

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 01.06.2026. – 31.08.2026.

1. UZ PĀRSKATA PERIODU ATTIECINĀMĀS PROJEKTA AKTIVITĀTES LAIKA POSMĀ NO 01.06.2026. LĪDZ 31.08.2026.

1.1. turpināta SA1 izpilde (kultūru skrīnings)

Iepriekšējā pārskata posmā:

No Latvijas Universitātes Mikroorganismu kultūru kolekcijas (LU MKK) uzglabātajiem 14 pienskābes baktēriju (LAB) un pieciem laktozi fermentējošajiem raugiem (LFY) atlasītas sešas bioloģiski aktīvos savienojumus (BAS) intensīvāk sintezējošās LAB kultūras, kuras vienlaikus uzkrāj peptīdu frakciju (PF) un viena perspektīvākā PF veidojoša LFY kultūra:

Šajā pārskata posmā:

- a) Raksturota iepriekš atlasīto LAB celmu un LFY augšanas un laktozes šķelšanas efektivitāte uz sūkalu bāzes veidotajās barotnēs;
- b) Sašaurināts turpmākajiem sūkalu fermentācijas mērogošanas eksperimentiem izvēlēto LAB celmu skaits līdz diviem celmiem;
- c) Sūkalu fermentācijas mērogošanas eksperimentiem papildus atlasīts viens industriālo ieraugu sastāvā atrodams LAB celms un viens no ražotāja piegādātajiem sūkalu paraugiem iegūts termotolerants LAB celms.

1.2. Turpināta SA2 izpilde (sūkalas saturošo barotņu un mikroorganismu augšanas apstākļu optimizācija)

Iepriekšējā pārskata posmā:

pētītas iespējas ar vienkāršu barības vielu maisījumu un konkrētu savienojumu papildināšanu palīdzību stimulēt sūkalās pēc siera graudu atdalīšanas saglabājušos mikroorganismu aktivitāti.

Šajā pārskata posmā:

noskaidrota efektīvākie kultivēšanas apstākļi un sūkalu sastāva bagātināšanas iespējas, potenciāli mērogojamam fermentācijas procesam BAP iegūšanai.

- a) salīdzināti uz sūkalu bāzes veidotu divu barotņu tipu un četru piedevu variantu kombinācijas optimālai LAB kultivēšanai stacionāros apstākļos;
- b) salīdzināti dažādi temperatūras un aerācijas režīma, kā arī barotnes tilpuma faktoru ietekme uz fermentācijas rezultātā iegūstamo mikroorganismu biomasu un laktozes konversijas produktiem, kas raksturoti ar HPLC hromatogrāfijas palīdzību;
- c) raksturota perspektīvāko LAB kultūru augšanas dinamika dažādu kultivēšanas faktoru iespaidā, izmantojot reālajā laikā iegūstamo augšanas reģistrāciju iekārtā RTS-8;
- d) sagatavots zinātniskas publikācijas manuskripts par divu, turpmākajai aizsargātai izmantošanai neplānojamu LU MKK LAB celmu BAS sintēzi ietekmējošajiem faktoriem.

1.3. Uzsākta SA3 izpilde (fermentētās sūkalās atrodamo BAP sastāva un secību raksturojums)

1.3.1. primārais fermentēto sūkalu BAP spektra raksturojums

- a) izstrādāta sūkalās atrodamās potenciālās BAP frakcijas izolēšanas un koncentrācijas darbplūsma ar centrifugējamu molekulmasas nodalīšanas (MWCO) membrānu filtru palīdzību;
- b) apgūta kapilārās elektroforēzes analīzes metode BAP spektra raksturošanai LAB un LFY barotnēs, sūkalu preparātos un sūkalu fermentācijas barotnē;
- c) sagatavoti paraugi sūkalu fermentācijas rezultātā veidotās BAP frakcijas HPLC analīzei.

ŅEMOT VĒRĀ PROJEKTĀ PAREDZĒTO INTELEKTUĀLĀ ĪPAŠUMA AIZSARDZĪBAS DOKUMENTU (IIAD) SAGATAVOŠANU, ŠEIT UN TURPMĀK

**MIKROORGANISMU CELMI,
FERMENTĀCIJAS BAROTNES MODIFIKĀCIJAS UN
IZMANTOTIE KULTIVĒŠANAS APSTĀKĻI**

**TIKS APZĪMĒTI AR NUMURIEM UN INDEKSIEM,
NEATKLĀJOT ŠO APZĪMĒJUMU SATURU, KAS TURPMĀK VARĒTU APDRAUDĒT IIAD IEGŪŠANU**

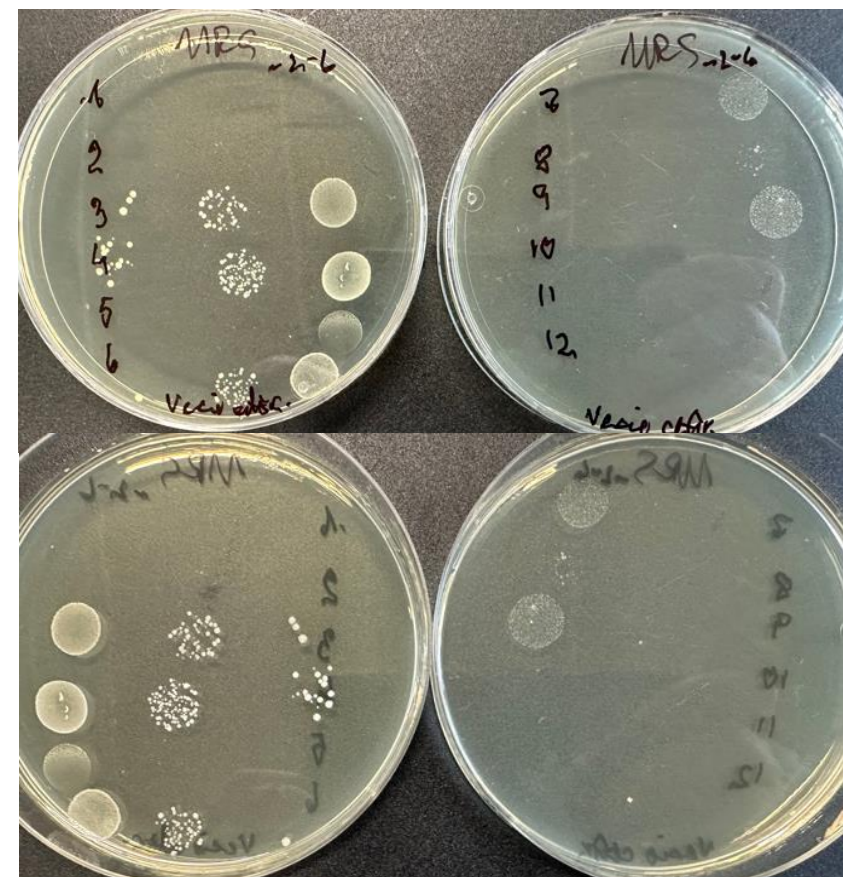
1. Sūkalu fermentācijas turpmākajiem eksperimentiem izvēlēto LAB celmu «Īsā saraksta» izveide

Sūkalu fermentācijas turpmākajiem mērogošanas eksperimentiem izvēlēto LAB celmu «Īsā saraksta» izveide

Apzīmējumi: MKK – iepriekš atlasītie perspektīvie BAP veidojoši, kā arī zinātniskās publikācijas mērķiem izvēlētie celmi no LU MKK krājuma; IND – no industriāliem ieraugiem izdalītās LAB tīrkultūras LAB audzētas pasterizētā uz sūkalu bāzes veidotā barotnē B (kas satur 10% RE piedevu) , 11 ml, stacionāri 48 h, 37oC, 0,1 ml inokulāts no MRS kultūras, kas iegūta no vienas LAB kolonijas. (tabula) . Titrētas uz MRS (attēlā: kultūru #. plašu reverss un averss), areobi; -4; -6; -7 atšķ; 10 ul, 48 h, 37oC.

Celms	Glikoze	Galaktoze	Pienskābe	OD590x3	pH
MKK 1	0.47	2.12	13.64	1.19	4.50
MKK 2	0.33	1.42	16.45	0.24	4.40
MKK 3	0.46	0.13	22.13	>2	4.15
MKK 4	2.36	2.34	19.58	1.29	4.07
MKK 5	0.33	1.39	15.25	0.40	4.45
MKK 6	0.45	0.11	20.93	2.00	4.20
MKK 7	0.32	1.49	13.45	0.67	4.55
MKK 8	0.27	1.47	13.55	0.51	4.60
MKK 9	0.25	1.68	13.63	0.77	4.60
IND 1	1.86	3.24	14.90	1.58	4.62
IND 2	ND	ND	ND	2.00	4.10
IND 3	ND	ND	ND	1.53	4.46

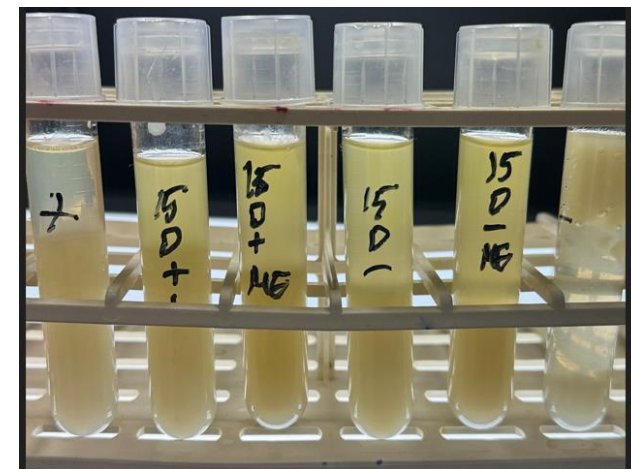
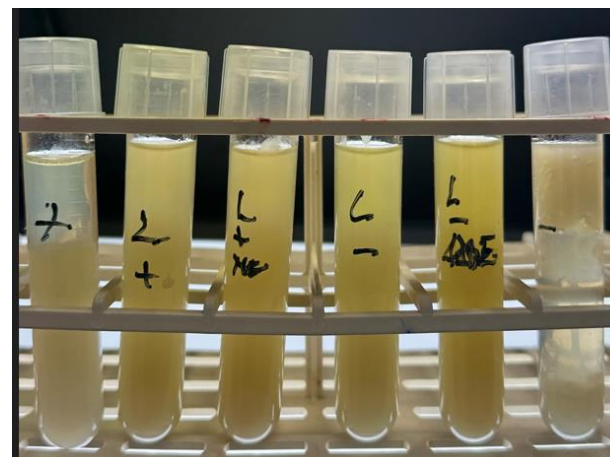
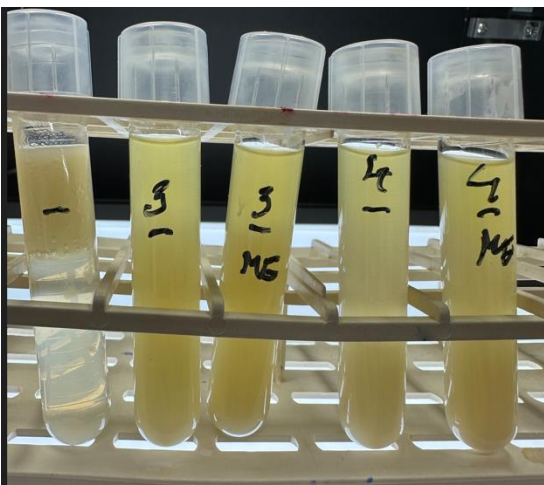
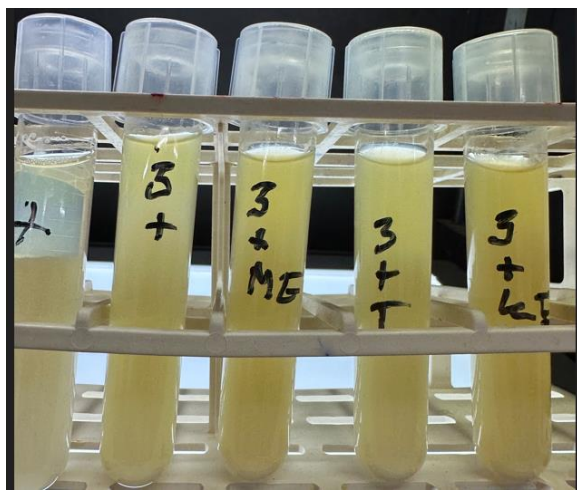
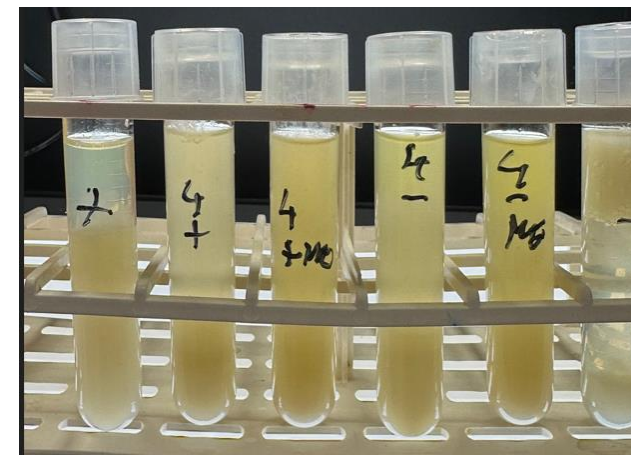
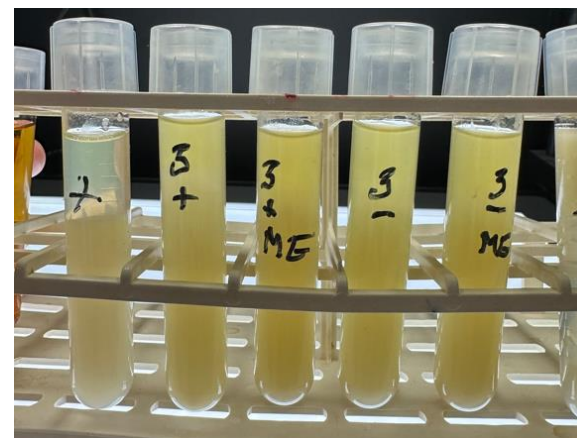
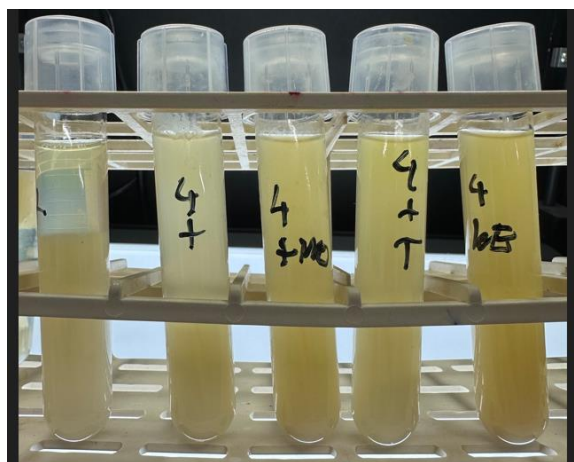
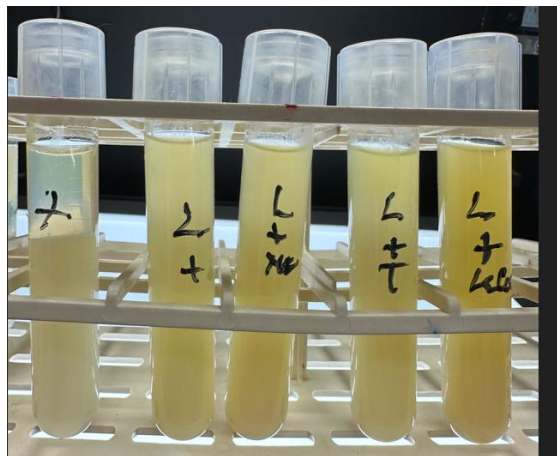
pH ir labs proksi rādītājs pienskābei, kas, savukārt MKK kultūrās labi korelē ar augšanu ((KVV un OD) IND celmi vāji vai nemaz neaug aerobi



«Īsā saraksta» kultūru augšanas vizuālā un instrumentālā vērtēšana dažāda sastāv barotnēs

Augšana barotnē B0 (bez RE piedevas), 9 ml, stacionāri 48 h, 37oC + 1 ml buferējošais maisījums ; + 1 ml piedevu maisījums (burti uz mēģenes; apzīmējumi A, B, C tabulā) . Kontroles: «+» vai «-» . Inokulāts – 0,1 ml no MRS 24 h kultūras. Tilpums vienādots ar 0.9% NaCl.

Tikai vizuāli var novērtēt barotnes komponentu agregāciju un sedimentāciju.

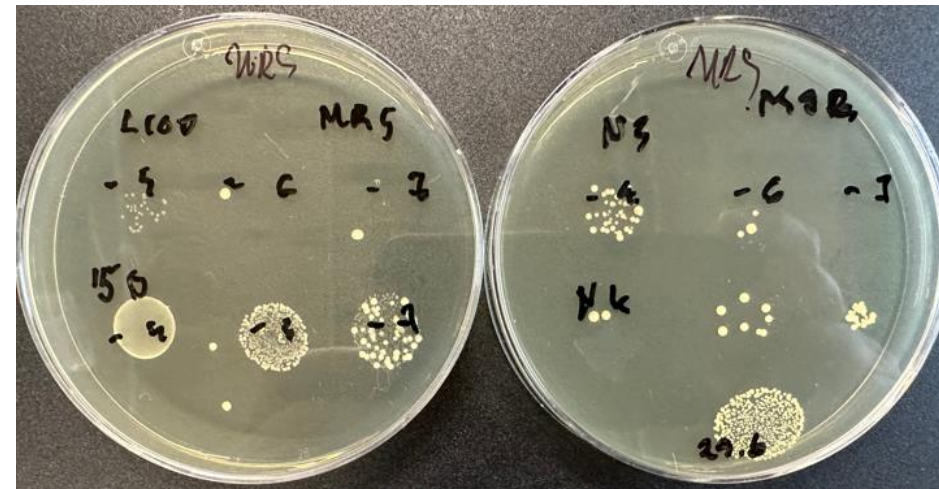
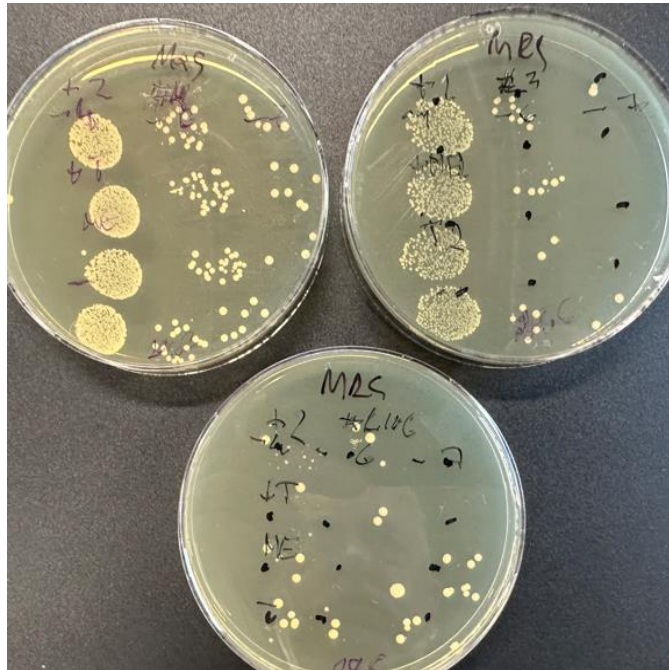


«Īsā saraksta» kultūru augšanas vizuālā un instrumentālā vērtēšana dažāda sastāv barotnēs

Augšana barotnē B0, 9 ml, stacionāri 48 h, 37oC + 1 ml buferējošais maisījums ; + 1 ml piedevu maisījums (burti uz mēģenes; apzīmējumi A, B, C tabulā) . Kontroles: «+» vai «-» . Tilpums vienādots ar 0.9% NaCl. Instrumentāli var vērtēt kopējo saduļķojumu, pH izmaiņas, kas veidojas pienskābes uzkrāšanās rezultātā un ir labs netiešs LAB aktivitātes indikators.

Kultūra	Buffersav..	Piedeva	ODx5	pH	Kultūra	Buffersav..	Piedeva	ODx5	pH
MKK 3	Ir	Nav	1.76	4.2	IND 2	Ir	Nav	1.49	4.01
MKK 3	Ir	A	1.53	4.25	IND 3	Ir	A	2.3	4.09
MKK 3	Ir	B	1.54	4.2	IND 4	Ir	B	1.91	3.94
MKK 3	Ir	C	1.7	4.2	IND 5	Ir	C	2	3.95
MKK 3	Nav	Nav	1.26	4.2	IND 6	Nav	Nav	1.5	3.91
MKK 3	Nav	C	1.64	4.2	IND 7	Nav	A	1.65	3.9
MKK 4	Ir	Nav	1.75	4.17	MKK 15	Ir	Nav	2	4.31
MKK 4	Ir	A	1.61	4.05	MKK 15	Ir	A	1.65	4.22
MKK 4	Ir	B	2	4.08	MKK 15	Ir	B	2	4.17
MKK 4	Ir	C	1.76	4.03	MKK 15	Ir	C	1.62	4.25
MKK 4	Nav	Nav	1.77	4.02	MKK 15	Nav	Nav	1.6	4.22
MKK 4	Nav	A	1.6	4.03	MKK 15	Nav	A	1.61	4.3

«Īsā saraksta» kultūru augšanas vizuālā un instrumentālā vērtēšana dažāda sastāv barotnēs

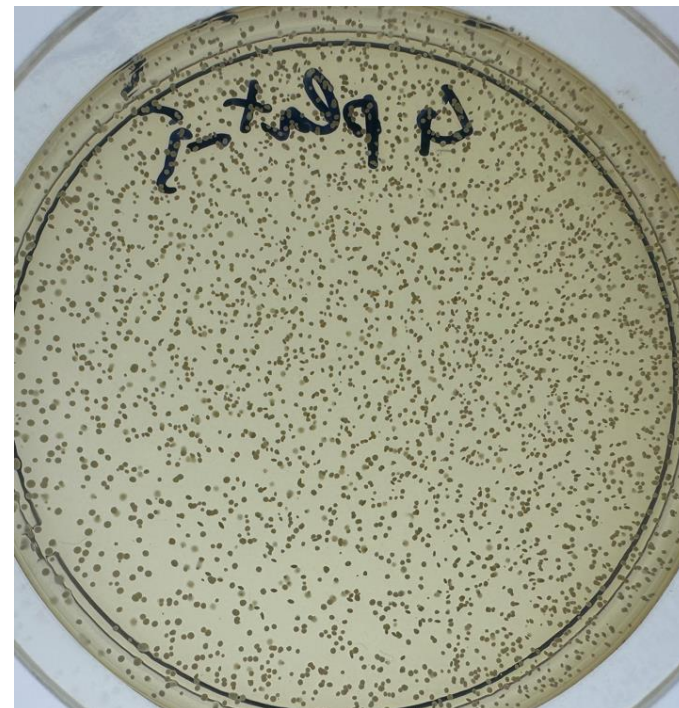


Kultūru KVV titrēšana no dažāda sastāva barotnēm pēc 48 h augšanas ar atšķaidījumiem uz MRS platēm. MKK 3, MKK 4 un MKK15 titrēts no visu barotņu tipiem ar pievienoto buferšķidumu (skat tabulu iepriekš). Visas četras kultūras - no barotnes B0, kur LAB audzētas bez buferšķiduma un papildvielu klātbūtnes. IND 2 (L100) kultūra, neraugoties uz masīvo uzkrāšanos mēģenēs, uz MRS aerobi negrib augt. To iespējams titrēt mīkstā virsagara slānī, daļēji ierobežojot skābekļa piekļuvi.



«Īsā saraksta» kultūru augšanas vizuālā un instrumentālā vērtēšana dažāda sastāv barotnēs

Kultūru KVV titrēšana no dažāda sastāva
barotnēm pēc 48 h augšanas ar
atšķaidījumiem uz MRS mīkstā virsagara
platēm.



IND 2 (L100) kultūra, neraugoties uz masīvo
uzkrāšanos mēģenēs, MRS mīkstā
virsagara slānī ar daļēji ierobežotu skābekļa
piekļuvi tomēr aug vājāk nekā pārējās,
kamēr AUT 13 izceļas ar lielu KVV skaitu.

Izvietolums:

MKK 3

MKK 4

IND 2

AUT 13



«Īsā saraksta» kultūru augšanas vizuālā un instrumentālā vērtēšana dažāda sastāv barotnēs

Neviena no pārbaudītajām piedevām vai mēģinājums papildu buferēt barotnes pH ar bufersavienojumu būtiski nemainīja pārbaudīto LAB kultūru augšanas intensitāti un pienskābes uzkrāšanu uz sūkalu bāzes veidotajās B tipa barotnēs, kurās jau sākotnēji ir pietiekami augsts, pH buferespēju nodrošinošs proteīnu daudzums, bet neviena no izmēģinātajām piedevām (A,B un C) salīdzinājumā ar standarta B barotnē izmantoto RE neveido īpašas, papildu augšanu un metabolismu stimulējošas vielas.

Dažos gadījumos fiksētās izmaiņas OD mērījumos, retāk pH vērtībā pēc 48 h inkubācijas pie 37oC stacionāri, mikroaerobi, 11 ml barotnes slānī 12 ml tilpuma mēģenē drīzāk liecina par nejaušām variācijām inokulāta kvalitātē.

Neraugoties uz to, ka eksperimentos tika izmantota uzņēmumā «Cesbvaines Piens» (CP) pasterizēts sūkalu koncentrāts un visi sūkalu paraugi tika vēlreiz autoklāvēti vai pasterizēti laboratorijā, vairākkārtīgi termiski apstrādātajos un pat pie 100oC 15 min izturētajos paraugos bija novērojama spontāna endogenas/autohtonas mikrofloras attīstība. Šādi iegūtās kultūras apzīmētas ar AUT. AUT 1 un 2 kultūras iegūtas jau no laboratorijā termiski apstrādātajiem sūkalu paraugiem; AUT 13 – no CP pasterizētā parauga. Šo kultūru koloniju morfolģija, mikroskopija, spēja veidot pienskābi no glikozes. to klātbūtne sūkalu paraugos liecina par piederību LAB grupai. Tā kā AUT 13 visstraujāk attīstījās MRS un veidoja lielu biomasu šajā barotnē, tālākajos eksperimentos lielākoties izmantota tieši šī kultūra.

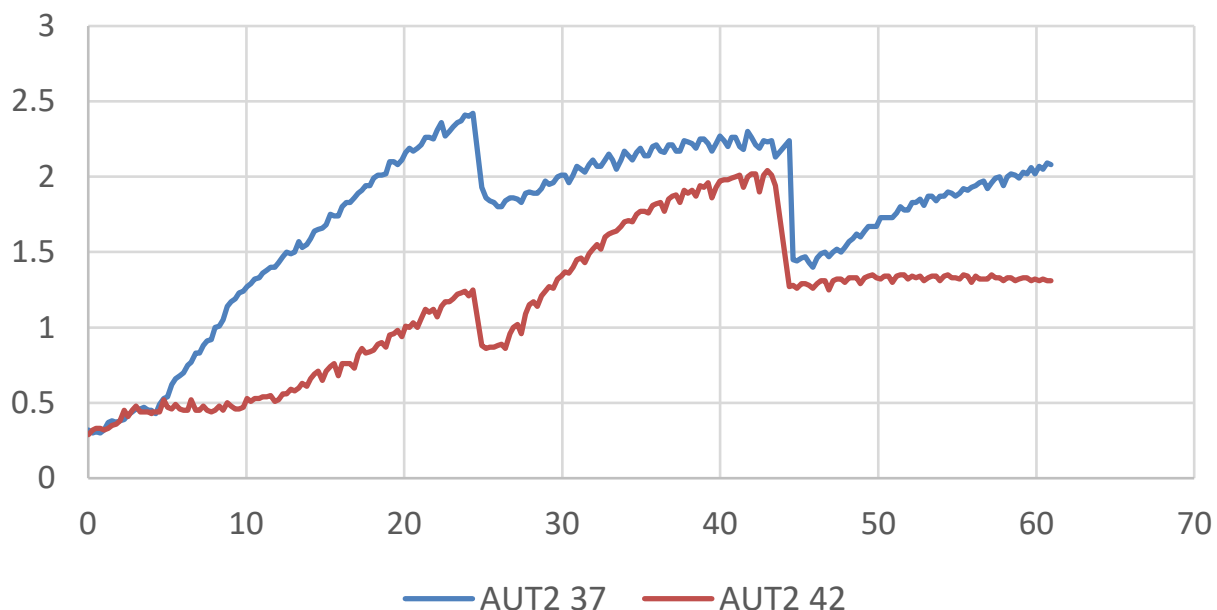
2. LAB kultūru augšanas dinamika un pienskābes veidošana uz sūkalu bāzes veidotās šķidrajās barotnēs

LAB kultūru augšanas dinamika un pienskābes veidošana uz sūkalu bāzes veidotās šķidrajās barotnēs.

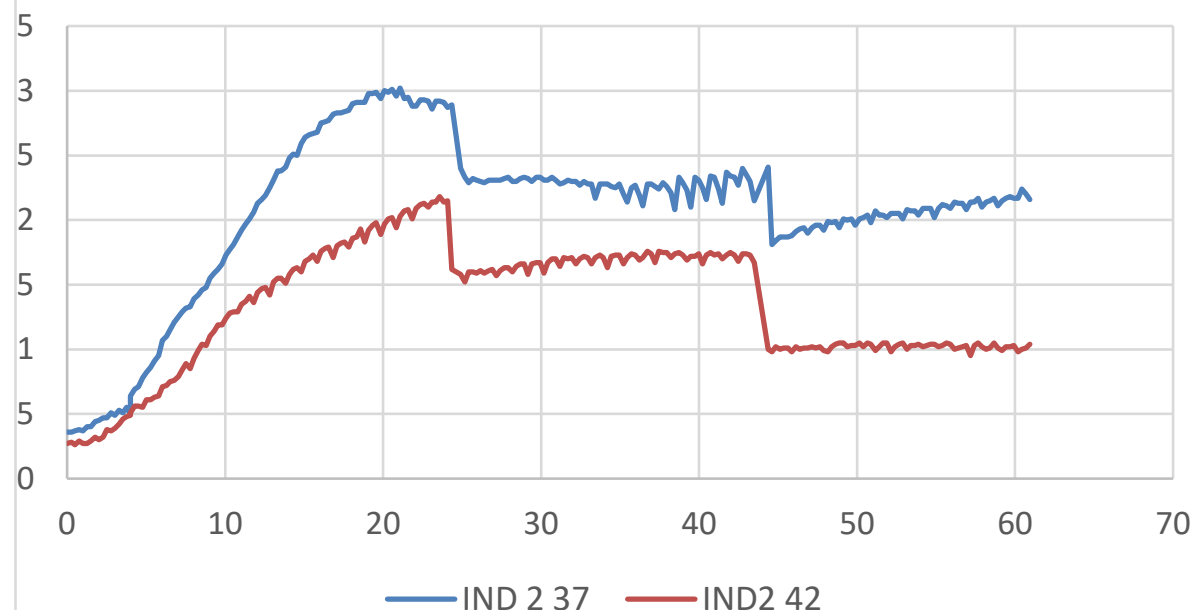
LAB kultūru augšana B2 barotnē pie 37 vai 42 °C RTS n x atkārtotu rotācijas / miera stāvokļa ciklu režīmā (5 min 300apgr/min; OD mērījums; 30 min stacionāri; OD mērījums; 25 min stacionāri, atkārtot no sākuma) x n
AUT 2 – LAB kultūra, kas audzējot stacionāru pie 42°C savairojusies pasterizētās un vēlreiz pie 100°C 15 min karsētās koncentrētās sūkalās.

Audzē pie 70°C 40 min pasterizētās un, lai atdalītu precipitēto proteīnu, dažādos režīmos centrifugētu sūkalu barotnēs bāzes, 35 ml tilpumā. Barotni inokulē ar 1,5 ml LAB naktskultūras no MRS. Pēc 24 h augšanas alikvotē 18 ml barotnes, ko aizstāj ar 18 ml H₂O. Atšķaidīšanu atkārto pēc 45h

LAB AUT 2 augšana pie 37 un 42°C RTS iekārtā



LAB IND 2 augšana pie 37 un 42°C RTS iekārtā

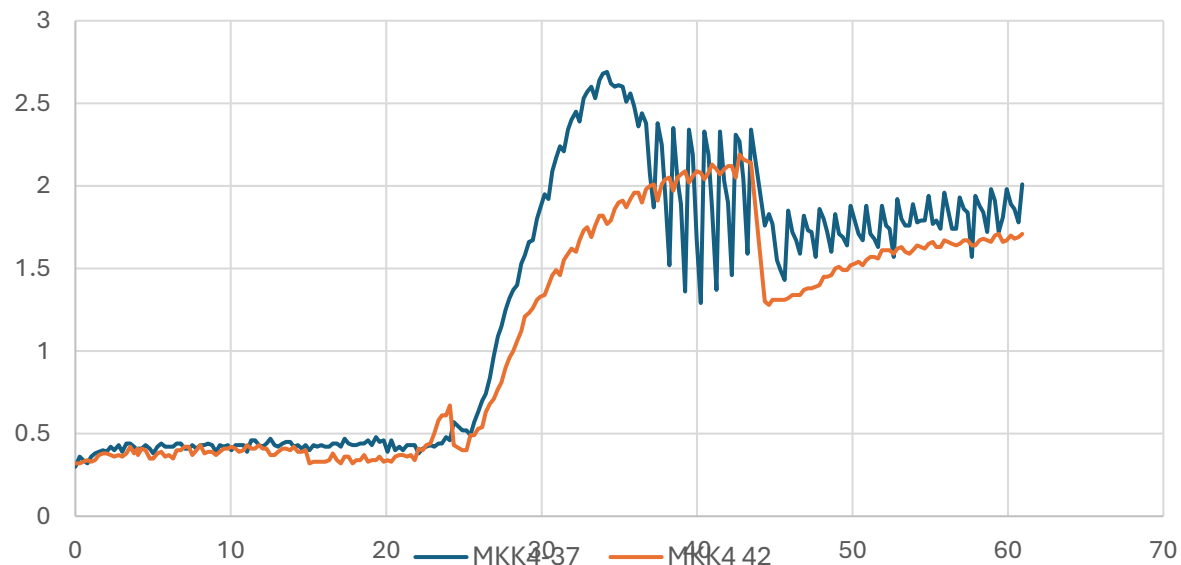


LAB kultūru augšanas dinamika un pienskābes veidošana uz sūkalu bāzes veidotās šķidrajās barotnēs.

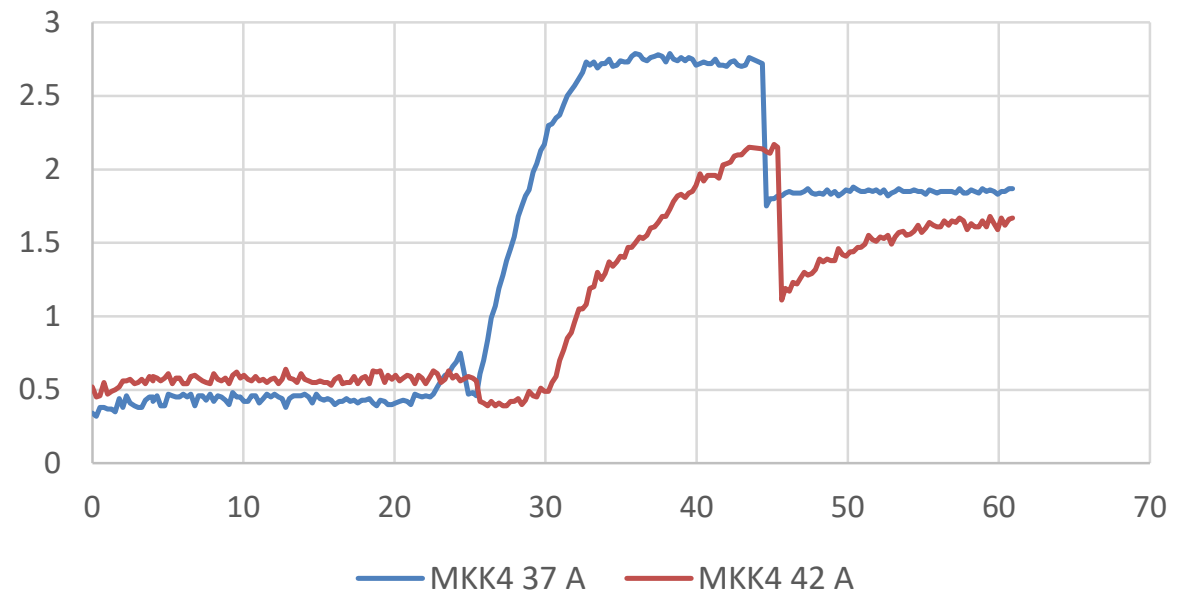
Eksperimenta apstākļi aprakstīti iepriekšējā slaidā

Redzams, ka visas kultūras, pat tās, kuras izolētas pie 42°C un spējušas izdzīvot atkārtotas termiskas apstrādes laikā, tomēr ir mezofilas – aug labāk pie 37, nevis 42°C. «Zāģi» augšanas līknē veido LAB šūnu sedimentācija/resuspendēšana periodiski rotētā atšķaidītā un tādejādi mazāk blīvā barotnē.

LAB MKK 4 augšana pie 37 un 42°C RTS iekārtā



LAB MKK 4 augšana pie 37 un 42°C aerējot RTS iekārtā

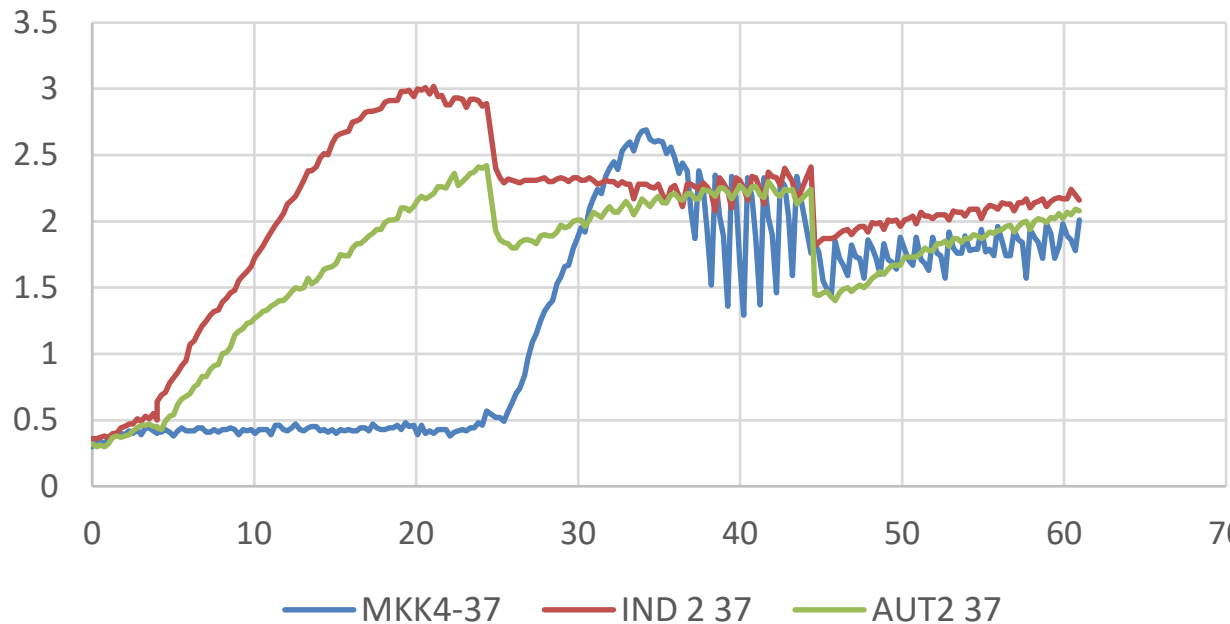


LAB kultūru augšanas dinamika un pienskābes veidošana uz sūkalu bāzes veidotās šķidrajās barotnēs.

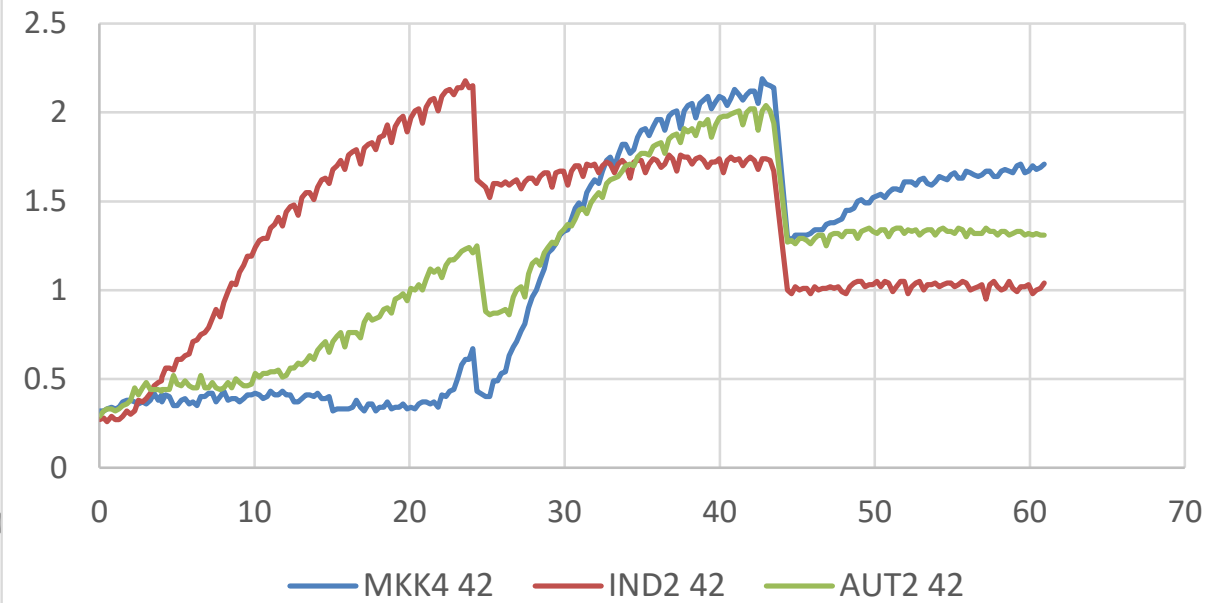
Eksperimenta apstākļi aprakstīti iepriekšējā slaidā

Redzams, ka izmantotā barotne B2 ir pietiekami bagāta ar barības vielām, lai spētu uzturēt kultūru augšanu arī pēc atkārtotas atšķaidīšanas. Straujākais sākotnējās augšanas temps novērojams kultūrai IND 2. MKK 4 usāk augšanu diennakti vēlāk nekā IND 2, bet sasniedz gandrīz identiskus maksimālos rādītājus, kuri gan atpaliek no cita tipa B barotnēs gūstamajiem rezultātiem.

Trīs LAB kultūru augšana pie 37°C RTS iekārtā



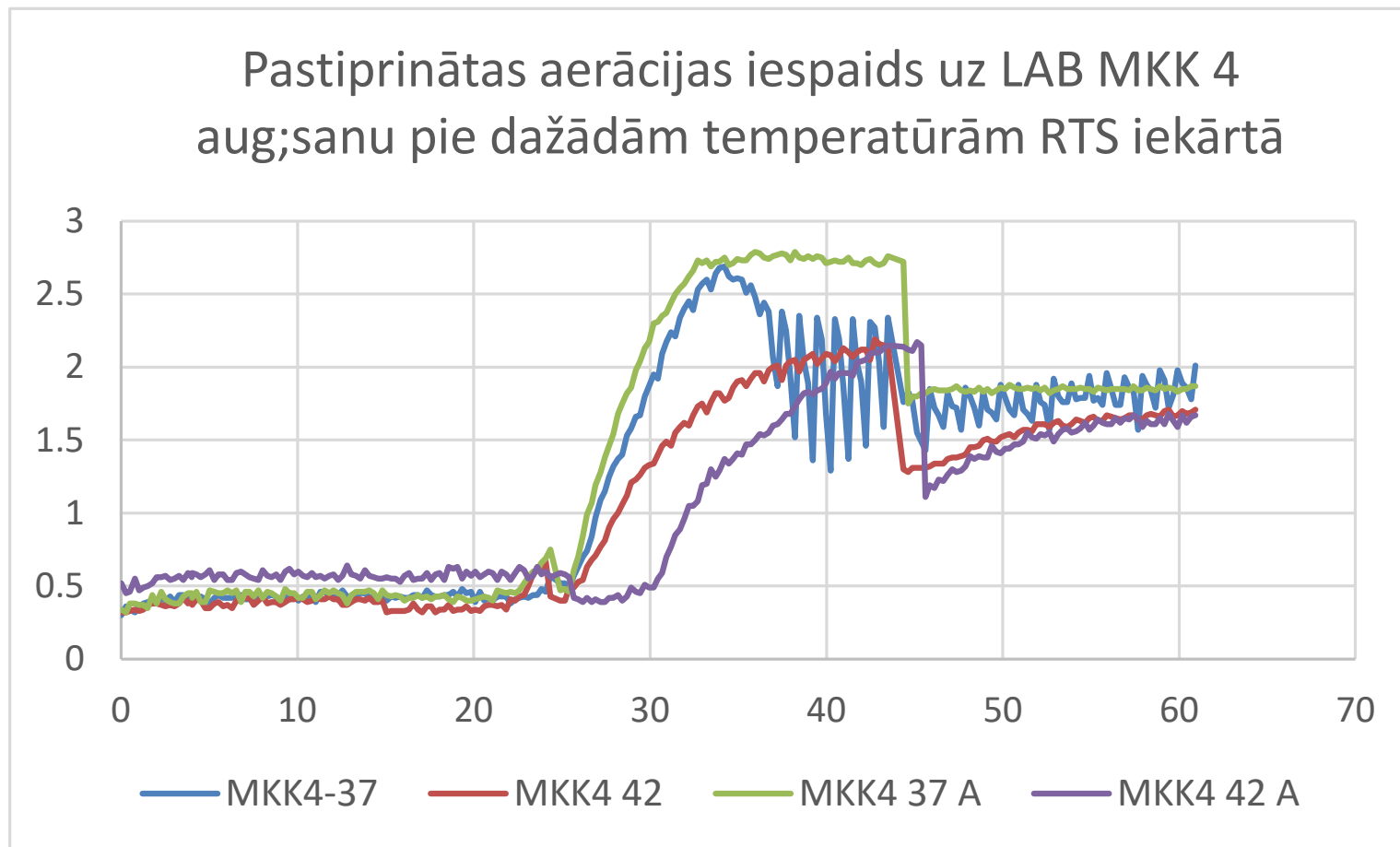
Trīs LAB kultūru augšana pie 42°C RTS iekārtā



LAB kultūru augšanas dinamika un pienskābes veidošana uz sūkalu bāzes veidotās šķidrajās barotnēs.

Eksperimenta apstākļi aprakstīti iepriekšējā slaidā

Aerācijas intensitāte maz iespaido MKK 4 kultūras augšanu B2 barotnē pie 37°C, mazliet kavē pie 42°C



LAB kultūru augšanas dinamika un pienskābes veidošana uz sūkalu bāzes veidotās šķidrajās barotnēs.

Eksperimenta apstākļi aprakstīti iepriekšējā slaidā

No LAB kultūrām paraugi laktozes šķelšanas produktu analīzei ar HPLC ņemti vienlaikus ar atšķaidīšanu., kuras rezultātā laktozes koncentrācija samazinās, bet pienskābes koncentrācija barotnē tomēr saglabājas būtiski nemainīga, kas apliecina laktozes tālāku izmantošanu.

Paraugs	t ^o	Glikoze	Pienskābe	Etīkskābe
MKK 4	37	0	4.02	1.01
MKK 4	42	0	3.78	0.99
IND 2	37	0	10.55	2.69
IND 2	42	0	8.17	3.07
AUT 42	37	0	9.16	2.83
AUT 42	42	0	5.64	2.33
MKK 4 aer	37	0	4.54	1.27
MKK 4 aer	42	0.14	2.31	0.58
48 h 2x atšķaida un audzē vēl 24 h				
MKK 4	37	0	6.92	1.47
MKK 4	42	0	5.89	1.51
IND 2	37	0	7.34	1.58
IND 2	42	0	5.33	1.67
AUT 42	37	0	6.35	1.67
AUT 42	42	0	5.60	1.67
MKK 4 aer	37	0	5.10	1.32
MKK 4 aer	42	0	3.69	1.14

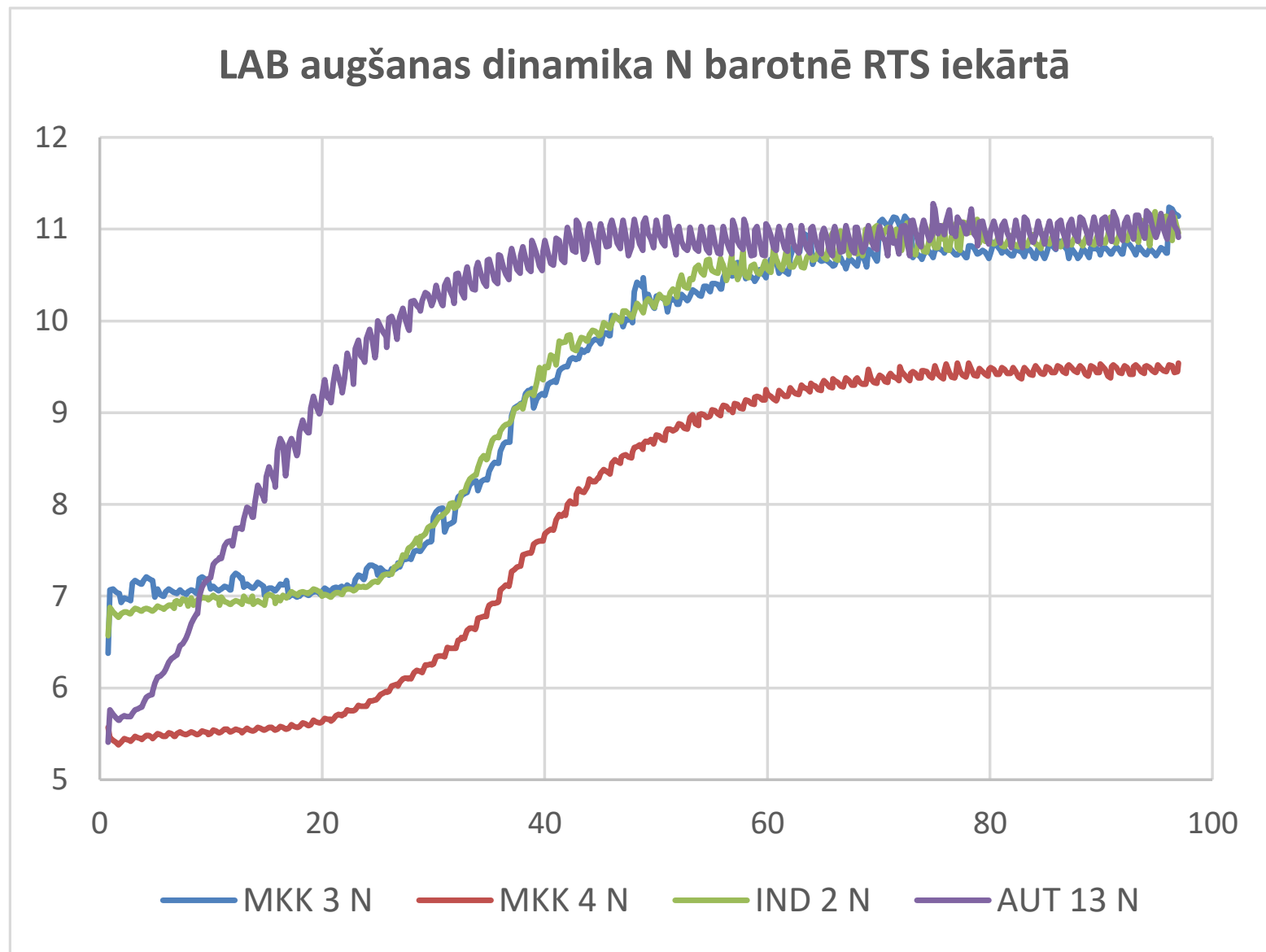
LAB kultūru augšanas dinamika un pienskābes veidošana uz N un B sūkalu bāzes veidotās šķidrajās barotnēs RTS iekārtā

Kultūras audzē identiskos cikliskas rotācijas/ miera stāvokļa atkārtojumu režīmā (aprakstīts iepriekš).

N barotnē augstākais sākotnējais augšanas ātrums ir AUT 13 kultūrai, kura iegūta no uzņēmumā CP pasterizētām koncentrētām sūkalām.

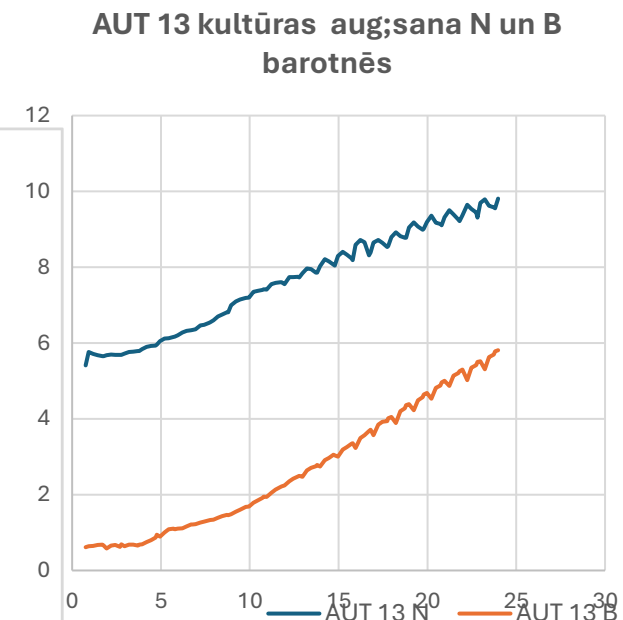
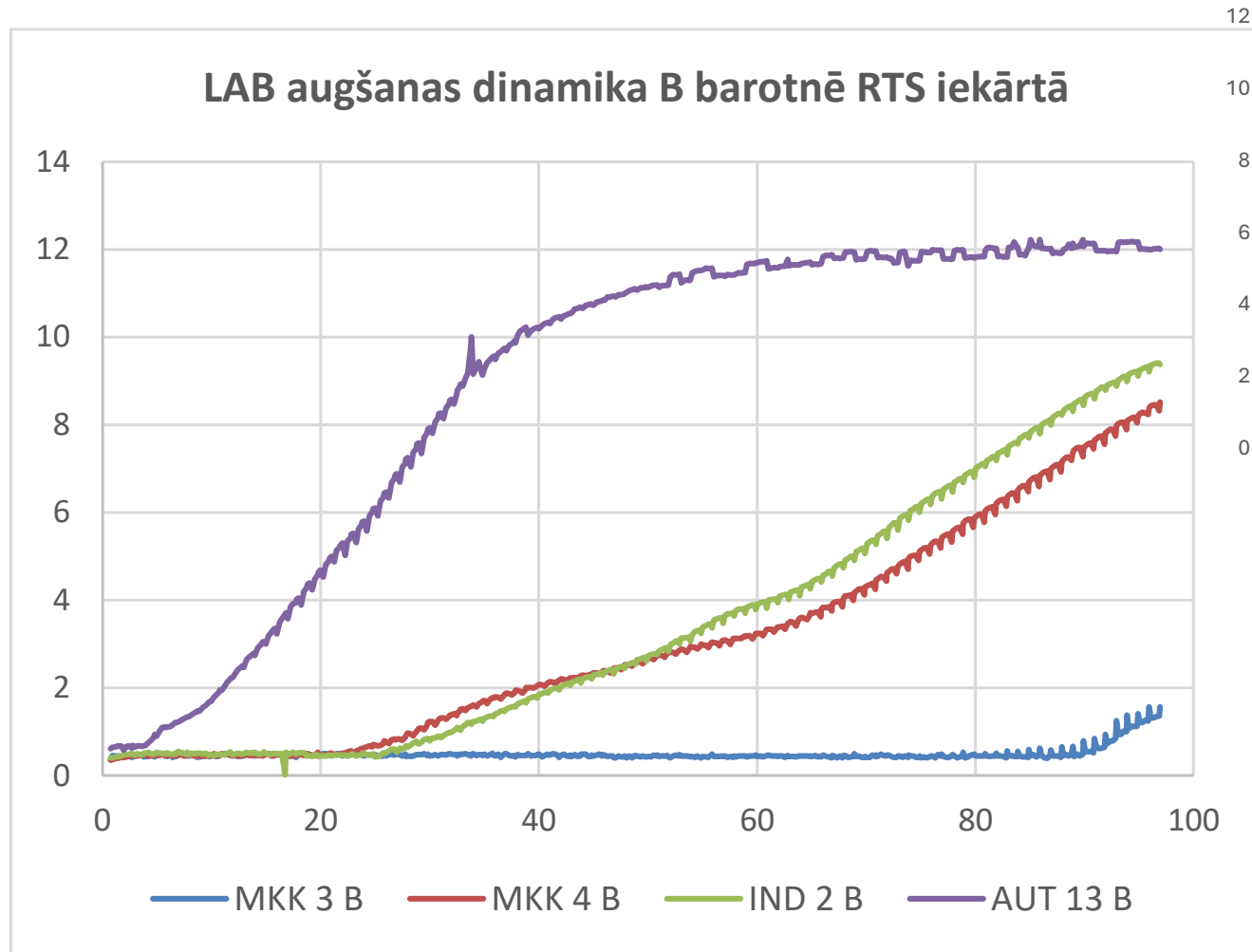
Kultūras MKK 3 un IND 2 līdzīgu augšanas tempu sasniedz pēc diennakts adaptācijas

Sākotnējā barotnes turbiditāte veido augstu OD bāzes līniju.

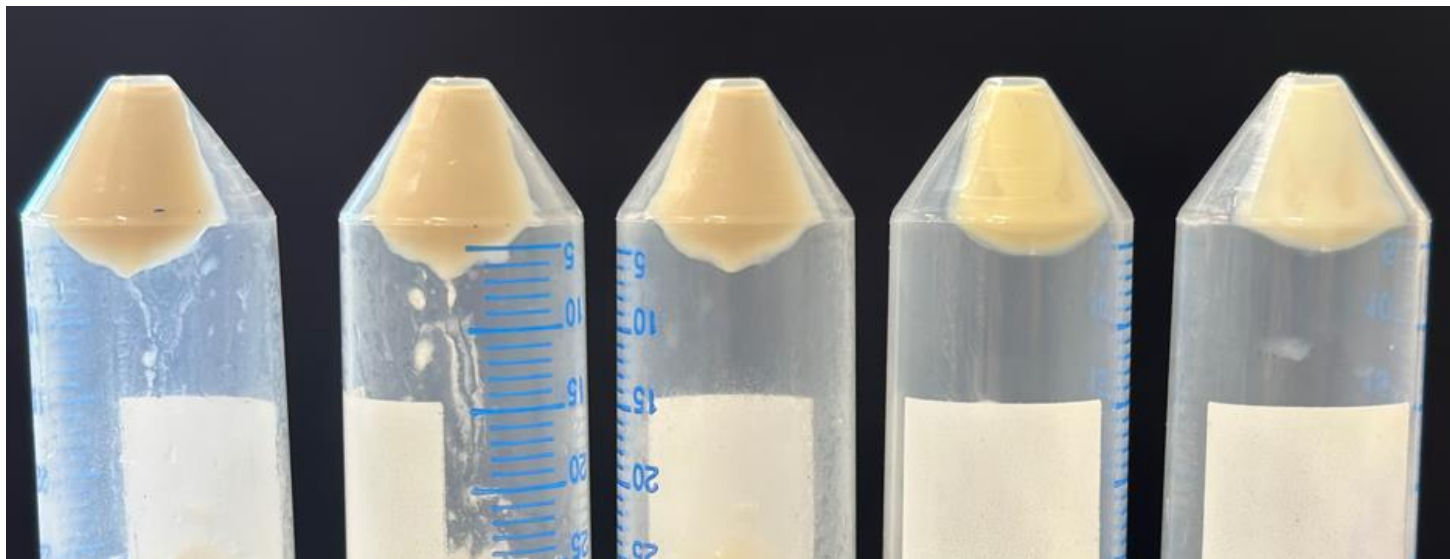


LAB kultūru augšanas dinamika un pienskābes veidošana uz N un B sūkalu bāzes veidotās šķidrajās barotnēs RTS iekārtā

Audzēšanas režīms veidu «zāģa zobu» profiku augšanas līknē (i»ezoomēts» fragments) Arī B barotnē AUT 13 kultūrai ir lielākais augšanas sākuma ātrums, kuram netiek līdzī ne MKK 4, ne IND 2, lai gan šīs kultūras pēc 120-130 stundām sasniedz tādu pašu OD (ap 12) kā AUT 13. MKK 3 sāk augt tikai pēc apm 90 stundām.



LAB kultūru biomasa un (iespējams) barotnes nogulsnes pēc 132 h augšanas N un B barotnēs RTS iekārtā



Kultūras centrifugētas pie 13 000 rpm, 12°C, 15 min.

Augšējais attēls: N barotne, apakšā – B.

No kreisās:

MKK 3

MKK 4

IND 2

AUT 13

Kontrole, endogēnās floras klātbūtne + proteīna precipitācija



B barotnēs nocentrifugēto masīvo nogulšņu mitrā masa = 2,5-2,7 g no apm.35 ml kultūras. Citur – tipiski ap 0,5 g.

LAB kultūru augšanas dinamika un pienskābes veidošana uz N un B sūkalu bāzes veidotās šķidrajās barotnēs RTS iekārtā

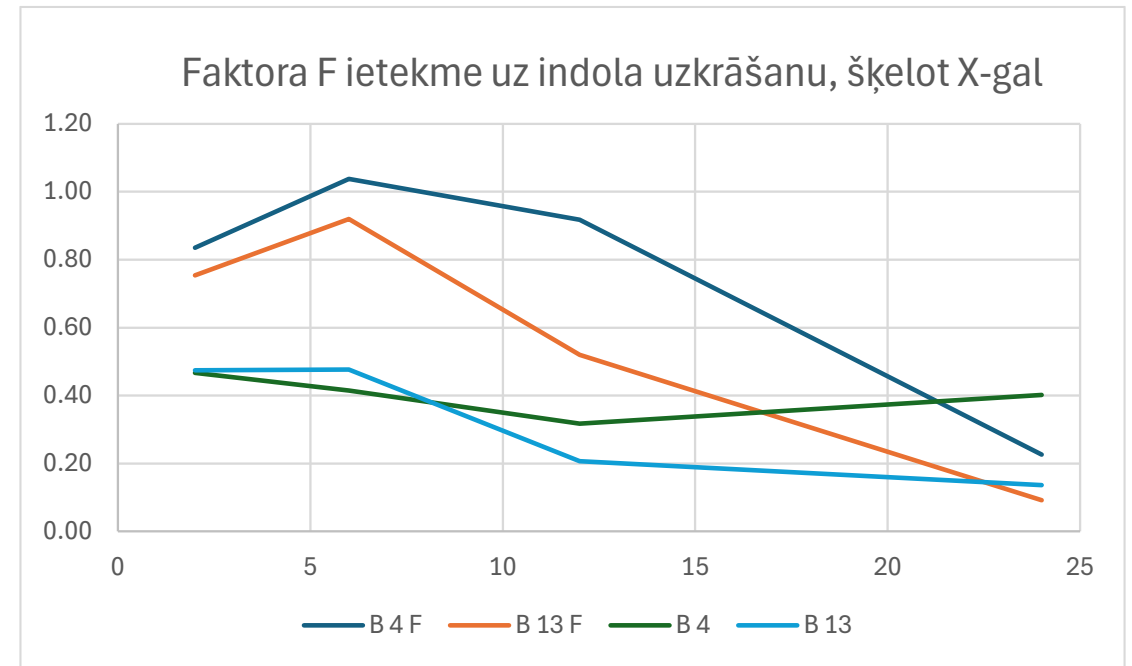
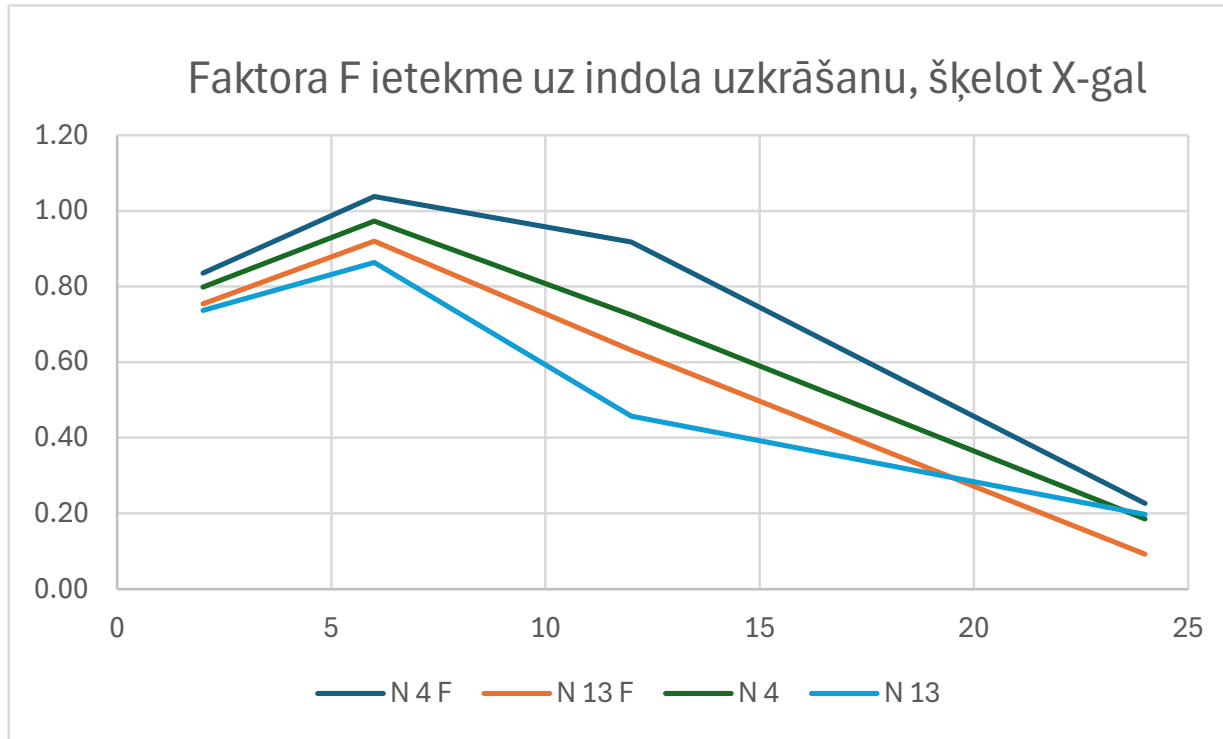
Barotne	Inokulāts	Glikoze	Pienskābe	Etiķskābe
B + stac	MKK 3	12.6	20.6	1.9
	MKK 4	13.1	21.5	1.8
	IND 2	12.9	22.5	2.0
	AUT 1	0.0	24.0	0.7
	Kont AUT	0.0	7.5	0.0
B stac	MKK 3	13.0	22.6	1.9
	MKK 4	12.8	23.4	2.2
	IND 2	13.2	21.5	1.5
	AUT 1	0.0	25.9	0.8
	Kont AUT	0.0	17.5	1.1
B-RTS	MKK 3	21.0	10.0	1.2
	MKK 4	20.6	20.2	1.1
	IND 2	20.8	26.5	1.0
	AUT 1	0.0	21.0	0.8
	Kont AUT	0.0	23.2	0.8

Barotne	Inokulāts	Glikoze	Pienskābe	Etiķskābe
N +stac	MKK 3	3.3	4.5	0.4
	MKK 4	3.4	4.7	0.4
	IND 2	3.6	4.3	0.3
	AUT 1	0.0	5.2	0.2
	Kont AUT	0.0	3.5	0.2
N stac	MKK 3	0.0	14.8	0.9
	MKK 4	3.1	15.0	1.1
	IND 2	2.8	14.7	0.9
	AUT 1	3.3	16.4	0.8
	Kont P	0.0	5.3	0.7
N-RTS	MKK 3	4.1	16.1	0.6
	MKK 4	4.2	14.1	0.9
	IND 2	4.2	13.9	0.9
	AUT 1	0.0	5.3	0.9
	Kont AUT	0.0	4.6	0.2

LAB neinokulētas kontroles barotnes audzētas stacionāri pie 370C, *Falcon* mēģenēs ar uz RTS audzētajiem stobriem identisku barotnes sastāvu un tilpumu.

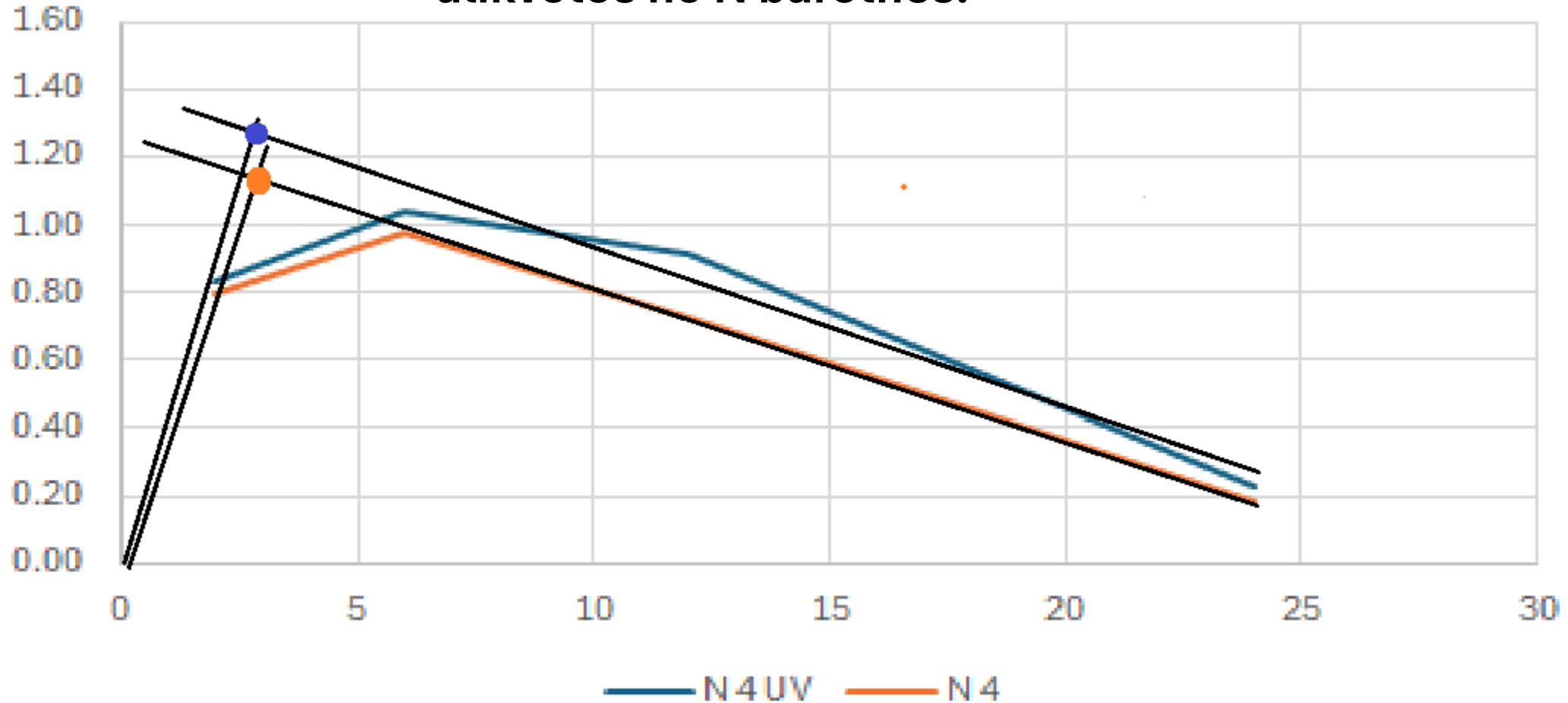
Eksperimentā vērojama liela glikozes daudzuma uzkrāšanās līdz ar pienskābi MKK3, MKK 4 un IND 2 kultūrās. Atšķirībā no tām AUT 13, kam raksturīga pati intensīvākā augšana, veido tikai pienskābi. Iespējams, ka paraugos, kas ņemti no kultūrām, kuras vēl turpina augt, glikoze vēl nav pilnīgi izmantota, bet AUT 13 jau ir stacionārā. Tas gan nevarētu būt tik izteikti atšķirīgas glikozes koncentrācijas iemesls N barotnē.

X-Gal šķelšanas produkti dažāda sastāva 'MKK4 un AUT 13 kultūru alikvotos no N barotnes.



0,2 ml alikvoti ņemti no 48 h audzētām N kultūrām, turpmāk kultivēti 96 lauciņu PCR platēs divos atkārtojumos, pievienojot katram lauciņam 2 ul X-Gal bāzes šķīdumu. Viņa plate pirms kultūras ienešanas apstrādāta ar UV starojumu, kas var veicināt lokālu ROS veidošanos – F faktors, Tumši zilo krāsu veido 5-bromo-4-hloro-3-hidroksindigo, kas rodas no hromogēnā substrāta X-gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozīda) laktozi šķeļošā enzīma, beta-galaktozidāzes (b-Gal) iedarbībā. Krāsu veidojošais savienojums ilgstošas inkubācijas rezultātā izbalē oksireductāžu, peroksidāžu un monooksigenāžu darbības rezultātā, adsorbējoties uz šūnām, vai tiekot transportēts šūnās.

X-Gal šķelšanas produkti dažāda sastāva 'MKK4 un AUT 13 kultūru alikvotos no N barotnes.



legūtās līknes faktiski parāda sākotnējo krāsvielas akumulāciju un tās tālākās metaboliskās konversijas intensitāti, kas arī var būt LAB biomasas bioloģiskās aktivitātes rādītājs. Maksimālo krāsvielas uzkrāšanās intensitāti var aprēķināt, ekstrapolējot lejupejošo līkni un atrodot krostpunktu ar taisni, kas savieno koordinātu sākuma punktu ar pirmē mērījuma rezultātu. Tas parādīts, izmantojot iepriekšējā slaidā redzamo divu līkņu piemēru.

3. BAP frakcijas veidošanās novērtējums, izmatojot kapilārās elektroforēzes (KEF) analīzi

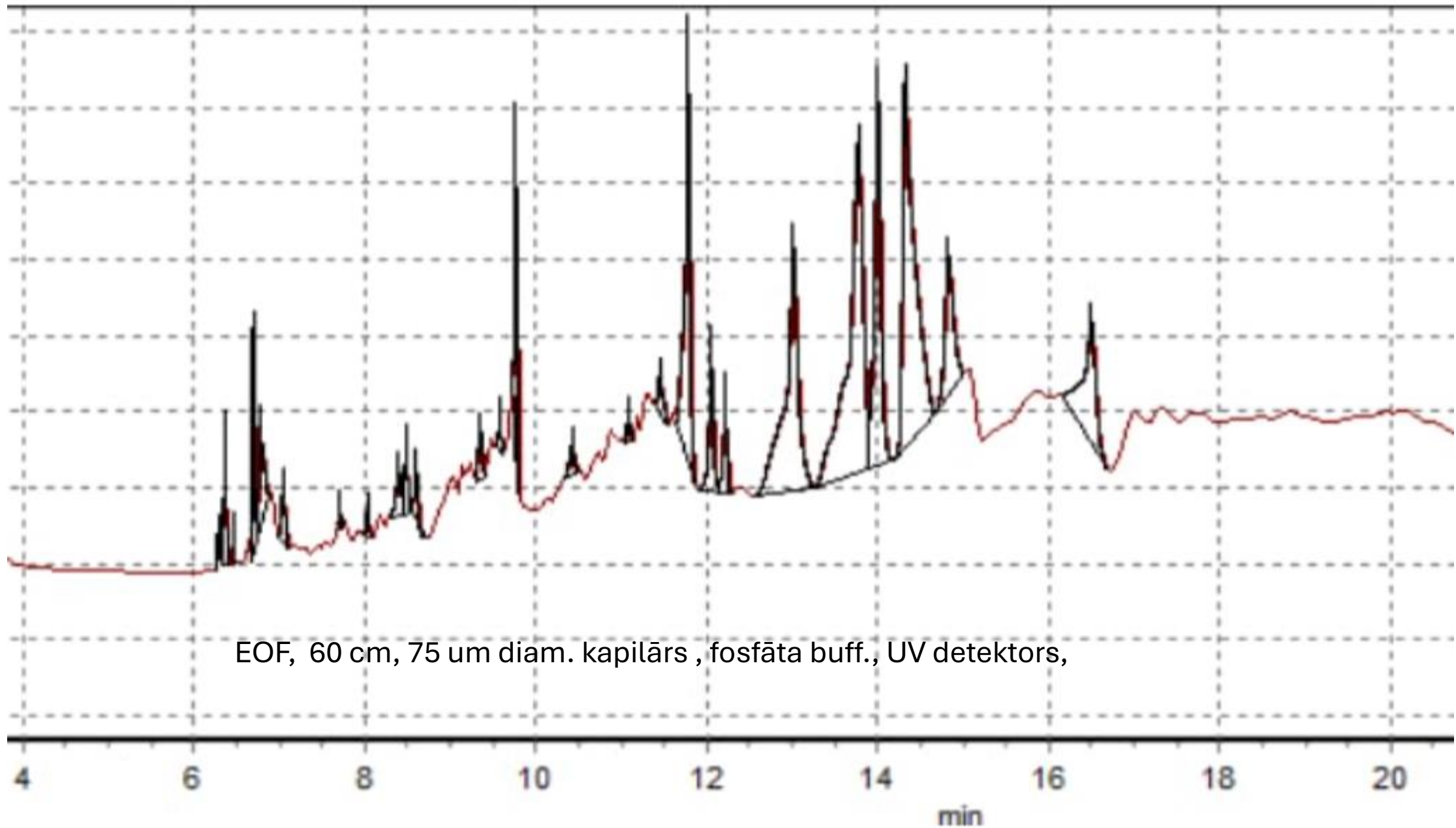
BAP frakcijas veidošanās novērtējums, izmantojot kapilārās elektroforēzes un HPLC analīzes

Lai novērtētu BAP frakcijas apjomu un sastāvu ar Kapilārās elektroforēzes (KEF) un augstspiediena šķidrumu hromatogrāfijas (HPLC) metodēm, nepieciešams sākotnēji atbrīvoties no augstmolekulārajiem proteīnu komponentiem fermentētajās sūkalās ar diferenciālas ultrafiltrēšanas palīdzību. Izmantojām Millipor un Sartorius firmu ultrafiltrus ar molekulmasas caurlaidības līmeņiem (MW cutoff , MWCO) 100kDa, 10 kDa, 5 kad un 3 kDa. Pirms ultrafiltrēšanas fermentēto sūkalu paraugi tika atbrīvoti no iespējamajiem piemaisījumiem, izmantojot membrānas filtru ar 0,45 um poru diametru. Spektrofotometrijas dati parādīja, ka filtrētajos paraugos varētu būt saglabāties analīzei pietiekams proteīna daudzums.

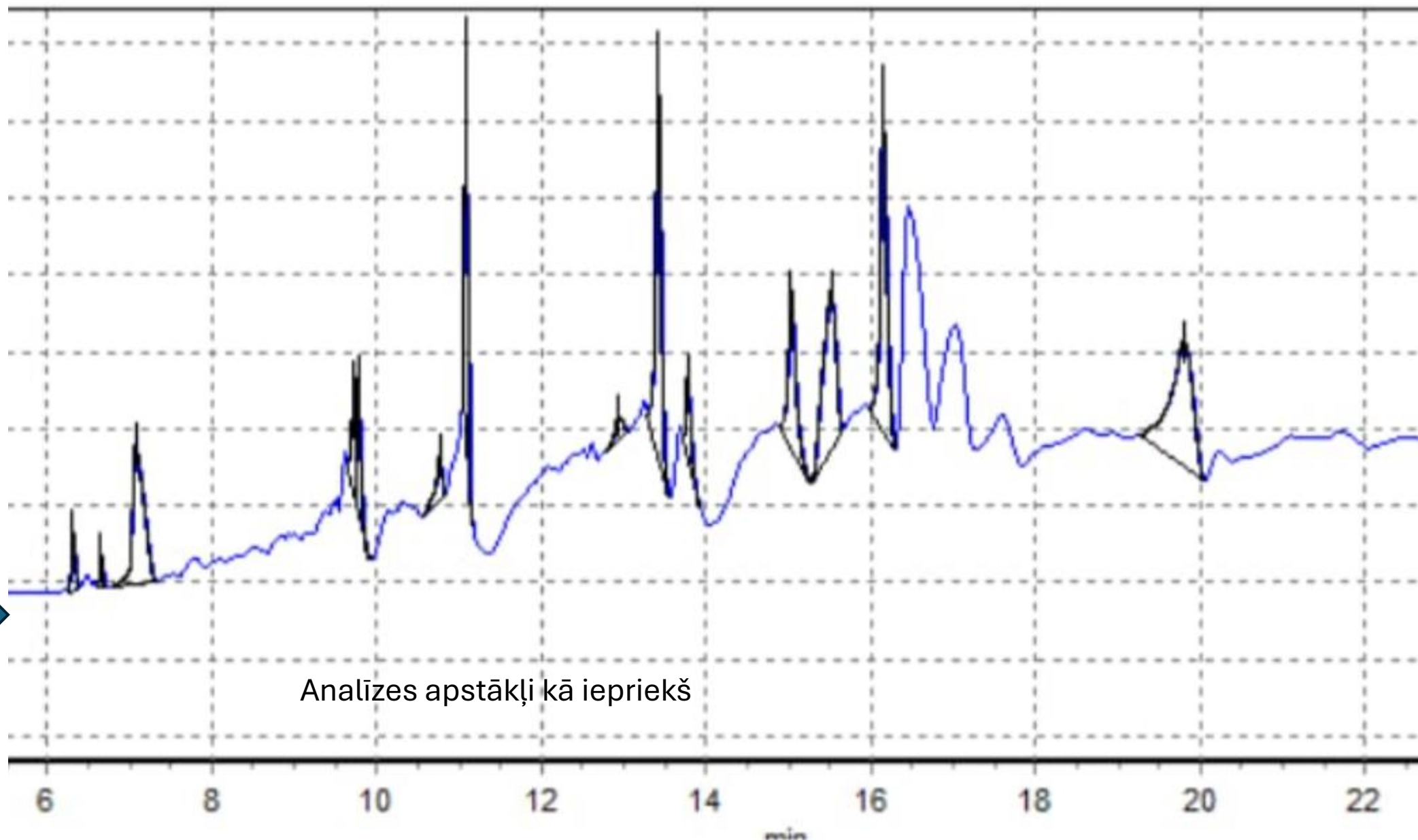
MWCO	Fraction	A280	260/280	Prot..mg/ml	Perserved vol.
Lactobacillus johnsonii MSC 1277					
100 KDa	Retentate	17.89	0.97	17.9	500 µL
100 KDa	Filtrate	3.56	1.02	3.6	500 µL x 2
10 KDa	Retentate	1.06	0.96	1.1	500 µL
10 KDa	Filtrate	3.12	1.03	3.1	500 µL x 2
5 KDa	Retentate	3.33	1.03	3.3	500 µL
5 KDa	Filtrate	3.31	1.04	3.3	500 µL x 2
3 KDa	Retentate	3.07	1.03	3.1	500 µL
3 KDa	Filtrate	2.96	1.02	3.0	500 µL x 2
Kluyveromyces marxianus MSC 286					
100 KDa	Retentate	21.90	0.99	21.9	500 µL
100 KDa	Filtrate	4.03	1.15	4.0	500 µL x 2
10 KDa	Retentate	1.21	1.11	1.2	500 µL
10 KDa	Filtrate	3.40	1.16	3.4	500 µL x 2
5 KDa	Retentate	3.59	1.17	3.6	500 µL
5 KDa	Filtrate	3.41	1.18	3.4	500 µL x 2
3 KDa	Retentate	3.35	1.18	3.4	500 µL
3 KDa	Filtrate	3.23	1.16	3.2	500 µL x 2

Tabulā norādītie paraugi nodoti HPLC analīzei

Sterilas MRS barotnes proteīnu un peptīdu KEF analīze,



MKK celms #547 kultivēts barotnē MRS, proteīni un peptīdi supernatantā



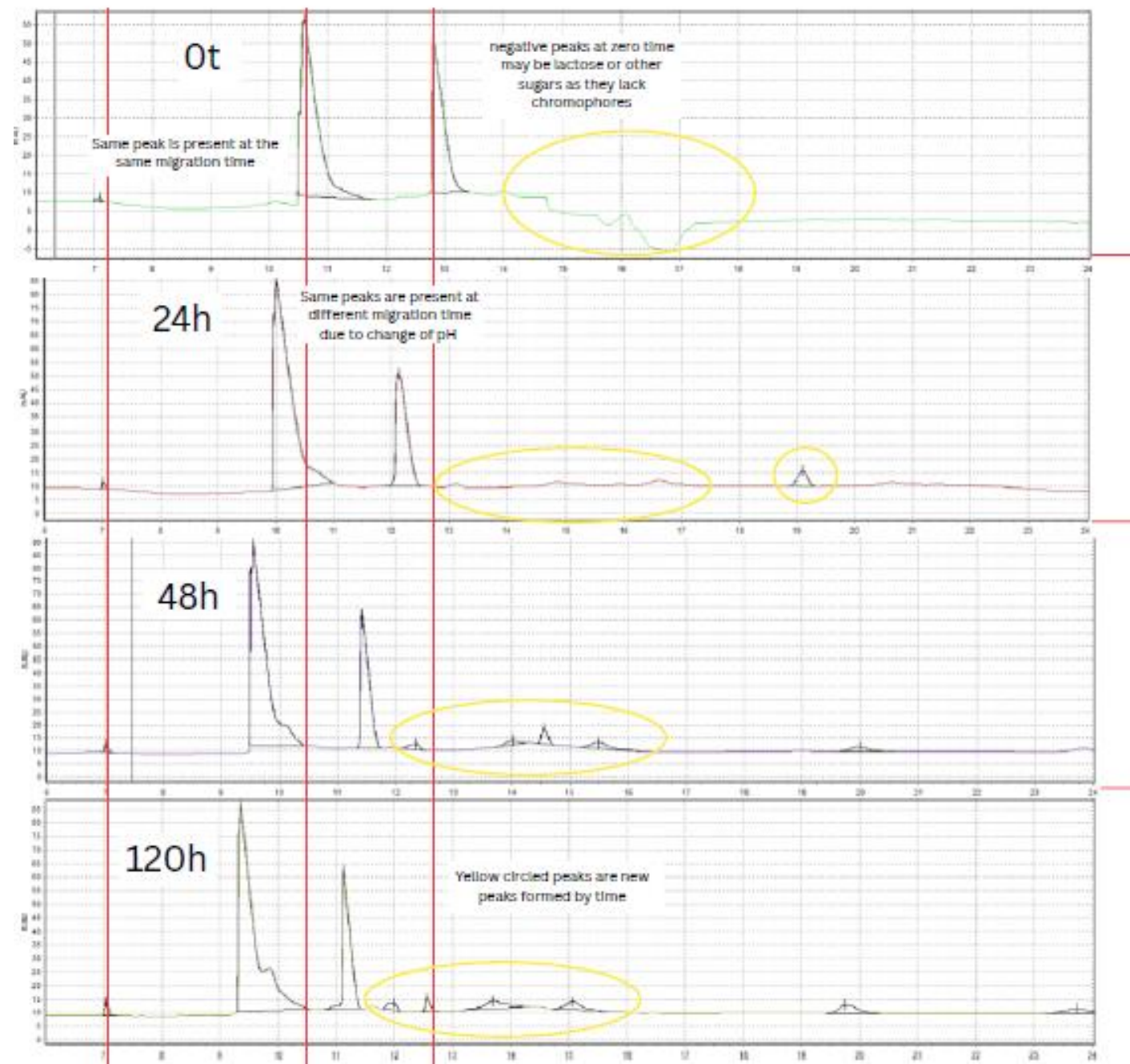
MKK celms #51277 kultivēts barotnē MRS, proteīni un peptīdi supernatantā



Autklavēta un caur membrānu filtru filtrēta NPW proteīnu un peptīdu analīze, uzglabājot preparātu bez inokulācijas 37°C temperatūrā.

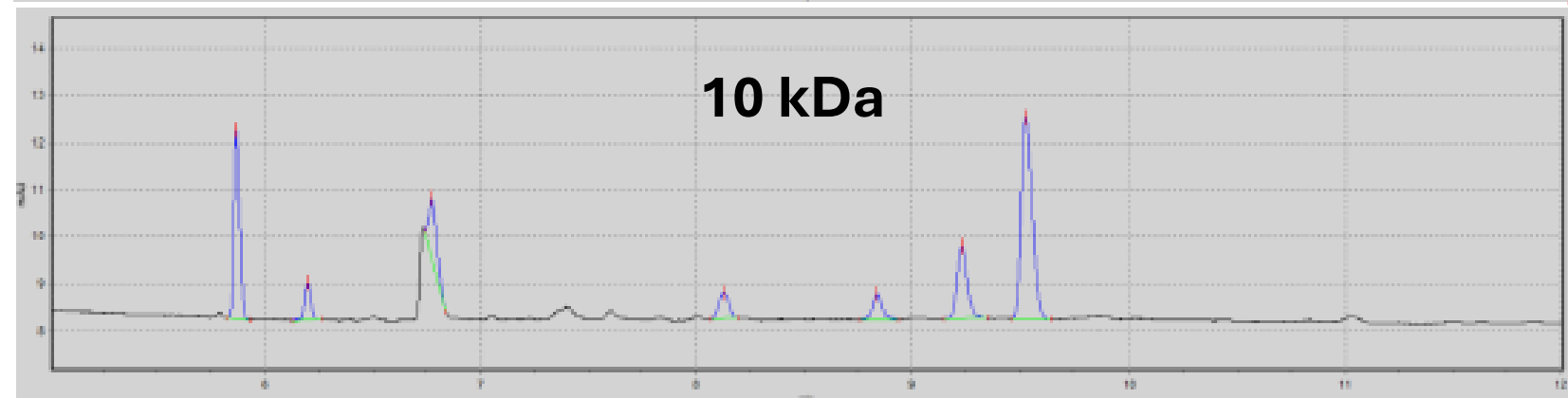
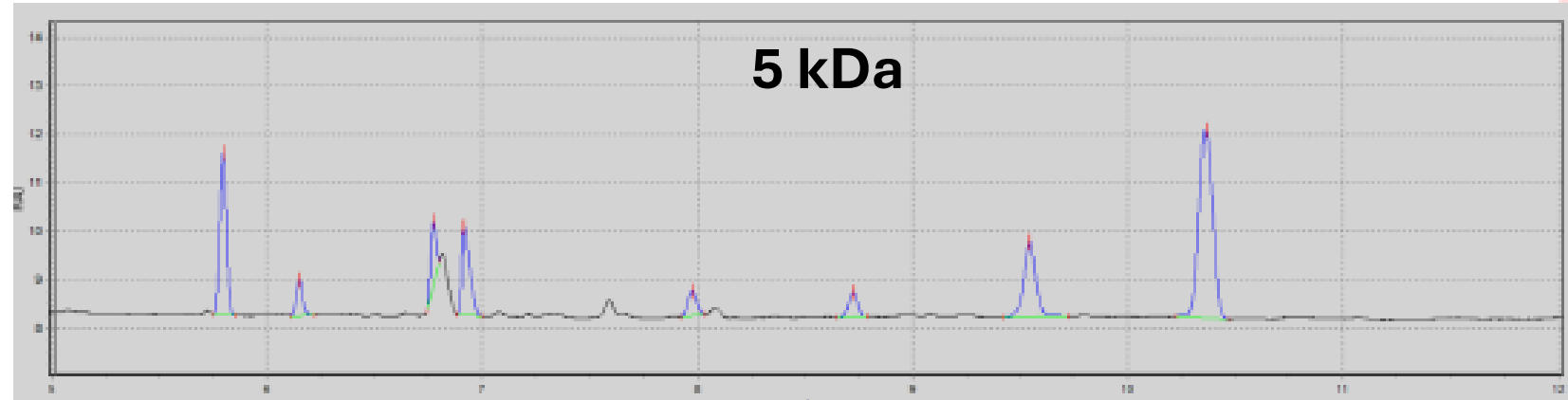
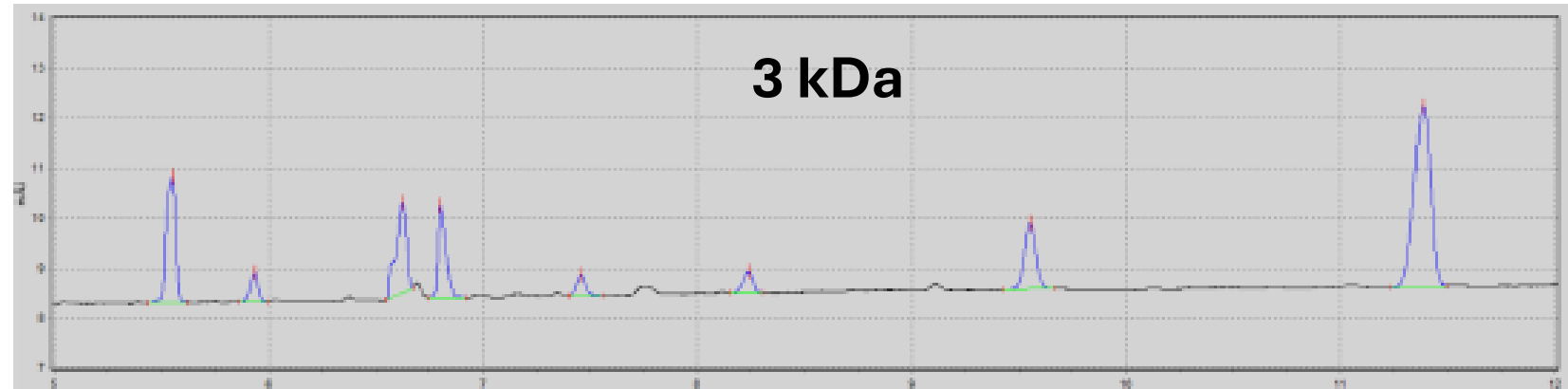
Inkubējot pazeminās sūkalu pH, pīķi nobīdās. Pakāpeniski uzkrājas EOP lēnāk eluējošies minori peptīdu pīķi (dzeltena elipse).

Lielie pīķi atbilst laktalbumīna un laktoglobulīna frakcijām sūkalās.



Kluyveromyces marxianus 286 kultūras supernatanta KEF analīze.

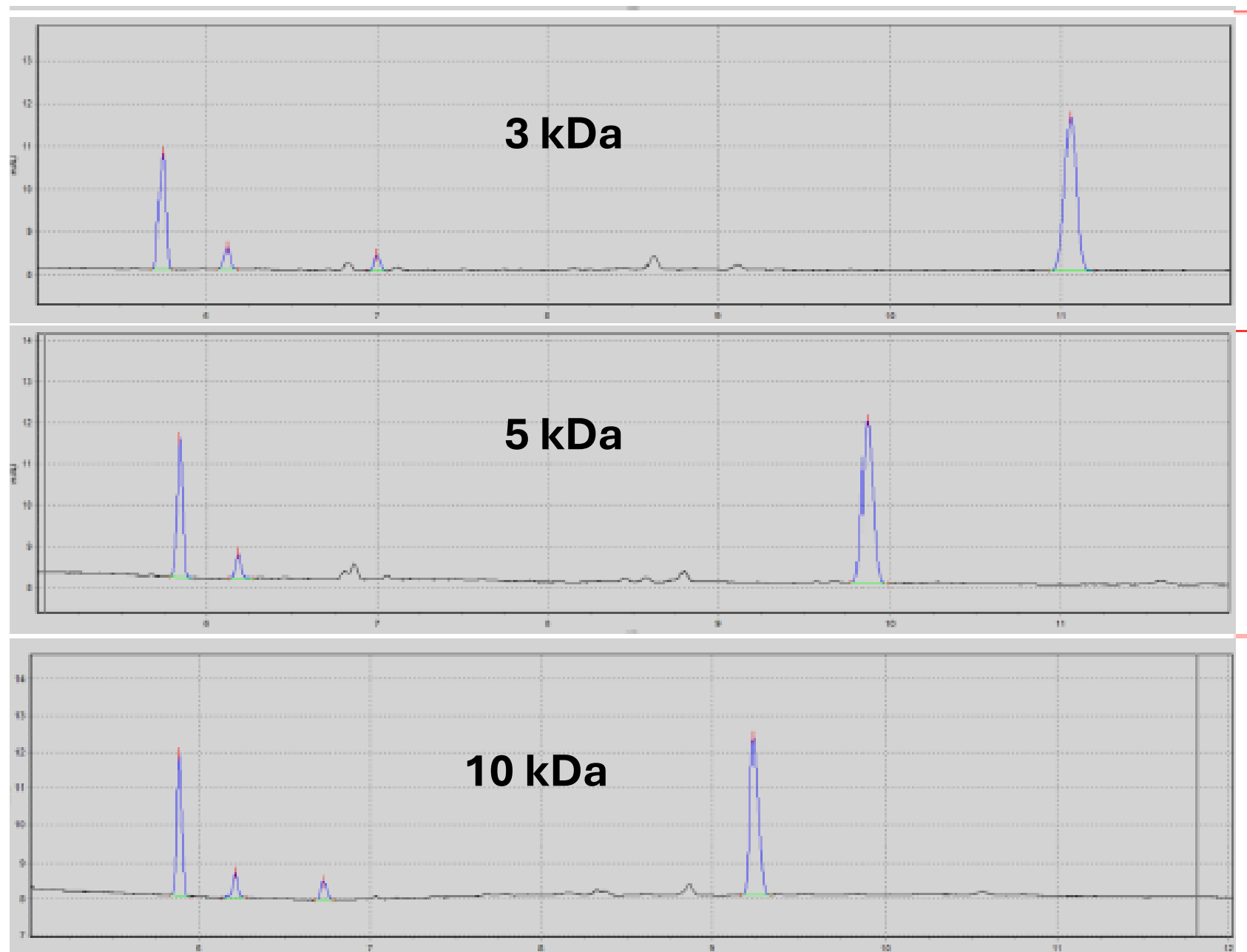
MRS barotnes
supernatants filtrēts
caur membrānu filtru un
tālāk frakcūnēts ar
MWCO 'filtriem.
KEF sadalījums, analizējot
aizvien mazāka MWCO
filtrātus it kā «izstiepjas».
Daži pīķi pie zemāka
MWCO tomēr nav
atrodami.



**Lactobacillus
johnsonii MKK 1277
kultūras
supernatanta KEF
analīze.**

MRS barotnes
supernatants filtrēts
caur membrānu filtru un
tālāk frakcionēts ar MWCO
filtriem.

KEF sadalījums, analizējot
aizvien mazāka MWCO
filtrātus it kā «izstiepjas».
Pīķi šķietami paliek tie
paši.



4. Publikācijas manuskripta sagatavošana

Kopsavilkums un galvenie attēli

Variability of Lactobacilli Metabolic Performance at Cheese Whey Fermentation: Response Surface Analysis for Two Strains.

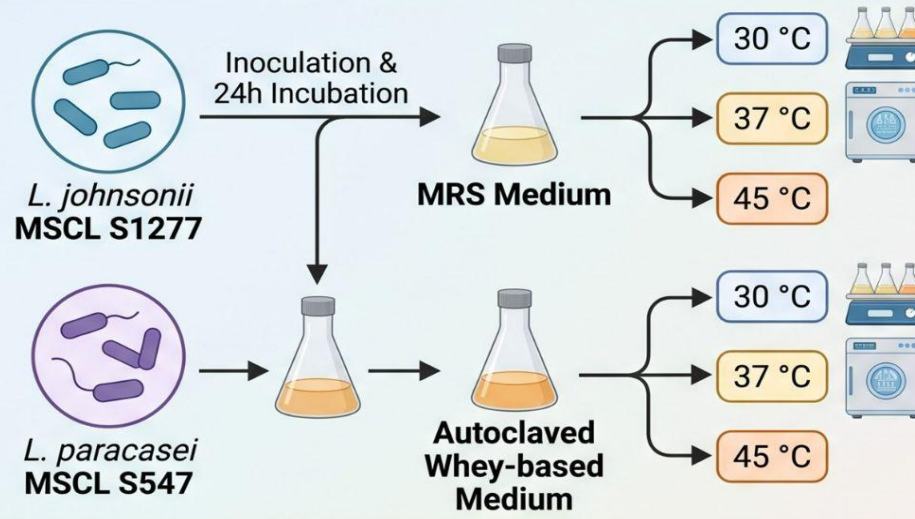
Abstract

Fermentation of cheese whey provides versatile opportunities for valorization applications because of its abundance in production lines, the high but poorly exploited value of its nutritional components, and the existing but insufficiently explored potential of active microorganism strains. In this study we (1) screened the lactic acid bacteria (LAB) from Microorganism Strain Collection of the University of Latvia (MSCL), which originated local environments and according to API analysis have been assigned to species with a documented propensity of the production of biologically active substances (BAS); and (2) explored the factors influencing the growth and activity of the enzymes reflecting the capacity to produce BAS in two strains: *Lactobacillus johnsonii* MSCL S1277 (S1277) and *Lactocaseibacillus paracasei* MSCL S547 (S547). LAB were propagated in MRS or whey-containing medium, and used for fermentation of sterilized primary cheese whey (PW) and reverse-osmose concentrated whey (CW) supplemented with glucose and yeast extract at 30, 37, 45 °C. The activity of hydrolytic enzymes (fluorescein diacetate hydrolysis, FDA); oxidoreductases (reduction of tetrazolium salts by dehydrogenase, DHA, and quinone by quinone reductase, QR); free-radical scavenging (inhibition of 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH, decoloration) as well as protein (Bradford staining) and α -amino group containing compound (amino acids and peptides, AGCC, ninhydrin reaction) concentration were estimated after 4, 17, 24, 48 h of fermentation. Viable cell count was determined at the end of fermentation.

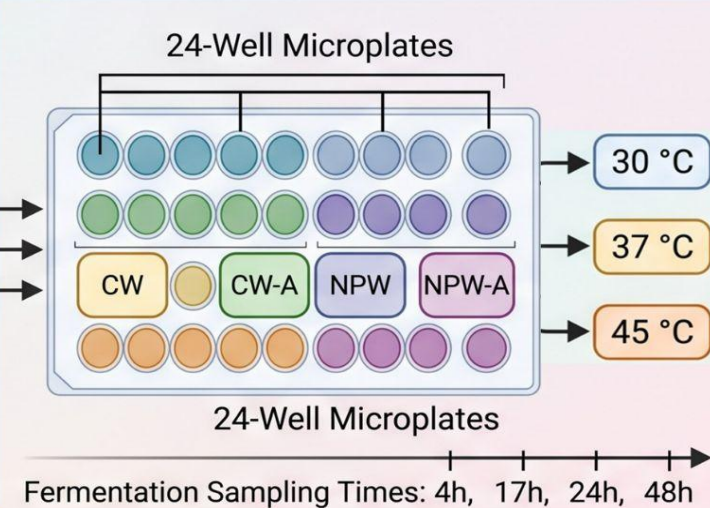
Response surface analysis revealed a complex relationship between fermentation conditions and time, LAB strain type, and biomass enzymatic activity, supporting the need to develop and apply a tailored optimization approach to achieve specific goals at whey fermentation.

Experimental Evaluation of Lactobacilli Strains in Diverse Media and Fermentation Conditions

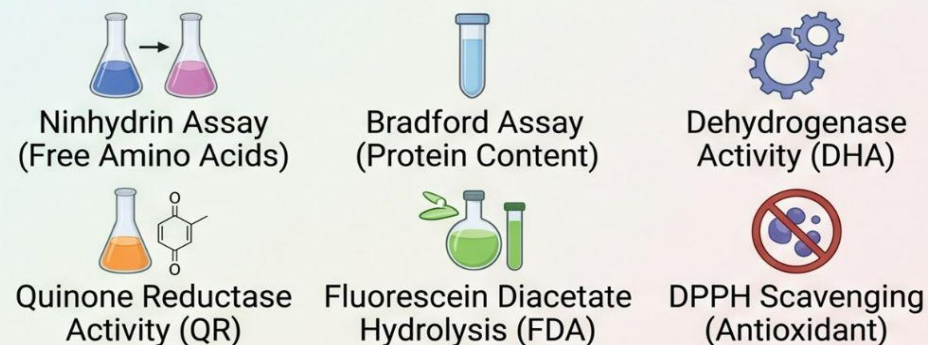
1. Strains & Primary Cultivation



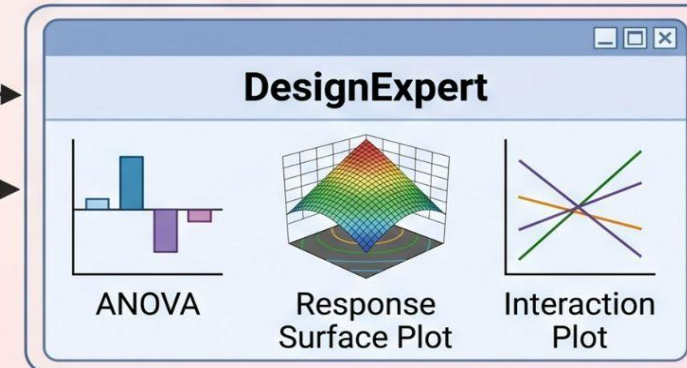
2. Secondary Fermentation in Microplates



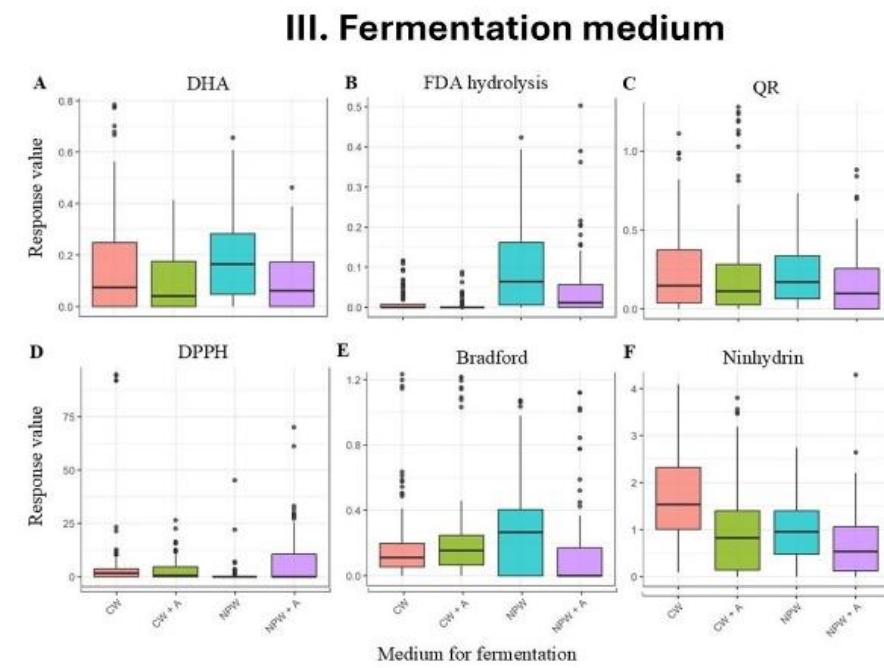
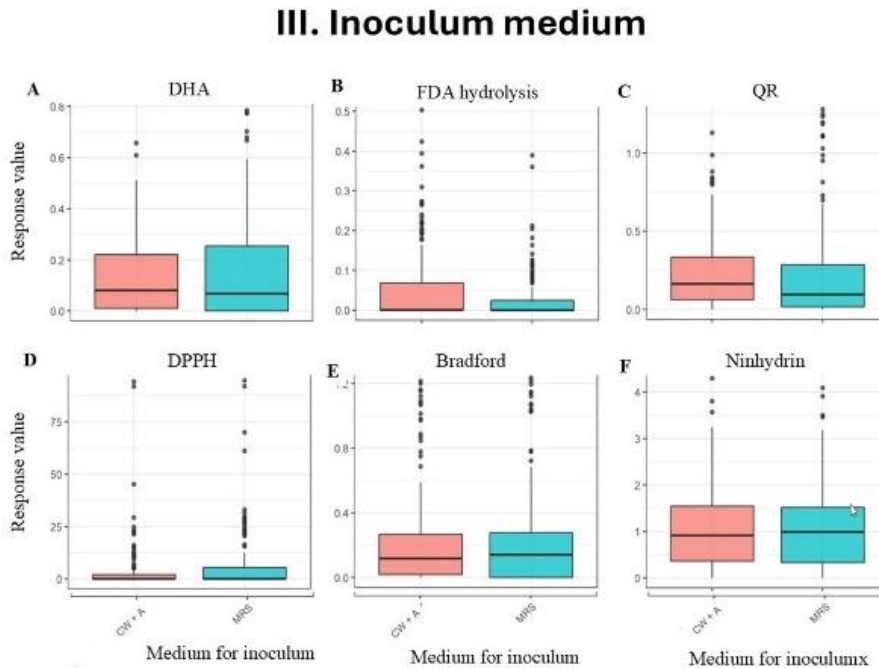
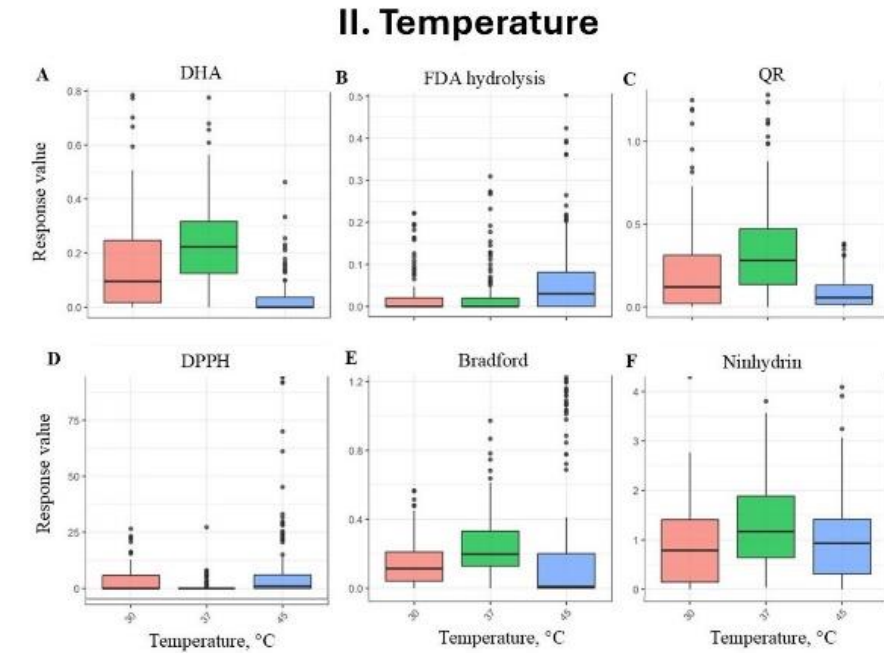
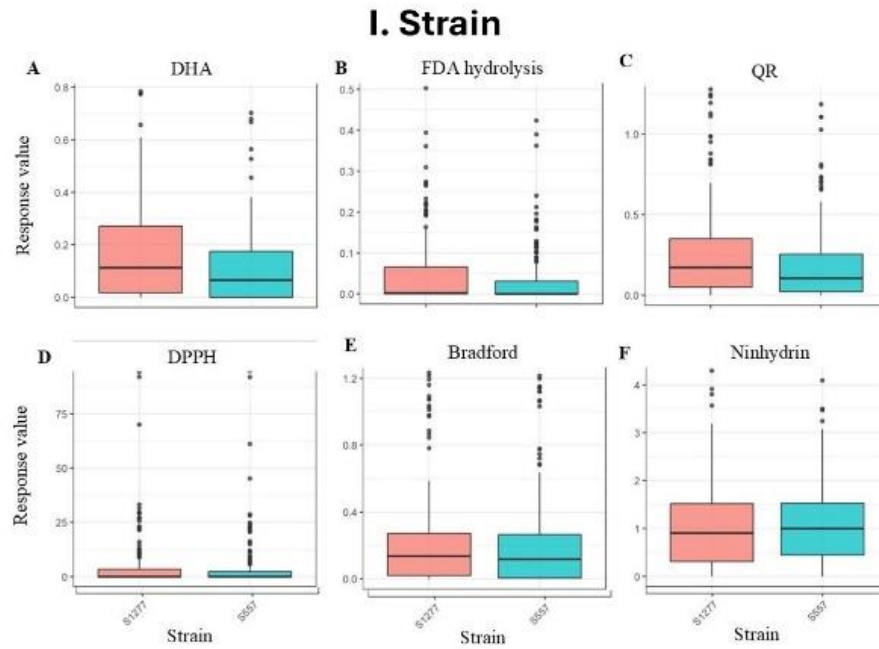
3. Endpoint Analysis

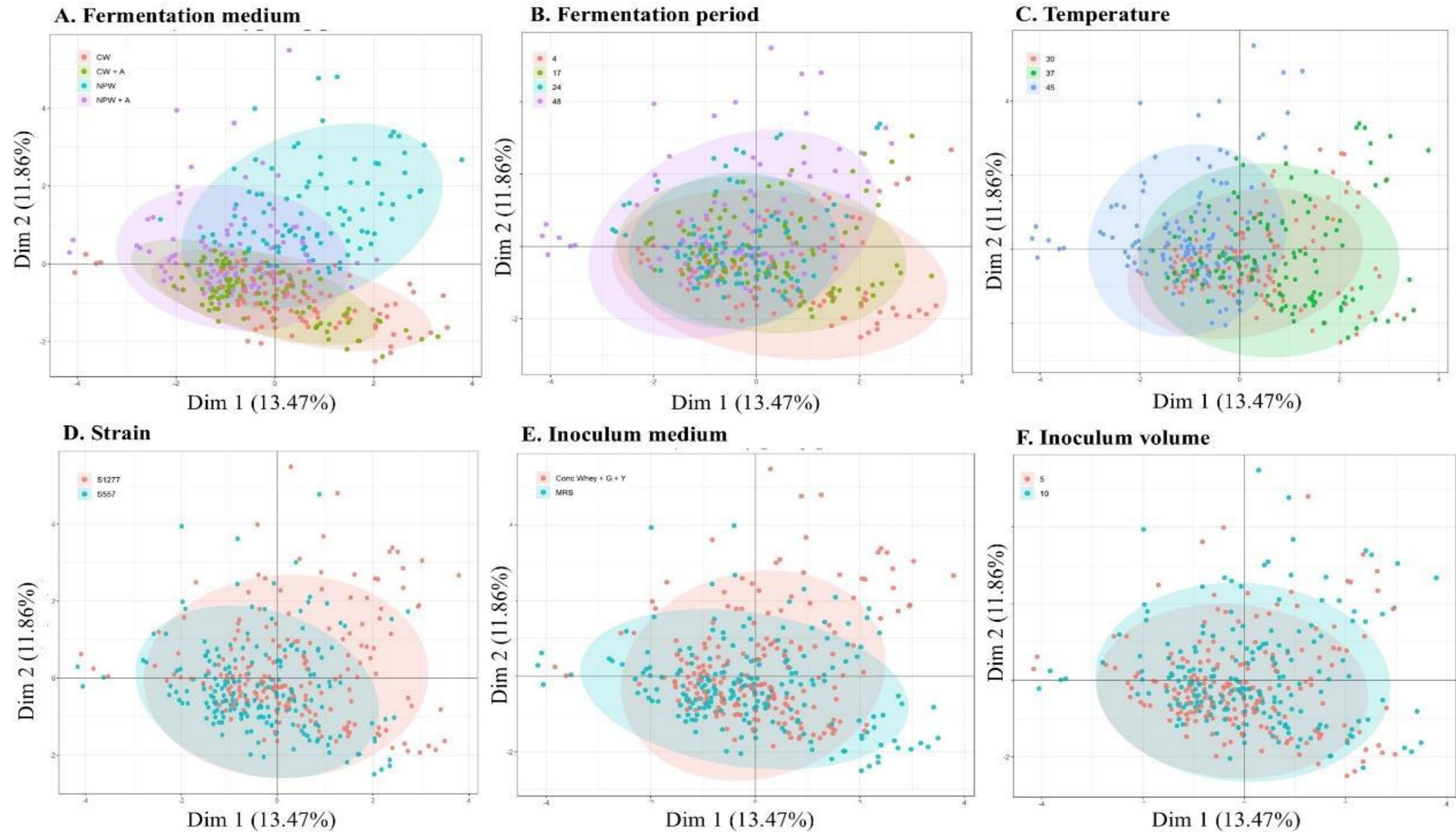


4. Data Analysis



.Boxplots of the median performance and variance in DHA (A); FDA hydrolysis (B); QR (C); DPPH scavenging activity (D); Bradford assay (E); Ninhydrin assay (F) during whey fermentation by *Lactobacillus johnsonii* MSCL 1277 and *Lactocaseibacillus paracasei* MSCL 547 in dependence on strain (I), temperature (II), inoculum medium (III), and fermentation medium (IV).

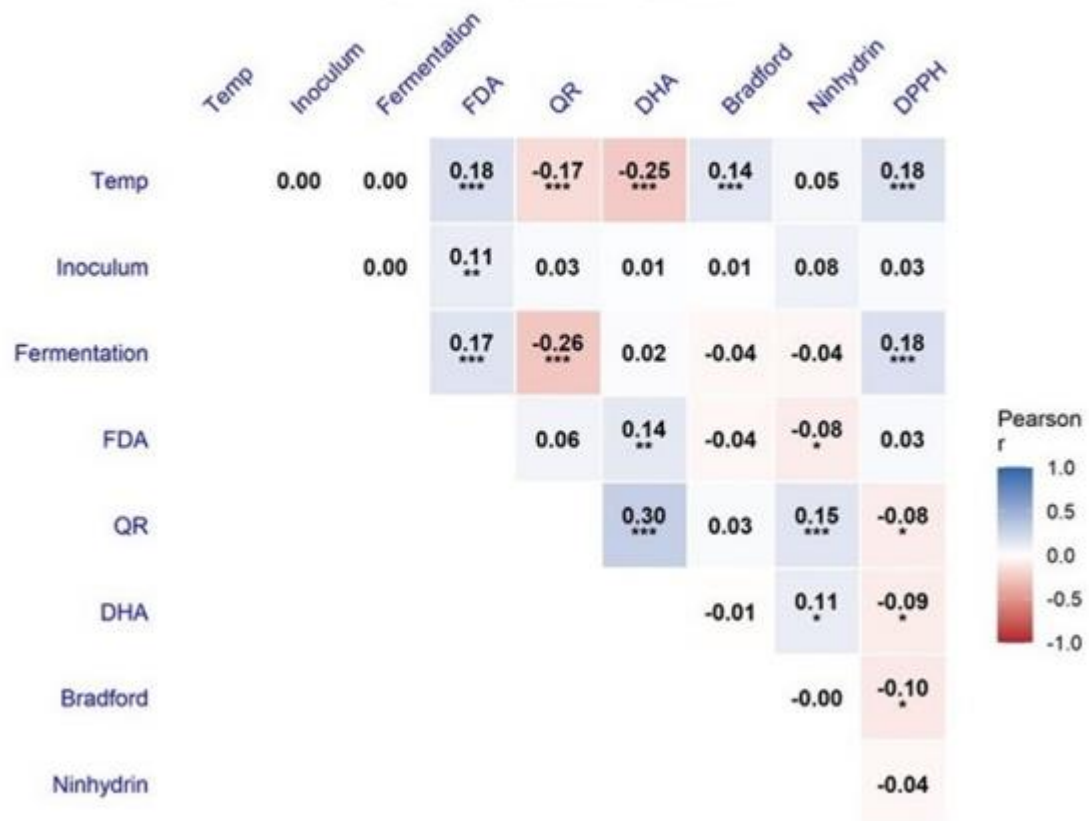




Factor analysis of mixed data (FAMD) for datasets of six variables. A – Fermentation medium; B – Fermentation period; C – Temperature; D – Strain; E – Inoculum medium; F - Inoculum volume.

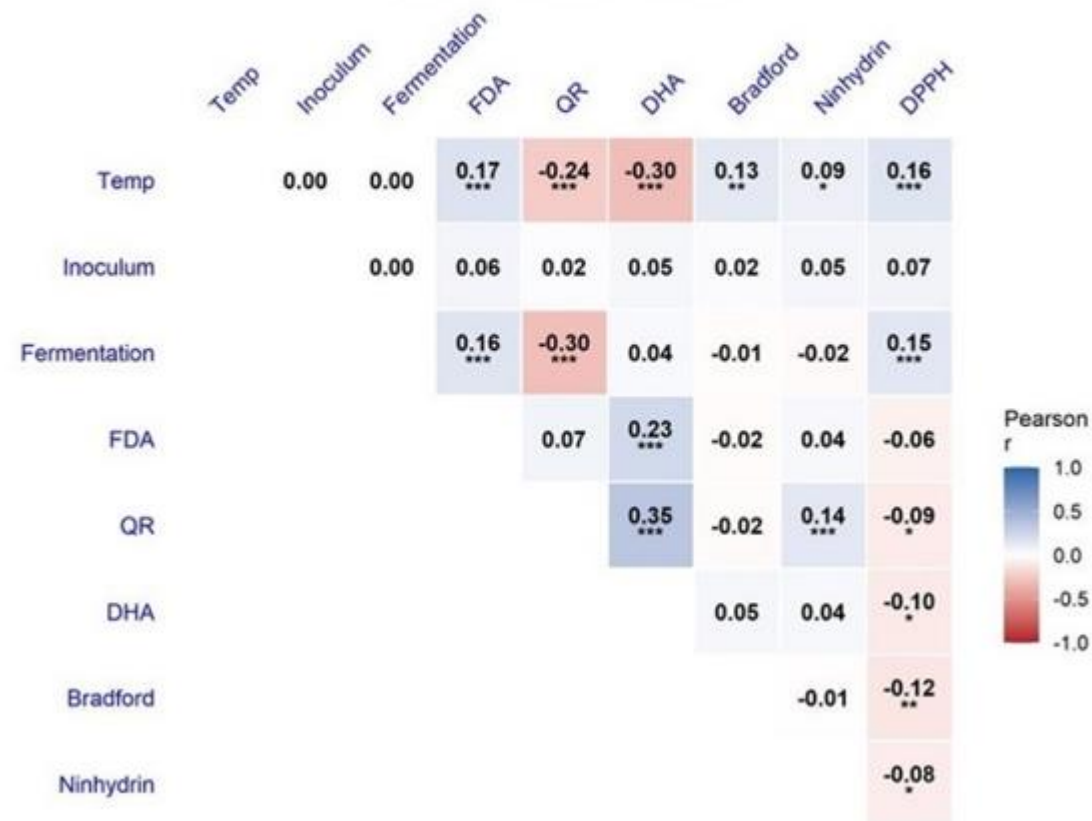
A. *Lacticaseibacillus paracasei* MSCL S547

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



B. *Lactobacillus johnsonii* MSCL S1277

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



Pearson correlation between six variables. A - *Lactobacillus johnsonii* MSCL 1277; B - *Lacticaseibacillus paracasei* MSCL 547; C – both strains.

5. GALVENIE REZULTĀTI: APKOPOJUMS

5.1. Ņemot vērā projektā paredzēto intelektuālā īpašuma aizsardzības dokumentu sagatavošanu, šeit un turpmāk izmantotie

mikroorganismu celmi,

fermentācijas barotnes modifikācijas un

izmantotie kultivēšanas apstākļi

tiks apzīmēti ar numuriem un indeksiem, neatklājot šo apzīmējumu saturu, kas varētu apdraudēt intelektuālā īpašuma tiesību iegūšanu.

5.2. Detalizēti raksturota sešu iepriekš atlasīto LAB celmu spēja augt dažāda sastāva uz siera sūkalu bāzes veidotās barotnēs. Vērtējot, augšanas ātrumu, biomasas uzkrāšanu un pienskābes veidošanas intensitāti, kas norāda uz intensīvu sūkalu proteolīzi, kā arī kultūru konkurētspēju mērogotā fermentācijā turpmākajam darbam atlasītas kultūras MKK 3 un MKK 4. Kā references kultūra izvēlēta viena no uzņēmuma «Cesvaines Piens» izmantotajām ierauga kultūrām, IND 2, un viena, iespējams no rūpnieciskajiem ieraugiem cēlusies kultūra, kura izolēta no vairākkārtīgi termiski apstrādātiem sūkalu paraugiem, AUT 13.

5.3 LAB kultūru augšanas dinamika un pienskābes veidošana uz sūkalu bāzes veidotās šķidrajās barotnēs raksturota kā stacionāros, tā arī daudzkanālu programmējamas kultivēšanas režīma iekārtā RTS-8. Raksturota LAB un LFY kultūru augšanas dinamika, atlasītas barotnes variants, kas efektīvāk izmantojams LAB kultivēšanai stacionāros apstākļos un īslaicīgas rotēšanas un miera stāvokļu maiņas ciklos sasniedzot lielu LAB biomasas iznākumu. Barotņu, laktozes, monocukuru un skābju sastāvs raksturots ar HPLC hromatogrāfiju. Pienskābe līdz pH3,5-3,7 sasniegšanai būtiski nekavē atlasīto LAB augšanu, taču tālāk nepieciešama skābes titrēšana. Pilnīgākai laktozes noārdīšanai barotnē nepieciešama atkārtota papildu barības vielu pievienošana kultivēšanas procesā. Katram no turpmākajai izpētei izvēlētajiem celmiem raksturīgi specifiski optimālie augšanas apstākļi un barotne, kas perspektīvā dod iespējas variēt veidojamo BAP spektru.

5.4 BAP frakcijas veidošanās novērtējumam apgūta kapilārās elektroforēzes analīze, izmantojot «Capel-205» iekārtu elektroosmotiskās plūsmas veidota sadalījuma režīmā. Raksturots proteīnu un peptīdu sākotnējais sastāvs LAB kultivēšanas barotnēs un termiski apstrādātās siera sūkalās. Izstrādāta darbplūsma analizējamo preparātu sākotnējai frakcionēšanai ar membrānu filtrēšanas un secīgas ultrafiltrēšanas palīdzību, izmantojot centrifugējamās MWCO filtru kasetes. Iegūti pirmie dati par 10, 5 un 3 kDa mazāku proteīna dabas savienojumu klātbūtni un koncentrāciju LAB un LFY barotnēs.

5.5. Sagatavots zinātniskas publikācijas manuskripts «Variability of Lactobacilli Metabolic Performance at Cheese Whey Fermentation: Response Surface Analysis for Two Strains» kas atspoguļo projekta izpildes gaitā gūtos rezultātus. Posma pārskatam pievienots sagatavotās publikācijas kopsavilkums un galvenie attēli.