

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

SINBIOTISKA PRODUKTA IEGŪŠANA, VEICOT NO  
PIENA PERMEĀTA IEGŪTA  
GALAKTOOLIGOSAHARĪDU (GOS) MAISĪJUMA  
SELEKTĪVU FERMENTĀCIJU AR PROBIOTISKIEM  
CELMIEM

Maģistra darbs

Autors: Sanija Ita Krēķe

Stud. apl. nr.: sk17127

Darba vadītājs: Dr.biol. Armands Vīgants

RĪGA 2022

## KOPSAVILKUMS

Piena permeāts un tajā esošā laktoze kā substrāts var tikt izmantots ogļhidrātu biokonversijas pētījumos, kā arī dažādu mikroorganismu kultivēšanā, lai veidotu produktus ar pievienoto vērtību.

Darba mērķis bija izvērtēt iespēju iegūt galaktooligosaharīdu (GOS) un pienskābo baktēriju saturošu sinbiotisku produktu, veicot selektīvu fermentāciju maisījumā, kas iegūts fermentatīvās GOS biosintēzes laikā no piena permeāta. Veicot fermentatīvu sintēzi ar  $\beta$ -galaktozidāzēm, tika iegūts un aprakstīts GOS saturošs maisījums, kurā vēlāk tika veikta selektīva fermentācija ar probiotiskajiem *Lactobacillus* spp. celmiem, izvērtējot šo celmu ogļhidrātu preferences un izdzīvotību.

Veicot fermentatīvu sintēzi no piena permeāta, tika konstatēts, ka ar *B. circulans*  $\beta$ -galaktozidāzi ir iespējams sasniegt augstāko GOS koncentrāciju, salīdzinot ar *A. oryzae* -galaktozidāzi, aizņemot vairāk kā pusi no kopējās ogļhidrātu koncentrācijas. Salīdzinot GOS maisījumus ar vai bez piedevām, tika novērots, ka GOS maisījums bez pievienotām piedevām ir piemērots substrāts probiotisko celmu kultivācijai. Kultivēšanas laikā *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* uzrādīja aktīvāku ogļhidrātu utilizāciju, savukārt ar *Lactobacillus acidophilus*-05 tika novērota augsta dzīvotspēja uzglabāšanas laikā. Salīdzinoši ar *Lactobacillus casei*-01 netika novērota aktīva ogļhidrātu utilizācija, kā arī fermentācijas un uzglabāšanas laikā šūnu dzīvotspēja bija zema.

Atslēgas vārdi: piena permeāts, galaktooligosaharīdu (GOS) biosintēze,  $\beta$ -galaktozidāzes, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*.

## SUMMARY

Sanija Ita Kreke (2022): Production of a synbiotic product by selective fermentation with probiotic strains using a mixture of galactooligosaccharides (GOS) obtained from milk permeate.

Milk permeate and its lactose can be used as a substrate in carbohydrate bioconversion studies as well as in the cultivation of various microorganisms to create value-added products.

The aim of the study was to evaluate the possibility of obtaining a synbiotic product containing galactooligosaccharide (GOS) and lactic acid bacteria by selective fermentation in a mixture obtained during enzymatic GOS biosynthesis from milk permeate. Enzymatic synthesis with  $\beta$ -galactosidases yielded and described a GOS-containing mixture that was subsequently selectively fermented with probiotic *Lactobacillus* spp. strains by assessing the carbohydrate preferences and viability of those strains.

In enzymatic synthesis from milk permeate, it was found that *B. circulans*  $\beta$ -galactosidase achieves the highest GOS concentration compared to *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase, occupying more than half of the total carbohydrate concentration. Comparing GOS mixtures with or without additives, it was observed that the GOS mixture without added additives is a suitable substrate for the cultivation of probiotic strains. During cultivation, *Lactobacillus rhamnosus* showed more active carbohydrate utilization, while *Lactobacillus acidophilus*-05 showed high viability during storage. With *Lactobacillus casei*-01 no active carbohydrate utilization was observed and cell viability was low during fermentation and storage.

Keywords: milk permeate, galactooligosaccharide (GOS) biosynthesis,  $\beta$ -galactosidases, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*.

## SATURS

IEVADS .....	5
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	7
1.1. Probiotikas .....	7
1.1.1. Probiotiku dzīvotspēja.....	8
1.2. <i>Lactobacillus</i> spp. ....	10
1.2.1. <i>Lactobacillus casei</i> .....	11
1.2.2. <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> .....	12
1.2.3. <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	12
1.3. Prebiotikas .....	13
1.4. Galaktooligosaharīdu raksturojums .....	15
1.4.1. Galaktooligosaharīdu biosintēze .....	15
1.4.2. Fermentācijas parametru ietekme uz galaktooligosaharīdu biosintēzes iznākumu.....	18
1.4.3. Galaktooligosaharīdu attīrīšana.....	19
1.5. Piena permeāts .....	19
1.5.1. Piena permeāta pielietojums biotehnoloģijā .....	21
1.6. Sinbiotikas .....	23
2. MATERIĀLI UN METODES .....	25
2.1. Pētījuma norises vieta un laiks .....	25
2.2. Materiāli.....	25
2.2.1. Reāģenti, materiāli un iekārtas.....	25
2.2.2. Mikrobioloģiskās barotnes.....	26
2.2.3. Izmantotās datorprogrammas.....	27
2.3. Metodes.....	27
2.3.1. Sējmateriāla sagatavošana un optiskā blīvuma noteikšana.....	27
2.3.2. GOS fermentatīva biosintēze ar $\beta$ -galaktozidāzēm.....	28
2.3.3. Probiotisko celmu kultivēšana GOS maisījumā.....	29
2.3.4. Dzīvo šūnu skaita noteikšana.....	29
2.3.5. Ogļhidrātu kvantitatīvā noteikšana .....	30
3. REZULTĀTI.....	31
3.1. GOS maisījumu sastāvs pēc $\beta$ -galaktozidāžu reakcijām .....	31
3.2. Probiotisko baktēriju kultivācija GOS maisījumā ar dažādām piedevām .....	33
3.3. <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> un <i>L. acidophilus</i> izdzīvotība un ogļhidrātu sastāva izmaiņas kultivēšanas un uzglabāšanas laikā.....	38
4. DISKUSIJA.....	44
4.1. GOS maisījuma iegūšana ar divām dažādām $\beta$ -galaktozidāzēm.....	44
4.2. Piedevu ietekme uz GOS maisījuma fermentāciju .....	45
4.3. Izdzīvotības un uzglabāšanas testi .....	47
SECINĀJUMI .....	49
PATEICĪBAS .....	50
LITERATŪRAS SARAKSTS .....	51

## IEVADS

Piena permeāts ir piena industrijas blakusprodukts, kuru iegūst ultrafiltrācijas laikā, ražojot piena proteīna koncentrātus un izolātus, un pieprasījumam pēc šādiem produktiem ir tendence pieaugt, jo gadu gaitā patērētāju interese par savu veselības stāvokli ir palielinājusies. Ultrafiltrācijas rezultātā piena permeātā ir atstāta laktoze, kuras koncentrācija ir aptuveni 80% no sausnes masas. Augstās laktozes koncentrācijas dēļ piena permeātam ir augsts ķīmiskā (COD) un bioloģiskā (BOD) skābekļa patēriņš, tādējādi bez atbilstošas apstrādes nav iespējams to noglabāt kā atkritumus. Lai mazinātu slogu uz piena permeāta attīršanas tehniskajiem procesiem, kā arī ņemot vērā, ka tas ir plaši pieejams un lēts substrāts, piena permeātā esošo laktozi var izmantot mikroorganismu fermentācijai un fermentatīvām biokonversijām. Tā kā piena permeāts ir piena industrijas blakusprodukts, tā biotehnoloģiskā izmantošana nekonkurētu ar pārtikas ražošanu.

Galaktooligosaharīdi (GOS) savukārt ir prebiotiski savienojumi, kurus iegūst no laktozes, fermentatīvi trāngalaktozilējot ar  $\beta$ -galaktozidāzēm. GOS produkcija ir viens no šādiem piena permeāta laktozes pielietojumiem. GOS savienojumi spēj neskarti iziet cauri kungā-zarnu traktam līdz resnajai zarnai, kur tos sāk metabolizēt labvēlīgā zarnu mikrobiota, tāpēc GOS tiek uzskatīti par prebiotikām, dodot labumu zarnu mikrobiotas populācijām un tādējādi cilvēka organismam. Respektīvi, GOS esamība pārtikas produktā uzlabo tā funkcionālās īpašības, taču GOS biosintēzes rezultātā iegūtais produkts satur ne tikai GOS, bet arī tādus nevēlamos blakusproduktus kā glikozi, galaktozi un atlikušo laktozi. Selektīva fermentācija ar pienskābām baktērijām varētu būt viens no risinājumiem GOS attīršanai.

*Lactobacillus* spp. jau izsenis ir plaši izmantotas probiotikas piena industrijā, jo tās spēj uzlabot produkta uzturvērtību, reoloģiskās īpašības un garšu, kā arī ir pierādīta pienskābo baktēriju terapeitiskā ietekme uz cilvēka organismu, kur ietilpst imūnās sistēmas darbības uzlabošana, laktozes nepanesības simptomu mazināšana, patogēnu attīstības un izplatīšanās ierobežošana u.c. pozitīvas norises. Papildus tam *Lactobacillus* spp. ir iekļauti GRAS (*Generally Recognized as Safe*) un QPS (*Qualified Presumption of Safety*) sarakstos, kas dod atļauju tās plaši un droši izmantot jaunu produktu ražošanā un fermentācijā. Viena no pienskābo baktēriju galvenajām lomām piena produktu ražošanā ir laktozes utilizācija, tādējādi tās var tikt izmantotas fermentācijas procesos, lai samazinātu laktozes koncentrāciju un tādā veidā attīrot GOS maisījumu, kuru tālāk var izmantot sinbiotisku produktu ražošanā.

**Darba mērķis** ir veikt pētījumus, lai izvērtētu iespēju iegūt GOS (kā prebiotikas) un pienskābes baktēriju (kā probiotikas) saturošu sinbiotisku produktu, veicot selektīvo fermentāciju ogļhidrātu maisījumā, kas iegūts fermentatīvās GOS biosintēzes laikā no piena permeāta.

**Darba uzdevumi:**

1. Galaktooligosaharīdu fermentatīvas sintēzes veikšana ar  $\beta$ -galaktozidāzēm un iegūto ogļhidrātu maisījuma raksturojums.
2. Izvērtēt, kurš no probiotiskajiem *Lactobacillus* spp. celmiem ir piemērotākais laktozes un glikozes utilizēšanai, un tādējādi palielinātu galaktooligosaharīdu īpatsvaru produktā.
3. Izvērtēt trīs dažādu *Lactobacillus* spp. celmu augšanu un izdzīvotību iegūtajā GOS saturošā produktā.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Probiotikas

Vārds “probiotikas” ir radies no grieķu-latīņu izcelsmes vārdu “*pro*” savienojumā ar grieķu izcelsmes vārdu “*βίος*”, kas tiešā tulkojumā nozīmē “uz dzīvi”. Vēsturiski probiotiku izmantošana ir tikpat sena cik apjaustā cilvēku eksistence, jo tiek pieņemts, ka cilvēki aptuveni pirms 10 000 gadiem sāka pievērsties lauksaimniecībai, nomainot paradumu *medīt* uz *audzēt* un *novākt*, tādējādi pievēršot lielāku uzmanību dzīvnieku pieradināšanai un piena ieguvei, ko arī pierāda atklātie zīmējumi uz alu sienām, kuros ir attēlota piena slaukšana. Iegūtais piens ir ticis raudzēts no dzīvnieku kuņģa vai ādas veidotās pudelēs līdz iegūts jogurts (Fuller 1992; Gasbarrini *et al.* 2016). Analizējot vēsturiskos novērojumus, pētnieki ir secinājuši, ka pirms fermentācijas metodēm pārtikas dehidratācija ir bijis vienīgais veids, kā tā laika cilvēki ilgstoši uzglabājuši ēdienu (Gogineni *et al.* 2013).

Termins “probiotikas” ir piedzīvojis vairākas definīcijas izmaiņas pēdējo ~70 gadu laikā. Pirmais zinātniskais darbs, kurā ir ticis pieminēts un definēts vārds “probiotikas”, ir publicēts 1953. gadā, kurā vācu zinātnieks Verners Kollaths (*Werner Kollath*) aprakstīja probiotikas kā aktīvas vielas, kuras ir svarīgas veselīgai dzīves attīstībai. Pēc tam dažādi zinātnieki izvirzīja vēl vairākus šīs definīcijas uzlabojumus līdz 1989. gadā pētnieks Rojs Fullers (*Roy Fuller*) nāca klajā ar daudz precīzāku skaidrojumu, kurš tiek lietots līdz pat mūsdienām. Viņš minēja, ka probiotikas ir dzīvus organismus saturoša ēdiena piedeva, kura spēj labvēlīgi ietekmēt saimniekorganismu, uzlabojot tā zarnu trakta mikrobioma līdzsvaru (Gogineni *et al.* 2013; Gasbarrini *et al.* 2016). Vienīgā piezīme bija no FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization*) 2002. gadā, kura savā definīcijā pieminēja, ka svarīgi ir atcerēties, lai probiotikas tiktu uzņemtas adekvātā daudzumā, tikai tad tiks novērotas probiotiku pozitīvās īpašības, kuras uzlabo saimniekorganisma vispārējo veselību (Gogineni *et al.* 2013).

Pēdējās desmitgadēs arvien biežāk tiek pievērstā uzmanība probiotiku pozitīvajām un veselību uzlabojošajām īpašībām, respektīvi, interese par probiotikām pieaug tāpat kā pieaug cilvēku interese par savu veselību un tās uzlabošanas iespējām. Ir veikti dažādi klīniskie pētījumi, kuros ir studēta probiotiku ietekme uz dažādām slimībām, kā, piemēram, kolīta, diabēta, hipertensijas u.c. slimību pētījumi, kuri veikti gan ar zīdaiņiem, gan jau ar pieaugušiem cilvēkiem. Apkopojot šos klīniskos pētījumus, nav novērots risks, kas būtu saistīts ar probiotiku lietošanu, tāpēc probiotikas ir ierakstītas QPS (*Qualified Presumption of Safety*)

sarakstā, kas ļauj tās droši izmantot, un konkrētiem probiotiskiem celmiem nav nepieciešams pilns drošības novērtējums, kā arī GRAS (*Generally Recognized as Safe*) sarakstā, kas ļauj tās izmantot pārtikas fermentācijā (Doron, Snyderman 2015; Hill *et al.* 2018). Pieaugot šai globālajai interesei par veselību, pārtikas un farmācijas industrijas intensīvi meklē un atklāj jaunus veidus, kā pievienot probiotikas pārtikas produktiem vai uztura bagātinātājiem, tādējādi veidojot mūsdienīgu funkcionālo produktu, kurš ir viegli pieejams un ekonomisks. No piena produktiem visbiežāk sastopams ir jogurts, kuram ir pievienotas probiotikas, tam seko kefīrs, tūrkultūra, siers u.c. piena produkti, un, pēc 2017. gada datiem, aptuveni 70% no globālās populācijas ir laktozes nepanesība, tāpēc aktuāli ir ne tikai funkcionālie piena produkti, bet arī produkti, kuri nesatur piena laktozi (Granato *et al.* 2010; Storhaug *et al.* 2017). Jāpiemin, ka arī medicīnas personāls arvien biežāk iesaka probiotiku lietošanu, lai uzlabotu gremošanas un imūnās sistēmas darbību, jo mūsdienās cilvēka ēšanas paradumi un dzīvesveids mainās, un tādējādi tiek veicināts zarnu mikrobioma disbalanss, kas noved pie dažādām veselības problēmām (Anuradha *et al.* 2005; Sanders *et al.* 2018). Uzņemot mikroorganismus papildus ir novērotas tādas terapeitiskās īpašības kā patogēnu attīstības un izplatīšanās ierobežošana, laktozes nepanesības simptomu mazināšana, iesaistīšanās hormonālajos un gremošanas procesos, tādos kā reabsorbcija, gremošana, peristaltika, dažādu vitamīnu producēšana u.c. īpašības (O'Connor *et al.* 2005; Biradar *et al.* 2004).

Ir aprēķināts, ka probiotiku tirdzniecība pārsniedz jau 38 miljardus eiro un 2023. gadā tā varētu sasniegt pat 60 miljardus eiro (Global Market Insights 2016). Probiotikās ietilpst tādas mikroorganismu ģintis kā *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* un *Saccharomyces*, kuras ir visbiežāk izmantotās, savukārt, retāk izmantotas ir *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* un *Escherichia* ģintis (Sanders *et al.* 2018). *Lactobacillus* un *Bifidobacteria* arī ir visbiežāk sastopamās ģintis cilvēka zarnu traktā, kur tās atrodas attiecīgi tievajā zarnā (*Lactobacillus* ģints sugas) un resnajā zarnā (*Bifidobacteria* ģints sugas), kas dod pamatotu iemeslu izmantot tās arī kā probiotikas (Calinoiu *et al.* 2016).

### 1.1.1. Probiotiku dzīvotspēja

Lai pārtikas produktu varētu definēt kā probiotisku, probiotiskiem mikroorganismiem ir jābūt dzīvotspējīgiem un jāsasniedz konkrēts skaits produktā. Pētījumos tiek minētas, ka probiotiku biomasas koncentrācijai 100g vai 100ml produktā vajadzētu būt no  $10^6$  līdz  $10^9$  KVV/g vai KVV/ml tajā brīdī, kad šis produkts tiek patērēts. Probiotiku daudzums nedrīkst nokrist zem šīm vērtībām līdz pat produkta derīguma termiņa beigām (Terpou *et al.* 2019;

AdebayoTayo, Akpeji 2016). Tiek rekomendēts probiotikas lietot regulāri 100g dienā vai 300g līdz 400g nedēļā, lai tiktu novērotas veselību uzlabojošas īpašības (Sarkar 2013). Tas ir saistīts ar to, lai orāli uzņemtais probiotiku daudzums būtu pietiekami augsts, un tās spētu iziet cauri kuņģa-zarnu traktam, kurā tās tiek pakļautas kuņģa skābei, žults sāļiem, pH izmaiņām ceļā līdz resnajai zarnai, kā arī, kad tās ir nonākušas galā, tām ir jāspēj konkurēt ar jau vietējiem mikroorganismiem un jāizdzīvo dažādās metabolītu koncentrācijās, kuras rodas fermentācijas rezultātā (Han *et al.* 2021).

Visbiežāk pārtikas ražotāji, iekļaujot probiotikas savos produktos, saskaras ar probiotiku nestabilitāti un zemu dzīvotspēju, un bieži vien norādītais probiotiku daudzums produkta derīguma termiņa beigās ir zem  $10^6$  KVV/g un nesakrīt ar to, kas ir norādīts uz etiķetes, kas ierobežo iespējas to definēt kā probiotisku funkcionālu produktu (Abadía-García *et al.* 2013). Produkta ražošanas un uzglabāšanas laikā ir vairāki faktori, kas ietekmē probiotiku dzīvotspēju. Probiotiku dzīvotspējas ietekmējošie faktori pārtikas produktos ir norādīti 1. tabulā.

1. tabula.

Probiotiku dzīvotspējas ietekmējošie faktori (Literatūras avoti: Sarkar 2013; Calinoiu *et al.* 2016).

Table 1

Factors influencing the viability of probiotics (Sources: Sarkar 2013; Calinoiu *et al.* 2016).

<b>Ēdiena parametri Food parameters</b>	<b>Apstrādes parametri Processing parameters</b>	<b>Mikrobioloģiskie parametri Microbiological parameters</b>
pH	Termiskā apstrāde	Celma veids, tā fizioloģiskās īpašības un mijiedarbība ar produktu
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> saturs	Produkta dzesēšanas ātrums	Inokulāta daudzums
Sāls, cukura saturs	Inkubācijas temperatūra	
Tauku saturs	Produkta uzglabāšanas veids	
Izšķīdušā skābekļa daudzums	Iepakojuma veids	
Ūdens aktivitāte		
Mākslīgās krāsvielas un saldinātāji		
Organisko skābju koncentrācija		

Tiek uzskatīts, ka dzīvotspējīgākās probiotikas ir tās, kuras ir vislabāk adaptējušās konkrētam produkta veidam. Respektīvi, izvēloties probiotiku, ko pievienot produktam, jāņem vērā tās izcelsme un sastopamība - ja konkrētā probiotika ir atrodama piena produktos, kā arī ir dabiska cilvēka zarnu trakta iemītniece, tad visticamāk tā arī būs atbilstoša vēlamā produkta izveidei, un būs novērojama augsta dzīvotspēja produkta uzglabāšanas un patērēšanas laikā (Monteagudo-Mera *et al.* 2011).

## 1.2. *Lactobacillus* spp.

Liela daļa no probiotikām ir pienskābās baktērijas, no kurām tieši *Lactobacillus* ģints pārstāvji sastāda lielāko daļu – kopā aptuveni 50 sugas (Bintsis 2018). Ģints pirmo reizi tika definēta kā *Lactobacillus* 1901. gadā pēc pētnieka Martina Villema Beijernika (*Martinus Willem Beijernick*) ierosinājuma. Vairāk kā simts gadu laikā ir novērojams straujš sugu un pasugu skaita pieaugums. Pēc 2020. gada datiem, šobrīd *Lactobacillus* ģintī ir definēta 261 suga un pasuga. *Lactobacillus* ģints sugas savā starpā ir morfoloģiski, fizioloģiski un ģenētiski daudzveidīgas. Tās ir Gram-pozitīvas, fakultatīvi anaerobas, nesporulējošas baktērijas. Pārsvārā tās ir nūjiņas, bet mēdz būt arī koki, šūnas var būt pa vienai, bet visbiežāk tās ir sakārtotas ķēdē. Arī temperatūras preferences tām ir atšķirīgas, taču kontrolētos augšanas apstākļos optimālākā temperatūra variē no +25°C līdz +40°C (Zheng *et al.* 2020; Ray 2004). *Lactobacillus* spp. enerģijas ražošanai izmanto ogļhidrātus, lai veicinātu biomasas augšanu. Kā primāro oglekļa avotu *Lactobacillus* spp. izmanto glikozi, kur ar glikolīzes procesu tā tiek fermentēta līdz piruvātam, kurš vēlāk tiek reducēts līdz pienskābei. Ja galvenais galaprodukts glikozes fermentācijā ir pienskābe, tad *Lactobacillus* spp. tiek raksturotas kā obligāti homofermentatīvas sugas un fermentāciju sauc par homolaktisku. Taču ir definētas arī obligāti heterofermentatīvas sugas (heterolaktiska fermentācija), kad papildus pienskābei tiek producēti tādi blakusprodukti kā CO<sub>2</sub>, etanols un acetāts jeb etiķskābe. Šādā fermentācijā pirmais metabolisma solis nav glikolīzes ceļš, bet gan fosfoketolāzes ceļš, kurš pēc tam pārslēdzas uz glikolīzes ceļu. Mannoze, fruktoze un galaktoze papildus glikozei arī ir heksozes, kuras var tikt fermentētas ar *Lactobacillus* spp., taču tās sugas, kuras fermentē heksozes nespēj fermentēt pentozes, piemēram, ksilozi vai arabinozi. Taču ir definētas sugas, kuras spēj izmantot abas fermentācijas – gan homolaktisku fermentāciju heksozēm, gan heterolaktisku fermentāciju pentozēm. Pentozu fermentācijas gadījumā ir novērojami papildus soļi ogļhidrātu konversijai. Šādas sugas sauc par fakultatīvi heterofermentatīvām sugām. Savukārt, ja substrātā ir atrodami disaharāīdi, piemēram, laktoze, saharoze vai maltoze, *Lactobacillus* spp. vispirms ir

nepieciešams producēt iekššūnu hidrolāzes, laktozes gadījumā  $\beta$ -galaktozidāzes, ar kuru palīdzību šie ogļhidrāti var tik šķelti (Madigan *et al.* 2006; Bintsis 2018).

Pateicoties šai *Lactobacillus* spp. spējai efektīvi fermentēt dažāda veida substrātus un tajā esošos ogļhidrātus, kā arī producēt plaša mēroga metabolisma galaproduktus, šīs baktērijas tiek plaši izmantotas piena produktu ražošanā, piemēram jogurta un siera produkcijā, un no nepiena produktiem – skābētu gurķu, skābmaizes u.c. produktu fermentācijā. Papildus tam, atkarībā no producētā metabolīta, tām ir definētas dažādas terapeitiskas īpašības. Pienskābes producēšana rezultējas pazeminātā pH, kas palīdz pret pūšanas procesiem un patogēnu organismu augšanu (Plaza-Diaz *et al.* 2017; Slover, Danziger 2008).

### 1.2.1. *Lactobacillus casei*

*Lactobacillus casei* ir dabiski atrodama suga cilvēku zarnu traktā, taču to ir iespējams izolēt arī no svaiga vai fermentēta piena, gaļas vai augu produktiem (Hosseini Nezhad *et al.* 2014). *Lactobacillus casei* grupā ir definētas divas pasugas – *L. casei*, *L. paracasei* (Hill *et al.* 2018). Optimālākā pH vērtība augšanai ir 5,5 un temperatūra +37°C (Erlina *et al.* 2020). Tā pieder pie fakultatīvi heterofermentatīvajām baktērijām. No heksozēm tās producē pienskābi caur EMP (*Embden-Meyerhof-Parnas Pathway*), taču pentozu šķelšanā izmanto fosfoketolāzes ceļu (Hill *et al.* 2018) Lielākā daļa (vairāk kā 90%) no producētās pienskābes ir L(+)-pienskābe (Jay *et al.* 2005). Ir izpētīts, ka iegūtā *L. casei* biomasas koncentrācija ir augsta substrātos ar pievienotu glikozi, laktozi, laktulozi un galaktooligosaharīdiem (GOS), savukārt substrātos ar pievienotu maltodekstrīnu, polidekstrozi un fruktooligosaharīdiem (FOS) ir novērojams zemāks biomasas pieaugums (Watson *et al.* 2013).

Pārtikas rūpniecībā *L. casei* pārsvarā izmanto piena produktu ražošanā un pārstrādē. Puscietā siera nogatavināšanas procesa beigās *L. casei* ir dominantā suga, aptverot aptuveni 96% no klātesošo mikroorganismu kopas. Kā arī *L. casei* kombinācijā ar *L. acidophilus* ir visbiežāk izmantotās sugas probiotisko preparātu un produktu izstrādē. *L. casei* sugai ir dokumentētas tādas terapeitiskās īpašības kā patogēnu organismu inhibēšana, zarnu imūnās sistēmas stiprināšana un diarejas simptomu mazināšana (Hosseini Nezhad *et al.* 2014). Pētījumā, kurā peles patērēja ar *L. casei* CRL 431 fermentētu pienu, tika novērotas pozitīvas izmaiņas mikrobiotas kompozīcijā, kā arī aptaukošanās biomarķieros, kas liecina, ka *L. casei* spēj iesaistīties un mazināt aptaukošanās simptomus (Nunez *et al.* 2014).

### 1.2.2. *Lacticaseibacillus rhamnosus*

*Lacticaseibacillus rhamnosus* (arī *L. rhamnosus* vai *Lcb. rhamnosus*) iepriekš sauktas par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, jo tika uzskatīts, ka *L. rhamnosus* ir *L. casei* grupas pasuga, taču ģenētiskos pētījumos tika noskaidrots, ka *L. rhamnosus* tomēr ir kā atsevišķa suga. Tomēr šīs izmaiņas ir nesenā un vēl jāpētī, ir novērojams, ka zinātniskajos pētījumos un komerciālo produktu ražošanā tiek pielietots *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* nosaukums (Oberger *et al.* 2022). *L. rhamnosus* īpašības ir līdzīgas kā *L. casei* - tā arī ir dabīga cilvēka zarnu trakta iemītniece un pieder pie fakultatīvi heterofermentatīvajām baktērijām. Ir novērots, ka tām ir salīdzinoši augsta pienskābes produkcija (gan L(+)-pienskābe, gan D(-)-pienskābe) (Ray 2004). Optimālā pH vērtība augšanai ir no 5,5 līdz 6,5 un temperatūra +37°C (Erlina *et al.* 2020). Publikācijā, kurā ir veikts apkopojums par *Lactobacillus* spp. un *Bifidobacteria* spp. sugu un celmu ogļhidrātu preferencēm, ir minēts, ka *L. rhamnosus* GG celms uzrāda visaugstāko biomasas koncentrāciju substrātā ar pievienotu glikozi un galaktooligosaharīdiem (GOS). Savukārt, zemāka koncentrācija novērota substrātā ar fruktooligosaharīdiem (FOS), laktulozi, polidekstrozi un laktozi, taču neaktīvākā augšana novērota substrātos ar maltodekstrīnu un inulīnu (Watson *et al.* 2013).

*Lacticaseibacillus rhamnosus* spēj regulēt zarnu mikrobiotas homeostāzi un pieķerties pie zarnu epitēlija gļotādas, tādā veidā uzlabojot adaptīvo imunitāti un veicinot imūnreakciju pret dažādiem patogēniem. Kā arī ir novērots, ka tās ražo bioloģiski aktīvus savienojumus, piemēram, antibakteriālus savienojumus, kuriem ir konstatētas veselību veicinošas īpašības vai arī dažādas taukskābes, ar kuru palīdzību tiek uzlabota zarnu sienas aizsargfunkcija (Minj *et al.* 2020).

### 1.2.3. *Lactobacillus acidophilus*

*Lactobacillus acidophilus* ir dabiski atrodama cilvēku zarnu traktā, mutē un sieviešu dzimumorgānos. Tā pieder pie obligāti homofermentatīvās pienskābo baktēriju grupas, kurā ietilpst 15 sugas. Tās nespēj fermentēt pentozes. Šo grupu arī klasificē kā *Thermobacterium*. Tā izmanto EMP (*Embden-Meyerhof-Parnas Pathway*) vai glikolīzes ceļu, lai fermentētu heksozes, producējot gan D(-)-pienskābi, gan L(-)-pienskābi. Pienskābes producēšanai *L. acidophilus* spēj fermentēt dažādus substrātus, kā, piemēram, galaktozi, fruktozi, laktozi, amigdālīnu, maltozi, stahiozi. *L. acidophilus* nespēj producēt pienskābi no arabinozes, mannitola, melibiozes, rafinozes un melelitozes (Minj *et al.* 2020). Kā arī *L. acidophilus* ir termofilas baktērijas, to optimālākā augšanas temperatūra variē no +30°C līdz +45°C, un

visaugstākais biomasas pieaugums konstatēts, kad augšanas vide ir skāba (pH no 4 līdz 6) (Anjum *et al.* 2014). Pienskābās baktērijas ir zināmas ar to spēju konkurēt ar citiem mikroorganismiem, tās producē lielāko daļu no bakteriocīdiem, kuri ir siltuma izturīgi, ne-lantibiotiski peptīdi ar zemu molekulāro masu, konkrēti *L. acidophilus* producē acidocīnu, acidofilīnu, acidofilicīnu, acidofilucīnu un laktacīnus B un F. Pētot *L. acidophilus* terapeitiskās īpašības, pētnieki galvenokārt koncentrējās uz pretmikrobu, pretvīrusu īpašībām, kā arī izmanto to kā līdzekli diarejas simptomu mazināšanai. Ir pierādīta augsta efektivitāte pret rotavīrusu, enterobaktēriju un kandidozes saslimšanām (Minj *et al.* 2020).

Pētījumā, kurā *L. acidophilus* auga laktozes saturošā substrātā, tika pierādīta inhibitorā aktivitāte pret dažādām patogēnu populācijām, respektīvi pēc 8 inkubācijas stundām, patogēnu populācijas bija strauji samazinājušās producēto organisko skābju un bakteriocīnu dēļ. Šobrīd ir ļoti daudz komerciāli produkti, kuri satur *L. acidophilus*, kā, piemēram, dažādi fermentēti pieni, jogurti, krēmi, miso pastas, tempe u.c. produkti (Anjum *et al.* 2014). Kā arī pētījumā, kuru veica orāli vai vagināli ievadot *L. acidophilus* NCFM celmu ķermeņi, tika novērsta uroģenitālā infekcija ar iedarbību uz trim patogēniem - *E. coli*, *K. pneumoniae* un *P. aeruginosa* (Marteau *et al.* 2001).

### 1.3. Prebiotikas

Vēl viens veids kā ar uztura palīdzību veikt izmaiņas zarnu mikrobiotā, tādējādi gūstot labumu organismam kopumā, ir ar prebiotiku palīdzību, kuras var veikt ģints līmeņa izmaiņas kuņģa-zarnu trakta mikrobiotas kompozīcijā (Gibson *et al.* 2010).

Pētnieki Leo F. Rettgers (*Leo F. Rettger*) un Harijs A. Čeplins (*Harry A. Cheplin*) 1921. gadā atklāja mijiedarbību starp ogļhidrātiem un mikrobiotu. Viņi eksperimentos ar cilvēkiem novēroja, ka *Lactobacillus* spp. (konkrēti – *L. acidophilus*) daudzums pēc konkrēta ogļhidrātu patēriņa, bija palielinājies, nonākot pie secinājuma, ka resnajā zarnā dominē anaerobi, kuri lielākoties gūst enerģiju no ogļhidrātiem (Gibson *et al.* 2017 cit. pēc Rettger, Cheplin 1921). Šis atklājums veicināja aktīvu zinātnisko projektu norisi turpmākajos gados. Jēdziens “prebiotikas” pirmo reizi tika skaidrots 1995. gadā, kad pētnieki Glens R. Gibsons (*Glenn. R. Gibson*) un Marsels B. Roberfroids (*Marsell B. Roberfroid*) tās raksturoja kā nesagremojamas pārtikas komponentes, kuras, selektīvi stimulējot augšanu un/vai aktivitāti vienai vai vairākām baktēriju grupām resnajā zarnā, spēj uzlabot saimniekorganisma veselību (Gibson *et al.* 1995; Lauzon *et al.* 2014). Gandrīz 10 gadus vēlāk Glens R. Gibsons atjaunoja iepriekšējo definīciju, uzsverot, ka mikrobiotas izmaiņas tiks novērotas ne tikai resnajā zarnā, bet visā

kuņģa-zarnu traktā (Gibson *et al.* 2004). Tad kādu laiku šis jēdziens netika vairs mainīts līdz 2008. gadā Starptautiskās probiotiku un prebiotiku zinātniskās asociācijas konferencē (ISAPP, *International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics*), pamatojoties uz to, ka iepriekšējā definīcija bija atbilstoša tikai daļai no ogļhidrātu grupas savienojumiem, prebiotikas tika skaidrotas kā selektīvi fermentētas komponentes, kuras izraisa specifiskas izmaiņas kuņģa-zarnu trakta mikrobiotas sastāvā un/vai aktivitātē, tādējādi uzlabojot saimniekorganisma veselību (Gibson *et al.* 2010). Šie jēdzieni galvenokārt attiecas uz *Lactobacillus* spp. un *Bifidobacteria* spp. bagātināšanu kuņģa-zarnu traktā, jo dominējošās prebiotikas iedarbojas tieši uz šīm ģintīm. Gadu gaitā, tehnoloģijai attīstoties, informācijas apjoms par mikrobiotu ir pieaudzis, tādējādi pieaugot arī zināšanām par prebiotikām, no kurām izriet, ka prebiotiku ietekme nenorobežojas tikai ar *Lactobacillus* spp. un/vai *Bifidobacteria* spp., bet arī *Enterobacter* spp., *Bacteroidetes* spp., *Faecalibacterium* spp. u.c. ģintis ir uzrādījušas pozitīvus rezultātus dažādos pētījumos, taču prebiotiku ietekme uz šīm ģintīm ir salīdzinoši mazāka. Vēl viens svarīgs faktors, kas novērots pēdējo gadu laikā - prebiotikas var būt efektīvas arī ārpus zarnu trakta, respektīvi ir konstatēta to ietekme uz ādas un vaginālo mikrobiotu (Davani-Davari *et al.* 2019; Gibson *et al.* 2017). Ņemot vērā šos novērojumus, 2017. gadā prebiotiku definīcija tika atjaunota, vēršot uzmanību uz to, ka prebiotikas ir substrāts, kuru saimniekorganisms var izmantot selektīvi, tādā veidā radot labumu savai veselībai. (Gibson *et al.* 2017).

Lai savienojumu klasificētu kā prebiotisku, tam ir jāatbilst 3 kritērijiem:

1. Nesagremojamība vai daļēja sagremojamība: izturība pret kuņģa pH, nav iespējama hidrolīze ar zīdītāju fermentiem, nenotiek uzsūkšanās kuņģa-zarnu traktā.
2. Zarnu mikrobiota spēj fermentēt šos savienojumus.
3. Zarnu baktēriju augšana un/vai aktivitāte tiek selektīvi stimulēta, kā rezultātā saimniekorganisma veselība tiek uzlabota (Gibson *et al.* 2010).

Ir vairāku veidu prebiotikas. Pārsvārā tās pieder pie dažādām ogļhidrātu grupām, un pārsvārā ogļhidrāti, kas definēti kā prebiotikas, ir tieši oligosaharīdi – galaktooligosaharīdi (GOS), fruktooligosaharīdi (FOS), inulīns, laktuloze (parasti izmanto kā laksatīvu līdzekli), glukooligosaharīdi (GIOS), sojas pupiņu oligosaharīdi (rafinoze, stahioze), ksilooligosaharīdi (XOS), izomaltooligosaharīdi (IMOs) un laktosaharoze. No minētajiem vispopulārākie pētījumos ir tieši GOS un FOS (Gibson *et al.* 2010). Taču ir pētījumi, kuros prebiotiskas

īpašības novērotas no kakao iegūtiem flavanoliem, kuru pielietošanas mēģinājumos tika novērota pienskābo baktēriju augšana, liekot secināt, ka ne tikai ogļhidrāti var būt prebiotikas (Tzounis *et al.* 2010).

#### 1.4. Galaktooligosaharīdu raksturojums

Dabiski galaktooligosaharīdi (GOS) ir atrodami dažādos pākšaugos – lēcās, turku zirņos, lupīnās, sojas pupiņās u.c. augos, kā arī GOS funkcionālās un strukturālās īpašības ir ļoti līdzīgas mātes pienā esošajiem cilvēka piena oligosaharīdiem (HMO), un tā iemesla dēļ komerciāli iegūts GOS tiek plaši izmantots zīdaiņiem paredzētā mākslīgā piena maisījumu ražošanā, lai tiktu nostiprināta veselīga mikrobiota un imūnā sistēma līdzīgi kā zīdaiņiem, kuri tiek baroti ar krūti. Šobrīd, lai sintētiski iegūtu GOS, pārsvarā tiek izmantots laktozes sīrups, kuru apstrādā ar  $\beta$ -galaktozidāzēm (Fischer, Kleinschmidt 2018; Yang *et al.* 2010). Ņemot vērā, ka GOS, atšķirībā no FOS un inulīna, ir izturīgs pret temperatūras un pH izmaiņām, to plaši pievieno dažādiem pārtikas izstrādājumiem, kā, piemēram, saldumiem, maizei, sulām, mērcēm, brokastu pārslām un pienam, kā arī to var izmantot kā cukura aizstājēju (Fischer, Kleinschmidt 2018; Macfarlane *et al.* 2008). Produktiem, kuriem pievieno GOS, parasti ir pazemināts glikēmiskais indekss, un, salīdzinot 1g GOS ar 1g saharozi, GOS enerģētiskā vērtība ir aptuveni 50% zemāka nekā saharozei (Sangwan *et al.* 2011).

GOS tiek saukts arī par oligogalaktozi, oligolaktozi, oligogalaktozillaktozi vai transgalaktooligosaharīdiem (TOS) (Sangwan *et al.* 2011). Tas ir galaktozes oligomērs, kurš parasti sastāv no vienas glikozes molekulas, kura atrodas galā, un vairākām galaktozes molekulām (no vienas līdz deviņām, citos avotos no 1 līdz 10, visbiežāk 2 līdz 4), kuras ir saistītas ar glikozīdiskajām saitēm ( $\beta$ -(1,2),  $\beta$ -(1,3),  $\beta$ -(1,4) un  $\beta$ -(1,6)). Reakcijā iesaistītais enzīms nosaka glikozīdisko saišu novietojumu, tāpēc GOS molekulārā struktūra ir mainīga (Gänzle 2011; Warmerdam 2013).

##### 1.4.1. Galaktooligosaharīdu biosintēze

Oligosaharīdu sintēzi var veikt gan ar enzimatiskām, gan ķīmiskām reakcijām. Ķīmisko reakciju izmantošana oligosaharīdu iegūšanai bija plaši pielietota līdz 1980-tajiem gadiem. Ķīmiskajās reakcijās tiek iesaistīti dažādi glikozilējošie aģenti, taču šāda veida reakcijām ir vairāki ierobežojumi, kā rezultātā tiek samazināts gala oligosaharīdu iznākums, kā arī iegūtie maisījumi ir slikti definēti (Krasnova, Wong 2019; Mannucci 2009). Tikai pēc tam, pateicoties polimerāzes ķēdes reakcijas (PKR) un rekombinētās DNS pielietojumam, tādējādi atvieglot

dažādu enzīmu iegūšanas procesus un uzlabojot to kvalitāti, tika arvien vairāk pielietoti enzimatiskās sintēzes procesi, lai iegūtu oligosaharīdus, konkrēti laktozes gadījumā tiek izmantotas  $\beta$ -galaktozidāzes GOS ieguvei (Mannucci 2009). Lai arī laktāze bieži tiek pieminēta kā sinonīms  $\beta$ -galaktozidāzei, tā tomēr pieder pie  $\beta$ -galaktozidāzes apakšklases (EC 3.2.1.108) (Nath *et al.* 2014).

$\beta$ -galaktozidāžu ( $\beta$ -gal, EC 3.2.1.23, glikozīda hidrolāze) izmantošana sniedzas daudzu desmitu gadu senā pagātnē. Šī enzīma pielietojumi ir plaši studēti, lai atbrīvotos no laktozes piena produktos, tādējādi tos varētu patērēt cilvēki, kuriem ir hipolaktāzija jeb laktozes nepanesība (Nath *et al.* 2014). 2. tabulā ir apkopojums no vairākām publikācijām, kur dabā ir tikušas atrastas un izolētas  $\beta$ -galaktozidāzes. Šī enzīma sastopamība ir plaši izplatīta gan mikroorganismos, gan augos un dzīvnieku audos, taču salīdzinot šos ieguves avotus, no mikroorganismiem izolētas  $\beta$ -galaktozidāzes ir visplašāk izmantotās vieglās pieejamības dēļ, kā arī ir uzrādīta augstāka produktivitāte mikrobiālās biokonversijas procesos, tādējādi samazinot arī izmaksas (Saqib *et al.* 2017). No mikroorganismiem, kurus izmanto  $\beta$ -galaktozidāžu ieguvei, izceļas *Aspergillus niger* un *Aspergillus oryzae* (pelējuma sēnes), *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* un *Kluyveromyces marxianus* (rauga sēnes) un *Bacillus circulans* kā bakteriālais avots  $\beta$ -galaktozidāžu izolācijai (Illanes 2011).

2. tabula.

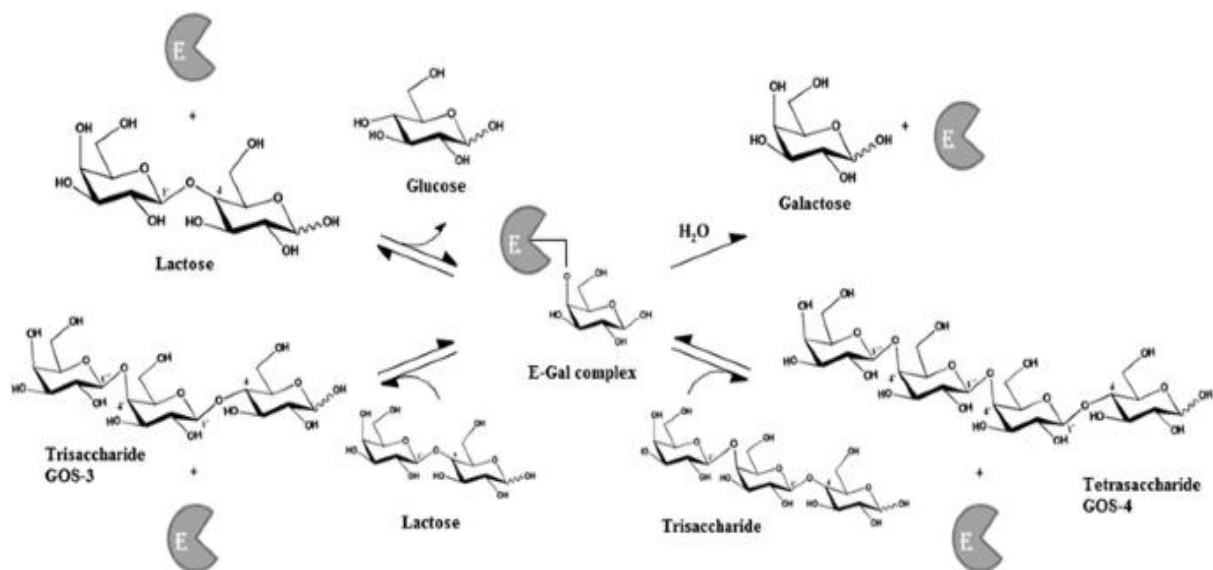
$\beta$ -galaktozidāzes avoti (Literatūras avoti: Saqib *et al.* 2017; Nivetha, Mohanasrinivasan 2017; Mannucci 2009; Luan, Duan, 2022).

Table 2

Sources of  $\beta$ -galactosidase (Sources: Saqib *et al.* 2017; Nivetha, Mohanasrinivasan 2017; Mannucci 2009; Luan, Duan, 2022).

<b>Baktērijas Bacteria</b>	<b>Raugi Yeast</b>	<b>Pelējuma sēnes Fungi</b>	<b>Augi Plants</b>	<b>Dzīvnieku audi Animal tissue</b>
<i>L. thermophilus</i>	<i>K. fragilis</i>	<i>A. foetidus</i>	Papaija	Zarnas
<i>L. helveticus</i>	<i>K. lactis</i>	<i>A. niger</i>	Zemenes	Smadzenes
<i>L. bulgaricus</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>A. oryzae</i>	Tomāts	Placenta
<i>B. circulans</i>	<i>C. pseudotropicalis</i>	<i>A. phoenicis</i>	Ābols	Zīdītāju sēklinieki
<i>B. megaterium</i>		<i>A. flavus</i>	Avokado	Ādas audi
<i>B. coagulans</i>		<i>M. meihei</i>	Kivi	Liellopu aknas
<i>B. aryabhatai</i>		<i>M. pusillus</i>	Melone	
<i>L. citrovorum</i>		<i>N. crassa</i>	Mango	
<i>S. lactis</i>			Japāņu persiku koki	
<i>S. thermophilus</i>			Kafijas pupiņas	
<i>E. coli</i>			Aprikozes	

Pievienojot  $\beta$ -galaktozidāzes laktozes saturošam maisījumam, vispirms notiek galaktozil-enzīma kompleksa izveide, kurā  $\beta$ -galaktozidāzes aktīvajam centram pievienojas brīvā laktozes molekula, un tajā pat laikā tiek atbrīvota viena glikozes molekula, pēc tam šis komplekss reaģē ar nukleofīliem akseptoriem, kuriem ir hidroksilgrupa, tie var būt laktozes molekula un ūdens. Ūdens gadījumā notiek hidrolīzes reakcija, kurā tiek hidrolizētas laktozes galaktozilsaites un atbrīvoti tās monosaharīdi D-glikoze un D-galaktoze. Paralēli hidrolīzei enzīma komplekss reaģē ar ogļhidrātu molekulu (šajā gadījumā laktozi) tādā veidā izveidojot trisaharīdu (gal-gal-glu, GOS-3), šis trisaharīds arī spēj darboties kā enzīma akceptors, tāpēc reakcija var turpināties, pievienojot papildu galaktozes daļas, rezultējoties tetrasaharīdā (gal-gal-gal-glu, GOS-4), pentasaharīdā (gal-gal-gal-gal-glu, GOS-5) utt. (1. attēls). Šo reakciju sauc par transgalaktozilēšanu, kura ir kinētiski kontrolēta reakcija, kā rezultātā maisījumā ir GOS ar vairākām galaktozes molekulām un vienu glikozes molekulu galā, un reakcijas rezultātā pāri palikušo disaharīdu laktozi un monosaharīdiem: galaktozi un glikozi (Vera *et al.* 2016; Mannucci 2009). Augsta laktozes koncentrācija maisījumā stimulē transgalaktozilēšanas norisi, tādā veidā stimulējot paaugstinātu GOS produkciju. Ja laktozes koncentrācija ir zema, tiek veicināti hidrolīzes procesi, kad ūdens molekulas strādā kā akseptori. Taču arī, ja sākotnējā laktozes koncentrācija ir bijusi augsta, pēc laika, kad ir sasniegta maksimālā iespējamā GOS koncentrācija, sākas hidrolīzes procesi, kurā tiek atbrīvotas galaktozes un glikozes molekulas, tādā veidā samazinot GOS daudzumu maisījumā, tāpēc ir svarīgi reakciju apstādināt tajā brīdī, kad GOS iznākums ir visaugstākais (Vera *et al.* 2016; Saqib *et al.* 2017).



1. attēls. GOS enzimatiskās biosintēzes shēma (Avots: Vera *et al.* 2016).

Figure 1. Scheme of GOS enzymatic biosynthesis (Source: Vera *et al.* 2016).

### 1.4.2. Fermentācijas parametru ietekme uz galaktooligosaharīdu biosintēzes iznākumu

Ir vairāki faktori, kas ietekmē galaktooligosaharīdu (GOS) iznākumu, un tiek uzskatīts, ka visnozīmīgākais no tiem ir enzīma avots, jo enzīma izcelsme ietekmē glikozīdisko saišu veidošanos. Komerciālās  $\beta$ -galaktozidāzes var tikt iegūtas no dažādiem mikroorganismiem, taču populārākie piena industrijā izmantotie celmi  $\beta$ -galaktozidāžu produkcijai priekš GOS sintēzes ir *Aspergillus oryzae*, *Bacillus circulans* un *Kluyveromyces lactis*. Mikroorganisma izcelsme ietekmē enzīma darbībai optimālāko pH vērtību, GOS iznākumu un temperatūru. GOS iznākums reakcijas maisījumā parasti variē no 20% līdz 45% (Vera *et al.* 2016). Šajā pētījumā tiek izmantotas  $\beta$ -galaktozidāzes, kuras izolētas no *A. oryzae* un *B. circulans*. Enzīmam, kurš iegūts no *A. oryzae*, optimālākā pH vērtība ir aptuveni 4,5, pie augstākām vērtībām transgalaktozilēšanas aktivitāte samazinās, optimālākā temperatūra variē no +40°C līdz +60°C, un augstākais iegūtais GOS iznākums ir aptuveni 30% (Vera *et al.* 2011). GOS maisījums, kurš iegūts biosintēzes laikā ar *A. oryzae*  $\beta$ -galaktozidāzēm, galvenokārt sastāv no trīsvērtīgajiem galaktooligosaharīdiem (GOS-3), pēc tiem seko GOS-4 un vismazāko proporciju sastāda GOS-2, GOS-5 un GOS ar augstākām vērtībām (Illanes 2011). Salīdzinoši  $\beta$ -galaktozidāžu, kuras iegūtas no *B. circulans*, ierosināto transgalaktozilēšanas procesu aktivitāte ir visaugstākā pie pH vērtības 6, temperatūras preferences ir tādas pašas kā no *A. oryzae* iegūtam enzīmam, respektīvi no +40°C līdz +60°C, un GOS iznākums ir aptuveni 40% (Torres *et al.* 2010). Savukārt ir novērojams vienmērīgs sadalījums starp GOS-2 līdz GOS-5 maisījumā, taču GOS, kuru vērtība ir augstāka par 5, īpatsvars ir zems (Panesar *et al.* 2006).

Arī substrāta koncentrācija un temperatūra ietekmē galaktooligosaharīdu iznākumu. Pētījumi ir snieguši neapšaubāmu pārliecību, ka augstāka laktozes koncentrācija rezultējas lielākā GOS iznākumā. Ir minētas dažādas laktozes koncentrācijas GOS biosintēzei, taču tiek uzskatīts, ka optimālākā laktozes koncentrācija ir sākot no 30% līdz 40% (w/v), taču nereti pētījumos laktozes koncentrācija tiek palielināta arī līdz 50% un 60% (w/v) (Vera *et al.* 2012; Torres *et al.* 2010). Laktozes koncentrācija nosaka arī GOS polimerizācijas pakāpi (DP), tādā veidā ietekmējot GOS-3, GOS-4 un citu vērtību GOS proporcionālo novietojumu reakcijas maisījumā (Vera *et al.* 2016). Paralēli lielu lomu spēlē arī temperatūra, respektīvi, augstāka temperatūra nosaka laktozes hidrolīzes un transgalaktozilēšanas reakcijas ātrumu, kā arī tiek ietekmēta laktozes šķīdība, ļaujot palielināt laktozes koncentrāciju reakcijas maisījumā. Taču, lai sasniegtu maksimālo GOS biosintēzes iznākumu, temperatūra nevar pārsniegt enzīma inaktivācijas temperatūru. Pētījumos tiek minēts, ka optimālākā temperatūra GOS biosintēzei

ir no +40°C līdz +50°C, tādā veidā izslēdzot iespējamību, ka maisījumā esošais enzīms tiks inaktivēts reakcijas laikā (Torres *et al.* 2010; Vera *et al.* 2016).

### 1.4.3. Galaktooligosaharīdu attīrīšana

Pēc laktozes hidrolīzes un transgalaktozilēšanas reakcijām, maisījumā paliek monosaharīdi galaktoze un glikoze un disaharīds laktoze. Atbrīvošanās no laktozes maisījumā ir svarīga, lai produktu varētu patērēt arī cilvēki ar laktozes nepanesību, savukārt atbrīvošanās no monosaharīdiem samazina produkta kalorisko vērtību, tādā veidā ļaujot to patērēt cilvēkiem, kuriem ir diabēts. Tāpēc GOS attīrīšana no šiem ogļhidrātiem ir viens no galvenajiem izaicinājumiem GOS ražošanā. Var tikt lietota GOS attīrīšana ar membrānu tehnoloģijām, taču tas ir salīdzinoši dārgs process (Vera *et al.* 2016). Taču ir iespējams arī izmantot mikroorganismus, kur selektīvas fermentācijas laikā tiek novākti nevajadzīgie ogļhidrāti, tādā veidā palielinot GOS koncentrāciju maisījumā. Ir pētīts raugu *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* un *Kluyveromyces marxianus* pielietojums ogļhidrātu selektīvai novākšanai no GOS, kuri iegūti no piena, veicot ogļhidrātu biokonversija ar β-galaktozidāzēm (Sangwan *et al.* 2014; Aburto *et al.* 2016; Vigants *et al.* 2019). Taču ir novērots, ka, izmantojot raugus selektīvai ogļhidrātu konversijai, gala produktam pēc fermentācijas piemīt raugiem specifiska garša un smarža, kas patērētājiem nav patīkama. Ir veikts pētījums, kurā ir izmantotas pienskābās baktērijas (*Lactobacillus helveticus*) priekš GOS attīrīšanas no laktozi saturošām sūkalām (Sangwan *et al.* 2014).

## 1.5. Piena permeāts

Pārtikas un lauksaimniecības organizācija (FAO, *The Food and Agriculture Organization of the United Nations*) katru gadu sagatavo pārskatu par Pasaules piena tirgus attīstību. 2020. gadā Eiropas Savienībā (EU) kopējais saražotais piena daudzums bija 236 miljoni tonnas, tādējādi ierindojoties 2. vietā pēc Āzijas valstīm, kurās tika saražoti 379 miljoni tonnas piena, un, iedzīvotāju populācijai augot, gadu gaitā ir novērojama tendence saražotā piena daudzumam pieaugt galvenajos pasaules reģionos (FAO 2021). Sociāli ekonomiskie faktori (ekonomikas attīstība, urbanizācija) ietekmē patērētāju uztura prasības – pārtikas preces ar augstu proteīna saturu tiek saistītas ar veselīgu dzīvesveidu, tāpēc tādi produkti kā piena vai sūkalu proteīna koncentrāti un izolāti arvien aktīvāk ienāk tirgū un attīstās (Henchion *et al.* 2017). 2020. gadā EU-27 valstīs (izņemot Lielbritāniju) kopējā pilnpiena pulvera produkcija sasniedza 338 tūkstošus tonnas, vājpiena pulvera produkcija – gandrīz pusotru miljonu tonnas (1 440 000t) un sūkalu pulvera produkcija – tuvu diviem miljoniem tonnas (1 969 000t)

(European Commission 2021). Savukārt 2020. gadā Amerikas Savienotajās Valstīs kopējā piena proteīna koncentrātu produkcija sasniedza aptuveni 94 tūkstošus tonnas un sūkalu proteīna koncentrātu produkcija – 217 tūkstošus tonnas, bet sūkalu proteīna izolāti – aptuveni 53 tūkstošus tonnas (USDA 2021). Lai gan dotos datus par Eiropas Savienības un Amerikas Savienoto Valstu piena produktu produkciju nav viegli salīdzināt atšķirīgo kategoriju dēļ, ir skaidri redzams, ka piena produktu ražošana notiek lielos apjomos, un, zinot, ka globālā piena industrija vēl turpina augt, ir sagaidāms, ka skaitļi gadu gaitā kļūs vēl lielāki.

Pie augsta proteīna saturošu produktu ražošanas apjoma sagaidāma arī augsta blakusproduktu produkcija. Piena minerālvielas, laktoze, sūkalu permeāts, bezlaktozes permeāts un piena permeāts ir blakusprodukti proteīnu koncentrātu un izolātu ražošanas procesiem (Burrington, Schoenfuss 2014). Izolāti no koncentrātiem atšķiras ar proteīna koncentrāciju produktā, respektīvi izolātiem proteīna saturs ir virs 90%, bet koncentrātiem zem 90% no sausnes masas (Meena *et al.* 2017). Piena proteīna koncentrātus ražo ar membrānas tehnoloģiju – ultrafiltrāciju. Ultrafiltrācijas procesā spiediens ir piena virzītājspēks un plūsma notiek paralēli membrānai, kura atdala makro molekulas no mazākām molekulām, šajā gadījumā – mikroorganismus, proteīnu un tauku molekulas no laktozes un minerālvielām. Vēlāk, atdalot pāri palikušo laktozi, tauku molekulas un izžāvējot iegūto retentātu (proteīna maisījumu), iegūst piena proteīna koncentrātus un izolātus. Filtrātu, kurš plūst cauri membrānai, sauc par piena permeātu, un tas satur ļoti daudz ūdeni un ūdenī šķīstošas komponentes. Piena permeāta ieguvei izmanto vājpienu ar 0,05% tauku saturu vai pienu, kas paredzēts ikdienas patēriņam ar 1,5 – 3,5% tauku saturu. Ja sākotnēji tiktu izmantotas sūkalas, tad iegūtais filtrāts būtu sūkalu permeāts (de Wit 2001; Bylund 1995).

Ultrafiltrācijas rezultātā piena permeātā ir laktoze, proteīns, pelni, tauki un dažādi minerālvielas. 3. tabulā ir apkopojums no dažādiem avotiem par piena permeāta pulvera sastāvu un pH. Piena permeātā ļoti mazos daudzumos ir sastopami proteīni (ap 4%) un tauki (zem 1%), jo tie tiek atdalīti ultrafiltrācijas procesā un lielākā daļa paliek retentātā. Ir sastopamas arī vērtīgas minerālvielas, aminoskābes, dažādi vitamīni, kā, piemēram, riboflavīns (B<sub>2</sub> vitamīns), kurš dod sūkalām un permeātiem dzelteno nokrāsu (de Wit 2001; Menchik *et al.* 2019). Piena permeātam pH ir ap 6, kas ir līdzīgs saldajām sūkalām, kurām pH ir aptuveni 6,3 (Huma *et al.* 2015). Taču lielāko daļu no permeāta pulvera masas aizņem laktoze (aptuveni 80%), tāpēc tas nav paredzēts ikdienas patēriņam, kā arī tam ir augsts galveno piesārņotāju rādītājs - ķīmiskā (KSP) un bioloģiskā (BSP) skābekļa patēriņa koeficients. Pētījumā, kurā pētīja piena pārstrādes blakusproduktu sastāvu, piena permeāta KSP vērtība variēja no 127 g/l līdz 142 g/l, bet BSP

vērtība bija no 110 g/l līdz 182 g/l. Citā pētījumā ĶSP vērtība piena permeātam bija 55 g/l. Lai gan informācija par Eiropas Savienībā maksimāli pieļaujamām ĶSP un BSP vērtībām piena pārstrādes notekūdeņos ir diezgan limitēta, abi autori min, ka iegūtie rezultāti ir augsti un tādējādi ir nepieciešama speciāla apstrāde pirms piena permeātu var noglabāt kā atkritumus (Menchik *et al.* 2019; Wang *et al.* 2009). Lai samazinātu saražotā permeāta daudzumu un ierobežotu iespējamo vides problēmu rašanās cēloņus, tiek pielietotas dažādas prakses, kā piemēram, permeāta maisīšana ar citiem piena produktiem, pulvera izbarošana lauksaimniecības dzīvniekiem, laktozes atdalīšana, lai to izmantotu ēdināšanā un farmācijā, vai arī, ņemot vērā augsto laktozes koncentrāciju, izmantot piena permeātu kā substrātu enzimatiskām biokonversijām un laktozes fermentācijas procesos ar pienskābajām baktērijām (Lorenzen *et al.* 2013; Paseephol *et al.* 2008).

3. tabula  
Piena permeāta pulvera ķīmiskais sastāvs.  
Table 3

Chemical composition of milk permeate powder.

<b>Parametri Parameters</b>	Shrestha <i>et al.</i> 2008	ADPI 2015	Durham 2009	Menchik <i>et al.</i> 2019
Proteīni	5,3%	3 – 5%, min 2%	~ 5,9%	~ 2,4%
Laktoze	85%	78-88%, min 76%	~ 84%	~ 79%
Tauki	0,25%	0-1%, max 1,5%	< 0,18%	~ 0,07%
Pelni	7,5%	8-11%, max 14%	~ 8,2%	~8,4 %
pH	-	5,5 – 6,6	6,6	6,37

### 1.5.1. Piena permeāta pielietojums biotehnoloģijā

Piena permeātam ir labas funkcionālās īpašības, kuras var tikt izmantotas dažādos pētījumos, lai veidotu jaunus produktus un sastāvdaļas dažādu industriju attīstībā, tādējādi tiktu arī samazināts slogs uz tehniskajiem procesiem, ar kuriem notiek permeāta attīrīšana, lai to varētu noglabāt kā atkritumus.

Goldar *et al.* (2016) pētnieku grupa izveidoja analogu jogurta veidu, kurš ir atbilstošs fenilketonūrijas (FKU) pacientu ēdināšanas prasībām. Pētījumā tika izmantots ultrafiltrēts piena permeāts un bez-piena krēma pulveris (*non-dairy creamer*) dažādās koncentrācijās, pievienojot tos iepriekš sagatavotai jogurta masai. Tad tika pievienotas trans-glutamināzes un starteris. Kā starteris jogurta fermentācijai tika izmantots *Lactobacillus delbrueckii subsp.*

*bulgaricus* un *Streptococcus thermophiles* maisījums. Tika pētīts skābums un fenilalanīna saturs jogurtos, mērītas kalorijas un noteiktas organoleptiskās īpašības. Autori secināja, ka piena permeāts paskābināja jogurtu uzglabāšanas laikā, par ko ir atbildīgas pienskābās baktērijas, kuras pienskābes produkcijai izmantoja piena permeātā esošo laktozi. Novērojumi liecināja, ka piena permeāta izmantošana analoga jogurta izveidē, ir piemērota FKU pacientu diētai.

Lai iegūtu etiķskābi, Talabardon *et al.* (2000) veica vairākus eksperimentus, kuros vēroja heterofermentatīvo baktēriju *Clostridium thermolacticum* un homoacetogēno baktēriju *Moorella thermoautotrophica* (iepriekš *Clostridium thermoautotrophicum*) kokultūras spēju fermentēt laktozi un piena permeātu līdz etiķskābei anaerobos termofilos apstākļos. Fermentācija tika veikta immobilizētu šūnu bioreaktorā, kurš tika izgatavots no apvalkotas stikla kolonnas, pildītas ar šķiedru slāni, lai varētu sasniegt augstu šūnu blīvumu un tām būtu vieglāk izturēt pieaugošo metabolītu koncentrāciju. Pētnieki barotnei pievienoja rauga ekstraktu, jo tika novērots, ka tas paātrina fermentāciju. Rezultātos augstākā sasniegtā etiķskābes koncentrācija bija 25,5 g/l un iznākums – 0,96 g/g no 1g laktozes, izmantojot piena permeātu kā oglekļa avotu fermentācijas procesos. Pētnieki secināja, ka piena permeāta izmantošana kā substrāta elements termofilo baktēriju fermentācijā, ir efektīvs veids etiķskābes ražošanai, jo konkrētajos apstākļos etiķskābes iznākums bija tuvu 100%.

Laktulozes enzimatiskai producēšanai no piena permeāta, Paseephol *et al.* (2008) pētnieku grupa izmantoja uz kalcija karbonāta bāzētus katalizatorus – austeru čaulas pulveri un kaļķakmeni laktozes izomerizācijai piena permeātā. Pirms izomerizācijas piena permeāts tika deprotenizēts, lai izvairītos no laktozil-amino savienojumu klātbūtnes laktulozes ieguves procesa laikā. Maksimālais laktulozes iznākums bija 22%, izmantojot aptuveni 50% no sākotnējās laktozes šķīdumā. Ir zināms, ka laktuloze darbojas arī kā prebiotikas cilvēka zarnu traktā, un to parasti izmanto kā oglekļa un enerģijas avotu piena produktos, kuriem pievienoti probiotiskie celmi, tāpēc pētnieki analizēja arī laktulozes sīrupa ietekmi uz dažādu probiotisko celmu augšanu. Rezultātā tika secināts, ka piena permeāts kā lēts un viegli pieejams piena industrijas blakusprodukts, un, ņemot vērā, ka tam ir augsta laktozes koncentrācija, ir labs substrāts laktulozes producēšanai, kā arī laktulozes sīrups atbalstīja komerciālo probiotisko celmu (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*) augšanu.

Zokaityte *et al.* (2020) pētījuma autori no piena permeāta izveidoja funkcionālu dzērienu prototipus, izmantojot 10 dažādus pienskābo baktēriju celmus fermentācijā ar piena permeātu

ar vai bez ābolu sulas ražošanas blakusproduktu (sēklu, mizas, lignocellulozes maisījums) pievienošanas. Pienskābās baktērijas tika inokulētas piena permeātā un inkubētas anaerobos apstākļos, un vēlāk šiem paraugiem tika pievienots/nepievienots ābolu blakusproduktu maisījuma pulveris. Pētījuma gaitā tika mērīts arī laktozes un galaktooligosaharīdu (GOS) saturs dzērienos. Augstākais GOS iznākums (26,80mg/100ml) tika iegūts piena permeāta fermentācijas laikā ar *Pediococcus acidilactici*, neizmantojot ābolu piedevas. GOS veidošanās šādos dzērienos, izmantojot piena permeātu, uzlabo to īpašības, jo GOS strādā kā prebiotikas cilvēka zarnu traktā. Labākās atsauksmes no patērētājiem, kuriem ļāva vērtēt un nogaršot šos dzērienus, bija tieši tiem dzērieniem, kuriem pievienoja ābolu piedevas. No komerciālā viedokļa iegūtie rezultāti izceļ piena permeāta potenciālu raudzētu dzērienu izgatavošanā, kā arī šādu dzērienu izveide atbalstītu patērētāju vēlmi uzturā lietot veselīgus un funkcionālus produktus.

## 1.6. Sinbiotikas

Vārds “sinbiotikas” ir grieķu izcelsmes, un tā nozīme ir – kopā (*syn:συν*) un dzīve (*biotic: β'ιος*) (Kolida, Gibson 2011). Sinbiotikas ir produkti, kuros ir prebiotikas sinerģiskā vai komplementārā kombinācijā ar probiotikām. Šāda kombinācija palīdz probiotiskajiem celmiem pārvarēt stresa apstākļus, respektīvi pētījumos ir novērots, ka šāda produkta patērēšana uzlabo probiotisko celmu izdzīvotību gremošanas sistēmā, mazinot grūtības, ar kurām tās saskaras ceļā līdz zarnu traktam (Pandey *et al.* 2015).

Sinbiotiku (tāpat kā probiotiku un prebiotiku) pamatā ir vēlme radīt produktus ar pievienoto vērtību, tādējādi uzlabojot zarnu mikrobioma kvalitāti un stimulējot mikroorganismu augšanu, kuriem ir potenciāli aizsargājošas un inhibējošas īpašības pret patogēniem organismiem. Visbiežāk izmantotās probiotikas šādos produktos ir *Lactobacillus* spp., *Bifidobacteria* spp., *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus coagulans*, bet retāk izmantotas ir *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Propionibacterium* spp. Savukārt, pie visbiežāk izmantotajām prebiotikām pieder dažādi ogļhidrātu grupu savienojumi, kā, piemēram, galaktooligosaharīdi (GOS), fruktooligosaharīdi (FOS), ksilooligosaharīdi (XOS), inulīns, kā arī ir iespējams izmantot arī prebiotikas no dabiskiem avotiem – cigoriņu saknes, bietes, kukurūzas, jakona saknes u.c. dabiskas izcelsmes ogļhidrātu savienojumiem (Pandey *et al.* 2015; De Vrese, Schrezenmeir 2008).

Ir divi veidi kā definēt sinbiotisku savienojumu:

- **Komplementārs (papildu)** – probiotisko celmu piemeklēšana ir balstīta konkrētās veselības problēmās, kuras vēlas adresēt, un prebiotiku piemeklēšana klāt ir netieša, to uzdevums ir stimulēt zarnu mikrobiotas atjaunošanos un labvēlīgo mikroorganismu vairošanos. Prebiotikas var ietekmēt konkrēto probiotiku aktivitāti, taču tāds nav bijis galvenais mērķis.
- **Sinergisks** – arī šajā gadījumā probiotiku izvēlās attiecīgi saimniekorganisma veselības stāvoklim, kuru vēlas labvēlīgi ietekmēt, taču prebiotikas tiek izvēlētas īpaši tādas, kuras stimulēs konkrēto probiotiku augšanu un aktivitāti, respektīvi prebiotiku primārais mērķis šajā gadījumā nebūs kopējās zarnu mikrobiotas stāvokļa un kvalitātes uzlabošana, bet drīzāk probiotiku atbalstīšana, lai tā spētu izdzīvot gremošanas traktā (Kolida, Gibson 2011).

Galvenie saimniekorganisma ieguvumi, lietojot uzturā sinbiotikas, ietver zarnu mikrobiotas sastāva uzlabošanos, respektīvi *Lactobacillus* spp. un *Bifidobacteria* spp. līmeņa paaugstināšanos. Taču ir novērota arī organisko skābju, it īpaši butirāta, līmeņa paaugstināšanās, tādā veidā pastiprinot zarnu sieniņas barjerfunkciju, kā arī tiek veicināti imūnmodelējoši procesi, lai mazinātu iekaisumu. Biomedicīnas pētījumos ir minēta arī sinbiotiku inhibējoša ietekme uz patogēnās *Helicobacter pylori* kolonizācijas procesiem, labvēlīga ietekme uz MRSA (*methicillin resistant Staphylococcus aureus*) infekcijas ārstēšanu, kā arī sinbiotiku uzņemšana paaugstina minerālu (Ca, Mg, P) biopieejamību un uzlabo aknu darbību (Pandey *et al.* 2015; Kolida, Gibson 2011).

## 2. MATERIĀLI UN METODES

### 2.1. Pētījuma norises vieta un laiks

Pētījums izstrādāts Latvijas Universitātē, Mikrobioloģijas un Biotehnoloģijas Institutā, Ogļhidrātu biokonversijas laboratorijā. Adrese: Jelgavas iela 1, Rīga. Laika periods: 2020. gada rudens līdz 2022. gada pavasarim.

### 2.2. Materiāli

#### 2.2.1. Reāģenti, materiāli un iekārtas

Pētījumā izmantotais piena permeāta pulveris ir iegūts no SIA “Baltic Dairy Board”. Piena permeāts tika izmantots kā substrāts galaktooligosaharīdu (GOS) enzimatiskai iegūšanai.

Lai iegūtu 20% laktozes šķīdumu, vārglāzē tiek iesvērts D-laktozes monohidrāta (SIGMA) pulveris, pievienots destilēts ūdens un maisījums uzkarsēts, lai veicinātu homogenitāti. Iegūtais šķīdums tiek sterilizēts autoklāvā +110°C temperatūrā. Vēlāk tas tiek izmantots MRS Broth barotnes modificēšanai, lai aizstātu glikozi. Gala iznākumā MRS Broth barotnē ir 5% laktoze. Barotņu pagatavošanā, kā arī eksperimentos, kuros nepieciešams ūdens, tika izmantots destilēts ūdens, kurš pieejams Mikrobioloģijas un Biotehnoloģijas institūta ūdens apgādes sistēmā.

Pētījumā izmantotie laboratorijas trauki: mērcilindri, pipetes (5µl, 20µl, 1000µl, 5ml, 10ml), daudzkanālu pipete (300µl), apaļkolba (1000ml), mērkolbas, vārglāzes. Vienreizējās lietošanas materiāli un to ražotāji ir norādīti 4. tabulā, savukārt pētījumā izmantotās iekārtas norādītas 5. tabulā.

4. tabula  
Laboratorijas trauki un vienreizējās lietošanas materiāli.

Table 4  
Laboratory consumables and disposable tableware.

Laboratorijas trauki Laboratory consumables	Ražotājs Manufacturer	Ražotājvalsts Country of manufacture
Pipešu uzgaļi	Sarstedt	Vācija
96 – lauciņu plate		
Petri plates		
Kivetes	Fisherbrand™	Apvienotā Karaliste
Stobrīni (50ml, 10ml)	VWR	Amerikas Savienotās Valstis
Parafilma	Bemis™ Parafilm®	

5.tabula  
Laboratorijas iekārtas.  
Table 5  
Laboratory equipment.

<b>Laboratorijas iekārtas Laboratory equipment</b>	<b>Ražotājs Manufacturer</b>	<b>Ražotājvalsts Country of manufacture</b>
Analītiskie sviri	BOECO	Vācija
Magnētiskais maisītājs	Biosan MSH 300	Latvija
UV laminārs	FlowFast V	Itālija
Spektrofotometrs	Biochrom Libra S22	Apvienotā Karaliste
Autoklāvs	Fisherbrand™	Apvienotā Karaliste
Inkubators-kratītājs	Eppendorf	Vācija
Inkubators-kratītājs	Biosan ES 20	Latvija
HPLC hromatogrāfs	Agilent 1100	ASV
Centrifūga	CertoClav	Austrija
Termostats	Biosan ES 20	Latvija
pH - metrs	HANNA instruments pH 211	ASV

### 2.2.2. Mikrobioloģiskās barotnes

Pētījumā izmantoto mikrobioloģisko barotņu sastāvs ir apkopots 6. un 7. tabulā.

6. tabula  
MRS Broth barotne modificēta (bez cukura), ražotājs SIGMA.  
Table 6

Modified MRS Broth medium (without carbohydrate), manufacturer SIGMA.

<b>Sastāvdaļas Ingredients</b>	<b>Viela (g) uz 1L barotnes Substance (g) per 1L medium</b>
Peptons Peptone	10
Gaļas ekstrakts Meat Extract	8
Rauga ekstrakts Yeast extract	4
Dikālīja fosfāts $K_2HPO_4$ Dipotassium hydrogen phosphate $K_2HPO_4$	2
Nātrija acetāta trihidrāts $CH_3COONa$ Sodium acetate trihydrate $CH_3COONa$	5
Triamonija citrāts $C_6H_{17}N_3O_7$ Triammonium citrate $C_6H_{17}N_3O_7$	2
Magnija sulfāta heptahidrāts $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Magnesium sulphate heptahydrate $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
Mangāna sulfāta tetrahidrāts $MnO_4S \cdot 4H_2O$ Manganese sulphate tetrahydrate $MnO_4S \cdot 4H_2O$	0,05

Tiek pievienots 1ml polisorbāts 80 (TWEEN ®; Sigma P8074). Pēc barotnes pagatavošanas tā tiek sterilizēta autoklāvā +110°C temperatūrā.

7. tabula  
MRS Agar barotne, ražotājs SIGMA.

Table 7  
MRS Agar medium, manufacturer SIGMA.

Sastāvdaļas Ingredients	Viela (g) uz 1L barotnes Substance (g) per 1L medium
Peptons Peptone	10
Gaļas ekstrakts Meat Extract	5
Rauga ekstrakts Yeast extract	5
D(+)-glikoze D(+)-glucose	20
Dikālīja fosfāts $K_2HPO_4$ Dipotassium hydrogen phosphate $K_2HPO_4$	2
Diamonija citrāts $C_6H_{14}N_2O_7$ Diammonium citrate $C_6H_{14}N_2O_7$	2
Nātrija acetāts $NaCH_3COO$ Sodium acetate $NaCH_3COO$	5
Magnija sulfāts $MgSO_4$ Magnesium sulphate $MgSO_4$	0,1
Mangāna sulfāts $MnSO_4$ Manganese sulphate $MnSO_4$	0,05
Agars Agar	12

Tiek pievienots 1ml polisorbāts 80 (TWEEN ®; Sigma P8074). Pēc barotnes pagatavošanas tā tiek sterilizēta autoklāvā +110°C temperatūrā.

### 2.2.3. Izmantotās datorprogrammas

Iegūto datu apkopošanai un analīzei izmantots Microsoft Word, Microsoft Excel, versija 2204. Hromatogrāfijas analīzēm izmantota Agilent ChemStation.

## 2.3. Metodes

### 2.3.1. Sējmateriāla sagatavošana un optiskā blīvuma noteikšana

Pētījumā izmantoti trīs komerciālie probiotiskie *Lactobacillus* spp. celmi:

- “nu-trish@ *Lactobacillus casei-01*” (no Chr. Hansen )
- *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* (no Mediterranea Biotechnologie)
- “nu-trish@ *Lactobacillus acidophilus-05*” (no Chr. Hansen)

*L. casei*, *L. casei subsp. rhamnosus* un *L. acidophilus* kultūras tiek uzglabātas liofilizētā stāvoklī oriģinālā iepakojumā saldētavā -18°C temperatūrā. Sterilos apstākļos katra kultūra tiek

iesvērtā atsevišķos stobriņos ar modificētu MRS Broth barotni (6. tabula), kurai papildus tiek pievienots laktozes šķīdums, lai rezultātā laktozes koncentrācija barotnē būtu 5%. Kultūras inkubē kratītājā (Biosan ES 20). Inkubācijas parametri: 24h, +37°C temperatūra, 100 RPM.

Pēc tam ar spektrofotometru (Biochrom Libra S22) tiek mērīts šūnu suspensijas optiskais blīvums (OD), iegūstot kvantitatīvus rādītājus par biomasas koncentrāciju šķīdumā. Stobriņi tiek izņemti no kratītāja, un sterilos apstākļos tiek paņemti paraugi, kurus izmantot optiskā blīvumu mērīšanai. Paraugu materiāli tiek iepildīti kivetēs un atšķaidīti ar destilēto ūdeni. Optiskais blīvums tiek mērīts pie 580nm viļņu garuma attiecībā pret references kivetī ar destilēto ūdeni. Mērīšanas diapazons spektrofotometrā ir robežās starp 0,04 – 0,200.

### 2.3.2. GOS fermentatīva biosintēze ar $\beta$ -galaktozidāzēm

Pētījumā izmantoti 2 komerciālie mikrobiālie enzīmi:

- Lactazyme – B (ražotājs GenoFocus), izcelsme: *Bacillus circulans*.
- Lactase 17MDP (ražotājs BIOCATALYSTS), izcelsme: *Aspergillus oryzae*.

Enzīmus uzglabā ledusskapī +4°C temperatūrā.

GOS sintēzei tika izmantots no piena permeāta pagatavots šķīdums ar laktozes koncentrāciju 500g/l. Dotā koncentrācija izraudzīta balstoties uz literatūras un fermentu ražotāju datiem par optimālo laktozes koncentrāciju GOS biosintēzei. Piena permeāta pulveris pa porcijām tiek iemaisīts uzkarstētā destilētā ūdenī, kā arī ņemot vērā augsto laktozes koncentrāciju, iemaisīšana notiek lēni. Pēc tam šķīdumu, nepārtraukti maisot, silda +85°C temperatūrā 20-30 minūtes, līdz tiek iegūta sīrupveida konsistence. Šķīdumu atdzesē līdz +50°C un pievieno enzīmus koncentrācijā 1g uz litru piena permeāta šķīduma. Enzīmus pirms pievienošanas suspendē nelielā ūdens daudzumā (5ml). GOS biosintēzi veic kolbās inkubatorā-kratītājā (Eppendorf) 24h, +50°C temperatūrā, pie kratīšanas ātruma 140 RPM.

Pēc inkubācijas kolbas tiek uzkarstētas ne zemāk kā +90°C temperatūrā, lai deaktivizētu enzīmus, un tiek paņemti paraugi hromatogrāfijas analīzēm, lai noteiktu laktozes, galaktozes, glikozes un galaktooligosaharīdu (GOS) koncentrāciju.

Iegūtais reakcijas produkts, kas satur GOS, laktozi, glikozi un galaktozi (tālāk tekstā saukts par GOS maisījumu) tika izmantots probiotisko celmu kultivēšanai.

### 2.3.3. Probiotisko celmu kultivēšana GOS maisījumā

Lai novērtētu, kā barotnes sastāvs ietekmē konkrēto probiotisko celmu augšanu, baktērijas tika kultivētas GOS maisījumā bez un ar piedevām.

Barotņu veidi:

1. GOS maisījums bez piedevām
2. GOS maisījums + modificēta MRS barotne (bez glikozes)
3. GOS maisījums + MRS Broth komponentes bez peptona, gaļas ekstrakta un rauga ekstrakta. Minētās sastāvdaļas netiek izmantotas to izmaksu dēļ. Izmantotās komponentes: dikālija fosfāts 2g/l ( $K_2HPO_4$ ); nātrija acetāta trihidrāts 5g/l ( $CH_3COONa$ ); triamonija citrāts 2g/l ( $C_6H_{17}N_3O_7$ ); magnija sulfāta heptahidrāts 0,2g/l ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ); mangāna sulfāta tetrahidrāts 0,05g/l ( $MnO_4S \cdot 4H_2O$ ).
4. GOS maisījums + amonija fosfāts 2g/l ( $(NH_4)H_2PO_4$ ). Lai novērtētu slāpekļa un fosfora avota ietekmi.
5. GOS maisījums + amonija sulfāts 2g/l ( $(NH_3)_2SO_4$ ). Lai novērtētu slāpekļa avota ietekmi.

Konkrēto komponentu koncentrācijas ir atbilstošas MRS Broth barotnei.

Kad ir nolasītas OD vērtības sējmateriālam ar katru celmu, ievērojot sterilitāti, atsevišķos stobriņos tiek iepildīts vajadzīgais daudzums sējmateriāla, lai gala šķīdumā  $OD=0,5$ . Šūnas tiek atdalītas no supernatanta un stobriņi tiek uzpildīti ar konkrēto substrāta veidu – MRS Broth bez laktozes, stdH<sub>2</sub>O un stdH<sub>2</sub>O ar atsevišķi pievienotām komponentēm. Katrai barotnei tiek pievienots GOS maisījums. Ņemot vērā, ka laktozes koncentrācija GOS maisījumā ir pārāk liela priekš mikroorganismu kultivācijas, GOS maisījums katrā stobriņā tiek atšķaidīts 4 reizes. Kopējais stobriņa tilpums  $V=45ml$ . Barotnes ar inokulētajām šūnām tiek liktas kratītājā. Katrai barotnei ir trīs bioloģiskie atkārtojumi. Kratīšanas parametri: +37°C temperatūra, 100 RPM.

Ik pēc 24h tiek veikta dzīvo šūnu skaita novērtēšana. Inkubācija tiek veikta 7 dienas, savukārt pēc tam stobriņi tiek ievietoti ledusskapī +4°C temperatūrā, lai novērtētu celmu izdzīvotību pēc ilgstošas uzglabāšanas ledusskapī.

### 2.3.4. Dzīvo šūnu skaita noteikšana

Lai noteiktu šūnu izdzīvotību barotnēs, tiek veikts izdzīvotības tests (*spot-test*) Petri platēs ar MRS Agar barotni (7. tabula). Ievērojot sterilitāti, ik pēc 24 stundām inkubācijas laikā

un ik pēc 7 dienām uzglabāšanas laikā, iegūtā šūnu suspensija tiek pilināta 96-lauciņu plates pirmajā (A) rindā, no katra stobriņa veicot 4 tehniskos atkārtojumus. Nākamajās rindās (B – E) tiek iepildīts stdH<sub>2</sub>O. No pirmās rindas tiek veikts sērijveida atšķaidījums līdz pēdējai rindai. No bedrītes uz bedrīti atšķaidījums ir desmitkārtīgs, tādā veidā nonākot no 10<sup>-1</sup> pirmajā rindā līdz 10<sup>-7</sup> atšķaidījumam pēdējā rindā. Tad iegūtie atšķaidījumi (no 10<sup>-7</sup> līdz 10<sup>-4</sup>) tiek pilināti uz MRS Agar platēm, kurās glikozes saturs ir 2%. Katrā pilienā tiek izsēti 5 μl no atšķaidītās šūnu suspensijas. Iegūtās Petri plates tiek ievietotas termostatā uz 48h +37°C temperatūrā. Pēc tam tiek skaitītas izaugušās koloniju veidojošās vienības.

### 2.3.5. Oglhidrātu kvantitatīvā noteikšana

Lai novērtētu GOS, laktozes, glikozes un galaktozes sastāva izmaiņas inkubācijas un uzglabāšanas laikā, paraugi tika analizēti ar HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) metodēm, izmantojot augstefektīvās šķidrums hromatogrāfijas sistēmu Agilent 1100 ar refrakcijas indeksa detektoru G1362A.

Paraugi pirms analīzēm tika centrifugēti un filtrēti caur 0,22μm celulozes acetāta filtru.

GOS, glikozes un galaktozes noteikšanai izmantota Shodex kolonna SUGAR KS-802. Kolonnas garums 300 mm, iekšējais diametrs 8mm. Kā mobilā fāze tika izmantots destilēts ūdens ar plūsmas ātrumu 0,5ml/min. Kolonnas temperatūra +80°C, refrakcijas indeksa detektora temperatūra +50°C. Kolonnā ievadāmā parauga daudzums 10μkl.

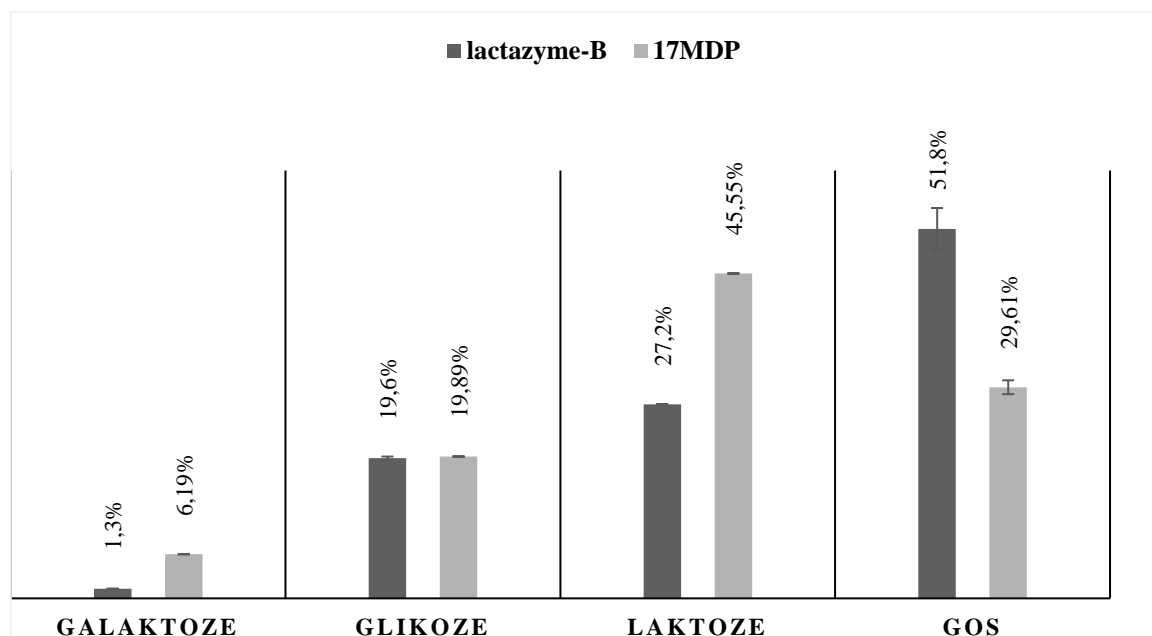
Laktozes koncentrācija tika noteikta ar kolonu YMC-Pack Poliamine II. Kolonnas garums 250mm, iekšējais diametrs 4,6mm. Ka mobilā fāze izmantots acetonitrila-ūdens maisījums (65% acetonitrils, 35% ūdens). Mobilās fāzes plūsmas ātrums 1,0 ml/min, kolonnas temperatūra +25°C, refrakcijas indeksa detektora temperatūra +40°. Kolonnā ievadāmā parauga daudzums 10μkl.

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. GOS maisījumu sastāvs pēc $\beta$ -galaktozidāžu reakcijām

Reakcijā tika izmantots no piena permeāta iegūts šķīdums, kurā laktozes koncentrācija bija 50%. Katram šķīdumam atsevišķi pievienoja 2 komerciālās mikrobiālās  $\beta$ -galaktozidāzes: Lactazyme – B, kura ir iegūta no *Bacillus circulans* un Lactase 17MDP, kura ir iegūta no *Aspergillus oryzae*. Pēc 24 stundu biosintēzes, enzīmi tika inaktivēti šķīdumu uzkaršējot, un tika noteikta laktozes, galaktozes, glikozes un GOS koncentrācija iegūtajā reakcijas maisījumā.

Galaktozes, glikozes, laktozes un galaktooligosaharīdu procentuālais daudzums no kopējās ogļhidrātu koncentrācijas ir parādīts 2. attēlā. Procentuālās vērtības konkrētam ogļhidrātam aprēķinātas no kopējo ogļhidrātu koncentrācijas. Reakcijas maisījumā, kuram tika pievienots Lactazyme-B, ir novērojams augsts procentuālais galaktooligosaharīdu iznākums, kas pārsniedz pusi (51,8%) no kopējiem cukuriem. Salīdzinoši augsts ir arī laktozes un glikozes iznākums, attiecīgi 27,2% un 19,6%, un zemākais bija galaktozes iznākums - mazliet augstāks par 1% no kopējās ogļhidrātu koncentrācijas.



2. attēls. Cukuru procentuālais (%) iznākums atsevišķos reakcijas maisījumos ar 2 pievienotām  $\beta$ -galaktozidāzēm: Lactazyme–B un Lactase 17MDP (attēlā 17MDP), reakcija veikta inkubatorā–kratītājā: 24h, +50°C, 140 RPM.

Figure 2. Percentage (%) yield of sugars in individual reaction mixtures with 2 added  $\beta$ -galactosidases: Lactazyme-B and Lactase 17MDP (17MDP in Figure), reaction performed in incubator-shaker:24h, +50°C, 140 RPM.

Savukārt, reakcijas maisījumā ar pievienotu Lactase 17MDP (turpmāk 17MDP), GOS iznākums sasniedza tikai trešdaļu no kopējo cukuru daudzuma (29,6%), savukārt, neizreagējušās laktozes koncentrācija bija saglabājusies augsta aptuveni 45% no kopējiem cukuriem. Netika novērotas vērā ņemamas atšķirības glikozes daudzumā starp abiem reakciju maisījumiem, reakcijas maisījumā ar pievienotu 17MDP, tas bija augstāks par 0,3%. Savukārt galaktozes iznākums bija par 5% augstāks, salīdzinot ar Lactazyme-B reakcijas maisījumu.

Analizējot iegūto GOS no sākotnējās laktozes, tika aprēķināts, ka augstāko GOS iznākumu 24 stundu biosintēzes procesā iespējams iegūt ar *B. circulans*  $\beta$ -galaktozidāzi Lactazyme – B, sasniedzot gandrīz pusi no sākotnējās laktozes koncentrācijas, jeb 46%. Savukārt, *A. oryzae*  $\beta$ - galaktozidāzes gadījumā pārkonvertēšana bija notikusi ar gandrīz trešdaļu no sākotnējās laktozes, jeb 29%. Sākotnējās laktozes un kopējo GOS vērtības pēc reakcijas (g/l) skatīt 8. tabulā.

8. tabula

Sākotnējā laktozes koncentrācija pirms  $\beta$ -galaktozidāžu reakcijas un kopējā GOS koncentrācija (g/l) pēc  $\beta$ -galaktozidāžu reakcijas. Reakcija veikta inkubatorā–kratītājā: 24h, +50°C, 140 RPM.

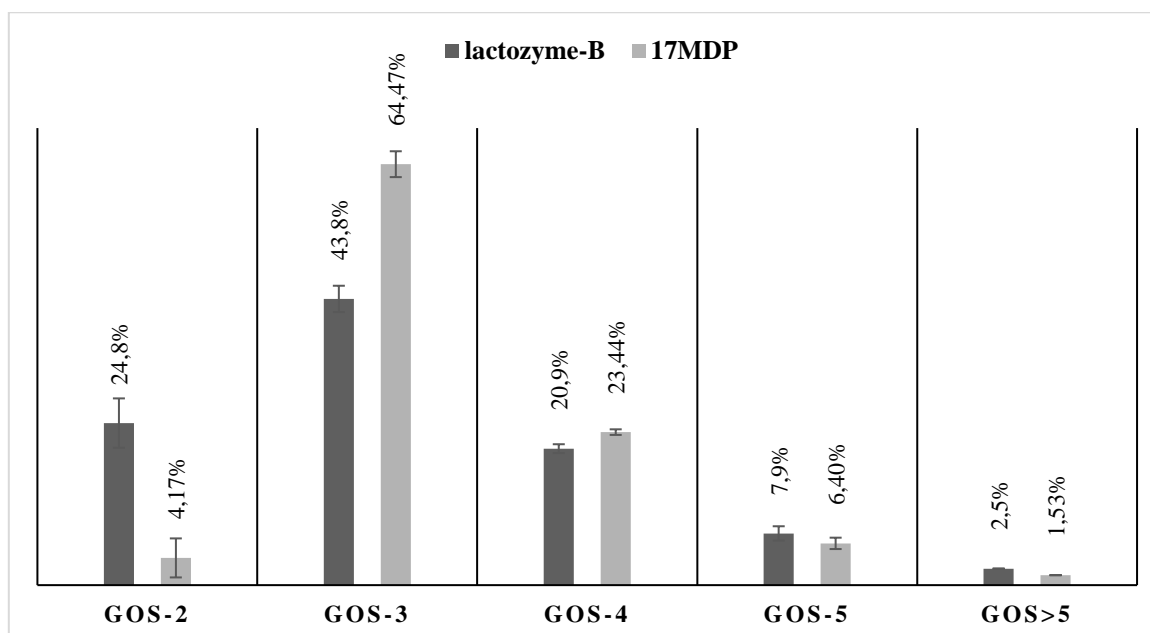
Table 8

Initial lactose concentration (g/l) before  $\beta$ -galactosidase reaction ar total GOS concentration (g/l) after  $\beta$ -galactosidase reaction The reaction was performed in an incubator-shaker: 24 h, +50°C, 140 RPM.

	Sākotnējā laktozes koncentrācija (g/l)	Kopējā GOS koncentrācija pēc reakcijas (g/l)
Piena permeāts + Lactazyme-B	498,2±2,3	228,6±13,1
Piena permeātas + 17MDP		145,8±9,8

Papildus tika noteikts GOS ar dažādu polimerizācijas pakāpi (DP) koncentrācijas reakcijas maisījumos ar pievienotām  $\beta$ -galaktozidāzēm (3. attēls). Procentuālās vērtības tika aprēķinātas no kopējo GOS koncentrācijas (g/l). Abos reakcijas maisījumos GOS ar polimerizācijas pakāpi 3 (GOS-3) aizņēma lielāko daļu, attiecīgi reakcijas maisījumā ar Lactazyme-B no kopējiem GOS, GOS-3 aizņēma gandrīz pusi (44%), savukārt reakcijas maisījumā ar 17MDP – vairāk kā pusi no kopējiem GOS, jeb 65%. Novērtējot otras lielākās koncentrācijas, bija novērojamas atšķirības starp enzīmiem, respektīvi ar Lactazyme-B bija novērojams, ka otrs augstākais iznākums ir ar GOS-2, kur tas sasniedza vienu ceturtdaļu no kopējiem GOS, jeb 25%, taču ar 17MDP otrs augstākais iznākums bija ar GOS-4, kur tas arī sasniedza aptuveni vienu ceturtdaļu no kopējiem GOS, jeb 24%. GOS-5 procentuālais

iznākums ir zems un tas nepārsniedz 8% abos gadījumos, un GOS ar polimerizācijas pakāpi, kas ir augstāka par 5, iznākums ir viszemākais, salīdzinot ar pārējiem GOS veidiem. Gan GOS-5, gan GOS>5 gadījumos ir novērojamas atšķirības starp reakcijā izmantotajiem enzīmiem, taču tās nav lielas un starpība starp tiem nepārsniedz ~1,5%.



3. attēls. Dažādu GOS veidu procentuālais (%) sastāvs atsevišķos reakcijas maisījumos ar 2 pievienotām  $\beta$ -galaktozidāzēm: Lactazyme-B un Lactase 17MDP (attēlā 17MDP), reakcija veikta inkubatorā-krautītājā: 24h, +50°C, 140 RPM.

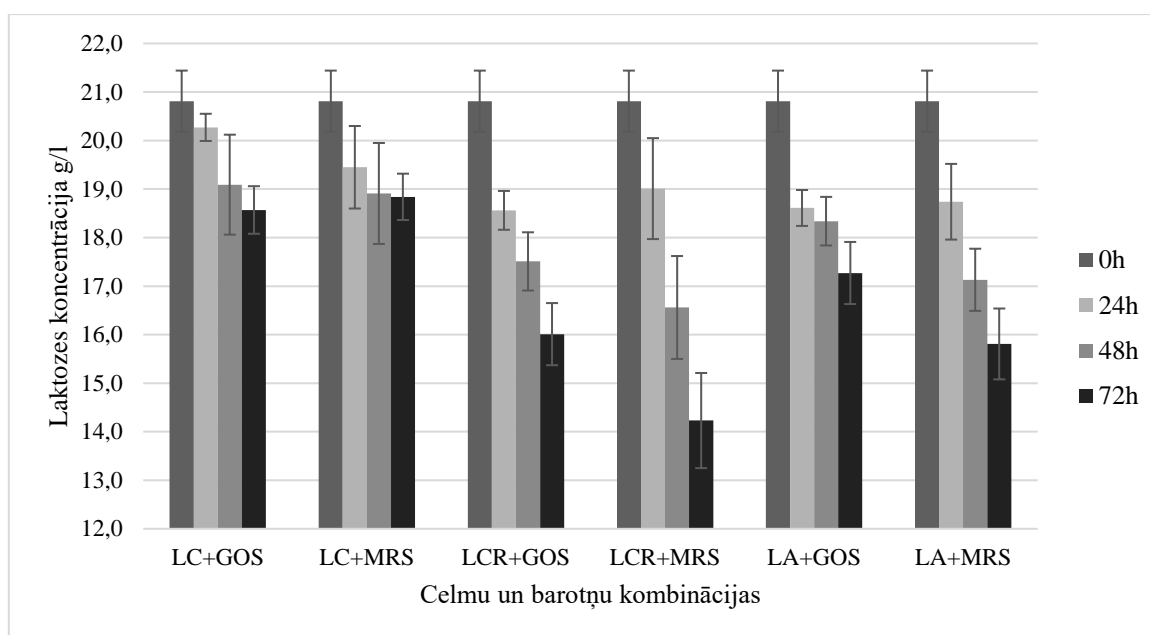
Figure 3. Percentage (%) composition of different types of GOS in separate reaction mixtures with 2 added  $\beta$ -galactosidases: Lactazyme-B and Lactase 17MDP, reaction in a incubator-shaker: 24h, + 50° C, 140 RPM.

Tika konstatēts, ka laktozes pārkonvertēšanas process ar Lactazyme – B pēc 24 stundu biosintēzes dod augstāku GOS koncentrāciju, salīdzinot ar Lactase 17MDP, tāpēc turpmākajos pētījumos tiek izmantots tieši no šī enzīma iegūtais GOS maisījums.

### 3.2. Probiotisko baktēriju kultivācija GOS maisījumā ar dažādām piedevām

Veikta 3 dienu fermentācija divu veidu barotnēs – GOS bez pievienotām piedevām un GOS ar pilnu MRS Broth barotni, kurām bija pievienoti celmi: *Lactobacillus casei*-01, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* un *Lactobacillus acidophilus*-05. Fermentācijas laikā tika ņemti paraugi un veiktas HPLC analīzes, lai noteiktu cukuru sastāva izmaiņas katrā barotnē.

4. attēlā ir novērojamas laktozes koncentrācijas (g/l) izmaiņas laika gaitā katrā no barotnēm ar katru no celmiem. Straujākais laktozes koncentrācijas kritums ir novērojams barotnēs ar pievienotu *Lactobacillus rhamnosus*, kur GOS barotnē bez pievienotām piedevām laktozes kritums ir 4,8 g/l, savukārt GOS barotnē ar pievienotu pilno MRS barotni, laktozes kritums ir 6,6 g/l pēc 3 dienu fermentācijas. *Lactobacillus acidophilus* barotnēs arī tika novērots laktozes samazinājums, kur attiecīgi tas bija 3,5 g/l (GOS bez piedevām) un 5g/l (GOS ar pilno MRS Broth barotni). Zemākās laktozes koncentrācijas izmaiņas tika novērotas ar *Lactobacillus casei* celmu, kur atšķirībā no *L. rhamnosus* un *L. acidophilus*, abās barotnēs laktozes koncentrācijas kritums pēc 3 dienu fermentācijas bija minimāls. Respektīvi tika novērots 2,2 g/l laktozes kritums GOS barotnē bez piedevām, savukārt 1,9 g/l kritums GOS barotnē ar pievienotu pilno MRS Broth barotni. Starpība starp *L. rhamnosus* un *L. casei* laktozes iznākumu beigu dienā GOS barotnē bez piedevām bija 2,5 g/l, bet GOS barotnē ar pievienotu pilno MRS barotni 4,6 g/l. Starp barotnēm laktozes iznākuma starpība bija augstākā (1,8 g/l) barotnēs ar pievienotu *L. rhamnosus*.



4. attēls. Laktozes koncentrācijas (g/l) izmaiņas laika gaitā divās barotnēs: GOS maisījums bez pievienotām piedevām (GOS) un GOS maisījums ar pievienotu pilno MRS Broth barotni (MRS); un trīs celmiem: *Lactobacillus casei*-01 (LC), *Lactobacillus rhamnosus* (LCR) un *Lactobacillus acidophilus*-05 (LA). Fermentācija veikta inkubatorā–kratītājā: 72h, +37°C, 100 RPM.

Figure 4. Changes in lactose concentration (g/l) over time in two culture medias: GOS mixture without additives (GOS) and GOS mixture with added complete MRS Broth medium (MRS); and three strains: *Lactobacillus casei*-01 (LC), *Lactobacillus rhamnosus* (LCR), and *Lactobacillus acidophilus*-05 (LA). Fermentation was performed in an incubator–shaker: 72h, +37°C, 100 RPM.

Aprēķinot laktozes kritumu no sākotnējās kopējo ogļhidrātu koncentrācijas (g/l), tika konstatēts, ka *L. casei* gadījumā ir tikusi utilizēta aptuveni 10% laktoze abos barotņu veidos, *L. rhamnosus* gadījumā GOS barotnē bez pievienotām piedevām laktozes patēriņš sasniedza vienu ceturtdaļu no kopējiem cukuriem, jeb 25%, bet barotnē ar pievienotu pilno MRS Broth – 30% no sākotnējās kopējo cukuru koncentrācijas. Savukārt, *L. acidophilus* gadījumā laktozes patēriņš sasniedza 70% no sākotnējās kopējo ogļhidrātu koncentrācijas GOS barotnē bez pievienotām piedevām un 50% barotnē ar pievienotu pilno MRS Broth barotni.

Glikozes utilizācija *L. casei* gadījumā ir notikusi gandrīz 100% no kopējo ogļhidrātu koncentrācijas (g/l), attiecīgi 97% GOS barotnē bez pievienotām piedevām un 94% GOS barotnē ar pievienotu pilno MRS Broth barotni. *L. rhamnosus* gadījumā patērētā glikozes proporcija ir bijusi salīdzinoši mazāks, respektīvi 67% GOS bezpiedevu barotnē un 40% barotnē ar pievienotu MRS Broth. *L. acidophilus* gadījumā glikozes patēriņš ir bijis 41% (GOS bez piedevām) 94% (GOS ar pilno MRS Broth barotni). Laktozes, glikozes un kopējo ogļhidrātu vērtības (g/l) skatīt 9.tabulā.

9. tabula

Laktozes, glikozes un kopējo ogļhidrātu koncentrācijas (g/l) starpība starp 1. un 3. dienu.  
Fermentācija veikta inkubatorā–kratītājā: 72h, +37°C, 100 RPM.

Table 9

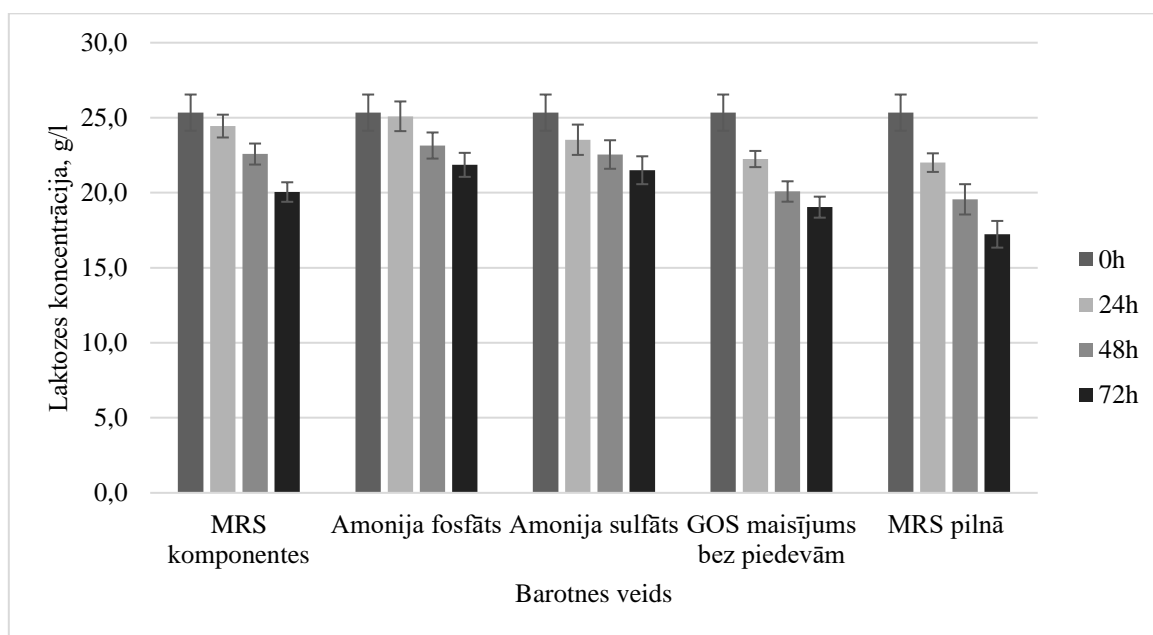
Difference between lactose, glucose and total carbohydrate concentration (g/l) between 1. and 3. day. Fermentation was performed in an incubator-shaker:72h,+37°C, 100 RPM.

	Laktozes patēriņš (g/l) (starpība starp 1. un 3. dienu)	Glikozes patēriņš (g/l) (starpība starp 1 un 3 dienu)	Kopējo ogļhidrātu patēriņš (g/l) (starpība starp 1 un 3 dienu)
LC + GOS	2,02±0,63	19,84±0,19	20,41±2,21
LC + (MRS+GOS)	3,10±0,67	22,87±0,21	24,32±1,96
LCR + GOS	4,52±0,85	11,91±0,23	17,88±1,57
LCR + (MRS+GOS)	6,85±0,78	9,06±0,25	22,14±1,76
LA + GOS	2,86±0,64	1,68±0,20	4,05±1,45
LA + (MRS+GOS)	4,78±0,51	8,54±0,28	12,2±1,52

Veikta 3 dienu fermentācija 4 veidu barotnēs – GOS maisījums ar MRS Broth komponentēm (bez peptona, gaļas un rauga ekstrakta), GOS maisījums ar pievienotu amonija fosfātu ((NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), GOS maisījums ar pievienotu amonija sulfātu ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) un, lai varētu veikt salīdzināšanu, GOS bez pievienotām piedevām. Barotnēm tika pievienots tikai

*Lactobacillus rhamnosus*, jo šis celms uzrādīja augstu laktozes patēriņu, salīdzinot ar *L. casei* un *L. acidophilus*.

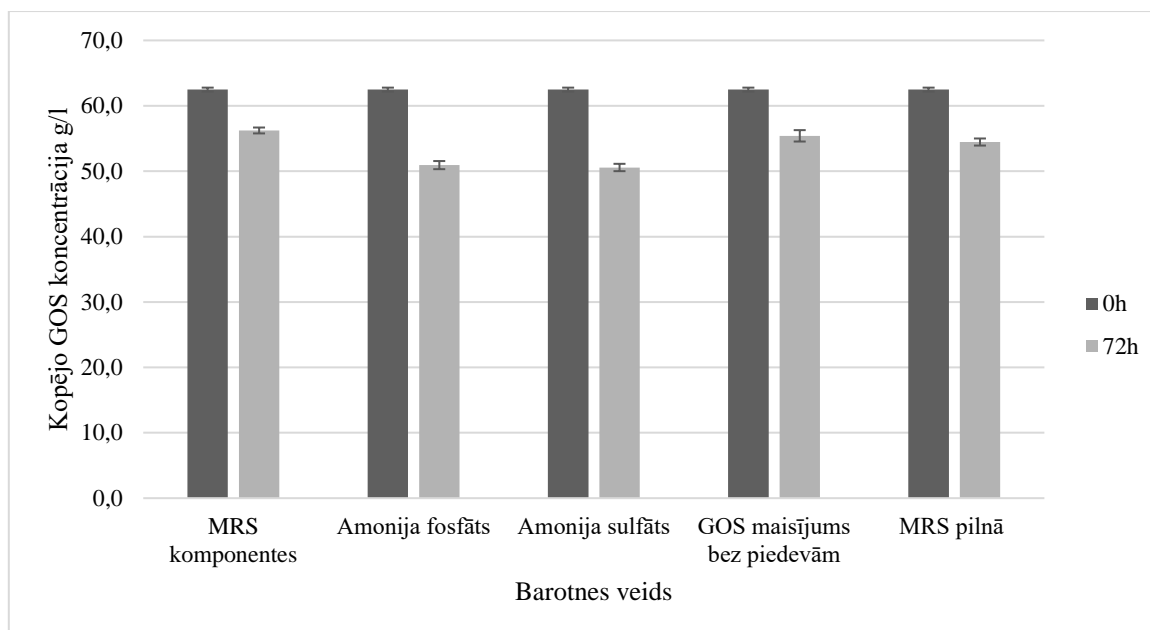
Laktozes koncentrācijas (g/l) izmaiņas laika gaitā katrā no barotnēm ar *L. rhamnosus* ir novērojamas 5. attēlā. Mazākās laktozes koncentrācijas izmaiņas tika novērotas ar GOS barotnēm, kurām tika pievienots amonija fosfāts un amonija sulfāts, attiecīgi kritums bija 3,8 g/l un 4,2 g/l pēc 3 dienu fermentācijas. Savukārt lielākais kritums tika novērots GOS barotnē bez piedevām (6,6 g/l), salīdzinoši barotnē ar MRS komponentēm tas bija 5,6 g/l. GOS barotnē bez pievienotām piedevām pirmajās 24 stundās notiek straujākais laktozes patēriņš (3,4 g/l), taču barotnē ar pievienotu amonija fosfātu, lēnākais (1 g/l).



5. attēls. Laktozes koncentrācijas (g/l) izmaiņas laika gaitā četrās barotnēs: GOS maisījums ar MRS komponentēm, GOS maisījums ar pievienotu amonija fosfātu, GOS maisījums ar pievienotu amonija sulfātu, GOS bez pievienotām piedevām; *Lactobacillus rhamnosus* (LCR). Fermentācija veikta inkubatorā–krotītājā: 72h, +37°C temperatūrā, 100 RPM.

Figure 5. Changes in lactose concentration (g/l) over time in four culture media: GOS mixture with added MRS components, GOS mixture with added ammonium phosphate, GOS mixture with added ammonium sulphate, GOS without added additives; *Lactobacillus rhamnosus* (LCR). Fermentation was performed in an incubator-shaker: 72h, + 37°C, 100 RPM.

6. attēlā ir redzamas kopējo GOS koncentrācijas (g/l) izmaiņas no pirmās līdz trešajai dienai katrā no barotnēm. Tika novērots, ka barotnēs ar pievienotu amonija fosfātu un amonija sulfātu, GOS utilizācija bija aktīvākā, salīdzinot ar pārējām barotnēm, attiecīgi 11,5 g/l un 11,6 g/l 3 dienu periodā. Savukārt, barotnē ar pievienotu pilno MRS Broth barotni, GOS patēriņš bija salīdzinoši mazāks – 7,8 g/l, GOS barotnē bez pievienotām piedevām – 7,6 g/l un barotnē ar pievienotām MRS komponentēm – 6,2 g/l.



6. attēls. Kopējā GOS koncentrācijas (g/l) izmaiņas laika gaitā četrās barotnēs: GOS maisījums ar MRS komponentēm, GOS maisījums ar pievienotu amonija fosfātu, GOS maisījums ar pievienotu amonija sulfātu, GOS bez pievienotām piedevām; *Lactobacillus rhamnosus*. Fermentācija veikta inkubatorā–kratītājā: 72h, +37°C, 100 RPM.

Figure 6. Changes in GOS concentration (g / l) over time in four media: GOS mixture with added MRS components, GOS mixture with added ammonium phosphate, GOS mixture with added ammonium sulphate, GOS without added additives. Fermentation was performed by *Lactobacillus rhamnosus* in an incubator - shaker for 72h, at a temperature of + 37°C, 100 RPM.

Papildus aprēķinot, cik liela proporcija no patērētajiem ogļhidrātiem aizņem tieši GOS, varēja novērot, ka GOS patēriņš ir sasniedzis aptuveni 70% abās barotnēs ar pievienotu slāpekļa avotu, GOS barotnē bez piedevām GOS utilizēšana ir notikusi aptuveni 54% no kopējiem ogļhidrātiem, savukārt barotnēs ar pievienotu MRS – 43% (MRS broth komponentes), 35% (MRS Broth pilnā barotne) no kopējiem ogļhidrātiem. Kopējo ogļhidrātu un kopējo GOS koncentrācijas izmaiņas (g/l) ir novērojamas 10. tabulā.

Kopējo GOS un kopējo ogļhidrātu koncentrācijas (g/l) starpība starp 1. un 3. dienu.  
Fermentācija veikta inkubatorā–kratītājā: 72h, +37°C, 100 RPM.

Table 10

Difference between total GOS and total carbohydrate concentration (g/l) between days 1 and 3. Fermentation was performed in an incubator-shaker: 72h, +37°C, 100 RPM.

	Kopējo GOS patēriņš (g/l)	Kopējo ogļhidrātu patēriņš (g/l)
GOS + MRS Broth komponentes	6,24±0,37	14,40±3,38
GOS + amonija fosfāts	11,51±0,46	16,21±2,50
GOS + amonija sulfāts	11,64±0,43	16,06±3,60
GOS bez piedevām	7,57±0,59	13,86±3,06
GOS + MRS Broth pilnā	7,80±0,42	22,14±3,11

### 3.3. *L. casei*, *L. rhamnosus* un *L. acidophilus* izdzīvotība un ogļhidrātu sastāva izmaiņas kultivēšanas un uzglabāšanas laikā

*Lactobacillus casei*-01, *Lactobacillus rhamnosus* un *Lactobacillus acidophilus*-05 celmi tika kultivēti GOS barotnē bez pievienotām piedevām 7 dienas. Pēc tam tika veikts uzglabāšanas tests, kur barotnes ar dzīvām šūnām tika ievietotas ledusskapī un turētas 3 nedēļas. Paralēli tika ņemti paraugi HPLC analīzēm, lai noteiktu pienskābes un cukuru izmaiņas fermentācijas un uzglabāšanas laikā.

11. tabulā ir redzamas pienskābes koncentrācijas (g/l) un pH vērtību izmaiņas 7 dienu fermentācijas laikā. Ir novērojamas atšķirības starp producētās pienskābes daudzumu. Respektīvi *L. acidophilus* to bija producējis vismazāk, taču *L. rhamnosus* visvairāk (starpība 9,05 g/l). Arī pH izmaiņās tika novērots, ka *L. rhamnosus* gadījumā pH no sākotnējās vērtības bija samazinājies visvairāk, respektīvi par 39%, *L. casei* gadījumā novērojams pH vērtības kritums par 35% un *L. acidophilus* – par 33%. Kopumā pH vērtības tika samazinātas līdz ~4.

## 11. tabula

Pienskābes koncentrācijas (g/l) un pH vērtības izmaiņas *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* un *Lactobacillus acidophilus* kultivācijas laikā GOS barotnē bez piedevām. Fermentācija veikta inkubatorā–kratītājā: 7 dienas, +37°C, 100 RPM.

Table 11

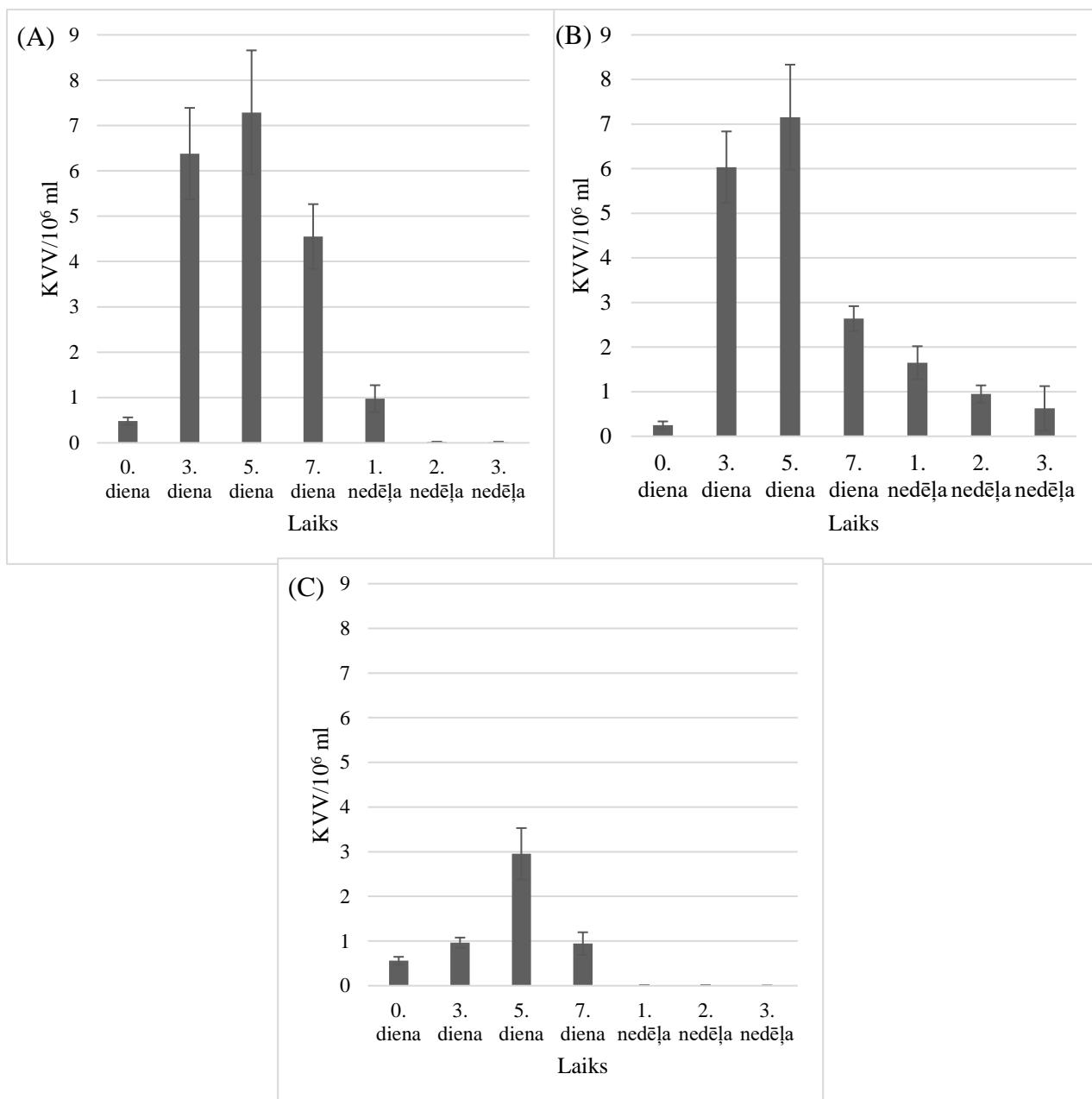
Changes in lactic acid concentration (g/l) and pH during cultivation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* in GOS medium without additives. Fermentation was performed in an incubator-shaker: 7 days, + 37°C, 100 RPM.

	Pienskābe (g/l)		pH	
	0h	168h	0h	168h
LC	0,09±0,01	9,65±0,01	6,32±0,09	4,13±0,09
LCR		15,84±0,03		3,87±0,05
LA		6,79±0,07		4,29±0,20

Kopējās biomasas koncentrācijas izmaiņas ir parādītas 7. attēlā. *L. rhamnosus* līdz pat septītajai dienai uzrādīja augstu biomasas koncentrāciju (KVV virs  $10^6$  ml). Piektajā dienā biomasas koncentrācija bija augstākā, pēc tam tā sāka samazināties. Pēc pirmās uzglabāšanas nedēļas tika novērots straujš dzīvotspējīgo šūnu kritums pēc fermentācijas 7. dienas, kur biomasas koncentrācija bija samazinājusies aptuveni četras reizes. Uzglabāšanas 1. nedēļā dzīvotspējīgo šūnu skaits bija samazinājies aptuveni 5 reizes, savukārt 2. un 3. nedēļā dzīvotspējīgo šūnu skaits bija zem  $10^6$  KVV/ml.

Salīdzinoši, *Lactobacillus acidophilus* arī uzrādīja augstu biomasas koncentrāciju fermentācijas laikā, kā arī augstākais biomasas pieaugums tika novērots 5. dienā. Atšķirībā no *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* uzrādīja labākos augšanas rezultātus arī uzglabāšanas laikā, biomasas koncentrāciju noturot virs  $10^6$  KVV/ml arī pēc 3. nedēļas, kad barotnes tika turētas zemā temperatūrā.

*Lactobacillus casei* kopumā salīdzinot ar pārējiem celmiem, uzrādīja viszemāko biomasas pieaugumu. Tāpat kā pārējiem celmiem, arī *L. casei* augstāko biomasas koncentrāciju uzrādīja fermentācijas 5. dienā, taču salīdzinot *L. casei* ar pārējiem celmiem, biomasas koncentrācija 5. dienā bija aptuveni 2 reizes zemāka, kā arī starp 7. fermentācijas dienu 1. uzglabāšanas nedēļu varēja novērot, ka dzīvotspējīgo šūnu skaits ir sarucis līdz minimumam un arī turpmākajās nedēļās tas saruka vēl vairāk, biomasas koncentrācijai esot zem  $10^6$  KVV/ml.



7. attēls. *Lactobacillus rhamnosus* (A), *Lactobacillus acidophilus* (B), *Lactobacillus casei* (C) augšanas dinamika kultivācijas laikā līdz 7. dienai un uzglabāšanas laikā no 1. līdz 3. nedēļai GOS maisījumā bez pievienotām piedevām. Fermentācija veikta inkubatorā–kratītājā: 7 dienas, +37°C, 100 RPM, uzglabāšana veikta ledusskapī: 3 nedēļas, +4°C.

Figure 7. Growth dynamics of *Lactobacillus rhamnosus* (A), *Lactobacillus acidophilus* (B), *Lactobacillus casei* (C) during cultivation up to day 7 and during storage from 1 to 3 weeks in GOS mixture without added additives. Fermentation was performed in an incubator-shaker: 7 days, + 37°C, 100 RPM, storage performed in a refrigerator: 3 weeks, + 4°C.

Glikozes, laktozes, kopējo GOS un kopējo ogļhidrātu izmaiņas fermentācijas un uzglabāšanas laikā ir norādītas 12. tabulā.

Fermentācijas un uzglabāšanas laikā ir novērojamas izmaiņas kopējo ogļhidrātu koncentrācijā (g/l). *Lactobacillus casei* gadījumā kopējo ogļhidrātu koncentrācijas turējās augstas gan fermentācijas, gan uzglabāšanas laikā. Nav novērojams aktīvs ogļhidrātu patēriņš – no pirmās fermentācijas dienas līdz 3. uzglabāšanas nedēļai kopējo ogļhidrātu koncentrācija ir pazeminājusies par aptuveni 3%. Savukārt, *L. acidophilus* un *L. rhamnosus* gadījumā augstākais kopējo ogļhidrātu koncentrācijas kritums novērojams pirmajās 7 dienās, kad notiek fermentācijas eksperiments - aptuveni 4% kopējās ogļhidrātu koncentrācijas kritums ar abiem celmiem. Savukārt uzglabāšanas eksperimenta laikā ogļhidrātu koncentrācija ar *L. acidophilus* tika samazināta vēl par 1% (kopā 5% kritums no sākotnējās vērtības), savukārt, *L. rhamnosus* – par 4% (kopā 8% kritums no sākotnējās vērtības).

*L. casei* gadījumā laktoze nav tikusi būtiski patērēta nevienā no eksperimenta stadijām, savukārt ir novērojams 13% kritums laktozes koncentrācijā no pirmās fermentācijas dienas līdz pēdējai uzglabāšanas nedēļai ar *L. acidophilus*, taču ar *L. rhamnosus* – 26% laktozes koncentrācijas (g/l) samazinājums. Ar šiem diviem celmiem straujākā laktozes utilizācija ir notikusi tieši fermentācijas laikā.

Lielākais glikozes koncentrācijas kritums fermentācijas eksperimenta laikā ir novērojams ar *L. casei* celmu, aptuveni 30% kritums, savukārt, ar *L. acidophilus* ir 17% kritums, bet ar *L. rhamnosus* – 12%. Uzglabāšanas eksperimenta laikā nav novērojams augsts glikozes patēriņš, respektīvi ar nevienu celmu tas nepārsniedz 5%.

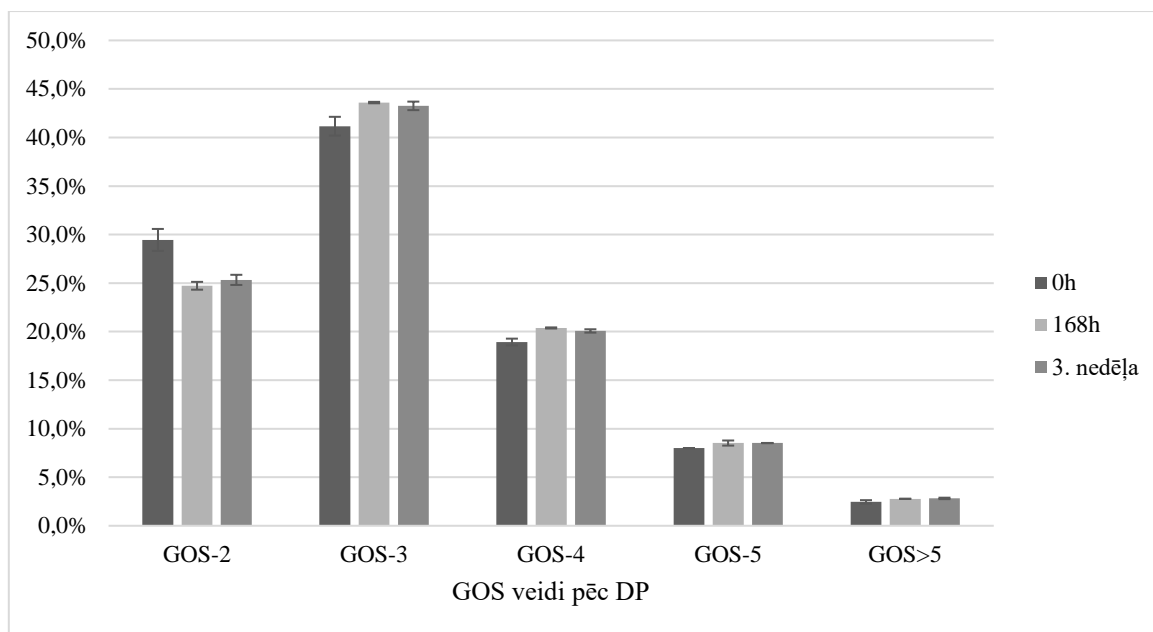
Ir novērojami kopējo GOS koncentrāciju (g/l) pieaugumi fermentācijas laikā. Ar *L. casei* – 10% pieaugums, *L. rhamnosus* – 3% pieaugumus, bet ar *L. acidophilus* – 2% pieaugums. Savukārt, uzglabāšanas laikā ir novērojams, ka GOS tiek patērēts. *L. casei* un *L. rhamnosus* gadījumā novērojams 4% pieaugums 3. uzglabāšanas nedēļu laikā, taču *L. acidophilus* gadījumā kopējās GOS koncentrācijas (g/l) pieaugums ir bijis minimāls – aptuveni 1%. Tikai *L. rhamnosus* gadījumā kopējā GOS koncentrācija pēc fermentācijas un uzglabāšanas eksperimentiem ir zemāka par sākotnējo vērtību.

12. tabula. Glikozes, laktozes, kopējo GOS un kopējo ogļhidrātu koncentrācijas (g/l) izmaiņas starp fermentācijas un uzglabāšanas laikā GOS maisījumā bez pievienotām piedevām. Fermentācija veikta inkubatorā–kratītājā: 7 dienas,+37°C, 100 RPM, uzglabāšana veikta ledusskapī: 3 nedēļas, +4°C

Changes in the concentration of glucose, lactose, total GOS and total carbohydrates (g/l) between fermentation and storage in a GOS mixture without additives. Fermentation was performed in an incubator-shaker: 7 days,+ 37°C, 100 RPM, storage performed in a refrigerator: 3 weeks, + 4°C

	Glikozes koncentrācija (g/l)			Laktozes koncentrācija (g/l)		
	0h	168h	3. nedēļa	0h	168h	3. nedēļa
LC	22,89±0,25	16,18±0,05	15,83±0,25	24,72±0,70	25,23±0,14	24,46±0,53
LCR		20,28±0,31	19,41±0,10		19,18±0,31	17,78±0,38
LA		19,07±0,23	18,80±0,14		21,18±0,17	20,86±0,23
	Kopējo GOS koncentrācija (g/l)			Kopējo ogļhidrātu koncentrācija (g/l)		
	0h	168h	3. nedēļa	0h	168h	3. nedēļa
LC	62,63±1,23	69,50±0,09	66,79±0,75	111,61±1,85	111,58±0,29	108,73±0,08
LCR		64,14±0,54	61,76±0,71		107,42±1,25	102,72±0,38
LA		63,81±0,38	63,04±0,56		107,41±0,98	106,09±0,98

Savukārt, skatoties izmaiņas GOS profilā ir novērojams, ka ar *L. rhamnosus* celmu izmaiņas ir notikušas ar visiem GOS veidiem (8. attēls). GOS profila procentuālās vērtības ir aprēķinātas no kopējās GOS koncentrācijas (g/l). Respektīvi ir novērojams, ka fermentācijas laikā GOS-2 koncentrācija samazinās par 5%, savukārt pārējo GOS veidu koncentrācijas pieaug, attiecīgi, GOS-3 pieaug par 2,4%, GOS-4 par 1,5%, savukārt zemāki procentuālo vērtību pieaugumi novērojami ar GOS-5 (0,5%), GOS>5 (0,3%). Uzglabāšanas eksperimenta laikā novērojamas mazas izmaiņas GOS profilā (zem 1%). Kā arī *L. casei* un *L. acidophilus* gadījumā netika novērotas vērā ņemamas izmaiņas ne fermentācijas laikā, ne uzglabāšanas laikā.



8. attēls. GOS profila izmaiņas fermentācijas un uzglabāšanas laikā ar *Lactobacillus rhamnosus*. Fermentācija veikta inkubatorā–kratītājā: 7 dienas, +37°C, 100 RPM, uzglabāšana veikta ledusskapī: 3 nedēļas, +4°C.

Figure 8.Changes in GOS profile during fermentation and storage with *Lactobacillus rhamnosus*. Fermentation was performed in an incubator-shaker: 7 days, + 37°C100 RPM, storage performed in a refrigerator: 3 weeks, + 4°C.

## 4. DISKUSIJA

### 4.1. GOS maisījuma iegūšana ar divām dažādām $\beta$ -galaktozidāzēm

Lai veiktu piena permeātā esošās laktozes enzimātisku biokonversiju, laktozes koncentrācija bija jāpielāgo izvēlētajam enzīma optimālākajai koncentrācijai. Laktozes pārkonvertēšanai līdz galaktooligosaharīdiem, izmanto  $\beta$ -galaktozidāzes, kuras veic ne tikai laktozes hidrolīzi līdz tās monomēriem – glikozi un galaktozi, bet papildus veic arī transgalaktozilāciju, kur laktoze strādā kā  $\beta$ -D-galaktozilgrupu akceptors un veido di-, tri-, tetra- un augstāku oligosaharīdu ķēdi, veidojot GOS polimērus ar dažādām polimerizācijas pakāpēm, tādā veidā paaugstinot prebiotiku saturu produktā. Tā kā pētījuma mērķis bija iegūt GOS maisījumu un veikt tajā mikroorganismu kultivēšanu, lai izvērtētu iespēju izmantot piena permeātu kā substrātu sinbiotiska produkta ieguvei, bija svarīgi izvērtēt abu  $\beta$ -galaktozidāžu rezultātā iegūto reakcijas maisījuma ogļhidrātu sastāvu.

Piena permeāta laktozes koncentrācija pirms enzimātiskās reakcijas veikšanas bija 50% un reakcija veikta +50°C temperatūrā, kas pēc literatūras datiem ir optimāla koncentrācija un temperatūra GOS ieguvei (Torres *et al.* 2010). Samazinot laktozes koncentrāciju, attiecība starp ūdeni un laktozi samazinās, tādējādi tiek palielināta hidrolīzes aktivitāte, jo tiek uzskatīts, ka ūdens arī var strādāt kā  $\beta$ -D-galaktozilgrupu akceptors (Neri *et al.* 2009). No tā izriet, ka reakcijas laikā lielāks pārsvars būtu uz laktozes hidrolīzes procesiem, nevis transgalaktozilāciju, kas mūsu gadījumā nav vēlama norise, jo tādā veidā tiktu samazināta GOS koncentrācija. Savukārt, ja laktozes koncentrācija būtu augstāka par 50-60%, tad šķīdums būtu pārāk blīvs un lipīgs un nebūtu iespējams veikt optimālu enzimātisko reakciju (Chen *et al.* 2002). Laktozes koncentrāciju varētu palielināt uzlabojot tās šķīdību, jeb paaugstinot temperatūru, bet temperatūras paaugstināšana nav iespējama dēļ riska inaktivēt enzīmus.

Salīdzinot šos divus enzīmus -  $\beta$ -galaktozidāzi, kas iegūta no *Aspergillus oryzae* un *Bacillus circulans*, tika novērots, ka augstākā iegūtā galaktooligosaharīdu (GOS) koncentrācija un zemākā iegūta laktozes koncentrācija pēc 24 stundu inkubācijas ir ar *B. circulans*  $\beta$ -galaktozidāzi. Iemesls tam varētu būt tāds, ka no pelējuma sēnes iegūtai  $\beta$ -galaktozidāzei optimālākā šķīduma pH ir skāba, aptuveni 4,5, taču pētījumā izmantotā piena permeāta pH ir tuvāk saldajām sūkalām, kas ir aptuveni 6,2, rezultējoties zemākā *A. oryzae*  $\beta$ -galaktozidāzes aktivitātē, nekā no *B. circulans* iegūtajai  $\beta$ -galaktozidāzei, kuras optimālākā pH vērtība sakrīt ar piena permeāta pH vērtību. Arī zema GOS procentuālais iznākums *A. oryzae* gadījumā sakrīt ar iepriekš veiktiem pētījumiem, kuros minēts, ka augstākā iegūtā GOS koncentrācija no

piena produktiem ir 30% (Vera *et al.* 2011). Zemāka producētā GOS koncentrācija ar *A. oryzae*  $\beta$ -galaktozidāzi varētu būt saistīta ar augstu enzīma hidrolītisko aktivitāti, jo tika novērots, ka starpība starp glikozi un galaktozi pēc 24 stundu inkubācijas, bija mazāka, salīdzinot ar *B. circulans*  $\beta$ -galaktozidāzi, kas liecina par to, ka galaktoze netiek izmantota GOS formācijai (Chen *et al.* 2002). Kā arī Mozaffar *et al.* (1985) pētījumā tika pierādīts, ka pienā esošie katjoni neinhibē *B. circulans*  $\beta$ -galaktozidāzes darbību, salīdzinot ar citām  $\beta$ -galaktozidāzēm, kuras samazināja savu aktivitāti kalcija un nātrija klātbūtnē, kas sniedz priekšrocības izmantot tieši *B. circulans*  $\beta$ -galaktozidāzi piena industrijā.

GOS sintēzes laikā var novērot, ka GOS ar dažādu polimerizācijas pakāpi (DP) sadalījums ir atšķirīgs starp reakcijā izmantotajām  $\beta$ -galaktozidāzēm, taču abu izmantoto  $\beta$ -galaktozidāžu reakcijas rezultātā GOS-3 bija dominējošais oligosaharīds no kopējiem producētiem GOS. Kā arī tika novērots, ka pieaugot galaktooligosaharīdu polimerizācijas pakāpei, samazinās tā koncentrācija reakcijas maisījumā. Tas ir saistīts ar GOS formācijas specifiku, kur var novērot, ka GOS-4 izveidē ir nepieciešams, lai būtu GOS-3, GOS-5 izveidei nepieciešams GOS-4 utt., jo šie saharīdi strādā kā galaktozes akceptori nākamajās formācijas stadijās (Sanz-Valero 2009). Kā arī šīs enzīma reakcijas ir laika atkarīgas - jo ilgāka reakcijas norise, jo aktīvāka ir GOS ar lielāku molmasu sintēze. Šajā eksperimentā reakcija tika veikta 24 stundas, jo iepriekš veiktā pētījumā (Vigants *et al.* 2019) tika novērots, ka pirmajās 24 stundās notiek straujākā GOS produkcija, kura nākamajās stundās nolīdzinās un vērā ņemami vairs nepaaugstinās, kā arī augstākā sasniegtā koncentrācija bija ar  $\beta$ -galaktozidāzes koncentrāciju 1 g/l, tāpēc šie parametri tika pielietoti arī šajā pētījumā, lai veicinātu augstu GOS produkciju. Iegūtie rezultāti par GOS profilu un atšķirībām starp abām  $\beta$ -galaktozidāzēm sakrīt ar literatūrā publicētajiem datiem (Vera *et al.* 2012; Illanes 2011).

Vērts pieminēt, ka literatūrā iepriekš ir tikušas salīdzinātas  $\beta$ -galaktozidāzes no *B. circulans* un *A. oryzae* kā arī no *K. lactis*, un šīs  $\beta$ -galaktozidāzes arī ir populārākie izmantotie enzīmi piena industrijā, taču piena permeāta izmantošana šādām ogļhidrātu biokonversijām ir maz aprakstīta, tāpēc šo divu mikrobiālo enzīmu salīdzināšana šajā pētījumā dod papildus guvumu tiešai neapstrādāta un nefiltrēta piena permeāta pulvera izmantošanai priekš GOS sintēzes.

#### 4.2. Piedevu ietekme uz GOS maisījuma fermentāciju

Tā kā GOS maisījumā ir vēl no hidrolīzes pāri palikusī galaktoze un glikoze, kā arī vēl neizreagējušā laktoze, ir vēlams piemeklēt optimālākos fermentācijas apstākļus, lai pienskābās

baktērijas fermentācijas laikā patērētu nevajadzīgos cukurus, turpinātu veikt transgalaktozilāciju un hidrolīzes procesus un pēc iespējas mazāk patērētu GOS. Šajā eksperimenta posmā netika veikts izdzīvotības tests, jo pirms dzīvotspējas novērtēšanas, bija jāpiemeklē optimālākā barotne *Lactobacillus* spp. kultivēšanai.

*Lactobacillus* spp. aug tikai ar uzturvielām bagātās barotnēs (Bernardeau *et al.* 2006). Salīdzinot GOS maisījumu bez piedevām un MRS šķidro barotni, ir paredzams, ka labākie rezultāti būs ar MRS šķidro barotni, jo tā ir speciāli paredzēta pienskābajām baktērijām, un tajā ir atrodamas tādas piedevas kā peptons, rauga ekstrakts, gaļas ekstrakts un glikoze, kas pienskābās baktērijas apgādā ar visiem tām nepieciešamajiem elementiem – oglekļa, slāpekļa avotu, minerālvielām un vitamīniem (Hugo *et al.* 2016). Zinot, ka GOS maisījums bez piedevām ir salīdzinoši nabadzīgs substrāts mikroorganismu kultivēšanai, GOS maisījums tika papildināts ar MRS Broth barotni (bez glikozes), lai izvērtētu, kā notiek GOS maisījuma fermentācija gadījumā, kad ir nodrošināti visi nepieciešamie augšanas faktori.

Skatoties laktozes koncentrācijas, tika novērots, ka *L. casei*-01 celms laktozi utilizē vismazāk, salīdzinot ar pārējiem celmiem. To varētu izskaidrot ar to, ka paralēli skatoties glikozes patēriņu, tas abās barotnēs ir samazinājies par aptuveni 95% no kopējās ogļhidrātu koncentrācijas, kas liecina par to, ka šajā gadījumā *L. casei* primārais oglekļa avots ir bijusi glikoze, nevis laktoze vai GOS, kā tas ir novērots ar pārējiem diviem celmiem. Līdzīgu ainu varēja novērot arī ar *L. acidophilus* un MRS šķidro barotni, kur glikozes patēriņš bija lielāks nekā laktozes patēriņš, savukārt, GOS barotnē bez pievienotām piedevām glikozes patēriņš bija uz pusi mazāks, tā vietā utilizējot pārsvarā laktozi. Kopumā visām eksperimentā izmantotajām pienskābajām baktērijām glikoze ir primārais oglekļa avots, kurš uzreiz arī var tikt patērēts, savukārt laktozes klātbūtnē baktērijām ir jāproducē  $\beta$ -galaktozidāzes, lai varētu notikt tās utilizēšana, tādējādi tiek arī paildzināta lag fāze (Kolev *et al.* 2022), tāpēc primāri tika skatīta laktozes utilizācijas dinamika, jo, ja tiek utilēta laktoze, tad tajā gadījumā paralēli var notikt arī glikozes utilizācija, un tādā veidā būtu iespējams atbrīvoties no vairākiem nevajadzīgiem ogļhidrātiem vienlaicīgi, tāpēc veicot nākamo eksperimentu, tika izmantots tikai *L. rhamnosus* celms, kurš uzrādīja lielāko laktozes koncentrācijas kritumu no sākotnējās vērtības.

Kopumā MRS Broth pievienošana uzrādīja pozitīvus rezultātus uz ogļhidrātu utilizāciju, pateicoties barotnē esošajiem elementiem. Barotnei atsevišķi pievienojot MRS komponentes, kuru sastāvā nebija peptons, rauga ekstrakts un gaļas ekstrakts, salīdzinot ar MRS Broth pilno barotni, tika novērotas atšķirības cukuru profila izmaiņās, kas liek domāt, ka tieši peptons,

rauga un gaļas ekstrakts ir tie elementi, kuri veicina baktēriju augšanu un aktīvu ogļhidrātu patēriņu. Parasti šādos eksperimentos tiek pievienots papildus proteīna avots un dažādi vitamīni, taču tas uzreiz sadārdzina sinbiotiska produkta izmaksas. Kopējā GOS utilizācijā netika novērotas vērā ņemamas atšķirības starp GOS+MRS Broth komponentēm, GOS+MRS Broth pilno barotni un GOS barotni bez piedevām, kas dod pamatojumu izdzīvotības testos izmantot tieši GOS maisījumu bez piedevām. Iemesls, kāpēc MRS barotnē esošo elementu atsevišķa pievienošana GOS maisījumam neuzrādīja vērā ņemamus uzlabojumus, varētu būt tāpēc, ka piena permeātā dabiski ir atrodams slāpekļvielas, kālija un magnija sāļi, kas veicina pienskābo baktēriju fermentācijas procesu (Menchik *et al.* 2019).

### 4.3. Izdzīvotības un uzglabāšanas testi

Organisko skābju esamība produktā piedod produktam specifisku skābenu un patīkamu garšu, tādā veidā uzlabojot tā garšas profilu, kā arī ir pierādīts, ka tas palīdz balansēt produkta saldumu, tāpēc bieži vien produktiem skābes tiek pievienotas atsevišķi, lai nomaskētu cukura klātbūtni (Reddy *et al.* 2016). Izdzīvotības testa (*spot-test*) laikā novērotās pH izmaiņas un pienskābes vērtības ir cieši saistītas. Tika novērots, ka fermentācijas laikā palielinoties, pH vērtības samazinājās un pienskābes daudzums palielinājās. Šāds novērojums ir saistīts ar pienskābo baktēriju metabolismu, kurā notiek laktozes hidrolīze un pēc tam acidoģenēze, kuras laikā tiek producēta pienskābe (Tang *et al.* 2017). Tā kā pētījumā izmantotās pienskābās baktērijas ir homofermentatīvas, vienīgais producētais galvenais metabolīts ir pienskābe, tāpēc pH samazināšanās noritēja tieši pienskābes ietekmē.

Piena permeātu kā substrātu var izmantot dažādu probiotisko mikroorganismu audzēšanai un produktu iegūšanai (Hugo *et al.* 2016). Biomasas pieaugums ir saistīts ar pienskābo baktēriju spēju augt šādos kontrolētos, paātrinātos apstākļos un tolerēt metabolisma rezultātā pieaugošo organisko skābju klātbūtni barotnē (Zokaityte *et al.* 2020). Tika novērots, ka dzīvo šūnu skaits palielinās fermentācijas laikā palielinoties. Augstākais dzīvotspējīgo šūnu skaits tika novērots piektajā dienā, pēc tam biomasai samazinoties. Tā kā 5. dienā substrātā vēl ir pietiekoši daudz fermentējamu ogļhidrātu, var secināt, ka iemesls tālākam biomasas samazinājumam ir pH samazināšanās un substrātā uzkrājušās pienskābes koncentrācijai. Pienskābo baktēriju skābju tolerances līmenis ir saistīts ar šūnā esošiem regulējošiem mehānismiem – neitralizācijas procesiem, protonu pumpi, šūnu membrānas izmaiņām u.c. procesiem (Wang *et al.* 2017). Tā iemesla dēļ arī pie zemām pH vērtībām bija novērojama dzīvotspējīgo šūnu klātbūtne arī pēc piektās fermentācijas dienas un 3 nedēļu

uzglabāšanas eksperimenta laikā. Taču bija novērojamas atšķirības starp *L. rhamnosus* un *L. acidophilus*. Respektīvi *L. rhamnosus* gadījumā bija novērojama augsta biomasa visu fermentācijas laiku, kura strauji pazeminājās, kad tika sākts uzglabāšanas eksperiments, savukārt *L. acidophilus* biomasas samazināšanās bija pakāpeniskāka un arī 3. uzglabāšanas nedēļā bija novērojama dzīvotspējīgo šūnu koncentrācija virs  $10^6$  KVV/ml. Šāds novērojums liek domāt, ka *L. rhamnosus* izdzīvotību daļēji ietekmē arī straujās temperatūras izmaiņas, kuras uzglabāšanas laikā bija zem optimālās temperatūras, taču *L. acidophilus* izdzīvotību vairāk ietekmē uzkrājušos metabolītu koncentrācija un pH samazināšanās. Kopumā no visiem celmiem *L. casei* uzrādīja viszemāko biomasas koncentrāciju.

Pienskābo baktēriju pievienošana laktozes saturošiem produktiem var uzlabot produkta īpašības producēto  $\beta$ -galaktozidāžu dēļ, kuras no laktozes sintezē GOS, taču enzīma izcelsme tieši ietekmē GOS iznākumu un laktozes hidrolīzes aktivitāti, un ir novērojamas atšķirības starp pienskābo baktēriju celmiem (Zokaityte *et al.* 2020). Ir novērojamas cukuru profila izmaiņas starp celmiem, taču nav novērojama šo izmaiņu negatīva ietekme uz kopējo GOS koncentrāciju. Kopumā GOS procentuālais iznākums gan fermentācijas, gan uzglabāšanas laikā saglabājās augsts – vairāk kā puse no kopējiem substrātā esošajiem ogļhidrātiem. Klātesoši bija GOS ar visām analizētajām polimerizācijas pakāpēm, taču lielāko proporciju no GOS sastādīja tieši GOS ar polimerizācijas pakāpi 3. Prebiotiskās īpašības tiek piedēvētas tieši GOS-3 un GOS-4, tāpēc iegūtais maisījums var kvalificēties kā prebiotisks (Illanes *et al.* 2011). Tā kā pāri palikušie monosaharīdi un disaharīds laktoze fermentācijas beigās vēl joprojām ir klātesoši, lai samazinātu produkta kalorisko vērtību un padarītu to pieejamu arī patērētājiem ar laktozes nepanesību, būtu ieteicams pielietot filtrācijas metodes, lai atbrīvotos no liekajiem ogļhidrātiem. Bieži vien sinbiotiska produkta iegūšanā tiek izmantotas kokultūras kā starteri ogļhidrātu selektīvai utilizācijai, taču šādā gadījumā ir jāpiemeklē saderīgi celmi to sinerģisko un antagonistisko mijiedarbību dēļ, kuras pamatā notiek metabolisma procesi (Zokaityte *et al.* 2020). Kā arī, piemeklējot vēlāmā produkta ieguvei atbilstošu probiotiku, ir jāņem vērā tā ogļhidrāta preferences, un konkrētā ogļhidrāta ietekmi uz probiotiku biomasas producēšanu (Watson *et al.* 2013). Šajā pētījumā tika novērots, ka *L. rhamnosus* ir aktīvāks kopējo ogļhidrātu patēriņā, taču *L. acidophilus* uzrāda dzīvotspēju virs  $10^6$  KVV/ml visa uzglabāšanas eksperimenta laikā, tāpēc kā piemērotākais prebiotiskais celms sinbiotiska produkta ieguvei no testētajiem trīs celmiem būtu *L. acidophilus*-05.

## SECINĀJUMI

1. Piemērotākā  $\beta$ -galaktozidāze optimālākajai laktozes konversijai un GOS produkcijai ir lactazyme-B, kurš iegūts no *Bacillus circulans*.
2. Probiotisko celmu kultivāciju var veikt no piena permeāta iegūtajā GOS maisījumā bez piedevām. Papildus slāpekļa un fosfora avotu pievienošana palielina ogļhidrātu utilizāciju ar testētajām pienskābajām baktērijām, bet palielina arī GOS utilizāciju, kas nav vēlama. Papildus piedevu pievienošana arī palielinātu gala produkta izmaksas.
3. Fermentācija un uzglabāšana ar *L. acidophilus* un *L. casei* neizmaina GOS molmasu profilu, bet *L. rhamnosus* gadījumā samazinās GOS-2 īpatsvars kopējā GOS sastāvā.
4. No testētajiem celmiem sliktākos augšanas un izdzīvošanas parametrus uzrādīja *Lactobacillus casei*-01 celms.
5. *Lactobacillus rhamnosus* uzrāda lielāku ogļhidrātu utilizāciju, bet *Lactobacillus acidophilus* ir labāka izdzīvošana uzglabāšanas laikā, tādēļ no testētajiem probiotisko baktēriju celmiem sinbiotiska produkta iegūšanai būtu rekomendējams *Lactobacillus acidophilus*.

## PATEICĪBAS

Vēlos izteikt vislielāko pateicību darba vadītājam Armandam Vīgantam par eksperimentālās daļas organizēšanu, konsultēšanu un palīdzību datu apkopošanā. Pateicos arī Ritai Ščerbakai par palīdzību ogļhidrātu analīzē, kā arī Kristiānai Kovtunai un Jekaterinai Martinovai par konsultēšanu eksperimentālās daļas laikā un vienkāršajos jautājumos un Uldim Kalneniekam par darba recenzēšanu.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

- Abadía-García L., Cardador A., Martín del Campo S. T., Arvízu S. M., Castaño-Tostado E., Regalado-González C., García-Almendarez B., Amaya-Llano S. L. 2013. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. – *International Dairy Journal*. 33(2):191-197.
- Aburto C., Guerrero C., Vera C., Wilson L., Illanes A. 2016. Simultaneous synthesis and purification (SSP) of galactooligosaccharides in batch operation. - *Food Sci Technol-LEB*, 72:81–89.
- AdebayoTayo B., Akpeji S. 2016. Probiotic Viability, Physicochemical and Sensory Properties of Probiotic Pineapple Juice. – *Fermentation*, 2(4):20.
- ADPI. 2015. Book of Dairy Ingredient Industry Standards: Dairy Permeate Standard. Illinois: ADPI.
- Anjum N., Maqsood S., Masud T., Ahmad A., Momin A. 2014. *Lactobacillus acidophilus*: Characterization of the Species and Application in Food Production. - *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(9):1241-1251.
- Anuradha S., Rajeshwari K. 2005. Probiotics in Health and Disease. - *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*. 6(1):67-72.
- Bernardeau M., Guguen M., Vernoux J. P. 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. – *FEMS Microbiology Reviews*. 30:487-513.
- Bintsis T. 2018. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. - *AIMS microbiology*, 4(4):665–684.
- Biradar S., Bahagyvati S., Shegunshi B. 2004. Probiotics And Antibiotics: A Brief Overview. - *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*. 2(1):1-6.
- Burrington K., Schoenfuss T. 2014. Technical Report: Coproducts of Milk and Whey Processing. - U.S. Dairy Export Council®, pp12.
- Bylund G. 1995. Dairy processing handbook. Sweden:Tetra Pak Processin System AB, 6.4:123-133.

- Calinoiu L. F., Vodnar D., Precup G. 2016. A Review: The Probiotic Bacteria Viability under Different Conditions. - *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 73(2):55.
- Chen C-S., Hsu C-K., Chiang B-H. 2002. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. - *Process Biochemistry*, 38:801-808.
- Davani-Davari D., Negahdaripour M., Karimzadeh I., Seifan M., Mohkam M., Masoumi S. J., Berenjian A., Ghasemi, Y. 2019. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. – *Foods*, 8(3):92.
- De Vrese M., Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. - *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1–66.
- de Wit, J.N. 2001. *Lecturer's Handbook on whey and whey products* 1st edition. Belgium: European Whey Products Association, 91 pp.
- Doron S., Snyderman D. R. 2015. Risk and Safety of Probiotics. - *Clinical Infectious Diseases*, 60(2):S129–S134.
- Durham, R.J. 2009. Modern approaches to lactose production. *Grām. Dairy-Derived Ingredients*. (edited by M. Corredig). Cambridge: Woodhead Publishing, 5:108-119.
- Erliana W., Widjaja T., Altway A., Sandra M., Susilo D. 2020. The effects of various pH and temperature to enhance lactic acid production using *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus*. - *AIP Conference Proceedings* 2197, 060005.
- European Commission, Milk Market Observatory. 2021. Annual Production Series of Dairy products. 2021. gada novembris.
- FAO. 2021. Dairy Market Review: Overview of global dairy market developments in 2020. 2021. gada aprīlis, Roma.
- Fischer C., Kleinschmidt T. 2018. Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review. - *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 17(3):678-697.
- Fuller R. 1992. Probiotics. The Scientific Basis. London, U.K.: Chapman & Hall. 1:2-8.
- Gänzle M. G. 2011. Lactose: Galacto-Oligosaccharides. – In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), Academic Press, 209-216.
- Gasbarrini G., Bonvicini F., Gramenzi A. 2016. Probiotics History. - *Journal of Clinical Gastroenterology*: 50(2):S116-S119.

- Gibson, G. R., Hutkins R., Sanders M. E., Prescott S. L., Reimer R. A., Salminen S. J., Scott K., Stanton C., Swanson K. S., Cani P. D., Verbeke K., Reid G. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. - *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8):491-502.
- Gibson G. R., Scott K. P., Rastall R. A., Tuohy K. M., Hotchkiss A., Dubert-Ferrandon A., Gareau M., Murphy E. F., Saulnier D., Loh G., Macfarlane S., Delzenne N., Ringel Y., Kozianowski G., Dickmann R., Lenoir-Wijnkoop I., Walker C., Buddington R. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. - *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7(1):1–19.
- Gibson G. R., Probert H. M., Loo J. V., Rastall R. A., Roberfroid M. B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. - *Nutrition Research Reviews*, 17(02):259.
- Gibson G. R., Roberfroid M. B. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. - *The Journal of Nutrition*, 125(6):1401–1412.
- Global Market Insights. 2016. Probiotics Market Size to Exceed USD 64 Billion by 2023: Global Market Insights Inc. Pieejams: <https://www.prnewswire.com/news-releases/probiotics-market-size-to-exceedusd-64-billion-by-2023-global-market-insights-inc-578769201.html>
- Gogineni V. K., Morrow L. E., Gregory P. J., Malesker M. A. 2013. Probiotics: History and Evolution. - *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*. 1:2.
- Goldar P., Givianrad M. H., Shams A. 2016. Effect of ultrafiltered milk permeate and non-dairy creamer powder concentration on low phenylalanine yoghurt's physicochemical properties during storage. - *Journal of food science and technology*, 53(7):3053–3059.
- Granato D., Branco G. F., Nazzaro F., Cruz A., G. Faria J. A. F. 2010. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. - *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9:292-302.
- Han S., Lu Y., Xie J., Fei Y., Zheng G., Wang Z., Liu J., Lv L., Ling Z., Berglund B., Yao M., Li L. 2021. Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. - *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11:609722.

- Henchion M., Hayes M., Mullen A. M., Fenelon M., Tiwari B. 2017. Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. – *Foods*, 6(7):53.
- Hill D., Sugrue I., Tobin C., Hill C., Stanton C., Ross R. P. 2018. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. – *Frontiers in Microbiology* 9:2107.
- Hugo A. A., Bruno F., Golowczyc M. A. 2016. Whey permeate containing galacto-oligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. - *Food Sci. Technol.* 69:185–190.
- Huma N., Pasha I., Sarwar M., Ahmad S., Shah F. 2015. Effect of different filtration membranes on composition of sweet and acid whey protein. - *Pakistan Journal of Food Sciences*, 25(2):79-85.
- Hosseini Nezhad M., Hussain M. A., Britz M. L. 2014. Stress Responses in Probiotic *Lactobacillus casei*. - *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(6):740–749.
- Illanes A. 2011. Whey upgrading by enzyme biocatalysis. - *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(6):9-9.
- Jay J. M., Loessner M. J., Golden D. A. 2005. Habitats, Taxonomy, and Growth Parameters. – In: *Modern food microbiology* 7th edition. New York: Springer. 2:11-31.
- Kolev P., Rocha-Mendoza D., Ruiz-Ramírez S., Ortega-Anaya J., Jiménez-Flores R., García-Cano I. 2022. Screening and characterization of  $\beta$ -galactosidase activity in lactic acid bacteria for the valorization of acid whey. - *JDS Communications*, 3(1):1-6.
- Kolida S., Gibson G. R. 2011. Synbiotics in Health and Disease. - *Annual Review of Food Science and Technology*, 2(1):373–393.
- Krasnova L., Wong C. H. 2019. Oligosaccharide Synthesis and Translational Innovation. - *Journal of the American Chemical Society*, 141(9):3735–3754.
- Lauzon H. L., Dimitroglou A., Merrifield D. L., Ringø E., Davies S. J. 2014. Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. - *Aquaculture Nutrition*, 169–184.
- Lorenzen P. C., Breiter J., Clawin-Rädecker I., Dau A. 2013. A novel bi-enzymatic system for lactose conversion. - *International Journal of Food Science and Technology*, 48:1396–1403.
- Luan S, Duan X. 2022. A Novel Thermal-Activated  $\beta$ -Galactosidase from *Bacillus aryabhatai* GEL-09 for Lactose Hydrolysis in Milk.- *Foods*, 11(3):372.

- Macfarlane G. T., Steed H., Macfarlane S. 2007. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. - *Journal of Applied Microbiology*, 104(2):305-344.
- Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. Prokaryotic Diversity: The Bacteria. – In: *Brock Biology of Microorganisms 11th Edition*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. 12:329-419.
- Mannucci F. 2009. Enzymatic Synthesis of Galactooligosaccharides From Whey Permeate. M.Phil Thesis. Technological University, Dublin, 183pp.
- Marteau P. R., de Vrese M., Cellier C. J., Schrezenmeir J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2):430s–436s.
- Meena G. S., Singh A. K., Panjagari N. R., Arora S. 2017. Milk protein concentrates: opportunities and challenges. - *J Food Sci Technol*, 54:3010–3024
- Menchik P., Zuber T., Zuber A., Moraru C.I. 2019. Short communication: Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate. - *J Dairy Sci*, 102(5):3978-3984.
- Minj J., Chandra P., Paul C., Sharma R. K. 2020. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: current applications and research perspectives. - *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–18.
- Monteagudo-Mera A., Caro I., Rodríguez-Aparicio L. B., Rúa J., Ferrero M. A., García-Armesto M. R. 2011. Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. - *Journal of food protection*, 74(8):1379–1386.
- Mozaffar Z., Nakanishi K. Matsuno R. 1985. Formation of oligosaccharides during hydrolysis lactose in milk using p-galactosidase from bacillus circulans. - *J. Food Sci.*, 50:1602-1608.
- Nath A., Mondal S., Chakraborty S., Bhattacharjee C., Chowdhury R. 2014. Production, purification, characterization, immobilization, and application of  $\beta$ -galactosidase: a review. - *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, 9:330-348.
- Neri D.F.M., Balcao V.M., Costa R.S., Rocha I.C.A.P., Ferreira E.M.F.C., Torres D.P. M., Rodrigues L.R.M., Carvalho L.B., Teixeira J.A., 2009. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. - *Food Chem*. 115:92–99.

- Nunez I. N., Galdeano C. M., De Leblanc Ade M. Perdigon G. 2014. Evaluation of immune 736 response, microbiota, and blood markers after probiotic bacteria administration in obese 737 mice induced by a high-fat diet. - *Nutrition*, 30:1423-1432.
- Oberg T. S., McMahon D. J., Culumber M. D., McAuliffe O., Oberg C. J. 2022. Invited review: Review of taxonomic changes in dairy-related lactobacilli. - *J. Dairy Sci.*, 105:2750–2770.
- O'Connor E. B., Barrett E., Fitzgerald G., Hill C., Stanton C., Ross R. P. 2005. Production of Vitamins, Exopolysaccharides and Bacteriocins by Probiotic Bacteria. Blackwell Publishing Ltd. 8:167-194.
- Pandey K. R., Naik S. R., Vakil B. V. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. - *Journal of Food Science and Technology*, 52(12):7577–7587.
- Panesar P.S., Panesar R., Singh R.S., Kennedy J.F., Kumar H. 2006. Microbial production, immobilization and application of  $\beta$ -D-galactosidase. - *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(4):530-543.
- Pasephol T., Small D. M., Sherkat F. 2008. Lactulose production from milk concentration permeate using calcium carbonate-based catalysts. - *Food Chemistry*, 111(2):283–290.
- Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F. J., Gil-Campos M., Gil A. 2019. Mechanisms of action of probiotics. - *Advances in Nutrition*, 10(Suppl1):S49–S66.
- Ray B. 2004. Microorganisms used in food fermentation. - In: *Fundamental food Microbiology* 3rd edition. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press. 10:125-137.
- Reddy A., Norris D. F., Momeni S. S., Waldo B., Ruby J. D. 2016. The pH of beverages in the United States. - *The Journal of the American Dental Association*, 147(4):255–263.
- Sanders M. E., Merenstein D., Merrifield C. A., Hutkins R. 2018. Probiotics for human use. - *Nutr Bull*, 43:212-225.
- Sangwan V., Tomar S. K., Singh R. R. B., Singh A. K., Ali B. 2011, Galactooligosaccharides: Novel Components of Designer Foods. - *Journal of Food Science*, 76:R103-R111.
- Sangwan V., Tomar S. K., Ali B, Singh R. R. B., Singh A. K., Mandal A. 2014. Galactooligosaccharides Purification Using Microbial Fermentation and Assessment of Its Prebiotic Potential by In Vitro Method. - *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(4): 573-585.

- Sanz-Valero JI. 2009. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase and posterior chromatographic separation. Phd Thesis. Ohio State University, USA, 270pp.
- Sarkar S. 2013. Microbiological Considerations for Probiotic Supplemented Foods. - International Journal of Microbiology & Advanced Immunology (IJMAI). 1(1):1-5.
- Saqib S., Akram A., Halim S. A., Tassaduq R. 2017. Sources of  $\beta$ -galactosidase and its applications in food industry. - 3 Biotech, 7(1):79.
- Shrestha A. K., Howes T., Adhikari B. P., Bhandari B., R. 2008. Spray Drying of Skim Milk Mixed with Milk Permeate: Effect on Drying Behavior, Physicochemical Properties, and Storage Stability of Powder, Drying Technology. - An International Journal, 26(2):239-247.
- Slover C. Danziger L. 2008. Lactobacillus: a Review. - Clinical Microbiology Newsletter, 30:23-27.
- Storhaug C. L., Fosse S. K., Fadnes L. T. 2017. Country, regional, and global estimates for lactose malabsorption in adults: a systematic review and meta-analysis. - The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 2(10):738–746.
- Talabardon M., Schwitzguebel J. P., Peringer P., Yang, S. T. 2000. Acetic Acid Production from Lactose by an Anaerobic Thermophilic Coculture Immobilized in a Fibrous-Bed Bioreactor. - Biotechnology Progress, 16(6):1008–1017.
- Tang J., Wang X. C., Hu Y., Zhang Y., Li Y. 2017. Effect of pH on lactic acid production from acidogenic fermentation of food waste with different types of inocula. - Bioresource Technology, 224:544–552.
- Terpou A., Papadaki A., Lappa I. K., Kachrimanidou V., Bosnea L. A., Kopsahelis N. 2019. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. – Nutrients, 11(7):1591.
- Torres D. P. M., Gonçalves M. do P. F., Teixeira J. A., Rodrigues L.R. 2010. Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. - Compr Rev Food Sci Food Saf., 9(5):438-454.
- Tzounis X., Rodriguez-Mateos A., Vulevic J., Gibson G. R., Kwik-Urbe C., Spencer J. P. 2010. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. - The American Journal of Clinical Nutrition, 93(1):62–72.

- USDA, National Agricultural Statistics Service. 2021. Dairy Products 2020 Summary (April 2021).
- Vera C, Córdova A, Aburto C, Guerrero C, Suárez S, Illanes A. 2016. Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. - *World J Microbiol Biotechnol*, 32(12):197.
- Vera C., Guerrero C., Conejeros R., Illanes A. 2012. Synthesis of galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. - *Enzyme and Microbial Technology*, 50(3):188–194.
- Vera C., Guerrero C., Illanes A. 2011. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. - *Carbohydrate Research*, 346(6):745–752.
- Vigants A., Kovtuna K., Martynova J. 2019. An application of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* for purification of galactooligosaccharides produced from milk permeate. 35th International Specialised Symposium on Yeasts, 21-25 October 2019. Antalya, Turkey. Abstract book.
- Wang C., Cui Y., Qu X. 2017. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. - *Archives of Microbiology*, 200(2):195–201.
- Wang S., Rao N. C., Qiu R., Moletta R. 2009. Performance and kinetic evaluation of anaerobic moving bed biofilm reactor for treating milk permeate from dairy industry. - *Bioresour Technol*, 100(23):5641-7.
- Warmerdam A. 2013. Synthesis of galacto-oligosaccharides with  $\beta$ -galactosidases. PhD thesis. Wageningen University, Wageningen, NL, 172pp.
- Watson D., O'Connell Motherway M., Schoterman M. H. C., van Neerven R. J. J., Nauta A., van Sinderen D. 2013. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. - *Journal of Applied Microbiology*, 114(4):1132–1146.
- Yang X., Zhao Y., He N., Croft K. D. 2010. Isolation, Characterization, and Immunological Effects of  $\alpha$ -Galacto-oligosaccharides from a New Source, the Herb *Lycopus lucidus* Turcz. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14):8253–8258.

- Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C., Harris H., Mattarelli P., O'Toole P. W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G. E., Gänzle M. G., Lebeer S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. - *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4):2782–2858.
- Zokaityte E., Cernauskas D., Klupsaite D., Lele V., Starkute V., Zavistanaviciute P., Ruzauskas M., Gruzauskas R., Juodeikiene G., Rocha J. M., Bliznikas S., Viskelis P., Ruibys R., Bartkiene, E. 2020. Bioconversion of Milk Permeate with Selected Lactic Acid Bacteria Strains and Apple By-Products into Beverages with Antimicrobial Properties and Enriched with Galactooligosaccharides. - *Microorganisms*, 8(8):1182.

Maģistra darbs „Sinbiotiska produkta iegūšana, veicot no piena permeāta iegūta galaktooligosaharīdu (GOS) maisījuma selektīvu fermentāciju ar probiotiskiem celmiem” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Sanija Ita Krēķe *paraksts* 31.05.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr.biol. Armands Vīgants *paraksts* 31.05.2022.

Recenzents: *paraksts* asoc. prof. Dr.biol. Uldis Kalnenieks

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 31.05.2022.

Lietvede: ..... *paraksts*