

**LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
VETERINARIJOS AKADEMIJA**

Veterinarijos fakultetas

Antanina Vitaitė

**Vietinės kilmės *Lactococcus lactis* padermių atrinkimas
ir jų probiotinių ir biologinių savybių nustatymas**

**Identification and determination of probiotic and
biological properties of local wild type *Lactococcus lactis*
bacteria**

Veterinarinės maisto saugos nuolatinių studijų
MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Darbo vadovas: Lektorė dr. Aušra Gabinaitienė
Maisto saugos ir kokybės katedra

Kaunas, 2020

**DARBAS ATLIKTAS MAISTO SAUGOS IR KOKYBĖS KATEDROJE (KLINIKOJE,
INSTITUTE)
PATVIRTINIMAS APIE ATLIKTO DARBO SAVARANKIŠKUMĄ**

Patvirtinu, kad įteikiamas magistro baigiamasis darbas „**Vietinės kilmės *Lactococcus lactis* padermių atrinkimas ir jų probiotinių ir biologinių savybių nustatymas**“.

1. Yra atliktas mano paties (pačios).
2. Nebuvo naudotas kitame universitete Lietuvoje ir užsienyje.
3. Nenaudojau šaltinių, kurie nėra nurodyti darbe, ir pateikiu visą naudotos literatūros sąrašą.

Elektroniniu laišku patvirtinu, o darbas bus pasirašytas pasibaigus karantino ir ekstremaliosios situacijos dėl COVID-19 pandemijos Lietuvos Respublikoje laikotarpiui.

2020 04 27
(data)

Antanina Vitaitė
(autorius vardas, pavardė)

(parašas)

**PATVIRTINIMAS APIE ATSAKOMYBĘ UŽ LIETUVIŲ KALBOS
TAISYKLINGUMĄ ATLIKTAME DARBE**

Patvirtinu lietuvių kalbos taisyklumą atliktame darbe.

Elektroniniu laišku patvirtinu, o darbas bus pasirašytas pasibaigus karantino ir ekstremaliosios situacijos dėl COVID-19 pandemijos Lietuvos Respublikoje laikotarpiui.

2020 04 27
(data)

Giedrė Zandovaitė
(redakatoriaus vardas, pavardė)

(parašas)

MAGISTRO BAIGIAMOJO DARBO VADOVO IŠVADA DĖL DARBO GYNIMO

Elektroniniu laišku patvirtinu, o darbas bus pasirašytas pasibaigus karantino ir ekstremaliosios situacijos dėl COVID-19 pandemijos Lietuvos Respublikoje laikotarpiui.

2020 04 28
(data)

lektorė, dr. Aušra Gabinaitienė
(darbo vadovos vardas, pavardė)

(parašas)

**MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS APROBUOTAS KATEDROJE (KLINIKOJE,
INSTITUTE)**

Elektroniniu laišku patvirtinu, o darbas bus pasirašytas pasibaigus karantino ir ekstremaliosios situacijos dėl COVID-19 pandemijos Lietuvos Respublikoje laikotarpiui.

(aprobacijos data)

Prof., dr. Mindaugas Malakauskas
(katedros (klinikos, instituto) vedėjo (-os) (vadovo (-ės))
vardas, pavardė)

(parašas)

Baigiamojo darbo recenzentas

Elektroniniu laišku patvirtinu, o darbas bus pasirašytas pasibaigus karantino ir ekstremaliosios situacijos dėl COVID-19 pandemijos Lietuvos Respublikoje laikotarpiui.

(vardas, pavardė)

(parašas)

Baigiamųjų darbų gynimo komisijos įvertinimas:

(data)

(gynimo komisijos sekretoriaus (-ės) vardas, pavardė)

(parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	6
SUMMARY	7
SANTRUMPOS	8
ĮVADAS	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Pieno rūgšties bakterijų charakteristika	11
1.1.1. <i>Lactococcus</i> genties morfologija ir biologinės savybės	12
1.1.2. <i>Lactococcus lactis</i> bakterijų biologinės savybės	13
1.1.3. <i>L. lactis</i> bakterijų panaudojimas	14
1.2. Probiotinės bakterijų savybės	17
1.3. Vietinės kilmės bakterijų kultūros	19
1.4. Rauginti pieno produktai ir jų nauda	19
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	21
2.1 Tyrimo objektas	21
2.2 Raugintų pieno produktų gamybos technologija	21
2.2.1 Bakterijų kultūrų paruošimas tyrimui	21
2.2.2 Raugų gamyba	22
2.2.3 Pieno raugų kokybinių savybių tyrimas	22
2.3 <i>L. lactis</i> probiotinių ir kitų biologinių savybių tyrimas	23
2.3.1 Atsparumo tulžies druskoms nustatymas	24
2.3.2 Atsparumo žemai pH reakcijai nustatymas	24
2.3.3 Pankreatino ir fenolio poveikio nustatymas	24
2.3.4 Angliavandenių fermentavimo tyrimas	25
2.3.5 Atsparumo temperatūrai nustatymas	25
2.4 <i>Lactococcus lactis</i> porūšių nustatymas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu... 25	
2.4.1. <i>Lactococcus lactis</i> DNR išskyrimas	25
2.4.2 PGR tyrimas	26
2.4 Statistinė duomenų analizė	27
3. TYRIMO REZULTATAI.....	29
3.1 Pieno ir pasukų raugų kokybinių savybių tyrimas	29
3.2 Probiotinių savybių tyrimas	32
3.2.1. Atsparumas tulžies druskoms	32

3.2.2.	Atsparumas žemai pH reakcijai	33
3.2.3.	Pankreatino ir fenolio poveikis.....	34
3.3.	Angliavandenių fermentavimas	34
3.4.	Atsparumas skirtingoms temperatūroms	35
3.5.	<i>Lactococcus lactis</i> porūšio identifikavimas PGR metodu	36
4.	REZULTATŲ APTARIMAS	38
	IŠVADOS.....	42
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	43
	PRIEDAI	47

SANTRAUKA

Vietinės kilmės *Lactococcus lactis* padermių atrinkimas ir jų probiotinių ir biologinių savybių nustatymas

Antanina Vitaitė

Magistro baigiamasis darbas

Tyrimo atlikimo vieta: LSMU VA Maisto saugos ir kokybės katedra.

Darbo vadovas: lektorė dr. Aušra Gabinaitienė

Darbo tikslas: atrinkti vietinės kilmės *Lactococcus lactis* padermes raugintų pieno produktų gamybai ir ištirti šių bakterijų probiotines ir biologines savybes.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti vietinės kilmės *L. lactis* padermių juslines savybes ir atrinkti priimtinausias padermes;
2. Nustatyti atrinktų *L. lactis* padermių probiotines ir biologines savybes;
3. Polimerazės grandininės reakcijos metodu nustatyti atrinktų *L. lactis* padermių porūšį.

Tyrimo metodika: tyrimo metu su 13 vietinės kilmės *L. lactis* padermėmis buvo pagaminti rauginti pieno produktai ir pagal produktams būdingus kokybinius rodiklius (rūgimo trukmę, konsistenciją, pH reakciją ir juslines savybes) tolimesniems tyrimams atrinktos 5 bakterijų padermės. Atrinktoms bakterijų padermėms tirtos probiotinės ir biologinės savybės: atsparumas 0,3 proc. tulžies druskoms ir žemai (2,5) pH reakcijai, 0,5 proc. pankreatino ir 0,2 ir 0,5 proc. fenolio poveikis, angliavandenių skaidymas, augimas skirtingose (+4 °C, +10 °C, +30 °C, +35 °C, +37 °C, +45 °C, +60 °C) temperatūrose. Naudojant polimerazinę grandininę reakciją identifikuotas *L. lactis* bakterijų porūšis.

Rezultatai ir išvados: remiantis pieno produktų kokybinių rodiklių tyrimo rezultatais, tolimesniems tyrimams atrinktos *L. lactis* bakterijų padermės Nr. 1, 3, 8, 9, 11. Šių bakterijų probiotinių savybių tyrimai parodė, kad didžiausiu atsparumu tulžies druskoms pasižymėjo bakterijų kultūra Nr. 9 ir Nr. 11 (išgyvenamumas padidėjo atitinkamai 113 ir 104 proc. nuo pradinės bakterijų koncentracijos). Žemai pH (2,5) reakcijai didžiausią atsparumą turėjo *L. lactis* padermė Nr. 9 (išgyvenamumas sumažėjo 67 proc. nuo pradinės koncentracijos). Pankreatino poveikiui buvo atspariausios bakterijų kultūros Nr. 8 ir 9, o skirtingos koncentracijos fenoliui - Nr. 11 ir 9 ($p \leq 0,05$). Angliavandenių fermentavimo tyrimo metu didžiausiu fermentiniu aktyvumu pasižymėjo bakterijų kultūra Nr. 1 (skaidė 34 proc. angliavandenių). Visos (5) bakterijų padermės priklauso mezofilinių bakterijų grupei, nes geriausiai augo +30 °C, +35 °C, +37 °C temperatūroje. PGR tyrimas parodė, kad visos atrinktos bakterijų padermės priklauso *Lactococcus lactis* porūšiui *lactis*.

Raktažodžiai: *Lactococcus lactis*, rauginti pieno produktai, probiotinės savybės, angliavandenių testas, PGR.

SUMMARY

Identification and determination of probiotic and biological properties of local wild type *Lactococcus lactis* bacteria

Antanina Vitaitė

Master's Thesis

Research location: Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary academy, Department of Food Safety and Quality

Supervisor: lecturer, dr. Aušra Gabinaitienė

The aim of the study was to select local strains of *Lactococcus lactis* for the production of fermented dairy products and to investigate the probiotic and biological properties of these bacteria.

The objectives of the study:

1. To study the sensory properties of local *L. lactis* strains and to select the most acceptable strains.
2. To determine the probiotic and biological properties of selected *L. lactis* strains.
3. To determine the subspecies of selected *L. lactis* strains by the polymerase chain reaction method.

Methodology: During the study, fermented milk products were produced with 13 strains of *L. lactis* of local origin, and 5 bacterial strains were selected for further investigation according to the product-specific qualitative parameters (fermentation time, consistency, pH reaction and sensory properties). Probiotic and biological properties of selected bacterial strains were studied: the resistance to bile salts (0.3 %) and low (2.5) pH reaction, the effect of 0.5 % pancreatin and 0.2 and 0.5 % of phenol, decomposition of carbohydrates, growth in different (+4 °C, +10 °C, +30 °C, +35 °C, +37 °C, +45 °C, +60 °C) temperatures. A subspecies of *L. lactis* was identified by polymerase chain reaction.

Results and conclusions: According of dairy products quality indicators survey for further investigation *L. lactis* bacteria strain No. 1, 3, 8, 9, 11 were selected. Studies of the probiotic properties of these bacteria showed that the highest resistance to bile salts was characterized by bacterial culture No. 9 and 11 (survival increased by 113 and 104% of baseline bacterial concentrations, respectively). At 2.5 pH reaction the highest resistance was characterized by bacterial culture No. 9 (survival decreased by 67 % of baseline bacterial concentrations), respectively. The most resistant bacterial cultures to pancreatin were No. 8 and 9 and for different concentrations of phenol - No. 11 and 9 ($p \leq 0,05$). In the carbohydrate fermentation study, the highest enzymatic activity was observed in bacterial culture No. 1 (decomposed 34% of carbohydrates). All (5) bacterial strains belong to the group of mesophilic bacteria because they grew best at +30 °C, +35 °C, +37 °C. PCR analysis showed that all selected bacterial strains belongs to the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Key words: *Lactococcus lactis*, fermented milk, probiotic properties, carbohydrates fermentation test, PCR

SANTRUMPOS

μl – mikrolitras;

Angl. – angliškai;

C° - Celsijaus laipsniai;

JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos;

L. lactis – *Lactococcus lactis*;

LogKSV/ml – logaritminis kolonijas sudarančių vienetų 1 mililitre skaičius;

MRS - De Man, Rogosa and Sharpe sultinys/agaras;

n– vienetų skaičius

Nr. – numeris

LsbB - bakteriocino pavadinimas

LSMU – Lietuvos sveikatos mokslų universitetas;

PGR – plomerazinė grandininė reakcija, angl. PCR.

PRB – pieno rūgšties bakterijos;

Proc. - procentai;

Pvz – pavyzdys, pavyzdžiui;

Kt. – kiti;

Sek. – sekundės;

spp. – angl. species;

subsp. – angl. subspecies;

temp. – temperatūra;

UV – ultravioletiniai spinduliai;

VA – Veterinarijos akademija;

val. – valanda.

IVADAS

Fermentuoti pieno produktai ilgą laiką buvo svarbi žmonių mitybos raciono dalis. Istoriškai fermentacijos procesas buvo susijęs su nenuspėjamu ir lėtu pieno rauginimu, kurį sukelia piene esantys mikroorganizmai. Moksliniai tyrimai leido pažinti fermentacijos eigą, o tai didino galimybes kontroliuoti mikrobiologinius procesus ir gaminti vis aukštesnės maistinės vertės fermentuotus pieno produktus. Rauginti pieno produktai yra svarbus funkcinio maisto komponentas, todėl intensyviai atliekami tyrimai su jais, įtraukiant probiotinius organizmus, kad rauginti pieno produktai taptų vertingesni. Vis didėjantis vartotojų susidomėjimas raugintais pieno produktais, besikeičiančios socialinės nuostatos ir moksliniais įrodymais pagrįstas tam tikrų maisto sudėtinųjų dalių naudingumas sveikatai skatina kurti naujus maisto perdirbimo metodus. Kai kurie kultūriniai pieno produktai, tokie kaip biojogurtas, yakultas, actimelis ir kiti., jau yra parduodami kaip terapiniai ir dietiniai produktai (39).

Pieno rūgšties bakterijos (PRB), tokios kaip *Lactobacillus* ar *Bifidobacterium* gentys, sudaro didelę probiotinių kultūrų dalį maisto papilduose, vaistuose ir funkcionaliuose maisto produktuose. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad probiotikai žarnyne konkuruoja su patogeniniais mikroorganizmais slopindami jų augimą bei padeda stabilizuoti virškinimo sistemą. Kiti probiotikų pranašumai yra žarnyno infekcijų prevencija, priešnavikinis aktyvumas ir laktozės įsisavinimo žmogaus žarnyne gerinimas. Kita vertus, kadangi tekstūra ir skonis yra pagrindiniai maisto produkto priimtumo rodikliai, labai svarbu, kad potencialios probiotikų padermės prisidėtų ir prie teigiamos galutinio produkto organoleptinės kokybės. Be naudos sveikatai ir įtakos produkto juslinėms savybėms, labai svarbu, kad galimos probiotinės bakterijos sugebėtų prisitvirtinti prie žarnyno epitelio ląstelių ir būtų atsparios skrandžio, tulžies ir kasos sekretams, kas leistų joms kolonizuoti žmogaus žarnyną (25).

Komercinių pieno rūgšties bakterijų probiotinės ir biologinės savybės yra plačiai ištirtos ir pritaikytos raugintų pieno produktų gamybai maisto pramonėje. Tačiau kuriant inovatyvesnius produktus atkeipiamas vis didesnis dėmesys į vietinės kilmės pieno rūgšties bakterijas, tokias kaip *Lactococcus lactis*. Šie mikroorganizmai pasižymi potencialiomis probiotinėmis ir puikiomis organoleptinėmis savybėmis (7, 8) lyginant su komercinėmis bakterijų kultūromis. Naujausi tyrimai parodė ir *L. lactis* potencialą bakteriocino gamyboje, kuris veikia kaip biokonservantas prieš daugelį patogeninių mikroorganizmų (13). Šias bakterijas lengviau panaudoti ir pieno produktų gamyboje besivystančioms šalims, nes nereikia jų importuoti iš kitų pasaulio šalių (10, 37). Potencialių probiotikų šaltiniai (vietinės kilmės bakterijos) suteikia vietos verslininkams papildomų galimybių kurti vietoje pritaikytą ir prieinamą sveiką maistą (10).

Darbo tikslas: Atrinkti vietinės kilmės *Lactococcus lactis* padermes raugintų pieno produktų gamybai ir ištirti šių bakterijų probiotines ir biologines savybes.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti vietinės kilmės *L. lactis* padermių juslines savybes ir atrinkti priimtinausias padermes.
2. Nustatyti atrinktų *L. lactis* padermių probiotines ir biologines savybes.
3. Polimerazės grandininės reakcijos metodu nustatyti atrinktų *L. lactis* padermių porūšį.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Pieno rūgšties bakterijų charakteristika

Pieno rūgšties bakterijos (PRB, angl. k., LAB) apibūdinamos kaip gramteigiamos, koko ar lazdelės formos, sporų negaminančios bakterijos, gebančios fermentuoti angliavandenius energijos ir pieno rūgšties gamybai. Visos pieno rūgšties bakterijos auga anaerobinėmis sąlygomis, bet kaip ir daugelis anaerobų, gali augti aplinkoje kurioje yra deguonies, todėl gali būti priskiriamos aerotoleranciniams ar fakultatyviems anaerobams (13).

Šios bakterijos skirstomos į dvi grupes: homofermentines ir heterofermentines. Homofermentinės bakterijos rauginamos angliavandenius pagamina iki 85–95 proc. pieno rūgšties ir nedaug šalutinių rūgimo produktų. Šiuo atveju rauginamos gliukozę bakterijos pagamina dvi laktato molekules (būdinga *Streptococcus* ir *Lactococcus* gentims). Heterofermentinės bakterijos sudaro vieną laktato molekulę ir daug šalutinių rūgimo produktų: acto rūgšties, etilo alkoholio, anglies dioksido, vandenilio (būdinga *Leuconostoc* gentims ir kai kurioms *Lactobacillus* rūšims). Pieno rūgšties bakterijos taip pat sugeba gaminti aromatines medžiagas, kurios maisto produktams suteikia malonų aromatą ir specifinių organoleptinių savybių. PRB geba slopinti patogeninių mikroorganizmų augimą, išlaikydamos produktų maistinę kokybę ir pagerindamos jų laikymo/vartojimo laiką (13).

PRB grupei priskiriamos pagrindinės gentys yra: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ir *Weissella*. Taip pat yra ir kitų genčių: *Aerococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* ir *Bifidobacterium* (13).

Pieno rūgšties bakterijos dar vadinamos probiotinėmis bakterijomis, kurios daro teigiamą poveikį žmonių virškinamojo trakto mikroflorai. Pavyzdžiui, *Lactobacillus acidophilus* kaip natūrali žmonių organizmo mikrofloros dalis randama burnos ertmėje, plonosiose žarnose ar ant lyties organų epitelinių ląstelių. Kai kurios pieno rūgšties bakterijos gamina fermentą amilazę. Viena jų yra *Lactobacillus* genties bakterijos, kurios aptinkamos paukščių ir žinduolių, tokių kaip kiaulė, arklys, triušis ir žmonių, įskaitant kūdikius, virškinimo trakte. Amilazės fermentai katalizuoja pradinę krakmolo hidrolizę į trypus oligosacharidus, tokiu būdu aktyvinamas krakmolo virškinimas plonajame žarnyne ir gliukozės absorbcija kraujyje (6).

PRB randamos piene, mėsoje, fermentuotuose produktuose, taip pat raugintose daržovėse ir fermentuotuose gėrimuose (13). Šios bakterijos dažniausiai naudojamos pramoniniame fermentavime: jogurtų ir sūrų gamybai. Pradinuose rauguose pieno fermentacijai naudojamos *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* bakterijų rūšys (5). Daugiau kaip 50 proc. pieno rūgšties bakterijų naudojama maisto

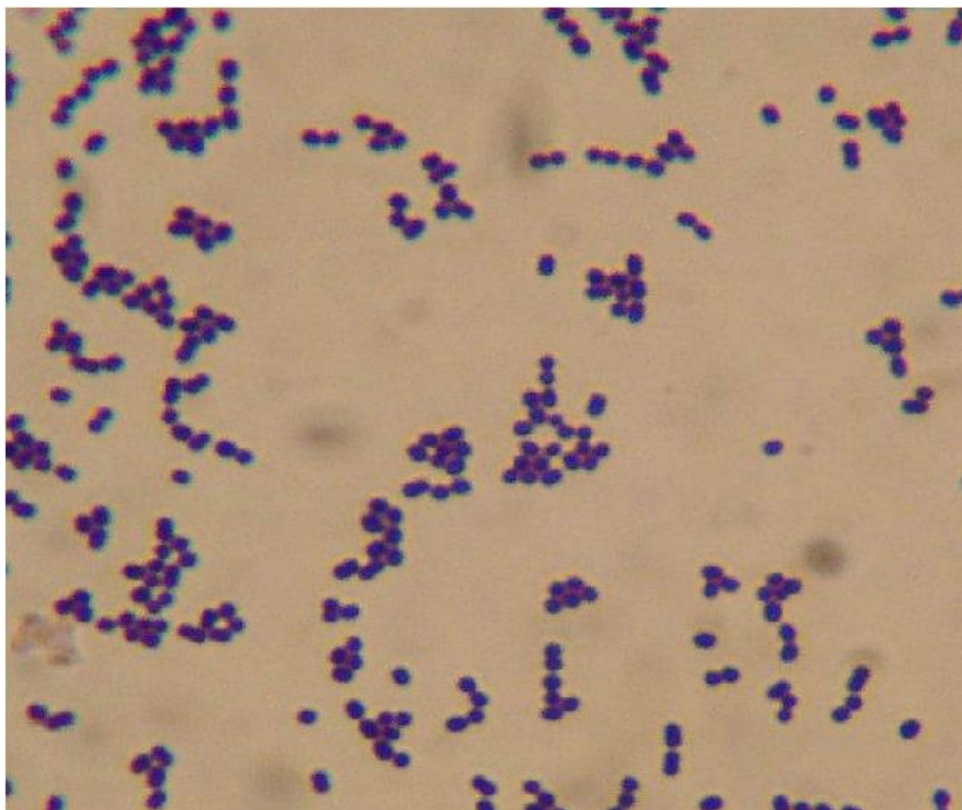
pramonėje ruošiant kepinius. PRB naudojamos ir farmacijoje, chemijos pramonėje ir cheminiuose pašaruose. Kosmetikos pramonėje pieno rūgšties bakterijos yra naudojamos kaip pH reguliatoriai, antimikrobinės medžiagos, taip pat kaip medžiagos drėkinančios ir šviesinančios odą.

1.1.1. *Lactococcus* genties morfologija ir biologinės savybės

Lactococcus genčiai priklauso 15 identifikuotų bakterijų rūšių su jų porūšiais: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus chungangensis*, *Lactococcus formosensis*, *Lactococcus fujiensis*, *Lactococcus hircilactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus laudensis*, *Lactococcus nasutitermitis*, *Lactococcus petauri*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus reticulitermitis*, *Lactococcus taiwanensis*, *Lactococcus termiticola*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis*.

Laktokokai, fakultatyvūs anaerobai, gaminantys L (+) pieno rūgštį iš laktozės savaime fermentuotame žaliame piene, per 10–20 val. aplinkos temperatūroje (+20– +30 °C). Šios bakterijos vadinamos „mezofiliniais pieno streptokokais“. Pirmasis pieno rūgštį, iš rauginto pieno, išskyrė, identifikavo ir aprašė Carl Wilhelm Scheele 1780 m. Švedijoje. Iš tikrųjų tai buvo l (+) laktokokų pagaminta pieno rūgštis. Pieno fermentacijos mikrobiologinį pobūdį pripažino ir Luji Pasteras (Louis Pasteur) (1857 m.). O pirmoji gryna bakterijų kultūra, kurią išskyrė ir moksliai aprašė Josephas Listeris 1873 m., buvo *Lactococcus lactis*, tuo metu vadinama „*Bacterium lactis*“. 1890 m. buvo išskirti mezofiliniai pieniniai streptokokai, atsakingi už greitą grietinės, rauginto pieno ir sūrio fermentaciją, ir buvo pradėti naudoti kaip pradinės kultūros pieno pramonėje. 1958 m. remiantis nukleorūgščių hibridizacijos tyrimais ir imunologiniais ryšiais, mezofiliniai pieniniai streptokokai atskirti nuo tikrųjų streptokokų (*Streptococcus* gentis) ir enterokokų (*Enterococcus* gentis) ir sukurta nauja *Lactococcus* gentis (16).

Lactococcus genties kamienai yra rutulio formos (kokai), mikroskopuojant gali būti matomi kaip pavieniai kokai (0.5 – 1.5 µm ilgio) ir gali sudaryti kokų poras arba trumpas kokų grandinėles (1 paveikslas) ir priklauso mezofilinių bakterijų grupei. Optimali augimo temperatūra yra +30 °C, tačiau gali augti temperatūrų ribose nuo +10 iki +45 °C. Jų gebėjimas augti aukštesnėje nei +40 °C temperatūroje, esant didesnei druskos koncentracijai (> 4 proc. natrio chlorido) ir gaminti rūgštis iš įvairių cukrų (arabinozės, laktozės, manitolio ir rafinozės) skiriasi priklausomai nuo rūšies. Ypač svarbus jų gebėjimas fermentuoti laktozę, nes šios bakterijos dažnai naudojamos kaip pradinės pieno rūgšties bakterijų kultūros pieno produktų gamybos pramonėje. Šių bakterijų augimą slopina 6,5 proc. NaCl ir 9,6 pH reakcija (7).



1 pav. *Lactococcus lactis* bakterijos nudažytos Gramo būdu (30).

Laktokokai aptinkami įvairiose aplinkose: žaliame karvės piene, augalinėse (raugintos daržovės ir vaisiai) ir gyvūninėse medžiagose. H. Kimoto su bendraautoriais (17) atlikto tyrimo metu, iš 54 fermentuotų daržovių, 9 siloso ir 4 įvairių žolelių mėginių (visi mėginiai iš Japonijos Hokaido ir Okinavos regionų) išskyrė vietinės kilmės *Lactococcus lactis* bakterijų kultūras ir ištyrė jų probiotines savybes.

1.1.2. *Lactococcus lactis* bakterijų biologinės savybės

Yra žinomi keturi *L. lactis* porūšiai:

L. lactis subsp. *lactis*;

L. lactis subsp. *cremoris*;

L. lactis subsp. *hordniae*;

L. lactis subsp. *tructae*.

Lactococcus lactis porūšiai pasižymi skirtingomis biologinėmis savybėmis, todėl naudojami skirtingų pieno produktų gamyboje. Porūšių gebėjimas augti aplinkoje esant 4 proc. NaCl, 9,2 pH reakcijai +40 °C temperatūroje yra išskirtinai *L. lactis* subsp. *lactis* požymiai. Arginino fermentavimas, glutamato dekarboksilinimas iki c - aminobutyro rūgšties, maltozės fermentavimas taip pat laikomi fenotipiniais *L. lactis* subsp. *lactis* požymiais (2, 3). Šis bakterijų porūšis pasižymi ir atsparumu stresui, todėl jos greitai ir gerai auga. *L. lactis* subsp. *lactis* naudojamos pieno rūgšties gamybai, kuri reikalinga varškės formavimui. Tuo metu *L. lactis* porūšis *cremoris* minėtų savybių

neturi. Jos yra jautrios aplinkos pokyčiams ir labai sunkiai prie jų prisitaiko. Dėl jų negebėjimo suformuoti adaptyvaus atsako į stresą, *L. lactis* subsp. *cremoris* yra lėtai augančios ir lėtos pieno rūgšties gamintojos. Ši bakterijų savybė panaudojama sūrių gamyboje, nes streso poveikyje bakterijos lengvai lizuojamos ir gali išlaisvinti fermentus, reikalingus sūrio nokinimui. Išskirtinė jų savybė – gebėjimas rauginiems produktams suteikti puikias skonines savybes (35).

Kitas *L. lactis* porūšis *hordniae* negali fermentuoti laktozės, todėl piene ir jo produktuose šios bakterijos neaptinkamos. Šios bakterijos yra išskiriamos iš cikadėlių (*Hordnia circellata*). Ketvirtas *Lactococcus lactis* porūšis *tractae* buvo išskirtas iš upėtakio ir pasižymi šiomis savybėmis: arginino dehidrolazės gamyba po 24 kultivavimo valandų, augimu 4 proc. NaCl aplinkoje. Padermės geba įsisavinti gliukonatą. Rūgštį gamina iš maltozės, laktozės, ribozės, manitolio, sacharozės ir amigdalino, bet ne iš D - ksilozės. Rūgšties gamyba iš melibozės ir rafinozės yra kintama. *L. lactis* subsp. *tractae* padermės jautrios cefuroksimui ir atsparios eritromicinui bei polimiksinui B. Pasitaiko ir tetraciklinui atsparių padermių (19).

1.1.3. *L. lactis* bakterijų panaudojimas

Fenotipiškai *Lactococcus lactis* yra klasifikuojama kaip gramteigiamos, sferinės, homolaktatinės, nesporuliuojančios ir fakultatyviosios anaerobinės žarnyno bakterijos su šimtais padermių ir biovariantų paskelbtų iki šiol. Natūralu, kad *L. lactis* yra griežtai homolaktinės fermentacijos bakterijos, kurios per labai efektyvią laktato dehidrogenazę iš piruvato paverčia savo anglies šaltinį l-laktatu. Pieno rūgštis pramoniniu požiūriu yra svarbus junginys, nes naudojamas kaip konservantas - rūgštiklis, kaip skonio stiprinimo priemonė maisto pramonėje, kaip emulsiklis ir drėkinamoji priemonė kosmetikos pramonėje bei kaip svarbi žaliava farmacijos pramonėje. *L. lactis* bakterijų kultūros, mišriai fermentuojant, gamina ir daugybę aromatinių acetilintų produktų, tokių kaip diacetilas, acetaldehidas ir acetatas, kurie yra svarbūs skonio junginiai pieno produktuose (7).

Naujausi tyrimai parodė *L. lactis* potencialą bakteriocino gamyboje, kuris veikia kaip biokonservantas prieš *Listeria monocytogenes*. Šių bakteriocinų nauda patvirtinta ir klinikiniais tyrimais, kurie parodė, kad šios medžiagos užkerta kelią bakterijų bioplėvelių susidarymui. PRB produkuojami bakteriocinai yra antimikrobiniai peptidai, kurie yra sintezuoti ribosominiu lygmeniu transkripcijos ir po transkripcijos lygiu; tai pirminiam kamienui suteikia imunitetą. Naujausių *L. lactis* bakteriocinų pavyzdžiai yra laktinas 3147, laktinas Q/Z ir LsbB. Tačiau labiausiai žinomas ir geriausiai apibūdinamas lantibiotikas – nizinas (7). Yra nustatyta, kad nizinas ir laktinas 3147 (abu priklauso I klasei) gamina *L. lactis* porūšis *lactis*, o *L. lactis* porūšis *cremoris* produkuoja laktokociną B (priklauso II klasei) (13).

Pieno rūgšties bakterijų gaminami bakteriocinai pagal biochemines savybes ir genetinius požymius skirstomi į tris klases:

I klasė – lantibiotikai: maži (<5 kDa) šilumoje stabilūs peptidai, veikiantys ląstelių membranų struktūras; po transliacijos jie labai modifikuojami, todėl susidaro būdingos tioeterio aminorūgštys lantioninas ir metilentioninas. Jos atsiranda per dviejų pakopų procesą, atsirandantį po transdukcijos modifikacijų: pirmiausia, genų užkoduotas serinas ir treoninas yra fermentuojami dehidratuojant, kad atitinkamai susidarytų dehidroalaninas ir dehidrobutirinas. Labai gerai žinomas šios grupės pavyzdys yra nizinas.

II klasė - ne lantibiotikai: kintamos molekulinės masės, bet paprastai maži (<10 kDa) bakteriocinai, stabilūs šilumai, turintys įprastų aminorūgščių. Dar skirstoma į tris mažesnes grupes.

III klasė - dideli peptidai, kurių molekulinė masė didesnė kaip 30 kDa. Šioje klasėje yra J ir V helveticinai, acidofilicinas A ir laktocinai A ir B. Dauguma mažos molekulinės masės bakteriocinų yra labai katijoniniai, esant pH 7,0, ir tai atrodo vienijantis lantibiotikų ir nelantibiotikų bruožas.

Mezofilinių *L. lactis* subsp. *lactis* gaminamas nizinas – yra polipeptidinis antibiotikas, kuris yra geriausiai ištirtas ir plačiai naudojamas kaip biologinis konservantas. Šis antibiotikas naudojamas gaminant konservuotus maisto produktus, nes tai leidžia sutrumpinti terminio apdorojimo trukmę ir taip išsaugoti produktų biologinę ir maistinę vertę. Taip pat šis bakteriocinas gramteigiamas bakterijas (įvairių serologinių grupių streptokokus, stafilokokus, pneumokokus, mikobakterijas ir sporas gaminančias aerobines ir anaerobines bakterijas) veikia baktericidiškai. Dėl savo gebėjimo absorbuotis sporų paviršiuje, nizinas pablogina sporų membranos pralaidumą ir sumažina sporų šiluminį stabilumą (4).

Taigi bakteriocinai patraukė dėmesį kaip galimi antibiotikų pakaitalai, kad būtų galima išgydyti ir užkirsti kelią bakterinėms infekcijoms. Bakteriocinus arba baktericidinius peptidus gamina kai kurie mikroorganizmai visose pagrindinėse eubakterijų ir archebakterijų rūšyse. Laktokokai gamina daugybę bakteriocinų, įskaitant minėtus nizinus, laktinus, laktostrepcinus, laktokocinus ir laktocinus (11). Svarbiausia savybė, kuria pasižymi bakteriocinai, tai jų gebėjimas slopinti per maistą plintančių patogenų, tokių kaip *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* ir *Listeria monocytogenes*, augimą (12).

Šiuo metu dedamos pastangos apibūdinti *L. lactis* padermių produkuojamus bakteriocinus, dėl jiems būdingų savybių, tokių kaip stabilumas rūgštinėje aplinkoje ir termotolerancija aukštoms temperatūroms. Tobulinant gamybos sistemas, ieškoma naujų jų panaudojimo galimybių (7).

L. lactis padermių gebėjimas gaminti biologiškai aktyvias medžiagas (vitaminus, peptidus ir fermentus) panaudojamas įvairių produktų gamyboje maisto pramonės, medicinos ar kosmetikos srityse. 1 lentelėje pateikiamas pramoninių fermentų ir junginių, kuriuos gamina *Lactococcus lactis* padermės, sąrašas.

1 lentelė. Pramoniniai fermentai ir junginiai gaminami Lactococcus lactis padermių.

Pramoninis tipas ir produktai	Panaudojimo galimybės
Junginiai	
Pieno rūgštis	Konservantas, kvapioji medžiaga, polilakto rūgštis, plastikas, emulsiklis, drėkiklis
Acetonas/Diacetilas	Skoninės savybės
L- alaninas	Saldiklis
Pramoninis tipas ir produktai	
Junginiai	
Linalolis	Skoninės savybės
Germacrene D	Antimikrobinis, insekticidinis, feromonas
β-Sesquiphellandrene	Antimikrobinis, antioksidantas, priešvėžinis
Hialurono rūgštis	Kosmetika, medicina
Vitaminai	
Folatai (B11) Sveikatos papildai	Sveikatos papildai
Riboflavinai (B12)	Sveikatos papildai
Biokuras	
Etanolis	Energijos šaltinis
Peptidai	
Bakteriocinas	Antimikrobinis, konservantas
„Brazzein“	Saldiklis
„Mabinlin II“	Saldiklis
Nisinas Z	Maisto konservantas
Fermentai	
β-ciklodekstrino gliukanotransferazė	Krakmolo skilimas
Kumarato CoA ligazė (4CL)	Metabolinė inžinerija
Alkoholio aciltransferazė (SAAT)	Metabolinė inžinerija
Linalolio/nerolidolio sintazė (FaNES)	Metabolinė inžinerija
Sesquiterpeno sintazė	Metabolinė inžinerija
3-hidroksi-3-metilglutarilo KoA reduktazė (HMGR)	Metabolinė inžinerija
Tulžies druskos hidrolazė (BSH)	Žarnyno metabolizmas, probiotikai
Rūgštinė ureazė	Karbamido hidrolizė

Dėl savo imunomoduliacinių savybių ir gebėjimo išgyventi praėjimą per virškinimo traktą *L. lactis* naudojamas kaip nešiklis, leidžiantis į žmogaus organizmą patekti tokiems vaistams kaip citokinai. Pirmieji tokio taikymo įrodymai buvo paskelbti L. Steidler ir bendraautorių (20) kur *L. lactis* inžinerinė interleukino-10 (IL-10) sekrecija buvo naudojama kolitui, eksperimento metu sukeltai pelių uždegiminei žarnyno ligai (UŽL) gydyti. Nuo to laiko, IL-10 išskiriantis *L. lactis* buvo pradėtas naudoti klinikinių tyrimų metu. Kartu buvo pradėtas ir genetiškai modifikuoto timidino auktrofinės *L. lactis* padermės biologinis „sulaikymas“. Nors klinikinių tyrimų rezultatai nebuvo daug žadantys, kaip tikėtasi, tačiau ši biologinio izoliavimo strategija buvo labai sėkminga. Ir minėta padermė tapo saugia genetiškai modifikuotų organizmų (GMO) seka. Nuo to laiko, kai IL-10 buvo naudojamas UŽL gydymui iš *L. lactis* buvo pagaminta daug kitų UŽL gydymui skirtų vaistų, įskaitant kitus citokinus, antioksidantinius fermentus ir proteazės inhibitorius (7).

1.2. Probiotinės bakterijų savybės

Probiotinės bakterijos yra labai naudingos žmogaus sveikatai. Šie mikroorganizmai gerina žarnyno mikrobiotos pusiausvyrą ir apsaugo ją nuo patogeninių mikroorganizmų. Kitas teigiamas probiotinių mikroorganizmų poveikis yra imuninės sistemos stimuliavimas, cholesterolio lygio kraujyje mažinimas, vitaminų (ypač B grupės vitaminų) sintezė ir antikancerogeninis bei antimikrobinis poveikis. Labai svarbus kriterijus, kurį turi atitikti probiotinės bakterijos yra išgyvenamumas virškinimo trakte. Taigi, probiotinių pieno rūgšties bakterijų nauda sveikatai yra skirtinga, atsižvelgiant į rūšį, ir šis poveikis pasireiškia skirtingais mechanizmais. *L. lactis* probiotinių savybių *in vitro* ir *in vivo* tyrimai pagrindžia jos panaudojimą kaip potencialią probiotikų padermę pagerinant maisto produktų maistinę vertę (8).

Dažniausiai kaip probiotikai naudojamos šios probiotinių PRB gentys: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ir *Lactococcus* bakterijų gentys. Minėtų probiotinių pieno rūgšties bakterijų genčių teigiamas poveikis žmogaus sveikatai yra moksliskai nustatytas ir įrodytas. Šios bakterijos gali būti sėkmingai naudojamos įvairių priežasčių sukeltam viduriavimui mažinti ir prevencijai, žarnyno mikrofloros pusiausvyros pagerinimui dėl antimikrobinio aktyvumo, laktozės netoleravimo simptomų palengvinimui, maisto prevencijai, alergijų atveju, imuninės potencijos stiprinimui ir priešnavikiniam aktyvumui stimuliuoti. Probiotinis maistas yra sveikatai palankus, vadinamojo funkcinio maisto grupė, turinti didelį komercinį susidomėjimą ir augančią rinkos dalį (9).

Probiotinė savybė laikomas ir bakterijų antimikrobinis aktyvumas. Slopinantį probiotinių bakterijų poveikį sukelia jų produkuojamos organinės rūgštys, vandenilio peroksidas, diacetilas, bakteriocinai ir specifinės medžiagos, tokios kaip antivirusiniai peptidai arba mažos molekulinės masės peptidai. PRB slopina patogeninių mikroorganizmų ir maistą gadinančių mikroorganizmų vystymąsi, konkuruodamos su maiste esančiomis bakterijomis, kurios trumpina maisto produktų tinkamumo vartoti laiką. Labiausiai žinomi laktokokų gaminami bakteriocinai yra nizinas, laktokocinas A, laktokokinas B, laktokokinas MN, laktokokinas G, laktokokinas 972, lakticinas 481, laktinas 3147, laktinas FS92, laktinas RM, laktinas NK24, laktokokinas R, laktokokinas MMT24, laktokokinas MMFII. Remiantis O. Yerlikaya tyrimo duomenimis, *Lactococcus lactis* K5 padermė slopino tik *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 bakterijas, o padermė K9 turėjo įtakos tik *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 bakterijų augimui. Tačiau padermė K9 neturėjo įtakos *Listeria monocytogenes* CECT 932 augimui ir vystymuisi. Panašus (mažesnis) slopinamasis poveikis buvo pastebėtas *Escherichia coli* CECT 4267, tuo tarpu slopinamasis poveikis prieš *Escherichia coli* ATCC 25922 padermę buvo didesnis. *Lactococcus lactis* Z9 ir Z3 kamienai nebuvo veiksmingi prieš *Bacillus cereus* CECT 131, tačiau turėjo didžiausią antimikrobinį / antibakterinį poveikį kitų bakterijų atžvilgiu. Be to, mažiausias antimikrobinis poveikis pastebėtas

prieš *Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis* ATCC 13076 ir *Escherichia coli* CECT 4267 bakterijas. Tik keturi iš *L. lactis* kamienų (Z3, Z6, Z9 ir Z10) buvo veiksmingi prieš šias dvi indikatorines bakterijas. Apskritai, dauguma tyrime išskirtų ir identifikuotų *L. lactis* padermių buvo veiksmingos prieš *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 bakterijas; tik *Lactococcus lactis* K10 padermė neturėjo jokio poveikio minėtai bakterijų padermei (8).

Probiotinių bakterijų gebėjimas išgyventi virškinimo trakte yra viena iš pagrindinių probiotinių savybių. Ši savybė susijusi su jų gebėjimu augti skirtingos koncentracijos tulžies druskose ir žemo pH toleravimu. Fiziologinė tulžies druskų koncentracija žarnyne kinta nuo 0,3 iki 0,5 proc. Probiotinių mikroorganizmų atsparumas tulžies druskoms yra susijęs su jų produkuojamo fermento hidrolazės aktyvumu. Fermentas hidrolizuodamas konjuguotas tulžies druskas sumažina slopinamąjį tulžies druskų poveikį mikroorganizmams. Probiotinės bakterijos yra atsparesnės tulžies druskai nei pieno rūgštės bakterijos; konkrečiai, dauguma *Streptococcus thermophilus* rūšių yra jautrios 0,5 proc. tulžies druskai. Moksliniai tyrimai rodo, kad dauguma iš žalio pieno ir kefyro išskirtų *Lactococcus lactis* padermių negali augti aplinkoje esant tulžies druskoms ir tai laikoma neigiama šių probiotinių bakterijų savybe (8).

Žmogaus skrandyje pH gali svyruoti nuo 1,5 nevalgius iki 4,5 pavalgius, o nurytą maistą suvirškinti gali prireikti iki 4 val. Kad probiotinės bakterijos atliktų savo fiziologinį vaidmenį žarnyne, bakterijoms reikia išgyventi labai rūgščiose skrandžio sultyse. Remiantis B. Rayavarupu (22) tyrimo rezultatais nustatyta, kad probiotinės bakterijos gerai augo kai pH kito nuo 4 iki 9. Kai pH 2, augimas nebuvo stebimas, tačiau silpnas augimas buvo stebimas esant pH 3, o kintami rezultatai buvo užfiksuoti esant pH 10. Galima daryti išvadą, kad laktobacilos, kurių augimą veikė žemas pH 2 ir 3, galėjo patekti į tyrimo aplinką iš maisto, gyvūnų ir žmonių. Laktobacilos toleruoja rūgštį dėl pastovaus tarpląstelinio gradiento ir citoplazminio pH.

Autoagregacija ir hidrofobiškumas – savybės, kuriomis taip pat turi pasižymėti probiotinės bakterijos. Mikroorganizmai, kuriems būdingos hidrofobiškumo savybės, sugeba tvirtai prilipti prie žarnų gleivinės ląstelių ir atlikti savo fiziologines funkcijas. Autoagregacija svarbi tuo, kad dvi ląstelės koegzistuoja viena su kita, o tai padeda formuojant bioplėveles (6). Autoagreguojančių PRB paviršiai yra labai hidrofobiniai, tuo tarpu neagreguojančių padermių paviršiai yra hidrofiliniai. Įrodyta, kad PRB ląstelių paviršiaus baltymai tarpininkauja sukibimui su žarnyno gleivine. Adhezijos prie epitelio paviršiaus mechanizmai apima tiek specifinį baltymo surišimą, tiek hidrofobinę sąveiką (21).

Probiotinės bakterijos turi kaip galima geriau toleruoti ir kasos fermentus. Kasos fermentai patenka į plonąją žarną per kasos kanalą ir dalyvauja maisto baltymų, angliavandenių ir riebalų virškinime. Galimos probiotinės laktobacilos yra tikrinamos dėl tolerancijos pankreatinui ir fenoliui žmogaus virškinimo trakto aplinkoje. Fenoliai yra toksiški metabolitai, kurie išsiskiria virškinimo

proceso metu iš aromatinių aminorūgščių ir endogeninių baltymų. Tam tikros probiotinės bakterijos gali toleruoti ribotą fenolių kiekį virškinimo trakte (6). Nagrinėjant R. Bhargavi (22) atliktą tyrimą, kurio metu buvo vertinama PRB probiotinės savybės, pastebėta, kad visos tirtos bakterijų padermės parodė atsparumą 0,2 proc. koncentracijos fenoliui, o esant 0,5 proc. fenolio koncentracijai buvo pastebėtas sumažėjęs bakterijų padermių augimas. Taip pat visų tirtų bakterijų padermių atsparumas užfiksuotas ir 0,5 proc. koncentracijos pankreatinui.

1.3. Vietinės kilmės bakterijų kultūros

Vietinės kilmės bakterijų kultūromis vadinamos tokios, kurios buvo išskirtos iš vietinių natūralių, nefermentuotų ar savaiminės fermentacijos produktų, į kuriuos ne pridėta komercinio raugo ar bakterijų kultūrų (10).

Šiais laikais išteklių neturinčių bendruomenių prieiga prie prieinamų probiotikų yra ribota, išskyrus vietoje pagamintas probiotikų padermes. Atsirado vis daugiau įžvalgos apie probiotinių funkcijų mechanizmus, o žmogaus žarnyno mikrobiotos įvairovė, stabilumas ir atsparumas tampa vis svarbesni. Todėl labai įvairus besivystančių šalių žmonių mikrobiomas siūlo jiems unikalų naudingų mikrobų šaltinį, kurių daugiau vakarų populiacijose gali nebūti. Potencialių probiotikų šaltiniai (vietinės kilmės bakterijos) suteikia vietos verslininkams papildomų galimybių kurti vietoje pritaikytą ir prieinamą sveiką maistą. Vietinės organizacijos taip pat gali būti geresnėje padėtyje, priimančios vietinius mitybos, sveikatos priežiūros ir įstatymų sprendimus, užuot pasikliaujant užsienio kompanijų probiotiniais produktais, ypač jei šie produktai nėra įprastos dietos dalis arba yra per brangūs besivystančių šalių vartotojams (10).

1.4. Rauginti pieno produktai ir jų nauda

PRB yra žmogaus raciono dalis ir jos dažniausiai gaunamos iš įvairių fermentuotų produktų, įskaitant pieno produktus. Šių bakterijų dauginimasis piene sukelia greitą pH kritimą (parūgštinimą) dėl pieno rūgšties susidarymo laktozės fermentavimo metu. Besivystant PRB piene keičiasi pieno maistinių medžiagų biologinis prieinamumas. Be to, augdamos piene šios bakterijos gamina naujus metabolitus, kurie sustiprina fermentuoto pieno produkto organoleptines ir jutimines (skonio ir kvapo) savybes. Daugelį patogeninių ir maisto produktų gedimą sukeliančių mikroorganizmų dauginimąsi slopina aplinkos rūgštinimas, o tai užtikrina fermentuotuose produktuose esančių nepageidaujamų bakterijų stabilizavimą.

Raugintais pieno produktais laikomi: natūraliai raugintas pienas, jogurtas, kefyras, kumysas ir kiti. Fermentuotų pieno produktų maistinė sudėtis priklauso nuo pieno maistinės sudėties. Pats pienas turi svarbių funkcinių komponentų, tokių kaip kalcis, fosforas, vitaminai, laktoferinas ir kiti. Gyvūnų rūšys, veislė, pašaras, laktacijos stadija, amžius ir aplinkos veiksniai daro įtaką pieno

maistinei sudėčiai. Kintamieji veiksniai, tokie kaip temperatūra ir laikymo sąlygos, apdorojimo rūšis ir trukmė (homogenizavimas, pasterizavimas, temperatūros ir fermentacijos bei brandimo trukmė) perdirbimo metu, taip pat turi įtakos pieno ir jo funkcinių komponentų maistinei vertei. Rauginamų maisto produktų galutinei mitybinei sudėčiai įtakos turi ir fermentavimą bei brandinimą atliekantys mikrobu tipai. Raugintuose produktuose yra naudingųjų bakterijų dalyvaujančių produktų gamyboje, taip pat augimo metu susidarančių funkcinių metabolitų šaltinis (organinių rūgščių, folio rūgšties, bioaktyvių peptidų), kuris dar labiau padidina raugintų pieno produktų vertę sveikatai. Įrodyta, kad pieno produktai, ypač jogurtas, ir probiotinės padermės, priklausančios skirtingoms PRB rūšims, užkerta kelią (arba palengvina) virškinimo trakto ligų ir disfunkcijų pasireiškimui. Kai kuriais atvejais mikrobiologinės pusiausvyros atkūrimas naudojant probiotikus turi aiškų teigiamą poveikį sveikatai ypač kai tai susiję su virškinimo trakto ligų gydymu ir profilaktika. Dalinis kazeinų, kurie gauti iš raugintų pieno produktų, virškinimas palengvina alerginio reaktyvumo praradimą žarnyno virškinimo metu ir taip padidina toleranciją pieno produktams. Tai sumažina alergiją pienui.

Naudingas žmogaus sveikatai laikomas dar vienas fermentuotas pieno produktas – sūris. Sūris yra žinomas kaip kariostatinis maistas dėl jo gebėjimo stimuliuoti seilių tekėjimą, didinti cukraus pašalinimo greitį, slopinti apnašas sukeliančias bakterijas (apnašų susidarymą skatina didelis kalcio ir neorganinio fosfato kiekio kaupimasis) padidinat burnos pH reakciją (23).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Tyrimo objektas

Tyrimas buvo atliktas 2018–2019 metais Lietuvos sveikatos mokslų universitete (LSMU) Veterinarijos akademijoje Maisto saugos ir kokybės katedroje, mikrobiologijos laboratorijoje. Tyrime tirta 13 laukinių (vietinės kilmės) *Lactococcus lactis* bakterijų padermių, kurios buvo gautos iš LSMU VA Maisto saugos ir kokybės katedros laboratorijos saugyklos. Mikroorganizmų padermės buvo išskirtos iš žalio ir rauginto karvių ir ožkų pieno (2 lentelė). Tyrime naudota ir etaloninė *Lactococcus lactis* ATCC 11454 padermė.

2 lentelė. Bakterijų padermės identifikavimo numeris ir išskyrimo šaltinis.

Bakterijų padermės numeris (Nr.)	Išskyrimo šaltinis
1	Žalias karvės pienas
2	Žalias ožkos pienas
3	Žalias karvės pienas
4	Žalias karvės pienas
5	Žalias karvės pienas
6	Žalias karvės pienas
7	Žalias karvės pienas
8	Žalias karvės pienas
9	Raugintas karvės pienas
10	Raugintas karvės pienas
11	Žalias karvės pienas
12	Raugintas karvės pienas
13	Raugintas ožkos pienas

Bakterijų padermės prieš pradėdant tyrimą buvo saugomos 1 ml šaldymo terpėje M17 (Merck KgaA, Vokietija) su 30 proc. glicerolio – 98 °C temperatūros šaldymo kameroje.

2.2 Raugintų pieno produktų gamybos technologija

2.2.1 Bakterijų kultūrų paruošimas tyrimui

Šio tyrimo metu tyrėme 13 laukinių *L. lactis* padermių gebėjimą rauginti pieno produktus. Tyrimui atlikti laukinės *Lactococcus lactis* padermės buvo atgaivintos skystoje MRS (angl., De Man, Rogosa and Sharpe agar) terpėje (Oxoid, Anglija). Darbas buvo atliekamas laminare. Į

sterilius mėgintuvėlius buvo įpilama po 10 ml skystos MRS terpės ir su sterilia kilpele įdėta užšaldytos *L. lactis* kultūros. Mėgintuvėlio turinys išmaišomas. Užsėtos mitybinės terpės 48 val. aerobinėmis sąlygomis kultivuotos termostate + 37 °C temperatūroje. Po 48 val. bakterijų kultūra centrifuguota 5000 aps/min. greičiu 5 min. Po centrifugavimo, nupylus terpę, ant kiekvieno mėgintuvėlio turinio buvo užpilta po 10 ml sterilaus distiliuoto vandens ir 5 min centrifuguota 5000 aps/min. greičiu. Po to terpė buvo vėl nusiurbiamą, o mėgintuvėlis užpilamas 10 ml sterilaus distiliuoto vandens. Toliau mėgintuvėlio turinys buvo išmaišomas su elektrine maišykle (BioSan, JAV). Paruoštos *Lactococcus lactis* bakterijų suspensijos dedama po 5 ml į pieno ir pasukų mėginius.

Kaip kontrolinis mėginys naudotas komercinis bakterijų raugas (UAB Rivona, Alytus). Pagal gamintojo aprašymą raugo sudėtyje yra mezofilinių bakterijų padermių (*L. lactis* subsp. *lactis/cremoris*; *Leuconostoc* sp.; *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*). Raugo forma – užšaldytos granulės. Gamybiniame rauge bendra bakterijų koncentracija yra $> 1 \times 10^{10}$ KSV/ml.

2.2.2 Raugų gamyba

Du litrai pasukų (pasukos po sviesto gaminimo iš privataus ūkio) pilamos į puodą ir pasterizuojamos + 85 – + 90 °C temperatūroje. Tada paliekama kambario temperatūroje, kad atvėstų iki + 25 °C temperatūros. Pasukoms atvėsus, jos išpilstomos po 100 ml į sterilius 200 ml talpos indus. Į kiekvieną indą su pasukomis buvo įpilama po 5 ml *Lactococcus lactis* bakterijų kultūros (žiūrėti 2.2.1 posk.). Į kontrolei paruoštą 100 ml pasukų mėginį buvo įdėta 0,03 g komercinio raugo. Indai buvo uždengti folija ir dedami rauginimui į termostatą 24 – 48 valandoms, +25 °C temperatūroje, aerobinėmis sąlygomis. Analogiškai tyrimui buvo paruoštas ir pienas (2,5 proc. riebumo, AB Pieno žvaigždės, Lietuva). Pasterizavus ir atvėsinus pieną iki + 25 °C temperatūros, jis buvo supilstytas į indus po 100 ml ir į kiekvieną indą sterilia pipete buvo įpilama po 5 ml laukinių *Lactococcus lactis* bakterijų kultūros. Į kontrolinį indą su pienu įdėta 0,03 g komercinio raugo. Pieno ir bakterijų kultūros fermentuojamos tokiomis pat sąlygomis kaip ir pasukos su pienarūgštėmis bakterijomis.

2.2.3 Pieno raugų kokybinių savybių tyrimas

Laukinių *Lactococcus lactis* padermių gebėjimas rauginti pieno produktus buvo tiriamas vertinant šias raugų savybes: rūgimo trukmę, pH reakcijos ir konsistencijos pasikeitimą pieno produktuose ir juslinį priimtinumą.

Rūgimo trukmės tyrimas. Rūgimo trukmė buvo stebima po 24 ir 48 rauginimo valandų. Po 24 val. iš kiekvienos stiklinės su steriliu šaukštu buvo imamas mėginys ir žiūrima, ar jau surūgo. Analogiškas vertinimas atliekamas ir po 48 val. Surūgimas lyginamas su kontroliniu mėginiu.

Konsistencijos pokyčių įvertinimas. Konsistencijos pokyčiai taip pat buvo stebimi po 24 ir 48 rauginimo valandų. Tyrimo metu konsistencijos pokyčiai vertinami vizuliai - tai yra steriliu šaukštu iš stiklinės vidurio imamas mėginys ir atidžiai apžiūrimas. Apžiūrėjus mėginį vizualiai įvertinama mėginio konsistencija 10 balų sistemoje. Pagal 10 balų konsistencijos vertinimo sistemą konsistencijos pokyčiai gali būti vertinami nuo nesurūgusios, skystos (0 balų) iki labai standžios masės su matoma duobute (10 balų) (žr. 3 lentelė).

3 lentelė. Konsistencijos pokyčių vertinimas balais ir jų reikšmės

Balai	Reikšmė
0	Produktas nesurūgęs, skystas.
1-2	Produktas nesurūgęs, matosi minimalus rūgimas.
3-4	Produktas pilnai nesurūgęs, bet atsiranda rūgimo požymių.
5-6	Produktas dalinai surūgęs, bet nepanašu į kontrolę.
7-8	Produktas surūgęs, panašu į kontrolę, bet duobute ilgai neišsilaiko.
9-10	Produktas surūgęs, masė standi, matoma duobutė, nėra skysčio. Konsistencija visiškai atitinka kontrolę.

pH reakcijos tyrimas. Kiekvieno raugo pH reikšmė buvo matuojama po 24 ir 48 rauginimo valandų. Tyrimas atliekamas mėginį atvėsinus iki + 20 C temperatūros. Mėginys imtas su steriliu šaukštu ir elektroniniu pH-metru (IQ Scientific Instruments, Kinija) pamatuojama pH reikšmė. Vienas mėginys matuotas 2 kartus. Iš nustatytų analizių išvestas vidurkis.

Raugintų pieno gaminių juslinių savybių tyrimas. Mėginių juslinė analizė buvo atliekama praėjus 48 rauginimo valandoms, remiantis LST ISO 6658:2000 Juslinė analizė. Metodika. Bendrosios nuorodos (34). Bendras, pieno ir pasukų raugintų su *L. lactis* bakterijų kultūra, mėginio skonio priimtumas, kiekvieno iš 10 ekspertų grupės individo, vertintas priimtumo skalėje nuo 0 (nepriimtinas) iki 10 (labai priimtinas) balų (žr. prieduose, 1 priedas). Vertinama ragaujant mėginį iš kiekvienos raugo stiklinėlės su atskirais steriliais šaukšteliais. Kvapas buvo vertinamas ekspertų grupės individualiai nuo intensyvaus iki neintensyvaus. Vertinimą atlieka kiekvienas ekspertas atskirai ir po to vertinimai surašomi į lentelę, kur išvedamas vertinimo balų vidurkis.

2.3 *L. lactis* probiotinių ir kitų biologinių savybių tyrimas

Probiotinės ir biologinės savybės buvo tiriamos penkioms *L. lactis* padermėms. Šios bakterijos, minėtoms savybėms tirti, buvo atrinktos pagal jų gebėjimo fermentuoti pieno produktus tyrimą (žiūrėti posk. 2.2.3). Bakterijų probiotinių savybių tyrimai buvo atlikti pagal A. Argyri ir bendraautorių (24), M. Thirabunyanon ir kt., (26) ir T. Padmavathi ir kitų mokslininkų (6) aprašytus metodus. Tirtos probiotinės savybės: atsparumas tulžies druskoms ir žemai pH reakcijai, pankreatino ir fenolio poveikis bakterijoms.

Tyrimo metu taip pat ištirtas pienarūgščių bakterijų gebėjimas fermentuoti angliavandenius ir bakterijų atsparumas skirtingoms temperatūroms pagal S. Abbasiliasi ir bendraautorių (27) pateiktus metodus.

Šiems tyrimams paruoštos šviežios laukinių *L. lactis* bakterijų kultūros. Jų paruošimas aprašytas poskyriuje 2.2.1, tik vietoj MRS terpės buvo naudotas 1 ml M17 terpės.

Lygiagrečiai probiotinių ir biologinių savybių tyrimai buvo atlikti ir su etalonine *Lactococcus lactis* ATCC 11454 bakterijų kultūra.

2.3.1 Atsparumo tulžies druskoms nustatymas

18 val. kultivuotos bakterijų kultūros (M17 terpėje) tyrimui paruoštos kaip nurodyta 2.2.1 poskyryje. Po to 1 ml paruoštos bakterijų suspensijos suspenduotos 9 ml MRS sultinio kurio sudėtyje buvo 0,3 proc. tulžies druskų (Liofilchem, Italija). Bakterijų atsparumas tulžies druskoms buvo vertinamas skaičiuojant gyvybingų (užaugusių) bakterijų kolonijų skaičių po kultivavimo + 37 °C temperatūroje MRS terpėje (bakterijų augimas vertintas praėjus 0 ir 4 val. po jų poveikio tulžies druskomis) (26). Su visomis tirtomis padermėmis tyrimas pakartotas po tris kartus.

2.3.2 Atsparumo žemai pH reakcijai nustatymas

18 val. kultivuotos *L. lactis* kultūros (M17 terpėje) 5 min centrifuguotos 10000 aps/min greičiu + 4 °C temperatūroje. Nupylus mėgintuvėlio viršutinį sluoksnį gautos nuosėdos du kartus plautos PBS buferiniu tirpalu (pH 7,2), vėliau suspenduotos 9 ml PBS tirpalu, kurio pH reakcija, panaudojant 0,5 N druskos rūgštį, buvo pakoreguota iki 2,5. Atsparumas žemai pH reakcijai buvo vertinamas skaičiuojant gyvybingų kolonijų skaičių MRS agare, kultivuojant užsėtas terpes aerobinėmis sąlygomis +37 °C temperatūroje. Bakterijų augimas vertintas po rūgščių poveikio praėjus 0 ir 3 val (+37 °C temperatūroje). Pasirinktos valandos atspindint laiką, kurį maistas praleidžia skrandyje (26).

2.3.3 Pankreatino ir fenolio poveikio nustatymas

Pankreatino ir fenolio poveikio tyrimas laukinėms *L. lactis* padermėms atliktas remiantis T. Padmavathi ir bendraautorių (6) metodikomis. Po 100 µl bakterijų suspensijos, 24 val kultivuotos MRS terpėje, dėta į MRS sultinį (Biolife, Italija). Tada į vienus mėgintuvėlius papildomai įdedama 0,5 proc. pankreatino, o į kitus 0,2 proc. ir 0,5 proc. fenolio. Visi mėgintuvėliai kultivuojami 24 val. + 37 °C temperatūroje aerobinėmis sąlygomis. Po kultivavimo matuotas kiekvieno mėgintuvėlio turinio optinis tankis prie 600 nm su spektrofotometru „Lange DR3900“ (Hach Lange GmbH, Vokietija).

2.3.4 Angliavandenių fermentavimo tyrimas

Angliavandenių fermentavimui ištirti buvo naudojamas „API 50 CH₂“, testas (Biomerieux, Prancūzija). Šiuo testu ištirtas 49 angliavandenių fermentavimas. Tyrimas buvo atliktas pagal gamintojo rekomendacijas. Pirmiausia buvo paruoštas padėkliukas ir dangtelis. Drėgnoms atmosferos sąlygoms sudaryti į padėkliuko šulinėlius buvo įpilta po 10 ml distiliuoto vandens. Plastikinės juostelės su šulinėliuose integruotais angliavandeniais buvo sudedamos į inkubavimo dėžutę. Tyrimui atlikti buvo naudota šviežia bakterijų kultūra (žiūrėti 2.2.1). Inokulianto paruošimui bakterijų kolonijos buvo suspenduotos API 50 CHL Medium terpėje (Biomerieux, Prancūzija) kol buvo gauta 2 McFarland'o vienetų optinio tankio bakterijų suspensija.

Po to į kiekvieną atskirą šulinėlį buvo dozuojuama paruoštos bakterijų suspensijos. Užpildžius pilnai šulinėlius ant jų viršaus buvo užpilta po 1 lašą mineralinio aliejaus (Biomerieux, Prancūzija), tada dėžutė buvo uždaroma. Testo juostelės kultivuotos 48 val. + 37 °C temperatūroje aerobinėmis sąlygomis. Tyrimo rezultatai buvo vertinami pagal gamintojo rekomendacijas. Teigiama reakcija buvo laikoma kai šulinėlio turinio spalva buvo pasikeitusi į geltoną. Kiekvienai bakterijų padermei gautas biocheminis profilis buvo vertintas gamintojo internetinėje duomenų bazėje.

2.3.5 Atsparumo temperatūrai nustatymas

L. lactis bakterijų padermių atsparumas skirtingai temperatūrai buvo nustatytas pagal S. Abbasiliasi ir bendraautorių (27) aprašytas metodikas. 24 val. kultivuotos bakterijų kultūros (MRS terpėje) persėtos į mėgintuvėlius su M17 sultiniu (Merck KgaA, Vokietija) ir į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinta po 1 lašą 40 proc. bromkrezolio tirpalo (bromkrezolis + 1ml etanolio) (Sigma, JAV). Bakterijos M17 sultinyje su bromkrezoliu kultivuotos aerobinėmis sąlygomis, skirtingose temperatūrose : + 4 °C, + 10 °C, + 30 °C, + 35 °C, + 37 °C, + 45 °C, + 60 °C. Bakterijų augimas buvo vertinamas po 24 ir 48 kultivavimo valandų. Bakterijoms augant mėgintuvėlio spalva pasikeisdavo iš violetinės į geltoną ir atsirasdavo drumstumas. Jei po kultivavimo laikotarpio mėgintuvėlio turinys išliko violetinės spalvos – augimas toje temperatūroje nevyko.

2.4. *Lactococcus lactis* porūšių nustatymas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu

2.4.1. *Lactococcus lactis* DNR išskyrimas

Bakterijų DNR išskyrimas buvo atliekamas naudojant „PrepMan“ metodą. Pirmiausia bakterijų kultūros auginamos 24 val. +37 °C temperatūroje mikroaerofilinėmis sąlygomis ant MRS agaro. Po 24 val. bakterijos surenkamos 1 µl sterilia mikrobiologine kilpele ir perkeliamos į 1,5 ml mėgintuvėlį su 200 µl PrepMan (Applied Biosystems, JAV) tirpalo. Mėgintuvėlių turinys išmaišomas sūkurinio tipo maišyklės pagalba (BioVortex, Biosan, Germany) 15-30 sek. Gauta

suspensija perkeliama į termociklerį +99 °C (+100 °C) temperatūroje ir paliekama 10 min. Po to mėgintuvėlis 3 min. centrifuguojamas 16000 aps/min. greičiu. Viršutinė skysčio dalis perkeliama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį. Pakartojamas 3 min centrifūgavimas 16000 aps/min. greičiu. Viršutinė skysčio dalis perkeliama į naują 200 µl mėgintuvėlį. Išskirta DNR iš karto naudojama PGR arba užšaldoma -20 °C temperatūroje.

2.4.2 PGR tyrimas

PGR reakcija buvo vykdoma norint nustatyti vietinės kilmės *L. lactis* bakterijų porūšius. Reakcijos metu buvo gausinami 16S rRNR geno fragmentai, naudojant molekulinis žymenis *LcLspp-F/Lc-R* ir *LcCr-F/Lc-R* (28) ir *Lacre-R/Lac-F* (31) (4 lentelė). *Lc-R* ir *LcLspp-F* molekuliniai žymenys skirti *Lactococcus lactis* rūšiai, o *Lc-R* ir *LcCr-F* – *L. lactis* subsp. *cremoris* patvirtinti. *Lacre-R* ir *Lac-F* molekuliniai žymenys skirti *L. lactis* subsp. *lactis* patvirtinti.

4 lentelė. PGR naudojamų molekulinų žymenų pavadinimas, seka ir bazių porų skaičius.

Žymenų pavadinimas	Žymenų seka (5'-3')	bp skaičius
<i>LcLspp-F</i>	GTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAA	387
<i>LcCr-F</i>	TGCTTGCACCAATTTGAAGAG	551
<i>Lc-R</i>	GTTGAGCCACTGCCTTTTAC	
<i>Lacre-R</i> <i>Lac-F</i>	GGGATCATCTTTGAGTGAT GTACTTGTACCGACTGGAT	163

Paaiškinimas: bp-bazių porų skaičius

Norėdami nustatyti ar mūsų tiriamos *L. lactis* padermės priklauso *cremoris* arba *lactis* porūšiui abiejų PGR tyrimų metu, pagal T. Odamaki ir kt., (28) ir Z. Y. PU ir kt., (31) pateiktus metodus (su modifikacijomis) buvo paruoštas 25 µl bakterijų DNR ir PGR reakcijos reagentų mišinys: 1 µl tiriamosios DNR, 5 µl 10 x PGR buferio (100 mM Tris-HCH, pH 8,8, 500 mM KCl, 0,8 proc. nonidet P40, MBI, Fermentas, Lietuva), 5 µl 25 mM Mg Cl₂ (MBI, Fermentas, Lietuva), 4 µl 2 mM dNTP mišinio (MBI, Fermentas, Lietuva), po 0,5 µl oligonukleotidinių pradmenų (Linea Libera, Lietuva), 0,3 µl 500 U Taq DNR polimerazės (MBI, Fermentas, Lietuva), ir 14,9 µl bidistiliuoto vandens.

L. lactis subsp. *cremoris* identifikavimo atveju paruoštų PGR produktų 30 ciklų amplifikacija atlikta „PTC-100 Programmable“ termocikleryje (MJ. Research Inc., JAV) pagal lentelėje nurodytus parametrus (5 lentelė).

5 lentelė. PGR produkto gamybos žingsniai.

Žingsnis	Temperatūra	Laikas
Pirminė denatūracija	+95°C	3 minutės
30 ciklai	+95°C	20 sekundžių
	+66°C	20 sekundžių
	+72°C	30 sekundžių
Galutinis grandinės ilginimas	+72°C	5 minutės
Laikymas	+4°C	-

L. lactis subsp. *lactis* identifikavimo atveju paruoštų PGR produktų 35 ciklų amplifikacija „PTC-100 Programmable“ termocikleryje atlikta pagal 6 lentelėje nurodytus parametrus.

6 lentelė. PGR produkto gamybos žingsniai identifikuojant *L. lactis* subsp. *lactis*.

Žingsnis	Temperatūra	Laikas
Pirminė denatūracija	+95°C	3 minutės
Ciklai 35	+94°C	40 sekundžių
	+58°C	40 sekundžių
	+72°C	1 minutė
Galutinis grandinės ilginimas	+72°C	5 minutės
Laikymas	+4°C	-

Abiejų tyrimų metu PGR produktai buvo frakcionuojami horizontaliosios elektroforezės metodu. *L. lactis* subsp. *cremoris* elektroforezė buvo vykdoma 1,5 proc., o *L. lactis* subsp. *lactis* 1 proc. „Top Vision LE GQ“ agarozės gelyje (MBI, Fermentas, Lietuva) su 6,5 µg/ml etidžio bromidu prie 100 V elektros srovės neilgiau kaip 60 minučių. PGR reakcijos metu pagausintiems fragmentams įvertinti buvo naudojamas molekulinės masės žymuo „GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“ (MBI, Fermentas, Lietuva). Elektroforezės geliui užpilti *L. lactis* subsp. *cremoris* atveju naudotas 1x TAE buferis (MBI, Fermentas, Lietuva), o *L. lactis* subsp. *lactis* – 1xTBE buferis (MBI, Fermentas, Lietuva). Gauti fragmentai vizualizuoti UV šviesoje. Duomenys apdoroti kompiuterine programa UVIPRO.

PGR reakcijose kaip teigiama kontrolė naudota etaloninė *Lactococcus lactis* ATCC 11454 padermė, kaip neigiama kontrolė – sterilus distiliuotas vanduo.

2.4 Statistinė duomenų analizė

Eksperimento metu gauti duomenys buvo suvesti į Microsoft Excel 2010 programą ir naudojantis statistine duomenų analizės programa SPSS Statistics (IBM, 25 versija) ir joje

taikomais parametriniais ANOVA metodais, įvertintas duomenų statistinis patikimumas. Statistiškai apdoroti duomenys vizualiai pateikti diagramose naudojant MS Excel 2010 programą. Rezultatai laikomi patikimi, kai pasiklovimo lygmuo $p \leq 0,05$.

3. TYRIMO REZULTATAI

3.1 Pieno ir pasukų raugų kokybinių savybių tyrimas

Šio tyrimo metu tyrėme 13 laukinių *L. lactis* padermių gebėjimą rauginti pieno produktus. Pieno ir pasukų raugų kokybinės savybės buvo vertinamos tiriant rūgimo trukmę, raugų konsistenciją, pH rodiklių kaitą ir juslines savybes.

Norėdami įvertinti pieno **rūgimo trukmę**, rūgimas buvo stebimas po 24 ir 48 rauginimo valandų. Įvertinus pieno surūgimą po 24 val. nustatėme, kad iš 13 mėginių 5 (38,46 proc.) buvo nesurūgę (bakterijų padermės Nr. 2, 5, 6, 7, 10). Šių raugų, kurie nesurūgo konsistencija, lyginant su kontroliniu mėginiu 10 balų vertinimo sistemoje buvo įvertinta 0 balų. Likusių raugų konsistencija įvertinta nuo 7 iki 10 balų. Labai panašūs rezultatai gauti vertinant pieno rūgimą ir konsistenciją po 48 rauginimo valandų. *L. lactis* bakterijų padermės Nr. 2, 5, 6, 7, 10 vis dar buvo nesurauginusios pieno ir jų konsistencija įvertinta nuo 0 iki 3 balų. Kiti 7 (53,84 proc.) pieno mėginiai buvo surūgę, jų konsistencija įvertinta nuo 7 iki 10 balų (7 lentelė).

7 lentelė. Pieno raugų kokybinių savybių vertinimas po 24 ir 48 rauginimo valandų.

Padermės numeris	Konsistencija* Po 24 val.	Konsistencija* Po 48 val	Juslinės savybės, jų vertinimas balais
K	10	10	10
1	10	10	8
2	0	0	3
3	8,5	9	7
4	9,5	10	5
5	0	0	2
6	0	1	1
7	0	0	1
8	9,5	10	7
9	10	10	8
10	0	3	1
11	7	7	8,5
12	10	10	6
13	9	9,5	7

Paaškinimas: K- kontrolė;

*Konsistencija stebima pakabinant masę šaukštu: 10 balų – labai standi masė, aiški duobutė, nėra skysčio; 0 – skysta masė, nesurūgo, nelieta duobutės.

Analogiški rezultatai gauti įvertinus ir pasukų rūgimą. Įvertinus rūgimą po 24 val. ir vėliau po 48 val. nustatėme, kad tos pačios 5 (38,46 proc.) padermės (Nr. 2, 5, 6, 7 ir 10) neraugino pasukų. Nesurūgusių mėginių konsistencijos tyrimas parodė, kad šie mėginiai daugiausiai surinko 5 balus. Likusių raugų (7/53,84 proc.) konsistencija įvertinta nuo 6 iki 10 balų (8 lentelė).

8 lentelė. *Pasukų raugų kokybinių savybių vertinimas po 24 ir 48 rauginimo valandų.*

Padermės numeris	Konsistencija* Po 24 val.	Konsistencija* Po 48 val	Juslinės savybės, jų vertinimas balais
K	10	10	10
1	9	9	8
2	0	1	1
3	8,5	9	7,5
4	8	10	5
5	0	4	2
6	0	5	2
7	0	1	2
8	5	8	7,5
9	10	10	8
10	0	4	2
11	6	8	8
12	9	10	1
13	7	9	4

Paaškinimas: K- kontrolė;

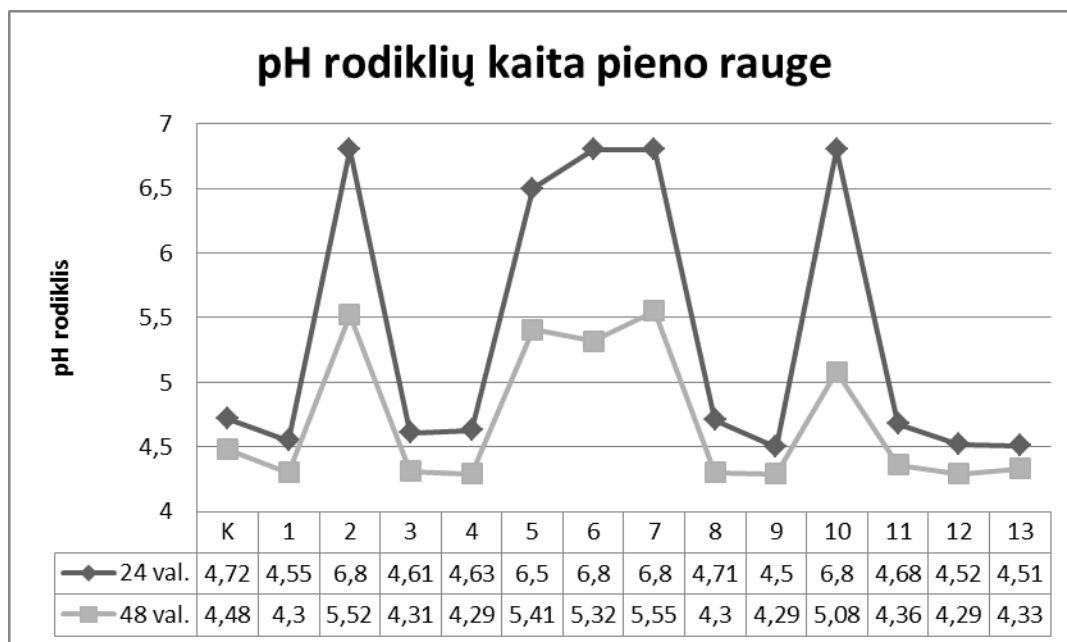
*Konsistencija stebima pakabinant masę šaukštu: 10 balų – labai standi masė, aiški duobutė, nėra skysčio; 0 – skysta masė, nesurūgo, nelieta duobutės.

Atliekant pieno raugų **juslinių savybių vertinimą**, kurio metu buvo vertinamas skonis ir kvapas, geriausiu jusliniu priimtinumu pasižymėjo 3 (23,07 proc.) mėginiai rauginti su bakterijų padermėmis Nr. 11 (8,5 balai) ir Nr. 1 ir 9 (po 8 balus). Šiems raugams buvo būdingas maloniai saldus, panašus į rūgpienį arba grietinėlę kvapas ir skonis. Minėtų padermių juslinės savybės buvo artimiausios kontrolei. Vertinant pasukų raugų juslines savybes geriausiu priimtinumu pasižymėjo 5 (38,46 proc.) mėginiai rauginti su padermėmis Nr 8, 3, 1, 9 ir 11. Šie raugai turėjo maloniai saldų šiek tiek su rūgštele kvapą ir skonį (8 lentelė).

Analizuojant tyrimo rezultatus galima teigti, kad mėginiai kurių juslinių savybių vertinimas buvo mažiau nei 6 balai yra nepriimtini vartotojams. Šie raugai turėjo intensyvų rūgštų kvapą, kuris nėra malonus (dėl kvapo, kai kurių raugų net nesinorėjo ragauti, nes iš karto atrodė nepriimtinas), arba kvapas buvo labai silpnas. Skonis taip pat buvo rūgštus. Bakterijų kultūros rauginamos pieną, gamino raugus, kurie turėjo priimtinesnį skonį ir kvapą, nei kad pasukų rauguose (lentelės 7 ir 8).

Pieno mėginiai. Vertinant mėginiuose **pH kitimą** rauginimo metu, jis buvo matuojamas po 24 ir 48 rauginimo valandų. Mėginių pH rodiklių pokyčiai pateikti 2 paveiksle. Tyrimo rezultatai rodė, kad po 24 val. žemu pH pasižymėjo 4 raugai su bakterijų padermėmis Nr 1, 9, 12 ir 13 (pH buvo nuo 4,5 iki 4,55), aukštesnis pH rodiklis nustatytas rauguose su bakterijų padermėmis Nr. 1, 5, 6, 7 ir 10. Po 48 rauginimo valandų daugelio mėginių (Nr 1, 3, 8, 9, 11, 12 ir 13) pH vertės keitėsi neženkliai - sumažėjo apie 0,2 – 0,4 vieneto, mėginių su padermėmis Nr 2, 5, 7, 10 pH rodikliai atitinkamai sumažėjo per 1,09 – 1,48 vieneto. Apibendrinant šio tyrimo rezultatus, galima teigti,

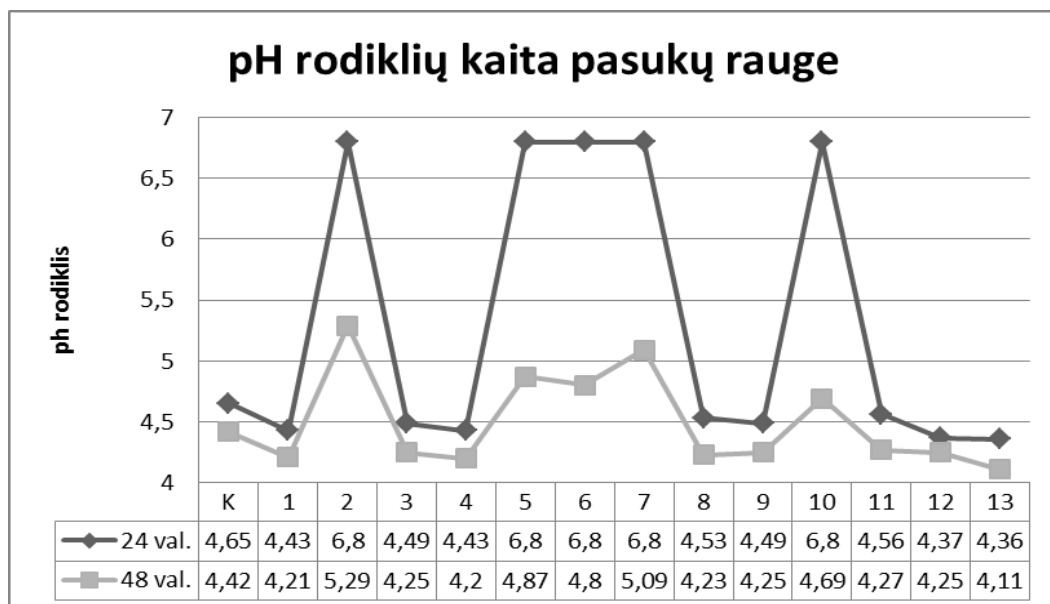
kad raugų mėginių su padermėmis Nr 1, 3, 4, 8, 9, 11, 12 ir 13 pH rodikliai buvo artimiausi kontrolinio raugo pH rodikliui.



2 pav. PH rodiklių kaita pieno rauguose.

Paaiškinimas: K- kontrolinis mėginys; mėginiai su bakterijų kultūra 1-13.

Pasukų mėginiai. Mėginių **pH rodiklių** pokyčiai pateikti 3 paveiksle. Tyrimo rezultatai rodo, kad po 24 val. žemu pH pasižymėjo 5 raugai su bakterijomis Nr. 1, 4, 9, 12 ir 13 (pH buvo nuo 4,36 iki 4,3), aukštesnis pH rodiklis nustatytas rauguose su bakterijų padermėmis Nr. 2, 5, 6, 7 ir 10. Po 48 rauginimo valandų daugelio mėginių (Nr. 1, 3, 4, 8, 9, 11, 12 ir 13) pH rodikliai keitėsi neženkiai ir sumažėjo apie 0,12 – 0,29 vieneto, o mėginių su padermėmis Nr. 2, 5, 6, 7, 10 pH rodikliai atitinkamai sumažėjo per 1,51 – 2,11 vieneto. Apibendrinant šio tyrimo rezultatus, galima teigti, kad raugų su bakterijomis Nr. 1, 3, 4, 8, 9, 11, 12 ir 13 pH vertės buvo artimiausios kontrolinio raugo pH rodikliui.



3 **pav.** PH rodiklių kaita pasukų rauguose. K- kontrolinis mėginys, mėginiai su bakterijų kultūra 1-13.

Paaiškinimas: K- kontrolinis mėginys; mėginiai su bakterijų kultūra 1-13.

Išanalizavus raugintų produktų kokybinių savybių tyrimo rezultatus, tolimesniems tyrimams atrinkome 5 vietinės kilmės *Lactococcus lactis* bakterijų padermes Nr. 1, 3, 8, 9, 11.

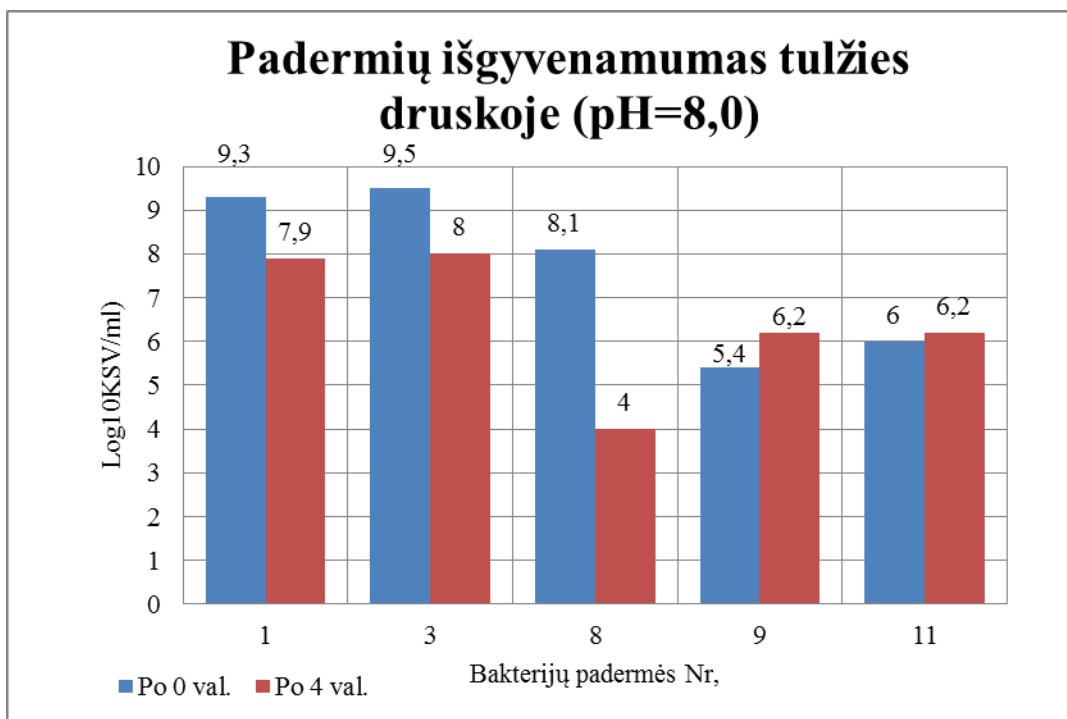
3.2 Probiotinių savybių tyrimas

Tyrimo metu tyrėme vietinės kilmės *Lactococcus lactis* bakterijų probiotines savybes, tokias kaip atsparumą tulžies druskoms, žemai pH reakcijai, fenolio ir pankreatino poveikį. Šios savybės parodo bakterijų gebėjimą išgyventi virškinimo trakte. Tiriamos buvo tik bakterijų padermės, atrinktos po kokybinių savybių tyrimo (Nr. 1, 3, 8, 9, 11).

3.2.1. Atsparumas tulžies druskoms

Tiriant vietinės kilmės *L. lactis* padermių atsparumą virškinimo trakte esančiai aplinkai, bakterijų augimas buvo vertinamas prie skirtingų aplinkų: prie pH 2,5 - rūgščioje aplinkoje, imituojant skrandžio terpę ir prie pH 8,0 - kuri parodo dvylikapirštės žarnos terpę. Padermių išgyvenamumo rodiklis – tai padermės gebėjimas išgyventi atitinkamomis sąlygomis, apskaičiuojamas procentais. Šio tyrimo metu apskaičiuotas išgyvenamumas – tai LogKSV/ml vienetų pokytis tarp 0 val. ir 3 val. (arba 4 val.) matavimų, išreikštas procentais.

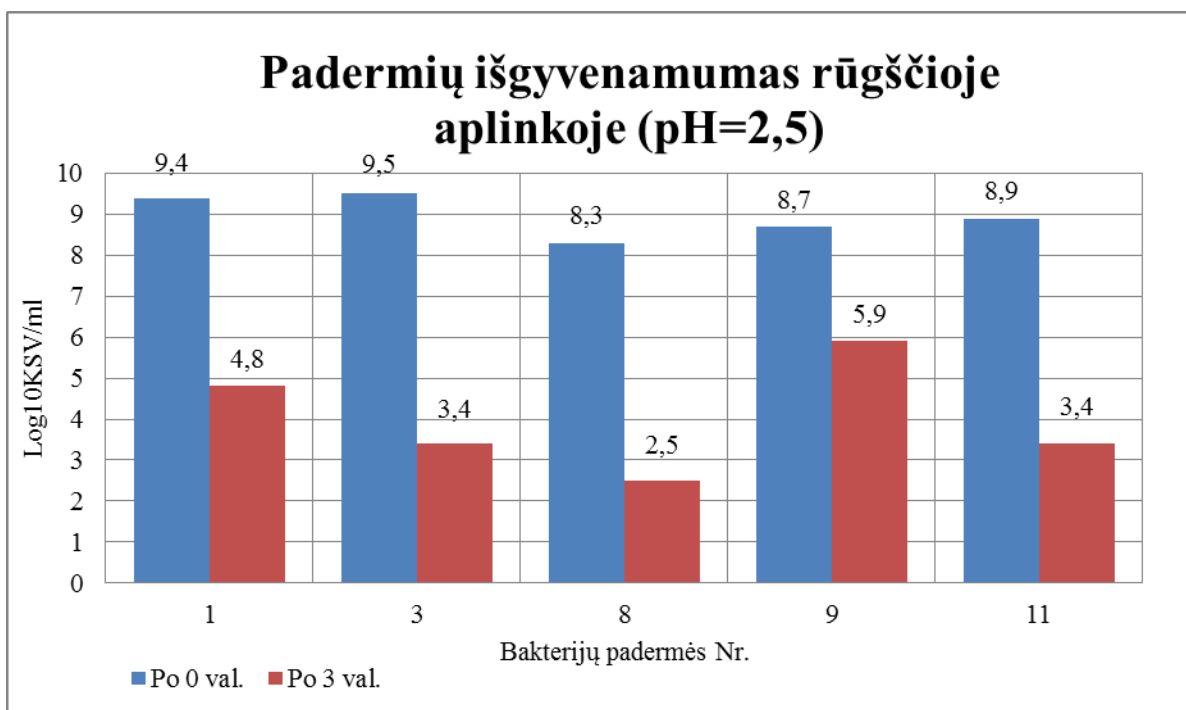
Padermių išgyvenamumo **tulžies druskoje** tyrimų rezultatai parodė, kad didžiausiu atsparumu tulžies druskoms pasižymėjo padermės Nr. 9 ir 11, kurių išgyvenamumas atitinkamai padidėjo 113 ir 104 proc. Mažiausiu išgyvenamumu pasižymėjo bakterijų kultūra Nr. 8 – bakterijų skaičius sumažėjo 4,1 LogKSV/ml (išgyvenamumas tik 49 proc. nuo pradinės kultūros). Tyrimo rezultatai pateikiami 4 paveiksle.



4 pav. Bakterijų padermių išgyvenamumas tulžies druskoje.

3.2.2. Atsparumas žemai pH reakcijai

Padermių išgyvenamumo **rūgščioje aplinkoje** tyrimo metu (5 paveikslas), nustatyta, kad didžiausią išgyvenamumą po 3 val. turėjo bakterijų padermė Nr. 9, kuri sumažėjo per 2,8 LogKSV/ml (išgyvenamumas 67 porc. nuo pradinės koncentracijos) bei padermė Nr. 1 kuri sumažėjo per 4,6 LogKSV/ml (išgyvenamumas 51 proc.). Mažiausiu išgyvenamumu pasižymėjo bakterijų kultūra Nr. 8 – išgyveno tik 30 proc. bakterijų nuo pradinės jų kultūros.



5 pav. Bakterijų padermių išgyvenamumas rūgščioje terpėje.

3.2.3. Pankreatino ir fenolio poveikis

L. lactis atsparumo pankreatinui tyrimai parodė, kad 0,5 proc. **pankreatinui** didžiausiu atsparumu pasižymėjo padermės Nr. 8 ir 9, mažiausiai atspari buvo bakterijų padermė Nr. 1. Kitos padermės pasižymėjo vidutiniu atsparumu pankreatinui (9 lentelė).

Tiriant bakterijų atsparumą skirtingoms **fenolio** koncentracijoms nustatyta, kad 0,2 proc. fenoliui atspariausia padermė Nr. 11, jautriausia – padermė Nr. 1. 0,5 proc. fenolio koncentraciją geriausiai išgyveno padermė Nr. 9, jautriausia buvo padermė Nr. 1.

Palyginus bakterijų išgyvenamumo duomenis skirtingose fenolio koncentracijose buvo nustatyta, kad fenolio koncentracijos stiprumas ypač didelę įtaką darė kontrolinių *L. lactis* padermių išgyvenamumui, jos buvo ypač jautrios naudotoms fenolio koncentracijoms ($p \leq 0,05$). Fenolio koncentracija terpėje buvo svarbi ir padermių Nr. 1, 3, 9 ir 11 išgyvenamumui ($p \leq 0,05$) (9 lentelė). Vienintelei bakterijų padermei Nr. 8 fenolio koncentracijos pasikeitimas nepadarė jokios įtakos ($p > 0,05$).

9 lentelė. Pankreatino ir fenolio koncentracijų įtaka bakterijų padermėms.

Bakterijų padermės Nr.	Pankreatinas	0,2 proc. Fenolis	0,5 proc. Fenolis	Fenolio 0,2 proc. ir 0,5 proc. koncentracijos palyginimas	Pasiklivimo lygmuo
1	-0,7±0,01	-0,62±0	-0,59±0	-0,03±0	0,01
3	0,12±0	-0,18±0	-0,16±0	-0,02±0	0,04
8	0,46±0,04	0,06±0,01	0,07±0	-0,02±0	0,21
9	0,4±0,01	0,05±0	0,09±0	-0,04±0	0,00
11	0,36±0,01	0,07±0	0,08±0	-0,01±0	0,02
Kontrolė	0,23±0,02	-0,09±0	-0,02±0,01	-0,07±0	0,00

Paaiškinimas: Nr - *L. lactis* padermės numeris; proc. - procentai

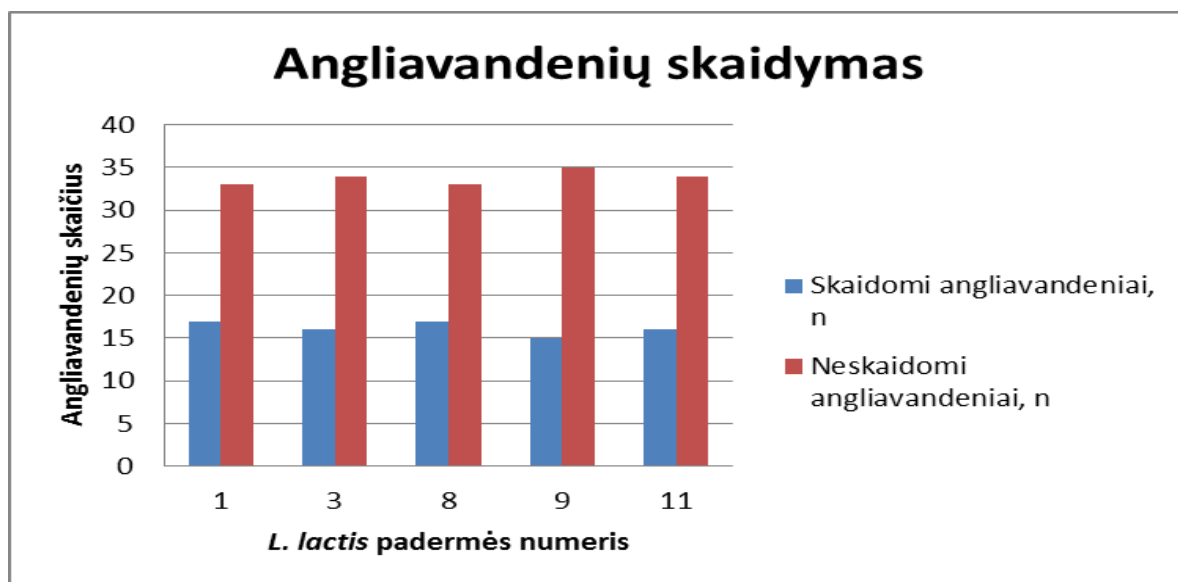
3.3. Angliavandenių fermentavimas

Atliekant **angliavandenių fermentavimo testą**, buvo tiriamas penkių *Lactococcus lactis* padermių gebėjimas skaidyti 50 skirtingų angliavandenių. Tirtos bakterijų padermės skaidė 32,4 proc., o neskaidė – 67,6 proc. angliavandenių. Bakterijų padermė Nr. 1 skaidė 34 proc. tirtų angliavandenių, padermė Nr. 3 - 32 proc., padermė Nr. 8 - 34 proc., padermė Nr. 9 - 30 proc. ir padermė Nr. 11 - 32 proc. tirtų angliavandenių. Silpniausiu fermentiniu aktyvumu pasižymėjo bakterijų padermė Nr. 9 (6 pav.).

Visos penkios bakterijų padermės skaidė D - ribozę, D - galaktozę, D - gliukozę, D - fruktozę, D - manozę, N - acetilgliukozaminą, arbutiną, eskulino geležies citratą, saliciną, D - celobiozę, D - maltosę, D - laktozę (jaučio kilmės), D - trehalozę. Angliavandenio gentiobiozės neskaidė tik viena bakterijų padermė – Nr. 11. Angliavandenį D - ksilozę fermentavo mikroorganizmų padermės Nr. 1, 3 ir 11, amygdaliną skaidė – padermės Nr. 1, 3 ir 8. Po dvi bakterijų padermes fermentavo

angliavandenius amidoną (krakmolą) (Nr. 8 ir Nr. 9) ir glikogeną (Nr. 1 ir Nr. 11). Angliavandenis D - sacharozė (cukrozė) buvo fermentuojamas tik padermės nr. 8, o ksilitolis – tik bakterijų padermės Nr. 11.

Angliavandenių apykaitos būdai buvo analizuojami ir naudojant API duomenų bazę. Išanalizavus ir apibendrinus testo rezultatus buvo nustatytas tirtų bakterijų *Lactococcus lactis* porūšis. Tyrimas parodė, kad bakterijų padermės priklauso *L. lactis* subsp. *lactis* porūšiui.



6 pav. Bakterijų *L. lactis* angliavandenių skaidymas.

Paiškinimas: n – skaičius, kiekis

3.4. Atsparumas skirtingoms temperatūroms

Tyrimas buvo atliekamas penkioms atrinktoms *L. lactis* bakterijų padermėms, auginant jas skirtingose temperatūrose: +4 °C, +10 °C, +30 °C, +35 °C, +37 °C, +45 °C ir +60 °C. Praėjus 24 ir 48 val. buvo stebimas jų augimas ir vertinamas pagal spalvines reakcijas: kai bakterijos augo – violetinė spalva pasikeitė į geltoną ir atsirado drumzlių. Praėjus 24 val. spalvos pasikeitimas buvo matomas visuose mėginiuose prie: +30 °C, +35 °C, +37 °C. Praėjus 48 val. bakterijų augimas nepasireiškė tik prie +4 °C, +45 °C, +60 °C. Tačiau prie +10 °C temperatūros buvo pastebėtas minimalus spalvos pakitimas, kuris parodė nedidelį bakterijų augimą. Likusiose temperatūrose (+30 °C, +35 °C, +37 °C) spalva pakito iki geltonos, taip pat visuose mėginiuose atsirado drumstumas (10 lentelė).

10 lentelė. *L. lactis* augimas skirtingose temperatūrose.

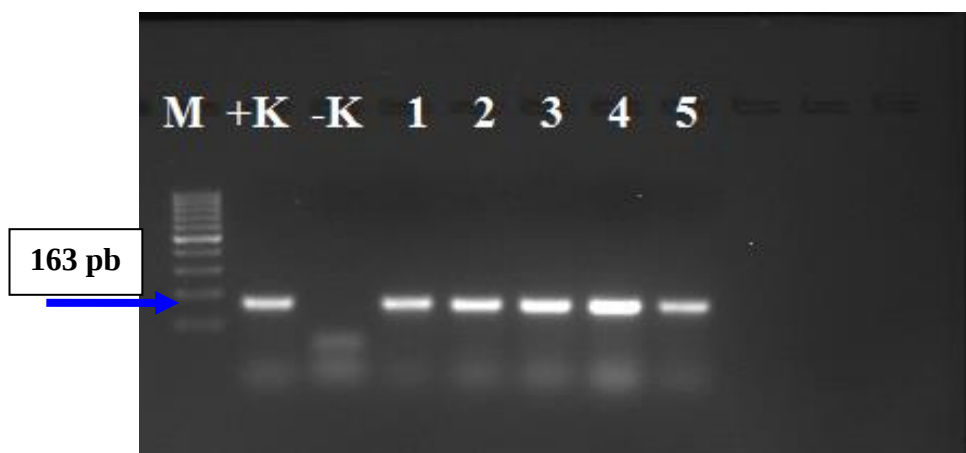
Augimo laikas	Temperatūra	L nr. 1	L nr.3	L nr.8	L nr.9	L nr.11
24 val.	(+ 4 °C)	-	-	-	-	-
	(+10 °C)	-	-	-	-	-
	(+30 °C)	+	+	+	+	+
	(+35 °C)	+	+	+	+	+
	(+37 °C)	+	+	+	+	+
	(+45 °C)	-	-	-	-	-
	(+60 °C)	-	-	-	-	-
48 val.	(+ 4 °C)	-	-	-	-	-
	(+10 °C)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	(+30 °C)	+	+	+	+	+
	(+35 °C)	+	+	+	+	+
	(+37 °C)	+	+	+	+	+
	(+45 °C)	-	-	-	-	-
	(+60 °C)	-	-	-	-	-

Paaškinimas: + auga; - neauga; +/- silpnai auga; val. valandos; L nr. – *L. lactis* padermės numeris.

3.5. *Lactococcus lactis* porūšio identifikavimas PGR metodu

Norėdami nustatyti vietinės kilmės *L. lactis* padermių (Nr. 1, 3, 8, 9, 11) porūšius (*L. lactis* subsp. *cremoris* ir *L. lactis* subsp. *lactis*) naudojant „PackMan“ metodą buvo išskirta šių bakterijų DNR.

Atlikus PGR tyrimą su minėtų bakterijų DNR ir su *L. lactis* rūšiai specifiniais pradmenimis buvo patvirtinta, kad visos tirtos padermės (100 proc.) priklauso *L. lactis* bakterijų rūšiai. Tyrimo metu gauti specifiniai 387 bp amplifikavimo produktai. PGR tyrimas su *Lc-R* ir *LcCr-F* molekuliniiais pradmenimis *L. lactis* porūšiui *cremoris* nustatyti buvo neigiamas.



7 pav. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* rūšies geno fragmento vizualizacija 1 proc. agarozės gelyje. M- molekulinis žymuo GeneRuler™ 100 bp; +K – teigiama kontrolė; -K – neigiama kontrolė; 1–5 bakterijų DNR mėginiai. Teigiami DNR mėginiai: 1, 2, 3, 4, 5.

L. lactis porūšiui *lactis* nustatyti atliktas PGR tyrimas su *Lacre-R* ir *Lac-F* pradmenimis. Tyrimas parodė, kad visos (100 proc.) tirtos bakterijų padermės priklauso *L. Lactis* subsp. *lactis* porūšiui, ir buvo gauti specifiniai 163 bp amplifikavimo produktai (7 pav.).

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Magistro baigiamojo darbo tyrime tirtos 13 vietinės kilmės *L. lactis* bakterijų padermių, kurios buvo išskirtos iš vietinės kilmės karvių ir ožkų šviežio ir rauginto pieno. Moksliniai tyrimai rodo, kad laktokokų padermės komercinėse pradinėse kultūrose pasižymi naudingomis savybėmis, tokiomis kaip laktozės ir citrato fermentavimas, proteolitinis aktyvumas, bakteriocino gamyba ir imunitetas / atsparumas bakteriofagams ir egzopolisacharidų gamyba. Šios savybės gali prisidėti prie norimo fermentuotų pieno produktų skonio ir struktūros kūrimo, prie optimalių pieno komponentų laktozės ir kazeino augimo, taip pat jų stabilumo ir išlikimo raugintuose produktuose. Šiomis savybėmis pasižymi ir laukinio tipo padermės, nors dažnai, šių bakterijų rūgštingumas yra gana žemas. Greitai gaminančios rūgštis bakterijos dažnai naudojamos kaip pradinių kultūrų padermės, tuo tarpu silpnai arba vidutiniškai gaminančios rūgštis gali būti naudojamos kaip papildomos kultūros, atsižvelgiant į kitas jų technologines savybes (36). Mūsų atliktas pieno raugų kokybinių savybių tyrimas parodė, kad 5 *L. lactis* bakterijų padermės Nr. 1, 4, 9, 12 ir 13 jau po 24 rauginimo valandų aktyviai gamino rūgštis pieno produktuose. Mėginių pH su šiomis padermėmis buvo mažesnis, nei kontroliniuose mėginiuose su komercinio raugo bakterijomis. Pagal šią savybę šios bakterijų padermės galėtų būti naudojamos kaip pradinė kultūra raugintų produktų gamyboje. Moksliniai tyrimai rodo, kad tik padermės, turinčios ketoacidinę dekarboksilazę, iš aminorūgščių gali gaminti aldehidus (aromatinės medžiagos). Šis gebėjimas labiau būdingas laukinio tipo *L. lactis* padermėms, nei toms, kurios naudojamos komerciniuose starteriuose (37). Mūsų tyrimai parodė, kad geriausiomis juslinėmis savybėmis pieno rauguose pasižymėjo 23,07 proc., (n=3) *L. lactis* padermių (raugų), o pasukose – 38,46 proc. (n=5) padermių. Priimtinausiomis juslinėmis savybėmis laikyti mėginiai, kurių kvapas ir skonis buvo maloniai saldus, su šiek tiek rūgštelės. Taip pat tyrimas parodė, kad vis dėl to, pieno raugų juslinės savybės buvo priimtinesnės nei pasukų. Taip galėjo atsitikti dėl to, kad pasukos yra pieno subproduktas su kitokiomis biologiškai aktyviomis medžiagomis.

Pastaraisiais metais buvo atlikta daug tyrimų siekiant atskirti / išskirti naujas *L. lactis* padermes nuo natūralios aplinkos mikrofloros ir apibūdinti jų pramoninį potencialą (15). H. Kimoto su bendraautoriais vietinės kilmės *L. lactis* bakterijas išskyrė iš fermentuotų daržovių, siloso ir įvairių žolelių mėginių. Tyrimo metu nustatyta, kad pieno rūgšties bakterijos, turinčios probiotinį poveikį, yra rauginame augaliniame maiste – marinuočiuose agurkuose, kurie yra vartojami Azijoje, įskaitant Japoniją, nuo senų senovės (17). T. Padmavathi (6) tyrimo metu, buvo išskirtos 32 laukinio tipo pieno rūgšties bakterijos iš rūgštynių, raugintų kopūstų ir agurkų bei palmių vyno. O. Yerlikava (8) *Lactococcus lactis* padermes išskyrė iš kefyro grūdelių ir žalio pieno. Svarbu

paminėti, kad tyrimai rodo, kad augalinės kilmės bakterijų padermių savybės yra kitokios, tai yra skiriasi nuo savybių, kurios būdingos padermėms išskirtoms iš pieno produktų (17). Priimtinesnėmis juslinėmis savybėmis pasižymi pieno produktai, kurių gamyboje naudojamos iš pieno ir jo produktų išskirtos bakterijų padermės. Remiantis šiais duomenimis mūsų tyrimui buvo atrinktos padermės išskirtos iš žalio pieno ir jo raugintų produktų. Be to D. Cavanagh ir bendraautorių (29) atliktas tyrimas, parodo ir šių padermių pranašumą sintetinat antimikrobines medžiagas. Mokslininkai nustatė, kad iš 79 laukinio tipo *L. lactis* padermių, 32 pasižymėjo antimikrobinėmis savybėmis. 17 iš šių padermių buvo rastas gerai žinomas antimikrobinis peptidas nizinas, tuo tarpu kitos pagamino diplokokokiną (2 padermės), laktokociną (3 padermės) arba dar neidentifikuotą į bakteriociną panašų junginį (10 padermių). Šios 79 laukinio tipo *L. lactis* padermės buvo išskirtos iš žalio pieno.

Mūsų tyrimo metu su *L. lactis* bakterijų padermėmis buvo gaminami rauginti pieno ir pasukų produktai ir remiantis kokybinę jų analizę, tolimesniems tyrimams atrinktos 5 *L. lactis* padermės. Geriausiomis juslinėmis savybėmis pasižymėjo rauginti produktai, kurie buvo pagaminti su *L. lactis* padermėmis Nr. 1, 3, 8, 9 ir 11, ir jų gaminami produktai juslinėmis savybėmis buvo labai artimi kontroliniam / komerciniam raugui. Kad lauko padermės pasižymi savybėmis suteikiančiomis rauginantiems produktams išskirtinį skonį ir aromatą yra įrodyta moksliniais tyrimais. D. Cavanagh ir bendraautorių tyrime (29) nustatyta, kad iš vietinės kilmės bakterijų padermių pagamintame sūryje yra aminorūgščių, kurios veikia kaip skoniniai junginiai. Aminorūgščių pavertimas kvapiaisiais junginiais prasideda aminotransferazės reakcija, aminorūgščių perkėlimu į α -ketoglutaratą ir α -keto rūgšties susidarymu.

Probiotinių bakterijų gebėjimas išgyventi virškinimo trakte yra viena iš pagrindinių savybių, kuria turi pasižymėti probiotinės bakterijos. Ši savybė susijusi su jų gebėjimu augti skirtingos koncentracijos tulžies druskose, žemo pH aplinkoje, kasos fermentų ar fenolių poveikyje. Tyrimais nustatyta, kad tulžies druskos tirpina ląstelių membranos lipidus, ko pasekoje ląstelės žūsta, dėl vidinių komponentų netekimo. Žemas pH imituoja žmogaus virškinimo traktą ir dauguma bakterijų neišgyvena šioje aplinkoje. Todėl atsparumas žemai pH reakcijai yra svarbus potencialiai probiotinėms bakterijoms, nes tai rodo, kad jos išlieka ilgesnį laiką gyvybingos žmogaus skrandyje ir gali būti įsisavinamos žarnyne. Be to tyrimais nustatyta, kad tolerancija pankreatinui ir fenoliui atspindi kasos fermentų ir toksiškų metabolitų poveikį bakterijų padermėms (6, 8, 22). Mūsų tyrimo metu geriausiomis probiotinėmis savybėmis pasižymėjo *Lactococcus lactis* bakterijų kultūra Nr. 9, išskirta iš rauginto pieno produktų: jos išgyvenamumas tulžies druskoje padidėjo 113 proc. nuo pradinės koncentracijos, išgyvenamumas rūgštinėje terpeje padidėjo 67 proc. nuo pradinės koncentracijos, augimas pankreatino ir skirtingų koncentracijų fenolio tirpaluose taip pat buvo teigiamas. Jautriausia tulžies druskai ir rūgštinei terpei buvo iš žalio pieno išskirta - *Lactococcus*

Lactis padermė Nr. 8, nors pankreatino ir fenolio tyrime ši padermė turėjo vieną iš geriausių rodiklių. Blogiausiai pankreatiną ir fenolį toleravo bakterijų padermė Nr. 1, nors kitas dvi probiotines savybes išgyveno vidutiniškai lyginant su kitomis laktobakterijų padermėmis. Pienarūšgtės bakterijos pasižymi skirtingomis probiotinėmis savybėmis, kurios priklauso ne tik nuo bakterijų rūšies, bet ir nuo jų išskyrimo šaltinio. T. Padmavathi (6) tyrimo metu, didžiausias atsparumas tulžies druskoms ir žemai pH reakcijai nustatytas 4 PRB iš 32 tirtų padermių. Šios bakterijos buvo išskirtos iš augalų, ar jų fermentuotų. Didžiausias bakterijų išgyvenamumas buvo stebimas kai pH buvo 7, mažiausias kai pH – 3 ir 10. Tiriant pankreatino ir fenolio poveikį bakterijoms, visos (32) bakterijos buvo atsparios pankreatinui ir 0,2 proc. fenolio koncentracijai. Veikiant 0,5 proc. fenolio koncentracijai buvo pastebėtas sumažėjęs bakterijų augimas. B. Rayavarupu (22) laktobacilų išgyvenamumo skirtingose pH reakcijose tyrimas parodė, kad bakterijos gerai augo kai pH kito nuo 4 iki 9. Kai pH buvo 2, augimas nebuvo stebimas, tačiau silpnas augimas buvo stebimas esant pH 3, o kintami rezultatai buvo užfiksuoti esant pH 10. B. Rayavarupu (22) tyrimo metu PRB parodė atsparumą 0,2 proc. koncentracijos fenoliui, o esant 0,5 proc. fenolio koncentracijai slopino bakterijų augimą. Visos tirtos bakterijos buvo atsparios 0,5 proc. koncentracijos pankreatinui. Šios laktobacilos buvo išskirtos iš palmių vyno.

Remiantis mūsų tyrimo duomenimis, nustatėme, kad geresnėmis probiotinėmis savybėmis (geriau auga tulžies druskoje) pasižymėjo *L. lactis* padermės išskirtos iš rauginto pieno, todėl galime teigti, kad šios bakterijos bus geriau virškinamos ir įsisavinamos žarnyne. Panašias išvadas padarė ir O. Yerlikava (8). Mokslininkas tyrė iš kefyro grūdelių ir žalio pieno išskirtas *Lactococcus lactis* padermes. Jis nustatė, kad kefyro bakterijų padermės turėjo geresnes probiotines savybes (antimikrobinis aktyvumas ir tulžies druskos dekonjugacijos savybės) nei iš žalio pieno išskirtos *L. lactis*. Iš žalio pieno iškirti kamienai pasižymėjo geresnėmis biocheminėmis ir technologinėmis savybėmis (geresnės hidrofobiškumo ir antioksidacinio aktyvumo savybės). Jis padarė išvadą, kad padermės, turinčios tinkamas biochemines savybes, ypač antimikrobinį aktyvumą, gali būti naudojamos kaip funkcinės kultūros, tačiau jos negali būti laikomos probiotinėmis, nes nėra atsparios tulžies druskoms. Nė viena iš žalio pieno padermių negalėjo augti esant tulžies druskai ir neparodė aminorūgščių dekarboksilinimo ar lipolitinio aktyvumo.

Remiantis galutiniais fermentacijos produktais, PRB galima suskirstyti į dvi grupes: homofermentacines ir heterofermentacines, pastarąsias suskirstant į fakultatyviai ir privalomai fermentuojančias rūšis. *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ir kai kurios *Lactobacillus* genčių bakterijų rūšys yra laikomos privalomai homofermentatyvinėmis dėl jų gebėjimo Embden – Meyerhof – Parnas (EMP) būdu fermentuoti tik heksozes beveik iki pieno rūgšties, tuo tarpu pentozės nėra skaidomos visų homofermentų. Fakultatyviai heterofermentuojančios PRB gentys, tokios kaip *Leuconostoc* ir kai kurios *Lactobacillus* genties rūšys, EMP būdu skaido heksozes iki

pieno rūgšties, taip pat gali metabolizuoti pentozes ir dažnai gliukonatą, nes jos turi ir aldolazę, ir fosfoketolazę. Privalomai heterofermentacinis PRB negali panaudoti heksozių per EMP kelią, nes trūksta glikolitinio fermento fruktozės-1,6-bisfosfato aldolazės. Vietoj to, fosfoglukonato būdu jie skaido heksozes, gaudami ne tik pieno rūgštį kaip galutinį produktą, bet ir nemažą kiekį etanolio arba acto rūgšties ir anglies dioksido. Remiantis G. Buron – Moles (32), *L. lactis* subsp. *lactis* ir *L. lactis* subsp. *cremoris* yra homofermentacinės bakterijos. Pagal jų vykdytą eksperimentą, *L. lactis* subsp. *cremoris* skaidė 10 proc. visų angliavandenių, o *L. lactis* subsp. *lactis* 29 – 35 proc. Šio, magistrinio darbo, angliavandenių fermentavimo tyrimo metu nustatyta, kad vietinės kilmės *L. lactis* bakterijų padermės skaidė 30 – 34 proc. tirtų angliavandenių. Pagal mūsų gautus rezultatus galima teigti, kad tirtos padermės priklauso *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* porūšiui ir homofermentacinei pieno rūgšties bakterijų grupei. Remiantis mokslinių tyrimų (31) duomenimis, angliavandenių fermentavimo tyrimo rezultatų patikimumas siekia apie 50 proc, dėl to *L. lactis* porūšiui nustatyti rekomenduojama naudoti tikslesnius ir patikimesnius metodus, tokius kaip PGR tyrimą (31).

Bakterijų augimas skirtingose temperatūrose svarbus technologiniame procese, kadangi žemesnės temperatūros daro gamybos procesą patogesnę (7). Moksliniame darbe tiriant temperatūros pokyčių įtaką bakterijų augimui, visos bakterijos augo +30 °C, +35 °C ir +37 °C temperatūrose. Todėl galime teigti, kad mūsų tirtos *L. lactis* padermės priklauso mezofilinių bakterijų grupei, kurių optimali augimo temperatūra yra nuo +30 °C iki +37 °C (7). Kitų mokslininkų tyrimai rodo, kad atskiros *L. lactis* padermės gali augti ir aukštesnėje temperatūroje. S. Abbasiliasi ir kitų mokslininkų (27) tyrime, *Lactococcus lactis* Kp10 izoliatai buvo auginama septyniose skirtingose temperatūrose (+4 °C, +10 °C, +30 °C, +35 °C, +37 °C, +45 °C, ir +60°C). Optimaliausia augimo temperatūra nustatyta nuo +30 °C iki +45 °C. Kitose temperatūrose augimas neužfiksuotas.

Norėdami identifikuoti bakterijų porūšius mikroorganizmus tyrėme molekulinės biologijos metodu – atlikome PGR tyrimą. Remiantis Z. Y. PU ir kt., (31) pateiktu metodu, nustatėme, kad visos 5 atrinktos *Lactococcus lactis* bakterijų padermės yra *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Panašus tyrimas buvo atliktas S. Buyukyoruk ir kt. (33), kai autorius išskyrė *Lactococcus lactis* iš 58 sūrio mėginių. Naudojantis PGR metodu ir 16S rDNR geno fragmentų *Lacre-R*, *Lac-F* ir *Cre-F* molekuliniiais žymenimis, 29 iš 58 bakterijų padermių buvo identifikuotos kaip *L. lactis* subsp. *lactis*, 4 – *L. lactis* subsp. *cremoris* (161 bp). Z. Y. Pu (31) PGR tyrimo tikslas buvo atrasti skirtumus tarp 16S rDNR geno fragmentų *L. lactis* subsp. *lactis* ir *L. lactis* subsp. *cremoris* aptikimui. Šio tyrimo metu buvo naudojami *Lacre-R*, *Lac-F* ir *Cre-F* molekuliniai žymenys. Tyrimo metu buvo nustatyta, kad *Lacre-R* ir *Lac-F* pradmenų sekų kombinacija yra specifiška identifikuojant *L. lactis* subsp. *lactis*, o *Lacre-R* ir *Cre-F* - *L. lactis* subsp. *cremoris*.

IŠVADOS

1. Ištyrus pieno produktų su vietinės kilmės *L. lactis* padermis kokybines savybes (rūgimo trukmę, konsistenciją, pH reakciją, skonį ir kvapą) iš 13 buvo atrinktos 5 bakterijų padermės, kurios turėjo geriausiai įvertintas savybes. Tai buvo bakterijų padermės Nr. 1, 3, 8, 9, 11.
2. Atrinkų *L. lactis* bakterijų padermių (Nr. 1, 3, 8, 9, 11) probiotinių (atsparumas tulžies druskai, atsparumas žemam pH, pankreatino ir fenolio poveikis ir angliavandenių testas) ir biologinių (augimas skirtingose temperatūrose) savybių tyrimas parodė, kad:
 - 2.1. Geriausiu atsparumu tulžies druskoms pasižymėjo bakterijų padermė Nr. 9 ir 11, jų išgyvenamumas padidėjo atitinkamai 113 ir 104 proc. nuo pradinės bakterijų koncentracijos.
 - 2.2. Didžiausią atsparumą 2,5 pH terpės reakcijai turėjo *L. lactis* padermė Nr. 9 (išgyvenamumas sumažėjo 67 proc. nuo pradinės bakterijų koncentracijos).
 - 2.3. 0,5 proc., pankreatino poveikiui buvo atspariausios bakterijų padermės Nr. 8 ir 9, o 0,2 ir 0,5 proc., fenoliui – padermės nr. 11 ir 9.
 - 2.4. Angliavandenių fermentavimo tyrimas parodė, kad didžiausiu fermentiniu aktyvumu pasižymėjo bakterijų padermė Nr. 1 (skaidė 34 proc. tirtų angliavandenių). Pagal fermentinio aktyvumo rezultatus buvo nustatyta, kad visos 5 bakterijų padermės yra *L. lactis* subsp. *lactis*.
 - 2.5. Visos (5) bakterijų padermės priklauso mezofilinių bakterijų grupei, nes geriausiai augo prie + 30 °C, + 35 °C, + 37 °C temperatūros.
3. Naudojantis polimerazės grandininės reakcijos metodu buvo nustatyta, kad visos 5 atrinktos bakterijų padermės turėjo 163 bp ir atitiko *L. lactis* subsp. *lactis* porūšį.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Wels M. Comparative genome analysis of *Lactococcus lactis* indicates niche adaptation and resolves genotype/phenotype disparity. *Front Microbiol* 2019;10:4.
2. Cavanagh D, Casey A, Altermann E, Cotter PD, Fitzgerald GF, Mcauliffe O. Evaluation of *Lactococcus lactis* isolates from nondairy sources with potential dairy applications reveals extensive phenotype-genotype disparity and implications for a revised species. *Applied and Environmental Microbiology* 2015;81(12):3961.
3. Nomura M, Kobayashi M, Narita T, Kimoto-Nira H, Okamoto T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *Journal of Applied Microbiology* 2006;101(2):396-405.
4. Stoyanova L, Sul'timova T, Botina S, Netrusov A. Isolation and identification of new nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from milk. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2006;42(5):492-499.
5. Douillard F, de Vos W. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microbial Cell Factories* 2014;13.
6. Padmavathi T, Bhargavi R, Priyanka PR, Niranjan NR, Pavitra PV. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 2018;16(2):357-362.
7. Adelene Ai-Lian Song. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbiology Cell Factories* 2017;16(1).
8. Yerlikaya O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *Journal of Dairy Science* 2019 Jan;102(1):124-134.
9. Sarao LK, Arora M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2017;57(2):344-371.
10. Sybesma W, Kort R, Lee Y. Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? *Trends Biotechnology* 2015;33(4):197-200.
11. Millette M, Dupont C, Archambault D, Lacroix M. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *Journal of Applied Microbiology* 2007;102(1):274-282.
12. Dal Bello B, Cocolin L, Zeppa G, Field D, Cotter PD, Hill C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology* 2012;153(1):58-65.

13. Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, Soccol CR. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2007 May;50(3):512-542.
14. Zhu Y, Zhang Y, Li Y. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009;83(4):597-610.
15. Özer, B., Kirmachi, H. A., Hayaloglu, A. A., Akcelik, M., & Akkoc, N. The effects of incorporating wild-type strains of *Lactococcus lactis* into Turkish white-brined cheese (Beyaz peynir) on the fatty acid and volatile content. *International Journal of Dairy Technology* 2011; 64(4), 494–501.
16. Teuber M. (1995) The genus *Lactococcus*. In: Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (eds) *The Genera of Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria*, vol 2. Springer, Boston, MA.
17. Kimoto H, Nomura M, Kobayashi M, Okamoto T, Ohmomo S. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 2004;38(2):111-117.
18. Taxonomy browser [žiūrėta 2020 m. kovo 22 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=1357&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
19. Pérez T. *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2011;61:1894.
20. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*. 2000;289:1352–5.
21. Lukić, J., Strahinić, I., Jovčić, B., Filipić, B., Topisirović, L., Kojić, M., & Begović, J. Different roles for lactococcal aggregation factor and mucin binding protein in adhesion to gastrointestinal mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012;78(22), 7993–8000.
22. Rayavarapu, B., & Tallapragada, P. Evaluation of potencial probiotic characters of *Lactobacillus fermentum*. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry* 2019;20(2), 183-197.
23. Mayo, B., & Alonso, L. Health Benefits of Fermented Dairy Products. *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages* 2015;231–260.
24. Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology* 2013;33(2), 282–291

25. Guo, Zhuang, et al. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT-Food Science and Technology* 2009; 42.10: 1640-1646.
26. Thirabunyanon M., Boonprasom P., Niamsup P. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology Letters* 2009; 31 (4): 571–576
27. Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. A., Ramanan, R. N., Vakhshiteh, F., Mustafa, S., Ariff, A. B. Isolation of *Pediococcus acidilactici* Kp10 with ability to secrete bacteriocin-like inhibitory substance from milk products for applications in food industry. *BMC Microbiology* 2012;12(1), 260.
28. Odamaki, T., Yonezawa, S., Kitahara, M., Sugahara, Y., Xiao, J.-Z., Yaeshima, T., Ohkuma, M. Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of *Lactococcus* species. *Letters in Applied Microbiology*, 2011; 52(5), 491–496.
29. Cavanagh, D.; Fitzgerald, G. F.; McAuliffe, O. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food microbiology* 2015; 47: 45-61.
30. *L. lactis* nudažyta Gram būdu. [žiūrėta 2020 m. kovo 31 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.semanticscholar.org/paper/OF-CHROMOSOMAL-AND-PLASMID-DNA-PROFILES-OF-lactis-.Okuklu/46dea14f36469b735a70ab1140527037cb6c7c8f/figure/6>
31. PU, Z. Y., et al. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 2002;93.2: 353-361.
32. Buron-Moles, Gemma, et al. Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype association study of 56 lactic acid bacteria genomes. *Applied microbiology and biotechnology* 2019; 103.7: 3135-3152.
33. Buyukyoruk S., Cibik R., Centikaya F., Soyutemiz G. E., Goksoy E. O., Kirkan S. Isolation, phenotypic and molecular identification of *Lactococcus lactis* isolates from traditionally produced village cheese. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2010;9(16), 2154-2158.
34. LST ISO 6658:2000 „Juslinė analizė. Metodika. Bendrosios nuorodos“. [žiūrėta 2020 m. kovo 01 d.]. Prieiga per internetą: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalActPrint/lt?jfwid=q8i88lfti&documentId=TAIS.213810&category=TAD>
35. Kim, Woojin S.; Ren, Jun; Dunn, Noel W. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters* 1999; 171.1: 57-65.

36. Özkalp, B., Özden, B., Tuncer, Y., Şanlıbaba, P., & Akçelik, M. Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey. *Le Lait* 2007; 87(6), 521-534.
37. Ziadi, M., Bergot, G., Courtin, P., Chambellon, E., Hamdi, M., & Yvon, M. Amino acid catabolism by *Lactococcus lactis* during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 2010; 20(1), 25–31.
38. Rozenber, S. et al. Effects of dairy products consumption on health: benefits and beliefs a commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. *Calcified tissue international* 2016;98.1: 1-17.
39. Parmjit, S. Fermented dairy products: starter cultures and potential nutritional benefits. *Food and Nutrition Sciences* 2011.

PRIEDAI

1 priedas. *Juslinių savybių vertinimas balais ir jų reikšmės.*

Balai	Reikšmė
0	Netinkamas vartoti, nepriimtinas.
1-2	Labai didelis nukrypimas nuo nustatytų juslinių rodiklių, nepriimtinas.
3-4	Didelis nukrypimas nuo nustatytų juslinių rodiklių.
5-6	Pastebimas nukrypimas nuo nustatytų juslinių rodiklių, .
7-8	Minimalus nukrypimas nuo nustatytų juslinių rodiklių, priimtinas.
9-10	Visiškai atitinka iš anksto nustatytus juslinius rodiklius, labai priimtinas.