

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 9.09.2025 – 30.11.2025

SA1 ietvarā, laika posmā no 9. septembra līdz 30. novembrim

Pārbaudīta A/S «Cesvaines piens» (CP) ražošanas procesā iegūstamo siera sūkalu (SS) divu veidu izmantošana LU Mikroorganismu kultūras kolekcijā (LU MKK) uzturēto laktobaktēriju (LAB) kultivēšanai:

- a) neatšķaidītas svaigas sūkalas (NS);
- b) NS pēc pasterizēšanas, koncentrēšanas procesa sākumā (PS);
- c) raksturota konkurējošo MO klātbūtne sūkalu frakcijās;
- d) analizētas SS papildu apstrādes iespējas, lai atbrīvotos no konkurējošo MO klātbūtnes.

Raksturota vairāku LAB celmu augšanu ietekmējošie faktori SS saturošās barotnēs

- a) barotnes sākotnējā pH ietekme;
- b) kompleksas LAB barotnes MRS piedevas ietekme;
- c) kultivēšanas temperatūras ietekme

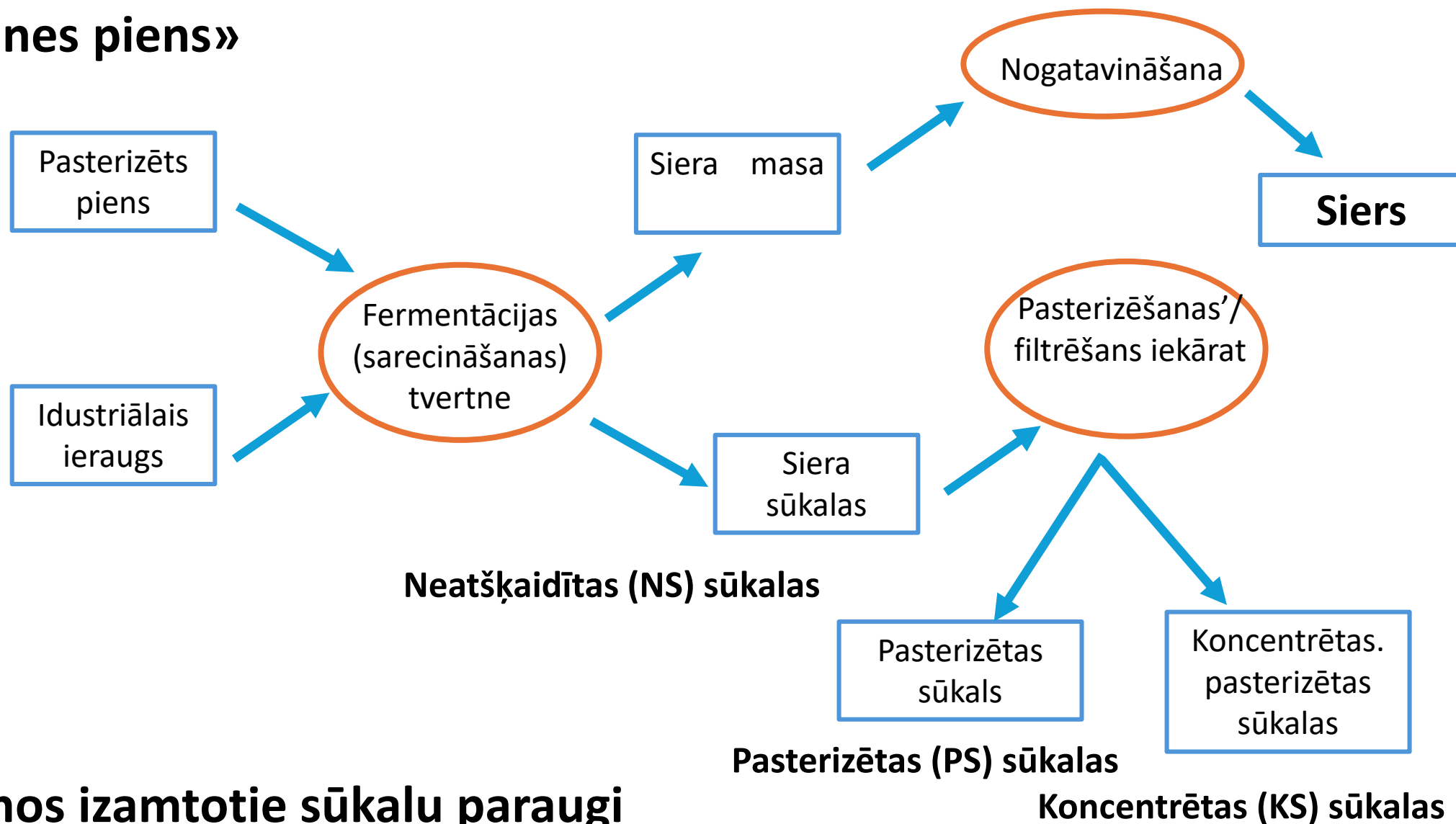
Raksturota ar bioaktīvo peptīduiespējamo uzkrāšanos saistītās LAB kultūru bioķīmiskās īpašības:

- a) proteolītiskā aktivitāte, izmantojot vājpiena gara un ninhidrīna testus
- b) metaboliskā spektra vispārēais raksturojumu, izmantojot «Eco-Plates» testu
- c) augšanas intensitātes, dehidrogenāžu, hinonreduktāžu un L-DOPA transformācijas īpašības mikroplašu testu formātā

Pētījumos izmantoti no (CP) pēc saskaņota piegādes grafika saņemtie un raksturotie SS frakciju paraugi

**SIERA SŪKALU PAPILDU APSTRĀDE, LAI ATBRĪVOTOS NO
KONKURĒJOŠO MIKROORGANISMU KLĀTBŪTNES**

Siera ražošanas galvenie etapi a/s «Cesvaines piens»



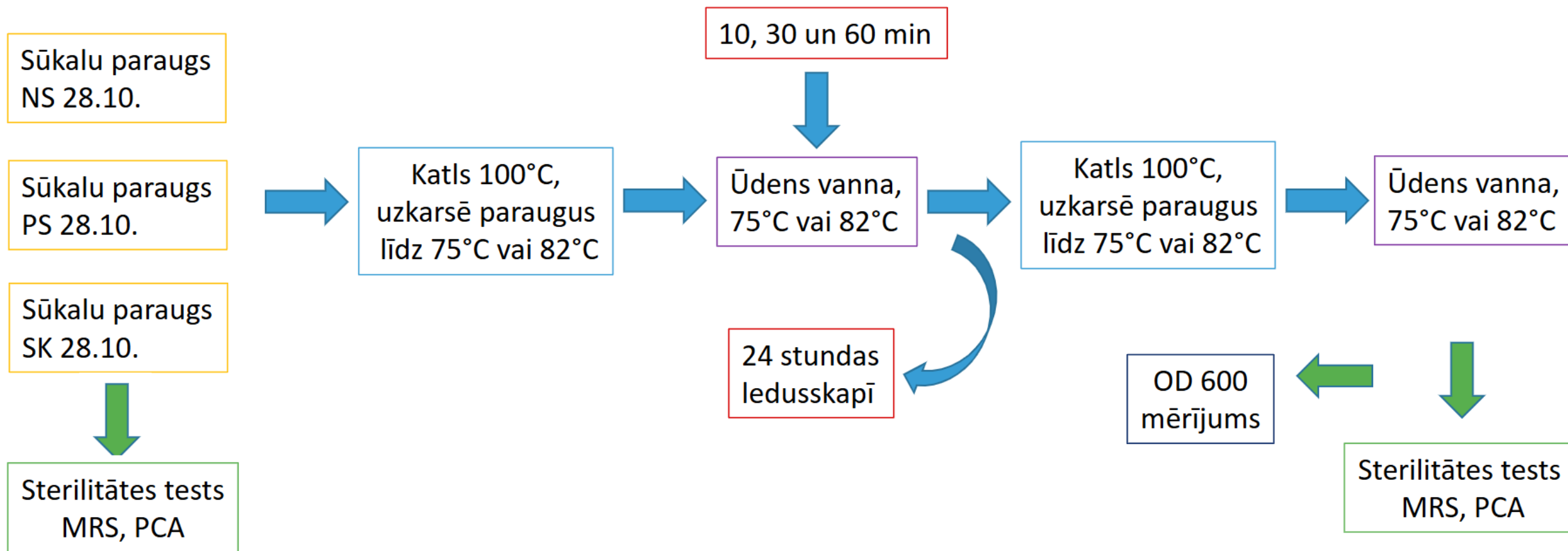
Pētījumos izamtotie sūkalu paraugi

Pētījumos izamtotie sūkalu paraugi



Neatšķaidītas (N) sūkalas

Kontaminējošās mikrofloras ierobežošanai izmantotās apstrādes shēma



Pasterizēšanas varianti sterilizēšanas vietā lietoti, lai maksimāli saglabātu sūkalu proteīna natīvo struktūru

Nešķaidītas sūkalas (NS) pēc pastērizācijas (75°C un 82°C)

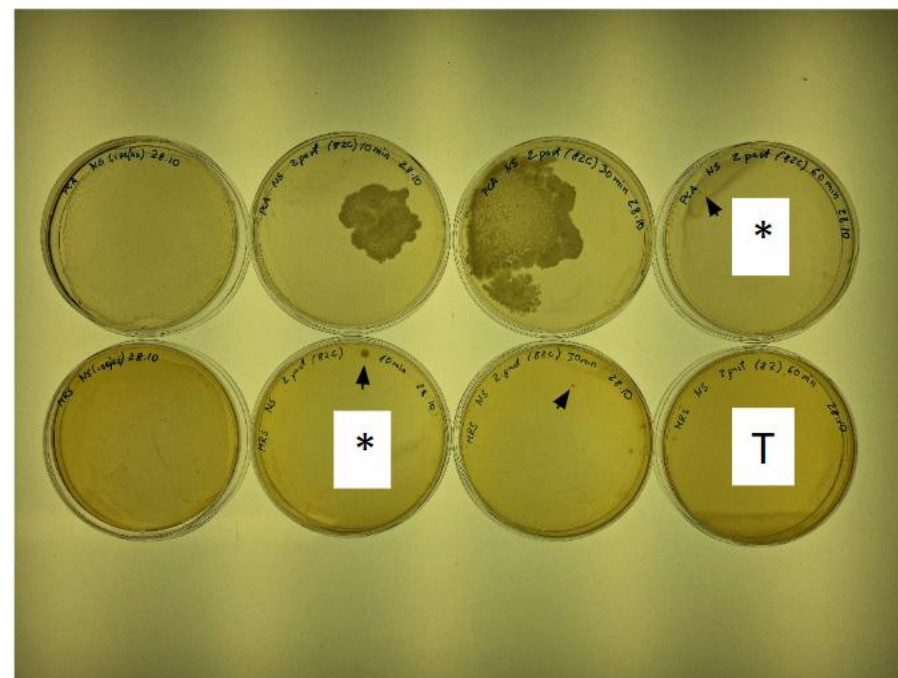
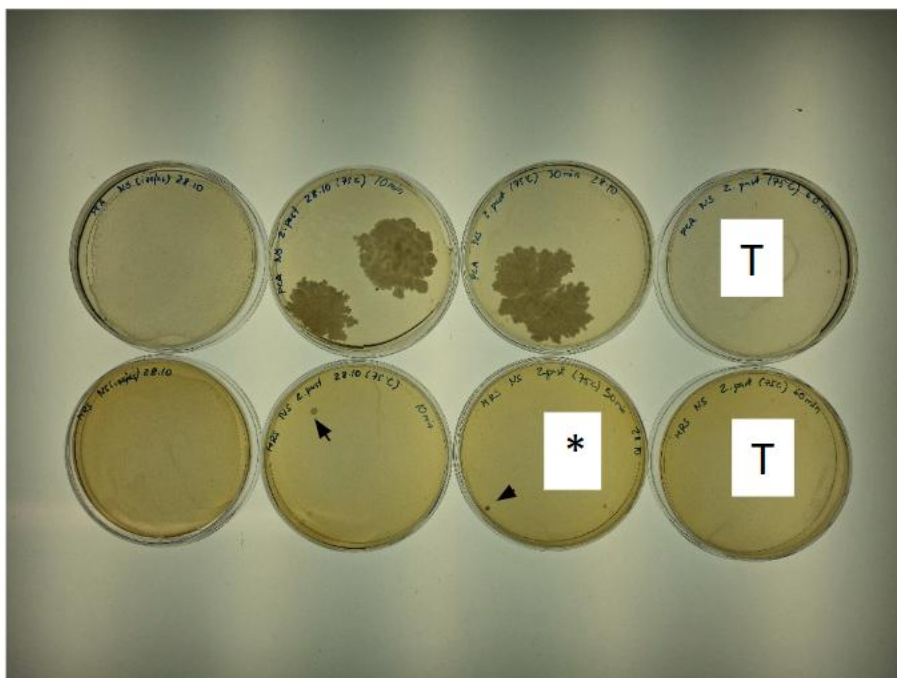
Uz plates sēj 0.5 ml
meatšķaidīta NS parauga

75°C

82°C

Izejas 10 min 30 min 60 min

Izejas 10 min 30 min 60 min



PCA

MRS

Sūkalu paraugs sākotnēji satur
ierauga kultūras šūnas

T – abas atkārtējuma plates tīras

* - otra atkārtējuma plate ir tīra

Pasterizētas sūkalas (PS) pēc pasterizācijas (75°C un 82°C)

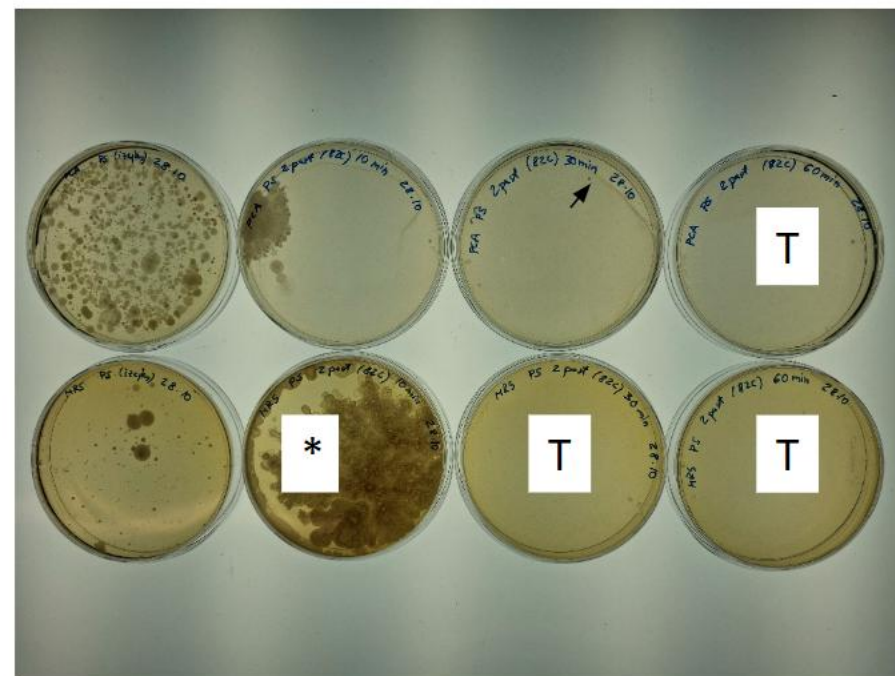
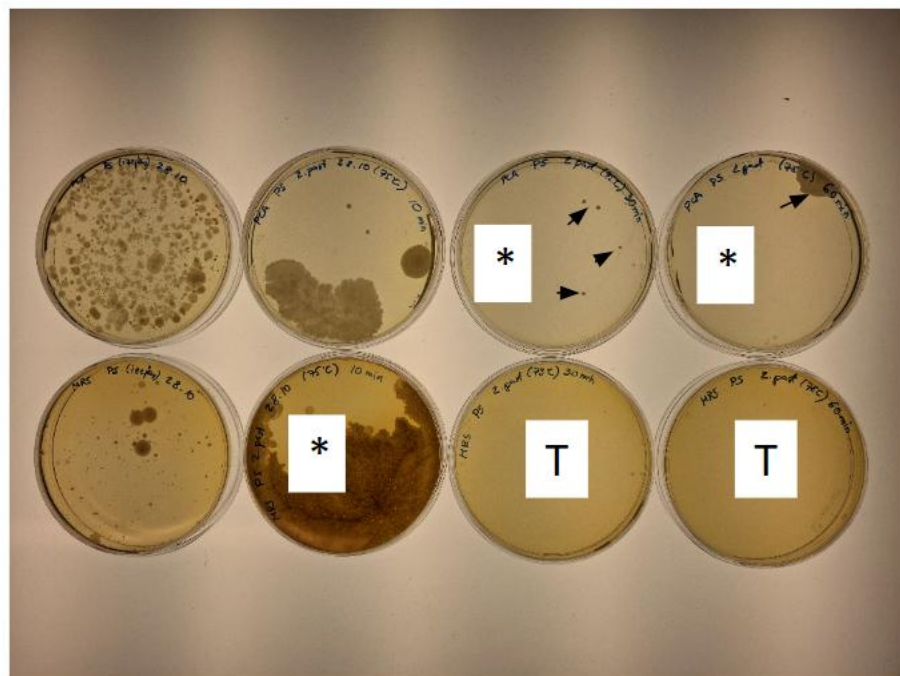
Uz plates sēj 0.5 ml
meatšķaidīta NS parauga

75°C

82°C

Izejas 10 min 30 min 60 min

Izejas 10 min 30 min 60 min



PCA

MRS

T – abas atkārtējuma plates tīras

* - otra atkārtējuma plate ir tīra

Pasterizēšana izraisa daļēju sūkalu proteīna denaturāciju

Supernatants pēc centrifugēšanas 10 minūtes pie 5000 apgr/min

75°C					
Nešķaidītas sūkalas		Pasterizētas sūkalas		Sūkalu koncentrāts	
Izejas (K)	0	Izejas (K)	0	Izejas (K)	0
10 min	0,501	10 min	0,367	10 min	1,072
30 min	0,421	30 min	0,414	30 min	1,526
60 min	0,472	60 min	0,311	60 min	1,568

82°C					
Nešķaidītas sūkalas		Pasterizētas sūkalas		Sūkalu koncentrāts	
Izejas (K)	0	Izejas (K)	0	Izejas (K)	0
10 min	0,306	10 min	0,307	10 min	0,579
30 min	0,3	30 min	0,302	30 min	0,669
60 min	0,214	60 min	0,053	60 min	0,043

Pēc pasterizācijas redzams optiskā blīvuma pieaugums visos paraugos.

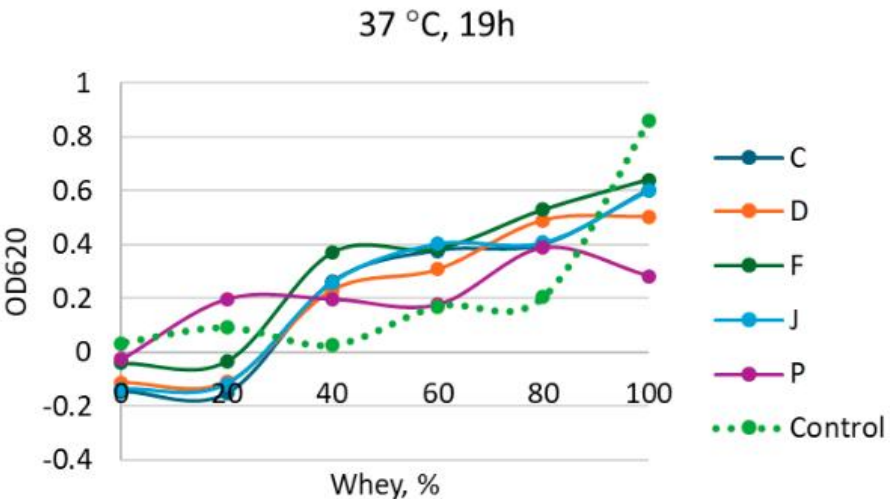
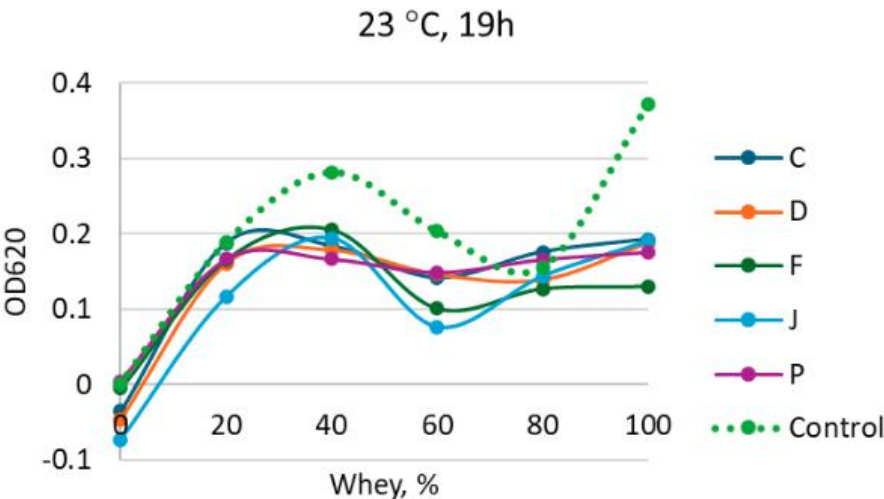
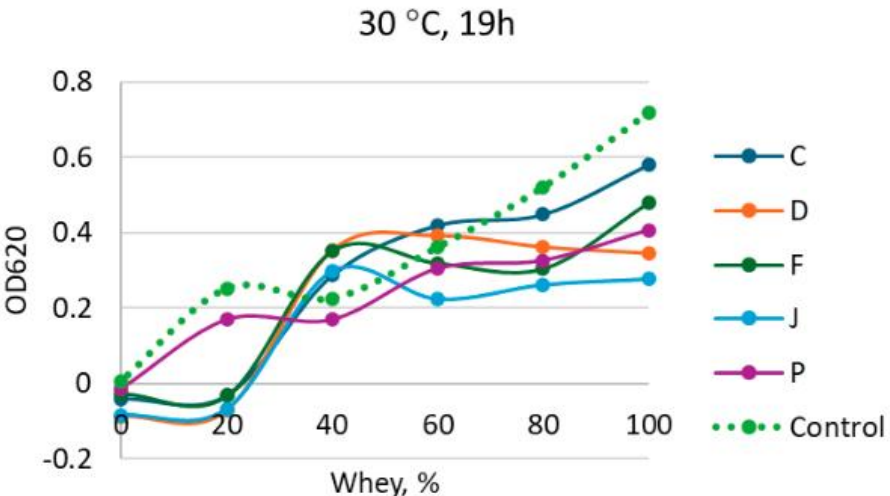
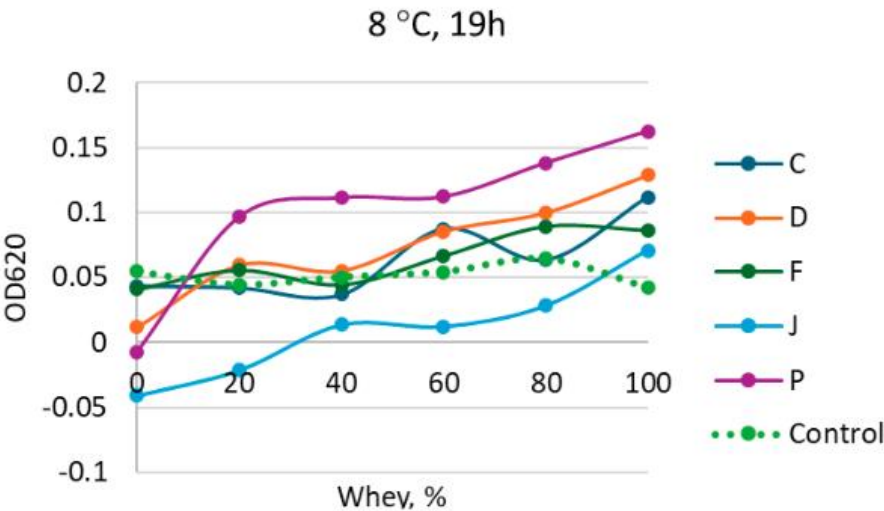
Secinājumi

- 1) PS sūkalas satur nelielu skaitu endosporas veidojošas baktērijas, kas atbilst ražošanas sanitārajām normām, taču ilgstošas kultivēšanas rezultātā spēj konkurēt ar LAB attīstību.
- 2) Spriežot pēc spektrofotometrijas datiem papildu pasterizēšanas procesā notiek sūkalu proteīnu denaturācija.
- 3) Liela apjoma LAB klātbūtne NS sūkalās, kas saglabājas no industriālā ierauga pievienošanas dod iespējas izmantot šīs sūkalas MKK LAB kultūru un industriālo inokulātu asociāciju veidošanai.
- 4) Turpmākajos eksperimentos ieteicams pasterizēšanas vietā:
 - a) izmantot sterilizēšanu, kas iznīcinātu baktēriju endosporas, rēķinoties ar lielāku sūkalu proteīna daļas denaturēšanu;
 - b) izmantot liela apjoma LAB inokulātus, kas īstermiņa kultivēšanas režīmā spētu ierobežot endosporu veidotāju attīstību.

PIENSKĀBES BAKTĒRIJU AUGŠANU IETEKMĒJOŠIE FAKTORI SIERA SĪKALAS SATUROŠĀS BAROTNĒS

Pasterizācijas rezistentās mikrofloras ietekme uz LAB augšanu PS saturošās barotnēs

Igāku laiku audzējot dažādus MKK LAB celmus' vairākās sūkalu koncentrācijas saturošās barotnēs, vērojama OD palielināšanās arī ar LAB neinokulētos kontroles variantos.

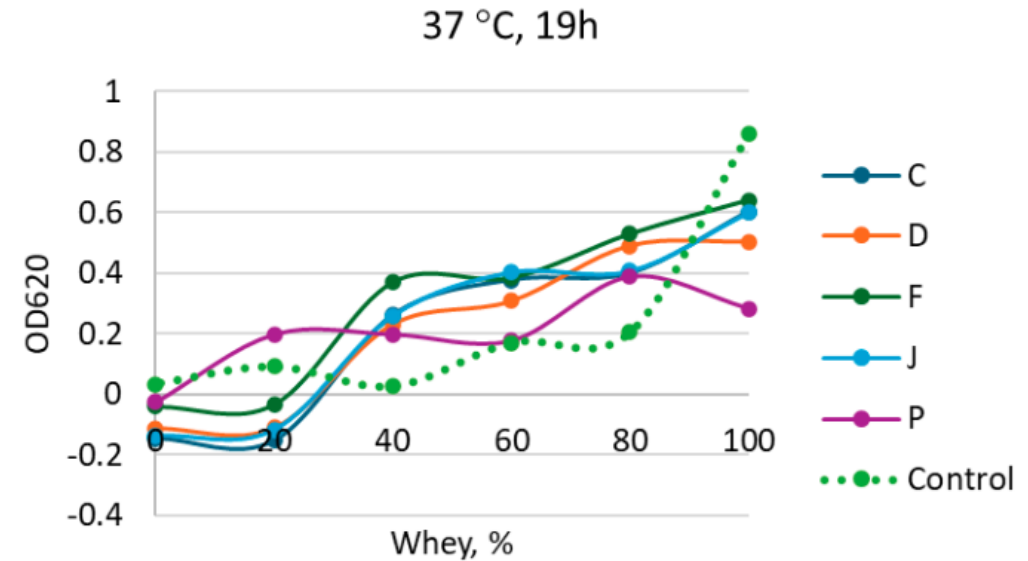
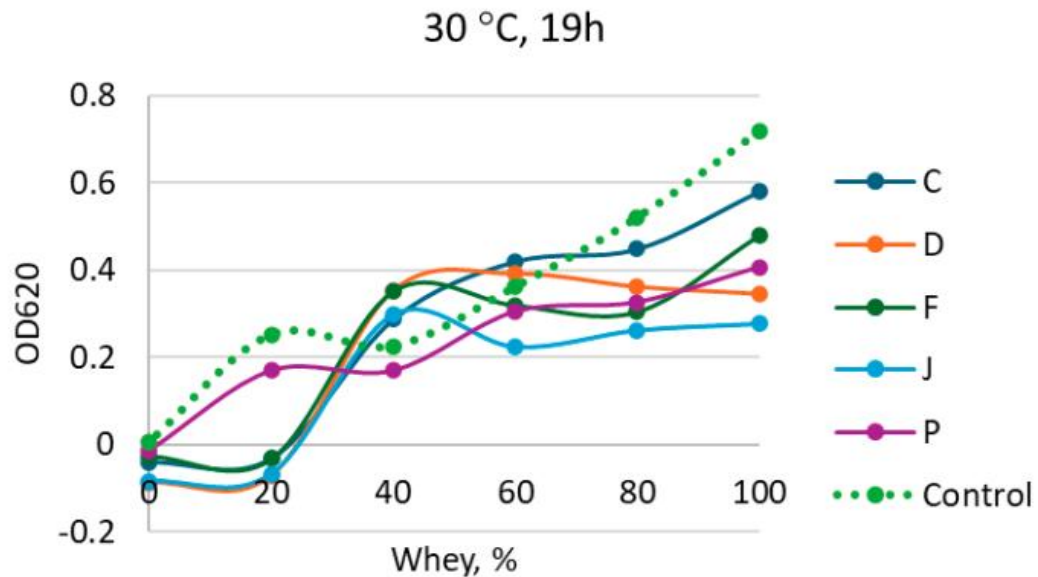


C	<i>Lactocaseibacillus</i>	<i>paracasei</i>	547
D	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbruecnii</i>	698
F	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	838
J	<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	1277
P	<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>plantarum</i>	551

Pasterizācijas rezistentās mikrofloras ietekme uz LAB augšanu PS saturošās barotnēs

C	<i>Lactocaseibacillus</i>	<i>paracasei</i>	547
D	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbruecnii</i>	698
F	<i>Limasilactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	838
J	<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	1277
P	<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>plantarum</i>	551

Gan endosporas veidojošajiem MO, gan LAB kultūrām optimālā augšanas temperatūra ir 37°C vai augstāk.



SS pH izmaiņas dažādās sūkalu frakcijās

R-40-34		A/S Cesvaines Piens Nosūtīto Paraugu ķīmiskie rādītāji						versija:1 aktualizēts:15.09.2025
Datums	Produkts	Tilpums, l	Tauki %	Olbalb. %	Laktoze	Sausna %	Ph	Piezīmes
9/16/2025	Sūkalas "pirmās" (no sieras vannas, nešķaidītas)	2	0.21	0.82	4.57	6.6	6.53	Testēts uz Milkoscan
9/30/2025	Sūkalas "pirmās" (no sieras vannas, nešķaidītas)	1	0.21	0.81	4.47	6.44	6.54	Testēts uz Milkoscan

FLORA™ C170	20230704_714083_PI_EU_FLORA_C170_EN	Lactococcus lactis subsp. cremoris
		Lactococcus lactis subsp. lactis

BS-40	70781cc7-c697-469a-b2d6-a979670c22dc	Hansen	Lactococcus lactis subsp. lactis
-------	--------------------------------------	--------	----------------------------------

	TDS, ppm	EC, uS/cm	pH
Nutrient Broth	1778	3556	6.10
NaCl 0.85%	4049	8098	5.68
NS	1640	3280	4.03
PS	1450	2900	4.90
KS	3964	7938	4.80
Phosphate buffer, 200 mM	1429	7149	7.04
Buffer+NS 50:50			6.64

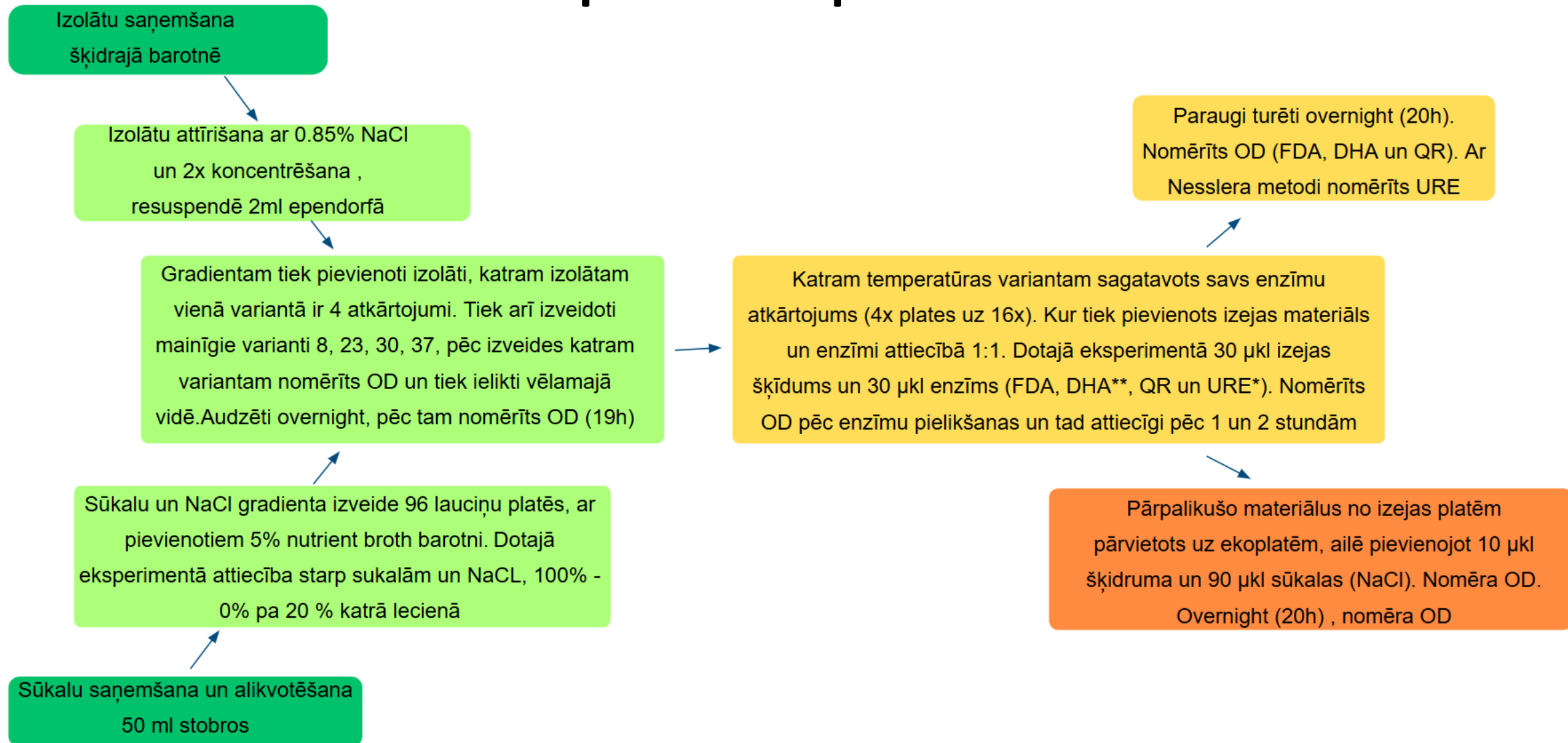
Neraugoties uz sākotnējo pH, kas visām sūkalu frakcijām CP analīzēs uzrādīts kā tuvs neitrālam, pēc neilga laika, kas nepieciešams sūkalu transportēšanai un sagatavošanai tālākajiem eksperimentiem, pH samazinās par 2-3 vienībām, šādas izmaiņas atbilst literatūrā aprakstītajām, taču tās var nelabvēlīgi ietekmēt LAB augšanu,

Secinājumi

- 1) Turpmākajos eksperimentos, ja barotnes tiek gatavotas uz PS vai KS bāzes, nepieciešams :
 - a) izmantot sterilizēšanu, kas iznīcinātu baktēriju endosporas, rēķinoties ar lielāku sūkalu proteīna daļas denaturēšanu;
 - b) izmantot liela apjoma LAB inokulātus, kas īstermiņa kultivēšanas režīmā spētu ierobežot endosporu veidotāju attīstību.
- 2) Visām, uz sūkalu frakciju bāzes veidotām barotnēm nepieciešams regulēt pH līdz apm. netrālam, pievienojot buferšķīdumu un palielināt LAB augšanai nepieciešamo barības vielu daudzumu ar rauga ekstrakta vai kompleksu barotņu kompozīciju piedevām.
- 3) Jaunajiem, no MKK iegūto LAB celmiem optimālā augšanas temperatūra ir 37°C

**PIENSKĀBES BAKTĒRIJU BIOAKTĪVO PEPTĪDU UZKRĀŠANOS
IESPAIDOJOŠĀS BIOĶĪMISKĀS ĪPAŠĪBAS**

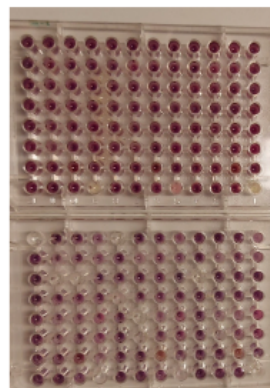
LAB bioaktīvo peptīdu sintēzei būtiskās enzīmātiskās aktivitātes izpētes darbplūsmas shēma



LAB enzimātiskās aktivitātes spektra raksturojums, izmantojot *Eco-Plates* testu

Pētītajiem LAB celmiem atrodama daudzveidīga hidrolītisko enzīnu aktivitāte, laktozes izmantošana raksturīga it īpaši *L.fermentum* kultūrai.

C	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	547
F	<i>Limasilactobacillus fermentum</i>	836
P	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	557

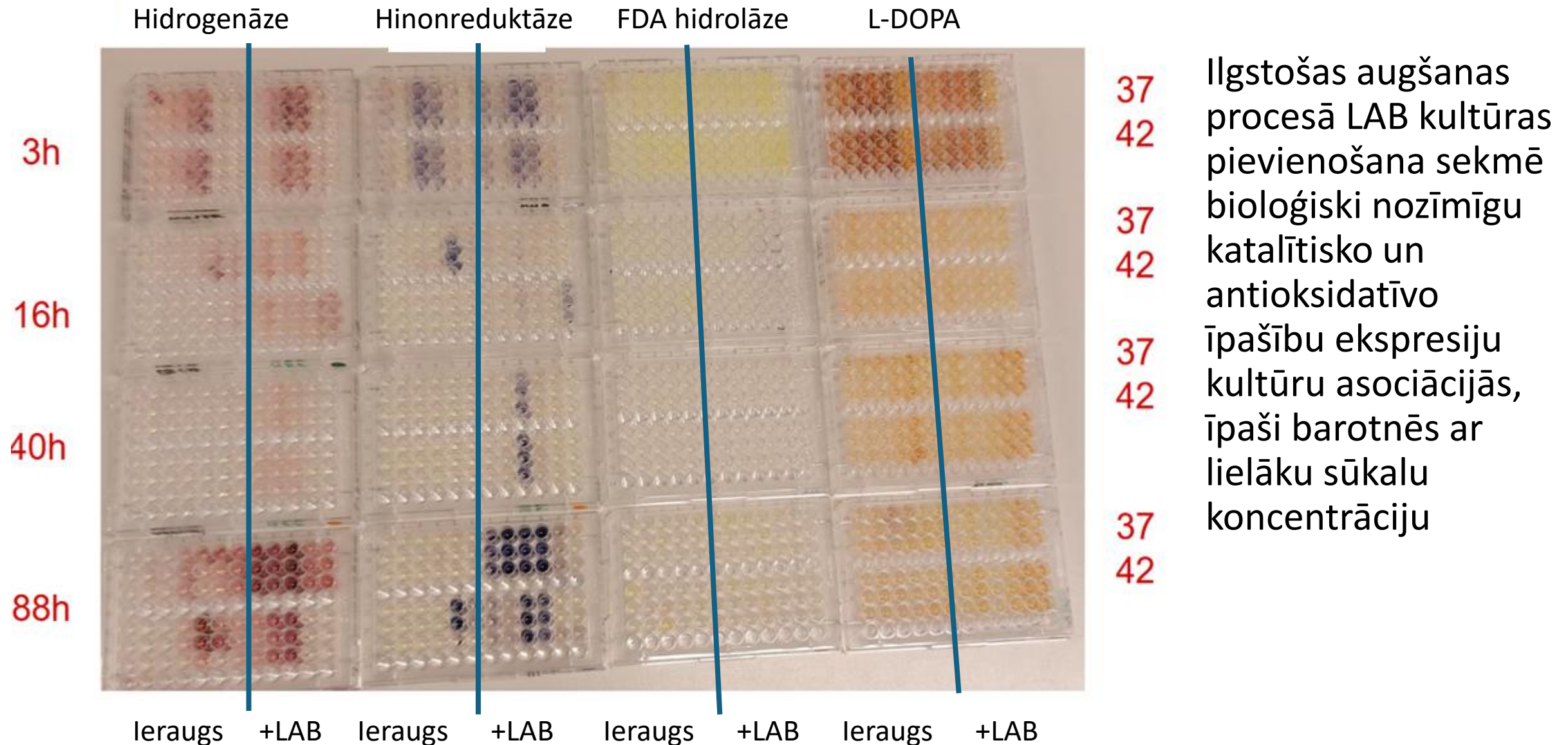


Ogļhidrāti	
Polimēri	
Karboksilskābes	
Aminoskābes	
Amīni	
Fenoli	

Urakawa et al.,
2013.
<http://dx.doi.org/10.5402/2013/410814>

Substrates	C		F		P	
	NaCl	Whey	NaCl	Whey	NaCl	Whey
Water	0.0012	0.2805	0.2551	0.7094	0.0634	0.0917
Pyruvic acid methyl ester	1.4163	1.5537	1.1067	1.6711	0.8818	1.5081
Tween 40	1.2882	1.4898	1.1274	1.4683	0.9609	1.6259
Tween 80	1.0326	1.3862	0.894	1.2958	0.7475	1.5203
alpha-cyclodextrin	1.6332	1.7833	1.4464	1.6062	1.455	1.6471
Glycogen	1.9523	1.951	1.334	1.7707	1.489	1.6428
D-cellobiose	1.0869	1.7738	1.1333	1.6663	1.0162	1.6886
alpha-D-lactose	1.0898	1.783	1.0531	2.1472	1.0984	1.6805
beta-methyl-D-glucoside	1.6049	1.777	1.1684	1.8871	1.1981	1.6543
D-xylose	1.0966	1.6282	0.9789	1.7457	1.6134	1.5382
i-erythriol	1.0772	1.5662	1.1975	1.9015	1.2419	1.7162
D-mannitol	0.9659	1.6545	0.9389	1.5907	1.0055	1.5579
N-acetyl-D-glucosamine	1.4981	2.0539	1.2877	1.6679	1.2517	1.4151
D-glucosamic acid	1.5082	1.638	1.3857	1.7923	0.0008	1.5976
Glucose-1-phosphate	1.3431	1.601	1.165	1.6617	1.3444	1.7176
D-l-alpha-glycerol phosphate	1.7733	1.5691	1.6368	1.687	1.5559	1.7168
D-galactonic acid-gamma-lactone	1.4691	1.6488	1.5533	1.894	1.7357	1.7149
D-galacturonic acid	1.755	1.5479	1.7567	1.6696	1.3813	1.5713
2-hydroxy benzoic acid	0.1903	1.279	0.0522	0.9977	0.3284	0.974
4-hydroxy benzoic acid	0.8069	1.553	0.0117	1.4282	0.8165	1.389
gamma-hydroxy butyric acid	1.4684	1.7298	1.4036	1.4618	1.4593	1.4182
Itaconic acid	1.6895	1.9639	1.6654	1.5452	-0.0005	1.7046
alpha-ketobutyric acid	0.5424	1.1546	0.5224	1.1787	0.6088	1.1099
D-malic acid	1.936	1.5819	1.878	1.7208	1.9059	1.6506
L-arginine	1.8062	1.6793	1.7458	1.8602	1.3734	1.5092
L-asparagine	1.8363	1.7304	1.65	1.5688	1.3311	1.4747
l-phenylalanine	1.7241	1.4937	1.6801	1.7254	1.5075	1.4635
L-serine	1.5871	1.5795	1.5308	1.2541	1.1966	1.5867
L-threonine	1.599	1.7238	0.4429	1.5048	1.8198	1.5325
Glycyl-L-glutamic acid	0.002	1.4727	1.6761	1.5184	1.9366	1.6376
Phenylethyl-amine	1.7994	1.6065	1.6717	1.7777	1.3426	2.3239
Putrescine	1.6381	1.4053	0.0009	1.5688	0.0021	1.8105

Bioaktivitāti raksturojošo īpašību salīdzinājums industriālā ierauga kultūrā, kas papildināta ar LAB celmu no MKK



Pētīto bioaktivitāti raksturojošo īpašību raksturojums

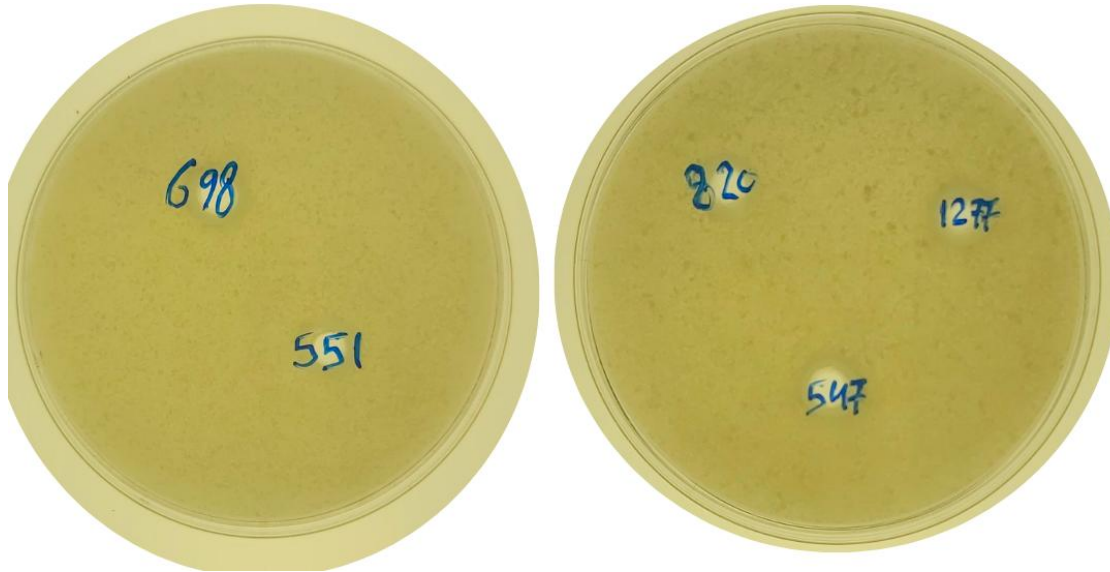
Dehidrogenāzes sadala organiskās vielas un atspoguļo mikroorganismu aktivitāti un dzīvotspēju.

Hinonreduktāzes aktivitāte var norādīt uz potenciālu mazināt oksidatīvo stresu, neitralizējot reaktīvās skābekļa sugas (ROS).

FDA hidrolīzes rezultātā izdalās fluoresceīns, kas norāda, ka šūnas ir dzīvotspējīgas un metaboliski aktīvas.

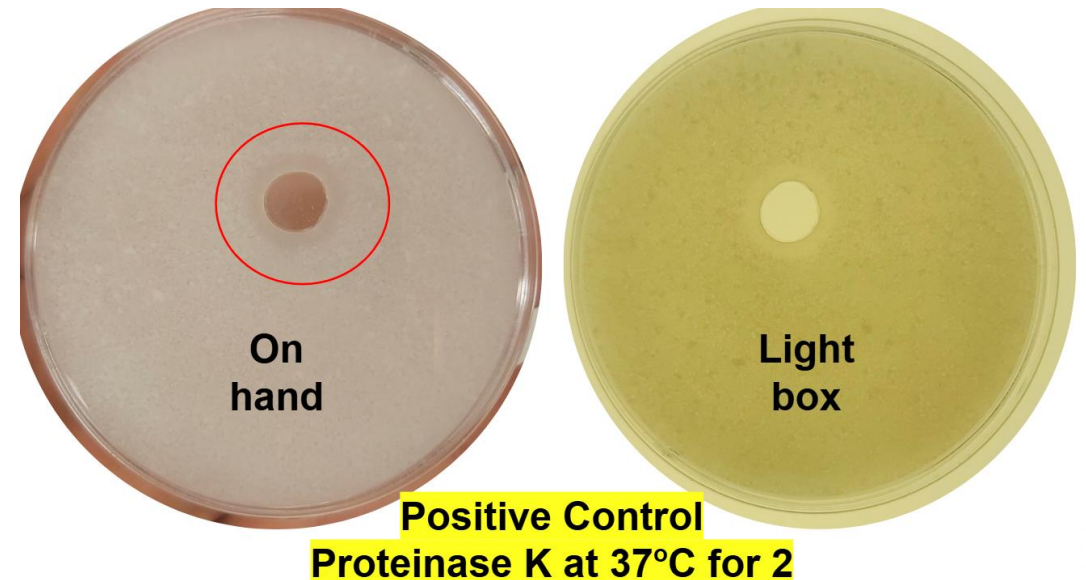
L-DOPA šķelšanas rezultātā veidojas fenola savienojumi, kas var kavēt patogēno mikroorganismu augšanu.

Proteolītisko aktivitāšu salīdzinājums no MKK iegūtajās LAB kultūrās Vājpiena agara tests



- *Lacticaseibacillus paracasei* 547
- *Limosilactobacillus fermentum* 838 / 820
- *Lactiplantibacillus plantarum* 551
- *Lactobacillus johnsonii* 1277
- *Lactobacillus delbrueckii* 698

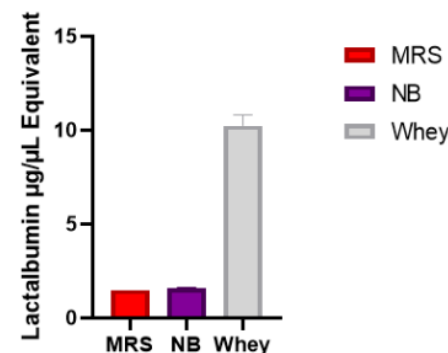
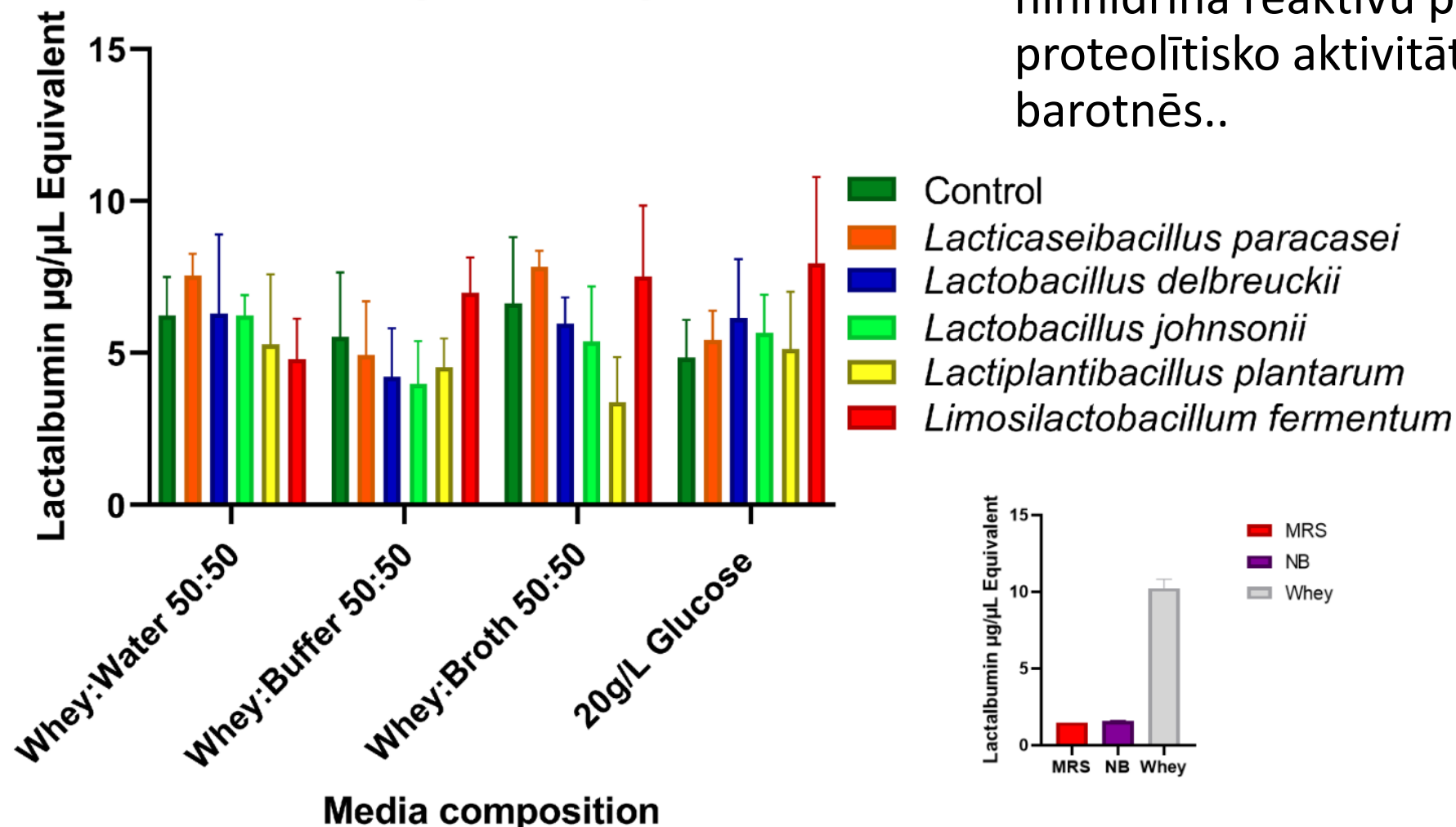
LAB kultūru suspensijās, salīdzinot ar pozitīvo kontroli, nav vērojama proteolītiska aktivitāte, kas novestu pie pilnīgas piena proteīna hidrolīzes un dzidru oreolu veidošanās ap agara bedrītēm.



Proteolītisko aktivitāšu salīdzinājums no MKK iegūtajās LAB kultūrās

Kultūru supernatantu krāsojums ar ninhidrīna reaktīvu parāda dažāda līmeņa proteolītisko aktivitāti dažāda sastāva barotnēs..

Ninhydrin Assay



Secinājumi

- 1) MKK LAB kultūru enzimatiskā aktivitāte parāda daudzveidīgu bioloģiski aktīvo komponentu veidošanas iespējas, ko apliecina plašs izmantojamo savienojumu spektrs *Eco=Plates* testā.
- 2) Veidojot industriālo ierauga kultūru un MKK LAB celmu asociācijas, iespējams iegūt nozīmīgu dehidrogenāžu un antioksidantu aktivitātes pieaugumu. Projektu turpinot nepieciešams padziļināti pētīt šādu sinerģiju veidošanas iespējas.
- 3) Vājpiena agara un ninhidrīna testi parāda, ka MKK LAB kultūrām raksturīga savstarpēji atšķirīga, bet kopumā ierobežota sūkalu proteīna degradācijas aktivitāte, kas apliecina to izmantošanas perspektīvu bioaktīvu peptīdu frakcijas iegūšanai. Proteolīzes produktu turpmākajai raksturošanai būs nepieciešams izmantot PAAG elektroforēzes, ultrafiltrācijas un hromatogrāfijas metodes.