  
A61P 13/08 (2012.01)  
A61P 37/08 (2012.01)

<p>(21) Patenditaotluse number: <b>P201100012</b></p> <p>(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev: <b>25.02.2011</b></p> <p>(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev: <b>15.10.2012</b></p> <p>(83) Bioloogilise aine, sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed:  <b>DSM 23881, 05.08.2010, DSMZ</b> <b>DSM 23882, 05.08.2010, DSMZ</b></p>	<p>(71) Patenditaotleja <b>OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogiate</b> <b>Arenduskeskus</b> <b>Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE</b></p> <p>(72) Leiutise autorid: <b>Tiiu Kullisaar</b> <b>Ropka 12A-45, 50111 Tartu, EE</b> <b>Mihkel Zilmer</b> <b>Puusepa 37, 50406 Tartu, EE</b> <b>Ene Tammsaar</b> <b>Sõpruse põik, Prillimäe, 79702 Rapla maakond, EE</b> <b>Andre Veskioja</b> <b>Tammemäe tee 1, Rosma küla, Põlva vald,</b> <b>63221 Põlva maakond, EE</b> <b>Epp Songisepp</b> <b>Tähe 105-7, 50107 Tartu, EE</b> <b>Kersti Zilmer</b> <b>Puusepa 37, 50406 Tartu, EE</b> <b>Lauri Bobrovski</b> <b>Väinjärve küla, Koeru vald, 73021 Järva maakond, EE</b> <b>Kersti Ehrlich</b> <b>Pargi 2-1, 50103 Tartu, EE</b> <b>Merle Rätsep</b> <b>Alasi 31-49, 50109 Tartu, EE</b> <b>Margus Punab</b> <b>Hiie 30, 51006 Tartu, EE</b> <b>Maire Vasar</b> <b>J. Hurda 27, 51005 Tartu, EE</b> <b>Marika Mikelsaar</b> <b>Jakobsoni 11-4, 51005 Tartu, EE</b></p> <p>(74) Patendivolinik: <b>Sirje Kahu</b> <b>Patendibüroo Ustervall OÜ</b> <b>Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE</b></p>
---	--

(54) **Mikroorganismide valimise meetod, isoleeritud mikroorganismide tüved *Lactobacillus plantarum* MCC1 DSM 23881 ja *Lactobacillus gasseri* MCC2 DSM 23882, neid sisaldav kompositsioon ja nende kasutamine**

(57) Leiutis käsitleb mikroorganismide valimise meetodit, uusi mikroorganismi tüvesid *L. plantarum* MCC1 DSM 23881 ja *L. gasseri* MCC2 DSM 23882 ning nende kasutamist antioksüdantse proteolüütilise koostisosana toidutoote või toidulisandi valmistamiseks. Nimetatud mikroorganisme sisaldavad toidutooted ja toidulisandid on hüpöallergilised, nende tarbimine vähendab piimaallergiat ja eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevat alumiste kuseteede ärritussümptomeid, nendega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku.

(57) The present invention relates to a method for the selection of strains, new microorganism strains *L. plantarum* MCC1 DSM 23881 and *L. gasseri* MCC2 DSM 23882 and their use as antioxidant proteolytic ingredients for the production of food products and dietary supplements. Food products and dietary supplements containing *L. plantarum* MCC1 and *L. gasseri* MCC2 are hypoallergenic, reduce milk allergy and lower urinary tract irritation symptoms accompanying benign prostatic hyperplasia and oxidative stress and inflammation associated with these.

Mikroorganismide valimise meetod, isoleeritud mikroorganismide tüved *Lactobacillus plantarum* MCC1 DSM 23881 ja *Lactobacillus gasseri* MCC2 DSM 23882, neid sisaldav  
5 kompositsioon ja nende kasutamine

#### TEHNIKAVALDKOND

Leiutis kuulub biotehnoloogia valdkonda ja leiab kasutamist  
10 toidutoodetetööstuses. Täpsemalt käsitleb leiutis mikroorganismi tüvesid *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 ning nende kasutamist piimaallergia ja eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevate alumiste kuseteede ärritussümptomite ning nendega seotud oksüdatiivse stressi ja põletiku  
15 vähendamiseks.

#### TEHNIKA TASE

Laktobatsille on laialdaselt kasutatud tervislike toidutoodete valmistamiseks juba kaua aega, näiteks  
20 juuretistena. Levinuim võte on laktobatsillide kasutamine funktsionaalses toidus. Funktsionaalne toit on toidutoode, mis peale tavaliste toiteliste väärtuste omab looduslikke lisakomponente, mis kasulikult mõjustavad organismi mingeid funktsioone või vähendavad haiguste riski.

25

Vähem on kasutusel aga võtteid, kus toidutoote valmistamisel on kasutatud eesmärgipäraselt bioselekteeritud elusaid laktobatsille, mis järgmises tehnoloogilises etapis pastöriseerimisega surmatakse. See tähendab, et lõpptoode ei  
30 sisalda elavaid piimhappebaktereid, kuid eeltöötluste, sobiva tehnoloogilise skeemi ja vajalike lisandite abil loodud tootel on eesmärgipärane biotoime.

Piimaallergia, selle leevendamine

Infektsioonid, põletiku-, allergia- ja oksüdatiivse stressi-  
seoselised probleemid näiteks toiduallergiad, kuseteede  
vaevused (nt eesnäärmevaevustega seotud kusemishäired)  
muutuvad ühiskonnale majanduslikult üha koormavamaks. Näiteks  
5 kuni 4% inimestest kannatab toiduallergiate all ja 100...200  
surmajuhtu on USAs otseselt toiduallergiast tingitud.  
Toiduallergiad (sh allergiline reaktsioon lehmapiimale) on  
eriti tõsine probleem väikelaste puhul. On ju piimatoodete  
kasutamine väikelastel hädavajalik nende normaalse kasvu ja  
10 arengu tagamiseks. Toidu allergilisuse probleemi lahendamine  
on äärmiselt komplitseeritud, sest absoluutselt allergiliste  
reaktsioonide vaba aga samas väga kõrge hea biokvaliteediga  
toodete loomine pole võimalik. Viimased diskussioonid ÜRO-s,  
FAO-s ja WHO-s on deklareerinud järgmist - *allergen-free:*  
15 *time to clarity; statement: there is no actual legislation to*  
*declare free from all allergens.* Seega: igasuguseid  
tehnoloogilisi ideid/lahendusi, mille tulemiks on  
hüpoallergilisemad tooted, mis vähendaksid vähemalt mõne  
protsendi võrra allergiliste vastustega väikelaste arvu,  
20 hinnatakse kõrgelt. Allergiliste vastuste vähenemise iga  
protsent on lõppkokkuvõttes/pikemas perspektiivis väga  
tähtis, sest mistahes edu allergia valdkonnas toidutoodete  
allergeensuse vähendamiseks omab olulist  
sotsiaalmajanduslikku väljundit (sh elukvaliteedi paranemine  
25 lastel ja täiskasvanutel ning ravikulutuste vähenemist).

Piimatoodete allergilisuse määravad valgud, kuid raske on  
esile tuua ühte nn põhi-allergeeni (Encyclopedia of Food  
Sciences and Nutrition (EFSN) AP, 2003, Wal, J. M. (2004)  
30 Bovine milk allergenicity. Ann.Allergy Asthma Immunol., 93,  
S2-11). Siiski kutsuvad nii kaseiin kui ka beeta-  
laktoglobuliin võrdses proportsioonis esile allergilisi  
reaktsioone. Lehmapiima allergia on seotud valdavalt  $\alpha$ -  
kaseiini ja  $\beta$ -laktoglobuliiniga (Host A. (2002). Frequency of

cow's milk allergy in childhood. Ann Allergy Immunol 89(Suppl 1):33-7; EFSN, 2003. Paljudel piimaallergiaga lastel on reaktsioon alfa-kaseiini suhtes (Hill D.J, Firer M.A, Shelton M.J et al. (1986) Manifestation of milk allergy in infancy: clinical and immunologic findings. J Pediatr 109: 270-6; EFSN, 2003, Vandenplas Y, Brueton M, Dupont C, Hill D, Isolauri E, Koletzko S, Oranje AP, Staiano A. (2007) Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. Arch Dis Child. 92:902-908).

10

Kaseiin koosneb järgmistest subühikutest:  $\alpha$ -S1 (peamine allergeen),  $\alpha$ -S2,  $\beta$ - ja  $\kappa$ -kaseiin, sealjuures ülekaalus on  $\alpha$ -S1 ja  $\beta$ -kaseiin. Piimavalkude ensümaatilise hüdrolüüsi vähendab nende allergeensust. Piimavalkude osalisel hüdrolüüsil tekivad suured peptiidid, põhjalikum hüdrolüüs annab suurte ja väikeste peptiidide ning aminohapete segu. Isegi põhjalik pepsiin-trüpsiin hüdrolüüs ei anna allergiavaba tulemust, sest natiivse valgu immunoreaktiivsete osiste tühised hulgad võivad anda allergilise reaktsiooni.

15

Seega ainult põhjaliku hüdrolüüsi-põhine lähenemine on tekitanud teatud võimalusi, ei paku aga lõplikku lahendust, ka vadakuvalkude hüdrolüsaatide puhul (Businco L, Cantani A, Longhi MA, Giampietro PG. (1989) Anaphylactic reactions to a cow's milk whey protein hydrolysate (Alfa-Ré, Nestlé) in infants with cow's milk allergy. Ann Allergy. 62(4):333-5.;

20

Sampson HA, James MJ, Bernhisel-Broadbent J. (1992) Safety of an amino-derived infant formula in children allergic to cow milk. Pediatrics. 90,463-465). Nii vajatakse uusi lähenemisi lehmapiima allergia vähendamiseks, mistõttu allergiat põhjustavate piimavalkude suunatud hüdrolüüs mikroorganismi(de) tüve(de)ga, mis annavad toodetele ka lisaväärtusi, on perspektiivne suund allergiaprobleemide oluliseks vähendamiseks.

25

30

Piimavalkude hüdrolüüsi piimhappebakterite ja lisaiainete abil on varem kirjeldatud. Patendis EE03424 (patenditaotlus WO9700078, Valio Oy) kirjeldatakse *L.rhamnosus* ATCC 53103 (LGG) tüve kasutamist allergiavastase valguhüdrolüsaadi-  
5 preparaadi valmistamiseks, kus valgud hüdrolüüsitakse pepsiini ja trüpsiiniga. LGG kasutamist allergiariski vähendamiseks käsitletakse mitmes Nestec SA leiutises. Patendis EP1296694 kirjeldatakse LGG kasutamist laste  
10 atoopiliste haiguste riski vähendamiseks. Patenditaotluses WO2008116907 on näidatud bifidobakterite ja LGG, *L.rhamnosus* CGMCC 1.3724, *L.reuteri* ATCC 55730 ja *L. paracasei* CNCM I-2116 kasutamist keisrilõikega sündinud imikutel allergiariski vähendamiseks, sh ka koos osaliselt (2-20%) hüdrolüüsitud proteiinidega. Nestec SA patenditaotluses WO03099037 on  
15 kirjeldatud piimhappebakterite proteolüütilist süsteemi ja *Bifidobacterium lactis* ATCC 27536 jt sisaldavat toidutoodet kasutamiseks mh ka toiduallergia vähendamiseks, kusjuures nimetatud bakterid võivad olla inaktiveeritud või surnud (*inactivated or dead*). Patendis EE04724 (patenditaotlus  
20 WO9929833, Arla Foods) kirjeldatakse *L.paracasei subsp. paracasei* kasutamist, sh lastel atoopiliste probleemide leevendamiseks. Patendis EP1175156 (Bioferme OY) kirjeldatakse mikroorganisme sisaldavat pastöriseeritud teraviljajooki. Patenditaotluses CN101427782 (Min Zhao)  
25 kirjeldatakse bifidobakterit sisaldavat maisijooki, mis valmistatakse fermenteerimise abil ja kus bakterid fermenteeritud tootes inaktiveeritakse. Vadakuproteiini-kontsentraadis (WPC, *whey protein concentrate*) on maksimaalseks  $\beta$ -laktoglobuliini hüdrolüüsiks saavutatud 21%  
30 (M.Pescuma et al (2007), Hydrolysis of whey proteins by *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium, *Journal of Appl Microbiol*, 103,5,1738-1746). Piimavalkude hüdrolüüsi (2-32%) kahe mikroorganismi toimel eesmärgiga saada heade

maitseomadustega toodet on kirjeldatud Euroopa patendis EP1383394 (New Zealand Dairy Board), kus üheks mikroorganismiks on pakutud *Macrococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Anthrobacter* või 5 *Corynebacterium*, eelistatult *Macrococcus caseolyticus*, teiseks mikroorganismiks piimhappebakter *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* või *Leuconostoc*, ja fermentatsioon lõpetatakse mikroorganismide eemaldamise või surmamise teel. Jaapani patenditaotluses JP7203844 (Morinaga Milk Industry 10 Co) kirjeldatakse piimavadaku osalist hüdroolüüsi (30%) mikroorganismist *Bacillus subtilis* saadud ensüümi, trüpsiini ja papaiini abil.

Eesnäärmevaevused, nende leevendamine

15 Eesnääre võib põhjustada mitmeid vaevusi: urineerimistakistust ja ärritust ning valu või ebamugavustunnet väikevaagna piirkonnas. Eesnäärmevaevused, just urineerimisega seotud probleemid on väga levinud, ning halvendavad paljude meeste elukvaliteeti. Hinnanguliselt 20 esineb prostata hüperplaasiat (eesnäärme liigkasv, *Benign prostatic hyperplasia* (BPH)) umbes pooltel 50-aastastest ning umbes 70% üle 70-aastastest meestest. Eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevad alumiste kuseteede sümptomid (*Lower urinary tract symptoms* (LUTS)) hõlmavad ärritavaid ja 25 obstruktiivseid (tühjendamise) sümptomeid, mille hindamisel on kasutusel rahvusvaheline eesnäärme sümptomite skoor, *International Prostate Symptom Score* - IPSS). Iga mitte-medikamentoosne võimalus, mis leevendaks meeste urineerimisraskusi oleks igati hinnatud ja parim on, kui 30 sellist toimet omaks mõni uudne toidutoode.

Mitmetes patenditaotlustes on kirjeldatud piimhappebakterite kasutamist terapeutilistes kompositsioonides urogenitaalsete infektsioonide, sh eesnäärmepõletiku ravimiseks ja leevendamiseks, kusjuures kompositsioonid sisaldavad üht või

mitut liiki piimhappebakterit (US2008274162, Nessa Jeffrey Bryan et al., 2007).

Piimhappebakterite kombinatsiooni, mille üks komponent sisaldab *L.crispatus*, *L.salivarius* ja *L.casei* ja teine  
5 komponent sisaldab *L.brevis*, *L.gasseri* ja *L.fermentum* saab kasutada toidulisandina või farmatseutilise kompositsioonina infektsioonide ja põletike, sealhulgas uretriidi raviks või ärahoidmiseks (EE04620, Actial Farmaceutica Lda, 2000). Piimhappebakterit *L.coprophilus* PL9001 (KCCM-10245) on  
10 kasutatud urogenitaalsete infektsioonide ärahoidmiseks ja ravimiseks (KR20040067161, PL BIO Co Ltd., 2003). Uroloogias lokaalraviks mõeldud farmatseutilised kompositsioonid võivad aktiivse toimeainena sisaldada piimhappebaktereid *L.casei*, *L.gasseri* (EP353581, Silvana Tosi et al., 1993).

15

Eeltoodust nähtub, et piimaallergia ja eesnäärmevaevuste leevendamist, sh piimvalgu osalise hüdrolüüsi ja piimhappebakterite abil on uuritud pikka aega.

20 Sellest hoolimata ei ole piimaallergiat ja eesnäärmevaevusi vähendavaid toidutooteid ja toidulisandeid kaubanduses piisavalt saada. Seega on olemas vajadus usaldusväärsete, katsetega tõendatud tervislike omadustega toidutoodete ja toidulisandite valmistamiseks ja kasutamiseks.

25

#### LEIUTISE OLEMUS

Leiutis käsitleb mikroorganismide valimise meetodit, milles valitakse antioksidantsed mikroorganismid, mis on võimelised piimavalku osaliselt hüdrolüüsima, tootma konjugeeritud  
30 linoolhapet, NO ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Valitud tüvesid kasutatakse piimaallergiat ning eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevaid alumiste kuseteede ärritussümptomeid ning nendega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku vähendava toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks.

Leiutis käsitleb nimetatud meetodi kohaselt valitud uusi isoleeritud antioksidantseid mikroorganismi tüvesid *L.plantarum* MCC1 DSM 23881 ja *L.gasseri* MCC2 DSM 23882, üht või mõlemat tüve sisaldavaid kompositsioone, nimetatud mikroorganismide kasutamist antioksidantse proteolüütilise koostisosana (ingrediendina) toidutoote ja toidulisandi valmistamiseks, mikroorganismide kasutamist piima allergiat ja eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevaid alumiste kuseteede ärritussümptomeid ning nendega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku vähendava toidutoote ja toidulisandi valmistamiseks ning meetodit eeltoodud vaevusi vähendava toidutoote ja toidulisandi saamiseks.

Leiutise objektideks olevad piimavalke osaliselt hüdrolüüsivad piimhappebakterid leiti astmelise bioselekttsiooni abil. Eesmärgiks oli leida multivalentseid biopotentsiaaliga tüved, mille multivalentsus võimaldaks tüvede kasulikke biotoimeid (hüpoallergilisem, vähem allergilisi vastuseid, põletikku, oksüdatiivset stressi vähendav mõju) sünergiliselt kasutada soovitud omadustega toidutoodete saamiseks. Leiutise lähenemiseideoloogia pole piimavalkude täieliku hüdrolüüsi saavutamine. Täielikku hüdrolüüsi on proovitud, see tekitab uusi probleeme, sh ka produkti ülitugeva organoleptilise ebameeldivuse. Leiutise ideoloogiaks valiti multibiopotentsete tüvede kasutamine koos vajalike tehniliste protseduuridega ning sobiva tervisliku lisatoorme kasutamisega. *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 on multibiopotentsed ja sünergilise toimega - nad on võimelised piimavalke (kaseiine) suunitletult (osaliselt) hüdrolüüsima, nad omavad olulist oksüresistentsust, tekitavad konjugeeritud linoolhapet, NO jt komponente. Seega võimaldab leiutis biotehnoloogilise terviklahenduse abil luua toidutooteid, mis omaksid potentsiaali vähendada piimaallergiat ning kuseteede vaevusi.



*L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 kirjeldus

Leiutise objektiks olevad *L.plantarum* MCC1 DSM 23881 ja *L.gasseri* MCC2 DSM 23882 isoleeriti terve lapse roojast Eesti-  
5 Rootsi laste mikrofloora võrdleva uuringu käigus. Tüvi *L.plantarum* MCC1 ja tüvi *L.gasseri* MCC2 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,  
10 Ühendkuningriik) ja kultiveeriti 37°C juures mikroaeroobses keskkonnas. Leiutise objektideks olevad tüved isoleeriti *Lactobacillus* ssp iseloomuliku pesa- ja rakumorfoloogia alusel. Järgnes provisoorne ja seejärel täpsem identifitseerimine, mida järgnevalt kirjeldatakse.

15

*L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 deponeeriti kultuurikollektsioonis Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH vastavalt numbrite DSM 23881 ja DSM 23882 all 05. augustil 2010.

20

Kultuur-morfoloogilised tunnused

Kultuur-morfoloogilised tunnused määrati MRS agar- ja puljongisöötmes (Oxoid) kasvatamise järgselt.

*L.plantarum* MCC1 kultiveerimiseks sobis MRS puljong 24-48 t  
25 mikroaeroobses keskkonnas, mille järel ilmnes puljongis ühtlaselt hägune kasv. 48 t MRS agarsöötmele kultiveerimise järel 37°C juures mikroaeroobses keskkonnas (CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>:10/5/85) on *L.plantarum* MCC1 pesad 2-2,5 mm läbimõelduga, valged, kumerad, läikivad ja korrapärase  
30 äärisega. Rakud on lühikesed ahelas osaliselt paralleelse asetusega pulgad. Optimaalne kasvutemperatuur on 37°C; tüvi paljuneb ka 15°C ja 45°C juures. Optimaalse kasvukeskkonna pH on 6,5. *L.plantarum* MCC1 on katalaas- ja oksüdaasnegatiivne,

fakultatiivselt hetero-fermentatiivne, ei hüdrolüüsi arginiini ja ei produtseeri glükoosi fermentatsioonil gaasi. *L.plantarum* MCC1 identifitseeriti API 50CHL System (bioMérieux, Prantsusmaa) test-kiti alusel kui *L.plantarum*  
 5 (kattuvus tüüpüvega: excellent, ID %-99.9, T index -0.83).

*L.plantarum* MCC1 molekulaarne identifitseerimine 16S rRNA järjestuse alusel andis homoloogia tüüpüvega *L.plantarum* Lp-01 (BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/sequence-analysis/>).  
 10 *L.plantarum* MCC1 süsivesikute fermentatsiooniprofiil API CHL 50 alusel on alljärgnev. Tüvi fermenteerib: riboosi, galaktoosi, D-glükoosi, D-fruktoosi, D-mannoosi, N-atsetüül-glükoosamiini, amügdaliini, arbutiini, eskuliini, salitsiini, tsellobioosi, maltoosi, laktoosi, sahharoosi,  
 15 trehhaloosi, meletsitoosi, D-raffinoosi, L-arabinoosi, metüül- $\alpha$ D-mannopüranosiidi, D-turanoosi, melibioosi, sorbitooli ja mannitooli.

API ZYM (bioMérieux, Prantsusmaa) test-kiti alusel omab *L.plantarum* MCC1 leutsiin arüülamidaasi, valiin arüülamidaasi,  $\alpha$ -glükosidaas,  $\beta$ -glükosidaas aktiivsust.  
 20

*L.gasseri* MCC2 kultiveerimiseks sobis MRS puljong 24-48 anaeroobses keskkonnas, mille järel ilmnes puljongis  
 25 ühtlaselt hägune kasv. 48 t MRS agarsöötmele kultiveerimise järel 37°C juures anaeroobses keskkonnas (CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>:5/5/90) olid *L.gasseri* MCC2 pesad 1,5-2 mm läbimõõduga, hallikasvalged, tuhmid ja ebakorrapärase äärisega. Rakud on keskmise jämedusega lühikesed kuni kokoidsed pulgad.  
 30 Optimaalne kasvutemperatuur on 37°C; tüvi paljuneb ka 45°C juures. Optimaalse kasvukeskkonna pH on 6,5. *L.gasseri* MCC2 on katalaas- ja oksüdaasnegatiivne, obligaatset homofermentatiivne (OHOL), ei hüdrolüüsi arginiini ja ei produtseeri glükoosi fermentatsioonil gaasi.

*L.gasseri* MCC2 identifitseeriti API 50CHL System (bioMérieux, Prantsusmaa) test-kiti alusel kui *L. delbrueckii ssp. delbrueckii* (kattuvus tüüptüvega: good, ID %-94.6, T index - 0.35). *L.gasseri* MCC2 molekulaarne identifitseerimine 16S rRNA järjestuse alusel andis homoloogia tüüptüvega *L. gasseri* IDCC 3102 (BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/sequence-analysis/>).

10 *L.gasseri* MCC2 süsivesikute fermentatsiooniprofiil API CHL 50 alusel on alljärgnev. Tüvi fermenteerib: laktoosi, sahharoosi, trehhaloosi ja eskuliini. API ZYM (bioMérieux, Prantsusmaa) test-kiti alusel omab *L.gasseri* MCC2 leutsiin arüülamidaasi, valiin arüülamidaasi, 15  $\alpha$ -glükosidaasi ja  $\beta$ -glükosidaasi aktiivsust.

#### Ohutus

Mikroobitüvede pärinemine terve lapse seedetraktist tõestab selle GRAS (*generally recognised as safe*) staatust ehk 20 mikroobitüved on inimesele ohutud ja sobivad suukaudselt manustamiseks. Samuti on laktobatsillide liigid *L. plantarum* ja *L. gasseri* kantud EFSA poolt QPS (*Qualified Presumption of Safety*) staatusega taksonoomiliste ühikute nimekirja (EFSA. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) 25 approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J* 2007; 587, 1-16).

#### Hemolüütiline aktiivsus

Metoodika: *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 hemolüütilist 30 aktiivsust määrati tüvede 4t inkubeerimise järel mikroaeroobses keskkonnas veriagarplaatidel (Blood Agar Base nr 2, Oxoid +7% inimese või hobuseverd).

Tulemus. Tüvedel MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 ei esinenud hemolüütilist aktiivsust.

Resistentsus antibiootikumidele

Metoodika: *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 tundlikkust antibiootikumidele testiti E-testi abil (AB Biodisk, Solna).

- 5 Minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon määrati vastavalt Euroopa Komisjoni soovitatud epidemioloogilistele murdepunktidele.

10 Tabel 1. *L.plantarum* MCC1 DSM 23881 ja *L.gasseri* MCC2 DSM 23882 antibakteriaalne tundlikkus (MIK, mg/l)

Antibiootikum	MIK* väärtused (µg/ml)				
	<i>L. plan- tarum</i> MCC1	<i>L. gasse- ri</i> _MCC2	<i>Lacto- bacillus</i> spp**	<i>L. plan- tarum</i> <sup>#</sup>	OHOL <sup>#</sup>
Ampitsilliin	0,094	0,031	2	2	1
Gentamütsiin	1,5	2	1	16	16
Streptomütsiin	16	ND	16	n.r.**	16
Erütromütsiin	0,125	0,047	4	1	1
Klindamütsiin	0,064	ND	n.r.	1	1
Tetratsükliin	2	0,5	16	32	4
Kloramfenikool	1,5	0,75	16	8	4
Kinupristiin/ dalfopristiin	1	ND	4	4	4
Tsefoksitiin	256	1,5	4	n.r.	n.r.
Tsefuroksiim	0,5	0,19	-	n.r.	n.r.
Imipeneem	ND	0,047	-	n.r.	n.r.
Tsiprofloksat- siin	0,38	>32	4	n.r.	n.r.
Rifampiin	ND	0,064	32	n.r.	n.r.
Trim/sulfam	ND	>32	32	n.r.	n.r.
Vankomütsiin	256	0,75	4	n.r.	2

\*MIK - minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon, murdepunkt resistentsusele, OHOL - Obligaatselt homohermentatiivsed laktobatsillid, n.r. - pole nõutud#

- 15 \*\* European Commission (EC), 2002. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary

importance. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General, Directorate C, Scientific Opinions, Brussels, Belgium. [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out64\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out64_en.pdf)

- 5 # FEEDAP Panel EFSA Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. The EFSA Journal (2008) 732, 1-15
- 10 *L.plantarum* MCC1 osutus Euroopa Komisjoni poolt laktobatsillidele sätestatud näitajate alusel resistentseks tsefoksitiini ja vankomütsiini suhtes (EC, 2002. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to
- 15 antibiotics of human clinical and veterinary importance. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General, Directorate C, Scientific Opinions, Brussels, Belgium. [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out64\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out64_en.pdf)).
- 20 On teada, et mitmed laktobatsillide liigid/tüved omavad loomulikku resistentsust nimetatud antibiootikumide suhtes ja seega ei ole antud mikroobi kasutamisel eeldatav antibiootikumresistentsuse geenide horisontaalne levik teistele mikroobidele. Teiste uuritud antibiootikumide suhtes
- 25 resistentsust ei esinenud.

Tüvel *L.gasseri* MCC2 ei esinenud resistentsust testitud antibiootikumide suhtes.

- 30 *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 funktsionaalsed omadused  
Metaboliitide profiil
- Metoodika: Metaboliitide profiil on kindlaks tehtud gaaskromatograafiliselt (HP 6890) mikroaeroobses kasvukeskkonnas inkubeerimisel 24t ja 48t järel (Tabel 2).
- 35 Laktobatsille kasvatati 48 t MRS agarsöötmele 10% CO<sub>2</sub> keskkonnas, tehti suspensioon 0,9% NaCl lahusesse tihedusega

10<sup>9</sup> mikroobi/ml McFarlandi järgi, saadud suspensioonist 1,0 ml külvati 9,0 ml MRS vedelsöötmesse. Määrati metaboliitide hulk mmol/l, kasutati kapillaarkolooni HP-INNOWax (15 m x 0,25 mm; 0,15 µm). Kolooni temperatuuri programm 60°C 1 min, 20°C/min 120°C 10 min; detektor (FID) 350°C.

Tabel 2. Äädikhappe, piimhappe ja merivaikhappe kontsentratsioon (mmol/l) MRS söötmes *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 mikroaeroobsel kultiveerimisel 24t ja 48t järel MRS söötmes

Liik	Äädikhape (mmol/l)		Piimhape (mmol/l)		Merivaikhape (mmol/l)	
	24t	48t	24t	48t	24t	48t
<i>L. plantarum</i> MCC1	0.9	1.3	100.0	137.2	0.4	0.5
<i>L. gasseri</i> MCC2	0.7	0.7	39.7	48.4	0.3	0.4

*L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 agregatsiooni ja piima kalgendamise võime selgitamine

Metoodika: Piima kalgendamise võime. Võimet piima kalgendada hinnati peale tüvede inkubeerimist 48t jooksul mikroaeroobselt UHT rasvatus piimas 37°C juures. Kalgendamisvõimet hinnati järgneva skeemi alusel:

1. Tugev (+) - piim kalgendunud 24 t jooksul,
2. Aeglane (+/-) - piim kalgendunud 48 t jooksul,
3. Puudub (-) - piim ei kalgendu.

Autoagregatsioon. Autoagregatsiooni võime hindamiseks suspendeeriti eelnevalt 24t jooksul MRS agarsöötmele ette kasvatatud tüvesid füsioloogilises lahuses. Tekkinud suspensiooni jäeti 15 minutiks toatemperatuuril seisma. Agregatsioonivõimet hinnati järgneva skeemi alusel: 0 - puudub, suspensioon ühtlaselt hägune; 1 - lahuses üksikud helbed; 2 - suspensioonis rohkesti helbeid, katsuti põhjas

mõningane sade; 3 - tugev, suspensiooni ei teki, katsuti põhjas sade, lahus peaaegu läbipaistev.

5 *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 kalgendasid piima 24t jooksul, omasid tugevaid autoagregatiivseid omadusi (Tabel 3).

Tabel 3. Tüvede agregatsiooni, üldproteolüüsi ja piima kalgendamisvõime

10

Tüvi	Autoagregatsioon	Piima kalgendamine
<i>L.plantarum</i> MCC1	3	+
<i>L.gasseri</i> MCC2	3	+

Prebiootikumide fermentatsioonivõime

15 Tagatoosi (Arla Food Ingredients), Raftiloos P95 (Beneo Orafti), Raftiloos Synergy 1 (Beneo Orafti) ja Raftiloos L60/75 (Orafti) fermentatsiooni hindamiseks külvati 0,05 ml uuritava laktobatsilli 48t vanust kultuuri MRS söötmesse, mis sisaldas glükoosi asemel 0,5% kas sorbiiti, tagatoosi või meletsitoosi. Indikaatorina lisati söötmesse

20 kloorfenoolpunast (0,004%). Fermentatsiooni hinnati värvuse muutuse alusel (punasest kollaseks) 48t möödumisel.

Tabel 4. *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 prebiootikumide kasutamise võime

	<i>L.plantarum</i> MCC1	<i>L.gasseri</i> MCC2
Tagatoos	-	+
L60/75	+	+
Raftiloos Synergy 1	+	-
Raftiloos P95	+	+

25

Antimikroobne aktiivsus patogeenidele

Metoodika: Antimikroobsete omaduste hindamiseks kasutati joonkülvitehnikat (Hutt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic

lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. J Appl Microbiol. 2006; 100(6):1324-32).

Patogeenide inhibitsiooni määramiseks mõõdeti kasvuvaba tsoon millimeetrites. Analoogselt Hütt jt. (2006) järgi arvutati kasutatud valimi tulemuste põhjal aritmeetiline keskmine ning standardviga ja sellest lähtuvalt hinnati tüvede antagonistlikku aktiivsust (mm) inkubeerimisel 37°C juures järgnevalt: - nõrk <9,7; keskmine 9,7-12,2; tugev >12,2. Kõiki katseid korrati paralleelselt vähemalt kolm korda.

10

Tabel 5. *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 antimikroobne aktiivsus patogeenide suhtes joonkülvi meetodil anaeroobses ja mikroaeroobses keskkonnas kultiveerimisel (patogeeni kasvupidurdus mm)

15

Patogeen	<i>L. plantarum</i> MCC1		<i>L. gasseri</i> MCC2	
	Anaeroobne	Mikro-aeroobne	Anaeroobne	Mikro-aeroobne
<i>Shigella sonnei</i>	20,3±2,3	20,3±2,1	9,5±2,9	7,7±1,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,7±2,9	15,0±1,0	3±3,2	2,3±2,5
<i>Escherichia coli</i>	17,3±2,5	18,0±1,0	6,3±3,4	6,3±1,2
<i>Enterococcus faecalis</i>	16,7±2,1	14,7±2,7	4,5±2,9	2,0±1,0
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	18,8±2,1	17,8±1,8	7,15±1,6	4,3±2,1
<i>S. enteritidis</i>	nd	7,1±2,8	nd	2,2 ±2,6
<i>Listeria monocytogenes</i>	nd	12,8±1,7	nd	2,8±1,0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	nd	12,8±1,0	nd	3,5±2,6

nõrk <9,7; keskmine 9,7-12,2; tugev >12,2; nd - ei määratud

*L.plantarum* MCC1 antimikroobne aktiivsus oli *in vitro* triipkatses (surmatud rakud ja nende eritatud metaboliitide toime) tugev enamuse testitud patogeenide (v.a *L.monocytogenes* ja *S. enteritidis*) suhtes mõlemas keskkonnas. *L.gasseri* MCC2 osutus mõlemas keskkonnas nõrgaks antagonistiks.

20



*Üldproteolüütilised omadused*

*L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 üldproteolüütilisi omadusi uuriti SMA söötmel (lõssi agarsöötmel) ja Ca-kaseinaadi agaril, külvates eelnevalt MRS puljongis 48t jooksul ettekasvatatud tüved testsöötmele. Külve inkubeeriti 7 päeva jooksul mikroaeroobses keskkonnas 37°C juures. Hinnati tekkinud proteolüüsijälje tugevust (6 katset, aritmeetiline keskmine) pallisüsteemi alusel: 4 - tugev, 3 - keskmine, 2 - nõrk, 1 - väga nõrk, 0 - puudub.

10

Tulemused: *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 on piisavalt hea üldproteolüütilise toimega (4 palli süsteemis oli *L.plantarum* MCC1 kolm palli ja *L.gasseri* MCC2 kaks palli).

15 Bioseleksioon spetsiifilisema proteolüütilise võime alusel (mass-spektromeetrilised ja RP-HPLC tehnoloogilised uuringud  $\alpha$ -S1-kaseiini ja  $\beta$ -kaseiini proteolüüsi ulatuse tuvastamiseks)

20 *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 puhul polnud teada, kuidas nad erinevaid piimavalke hüdrolüüsivad. Nii tehti esmalt kindlaks hüdrolüüsi käigus tekkivad muutused molekulmassi spektrites, kasutades üksikuid puhtaid piimaproteiine ( $\beta$ -laktoglobuliin,  $\alpha$ -S1 kaseiin,  $\beta$ -kaseiin), et hiljem analüüsida täispiima valkude spektri muutusi. Piimavalgude

25 hüdrolüüsi produktide molekulmassid määrati MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) mass-spektromeetril (Marsilio, R. Catinella, S. Seraglia R. Traldi P. (1995) *Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Mass-Spectrometry for the Rapid Evaluation of Thermal-Damage in Milk*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 9, 550-552). Kultuuridest tehti KCl füsioloogilisse lahusesse suspensioon tihedusega  $10^9$  PMÜ/ml vastavalt McFarland 4 standardile. Saadud suspensiooni lisati 10  $\mu$ l piimavalgu fraktsiooni. Tüvede elulemust neis fraktsioonide lahustes

30

määrati väljakülvidega lahjenduste rea meetodil katse eel ja lõpus. Tüvesid inkubeeriti vastavas valgufraktsiooni keskkonnas 2...6 päeva jooksul 37°C juures. Seejärel proovid tsentrifuugiti ning valkude profiil määrati mass-spektromeetril (*Voyager DE Pro, Applied Biosystems*) Joonis 5 fig 1 ja joonis fig 2). Leiti, et leiutise objektideks olevad tüved on võimelised kohandama ainevahetust toitainetevaese keskkonnaga. Näiteks olid katses ainsaks toitaine allikaks kas  $\alpha$ -S1 kaseiin,  $\beta$ -laktoglobuliin,  $\beta$ -10 kaseiin või tüve enese rakkudest saadavad ained. Tüved olid katse lõpus leitavad kõigis kolmes proteiinifraktsiooni keskkonnas ( $\alpha$ -S1 kaseiin,  $\beta$ -laktoglobuliin,  $\beta$ -kaseiin).

Järgnevalt uuriti tüvede proteolüütilisi omadusi 2,5% 15 rasvasisaldusega kaubanduslikus piimas RP-HPLC (*Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*) meetodi abil. Mõõdeti  $\alpha$ -S1 kaseiini ja  $\beta$ -kaseiini proteolüüsi ulatust inkubatsiooni 2. ja 4. päeval (Joonis fig 3). Selleks võrreldi uuritavale piimaproteiinile vastava RP-HPLC 20 kromatogrammi piigi pindala suurust stardimomendiga (kontroll, st piim enne laktobatsillide lisamist, võrdustati 100%-ga) ja leiti allesjäänud piimaproteiini hulk protsentides. Lisaks katsetati pikemate kuni 21 päevaste inkubatsiooniaegadega. Uuriti ka leiutise objektideks olevate 25 tüvede kombinatsioone parandamaks proteolüütilist efektiivsust ning proteolüütilisust ka vadakuga (vähendamaks allergeensete kaseiinide hulka) eellahjendatud piima puhul. Piimaproovide ettevalmistamine RP-HPLC analüüsiks ja kromatografeerimise tingimused on välja töötatud Bobe *et.al* poolt kirjeldatud 30 meetoodika eeskujul (Bobe G, Beitz DC, Freeman AE, Lindberg GL. (1998) Separation and Quantification of Bovine Milk Proteins By reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 458-463). Võrreldi omavahel 2,5% rasvasisaldusega kaubanduslikku piima, kuhu

lisati  $10^7$  PMÜ/ml uuritavat tüve ja inkubeeriti 37°C juures, ning ilma tüveta piima. Piimaproteiinide eraldamiseks kasutati kõrgefektiivset vedelikkromatograafi (HPLC) (Hewlett Packard 1100) ning poorse ränidioksiidiga täidetud pöördfaasi kolonni Zorbax 300SB-C18. Liikuvaks faasiks oli muutuva gradiendiga elueeriv süsteem, mille komponendid olid: lahus A - atseetonitriil, vesi, TFA suhtes 900:100:1 (v/v/v); Lahus B - atseetonitriil, vesi TFA suhtes 100:900:1 (v/v/v). Gradient algab lahus B-ga ja lahus A osakaal hakkab suurenema kohe peale proovi süstimist süsteemi. Lahutusfaasis, mille jooksul toimub piimaproteiinide eraldumine, suureneb lahus A sisaldus 0,47% minutis. Saadud fraktsioonid samastati võrreldes retensiooniaegu peamiste piimaproteiinide standardite retensiooniaegadega ja molekulmassi määramise kaudu MALDI-TOF mass-spektromeetril. Piimaproteiinid elueeruvad järjekorras:  $\kappa$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\alpha$ -LA ja  $\beta$ -LG. *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 andsid  $\alpha$ -S1 kaseiini ja  $\beta$ -kaseiini puhul sobivad toimed (vt koondandmed joonis fig 1 ja joonis fig 2), laste lehmapiima allergiavastuses domineerivate valkude  $\alpha$ -S1 kaseiin ja  $\beta$ -kaseiin hulk vähenes teiseks toimepäevaks. Tuginedes RP-HPLC analüüsile oli parim suunatud osaline proteolüüsija *L.gasseri* MCC2 (joonis fig 3). Kombineerides eelnimetatud laktobatsille omavahel, proteolüütiline efekt piimas pisut vähenes võrreldes samade tüvede kasutamisega üksinda. *L.plantarum* MCC1 inkubeeriti ka 4 päeva 40% piimast ja 60% vadakust koosnevas segus:  $\alpha$ -kaseiini sisaldus oli neljandaks päevaks 81% ja  $\beta$ -kaseiini sisaldus 83% võrreldes stardimomendiga. Jõuti püstitatud eesmärgini: tüved *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 ning nende kombinatsioon vähendasid  $\alpha$ -S1 kaseiini ja/või  $\beta$ -kaseiini hulka 20...40% (st toimus suunatud mõõdukas hüdrolyüs).

*L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 hüdroolüüsivad piimaallergiat põhjustavaid valke ja on hea üldproteolüütilise aktiivsusega. Nende eraldi või koos kasutamine vähendab piimaallergiat ja seetõttu saab neid kasutada piimaallergiat vähendava toidutoote ja tervislike omadustega toidulisandi valmistamiseks.

Bioselektatsioon konjugeeritud linoolhappe (CLA) produktsiooni alusel

- 10 CLA tähistab 18-süsinikulise rasvhappe, linoolhappe (LA, *cis*-9, *cis*-12-18:2) isomeeride rühma, kus kaksiksidemed on konjugeeritud. CLA moodustub looduslikult biohüdrogeenimise ja oksüdatsiooni protsesside käigus. CLA-l arvatakse olevat anti-adipogeenne, antikantserogeenne, anti-diabetogeenne ja põletikuvastane toime, regulatoorne toime immuunsüsteemile, tsütokiinide ja immuunglobuliinide produktsioonile ning võime moduleerida teatud geenide ekspressiooni kas otseselt või kaudselt läbi spetsiifiliste transkriptsiooni faktorite (Wahle, K. W. J., Heys, S. D. and Rotondo, D. (2004).
- 20 Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? Prog. Lipid Res. 43: 553-587). Kuna mitmed piimhappebakterid on võimelised muutma linoolhapet konjugeeritud linoolhappeks, siis oleks võimalik tõsta fermenteeritud piimaproductides CLA sisaldust (Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P. and Eyer, H. (2004). Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products- a review. Int. Dairy J. 14: 1-15). Sel eesmärgil on vajalik testida, millised piimhappebakteritest on CLA tootjad. On teada, et mikroobide kasvukeskkonnas esinevad vabad rasvhapped on bakteriostaatilise toimega, mõjutades mikroobide kasvu ja rakumembraani permeaablust. Toime tugevus sõltub konkreetsest rasvhapest. Kõrgema küllastamatuse astmega pikaahelalised rasvhapped omavad tugevamat antimikroobset toimet. Kaksiksidemete stereokeemia

mõjutab samuti antimikroobset aktiivsust: *cis*-konfiguratsiooniga rasvhape on tugevam inhibiitor kui *trans*-vorm (Kankaanpää, P. E., Salminen, S. J., Isolauri, E., Lee, Y. K. (2001). The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. FEMS Microbiol. Lett. 194: 149-153). Mikroobidel on väljakujunenud kaitsemehhanism elutegevust pärssiva ühendi kahjutustamiseks: polüküllastamata rasvhapped isomeriseeritakse vähem inhibeerivateks variantideks, näiteks tugevama bakteriostaatilisega toimega linoolhape (LA) konverteeritakse CLA-ks (Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P. and Eyer, H. (2004). Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products- a review. Int. Dairy J. 14: 1-15). Suurem osa tekkinud CLA-st jääb keskkonda; üks osa liidetakse rakumembraani lipiidide koosseisu. On leitud, et CLA võib vähesel määral paikneda ka mikroobiraku sees. LA ja teiste rasvhapete (oleiinhape, ritsinoolhape) konjugeerimise võimet on leitud mitmete mikroobiperekondade esindajatel, sealhulgas *Lactobacillus sp.* Kasutatades meie poolt välja arendatud CLA määramismeetodit hinnati kvantitatiivselt tüvede võimet toota CLA kasvukeskkonda (MRS, lõss) lisatud linoolhappe baasil. Selgus, et *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2, millel olid nii vajalik suunitletud proteolüütiline toime, tekitasid CLA-d märkimisväärselt (Tabel 7). Samas polnud need tüved sisuliselt tundlikud LA bakteriostaatilisellele toimele.

Bioselektatsioon oksüresistentsuse (antioksidantsuse) baasil Uuriti, kas tüvedel *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2, millel on spetsiifiline piiratud proteolüütilisus, ka CLA-produktiivsus, on olemas füsioloogiliselt oluline oksüresistentsus. Oksüresistentsust peaks määrama vähemalt kahe meetodiga.

Esimese meetodina kasutati linoleenhappe-testi (LA-test), millega on võimalik määrata laktobatsillide rakususpensioonide võimet inhibeerida linoleenhappe peroksüdatsiooni.

5

Teise meetodina kasutati kommertsiaalset testi (Totaalne antioksidantne staatus-TAS, Randox Laboratories Ltd., UK), mis põhineb vesinikperoksiidi poolt genereeritud ferrüülmetmüoglobiin-radikaali tekke allasurumises

10

laktobatsillide rakkude suspensiooni poolt (Rice-Evans and Miller 1994). TAS väärtus avaldati trolox (vitamiin E lahustuv vorm) ühikutes (mmol/L). Mõlemad meetodid on publitseeritud (Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A. (2002). Two antioxidative

15

lactobacilli strains as promising probiotics. Int. J. Food Microbiol. 72, 215-224; Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K., Vihalemm, T., Zilmer, M. (2003) Antioxidative probiotic fermented goats milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects.

20

British Journal of Nutrition 90, 449-456).

TAA ja TAS määramiseks inkubeeriti tüvesid MRS puljongis (Oxoid) 24t 37°C juures. Mikroobirakke tsentrifuugiti temperatuuril 4°C 1500 pööret/min 10 minuti jooksul, pesti isotoonilise soolalahusega (4°C) ja suspendeeriti 1,15% KCl (Sigma, USA). Suspensiooni tiheduseks oli OD<sub>260</sub> 1.1 juures 10<sup>9</sup> mikroobirakku/ml. *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 on füsioloogiliselt olulise totaalse antioksidatiivsusega (Tabel 6).

30

Tabel 6. Oksüresistentsus TAA- ja TAS-meetoditel (n=7-9); M±SD)

Tüvi	TAA (%)	TAS (mmol/l)
<i>L.plantarum</i> Inducia DSM 21379	26±12	0,13±0,04
<i>L. plantarum</i> MCC1 DSM 23881	20±8	0,05±0,02
<i>L.gasseri</i> MCC2 DSM 23882	25±6	0,03±0,03
<i>L.plantarum</i> Tensia DSM 21380	22±5	0,05±0,02

Bioselektatsioon lämmastikoksiidi ja vesinikperoksiidi  
5 produtseerimisvõime alusel

Eesmärgipärase informatsiooni saamiseks uuriti preselekteeritud tüvesid (spetsiifiline piiratud proteolüütilisus, CLA-produktsioon, antioksidantsus) ka NO ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produtseerimise suhtes. Kirjanduse andmetel pole  
10 eelnevaid uuringuid mikroobitüvede NO ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> samaaegse produktsiooni kohta. Mõõtmised viidi läbi elusrakkudega kasutades elektrokeemilist mõõtmist (*Apollo* 4000 vabade radikaalide anlüsaator WPI, Berlin, Saksamaa, kasutades ISO-HPO<sub>2</sub> ja ISO-NOP tüüpi elektroode. Elektroodid viidi MRS  
15 puljongis (Oxoid) kasvanud kultuuri, signaalid registreeriti samaaegselt 5-7 minuti kestel ning arvutati keskmine signaalitugevus mõõtmise aja jooksul. Iga eksperimendipunkti mõõdeti 4 sõltumatu paralleelina ja iga paralleeli mõõdeti kaks korda. Uuritava proovi NO ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioonid  
20 tehti kindlaks proovi signaali võrdlemisel standardgraafikuga.

*L.plantarum* MCC1 on NO ja vesinikperoksiidi märkimisväärse produtseerimisvõimega, mõlemaid ühendeid produtseerib ka *L.gasseri* MCC2 (Joonis fig 4 ja 5).

25 Seega sobivad tüved *L. plantarum* MCC1 ja *L. gasseri* MCC2 kasutamiseks antioksidantse lisandina toidutoote ja toidulisandi valmistamiseks.

Tabelis 7 on toodud eelnimetatud tüvede ning nende kombinatsiooni funktsionaalsete omaduste kokkuvõte.

Tabel 7. Tüvede *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 ning nende kombinatsiooni funktsionaalsete omaduste kokkuvõte

FUNKTSIONAALSED OMADUSED		MCC1	MCC2
1	<i>In vitro</i> antagonism:#	2	1
2	Bakteritsiidse H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> produktsioon 1	3	2
3	Bakteritsiidse ja lõõgastusfaktori NO produktsioon 2	3	2
4	CLA produktsioon*** MRS Löss	3 3	2 1
5	Üldproteolüütiline toime	3	2
	Oksüresistentsus & TAA TAS	3 1	3 1
7	Prebiootikumide fermentatsioon 4	3	1
8	Biogeensete amiinide tekitamistase 3	3	3
9	Kaseiinide proteolüütilisus 5	2	3
	Positiivsete skooride summa	29	21
OHUTUS JA POSITIIVSED TOIMED		MCC1	MCC1+MCC2
1	Hemolüütiline aktiivsus <i>in virto</i>	0	
2	Loomkatse (NIH liini hiired) Tüve translokatsioon Histoloogilised muutused	0 0	
3	Vabatahtlikega ohutuskatsed, 2 nädalat ## Alakõhuvalu Puhitused Summaarne skoor	n = 10  0/30SC 30 0/30SC 30 3	n = 9  0/27SC 27 0/27SC 27 3
4	KMI, vererõhk, vereglukoos, vere lipiidid, kolesterool, lipoproteiinid, maksafunktsioon, põletiku- ja OxS markerid ei erinenud endeemilistest referentsväärtustest	3	3
5	Statistiliselt tõesed positiivsed muutused süsteemse põletiku ja oksüdatiivse stressi markerites	3 MPO 3Isopros- taanid	3 hsCRP, 3 IL-10 3Isopros- taanid
6	Olulised positiivsed trendid (teiste markerite arv)	3(oxLDL, B2GPI- LDL, sdLDL)	5(IgE, BP, oxLDL, b2GPI- LDL, sdLDL)
	Positiivsete skooride summa	15	20

5 #SKOOR 3 >= 20 mm; SKOOR 2 = 15-20 mm; SKOOR 1 = < 15 mm, ## SKOOR 3 - ei ole kaebusi; SKOOR 2 - mõningad kaebused; SKOOR 1 - muutused, kaebused, <sup>1</sup> SKOOR 3 - 400-500; SKOOR 2- 300 -399; SKOOR 1 - 100-299 ühikut, <sup>2</sup> SKOOR 3 - 2.0 -3.0; SKOOR 2 - 1.0 -1.99; SKOOR 1- <1.0 ühikut, <sup>4</sup> SKOOR 3 - Inuliin, selle derivaadid tagatoos SKOOR 2 - ainult



inuliin või tagatoos - ei inuliini ega tagatoosi, <sup>5</sup> SKOOR 3 - 30...45%, SKOOR 2 - 15...30%, SKOOR 1 - < 15%, <sup>3</sup> SKOOR 3 - ainult jäljed; SCORE 2 - < 10; SKOOR 1- 11-30 ühikut (pikaajalise toime korral), <sup>4</sup> SKOOR 3 TAA > 20, TAS >0.1; SKOOR 2 - TAA >15, TAS 0.05-0.09; SKOOR 1 - TAA <15, TAS < 0.05ühikut, \*\*\* SKOOR: CLA produktsioon 3 - 40...31, SKOOR 2 30 - 20...15, SKOOR 1 14 ...10 ühikut

Ülaltoodu kirjeldas leiutise objektideks olevaid mikroorganismide tüvesid.

10

Järgmisteks leiutise objektideks on kompositsioonid, mis sisaldavad üht või mõlemat tüve *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2.

Kui kompositsioon sisaldab ainult üht tüve, siis on tüve sisaldus vahemikus 0,8-1,2 mahuprotsenti, kusjuures tüve *L.plantarum* MCC1 iduarv on  $0,25 \times 10^8 - 4 \times 10^8$  pmü/ml ja tüve *L.gasseri* MCC2 iduarv on  $0,5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  pmü/ml.

Eelistatult on ühe tüve kasutamise puhul tüve sisaldus vähemalt 1,0 mahuprotsenti, kusjuures iduarv *L.plantarum* MCC1 sisalduse korral on vahemikus  $0,4 \times 10^8 - 4,8 \times 10^8$  pmü/ml ja *L.gasseri* MCC2 sisalduse korral  $0,8 \times 10^7 - 1,2 \times 10^8$  pmü/ml.

Kui kompositsioon sisaldab mõlemat tüve *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2, siis on kummagi sisaldus kummalgi vahemikus 0,4-0,6 mahuprotsenti, kusjuures *L.plantarum* MCC1 iduarv on vahemikus  $0,2 \times 10^8 - 2,4 \times 10^8$  pmü/ml ja *L.gasseri* MCC2  $0,4 \times 10^7 - 0,6 \times 10^8$  pmü/ml.

Mõlema tüve esinemise korral on eelistatult mõlema sisaldus vähemalt 0,5 mahuprotsenti, kusjuures tüve *L.plantarum* MCC1 iduarv on vahemikus  $0,25 \times 10^8 - 2 \times 10^8$  pmü/ml ja *L.gasseri* MCC2  $0,5 \times 10^7 - 0,5 \times 10^8$  pmü/ml.

Eelnimetatud tüved võivad olla elusad või surmatud.

Leiutise järgmisteks objektideks on nimetatud tüvede eraldi või koos kasutamine

- antioksidantse proteolüütilise koostisosana  
 (ingrediendina) toidutoote ja/või toidulisandi  
 valmistamiseks,

- hüpoallergilise, piimaallergiat vähendava toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks,
- eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevaid alumiste kuseteede ärritussümptomeid ning nendega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku vähendava toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks.

Leiutise järgmiseks objektiks on meetod piimaallergiat ja kuseteede vaevusi ning nendega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku vähendava toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks.

Leiutisekohane meetod hõlmab järgmisi etappe:

- A) piimavalku sisaldavat lähteseogu soojendatakse  $37+2^{\circ}\text{C}$ ;
- B) lisatakse *L.plantarum* MCC1 ja/või *L.gasseri* MCC2 või mõlemad koos. *L.plantarum* MCC1 üksinda kasutamisel lisatakse seda kuni 1,2 mahuprotsenti, eelistatult 1 mahuprotsent iduarvuga  $0,4 \times 10^8 - 4,8 \times 10^8$  pmü/ml. *L.gasseri* MCC2 üksinda kasutamisel lisatakse seda kuni 1,2 mahuprotsenti, eelistatult 1 mahuprotsent iduarvuga  $0,8 \times 10^7 - 1,2 \times 10^8$  pmü/ml.
- Mõlema eelnimetatud mikroorganismi kooskasutamisel lisatakse neid kokku kuni 1,2 mahuprotsenti, eelistatult 1 mahuprotsent, kusjuures *L.plantarum* MCC1 lisatakse  $0,25 \times 10^8 - 2 \times 10^8$  pmü/ml ja *L.gasseri* MCC2  $0,5 \times 10^7 - 0,5 \times 10^8$  pmü/ml. Fermenteerimise lõpp pH on  $4,2 \pm 0,25$ .
- C) segu fermenteeritakse *L.plantarum* MCC1 või *L.gasseri* MCC2 toimel või *L.plantarum* MCC1 + *L.gasseri* MCC2 toimel temperatuuril  $37+2^{\circ}\text{C}$  vähemalt 18-26 tundi.
- D) segu pastöriseeritakse vahemikus  $80-85^{\circ}\text{C}$  (eelistatult  $82^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) 30-35 minutit (eelistatult 30 minutit) ning jahutatakse temperatuurile  $20-30^{\circ}\text{C}$ ;
- E) saadud segu maitsestatakse lisanditega ja jahutatakse temperatuurini  $2-6^{\circ}\text{C}$ .
- F) saadud segu kasutatakse toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks. Toidutoote korral saadud segu villitakse,

säilitatakse (2-6°C) ja tehakse vajalikud analüüsid (oksüresistentsuse määramine jt). Saadud segu saab kasutada pulbrilisel (kapslid, pastillid, tabletid, pulbrikotikesed jmt) või vedeliku kujul (ampullid) turustatava toidulisandi valmistamiseks.

Pulbrilise toidulisandi valmistamisel eemaldatakse saadud segust vesi, näiteks lüofiliseerimise (külmkuivatuse), pihustuskuivatuse, valtskuivatuse vm tuntud meetodi abil (kuni soovitud pulbrilise konsistentsi saamiseni). Vedela toidulisandi valmistamise korral eemaldatakse saadud produktist vesi osaliselt kuni soovitud konsistentsi saamiseni. Toidulisandi võib valmistada sobiva lisaainega (nt antioksidandid, magusained, prebiootikumid) või ilma selleta. Eelkirjeldatud meetodis on piimavalgu allikaks piim, piimapulber, piimavalgu kontsentraat, vadak vm piimavalgu allikas. Sobivaks lisandiks on puuvilja- või marjamahl, -kontsentraat, siirup või mahla jook, või puuvilja või marjamoos, eelistatult astelpaju, mustika või vaarika mahl, vm mahl, siirup, kontsentraat.

20

#### JOONISTE LOETELU

Joonis fig 1 - MALDI-TOF mass-spektromeetiline analüüs (illustratiivne tüüp-eksperiment). Beeta-kaseiin pärast 30-minutilist segamist tüvega *L.gasseri* MCC2;

25 Joonis fig 2 - MALDI-TOF mass-spektromeetiline analüüs (illustratiivne tüüp-eksperiment). Pärast 48-tunnilist inkubatsiooni tüvega *L.gasseri* MCC2 oli beeta-kaseiini 24,0 kDa massispektri piik oluliselt elimineerunud.

Joonis fig 3 - Tüvede *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 toime 48 ja 96-tunnilise inkubatsiooni puhul beeta-kaseiini tasemele (basaaltasemeks võeti 100%, MALDI-TOF mass-spektromeetrilise ja RP-HPLC analüüsi andmete põhjal).

30

Joonis fig 4 - NO produtseerimine tüvede *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 poolt.

Joonis fig 5 - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produtseerimine tüvede *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 poolt.

Joonis fig 6 - Toidutoote ja toidulisandi valmistamise skeem.

## 5 LEIUTISE TEOSTUSNÄITED

Näide 1. Meetod piima allergiavastuseid ning kuseteede ärritussümptomeid ning nendega seotud oksüdatiivse stressi ja põletikku vähendava, mikroorganisme *L.plantarum* MCC1 või *L.gasseri* MCC2 või nende kombinatsiooni sisaldava toidutoote ja eelnimetatud tervislike omadustega toidulisandi valmistamiseks.

Alljärgnevalt on esitatud eelistatud teostusnäide.

Piima allergiavastuseid ning kuseteede vaevusi vähendava toidutoote ja/või -lisandi valmistamiseks kasutati 24 t jooksul fermenteris ettekasvatatud ja seejärel lüofiliseeritud mikroobikultuure.

Toidutoote valmistamiseks aktiveeriti lüofiliseeritud mikroobikultuurid *L.plantarum* MCC1 ja/või *L.gasseri* MCC2 väheses soojas (vähemalt 20°C) vadakus, piimas või piimapulbrist/piimavalgu kontsentraadist vm piimavalgu allikast valmistatud lahuses vähemalt 4 tunni jooksul.

Meetod tervislike omadustega toidutoote ja toidulisandi valmistamiseks hõlmas järgmisi etappe (vt skeem joonisel 6):

- 25 a) Piimavalgu sisaldav lähtesegu, juustutööstusest saadud vadak (keemilis-füüsikalised omadused tabelis 8), millest separeerimise teel oli vähendatud rasvafaasi ning eemaldatud juustutolm, soojendati fermentatsioonitemperatuurini 37±2°C;
- 30 b) Lisati 1 mahuprotsent tüve *L. plantarum* MCC1 (iduarvuga 0,5 x10<sup>8</sup>-4x10<sup>8</sup> pmü/ml) või tüve *L.gasseri* MCC2 (iduarvuga 1x10<sup>7</sup>-1x10<sup>8</sup> pmü/ml) või mõlemat koos (kumbagi 0,5 mahuprotsenti, mis sisaldas tüve *L.plantarum* MCC1 elusrakke tihedusega vahemikus 0,25-2x10<sup>8</sup> pmü/ml ja tüve

*L.gasseri* MCC2 elusrakke tihedusega vahemikus  $0,5 \times 10^7$ - $0,5 \times 10^8$  pmü/ml.

Tabel 8. Vadaku keemilis-füüsikalised omadused

Koostisosa/parameeter	Sisaldus
Rasv (%)	< 0,1
Valk (%)	0,66±0,10
Laktoos (%)	4,07±0,59
Kuivaine (%)	5,37±0,27
Tihedus (g/cm <sup>3</sup> )	1,0199±0,0002
pH	6,14±0,41

- 5 c) Segu fermenteeriti 18...26 t temperatuuril 37±2 °C, mille jooksul toimus tüve(de) *L. plantarum* MCC1 ja/või *L.gasseri* MCC2 toimel piimavalgu osaline hüdroolüüs. Fermentatsioon kestis happesuse jõudmiseni väärtusele pH 4,20 ± 0,25;
- 10 d) Tüve(de) *L. plantarum* MCC1 ja/või *L.gasseri* MCC2 inaktiveerimiseks (surmamiseks) segu pastoriseeriti 82±2° C juures 30-35 min ning jahutati temperatuurile 20-30°C;
- e) Saadud segu maitsestati selekteeritud lisanditega, milleks oli puuvilja- või marjamahl, -kontsentraat, -siirup, 15 mahlajook või puuvilja või marjamoos. Näiteks kasutati 16...17 mahuprotsenti astelpaju moosi või 4,7...5 mahuprotsenti kirsi kontsentreeritud mahlajooki ja astelpaju mahla ning 9,8...10,2 mahuprotsenti vaarika- mustika kontsentreeritud mahlajooki.
- 20 f) Saadud segu jahutati 2-6°C, toidutoode villiti, tehti organoleptiline ja oksüresistentsuse analüüs ja säilitati (2-6°C) ning viidi läbi kliinilised uuringud (vt allpool).

25 Pulbrilise toidulisandi valmistamiseks eemaldati saadud segust vesi, kasutades selleks toiduainete tehnoloogias tuntud meetodeid (näiteks Lüofiliseerimise või kuivatamise (pihustus-, valtskuivatamise jne) teel). Eelistatult kasutati pulbrilise toidulisandi valmistamiseks üheastmelist

pihustuskuivatit (õhu sisenemise temperatuur 160°C ja väljuva õhu temperatuur 80°C).

Eelpool kirjeldatud viisil valmistatud segule lisati sobivat täiteainet, mille sulamispunkt on laktoosi sulamispunktist  
5 kõrgem, näiteks maltodekstriini (vahekorras 1:1 vadaku kuivainega).

Teise variandina kasutati vee, suhkru (laktoosi) ja soolade eraldamist ultrafiltratsiooniga, millele järgnes kontsentreerimine vaakumaparaadiga ja kuivatamine  
10 (pihustuskuivatamine), saades niiviisi väikse laktoosisisaldusega ja suure valgusisaldusega pulbrilise toidulisandi.

Kolmanda variandina kasutati vee eemaldamiseks kontsentreerimist vaakumaparaadiga, millele järgnes  
15 pihustuskuivatamine. Lõpptulemuseks oli laktoosi sisaldav pulbriline toidulisand.

Tabel 9. Toidutoote (vadakujoogi), mis sisaldas tüvesid MCC1+MCC2, ning mis oli maitsestatud astelpajumoosiga, ja  
20 toidulisandi, mis sisaldas tüvesid MCC1+MCC2, ning mis oli maitsestatud astelpajumoosiga, keemilis-füüsikalised omadused

Koostisosa/parameeter	Sisaldus	
	Vadaku jook	Toidulisand
Toiduaine arvutuslik energeetiline väärtus	66	390
kcal/100g	219	1654
kJ/100gr		
Rasv (%)	0,41	3,46
Valk (%)	0.90	5,96
Tuhk (%)	0,46	3,4 1
Kuivaine (%)	16,36	96,58
Arvutuslik süsivesikute sisaldus (%)	14,6	83,8
Glükoos (%)	<0,5(0,1)	1,1
Fruktoos	<0,5(0,02)	<0,5(0,2)
Sahharoos	<0.3(0)	<0,3(0,1)

Ülaltoodud viisil valmistati toidutooted TT-I - TT-V, mis sisaldasid leiutise objektideks olevaid mikroorganisme ja lisandeid alljärgnevalt:

5 Toidutoode I (ehk TT-I): Piimavalku sisaldav segu + *L.plantarum* MCC1 + *L.gasseri* MCC2; lisand astelpaju mahl (AP);

Toidutoode II (ehk TT-II): Piimavalku sisaldav segu +  
10 *L.plantarum* MCC1; lisand vaarika-mustika kontsentreeritud mahla jook (VM).

Toidutoode III (ehk TT-III): Piimavalku sisaldav segu +  
15 *L.plantarum* MCC1 + *L.gasseri* MCC2; lisand mustasõstra-vaarika kontsentreeritud mahla jook (MV).

Toidutoode IV (ehk TT-IV): Piimavalku sisaldav segu +  
*L.plantarum* MCC1; lisand mustika kontsentraat (M)

20 Toidutoode V (ehk TT-V): Piimavalku sisaldav segu + *L.plantarum* MCC1; lisand pohla kontsentreeritud mahla jook (P)

Toidulisand I (ehk TL/FP-I): Piimavalku sisaldav segu +  
25 *L.plantarum* MCC1 + *L.gasseri* MCC2; lisand astelpaju mahl (AP);

Toidulisand II (ehk TL/FP-II): Piimavalku sisaldav segu +  
*L.plantarum* MCC1; lisand vaarika-mustika kontsentreeritud mahla jook (VM).

30 Toidulisand III (ehk TL/FP-III): Piimavalku sisaldav segu + *L.gasseri* MCC2; lisand.

35 Tabel 10.

Toidutoote organoleptilise tüüptesti näide.

Degustaatorid (n = 15). Paluti hinnata järgmisi parameetreid: konsistents, värvus, lõhn, maitse ja happesus alljärgneva skoori alusel: 1 - vastik, 2 - mitte eriti vastuvõetav, 3 - vastuvõetav, 4 - hea, 5 - suurepärane/ahvatlev

	TT-V	TT-IV	TT-III	TT-I
Konsistents	2,3±1,2	3,6±1,0	3,3±1,3	4±1,1
Värv	2,6±0,9	3,8±0,8	3±1	4,1±1,2
Maitse	2,8±0,9	3,2±1,0	3,8±0,8	3,5±1,0
Lõhn	2,6±0,9	2,8±1,0	3,4±0,8	3,4±1,2
Happesus	2,8±0,9	3,1±0,8	3,7±0,6	3,2±1,2
Kokku	2,6±1,0	3,3±0,9	3,4±0,9	3,7±1,2

Näide 2. Lisandid piima allergiavastuseid ning kuseteede ärritussümptomeid ning nendega seotud oksüdatiivse stressi ja põletikku vähendava, mikroorganisme *L.plantarum* MCC1 või *L.gasseri* MCC2 või nende kombinatsiooni sisaldava toidutoote ja toidulisandi valmistamiseks.

Toodete lisanditeks kasutati astelpaju mahla (AP) (valmistatud astelpaju marjadest, säilitusaineteta, külmpressitud ja pastoreeritud), vaarika-mustika kontsentreeritud mahla jooki (koostis: kontsentreeritud vaarika-mustika mahl (VM), suhkur, happesuse regulaator sidrunhape, säilitusaine kaaliumsorbaat, lahjendati 10 korda), pohla kontsentreeritud mahla jooki (P) ja mustika kontsentraati (M) (vt tabel 10). Lisanditel määrati antioksidantsus (TAA ja DPPH testid) ning bioelementide sisaldused aatomabsorptsioonspektrofotomeetrilisel (AAS) meetodil Spektra AAFS ja 220Z. (Varian, Austraalia), Cu, Zn, Fe, Mn sisaldused määrati AAS-leekmeetodil, K sisaldused emmisioonmeetodil-õhk-atsetüleen segus. Lõpptoote organoleptilised testid viidi läbi vastavalt kehtivatele nõuetele spetsiaalsete küsitluslehtedega. Tulemused on toodud Tabelis 10.



Näide 3. Kliiniline uuring nr. 1.

Toodete ohutus ja kasulikud toimed, biokeemilised-kliinilised ja organoleptilised testid

Mitmekülgse bioseleksiooniga saadud multibiopotentsete  
5 tüvede ja lisandite kasutamise ning sobiva tehnoloogise  
skeemi rakendamisega (vt näide 1) saadi toidutooted TT-I  
(MCC1+ *L.gasseri* MCC2, AP) ja TT-II (MCC1, VM). Järgnevalt  
teostati kliinilisi uuringuid (kooskõlas Tartu Ülikooli  
Inimuuringute Eetikakomitee poolt heakskiidetud Maaailma  
10 Arstide Liidu Helsinki Deklaratsiooniga (*Declaration of  
Helsinki of the World Medical Association, approved by the  
Ethics Committee, UT*)) selgitamaks toidutoodete TT-I ja TT-II  
ohutust ja tervislikke toimeid.

Kliinise katsetuse üldskeem oli järgmine: 25 vabatahtlikku  
15 (11 naist, 14 meest) vanuses 40-65 eluaastat jagati  
juhuslikult kahte gruppi järgmiste uuringusse kaasamise  
kriteeriumide alusel: isikud ilma kliiniliste probleemideta,  
krooniliste haigusteta, spetsidieetideta, vitamiinide,  
mineraalainete preparaatide tarbimiseta, osalejad ei pea  
20 muutma oma füüsilist aktiivsust, alkoholi tavatarbimist,  
suitsetamisharjumusi ega söömisharjumusi. Enne ja pärast  
kahenädalast igapäevast 200g toidutoote TT-I (n=10) või TT-II  
(n=15) tarbimist määrati järgmised biokeemilis-kliinilised  
parameetrid: põletikumarkerid (hsCRP, MPO, IL-6, IL-10),  
25 lipiidide ja lipoproteiinide markerid (TG, kolesterool, LDL-  
kolesterool, HDL-kolesterool, sdLDL), immuunglobuliinid (IgM,  
IgA, IgG, IgE), oksüdatiivse stressi (OxS) markerid  
(isoprostaanid, oxLDL, LDL-b2GPI), vere glükoos, vererõhk ja  
uriini kreatiniin.

30 Tulemused

1) Ohutus

Igapäevase küsitlusankeedi teadusanalüüs näitas, et  
kahenädalasel tarbimisel ükski katsealune ei kaevanud  
ebamugavustunnet ega seedekulgla probleeme ega esinenud

mingeid negatiivseid nähte. TT-I või TT-II tarbimine ei omanud toimeid, mis oleksid viinud nende biokeemilisi ja kliinilisi näitajaid väljapoole endeemiliste referentsväärtuste piire. Nad ei tõstnud IgE antikehade kui ühe olulise allergiamarkeri hulka võrreldes katse-eelse perioodiga, ei tekitanud põletikureaktsiooni (hsCRP oxLDL, MPO, IL-6) ega muutnud ka vere lipiidide, lipoproteiinide (TG, LDL, HDL) ja glükoosi väärtusi ega suurendanud OxS taset organismis (isoprostaanid, oxLDL, MPO, sdLDL, LDL b2GPI) (Tabel 10) ja ei kahjustanud neeru-funktsioone (uriini kreatiniin). Seega: leiutise ideoloogia põhjal saadud TT-I ja TT-II ei kutsu tervetel isikutel esile ei põletikureaktsioone, üldist allergilist sensibilisatsiooni, OxS ega kahjusta seega organismi.

15

## 2) Tervist soodustavad toimed

Esimese kliinilise uuringu tulemuste analüüs näitas, et TT-I või TT-II tarbimine indutseeris mõningaid statistiliselt tõeseid ja mõnevõrra erinevaid positiivseid toimeid (Tabel 10). TT-I avaldas kogu organismi süsteemse OxS koormust vähendavat toimet (uriini isoprostaanide ja vere MPO taseme langus) ja põletikuvastast toimet (vere MPO langus). TT-II vähendas kogu organismi süsteemse OxS koormust (uriini isoprostaanide taseme langus), ja avaldas süsteemset põletikuvastasttoimet (hc-CRP langus ja IL-10 tõus). Samas ei muutnud mõlema toidutoote tarbimine immuunglobuliinide IgM, IgA ja IgM arvulisi väärtusi.

Seega: esimene kliiniline uuring näitas, et leiutise ideoloogia (tüvede multivariantne suunitletud bioselektsioon, lisandite bioselektsioon ja tehnoloogiline lahendus) andsid toidutooted, mis on ohutud ning omades mitmeid põletik- ja oksüdatiivne stress-seotud toimeid on hüpallergilisemad (annavad vähem allergiavastuseid võrreldes lehmapiimaga) ning omavad positiivset efekti biokeemilistele ja kliinilistele

parameetritele ka eesnärmevaevustega (sh kusemishäiretega) isikute puhul.

Tabel 11. Biokeemilised ja kliinilised parameetrid (kliiniline uuring nr. 1; M± SD)

	GRUPP I (TT-II)*		GRUPP II (TT-I)**	
	Enne	Pärast	Enne	Pärast
Vererõhk, mmHg	123/74±7/5	125/70±9/5	118/71±12/5	
Üldkolesterool mmol/L	5.8±1.3	5.9± 1.4	6.3±1.1	6.6±0.9
HDL- kolesterool mmol/L	1.6±0.4	1.6±0.5	1.7±0.5	1.7± 0.5
LDL- kolesterool	4.0±1.1	4.1±1.2	4.6± 1.1	4.9±1.1
triglütseriidid mmol/L	1.4±1.3	1.4± 1.3	1.4± 0.5	1.5±0.7
Glükoos mmol/L	5.2±0.4	5.2±0.7	5.2± 0.5	5.3±0.5
hs-CRP mg/L	0.72±0.45	0.90±0.59	3.1±1.8***	1.9±1.5*** p = 0.049
IgM g/L	1.26±0.48	1.29±0.49	1.09±0.37	1.10±0.35
IgA g/L	2.42±0.85	2.38±0.87	3.06±1.46	3.08±1.48
IgE g/L	52±56	53±59	88±95	77±81
MPO pmol/L	67±22	51± 13 p=0.018	53±14	61±16
IL-6 pg/ml	2.6±1.2	2.6±0.9	3.9±2.1	2.9±0.9
IL-10 pg/ml	6.8±2.9	6.1±2.6	6.4± 2.5***	7.8±2.9*** p= 0.04
oxLDL U/L	77±33	75±33	74±24***	69± 21*** p = 0.039
LDL□2GPI	1.4±1.6	1.1±1.2	1.2±1.2***	1.0± 0.7***
sdLDL	38.6±15.7	37.1±16.3	39.6±16.1	38.8±16.0
8-isoprostaanid ng/ml	36.7±6.9	31.3±12.5 p =0.034	49.6± 8.9***	37.7± 6.7*** p=0.021

\*n = 10, \*\* n= 9, \*\*\*n = 15; vererõhk langes II grupis neljal inimesel

Näide 4. Kliiniline uuring nr 2. Lehmapiimavalgu allergia uuringud lastel

Lehmapiimavalgust tingitud reaktsioone esineb 5-15% imikutest (Host A. (2002). Frequency of cow's milk allergy in childhood. Ann Allergy Immunol 89(Suppl 1):33-7), kuid lehmapiimavalguallergiat (LPVA) esineb 2-7,5% (Hill DJ, Firer MA, Shelton MJ et al. (1986) Manifestation of milk allergy in

infancy: clinical and immunologic findings. *J Pediatr* 109: 270-6). LPVA võib olla IgE või mitteIgE vahendatud. Varasteks reaktsioonideks on reeglina urtikaaria, angioödeem, oksendamine või atoopilise dermatiidi ägenemine.

5 Hilisreaktsioonina esinevad atoopilise dermatiidi ägenemine või gastrointestinaalsed vaevused (Vandenplas Y, Brueton M, Dupont C, Hill D, Isolauri E, Koletzko S, Oranje AP, Staiano A. (2007) Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child*.

10 92:902-908). Ükski eksisteerivatest diagnostilistest testidest ei tõesta ega lükka ümber, kas lapsel on LPVA või ei (Vanto T, Juntunen-Backman K, Kalimo K et al. (1999) The patch test, skin prick test, and serum milk-specific IgE as diagnostic tools in cows' milk allergy in infants. *Allergy*

15 54:837-42). Seetõttu on LPVA diagnostiliseks kuldstandardiks eliminatsioonidieet sellele järgneva provokatsiooniga (Vandenplas Y, Brueton M, Dupont C, Hill D, Isolauri E, Koletzko S, Oranje AP, Staiano A. (2007) Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in

20 infants. *Arch Dis Child*. 92:902-908). Provokatsioonitesti protokollina kasutati Isolauri et al poolt kirjeldatud ja rahvusvaheliselt tunnustatud skeemi taoliste uuringute jaoks (Isolauri E, Turjanmaa K. (1996) Combined skin prick and patch testing enhances identification of food allergy in

25 infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*;97:9-15; Sütas Y, Kekki O-M, Isolauri E. (2000) Late onset reactions to oral food challenge are linked to low serum interleukin-10 concentrations in patients with atopic dermatitis and food allergy. *Clin Exp Allergy* 30:1121-8).

30 Metoodika

Avatud provokatsioon toidutoodetega TT-II ja TT-I-ga viidi läbi SA Tartu Ülikooli Kliinikumi (TÜK) Lastekliiniku Allergiahaiguste keskus (kooskõlas Tartu Ülikooli Inimuuringu Eetikakomitee poolt heakskiidetud Maailma

Arstide Liidu Helsinki Deklaratsiooniga (Declaration of Helsinki of the World Medical Association, approved by the Ethics Committee, UT)). Testimine viidi läbi 20 korda (osa katsealuseid osales mõlema toidutoode uuringus) lastega vanuses 9 kuud - 4 aastat 8 kuud (keskmine vanus 25,1 kuud). Uuringueelne taust oli järgmine: kõigil lastel oli diagnoositud lehmapiimaallergia ja/või talumatus TÜK Lastekliiniku Allergiahaiguste keskuse arsti poolt (IgE test piimale, NTT piimale), toetudes anamneesile ja 10 abiuuringutele. Kõik uuringugrupi lapsed olid piimavabal eliminatsioonidieedil. Piima tarbimise järgselt tekkis 9-l lapsel nahalööve, enamasti atoopilise dermatiidi ägenemine, ühel lapsel äge nõgeslööve, ühel lapsel kõhulahtisus. Ühel lapsel tekkis hingamisraskus ja nahalööve ainult töödeldud 15 piimaproduktide söömise järgselt. 3-l lapsel oli kaasuvana diagnoositud astma, neist ühel ka allergiline riniit ja ühel õietolmuallergia (pollinoos). Ühel lapsel esines kaasuvate haigustena astma ja õietolmuallergia. Lastest keegi ei saanud antihistamiinset ega kortikosteroidravi. Kolmel lapsel oli 20 kaasuva haigusena astma remissioonis, mistõttu nad ei saanud astma püsiravi provokatsioonitesti tegemise ajal.

Avatud suukaudne provokatsioon viidi läbi esimesel uuringupäeval TÜK Lastekliiniku Allergiahaiguste keskuses. Lapsele anti suurenevas koguses (tilk alahuulele, 2ml, 10 ml, 25 50 ml, 100 ml) uuritavat toodet (TT-II või TT-I). Iga koguse järgselt hinnati lapse seisundit ja allergilise reaktsiooni teket 20 minuti jooksul. Lööbe, köha, hingamisraskuse või kõhuvalu/kõhulahtisuse tekkimisel katkestati toote edasine manustamine koheselt. Kui lapsel esimesel uuringupäeval kuni 30 100 ml toote järgselt reaktsiooni ei tekkinud, sai laps teisel, kolmandal ja neljandal päeval uuritavat toodet 100 ml/päevas kodus. Lapsevanematel paluti hinnata hilisreaktsioonide teket. Test loeti positiivseks, kui tekkis: a) varajane reaktsioon - esimesel

provokatsioonipäeval väikese koguse toote andmise järgselt tekkis sügelus, lööve, nõgeslööve või oksendamine; b) hilisreaktsioon - dermatiidi ägenemine, oksendamine, kõhuvalu, kõhulahtisus tekkis >24 tundi hiljem uuritava toote provokatsiooni alustamist. Avatud provokatsioonitest oli negatiivne, kui provokatsiooni ajal (neljal päeval) ega ka selle järgsel nädalal reaktsiooni ei tekkinud. Seega uuritav talus seda uuritavat toodet.

Tulemuste kokkuvõte

- 10 Toidu allergilisuse probleemi lahendamine on äärmiselt komplitseeritud ja absoluutselt allergiliste reaktsioonide vaba aga kõrge biokvaliteediga toodete loomine pole võimalik. Probleemi teeb veelgi keerulisemaks see, et nüüdisajal võib lapsel esineda allergiline reaktsioon mitmete toidutoodete
- 15 (aga ka muude olmefaktorite suhtes) korraga. Viimane asjaolu ilmnes ka meie uuringutes (vt Tabel 5), mistõttu on raske välistada, et antud hetkel ei avaldunud positiivne vastuslööve hoopis muude põhjuste poolt initseerituna. Seetõttu oli leiutise fookus suunatud sellele, et tulemuseks
- 20 oleks vähem allergilisi vastuseid, st saadud toidutooted oleksid hüpoallergilisemad kui lehmapiim. Suurendaks ju iga protsent antud toidutoodetele allergiavabu või vähem allergilisi lapsi nende laste hulka, kes saaksid oma bioloogilise arengu tähtsamal perioodil täisväärtuslikuks
- 25 arenguks piisavalt bioloogiliselt kõrgväärtuslikku toitu. Provokatsioonitest näitas, et nii toidutoode TT-II kui ka TT-I olid hüpoallergilisemad kui lehmapiim (Tabel 5). Vähemalt 3...4 lapsel 12-st ei tekkinud TT-I tarbimisel provokatsioonitesti alusel mingit allergilist reaktsiooni.
- 30 Kolmel testitaval kaheksast ei tekkinud TT-II tarbimisel mingit allergilist reaktsiooni. Viiest testitavast, kellel toidutoode TT-I tingis siiski teatud reaktsiooni, talusid kolm aga TT-II (60%). TT-II on seega juhtude mõttes veelgi

hüpoallergilisem kui TT-I. TT-II eelistasid enamik lapsi ka maitsete omaduste tõttu.

Tabel 12. Lehmapiima allergilise vastuse uurimine  
5 (hüpoallergilisuse uuring)

P/T	Diagnoos Kliiniline avaldus	NTT piimale	NTT TT-I-le	Provokatsiooni test TT- I-le	Teised NTT	Va- nus
T1	LPA, AD nahalööve	neg	neg	neg	munakollane munavalge	23k
P2	LPA, BA, AR (30k) nahalööve, hingamisraskus	pos	neg	neg	-	36k
P3	LPA, AD, BA (24k), pollinoos, nahalööve	pos	pos	pos, (alates 50ml) lööve põskedel	muna, pähklid, kass, õietolm, kodutolmulest, jt	46k
P4	LPA, AD nahalööve	pos	pos	pos (alates 10 ml, lööve)	munakollane munavalge	16k
P5	LPT, AD, BA (27k) kõhulahtisus	neg	neg	pos (teisel päeval; lööve)	munavalge	28k
T6	LPA, AD nahalööve	neg	neg	pos (kolmandal päeval, lööve)	munakollane munavalge	9k
T7	AD nahalööve	neg	neg	pos (teisel päeval, lööve, kõhuvalu)	Neg	18k
P8	LPA, AD nahalööve	pos	neg	neg	Neg	40k
P9	LPA, AD nahalööve	pos	pos	pos (alates 10ml, lööve)	munakollane, munavalge	14k
P10	LPA, AD nahalööve	pos	neg	neg (esimesel päeval), teisel ei tahtnud juua	Neg	31k
P11	Urtikaaria nõgeslööve	pos	neg	neg/pos (2..4p kõhulahtisus)	munakollane, munavalge	14k
P12	LPA, AD nahasügelus	pos	pos	pos ( teisel päeval nahasügelus)	munakollane munavalge	33k
P/T	Diagnoos Kliiniline avaldus	NTT piimale	NTT TT-II-le	Provokatsiooni test TT- II-le	Teised NTT	Va- nus
P9	LPA, AD nahalööve	neg	pos	neg	munakollane, munavalge	23k
P3	LPA, AD, BA (24k), pollinoos, nahalööve	pos	pos	pos, (teisel päeval sügelus, 3 ja 4 ülrierutus)	muna, pähklid, kass, õietolm, kodutolmulest, jt	56k
P11	Urtikaaria nõgeslööve	pos	neg	neg (esimesel päeval kõhulahtisus peale 100ml, 2..4 p probleemideta)	munakollane, munavalge	16k
P12	LPA, AD nahasügelus	pos	pos	pos (esimesel päeval sügelev lööve)	munakollane munavalge	34k
T7	AD nahalööve	neg	neg	neg	neg	27k
P13	LPA, AD nahalööve	pos	pos	neg	munakollane munavalge	12k
P14	LPA, AD nahalööve	pos	neg	pos (teisel päeval lööve)	munakollane, munavalge	18k
P15	AD nahalööve	pos	neg	neg	munakollane, munavalge	17k

LPA - lehmapiimaallergia, AD - atoopiline dermatiit, BA – bronhiaalastma

Näide 5. Kliiniline uuring nr 3. Toidutoodete TT-I ja TT-II mõju eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevate alumiste kuseteede ärritussümptomitele ning oksüdatiivse stressile ja põletiku näitajatele.

- 5 Eespoolsed kliinilised uuringud näitasid, et leiutise ideoloogia (tüvede multivariantne suunitletud bioseleksioon, lisandite bioseleksioon ja tehnoloogiline lahendus andsid toidutooted TT-I ja TT-II, mis on kasutamisel ohutud ning omades mitmeid põletik- ja oksüdatiivne stress-seotud
- 10 toimeid, on hüpollergilisemad ning omavad positiivset efekti kuseteede ärritussümptomitele ning OxS ja põletiku näitajatele.

#### Metoodika

- Osales 55 meest (manustasid TT-I) ja 5 meest (manustasid TT-
- 15 II), kellel esines kerge või mõõdukas IPSS (*International Prostate Symptom Score*, rahvusvaheline eesnäärme sümptomite skoor) < 8. IPPS küsimustik hõlmab 3 küsimust, mis hindavad alumiste kuseteede ärritussümptomeid ja 4 küsimust, mis hindavad kusemistakistust (obstruktiivseid sümptomeid)).
- 20 Tehti ka vajalikud eeluuringud (PSA eesnäärme sekreet) uuringugrupi täpseks seleksiooniks. See tähendab, et eesnäärme sekreedi uuringute ja NIH-CPSI küsimustikuga oli välistatud aktiivne prostatiit (eesnäärme põletik) ning PSA testi ja digitaalse palpatsiooni abil kliiniliselt
- 25 eesnäärmevähi võimalus. Uuringugruppi kaasasime seega väheste või keskmise raskusastme kusemishäiretega mehed, kellel olid välistatud teised kaebuste põhjused (prostatiit, eesnäärmevähk). Patsiendid (kerge ja keskmise kusemishäirega, ilma põletikureaktsioonita) tarbisid toidutoodet TT-I või TT-
- 30 II kahe nädala jooksul 200 g päevas.

#### Tulemused

TT-I. Viidi läbi kaks katseseeriat. Esimeses oli 23 patsienti ja teises (mille puhul tehti ka platseebo kontroll) oli 32



patsienti (Tabel 13). Mõlemal korral ilmnes põletikumarkeri hsCRP ja OxS markeri isoprostaanide statistiliselt tõene langus. Teine katseseeria tõi välja ka anti-inflammatoorse IL-10 ning põletiku/OxS marker oxLDL statistiliselt  
5 positiivsed muutused. Esimeses katseseerias (n=23) ilmnes samuti nende markerite positiivse muutuse trend. Teises katseseerias määrati ka glükosüülitud hemoglobiini tase, mille langus oli statistiline.

10 Kui summeerida mõlema katseseeria tulemused (Tabel 13), siis alanenesid statistiliselt hsCRP, isoprostaanid ja oxLDL, positiivne languse trend oli ka IgE puhul ning statistiliselt tõusis IL-10. Esines korrelatsioon hsCRP ja oxLDL vahel pärast TT-I tarbimist. Kontrollrühmas (platseebo) ei ilmnenud  
15 statistiliselt tõenäolisi muutusi ühegi nimetatud parameetri puhul.

TT-II. Viidi läbi üks katseseeria ja määrati järgmised näitajad: IgE kU/L, oxLDL, IL-10, 8-isoprostaanid, hsCRP ja  
20 MPO. Leiti, et TT-II kasutajate grupil toimus põletiku- ja OxS markeri MPO taseme statistiliselt oluline vähenemine (enne  $77 \pm 13$  ja pärast  $53 \pm 9$  ng/ml,  $p=0,0056$  ja kusemishäirete sageduse vähenemine üle 40%-l tarbijatel.

25 Tulemuste kokkuvõte

Nii TT-I kui ka TT-II manustamine langetasid OxS ja põletiku taset katsealustel, kel esinesid mõõdukad alumiste kuseteede vaevused (IPSS<8 palli) ja olid juhtival kohal ärritussümptomid. TT-I puhul 66%-l uurimisrühma meestest  
30 (55), kel esinesid mõõdukad alumiste kuseteede vaevused (IPSS<8 palli) ja olid juhtival kohal ärritussümptomid, toimus vaevuste vähenemine keskmiselt 20% ulatuses ning 30%-l uurimisrühmast toimus vaevuste vähenemine keskmiselt 40% ulatuses. Patsientide kliinilised ja biokeemilised näitajad

(hs-CRP, IL-10, oxLDL, 8-isoprostaanid) paranesid statistiliselt tõenäoliselt. Kontrollgrupil muutusi ei esinenud.

5 Tabel 13. TT-I uuringute katseseeriad (M±SD)

	Esimene katseseeria (n=23)		Teine katseseeria (n=32)		Kõik kokku (n=55)	
	Enne	Pärast	Enne	Pärast	Enne	Pärast
hsCRP mg/L	2,09±1,06	1,04±0,90 p=0,016	1,92±1,24	1,57±1,10 p=0,060	1,99±1,17	1,50±0,96 p=0,002
B-Hb A1c, % kogu Hb 4,5...5,7	ei määratud		5,87±0,35	5,79±0,36 p=0,0013		
IgE, kU/L	98,3±67,5	86,6±56,1	129,8±133,4	130,6±129,3	116,2±107,0	112,5±99,8
oxLDL, U/L	64±12	63±13	72±16	70±16 p=0,047	68 ± 15	65 ± 15 p=0,045
IL-10	5,0±1,7	5,6±2,5	8,6±2,2	10,0±2,8 p=0,014	7,1 ±2,6	8,2±3,3 p=0,012
8-iso-prostaamid ng/mmol kreatiniinile	50,8±10,6	43,3±0,9 p=0,03	47,8±15,9	37,2±10,1 p= 0,0007	48,2±14,2	39,8±10,2 p=0,005

10 Näide 6. Toidulisandi (TL/FP-I) mõju eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevate alumiste kuseteede ärritus-sümptomitele ning oksüdatiivse stressile ja põletiku näitajatele.

15 Uuringusse kaasati 10 meest, kellel esines kerge või mõõdukas kusemishäire - IPSS (rahvusvaheliste eesnäärme-vaevuste skoor), kusjuures eelnevate eesnärmesekreedi uuringute põhjal: NIH-CPSI küsimustik, oli välistatud aktiivne eesnäärme põletik ning PSA testi ja digitaalse palpatsiooni abil kliiniliselt olulise eesnäärmevähi võimalus.

20 Toidulisandit tarbiti 45 g päevas 14 päeva jooksul. Kõigil 10-l väheste (IPSS 2-7 palli) ja keskmise (IPSS 8-19 palli) kusemishäirega patsiendil, vastavalt 3/7, paranesid kusemishäired pärast toidulisandi tarvitamist (p=0,003)

vastavalt "Rahvusvahelise prostata sümptomite küsimustikule" 50-66% ulatuses, kusjuures eriti märgatav positiivne muutus toimus vajaduse vähenemisel öösel urineerida (keskmiselt 87,5%).

5

Koondkokkuvõtte kõigist kliinilistest uuringutest

*L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 sisaldavad toidutooted, toidulisandid on hüpoallergilised, Oxs taset langetavad ja omavad statistiliselt tõest mõju eesnäärmevaevustele neil,

10

kel esinevad mõõdukad alumiste kuseteede vaevused ja kellel on juhtival kohal ärritussümptomid.

15

## PATENDINÕUDLUS

- 5 1. Mikroorganismide valimise meetod, milles valitakse antioksidantsed mikroorganismid, mis on võimelised piimavalku osaliselt hüdrolüüsima, tootma konjugeeritud linoolhapet, NO ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
2. Isoleeritud mikroorganismi tüvi *L.plantarum* MCC1 DSM 23881, mis on valitud punkti 1 meetodi kohaselt.
- 10 3. Isoleeritud mikroorganismi tüvi *L.gasseri* MCC2 DSM 23882, mis on valitud punkti 1 meetodi kohaselt.
4. Punktidele 2 või 3 vastav mikroorganism surmatud kujul.
5. Kompositsioon, mis sisaldab üht või mitut punktidele 2 - 4 vastavat mikroorganismi.
- 15 6. Kompositsioon vastavalt punktidele 5, kus ühe mikroorganismi esinemise korral on mikroorganismi sisaldus vahemikus 0,8-1,2 mahuprotsenti, kusjuures iduarv *L.plantarum* MCC1 korral on 0,25x10<sup>8</sup>-4x10<sup>8</sup> pmü/ml ja *L. gasseri* MCC2 korral on 0,5x10<sup>7</sup>-1x10<sup>8</sup> pmü/ml, ning mõlema mikroorganismi esinemise korral on kummagi 20 sisaldus vahemikus 0,4-0,6 mahuprotsenti, kusjuures *L. plantarum* MCC1 iduarv on vahemikus 0,2x10<sup>8</sup>-2,4x10<sup>8</sup> pmü/ml ja *L. gasseri* MCC2 iduarv on vahemikus 0,4x10<sup>7</sup>-0,6x10<sup>8</sup> pmü/ml.
- 25 7. Punktidele 2 ja/või 3 vastava mikroorganismi kasutamine koos või eraldi antioksidantse proteolüütilise koostisosana, ingrediendina toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks.
8. Punktidele 2-4 vastava mikroorganismi kasutamine koos või eraldi hüpoallergilise, piimaallergiat vähendava 30 toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks.
9. Punktidele 2-4 vastava mikroorganismi kasutamine koos või eraldi eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevaid alumiste kuseteede ärritussümptomeid ning

nendega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku vähendava toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks.

10. Meetod piimaallergiat ja kuseteede vaevusi ning sellega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku vähendava toidutoote ja toidulisandi valmistamiseks, mis hõlmab järgmisi etappe:

A) piimavalgu sisaldav lähtesegu soojendatakse ( $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ );

B) lisatakse 1 mahuprotsent punktile 2 vastavat mikroorganismi iduarvuga  $0,4\times 10^8$ - $4,8\times 10^8$  pmü/ml ja/või punktile 3 vastavat mikroorganismi iduarvuga  $0,8\times 10^7$ - $1,2\times 10^8$  pmü/ml või punktile 2 ja punktile 3 vastavat mikroorganismi koos iduarvudega vastavalt  $0,25\times 10^8$ - $2\times 10^8$  pmü/ml ja  $0,5\times 10^7$ - $0,5\times 10^8$  pmü/ml;

C) saadud segu fermenteeritakse temperatuuril  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  18...26 tundi;

D) segu pastöriseeritakse temperatuuril  $82\pm 2^{\circ}\text{C}$  30-35 minutit ja jahutatakse temperatuurile  $20$ - $30^{\circ}\text{C}$ ;

E) segu maitsestatakse lisandiga, saadud toidutoode jahutatakse  $2$ - $6^{\circ}\text{C}$ ;

F) pulbrilise toidulisandi valmistamise korral eemaldatakse segust vesi kuni pulbrilise konsistentsi saamiseni ning vedela toidulisandi valmistamise korral eemaldatakse segust vesi osaliselt kuni soovitud konsistentsi saamiseni.

11. Meetod vastavalt punktile 10, kus lisandiks on puuvilja- või marjamahl, kontsentraat, siirup või mahlajook või puuvilja või marjamoos, eelistatult astelpaju, mustika või vaarika mahl.

12. Meetod vastavalt punktile 10, kus piimavalgu allikaks on vadak, kontsentreeritud vadak, vadakupulber, piim, piimapulber või piimavalgu kontsentraat.

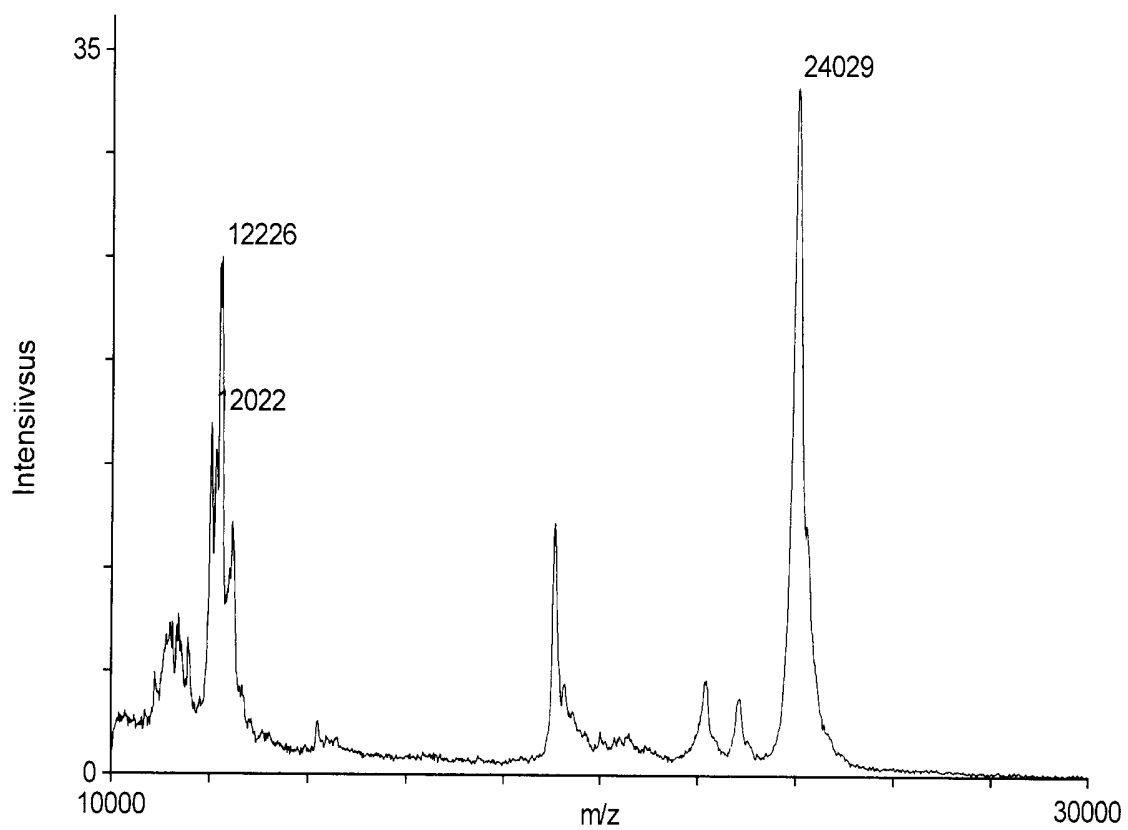


FIG.1

2/6

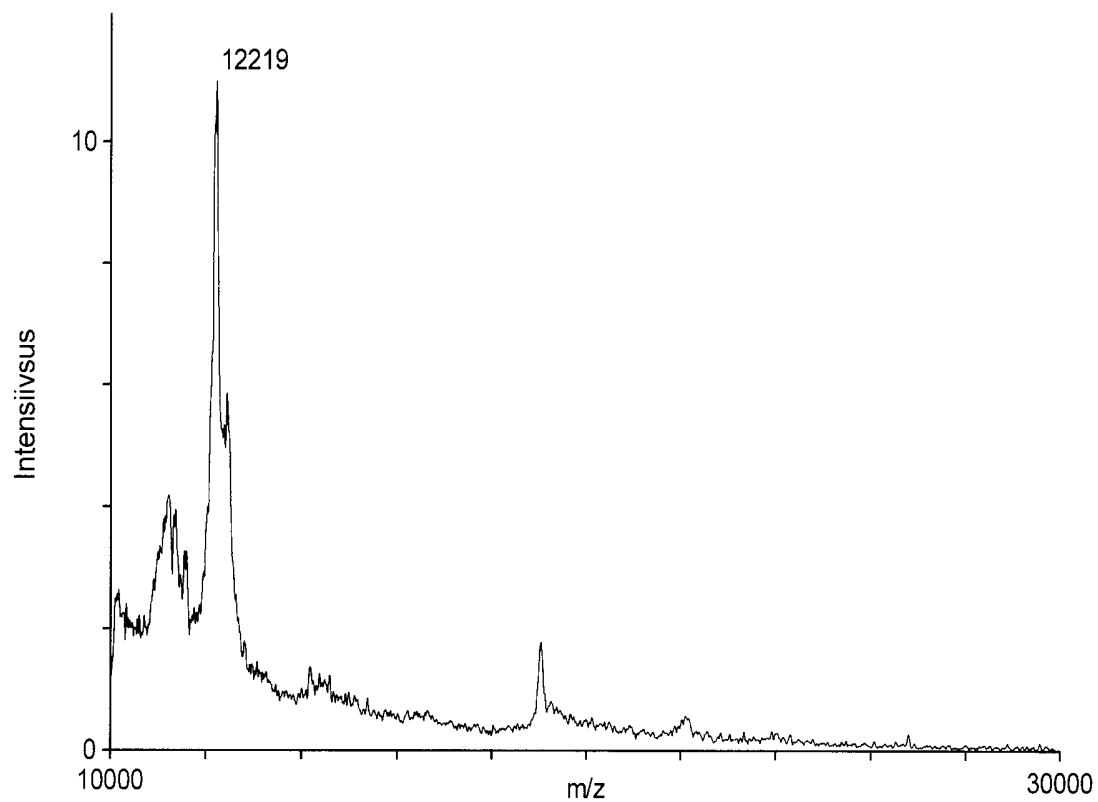


FIG. 2

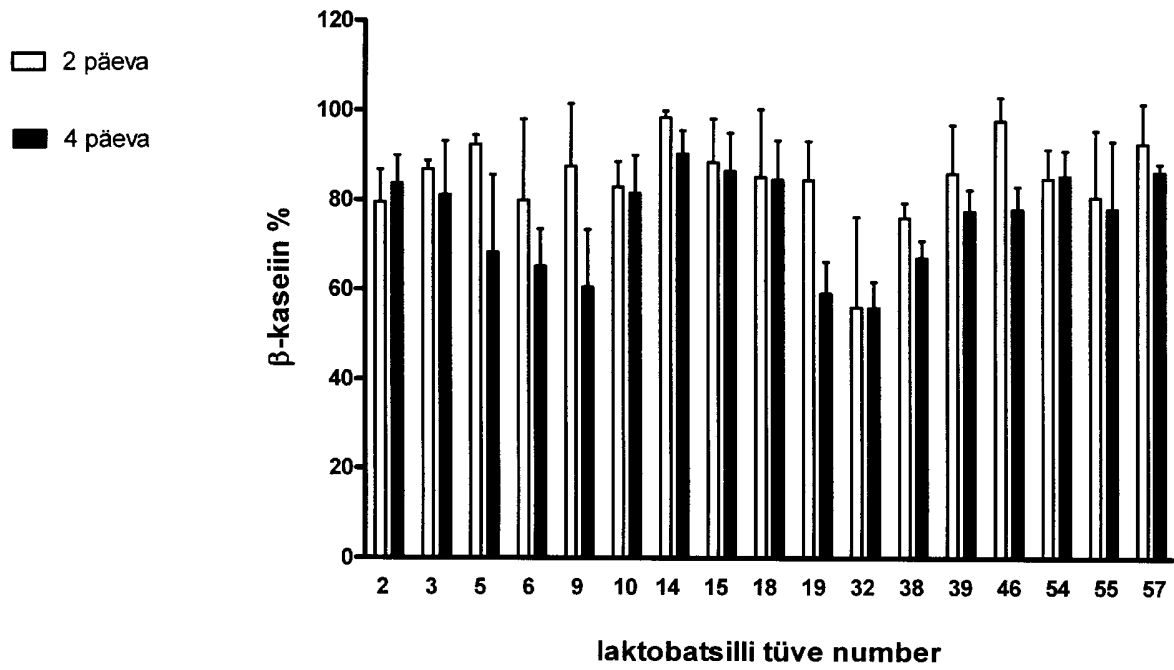


FIG 3



4/6

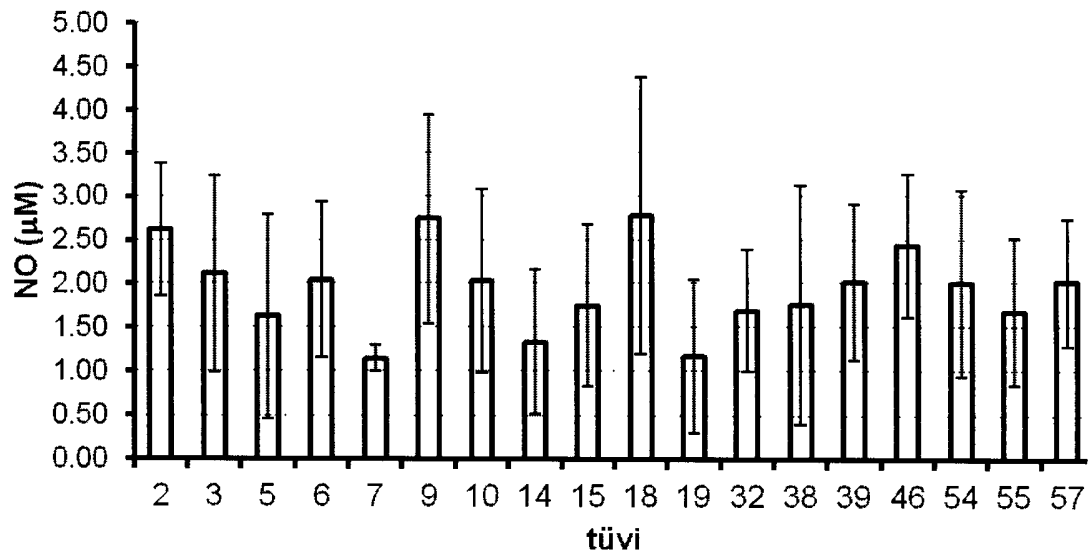


FIG 4

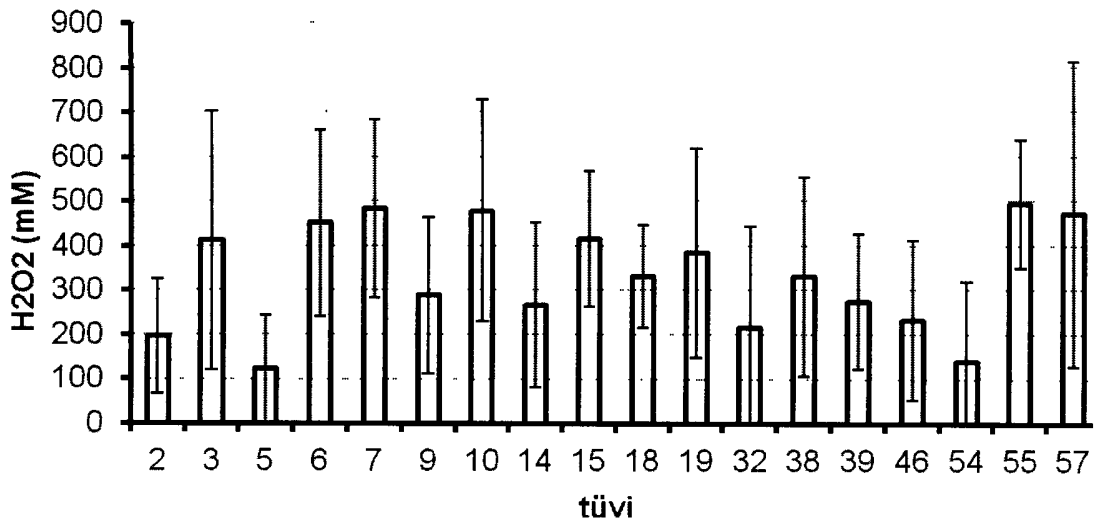


FIG 5

6/6

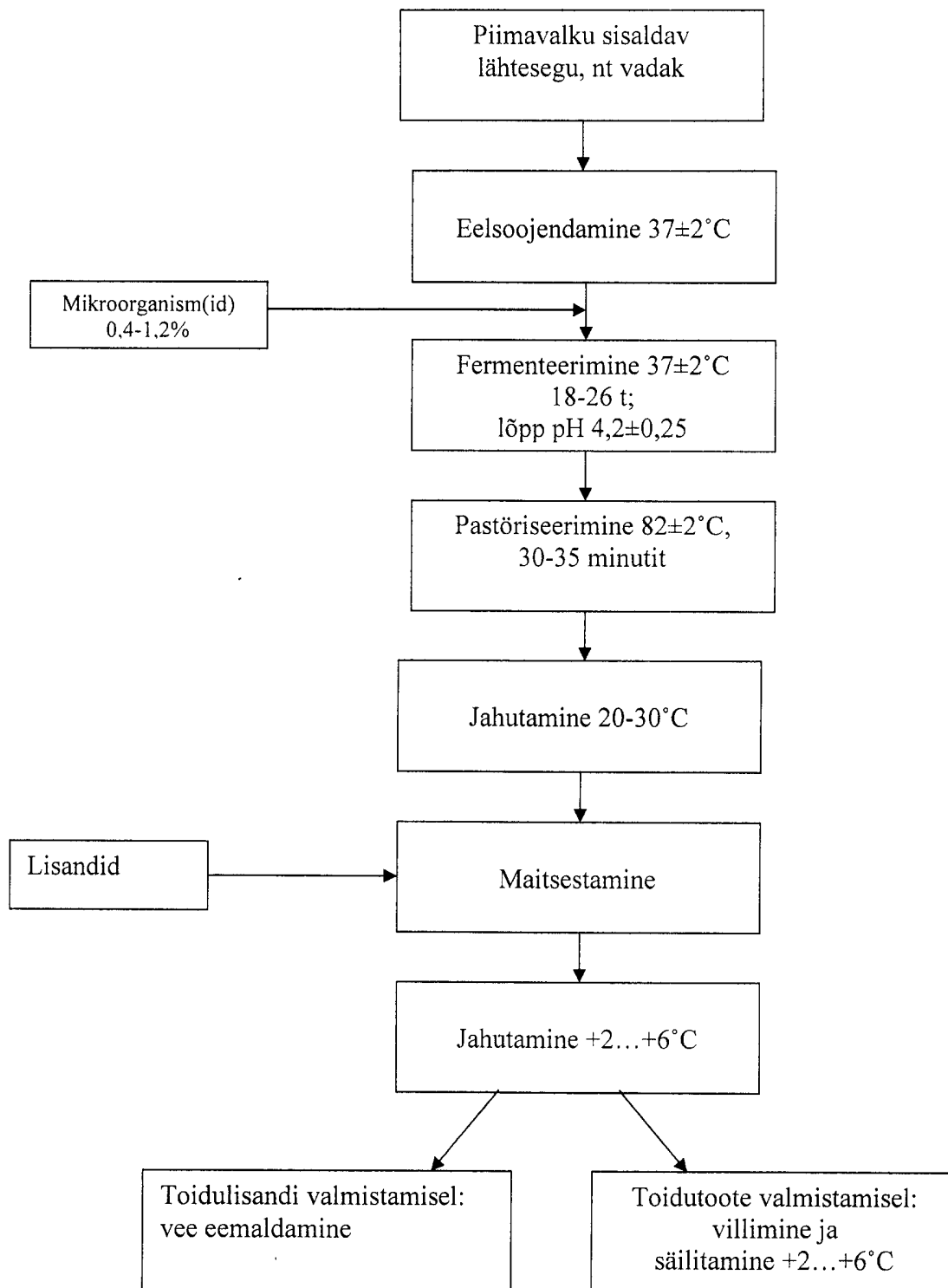


FIG. 6