



Latvijas Universitāte
Bioloģijas fakultāte
LU Mikrobioloģijas un Biotehnoloģijas institūts

DAŽĀDAS IZCELSMES FRUKTĀNU PREBIOTISKĀS ĪPAŠĪBAS

Publikāciju kopa

Promocijas darba kopsavilkums

Autors: Pāvels Semjonovs

Darba vadītājs: Pēteris Zikmanis, *Dr. habil. biol.*, vadošais pētnieks (LU MBI, Rīga, Latvija)

Konsultants: Mārtiņš Beķers, *Dr. habil. biol.*, *prof. emeritus.*, akadēmiķis, (LU MBI, Rīga, Latvija)

Recenzenti:

Rīga 2008

ANOTĀCIJA

Attīstoties izpratnei par probiotiķu, prebiotiķu un sinbiotiķu lomu cilvēka veselības uzturēšanā, probiotiskos mikroorganismus saturošos ieraugus šobrīd plaši pielieto fermentēto funkcionālās pārtikas produktu ražošanā. Promocijas darbā ir izvērtēta inovatīvu fruktānu avotu (pienskābes baktēriju eksopolisaharīdi (EPS), topinambūra (*Helianthus tuberosus*) koncentrāts (TK), levāns (β -2,6 polifruktāns) un fruktānu sīrups) ietekme uz dažiem tehnoloģiski nozīmīgiem pienskābes baktēriju un bifidobaktēriju probiotiskajiem celmiem un tos saturošajiem ieraugiem, veidojot jaunu pieeju sinbiotisko fermentēto produktu funkcionālās kvalitātes uzlabošanai. Promocijas darba gaitā identificēts homofermentatīvs, laktozi asimilējošs un fruktānus saturošu EPS kompleksu sintezējošs *Pediococcus pentosaceus* P 773 celms, kā arī seši tehnoloģiski perspektīvi fruktānus saturošos EPS kompleksus sintezējoši *Lactobacillus* celmi, kas piemēroti daudzveidīgu pārtikas substrātu (piens, augļu un dārzeņu sulas, graudu un pākšaugu substrāti) fermentēšanai un spēj *in situ* sintezēt fruktānus fermentācijas gaitā. Tas ļauj izmantot šādus EPS kompleksus sintezējošos celmus kombinācijās ar probiotiskajām vai/un tehnoloģiskajām kultūrām jauna tipa prebiotisko un/vai sinbiotisko produktu veidošanai, novēršot nepieciešamību produktam papildus pievienot prebiotiskās piedevas. *Zymomonas mobilis* sintezētais augstmolekulārais levāns, kā arī fruktānu sīrups, fruktānus saturošie pienskābes baktēriju EPS kompleksi un inovatīvie augu izcelsmes fruktānu avoti (TK) kā vienīgie oglekļa avoti nodrošina probiotisko mikroorganismu attīstību. To efektivitāte ir samērojama, vai arī atsevišķos gadījumos būtiski augstāka, salīdzinot ar komerciāli pieejamajiem prebiotiskajiem fruktānu preparātiem. Fruktānus saturošo preparātu pievienošana saraudzējamajam pārtikas pamatsubstrātam (piens, auzu substrāts) nodrošina augstāku pienskābes baktēriju un bifidobaktēriju īpatsvaru fermentētajā produktā, kā arī paaugstina šūnu dzīvotspēju produkta uzglabāšanas laikā pie pazeminātas temperatūras, tādējādi uzlabojot un uzturot nepieciešamo funkcionālās kvalitātes līmeni fermentētajos sinbiotiskajos produktos.

Promocijas darba rezultāti apkopoti un publicēti septiņos zinātniskajos rakstos (no tiem seši raksti nozares starptautiski recenzējamajos žurnālos) un divos Latvijas Republikas un Eiropas Savienības patentu pieteikumos. Par darba rezultātiem ziņots arī 14 starptautiskajās un piecās vietējās zinātniski-praktiskajās konferencēs. Promocijas darbs izstrādāts 2003.-2008. g. Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un Biotehnoloģijas institūtā.

SUMMARY

In step with a growing insight on the role of probiotics, prebiotics and synbiotics to keep human health the starters containing probiotic microorganisms find a wider application in manufacturing of fermented functional foods. The present promotion work deals with an appraisal of effects achieved by innovative fructan sources (exopolysaccharides (EPS) of lactic acid bacteria (LAB), concentrate from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers (JAC), levan (β -2,6 polyfructan) and fructan syrup) on probiotic strains and technologically potent LAB as well as related starters, thereby developing a novel approach to improve the functional qualities of fermented products. The lactose-positive homofermentative strain of *Pediococcus pentosaceus* P773 – producer of fructan-containing EPS complex as well as six strains of technologically potent lactobacilli with a similar EPS-producing capacity have been identified during present studies. These strains are capable to ferment multiform food-grade substrates (cereal- and legumes- mashes, milk, juices) as well as to produce fructans *in situ* during fermentation, which makes possible to employ them in combinations with other probiotic or/and technological strains for the development of novel type synbiotic products without conventionally used exogenous supplementation with prebiotic substances. All the inquired fructan preparations such as levan of high molecular mass from *Zymomonas mobilis*, fructan syrup, EPS of LAB and innovative source of plant origin (JAC) as a sole carbon source meet the growth requirements of probiotic strains under study with an efficiency being comparable to that of commercial prebiotic fructan sources as even higher in particular cases. The addition of fructan preparations before fermentation to the food- grade primary substrates (milk, oat mash) provides a higher proportion of bifidobacteria and LAB in final products as well as cells survival during a low-temperature storage, which improves and maintains the functional qualities of fermented synbiotic products.

The main results of this promotion work are summarized and published as the seven original papers (six of them - in the internationally peer-reviewed journals) in the field of present research and two patent applications of Latvia and EU. Preliminary results of studies have been presented at fourteen international and five local conferences. The promotion work was carried out during 2003 – 2008 at the Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia.

SATURA RĀDĪTĀJS

	lpp
Anotācija.....	1
Summary.....	2
Satura rādītājs.....	3
Saīsinājumu saraksts.....	4
Pētījuma aktualitāte.....	5
Zinātniskā darba aprobācija.....	11
Ieskats fermentēto funkcionālo uzturlīdzekļu pilnveidošanas problēmās un iespējamajos risinājumos.....	16
Materiāli un metodes.....	25
Rezultātu pārskats un diskusija.....	29
Secinājumi.....	49
Aizstāvēšanai izvirzāmās tēzes.....	51
Literatūras saraksts.....	52

SAĪSINĀJUMU SARAKSTS

PB – pienskābes baktērijas;

EPS – eksopolisaharīdi;

PB EPS – pienskābes baktēriju eksopolisaharīdi;

OA – oglekļa avots;

TK – topinambūta koncentrāts;

FS – fruktānu sīrups;

FOS – fruktooligosaharīdi;

IS – inulīns (*Sigma-Aldrich*, Vācija);

kvv – kolonijas veidojošās vienības;

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Uztura izšķiroša nozīme cilvēka veselības un darbaspēju uzturēšanā ir novērtēta jau antīkās pasaules autoru darbos uzsverot pārtikas lomu daudzu saslimšanu profilaksē un ārstēšanā. Tā, vēl sengrieķu ārsts un dabas pētnieks Hipokrāts (460. – 370. g. p. m.ē.) paplašināja uztura nozīmi ārpus organisma tiešo enerģētisko vajadzību apmierināšanas, iesakot: „Lai tavs uzturs kļūst par zālēm, un zāles par uzturu”, kas būtībā atspoguļo mūsdienu funkcionālās pārtikas koncepciju (*Hastler, 1998*). Pēdējos gadu desmitos pasaulē notiekošās straujās sociāli ekonomiskās pārmaiņas būtiski ietekmē iedzīvotāju ēšanas paradumus un ar tiem cieši saistīto populācijas veselības stāvokli, kas, savukārt, aktualizē pētījumus pārtikas zinātņu, medicīnas, biotehnoloģijas un mikrobioloģijas jomās, īpaši uzsverot pārtikas funkcionālo nozīmi, kas būtiski pārsniedz tās tiešo uzturvērtību (angl., *strict nutritional value*) (*Diplock, 1999*). Pārtikas funkcionālās nozīmes kontekstā ir attīstījušas probiotiķu¹, prebiotiķu² un sinbiotiķu³ klasiskās koncepcijas (*Fuller, 1989; Gibson and Roberfroid, 1995; Schrezenmeir, 2001*).

Attīstoties izpratnei par pro-, pre- un sinbiotiķu lomu organisma veselības uzturēšanā, probiotiskos mikroorganismus saturošos ieraugus šobrīd plaši izmanto fermentēto produktu ražošanā (*Matilla-Sandholm et al., 2002; Leroy and De Vuyst, 2004*) Turklāt, vienā produktā apvienojot probiotiķi un piemērotu prebiotisko substanci ir iespējams uzlabot šāda sinbiotiskā produkta efektivitāti cilvēka zarnu traktā (*Bielicka et al., 2002*). Tomēr jāatzīmē, ka vispusīgi pierādītu sinbiotisko pāru (probiotiķis/prebiotiķis) klāsts joprojām ir visai ierobežots (*De Vuyst, 2000; Bielicka et al., 2002*) un neapmierina augošo pieprasījumu pēc efektīviem un daudzveidīgiem sinbiotiskajiem produktiem. Sinbiotiskā produkta lielāku efektivitāti (*Rastall et al., 2005*), salīdzinot to ar atsevišķi uzņemtu probiotisko produktu un/vai prebiotisko substanci, nodrošina probiotiķa metabolisma pieskaņošanās prebiotiskajai substancei jau produkta fermentēšanas stadijā, kas ļauj probiotiķim efektīvāk to izmantot arī cilvēka zarnu traktā (*Gallaher and Khil, 1999; Gibson and Fuller, 2000; Matilla-Sandholm et al., 2002; Bielicka et al., 2002*). Tādējādi, prebiotiskās substances pievienošana pārtikas substrātam pirms tā fermentēšanas ar probiotiķi saturošo ieraugu varētu būt ievērojami efektīvāka,

¹ Probiotiķi – dzīvie mikroorganismi, kuri pozitīvi ietekmējot saimniekorganismu uzlabo tā veselību (*Fuller, 1989; Schrezenmeir, 2001*).

² Prebiotiķi – nesagremojamie pārtikas ingredientu, kuri selektīvi stimulē noteiktu baktēriju augšanu un/vai aktivitāti saimniekorganisma zarnu traktā, tādējādi uzlabojot veselību (*Gibson and Roberfroid, 1995*).

³ Sinbiotiķi – pro- un prebiotu kombinācijas, kuras uzlabo dzīvo mikrobiālās izcelsmes ingredientu izdzīvošanu gremošanas traktā, tādējādi pozitīvi ietekmējot saimniekorganismu (*Gibson and Roberfroid, 1995; Schrezenmeir, 2001*).

salīdzinot ar tās papildus iekļaušanu jau gatavajā produktā. Ņemot vērā krasi atšķirīgus apstākļus zarnu traktā, kur, (saskaņā ar prebiotiku klasisko definīciju^b) būtu jāizpaužas to labvēlīgajai iedarbībai uz probiotiķiem) un fermentējamā pārtikas substrāta sistēmā, līdz šim nav salīdzinoši izvērtēta dažādu prebiotisko substanču, īpaši inovatīvo, ietekme uz probiotiķu kultūrām un tos saturošajiem ieraugiem produkta fermentācijas gaitā.

Pienskābās rūgšanas ceļā iegūtie produkti izsenis ieņem nozīmīgu vietu veselīgajā uzturā un pēc būtības ierindojami funkcionālās pārtikas grupā (*Farnworth, 2007*). Skābpiena produktu pieejamība, to augstā uzturvērtība un piemērotība bagātināšanai ar probiotiķiem nosaka to, ka ievērojama daļa funkcionālās pārtikas produktu šobrīd ir pārstāvēta tieši ar probiotiķus saturošajiem piena produktiem (*Hoolihan, 2003; Saxelin et al, 2003*). Tai pašā laikā piena produktu patēriņu ierobežo populācijā plaši izplatītais laktozes nepanesamības sindroms, kas atkarībā no laktāzes nepietiekamības pakāpes var ierobežot pat skābpiena produktu lietošanu uzturā (*De Vrese et al., 2001*). Pēdējā laikā aizvien vairāk izpaužas arī ekonomisko faktoru ierobežojošā ietekme – izejvielu deficīts, pieaugošas ražošanas izmaksas, kas, savukārt, var ietekmēt piena produktu pieejamību patērētājam.

Fermentētie produkti, kuru ražošanai izmanto graudu izejvielas no to fizioloģiskās ietekmes un ekonomisko apsvērumu viedokļa uzskatāmi par daudzsološu alternatīvu skābpiena produktiem (*Bekers et al., 2001; Charalampopoulos et al., 2002a*) un ir guvuši patērētāju piekrišanu arī Latvijas tirgū (Auzu Bio Lakto, Rīgas piena kombināts). Tie uzskatāmi par būtisku ogļhidrātu, olbaltumvielu, aminoskābju (tai skaitā neaizstājamo), B grupas vitamīna, E vitamīna, makro- un mikroelementu, un īpaši, diētisko šķiedru avotu cilvēka uzturā. Auzu substrātu īpašo vērtību nosaka augstais šķīstošo diētisko šķiedru – β -glikāna saturs, kuram piemīt spēja efektīvi pazemināt holesterīna līmeni asinīs, mazināt hipertensiju, regulēt glikozes un insulīna līmeni asinīs, lipīdu vielmaiņu un uzlabot gremošanas sistēmas stāvokli (*Charalampopoulos et al., 2002 a,b*).

Neraugoties uz graudu produktu vispāratzītu augstu uzturvērtību un fizioloģisko aktivitāti, kā arī piemērotību probiotisko produktu veidošanai, to pārstāvība funkcionālās pārtikas piedāvājumā joprojām ir visai ierobežota. Tai pašā laikā ir pamats uzskatīt, ka ir iespējama funkcionāli augstvērtīgu fermentēto produktu iegūšana arī izmantojot mazāk tradicionālas graudu izejvielas (griķi, rudzi, mieži u.c.).

Būtisks priekšnosacījums funkcionālās pārtikas produktu plašākai iesaistīšanai ikdienas uzturā ir piedāvājuma daudzveidīgums, kurā pārstāvētas dažādas produktu grupas lai apmierinātu patērētāju atšķirīgas prasības. Tā, arī augļu un dārzeņu sulas ir piemērotas pro-,

pre- un sinbiotisko produktu veidošanai (*Karovicova and Kohaidova, 2003*). Līdz šim nebūdami pārstāvēti Latvijas tirgū tie spētu dažādot funkcionālo produktu klāstu.

Ņemot vērā sinbiotiskajos produktos izmantojamo sinerģisko pāru – probiotiskā celma un prebiotiskās substances iespējamo mijiedarbības specifiskumu (*De Vuyst, 2000; Leroy and De Vuyst, 2004; Semjonovs et al., 2007a*) ir būtiski izvērtēt inovatīvo fruktānu avotu - pienskābes baktēriju (PB) eksopolisaharīdu (EPS), topinambūra koncentrāta (TK), levāna, fruktānu sīrupa (FS) ietekmi uz atzītajiem probiotiskajiem celmiem un tos saturošajiem ieraugiem. Šī pētījuma gaitā ir apstiprināta un novērtēta inovatīvo fruktānu avotu spēja veicināt probiotiķu attīstību pārtikas substrātos. Tomēr jāatzīmē, ka fruktānus saturošo piedevu un probiotisko celmu iekļaušana funkcionālo produktu ražošanas tehnoloģijās var sadārdzināt produkta ražošanas izmaksas, ko, protams, varētu mazināt produkta pieauguši pievienotā vērtība un tirgus cena, tomēr tirgus nestabilitātes un pieaugošo ražošanas izmaksu apstākļos jebkura pašizmaksu paaugstinoša komponente vērtējama kā zināms riska faktors. Šo problēmu ļautu mazināt fruktānus sintezējošo potenciāli probiotisko PB kultūru izmantošana fermentēto funkcionālo produktu ražošanā, kas līdz šim nebija iespējama, jo funkcionālo ieraugu tirgū nav pieejami šādi tehnoloģiski efektīvi celmi. Šī pētījuma gaitā identificētie tehnoloģiski perspektīvie *Lactobacillus* un *Pediococcus* celmi ir piemēroti daudzveidīgu pārtikas substrātu fermentēšanai (piens, graudu un pākšaugu substrāti, augļu un dārzeņu sulas, sojas piens) un var tikt izmantoti principiāli jauna tipa prebiotisko un/vai sinbiotisko produktu veidošanai, *in situ* bagātinot tos ar fruktānus saturošajiem EPS kompleksiem. Jāatzīmē, ka literatūras dati norāda uz fruktānus nesaturošo PB EPS kompleksu augstu fizioloģisko aktivitāti (*Welman and Maddox, 2003*), kuru neapšaubāmi paplašina fruktānu klātbūtne tajos (*Kaur and Gupta, 2002*). Spēja sintezēt EPS ir būtiska arī raugoties no tehnoloģiskā un produktu kvalitātes viedokļa (*Welman and Maddox, 2003; Korakli et al., 2003*). Jānorāda, ka neskatoties uz pēdējos gados pieaugošo uzmanību attiecībā uz *Pediococcus* izmantošanas iespējām, īpaši piena rūpniecībā (*Simpson and Taguchi, 1995; Caldwell et al., 1996*), līdz šim nav bijis ziņu par fruktānus sintezējošajiem celmiem šajā ģintī.

Saskaņā ar vispāratzītajām pro-, pre- un sinbiotiku mijiedarbību raksturojošām definīcijām^{1;2;3} visi līdz šim mums zināmie literatūras avoti izvērtē prebiotisko substanču iedarbību gremošanas trakta sistēmā (*in vivo*, vai *in vitro* – simulētajās sistēmās), kā arī to ietekmi uz probiotiskajiem celmiem un raksturīgo zarnu trakta mikrofloru – kā vienīgie nodrošinot mikroorganismus (*in vitro*) ar oglekli (*Gibson and Roberfroid, 1995; Gibson and Fuller, 2000; Schrezenmeir, 2001; Biedrzycka and Bielecka, 2004; Rastall et al., 2005*). Promocijas darbā iegūtie rezultāti liecina, ka pirms fermentācijas pievienoti fruktānu avoti

būtiski paaugstina probiotiķu koncentrāciju gatavajā produktā, kas, tādējādi, ļauj paplašināt priekšstatus par fruktānu – prebiotiķu ietekmi², un secināt, ka tā izpaužas ne tikai kā probiotisko mikroorganismu selektīvā stimulēšana zarnu traktā (*Gibson and Roberfroid, 1995*), vai līdzīgos apstākļos (oglekļa pamatavotu deficīts) *in vitro*, bet arī tieši pārtikas substrāta fermentācijas gaitā - dominējošo oglekļa pamatavotu klātbūtnē (piem., piena laktoze), līdz ar to paaugstinot fermentētā sinbiotiskā pārtikas produkta funkcionālo kvalitāti.

Promocijas **darba mērķis** – novērtēt dažādas izcelsmes inovatīvo fruktānu avotu piemērotību fermentēto sinbiotisko produktu veidošanai.

Darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi **uzdevumi**:

1. Izvērtēt inovatīvo fruktānu avotu probiotisko potenciālu uz dažādu grupu pārtikas substrātu pienskābās fermentēšanas gaitu.
2. Novērtēt atšķirīgās izcelsmes fruktānu avotu ietekmi uz probiotiskajiem mikroorganismiem individuālajās kultūrās un tos saturošajos ieraugos.
3. Konstatēt β -fructozidāžu klātbūtni probiotisko mikroorganismu metaboliskajā aparātā un fruktānu ietekmi uz to aktivitāti.
4. Identificēt fruktānus saturošos EPS kompleksus sintezējošos PB celmus un novērtēt to tehnoloģisko potenciālu dažādu grupu pārtikas substrātu fermentēšanai.
5. Izvērtēt tehnoloģiski perspektīvo fruktānus saturošos EPS kompleksus sintezējošo PB celmu piemērotību pārtikas substrātu bagātināšanai ar fruktāniem *in situ* fermentācijas gaitā.
6. Novērtēt fruktānu avotu ietekmi uz PB un bifidobaktēriju dzīvotspēju fermentētajos produktos to uzglabāšanas laikā pie pazeminātas temperatūras.

Promocijas darba **novitāte un zinātniskais nozīmīgums**:

1. Izvērtēta un salīdzināta inovatīvo (mikrobiālās un augu izcelsmes) un komerciāli pieejamo fruktānu avotu, kā vienīgo oglekļa avotu, spēja uzturēt probiotiķu augšanu.
2. Konstatēta un salīdzinoši novērtēta fruktānu avotu spēja veicināt probiotiķu attīstību dažādos pārtikas substrātos, kas ļauj tos atzīt par piemērotiem fermentēto sinbiotisko produktu funkcionālās kvalitātes (t.i. probiotiķu koncentrācija) uzlabošanai.

3. Novērtēta fruktānu ietekme uz probiotiķu un probiotisko ieraugu β -fruktozidāžu aktivitāti.
4. Novērtēta fruktānu avotu ietekme uz pārtikas substrātu fermentācijas gaitu.
5. Selektīvi novērtēta fruktānu avotu ietekme uz probiotisko ieraugu sastāvā pārstāvētām probiotiskām un tehnoloģiskajām kultūrām pārtikas substrātu fermentācijas gaitā.
6. Konstatēta un novērtēta fruktānu avotu pozitīvā ietekme uz PB un bifidobaktēriju dzīvotspēju fermentētajos produktos to uzglabāšanas laikā.
7. Identificēti septiņi tehnoloģiski perspektīvi, tai skaitā pirmo reizi *Pediococcus* ģintī - fruktānus sintezējošais un laktozi fermentējošais *P. pentosaceus* P 773 celms.
8. Novērtēts pienskābes baktēriju EPS kompleksu sastāvs un pārstāvēto polimēru vidējā molmasa.
9. Novērtēta fruktānus saturošos EPS kompleksus sintezējošo PB celmu piemērotība dažādu grupu pārtikas substrātu fermentēšanai.
10. Konstatēta un novērtēta fruktānus saturošos EPS kompleksus sintezējošo PB celmu spēja sintezēt fruktānus *in situ* dažādu grupu pārtikas substrātu fermentācijas gaitā, tādējādi radot nepieciešamo pamatu principiāli jauna tipa fermentēto sinbiotisko produktu veidošanai.

Promocijas darba tēmas aktualitāte un izstrāde ir **saistīta ar dalību sekojošos projektos:**

1. Valsts pētījumu programma "Inovātīvās tehnoloģijas augstvērtīgu, drošu un veselīgu pārtikas produktu ieguvei no ģenētiski, fizioloģiski un bioķīmiski daudzveidīga augu un dzīvnieku izejmateriāla" („Funkcionālās pārtikas fizioloģiski aktīvu vielu koncentrātu ieguve, izpēte un izmantošana”);
2. LZP projekts „Atjaunojamo resursu biotehnoloģiskā konversija un tās produkcijas izmantošana”.

Promocijas darbs ir izstrādāts izmantojot ESF projekta ESSS 2004/3 „Doktorantu un jauno zinātnieku atbalsts Latvijas Universitātē” **finansējumu** (Līgums Nr. 2004/0001/VPD1/ESF/PIAA/04/NP/3.2.3.1/0001/0001/0063).

Promocijas darba **tautsaimnieciskā nozīmība**. Atšķirīgas izcelsmes prebiotisko fruktānu avotu specifiskās ietekmes novērtējums dažādu grupu pārtikas substrātos ļauj uzlabot

fermentēto produktu funkcionālo kvalitāti un dažādot to klāstu, kas ir izšķirošs priekšnosacījums to efektivitātei un plašākai iekļaušanai iedzīvotāju uzturā. Fruktānus saturošos EPS kompleksus sintezējošo PB celmu ieviešana ražošanas praksē ļautu piedāvāt jauna tipa funkcionālos sinbiotiskos produktus ar augstu pievienoto vērtību, tādējādi stiprinot Latvijas ražotāju konkurētspēju vietējā un pasaules tirgū.

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA

Par promocijas darba rezultātiem ir ziņots 14 starptautiskajās zinātniski-praktiskajās konferencēs Latvijā, Lietuvā, Francijā, Šveicē, Ukrainā, Slovēnijā, Ungārijā, Krievijā, Bulgārijā, kā arī piecās vietējās konferencēs Latvijas Universitātē un Latvijas Lauksaimniecības Universitātē.

1. Semjonovs P, Jasko J, Kozlinskis E, Zikmanis P, Beķers M. (2005) *Bifidogenic prebiotic properties of β -2,6 and β -2,1 fructan in fermented milk products*. International Scientific Practical Conference, New Technologies in Traditional Food; Latvia University of Agriculture, Jelgava 11th of May (referāts / oral presentation).
2. Semjonovs P, Marauska M, Linde R, Kozlinskis E, Zikmanis P, Bekers M. (2004) *Influence of fructans on the fermentation performance of Bifidobacteria containing starters*. International Conference, Probiotics, prebiotics, synbiotics and functional food products – up to day and future; Moscow, Russia, 2 – 4th of June (poster and oral presentation / stenda referāts un mutisks ziņojums).*
3. Semjonovs P, Marauska M, Bekers M, Linde R, Viesturs U. (2003) *Fructans and fructan syrup as prebiotics for Bifidobacterium*. 11th European Congress on Biotechnology - Building Bridges between Biosciences and Bioengineering; Basel, Switzerland, 24 -29 of August (poster presentation / stenda referāts).*
4. Semjonovs P, Marauska M, Linde R, Kozlinskis E, Zikmanis P, Bekers M. (2004) *Influence of levan and inulin on the fermentation of lactose by probiotic bacteria*. The World of Inulin and fructose, International Conference; Kiev, Ukraine, 8 – 9 of April (poster and oral presentation / stenda referāts un mutisks ziņojums).*
5. Bekers M, Sprudza D, Vina I, Semjonovs P, Upite D, Kaminska E. (2004) *Inulin for reducing of hyperlipidemia*. The World of Inulin and fructose, International Conference; Kiev, Ukraine, 8 – 9 of April (poster presentation / stenda referāts).*
6. Vina I, Leimane I, Bekers M, Semjonovs P. (2004) *Chicory extract for prophylactic syrups containing immunomodulators and antioxidants*. The World of Inulin and fructose, International Conference; Kiev, Ukraine, 8 – 9 of April (poster presentation / stenda referāts). *

* Konferenču tēzes / Abstracts

7. Bekers M, Upite D, Upitis A, Kaminska E, Grube M, Danilevich A, Semjonovs P. (2004) *The chemical composition studies of chicory*. The World of Inulin and fructose, International Conference; Kiev, Ukraine, 8 – 9 of April (poster presentation / stenda referāts). *
8. Bekers M, Marauska M, Semjonovs P, Grube M, Rapoport A, Ionina R. (2003) *The effect of fructooligosaccharides and polyfructans on the development of bifidobacteria*. FEMS 2003 – 1st Congress of European Microbiologists; Slovenia, Ljubljana, June 29 – July 3 (stenda referāts / poster presentation).*
9. Bekers M, Upite D, Upitis A, Kaminska E, Grube M, Marauska M, Danilevich A, Semjonovs P. (2004) *Chicory coffe as source of prebiotics*. The role of chemistry and physics in the development of agricultural tehnologies, International research conference; Kaunas, Lithuania, 14 of October (poster presentation / stenda referāts).*
10. Toma M M, Raipulis J, Semjonovs P. (2005) *Probiotics, Prebiotics & Synbiotics – Food or Drugs for Human Health ?* Trainnet Future & Lithuanian Food Quality and Safety – LIT-FQSN; Vilnius, Lithuania, 16 - 17th of June (referāts / oral presentation).
11. Raipulis J, Toma M M, Semjonovs P (2004) *The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone*. The 19th International ICFMH Symposium FoodMicro2004; Portoroz, Slovenia, 12 -16th September (poster presentation / stenda referāts).*
12. Semjonovs P, Bekers M, Zikmanis P. (2007) *Levan promotes the development of probiotic strains involved in commercial dairy starters by fermentation of milk*. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and Functional Foods: Scientific and Clinical Aspects, International Congress; St. Petersburg, Russia, May15 -16th (poster presentation / stenda referāts).*
13. Vina I, Semjonovs P, Marauska M, Karklina D, Bekers M. (2007) *Inulin in Jerusalem artichoke concentrate for functional food: influence on sera level of antibodies and circulating immunocomplexes*. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and Functional Foods: Scientific and Clinical Aspects, International Congress; St. Petersburg, Russia, May15 -16th (poster presentation / stenda referāts).*
14. Grube M, Bekers M, Upite D, Kaminska E, Semjonovs P, Linde R. (2007) *Evaluation of Jerusalem artichoke and chicory as valuable functional food components*. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and Functional Foods: Scientific and

- Clinical Aspects, International Congress; St. Petersburg, Russia, May15 -16th (poster presentation / stenda referāts).*
15. Vigants A, Kozlinskis E, Bekers M, Scherbaka R, Semjonovs P. (2007) *The Potential of probiotic bacteria for development of novel fermented functional foods from cabbage (Brassica oleracea var. capitata) juice*. 2nd Baltic Conference on Food Science and Technology – FOODBALT- 2007; Kaunas, Lithuania, June 13-14th (referāts / oral presentation).*
 16. Semjonovs P, Shakirova L, Grube M, Auzina L, Zikmanis P. (2006) *Levan Promotes the Hydrophobicity and Biomass Productivity of Probiotic Bacteria in Lactose Containing Media*. 13th World Congress of Food Science & Technology FOOD IS LIFE; Nantes, France, September 17 – 21th (poster presentation / stenda referāts). *
 17. Semjonovs P, Zikmanis P, Bekers M. (2007) *Jerusalem artichoke concentrate as the functional supplement for probiotic-fermented foods*. ST. PETERSBURG – GASTRO – 2007, International Meeting; St. Petersburg, Russia, May16 -18th (poster presentation / stenda referāts).*
 18. Semjonovs P, Jasko J, Zikmanis P, Bekers M. (2006) *Prebiotic Properties of Concentrate from Jerusalem Artichoke Tubers in Regard to Yogurt Starters*. 3rd Central European Congress on Food –CEFood 2006; Sofia, Bulgaria, May 22 -24th, (poster presentation / stenda referāts).
 19. Semjonovs P, Vina I, Linde R, Sprudzha D, Bekers M. (2006) *Jerusalem Artichoke Concentrate as Antiallergic Agent*. 3rd Central European Congress on Food – CEFood 2006; Sofia, Bulgaria, May 22 -24th, (poster presentation / stenda referāts).*
 20. Bekers M, Marauska M., Semjonovs P, Grube M. (2004). *Fructan Syrup as Source of Prebiotics for Probiotic Bacteria*. 2nd Central European Congress on Food – CEFood 2004; Budapest, Hungary, April 26 -28th, (poster presentation / stenda referāts).*
 21. Semjonovs P, Vīgants A, Zikmanis P. (2004) *Fuktānu un to hidrolīzes produktu iegūšana un prebiotiskās īpašības*. LU 62. Zinātniskā Konference; Latvijas Universitāte, Rīga, 8. janvārī (referāts / oral presentation).
 22. Semjonovs P, Jaško J, Kozlinskis E, Bekers M, Zikmanis P (2005) *Fruktānu ietekme uz prebiotiskajām baktērijām pienskābās rūgšanas apstākļos*. LU 63.

Zinātniskā Konference; Latvijas Universitāte, Rīga, 10. februārī (referāts / oral presentation).

23. Semjonovs P, Jaško J, Zikmanis P, Beķers M (2006) *Helianthus tuberosus* fruktānu prebiotiskās īpašības. LU 64. Zinātniskā Konference; Latvijas Universitāte, Rīga, 7. februārī (referāts / oral presentation).
24. Semjonovs P, Jaško J, Zikmanis P, Plūme I, Kļava D, Kārkliņa D, Beķers M (2006) *Topinambura* koncentrāts – jauns prebiotiku avots ar polifunkcionālām īpašībām. Zinātne un inovācijas Zemgales attīstībai, Zinātniski Praktiskā Konference; Latvijas Lauksaimniecības Universitāte, Jelgava, 17. februārī (poster presentation / stenda referāts).

Promocijas darba rezultāti apkopoti un publicēti septiņās zinātniskajās publikācijās, no tām seši raksti nozares starptautiski recenzējamajos žurnālos.

1. Semjonovs P, Marauska M, Linde R, Grube M, Zikmanis P, Bekers M (2004) Development of *Bifidobacterium lactis* Bb 12 on β -(2,6)-linked fructan-containing substrate. *Eng Life Sci*, 4 (5): 433 - 437.
2. Semjonovs P, Jasko J, Kozlinskis E, Zikmanis P (2005) An increase of biomass productivity and acidifications power of probiotic starter ABT-5 in lactose-containing media supplemented by fructans. *New Technologies in Tradicional Food*; LLU, PTF, Reports; Jelgava, pp. 159 – 165.
3. Raipulis J, Toma M M, Semjonovs P (2005) The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone. *Int J Food Microbiol*, 102 (3): 343- 347.
4. Semjonovs P, Zikmanis P (2007) An influence of levan on the fermentation of milk by a probiotic ABT-type starter. *J Food Technol* 5 (2): 123-130.
5. Semjonovs P, Zikmanis P, Bekers M (2007) An influence of fructan containing concentrate from jerusalem artichoke tubers on the development of probiotic dairy starters on milk and oat-based substrates. *Food Biotechnol*, 21 (4):347:363.
6. Semjonovs P, Zikmanis P (2007) Evaluation of novel lactose-positive and exopolysaccharide-producing strain of *Pediococcus pentosaceus* for fermented foods. *Eur Food Res Technol* (online available, in press).
7. Semjonovs P, Jasko J, Auzina L, Zikmanis P (2008) The use of exopolysaccharide-producing cultures of lactic acid bacteria to improve the functional value of fermented foods. *J Food Technol* 6 (2): 101-110.

Promocijas darba gaitā **izstrādātie inovatīvie produkti un tehnoloģijas ir pieteikti aizsardzībai ar Eiropas un Latvijas valsts patentiem.**

Patentu pieteikumi:

1. Semjonovs P, Zikmanis P. *Pediococcus pentosaceus* lactose-positive strain and a complex of fructan-containing exopolysaccharides synthesized by the strain. P-07-79 (05.07.2007.).
2. Semjonovs P, Zikmanis P. Pienskābes bakteriju fruktānus saturošie eksopolisaharīdu kompleksi, to izmantošana raudzētajos produktos, pārtikas kvalitātes un funkcionālo īpašību uzlabošanai. P-07-105 (21.09.2007.).

Atsevišķi promocijas darba gaitā **attīstīti produkti** tika pārstāvēti XII Starptautiskajā Pārtikas Izstādēs *RIGA FOOD* 2006. un 2007. gadā, t. sk. ar stenda ziņojumu „Topinambūra koncentrāts – dabīgs šķiedrvielu un prebiotiku avots veselīgai pārtikai” (LU Inovāciju Centra stends).

Promocijas darba gaitā gūtie rezultāti nodrošināja teorētisko bāzi uzlabotā polifunkcionālā sinbiotiskā produkta (Auzu Biolakto ar topinambūra koncentrāta piedevu) veidošanai, kas tika veiksmīgi **ieviests ražošanā** A/S „Rīgas piena kombināts”.

Promocijas darbs izstrādāts 2003. – 2008. gadā Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un Biotehnoloģijas institūtā (LU MBI).

IESKATS FERMENTĒTO FUNKCIONĀLO UZTURLĪDZEKĻU PILNVEIDOŠANAS PROBLĒMĀS UN IESPĒJAMAJOS RISINĀJUMOS

Šobrīd plašajā, un joprojām augošajā funkcionālo uzturlīdzekļu klāstā īpašu uzmanību ir izpelnījušies pienskābās rūgšanas ceļā iegūti produkti (*Diplock, 1999; Hoolihan, 2003*). Ņemot vērā izsenis zināmo noteiktajām pienskābes baktēriju (PB) grupām raksturīgo spēju uzlabot pārtikas produktu organoleptiskās īpašības, produkta sanitāro drošumu, papildzināt uzglabāšanas laiku, paaugstināt uzturvērtību un fizioloģisko aktivitāti, to izraisīto spontānās vai mikrobioloģiski definētās rūgšanas procesu plaši pielieto pārtikas biotehnoloģijās fermentēto produktu iegūšanai (*Farnworth, 2007*). Pēdējās desmitgadēs interese par PB izmantošanu pārtikas ražošanā īpaši pieaugusi pateicoties pētījumiem, kas apstiprina daudzu *Lactobacillus*, *Pediococcus* un *Bifidobacterium* celmu probiotiskās īpašības un būtisku lomu cilvēka un dzīvnieku veselības uzturēšanā (*Rastall et al., 2005*), ar probiotiķiem saprotot - dzīvos mikroorganismus, kuri pozitīvi ietekmējot saimniekorganismu uzlabo tā veselību (*Fuller, 1989; Schrezenmeir, 2001*). Probiotisko mikroorganismu un tos saturošo produktu pozitīvā iedarbība uz cilvēka veselību un labsajūtu saistāma ar dažādas etimoloģijas diareju un konstipāciju profilaksi un ārstēšanu, patogēno un nosacīti patogēno mikroorganismu īpatsvara samazināšanu zarnu traktā, humorālās un celulārās imunitātes stimulēšanu, potenciāli kaitīgu metabolītu koncentrācijas samazināšanu zarnu traktā, *Helicobacter pylori* izraisīto infekciju profilaksi, alergisko reakciju mazināšanu, kairināto zarnu un laktozes nepietiekamības sindroma novēršanu, pozitīvu ietekmi uz kalcija un magnija metabolismu, gremošanas takta kancerogēzes procesu profilaksi, asinsspiediena pazemināšanu un holesterīna līmeņa samazināšanu asins plazmā (*Ouwehand et al., 2002*).

Bez tiešas pārstāvības skābpiena produktos, probiotiķi ir pieejami liofilizētās biomasas veidā (kapsulas, pulveri, tabletes u.c.), ar to bagātina arī dažādus pārtikas produktus (sulas, jogurti, piena dzērieni u.c.) – neiesaistot probiotiskās kultūras pārtikas substrāta fermentēšanas procesā. Šādu pieeju zināmā mērā attaisno daudzu probiotisko celmu nepietiekama attīstība pārtikas substrātā. Tā, vairums probiotisko celmu no *Lactobacillus* un *Bifidobacterium* ģintīm lēni attīstās pienā. Neskatoties uz to, mūsdienās probiotiskie mikroorganismi tiek iekļauti cilvēka uzturā – uzņemot tos ar skābpiena produktiem (*Hoolihan, 2003; Saxelin et al., 2003*). Izmantojot probiotisko mikroorganismu tīrkultūras praktiski nav iespējams sasniegt patērētājam pieņemamas produkta organoleptiskās īpašības. Šī iemesla dēļ probiotiķus parasti izmanto kombinācijās ar t.s. tehnoloģiskajām kultūrām, kas

nodrošina produkta vēlamās tehnoloģiskās un organoleptiskās īpašības. Taču izteikti atšķirīgi probiotisko un tehnoloģisko, (piemēram, jogurtu ražošanā izmantojamo *L. bulgaricus* un *S. thermophilus*) kultūru augšanas ātrumi, probiotisko celmu nepietiekama attīstība fermentējamajā pārtikas substrātā (visbiežāk pienā) var kavēt probiotiskajam produktam minimāli nepieciešamās probiotiķa dzīvo šūnu koncentrācijas sasniegšanu. Kā iemeslus nepietiekamajai probiotiķa koncentrācijai gatavajā produktā min (*De Vuyst, 2000; Mattila-Sandholm, 2002; Leroy and De Vuyst, 2004*) tehnoloģisko kultūru un probiotisko celmu nesaderību, pieņemot, kā ideālā gadījumā to mijiedarbībai jābūt sinerģiskai; arī vairāku produktā iekļauto probiotisko celmu savstarpēji konkurējošo mijiedarbību; probiotisko celmu pazeminātu proteāžu vai/un β -galaktozidāzes aktivitāti, attieksmi pret specifiskiem augšanas faktoriem, nepietiekamu aerotoleranci. Probiotisko celmu neapmierinoša attīstība produkta ražošanas stadijā vai to dzīvo šūnu koncentrācijas samazināšanās uzglabāšanās laikā zem minimāli nepieciešamā (10^6 kvv ml⁻¹) līmeņa (*Rasic and Kurmann, 1983*) var radīt stāvokli, kad ražotāja deklarētais produkta probiotiskais potenciāls nespēj pozitīvi ietekmēt patērētāja veselību, pat regulārās lietošanas gadījumā. To apstiprina dati par bieži konstatēto nepietiekamo probiotiķu koncentrāciju rūpnieciski ražotajos produktos (*Shah, 2000*). Šai sakarā būtu jānosauc vairāki principiāli pamatvirzieni probiotiķu attīstības uzlabošanai fermentēto produktu ražošanas stadijā:

- kā vienu no kritērijiem veicot potenciāli probiotisko celmu atlasīšanu ir izvirzāma nepieciešamība izvērtēt arī to piemērotību attīstībai izplatītākos pārtikas substrātos, īpaši kombinācijās ar tehnoloģiskajām kultūrām;

- nepieciešams izvērtēt pārtikas substrātu, īpaši piena bagātināšanu ar probiotiskajiem celmiem specifiskajiem augšanas faktoriem;

- nepieciešams izvērtēt tehnoloģisko vai/un funkcionālo piedevu (ciete, pektīns, fruktāni u.c.) ietekmi uz probiotisko celmu un tehnoloģisko kultūru savstarpējo mijiedarbību;

- izstrādājot probiotisko ieraugu kombinācijas jāpievērš uzmanība tehnoloģisko kultūru spējai kompensēt probiotiskā celma metaboliskās nepilnības (ierobežojumi) konkrētajā pārtikas substrātā (piem., probiotiskā celma ar vāju proteolītisko aktivitāti apvienošana vienā ieraugā ar kultūru, kurai šī īpašība ir izteiktāka, varētu uzlabot tā attīstību) (*De Vuyst, 2000; Mattila-Sandholm, 2002; Leroy and De Vuyst, 2004*).

Augstu probiotiķu koncentrāciju gatavajā produktā nodrošina divu stadiju fermentācijas metodes izmantošana, kas paredz piena fermentēšanu ar probiotisko celmu tam optimālajā temperatūrā 2 – 48 stundu laikā ar tam sekojošo fermentēšanu ar tehnoloģiskajām kultūrām (kas ļauj izmantot gan termofilās, gan mezofilās kultūras) līdz produkta

nepieciešamajam skābuma līmenim. Neskatoties uz probiotiķu relatīvi augsto koncentrāciju gatavajā produktā divu stadiju fermentācijas metode nav guvusi plašāku izplatību vairāku iemeslu dēļ. Tā, pagarinot ražošanas ciklu būtiski pieaug ražošanas izmaksas un produkta kontaminācijas draudi, turklāt ne visu probiotisko celmu izmantošana ļauj iegūt produktu ar labām organoleptiskām un reologiskām īpašībām (*Tamime and Robinson, 1999; Haddadin et al., 2004*).

Probiotiku koncentrācija var būtiski samazināties produkta uzglabāšanas laikā, kas pazemina tā funkcionālo vērtību, un, līdz ar to sagaidāmo pozitīvo ietekmi uz patērētāja veselību (*Rasic and Kurmann, 1983; Shah, 2000; Cogan et al., 2007*). Probiotiku koncentrācijas noturība skābajā vidē ir celmam specifiska īpašība, kas atkarīga no to šūnapvalka un membrānu struktūras īpatnībām. Izvērtējot potenciāli probiotisko celmu komerciālas izmantošanas iespējas probiotiku noturība pret ārvides nelabvēlīgajiem apstākļiem ir būtisks kritērijs, īpaši ņemot vērā, ka tā var pozitīvi korelēt ar probiotiķa šūnu spēju pārvarēt kuņģa skābās vides barjeru un nonākt patērētāja zarnu traktā (*Gibson and Fuller 2000*). Probiotiku šūnu izdzīvotību gan fermentētā produkta, gan kuņģa sulas skābajā vidē var būtiski palielināt pielietojot mikroiekapsulēšanas metodes (*Anal and Singh, 2007*).

Probiotisko produktu kvalitātes kontroli būtiski apgrūtina caurmēra ražotājam vienkārši lietojamo probiotisko celmu selektīvās kontroles metožu nepilnības un nepieciešamība adaptēt tās konkrētajai ierauga celmu kombinācijai. Tā, ja *Bifidobacterium* un *L. acidophilus* celmu selektīvajai šūnu uzskaitē tehnoloģisko kultūru klātbūtnē ir piedāvāts samērā plašs barotņu klāsts (*Charteris et al., 1997*), tad *L. plantarum*, *L. rhamnosus* un *L. reuteri* pietiekami selektīva uzskaitē ieraugu tehnoloģisko kultūru vai citu probiotiķu klātbūtnē joprojām paliek neatrisināta; šeit daudzsološas perspektīvas saskatāmas molekulāro metožu pielietošanā (*Charteris et al., 1997; Cogan et al., 2007*).

Novērtējot probiotiķu būtisko lomu veselības un labsajūtas uzturēšanā līdztekus attīstījās arī prebiotiku un sinbiotiku koncepcijas. Prebiotikus definē kā nesagremojamos pārtikas ingredientus, kuri selektīvi stimulē noteiktu baktēriju augšanu un/vai aktivitāti saimniekorganisma zarnu traktā, tādējādi uzlabojot veselību (*Gibson and Roberfroid, 1995*). Plašs pētījumu klāsts apstiprina prebiotiku labvēlīgo ietekmi uz cilvēka veselību, kas visbūtiskāk izpaužas veicinot probiotisko baktēriju attīstību zarnu traktā. Tomēr atsevišķi pētījumi parāda prebiotisko vielu – lielākoties fruktānu (holesterīna līmeņa pazemināšana, antikancerogēnas un imunostimulējošas īpašības) ietekmi arī gnotobiotiskajos dzīvniekos (*Kaur and Gupta, 2002*), tādējādi neļaujot to ierobežot vienīgi ar ietekmi uz zarnu trakta mikrofloru. Prebiotiskā aktivitāte ir konstatēta vairākām vielu grupām, tostarp:

fruktooligosaharīdiem (inulīns, levāns, fruktooligosaharīdi), galaktooligosaharīdiem, laktitolam, laktulozei, gentiooligosaharīdiem, izomaltooligosaharīdiem, ksilobiozei, ksilooligosaharīdiem, polidekstrozei, arabinogalaktāniem, β-glikānam, pektīnam. Šeit minami arī daudzveidīgi nerafinētie augu izcelsmes preparāti, kas iegūti no topinambūra bumbuļiem, citrusaugļiem, āboliem, graudiem, sojas pupiņu oligosaharīdiem u.c. (*Rastall and Maitin, 2002*). Augu izcelsmes un fermentatīvās sintezes vai hidrolīzes ceļā iegūtie fruktānu poli- un oligosaharīdi šobrīd ir visplāšāk pārstāvēti prebiotisko piedevu tirgū (*Voragen, 1998*). Literatūras dati norāda uz atsevišķu fruktooligosaharīdu specifisku transporta sistēmu klātbūtni un līdzdalību bifidobaktēriju (*Meulen et al., 2004; 2006*) un pienskābes baktēriju (*Kaplan and Hutkins, 2003; Barrangou et al., 2006*) metabolismā. Šādas specializētas transportsistēmas nav tieši saistītas ar glikozes, fruktozes un saharozes transportu un var izskaidrot fruktooligosaharīdu iespējamo selektīvo ieguldījumu probiotisko mikroorganismu attīstībā. Minētais zināmā mērā var būt par iemeslu probiotiķu un pārējo mikrofloras pārstāvju atšķirīgai atbildes reakcijai uz prebiotisko vielu iekļaušanu uzturā. Turklāt, ir konstatēts, ka probiotiskā celma un tam specifiskās prebiotiskās vielas apvienošana vienā produktā, ļauj būtiski paaugstināt tā kopējo profilaktisko un terapeitisko iedarbību uz patērētāja veselības stāvokli (*Gallaher and Khil, 1999; Gibson and Fuller, 2000; Matilla-Sandholm et al., 2002; Bielicka et al., 2002*). Šādas probiotiķu un prebiotķu kombinācijas, kuras uzlabo vēlamo mikrofloras pārstāvju izdzīvošanu gremošanas traktā, tādējādi pozitīvi ietekmējot saimniekorganismu, ir pazīstamas kā sinbiotīķi (*Gibson and Roberfroid, 1995; Schrezenmeir, 2001*). Jāatzīmē, ka to sinbiotīķu klāsts, kuros prebiotiskās substances iedarbība izpaužas selektīvi attiecībā uz kombinācijā iekļauto konkrēto probiotisko celmu joprojām ir visai šaurs. Lielākoties tiek uzsvērts, arī *in vivo* kontrolēta, probiotiķa un prebiotīķa ietekme uz noteikto grupu mikroorganismiem zarnu traktā vai sinbiotiskā produkta lietošanas ietekme uz kādas organisma mērķfunkcijas uzlabošanu (*Gibson and Fuller, 2000; Bielicka et al., 2002*). Tai pašā laikā prebiotisko piedevu asimilējamības pētījumi *in vitro* norāda uz to efektivitātes pozitīvo korelāciju ar prebiotisko piedevu ietekmi uz zarnu trakta mikrofloru pētījumos *in vivo* (*Kneifel et al., 2005; Gibson and Fuller, 2000*).

Fruktozes polisaharīdus un oligosaharīdus (fruktānus) izmanto pārtikas produktu ražošanā ne tikai produktu funkcionālo īpašību uzlabošanai (prebiotīķi), bet arī produktu organoleptisko un reoloģisko īpašību uzlabošanai: kā tauku aizstājējus un emulgatorus (inulīns), bezkaloriju saldvielas (FOS) (*Voragen, 1998*). Jāatzīmē, ka neatkarīgi no fruktānu piedevu izmantošanas nolūkiem un veida skābpiena produktu ražošanas procesā, fermentēto sinbiotisko produktu gadījumā ir būtiski novērtēt piedevas iespējamo ietekmi uz

probiotiskajiem celmiem un tehnoloģiskām kultūrām izmantojamo ieraugu sastāvā, izvērtējot arī fermentējamā pārtikas substrāta īpatnības, un, nepieciešamības gadījumā adaptējot tehnoloģiskā procesa parametrus (*De Vuyst 2000; Matilla-Sandholm et al., 2002; Leroy and De Vuyst 2004*).

Neraugoties uz fruktānu acīmredzamām funkcionālām un tehnoloģiskām priekšrocībām, to izmantošana pārtikas rūpniecībā šobrīd vēl nav ieņēmusi tai pienācīgu vietu, lielākoties fruktānu salīdzinoši augsto cenu, kā arī produkcijas ražošanas tehnoloģijas pielāgošanas varbūtējas nepieciešamības dēļ. Lai panāktu skābpiena produktu, īpaši jogurtu, vēlamu viskozitāti, tekstūru un garšu pienu var bagātināt ar vājpiena vai sūkalu koncentrātu, kazeinātiem u.c.. Sausnas saturu pienā var paaugstināt izmantojot arī koncentrēšanas metodes (ietvaicēšana, membrānfiltrācija u.c), kas ražotājam rada nevēlamas papildus izmaksas. Pārtikas produktu stabilizēšanai un viskozitātes paaugstināšanai plaši izmanto augu izcelsmes (ciete, pektīns, guarsveķi u.c.), aļģu (agars, algināti), dzīvnieku (želatīns), un mikrobiālās izcelsmes (ksantāns, gellāns u.c) piedevas. Šīs cilvēka gremošanas traktā asimilējamas piedevas būtiski paaugstina skābpiena produktu enerģētisko vērtību, kas pēdējo gadu desmitu uzturzinību atziņu, arī tirgus tendenču skatījumā neļauj šādu produkciju ierindot funkcionālās pārtikas grupā (*De Vuyst, 2000*).

Mikrobiālās izcelsmes polisaharīdu spēja veidot augstas viskozitātes šķīdumus pie salīdzinoši nelielas polimēra koncentrācijas (*Welman and Maddox, 2003*) ļauj tos izmantot pārtikas produktu īpašību, tai skaitā funkcionālās kvalitātes uzlabošanai, kā alternatīvus tradicionālajām tehnoloģiskajām piedevām (*Dal Bello et al., 2001; Korakli et al., 2002; Welman and Maddox, 2003; Van Geel-Schutten et al., 1998, 1999; Tieking et al., 2005*).

Atsevišķi pienskābes baktēriju celmi spēj izmantot saharozi vai rafinozi kā specifiskos substrātus ekstracellulāro polisaharīdu (EPS) sintēzei. Savukārt, EPS ietekmē skābpiena produktu tekstūras un organoleptiskās īpašības (*Cerning, 1990*). Atkarībā no PB EPS struktūras īpašībām un biosintēzes mehānismiem tie iedalāmi heteropolisaharīdos un homopolisaharīdos.

Heteropolisaharīdi sastāv no atšķirīgiem monomēriem (glikoze, fruktoze, galaktoze, ramnoze) un/vai to atvasinājumiem, dažos gadījumos ar lādētajām funkcionālajām grupām (acetāts, fosfāts vai glicerolfosfāts). Tie pārsvarā tiek sintezēti nelielā daudzumā, to koncentrācijai vidē nepārsniedzot 100 mg l⁻¹. Heteropolisaharīdu sintezi nodrošina ar citoplazmatisko membrānu saistītas glikoziltransferāzes. Heteropolisaharīdus veido pienskābes baktērijas no *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ģintīm (*De Vuyst and Degeest, 1999*), kā arī atsevišķas bifidobaktērijas, piem., *Bifidobacterium adolescentis*

(Hosono et al., 1997). Tā, *Lactobacillus brevis* celms, kas izolēts no kefīra ierauga, sintezē polisaharīdu, kas sastāv no D- galaktozes un D-glikozes attiecībā 1:1 (Sikkema and Oba, 1998). *Lactobacillus helveticus* veido vairākus EPS ar atšķirīgi sakārtotiem monomēriem. Dažādi celmi spēj sintezēt EPS, kas satur D-galaktozi un D-glikozi; D-galaktopiranozil, D- glikopiranozil un 2-acetamīd-2-dezoksi-D-glikopiranozil atlikumus; D-galaktozi un D-glikozi attiecībā 1:1 ar laktozes sānu ķēdēm. *Lactobacillus sake*, kas izolēts no fermentētas gaļas produktiem, veido no atkārtotiem pentasaharīdiem sastāvošos EPS. Katrs šāds posms sastāv no glikozes, ramnozes un glicerīn-fosfāta. Šādiem EPS piemīt komplicēta un celmam specifiska telpiskā struktūra (Robijn et al., 1996; Yamamoto et al., 1995). *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* NCFB 2772 veido EPS, kas pamatā sastāv no galaktozes, arī glikozes un ramnozes monomēriem (Grobbe et al., 1997). *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, kā arī *Lactococcus*, *Streptococcus* heteropolisaharīdus sintezējošos celmus saturošos ieraugus samērā plaši izmanto skābpiena produktu ražošanā to reoloģisko īpašību uzlabošanai (De Vuyst, 2000, Leroy and De Vuyst, 2004). Tomēr, to praktiskais pielietojums ir iespējams vienīgi skābpiena produktu ražošanā (De Vuyst and Degeest, 1999).

Homopolisaharīdi pamatā pārstāvēti viena tipa monocukuri – glikoze (glikāni) vai fruktoze (fruktāni, piem., levāns). To sintēzi nodrošina ekstracelulārās glikozil- vai fruktoziltransferāzes donora molekulu (saharoze vai rafinoze) un akceptora molekulu (augošais polimērs, saharoze, rafinoze vai ūdens molekula) klātbūtnē. Atšķirība no heteropolisaharīdu sintēzes, homopolisaharīdu sintēzē iesaistīts tikai viens ferments (levāna gadījumā – levānsaharāze), un kā substrāts tiek izmantota saharozes vai rafinozes molekula nevis enerģētiski aktivētas monocukuru molekulas (Van Hijum et al., 2004). Atšķirībā no enerģiju patērējošā heteropolisaharīdu sintēzes procesa, homopolisaharīdu sintēzes gadījumā enerģija tiek iegūta saharozes molekulas šķelšanas rezultātā, kas potenciāli nodrošinā daudz augstāku homopolisaharīdu iznākumu – sasniedzot līdz pat 40 g l⁻¹ (Korakli et al., 2003). Pateicoties telpiskās struktūras īpašībām, lielākai molmasai, potenciāli lielākam iznākumam un vides faktoru relatīvi mazākai ietekmei uz polimēra struktūru PB homopolisaharīdi uzskatāmi par perspektīvākiem aģentiem pārtikas produktu tehnoloģisko un funkcionālo īpašību uzlabošanai, tos salīdzinot ar heteropolisaharīdiem vai augu izcelsmes fruktāniem (De Vuyst and Degeest, 1999; Welman and Maddox, 2003; Vijn and Smeekens, 1999). Joprojām ierobežotie pētījumi rāda, ka arī homopolisaharīdu sintēze tehnoloģiski nozīmīgās koncentrācijās ir sasniedzama *in situ*, t.i., pārtikas substrāta rūgšanas procesa gaitā. Tā, *L. sanfranciscensis* LTH2590 maizes mīklas rūgšanas procesā *in situ* sintezēja 0,3 -2,0 g kg⁻¹

(no miltu bāzes) augstmolekulāros glikozes un/vai fructozes eksopolisaharīdus, kas spēja būtiski uzlabot mīklas reoloģiskās un maizes tekstūras īpašības jau koncentrācijās 0,01 -0,1 g kg⁻¹(no miltu bāzes). Sintezētais augstmolekulārais (~2000 kDa) fruktāns raksturots kā termostabils un rezistents skābajā vidē, kā arī asimilējams bifidobaktēriju kultūrās (*Korakli et al., 2002; Tieking et al., 2003*).

Jāatzīmē, ka homopolisaharīdu sintēzes spēja ir uzskatāma par celmam specifisku īpašību (*Van Geel-Schutten et al., 1998, 1999; Van Hijum et al., 2004*). Pienskābes baktēriju sintezēto individuālo eksopolisaharīdu (vai to kompleksu) produktivitāte, struktūra, monomēru sastāvs, kas nosaka celma komerciālās izmantošanas lietderīgumu, arī sintezēto polisaharīdu ietekmi uz produkta organoleptiskām un reoloģiskām īpašībām un to fizioloģisko aktivitāti ir cieši saistīta ar vides un tehnoloģiskā procesa faktoriem. Tā, *Lactobacillus reuteri* LB 121 saharozes klātbūtnē sintezēja glikānu/fruktānu eksopolisaharīdu kompleksu, kuru īpatsvars, attiecīgi, mainījās 1:3 līdz 2:1 robežās, atkarībā no kultivēšanas apstākļiem. Rafinozes klātbūtnē fruktāna īpatsvars eksopolisaharīdu kompleksā pieauga līdz 1:96, vienlaicīgi būtiski samazinoties tā iznākumam un izmainoties citu rūgšanas produktu sastāvam (*Van Geel-Schutten et al., 1998, 1999; Van Hijum et al., 2004*). *Lactobacillus reuteri* LB 121 celma un tā spontāni radušos mutantu homopolisaharīdu biosintētiskai potenciāls, to struktūras īpašības un molmasas būtiski atšķirās no sākotnējā celma sintezēto polisaharīdu īpašībām (*Van Geel-Schutten et al., 1999*). Ir jāuzsver nepieciešamība tehnoloģiski perspektīvo kultūru atlasī samērot ar fermentējamā pārtikas substrāta īpatnībām. Tā, heteropolisaharīdus sintezējošais *Streptococcus thermophilus* celms, kas mākslīgajā barotnē sintezēja vairāk nekā 1 g l⁻¹, ražošanas tehnoloģijai tuvinātajos apstākļos pienā desmitkārtīgi samazināja EPS iznākumu, nenodrošinot vēlamu ietekmi uz skābpiena produkta īpašībām (*Degeest et al., 1999*). Tādējādi, izvērtējot funkcionālo (*Leroy and De Vuyst, 2004*) pienskābes baktēriju kultūru izmantošanu fermentēto pārtikas produktu ražošanā var apgalvot, ka izšķirošs faktors ir šādu kultūru (celmu) piemērotība konkrētā pārtikas substrāta fermentēšanai un ražošanas procesa tehnoloģiskajām īpatnībām. Tā, *L. reuteri* (*Kandler et al., 1980*) pateicoties daudzpusējai pozitīvajai iedarbībai uz cilvēka vai dzīvnieku organismu (*Casas and Dobrogosz, 2000*) ir atzīta par visai daudzsološu probiotisko celmu atlasei un šo celmu ieviešanai funkcionālo produktu ražošanas praksēs (*Speck an al., 1993*). Tai pašā laikā *L. reuteri* celmi, kuru probiotiskā efektivitāte ir skaidri pierādīta nespēj pietiekami labi attīstīties pienā (*Hidalgo-Morales et al, 2005*). Ņemot vērā, ka mūsdienās lielāka daļa fermentēto probiotisko produktu joprojām tiek ražota uz piena bāzes, tas uzskatāms par būtisku šķērslī *L. reuteri* celmu plašākai komerciālai izmantošanai (*Heller, 2001; Mattila-*

Sandholm, 2002; Leroy and De Vuyst, 2004). Vāja attīstība pienā raksturīga arī daudziem probiotiskajiem *Bifidobacterium*, *L. acidophilus* un *L. casei* celmiem (*Gomes and Malcata, 1999*). Tā, *L. reuteri* atsevišķu celmu nepietiekama attīstība pienā ir saistīta ar to zemo proteolītisko aktivitāti, ko var uzlabot pievienojot kazeīna hidrolizātu (*Hidalgo-Morales et al., 2005*), līdzīgi kā *Bifidobacterium* un *L. acidophilus* celmiem (*Gomes et al., 1998*). Tai pašā laikā ir ziņots par *L. reuteri* celmiem, kuri pietiekami labi attīstās pienā un ir piemēroti tā fermentēšanai (*Dellaglio et al., 1981; Xanthopoulos et al., 2000*). Neraugoties uz skābpienapiena produktu augstu uzturvērtību un fizioloģisko aktivitāti (*Gurr, 1987*), probiotiķu šūnas aizsargājošajām skābpiena produktu gēla īpašībām, kas nodrošina sekmīgu kuņģa barjeras pārvarēšanu (*Charteris et al., 1998*), neapšaubāmas priekšrocības piemīt arī fermentētajiem graudu produktiem (*Jaskari et al., 1998; Martensson et al., 2001; 2005; Charalampopoulos et al., 2002b*), arī sakarā ar graudu substrātu probiotiķu aisargīpašībām (*Charalampopoulos et al., 2002a*). Ņemot vērā *L. reuteri* (*Kandler et al., 1980; Dellaglio et al., 1981*), kā arī vairuma bifidobaktēriju un probiotisko *Lactobacillus* celmu metabolisma īpatnības, graudu substrāti var kalpot par piemērotu pamatsubstrātu fermentēšanai ar probiotiskajām kultūrām (*Bekers et al., 2001*). Tādējādi, ar funkcionālo kultūru (piem., probiotiķi, prebiotiskos EPS sintezējošās kultūras) ieviešanu ražošanas praksē saistīto sarežģītumu risināšanai var būt nepieciešama pārtikas substrāta un ražošanas tehnoloģijas piemērošana esošo celmu īpatnībām, vai arī piemērotības konkrētajam pārtikas substrātam un produkta ražošanas īpatnībām kritērija izvirzīšana par vienu no būtiskākajiem funkcionālo kultūru atlasē. Tā, pārtikas substrātu fermentēšanai piemērotu laktozi asimilējošo *Pediococcus* celmu trūkums, neļauj piena produktu ražošanas praksēs ieviest (*Caldwell et al., 1996*) šīs ģints celmus, kurā eksopolisaharīdu sintēze ir diezgan plaši izplatīta (*Simpson and Taguchi, 1995; Llauberes et al., 1990*) un varētu būt visai noderīga skābpiena produktu (*Caldwell et al., 1996*), tai skaitā funkcionālo – fruktānus saturošo ražošanā.

Papildinot datus par PB eksopolisaharīdu ietekmi uz skābpiena produktu reoloģiskajām un sensorajām īpašībām (*Robijn et al., 1996*) literatūrā ir sastopami ziņojumi par to potenciālu funkcionālās pārtikas produktu veidošanai, kā arī to terapeitisko potenciālu. Tā, pienu saraudzējot ar EPS producējošo *Lactococcus lactis ssp. cremoris* SBT0495 celmu, produktam konstatētas holesterīna līmeņi pazeminošas īpašības (*Nakajima et al., 1992*). Ir ziņots par pienskābes baktēriju EPS antikarcinogēnām (*Oda et al., 1983*), imunostimulējošām īpašībām (*Chabot, 2001*) un bifidogēnām īpašībām cilvēka zarnu traktā (*Martensson et al., 2005*). Ir konstatēts, ka *L. sanfranciscensis* eksopolisaharīdi var kalpot kā vienīgais oglekļa avots bifidobaktēriju kultūrām (*Korakli et al., 2002; Dal Bello et al., 2001*). Savukārt,

fruktānu daudzpusīga pozitīvā iedarbība uz cilvēka veselību (*Kaur and Gupta, 2002*), tai skaitā fruktānu prebiotiskās īpašības (*Gibson and Roberfroid, 1995*) un bakteriālās izcelsmes homopolisaharīdu (fruktānu) tehnoloģiskās priekšrocības (*De Vuyst and Degeest, 1999; Welman and Maddox, 2003*) liek pievērst uzmanību fruktānus sintezējošo pārtikas grupas pienskābes baktēriju celmu meklējumiem dabiskajās ekosistēmās. Jāuzsver, ka šobrīd fruktānus sintezējošie celmi atrasti tikai dažās PB ģintīs un to klāsts ir visai ierobežots: *L. reuteri* (*Van Geel-Schutten et al., 1998*), *L. sanfranciscensis* (*Korakli et al., 2002*), *L. acidophilus*, *L. crispatus* un *L. mucosae* (*Tieking et al., 2005*), *L. pontis*, *L. frumenti*, *L. panis* un *W.confusa* (*Tieking et al., 2003*), *S. salivarius* un *S. mutans* (*Ebisu et al., 1975*), kā arī *P. pentosaceus* (*Semjonovs et al., 2007*). Jāpiebilst, ka vairākums fruktānus sintezējošo *Lactobacillus* ģintis sugu (izņemot *L. sanfranciscensis*, *L. panis*) ir regulāri izdalāmi no cilvēka vai/un dzīvnieku zarnu trakta, kas norāda uz to potenciāli iespējamām probiotiskajām īpašībām, domājams, tās vēl jo vairākt varētu tikt pastiprinātās pateicoties polisaharīdu sintēzei, kuri, līdzīgi kapsulārajiem polisaharīdiem, varētu veicināt probiotiķu adhēziju pie zarnu trakta epitēlijšūnām (*Costetron et al., 1987*). Tai pašā laikā būtu lietderīgi izvērtēt arī tādu celmu probiotiskās īpašības, kuru izcelsme nav saistāma ar cilvēkā vai/un dzīvnieku zarnu traktu. Kā apstiprinājums šādas izvērtēšanas lietderīgumam jāmin *Bifidobacterium lactis* suga, kuras celmi to izcilo tehnoloģisko un terapeitisko īpašību dēļ pēdējā desmitgadē kļuvuši par vienu no populārākajām bifidobaktērijām izmantošanai funkcionālās pārtikas produktos un pārtikas piedevās – lai gan, sugas dabiskā ekoloģiskā niša nav saistīta ar cilvēka vai/un dzīvnieku gremošanas traktu (*Talwalkar and Kailasapathy, 2004*).

MATERIĀLI UN METODEDES

Mikroorganismu kultūras. *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *B. lactis* MBI-OX1, *B. angulatum* CCM 7093, *B. animalis* CCM 4988, *B. pseudocatenulatum* CCM 7094, *B. breve* CCM 3763, *B. longum* CCM 3764; *Lactobacillus acidophilus* La-5, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* Lb-12 (*L. bulgaricus*), *L. sanfranciscensis* DSM 20451, *L. reuteri* MBI-C43, *L. reuteri* MBI-C44, *L. reuteri* MBI-C45, *L. reuteri* MBI-C25, *L. reuteri* MBI-C42, *L. panis* MBI-V35, *L. pontis* MBI-C40; *Streptococcus thermophilus* ST, *Pediococcus pentosaceus* P 773. Kultūras pārstāvētas LU MBI kultūru kolekcijā.

Fruktānu avoti

Inovatīvie fruktānu avoti:

Pienskābes baktēriju eksopolisaharīdi – iegūti izmantojot *L. sanfranciscensis* DSM 20451, *L. reuteri* MBI-C43, *L. reuteri* MBI-C44, *L. reuteri* MBI-C45, *L. reuteri* MBI-C25, *L. reuteri* MBI-C42, *L. panis* MBI-V35, *L. pontis* MBI-C40 un *Pediococcus pentosaceus* P 773 producentu kultūras sakaņā ar patentu pieteikumos P-07-79 un P-07-105 aprakstītajām metodēm.

Topinambūra koncentrāts – iegūts saskaņā ar patentu LV13539 (*Bekers et al.*, 2007) aprakstīto metodi.

Fruktānu sīrups - iegūts atbilstoši ar patentā LV12850 (*Bekers et al.*, 2002).

Levāns (β-2,6-polifruktāns) – iegūts izmantojot *Z. mobilis* S 113 saskaņā ar patentiem LV12850 (*Bekers et al.*, 2002) un LV5709 (*Bekers et al.*, 1995).

Komerčiālie fruktānu avoti:

(Sigma-Aldrich, Vācija) – ķīmiski tīrs inulīna preparāts no dāliju gumiem (5 kDa);

Raftiline® ST (Orafti, Beļģija) – inulīna preparāts no cigoriņu saknēm izmatošanai pārtikas ražošanā ;

Raftilose® L60/75 (Orafti, Beļģija) – fruktooligosaharīdu (60 %) sīrups no cigoriņu saknēm izmatošanai pārtikas ražošanā;

Nutraflora® FOS (Twinlab, ASV) – fruktoligosaharīdu preparāts (iegūts saharozes enzimatiskās konversijas ceļā.

Barotnes, substrāti un audzēšanas apstākļi. Bifidobaktēriju, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* un *S. thermophilus* uzturēšanai un pavairošanai izmantojama MRS barotne (*De Man et al.*, 1960), kas bagātināta ar 0,5 g l⁻¹ L-cisteīnu (*Gomes et al.*, 1999). Lai tuvinātu barotnes receptūru pienam attiecībā uz tajā dominējošo oglekļa avotu – laktozi (mēģinājumos, kur metodisko apsvērumu dēļ nav iespējama piena izmantošana), glikozi 20,0

g l⁻¹ barotnes receptūrā (De Man et al., 1960) aizstāj ar 45,0 g l⁻¹ laktozi (Semjonovs et al., 2007). Augstāk minētās kultūras audzē⁴ pie 37°C anaerobajā vidē (BBL GasPak 150TM System, ASV). *L. sanfranciscensis* (30°C), *L. panis* (37°C) un *L. pontis* (30°C) uzturēšanai un audzēšanai anaerobajā vidē izmanto *Sour Dough Medium* (Barotne 225, DSMZ^d), *Lactobacillus medium IV* (Barotne 859, DSMZ) un *Lactobacillus medium III* (Barotne 638, DSMZ), attiecīgi⁵. Sējmateriālu (2 %) ņem no kultūras augšanas velīnās eksponenciālās fāzes (24 – 48 h). Šūnu koncentrāciju sējmateriālā nosaka spektrofotometriski pie λ=550 nm (Shimadzu UV-vis, Japāna) un, ja nepieciešams, nolīdzsvaro kultūrām ar atšķirīgu augšanas ātrumu.

PB un bifidobaktēriju selektīvā kontrole jauktajās populācijās. Pēc paraugu noņemšanas un decimālo atšķaidījumu pagatavošanas saskaņā ar IDF Standard 50B:1985 un IDF Standard 122A:1988 PB un bifidobaktēriju selektīvajai uzskaiti jauktajās populācijās izmanto agarizētās selektīvās barotnes. *Bifidobacterium lactis* selektīvajai uzskaiti MRS agaram ar glikozi 20,0 g l⁻¹ kā vienīgo oglekļa avotu (De Man et al., 1960) pēc autoklavēšanas (121 °C, 15 min) un pH uzstādīšanas 6,2 ± 0,2 robežās, pievieno (g l⁻¹), LiCl (3,000), nalidiksīnskābi (0,015), neomicīna sulfātu (0,100) un paramomicīna sulfātu (0,125). Koloniju skaitīšanu (kvv/ml) veic pēc 72 h inkubēšanas anaerobajā vidē (BBL GasPak 150TM System, USA) pie 37°C. *Lactobacillus acidophilus* selektīvo uzskaiti veic uz MRS agara ar maltozi 20,0 g l⁻¹ kā vienīgo oglekļa avotu; inkubē tādos pašos apstākļos kā *B. lactis* uzskaites gadījumā. *Streptococcus thermophilus* selektīvi uzskaita uz Lee's agara (Lee et al., 1974) pēc 48 h ilgas inkubācijas pie 43°C aerobajā vidē. *Lactobacillus bulgaricus* selektīvi uzskaita uz paskābinātā MRS agara ar glikozi 20,0 g l⁻¹ kā vienīgo oglekļa avotu – ar etiķskābi uzstādot pH 5,4; inkubē anaerobi (BBL GasPak 150TM System, ASV) pie 48 h pie 43°C (Charteris et al., 1997).

Fermentējamo pārtikas substrātu pagatavošanai miežu un griķu putrimus, auzu un rudzu pārslas, šķeltos zirņus, baltās pupiņas (visas izejvielas ir no A/S “Dobeles Dzirnāvnīks”, Latvija) samal rupjā maluma miltos. Iegūtajiem miltiem (60,0 g l⁻¹) pievieno krāna ūdeni. Graudu un pākšaugu substrātu termisko un enzimatisko apstrādi veic saskaņā ar LV 12304 (Bekers et al., 1999). Vājpiena un sojas piena barotņu pagatavošanai 75,0 g l⁻¹ šķīstošā vājpiena pulvera (A/S “Valmieras piens”, Latvija) vai 75,0 g l⁻¹ šķīstošā sojas piena pulvera (SIA “Alma Sinta”, Latvija). Inhibītoru iespējamo klātbūtni pienā pārbauda pēc LVS 174:1999. Ābolu, burkānu un kāpostu (RIMI, Latvija) sulas pagatavotas izmantojot

⁴ izņemot selektīvās uzskaites gadījumus.

⁵ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. <http://www.dsmz.de/>

mehānisko suluspiedi. Lai veicinātu bifidobaktēriju un PB augšanu, kā arī EPS sintēzi pārtikas substrātus bagātina ar saharozi 100,0 g l⁻¹, 3,0 g l⁻¹ kazeīna triptonu (*Difco*, ASV) un 3,0 g l⁻¹ rauga ekstraktu (*Sigma-Aldrich*, Vācija). Pārtikas substrātu fermentēšanu veic anaerobajā vidē, katrai kultūrai optimālajā temperatūrā.

Pienskābes baktēriju EPS iegūšana. PB EPS sintēzi veic kultūrām optimālajos apstākļos (*L. reuteri* celmi un *L. panis* pie 37°C, *L. sanfranciscensis* pie 30°C; anaerobajā vidē) audzējot tās MRS modificētajā barotnē, kur glikoze ir aizstāta ar saharozi 120,0 g l⁻¹ vai rafinozi 120,0 g l⁻¹, vai arī attiecīgajai kultūrai piemērotajā barotnē (*L. sanfranciscensis* un *L. panis*), kopējo ogļhidrātu koncentrāciju barotnē papildinot (120,0 g l⁻¹) ar saharozi vai rafinozi. Pēc 72 h ilgās audzēšanas šūnas atdala centrifugējot (4000 x g, 20 min), fugātam pievieno atdzesētu 95 % tilp. etanolu (1 : 3, pēc tilpuma) un iztur 12 h pie 4°C. Izgulsnējušos eksopolisaharīdu kompleksus atdala centrifugējot (4000 x g, 20 min), šķidrina dejonizētā ūdenī un atkārtoti izgulsnē ar etanolu. Lai novērstu iespējamu brīvo cukuru un barotnes palieku klātbūtni EPS preparātos tos pārgulsnē divas reizes, tad žāvē līdz nemainīgajam svaram pie 45°C (*Van Geel-Schutten et al.*, 1999). Iegūtos EPS preparātus izmanto kā vienīgo oglekļa avotu (20,0 g l⁻¹) modificētajā MRS barotnē vai kā piedevu (20,0 g l⁻¹) modificētajai MRS barotnei ar laktozi 45,0 g l⁻¹. Barotnes sterilizē autoklavējot (121°C, 15 min), pēc sterilizēšanas pārbauda vai nav nav notices būtisks brīvo cukuru koncentrācijas pieaugums.

Analītiskās metodes

Mirorganismu biomasu šķidrās maksliģajās barotnēs nosaka turbidimetriski pie $\lambda=550$ nm izmantojot individuālās kalibrācijas līknes (*Semjonovs et al.*, 2007).

Mirorganismu biomasu fermentētajā pienā nosaka turbidimetriski pie $\lambda=480$ nm kazeīna micellas iepriekš izšķīdinot ar nātrija hidroksīdu un etilēndiamīnteraacetātu (EDTA) pie pazeminātas temperatūras (*Kanasaki et al.*, 1975).

Kopējo ogļhidrātu koncentrāciju nosaka ar antrona metodi (*Morris*, 1948).

Reducējošo cukuru koncentrācija noteikta ar dinitrosalicīlskābes (DNS) metodi (*Miller*, 1959).

Glikozes un fruktozes koncentrāciju nosaka ar standarta enzimatisko metodi izmantojot *ENZYTECTM D-Glucose / D-Fructose tests* (*Scil Diagnostics GmbH*, Vācija).

Titrējamo skābumu (°T) nosaka paraugu titrējot ar 0,1 N NaOH indikatora fenolftaleīna klātbūtnē.

Fruktānu koncentrāciju nosaka izmantojot selektīvās enzimatiskās analīzes AOAC 999.03 metodi (*Megazyme*, Īrija) (*McClearly et al*, 1997).

PB EPS kompleksu sastāvu iepriekš veicot skābo hidrolīzi (H_2SO_4 (1 mol/l), 100 °C, 2 h) nosaka ar augstspiediena hromatogrāfijas metodi izmantojot *Zorbax* ogļhidrātu kolonnu (0,46 x 25 cm) un *Agilent 1100* refrakcijas detektoru. Kolonnas temperatūra - 30°C, mobīlā fāze – acetilnitritrila šķīdums ūdenī (70:30) plūsmas ātrums – 1.2 ml min⁻¹.

PB EPS kompleksu **gel-filtrācija** veikta izmantojot *Amersham Biosciences XK* (1,6 x 70 cm) kolonnu ar *Sepharyl S-400 HR gel* (*Pharmacia Biotech*, Zviedrija) pildījumu, mobīlā fāze – 0.1 M NaCl, plūsmas ātrums 0,75 ml min⁻¹, frakciju intervāls – 2 min. Kolonnu kalibrē ar dažādas molmasas (100 – 4000 kDa) dekstrāniem (*Pharmacia*, Zviedrija).

Mazmolekulāro ogļhidrātu kompozīciju nosaka ar augstspiediena hromatogrāfijas metodēm izmantojot *Jordi Gel GBR* kolonnu (0,8 x 30 cm) un *Agilent 1100* refrakcijas detektoru. Kolonnas temperatūra - 35°C, mobīlā fāze – dimetilsulfoksīds, plūsmas ātrums – 0,6 ml/min.

PB un bifidobaktēriju β-fruktozidāžu aktivitāti nosaka pēc 16 h audzēšanas MRS barotnē ar laktozi kā vienīgo oglekļa avotu. Centrifugējot (3000 x g, 15 min) šūnu biomasu atdala no kultūras šķidrums, tad supernatantu inkubē ar (17,0 g l⁻¹) PB EPS, levānu, inulīnu, TK vai saharozi (50 mM) 50 mM acetāta buferī 30 min pie 37°C. Biomasas bezšūnu ekstraktu iegūst šūnu suspensiju (20,0 g l⁻¹) sonicējot (300 W l/cm², 15 min); šūnu paliekas atdala ar centrifugēšanu (10 000 x g, 15 min). β-fruktozidāžu aktivitāti PB un bifidobaktēriju bezšūnu ekstraktos nosaka tādos pašos astākļos kā kultūras šķīdumos un izsaka to nosacītajās vienībās (NV) kā reducējošo cukuru daudzumu (μg min⁻¹), kas rodas β-fruktozidāžu ietekmē no inkubējamajiem fruktānu substrātiem – attiecinot to uz šūnu biomasu kultūras šķīdumā (*Zikmanis et al.*, 1997).

Datu statistiskā apstrāde

Iegūtie rezultāti ir pārstāvēti ar vidējiem aritmētiskajiem lielumiem +/- standartklūda vai to standartnovirze (5 – 10 %) robežās. Eksperimenti veikti vismaz trīs neatkarīgos atkārtojumos un novērtēti ar vienfaktora vai divfaktoru dispersijas analīzi (attiecīgi, *ANOVA*, *MANOVA*) izmantojot *Statgraphics*[®] *Plus. Manugistics, Inc., US* programmas un nosakot faktoru kritiskās diferences pie ticamības līmeņa $p \leq 0.05$ saskaņā ar *Tukey-HSD* testu. Aprēķini veikti izmantojot *Microsoft Excel for Windows 7.0* programmu. Faktoru (kultūras, substrāti, piedevas) ietekme izvērtēta izmantojot arī neparametrisko rangu dispersijas analīzi (Frīdmana- un Kendela *W*-testi) savstarpēji saistītām datu kopām. Faktoru gradāciju pāru kritiskās starpības izvērtētas pēc Vilksoksona rangu testa.

REZULTĀTU PĀRSKATS UN DISKUSIJA

Pēdējās desmitgades daudzpusīgu pētījumu rezultātā fruktozes oligo- un polisaharīdi (fruktāni) ir atzīti par efektīvām prebiotiskām substancēm, kas pozitīvi ietekmē cilvēka vai dzīvnieka zarnu trakta labvēlīgo mikrofloru – t.i. probiotiskos mikroorganismus (*Biedrzycka and Bielecka, 2004; Rastall et al., 2005*). Izvērtējot dažādus fruktānu avotus (1. tabula) konstatēts, ka fruktānu sīrups (FS) ir vispiemērotākais oglekļa avots (OA) gan probiotiskajām kultūrām *Bifidobacterium lactis* un *Lactobacillus acidophilus* gan arī *Streptococcus thermophilus*, pie kam, uz šī substrāta kultūru biomasas produktivitāte ir samērojama ar iegūto uz salīdzinoši viegli asimilējama OA laktozes (1.tabula). Arī mazmolekulārie fruktooligosaharīdi (FOS) un topinambūra koncentrāts (TK) izmantojami kā vienīgais OA minētajām kultūrām, kaut arī mazāk efektīvi nekā laktoze. Tā, FOS, salīdzinot ar TK, ir piemērotāks (*B. lactis*) vai samērojams (*L. acidophilus*) OA šīm probiotiskajām kultūrām. Jāatzīmē, ka *B. lactis* un *L. acidophilus* biomasas produktivitāte uz FS ir samērojama vai pārsniedz uz laktozes iegūto. Ņemot vērā to, ka bifidobaktēriju kultūrām laktoze salīdzinot ar glikozi ir grūtāk asimilējams OA, tas kavē to attīstību pienā un nenodrošina probiotiskajiem produktam pietiekamu šūnu īpatsvaru. FS pievienošana saraudzējamajam pienam varētu būtiski uzlabot to probiotisko kvalitāti. Salīdzinot novēroto OA efektivitāti *S. thermophilus* kultūrai, konstatēts, ka FS ir piemērotāks tās attīstībai salīdzinot ar TK, FOS, Raftiline® ST un Inulīnu”*Sigma- Aldrich*” (IS) (dilstošā secībā), tādēļ ir pamats uzskatīt, ka galvenokārt tieši saharoze, nevis augu izcelsmes fruktānu klātbūtne ietekmē *S. thermophilus* biomasas produktivitāti, ja fruktānu avots kā piemaisījumu satur saharozi.

Probiotisko kultūru gadījumā augu izcelsmes fruktānu avotu efektivitāte, t.i., to piemērotība biomasas veidošanai ir proporcionāla mazmolekulāro FOS īpatsvaram barotnē, kas saskan ar literatūrā minētajiem datiem (*Perrin et al., 2002; Biedrzycka and Bielecka, 2004*). Tā, FOS vislabāk nodrošina *B. lactis* un *L. acidophilus* biomasas veidošanos, kamēr IS, kas nesatur mazmolekulāros FOS – vissliktāk. Probiotiskās kultūras (*B. lactis, L. acidophilus*) un *S. thermophilus* spēj izmantot arī augstmolekulāro β -2,6 polifruktānu – levānu (2000 kDa) – attiecīgi 37%, 32% un 31 % no laktozes līmeņa, kas ir būtiski mazāk salīdzinot ar mazmolekulāro fruktooligosaharīdu (FOS, TK, Raftiline® ST) izmantošanu. Tai pašā laikā *B. lactis, L. acidophilus* un *S. thermophilus* kultūras asimilēja IS (5kDa) ievērojami vājāk, salīdzinot ar levānu (attiecīgi 18 %, 18 % un 24 %, no laktozes līmeņa). Tādēļ jāsecina, ka mikrobiālās izcelsmes polifruktāni ar tiem raksturīgo β -2,6 glikozīdisko saiti ir vieglāk asimilējami probiotisko un pienskābes baktēriju (PB) kultūrās, salīdzinot ar augu izcelsmes

(β -2,1 glikozīdiskā saite) polifruktāniem, neskatoties uz būtiskām atšķirībām to molekulārajās masās. Pienskābes baktēriju eksopolisaharīdi (PB EPS), kas satur augstmolekulāros (55-2000 kDa) glikānus un fruktānus, ir salīdzinoši labi asimilējami bifidobaktēriju un PB kultūrās. Turklāt, *Pediococcus pentosaceus* EPS gadījumā, neskatoties uz levānam tuvu vidējo molmasu, tie uzskatāmi par ievērojami labāku OA *B. lactis* kultūrai, ko varētu izskaidrot ar lielāku *B. lactis* hidrolāžu afinitāti attiecībā uz glikāniem, salīdzinot ar fruktāniem, kā arī ar to, ka glikānu hidrolīzes produkts (glikoze) ir labāk asimilējams *B. lactis* kultūrā, salīdzinot ar fruktozi (fruktānu hidrolīzes produkts).

Jāatzīmē, ka glikānu, saharozes un reducējošo cukuru piemaisījumu klātbūtne fruktānu avotos ir pozitīvi vērtējama no sinbiotiskā produkta funkcionālās kvalitātes viedokļa. Ņemot vērā, ka probiotiskās kultūras, īpaši bifidobaktērijas, salīdzinot ar laktozi vieglāk asimilē reducējošos cukurus un saharozi (*Gomes and Malcata, 1999*), šo piemaisījumu klātbūtne saraudzējamajam pienam pievienojamajos fruktānu avotos ļauj salīdzinoši lielākai daļai fruktānu nonākt cilvēka zarnu traktā, turpinot prebiotisko iedarbību kā attiecībā uz sinbiotiskā produkta probiotiskajiem celmiem, tā arī uz endogēnās mikrofloras pārstāvjiem.

Fruktānu pievienošana pamatsubstrātam (piens, auzu hidrolizāts u.c.) pirms tā saraudzēšanas ar probiotiskajiem ieraugiem būtiski paaugstina dzīvo šūnu skaitu sinbiotiskajā produktā (1. attēls), tādējādi paaugstinot tā funkcionālo potenciālu (*Mattila-Sandholm, 2002; De Vuyst, 2000*). Tā, visi salīdzinātie fruktānu avoti (izņemot FOS *S. thermophilus* gadījumā) pievienojot tos laktozi saturošajai barotnei spēja nodrošināt augstāku biomasas produktivitāti, salīdzinot ar kontroli. Fruktānu ietekme uz probiotisko baktēriju biomasas produktivitāti laktozi saturošajā barotnē tikai atsevišķos gadījumos ir atkarīga no fruktānu kā vienīgā OA piemērotības kultūrai.

Fruktānu piedevu ietekme uz biomasas produktivitāti laktozi saturošajā barotnē visumā ir lielāka probiotiskajās *B. lactis* un *L. acidophilus* kultūrās, salīdzinot ar *S. thermophilus*, kas skaidrojams ar to, ka tieši laktoze kā pamatsubstrāts ir efektīvāks OA *S. thermophilus* kultūrai, salīdzinot ar probiotiskajam kultūrām (*Gomes and Malcata, 1999*).

Visefektīvākā fruktānus saturošā piedeva *B. lactis* un *L. acidophilus* kultūrās ir PB EPS, turpretim IS ietekme ir vismazāka (IS kā vienīgais OA un kā piedeva laktozi saturošajai barotnei). Tai pašā laikā IS, būdams vāji asimilējams kā vienīgais OA, visefektīvāk veicina *S. thermophilus* biomasas produktivitāti. Līdzīgu ietekmi izrāda arī FS (142 %), levāns (118 %) un PB EPS (114 %). Tas liecina, ka *S. thermophilus* attīstību LSB visefektīvāk ietekmē salīdzinoši lielmolekulāru fruktānu klātbūtne, pie kam, neatkarīgi no to izcelsmes un saišu tipa. *B. lactis* kultūrā PB EPS un levāns efektīvāk veicina biomasas produktivitāti (attiecīgi

Fruktānu piedevu ietekme uz probiotisko piena produktu ieraugos pārstāvēto kultūru attīstību

	Biomases produktivitāte (Q _x , g l ⁻¹ h ⁻¹)														
	Laktoze	Levāns		PB EPS ^c		FS ^d		TK ^e		FOS ^f		IR ^g		IS ^h	
	Kontrolē	A ^a	B ^b	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Bifidobacterium lactis</i> B12	23.0	8.5	49.0	19.2	79.5	26.7	40.1	13.3	46.4	21.8	43.6	10.6	46.1	4.1	29.1
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5	37.0	11.8	46.0	11.5	85.6	37.0	53.0	21.4	61.7	21.8	49.3	11.1	57.6	6.7	44.2
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST	98.0	30.4	116	15.2	111.3	77.4	139.1	30.2	105.0	28.4	98.0	26.5	99.9	23.5	142.0

^aA - fruktānu avots, kā vienīgais oglekļa avots;

^bB - fruktānu avots, kā piedeva (2 %) MRS barotnei ar laktozi;

^cPienskābes baktēriju (*Pediococcus pentosaceus* P773) eksopolisaharīdi;

^dFruktānu sīrups;

^eTopinambūra koncentrāts;

^fFruktooligosaharīdi (Nutraflora[®] FOS);

^gInulīns Raftiline[®] ST;

^hInulīns (*Sigma-Aldrich*).

Rezultāti pārstāv 12 neatkarīgu eksperimentu vidējo vērtību paraugkopu izteiktu biomasas produktivitātes Q_x, g l⁻¹h⁻¹ vienībās ar standartnovirzēm 5 % robežās. Faktoru (kultūras, substrāti) ietekme izvērtēta izmantojot neparametrisko rangu dispersijas analīzi (Frīdmana- un Kendela W-testi) savstarpēji saistītām datu kopām. Faktoru gradāciju pāru kritiskās starpības izvērtētas pēc Vilksona rangu testa.

346 % un 213 %), salīdzinot ar TK un Raftiline® ST (attiecīgi 202 % un 200 %), kas pozitīvi korelē ar šo fruktānu avotu spēju kalpot par vienīgo OA *B. lactis* kultūrā. Salīdzinot ar levānu, *L. acidophilus* kultūrā polifruktānus saturoša piedevas (TK, Raftiline® ST un FS) efektīvāk ietekmē biomasas produktivitāti (attiecīgi 167 %, 157 % un 147 %).

Šie dati ļauj raksturot fruktānu avotu stimulējošo ietekmi uz biomasas veidošanos kā aditīvu, jo vairumā gadījumu fruktānu piedevas kopējā ietekme nepārsniedz atsevišķu katrai kultūrai raksturīgo biomasas produktivitātes raksturlielumu summu (pamatsubstrātas un fruktānu avots, kā vienīgie OA). Turklāt, vieglāk asimilējamā oglekļa klātbūtne būtiski veicina gan fruktānu avota gan kopējo ogļhidrātu patēriņu (2. tabula), kas izpaužas kā lielāks baktēriju, tai skaitā probiotisko, biomasas pieaugums un ātrāka skābju veidošanās un norāda uz iespēju intensificēt raudzējamā produkta ražošanas procesu. Literatūras dati norāda uz neatkarīgu fruktooligosaharīdu transporta sistēmu klātbūtni bifidobaktērijās (*Meulen et al., 2004; 2006*) un pienskābes baktērijās (*Kaplan and Hutkins, 2003; Barrangou et al., 2006*), kas izskaidro fruktooligosaharīdu aditīvo stimulējošo ietekmi uz kultūru attīstību. Salīdzinot inovatīvo fruktānu avotu (PB EPS, Levāns, TK, FS) ietekmi uz biomasas produktivitāti, jāsecina, ka to efektivitāte būtiski pārsniedz komerciāli pieejamā preparātu (Raftiline® ST, FOS, IS) iespējas, īpaši attiecībā uz probiotiskajām kultūrām.

2. tabula

Fruktānu piedevu (20.0 g l⁻¹) ietekme uz ierauga ABT-5 kultūru attīstību (12 h) pienā

Piedevas	Šūnu biomasa, g l ⁻¹	Titrējamais skābums, °T	Ogļhidrātu patēriņš, g l ⁻¹ h ⁻¹
- ^a	1.58	108.2	0.35
Levāns ^b	2.12	122.4	0.74
Inulīns ^c	1.71	116.3	0.66

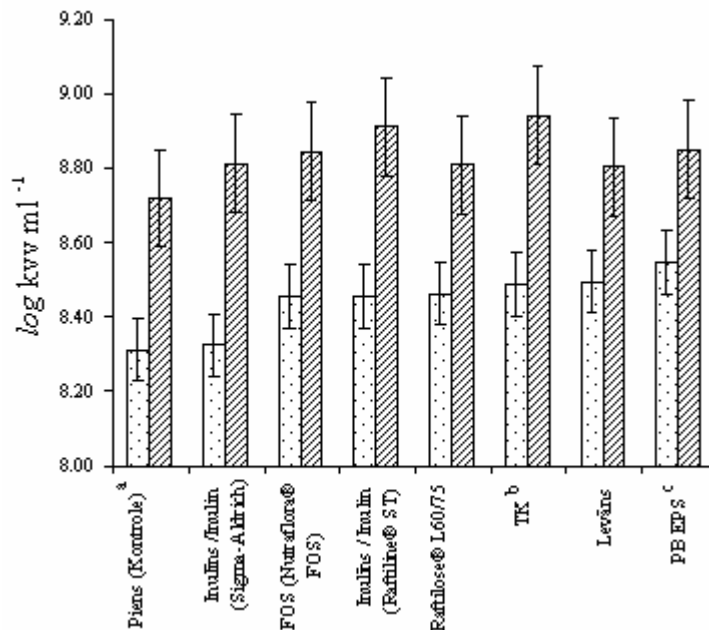
^a kontrole, piens bez fruktānu piedevām;

^b *Zymomonas mobilis* sintezēts β-2,6 polifruktāns (2000 kDa);

^c Inulīns (*Sigma-Aldrich*, Vācija).

Ir pamats uzskatīt, ka atšķirīga fruktānu avotu ietekme uz biomasas produktivitāti probiotiskajās kultūrās varētu būt saistīta ne tikai ar kultūru atšķirīgām „prioritātēm” attiecībā uz fruktānu piedevā esošajiem cukuru u.c. piemaisījumiem, fruktānu izcelsmi, saišu tipu, bet arī ar probiotisko celmu atšķirīgu acidotoleranci, kur lielmolekulārajiem savienojumiem varētu būt izteiktākas protektīvās īpašības attiecībā uz probiotiķu šūnām, nekā

mazmolekulārajiem. Tā, lielmolekulārie fruktānu avoti (levāns un PB EPS) labāk veicina biomasas produktivitāti salīdzinoši mazāk acidotolerantajā *B. lactis* kultūrā (attiecīgi 213 % un 346 %), salīdzinot ar *L. acidophilus* (attiecīgi 124 % un 231 %) un izteikti acidotoleranto *S. thermophilus* (attiecīgi 118 % un 114 %).



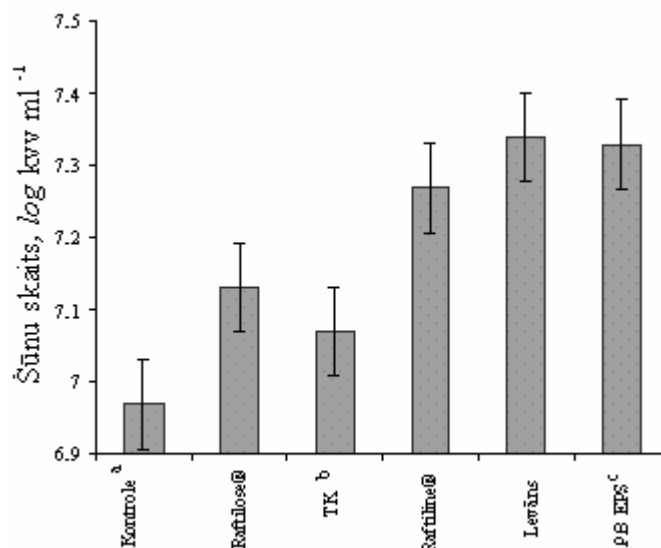
^aPiens bez fruktānu piedevām;

^bTopinambūra koncentrāts;

^cPienskābes baktēriju (*Pediococcus pentosaceus* P773) eksopolisaharīdi.

1. att. Fruktānu piedevu (2 %) ietekme uz *Bifidobacterium lactis* Bb12 (□) un *Lactobacillus acidophilus* La5 (▨) attīstību (24 h) pienā.

Izšķirošs probiotisko produktu kvalitātes rādītājs ir PB un bifidobaktēriju šūnu skaits visa to derīguma termiņa ietvaros (*De Vuyst, 2000; Shah, 2000; Mattila-Sandholm et al., 2002*). Ir zināms, ka probiotiķu, īpaši bifidobaktēriju, saglabāšanās fermentētajos produktos ir apgrūtināta, un to šūnu koncentrācija produkta uzglabāšanas laikā var samazināties zem probiotiskajam produktam minimāli nepieciešamā līmeņa (*Shah, 2000*). Kā redzam 2. attēlā, fruktānu avotu pievienošana būtiski kavē PB un bifidobaktēriju šūnu skaita samazināšanos produkta uzglabāšanas laikā, tādējādi uzturot probiotiskā produkta funkcionālo kvalitāti pietiekamā līmenī. Fruktānu protektīvā ietekme uz PB un bifidobaktērijiem ir proporcionāla fruktānu molmasas pieaugumam. Jāuzsver, ka *P. pentosaceus* EPS (~ 2000 kDa), kas satur fruktānus un glikānus (1:3) un levāns (~2000 kDa) vienādā mērā aizsargā PB un bifidobaktērijas no vides nelabvēlīgās ietekmes uzglabāšanas laikā. Tas norāda, ka šāda protektīvā ietekme ir nespecifiska, jo tā ir raksturīga gan fruktozes, gan arī glikozes polisaharīdiem.



^aFermentētā kāpostu sula bez piedevām;

^bTopinambūra koncentrāts;

^cPienskābes baktēriju (*Pediococcus pentosaceus* P773) eksopolisaharīdi.

2. att. Fruktānu avotu (20,0 g l⁻¹) ietekme uz pienskābes baktēriju un bifidobaktēriju dzīvotspēju fermentētās kāpostu sulas uzglabāšanas laikā (+4^oC, 8 dienas). Spontāni fermentētajā kāpostu sulā (pH 4.00) pievieno *Bifidobacterium lactis* suspensiju līdz log kvv 8.0 ± 0.5 ml⁻¹.

Tai pašā laikā fruktāni var aktīvi iesaistīties PB, tostarp probiotisko un bifidobaktēriju metabolismā, uz ko norāda dažāda specifiskuma un lokalizācijas β-fruktānhidrolāžu klātbūtne (3. tabula), kas īpaši aktīvi izpaužas sinerģiskajās mikroorganismu asociācijās (piem., probiotisko ieraugu gadījumos) (3. attēls).

3. tabula

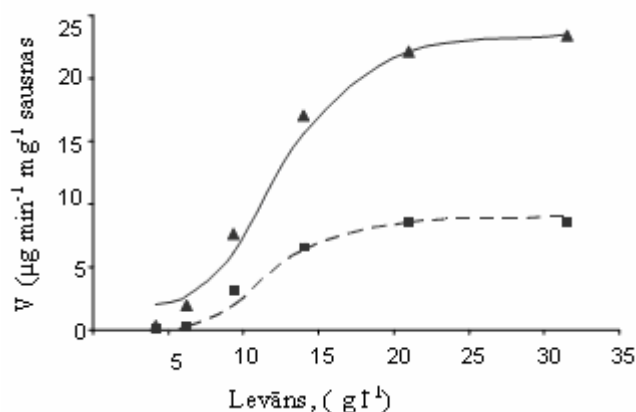
β-fruktānhidrolāžu aktivitāte probiotiskajā ieraugā ABT-5 pārstāvēto kultūru bezšūnu ekstraktos

Kultūras	Fermentu aktivitāte (RS ^a μg ml ⁻¹ min ⁻¹ mg ⁻¹)	
	Reakcijas substrāts	
	Saharoze	Levāns
<i>B. lactis</i>	60.58	16.77
<i>L. acidophilus</i>	2.11	5.61
<i>S. thermophilus</i>	0.01	8.58

^aReducējošie cukuri.

Probiotiskās baktērijas *L. acidophilus* un *B. lactis*, kā arī skābpiena produktos bieži izmantojamais *S. thermophilus* inhibē furazolidona genotoksicitāti (4.tabula). Interesanti, ka

novērotā genotoksicitātes inhibīcijas efektivitāte ir pretēji proporcionāla attiecīgo kultūru biomasas un titrējamo skābju veidošanai laktozi saturošajā barotnē vai pienā (1.tabula; 4. tabula).



3. att. ABT-5 ierauga fruktānhidrolāžu kinētika atkarībā no levāna (substrāts) koncentrācijas: brīvo cukuru veidošanās bezšūnu ekstrakta klātbūtnē (■) un levāna koncentrācijas samazināšanās bezšūnu kultūras šķidruma klātbūtnē (▲).

Literatūrā sastopami dati par pienskābes baktēriju spēju inhibēt 4-nitrokvinolin-1-oksīda genotoksisko aktivitāti (Cenci et al., 2002), ar ko zināmā mērā varētu saistīt probiotiķiem raksturīgas antikancerogēnas ietekmes mehānismus zarnu traktā (Gallagher and Khil, 1999).

4. tabula

Probiotiskajos piena produktu ieraugos bieži pārstāvēto kultūru furazolidona genotoksicitāti inhibējošā iedarbība

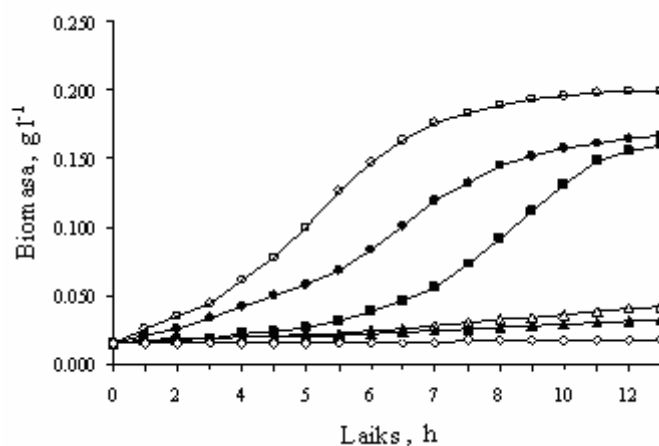
Mikroorganismu kultūras	^a Furazolidona genotoksicitātes inhibēšana, %	^b Šūnu skaits, kvv ml ⁻¹	^b Titrējamais skābums, °T
<i>Bifidobacterium lactis</i>	92.0 ± 6.3	2.03 ± 0.12 x 10 ⁷	75.3 ± 2.7
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	81.9 ± 7.2	5.27 ± 0.34 x 10 ⁷	105.2 ± 5.1
<i>Streptococcus thermophilus</i>	75.0 ± 5.9	9.38 ± 0.43 x 10 ⁸	182 ± 8.2

^a Probiotiskās kultūras inkubē kopā ar furazolidonu 150 min pie 37°C. Furazolidona genotoksicitātes relatīvā inhibēšana (%) aprēķināta pēc tā atlikušās aktivitātes supernatantā (SOS indukcijas faktors) salīdzinot ar pozitīvo kontroli (furazolidona ietekme bez koinkubācijas ar probiotiskajām kultūrām) (Raipulis et al., 2005);

^b Pienā, pēc 24 h fermentācijas.

Izvērtējot fruktānu stimulējošās ietekmes praktiskās pielietojšanas iespējas ir konstatēts, ka tie spēj būtiski paaugstināt dzīvo šūnu skaitu laktozi saturošajās barotnēs.

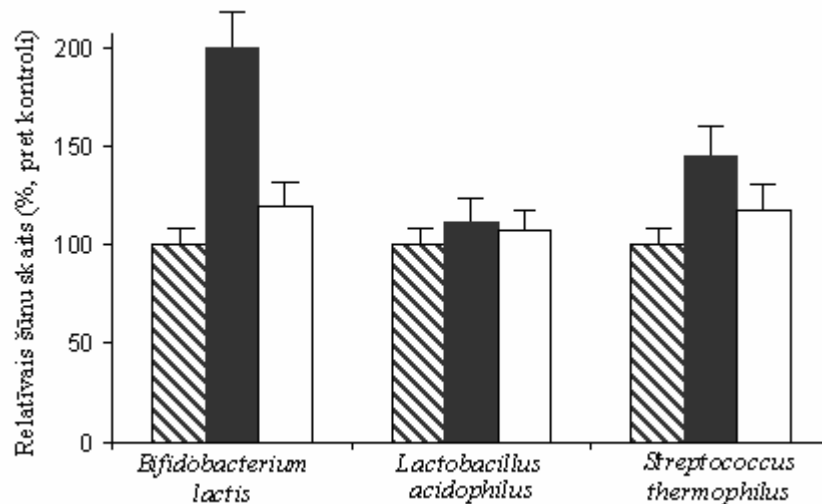
Skābpiena produkti, neskatoties uz zināmiem ierobežojumiem (*De Vrese et al., 2001*), ir atzīti par piemērotiem un šobrīd arī visplašāk izplatītiem pārtikas produktiem probiotiķu iesaistīšanai cilvēka uzturā (*Gurr, 1987; Hoolihan, 2003*). To veicina piena produktu patēriņa specifiskie tirgus un uzturvērtības aspekti, arī tas, ka skābpiena produktu recekļa struktūras īpatnības nodrošina pietiekoši efektīvu aizsargvidi probiotiķa šūnām produkta ražošanas un uzglabāšanas laikā, kā arī pret agresīvajiem faktoriem patērētāja gremošanas traktā (*Charteris et al., 1998*). Ņemot vērā pēdējo īpašību, nav acīmredzami, ka fruktānu protektīvās īpašības izpaudīsies arī attiecībā uz pienskābās rūgšanas metabolītiem (pamatā skābes) un augšanas faktoriem visai bagātajā barotnē – pienā. Iegūtie dati ļauj novērtēt fruktānu avotus kā perspektīvas piedevas kvalitatīvu sinbiotisko skābpiena produktu ar paaugstinātu probiotiķu šūnu skaitu veidošanai (1. attēls), kas ir būtisks priekšnoteikums produkta funkcionālajai efektivitātei tās profilaktiskajās un terapeitiskajās izpausmēs (*Mattila-Sandholm, 2002; De Vuyst, 2000*).



4. att. Ierauga ABT-5 biomasas veidošanās dinamika MRS barotnē ar laktozi kā vienīgo oglekļa avotu (■), ar inulīna (*Sigma-Aldrich*) (●) vai levāna (○) 2 % piedevu. Kontroles varianti: levāns (Δ) vai inulīns (▲) – kā vienīgais oglekļa avots, MRS barotne bez oglekļa avota (◇).

Neraugoties uz to, ka fruktānu piedevas sarauzējamajā pienā ļauj sasniegt tehnoloģiski pietiekamu titrējamo skābju līmeni, probiotiskos celmus visai reti izmanto kā viencelma ieraugus piena sarauzēšanai, jo tie neļauj sasniegt produkta vēlamo organoleptisko īpašību kopumu. Vairums probiotisko celmu nespēj pietiekami ātri attīstīties pienā bez to augšanu veicinošām piedevām (*Gomes and Malcata, 1999; Mattila-Sandholm, 2002; De Vuyst, 2000*). To attīstības veicināšanai, var izmantot dažādus fruktānu avotus (1.

tabula, 1. attēls). Probiotiskos celmus fermentēto produktu ražošanai parasti izmanto kombinācijās ar tehnoloģiskajām kultūrām, kas nodrošina produkta vēlamās reoloģiskās un organoleptiskās īpašības. Līdz ar to, izstrādājot sinbiotiskos produktus ir būtiski novērtēt prebiotiskās piedevas ietekmi ne tikai uz izmantojamā ierauga šūnu biomasas veidošanos kopumā (4.attēls), t.i. novērtēt ietekmi uz produkta rūgšanas gaitu, bet arī uz atsevišķām ierauga sastāvā esošām probiotiskajām un tehnoloģiskajām kultūrām (*De Vuyst, 2000; Mattila-Sandholm, 2002; Leroy and De Vuyst, 2004*).

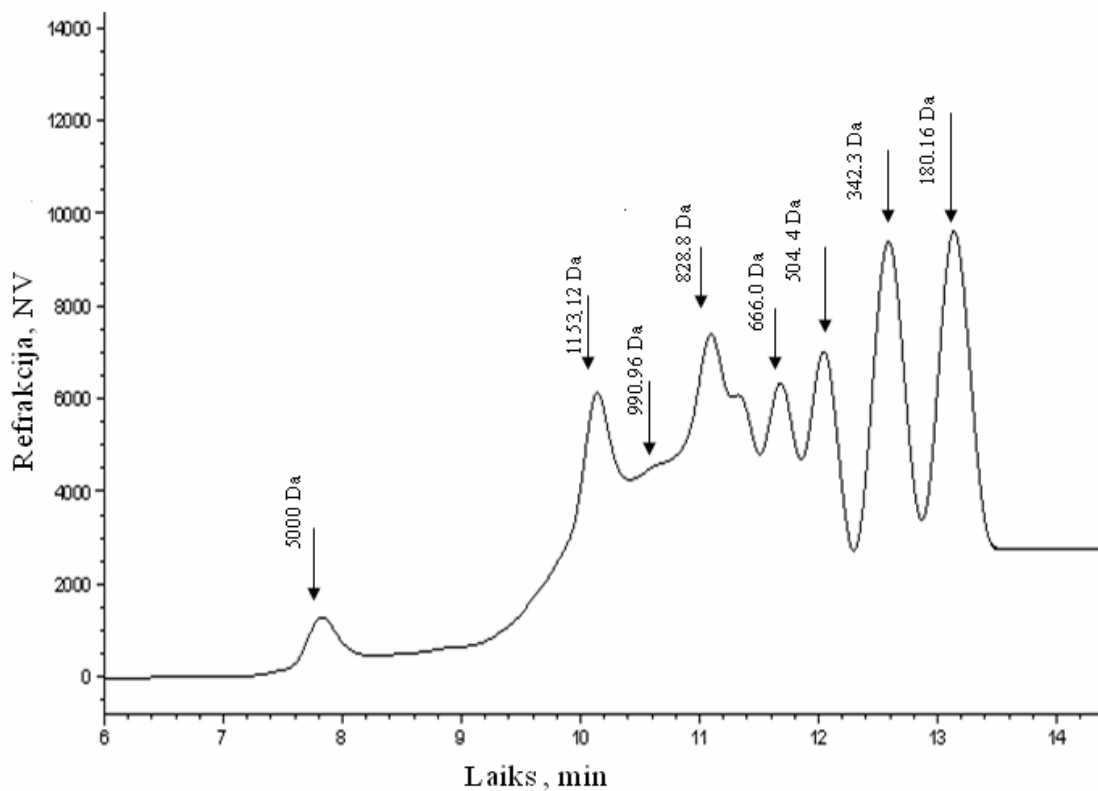


5. att. Ieraugā ABT-5 pārstāvēto kultūru relatīvās šūnu skaita izmaiņas pienu (▨) bagātinot ar levāna (■) vai inulīna (*Sigma-Aldrich*) (□) piedevām (2 %). Šūnu skaits kontroles variantos: $5.55 \pm 0.56 \times 10^6$ (*B. lactis*); $6.30 \pm 0.65 \times 10^7$ (*L. acidophilus*); $1.31 \pm 0.12 \times 10^9$ (*S. thermophilus*).

Jāsecina, ka polifruktānu piedevas (5. attēls; 4. tabulā) būtiski intensificē pienskābās rūgšanas gaitu gan izmantojot atsevišķus celmus, gan to asociācijas, pie kam, to pievienošana ļauj būtiski samazināt lag-fāzes ilgumu, kas īpaši svarīgi pienā lēni augošām *Bifidobacterium* un *L. acidophilus* kultūrām. Kombinācijās ar salīdzinoši ātrāk augošām *S. thermophilus* un/vai *L. bulgaricus* kultūrām probiotiskie celmi bieži nespēj sasniegt funkcionālajam produktam pietiekamu šūnu skaitu vienlaicīgi ar tehnoloģisko kultūru nodrošinātiem produkta vēlamajiem organoleptiskajiem parametriem (*Tamime and Robinson, 1999*). Izmantojot selektīvās skaitīšanas metodes novērojām, ka fruktānu piedevas būtiski paaugstina probiotiķu (īpaši *B. lactis*) šūnu skaitu sinbiotiskajā produktā izmantojot tehnoloģiski nozīmīgos ABT – tipa ieraugus (4. attēls).

Funkcionālās pārtikas produktu klāsta dažādošana un to kvalitātes uzlabošana ir aktuāls mūsdienu pārtikas zinātnes uzdevums. Viens no galvenajiem sinbiotisko produktu

funkcionālās kvalitātes kritērijiem neapšaubāmi ir dzīvu probiotiķu koncentrācija tajos. Kā rāda šī pētījuma rezultāti, to ir iespējams būtiski paaugstināt izmantojot prebiotiskos fruktānu avotus. LU MBI izstrādāta tehnoloģija topinambūra koncentrāta (TK) ražošanai ļauj iegūt no Latvijā audzētām izejvielām funkcionālo piedevu ar plašām izmantošanas iespējām un izteiktām prebiotiskām īpašībām. TK ogļhidrātu profils (6. attēls) norāda, ka tas satur aptuveni 50 % fruktānu. Salīdzinot ar neapstrādātajiem topinambūra bumbuļiem (fruktānu PP⁶ 11-30), tajā dominē mazas un vidējās molmasas fruktooligosaharīdi (PP 3-8), kuri veidojas topinambūra bumbuļu endoinulināžu darbības un termiskās apstrādes ietekmē ražošanas procesa ietvaros (Bekers et al., 2007).



6. att. Topinambūra koncentrātā pārstāvēto ogļhidrātu sadalījums izmantojot augstspiediena šķidrums hromatogrāfijas metodi. Savienojumu molmasa norādīta ar bultiņām.

Kā substrātu izmantojot auzu pārslu hidrolizātu konstatēts (5. tabula), ka kopējais šūnu skaita pieaugums TK ietekmē, līdzīgi kā saraudzējot pienu (6.tabula) ir lielāks B ieraugam (*B. lactis*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*), salīdzinoši vismazākais tas ir A (*B.*

⁶ Polimerizācijas pakāpe

lactis, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*) jogurta ieraugam (5. un 6. tabulas). Izmantojot selektīvās barotnes ir noskaidrots, ka B ieraugā ir konstatējama vislielāka TK ietekme uz *B. lactis* šūnu skaitu, kā arī uz kopējo probiotisko baktēriju (*B. lactis*, *L. acidophilus*) šūnu skaitu. Tai pašā laikā TK piedeva izmantojot ABT tipa C ieraugu (*B. lactis*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*) vislabāk veicināja *L. acidophilus* pieaugumu, nodrošinot augstu probiotiķu koncentrāciju, tomēr nedaudz mazāku (5,7%) nekā B ieraugā. TK ietekme uz *B. lactis* šūnu skaitu ir lielāka C ieraugā salīdzinot ar A ieraugu, kurā nav pārstāvēts *L. acidophilus*.

Šāds novērojums saskan ar priekšstatiem par protosimbiotiskajām attiecībām starp *B. lactis* un *L. acidophilus* kultūrām (Gomes and al., 1998), kas skaidrojams ar *L. acidophilus* labāku proteolītisko aktivitāti (Gomes and Malcata, 1999). ABT tipa ieraugus šobrīd izmanto arī funkcionālā raudzētā produkta uz auzu bāzes (Auzu BioLakto, Latvia) ražošanai. Bagātinot to ar TK rūgšanas gaitā vērojama fruktānu koncentrācijas samazināšanās galvenokārt, domājams, iedarbojoties *L. acidophilus*. Tādējādi, funkcionālo produktu uz auzu bāzes bagātinot ar fruktānus saturošo TK ir iespējams paplašināt auzu β -glikānu prebiotisko ietekmi. Jāatzīmē, ka produkta fermentēšanas gaitā (18 h) noārdās tikai apmēram 22 % fruktānu. Tātad, lielāka to daļa varētu turpināt prebiotisko iedarbību cilvēka zarnu traktā. TK piedeva minimāli ietekmē *S. thermophilus* šūnu skaitu. ABT – tipa ierauga sistēmā, kā arī individuālajā *S. thermophilus* kultūrā, taču visai ievērojami ietekmē *S. thermophilus* šūnu skaita pieaugumu B, kā arī A ieraugā (5. un 6. tabulas), kur šī ietekme notiek pastarpināti – TK piedevai būtiski ietekmējot *L. bulgaricus* šūnu skaitu. Tas skaidrojams ar jogurta biosistēmā nepieciešamajām protosimbiotiskajām attiecībām starp šīm sugām (Zourari et al., 1992; Tamime and Robinson, 1999). Jādomā, ka *S. thermophilus* šūnu skaita pieaugums B ieraugā salīdzinot ar A ieraugu ir būtiskāks tādēļ, ka *L. bulgaricus* un *S. thermophilus* savstarpēji pozitīva ietekme ir pastiprināta ar *L. acidophilus* klātbūtni. Jāatzīmē, ka bagātinot pienu ar TK ir nepieciešami lietot stabilizātorus (ciete, pektīns u.c.), kas uzlabojot produkta tekstūru un stabilizējot suspendētas TK daļiņas. Tomēr šādas piedevas uzskatāmas par papildus kaloriju avotu ar zemu funkcionālo vērtību. Ir konstatēts, ka bagātinot auzu pārslu hidrolizātu ar TK, nav vajadzības lietot papildus piedevas JAC daļiņu stabilizēšanai. TK kombinācijā ar auzu β -glikānu var paplašināt tā prebiotiskās aktivitātes spektru – paaugstinot arī produkta kopējo funkcionalitāti (Jaskari et al., 1998; Kaur and Gupta, 2002).

Daudzveidīgs cilvēka veselībai derīgu mikro- un makroelementu sastāvs, kā arī dažādas molmasas fruktānu klātbūtne TK ļauj to raksturot kā perspektīvu pārtikas piedevu gan funkcionālo, gan tehnoloģisko īpašību ziņā.

Topinambūra koncentrāta (TK) 40.0 g l⁻¹ ietekme uz ieraugos pārstāvēto kultūru selektīvo šūnu skaitu auzu barotnē 8 h ilgas fermentēšanas beigās. Rezultāti pārstāvēti ar vidējiem aritmētiskajiem lielumiem no trīs neatkarīgajiem mēģinājumiem ± standartnovirze

Barotne	Ierauga sastāvs	Ieraugā pārstāvētās kultūras, kvv ml ⁻¹				Kopējais šūnu skaits, kvv ml ⁻¹
		<i>B. lactis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	
Auzu barotne (Kontrole)	A	4.20 ± 0.21 x 10 ⁶	-	5.81 ± 0.26 x 10 ⁷	5.40 ± 0.28 x 10 ⁷	1.16 ± 0.05 x 10 ⁸
	B	1.20 ± 0.05 x 10 ⁶	4.30 ± 0.25 x 10 ⁷	1.58 ± 0.15 x 10 ⁸	1.94 ± 0.07 x 10 ⁸	3.96 ± 0.15 x 10 ⁸
	C	8.89 ± 0.38 x 10 ⁶	1.46 ± 0.04 x 10 ⁷	1.31 ± 0.15 x 10 ⁷	-	3.66 ± 0.16 x 10 ⁷
+ TK	A	5.79 ± 0.23 x 10 ⁶	-	2.92 ± 0.18 x 10 ⁸	4.33 ± 0.15 x 10 ⁸	7.31 ± 0.29 x 10 ⁸
	B	2.70 ± 0.06 x 10 ⁶	1.10 ± 0.06 x 10 ⁸	3.09 ± 0.20 x 10 ⁹	1.54 ± 0.09 x 10 ⁹	4.74 ± 0.17 x 10 ⁹
	C	1.28 ± 0.05 x 10 ⁷	5.56 ± 0.14 x 10 ⁷	1.52 ± 0.16 x 10 ⁷	-	8.36 ± 0.31 x 10 ⁷

Topinambūra koncentrāta (TK) 40.0 g l⁻¹ ietekme uz šūnu biomasas (mg ml⁻¹) un titrējamo skābju (°T) veidošanos pienu fermentējot (8 h) ar atšķirīga sastāva ieraugiem. Rezultāti pārstāvēti ar vidējiem aritmētiskajiem lielumiem no trīs neatkarīgajiem mēģinājumiem ± standartnovirze

Barotne	Ierauga sastāvs					
	A		B		C	
	<i>B. lactis</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>		<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>		<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>S. thermophilus</i>	
	Biomasa, mg ml ⁻¹	Titrējamais skābums, °T	Biomasa, mg ml ⁻¹	Titrējamais skābums, °T	Biomasa, mg ml ⁻¹	Titrējamais skābums, °T
Piens (Kontrole)	0.41 ± 0.01	42.0 ± 1.8	0.33 ± 0.01	37.5 ± 1.5	0.39 ± 0.01	42.0 ± 1.6
+ TK	0.98 ± 0.04	85.0 ± 1.9	1.19 ± 0.03	100.0 ± 1.9	1.20 ± 0.02	101.0 ± 2.1

Tā, TK stimulējošā ietekme attiecībā uz probiotiķiem *L. acidophilus* un *B. lactis* būtiski (7 – 38 %) pārsniedz komerciāli pieejamo fruktānu avotu (Nutraflora® FOS, Raftiline® ST un Raftilose® L60/75) ietekmi pienā. Kā redzam 5. un 6. tabulās; 1. attēlā., TK piedeva pienam ļauj ne tikai paaugstināt sinbiotiskā skābpiena produkta funkcionālo kvalitāti (probiotiku šūnu skaits), bet arī būtiski intensificēt pienskābās rūgšanas gaitu izmantojot ABT-tipa un jogurtu probiotiskos ieraugus. Šeit būtu jāpievērš uzmanība TK izteikti stimulējošai ietekmei uz *L. bulgaricus* (vienu no jogurtu tehnoloģiskajām pamatkultūrām) attīstību.

7. tabula

Pienskābes baktēriju eksopolisaharīdu (EPS) (substrāts - saharozes) raksturlielumi

Kultūra	EPS vidējā molmasa, kDa			Attiecība (glikāns / fruktāns)	EPS sintēze, g l ⁻¹
	EPS kopumā	Glikāns ^a	Fruktāns ^a		
<i>L. reuteri</i> MBI-C42	114	114	95	1 / 0.8	6.0
<i>L. reuteri</i> MBI-C43	66	95	55	1 / 2.1	5.4
<i>L. panis</i> MBI-V35	867	867	867	1 / 2.9	8.6
	345	415	345	1 / 1.5	
	137	79	165	1 / 1.2	

^a vidējā molmasa, kas aprēķināta ņemot vērā glikozes/fruktozes attiecības izmaiņas attiecīgajā EPS frakcijā.

Būtu atkārtoti jāuzsver, ka probiotisko produktu profilaktiska un terapeitiska efektivitāte ir tieši atkarīga no probiotiķu dzīvo šūnu koncentrācijas tajā, arī tas, ka fruktānu avoti var būtiski uzlabot fermentēto probiotisko produktu funkcionālo kvalitāti. Literatūrā ir sastopamas norādes par atsevišķu PB celmu spēju sintezēt hetero-EPS. Tā, hetero-EPS sintezējošās PB *L. bulgaricus* un *S. thermophilus* celmus izmanto jogurtu ražošanā (*Leroy and De Vuyst, 2004*).

***Lactobacillus reuteri* LB 121 un *Lactobacillus panis* MBI-V35 eksopolisaharīdu (EPS) (sintezēti uz saharozes) ietekme uz *Bifidobacterium* kultūru attīstību (g l^{-1}) un titrējamo skābju veidošanu ($^{\circ}\text{T}$) MRS barotnē ar laktozi vai EPS kā vienīgo oglekļa avotu, pēc 48 h**

<i>Bifidobacterium</i> Kultūras	Oglekļa avots barotnē									
	Laktoze ^a		<i>L. reuteri</i> LB 121 EPS ^a		<i>L. panis</i> EPS ^a		+ <i>L. reuteri</i> LB 121 EPS ^b		+ <i>L. panis</i> EPS ^b	
	g l^{-1} ^c	$^{\circ}\text{T}$ ^d	g l^{-1} ^c	$^{\circ}\text{T}$ ^d	g l^{-1} ^c	$^{\circ}\text{T}$ ^d	g l^{-1} ^c	$^{\circ}\text{T}$ ^d	g l^{-1} ^c	$^{\circ}\text{T}$ ^d
<i>B. lactis</i> Bb 12	0.99	122.4	0.26	52.3	0.66	56.1	1.14	137.6	1.14	145.1
<i>B. lactis</i> OX-1	2.10	213.2	0.44	56.2	0.35	58.2	2.42	224.3	2.63	236.1
<i>B. angulatum</i>	0.11	37.3	0.11	38.4	0.40	73.5	0.15	38.7	0.18	46.5
<i>B. brevis</i>	0.11	38.4	0.10	33.5	0.06	43.8	0.13	41.2	0.25	45.1
<i>B. longum</i>	0.11	37.8	0.36	58.3	0.29	68.5	0.27	58.4	0.25	52.6
<i>B. animalis</i>	0.97	142.1	0.34	56.4	0.30	64.6	1.10	160.8	1.07	179.7
<i>B. pseudocatenulatum</i>	0.11	39.2	0.10	35.2	0.11	42.1	0.13	44.2	0.19	50.2

^a vienīgais oglekļa avots;

^b Pienskābes baktēriju eksopolisaharīdi kā piedeva (20.0 g l^{-1}) MRS barotnei ar laktozi (45.0 g l^{-1});

^c Šūnu biomasa, g l^{-1} ;

^d Titrējamais skābums, $^{\circ}\text{T}$.

Pienskābes baktēriju eksopolisaharīdu (EPS) ietekme uz probiotiskajiem ieraugiem raksturīgo kultūru (*Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 un *Streptococcus thermophilus* attīstību modificētajā MRS barotnē (24 h)

Oglekļa avots barotnē	Biomasa, g l ⁻¹			
	<i>B. lactis</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. thermophilus</i>
Laktoze (Kontrole)	0.36	1.37	0.40	1.13
<i>L. reuteri</i> MBI-C42				
EPS ^a	0.38	0.73	0.62	0.67
Laktoze + EPS ^b	0.56	1.60	0.76	0.60
<i>L. reuteri</i> MBI-C43				
EPS ^a	0.35	0.76	0.54	0.46
Laktoze + EPS ^b	0.50	1.54	0.62	0.38
<i>L. panis</i> MBI-V35				
EPS ^a	0.23	2.94	0.28	0.87
Laktoze + EPS ^b	0.47	2.81	0.91	1.08
<i>L. sanfranciscensis</i> DSM20451				
EPS ^a	0.37	1.24	0.58	0.96
Laktoze + EPS ^b	0.50	2.37	0.72	0.87
<i>L. reuteri</i> LB 121				
EPS ^a	0.10	3.78	0.12	2.38
Laktoze + EPS ^b	1.12	2.44	0.94	1.11
EPS ^c	0.06	3.19	0.16	0.84
Laktoze + EPS ^b	0.80	1.45	0.91	0.80

^a Pienskābes baktēriju eksopolisaharīdi (biosintēze no saharozes), kā vienīgais ogleklā avots modificētajā MRS barotnē;

^b Pienskābes baktēriju eksopolisaharīdi, kā piedeva (20.0 g l⁻¹) MRS barotnei ar laktozi (45.0 g l⁻¹);

^c Pienskābes baktēriju eksopolisaharīdi (biosintēze no rafinozes), kā vienīgais ogleklā avots modificētajā MRS barotnē.

Lai nodrošinātu skābpiena produktu, īpaši ar zemu tauku saturu, vēlamās tekstūras, garšas un reoloģiskās īpašības un mazinātu to sinerēzi, saraudzējamajam pienam parasti pievieno vājpiena vai sūkalu koncentrātus, kazeinātus, koncentrē ar ietvaicēšanas vai membrānfiltrācijas metodēm, kas būtiski paaugstina ražošanas izmaksas. Bez tam, produktu tekstūras stabilizēšanai un viskozitātes paaugstināšanai var pievienot speciālas piedevas (cietes, želatīns, pektīni, guārsveķi, algināti u.c.). Arī EPS sintezējošo jogurta ieraugu izmantošana ļauj būtiski uzlabot produkta organoleptiskās un teoloģiskās īpašības (*Tamime and Robinson, 1999*), kaut gan to pielietošanas iespējas aprobežojas ar fermentētajiem piena produktiem (*Leroy and De Vuyst, 2004*).

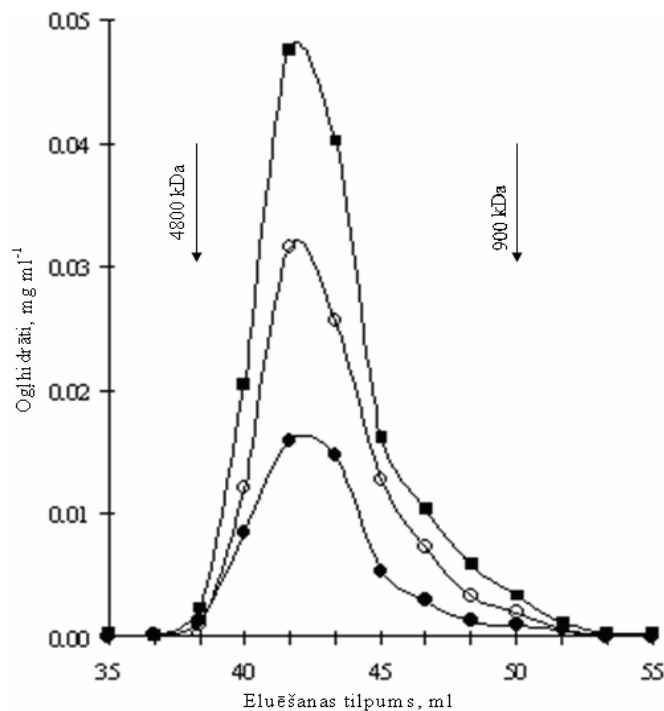
10. tabula

***Lactobacillus* fruktānus sintezējošo celmu spēja veidot titrējamās skābes (°T) dažādos ar saharozi (120.0 g l⁻¹) bagātinātos pārtikas substrātos, 48 h fermentācijā**

Fermentējamais pārtikas substrāts	Titrējamais skābums, °T				
	<i>L. reuteri</i> MBI-C42	<i>L. reuteri</i> MBI-C43	<i>L. panis</i>	<i>L. pontis</i>	<i>L. sanfranciscensis</i>
Auzu	148.2	132.6	27.5	35.5	75.8
Miežu	108.4	143.1	20.6	38.9	81.7
Zirņu	125.5	181.9	61.5	72.1	58.6
Griķu	125.3	139.4	46.6	42.1	80.4
Pupiņu	159.5	117.5	70.2	51.6	91.3
Rudzu	132.3	182.3	19.3	37.3	56.6
Sojas piens ^a	68.7	17.9	22.7	29.2	28.2
Piens ^a	144.1	188.9	53.0	44.4	82.2
Burkānu biezsula ^a	192.2	182.4	36.2	65.0	97.8
Ābolu biezsula ^a	120.1	144.7	102.8	98.0	103.2

^a bez apstrādes ar α-amilāzi.

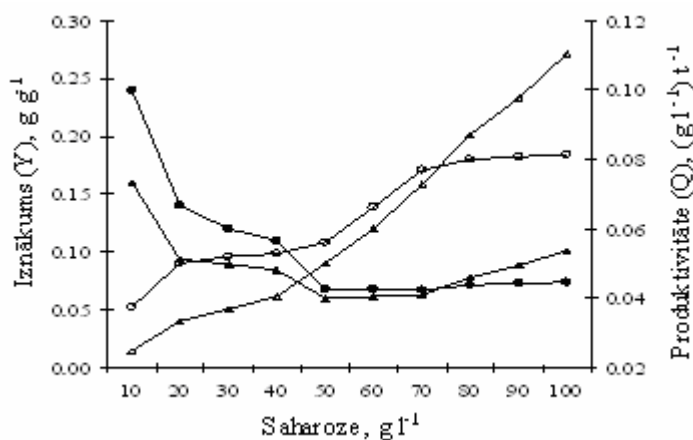
Stabilizējošo un iebiezinošo piedevu iekļaušana produkcijas receptūrās paaugstina tās ražošanas izmaksas. Turklāt, ienesot cilvēka organismā papildus asimilējamus oglekļa avotus mazinās produktu diētiskā un funkcionālā vērtība. Pēdējā laikā būtiski pieaug pieprasījums pēc „dabīgajiem” un „veselīgajiem” pārtikas produktiem, taču mākslīgo ingredientu pievienošana fermentētajiem produktiem neļauj pozicionēt tos šajā aizvien augošajā tirgus segmentā. Tādējādi, ir aktuāli nepieciešamas tehnoloģiski efektīvas EPS-sintezējošās PB kultūras, kas būtu piemērotas daudzveidīgu pārtikas substrātu, ne tikai piena sarauzēšanai. Jāatzīmē, ka izmantojot EPS-sintezējošās PB kultūras ir iespējams ne tikai uzlabot produktu tehnoloģiskās īpašības, bet arī paaugstināt to funkcionālo vērtību. Tā, ir ziņots par PB-EPS antihiperlipidemisko, imunostimulējošo un antikancerogēno iedarbību (*Welman and Maddox, 2003*). Efektīvās EPS-producējošās PB spēj sintezēt EPS *in situ* tehnoloģiski un fizioloģiski pietiekamajā koncentrācijā produkta fermentēšanas gaitā (*Korakli et al., 2003*). Tādējādi ir iespējams panākt produkta optimālas tehnoloģiskās īpašības un uzlabot to funkcionālo vērtību (t.i., paaugstināt arī tā pievienoto vērtību bez papildus izmaksām, kas ir būtisks faktors fermentētās pārtikas ražošanā augošo izmaksu un konkurentā tirgus apstākļos).



7. att. *Pediococcus pentosaceus* P 773 eksopolisaharīdu gel-filtrācijas profils. Glikāns (○) un fruktāns (●), profils aprēķināts analizējot kopējo ogļhidrātu koncentrāciju (■) un glikozes/fruktozes attiecību atbilstošajā frakcijā.

Pēdējos gados ir ziņots par PB spēju sintezēt fruktānus saturošos EPS (*Van Geel-Schutten et al., 1998; Korakli et al., 2003; Tiekling et al., 2003; 2005*). Tomēr, līdz šim brīdim šāds PB biosintētiskais potenciāls, kas izriet no levānsaharāžu klātbūtnes atsevišķu celmu fermentu sistēmās, netiek izmantots ražošanas praksē. Šobrīd tirgū nav pieejami ieraugi, kuru sastāvā būtu pārstāvēti fruktānus sintezējoši PB celmi. Atsevišķu PB celmu spēja *in situ* sintezēt fruktānus saturošos EPS līdz šim nav izmantota funkcionālās pārtikas ražošanā. Tādējādi, par izšķirošo ierobežojumu šādu principiāli jaunu funkcionālo produktu ar paaugstināto pievienoto vērtību ražošanai šobrīd ir jauzskata tehnoloģiski piemērotu celmu trūkumu.

Šī pētījuma ietvaros ir izdevies izolēt un definēt potenciāli probiotiskus tehnoloģiski perspektīvus fruktānus sintezējošos PB celmus no *Lactobacillus* (7. tabula) un *Pediococcus* ģintīm (7. attēls). Jāatzīmē, ka neskatoties uz pēdējo gadu pētījumiem par *Pediococcus* izmantošanas potenciālajām iespējām pārtikas ražošanā, sevišķi piena rūpniecībā, joprojām nebija datu par fruktānus sintezējošajiem (7. attēls) celmiem *Pediococcus* ģintī. Kā redzam 7. un 8. attēlos. un 7.tabulā saharozes klātbūtnē PB spēj sintezēt fruktānus saturošos EPS, kas pārstāvēti ar līdzīgu (55-2000 kDa) molmasu glikānu un fruktānu maisījumiem.



8. att. Saharozes koncentrācijas ietekme uz *Pediococcus pentosaceus* P 773 biomasas iznākumu (▲) un produktivitāti (Δ), kā arī eksopolisaharīdu iznākumu (●) un produktivitāti (○) modificētajā MRS barotnē ar saharozi.

Jāatzīmē, ka tehnoloģiski un fizioloģiski efektīvs fruktānus saturošo EPS līmenis tiek sasniegts jau pie minimālām saharozes koncentrācijām, kuras ierasti izmanto produktu garšas uzlabošanai.

Kā redzam 8. tabulā PB EPS, līdzīgi kā iepriekš minētie fruktānu avoti (1. tabula), var tikt izmantoti kā vienīgais oglekļa avots septiņos *Bifidobacterium* celmos, un stimulēt to

attīstību laktozi saturošajā barotnē (LSB) un pienā (1. attēls). Attiecībā uz *Bifidobacterium* celmiem PB EPS stimulējošā iedarbība izpaužas jo intensīvāk, jo augstāks ir glikāna īpatsvars EPS kompleksā. Tādējādi, salīdzinoši lielāks EPS kompleksā esoša fruktāna daudzums varētu nonākt patērētāja zarnu traktā turpinot prebiotisko iedarbību attiecībā uz tā endogēno mikrofloru. PB EPS būtiski veicina arī *L. bulgaricus* un, atsevišķos gadījumos *L. acidophilus* attīstību LSB (9. tabula).

Fruktānus sintezējošās PB spēj attīstīties (10. tabula) daudzveidīgos pārtikas substrātos – graudu izcelsmes (auzas, mieži, griķi, rudzi), pākšaugu substrātos (pupiņas, zirņi, sojas piens), arī pienā un sulās (burkāni, āboli, kāposti). Attieksme pret fermentējamo pārtikas substrātu ir

11. tabula.

Fruktānu veidošanās *in situ* dažādu grupu pārtikas substrātos fermentācijas gaitā (48 h). Pārtikas substrāti pirms fermentācijas ar fruktānus veidojošajām *Lactobacillus* tika apstrādāti ar α -amilāzi un bagātināti ar saharozi (120.0 g l⁻¹)

Kultūras	Substrāts	Fruktānu beigu koncentrācija, mg g ⁻¹ substrāta sausas		
		Rudzu substrāts	Burkānu biezsula	Piens
<i>L. reuteri</i> LB 121		27.7	9.9	6.2
<i>L. reuteri</i> MBI-C42		22.0	10.7	8.4
<i>L. reuteri</i> MBI-C43		26.1	10.1	9.3
<i>L. panis</i> MBI-V35		7.3	1.9	3.2
<i>L. sanfranciscensis</i> DSM 20451		9.4	5.6	3.5

celmam specifiska, un, līdz ar to ir viens izšķirošajiem priekšnoteikumiem celma turpmākajai izmantošanai ražošanas praksē. Salīdzinoši izvērtējot, *L. reuteri* celmi un *P. pentosaceus* ir efektīvāki to izmantošanai fermentēto pārtikas produktu iegūšanai. Kā redzam 11. tabulā EPS sintezējošie PB celmi attīstoties dažādu grupu pārtikas substrātos fermentācijas gaitā spēj *in situ* veidot fruktānus, tā būtiski paaugstinot produkta funkcionālo vērtību, kuru nosaka fruktānu vispārāztītās prebiotiskās u.c. īpašības. Promocijas darba gaitā iegūtie rezultāti kopumā demonstrē principiāli jaunu pieeju prebiotisko un/vai sinbiotisko produktu ar augstu pievienoto vērtību veidošanai, kā arī to funkcionālās kvalitātes uzlabošanai un uzturēšanai.

SECINĀJUMI

1. Mikrobiālās izcelsmes augstmolekulārie fruktāni (levāns ~ 2000 kDa) un fruktānus saturošie pienskābes baktēriju eksopolisaharīdu kompleksi (55-867 kDa) līdzīgi kā augu izcelsmes fruktāni kā vienīgais oglekļa avots efektīvi nodrošina probiotisko mikroorganismu attīstību ar komerciāli pieejamiem prebiotiskajiem fruktānu preparātiem samērojamā līmenī, to pārsniedzot atsevišķos gadījumos.
2. Mikrobiālās izcelsmes fruktānu avoti (levāns, pienskābes baktēriju eksopolisaharīdu kompleksi, fruktānu sīrups) līdzīgi kā komerciāli pieejamie augu izcelsmes fruktānu avoti veicina probiotisko mikroorganismu attīstību, un ir izmantojami kā piedevas saraudzējamajam pamatsubstrātam (piens, auzu substrāts), kas nodrošina augstāku probiotiķu īpatsvaru fermentētajā produktā, un, līdz ar to var uzlabot sinbiotiskā produkta funkcionālo kvalitāti.
3. Topinambūra koncentrāts kā inovatīvs augu izcelsmes fruktānu avots atzīstams par efektīvu sinbiotisko piedevu attiecībā uz *B. lactis* Bb12 un *L. acidophilus* La-5 probiotiskajiem celmiem ABT-tipa un jogurtu ieraugos.
4. Fruktānu pievienošana saraudzējamajam pamatsubstrātam (piens, auzu hidrolizāts) atšķirīgi ietekmē probiotisko ieraugu mikroorganismus celmam un fruktānu piedevai specifiskā veidā, kas jāņem vērā, saraudzējamo substrātu bagātinot ar fruktānu piedevām pirms fermentēšanas procesa sākšanas.
5. Fruktānu piedevu protektīvās īpašības var paaugstināt pienskābes baktēriju un bifidobaktēriju dzīvotspēju fermentētajos produktos to uzglabāšanas laikā pie pazeminātas temperatūrās, tādējādi uzturot probiotiķus saturošo produktu funkcionālo kvalitāti nepieciešami augstā līmenī.
6. Identificēti seši tehnoloģiski perspektīvi fruktānus saturošos EPS kompleksus sintezējošās *Lactobacillus* celmi, kas piemēroti daudzveidīgu pārtikas substrātu (piens, augļu un dārzeņu sulas, graudu un pākšaugu substrāti) fermentēšanai un spēj *in situ* sintezēt fruktānus fermentācijas gaitā. Tas ļauj izmantot fruktānus saturošos eksopolisaharīdu kompleksus sintezējošos celmus kombinācijā ar probiotiskajām kultūrām jauna tipa sinbiotisko produktu ražošanai, bez papildus prebiotisko piedevu pievienošanas.
7. Izolēts un identificēts tehnoloģiski perspektīvs homofermentatīvs laktozi asimilējošs un fruktānus saturošu eksopolisaharīdu kompleksu sintezējošs *Pediococcus pentosaceus* P 773 celms, kas spēj izmantot daudzveidīgus, tai skaitā tehnoloģiski

izmantojamus pārtikas substrātus, fermentācijas gaitā augšanas vidē izdalot prebiotiskos eksopolisaharīdus. Kombinācijās ar *Bifidobacterium* un/vai *L. acidophilus* probiotiskām kultūrām, celms ir piemērots jauna tipa sinbiotisko produktu veidošanai.

AIZSTĀVĒŠANAI IZVIRZĀMĀS TĒZES

1. Fruktānu piedevas pievienotas saraudzējamajam pārtikas pamatsubstrātam pirms tā fermentācijas veicina probiotisko mikroorganismu attīstību, tādējādi veidojot jaunu pieeju sinbiotisko produktu funkcionālas kvalitātes uzlabošanai.
2. Pirmo reizi *Pediococcus* ģintī identificēts homofermentatīvs laktozi asimilējošs un fruktānus saturošu eksopolisaharīdu kompleksu sintezējošs *P. pentosaceus* P 773 celms, kā arī seši tehnoloģiski perspektīvi fruktānus saturošos EPS kompleksus sintezējoši *Lactobacillus* celmi, kas piemēroti daudzveidīgu pārtikas substrātu fermentēšanai un fermentācijas gaitā *in situ* tos bagātina ar fruktāniem. Tas ļauj izmantot šādus celmus kombinācijās ar probiotiskajām vai/un tehnoloģiskajām kultūrām jauna tipa pre- un/vai sinbiotisko produktu veidošanai.
3. Inovatīvie fruktānu avoti – topinambūra koncentrāts, levāns un fruktānu sīrups veicina probiotisko mikroorganismu attīstību pārtikas substrātu fermentācijas gaitā ar komerciāli pieejamiem prebiotiskajiem fruktānu preparātiem samērojamā līmenī, to pārsniedzot atsevišķos gadījumos. Tie ir piemēroti sinbiotisko produktu veidošanai un to funkcionālas kvalitātes uzlabošanai.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Anal AK, Singh H (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Technol*, 18:240-251.
2. Barrangou R, Azcarate-Peril MA, Duong T, Connors SB, Kelly RM, Klaenhammer TR (2006) Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 3816–3821.
3. Bekers M, Grube M, Upite D, Kaminska E, Linde R, Scherbaka R, Danilevich A (2007) Carbohydrates in Jerusalem artichoke powder suspension. *Nutr Food Sci*, 37:42-49.
4. Bekers M, Laukevics J, Upite D, Kaminska E, Vigants A, Viesturs U (2002) Process for the production of fructane from sucrose. Pat. LV12850.
5. Bekers M, Marauska M, Laukevics J, Grube M, Karklina D, Viesturs U, Vigants A (1999) Polifunkcionālu pārtikas produktu ieguves paņēmiens no graudu izejvielām. Pat. LV12304.
6. Bekers M, Marauska M, Laukevics J, Grube M, Vigants A, Karklina D, Skudra L, Viesturs, U. (2001). Oats and fat-free milk based functional food product. *Food Biotechnol*. 15:1-12.
7. Bekers M, Svinka J, Raipulis J, Laivenieks M, Pankova L, Mezbarde I (1995) *Zymomonas mobilis celms - levāna producentis*. Pat. LV5709
8. Bekers M, Viesturs U, Danilevics A, Upite D, Kaminska E, Marauska M, Grube M, Linde R (2007) Method of production and use of fructans and fructose containing products from inulin containing raw materials. Pat.LV13539
9. Biedrzycka E, Bielecka M (2004) Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci Technol*, 15:170-175.
10. Bielicka M, Biedrzycka E, Majkowska A (2002) Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Res Int*, 35:125-131.
11. Caldwell SL, McMahon DJ, Oberg GJ, Broadbent IR (1996) Development and characterisation of lactose-positive *Pediococcus* species for milk fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 62:936-941
12. Casas JA, Dobrogosz WJ (2000) Validation of the Probiotic Concept: *Lactobacillus reuteri* Confers Broad-spectrum Protection against Disease in Humans and Animals. *Microbial Ecol Health Disease*, 12(4): 247-285

13. Cenci G, Rosi I, Trotta F, Caldini G (2002) Lactic acid bacteria isolated from dairy products inhibit genotoxic effects of 4-nitroquinoline-1-oxide in SOS-chromotest. *System Appl Microbiol*, 25:483-490.
14. Cerning J (1990) Extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 87: 113-130.
15. Chabot S (2001) Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. *Lait* 81: 683-697.
16. Charalampopoulos D, Pandiella SS, Webb C (2002b) Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *J Appl Microbiol*, 92:851-859.
17. Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella SS, Webb C (2002b) Application of cereals and cereal compounds in functional foods: a review. *J Appl Microbiol*, 93:505-511.
18. Charteris W P, Kelly P M, Morelly L, Collins K (1997) Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int J Food Microbiol*, 35:1-27.
19. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK (1998) Development and application of an *in vivo* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*, 84:759-768.
20. Cogan TM, Beresford TP, Steele J, Broadbent J, Shah NP, Ustunol Z (2007) Invited Review: Advances in Starter Cultures and Cultured Foods. *J Dairy Sci*, 90:4005-4021.
21. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*, 41:435-464.
22. Dal Bello F, Walter J, Hertel C, Hammes WP (2001) *In vitro* study of Prebiotic Properties of Levan-type Exopolysaccharides from Lactobacilli and Non-digestible Carbohydrates Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Syst Appl Microbiol*, 24:232-237.
23. De Man J C, Rogosa M, Sharpe M E (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol*, 23:130-135.
24. De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Lane C, Schrezenmeir J (2001) Probiotics – compensation for lactose insufficiency. *Am J Clin Nutr*, 73:421-429.
25. De Vuyst L (2000) Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures. *Food Technol Biotechnol*, 38:105-112.

26. De Vuyst L and Degeest B (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 23:153-177.
27. Degeest B, Van de Ven S, De Vuyst L (1999). Process characteristics of exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Macromolecular Symposia*, 140:34-52.
28. Dellaglio F, Arrizza FS, Leda A (1981) Classification of citrate-fermenting lactobacilli isolated from lamb stomach, sheep milk, and pecorino romano cheese. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig*, C2: 349-356.
29. Diplock AT (1999), Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *Br J Nutr*, 81: S1-S27.
30. Ebisu S, Kato K, Kotani S, Misaki A (1975) Structural differences in fructans elaborated by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. *J Biochem*, 1978:879-887.
31. Farnworth ER (2007) *Handbook of Fermented Functional Foods*. Taylor & Francis (eds). Woodhead Publishing Limited, Cambridge; pp. 1-162.
32. Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66:365-378.
33. Gallaher DD, Khil J (1999) The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. *J Nutrition*, 129: 1483-1487.
34. Gibson GB and Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125:1401-1412.
35. Gibson GR, Fuller R (2000) Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutrition*, 130:391-395.
36. Gomes AMP, Malcata FX (1999) *Bifidobacterium ssp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Technol*, 10:139-157.
37. Gomes AMP, Malcata FX, Klaver FAM (1998) Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* B0 and *Lactobacillus acidophilus* Ki by Milk Hydrolysates. *J Dairy Sci*. 81:2817-2825.
38. Grobben GJ, van Casteren WHM, Schols HA, Oosterveld A, Sala G, Smith MR, Sikkema J, de Bond JAM (1997) Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 48:516:521.

39. Gurr MI (1987) Nutritional aspects of fermented milk products. *FEMS Microbiology Reviews*, 87:337-342.
40. Haddadin MSY, Awaisheh SS, Robinson RK (2004) The Production of Yoghurt with Probiotic Bacteria Isolated from Infants in Jordan. *Pak J Nutr*, 3:290 -293.
41. Hastler CM. (1998) A new look at an ancient concept. *Chem Industry*, 2:84-89
42. Heller KJ (2001) Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am J Clin Nutr*, 73:374-379.
43. Hidalgo-Morales M, Robies-Olivera V, Garcia HS (2005) *Lactobacillus reuteri* β -galactosidase activity and low milk acidification ability. *Can J Microbiol*, 51:261-267.
44. Hoolihan L (2003) The market for functional dairy products: the case of the United States. In: Matilla-Sandholm T and Saarela M (eds). *Functional dairy products*. Woodhead Publishing Limited , Cambrige; pp.378-390.
45. Hosono A, Lee J, Ametani M, Natsume M, Hirayama T, Adachi T, Kaminogawa S (1997) Characterisation of water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M 101-4. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61:312-316.
46. Jaskari J, Kontula P, Siitonen A (1998) Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 49:175-181.
47. Kanasaki M, Breheny S, Hiller A J, Jago G R. (1975) A rapid method for the estimation of bacterial populations in milk. *Aust J Dairy Technol*, 30:142-144.
48. Kandler O, Stetter K, Kohl R (1980) *Lactobacillus reuteri* sp. nov. A new species of heterofermentative lactobacilli. *Zbl Bakt Hyg Abt Orig*, C1:264-269.
49. Kaplan H, Hutkins RW (2003) Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol*, 69:2217-2222.
50. Karovicova J, Kohaidova Z (2003) Lactic acid fermented vegetable juices. *Hort Sci*, 30:152-158.
51. Kaur N, Gupta AK (2002) Application of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci*, 27: 703-714.
52. Kneifel W, Rojal A, Kulbe KD (2000) *In vitro* growth behavior of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microb Ecol Health Dis*, 12:27-34.

53. Korakli M and Vogel RF (2006) Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glucansucrases and therapeutic potential of their synthesised glucans. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71:790:803.
54. Korakli M, Pavlovic M, Ganzle MG, Vogel RF(2003) Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *J Appl Microbiol Biotechnol*, 69:2073-2079.
55. Korakli M, Ganzle MG, Vogel RF (2002) Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolisaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Appl Microbiol*, 92:958-965.
56. Lee SY, Vedamuthu E R, Washam C J (1974) An agar medium for the differential enumeration of youghurt starter bacteria. *J Milk Food Technol*, 37:272.
57. Leroy F, De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol*, 15:67-78.
58. Llauberes RM, Richard B, Lonvaud A (1990) Structure of an extracellular beta-D-glucan from *Pediococcus sp.* a wine lactic bacteria. *Carbohydr Res*, 203:103-7.
59. Martensson O, Andersson C , Andersson K, Oste R, Holst O (2001) Formulation of an oat-based fermented product and its comparison with yoghurt. *J Sci Food Agric*, 81:1314-1321.
60. Martensson O, Biorklund M, Lambo, AM, Duenas-Chasco M, Irastoza A, Holst O, Norin E, Welling G, Oste R, Onning G (2005) Fermented, ropy, oat-based products reduce cholesterol level and stimulate the bifidobacteria flora in humans. *Nutr Res*, 25: 429-442.
61. Mattila-Sandholm T, Myllarinen P, Crittenden R, Mogensen G, Foden R, Saarela M (2001) Technological chalenges for future probiotic foods. *Int Dairy J*, 12:173-182.
62. McClearly B V, Murphy A, Mugford D C (1997) Determination of oligofructans and fructan polysaccharides in foodstuffs by an enzymatic/spectrophotometric method:collaborative study. *J AOAC International*, 83:356-364.
63. Meulen R V, Avonts L, De Vuyst L (2004) Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Appl Environ Microbiol*, 70:1923-1930.
64. Meulen R V, Makras L, Verbrugghe K, Adriany T, De Vuyst L (2006) In vitro kenetic analisis of oligofructose consumption by Bacteroides and Bifidobacterium spp. Indicates different degradation mechanisms. *Appl Environ Microbiol*, 72:1006-1012.

65. Miller G L (1959) Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31:426-428.
66. Morris D L (1948) Quantitative detection of carbohydrates with Deywood's anthrone reagent. *Sci*, 107:254-255.
67. Nakajima H, Suzuki Y, Kaizu H, Hirota T (1992) Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *J Food Sci*, 57:1327-1329.
68. Oda M, Hasegawa H, Komatsu S, Kambe M, Tsuchiya F (1983). Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus sp.*. *Agric Biol Chem*, 47: 1623-1625.
69. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82:279-289.
70. Perrin S, Fougnyes C, Grill JP, Jacobs H, Schneider F (2002) Fermentation of chicory fructo oligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerisation by three strains of bifidobacteria . *Can J Microbiol* 48:759-763.
71. Raipulis J, Toma MM, Semjonovs P (2005) The effect of probiotics on the genotoxicity of furasolidone. *Int J Food Microbiol*, 102:343-347.
72. Rasic JL, Kurmann JA (1983) *Bifidobacteria and their role*. Birkhauser, Basel.
73. Rastall R, Gibson G, Gill H, Guarner F, Klaenhammer T, Pot B, Reid G, Rowland I, Sanders ME. (2005) Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbial Ecology*, 52:45-152.
74. Rastall RA, Maitin V (2002) Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Cur Opin Biotechnol*, 13:490-496.
75. Robijn GW, Imberty A, van den Berg DJC, Ledebøer AM, Kamerling JP, Vliegenthart JFG, Perez S (1996) Predicting helical structures of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sake* 0-1. *Carbohydr Res*, 285:129-139.
76. Saxelin M, Korpela R, Mayra-Makinen A (2003) Introduction: classifying functional dairy products. In: Matilla-Sandholm T and Saarela M (eds). *Functional dairy products*. Woodhead Publishing Limited , Cambridge; pp.1-17.
77. Schrezenmeir J, de Vrese M (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr*, 73:361-364.
78. Semjonovs P, Zikmanis P (2007) Evaluation of novel lactose-positive and exopolysaccharide-producing strain of *Pediococcus pentosaceus* for fermented foods. *Eur Food Res Technol*, (online available, in press).

79. Shah NP (2000) Probiotic bacteria: Selective enumeration, and survival in dairy foods. *J Dairy Sci*, 83:1-14.
80. Sikkema J and Oba T (1998) Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria. *Snow Brand R&D Reports*, 107:1-31.
81. Simpson WJ, Taguchi H (1995) The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. In: Wood BJB and Holzapfel WH (eds). *The genera of Lactic acid Bacteria*. London, Chapman & Hall, pp. 125-172.
82. Speck ML, Dobrogosz WJ, Casas JA (1993) *Lactobacillus reuteri* in Food Supplementation. *Food Technol*, July: 91-94.
83. Talwalkar A, Kailasapathy K (2004). A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yougurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. *Compreh Rev Food Sci Food Safety*, 3:117-124.
84. Tamime AY, Robinson R K (1999) *Yoghurt Science and Technology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
85. Tiekink M, Kaditzky S, Valcheva R, Korakli M, Vogel RF, Ganzle MG (2005) Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *J App Microbiol*, 99:692-702.
86. Tiekink M, Korakli M, Ehrmann MA, Ganzle MG, Vogel RF (2003) *In situ* production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 69(2):945-952.
87. Van Geel-Schutten GH, Faber EJ, Smit E, Bonting K, Smith MR, Ten Brink B, Kamerling JP, Vliegthart JFG, Dijkhuizen L (1999) Biochemical and Structural Characterisation of the glucan and Fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and mutant strains. *Appl Environ Microbiol*, 65: 3008-3014.
88. Van Geel-Schutten GH, Flesch F, Brink TB, Smith MR, Dijkhuizen L (1998) Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50: 697-703.
89. Van Hijum SAFT, Szalowska E, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L (2004) Biochemical and molecular characterisation of levansucras from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol*, 150:621-630.
90. Vijn I, and Smeekens S (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol*, 120:351-360.

91. Voragen AGJ (1998) Technological aspects of functional food carbohydrates. In: *Functional food science in Europe*. European Commission, Quality of life and management of living resources, pp. 41-48.
92. Welman AD, Maddox IS (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol*, 21:269 – 343
93. Xanthopoulos V, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N (2000) Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiol*, 17:205-215.
94. Yamamoto Y, Nunome T, Yamauchi R, Kato K, Sone Y (1995) Structure of an exopolysaccharide of *Lactobacillus helveticus* TN-4, a spontaneous mutant strain of *Lactobacillus helveticus* TY1-2. *Carbohydr Res*, 275:319-332.
95. Zikmanis P, Kruce R, Auzina R (1997) An elevation of the molar growth of *Zymomonas mobilis* during aerobic exponential growth. *Arch Microbiol*, 167:167-171.
96. Zourari A, Accolas JP, Desmazeaud MJ (1992) Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait* 72:1-34.