

Projekts Nr.18-00-A01612-000002 "Probiotiku iegūšana no siera un biezpiena suliņām un tālāka pielietošana uzlabotu polifunkcionālu piena produktu ražošanā", turpmāk – Projekts,

kurš realizēts Eiropas lauksaimniecības fonda lauku attīstībai Latvijas lauku attīstības programmas 2014-2020.gadam pasākuma "Sadarbība" 16.1.apakšpasākuma "Atbalsts Eiropas Inovāciju partnerības lauksaimniecības ražīgumam un ilgtspējai lauksaimniecības ražīguma un ilgtspējas darba grupu projekta īstenošanas" ietvaros.

INFORMĀCIJU SAGATAVOJA Sadarbības partneri un to kontaktinformācija:

Vadošais partneris: AS "Cesvaines piens", reģ. Nr.40003212709, Dzintra Simsons - tel. Nr. 26537824, e-pasts: cpiens@apollo.lv

Sadarbības partneri:

Z/s "Lejas Jēci", reģ. Nr.54101025561, Jānis Razminovičs - tel. Nr. 29424737, e-pasts: maras.m@sveiks.lv

Latvijas Universitāte, reģ. Nr. 90000076669, Armands Vīgants – tel. Nr. 26587528, armands.vigants@lu.lv

SIA "AISIS", reģ.Nr.40003769666, Ivars Upmalis – tel. Nr. 29258420, e-pasts: iu@aisis.lv

PROJEKTA KOORDINATORS:

Anita Laima Lancmane, tel. 29242881, e-pasts anita.lancmane@inbox.lv

PROJEKTA ĪSTENOŠANAS PERIODS

25.04.2018 – 20.12.2019

KOPĒJĀS PROJEKTA IZMAKSAS

500 000 EUR

I. PROJEKTĀ PLĀNOTO DARBĪBU KOPSAVILKUMS

Projektā bija uzstādīti sekojoši zinātniskā darba mērķi:

- 1.** Noskaidrot piena liellopu barības shēmu iespējamo ietekmi uz piena kvalitatīvo rādītājiem, kuri var ietekmēt probiotiku augšanas intensitāti rūpnieciskos apstākļos no šī piena iegūtajām suliņām;
- 2.** Probiotika audzēšanas tehnoloģijas izstrāde rūpnieciskos apstākļos uz siera un biezpiena suliņām;
- 3.** Polifunkcionāla piena produkta rūpnieciska ieguve no rūpnieciskos apstākļos izaudzēta probiotika.

Dotais Projekts tika realizēts 19. darbībās, ar kurām tika paveikti sekojoši uzdevumi:

1. Projekta vajadzībām nepieciešamie sagatavošanas darbi un metožu atstrāde.

Saskaņā ar darbību Nr.1 Latvijas Universitātē tika veikta probiotisko kultūru izvēle un analītisko metožu atstrāde. Ņemot vērā vēlākās potenciālās rūpnieciskās ražošanas specifiskumu un tehniskās iespējas tika izvēlēti celmi, kuriem nav prasību uz strikti anaerobiem apstākļiem, respektīvi, fakultatīvi anaerobi (aerotoleranti) *Lactobacillus casei* celmi. Tika atstrādātas projekta vajadzībām nepieciešamās mikrobioloģiskās un analītiskās metodes, tās pielāgojot šiem mikroorganismu celmiem. Tika atstrādāta šūnu biomasas noteikšanas fotometriskā metode, veicot kalibrāciju ar minētājām šūnu kultūrām, piemeklēta piemērotā barotne un apstākļi šūnu pavairošanai un uzturēšanai. Notestēta augšanas līkņu uzņemšana, izmantojot automātisko plašu 96 lauciņu lasītāju-inkubatoru TECAN M200Pro 96.

AS "Cesvaines piens", turpmāk – **Cesvaines piens**, 3. darbības ietvaros veica tehniskos sagatavošanās darbus siera un biezpiena suliņu ražošanai projekta eksperimentālo darbu vajadzībām. Šajā laikā tika pārplānoti ražošanas līnijas noslodzes grafiki, tos pielāgojot eksperimentālām vajadzībām, apzināti Projekta nodrošināšanai nepieciešamie cilvēkresursi un materiālie resursi. Uzņēmuma laboratorija tika pielāgota Projektam nepieciešamo datu fiksēšanai.

Tā kā Projekta realizācija paredzēja probiotiķu masas iegūšanu rūpnieciskos apstākļos no konkrētā piena pārstrādes ražošanas līnijā iegūtām siera un biezpiena suliņām, tad SIA "AISIS", turpmāk – **AISIS**, 4. darbības ietvaros veica rūpnīcas infrastruktūras izpēti un mērījumus, kas nepieciešami probiotiķu audzēšanas pilotiekārtas konstruēšanai.

Z/S "Lejas Jēci", turpmāk – **Lejas Jēci**, veica izmaiņas slaucamo govju ēdināšanā, lai pielāgotos Projektā izvirzītajām prasībām – definētas kvalitātes piena ražošanai.

2. Definētas kvalitātes piena iegūšana Projekta vajadzībām.

2.,5.un 6 darbību ietvaros, sadarbojoties Latvijas Universitātei, Lejas Jēci un Cesvaines piens tika veikta pētījums par piena liellopu barošanas ietekmi uz piena kvalitāti un tā sekojošu ietekmi uz probiotiķu augšanu un dzīvotspēju no šī piena iegūtajās suliņās. Eksperimentu vajadzībām Latvijas Universitātei tika piegādāti siera un biezpiena suliņu paraugi no Cesvaines piens tehnoloģiskās līnijas, kur no Lejas Jēci saražtā piena tika iegūti siera un biezpiena produkti. Lai ierobežotu probiotiķu augšanas un izdzīvotības ietekmējošo faktoru daudzumu, Lejas Jēci piena liellopi visā Projekta darbības laikā tika baroti pēc stingri definētas barības shēmas (5.darbība).

Iepriekšminētā nosacījuma kontroli veica Cesvaines piens laboratorijā, kurā tika veikta Lejas Jēci projektam piegādātā piena testēšana, nosakot katrai svaigpiena partijai organoleptisko novērtējumu, inhibitorvielu klātbūtni, temperatūru, skābumu, pH, tauku un olbaltumvielu saturu, sasaldēšanas punktu, kopējo mikroorganismu un somatisko šūnu skaitu 1 ml svaigpiena. Projekta laikā tika nomainītas trīs piena liellopu barības receptes, jo tika konstatēts, ka tās neuzrāda statistiski būtisku ietekmi uz probiotiķu augšanas un izdzīvotības parametriem. Tāpēc, sākot ar 01.08.2019, Lejas Jēci turpmāko Projekta laiku piena liellopus baroja saskaņā ar 01.08.2019 apstiprināto piena govju barošanas recepti (3.barības recepte). Tādējādi tālākam eksperimentālam darbam tika izmantots pēc vienas barības receptes

iegūtais piens, nodrošinot projekta eksperimentālam darbam nemainīgus piena kvalitātes rādītājus, turpmāk – **definēts piens**.

3. Laboratorijas līmeņa pētījumi par probiotisko kultūru kultivēšanu uz siera un biezpiena suliņu barotnēm.

Latvijas Universitātē 2.darbības ietvaros tika veikti pētījumi par probiotisko kultūru kultivēšanu uz siera un biezpiena suliņu barotnēm. Šiem mērķiem Cesvaines piens, 6.darbības ietvaros visā Projekta darbības laikā, nodrošināja šo suliņu iegūšanu rūpnieciskos apstākļos un piegādi Latvijas Universitātei.

Latvijas Universitāte Projekta laikā veica eksperimentus ar šādiem probiotisko kultūru celmiem: Chr. Hansen "nu-trish"[®] *Lactobacillus casei*-01 un *Lactobacillus casei subsp. Rhamnosus*. Eksperimentu laikā tika izvērtēta šo probiotisko šūnu biomasas augšanas parametri un dzīvo šūnu daudzums. Šo eksperimentālo paraugu rezultāti tika salīdzināti ar probiotiķu augšanas parametriem uz standarta modeļbarotnes (MRS barotne ar laktozi). Tāpat eksperimentu laikā fermentācijas procesā tika novērtēta probiotisko celmu galvenā metabolīta, – pienskābes, veidošanās parametri, kuri veidojas fermentācijas procesā. Tika atstrādāti šādi laboratorijas līmeņa fermentācijas procesu ietekmējošie parametri - temperatūra, maisīšanas ātrums un barotnes pH, ar mērķi maksimizēt probiotisko šūnu biomasas iznākumu. Probiotiku biomasas maksimizēšanai, tika izpētīta optimālās laktozes koncentrācija. Tika secināts, ka no probiotiķu audzēšanas parametru viedokļa abi probiotiskie celmi ir izmantojami audzēšanai uz suliņām un Projekta darbā tika pētīta to izdzīvotība piena produktos un to ietekme uz piena produktu kvalitātes rādītājiem.

4. Laboratorijas līmeņa pētījumi par probiotisko kultūru pievienošanu un dzīvotspēju piena produktos.

Latvijas Universitāte sākotnējos pētījumos izmantoja šādus Cesvaines piens Projekta vajadzībām izgatavotos un Latvijas Universitātei piegādātos piena produktus:

- 1) formas biezpiens, 0,5% tauku saturs, svars ap 275 g;
- 2) formas biezpiens, 9% tauku saturs, svars ap 275 g;
- 3) irdens biezpiens, 0,5% tauku saturs, svars ap 400g;
- 4) irdens biezpiens, 9% tauku saturs, svars ap 400g;
- 5) irdeni proteīna graudi;
- 6) mājas siera graudi bez saldā krējuma), 0,5% tauku saturs;
- 7) mājas siers ar saldo krējumu 180 g;
- 8) brokastu biezpiens (vājpiena piezpiens, daļa krējuma).

Lai optimizētu probiotiķu izdzīvotību iepriekšminētajos piena produktos, balstoties uz Latvijas Universitātes ieteikumiem, tika veiktas:

- Cesvaines piens tehnoloģiskās līnijas izpēte un pielāgošana, lai panāktu optimālo suliņu sastāvu, kurš nepieciešams probiotiķu augšanas nodrošināšanai;

- noteikta optimālo probiotiķu pievienošanas vieta tehnoloģiskā līnijā, nodrošinot to optimālo izdzīvotību produktā.

Saskaņā ar darbību Nr.7 šajā laikā Latvijas Universitātē veica pētījumus par par probiotisko kultūru pievienošanas ietekmi Cesvaines piens izgatavotajiem piena produktiem un probiotiķu izdzīvotību tajos. Pētījums tika veikts ar probiotisko Chr. Hansen “nu-trish[®] *Lactobacillus casei-01*” un *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* celmiem.

Uz iegūtās praktiskās pieredzes bāzes Cesvaines piens izstrādāja biezpiena produktus (8.darbība), ar kuriem tika veikti turpmākie probiotiķu pievienošanas eksperimenti:

- 1) irdenais biezpiens ar tauku saturu 0,5%;
- 2) irdenais biezpiens ar tauku saturu 9%;
- 3) mājas siers.

Tika skatītas korelācijas starp probiotiķu pievienošanas metodi/ vietu, probiotiķu izdzīvošanas rādītājiem un produkta sastāvu. Šim nolūkam tika veikti “spot-testi” uz mikrobioloģiskajām platēm, nosakot dzīvo probiotisko baktēriju skaita izmaiņas dinamiku laika periodā.

Tā kā, kā piemērotākie produkti tālākai rūpnieciskai probiotiķus saturošu produktu izstrādei tika izvēlēti irdenie biezpieni un mājas siers, tad Latvijas Universitāte (darbība Nr.16) veica šiem produktiem iepakojuma ietekmes izpēti uz probiotiķu izdzīvotību produkta derīguma termiņa laikā.

5. Rūpnieciskās fermentācijas pilotiekārtas konstruēšana un izgatavošana.

Tā kā tika veikti pētījumi par probiotiskās kultūras inokuluma, turpmāk – **Probiotika biomasa**, sagatavošanu tā pievienošanai piena produktos, uz šo pētījuma pamata tika izstrādātas rekomendācijas AISIS, lai tā varētu izgatavot Cesvaines piens ražošanas līnijai piemērotu biorektoru, kurā tiktu rūpnieciski iegūta Probiotika biomasa. Šajā sakarā Latvijas Universitāte izvērtēja nepieciešamo Probiotika biomasas daudzumu un koncentrāciju (gan pēc dzīvo šūnu skaita, gan pēc inokuluma kopējā tilpuma), kura iegūšanai tika izmantoti *Chr. Hansen “nu-trish[®] Lactobacillus casei-01”* un *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* celmi. Probiotika biomasa tika audzēta gan uz siera, gan uz biezpiena suliņām (6. darbība). Probiotiku augšanas rezultātu salīdzinājumam tika izmantota pussintētiskā MRS barotne.

AISIS, vadoties no Latvijas Universitātes rekomendācijām, kas balstītas uz procesa parametriem, kas iegūti laboratorijas eksperimentos un ņemot vērā Cesvaines piens esošo infrastruktūru un tehniskās iespējas, veica probiotiķu audzēšanas pilotiekārtas, turpmāk – **Pilotiekārta**, projektēšanu (skat. Projektam pievienoto apstiprināto skici), kā arī pilotiekārtas konstruēšanu un izgatavošanu (10,11,12,13. darbības). Iekārta tika uzstādīta AS Cesvaines piens rūpnīcā, pieslēdzot (skat.pievienoto apsaiestes shēmu) to pie vietējās infrastruktūras (CIP mazgāšana, tvaika padeves, ūdens padeves, ledusūdens padeves, kanalizācijas un elektroapgādes līnijām). Uzstādītā Pilotiekārta tika izmantota laboratorijā izstrādātās Probiotiku biomasas iegūšanas metodes validēšanai rūpnieciskam mērogam tuvinātos

apstākļos, no Cesvaines piena siera un biezpiena suliņām, kā arī probiotiķu biomasas saudzēšanai rūpnīcas eksperimentiem ar tālāku probiotiķu pievienošanu biezpiena produktiem.

6. Probiotika audzēšanas tehnoloģijas izstrāde rūpnieciskos apstākļos uz siera un biezpiena suliņām

Latvijas Universitātes laboratorijas apstākļos izstrādātā probiotiķu audzēšanas metodika tika mērogota un validēta Cesvaines piens rūpnīcā uzstādītajā Pilotiekārtā (9. darbības ietvaros). Šim nolūkam Latvijas Universitātē tika sagatavota Probiotika biomasas materiāls, kurš tika ienests Pilotiekārtā ar iepriekš paterizētām siera un biezpiena suliņām. Probiotiku audzēšanas sākotnējie parametri Pilotiekārtā (temperatūra, audzēšanas ilgums) tika izvēlēti balstoties uz laboratorijas apstākļos iegūtajiem datiem. Tā kā lielāka mēroga fermentācijā, salīdzinot ar laboratorijas līmeņa fermentāciju, ir atšķirīgi masas pārnese procesi, tad maisīšanas ātrumu tiešā veidā pārnest no laboratorijas datiem nevar. Tādēļ šis parametrs tika optimizēts rūpnīcā Pilotiekārtas līmenī, mainot maisīšanas režīmus un skatot to ietekmi uz probiotiķu augšanas dinamiku (darbība Nr.13), kur Probiotiku biomasas kontrole tika veikta nosakot dzīvo šūnu skaitu paraugos. Pilotiekārtas validācijas laikā tika mainīti arī suliņu pasterizācijas parametri. Latvijas Universitātē tika veikti Pilotiekārtas probiotiķu biomasas paraugu analīze (15. darbība) un pilotiekārtā iegūtie rezultāti tika salīdzināti ar laboratorijas apstākļos iegūtajiem.

7. Polifunkcionāla biezpiena produkta izstrāde rūpnieciskā līmenī .

Pētījumi rūpnīcā sākotnēji tika veikti mazākā mērogā ar Latvijas Universitātē saudzēto Probiotiku biomasu, pievienojot biezpienam vai mājas sieram 10% (no biezpiena vai mājas siera masas).

Probiotiskus saturošu biezpiena produktu rūpnieciskas ražošanas izstrāde tika veikta balstoties uz Latvijas Universitātē laboratorijas pētījumos iegūtajiem rezultātiem. Kā jau teikts iepriekš, rūpnieciskā mērogā tika atstrādāti trīs veida produkti, kas tika atzīti par perspektīvākajiem, veicot laboratorijas mēroga eksperimentus - irdenais biezpiens ar tauku saturu 5% un 9% un mājas siers ar saldo krējumu. Kā rūpnieciski vispiemērotākais probiotiskais celms gala variantā tika izvēlēts Chr. Hansen "nu-trish[®] *Lactobacillus casei-01*", jo dotais celms eksperimentos uzrādīja labus augšanas un izdzīvotības rādītājus, bet negatīvi neietekmēja produkta skābumu, konsistenci un garšas īpašības.

Pēc probiotiķu audzēšanas validācijas Pilotiekārtā turpmākajiem eksperimentiem ar mājas sieru un irdeno biezpienu tika izmantots šajā iekārtā iegūtā Probiotiku biomasas. Šiem produktiem tika noteikts sākotnējais probiotiķu skaits un dzīvo probiotiķu šūnu skaits produkta derīguma termiņa beigās.

Tika veikti pētījumi par Probiotiku biomasas pievienošanas vietu produktam uz tehnoloģiskās līnijas (izsmidzināšana uz graudu virsmas, manuāla iemaisīšana, pievienošana ar piltuvi). Kā visoptimālākā Probiotika biomasas pievienošana metode mājas sieram tika atzīta masas manuāla iemaisīšana, bet irdenajam biezpienam – tā pievienošama ar piltuvi.

Kā visperspektīvākais produkts patēriņa tirgum tika atzīts ar probiotiķiem bagātināts mājas siers (14.darbība).

Esperimentālā darba beigās tika skatīta iepakojuma ietekme uz probiotikās kultūras izdzīvotību biezpienā un mājas sierā (16. darbība). Produkti pēc probiotiķu pievienošanas tika iesaiņoti hermētiski noslēgtos plastikāta iepakojumos, kādos Cēsaines piens rūpnīcā tiek fasēti biezpiens un mājas siers. Produktu paraugi tika nosūtīti Latvijas Universitātei, kur tie tika izturēti un noteikti to mikrobioloģiskie rādītāji - dzīvo probiotisko šūnu skaits un to izdzīvotība noteiktā laika periodā (15. darbība).

8. Rezultātu apkopošana un atskaišu sagatavošana.

Projekta 17.18. un 19. darbības ietvēra rezultātu apkopošanu un atskaišu sagatavošanu, kuras sagatavoja sadarbības partneri: Latvijas Universitātes, Cēsaines piens, Lejas Jēci un AISIS, uz kurām balstoties vadošais partneris Cēsaines piens sagatavoja un iesniedza gala atskaišu dokumentāciju. Iepriekš minēto darbību rezultāti apkopti nodaļā "Projekta rezultātu aprakstā". Balstoties uz tiem var secināt, ka projektā definētie mērķi ir pilnībā sasniegti un projektā iesaistīto četru partneru sinerģiskas sadarbības rezultātā ir izstrādāta metodika ar probiotiķiem bagātināta biezpiena produkta ražošanai, izmantojot rūpnieciski iegūtas siera un biezpiena suliņas.

II. PROJEKTA REZULTĀTU APRAKSTS

1. Piena liellopu barības shēmu iespējamās ietekmes izpēte uz piena kvalitatīviem rādītājiem, kuri var ietekmēt probiotiķu augšanas parametrus no šī piena iegūtajās suliņās.

Projekta laikā tika testēta piena liellopu barības shēmas nomaiņas ietekme uz piena un tā pārstrādes rezultātā iegūto suliņu kvalitatīvo sastāvu, kā arī uz to bāzes audzēto probiotisko kultūru augšanas rādītājiem, lai noskaidrotu vai fluktuācijas barības sastāvā būtiski ietekmē piena un suliņu sastāvu un kādu riska faktoru tas varētu radīt Projekta realizācijas rezultātā izstrādātā probiotiskā produkta kvalitātei.

Sākotnēji tika pieņemts, ka cukura saturs slaucamo govju racionā varētu ietekmēt probiotiķu augšanas intensitāti piena suliņās. Līdz ar to pārbaudes tika veiktas ar siera un biezpiena suliņām, kuras tika iegūtas no piena, kurš iegūts barojot slaucamās govīs ar trīs dažādām barības receptēm. Visas trīs barības receptes (vienas slaucamās govīs dienas barības deva) saturēja vienādu daudzumu skābbarības un DOFEED minerālbarību (liellopiem), bet atšķīrās ar siera daudzumu un cukurbiešu melases daudzumu.

Barības shēma Nr 1 saturēja 2 kg siera un 0,7 kg cukurbiešu melases;

Barības shēma Nr 2 saturēja 1 kg siera un 0,5 kg cukurbiešu melases;

Barības shēma Nr 3 saturēja 2 kg siera un 0,5 kg cukurbiešu melases.

Izanalizējot piena kvalitātes datus netika konstatētas būtiskas korelācijas starp barošanas shēmām un piena pamatrādītājiem. Arī suliņu analīzes neuzrādīja būtiskas atšķirības galvenajos suliņu pamatsastāva rādītājos. Tomēr, ņemot vērā, ka mikroorganismu augšanai

var būt būtiski tādi rādītāji kā vitamīni, minerālvielas un aminoskābju saturs, tad tika veikta testa fermentācijas ar probiotiķiem, kuriem kā substrāts to augšanai tika izmantotas iepriekšminētās suliņas. Tika konstatēts, ka slaucamo govju barības receptes neatstāj statistiski būtisku ietekmi uz probiotiķu augšanu suliņās (tabula 1).

Tabula 1

Barības shēma	<i>Lactobacillus casei</i> biomasa g/l 24 h	<i>Lactobacillus casei</i> biomasa g/l 48 h
Nr.1	3.15 ±0.32	4.21 ±0.28
Nr.2	3.30 ±0.45	4.11 ±0.25
Nr.3	3.35 ±0.40	4.09 ±0.35

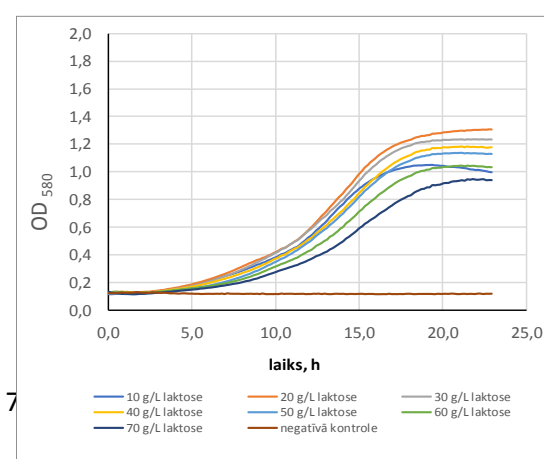
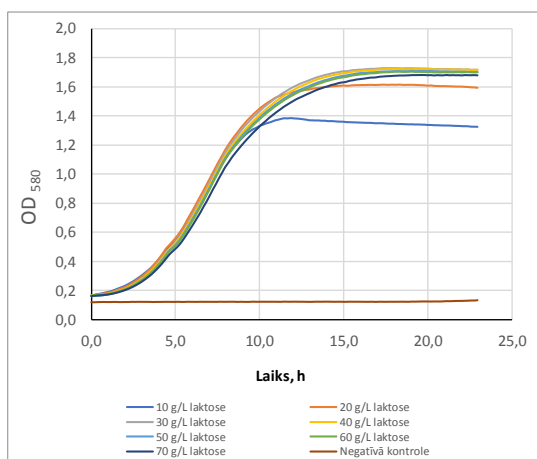
Līdz ar to tika secināts, ka nav lietderīgi tālāki pētījumi par barības shēmas ietekmi uz probiotiķu augšanu un tālākajiem projekta eksperimentāliem darbiem un kā piemērots turpmākajiem eksperimentiem, lai samazinātu blakus faktoru ietekmi uz eksperimentu rezultātiem tika atzīts piens, kas iegūts barojot slaucamās govīs ar barības shēmu Nr.3, turpmāk – **Definēts piens**.

2. Probiotika audzēšanas uz siera un biezpiena suliņām tehnoloģijas izstrāde laboratorijas līmenī un šīs tehnoloģijas validēšana un mērogošana rūpnieciskos apstākļos fermentācijas pilotiekārtā.

Balstoties uz zinātniskajā literatūrā un datu bāzēs esošo informāciju, kā arī uz LU MBI iepriekšējo pieredzi, pētījumam tika izvēlētas iepriekšminētās divas probiotisko celmu kultūras (ņemot vērā vēlākās potenciālās rūpnieciskās ražošanas specifiskumu un tehniskās iespējas tika izvēlēti celmi, kuriem nav prasību uz strikti anaerobiem apstākļiem, respektīvi fakultatīvi anaerobi (aerotoleranti) Chr. Hansen “nu-trish[®] *Lactobacillus casei*-01 un *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* celmi).

Eksperimenti tika veikti audzējot iepriekšminētos probiotiskos celmus uz siera un biezpiena suliņu paraugiem, kas tika piegādāti no Cesvaines piens ražotnes. Tika salīdzināta probiotisko celmu augšana uz dažādiem suliņu paraugiem, kā arī laktozi saturošām modeļbarotnēm.

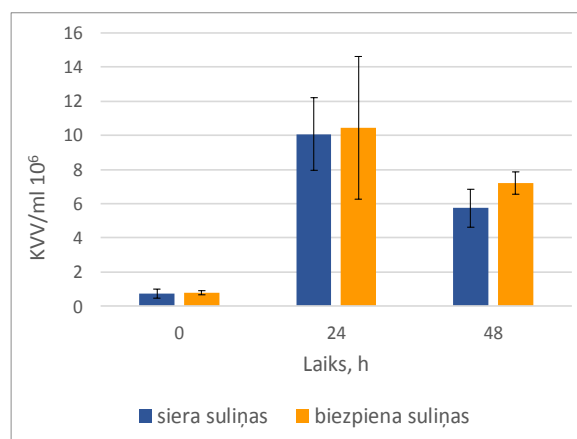
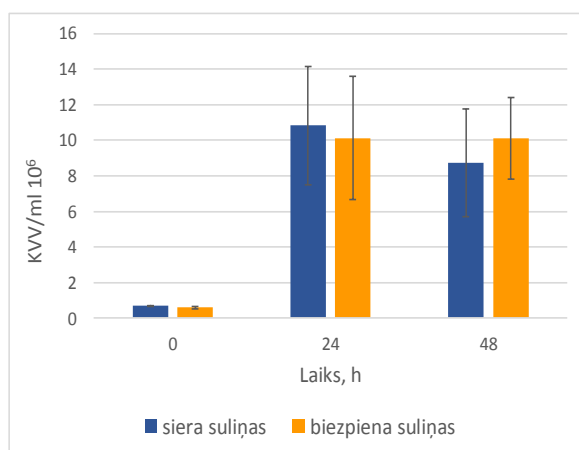
Tika veikti pētījumi par optimālās laktozes koncentrāciju, kura nepieciešama Probiotiku biomasas maksimizēšanai. Šim nolūkam tika izmantota laktozi saturoša MRS barotne (ka modeļbarotne) un uzņemtas augšanas līknes (1. attēls).



1. attēls. Augšanas līknes Chr. Hansen "nu-trish"[®] *Lactobacillus casei*-01 (A) un *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* (B) celmiem pie dažādām Laktozes koncentrācijām MRS barotnē.

Tika konstatēts, ka optimālā laktozes koncentrācija abu probiotisko celmu augšanai ir 4-5 g/l robežās, kas ir tuvu laktozes koncentrācijai siera un biezpiena suliņās, tādējādi ļaujot secināt, ka suliņas ir izmantojamas probiotiķu audzēšanai dabīgā veidā, bez atšķaidīšanas vai iekonzentrēšanas.

Audzējot abus probiotisko celmus uz siera (saldajām) suliņām un biezpiena (skābajām) suliņām tik konstatēts, ka dzīvo probiotisko šūnu skaits siera suliņu gadījumā pēc 24 stundu fermentācijas uzrādīja augstākus rādītājus salīdzinot ar biezpiena suliņām, tomēr pēc 48 stundu fermentācijas šie rādītāji izlīdzinājās, sasniedzot 10^6 - 10^7 koloniju veidojošās vienības uz ml (2. attēls). Salīdzinot šūnu augšanas intensitāti suliņās ar pussintētisko modeļbarotni (laktozi saturoša MRS barotne), rezultāti bija līdzīgi (standartnoviržu robežās), kas liecina par pietiekošu probiotiķiem nepieciešamo augšanas faktoru klātbūtni suliņu barotnēs. Līdz ar to var secināt, ka gan saldās (siera), gan skābās (biezpiena) sūkalas ir piemēroti substrāti probiotiskā *Lactobacillus casei* celma pavairošanai, bez papildus piedevu pievienošanas.

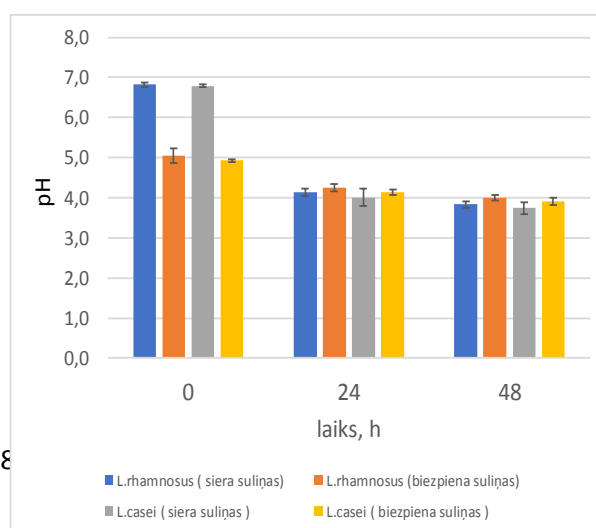
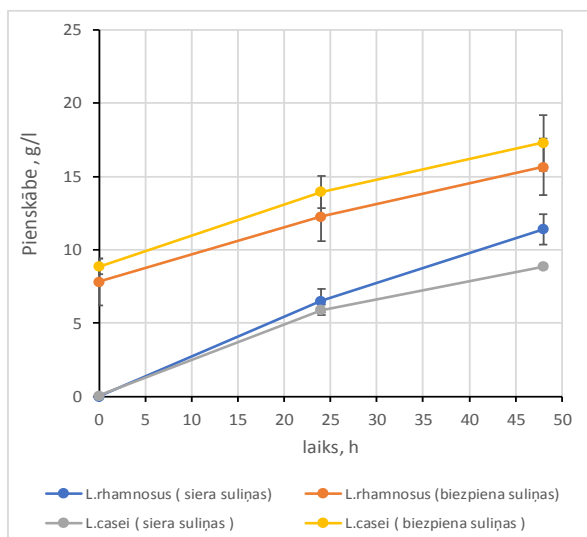


A

B

2. attēls. Chr. Hansen "nu-trish"[®] *Lactobacillus casei*-01 (A) un *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* (B) celmu augšana uz siera un biezpiena suliņām.

Tika novērtēta probiotisko celmu galvenā metabolīta - pienskābes veidošanās parametri fermentācijas procesā un suliņu pH izmaiņas (3. attēls.)



ε

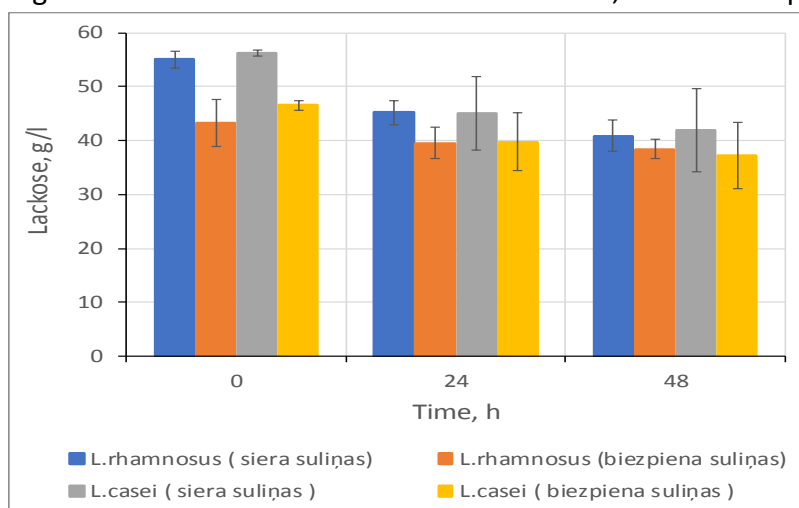
A

B

3. attēls. Pienskābes daudzuma un pH izmaiņas audzējot probiotiskos celmus uz siera un biezpiena suliņām.

Sākotnējais dabīgo siera suliņu pH bija robežās starp 6,74 – 6,88, un biezpiena suliņu pH vērtību diapazons bija no 4,92 – 5,33. Šīs pH vērtības iekļaujas abām probiotisko kultūrām augšanai pieņemamā pH diapazonā. Pēc 24 stundām pH abās barotnēs bija nolīdzinājies ap vērtību 4. Salīdzinot mērījumus starp barotnēm, straujākais pH vērtības kritums bija novērojams tieši siera suliņām. Turpretī pēc 48 stundām gan siera, gan biezpiena suliņām pH vērtība ir samazinājusies minimāli, salīdzinot ar rezultātiem pēc 24 stundām. Šie pH dati korelē ar pienskābes veidošanās dinamiku. Tāpat pH izmaiņu straujums un gala vērtība varētu būt atkarīga arī no suliņu buferkapacitātes. Var secināt, ka zemākais pH, kādu sasniedz *Lactobacillus casei* un *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* augot suliņu barotnē līdz 48 stundām, ir ap 4.

Izvērtējot laktozes daudzuma izmaiņas audzēšanas procesā redzams (4. attēls), ka pēc fermentācijas beigām visa laktoze nav utilizēta, bet probiotiķu augšana ir apstājusies. Tātad var secināt, ka laktozes daudzums sulinās nav limitējošais faktors probiotiķu augšanai un augšanas inhibēšanās saistīta ar metabolītu, tai skaitā pienskābes uzkrāšanos un pH samazināšanos.



4. attēls. Laktozes utilizācija . Chr. Hansen “nu-trish[®] *Lactobacillus casei*-01 un *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* augot uz siera un biezpiena sūklām

Laboratorijas līmeņa

fermentatoros (ar darba tilpumu 400 ml) tika novērtēta Probiotiskās masas maisīšanas ietekme uz abu probiotisko celmu augšanu. Netika novērotas statistiski būtiskas atšķirības uz probiotiķu augšanas parametriem probiotiskās masas maisīšanas ātrumam diapazonā no 50-200 apgriezieniem minūtē.

Laboratorijas apstākļos izstrādātā probiotiķu audzēšanas metodika tika mērogota un validēta Cesvaines piens rūpnīcā šim nolūkam konstruētā fermentācijas pilotiekārtā ar tilpumu 100 litri. (iekārtas shēmu skat. Projekta pielikumā). Eksperimentiem rūpnīcā tika izvēlēts Chr. Hansen “nu-trish[®] *Lactobacillus casei*-01 celms, kurš balstoties uz laboratorijas pētījumiem par pievienošanu biezpiena produktiem (skat. zemāk) tika atzīts par piemērotāko. Probiotiķu audzēšana Pilotiekārtā tika veikta izmantojot iepriekš pasterizētas siera vai biezpiena suliņas.

Pēc 48 stundu fermentācijas 35 °C temperatūrā tika iegūtas $4 \cdot 10^7$ - $6 \cdot 10^7$ koloniju veidojošās vienības uz ml, kas pat pārsniedza rezultātus, kuri tika iegūti laboratorijas eksperimentos. Tas varētu būt skaidrojams ar to, ka rūpnīcas eksperimentos, iespējams, bija zemāks izšķīdušā skābekļa daudzums fermentācijas vidē. Lai arī *Lactobacillus casei* ir aerotolerants celms, tomēr anaeroba vide ir vēlama tā labākai augšanai. Tā kā suliņu pasterizācija paaugstinātā temperatūrā tika veikta tieši pirms audzēšanas pašā fermentācijas iekārtā, tad iespējams, tas veicinājis izšķīdušā skābekļa aizvadīšanu. Rūpnīcas eksperimentu laikā pirms probiotiķu pievienošanas tika arī testēti dažādi suliņu pasterizācijas režīmi, un 72-74 °C tika atzīta par pietiekošu, lai novērstu nevēlamu mikroorganismu infekciju un augšanu probiotiķu kultivēšanas laikā.

Līdzīgi kā laboratorijas eksperimentos, Pilotiekārtā iegūtās Probiotiku biomasas rezultāti būtiski neatspoguļoja siera un biezpiena suliņām, tādējādi apstiprinot to ka probiotiskā *Lactobacillus casei* celma pavairošanai iespējams izmantot abu veida suliņas.

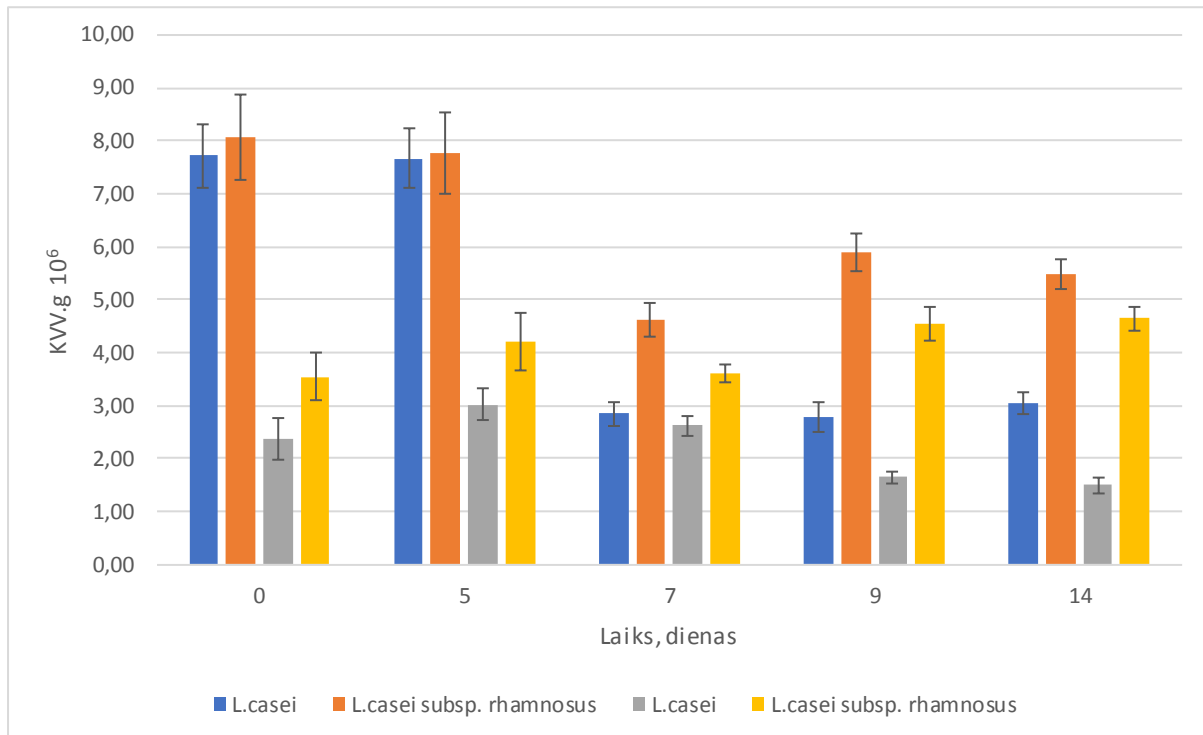
3. Polifunkcionāla probiotiķus saturoša biezpiena produkta izstrāde laboratorijas līmenī un metodikas pārbaude rūpnieciskā pilotlīmenī.

Lai izstrādātu rūpnieciski ar probiotiķiem bagātinātu piena produktu, sākotnēji tika veikti pētījumi laboratorijas līmenī, lai izvēlētos piemērotāko ar probiotiķiem bagātināto piena pārstrādes produktu. Saskaņā ar darbību Nr.7 Latvijas Universitātē tika veikti pētījumi par par probiotisko kultūru pievienošanu biezpiena produktiem un mikroorganismu izdzīvotību tajos. Pētījums tika veikts ar probiotisko probiotisko Chr. Hansen "nutrish"[®] *Lactobacillus casei*-01" un *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* celmiem.

Tika konstatēts, ka probiotiskā celma *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* izdzīvotības vidējie rādītāji vājpiena un pilnpiena biezpienā ir līdzīgi probiotiskā celma Chr. Hansen "nutrish"[®] *Lactobacillus casei*-01 rādītājiem (dzīvo šūnu skaitam saglabājoties virs 10^6 KVV/g līdz pat 20 dienām), tomēr eksperimentos ar *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* tika novērota lielāka rezultātu izkliede.

Tāpat tika veikti arī eksperimenti ar saldo krējumu saturošu mājas sieru. Tika variēta probiotiķu sākotnējā koncentrācija no $3 \cdot 10^6$ līdz $7 \cdot 10^6$ KVV/g. Probiotiskā celma *Lactobacillus casei*-01 gadījumā pēc 14 dienu izturēšanas pie 4 °C tika novērota dzīvo šūnu skaita samazinājums par 35-60%. Lielākais procentuālais samazinājums tika novērots pie augstākas sākotnējās Probiotiskās biomasas daudzuma pievienošanas produktā. *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* gadījumā izdzīvotības rādītāji bija labāki: svārstījās no 35% dzīvo šūnu samazinājuma pie augstākas sākotnējās Probiotiskās biomasas daudzuma pievienošanas līdz pat 25% samazinājumam - pie zemākās sākotnējās Probiotiskās masas daudzuma. Tomēr visos gadījumos dzīvo šūnu skaits pēc 14 dienām saglabājās virs $1 \cdot 10^6$ KVV/g (5. attēls).

Svarīgi norādīt, ka *Lactobacillus casei*-01 gadījumā netika novērotas būtiskas izmaiņas mājas siera pH un konsistencē, savukārt *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* gadījumā tika novērota produkta paskābināšanas un pH samazināšanās, kā arī produkta šķidrās fāzes sarecēšana, kas ietekmē produkta pievilcību pircēja acīs.



5. attēls. Probiotisko kultūru dzīvo šūnu skaita izmaiņas mājas sierā pie dažādām sākontējā inokuluma koncentrācijām.

Pētījumi rūpnieciskos apstākļos tika veikti ar dažādiem biezpieniem (formas un irdenais biezpiens, ar tauku saturu 0,5% un 9%), kā arī pētījumā tika iekļauti tādi biezpiena produkti, kā proteīna graudi un brokastu biezpiens (vājpiena biezpiens ar pievienotu krējumu). Šiem produktiem tika izvērtēts, cik daudz Probiotiku biomasas un kādā koncentrācijā gan laboratorijas, gan rūpnieciskos apstākļos ir jāpievieno un ar kādām pievienošanas metodēm (iemiesāšana produkta masā, uzsmidzināšana uz biezpiena graudu virsmas).

Uzsmidzināšanas metodes gadījumā probiotiķi netiek vienmērīgi iemiesāti piena produkta masā, bet tiek uznesti uz virsmas. Pielietojot uzsmidzināšanas metodi (visiem produktiem), lai arī tas ļauj saglabāt vājpiena un pilnpiena biezpiena produkta sākotnējo struktūru, tomēr probiotiķu izdzīvotība uzrādīja sliktākus rezultātus, salīdzinot ar iemiesāšanas metodi attiecībā uz probiotiķu koncentrāciju gala produktā.

Lai sasniegtu to pašu probiotiķu daudzumu uz produkta masas vienību, ar uzsmidzināšanas metodi produktam nepieciešams pievienot 3-5 reizes koncentrētāku biomasas suspensiju kā ar iemiesāšanas metodi, kā arī bija novērojama sliktāka rezultātu atkārtojamība probiotiķu gala koncentrācijai pēc divu nedēļu uzglabāšanas. Pēc produkta divu nedēļu uzglabāšanas, kuram probiotiķi tika pievienoti ar uzsmidzināšanas metodi, probiotiķu koncentrācija virs $1 \cdot 10^6$ KVV/g saglabājas tikai 70% gadījumu.

Brokastu biezpiena gadījumā rezultāti būtiski neatšķīrās no iepriekš iegūtajiem rezultātiem, kuri tika veikti ar vājpiena un pilnpiena biezpienu. Tomēr jāatzīmē, ka proteīna graudu gadījumā bija novērojams straujāks probiotisko šūnu skaita samazinājums, salīdzinot ar pārējiem biezpiena produktiem.

Tika konstatēts, ka no probiotiķa pievienošanas tehniskās realizācijas un izmaksu viedokļa, izdevīgāki var būt irdenie produkti, kā arī produkti, kuriem probiotiķa suspensijas pievienošana notiek fasēšanas automāta piltuvē: mājas siers, irdenais biezpiens ar 0,5% tauku un irdenais biezpiens ar 9% tauku. Kā probiotiskais celms gala rūpnieciska mēroga pētījumiem tika izvēlēts Chr. Hansen "nu-trish@ Lactobacillus casei-01", jo dotais celms iepriekšējos eksperimentos uzrādīja labus izdzīvotības rādītājus, kā arī negatīvi neietekmēja produkta skābumu, konsistenci un garšas īpašības. Kā piemērotākais Probiotiku biomasas pievienojamais daudzums tika atzīts 10% no produkta masas. Tas ļāva ienest vajadzīgo probiotiķu daudzumu, būtiski neizmainot produkta konsistenci un nezaudējot probiotiķu dzīvotspēju.

Probiotiskās kultūras izdzīvotība biezpiena produktos bija aptuveni vienāda gan gadījumā, kad tā tika audzēta Pilotiekārtā gan biezpiena (skābajās) suliņās, gan siera (saldajās) suliņās. Tātādējādi var secināt, ka ar probiotiķiem bagātinātu biezpiena produktu ražošanas procesā iespējams izmantot probiotiķus, kuri ir audzēti uz abu veida suliņām.

Tika pārbaudīta probiotiķu izdzīvotība fasētā gala produktā - rūpnīcā izmantojamā standarta hermētiskā plastikāta iepakojumā. Tika konstatēts, ka dotais iepakojums nodrošina stabilu probiotisko dzīvo šūnu koncentrāciju virs 10^6 KVV/g vismaz 14 dienu garumā uzglabājot pie 4° C.

No rūpnīcā veiktajiem eksperimentiem tika izdarīts secinājums, ka vadoties no ekonomiskiem apsvērumiem, probiotiķu pievienošanas tehnoloģisko risinājumu vienkāršības un probiotiķu izdzīvotības ilguma produktā, kā perspektīvākais produkts tālākai potenciālai ražošanai būtu ar probiotiķiem bagātināts mājas siers.

4. Pilotiekārta

Tika izveidota pilotiekārta probiotiķu audzēšanai rūpnieciskos apstākļos no rūpnīcā saražotajām siera un biezpiena suliņām. Kā atbilstošākais risinājums tieši Cesvaines piens ražošanas līnijai tika atzīts iekārtas tilpums 100 litri.

Projektējot un izgatavojot iekārtu tika ņemtas par pamatu sekojošas tehnoloģiskas prasības:

- Fermentācijas iekārta pirms procesa jāizmazgā (vēlams ar sārmu);
- CIP sterilizācija ar karstu tvaiku;
- Fermentācijas iekārtā jāiepilda 98 l pasterizētas sūkalas;
- Iestādītā darba temperatūru 37° C, spiediens līdz 2 bar;
- Pievieno probiotiķu sējmateriālu 2l (iepriekš laboratorijā saudzēts kolbās uz suliņām);

- Temperatūra tiek uzturēta 37° C (visu audzēšanas laiku);
- pH uzturēšana nav nepieciešama;
- Magnētiskais maisītājs var nodrošināt maisīšanu ar ātrumu līdz 380 apgr/min. Rekomendējams būtu sākt ar nelieliem apgriezieniem 10-20 apgr/min;
- Procesa laiks: 24-48 stundas. (ieteicams turpināt pētījumus, jo katrai probiotiķu audzēšanas iekārtai var šis laiks atšķirties);
- Pēc tam fermentatoru atdzesē līdz 4 °C ar ledus ūdeni un atstāj uz 12 stundām (laiks arī būs jāprecizē), lai probiotiķu biomasa nostājas;
- Pēc tam nostādināto biomasu no apakšas noliet caur apakšējo vārstu tīrā, vēlams ar tvaiku apstrādātā tvertnē. Līdz pievienošanai produktam uzglabāt vēsumā (4°C).

Saskaņā ar probiotiķu augšanas efektivitātes laboratorisku novērtējumu, tika secināts, ka uzkonstruētā Pilotiekārta ļauj iegūt rūpnieciskos apjomos ražošanai nepieciešamo probiotiķu biomasu no rūpnīcā iegūtām siera un biezpiena suliņām tādā kvalitātē, kas nodrošina probiotiķu optimālu izdzīvotību biezpiena gala produktos.

5. Rezultātu kopsavilkums un secinājumi.

Izpētīta liellopu barošanas shēmas ietekme uz piena un suliņu kvalitāti un sekojošu probiotisko kultūru audzēšanas parametriem un secināts, ka tā nav riska faktors probiotiķu kultivācijai.

Pierādīts, ka pētījumā izmantotos probiotiskos celmus (Chr. Hansen “nu-trish[®] *Lactobacillus casei*-01” un *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*) var audzēt gan uz skābajām (biezpiena) gan saldajām (siera) suliņām, bez citu papildpiedevu pievienošanas vai iekonzervēšanas.

Laboratorijas mērogā iegūtie rezultāti ir pārbaudīti rūpnieciskā pilotiekārtas mērogā un ir novērojama laba sakritība starp šiem rezultātiem. Līdz ar to ir izstrādāta metodika probiotiskā Chr. Hansen “nu-trish[®] *Lactobacillus casei*-01 celma audzēšanai uz siera un biezpiena suliņām rūpnieciskā mērogā.

Projekta pētījumiem tika konstruēta Cesvaines piens rūpnīcas infrastruktūrai pielāgota fermentācijas iekārta probiotiķu audzēšanai pilotlīmenī, kas ļāva laboratorija līmenī iegūtos rezultātus validēt un mērogot ražošanai pietuvinātos apstākļos.

Ar probiotiķiem bagātināta produkta izstrādei laboratorijā tika testēti virkne biezpiena produktu, no kuriem par perspektīvākiem pilotlīmeņa eksperimentiem tika atzīti mājas siers un irdenais biezpiens, kuriem Probiotiku biomasa tiek pievienota ar iemaisīšanas metodi.

Konstatēts, ka tauku saturs biezpienā (0,5% un 9%), kā arī produkta iepakojums neuzrādīja būtisku ietekmi uz probiotiķu izdzīvotību.

Izstrādāta tehnoloģija ekonomiski visperspektīvākajam produktam - ar probiotiķiem bagātināta mājas siera (ar saldo krējumu) ražošanai. Dotais biezpiena produkts izvēlēts, kā piemērotākais vairāku apsvērumu dēļ:

- Tehniski vieglāka probiotiskās masas pievienošana;
- Laba probiotiķu izdzīvotība – pēc divām nedēļām probiotiskās kultūras KVV/g produkta saglabājās virs 10^6 ;
- Probiotiskās kultūras *Lactobacillus casei* pievienošana neizraisīja būtiskās izmaiņas produkta konsistencē un garšas īpašībās.

Līdz ar to var secināt, ka projektā uzstādītie mērķi ir pilnībā izpildīti.

Projektā iegūtie rezultāti prezentēti starptautiskā konferencē “**European Biotechnology Congress 2019**” Spānijā Valensijā, kā stenda referāts. Šie konferences materiāli publicēti starptautiskā Web of Science datu bāzē indeksētā zinātniskā žurnālā:

K. Kovtuna, J. Martynova, S.I. Krēķee, R. Scherbaka, A. Vigants “The sweet and acidic whey as substrates for probiotics biomass production”(2019) Journal of Biotechnology, Volume 305, Supplement 15 , Pages S53-S54, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.190>.

Vadošais partneris: AS “Cesvaines piens”

Valdes locekle Dzintra Simsone

Sadarbības partneri:

Z/s “Lejas Jēci” īpašnieks

Jānis Razminovičs

Latvijas Universitātes projekta vadošais pētnieks

Armands Vīgants

SIA “AISIS” projekta vadītājs

Ivars Upmalis
