



EESTI VABARIIK  
PATENDIAMET

(11) **EE 201500006 A**

(51) Int.Cl.  
C12N 1/20 (2015.01)  
C12R 1/225 (2015.01)  
A23C 9/123 (2015.01)  
A23C 9/133 (2015.01)  
A23C 21/02 (2015.01)

(12) **PATENDITAOTLUS**

<p>(21) Patenditaotluse number: <b>P201500006</b></p> <p>(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev: <b>25.02.2011</b></p> <p>(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev: <b>16.03.2015</b></p> <p>(62) Varasema patenditaotluse, millest patenditaotlus on eraldatud, esitamise kuupäev ja number: <b>25.02.2011 P201100012</b></p> <p>(83) Bioloogilise aine, sealhulgas mikroorganismi tüve deponeerimise andmed <b>DSM 23882, 05.08.2010, DSMZ</b></p>	<p>(71) Patenditaotleja: <b>OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskus Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE</b></p> <p>(72) Leiutise autorid: <b>Tiiu Kullisaar Ropka 12A-45, 50111 Tartu, EE Mihkel Zilmer Puusepa 37, 50406 Tartu, EE Ene Tammsaar Sõpruse põik, Prillimäe, 79702 Rapla maakond, EE Andre Veskioja Tammemäe tee 1, Rosma küla, Põlva vald, 63221 Põlva maakond, EE Epp Songisepp Tähe 105-7, 50107 Tartu, EE Kersti Zilmer Puusepa 37, 50406 Tartu, EE Lauri Bobrovski Väinjärve küla, Koeru vald, 73021 Järva maakond, EE Kersti Ehrlich Pargi 2-1, 50103 Tartu, EE Merle Rätsep Alasi 31-49, 50109 Tartu, EE Margus Punab Hiie 30, 51006 Tartu, EE Maire Vasar J. Hurda 27, 51005 Tartu, EE Marika Mikelsaar Jakobsoni 11-4, 51005 Tartu, EE</b></p> <p>(74) Patendivolinik: <b>Sirje Kahu Patendibüroo Ustervall OÜ Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE</b></p>
---	---

(54) **Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus gasseri* MCC2 DSM 23882 ning selle kasutamine**

(57) Leiutis käsitleb mikroorganismi tüve *Lactobacillus gasseri* MMC2 DSM23882 ning selle kasutamist antioksüdantse proteolüütilise koostisosana toidutoote või toidulisandi valmistamiseks. Nimetatud mikroorganismi sisaldavad toidutooted ja toidulisandid on hüpoallergeensed, nende tarbimine vähendab piimaallergiat ja eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevaid alumiste kuseteede ärritussümptomeid, nendega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku.

(57) The present invention relates to a new microorganism strain *Lactobacillus gasseri* MCC2 DSM23882 and its use as antioxidant proteolytic ingredient for the production of food products and dietary supplements. Food products and dietary supplements comprising *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.

Isoleeritud mikroorganismi tüvi *Lactobacillus gasseri* MCC2  
DSM 23882 ning selle kasutamine

#### TEHNIKAVALDKOND

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

#### TEHNIKA TASE

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

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

Piimaallergia, selle leevendamine

Infektsioonid, põletiku-, allergia- ja oksüdatiivse  
stressi-seoselised probleemid näiteks toiduallergiad,  
30 kuseteede vaevused (nt eesnäärmevaevustega seotud

kusemishäired) muutuvad ühiskonnale majanduslikult üha koormavamaks. Näiteks kuni 4% inimestest kannatab toiduallergiatega all ja 100...200 surmajuhtu on USA-s otseselt toiduallergiast tingitud. Toiduallergiad (sh allergiline reaktsioon lehmapiimale) on eriti tõsine probleem väikelaste puhul. On ju piimatoodete kasutamine väikelastel hädavajalik nende normaalse kasvu ja 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: 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, 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 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) 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).

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. 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.; 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.

Piimavalkude hüdrolüüsi piimhappebakterite ja lisaiinete abil on varem kirjeldatud. Patendis EE03424 (patenditaotlus WO9700078, Valio Oy) kirjeldatakse *L.rhamnosus* ATCC 53103 (LGG) tüve kasutamist allergiavastase valgühüdrolüüsaadi-preparaadi valmistamiseks, kus valgud hüdrolüüsitakse pepsiini ja trüpsiiniga. LGG kasutamist allergiariski vähendamiseks käsitletakse mitmes Nestec SA leiutises. Patendis EP1296694 kirjeldatakse LGG kasutamist laste 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 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 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) 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% (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 *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 Co) kirjeldatakse piimavadaku osalist hüdroolüüsi (30%) mikroorganismist *Bacillus subtilis* saadud ensüümi, trüpsiini ja papaiini abil.

Eesnäärmevaevused, nende leevendamine

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 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 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 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).

5 Piimhappebakterite kombinatsiooni, mille üks komponent sisaldab *L.crispatus*, *L.salivarius* ja *L.casei* ja teine 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  
10 *Farmaceutica Lda*, 2000). Piimhappebakterit *L.coprophilus* PL9001 (KCCM-10245) on kasutatud urogenitaalsete infektsioonide ärahoidmiseks ja ravimiseks (KR20040067161, PL BIO Co Ltd., 2003). Uroloogias lokaalraviks mõeldud farmatseutilised kompositsioonid võivad aktiivse  
15 toimeainena sisaldada piimhappebaktereid *L.casei*, *L.gasseri* (EP353581, Silvana Tosi et al., 1993).

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 uut isoleeritud antioksidantset mikroorganismi tüve *L.gasseri* MCC2 DSM 23882, seda sisaldavat kompositsiooni, nimetatud mikroorganismi kasutamist antioksidantse proteolüütilise koostisosana  
30 (ingrediendina) toidutoote ja toidulisandi valmistamiseks, mikroorganismi kasutamist piima allergiat ja eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevaid alumiste kuseteede

ärritusümptomeid ning nendega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku vähendava toidutoote ja toidulisandi valmistamiseks ning meetodit eeltoodud vaevusi vähendava toidutoote ja toidulisandi saamiseks.

- 5 Leiutise objektiks olev piimavalke osaliselt hüdroolüüsiv piimhappebakter leiti astmelise bioselektsiooni abil. Eesmärgiks oli leida multivalentseid biopotentsiaaliga tüved, mille multivalentsus võimaldaks tüvede kasulikke biotoimeid (hüpoallergilisem, vähem allergilisi vastuseid, 10 põletikku, oksüdatiivset stressi vähendav mõju) sünergiliselt kasutada soovitud omadustega toidutoodete saamiseks. Leiutise lähenemiseideoloogia pole piimavalitude täieliku hüdroolüüsi saavutamine. Täielikku hüdroolüüsi on proovitud, see tekitab uusi probleeme, sh ka produkti 15 ülitugeva organoleptilise ebameeldivuse. Leiutise ideoloogiaks valiti multibiopotentsete tüvede kasutamine koos vajalike tehniliste protseduuridega ning sobiva tervisliku lisatoorme kasutamisega. *L.gasseri* MCC2 on multibiopotentne ja sünergilise toimega - ta on võimeline 20 piimavalke (kaseiine) suunitletult (osaliselt) hüdroolüüsima, ning omab olulist oksüresistentsust, tekitab konjugeeritud linoolhapet, NO jt komponente. Seega võimaldab leiutis biotehnoloogilise terviklahenduse abil luua toidutooteid, mis omaksid potentsiaali vähendada 25 piimaallergiat ning kuseteede vaevusi.

*L.plantarum L.gasseri* MCC2 kirjeldus

- Leiutise objektiks olev *L. gasseri* MCC2 DSM 23882 isoleeriti terve lapse roojast Eesti-Rootsi laste mikrofloora võrdleva uuringu käigus. Tüvi *L. gasseri* MCC2 30 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, Ühendkuningriik) ja



kultiveeriti 37°C juures mikroaeroobses keskkonnas. Leiutise objektiks olev tüvi isoleeriti *Lactobacillus ssp* iseloomuliku pesa- ja rakumorfoloogia alusel. Järgnes provisoorne ja seejärel täpsem identifitseerimine, mida

5 järgnevalt kirjeldatakse.

*L.gasseri* MCC2 deponeeriti kultuurikollektsioonis Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH numbri DSM 23882 all 05. augustil 2010.

Kultuur-morfoloogilised tunnused

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

*L.gasseri* MCC2 kultiveerimiseks sobis MRS puljong 24-48 t jooksul anaeroobses keskkonnas, mille järel ilmnes puljongis ühtlaselt hägune kasv. 48 t MRS agarsöötmele

15 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. Optimaalne kasvutemperatuur on 37°C; tüvi

20 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.

25 *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

30 homoloogia tüüptüvega *L. gasseri* IDCC 3102 (BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/sequence-analysis/>).

*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  
5 *L.gasseri* MCC2 leutsiin arüülamidaasi, valiin arüülamidaasi,  $\alpha$ -glükosidaas ja  $\beta$ -glükosidaasi aktiivsust.

#### Ohutus

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

#### Hemolüütiline aktiivsus

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

Tulemus. Tüvel *L.gasseri* MCC2 ei esinenud hemolüütilist aktiivsust.

#### 25 Resistentsus antibiootikumidele

Metoodika: *L.gasseri* MCC2 tundlikkust antibiootikumidele testiti E-testi abil (AB Biodisk, Solna). Minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon määrati vastavalt Euroopa Komisjoni soovitatud epidemioloogilistele murdepunktidele.

Tabel 1. *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  
 5 resistentsusele, OHOL - Obligaatselt homohementatiivsed  
 laktobatsillid, n.r. - pole nõutud#

\*\* European Commission (EC), 2002. Opinion of the Scientific Committee  
 on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of  
 10 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)

# FEEDAP Panel EFSA Technical guidance prepared by the Panel on  
 Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)  
 15 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

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

*L.gasseri* MCC2 funktsionaalsed omadused

Metaboliitide profiil

- 5 Metoodika: Metaboliitide profiil on kindlaks tehtud gaaskromatograafiliselt (HP 6890) mikroaeroobses kasvukeskkonnas inkubeerimisel 24t ja 48t järel (Tabel 2). Laktobatsille kasvatati 48 t MRS agarsöötmele 10% CO<sub>2</sub> keskkonnas, tehti suspensioon 0,9% NaCl lahusesse
- 10 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 kapillaarkoloni HP-INNOWax (15 m x 0,25 mm; 0,15 µm). Koloni temperatuuri programm 60°C 1 min, 20°C/min 120°C 10
- 15 min; detektor (FID) 350°C.

Tabel 2. Äädikhappe, piimhappe ja merivaikhappe kontsentratsioon (mmol/l) MRS söötmes *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

20

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

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

1. Tugev (+) - piim kalgendumine 24 t jooksul,
2. Aeglane (+/-) - piim kalgendumine 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.

5 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.

10 *L.gasseri* MCC2 kalendas piima 24t jooksul, omas tugevaid autoagregatiivseid omadusi (Tabel 3).

Tabel 3. Tüvede agregatsiooni, üldproteolüüsi ja piima kalgendamisvõime

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

15

Prebiootikumide fermentatsioonivõime

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

25

Tabel 4. *L.gasseri* MCC2 prebiootikumide kasutamise võime

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

Antimikroobne aktiivsus patogeenidele

Metoodika: Antimikroobsete omaduste hindamiseks kasutati joonkõlvitehnikat (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.

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

Patogeen	<i>L.plantarum</i> MCC1		<i>L.gasseri</i> MCC2	
	Anaeroobne	Mikroaeroobne	Anaeroobne	Mikroaeroobne
<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

20 *L.gasseri* MCC2 osutus mõlemas keskkonnas nõrgaks antagonistiks.

Üldproteolüütilised omadused

*L.gasseri* MCC2 üldproteolüütilisi omadusi uuriti SMA söötmel (lõssi agarsöötmel) ja Ca-kaseinaadi agaril, külvates eelnevalt MRS puljongis 48t jooksul ettekasvatatud 5 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.gasseri* MCC2 on piisavalt hea üldproteolüütilise toimega (4 palli süsteemis oli *L.gasseri* MCC2 kaks palli).

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

*L.gasseri* MCC2 puhul polnud teada, kuidas ta erinevaid piimavalke hüdrolüüsib. Nii tehti esmalt kindlaks hüdrolüüsi käigus tekkivad muutused molekulmassi 20 spektrites, kasutades üksikuid puhtaid piimaproteiine ( $\beta$ -laktoglobuliin,  $\alpha$ -S1 kaseiin,  $\beta$ -kaseiin), et hiljem analüüsida täispiima valkude spektri muutusi. Piimavalkude hüdrolüüsi produktide molekulmassid määrati MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of- 25 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 30 füsioloogilisse lahusesse suspensioon tihedusega  $10^9$  PMÜ/ml vastavalt McFarland 4 standardile. Saadud suspensiooni

lisati 10 µl piimavalgu fraktsiooni. Tüvede elulemust neis fraktsioonide lahustes 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 fig 1 ja joonis fig 2). Leiti, et leiutise objektiks olev tüvi on võimeline kohandama ainevahetust toitainetevaese keskkonnaga. Näiteks olid katses ainsaks toitaine allikaks kas  $\alpha$ -S1 kaseiin,  $\beta$ -laktoglobuliin,  $\beta$ -kaseiin või tüve enese rakkudest saadavad ained. Tüvi oli katse lõpus leitav kõigis kolmes proteiinifraktsiooni keskkonnas ( $\alpha$ -S1 kaseiin,  $\beta$ -laktoglobuliin,  $\beta$ -kaseiin).

15 Järgnevalt uuriti tüve proteolüütilisi omadusi 2,5% 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 20 võrreldi uuritavale piimaproteiinile vastava RP-HPLC 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 25 päevaste inkubatsiooniaegadega. Uuriti ka leiutise objektiks oleva tüve kombinatsioone parandamaks proteolüütilist efektiivsust ning proteolüütilisust ka vadakuga (vähendamaks allergeensete kaseiinide hulka) eellahjendatud piima puhul. Piimaproovide ettevalmistamine 30 RP-HPLC analüüsiks ja kromatografeerimise tingimused on välja töötatud Bobe *et.al* poolt kirjeldatud 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

5 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

10 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

15 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

20 järjekorras:  $\kappa$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\alpha$ -LA ja  $\beta$ -LG. *L.gasseri* MCC2 andis  $\alpha$ -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

25 toimepäevaks. Tuginedes RP-HPLC analüüsile oli parim suunatud osaline proteolüüsija *L.gasseri* MCC2 (joonis fig 3). Kombineerides laktobatsille *L.plantarum* MCC1 *L.gasseri* MCC2 omavahel, proteolüütiline efekt piimas pisut vähenes võrreldes samade tüvede kasutamisega üksinda. *L.plantarum*

30 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: tüvi *L.gasseri* MCC2 ja selle kombinatsioon tüvega *L.plantarum* MCC1 vähendas  $\alpha$ -S1 kaseiini ja/või  $\beta$ -kaseiini hulka 20...40% (st toimus suunatud mõõdukas hüdroolüüs).

- 5 *L.gasseri* MCC2 hüdroolüüsib piimaallergiat põhjustavaid valke ja on hea üldproteolüütilise aktiivsusega. *L.gasseri* MCC2 eraldi või koos tüvega *L.plantarum* MCC1 kasutamine vähendab piimaallergiat ja seetõttu saab teda kasutada piimaallergiat vähendava toidutoote ja tervislike  
10 omadustega toidulisandi valmistamiseks.

Bioselektioon konjugeeritud linoolhappe (CLA) produktsiooni alusel

- CLA tähistab 18-süsinikulise rasvhappe, linoolhappe (LA, *cis*-9, *cis*-12-18:2) isomeeride rühma, kus kaksiksidemed on  
15 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  
20 võime moduleerida teatud geenide ekspressiooni kas otseselt või kaudselt läbi spetsiifiliste transkriptsiooni faktorite (Wahle, K. W. J., Heys, S. D. and Rotondo, D. (2004). Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? Prog. Lipid Res. 43: 553-587). Kuna  
25 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  
30 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 rasvhappest. 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 bakteriostaatilise 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 tüve võimet toota CLA kasvukeskkonda (MRS, lõss) lisatud linoolhappe baasil. Selgus, et *L.gasseri* MCC2, millel oli nii vajalik suunitletud proteolüütiline toime, tekitas CLA-d märkimisväärselt (Tabel 7). Samas polnud see tüvi sisuliselt tundlik LA bakteriostaatilisele toimele.

Bioselektatsioon oksüresistentsuse (antioksidantsuse) baasil.

Uuriti, kas tüvel *L.gasseri* MCC2, millel on spetsiifiline piiratud proteolüütilisus ja ka CLA-produktiivsus, on olemas füsioloogiliselt oluline oksüresistentsus. Oksüresistentsust peaks määrama vähemalt kahe meetodiga.

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

- Teise meetodina kasutati kommertsiaalset testi (Totaalne antioksidantne staatus-TAS, Randox Laboratories Ltd., UK), mis põhineb vesinikperoksiidi poolt genereeritud ferrüülmetmüoglobiin-radikaali tekke allasurumises laktobatsillide rakkude suspensiooni poolt (Rice-Evans and Miller 1994). TAS väärtus avaldati trolox (vitamiin E lahustuv vorm) ühikutes (mmol/L). Mõlemad meetodid on 15 publitseeritud (Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A. (2002). Two antioxidative 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. British Journal of Nutrition 90, 449-456).
- 20

- TAA ja TAS määramiseks inkubeeriti tüvesid MRS puljongis (Oxoid) 24t 37°C juures. Mikroobirakke tsentrifuugiti 25 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.gasseri* MCC2 on füsioloogiliselt 30 olulise totaalse antioksidatiivsusega (Tabel 6).

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

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

Bioselektatsioon lämmastikoksiidi ja vesinikperoksiidi

5 produtseerimisvõime alusel

Eesmärgipärase informatsiooni saamiseks uuriti preselekteeritud tüvesid (spetsiifiline piiratud proteolüütilisus, CLA-produktsioon, antioksüdantsus) 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> 20 kontsentratsioonid tehti kindlaks proovi signaali võrdlemisel standardgraafikuga.

*L.gasseri* MCC2 on NO ja vesinikperoksiidi märkimisväärse produtseerimisvõimega (Joonis fig 4 ja 5).

Seega sobib tüvi *L. gasseri* MCC2 kasutamiseks 25 antioksüdantse lisandina toidutoote ja toidulisandi valmistamiseks.

Tabelis 7 on toodud tüvede *L.plantarum* MCC1, *L.gasseri* MCC2 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 vitro</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, vereglükoos, 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 3 Isopros- taanid	3 hsCRP, 3 IL-10 3 Isopros- 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>6</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 tootmisprotsess 3 - 40...31, SKOOR 2 30 - 20...15, SKOOR 1 14 ...10 ühikut

Ülaltoodu kirjeldas leiutise objektiks olevat mikroorganismi tüve *L.gasseri* MCC2.

10

Järgmiseks leiutise objektiks on kompositsioon, mis sisaldab tüve *L.plantarum* MCC2.

Kompositsioonis on tüve *L.gasseri* MCC2 sisaldus vahemikus 0,8-1,2 mahuprotsenti ja iduarv  $0,5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  pmü/ml.

15 Eelistatult on tüve sisaldus vähemalt 1,0 mahuprotsenti, kusjuures iduarv on  $0,8 \times 10^7 - 1,2 \times 10^8$  pmü/ml.

Kui kompositsioon sisaldab tüvesid *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2, siis on kummagi sisaldus vahemikus 0,4-0,6 mahuprotsenti, kusjuures *L.plantarum* MCC1 iduarv on

20 vahemikus  $0,2 \times 10^8 - 2,4 \times 10^8$  pmü/ml ja *L.gasseri* MCC2 iduarv vahemikus  $0,4 \times 10^7 - 0,6 \times 10^8$  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*

25 MCC2  $0,5 \times 10^7 - 0,5 \times 10^8$  pmü/ml.

Eelnimetatud tüved võivad olla elusad või surmatud.

Leiutise järgmisteks objektideks on tüve *L.gasseri* MCC2 kasutamine

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

- hüpoallergilise, piimaallergiat vähendava toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks,

35 - 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.

5

Leiutisekohane meetod hõlmab järgmisi etappe:

A) piimavalgu sisaldavat lähtesegu soojendatakse  $37+2^{\circ}\text{C}$ ;

B) lisatakse *L.gasseri* MCC2 kuni 1,2 mahuprotsenti, eelistatult 1 mahuprotsent iduarvuga  $0,8 \times 10^7 - 1,2 \times 10^8$

10 pmü/ml. *L.plantarum* MCC1 ja *L.gasseri* MCC2 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  $4,2 \pm 0,25$ .

15 C) segu fermenteeritakse *L.gasseri* MCC2 toimel või *L.gasseri* MCC2 + *L.plantarum* MCC1 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 20 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 ( $2-6^{\circ}\text{C}$ ) ja tehakse vajalikud analüüsid 25 (oksüresistentsuse määramine jt). Saadud segu saab kasutada pulbrilisel (kapslid, pastillid, tabletid, pulbrikotikesed jmt) või vedeliku kujul (ampullid) turustatava toidulisandi valmistamiseks.

30 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 35 produktist vesi osaliselt kuni soovitud konsistentsi



saamiseni. Toidulisandi võib valmistada sobiva lisaainega (nt antioksidandid, magusained, prebiootikumid) või ilma selleta.

5 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.

10

## JOONISTE LOETELU

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

15 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  
20 toime 48 ja 96-tunnilise inkubatsiooni puhul beeta-kaseiini tasemele (basaaltasemeks võeti 100%, MALDI-TOF mass-spektromeetrilise ja RP-HPLC analüüsi andmete põhjal).

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

25 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.

## 30 LEIUTISE TEOSTUSNÄITED

Näide 1. Meetod piima allergiavastuseid ning kuseteede ärritussümptomeid ning nendega seotud oksüdatiivse stressi ja põletikku vähendava, mikroorganismide *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  
5 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  
10 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  
15 valmistamiseks hõlmas järgmisi etappe (vt skeem joonisel  
fig 6):

a) Piimavalgu sisaldav lähtesegu, juustutööstusest saadud  
vadak (keemilis-füüsikalised omadused tabelis 8),  
millest separeerimise teel oli vähendatud rasvafaasi  
20 ning eemaldatud juustutolm, soojendati fermentatsiooni-  
temperatuurini 37±2°C;

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  
25 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 0,5x10<sup>7</sup>-  
0,5x10<sup>8</sup> pmü/ml.

30 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

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

- Pulbrilise toidulisandi valmistamiseks eemaldati saadud segust vesi, kasutades selleks toiduainete tehnoloogias
- 25 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).
- 30 Eelpool kirjeldatud viisil valmistatud segule lisati sobivat täiteainet, mille sulamispunkt on laktoosi sulamispunktist kõrgem, näiteks maltodekstriini (vahekorras 1:1 vadaku kuivainega).

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

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

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

Koostisosa/parameeter	Sisaldus	
	Vadaku jook	Toidulisand
Toiduaine arvutuslik energeetiline väärtus		
kcal/100g	66	390
kJ/100gr	219	1654
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 toidutooded TT-I - TT-V, mis sisaldasid leiutise objektideks olevaid mikroorganisme ja lisandeid alljärgnevalt:

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

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

10 Toidutoode III (ehk TT-III): Piimavalku sisaldav segu + *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).

15

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

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

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

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

30

Tabel 10.

Toidutoote organoleptilise tüüptesti näide.

35 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

5

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.

10

Toodete lisanditeks kasutati astelpaju mahla (AP) (valmistatud astelpaju marjadest, säilitusaineteta, külmpressitud ja pastoriseeritud), vaarika-mustika kontsentreeritud mahla (VM), suhkur, happesuse regulaator sidrunhape, säilitusaine kaaliumsorbaat, lahjendati 10 korda), pohla kontsentreeritud mahla (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-atsetüleeni segus.

Lõpptoote organoleptilised testid viidi läbi vastavalt kehtivatele nõuetele spetsiaalsete küsitluslehtedega. Tulemused on toodud Tabelis 10.

15

20

25

Näide 3. Kliiniline uuring nr. 1.

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

Mitmekülgse bioselekttsiooniga saadud multibiopotentsete 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 (koosõlas Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetikakomitee poolt heakskiidetud Maailma 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 (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 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), 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.

## 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 eesnäärmevaevustega (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 mmol/L	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

5

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

- 10 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
- 15 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. 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. 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 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 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 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 keskuses (koosõlas Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetikakomitee poolt heakskiidetud Maailma

35

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 abiuringutele. 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 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 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, 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 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

5 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

15 mitmete toidutoodete (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

20 sellele, et tulemuseks oleks vähem allergilisi vastuseid, st saadud toidutoodet 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

25 täisväärtuslikuks 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

30 allergilist reaktsiooni. 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-

35 II eelistasid enamik lapsi ka maitseliste omaduste tõttu.

Tabel 12. Lehmapiima allergilise vastuse uurimine (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 ülierutatus)	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

5 mõju eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevate

alumiste kuseteede ärritussümptomitele ning oksüdatiivse stressile ja põletiku näitajatele.

Eespoolsed kliinilised uuringud näitasid, et leiutise ideoloogia (tüvede multivariantne suunitletud  
5 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 toimeid, on hüpallergilisemad ning omavad positiivset efekti kuseteede  
10 ärritussümptomitele ning OxS ja põletiku näitajatele.

#### Metoodika

Osales 55 meest (manustasid TT-I) ja 5 meest (manustasid TT-II), kellel esines kerge või mõõdukas IPSS (*International Prostate Symptom Score*, rahvusvaheline  
15 eesnäärme sümptomite skoor) < 8. IPSS küsimustik hõlmab 3 küsimust, mis hindavad alumiste kuseteede ärritussümptomeid ja 4 küsimust, mis hindavad kusemistakistust (obstruktiivseid sümptomeid)). Tehti ka vajalikud eeluurinud (PSA eesnäärme sekreet) uuringugrupi täpseks  
20 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 eesnäärmevähi võimalus. Uuringugruppi kaasasime seega väheste või keskmise  
25 raskusastme kusemishäiretega mehed, kellel olid välistatud teised kaebuste põhjused (prostatiit, eesnäärmevähk). Patsiendid (kerge ja keskmise kusemishäirega, ilma põletikureaktsioonita) tarbisid toidutoodet TT-I või TT-II kahe nädala jooksul 200 g päevas.

30

#### 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  
35 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 positiivsed muutused. Esimeses katseseerias (n=23) ilmnes samuti nende markerite positiivse muutuse trend. Teises katseseerias määrati ka glükosüülitud hemoglobiini tase, mille langus oli statistiline.

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 ilmnunud 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 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.

#### 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 (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, oxLD, 8-isoprostaanid) paranesid statistiliselt tõenäoliselt. Kontrollgrupil muutusi ei esinenud.

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- prostaanid 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

- 5 Näide 6. Toidulisandi (TL/FP-I) mõju eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevate alumiste kuseteede ärritus-sümptomitele ning oksüdatiivse stressile ja põletiku näitajatele.
- 10 Uuringusse kaasati 10 meest, kellel esines kerge või mõõdukas kusemishäire - IPSS (rahvusvaheliste eesnäärmevaevuste skoor), kusjuures eelnevate eesnärmesekreedi uuringute põhjal: NIH-CPSI küsimustik, oli välistatud aktiivne eesnäärme põletik ning PSA testi ja digitaalse
- 15 palpatsiooni abil kliiniliselt olulise eesnäärmevähi võimalus. 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
- 20 (p=0,003) vastavalt "Rahvusvahelise prostata sümptomite küsimustikule" 50-66% ulatuses, kusjuures eriti märgatav positiivne muutus toimus vajaduse vähenemisel öösel urineerida (keskmiselt 87,5%).



Koondkokkuvõte kõigist kliinilistest uuringutest

*L.gasseri* MCC2 sisaldavad toidutooted ja toidulisandid on hüpoallergilised, Oxs taset langetavad ja omavad statistiliselt tõest mõju eesnäärmevaevustele neil, kel 5 esinevad mõõdukad alumiste kuseteede vaevused ja kellel on juhtival kohal ärritussümptomid.

## PATENDINÕUDLUS

1. Isoleeritud mikroorganismi tüvi *L.gasseri* MCC2 DSM 23882.
- 5 2. Punktile 1 vastav mikroorganism surmatud kujul.
3. Kompositsioon, mis sisaldab punktidele 1 - 2 vastavat mikroorganismi.
4. Punktidele 1 ja 2 vastava mikroorganismi kasutamine antioksidantse proteolüütilise koostisosana, ingrediendina toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks.
- 10 5. Punktidele 1 ja 2 vastava mikroorganismi kasutamine hüpoallergilise, piimaallergiat vähendava toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks.
- 15 6. Punktidele 1 ja 2 vastava mikroorganismi kasutamine eesnäärme healoomulise suurenemisega kaasnevaid alumiste kuseteede ärritussümptomeid ning nendega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku vähendava toidutoote ja/või toidulisandi valmistamiseks.
- 20 7. Meetod piimaallergiat ja kuseteede vaevusi ning sellega seotud oksüdatiivset stressi ja põletikku vähendava toidutoote ja toidulisandi valmistamiseks, mis hõlmab järgmisi etappe:
  - 25 A) piimavalgu sisaldav lähtesegu soojendatakse ( $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ );
  - B) lisatakse 1 mahuprotsent punktile 1 vastavat mikroorganismi iduarvuga  $0,5 \times 10^7 - 0,5 \times 10^8$  pmü/ml;
  - C) saadud segu fermenteeritakse temperatuuril  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  18...26 tundi;
  - 30 D) segu pastoreeritakse 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.

5

8. Meetod vastavalt punktile 7, kus lisandiks on puuvilja- või marjamahl, kontsentraat, siirup või mahlajook või puuvilja või marjamoos, eelistatult astelpaju, mustika või vaarika mahl.

10

9. Meetod vastavalt punktile 8, kus piimavalgu allikaks on vadak, kontsentreeritud vadak, vadakupulber, piim, piimapulber või piimavalgu kontsentraat.

15

1 / 6

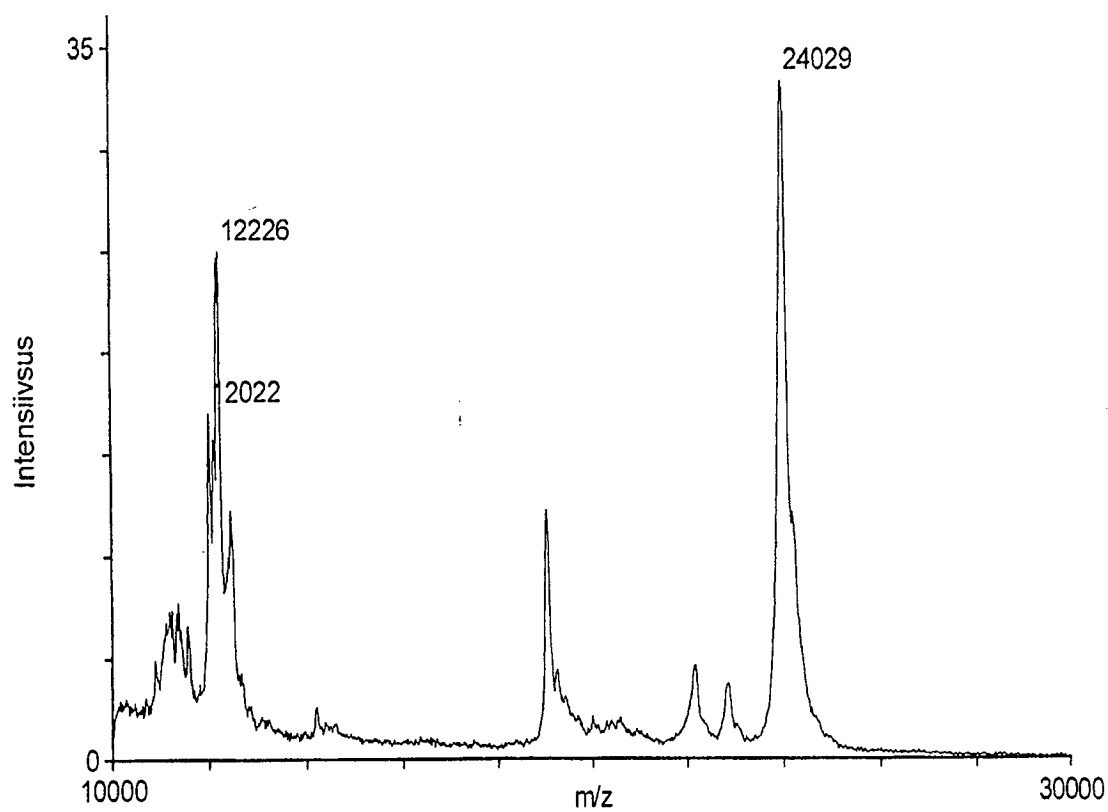


FIG. 1

2/6

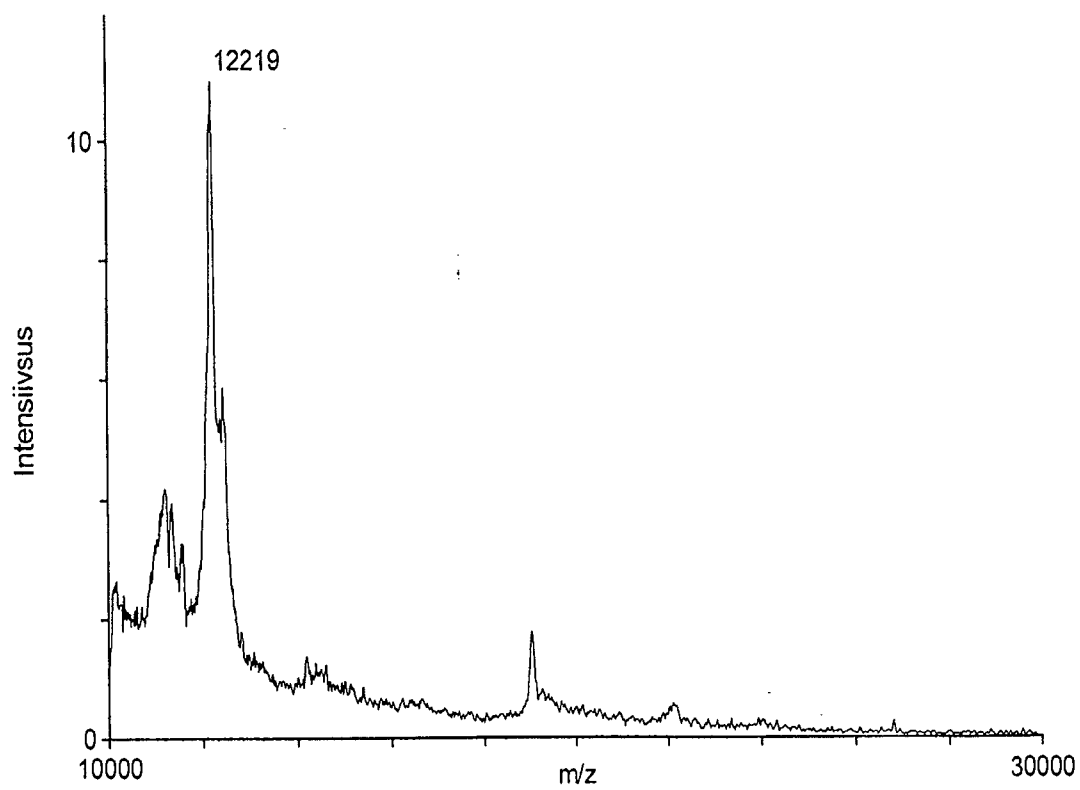


FIG. 2

3/6

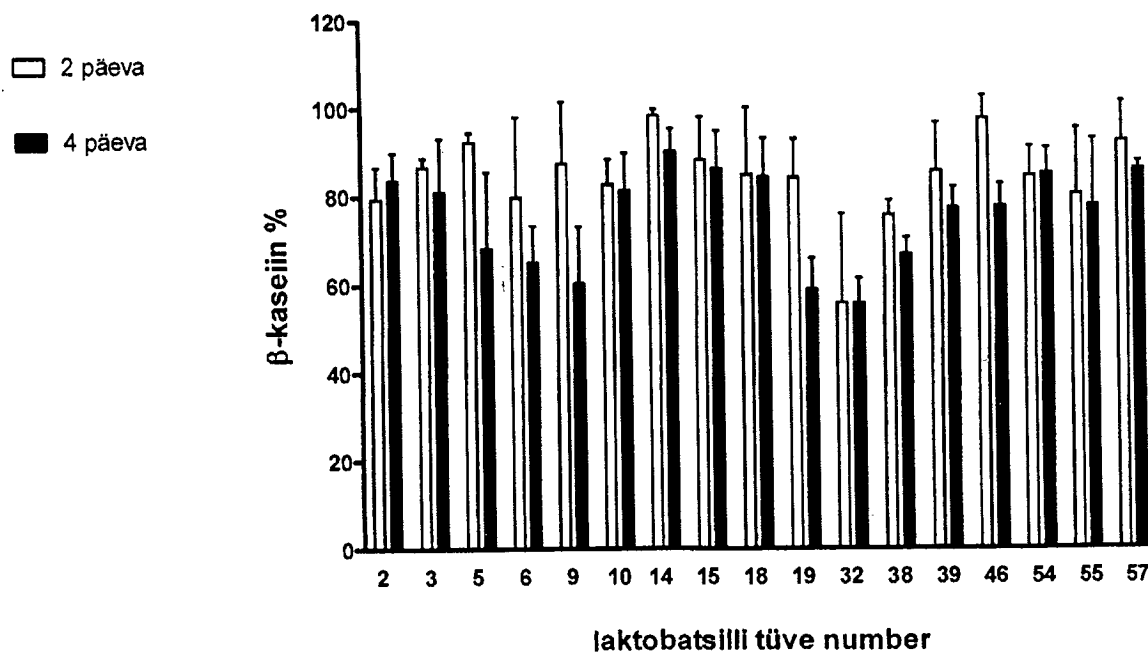


FIG 3

4/6

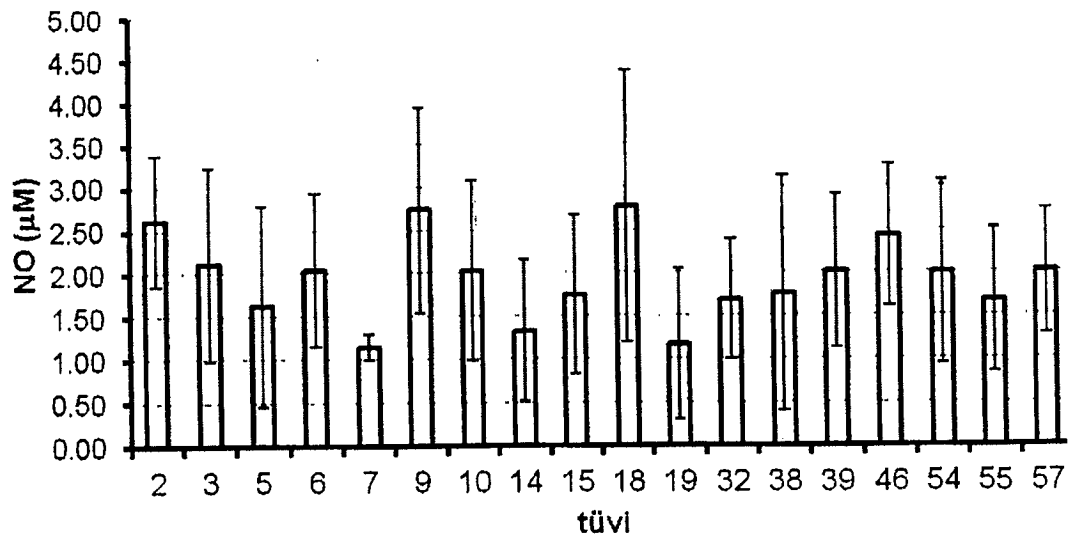


FIG 4

5/6

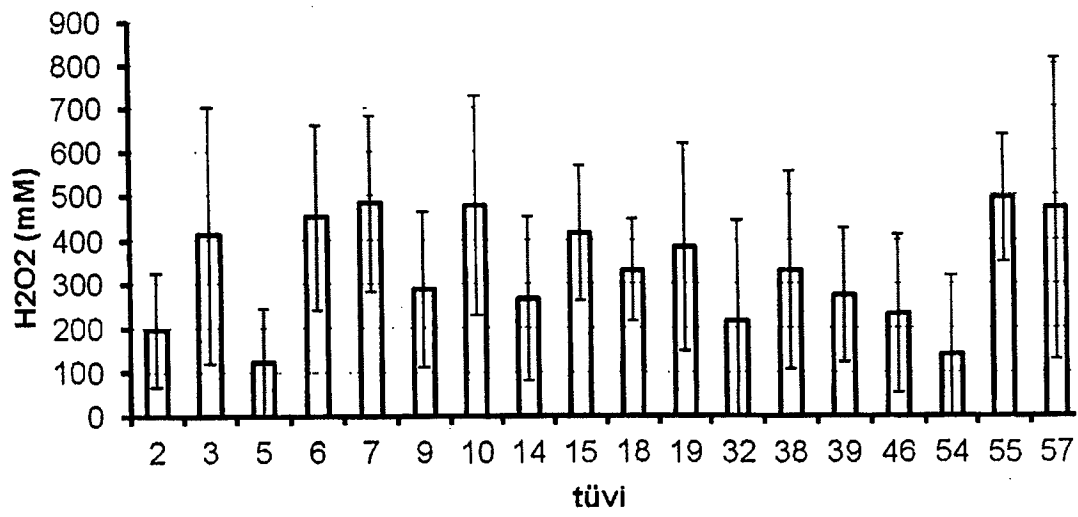


FIG 5



6/6

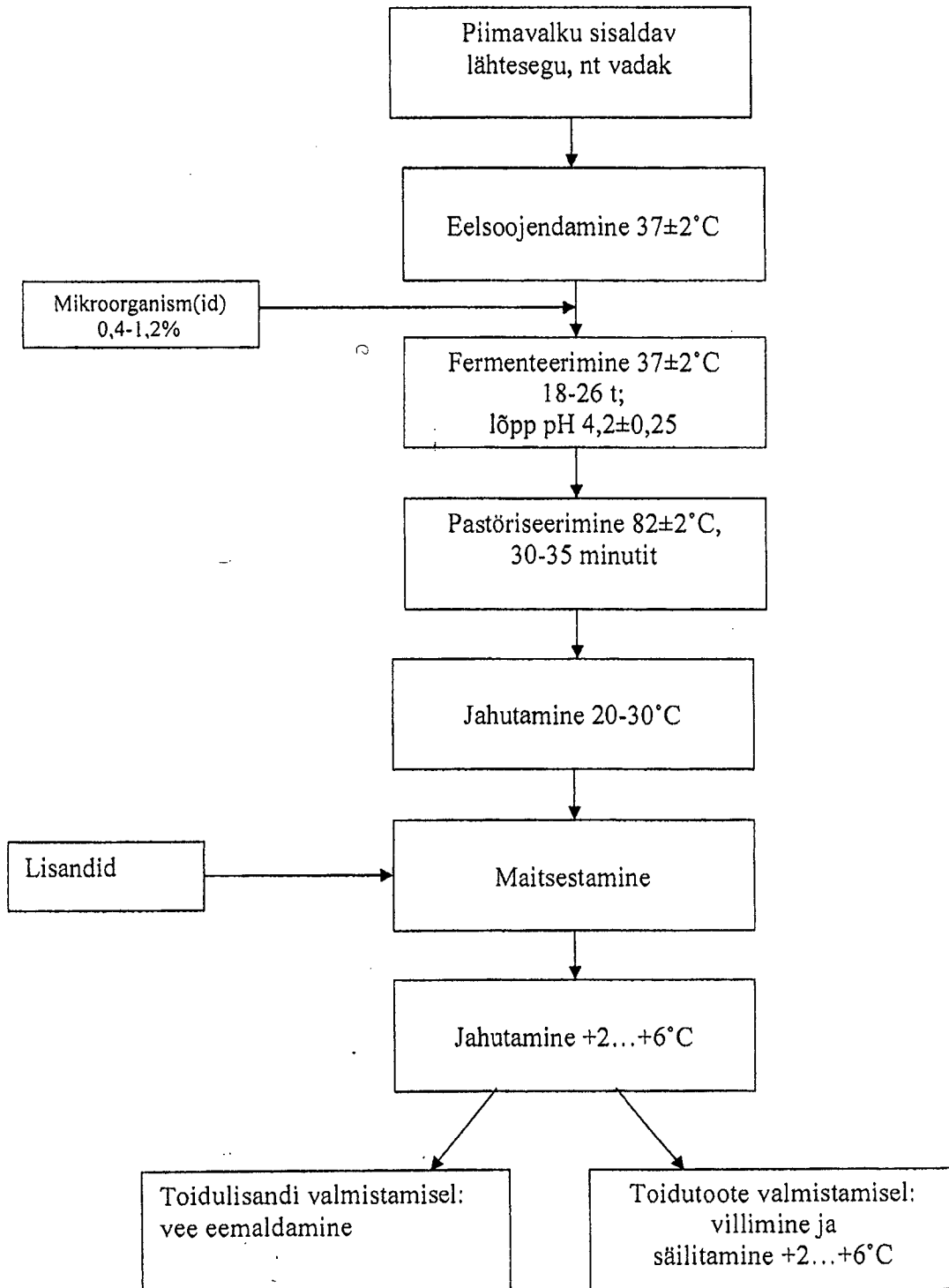


FIG. 6