

Kõige olulisemad faktid toimiva probiootikumi valimiseks.

Merli Špitsmeister

Biokeemia ja biotehnoloogia Msc

Elusate bakterite tootmine vajab ekspertiisi ja tugevat kvaliteedi kontrolli kogu protsessi jooksul. Ainult üksikud firmad maailmas omavad teadmisi ja tööstuslikku võimet toota baktereid viisil, mis tagab, et toote etiketil toodu vastab tegelikkusele: puhas, elus, stabiilne, terviklik bakteripreparaat. (Castex and Panes, 2012)

Probiootilised toidulisandid peavad kvaliteedi, ohutuse ja funktsionaalsuse osas vastama kindlatele kriteeriumidele. Kvaliteedi tagamiseks on äärmiselt oluline, et toote etiketil väljatoodud elus rakkude arv vastaks tegelikkusele. Uuringud on aga näidanud, et paljud kommertsiaalsed tooted sisaldavad raporteeritust oluliselt vähem elus rakke. (Davis, 2014) Toote sildil peaks olema täpselt ära toodud kasutatud organismid, vähemalt liigi tasemel. Ideaalis peaks etiketil toodud organismide arv vastama aegumistähtaja omale ja kasutama peaks tüvesid, mis on leitud selles doosis antud peremehel efektiivsed olema. (Weese, 2003)

Sama bakteriliigi erinevad tüved võivad käituda erinevalt, mistõttu teatud kliinilise uuringu tulemused on omistatavad ainult konkreetsele kasutatud tüvele (Sanders, 2008). Siiski, ka erinevad tüved võivad omada sarnast efekti (Ibnou-Zekri et al., 2003).

On leitud, et probiootikumid, mis sisaldavad erinevaid bakteritüvesid ja bakteriliike on efektiivsemad kui üht tüve sisaldavad. Mitmetüvelised probiootikumid võivad sooles tekitada nišši, mis võimaldab ka soolde jõudmise teekonnal kahjustada saanud bakteritel paremini koloniseeruda. Näiteks tüved, mille optimaalne pH on 6-7, paljunevad soolestikus kiiresti, langetades sellega pH-d, mis loob sobiva keskkonna happelimeste bakterite kasvuks. Teatud tüved, nagu *S.thermophilus*, tarbivad hapnikku ja tekitavad sellega anaeroobsed tingimused, mis soodustab anaeroobide (nt bifidobakterid) kasvu. On oluline, et valitud tüvede vahel valitseks sümbioos ja et nad üksteist ei inhibeeriks. Teiste kasvule inhibeerivalt võib mõjuda näiteks vesinikperoksiidi või bakteriotsiinide tootmine. Üldiselt toimivad erinevad laktobatsillide, laktokokkide, streptokokkide, bifidobakterite ja propioonibakterite tüved üksteisega sümbioosis, võimendades üksteise kasvu ja metaboolset aktiivsust. (Timmerman et al., 2004)

Probiootikumide doosid on tavaliselt standardiseeritud elavate bakterite arvule mahuühiku kohta: ühele elus bakterile vastab üks kolooniat moodustav ühik (cfu). Kui palju on piisav doos probiootikume, ei ole konkreetselt defineeritud, kuid rusikareegliks on, et probiootikume kasutatakse minimaalselt doosis 10^9 cfu. See võib aga sõltuvalt tüvest, oodatavast toimest ja probiootikumi maatriksist varieeruda. (Forssten et al., 2011) Terapeutiliseks toimeks vajalik miinimumkontsentratsioon on tüvespetsiifiline, mistõttu peaks probiootikumide tase doosis põhinema tasemel, mis on leitud inimestel läbiviidud uuringutes efektiivne olema (Shornikova et al., 1997).

Probiootikumidega samaaegselt ei ole mõistlik tarbida essentsiaalseid õlisid, nagu nt piparmünt, kuna mitmed essentsiaalsed õlid on antibakteriaalse toimega. Antibakteriaalne

toime seisneb bakteri rakuseina ja membraani kahjustamises, mis viib raku lagunemiseni (Kavanaugh and Ribbeck, 2012, Swamy et al., 2016). Ka kurkumil on nii gram-negatiivsete kui gram-positiivsete bakterite membraane kahjustav aktiivsus (Tyagi et al., 2015).

Toote vormi mõju funktsioonile pole veel piisavalt uuritud. Probiootikumide kasv tootmise ajal, säilitamise tehnoloogia, probiootikumi metaboolne staadium ja lisaainete olemasolu tootes võivad mõjutada toote efektiivsust. (Sanders, 2008)

Bakterite eraldamiseks kultuurvedelikust kasutatakse tsentrifuugimist või filtreerimist. Filtreerimine on rakke säästvam. Tsentrifugaaljõu tulemusel võivad rakkude seinad rebeneda ja rakud kahjustuda või hukkuda (Trenev, 1998). Tihti saab kahjustatud ka bakteriraku pind, mis mõjutab selle kleepumist pindadele. Tsentrifugaalimise kahjustused sõltuvad oluliselt kasutatud tsentrifugaaljõu suurusest. (Peterson et al., 2012)

Hapniku tase probiootikumide pakendis peab olema nii madal kui võimalik, kuna hapnik võib olla osadele rakkudele toksiline, teatud bakterid võivad hapniku olemasolul toota toksilisi peroksiide ja ainete oksüdeerumisel tekkivad vabad radikaalid on bakterirakkudele toksilised. Hapnikutundlikkus varieerub tugevalt erinevate tüvede ja liikide vahel. (Tripathi and Giri, 2014)

Bakterite säilitamisel tuleb toote paremaks säilimiseks tagada niiskustase 2,8-5,6% (Zajed and Roos, 2004).

Kuigi uuringud on näidanud, et prebiootikumid (nt. Inuliin) võivad võimendada probiootikumide kasvu (Gibson, 1999), tasub nende lisamisel meeles pidada, et ka potentsiaalselt patogeensed enterobakterid võivad neid toiduallikana kasutada (Hartemink et al., 1997). *In vitro* uuringus on näiteks leitud, et prebiootikum Inuliin suurendab *Klebsiella* aktiivsust (Valyshev et al., 2000).

Meditiinikoolides ei anta arstidele piisavalt teadmisi inimese mikrobioomi ja probiootikumide kasutamise kohta, mistõttu nende kasutamine on ebapiisav. Kuigi arstide täiendkursustel ja konverentsidel on hakatud nendel teemadel loenguid läbi viima, valitsevad laialdaselt siiski valearusaamad ja ignorantsus. (Reid, 2016)

Mis juhtub maos?

Enamik mikrobioota uuringutest on keskendunud jämesoole mikrobiootale, kuna selle representatiivseks esindajaks on fekaalne mikrobioota, mida on lihtne analüüsida. Mao ja peensoole mikrobioom on palju tundmatum, kuna selle uurimine nõuab invasiivseid proovivõtu meetodeid. Mikroobide populatsioonide tihedus maos (10^2 - 10^4) ning peensooles (10^6 - 10^8) on võrreldes jämesoolega (10^{10} - 10^{11}) oluliselt väiksem. Seega tarbides probiootikume doosis 10^{10} , tekitab see märkimisväärse populatsioonide muutuse maos ja peensooles. (EI Aidy et al., 2015)

Katsetest on ilmnenu, et piimhappebakterite ellujäämine seedetraktis on tugevalt tüvespetsiifiline, kuid tulemused on erinevate indiviidide vahel sarnased (van Bokhorst-van de Veen et al., 2012). Edetabeli kõrgeimatel kohtadel on *B.animalis*, *L.casei*, *L.rhamnosus* ja

L.plantarum. (Oozeer et al., 2006) Loomkatsed on näidanud, et ellujäämine sõltub ka probiootikumi maatriksist, mao pH-st ja kokkupuuteajast (Derrien and van Hylckama Vlieg, 2015). Teadlased on arvamisel, et inimpäritolu tüved elavad liikumise läbi mao paremini üle (Dunn et al., 2001, Thakur et al., 2016).

Kuidas probiootikumid töötavad?

Sissesöödud bakterid võivad mõjutada alalisi kogukondi soolestikus läbi vähemalt kolme erineva mehhanismi:

- a) **Troofilised vastasmõjud.** Probiootikumid soodustavad asukate kasvu, varustades neid kasvusubstraatidega. Kasvusubstraatideks võivad olla nii piimhappebakterite elutegevuse käigus tekkivad ained nagu atsetaat, laktaat ja propionaat kui ka bakterite lagunemisel neist vabanevad suhkrud, aminohapped, siaalhapped ja sulfaadid. Mõned bakterid toodavad ka kasvufaktoreid ja vitamiine ning teatud bakterid võivad stimuleerida alaliste bakterite süsivesikute metabolismi. (Derrien and van Hylckama Vlieg, 2015, Ryan et al., 2015)
- b) **Stimuleerides või inhibeerides teatud liikmete kasvu.** Probiootikumid võivad otseselt mõjutada patogeene arvukust pH langetamisega, mis kaasneb laktaadi ja lühikese ahelaga rasvhapete (SCFA) tootmisega. Patogeene aitab hävitada ka EPS-i ja bakteriotsiinide tootmine. Piimhappebakterite võimet toota bakteriotsiine on põhjalikult uuritud ning *in vitro* uuringutes on leitud, et bakteriotsiinid võivad olla laiatoimelised ja põhjustada suuri muutusi mikrobiotas. (Rea et al., 2011) Kasvusubstraatide ja elupaikade pärast konkureerimine võib samuti alandada teatud bakterite taset (Corr et al., 2009). Piimhappebakterite võime langetada pH-d soodustab butüraadi tootjate (Walker et al., 2005) ja atsetogeene (Gibson et al., 1990) kasvu. Langust butüraadi tootjate hulgas ja tõusu proteobakterite hulgas on sageli seostatud kehva tervise ja haigustega nagu IBS, põletikuline soolehagust ja tüüp 2 diabeet (Derrien and van Hylckama Vlieg, 2015). Probiootiliste bakterite poolt toodetavad vitamiinid ja metaboliidid võivad ühtede bakterite kasvu inhibeerida ning teiste oma soodustada (Derrien and van Hylckama Vlieg, 2015).
- c) **Kaudne mehhanism.** Sissesöödud bakterid tekitavad peremehe organismis reaktsiooni, mis omakorda muudab mikrobiota koostist või aktiivsust. On leitud, et osad probiootikumid suurendavad mutsiinide sünteesi (Caballero-Franco et al., 2007, Lebeer et al., 2010). Mutsiinid on limaskestas suured glükoproteiinid, mis moodustavad füüsilise barjääri soole epiteeli ja soolesiseste bakterite, patogeene ja antigeenide vahele. Seda barjääri hoitakse ka sIgA, lima ja antimikroobsete peptiidide tootmise abil. Probiootikumide tarbimine suurendab sIgA taset (Mohan et al., 2008, Wang et al., 2014) ja aitab seega tugevdada soole barjääri funktsiooni.

Tähelepanuväärseks võib pidada probiootikumide võimet omada toimet ka soolestikust väljapoole:

- a) **Läbi tegeliku organismide ülekande:** Näiteks soolest piimanäärmetesse (Reid, 2016): nimelt on leitud, et piimhappebakterite tarbimine on efektiivne alternatiiv antibiootikumidele imetavade emade rinnapõletiku korral (Arroyo et al., 2010).
- b) **Tootes molekul, mis imenduvad läbi sooleseina.** Laktobatsillide poolt toodetavad faktorid võivad kaitsta spermatooside reaktiivsete hapnikuosakeste (ROS) poolt põhjustatud rakumembraani kahjustuste eest ja aitavad seeläbi säilitada nende liikuvust (Barbonetti et al., 2013). Piimhappebakterid toodavad konjugeeritud linoleenhappeid, millel on positiivne mõju põletiku, vähi, metaboolsete häirete ja kardiovaskulaarsete haiguste korral (Passione, 2012). Lisaks toodavad nad metalle siduvaid ensüüme, mis muudab metallid inimesele kergesti omistatavaks (Calomme et al., 1995). Piimhappebakterite poolt toodetud molekulid võivad mõjutada ka tuju, vererõhku ja üldiselt soole-aju telge (Passione, 2012).
- c) **Mõjutades peremehe poolt toodetavate keemiliste ühendite taset.** Probiootikumid võivad alandada vere kolesterooli taset läbi mitmete mehhanismide: sidudes deoksükoolhapet (Guo et al., 2012), mõjutades sapisoolade hüdrolyüsi, inhibeerides teatud ensüüme ja suurendades kolesterooli assimilatsiooni (Tomaro-Duchesneau et al., 2014). Probiootikumid võivad mõjutada ka aju, tootes neurokemikaale või stimuleerides inimest neid tootma (Lyte 2011, Forsythe et al., 2014). Probiootikumide võime leevendada hingamisteede infektsioonide tõsidust ja kestust on samuti näide toimest soolestikust kaugemale (Hao et al., 2011).

Probiootikumide puhul on huvitav, et suhteliselt väike arv organisme, võrreldes mikroobide arvuga elupaigas (sooles), kuhu nad sisenevad, suudab tekitada flooras muutusi. Ka terve vagiina mikroobne analüüs on näidanud, et laktobatsille on seal hõredalt, kuid ometi piisab sellest patogeene kontrolli all hoidmiseks. Seda võib seletada väikse arvu laktobatsillide võimega konkureerida pindadel suure arvu patogeenidega (Hawthorn and Reid, 1996), mille üheks põhjuseks võib olla biosurfaktantide tootmine (Velraeds et al., 1996).

Kasutatud kirjandus

Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2010). Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases*, 50(12), 1551-1558.

Barbonetti, A., Vassallo, M. R. C., Cinque, B., Filipponi, S., Mastromarino, P., Cifone, M. G., ... & Francavilla, F. (2013). Soluble products of *Escherichia coli* induce mitochondrial dysfunction-related sperm membrane lipid peroxidation which is prevented by lactobacilli. *PLoS One*, 8(12), e83136.

Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee, K. (2007). The VSL# 3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), G315-G322.

Castex, M., Panes, J. (2012) Producing quality probiotics is an art and science. *AQUA Culture Asia Pacific Magazine*.

- Corr, S. C., Hill, C., & Gahan, C. G. (2009). Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Advances in food and nutrition research*, 56, 1-15.
- Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 429-453.
- Davis, C. (2014). Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 9-17.
- Derrien, M., & van Hylckama Vlieg, J. E. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, 23(6), 354-366.
- El Aidy, S., Van Den Bogert, B., & Kleerebezem, M. (2015). The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Current opinion in biotechnology*, 32, 14-20.
- Forssten, S. D., Sindelar, C. W., & Ouwehand, A. C. (2011). Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*, 17(6), 410-413.
- Forsythe, P., Bienenstock, J., & Kunze, W. A. (2014). Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. In *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease* (pp. 115-133). Springer New York.
- Gibson, G. R., Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., Allison, C., Segal, I., Vorster, H. H., & Walker, A. R. (1990). Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut*, 31(6), 679-683.
- Gibson, G. R. (1999). Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *The Journal of nutrition*, 129(7), 1438S-1441S.
- Guo, C. F., Zhang, L. W., Han, X., Yi, H. X., Li, J. Y., Tuo, Y. F., ... & Yang, L. (2012). Screening for cholesterol-lowering probiotic based on deoxycholic acid removal pathway and studying its functional mechanisms in vitro. *Anaerobe*, 18(5), 516-522.
- Hawthorn, L. A., & Reid, G. (1990). Exclusion of uropathogen adhesion to polymer surfaces by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 24(1), 39-46.
- Hao, Q., Lu, Z., Dong, B. R., Huang, C. Q., & Wu, T. (2011). Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*, 9(9).
- Hartemink, R., Van Laere, K. M. J., & Rombouts, F. M. (1997). Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 83(3), 367-374.
- Ibnou-Zekri, N., Blum, S., Schiffrin, E. J., & von der Weid, T. (2003). Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infection and immunity*, 71(1), 428-436.

Kavanaugh, N. L., & Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 78(11), 4057-4061.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 171-184.

Lyte, M. (2011). Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *Bioessays*, 33(8), 574-581.

Mohan, R., Koebnick, C., Schildt, J., Mueller, M., Radke, M., & Blaut, M. (2008). Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatric research*, 64(4), 418-422

Oozeer, R., Leplingard, A., Mater, D. D., Mogenet, A., Michelin, R., Seksek, I., ... & Corthier, G. (2006). Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Applied and environmental microbiology*, 72(8), 5615-5617.

Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17-25.

Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2.

Peterson, B. W., Sharma, P. K., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2012). Bacterial cell surface damage due to centrifugal compaction. *Applied and environmental microbiology*, 78(1), 120-125.

Rea, M. C., Dobson, A., O'Sullivan, O., Crispie, F., Fouhy, F., Cotter, P. D., ... & Ross, R. P. (2011). Effect of broad-and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4639-4644.

Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M., & Stanton, C. (2015). Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & function*, 6(3), 679-693.

Sanders, M. E. (2006). Summary of probiotic activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. *Journal of clinical gastroenterology*, 40(9), 776-783.

Sanders, M. E. (2008). Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46(Supplement_2), S58-S61.

Shornikova, A. V., Casas, I. A., Mykkänen, H., Salo, E., & Vesikari, T. (1997). Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *The Pediatric infectious disease journal*, 16(12), 1103-1107.

Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.

Zayed, G., & Roos, Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 39(9), 1081-1086.

Thakur, N., Rokana, N., & Panwar, H. (2016). Probiotics: Selection criteria, safety and role in health and. *Journal of Innovative Biology January*, 3(1), 259-270.

Timmerman, H. M., Koning, C. J. M., Mulder, L., Rombouts, F. M., & Beynen, A. C. (2004). Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—a comparison of functionality and efficacy. *International journal of food microbiology*, 96(3), 219-233.

Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M. L., Shah, D., Jain, P., Saha, S., & Prakash, S. (2014). Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: an in vitro investigation. *BioMed research international*, 2014.

Trenev, Natasha. Probiotics, Nature's Internal Healers. Avery: New York, 1998. P. 122 – 125.

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225-241.

Tyagi, P., Singh, M., Kumari, H., Kumari, A., & Mukhopadhyay, K. (2015). Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PloS one*, 10(3), e0121313.

Valyshev, A. V., Kirillov, V. A., Kirillov, D. A., & Bukharin, O. V. (2000). The effect of inulin on the biological properties of enterobacteria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, (1), 79-80.

van Bokhorst-van de Veen, H., van Swam, I., Wels, M., Bron, P. A., & Kleerebezem, M. (2012). Congruent strain specific intestinal persistence of *Lactobacillus plantarum* in an intestine-mimicking in vitro system and in human volunteers. *PLoS One*, 7(9), e44588.

Velraeds, M. M., Van der Mei, H. C., Reid, G., & Busscher, H. J. (1996). Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and environmental microbiology*, 62(6), 1958-1963.

Wang, L., Zhang, J., Guo, Z., Kwok, L., Ma, C., Zhang, W., ... & Zhang, H. (2014). Effect of oral consumption of probiotic *Lactobacillus plantarum* P-8 on fecal microbiota, SIgA, SCFAs, and TBAs of adults of different ages. *Nutrition*, 30(7), 776-783.

Walker, A. W., Duncan, S. H., Leitch, E. C. M., Child, M. W., & Flint, H. J. (2005). pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3692-3700.

Weese, J. S. (2003). Evaluation of deficiencies in labeling of commercial probiotics. *The Canadian veterinary journal*, 44(12), 982.