

Bioloģiski aktīvu peptīdu frakciju saturoši inovatīvi produkti no fermentētām siera sūkalām

Projekta līguma numurs: 1.1.1.3/1/24/A/169

Pārskats par periodu 9.06.2025 – 9.09.2025



Līdzfinansē
Eiropas Savienība



Nacionālais
attīstības plāns

Rūpnieciskā pētījuma pirmā apakšaktivitāte (SA1)

Mikroorganismu (MO) celmu ar augstu siera sūkalu fermentācijas spēju atlase no Latvijas Universitātes (LU) īpašumā esošās celmu kolekcijas.

Projektā izmantos oriģinālu laktozi fermentējošu baktēriju (LAB) un raugu (LAR) kolekciju, kas tiek uzglabāta LU Mikroorganismu kultūru kolekcijā (LU MKKK). Šie MO ir izolēti no rūpnieciski fermentētiem pienu saturošiem (rūgušpiens, kefīrs, jogurts) un nesaturošiem (alus, skābēti kāposti, skābbarība) pārtikas un barības produktiem, kā arī no vides objektiem (augu virsmām, sapropeļa, bitēm).

SA1 ietvarā, laika posmā no 9. jūnija līdz 9. septembrim

Pārbaudītas no LU MKKK saņemtu trīs LAB kultūras:

- *Lactobacillus acidophilus* (A);
- *Lactobacillus delbrueckii* (D);
- *Lactobacillus johnsonii* (J),
- kā arī viens LAR *Kluyveromyces marxianus* (Km) izolāts.

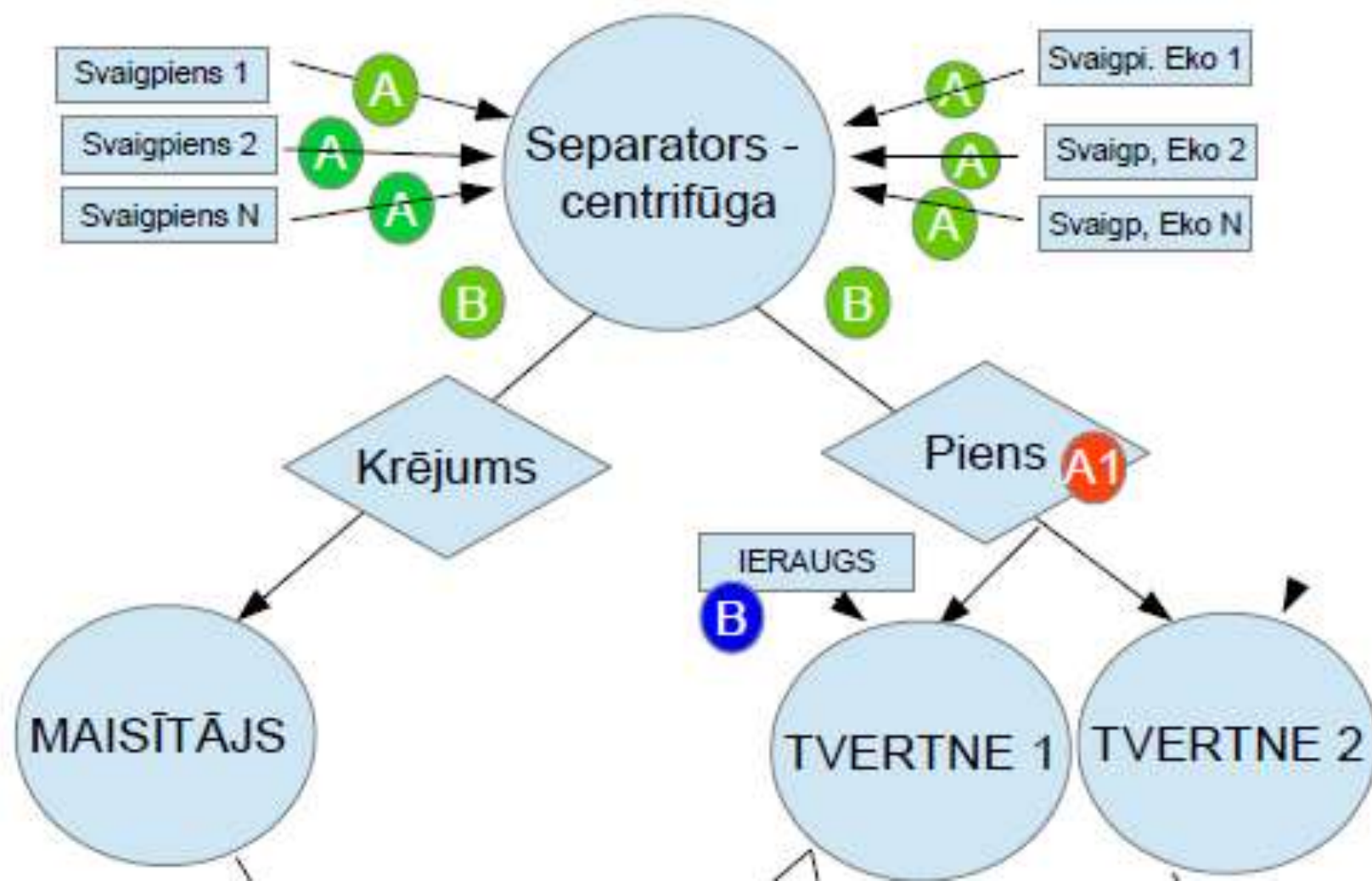
Sākotnējā skrīninga ietvarā pētīta šo MO

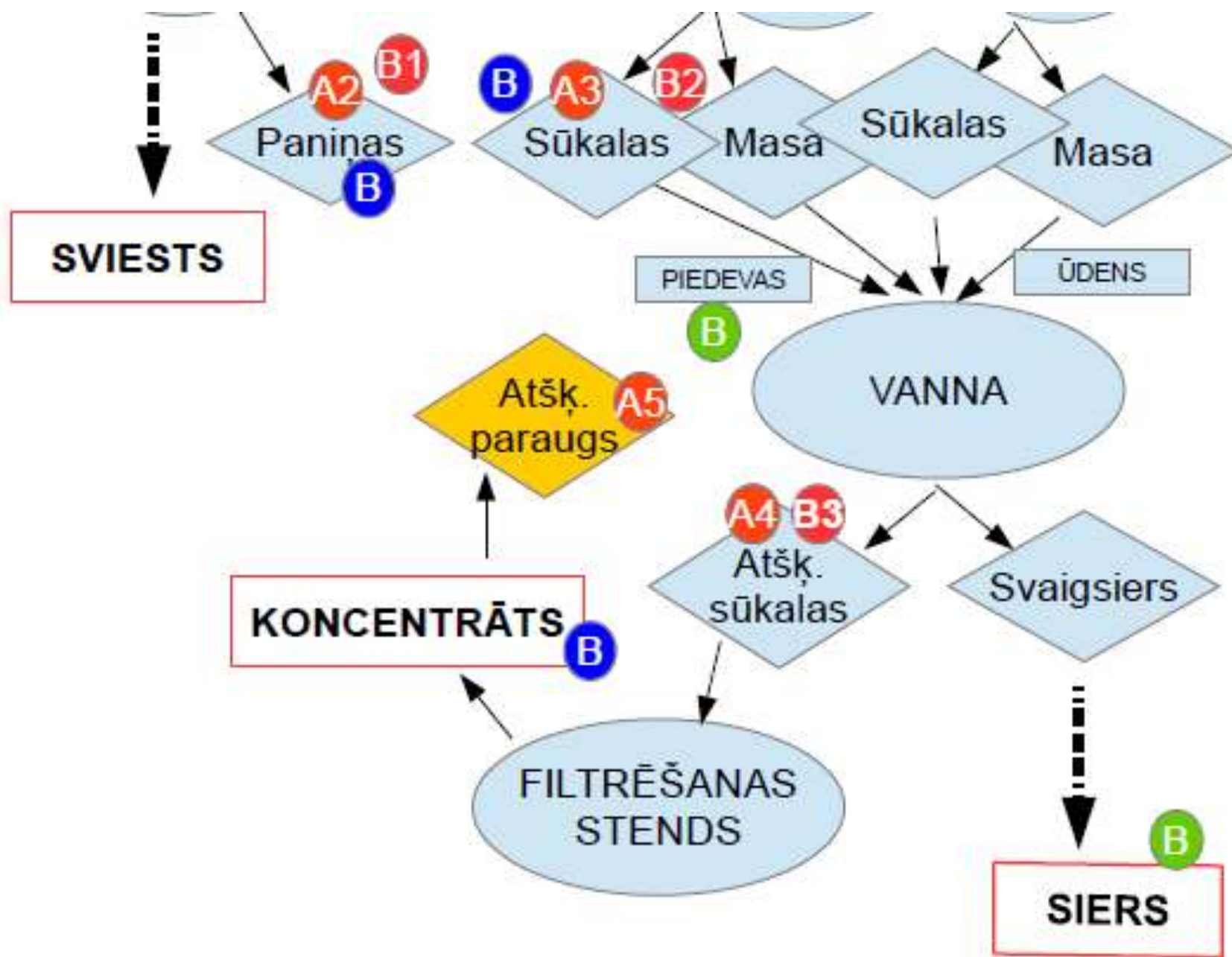
- (a) augšana uz agarizētām barotnēm homogenitātes raksturošanai un tīrkultūru iegūšanai;
- (b) skrīninga testkultūru iegūšana šķidrajās barotnēs, dziļumkultivēšanā;
- (c) spēja šķelt laktozi, izmantojot X-Gal kā hromogēna substratu un spēja šķelt proteīnu, izmantojot piena pulvera un laktalbumīna agara barotnes.

Pētīta A/S Cesvaines piens (CP) ikdienas ražošanā iegūstamo sūkalu patiju bioķīmisko īpašību stabilitāte

Piena pārstrādes shēma CP un sūkalu paraugu īpašības

Piena pārstrādes shēma CP





A/S Cesvaines piens jūlijā un augustā apstrādāto 237 SS paraugu vidējie rādītāji (Milkoscan)

Pirmās sūkalas				Otrās sūkalas				
Tauki %	Olbalb. %	Laktoze	Sausna %	Tauki %	Olbalb. %	Laktoze	Sausna %	Ierauga tips
0.2	0.8	4.7	6.5	0.1	0.6	3.5	4.8	b Vidējais
0.23	0.81	4.62	6.54	0.15	0.60	3.47	4.91	c Vidējais
0.23	0.80	4.56	6.44	0.15	0.60	3.43	4.92	cc Vidējais
0.17	0.80	4.67	6.52	0.12	0.62	3.63	5.08	dcc Vidējais
0.22	0.82	4.66	6.57	0.14	0.87	3.51	4.98	ps Vidējais
0.23	0.81	4.65	6.55	0.16	0.59	3.47	4.90	tv Vidējais
0.22	0.80	4.62	6.51	0.15	0.63	3.48	4.94	Kopējais vidējais

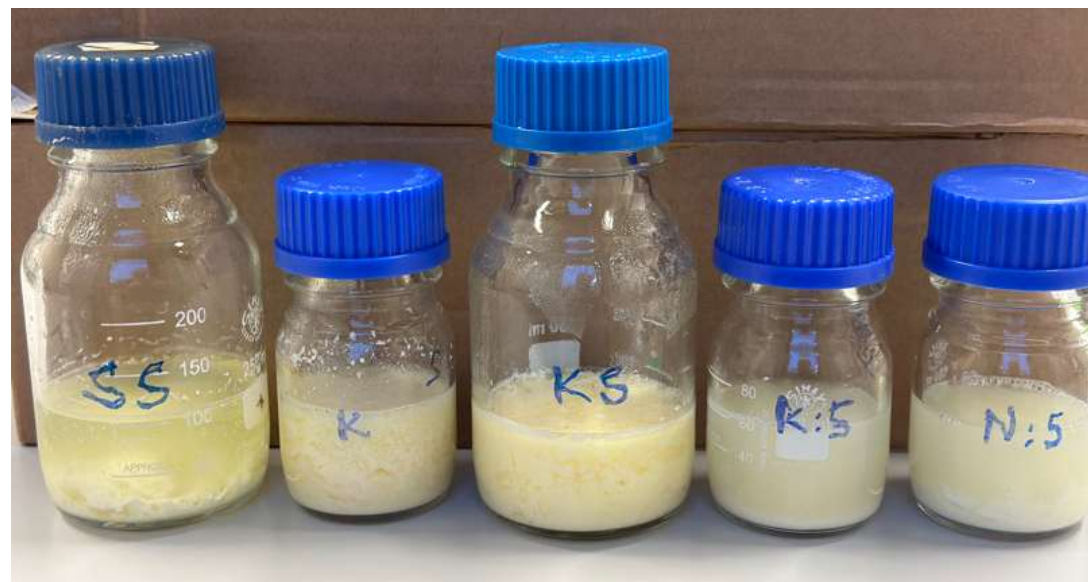
PASTERIZĒTĀS SŪKALAS						
Tauki %	Olbalb. %	Laktoze	Sausna %	pH		
0.08	0.64	3.81	5.19	6.55	Vidējais	
0.01	0.07	0.28	0.39	0.06	Standartnovirze	

Siera sūkalu paraugi, saņemti no A/S Cesvaines piens

Pirms autoklāvēšanas



Pēc autoklāvēšanas



Sīkalas stāvējušas gandrīz 2 nedēļas l-skapī (kopš 18.06)

Sūkalas un to koncentrāts vispirms fūgoti, K – koncentrāts, KS koncentrāta supernatants ,

KS – koncentrāts 5x atšķaida ar H₂O (~ =sūkalas) . nogulsnes tāpat. Pēc tam autoklāvē. Visur precipitir proteīns.

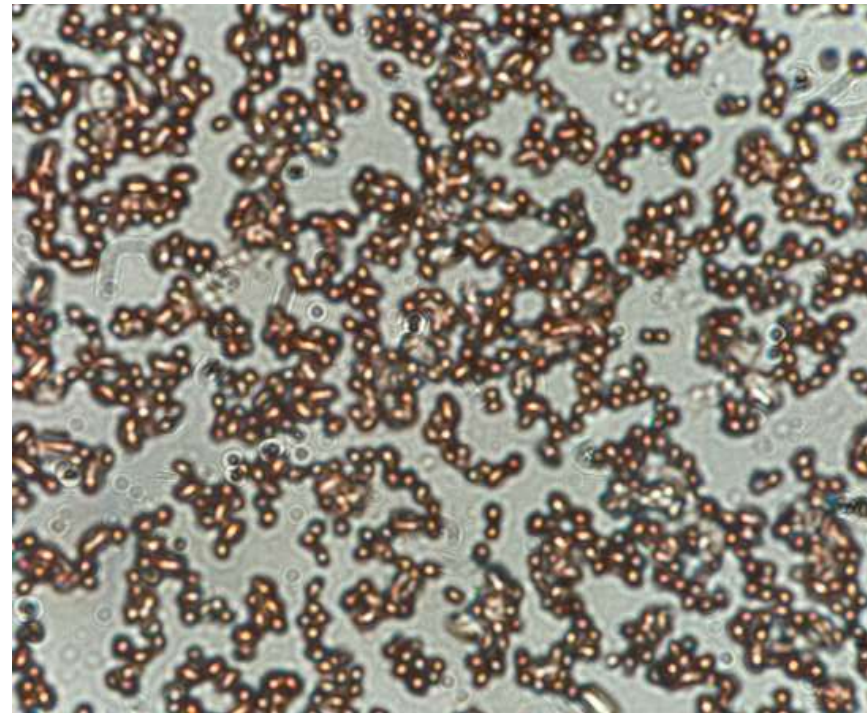
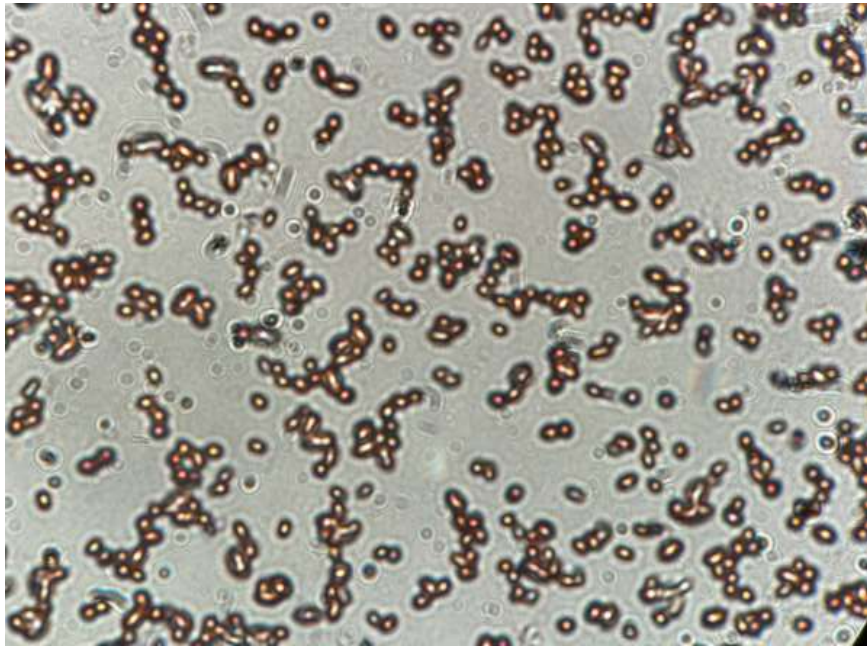
Pēc autoklavēšanas visus paraugus autoklavē, tālāk izmanto supernatantus SS (sūkalām – iezālgans)) , KS (koncentrētām sūkalām - dzintarkrša) arī N:5 un K:5 sūkalu koncentrāta nogulšņu un supernatanta atšķaidījumi ūdenī

Autklāvēta SK nogulsnēm ir patīkama, maigi saldena garša, pastoza tekstūra

Kultūras, barotnes un audzēšanas apstākļi

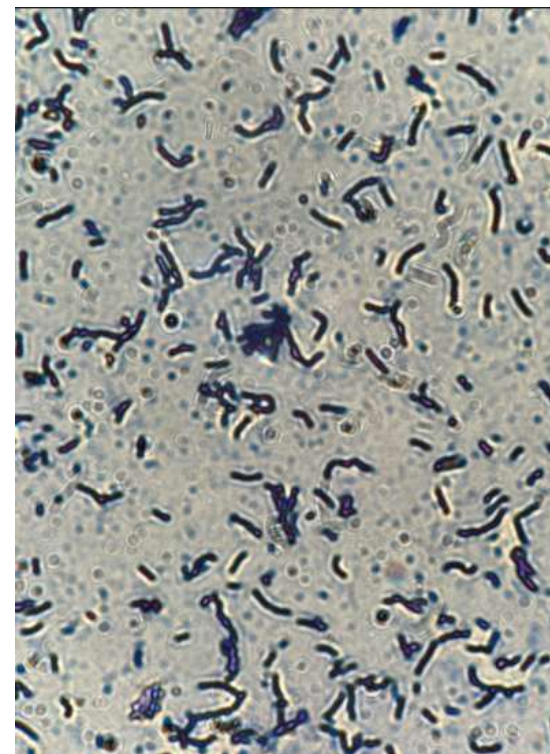
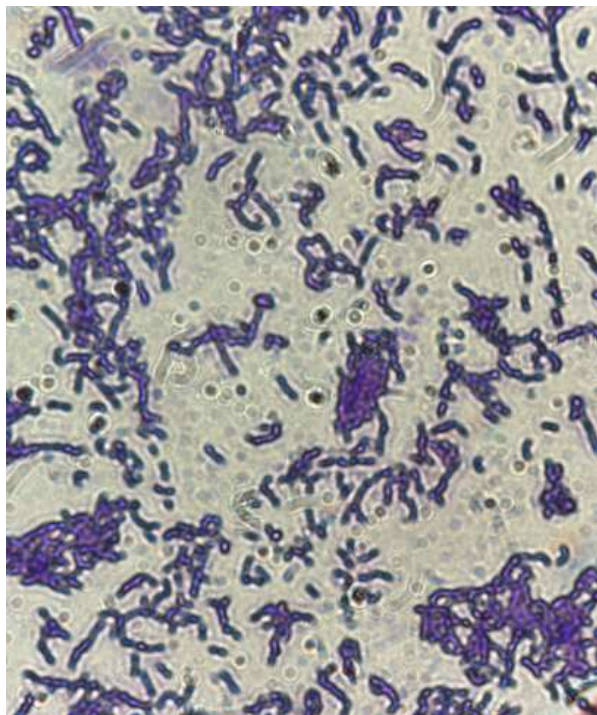
MO kultūru mikroskopija

K.m. kultūra x 400 un x1000, krāsota ar safranīnu



MO kultūru mikroskopija

A, D un J kultūras no MEF barotnes x 1000 krāsotas ar kristālvioleto



BAROTŅU VEIDI

- Šķidrās, gatavā veidā nopērkamās barotnes.
- Misas ekstrakta buljons (**ME**, Milipore, 17 g/l)
- Sojas triptona buljons (**STB**, Biolife, 30 g/l)
- **MRS** (De Man–Rogosa–Sharpe) buljons LAB kultivēšanai (Diagnostic Liofilchem, DL 29.2 g/l)

Visas barotnes sterilizē autoklāvā pie 1 atm. virssspiediena 15 min (121°C).

Lai iegūtu agarizētu barotni, buljonam pirms autoklavēšanas pievieno 15 g/l agaru, barotnes akronīmu papildina ar burtu A.

Citi ķīmiskie reaktīvi (sāļi, skābes, organiskie savienojumi), izņemot barotnes, piegādāti no Sigma-Aldrich, Millipore, Biolife vai Enola uzņēmumiem, vismaz analītikā izmantojamās tīrības pakāpē

BAROTŅU VEIDI

- **Modificētās, laboratorijā gatavotās barotnes**
- Sojas triptona buljons F (**STBF**; STB + rauga ekstrakts, 5g/l;)
- Misas ekstraksts F (**MEF**; ME + rauga ekstrakts, 5g/l; NaCl 2.5 g/l; + K acetāts, 5g/l; + K_2HPO_4 , 2 g/l; + $MgSO_4$, 0,1 g/l)
- MRS aizvietotājbarone (**RB**; kazeīna hidrolizāts, 10 g/l, laktalbumīna hidrolizāts, 5 g/l; rauga ekstrakts, 5 g/l; K_2HPO_4 , 2 g/l; Na citrāts, 1 g/; Na acetāt, 5 g/l; $(NH_4)_2SO_4$, 1g/l; $MgSO_4$, 0,1 g/l; $MnCl_2$, 0,05 g/l)

Modificētās barotnes gatavo divkāršā vai trīskāršā koncentrācijā un eksperimentos papildina ar cukuru (glikozes, galaktozes, laktozes) šķīdumiem vai sūkalu produktiem.

Iesala ekstraktu saturošo barotņu modifikācijas

- 1) Iesala ekstrakts (**IeEx**; SIA Ilgezeem, 130 g uz 0,5 l autoklavēts, tad nogulsnes nofūgotas atšķaidītas ~2x līdz s 1,028 nofiltrēte, autoklavēts **vēlreiz**
- 2) IeEx atšķaidīts uzreiz uz d=1,028 nofiltrēts autioklavēts.
- 3) **IeExA1** kā (1) tikai otrā autoklavēšanas vietā filtrēts caur 0,22 mikroniem;
- 4) **IeExN1** kā (2) pēc papīra filtrēšanas mēģināts filtrēt caur 0.22mikroniem – nekas daudz nesanāk.

BAROTŅU VEIDI

Agarizētās barotnes

Visu šķidro barotņu agarizētos variantus iegūst pirms autoklavēšanas pievienojot 15 g/l agara (Diagnostic Liofilchem, DL). Barotņu akronīmam pievieno burtu A.

Tikai agarizētā veidā izmantotās barotnes

- Piena agars MO skatīšanai (**PA**, LAB 77115, 19,6 g/l)
- MRS agars Vegitone ar bromkrezolzaļā indikatoru (MRSA-V, Milipore, 62.2 g/l)
- Vājpiena pulvera agars (**VPA**, 5% šķīdums 1.5% agarā 0.1 RB barotnē)
- Lakalbumīna agars (**LAA**, 5% šķīdums 1.5% agarā 0.1 RB barotnē)

Virsaģara barotnes

- MO (~ 1000 kolonijas veidojošās vienības, KVV) pie 42°C suspendētas 6 ml 0.8% agaru saturošā barotnē (virsaģarā), suspensija uzlieta un atdzesēta uz agarizētas barotnes virsmas

MO audzēšana: 30 °C vai 37°C temperatūrā

Dziļumkultivēšana

LAB: (a) 12 ml barotnes 15 ml koniskajos Facon polipropilēna stobros (F stobri) vai
(b) 12 ml barotnes 14 ml apaļdibena Facon polistirēna stobros (D stobri).

LAR: (a) 15 ml barotnes 50 ml koniskajos Facon polipropilēna stobros (FL stobri) vai
(b) 12 ml barotnes 14 ml apaļdibena D stobros.

Virsmas kultivēšana: 93 mm polistirēna plates (Sarsted) **Varianti**

- a) aerobi, bez gaisa piekļuves ierobežojuma (audzA)
- b) (vakuumēti, pazemināts atmosfēras spiediens iekausējot vakumplēvē ar Stollar vakuumēšanas iekārtu (**audzV**);
- c) pazeminātā O₂, paaugstinātā CO₂ klātbūtne (GazPak AZ Anaerobic Container System Sachet + Indicator, Liöfilchem)m, (**audzK**);
- d) pazemināta O₂ koncentrācija (Deoxidizer, pārtikas uzglabāšanai, 30 ml un 90 ml iepakojumi), (**audzDM** un **audzDL**).

**Augšana uz agarizētām barotnēm, tīrkultūru
iegūšana**

LAB tīrkultūru iegūšana

No LU MKK saņemtajiem paraugu viendabīgumu pārbauda uz agarizētas barotnes iegūstot testa kultūras no atsevišķām kolonijām vai no viendabīgu koloniju kopas.

LAB audzēšanai uz agarizētas barotnes ieteicamas MRS vai leEx atvasinājumi. Orientējoši, MO augšanas intensitāti sekmē pazemināts virsmas spraigums (0,1% nejonu deterģenti, 2% autoklāvēts SSKS)

Audzējot uz virsmas pie optimāli 37°C, samazināta O₂ un palielināta CO₂ klātbūtnē GazPak katalizatora sistēmā, kolonijas izveidojas apm 48 h laikā. Līdzīgu rezultātu dod audzēšana vakuumētā sistēmā, un arī bez īpašas piekļuves O₂ ierobežošanas, kolonijas uz optimālām barotnēm izveidojas 72-80 stundu laikā.

Labākus rezultātus nekā audzēšana uz agara virsmas dod audzēšana virsagarā, kur kolonijas izveidojas apm.38 stundu laikā, vidēji vairāk un labāk sadalītas nekā uz agara virsmas.

LAR tīrkultūru iegūšana

No LU MKK saņemtajiem paraugu viendabīgumu pārbauda uz agarizētas barotnes iegūstot testa kultūras no atsevišķām kolonijām vai no viendabīgu koloniju kopas.

LAR audzēšanai uz agarizētas barotnes ieteicamas leEx atvasinājumi. Orientējoši, rauga augšanas intensitāti sekmē pazemināts virsmas spraigums, 2% autoklāvēts SSKS.

Audzējot uz virsmas pie optimāli 30°C, būtiski neatšķiras rezultāti, kurus iegūst vai nu samazināta O₂ un palielināta CO₂ klātbūtnē GazPak katalizatora sistēmā, vai audzēšana vakuumeetā sistēmā, vai arī bez īpašas piekļuves O₂ ierobežošanas. Kolonijas izveidojas apm 24 stundu laikā.

Augšana aerobi uz MRSA-V 48 h

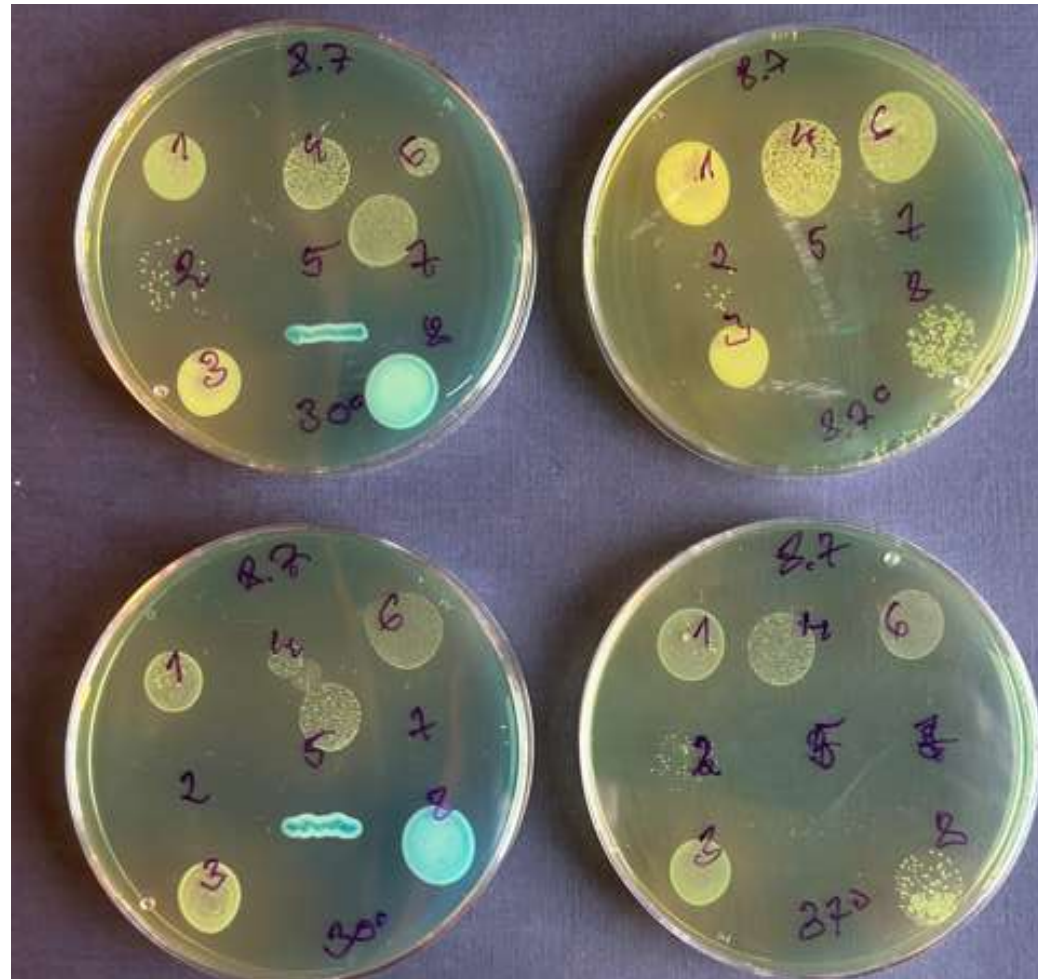
1- *L.acidophilus* (A); 2 –*L.delbruckii* (D); 3-*L.johansenii* (J) – nomazgā prim. plati ar STB (D neaig??)
4-6 – A,D un J (-2) atšķaidījums 1% NaCl; 7 – izsējums no SS (-2) atšķ, parauga (1. tvertne); 8 – *Kl.marxianus* (-2) un štrihs no atsevišķas kolonijas



Dažadas barotnes, augšana 60h,

MRSA-V
vakuums 30°C,

MRSA-V
vakuums 30°C



MRSA-V
vakuums 37°C

MRSA-V aerobi
37°C

Dažadas barotnes, augšana 60h,

MEA vakuums
30°C



MEA vakuums
37°C



leExA1A
vakuums 30°C



leEx – Barone
autoklavēta, tad
centrifugēta, filtrēta, +
agars autoklavēta otrreiz

leExA1A
vakuums 37°C



**K.m, pēc 24 un 48 h augšanas uz MEA 30°C visām platēm + X-Gal.
Sukalu extr. konc sekmē augšanu, bet beta-gal nerādās**

MEA+ SSKSup

ME

ME+ SSSKSup

ME+ SS Sup

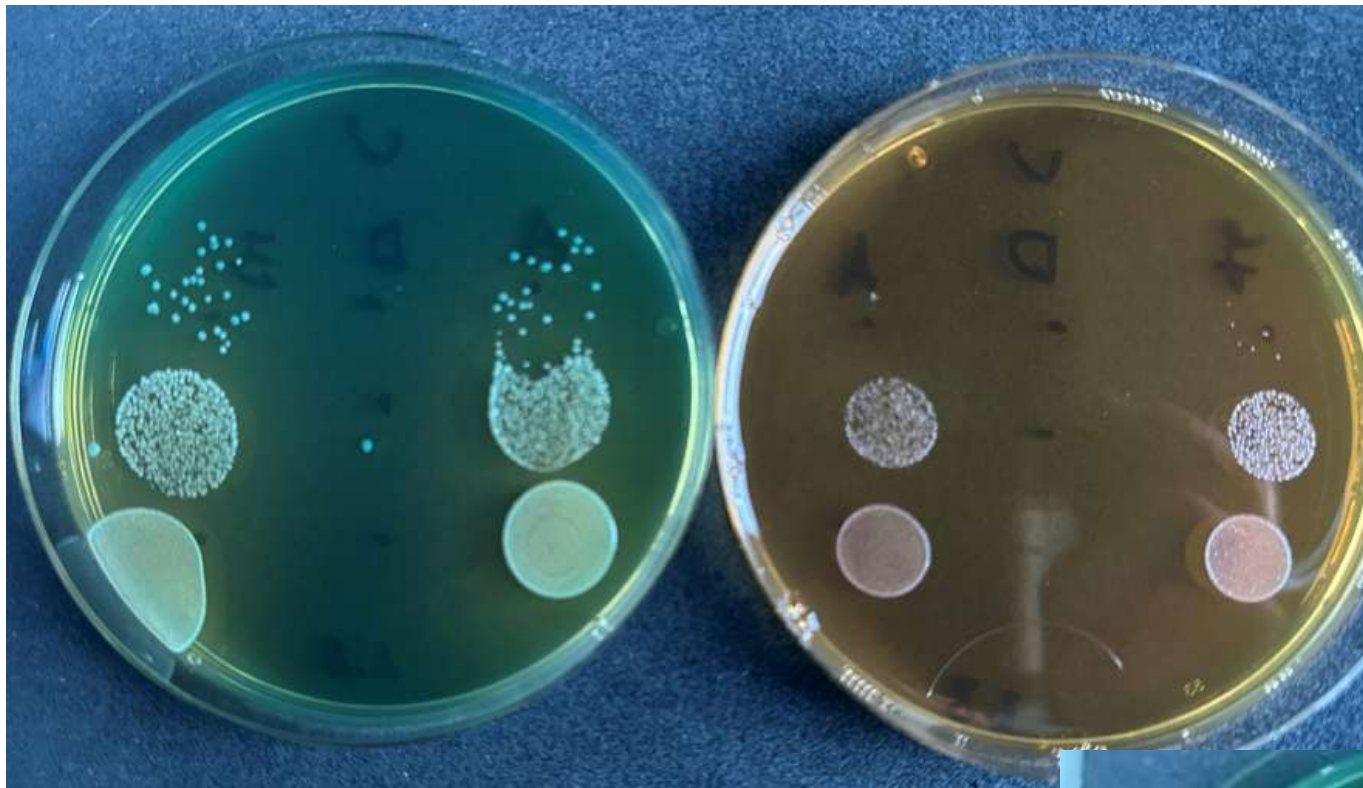


ME+ SS Sup



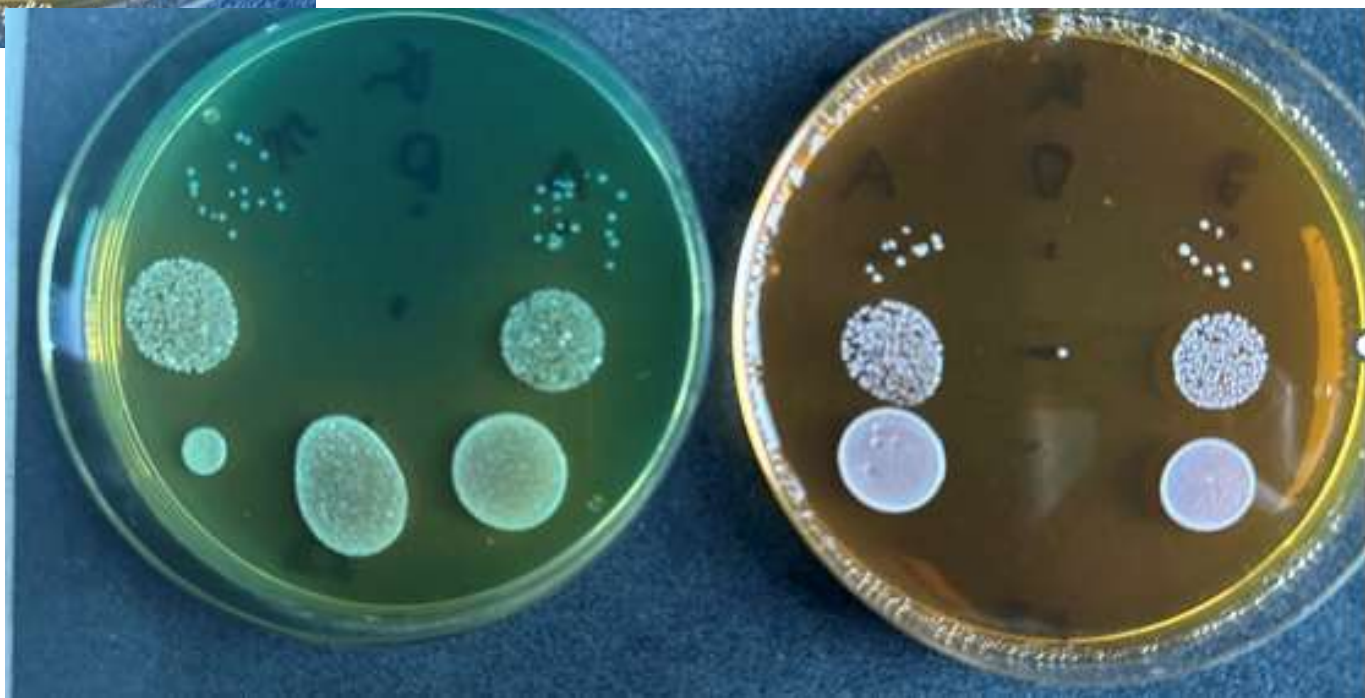
ME

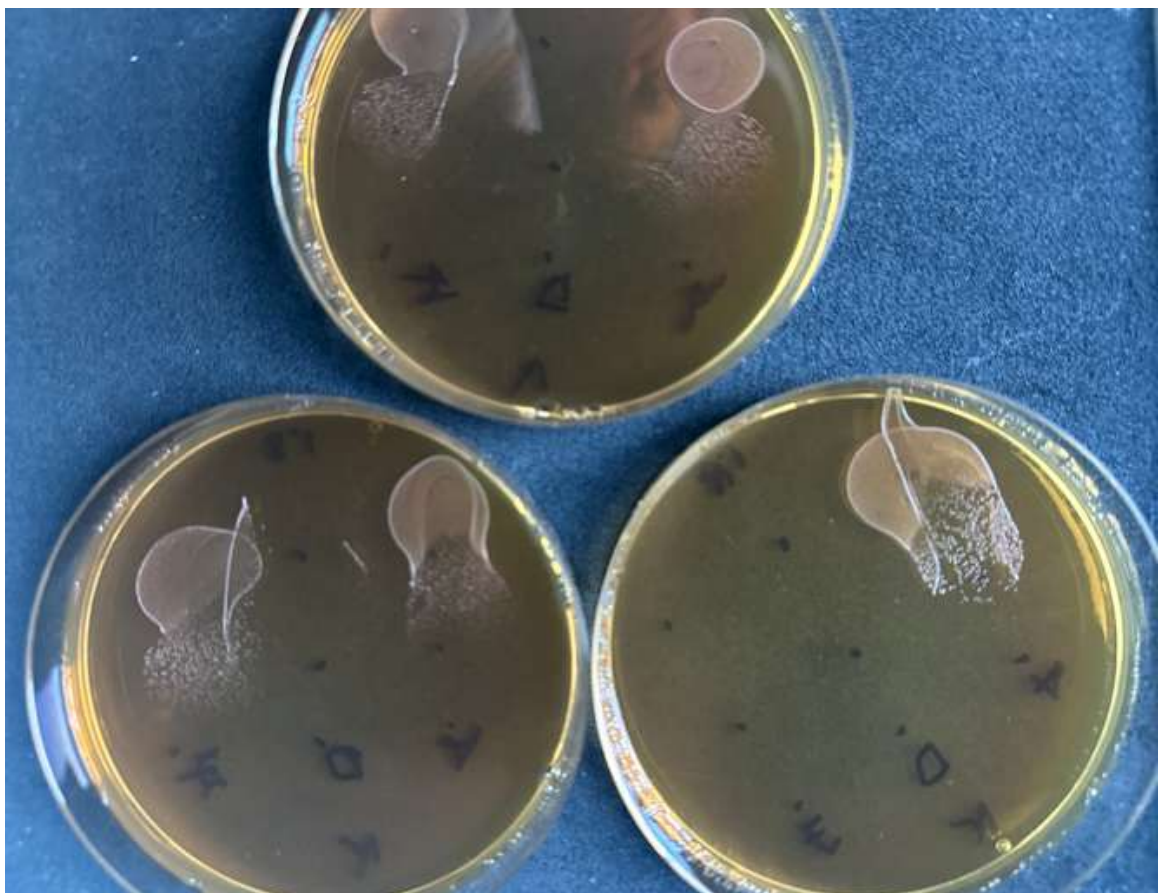
SSK Sup iegūts vispirms nofugojot 4000 c 10 min SSK,sup autoklāvēkot (121°C) un atkal fugojo. Tāpat ar sūkal\am. SSK supernatants zeltaini dzelteīgs, sūkalu = pelēcīgi zaļgans. Uz plates iesucina 0.4 ml. sēj pēc tam, kad plate 2 d bijusi ledusskapī



No suspensijām, kuras vēlāk izmanto audzēšanai, uzsēj -2; -4 un -6 atšākaidījumus – STB uz dažādām barotnēm

Augšā plates 60h MRSA-V un MRSA audzV
 Pa labi – tas pats audzK versija MRSA-v abos gadījumos aug vienādi, MRSA - it kā mazliet labāk audzK 37oC ~ 60h



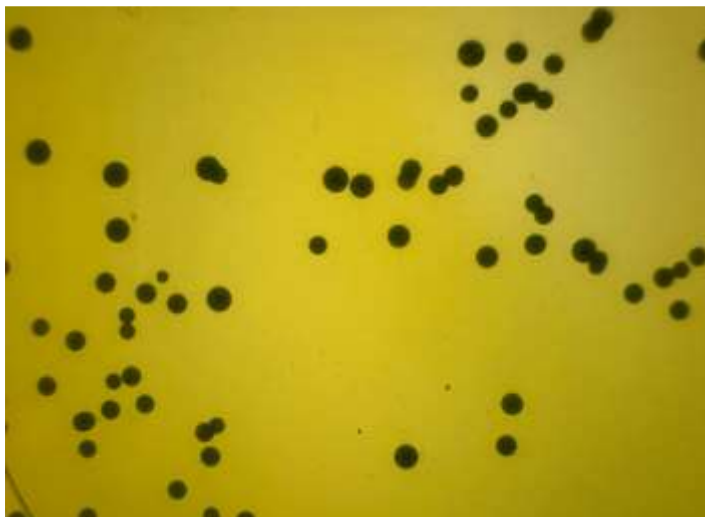
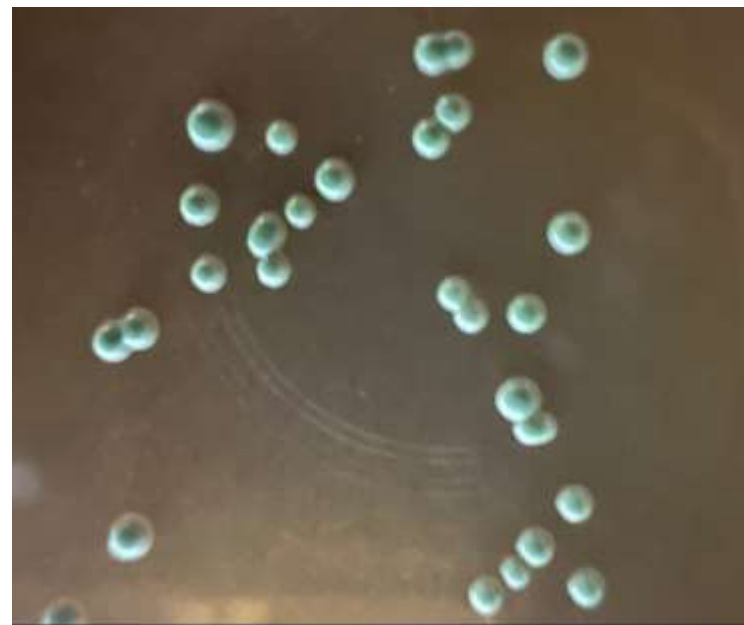


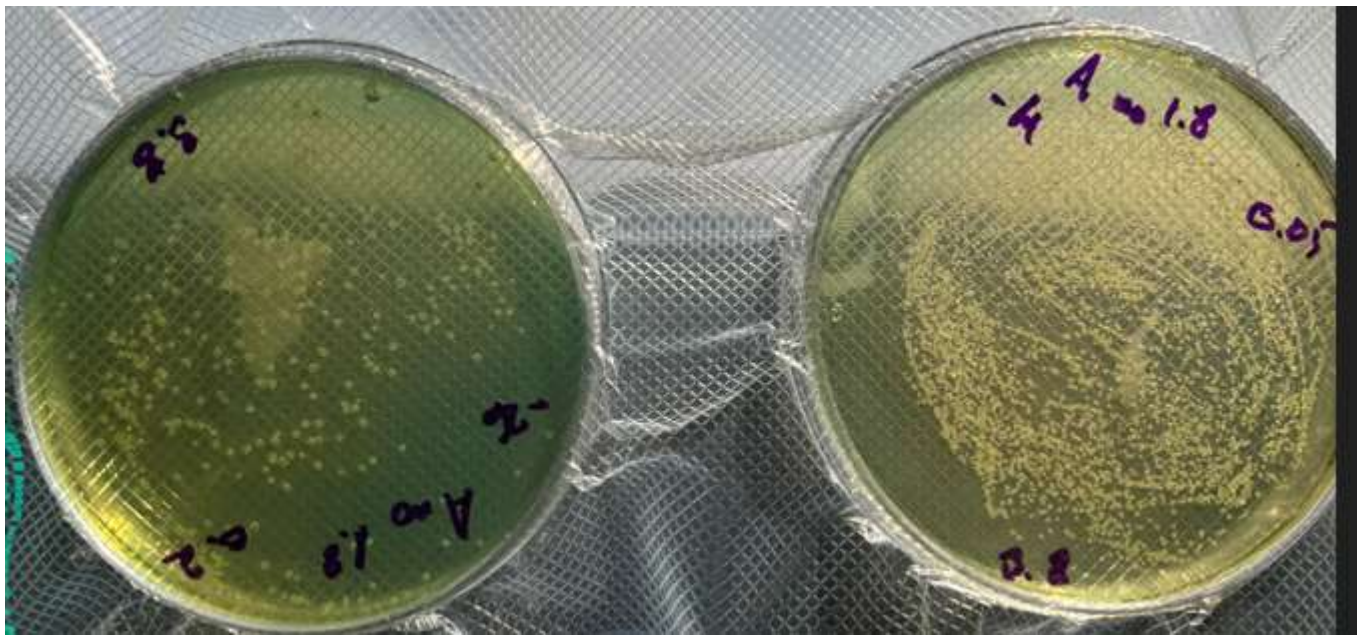
Lielie (-2) atšķaifījumi tīri labi izaug uz MRSA arī aerobos apstākļos 37oC ~ 60h
brāķēti sējumi, kur atšķaidījumu pilieni saplūst

9. varianta uz MRSA-V, audzē aerobi V un A variantos **D uzsēj no 1.08.sāktā audzēšanas eksperimenta 5.08.no**
leEx -5 02.ml, -3 0.05 ml

Pēc 4 dn izaug labi. Foto uz gaismas galda makro režīmā

D izskatās vairāk nekā A vai J mīl augt uz leEx un labāk aug aerobi nekā A vai J



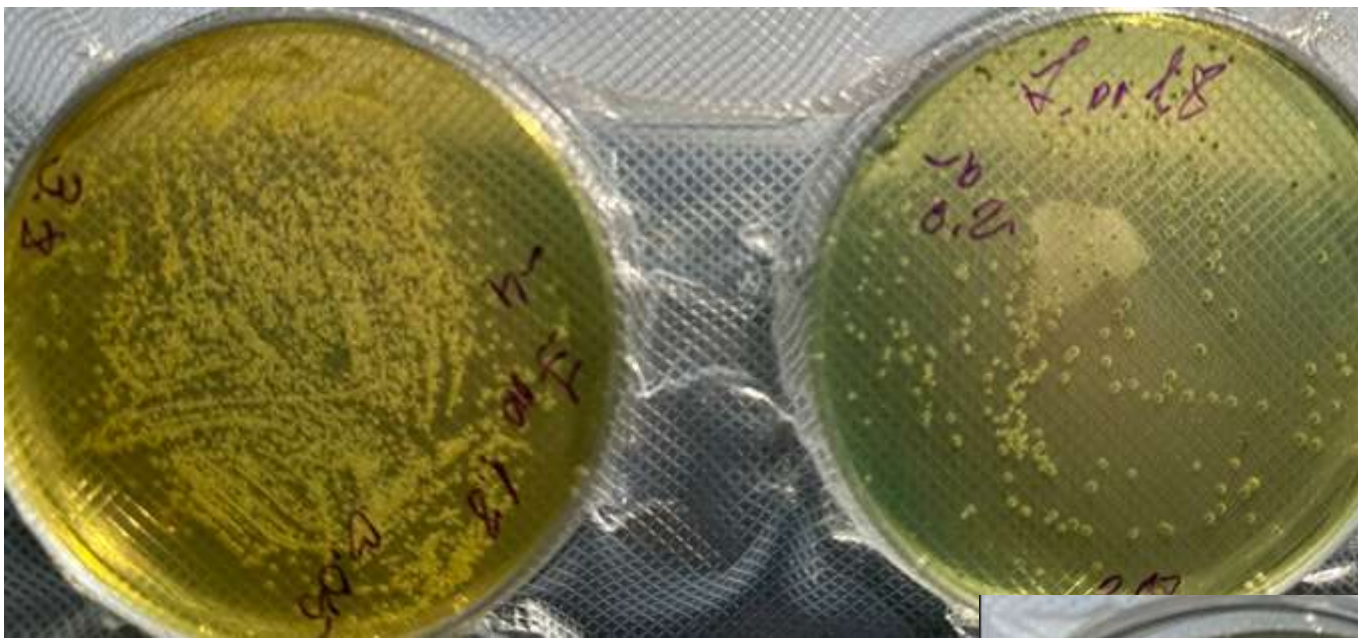


A no 1.08.taisītiem atšķaidījumiem -4 0.05 ml un
-6 0.3 ml uz MRSA-V, audzV~60h.

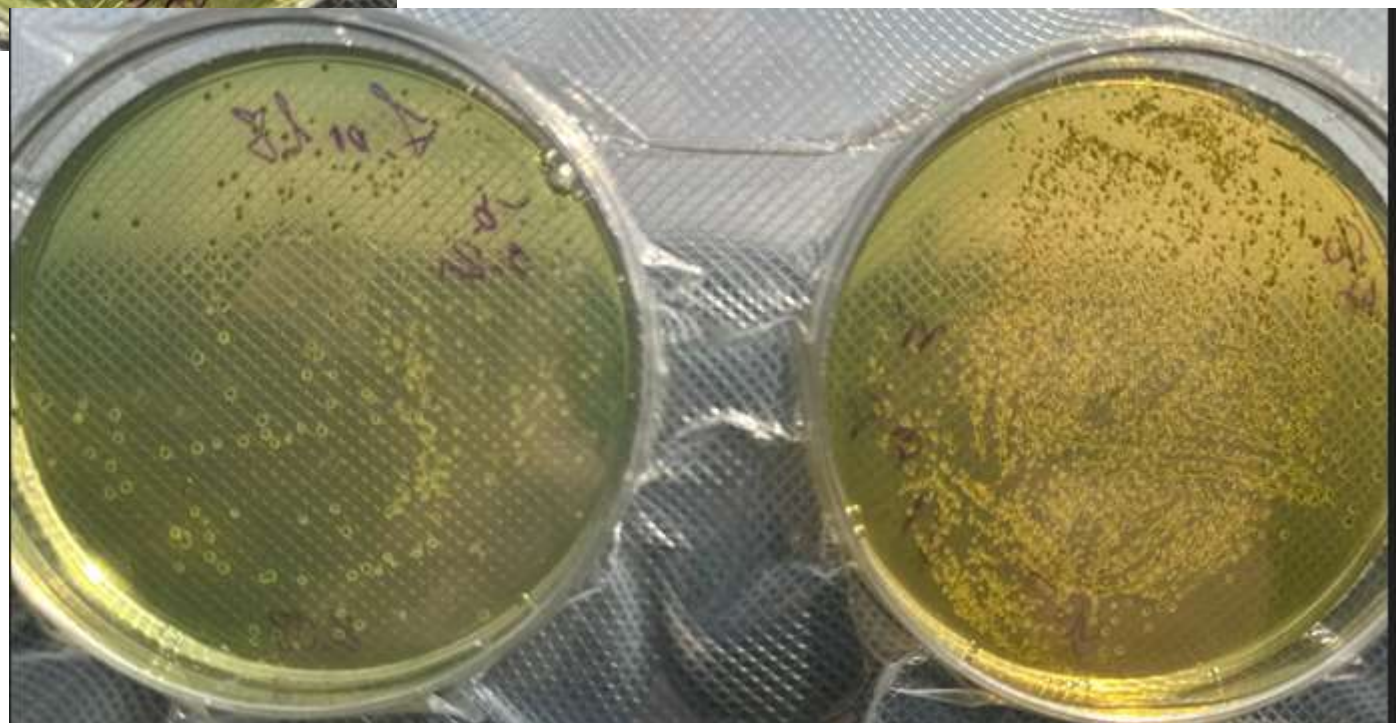
Fotografēts pret logu, neizņemot no vakuma
iepakojuma.

Izskatās tīri un atbilst ap apm 1×10^9 š/ml



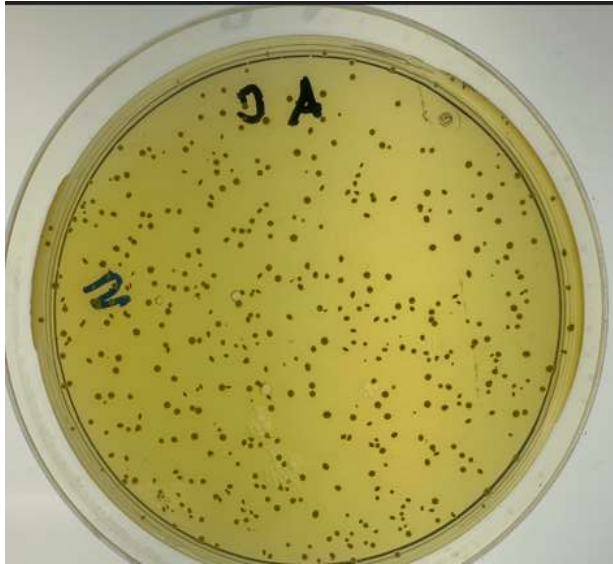


J no 1.08.taisītiem atšķaidījumiem -4 0.05 ml
 un -6 0.3 ml uz MRSA-V, audzV ~60h.
 Fotografēts pret logu, neizņemot no vakuma
 iepakojuma.
 Izskatās tīri un atbilst apm $1,5 \times 10^9$ š/ml



A kultūra virsagarā

Uz MEA ar
AzaCas,



Uz MEA ar X-Gal



Uz LAA ar X=gal

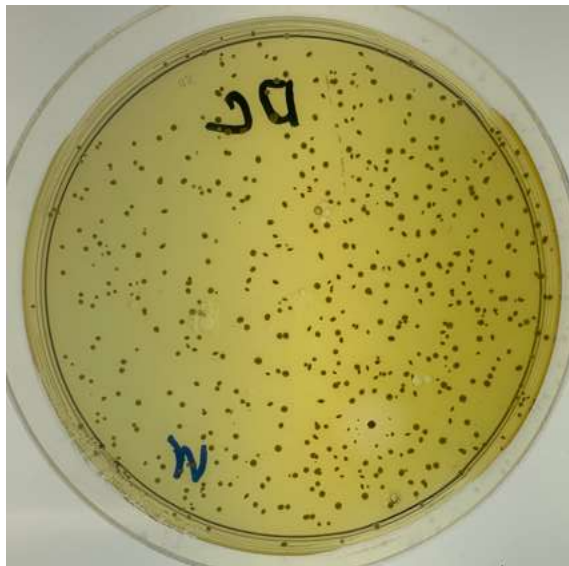


Uz VPA ar X-Gal



D kultūra virsagarā

Uz MEA ar
AzaCas,



Uz MEA ar X-Gal

Uz LAA ar X=gal

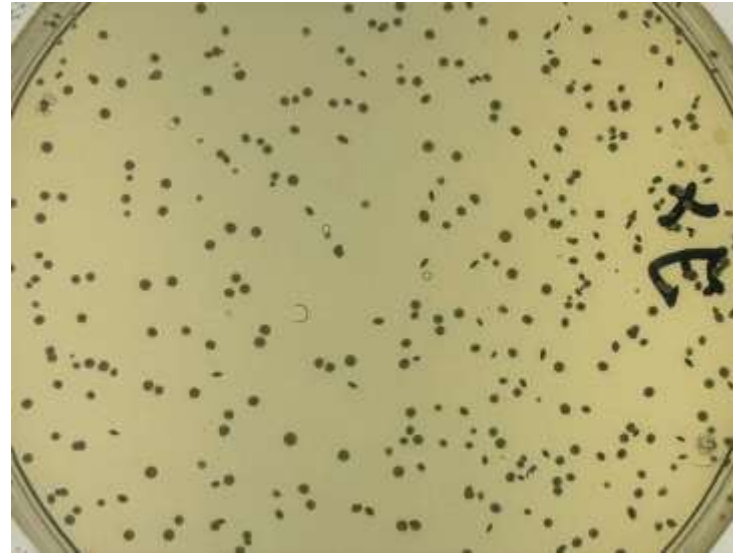
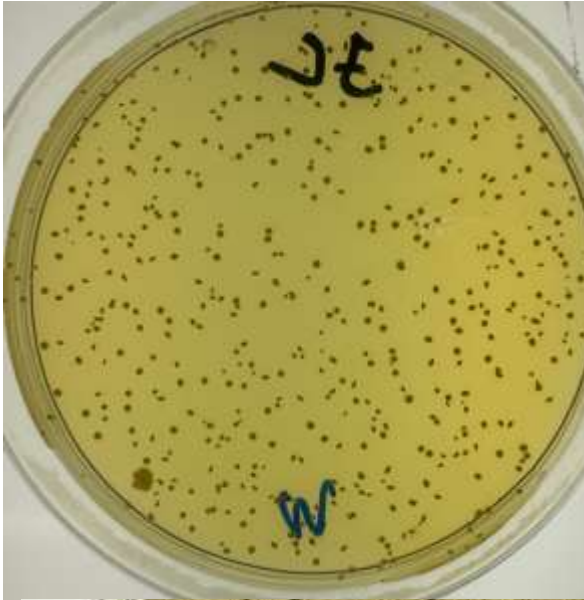


Uz VPA ar X-Gal

J kultūra virsagarā

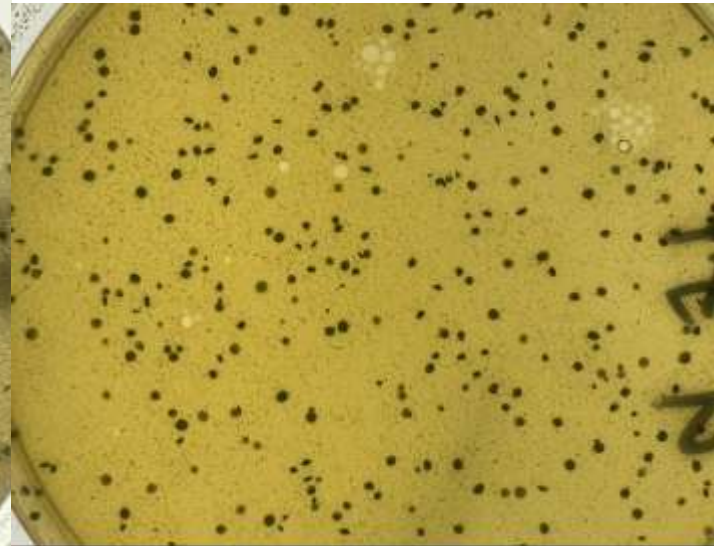
Nav labi redzams uz foto, bet zilais X-Gal šķelšanas produkts veidojas uz LAA un VPA, bet v;aji uz MEA pamaatnes

Uz MEA ar
AzaCas,



Uz MEA ar X-Gal

Uz LAA ar X=gal



Uz VPA ar X-Gal

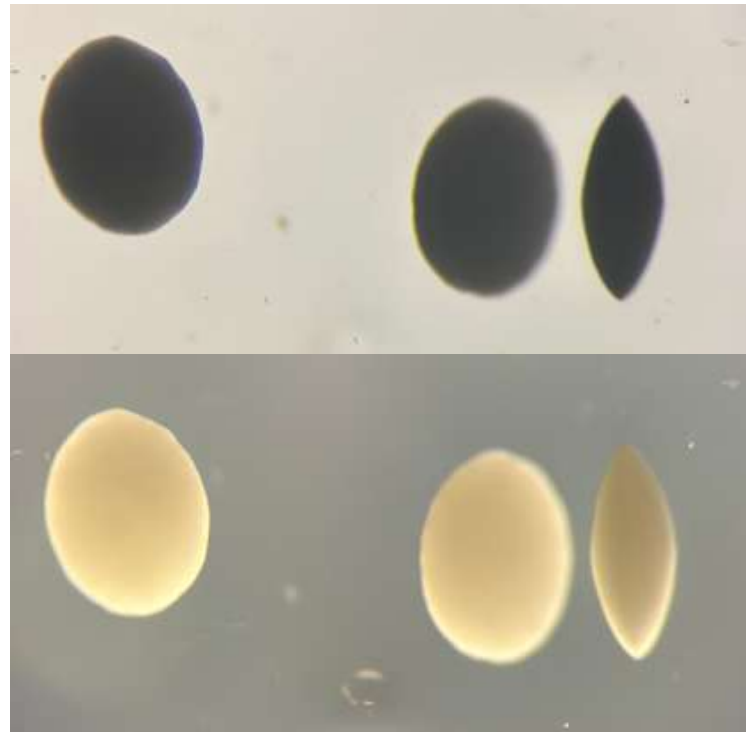
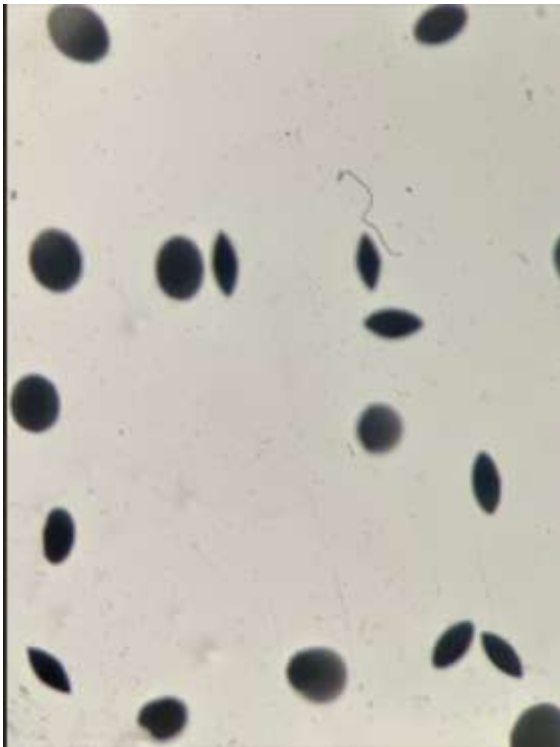
MO suspensijās, veidotas no 2 – 5. augustam atsētajās A, D un J platēs.

Audzēšana virsagarā, lai noskaidrotu gaisa/agara fāzes pārejas iespaidu

Virsagars 0.8% agars STB, Apakšā dažādas barotnes.

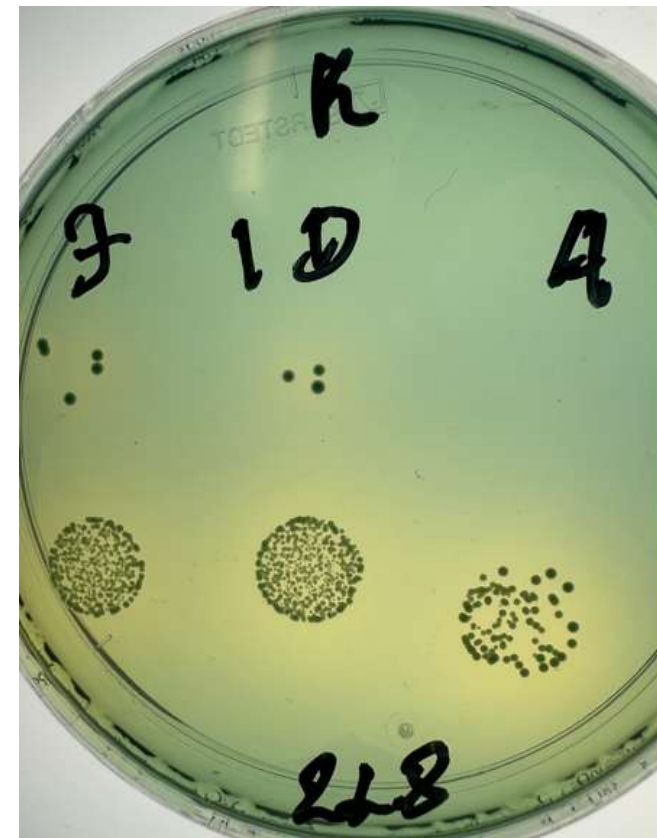
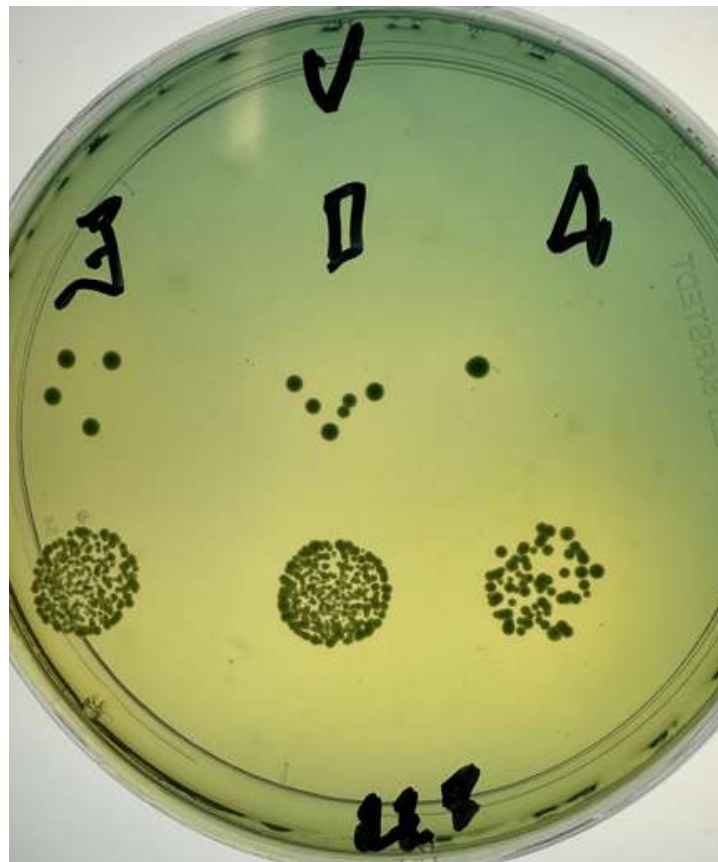
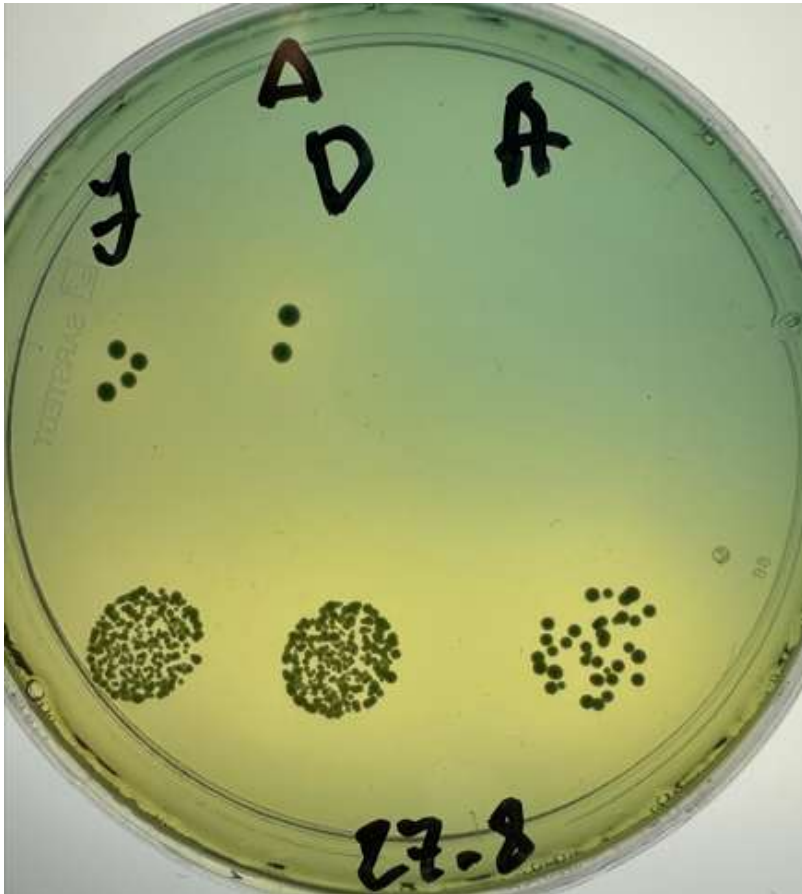
Virsagaram pievieno X-Gal vai AzaCas.

Kolonijas veidojas ! 2 dn laikā, t.i. ātrāk kā audzA versijā'. Foto no binokulārā mikroskopa.



MO suspensijās no iepriekšējā audzēšanas eksperimenta RB+ glikoze stobriem

:Pa 10 ul -6 un -4 atšķaid audzēts uz MRSA-V aerobi (A). vakuumā (V) un ar katalizatoru (K) 3 diennaktis 37°C



Skrīninga testkultūru iegūšana un īpašības

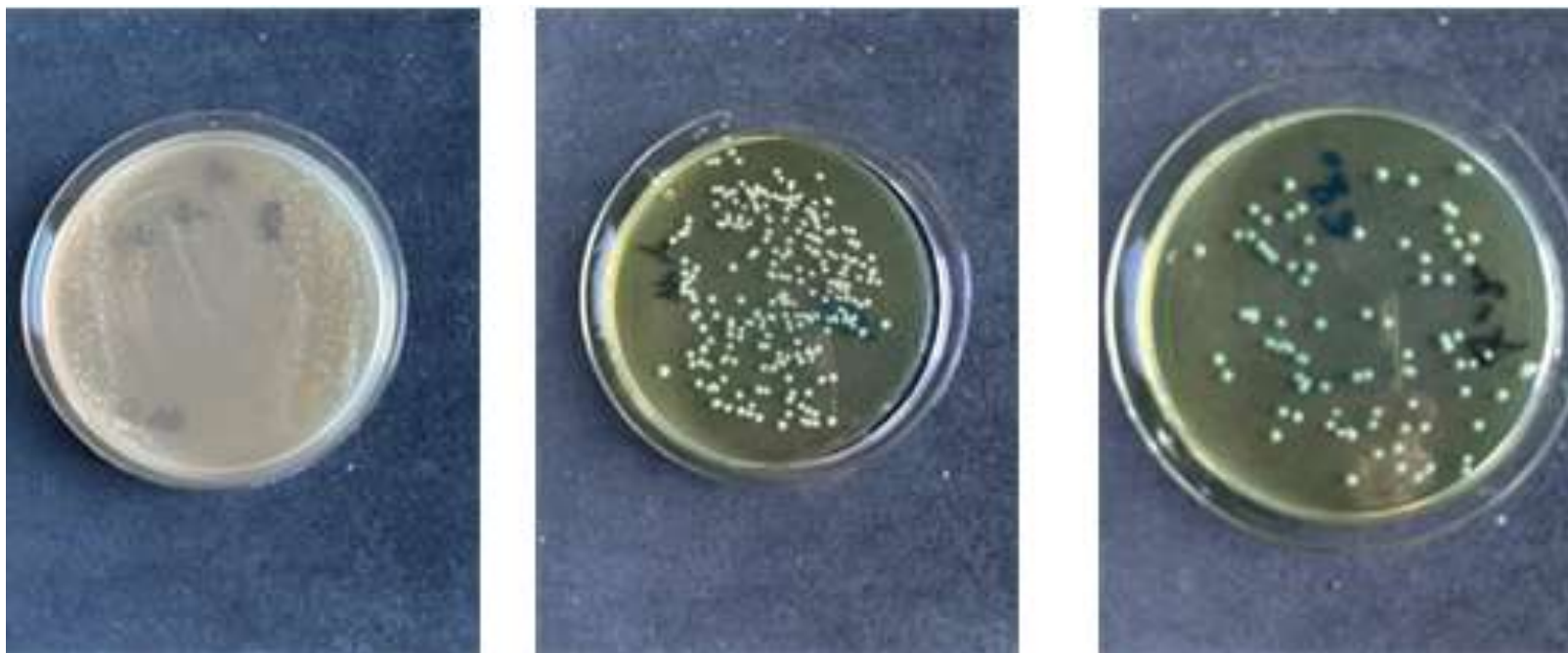
LAB un LAR skrīninga testkultūru iegūšana

LAB testkultūru audzēšanai ieteicami 37-40°C. neaerēta dziļumkultūra RPB barotnē ar 2% glikozi (Gli).

Maksimālo OD kultūras sasniedz apm.24 stundu laikā neatkarīgi no izmantotā cukura avota. Ar galaktozi (Gal) MO pirmo 12 stundu kultūras aug lēnāk nekā Gli, taču vēlāk OD izlīdzinās. Laktoze (Lak, 2-5%) un sūkalu piedevas dod 2-3 x mazāku OD galarezultātu nekā Gli, SSKS frakcija, kur Lak koncentrācija sagaidāma ap 10-12% vēl vairāk ierobežo, taču pilnībā neaptur augšanu. Prekultivācija ar Lak neuzlabo augšanu Lak klātbūtnē nākamajā augšanas ciklā. Izmantojot Gli un Gal barotne paskābinās līdz apm pH3,5-4, ar pārejiem cukuru avotiem paskābināšanās ir 1-1,5 pH vienības no sākotnējā pH6,5-7.

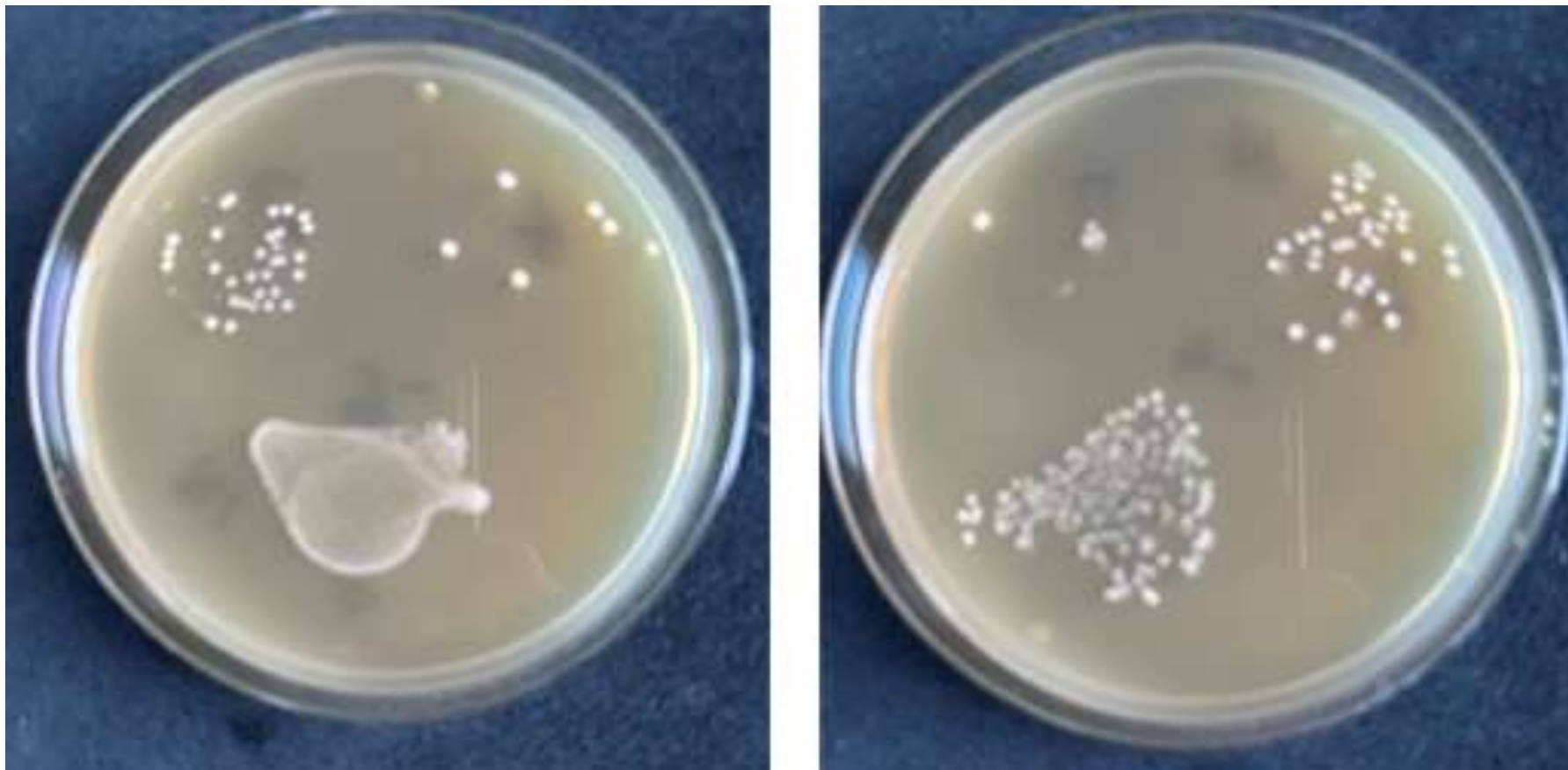
LAR testkultūru audzēšanai ieteicami 30°C. pie 100 rpm uz laboratorijas kratītāja aerēta dziļumkultūra leEx barotnē. Maksimālo OD kultūras sasniedz apm.38-48 stundu laikā. Barotne paskābinās līdz apm pH4,5-5.

Audzēšana dziļumkiulūras Falcon koniskajos un apaļdibena stobros,
izejas materiāls – koloniju suspensija (susp.) un atsevišķas kolonijas (VK)



D kultūras suspensiju taisa STB no leExA1A plates, OD590 D stobrā – 1,3
A un J suspensijas – no MRSA-V platēm OD590 D stobros abos >2

Audzēšana dziļumkiulūras D stobros stobros,
izejas materiāls – koloniju suspensija (susp.) un atsevišķas kolonijas (VK)

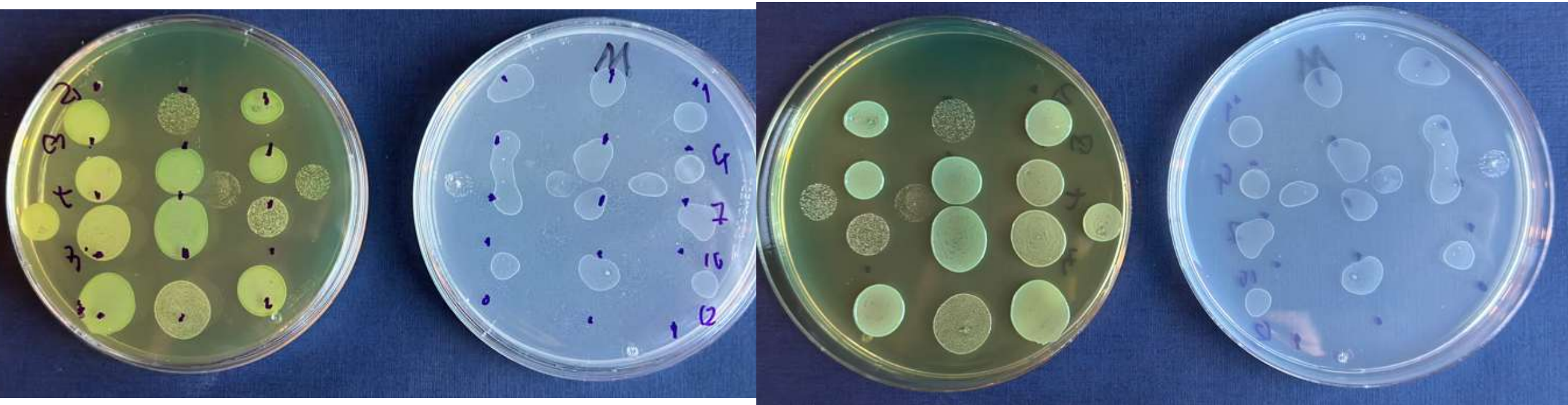


Atsevišķas kolonijas ņem no leExA1A barotnēm. D – no plates pa labi augšā
A un J no plates pa kreisi (vairākas kolonijas, uz platēm sēti visu trīs celmu atšķaidījumu pilieni).

Audēšana dziļumkultūrās F un D stobros

ME un četrās leEx modif. barotnēs 60 h 37°C augušās A,D,J kultūras pa 15 ul neatšķaidīts uz MEA un MRSA-V + 0,4 ml SSK autokl. supernatants BEZ X-Gal

60 h 37°C vakuummaisi izaug uz MRSA-V labi, uz MEA vāji, bet ir



Augšanas eksperiments, 1.-3.augusts, 2025.

Barotnes veids, izsējas apjoms un augšanas ātrums

Augšanas dati		20h	2.08	40h 3.08				
Sēts	Barotne	#	A	D	J	A	D	J
Susp.	STB	1	1.35	0	1.35	NN	0	NN
Susp.	STBF	2	>2	0.13	>2	NN	1.12	NN
Susp.	MEF	3	>2	0.14	>2	NN	1.46	NN
Susp.	leEx	4	>2	0.19	>2	NN	0.06	NN
VK	STB	5	0.91	0.41	0.71	1.07	0.92	1.36
VK	STBF	6	1.11	0.73	0.45	1.82	1.65	1.96
VK	MEF	7	1.03	0.03	0.85	1.78	0.02	1.9
VK	leEx	8	0.6	0.66	++	1.26	1.35	~++

Uzsējot – 1 ml suspensijas dod A un J OD590 ~ 0.3, D – apm. 0.1

D stobrus var mērīt pa taisno MPW colorwave spektrometrā, F stobru, kur aug 8J versija: uz aci

NN – noņemts. Sarkanie stūrīši – mērīts pH, kur aug glikozes klātbūtnē – krīt līdz 3.5

Pamatos, pie normālas, pat nelielas, izsējas augšana beidzās 24. h laikā

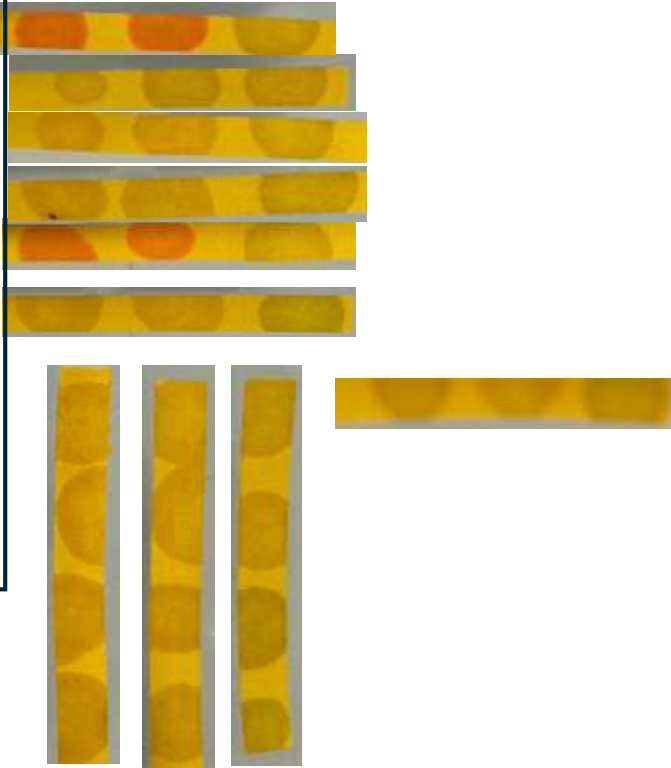
3.08. A un J uzsēj no 1.08.taisītiem atšķaidījumiem -4 0.05 ml un -6 0.3 ml uz MRSA-V, audzē vakumā

Augšanas eksperiments, 4.-5.augusts, 2025.

Barotnes sastāvs un piedevas

D stobri, barotnes sastāvs, ml					OD590 12h	
	2x MAF	Cukurs	Tilp, ml	H2O	A	J
#1	6.4	glik 20%	1.2	4.4	2,00	1.96
#2	6.4	lakt 10%	4.1	1.5	1.16	0.84
#3	6.4	lakt 10%	4.1	1.4	1.45	1.83
#4	6.4	lakt 10%	4.1		1.11	0.89
#5	6.4	gal 20%	1.2	4.4	1.18	1.84
#6	6.4	SS	5.6		0.96	1.07
#7	6.4	SSKS/5	5.6		1.09	0.99
#8	6.4	SSKN-5	5.6		0.95	1.04
#9	6.4	SSK	5.6		0.76	0.68
#10	6.4	SSK	2.8	2.8	1,00	1.16

pH izmaiņas



Sēj pa 0,1 ml no 1.08 taisītās suspensijas Sojas buljonā
#3 pievienoti).1 ml 20% glikozes – neliels stimulējošs efekts
#4 pievieniti 1,6 ml LaBH, 40 g.l; (8x), efekta nav
Pēs 40 h mērīti barotņu un attēcīgo kontroļu pH: ņemti 3 ul uz universālā indikatorpapīra.
Redzama ievērojama paskābināšanās A un J augot uz 2% glik vai gal saturošas barotnes

Augšanas eksperiments, 5.-8.augusts, 2025.

Barotnes sastāvs, laktozes koncentrācija un enzīmu aktivitāte

Uzsēšanai izmanto atliekas no augusta sākuma suspensijām no p A un J platēm,- pa 0,1 ml

5. augusts. pirmie mērījumi 6. augustā. uz Xgal un AzCas platēm sēj 8.08

	18 h						
	Bāze	Cukurs	ml	H2O ml	A	J	K
#1	4	glik 20%	1.2	7	2	2	0
#2	4	galakt 20%	1.2	7	2	2	0
#3	4	lakt 10%	1.2	7	0.75	0.72	0
#4	4	lakt 10%	2.4	5	0.86	0.9	0
#5	4	lakt 10%	4	4	0.98	0.81	0
#6	4	lakt 10%	8	0	0.86	0.93	0
	42 h						
	Bāze	Cukurs	ml	H2O ml	A	J	K
#1	4	glik 20%	1.2	7	2	2	0
#2	4	galakt 20%	1.2	7	1.97	2	0
#3	4	lakt 10%	1.2	7	0.9	0.82	0
#4	4	lakt 10%	2.4	5	0.75	0.8	0
#5	4	lakt 10%	4	4	0.77	0.81	0
#6	4	lakt 10%	8	0	0.85	0.87	1.35 ??

Augšanā faktiski viss notiek pirmajās 18 h

6. paraugā infekcija ir tikai kontrolē

Augšanas eksperiments, 7.-8. augusts, 2025.

Vai iespējams inducēt ar SS un SSK izmantpšanu ar ugšanu laktozes barotnē

Uzsēšanai izmanto 0.5 ml suspensijas no iepriekšējās dienas kultūrām #1 un #5 (no Glik = 1-4 un Lact =5-8)

K.m. - no mēnesi vecas kultūras leEx baronē (#1-4; mikr. bildes) un šūnu susp. no štrihiem uz ME plates (#5-6)

	18 h							30oC	
	3xMEF	Cukurs	ml	H2O ml	sēja	A	J	K.m	p»H:Km, A,J, K
#1	4	glik 20%	1.2	6	0.5	1.53	1.63	1.68	
#2	4	lakt 10%	7	0	0.5	0.76	0.83	0.98	
#3	4	SS	7	0	0.5	1.13	1.19	0.97	
#4	4	SSK	7	0	0.5	0.95	0.93	0.9	
#5	4	glik 20%	1.2	6	0.5	1.5	1.36	0.82	
#6	4	lakt 10%	7	0	0.5	0.86	0.66	0.67	
#7	4	SS	7	0	0.5	1.03	1.12	0.58	
#8	4	SSK	7	0	0.5	0.97	1.18	0.6	

Tālāk aug 20 h visi pie 37, izskatās, ka raugi turpina kustēties

Vēlreiz mēra pēc apm 40 h ledusskapī

KS paraugos uz beigām nāl klīdzi nogulsnes no 2x autokl. susp

pH indikatori pēc 18 h uzrāda nozīmīgu paskābināšanos tikai glikozes klātbūtnē (augšējie stripi).

Pāšās beigās (pēc ledusskapja) arī SSK paskābinājušās (**kontrolē- trešais punkts, raugi – 4.)**

Salīdzinot šūnu nogulšņu daudzumu mēģenē **Glikoze 2x> laktoze= sūkalas 2x > konc sūkalas**



Augšanas eksperiments, 2-3..septembris, 2025.
RE barotnes versijas - nav NaCl, iesala komponentu)

2.09		13 h				
Barotne		Piedevas		D ap	D lanc	J ap J lanc
RE+glik		0.92	1.12	1.81	1.65	
RE+lakt			0.41	0.47	0.57	0.46
2x RE	SSK S 6ml		0.67	0.74	0.69	0.51
2x RE	SSK N 6ml		0.56	0.51	0.71	0.68
		38 h				
RE+glik		>2	>2	>2	>2	
RE+lakt			0.6	0.66	0.59	0.58
2x RE	SSK S 6ml		0.77	0.97	0.75	0.82
2x RE	SSK N 6ml		0.82	0.77	0.75	0.85

	16 h		
	A	D	J
MRS	1.05	1.06	1.06
RP gli	1.43	1.59	1.53
RP lak	0.83	0.82	0.83
STB gal	1.19	0.6	0.8
MEF gal	1.34	0.74	0.87
leEx	1.01	0	0.54
	21h		
MRS	1.05	1.11	1.07
RP gli	1.57	1.74	1.65
RP lak	0.82	0.88	0.91
STB gal	1.7	1.5	1.72
MEF gal	1.33	1.11	1.34
leEx	1.33	0	1.25
	40 h		
MRS	1.27	1.22	1.23
RP gli	1.76	1.65	1.64
RP lakx	0.75	1.01	0.83
STB gal	1.51	1.63	1.78
MEF gal	1.53	1.51	1.53
leEx	1.92	0	1.73

Augšanas eksperiments, 7-9. septembris, 2025. Barotņu salīdzināšana, ir 2x autokl versijas

Suspensijas D stobros no 27.08 sētajās
30.8 fotografētās audzV plates =4 atšķ.

	1% NaCl	OD590	sēj
A	3ml	1.1	0.2
D	3ml	0.73	0.26
J	3ml	0.76	0.24

Augšanas sākuma fāzē kultūras atšķiras pēc
gaktiozes izmantošanas ātruma, vēlāk
ilīdzinās.

Enzīmi skrīninga testkultūrās

Enzīmu testi - izmantotās metodes

LAB un LAR kultūru augšanai un peptīdu frakcijas iegūšanai sūkalu barotnēs būtiskās enzīmu aktivitātes ir beta-galaktozidāze (**b-Gal**, šķel Lak par Gli un Gal) un proteāzes (**Pr**, veido peptīdus no laktalbumīna u.c. proteīniem).

b-Gal orientējoši raksturo hromogēnā substrāta X-Gal šķelšana, kas iekrāso šūnas zilā krāsā.

Pr orientējoši raksturo suspendētā proteīna šķelšana VAA vai LAA, vai arī fluorescējošā AzaCas šķelšana. Ap aktīvajām kolonijām veidojas dzidras zonas.

Testa sistēmas validē ar proteīnāzes K (ProtK) palīdzību.

Enzīmu testi - rezultāti

b-Gal

Lielāko aktivitāti visos testos uzrāda D kultūra.

b-Gal aktivitāte korelē ar kultūru augšanas intensitāti

b-Gal aktivitāti neinducē audzēšana uz laktozi saturošām barotnēm

b-Gal aktivitāte ir relatīvi vājāka ME barotnēs, salīdzinot ar MRS, STB vai RB,

Pr

Ārpusšūnas proteāzu aktivitāti ar izmantotajām metodēm neizdevās atrast nevienā no kultūrām.

ProtK parādīja, ka testsistēmas darbojas.

Barotnes dzidrināšana norāda uz proteīnu šķelšanu aminoskābēs. Peptīdu veidošanās var arī neveidot dzidrināšanas efektu. Jāpārbauda ninhidrīnu (Nh) izmantojošo testu piemērotība.

F un D stobros ME un četrās leEx modif. barotnēs 60 h 37°C augušās A,D,J kultūras pa 15 ul neatšķaidīts uz MEA un MRSA-V + 0,4 ml SSK autokl. supernatants AR X-Gal 50 ul iesmērēti platē (20 mg/ml DMSO)

No apakšas, balts fons



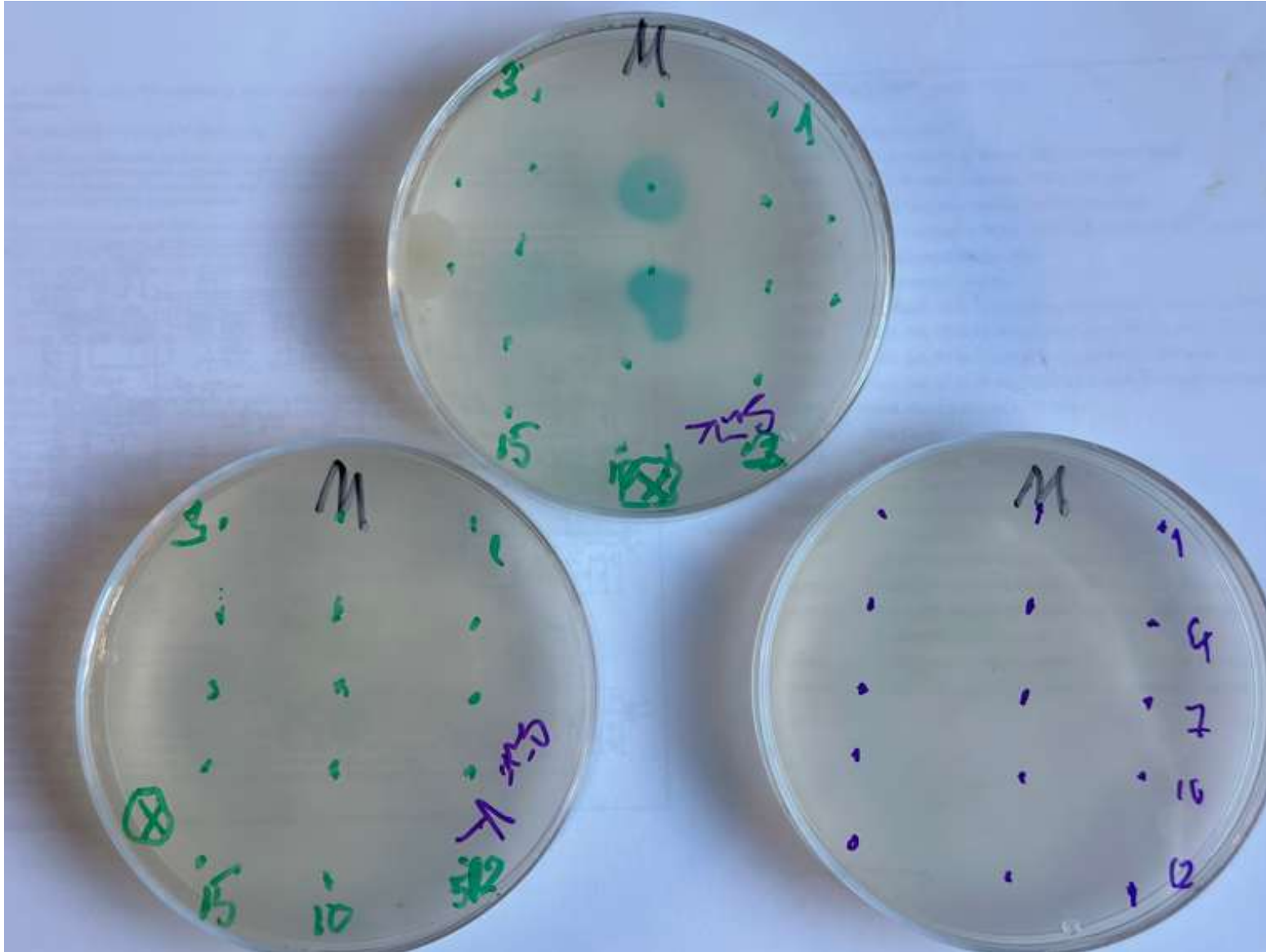
No augšas



X-Gal augšanu nekavē, sūkalu extr. autoklāvēts supernatants visnotaļ stimulē (virsmas spraigums?), tomēr beta-gal redzams tikai D kultūrā uz parastas un pēc pirmās autokl. fūgotas šķidrās leEx barotnes, augot uz ME – kur krāsa labi ieraugama

Jūlijs, ME un četrus leEx versiju exp F un D stobros.

Šajā skrīningā beta-gal aktivitāte parādās tikai D celmā, barotnēs ar, leEx, SSK supernatanta klatbutnē



8. augusts **AzaCKazeīns** - 2% K fosf buferī pH 6.9 1 ml uz plati

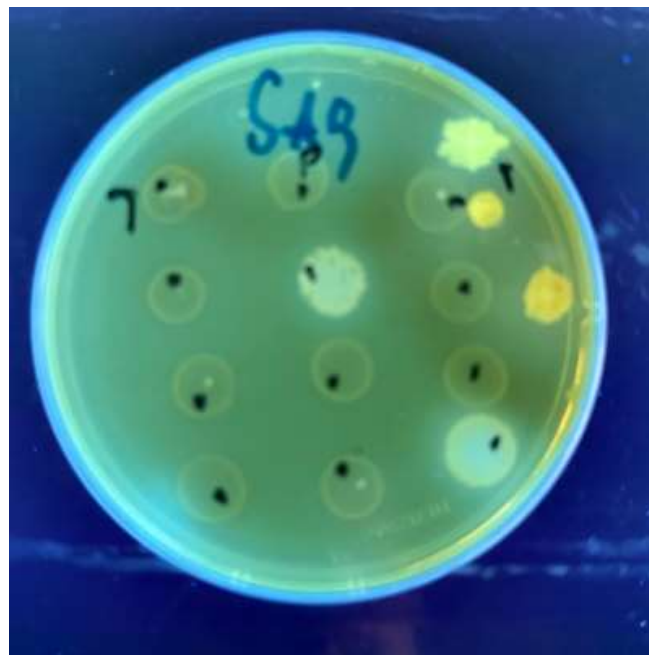
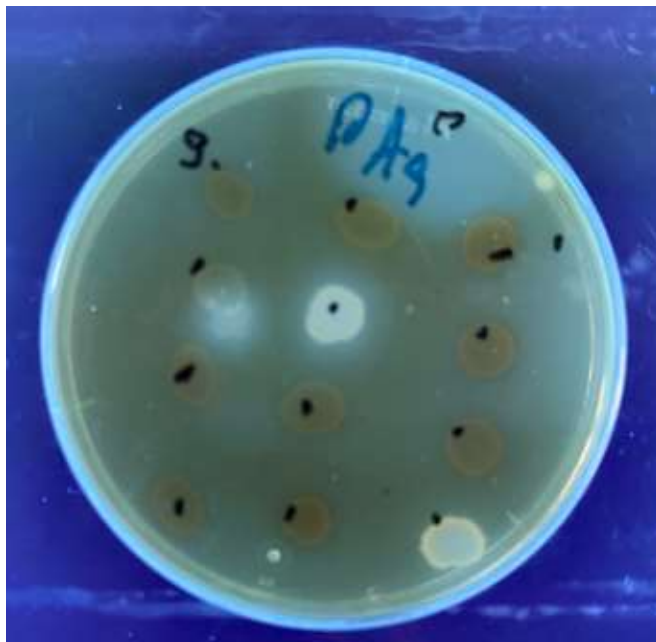
AzKaz plates augšdaļā – 2 mkl Proteināze K . Plates audzē 3 d vakumētas 37oC.

Ieleik ledusskapī 11.08. Fotografē (oto pēc ledusskapja 12.08, izņemot AzC – uz UV 526.ist. -11.08

Fotografēts ar iFonu uz UV 528. telpā caur aizsargvāku. Ir arī m/b foto no UV boksa

1-6 paraugi ar A kultūru 7 - 12, ar J. Izskatās, ka inficēti varētu būt 4. un 6. paraugs A vai arī abi 6. A un J.

Kazeīna hidrolīzes zonu ar ProT redz, ar citiem – neizskatās.



8.08. Suspensijas pa 10 mkl sēj uz baronēm arX kggal (jaunais DMSO 20 mg/ml, 100 mkl uz plati
12.08 (pēc dn ledusskapī) x-gal šķelšanas akticitāte uz fosfoimidžera plašu dzēšanas gaismas galda
Xgal plates
##1-6, A kultūra; ##7-12 – J kultūra.

Piena agars

Sojas agars (no apakšas)

Sojas agaes (no augšas, bez vāka)



Foto 12.08 uz Fosfoimidžera plašu dzēšanas gaismas galda
Xgal plates

MEFA ar 5% laktozi



MEFA ar 2% glikozi

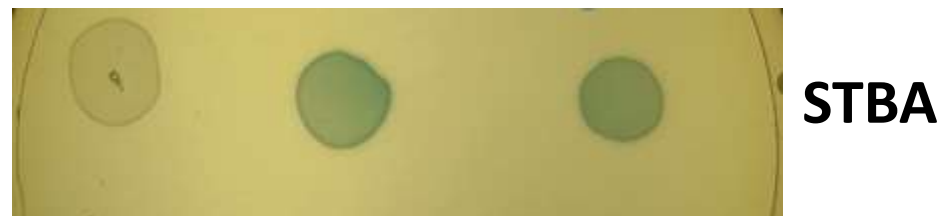
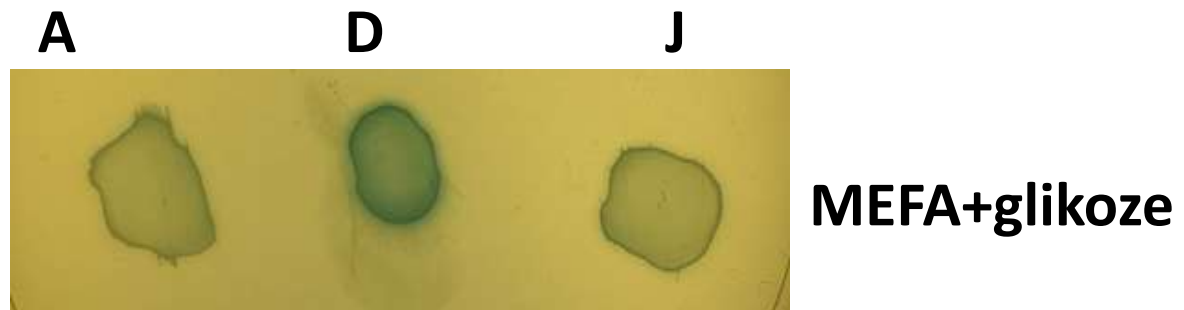


MRSA-v (fons no zilganzaļa - >
dzeltens, paskābināts)



Galaktozdāzēs aktivitāte suspensijās no 2 – 5.08 sētajās A, D un J platēm.

Suspensijas no atsevišķām kolonijām 22.08. Uz platēm – audzV, 3 dn+ lesusskapis. X-Gal pievinots kā iepriekš. Foto uz gaismas kameras 26.08.



Galaktozdāzēs aktivitāte skrīninga testkuktūrās no ledusskapī stāvējušām A, D un J stobriem.

Suspensijas no atsevišķām kolonijām 27.08. Uz platēm – audzV, 2 dn+ lesusskapis. X-Gal pievinots kā iepriekš. Foto uz gaismas kameras 26.08.



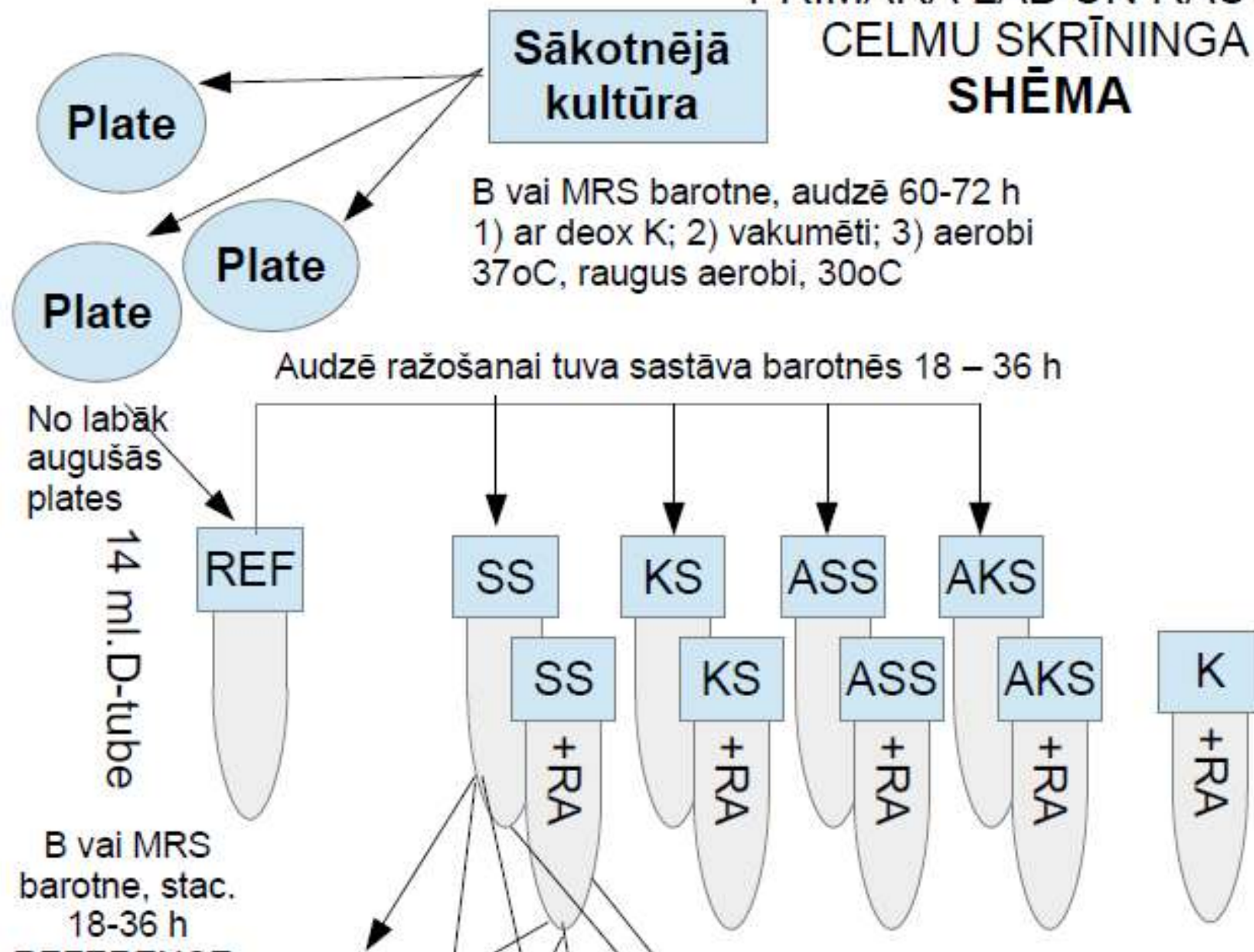
VPA + X-Gal

1. rinda= A, D, J no RE+Gli, 2. rinda A, D, J no RE+Lak,

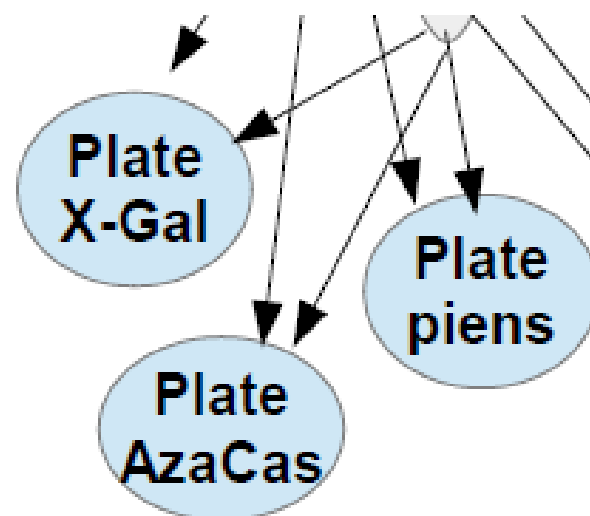


LAA + X-Gal

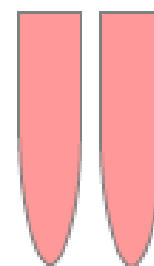
PRIMĀRĀ LAB UN RAUGU CELMU SKRĪNINGA SHĒMA



18-36 h
REFERENCE



Barotnēs fiksē pH izmaiņas,
paraugus dod analizēt uz
Milkoskanu Cesvainē



Ninhidrīna reakcija
centrifugētā (varbūt arī
filtrētā) barotnē pirms
un pēc augšanas

Beta laktamāze un proteāzes 36-48 h audzējot
optimālos O₂ apstākļos uz B vai Sojas agara

Barotnes

B – bāze vai MRS

SS – pasteriz. siera sūkalas

KS – koncentrētas siera sūkalas

ASS – autokl.SS supernat.

AKS – autokl KS supenatants

RA – rauga autolizāts vai ekstrakts

Perspektīvās kultūras detalizēti

raksturo, izmantojot saglabāto

REFERENCI (bioķīmija,
morfoloģija, sekvencēšana)

Neperspektīvās kultūras atmet