

LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE
LATVIA UNIVERSITY OF AGRICULTURE

PĀRTIKAS TEHNOLOĢIJAS FAKULTĀTE
FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY

Ilze Beitāne

Mg.oec.

**LAKTULOZES UN INULĪNA IZVĒRTĒJUMS JAUNA
FUNKCIONĀLA PIENA PRODUKTA IZSTRĀDĒ**

**THE EVALUATION OF LACTULOSE AND INULIN FOR
THE DEVELOPMENT OF A NEW
FUNCTIONAL MILK PRODUCT**

Promocijas darba kopsavilkums
Inženierzinātņu doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Pārtikas zinātnes nozarē, Pārtikas mikrobioloģijas apakšnozarē

Summary of doctoral thesis for acquiring
the Doctor's degree of Engineering Sciences in sector of Food Sciences,
in sub-sector of Food Microbiology

Jelgava
2008

Promocijas darba zinātniskā vadītāja /
Scientific advisor:

Inga Ciproviča
asoc. prof. Dr.sc.ing.

Oficiālie recenzenti / Official reviewers:

Dr.habil.med., profesore **Aija Žileviča** – Latvijas Universitāte / Professor of
University of Latvia

Dr.habil.sc.ing., profesore **Sigita Angele Urbiene** – Lietuvas
Lauksaimniecības universitāte / Professor of Lithuanian University of
Agriculture

Dr.biol., docente **Silvija Strikauska** – Latvijas Lauksaimniecības universitāte /
Assist. professor of Latvia University of Agriculture

Promocijas darba izstrāde veikta ar ESF granta atbalstu.

Doctoral thesis has been worked out by financial support of ESF.



Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2008.gada 20.augustā plkst. 11⁰⁰ LLU
Pārtikas zinātnes promocijas padomes atklātajā sēdē Jelgavā, Lielajā ielā 2,
Pārtikas tehnoloģijas fakultātē, 145. auditorijā.

The defence of the Doctor thesis in an open session of the Promotion Council
of Food Science of Latvia University of Agriculture will be held on August 20,
2008, at 11 a.m. in room 145, Latvia University of Agriculture, 2 Liela street,
Jelgava.

Ar promocijas darbu un kopsavilkumu var iepazīties LLU Fundamentālajā
bibliotēkā, Lielajā ielā 2, Jelgavā, LV-3001 un <http://lluqb.llu.lv/llu-theses.htm>.
Atsauksmes sūtīt Promocijas padomes sekretārei, LLU Pārtikas tehnoloģijas
fakultātes docentei *Dr.phys.* L.Markevičai Lielā ielā 2, Jelgava, LV-3001 un /
vai Lilija.Markevica@llu.lv.

The doctoral thesis is available at the Fundamental Library of Latvia University
of Agriculture, 2 Liela street, Jelgava and <http://lluqb.llu.lv/llu-theses.htm>.
Refereces are welcome to send to L.Markeviča, *Dr.phys.*, the Secretary of the
Promotion Council of Latvia University of Agriculture, Faculty of Food
Technology, 2 Liela street, Jelgava, LV-3001, Latvia, and / or
Lilija.Markevica@llu.lv.

SATURS

Pētījuma aktualitāte	4
Zinātniskā darba aprobācija	5
Materiāli un metodes	7
Pētījuma rezultāti un diskusija	12
1. Laktulozes un inulīna koncentrācijas ietekme uz <i>B.lactis</i> vairošanās dinamiku pienā	12
2. Laktozes un prebiotiku satura izmaiņas piena raudzēšanas laikā	18
3. Bioloģiski aktīvo savienojumu saturs sinbiotiskajā raudzētajā piena produktā	22
3.1. B grupas vitamīnu saturs sinbiotiskajā raudzētajā piena produktā	22
3.2. Aminoskābju saturs sinbiotiskajā raudzētajā piena produktā ...	26
4. <i>B.lactis</i> ietekme uz holesterīna saturu sinbiotiskajā raudzētajā piena produktā	29
5. Sinbiotiskā raudzētā piena produkta kvalitātes rādītāji	31
Secinājumi	34

CONTENT

Topicality of the research	35
Approbation of the scientific work	37
Materials and methods	37
Results and discussion	39
1. The evaluation of the effect of lactulose and inulin concentration on <i>B. lactis</i> proliferation dynamics in milk	39
2. The changes of lactose and prebiotics content during milk fermentation	42
3. The evaluation of the content of biologically active compounds in the synbiotic fermented milk product	44
3.1. The content of B group vitamins in the synbiotic fermented milk product	44
3.2. The content of amino acids in the synbiotic fermented milk product	46
4. <i>B.lactis</i> influence on the cholesterol content in the synbiotic fermented milk product	48
5. The quality indices of synbiotic fermented milk product	49
Conclusions	51

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Pieaugot dzīves steigai un stresam, cilvēkiem vairs neatliek laika pilnvērtīgi un mierīgi ieturēt maltīti, nodoties fiziskām aktivitātēm, tāpēc visā pasaulē un arī Latvijā pieaug risks saslimt ar tādām strauji progresējošām slimībām kā sirds un asinsvadu, cukura diabētu (*Diabetes mellitus*), vēzi, osteoporozī, u.c. Lai novērstu šo risku un veicinātu vispārējo cilvēku veselības stāvokļa uzlabošanu, tirgū ir ienākusi jauna pārtikas produktu grupa – funkcionālā pārtika. Tās pirmsākumi meklējami 20.gs. sākumā, kad krievu zinātnieks, Nobela prēmijas laureāts I.Mečņikovs izvirzīja hipotēzi, ka, lietojot uzturā raudzētus piena produktus, ir iespējams paildzināt cilvēka mūžu. Kopš tā laika funkcionālās pārtikas jomā ir veikti neskaitāmi pētījumi, īpašu uzmanību pievēršot probiotiskajiem piena produktiem, kas veido lielāko funkcionālās pārtikas daļu. Šie produkti pietiekamā daudzumā satur dzīvas pienskābes (vai citas izcelsmes) baktērijas, kas labvēlīgi ietekmē cilvēku un dzīvnieku gremošanas orgānu sistēmas mikrofloru. Lai probiotikas spētu vairoties, ir nepieciešamas prebiotikas, kas stimulē to vairošanos. Probiotiku un prebiotiku simbioze varētu būt viena no iespējām, kā uzlabot patērētāju vispārējo veselības stāvokli un mazināt risku saslimt ar iepriekš minētajām slimībām.

Bez tam būtu jāakcentē, ka atbilstoši LR MK noteikumu Nr.964 (23.11.2004.) „Pārtikas preču marķēšanas noteikumi” 10. punkta redakcijai „pārtikas preču marķējumā sniegtā informācija, kā arī marķēšanā izmantotās metodes pārtikas precei nedrīkst piedēvēt tādas īpašības vai ietekmi, kāda tai nepiemīt, kā arī radīt priekšstatu, ka pārtikas precei piemīt specifiskas iezīmes, ja šādas iezīmes piemīt visām attiecīgā veida pārtikas precēm”. Iepriekšminētais skaidri demonstrē, ka ir nepieciešamas pētnieciskā darba atziņas jaunu, t.sk. funkcionālu, produktu izstrādē un virzīšanā tirgū. Eiropas Parlamenta un Padomes Regula Nr.1924/2006 „Par uzturvērtības un veselīguma norādēm uz pārtikas produktiem” norāda, ka jebkuram apgalvojumam par pārtikas produktu uzturvērtību, to profilaktiskajām īpašībām ir jābūt pierādītam pētījumu rezultātā. Līdz ar to, veidojot jaunus, funkcionālus produktus, ir jādomā gan par produktu kvalitāti un tehnoloģisko procesu atstrādāšanu, gan par bioloģiski aktīvo sastāvdaļu apzināšanu un to satura izvērtēšanu.

Lai gan Latvijas pārtikas tirgus nemitīgi tiek papildināts ar jauniem uzturproduktiem, Latvijas funkcionālo pārtikas produktu klāsts, īpaši sinbiotisko, kas tapuši zinātnisko pētījumu rezultātā, ir nepietiekams. Lai to papildinātu, ir nepieciešams sekmēt pētījumus par dažādu probiotiku un prebiotiku simbiozi, analizējot bioloģiski aktīvo sastāvdaļu saturu produktu ražošanas un uzglabāšanas laikā un vērtējot probiotisko mikroorganismu dzīvotspēju produkta gatavošanas etapos un visā tā realizācijas laikā. Ne mazāk svarīgs pētnieciskā darba uzdevums ir tehnoloģisko rādītāju izziņāšana, to ietekme uz produkta sensorajām īpašībām. Šādu kompleksu pētījumu Latvijā faktiski nav, līdzšinējie galvenokārt ir fokusējušies uz klasisku skābpiena

produktu ražošanas tehnoloģiju adaptāciju dažādu funkcionālo produktu ražošanā, cenšoties izziņāt probiotiku dzīvotspēju produktā.

Pētījuma mērķis – jauna funkcionāla piena produkta izstrāde, pamatojoties uz tā uzturvērtības un tehnoloģisko īpašību pētījumiem.

Pētījuma uzdevumi:

1. izvērtēt laktulozes un inulīna koncentrācijas ietekmi uz *Bifidobacterium lactis* vairošanās dinamiku pienā;
2. pētīt laktozes un pievienoto prebiotiku fermentācijas pakāpi *Bifidobacterium lactis* ietekmē piena raudzēšanas laikā;
3. analizēt piena raudzēšanas laikā radušos bioloģiski aktīvo savienojumu – vitamīnu B₁, B₂, B₆ un B₁₂, neaizstājamo un aizstājamo aminoskābju – saturu sinbiotiskajā raudzētajā piena produktā;
4. izziņāt *Bifidobacterium lactis* holesterīna asimilācijas spējas pienā;
5. novērtēt sinbiotiskā raudzētā piena produkta kvalitātes rādītājus.

Pētījuma novitāte un zinātniskais nozīmīgums

Pirmo reizi Latvijā:

1. analizētas *Bifidobacterium lactis* tehnoloģiskās īpašības jauna sinbiotiska raudzēta piena produkta izveidē;
2. izvērtēta laktulozes un inulīna koncentrācijas ietekme uz *Bifidobacterium lactis* vairošanās dinamiku pienā;
3. noteikta piena raudzēšanas laikā sintezēto bioloģiski aktīvo savienojumu (B₁, B₂, B₆ un B₁₂ vitamīnu, neaizstājamo un aizstājamo aminoskābju) koncentrācija;
4. izziņātas *Bifidobacterium lactis* spējas asimilēt pienā esošo holesterīnu.

Zinātniskā darba tēma un tās izstrāde ir saistīta ar:

1. LZP Grantu Nr.04.1051 (R43) “Prebiotiku īpašību izpēte un to pielietojums jaunu funkcionālu pārtikas produktu izgatavošanā”;
2. Valsts pētījuma programmas Agrobiotehnoloģijā ”Inovatīvas tehnoloģijas augstvērtīgu, drošu un veselīgu pārtikas produktu ieguvei no ģenētiski, fizioloģiski un bioķīmiski daudzveidīga augu un dzīvnieku izejmateriāla” projektu „Jaunu, funkcionālām sastāvdaļām bagātu pārtikas produktu ražošanas tehnoloģijas”.

Darba tautsaimnieciskā nozīme

Pētījums par sinbiotiska raudzēta piena produkta izveidi rada iespēju izstrādāt un ieviest ražošanā jaunu produkta veidu un, balstoties uz pētījuma rezultātiem un atziņām, akcentēt tā pozitīvās īpašības.

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA

Par darba rezultātiem ziņots deviņās starptautiskajās zinātniskajās konferencēs un kongresos Latvijā, Francijā, Maltā, Grieķijā, Ungārijā un Spānijā.

1. Beitāne, I., Ciproviča, I., Kārklīņa, D. (2007). The amount of B₁ and B₂ vitamins in milk with added prebiotics and fermented by bifidobacteria. 10th European Nutrition Conference. 10 – 13 July France, Paris (poster presentation).
2. Beitāne, I., Ciproviča, I. (2007). The study of rheological properties of functional fermented milk. 13th International Scientific Conference „Research for rural development 2007” 16 – 18 May, Latvia, Jelgava (oral presentation).
3. Ciproviča, I., Beitāne, I. (2007). The study of the nutritive value of fermented milk with probiotics and prebiotics. International Symposium on Developments in Functional Foods in Europe – International Impact and Significance. 9 – 11 May, Malta (poster presentation).
4. Beitāne, I., Ciproviča, I. (2007). The study of the reduction of cholesterol level in milk by prebiotics and probiotics. 5th International Congress on Food Technology „Consumer Protection through Food Process Improvement and Innovation in the Real World” 9 – 11 March, Greece, Thessaloniki (poster presentation).
5. Ciproviča, I., Beitāne, I. (2006) The possibility of improvement the nutritive value of fermented milk. International Scientific Conference „Animals. Health. Food Hygiene.”, 10th November, Latvia, Jelgava (oral presentation).
6. Ciproviča, I., Beitāne, I., Kārklīņa, D. (2006). The changes of the concentration of B₁ and B₂ vitamins during milk fermentation by probiotics and prebiotics. The First SAFE International Congress on Food Safety „Nutrition and Food Safety: Evaluation of Risks and Benefits” 11 – 14 June, Hungary, Budapest (poster presentation).
7. Beitāne, I., Ciproviča, I. (2006). The changes of the concentration of thiamin and riboflavin in milk enriched with prebiotics and probiotics. 12th International Scientific Conference „Research for rural development 2006”, 17 – 20 May, Latvia, Jelgava (oral presentation).
8. Ciproviča, I., Kārklīņa, D., Beitāne, I. (2005). The stimulating of growth of *Bifidobacterium lactis* in milk enriching with lactulose. Conference „Innovations in traditional foods”, 25 – 28 October, Spain, Valensia (poster presentation).
9. Beitāne, I., Ciproviča, I. (2005). The dynamic of growing of *Bifidobacterium lactis* in substrate enriching with lactulose. 11th International Scientific Conference „Research for rural development 2005”, 18 – 21 May, Latvia, Jelgava (oral presentation).

Pētījumu rezultāti apkopoti un publicēti septiņos vispāratzītos recenzējamos zinātniskajos izdevumos latviešu un angļu valodā, no tiem sešos Latvijas Zinātnes Padomes atzītos zinātniskajos izdevumos:

1. Beitāne, I., Ciproviča, I. (2007) The study of rheological properties of functional fermented milk. **In:** International Scientific Conference Proceedings „Research for rural development 2007”, 16 – 18 May, Latvia, Jelgava, p. 123 – 127.
2. Beitāne, I., Ciproviča, I. (2007) The study of the reduction of cholesterol level in milk by probiotics and prebiotics. **In:** Proceedings of 5th International Congress on Food Technology „Consumer Protection through Food Process Improvement&Innovation in the Real World”, Volume III, ed. by E.S.Lazos, Thessaloniki, Greece, 2007, p. 168 – 171.
3. Ciproviča, I., Beitāne, I. (2006) The possibility of improvement the nutritive value of fermented milk. **In:** International Scientific Conference Proceedings „Animals. Health. Food Hygiene.”, Latvia University of Agriculture, Faculty of Veterinary Medicine, Jelgava, Latvia, 10th November 2006, p. 48 – 52.
4. Beitāne, I., Ciproviča, I. (2006) The changes of the concentration of thiamin and riboflavin in milk enriched with prebiotics and probiotics. **In:** International Scientific Conference Proceedings „Research for rural development 2006”, 17 – 20 May, Latvia, Jelgava, p. 201 – 204.
5. Ciproviča, I., Kārkliņa, D., Beitāne, I. (2005) The stimulating of growth of *Bifidobacterium lactis* in milk enriching with lactulose. **In:** Congress Proceedings „Innovations in traditional foods”, Volume II, ed. by P.Fito and F.Toldra, London: Elsevier, 2005; p. 951 – 954.
6. Beitāne, I., Ciproviča, I. (2005) The dynamic of growing of *Bifidobacterium lactis* in substrate enriching with lactulose. **In:** International Scientific Conference Proceedings „Research for rural development 2005”, 18 – 21 May, Latvia, Jelgava, p. 202 – 204.
7. Kārkliņa, D., Ciproviča, I., Beitāne, I. (2005) Effect of lactulose as a bifidogenic factors on growth of *Bifidobacterium lactis* in milk fermentation. **In:** Proceedings of 4th International Congress on Food Technology „Accessing Useful Technologies.Optimizing Food Safety and Nutrition”, Volume II, ed. by E.S.Lazos, Athens, 2005, p. 58 – 61.

Publicēšanai LLU Rakstos / **Submitted to be published** in LUA Proceedings:
 Beitāne, I., Ciproviča, I. (2008) Prebiotikas – probiotisko baktēriju vairošanās un dzīvotspējas veicinātājas pienā. / Prebiotics – the influencing factors for growing and surviving of probiotics in milk.

MATERIĀLI UN METODEDES

Pētījumu laiks un vieta

Eksperimentālais darbs veikts laika posmā no 2004.gada oktobra līdz 2007.gada oktobrim:

- LLU Pārtikas tehnoloģijas katedras Pārtikas produktu analīžu laboratorijā;
- LLU Pārtikas tehnoloģijas katedras Mikrobioloģijas laboratorijā;
- LLU Pārtikas tehnoloģijas katedras Iepakojuma materiālu īpašību izpētes laboratorijā;
- LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskā institūta “Sigra” Bioķīmijas laboratorijā;
- LU Bioloģijas institūta Dzīvnieku bioķīmijas un fizioloģijas laboratorijā;
- LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūta Tehniskās mikrobioloģijas un pārtikas biotehnoloģijas laboratorijā;
- LU Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un Biotehnoloģijas katedras laboratorijā;
- PVD Nacionālā diagnostikas centra Pārtikas un vides izmeklējumu laboratorijā.

Pētījumā izmantotie materiāli

Pasterizēts piens ar tauku saturu 2,5%.

Saskaņā ar LR MK noteikumiem Nr.521/16.09.2003. „Klasifikācijas, kvalitātes un marķējuma prasības piena produktiem, saliktiem piena produktiem un piena produktu izstrādājumiem” dzeramais piens ir ar šādiem kritērijiem:

- satur ne mazāk kā 2,9% olbaltumvielu;
- blīvums 20 °C temperatūrā nav mazāks par 1028 kg·m⁻³;
- beztauku sausnas saturs ir ne mazāks kā 8,5%.

Saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes regulu (EEK) Nr.2073/2005 „Par pārtikas produktu mikrobioloģiskajiem kritērijiem” pasterizētam pienam un citiem pasterizētiem piena produktiem jāatbilst šādiem kritērijiem: ražošanas procesa beigās 1 ml piena pieļaujamais *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu skaits no 1 līdz 5 KVV.

***Bifidobacterium lactis* (Bb–12)** – liofilizētais ieraugs (Chr.Hansen, Dānija). Izmantotā ierauga raksturojums sniegts 1. tabulā.

1. tabula / Table 1

Liofilizētā ierauga (Bb–12) raksturojums
The characterization of freeze-dried starter culture (Bb–12)

Nr.p.k. / No	Rādītāji / Indices	Specifikācija / Specification
1.	Kopējais šūnu skaits / Total cell count (KVV·g ⁻¹ / cfu·g ⁻¹)	≥10 ¹¹
2.	Koliformas / Coliforms (lielākais iespējamais skaits·g ⁻¹ / MPN·g ⁻¹)	<10
3.	Enterokoki / Enterococci (KVV·g ⁻¹ / cfu·g ⁻¹)	<100

1. tabulas nobeigums / The end of table 1

Nr.p.k. / No	Rādītāji / Indices	Specifikācija / Specification
4.	Pelējumi / Moulds (KVV·g ⁻¹ / cfu·g ⁻¹)	<10
5.	Netipiskās pienskābes baktērijas / Non starter lactic acid bacteria (KVV·g ⁻¹ / cfu·g ⁻¹)	<500
6.	<i>Staphylococcus aureus</i> (KVV·g ⁻¹ / cfu·g ⁻¹)	<10
7.	Raugi / Yeasts (KVV·g ⁻¹ / cfu·g ⁻¹)	<10

Prebiotikas:

Laktulozes šķīdums – *Lactulosae* (Duphalac®, Holande) ar zeltainu nokrāsu un viegli saldenu garšu. 100 ml šķīduma satur ne mazāk kā 67% laktulozes, mazāk kā 10% galaktozes un mazāk kā 6% laktozes. 1 g laktulozes šķīduma enerģētiskā vērtība ir 2 kcal/8,37 kJ.

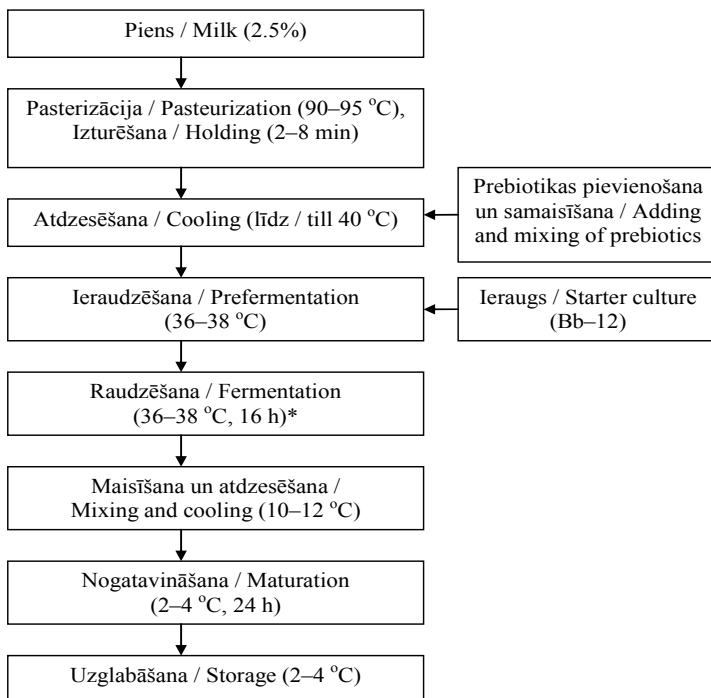
Inulīns – RAFTILINE®HP (ORAFI Active Food Ingredients, Beļģija), smalks, balts, granulēts pulveris ar neitrālu garšu, bez raksturīgas pēcgaršas, ar inulīna saturu, kas nav mazāks par 99,5%. Glikozes, fruktozes un saharozes saturs nav lielāks par 0,5%. Inulīna polimerizācijas pakāpe ≥ 5 ($\geq 99\%$). Sausnas saturs $97 \pm 1,5\%$. Pulvera šķīdība ūdenī: 25 °C temperatūrā 20 g·l⁻¹, 90 °C temperatūrā 300 g·l⁻¹. 1 g inulīna enerģētiskā vērtība ir 0,97 kcal/4,05 kJ.

Kontroles un raudzēto piena paraugu ar prebiotikām gatavošanas tehnoloģija

Lai izsekotu bifidobaktēriju vairošanās dinamikai, atsevišķi tika gatavoti analizējamā produkta paraugi ar atšķirīgu laktulozes šķīduma (1%, 2%, 3%, 4% un 5%) un inulīna (1%, 2%, 3%, 4% un 5%) koncentrāciju, kā arī kontrole bez prebiotikām. Ņemot vērā ievērojamo laktulozes saturu šķīdumā $\geq 67\%$, turpmāk tekstā tās apzīmēšanai lietots nosaukums 1%, 2%, 3%, 4% un 5% laktuloze. Gatavojot paraugus, atšķīrās pievienotā inulīna un laktulozes daudzums. Lai salīdzinātu dažādas prebiotiku koncentrācijas ietekmi uz pētāmajiem parametriem, tas veikts pēc to absolūtajiem lielumiem.

Analizējamo raudzēto piena paraugu tehnoloģiskā shēma parādīta 1. attēlā.

Produkti tika gatavoti, izmantojot klasisko skābpiena dzērienu ražošanas tehnoloģiju. Piena raudzēšanas temperatūra un laiks izvēlēts, balstoties uz ierauga ražotāja (Chr.Hansen) rekomendācijām. Ieraugu pienam pievienoja suspensijas veidā. Pievienotais ieraugs bija 2% no produkta daudzuma. Pienam ar ieraugu pievienots ne mazāk kā $1 \cdot 10^6$ *Bifidobacterium lactis* KVV.



1. att. Raudzētā piena parauga ar prebiotikām gatavošanas tehnoloģija
Fig. 1. The technology of fermented milk sample with prebiotics

* Raudzēšanas režīms izvēlēts, pamatojoties uz ierauga ražotāja (Chr.Hansen, Dānija) rekomendācijām un skābpiena dzērienu ražošanas praksi, izmantojot bifidobaktēriju ieraugu. / The fermentation parameters are chosen according to the recommendations of starter producer (Chr.Hansen, Denmark) and good manufacturing practice using bifidobacteria starter.

Pētījumā noteiktie rādītāji un lietotās metodes

Promocijas darbā noteiktie rādītāji, lietotās metodes vai standarti un analizējamo paraugu skaits apkopots 2. tabulā.

**Nosakāmo rādītāju, analīžu metožu vai standartu un
analizējamo paraugu apkopojums**
**The summary of analysed indices, analysis methods or standards
and number of samples**

Kvalitātes rādītāji / Quality indices	Rādītāji / Indices	Analizējamo paraugu skaits/ Number of analysed samples	Metode vai standarts / Method or standards
Fizikāli-ķīmiskie rādītāji / Physical and chemical indices	pH	440	LVS ISO 6092:2003
	B ₁ , B ₂ , B ₆ un B ₁₂ vitamīna saturs/The content of vitamīns B ₁ , B ₂ , B ₆ and B ₁₂	110	B ₁ vitamīns – AOAC Official Method 986.27; B ₂ vitamīns – AOAC Official Method 970.65; B ₆ vitamīns – mikrobioloģiskā metode, izmantojot J.Odincovas metodiku; B ₁₂ vitamīns – mikrobioloģiskā metode, lietojot <i>Escherichia coli</i> 113-3
	Neaizstājamo un aizstājamo aminoskābju saturs/The content of essential and non-essential amino acids	26	Ar automātisko aminoskābju analizatoru AAA 339 (Microtechna Praha), saskaņā ar “Amino acid Standard solution for protein hydrolysates – 0,5 μmole per ml” prasībām
	Laktozes, laktulozes un inulīna saturs/The content of lactose, laktuloze and inulin	63	Laktozei un laktulozei - IDF standarts 147B:1998 “Heat-treated milk. Determination of lactulose content. Method using High-performance liquid chromatography”; Inulīnam - Megazyme – fruktānu noteikšanas metode, saskaņā ar AOAC Official Method 999.03, AACC Official Metod 32.32 prasībām

2. tabulas nobeigums / The end of table 2

Kvalitātes rādītāji / Quality parameters	Rādītāji / Indices	Analizējamo paraugu skaits/ Number of analysed samples	Metode vai standarts/ Method or standards
Fizikāli–ķīmiskie rādītāji / Physical and chemical indices	Holesterīna saturs/Cholesterol content	36	AOAC Official Method 976.26A
	Šķietamā viskozitāte/The apparent viscosity	36	Ar reometru <i>DV-III Ultra</i> BROOKFIELD, saskaņā ar iekārtas ražotāja rekomendācijām
Mikrobioloģiskie rādītāji / Microbiological indices	<i>Bifidobacterium lactis</i> koloniju veidojošo vienību skaits/ The colony forming units of <i>Bifidobacterium lactis</i>	121	Gorjaeva šūnu skaitīšanas tehnika; Izmantojot selektīvo barotni (Thioglycollate broth U.S.P. Alternative (OXOID), saskaņā ar “Selective Enumeration of Bifidobacteria in Dairy Products: Development of a Standard Method” vadlīnijām
Sensorie rādītāji / Sensory properties	Patikšanas pakāpe/The degree of liking Garša+smarža/ Aroma and flavour Konsistence/ Consistency	44	Hēdoniskā skala/Hedonic scale; ISO 6564–1985(E) “Flavour profile methods”; ISO 11036:1994 “Sensory analysis – Texture profile”

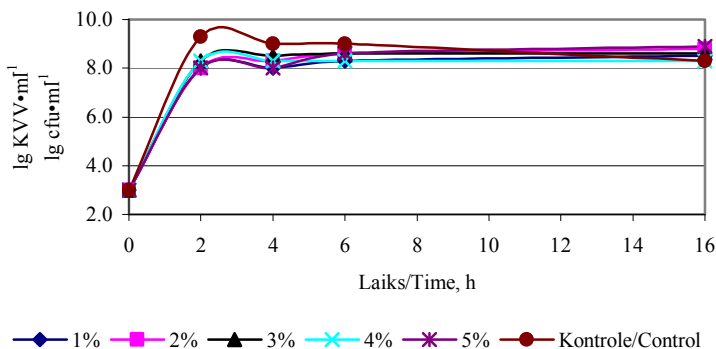
Datu matemātiskā apstrāde veikta, lietojot SPSS un Microsoft Excel programmas, izmantojot dispersijas analīzi, Fišera jeb F-testu, t-testu, Tjūkija testu un *Herschel-Bulkley* modeli.

PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

1. Laktulozes un inulīna koncentrācijas ietekme uz *B.lactis* vairošanās dinamiku pienā

Literatūrā ir atrodams atziņas, ka bifidobaktērijas vāji un dažkārt pat pilnīgi nevairojas pienā (Modler, 1994; Domaga, Juszczak, 2004), tāpēc to augšanai

tiek izmantotas prebiotikas (Martinez-Villaluenga et al., 2006). Pētījumā *B.lactis* vairošanai kā prebiotikas tika izmantota laktuloze un inulīns. *B.lactis* vairošanās dinamika pienā atkarībā no laktulozes un inulīna koncentrācijas atspoguļota 2. un 4. attēlā.



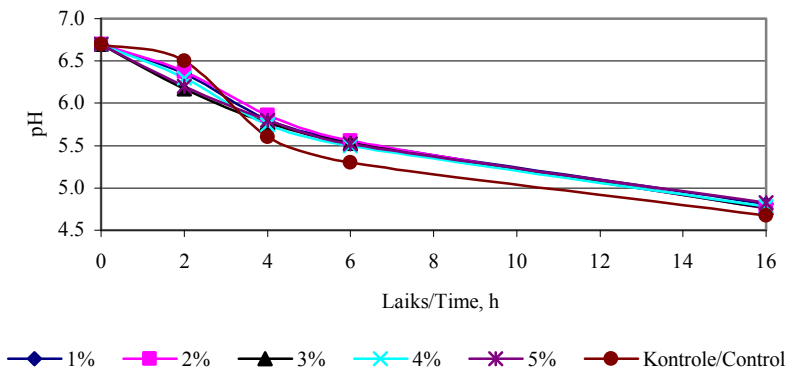
2. att. *B.lactis* vairošanās dinamika piena raudzēšanas laikā atkarībā no pievienotās laktulozes koncentrācijas

Fig. 2. The dynamics of growth of *B.lactis* in milk depending on the concentration of lactulose

Kā redzams no 2. attēla, pirmajās divās raudzēšanas stundās ir vērojams straujš *B.lactis* skaita pieaugums, īpaši kontrolei. Tas skaidrojams ar optimāliem *B.lactis* augšanas apstākļiem un piemērotu vides pH (3. attēls).

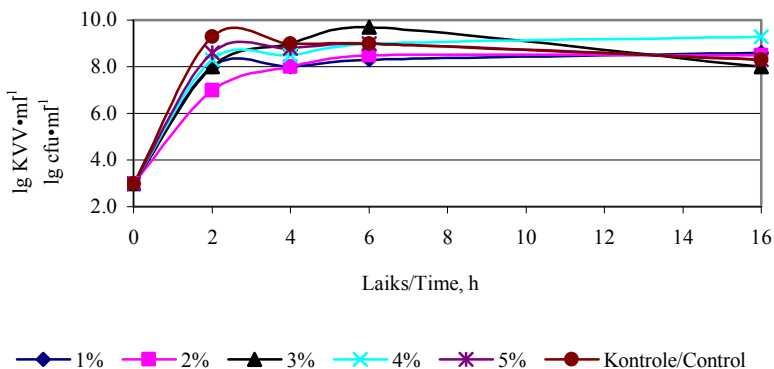
Sākot ar otro raudzēšanas stundu, pH straujāk samazinājies kontrolei, nevis piena paraugiem ar laktulozi. Tas izskaidro *B.lactis* skaita samazinājumu kontrolei tālākā raudzēšanas laikā (2. attēls). Laktulozes klātbūtne nodrošina pakāpenisku pH kritumu, tāpēc visā piena raudzēšanas laikā ir vērojams neliels, bet sistemātisks *B.lactis* pieaugums. Tas norāda uz savstarpēju sakarību starp bifidobaktēriju augšanas ātrumu un skābuma intensitātes pieaugumu. *B.lactis* izteiktās vairošanās spējas pienā var skaidrot šādi: *B.lactis* sākotnēji ir izdalīta no dzīvnieku fecēm un adaptēta pienā (Klein et al., 1998). Tai piemīt relatīva skābekļa un skābes tolerance, kas daļai bifidobaktēriju sugu nav novērojama.

Augstākais *B.lactis* skaits raudzēšanas beigās tika noteikts raudzētajiem piena paraugiem ar 2% ($6 \cdot 10^8$ KVV·ml⁻¹) un 5% laktulozes ($8 \cdot 10^8$ KVV·ml⁻¹). Iegūtie rezultāti sasaucas ar Palframan u.c. (2002) pētījuma atziņām, ka laktulozei labākais bifidogēnais efekts tiek panākts, pievienojot to 2%. Martinez-Villaluenga u.c. (2006) pētījumā norāda, ka *B.lactis* vairošanās vienlīdz labi tiek veicināta, pievienojot 0,5%, 1% un 2% laktulozes.



3. att. pH izmaiņas piena paraugiem ar laktulozi raudzēšanas laikā
Fig. 3. The changes of pH during fermentation
of milk samples with lactulose

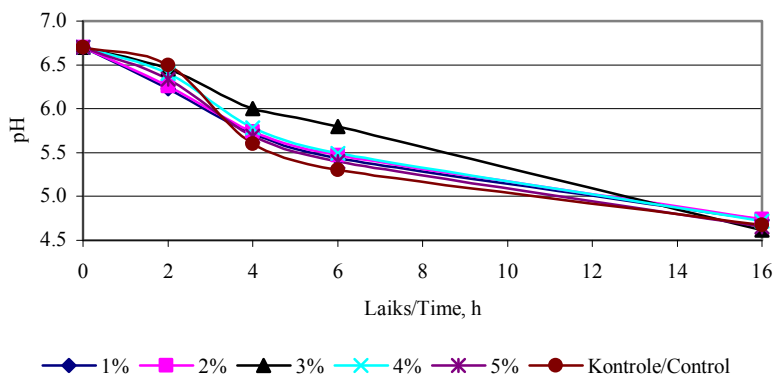
B.lactis vairošanās dinamika pienā, pievienojot inulīnu atšķirīgā koncentrācijā, atspoguļota 4. attēlā.



4. att. *B.lactis* vairošanās dinamika piena raudzēšanas laikā atkarībā no pievienotās inulīna koncentrācijas
Fig. 4. The dynamics of growth of *B.lactis* in milk depending on the concentration of inulin

B.lactis vairošanās dinamikā piena paraugos ar inulīnu ir vērojamas līdzīgas tendences kā ar laktulozi. Arī šeit pirmajās divās raudzēšanas stundās ir straujš

B.lactis skaita pieaugums pienā, izņemot paraugu ar 3% inulīna, kur ievērojams pieaugums tika noteikts līdz pat sestajai raudzēšanas stundai. Šeit ir vērojama pozitīva korelācija starp bifidobaktēriju vairošanos un vides pH. Raudzētajam piena paraugam ar 3% inulīna līdz pat raudzēšanas sestajai stundai pH ir tuvu optimālajam bifidobaktēriju vairošanai (5. attēls).



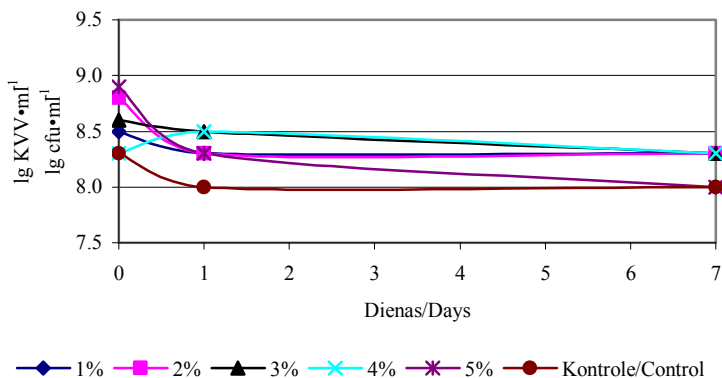
5. att. pH izmaiņas piena paraugiem ar inulīnu raudzēšanas laikā
Fig. 5. The changes of pH during fermentation of milk samples with inulin

Iegūtie rezultāti parādīja, ka inulīna klātbūtne nodrošina pakāpenisku pH samazinājumu, līdz ar to visā piena raudzēšanas laikā tiek veicināts *B.lactis* pieaugums piena paraugos ar 1%, 2% un 4% inulīna. Raudzēšanas beigās augstākais *B.lactis* skaits tika noteikts piena paraugam ar 4% inulīna ($2 \cdot 10^9$ KVV·ml⁻¹). Šeit ir meklējamas paralēles ar *Shin* u.c. (2000) pētījumu, kur ir norādes, ka fruktooligosaharīdi ir visefektīvākās prebiotikas starp pētītajiem ogļhidrātu avotiem, uzsverot, ka fruktooligosaharīdu efektivitāte pieaug, palielinoties to koncentrācijai (maksimāli līdz 5%). Savukārt *Palframan* u.c. (2002) pētījumā norādīja, ka fruktooligosaharīdiem augstākais bifidogēnais efekts tiek panākts 1% koncentrācijā. Šis atšķirīgās atziņas varētu skaidrot ar pētījumos izmantotajām atšķirīgajām fruktooligosaharīdu polimerizācijas pakāpēm un bifidobaktēriju sugām. Līdz ar to ir jāsecina, ka vienas sugas īpatnības nevar attiecināt uz visu ģinti. To apstiprināja *Bielecka* u.c. (2002) pētījuma atziņa, ka tikai 18 sugas no 30 pētītajām (galvenokārt *B.longum* un *B.animalis*) spēj asimilēt fruktooligosaharīdus.

Eksperimenta rezultāti parādīja, ka pievienotā prebiotiku koncentrācija būtiski ietekmē *B.lactis* skaitu paraugos, tādēļ var secināt, ka, pievienojot laktulozi un inulīnu, ir iespējams veicināt *B.lactis* vairošanos. Optimālā laktulozes koncentrācija ir 2% un 5%, inulīnam – 4%. Paraugs ar 4% inulīna būtiski atšķirās no pārējiem paraugiem, tādējādi parādot, ka arī prebiotikas veids var ietekmēt *B.lactis* skaitu raudzētajā pienā. Tas apstiprina pētījumos izteiktās

atziņas, ka bifidobaktēriju augšanai īpaši piemēroti ir fruktooligosaharīdi (Simmering, Blaut, 2001).

Līdzās bifidobaktēriju augšanas stimulēšanai pienā ne mazāk svarīgs faktors ir bifidobaktēriju dzīvotspējas nodrošināšana produktā tā uzglabāšanas laikā. Ōzer u.c. (2005) norāda, ka viena no iespējām, kā sekmēt *B.bifidum* BB-02 un *L.acidophilus* LA-5 dzīvotspēju (ap 10^7 KVV·g⁻¹) jogurta uzglabāšanas laikā, ir prebiotiku pievienošana. Tāpēc raudzētajiem piena paraugiem ar prebiotikām tika noteikts *B.lactis* skaits 1. un 7. uzglabāšanas dienā. Iegūtie rezultāti atspoguļoti 6. un 7. attēlā.

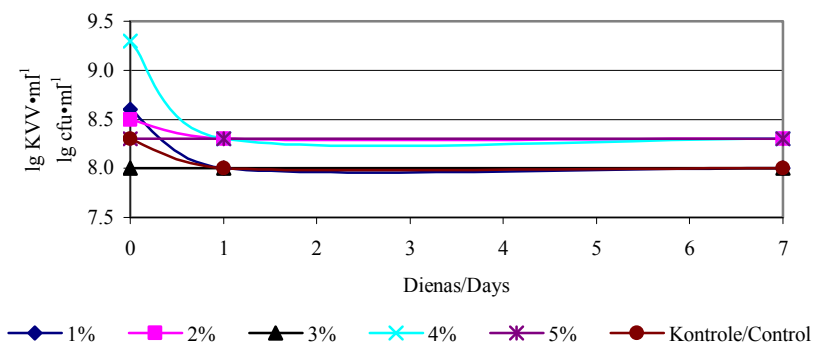


6. att. *B.lactis* skaita izmaiņas raudzētajos piena paraugos to nogatavināšanas un uzglabāšanas laikā atkarībā no pievienotās laktulozes koncentrācijas
Fig. 6. The changes of *B.lactis* in fermented milk samples during maturation and shelf life of the product depending on the concentration of lactulose

Tūlīt pēc raudzēšanas, laika posmā no 0 līdz 1. dienai, notiek produkta nogatavināšana. Tās laikā ir vērojams krass *B.lactis* skaita samazinājums paraugos, ko var skaidrot gan ar skābekļa klātbūtni, produktu samaisot, gan ar temperatūras izmaiņām, produktu atdzesējot, gan ar tālāku skābuma pieaugumu bioķīmisko norišu rezultātā, produktu nogatavinot. Literatūrā un arī praksē ir zināms, ka skābpiena dzērienu uzglabāšanas laikā pH turpina samazināties, sasniedzot pat 4,4 (Alkalin et al., 2004), savukārt analizētajiem raudzētajiem piena paraugiem pH nenoslīdēja zemāk par 4,6. Šo atšķirību var skaidrot ar pētījumā izmantoto monokultūru *B.lactis*, savukārt literatūrā aprakstītā produkta ieraugā bez bifidobaktērijām ietilpa arī *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* un *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Kontrolei un raudzētajiem piena paraugiem ar 1% un 2% laktulozes pH izmaiņas bija nenozīmīgas, tas arī izskaidro nemainīgo *B.lactis* skaitu paraugu uzglabāšanas

laikā (6. attēls). Raudzētajiem piena paraugiem ar 3% laktulozes un vairāk bija vērojams *B.lactis* skaita samazinājums no 0,5 līdz 1 lg vērtībai. Pētījuma rezultāti sasaucas ar literatūrā minētajām atziņām, ka optimālais bifidogēnais efekts laktulozei tiek panākts tieši nelielās koncentrācijās, kas arī nodrošina nemainīgu *B.lactis* skaitu paraugu uzglabāšanas laikā.

B.lactis skaita izmaiņas raudzētajos piena paraugos ar inulīnu nogatavināšanas un uzglabāšanas laikā atspoguļotas 7. attēlā.



7. att. *B.lactis* skaita izmaiņas raudzētajos piena paraugos to nogatavināšanas un uzglabāšanas laikā atkarībā no pievienotās inulīna koncentrācijas

Fig. 7. The changes of *B.lactis* in fermented milk samples during maturation and shelf life of the product depending on the concentration of inulin

Raudzētajiem piena paraugiem ar inulīnu bija vērojamas līdzīgas tendences kā ar laktulozi, kur nogatavināšanas laikā tika konstatēts izteikts *B.lactis* skaita samazinājums. Savukārt uzglabāšanas laikā inulīna klātbūtne raudzētajos piena paraugos nodrošināja nemainīgu *B.lactis* skaitu, kas ir ļoti pozitīvi, veidojot sinbiotisko raudzēto piena produktu. Alaklin u.c. (2004) pētījumā norāda, ka uzglabāšanas laikā dzīvotspējīgo bifidobaktēriju skaits ir augstāks, ja tās ir augušas fruktooligosaharīdu klātbūtnē. Ar šīs atziņas palīdzību var skaidrot pētījuma rezultātus, kur uzglabāšanas laikā augstākais un nemainīgākais *B.lactis* skaits ($8,3 \text{ lg KVV} \cdot \text{ml}^{-1}$) tika konstatēts raudzētajiem piena paraugiem ar 2%, 4% un 5% inulīna.

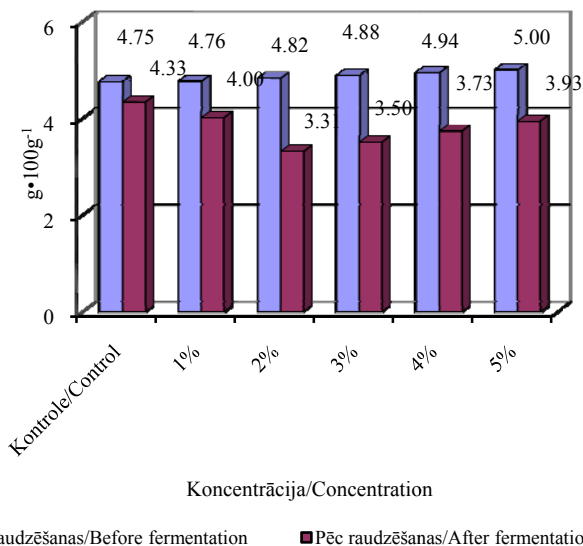
Pētījumā iegūtie rezultāti apstiprina literatūrā minētās atziņas par laktulozes un inulīna bifidogēno efektu. Pievienojot pienam laktulozi un inulīnu, raudzēšanas laikā tiek veicināta *B.lactis* vairošanās pienā un uzglabāšanas laikā nodrošināta to dzīvotspēja raudzētajos piena paraugos. *B.lactis* skaits paraugos raudzēšanas, nogatavināšanas un uzglabāšanas termiņa beigās bija no 10^8 līdz $10^9 \text{ KVV} \cdot \text{ml}^{-1}$,

kas ir būtiski augstāks par noteikto terapeitisko minimumu bifidobaktērijiem – 10^6 KVV·g⁻¹. Kā optimālā laktulozes koncentrācija *B.lactis* vairošanai piena raudzēšanas laikā un tā dzīvotspējas nodrošināšanai paraugu uzglabāšanas laikā ir 2%, inulīnam – 4%.

2. Laktozes un prebiotiku saturs izmaiņas piena raudzēšanas laikā

Martinez-Villaluenga u.c. (2006) norāda, ka *B.lactis* spēj pārraudzēt laktulozi koncentrācijās no 0,5 līdz 2%, savukārt Ōzer u.c. (2005) akcentē, ka, salīdzinot ar inulīnu, laktulozi efektīvāk asimilē *Bifidobacterium bifidum* BB-02 un *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Ņemot vērā šo autoru atziņas, arī daudzviet literatūrā pretrunīgos datus, tika noteikts laktozes, laktulozes un inulīna saturs pienā pirms un pēc raudzēšanas.

Laktozes saturs pienā pirms un pēc raudzēšanas, pievienojot no 1% līdz 5% pētāmās prebiotikas, parādīts 8. un 9. attēlā.

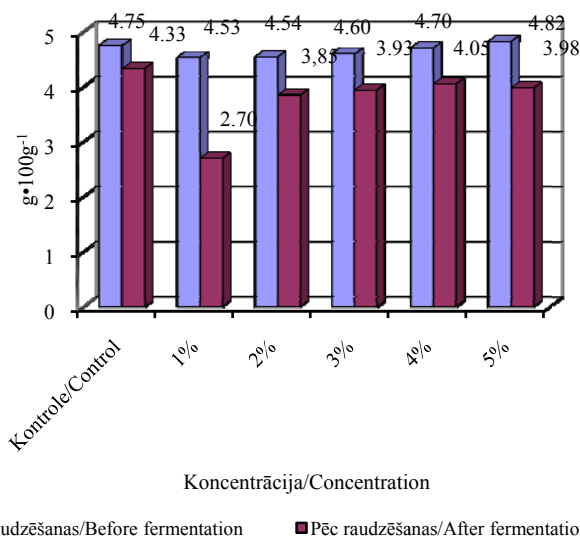


8. att. Laktozes saturs pienā pirms* un pēc raudzēšanas paraugiem ar dažādu laktulozes koncentrāciju

Fig. 8. The content of lactose in milk before* and after fermentation depending on the concentration of lactulose of samples

* Laktozes saturs palielinājums paraugos pirms raudzēšanas ir saistīts ar laktulozes šķīduma sastāvu, satur līdz 6% laktozes. / The increasing of the content of lactose in milk samples before fermentation is connected with the content of lactulose solution (contain till 6% of lactose).

Iegūtie rezultāti (8. attēls) apstiprināja literatūrā minētās atziņas, ka bifidobaktērijas vāji asimilē laktozi (Modler, 1994). Raudzēšanas laikā bifidobaktērijas ir spējušas utilizēt $0,42 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ laktozes kontrolei. Savukārt piena paraugiem ar laktulozi laktozes satura izmaiņas ir atkarīgas no pievienotās laktulozes koncentrācijas, t.i., palielinoties pievienotās laktulozes koncentrācijai, samazinās laktozes asimilācija piena raudzēšanas procesā. Literatūrā ir atrodamas atziņas, ka laktozes asimilācija ir atkarīga no pievienotās bifidobaktēriju sugas, augstāku asimilāciju konstatējot *B.bifidum*, *B.breve* un *B.infantis* (Lamoureux et al., 2002). Lai izvērtētu laktulozes koncentrāciju ietekmi uz laktozes asimilāciju paraugos, tika izmantota dispersijas analīze. Iegūtie rezultāti parādīja, ka laktulozes koncentrācijai nav būtiskas ietekmes uz bifidobaktēriju spēju asimilēt laktozi ($p>0,05$). Izvērtējot laktozes satura samazinājumu analizētajos paraugos un kontrolei, salīdzinot ar sākotnējo laktozes saturu pienā, tas ir jāuzskata par būtisku ($p<0,05$). To varētu skaidrot ar *B.lactis* īpašībām: tā ir adaptēta pienā (Klein et al., 1998) un spēj vairoties tajā, izmantojot laktozi kā barības vielu šūnu enerģijas metabolismam. Līdzīgi kā raudzētajiem piena paraugiem ar laktulozi, laktozes asimilācija samazinās līdz ar inulīna koncentrācijas (līdz 4%) palielinājumu pienā (9. attēls).



9. att. Laktozes saturs pienā pirms* un pēc raudzēšanas paraugiem ar dažādu inulīna koncentrāciju

Fig. 9. The content of lactose in milk before and after fermentation depending on the concentration of inulin

* Laktozes satura izmaiņas piena paraugos pirms raudzēšanas saistītas ar inulīna sastāvu (līdz 0,5% saturot monosaharīdus – glikozi un fruktozi, un disaharīdu – saharozi). Nosakot laktozi, kopējā

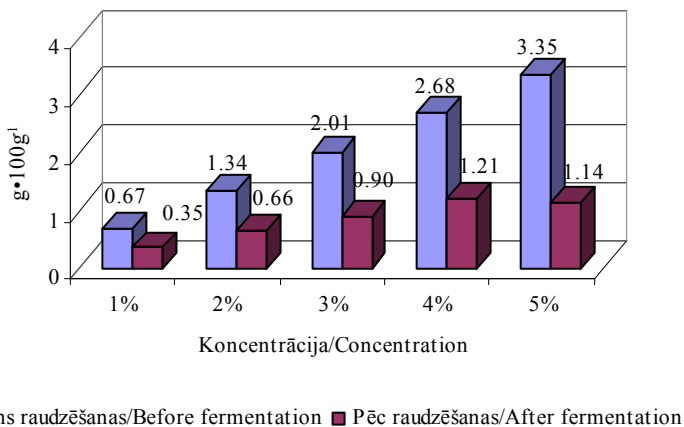
summā tiem pieskaitīta arī glikoze. / The changes of the content of lactose in milk samples before fermentation are connected with the content of inulin (contain till 0.5% glycose, fructose, and saccharose). The content of glycose is calculated into the total content of lactose according to the standard method for determination of lactose in milk.

Paraugā ar 5% inulīna laktozes asimilācija nedaudz pieaug, taču šeit nav konstatētas būtiskas atšķirības starp raudzētajiem piena paraugiem ar 2%, 3% un 4% inulīna un ar kontroli ($p>0,05$).

Laktozes saturs piena paraugiem ar inulīnu un kontrolei pirms un pēc raudzēšanas (9. attēls) tika konstatēts kā būtisks ($p<0,05$). Tomēr šeit ir jāpiebilst, ka laktozes asimilācija ir atkarīga no pievienotās prebiotikas veida un koncentrācijas. Vērtējot rezultātus, ir jāņem vērā, ka *B.lactis* ir pielāgots pienam, līdz ar to tā vairošanās un augšanas ātrums pienā ir augstāks kā citām bifidobaktēriju sugām. Tas arī izskaidro laktozes satura samazinājumu raudzētajos piena paraugos.

Literatūrā ir atrodamas norādes par bifidobaktēriju spēju asimilēt laktulozi (Özer et al., 2005) un rafinozes atvasinājumus (Martinez-Villaluenga et al., 2006), tāpēc darbā analizēts arī laktulozes un inulīna saturs pirms un pēc piena raudzēšanas, lai varētu meklēt likumsakarības starp laktozes, laktulozes vai inulīna asimilāciju pienā *B.lactis* ietekmē.

Laktulozes saturs pienā pirms un pēc raudzēšanas atspoguļots 10. attēlā.



10. att. Laktulozes saturs pienā pirms un pēc raudzēšanas
Fig. 10. The content of lactulose in milk before and after fermentation

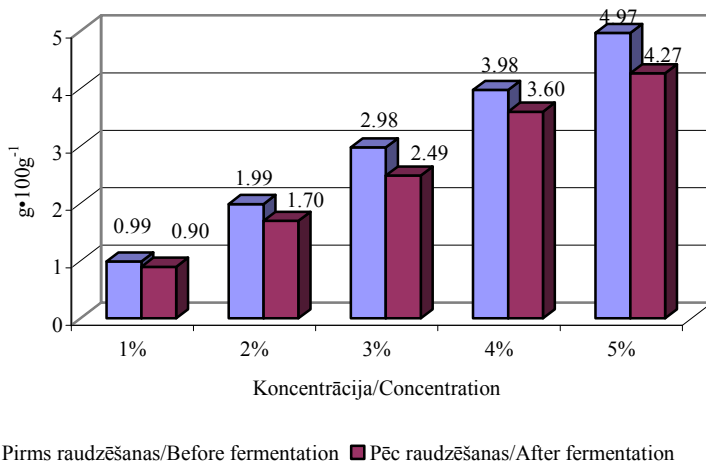
Iegūtie rezultāti parādīja, ka bifidobaktērijas spēj hidrolizēt līdz 50% produktā esošo laktulozi, izņemot raudzēto piena paraugu ar 5% laktulozes, kur tika konstatēts laktulozes samazinājums par 2/3. Jāatzīmē, ka raudzēšanas beigās

paraugiem ar 5% laktulozes tika noteikts arī augstākais *B.lactis* skaits ($1 \cdot 10^9$ KVV·ml⁻¹). Pieaugot laktulozes koncentrācijai, palielinās laktulozes asimilācija pienā un *B.lactis* skaita pieaugums, tādējādi norādot uz probiotikas un prebiotikas savstarpēju mijiedarbību. Iegūtie rezultāti apstiprināja literatūrā minētās atziņas par laktulozes bifidogēno efektu (Palframan et al., 2002; Bouhnik et al., 2004) un bifidobaktēriju spēju asimilēt laktulozi (Saarela et al., 2003; Özer et al., 2005).

Laktulozes satura izmaiņas analizētajos paraugos ir būtiskas ($p < 0,05$), līdz ar to var secināt, ka *B.lactis* piemīt spēja asimilēt laktulozi. Tas sasaucas ar literatūrā atrodamām atziņām, ka bifidobaktērijas labāk vairojas tieši laktulozes klātbūtnē (Rycroft et al., 2001) un kā vairāki resnās zarnas mikroorganismi, arī bifidobaktērijas, spēj utilizēt laktulozi un laktitolu (Kontula et al., 1999).

Salīdzinot laktozes un laktulozes satura izmaiņas raudzētajos piena paraugos, redzams, ka *B.lactis* spēj asimilēt no 47% līdz 66% laktulozi un tikai no 9% līdz 31% laktozi. Vērtējot iegūtos datus, var secināt, ka *B.lactis* kombinācijā ar laktulozi ir piemērots sinbiotiska piena produkta izveidē.

Inulīna saturs pienā pirms un pēc raudzēšanas atspoguļots 11. attēlā.



11. att. Inulīna saturs pienā pirms un pēc raudzēšanas
Fig. 11. The content of inulin in milk before and after fermentation

Rezultāti parādīja, ka bifidobaktērijas vāji hidrolizē inulīnu (10–20%). Šeit ir meklējamas zināmas paralēles ar literatūrā atrodamām atziņām, kur Semjonovs u.c. (2004) norāda, ka *B.lactis* nespēj asimilēt inulīnu. Savukārt Biedrzycka no Bielecka (2003) secina, ka bifidobaktēriju spēja asimilēt inulīnu ir atkarīga no prebiotikas polimerizācijas un tīrības pakāpes. Jo augstāka polimerizācijas un tīrības pakāpe, jo vājāk bifidobaktērijas asimilē inulīnu. Ar

to varētu skaidrot inulīna asimilācijas pakāpi raudzētajos piena paraugos, jo pētījumā tika izmantots inulīns ar augstu tīrības pakāpi.

Analizējot rezultātus par inulīna ietekmi uz *B.lactis* vairošanos pienā, jāsecina, ka inulīns veicina *B.lactis* vairošanos pienā, taču tas netiek pietiekami asimilēts raudzēšanas procesā. Literatūrā ir atrodamas atziņas, ka inulīna klātbūtne resnajā zarnā nodrošina bifidobaktēriju populācijas pieaugumu un palielinātu īso ķēžu taukskābju sintēzi (Van de Wiele et al., 2004). Iespējams, ka līdzīgas norises varētu notikt, raudzējot pienu ar bifidobaktērijām inulīna klātbūtnē.

No pētījuma rezultātiem izriet, ka gan laktuloze, gan inulīns spēj stimulēt *B.lactis* vairošanos, taču kā piemērotākā barības viela ir laktuloze.

3. Bioloģiski aktīvo savienojumu saturs sinbiotiskajā raudzētajā piena produktā

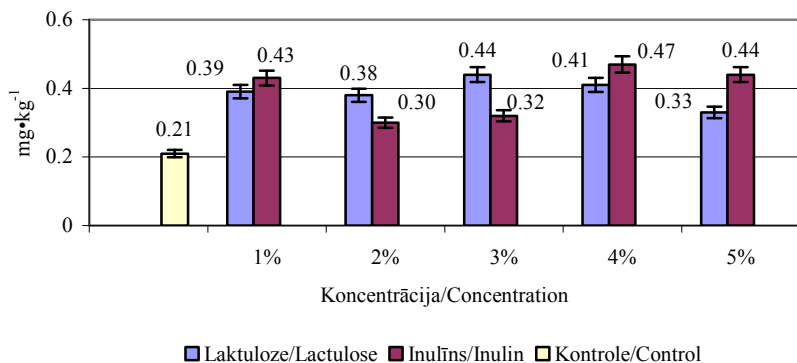
3.1. B grupas vitamīnu saturs sinbiotiskajā raudzētajā piena produktā

Bifidobaktērijas raudzēšanas procesā spēj sintezēt ūdenī šķīstošos vitamīnus, taču katrai *Bifidobacterium* ģints sugai šīs spējas ir atšķirīgas. Tāpēc darbā tika pētīts, kā *Bifidobacterium lactis* spēj sintezēt B₁, B₂, B₆ un B₁₂ vitamīnus un kā sintezēto vitamīnu saturu ietekmē pievienotās prebiotikas veids un koncentrācija.

Vitamīnu B₁, B₂, B₆ un B₁₂ saturs raudzētajos piena paraugos atkarībā no pievienotās laktulozes un inulīna koncentrācijas, kā arī kontrolei parādīts 12., 13., 14. un 15. attēlā.

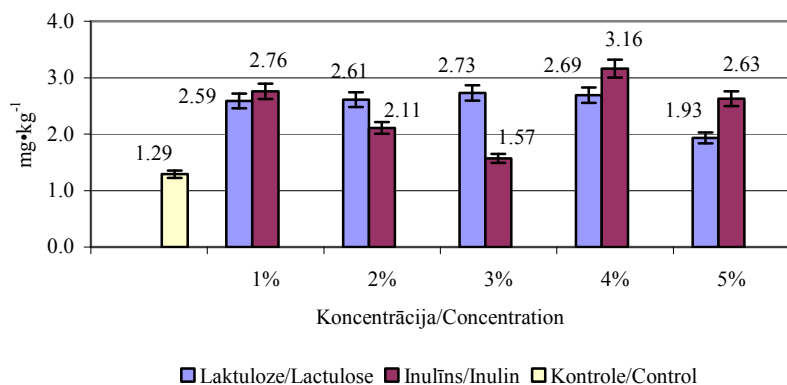
Pētījumu rezultāti (12. attēls) parādīja, ka **B₁ vitamīna** saturs būtiski palielinās raudzētajos piena paraugos, pievienojot gan laktulozi (p -vērtība=0,0001<0,05), gan inulīnu (p -vērtība=0,0032<0,05). Pētījumā, konstatēts, ka prebiotikas veidam nav būtiskas ietekmes (p -vērtība=0,48>0,05) uz B₁ vitamīna saturu paraugos.

Salīdzinot iegūtos rezultātus (12. attēls) ar literatūrā norādīto B₁ vitamīna saturu pienā – 0,4 mg·kg⁻¹ (Горбатова, 1984; Chandan, 1997; Milk quality, 1999), redzams, ka kontrolei ir vērojams krass B₁ vitamīna satura samazinājums (0,21 mg·kg⁻¹). To varētu skaidrot ar bifidobaktēriju augšanai nepieciešamajiem vitamīniem B₁, B₆, B₉, B₁₂ un PP (Deguchi et al., 1985). Lielo vitamīna satura kritumu, kā rāda pētījuma dati, ir iespējams mazināt vai pat novērst, pievienojot piena paraugiem prebiotikas. Bez tam atšķirības starp pienu un kontroli var skaidrot arī ar termiskās apstrādes režīma ietekmi, kurā pētāmā vitamīna koncentrācija samazinās par 20% (Milk quality, 1999).



12. att. Laktulozes un inulīna koncentrācijas ietekme uz B₁ vitamīna saturu raudzētajos piena paraugos
Fig. 12. The influence of lactulose and inulin concentrations on the content of vitamin B₁ in fermented milk samples

Pētījuma rezultāti liecina, ka prebiotiku pievienošana sekmē B₁ vitamīna producēšanu un būtiski palielina tā koncentrāciju galaproduktā. Aplūkojot B₂ vitamīna saturu raudzētajos piena paraugos ar prebiotikām (13. attēls), vērojamas līdzīgas tendences, kā B₁ vitamīnam.

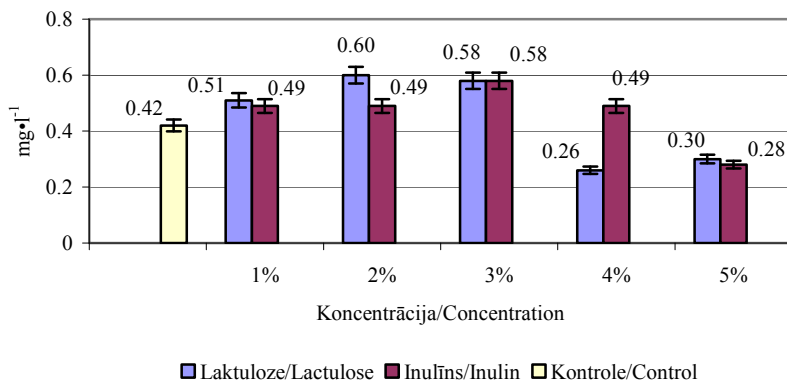


13. att. Laktulozes un inulīna koncentrācijas ietekme uz B₂ vitamīna saturu raudzētajos piena paraugos
Fig. 13. The influence of lactulose and inulin concentrations on the content of vitamin B₂ in fermented milk samples

Laktulozes (p -vērtība=0,0005<0,05) un inulīna (p -vērtība=0,0069<0,05) klātbūtne raudzētajos piena paraugos būtiski palielināja B₂ vitamīna saturu, tomēr prebiotikas veidam nav būtiskas ietekmes (p -vērtība=0,422>0,05) uz B₂ vitamīna saturu.

Ja salīdzina pētījumā iegūtos rezultātus ar literatūrā norādīto B₂ vitamīna saturu pienā – 1,5–1,7 mg·kg⁻¹ (Горбатова, 1984; Chandan, 1997; Milk quality, 1999), redzams, ka raudzētajā piena paraugā noteiktā prebiotiku koncentrācijā ir līdz pat divām reizēm augstāka. Tas sasauca ar literatūrā minētajiem pētījumiem par bifidobaktēriju spēju sintezēt ūdenī šķīstošos vitamīnus, tajā skaitā arī B grupas vitamīnus (Deguchi et al., 1985). No pētījuma datiem izriet, ka, raudzējot pienu noteiktu prebiotiku klātbūtnē, ir iespējams atgūt vai pat būtiski palielināt B₂ vitamīna saturu paraugā.

Vērojot B₆ vitamīna saturu raudzētajos piena paraugos ar prebiotikām (14. attēls) konstatēts, ka augstākie rādītāji tiek panākti piena paraugiem ar prebiotikām noteiktā koncentrācijā – laktulozei no 1% līdz 3% (0,51 līdz 0,60 mg·l⁻¹) un inulīnam no 1% līdz 4% (0,49 līdz 0,58 mg·l⁻¹).



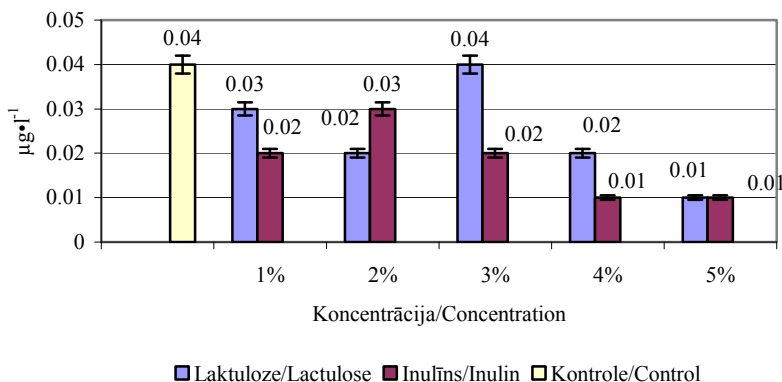
14. att. Laktulozes un inulīna koncentrācijas ietekme uz B₆ vitamīna saturu raudzētajos piena paraugos

Fig. 14. The influence of lactulose and inulin concentrations on the content of vitamin B₆ in fermented milk samples

Augstākā laktulozes un inulīna koncentrācijā (5%) B₆ vitamīna saturs ir 0,30 mg·l⁻¹ un 0,28 mg·l⁻¹. Tas ir ievērojami zemāks nekā kontrolei (0,42 mg·l⁻¹). Kā zināms, piena sausnas saturs svārstās robežās no 11% līdz 14% (Ozola, Ciproviča, 2002), bet raudzētajiem piena paraugiem, pievienojot prebiotikas koncentrācijās līdz 5%, tas ir robežās no 14% līdz 18% (Fluckiger,

1982). Būtiski palielinot sausnas saturu, mainās produkta ūdens aktivitāte un tiek kavēta mikroorganismu vairošanās, īpaši grampozitīvo. *B.lactis* spēja producēt B₆ vitamīnu samazinās, pievienojot 5% laktulozes vai inulīna. B₆ vitamīna saturs šajos paraugos samazinās, attiecīgi, līdz 0,28 un 0,30 mg·l⁻¹. Izmantojot t-testu, tika konstatēts, ka ne laktulozes ($p\text{-vērtība}=0,35>0,05$), ne inulīna ($p\text{-vērtība}=0,21>0,05$) klātbūtne būtiski neietekmē B₆ vitamīna saturu raudzētajos piena paraugos. Salīdzinot iegūtos pētījuma rezultātus (14. attēls) ar B₆ vitamīna saturu pienā, kas literatūrā ir norādīts robežās no 0,4 līdz 0,6 mg·l⁻¹ (Горбатова, 1984; Chandan, 1997; Milk quality, 1999), redzams, ka, pievienojot laktulozi koncentrācijās līdz 3% un inulīnu līdz 4%, raudzētajā pienā ir iespējams panākt B₆ vitamīna satura palielinājumu. Kaut arī literatūrā ir minēts, ka bifidobaktērijām ir nepieciešams B₆ vitamīns, lai tās varētu normāli vairoties (Deguchi et al., 1985; Ballongue, 2004), pētījuma rezultāti parādīja, ka, pievienojot prebiotikas, raudzētajā pienā var panākt B₆ vitamīna saturu palielinājumu. Tātad varam secināt, ka *B.lactis* pēj producēt B₆ vitamīnu, tāpēc arī tiek kompensēts vai palielināts vairošanās procesā izmantotā B₆ vitamīna saturs.

B₁₂ vitamīna saturs raudzētajos piena paraugos ar prebiotikām dots 15. attēlā.



15. att. Laktulozes un inulīna koncentrācijas ietekme uz B₁₂ vitamīna saturu raudzētajos piena paraugos

Fig. 15. The influence of lactulose and inulin concentrations on the content of vitamin B₁₂ in fermented milk samples

Pētījuma rezultāti (15. attēls) parādīja, ka B₁₂ vitamīna saturs raudzētajos piena paraugos ar atšķirīgu laktulozes un inulīna koncentrāciju samazinās, izņemot raudzēto piena paraugu ar 3% laktulozes. Augstākā prebiotiku koncentrācijā (4% līdz 5% laktulozei un 3% līdz 5% inulīnam) B₁₂ vitamīna saturs raudzētajā

piena paraugā samazinās līdz $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. B_{12} vitamīna samazinājumu var skaidrot līdzīgi kā B_6 vitamīna gadījumā, bifidobaktērijām ir nepieciešami vitamīni, tajā skaitā B_{12} (Ballongue, 2004). No pētījuma izriet, ka piena raudzēšanas laikā B_{12} vitamīna sintēze ir ievērojami mazāka, salīdzinot ar tā izmantošanu bifidobaktēriju šūnu dzīvības procesu nodrošināšanā. Ņemot vērā arī dažādo *B.lactis* skaitu raudzētajos piena paraugos ar un bez prebiotikām, šeit var skaidri iezīmēt tendenci: jo augstāks *B.lactis* skaits paraugos, jo zemāka B_{12} vitamīna koncentrācija tajos.

Dispersijas analīzes rezultāti parādīja, ka koncentrācijai ir būtiska ietekme uz B_{12} vitamīna saturu raudzētajā pienā ($p < 0,05$). Būtiskas atšķirības šeit pastāv starp kontroli un raudzētajiem piena paraugiem ar prebiotikām 4% un 5% koncentrācijā, tātad palielināta prebiotiku koncentrācija nomāc B_{12} vitamīna sintēzi raudzētajā pienā.

Kopumā pētījuma rezultāti parādīja, ka, pievienojot prebiotikas, raudzētajos piena paraugos ir iespējams panākt būtisku B_1 un B_2 vitamīna satura palielinājumu.

3.2. Aminokābju saturs sinbiotiskajā raudzētajā piena produktā

Pienskābes baktērijas spēj sintezēt arī aminoskābes, to nosaka pienskābes baktēriju proteolītiskās īpašības (Simova et al., 2006). Kā zināms, šīs īpašības mikroorganismiem ir noteiktas ģenētiski. Tajā pašā laikā ir jāatzīmē, ka bifidobaktērijām proteolītiskās īpašības ir ļoti vājas (Sgorbati et al., 1995). Tomēr literatūrā ir atrodamas zinātnisko pētījumu atziņas, kas norāda uz bifidobaktēriju spēju sintezēt ievērojamu daudzumu aminoskābju (Matteuzzi et al., 1978; Sgorbati et al, 1995; Ballongue, 2004). Līdz ar to promocijas darba ietvaros tika noteikts aminoskābju saturs raudzētajos piena produktos ar prebiotikām.

Neaizstājamo aminoskābju satura izmaiņas raudzētajos piena paraugos ar laktulozi parādītas 3. tabulā.

3. tabula / Table 3

**Neaizstājamo aminoskābju saturs raudzētajos piena paraugos ar laktulozi, $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ produkta /
The amount of essential amino acids in fermented milk samples with lactulose, $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ product**

Aminoskābes/ Amino acids	Piens/ Milk	Kontrolē/ Control	Pievienotās laktulozes koncentrācija/ Concentration of lactulose				
			1%	2%	3%	4%	5%
Treonīns/ Threonine	0.107	0.095	0.102	0.112	0.100	0.093	0.089
Valīns/ Valine	0.130	0.115	0.112	0.123	0.121	0.105	0.098
Metionīns/ Methionine	0.061	0.064	0.066	0.075	0.069	0.060	0.064

3. tabulas nobeigums / The end of table 3

Aminoskābes/ Amino acids	Piens/ Milk	Kontrole/ Control	Pievienotās laktulozes koncentrācija/ Concentration of lactulose				
			1%	2%	3%	4%	5%
Izoleicīns/ Isoleucin	0.095	0.087	0.099	0.108 <i>p<0.05</i>	0.096	0.095	0.087
Leicīns/ Leucine	0.254	0.232	0.255	0.271 <i>p<0.05</i>	0.251	0.249	0.235
Fenilalanīns/ Phenylalanine	0.115	0.114	0.109	0.093	0.104	0.107	0.101
Tirozīns/ Tyrosine	0.131	0.123	0.132	0.121	0.129	0.129	0.122
Lizīns/ Lysine	0.197	0.181	0.197	0.208 <i>p<0.05</i>	0.199	0.193	0.189
Kopā/ Total	1.090	1.011	1.072	1.111	1.069	1.031	0.985

Novērtējot neaizstājamo aminoskābju saturu raudzētajos piena paraugos ar laktulozi, redzams, ka pievienotā laktulozes koncentrācija ietekmē aminoskābju saturu. Šeit parādās līdzīga atziņa, kas minēta *Ballongue* (2004) pētījumā, ka ne tikai *Bifidobacterium bifidum* ievērojamā daudzumā spēj producēt valīnu un treonīnu, bet arī *Bifidobacterium lactis* prebiotiku klātbūtnē spēj sintezēt treonīnu, metionīnu, izoleicīnu, leicīnu, tirozīnu un lizīnu. Aminoskābju saturs raudzētajos piena paraugos ir atkarīgs no pievienotās laktulozes koncentrācijas. Kā parādīja pētījuma rezultāti (3. tabula), optimālā laktulozes koncentrācija, kurā ir noteikti augstākie neaizstājamo aminoskābju rādītāji, līdz ar to arī kopējā summa, ir 2%.

Dispersijas analīzes rezultāti parādīja, ka būtiskas atšķirības tika konstatētas izoleicīna, leicīna un lizīna saturā, kur iegūtās *p*-vērtības ir mazākas par 0,05.

Raudzētajiem piena paraugiem ar inulīnu, salīdzinot ar kontroli, neaizstājamo aminoskābju saturs bija līdzīgs vai būtiski mazāks (*p*<0,05).

Vērtējot neaizstājamo aminoskābju saturu summu paraugos ar un bez prebiotikām, jāuzsver, ka raudzētajā piena paraugā ar 2% laktulozes, tā bija augstāka (1,111 g·100 g⁻¹), salīdzinot ar pienu (1,090 g·100 g⁻¹) un kontroli (1,011 g·100 g⁻¹). Eksperimentu rezultāti sasaucas ar *Palframan* u.c. (2002) pētījumiem, konstatējot, ka augstākais bifidogēnais efekts laktulozei tiek sasniegts 2% koncentrācijā.

Lai izvērtētu *B.lactis* spēju sintezēt neaizstājamās aminoskābes noteiktā koncentrācijā, tās salīdzinātas ar citu literatūrā norādīto pienskābes baktēriju sintezēto aminoskābju saturu (4. tabula).

Neaizstājamo aminoskābju saturs raudzētajos piena paraugos, izmantojot dažādas pienskābes baktērijas, g·100 g⁻¹
The amount of essential amino acids in fermented milk samples using different lactic acid bacteria, g·100 g⁻¹ product

Aminoskābes/ Amino acids	<i>B.lactis</i> Bb-12	Simova et.al., 2006			
		<i>L.lactis</i> C15	<i>L.bulgaricus</i> HP1	<i>L.helveticus</i> MP12	<i>S.thermophilus</i> T15
Treonīns/ Threonine	0.095 <i>p<0.05</i>	0.005	0.035	0.011	0.002
Valīns/ Valine	0.115	0.096	0.138	0.092	0.061
Metionīns/ Methionine	0.064 <i>p<0.05</i>	0.006	0.040	0.048	0.028
Izoleicīns/ Isoleucine	0.087	0.003	0.254	0.144	0.003
Leicīns/ Leucine	0.232	0.037	0.266	0.297	0.033
Fenilalanīns/ Phenylalanine	0.114	0.092	0.142	0.294	0.124
Tirozīns/ Tyrosine	0.123 <i>p<0.05</i>	0.022	0.022	0.020	0.014
Lizīns/ Lysine	0.181 <i>p<0.05</i>	0.006	0.074	0.036	0.003
Kopā/ Total	1.011	0.267	0.971	0.942	0.268

Apškatot 4. tabulas datus, redzams, ka *B.lactis*, salīdzinot ar citām pienskābes baktērijām, ievērojami vairāk spēj producēt treonīnu, metionīnu, tirozīnu un lizīnu ($p<0.05$). Arī *Matteuzi* u.c. (1978) pētījumā norāda, ka *B.bifidum* spēj sintezēt treonīnu līdz pat 150 mg·l⁻¹. Tas novērojams arī neaizstājamo aminoskābju summā, konstatējot, ka *B.lactis* pārspēj sintezēto neaizstājamo aminoskābju satura ziņā tādus pienskābes baktēriju celmus kā *L.helveticus* MP12, *L.lactis* C15 un *S.thermophilus* T15.

Vērtējot aizstājamo aminoskābju saturu raudzētajos piena paraugos ar atšķirīgu laktulozes koncentrāciju, tika konstatēta līdzīga tendence kā neaizstājamām aminoskābēm, proti, pievienotās laktulozes koncentrācijas pozitīvi ietekmē aizstājamo aminoskābju saturu. Pēc aizstājamo aminoskābju summas konstatēts, ka augstākais saturs tiek panākts paraugam ar 2% laktulozes. Tomēr dispersijas analīzes rezultāti parādīja, ka starp kontroli un raudzētajiem piena paraugiem ar laktulozi aizstājamo aminoskābju satura ziņā būtisku atšķirību nepastāv. Raudzētajiem piena paraugam ar inulīnu, salīdzinot ar kontroli, aizstājamo aminoskābju saturs bija līdzīgs vai būtiski mazāks arginīna satura ziņā ($p<0,05$).

Apkopojot iegūtos rezultātus par aminoskābju saturu raudzētajos piena paraugos ar prebiotikām, izriet, ka bifidobaktēriju proteolītiskās īpašības ir

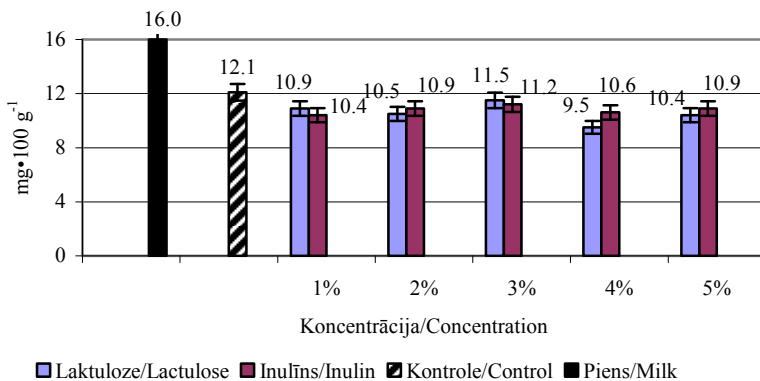
iespējams veicināt, pievienojot laktulozi. Savukārt inulīna klātbūtne būtiski neietekmēja ne aizstājamo, ne neaizstājamo aminoskābju saturu raudzētajos piena paraugos, izņemot leicīnu, fenilalanīnu, lizīnu un arginīnu, kur tika konstatētas būtiskas atšķirības. Augstākais šo aminoskābju saturs tika iegūts kontrolei. Salīdzinot *B.lactis* proteolītiskās īpašības ar citām pienskābes baktērijām, noskaidrojās, ka *B.lactis* ievērojamos daudzumos spēj producēt treonīnu, metionīnu, tirozīnu, lizīnu un asparagīnskābi, kas tikai bagātina gatavojamā produkta uzturvērtību.

4. *B.lactis* ietekme uz holesterīna saturu sinbiotiskajā raudzētajā piena produktā

Zinātniskajos pētījumos ir atrodamas atziņas, ka raudzētu piena produktu lietošana uzturā būtiski samaza holesterīna līmeni asinīs (Mann, Spoerry, 1974; Gomes et al., 1999). *Manning, Gibson (2004)* pētījumos norāda uz pienskābes baktēriju spēju samazināt kopējo un LDL holesterīna līmeni asinīs, taču pats mehānisms, kā tas notiek, šobrīd vēl nav īsti skaidrs. Kā zināms, pienā holesterīns ir tauku lodīšu membrānu sastāvā un tas ir līdz 95% no kopējā sterīnu satura pienā (Jensen, Clark, 1988). Holesterīna saturs pienā svārstās no 0,09 g·l⁻¹ līdz 0,22 g·l⁻¹, vidēji 0,16 g·l⁻¹ (Piironen et al., 2002; Paura et al., 2003), un to ir iespējams samazināt, izmantojot pienskābes baktērijas. Tomēr pienskābes baktēriju iedarbība nav konstanta, ir iespējams gan būtisks holesterīna samazinājums, gan arī nemainīgs holesterīna saturs, tas ir atkarīgs galvenokārt no baktēriju sugas (Obermann, Libudzisz, 1998). To arī apstiprina *Pereira un Gibson (2000)* pētījuma atziņas, ka atkarībā no pienskābes baktērijas sugas, holesterīna satura samazinājums selektīvajā barotnē ir iespējams no 0,4% līdz 47%. *Ziarno u.c. (2007)* norāda, ka *Lactobacillus acidophilus* un *Bifidobacterium spp.* raudzētajā pienā spēj asimilēt holesterīnu no 18% līdz 38%. Līdz ar to darba ietvaros tika pētīta prebiotiku ietekme uz holesterīna saturu raudzētajā pienā.

Holesterīna saturs pienā un raudzētajos piena paraugos ar prebiotikām parādīts 16. attēlā.

Pētījuma rezultāti parādīja, ka, raudzējot pienu ar *B.lactis*, iespējams panākt ievērojamu holesterīna satura samazinājumu. Iegūtie rezultāti apstiprināja literatūrā minēto apgalvojumu par pienskābes baktēriju, tajā skaitā bifidobaktēriju, spēju samazināt holesterīna saturu pienā (Daly et al., 1998). Tāpēc var apgalvot, ka *B.lactis* spēj ietekmēt holesterīna saturu raudzētajā pienā. Vērtējot prebiotiku ietekmi uz holesterīna satura izmaiņām raudzētajos piena paraugos (16. attēls), redzams, ka tas ir atkarīgs no izmantotās prebiotikas veida un koncentrācijas.



16. att. Holesterolīna saturs pienā, kontrolē, raudzētajos piena paraugos ar atšķirīgu laktulozes un inulīna koncentrāciju

Fig. 16. The level of cholesterol in milk, in control and in fermented milk samples with different concentrations of lactulose and inulin

Zemākie holesterīna satura rādītāji tika iegūti raudzētajiem piena paraugiem ar 4% ($9,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) un 5% ($10,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) laktulozes, savukārt raudzētajiem piena paraugiem ar inulīnu zemākie holesterīna rādītāji bija vērojami koncentrācijā 1% ($10,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) un 4% ($10,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Šeit ir meklējamas paralēles ar literatūrā aprakstīto, *Delzenne* u.c. (1999) norāda uz inulīna spēju nomākt triglicerīdu sintēzi, tādējādi samazinot holesterīna saturu asinīs.

Dispersijas analīzes rezultāti parādīja, ka prebiotikas veidam nav būtiskas ietekmes ($p > 0,05$) uz holesterīna saturu pienā. Savukārt prebiotiku koncentrācija būtiski ietekmē holesterīna saturu raudzētajā pienā. Būtiskās atšķirības tika konstatētas starp kontroli un raudzēto piena paraugu ar 4% laktulozes ($p < 0,05$).

No pētījuma rezultātiem izriet, ka, raudzējot pienu, var panākt ievērojamu holesterīna satura samazinājumu, attiecīgi, no $16,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ uz $12,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Šo pozitīvo tendenci var veicināt, izmantojot prebiotikas un samazinot holesterīna saturu raudzētajā pienā līdz pat $9,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Te ir meklējamas paralēles ar *Roberfroid* (1993) pētījuma atziņām, ka, pievienojot jogurtam 2,5% fruktooligosaharīdus, ir iespējams veicināt holesterīna samazinājumu asinīs. Līdzīgas tendences tika iegūtas pētījumā, kur holesterīna saturs raudzētajos piena paraugos, būtiski samazinājās, pievienojot laktulozi un inulīnu. Kopumā iegūtie pētījuma rezultāti apstiprināja literatūrā minētās atziņas par *B.lactis* spēju piena raudzēšanas laikā asimilēt holesterīnu.

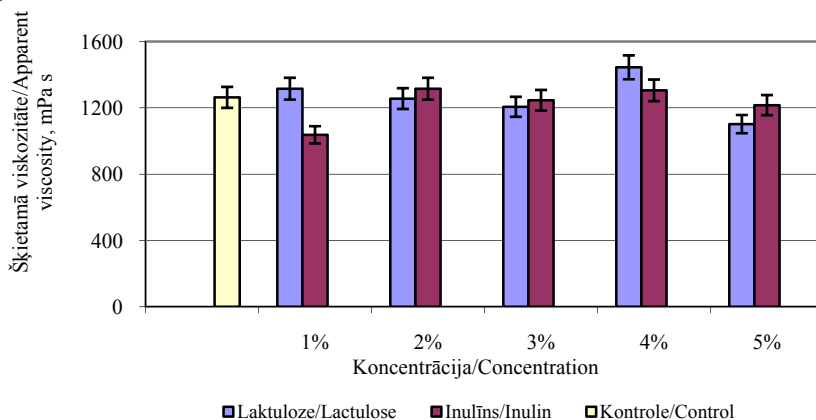
5. Sinbiotiskā raudzētā piena produkta kvalitātes rādītāji

Izstrādājot jaunus pārtikas produktus, liela, bieži vien pat izšķiroša, nozīme ir to sensorajām īpašībām. Tāpēc raudzētajiem piena paraugiem ar prebiotikām un kontrolei tika veikts sensorais novērtējums un noteikti struktūrmehāniskie rādītāji.

Iegūtie rezultāti parādīja, ka, pievienojot prebiotikas, ir iespējams ne tikai celt produkta uzturvērtību, bet arī paaugstināt produkta patikšanas pakāpi, „garšas+smaržas” un konsistences intensitāti, kas ir svarīgs nosacījums patērētājam. Palielinot pievienotās prebiotikas daudzumu, ir vērojama tendence, ka pieaug produkta patikšanas pakāpe, „garšas+smaržas” un arī konsistences intensitāte. Tomēr augstāki rādītāji tika iegūti raudzētajiem piena paraugiem ar laktulozi. Tas sasaucas ar literatūrā minēto, ka, pievienojot jogurtam laktulozes sīrupu, tika panākts augstāks sensorais novērtējums nekā jogurtam bez laktulozes (Kulikauskiene, 2004).

Ņemot vērā, ka pievienotā prebiotiku koncentrācija ietekmē produkta konsistenci, tika arī vērtēta produkta viskozitāte, tās izmaiņas atšķirīgu prebiotiku un to koncentrācijas ietekmē.

Raudzētajiem piena paraugiem ar prebiotikām un kontrolei šķietamā viskozitāte parādīta 17. attēlā.



17. att. Šķietamā viskozitāte raudzētajiem piena paraugiem atkarībā no pievienotās laktulozes un inulīna koncentrācijas, $\gamma=7,01 \text{ s}^{-1}$

Fig. 17. The apparent viscosity of fermented milk samples with different added lactulose and inulin concentrations, $\gamma=7,01 \text{ s}^{-1}$

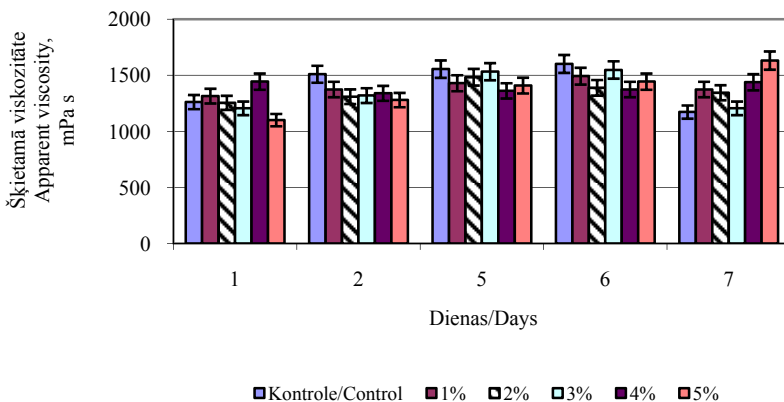
Iegūtie rezultāti parādīja, ka šķietamās viskozitātes vērtība ir mazāka raudzētajiem piena paraugiem ar prebiotikām un kontrolei, salīdzinot ar citiem literatūrā norādītajiem raudzētajiem piena produktiem (Domaga et al., 2004). Šo neatbilstību literatūras datiem varētu skaidrot ar to, ka pētījumā kā ierasts

tika izmantots *B.lactis*, savukārt literatūrā vērtēto produktu ieraugā homofermentatīvās pienskābes baktērijas, kas, nodrošinot intensīvu laktozes hidrolīzi un kazeīna koagulāciju, rada augstāku viskozitāti galaproduktam.

Izmantojot dispersijas analīzi, tika konstatēts, ka šķietamās viskozitātes vērtībā nav būtisku atšķirību ($p>0,05$) starp raudzētajiem piena paraugiem ar laktulozi un inulīnu, to koncentrācijām, arī starp kontroli.

Penna u.c. (2006) pētījumā norāda, ka produkta viskozitāte ir atkarīga no sausnas saturā: pieaugot sausnas saturam, palielinās arī viskozitāte. Pētījumā raudzētajiem piena paraugiem ar laktulozi tika novērota pretēja tendence, palielinot laktulozes koncentrāciju līdz 5%, šķietamā viskozitāte samazinājās no 1444 mPa s (4% laktulozes) līdz 1101 mPa s. Augsts dažādu ogļhidrātu īpatsvars produktā liek pienskābes baktērijām izvēlēties vieglāk hidrolizējamus savienojumus, bez tam ogļhidrātu fermentācijas ceļā veidojas atšķirīgs organisko vielu saturs, kas ietekmē kazeīna koagulāciju, izoelektriskā punkta lielumu, u.c. Piena raudzēšanas procesu un blīvumu ietekmē arī produkta sastāvs. Palielinot cukura saturu, raudzēšanas process paildzinās, un iegūstam produktu ar šķidrāku konsistenci. Šī atziņa ir jāattiecina arī uz laktulozi un inulīnu.

Raudzētajiem piena paraugiem ar prebiotikām tika pētītas arī šķietamās viskozitātes izmaiņas uzglabāšanas laikā, veicot mērījumus 1., 2., 5., 6. un 7. uzglabāšanas dienā. Iegūtie rezultāti atspoguļoti 18. un 19. attēlā.



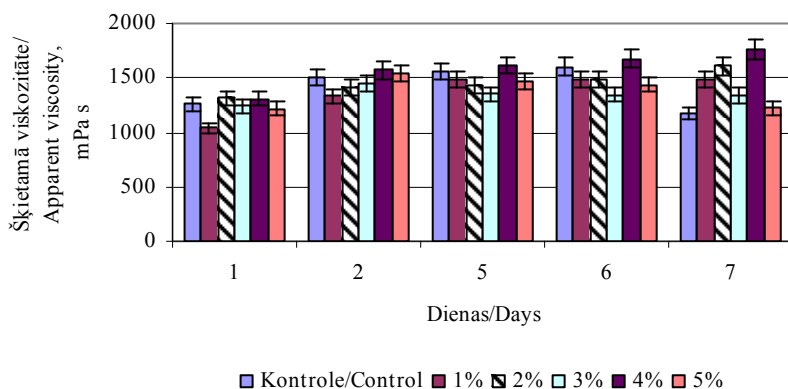
18. att. Uzglabāšanas laikā novērotās šķietamās viskozitātes izmaiņas raudzētajiem piena paraugiem ar laktulozi, $\gamma=7,01 \text{ s}^{-1}$

Fig. 18. The changes of apparent viscosity of milk samples fermented with lactulose during shelf life, $\gamma=7,01 \text{ s}^{-1}$

Iegūtie rezultāti parādīja, ka pievienotā laktulozes koncentrācija ietekmē produkta šķietamo viskozitāti uzglabāšanas laikā. Raudzētajiem piena

paraugiem ar laktulozi bija vērojams šķietamās viskozitātes samazinājums 5. vai 6. uzglabāšanas dienā, izņemot paraugu ar 5% laktulozes. Pētījuma dati bija pretrunā ar literatūrā minēto, kur *Kulikauskiene* (2004) norāda, ka laktulozes sīrups, pievienots 2,5% koncentrācijā, būtiski neietekmē jogurta šķietamo viskozitāti uzglabāšanas laikā. Atšķirības starp pētījuma rezultātiem un literatūrā minēto var skaidrot ar dažādu ieraugu lietošanu, jo pētījumā tika izmantota monokultūra – *B.lactis*, savukārt *Kulikauskiene* (2004) izmantoja multikultūru – jogurta ieraugu.

Dispersijas analīzes rezultāti parādīja, ka uzglabāšanas laikam ir būtiska ietekme (p -vērtība=0,04<0,05), savukārt pievienotai laktulozes koncentrācijai nav būtiskas ietekmes uz raudzēto piena paraugu šķietamo viskozitāti (p >0,05).



19. att. Uzglabāšanas laikā novērotās šķietamās viskozitātes izmaiņas raudzētajiem piena paraugiem ar inulīnu, $\gamma=7,01 \text{ s}^{-1}$

Fig. 19. The changes of apparent viscosity of milk samples fermented with inulin during shelf life, $\gamma=7,01 \text{ s}^{-1}$

Inulīns dažādā koncentrācijā ietekmē raudzēto piena paraugu šķietamo viskozitāti uzglabāšanas laikā (19. attēls). Raudzētajiem piena paraugiem ar 1%, 2% un 4% inulīna uzglabāšanas laikā bija vērojams šķietamās viskozitātes pieaugums. Augstākā šķietamā viskozitāte tika konstatēta paraugam ar 4% inulīna. Tas sasaucas ar literatūrā minēto, ka, palielinot inulīna koncentrāciju jogurtā līdz 4%, pieaug arī tā viskozitāte (Kip, 2006). Bez tam šeit ir meklējamas paralēles ar pētījuma rezultātiem par inulīna bifidogēno efektu, kas šajā pētījumā tika konstatēts 4% koncentrācijā.

Dispersijas analīze parādīja, ka gan prebiotikas koncentrācijai ($p=0,04<0,05$), gan arī uzglabāšanas laikam ($p=0,003<0,05$) ir būtiska ietekme uz produkta šķietamo viskozitāti. Zemākā šķietamā viskozitāte raudzētajiem piena paraugiem ar inulīnu tika noteikta 1. un 7. uzglabāšanas dienā. Savukārt

koncentrācijas ziņā būtiski atšķirās raudzētais piena paraugs ar 4% inulīna, tam uzglabāšanas laikā konstatēja augstāko šķietamo viskozitāti.

Pētījuma rezultāti parādīja, ka raudzētie piena paraugi ar prebiotikām ir pieskaitāmi pie pseidoplastiskiem bīdes spēka sašķidrīnāmiem šķidrūmiem, kur novirze no Ņūtona šķidrūmiem ir atkarīga no pievienotās prebiotikas koncentrācijas.

SECINĀJUMI

1. Laktuloze un inulīns dažādā koncentrācijā spēj būtiski ietekmēt *Bifidobacterium lactis* koloniju veidojošo vienību skaita pieaugumu (no 10^3 līdz 10^9 KVV·ml⁻¹) piena raudzēšanas laikā un nodrošināt to dzīvotspēju sinbiotiskajā raudzētajā piena produktā uzglabāšanas laikā.
2. *Bifidobacterium lactis* koloniju veidojošo vienību skaits paraugos raudzēšanas, nogatavināšanas un uzglabāšanas termiņa beigās ir būtiski augstāks ($p < 0,05$) par noteikto terapeitisko minimumu bifidobaktērijām – 10^6 KVV·g⁻¹.
3. *Bifidobacterium lactis* spēj asimilēt līdz pat 66% laktulozes, salīdzinot ar ievērojami zemāku laktozes (līdz 37%) un inulīna (līdz 20%) asimilācijas pakāpi. Laktuloze ir uzskatāma par piemērotāko barības vielu *Bifidobacterium lactis* vairošanai un dzīvotspējas nodrošināšanai produktā.
4. Pētījumā noskaidrots, ka vienas bifidobaktēriju sugas īpatnības nevar attiecināt uz visu ģinti.
5. Dažādā koncentrācijā pievienotās prebiotikas būtiski ietekmē piena raudzēšanas laikā sintezēto B₁ un B₂ vitamīna saturu ($p < 0,05$), savukārt tām nebija būtiskas ietekmes uz B₆ un B₁₂ vitamīna saturu ($p > 0,05$).
6. Piena raudzēšanas laikā *Bifidobacterium lactis* producē ievērojamu treonīna, metionīna, tirozīna, lizīna un asparagīnskābes koncentrāciju ($p < 0,05$). Sintezēto neaizstājamo aminoskābju saturs būtiski atšķiras sinbiotiskajos raudzētā piena paraugos ar laktulozi.
7. *Bifidobacterium lactis* vairojoties pienā noteiktas laktulozes un inulīna koncentrācijas klātbūtnē spēj asimilēt līdz pat 25–40% pienā esošo holesterīnu.
8. Dažādu laktulozes koncentrāciju pievienošana būtiski palielina raudzēto piena paraugu patikšanas pakāpi produktu sensorajā vērtēšanā.
9. Pētījumā noskaidrots, ka prebiotikas un to koncentrācijas ietekmē paraugu sensorās īpašības un šķietamo viskozitāti.
10. Optimālā laktulozes koncentrācija, izvērtējot raudzēto piena paraugu uzturvērtību un tehnoloģiskās īpašības, ir 2%, inulīnam – 4%, ko apstiprina *Bifidobacterium lactis* koloniju veidojošo vienību skaits, B₁ un B₂ vitamīnu un neaizstājamo aminoskābju koncentrācijas raudzētajos piena paraugos.

TOPICALITY OF RESEARCH

Due to the increasing haste and stress in our lives, people do not have time enough to enjoy their meals in full value and in a quiet atmosphere as well as to go in for physical activities. The increasing risk of such rapidly progressing illnesses as cardiovascular diseases, *Diabetes mellitus*, cancer, osteoporosis etc. is not significant only in Latvia but also throughout the world. In order to prevent the risk of illness and facilitate improvement of people's general health condition, a new group of foodstuffs, namely, functional food, has entered the market. The beginning of it can be found in the early 20th century when I. Mechnikoff, a Russian scientist, Nobel Prize winner, advanced a hypothesis that it is possible to prolong human's life by consuming fermented dairy products. Since that time numerous investigations have been carried out in the field of functional food paying a special attention to probiotic dairy products which make the largest part of the functional food. These products contain live lactic acid bacteria (or bacteria of other origin) in optimum amounts that favorably influences microflora of the digestive system in man and in animals. To be able to proliferate, probiotics need prebiotics which stimulate their growth. The symbiosis of probiotics and prebiotics might be one of the possibilities how to improve the consumer's general health condition and prevent the risk in getting the above mentioned diseases.

Moreover, it should be pointed out that in accordance to the Regulation No. 964 (Oct.23, 2004) of the Cabinet of Ministers of the Republic of Latvia "Regulations on the foodstuffs labeling" paragraph 10 wording "in the information presented on the foodstuff labeling as well as labeling methods, it is not allowed to attribute to the foodstuff such properties or influence which this product does not possess, as well as to create a conception that this product has some specific features if these features have all these products of this particular type of foodstuff". The above mentioned expression of the legislative act demonstrates clearly that research achievements are necessary in developing new products, including functional products, and their advancement into the market. The new regulation of the European Parliament and Council No. 1924/2006 "Concerning references on foodstuff labels about the health claims" clearly declares that any statement about the food value and its preventive properties must be proved in the result of research. Consequently, when new functional products are developed you should consider both the product quality and technological processes, and investigations of biologically active ingredients and their content evaluation.

Although the Latvian food market is satiated and is being constantly supplemented with new foodstuffs, the choice of Latvian functional products, especially the synbiotic ones developed in the result of scientific research, is insufficient. In order to replenish their variety, it is necessary to facilitate

investigations on symbiosis of different probiotics and prebiotics by analyzing both the content of biologically active ingredients during the time of production and shelf life, as well as evaluating the viability of probiotic microorganisms during different stages of production and throughout the self life. No less important objective of the research work is investigation of technological properties, their effect on the sensory profile of the product. Actually, there are no such complex investigations in Latvia; the former ones have been focused mainly on the adaptation of classical fermented milk product technologies for producing various functional products, the chief aim has been to find out the viability of probiotics in the product.

The aim of the research was to work out a new milk product based on investigations of its nutritional value and technological properties.

The objectives of the research were the following:

1. to evaluate the effect of lactulose and inulin on the proliferation dynamics of *Bifidobacterium lactis* in milk;
2. to investigate the fermentation ability of lactose and the added prebiotics influenced by *Bifidobacterium lactis* during fermentation of milk samples;
3. to analyze the content of biologically active compounds produced during milk fermentation: vitamins B₁, B₂, B₆ and B₁₂, essential and non-essential amino acids;
4. to find out *Bifidobacterium lactis* assimilating abilities of cholesterol in milk;
5. to evaluate the quality parameters of synbiotic fermented milk.

The novelty of the research and scientific importance:

For the first time in Latvia:

1. *Bifidobacterium lactis* technological properties were analyzed to develop the new synbiotic fermented milk product;
2. the influence of lactulose and inulin concentration on *Bifidobacterium lactis* proliferation dynamics in milk was evaluated;
3. the concentration of biologically active compounds (vitamins B₁, B₂, B₆ and B₁₂, essential and non-essential amino acids) synthesized in milk during fermentation were established;
4. *Bifidobacterium lactis* assimilating abilities of cholesterol in milk were found out.

The theme of the research and its working out were connected with:

1. Grant of Latvian Council of Science No. 04.1051 (R43) “Investigation of prebiotic properties and their application for new functional food production”;
2. The state research Program of Agrobiotechnology “Innovative technologies of obtaining high value, safe and healthy food from physiologically and biochemical diverse plant and animal raw

material” project “Production technologies of new food products rich in functional components”.

The economic importance of the research

The research on development of synbiotic fermented milk product makes it possible to work out and introduce into production the new type of product, and stresses its positive properties based on the research results.

APPROBATION OF THE SCIENTIFIC WORK

The research results have been reported at nine international scientific conferences and congresses in Latvia, France, Malta, Greece Hungary, and Spain (see the list on pages 5 and 6).

The research results are collected and published in seven recognized refereed scientific publications in the Latvian and English language, out of them six scientific publications recognized by Latvian Council of Science (see pages 6 and 7).

MATERIALS AND METHODS

Time and place of the research

The experimental work was carried out during the period from October 2004 to October 2007. In 2007 the data were collected and statistically processed, and thesis was prepared.

The investigations were carried out at the following places:

- Laboratory of Food Analysis of the Food Technology Department, Latvia University of Agriculture (LUA);
- Laboratory of Microbiology of the Food Technology Department, LUA;
- Laboratory of Packaging Material Investigations of the Food Technology Department, LUA;
- Laboratory of Biochemistry of the Scientific Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine “Sigrā”, LUA;
- Laboratory of Animal Biochemistry and Physiology of the Institute of Biology, Latvia University (LU);
- Laboratory of Technical Microbiology and Food Biotechnology of the Institute of Microbiology and Biotechnology, LU;
- Laboratory of Microbiology and Biotechnology Department of the Faculty of Biology, LU;
- Laboratory of Food and Environmental Investigations of the National Diagnostic Center, Food and Veterinary Service.

Materials used in the research

Pasteurized milk with fat content 2.5%.

In compliance with the Regulations of the Cabinet of Ministers of the Republic of Latvia No. 521 (16 Sept. 2003) “Requirements of classification, quality and labeling for dairy products, complex dairy products and food of dairy products”, the drinking milk is characterized by the following criteria¹:

- milk contains no less than 2.9% proteins;
- milk density at temperature of 20 °C is no less than 1028 kg·m⁻³;
- non fat dry solid of milk is no less than 8.5 %.

In compliance with the regulation of the European Parliament and Council No. 2073/2005 “On microbiological criteria of foodstuffs”, pasteurized milk and other pasteurized milk products must meet the following criteria²: at the end of production process the permissible amount of *Enterobacteriaceae* in 1 ml of milk is from 1 to 5 cfu.

***Bifidobacterium lactis* (Bb-12)** a freeze-dried starter culture (Chr. Hansen, Denmark). Characterization of the applied starter culture is given in Table 1.

Prebiotics:

Lactulose solution is *Lactulosae* (Duphalac[®], Netherlands) with a golden shade and light sweetish taste. 100 ml of solution contain no less than 67% of lactulose, less than 10% of galactose and less than 6% of lactose. The energy value of 1 g lactulose solution is 2 kcal/8.37 kJ.

Inulin – RAFTILINE[®] HP (ORAFI Active Food Ingredients, Belgium) is a fine white granulated powder with a neutral taste without any typical after-taste, with inulin content no less than 99.5%. Glucose, fructose and saccharose content are no more than 0.5 %. Inulin polymerization degree is ≥ 5 ($\geq 99\%$). The dry matter content is $97 \pm 1.5\%$. The powder solubility in water at temperature of 25 °C is $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, at temperature of 90 °C it is $300 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, the energy value of 1 g inulin is 0.97 kcal/4.05 kJ.

The technology of preparation of control and fermented milk samples with prebiotics

In order to trace the dynamics of bifidobacteria proliferation, separate samples with different lactulose solutions (1%, 2%, 3%, 4% and 5%) and inulin concentrations (1%, 2%, 3%, 4% and 5%) as well as control samples without prebiotics were prepared. Taking into consideration the remarkable lactulose content in the solution $\geq 67\%$, further in the text the following terms are used 1%, 2%, 3%, 4% and 5% of lactulose. The added inulin and lactulose amount in different samples is different. In order to compare the influence of various prebiotic concentrations on the studied parameters, the comparison was carried out by their absolute quantities. The technology of fermented milk samples is shown in Figure 1.

Products were made according to the technology of classical fermented milk drinks. The fermentation temperature and time were chosen in accordance with the recommendations of the producer (Chr. Hansen) of starter cultures. The starter culture suspension was added to milk, and each time 100 ml of the product was prepared. The added starter culture comprised 2% of the product. No less than $1 \cdot 10^6$ of *Bifidobacterium lactis* cfu was added to milk with a starter culture.

The analyzed indices and methods applied in the research

The analyzed indices, applied methods or standards and the number of analysed samples are given in Table 2.

The statistic analyses of data was carried out using SPSS and Microsoft Excel programs, dispersion analysis, Fisher's or F-test, t-test, Tukey's test and Herschel-Bulkley model.

RESULTS AND DISCUSSION

1. The evaluation of the effect of lactulose and inulin concentration on *B. lactis* proliferation dynamics in milk

It is reported in literature that bifidobacteria poorly grow in milk and sometimes do not multiply at all (Modler, 1994; Domaga, Juszczak, 2004), that is why prebiotics are used for their growth (Martinez-Villaluenga et al., 2006). In the present research, lactulose and inulin were used as prebiotics for *B.lactis* growing.

The dynamics of *B.lactis* growth in milk depending on the concentration of lactulose and inulin are presented in Figures 2 and 4.

As it is shown in Figure 2, there is a rapid increase of *B.lactis* cfu during the first two fermentation hours, especially in control. It could be explained by the optimum growing conditions and suitable pH (Figure 3).

Starting with the second hour of fermentation, pH has decreased more rapidly in control samples in comparison with that in milk samples with lactulose. That explains the decrease of *B.lactis* in control samples during further fermentation (Figure 2). The presence of lactulose ensures a gradual pH decrease, consequently a slight but systematic *B.lactis* increase is observed throughout the milk fermentation period. That indicates to mutual relations between the speed of bifidobacteria growth and the increase of acidity intensity. The pronounced growing abilities of *B.lactis* in milk might be explained as follows: initially *B.lactis* is isolated of animal faeces and adapted in milk (Klein et al., 1998). It possesses a relative oxygen and acid tolerance which is not observed in some bifidobacteria species.

The highest number of *B.lactis* in fermented milk samples was established at the end of fermentation with 2% ($6 \cdot 10^8$ cfu·ml⁻¹) and 5% of lactulose

($8 \cdot 10^8$ cfu·ml⁻¹). The obtained results correspond to Palframan's et al. (2002) investigations that the highest bifidogenic effect is reached by adding it 2%. Martinez-Villaluenga et al. (2006) have pointed out that *B.lactis* growing can be equally well promoted by adding 0.5%, 1% and 2% of lactulose.

B.lactis growing abilities in milk by adding inulin in different concentrations is given in Figure 4.

Evaluating the dynamics of *B.lactis* growth in milk samples with inulin, trends similar to those with lactulose can be observed. There is also a rapid increase of *B.lactis* cfu in milk during the first two hours of fermentation, with the exception of the sample with 3% of inulin, where a remarkable increase was established until the sixth hour of fermentation. Here is a positive correlation between the growth of bifidobacteria and pH. pH in the fermented milk sample with 3% of inulin is close to optimum for the growth of bifidobacteria until the sixth hour of fermentation (Figure 5).

The obtained results show evidence that the presence of inulin ensures the gradual pH decrease, consequently throughout the fermentation period the increase of *B.lactis* is facilitated in samples with 1%, 2% and 4% of inulin. At the end of fermentation the highest *B.lactis* cfu was established in milk sample with 4 % of inulin ($2 \cdot 10^9$ cfu·ml⁻¹). An analogy can be found with Shin's et al (2000) studies, where it is reported that fructo-oligosaccharides are the most effective prebiotics among the investigated sources of carbohydrates, and it is stressed there that the effectiveness of fructo-oligosaccharides increases by increasing their concentration (maximum up to 5%). Palframan et al. (2002), in their turn, have indicated that the highest bifidogenic effect of fructo-oligosaccharides can be reached in the concentration of 1%. These different conclusions could be explained by the different stages of polymerization of fructo-oligosaccharides and bifidobacteria species used in the research. Consequently, the conclusion can be drawn that peculiarities of one species cannot be attributed to the entire genus. That was confirmed by Bielecka et al. (2002) research achievement that only 18 species out of 30 investigated ones (mainly *B.longum* and *B. animalis*) are able to assimilate fructo-oligosaccharides.

The obtained results have shown that the added concentration of prebiotics influences significantly the amount of *B.lactis* in the samples, therefore it can be concluded that it is possible to facilitate *B.lactis* growth by adding lactulose and inulin. The most optimum lactulose concentrations are 2% and 5%, and those of inulin – 4%. The sample with 4 % of inulin significantly differed from all other samples showing that the type of prebiotic also can affect *B.lactis* amount in fermented milk. That confirms the conclusions expressed in studies that for the growth of bifidobacteria especially good are fructo-oligosaccharides (Simmering, Blaut, 2001).

Together with the stimulation of the growth of bifidobacteria in milk, no less important factor is the provision of viability of bifidobacteria in the product

during its shelf life. Özer et al. (2005) have reported that one of the opportunities how to facilitate *B.bifidum* BB-02 and *L.acidophilus* LA-5 viability (about 10^7 cfu·g⁻¹) during the storage of yoghurt is adding prebiotics. Consequently, the amount of *B.lactis* in fermented milk samples with prebiotics was established on day 1 and 7 of storage. The obtained results are given in Figures 6 and 7.

Maturation of the product follows the fermentation during the period from 0 to 1st day, which is presented in Figure 6. During the time of maturation there is a rapid decrease of the number of *B.lactis* in the samples. That may be explained both by the presence of oxygen when the product is mixed, and the changes of temperature, when the product is cooled, as well as the further increase of acidity as a result of biochemical reactions during the maturation. It is known from literature and practice that during the time of storage of fermented milk drinks the pH continues to decrease reaching even 4.4 (Alkalin et al., 2004), but in the analyzed fermented milk samples, in turn, pH did not fall lower than 4.6. This difference could be explained by the single starter culture used in the present research, whereas in the literature described starter culture of the product contained not only bifidobacteria but also *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. In the control samples and in fermented milk samples with 1% and 2% of lactulose, the pH changes were insignificant which explains the unchanged amount of *B.lactis* during the shelf life of the samples (Figure 6). In turn, fermented milk samples with 3% of lactulose and more, the amount of *B.lactis* decrease was observed from 0.5 to 1 lg value. The results of this research relate to those mentioned in literature that the most optimum bifidogenic effect of lactulose is reached just in small concentrations which also ensures a stable amount of *B.lactis* during the shelf life of the samples.

The changes of the amount of *B.lactis* in fermented milk samples with inulin during maturation and shelf life of the product are reflected in Figure 7.

Similar tendencies were observed in both the fermented milk samples with inulin and with lactulose where there were pronounced decreases of *B.lactis* during the maturation. In turn, during the shelf life, the presence of inulin in fermented milk samples ensured an unchangeable *B.lactis* amount that is very good for producing a synbiotic fermented dairy product. Alkalin et al. (2004) have indicated that the amount of bifidobacteria of great viability is higher in the presence of fructo-oligosaccharides. This conclusion makes it possible explain the research results when the highest and most unchangeable *B.lactis* concentration ($8.3 \lg \text{ cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$) was established in fermented milk samples with 2%, 4% and 5% of inulin.

The obtained results of the present research have confirmed the conclusions reported in literature on the bifidogenic effect of lactulose and inulin. By adding lactulose and inulin, both the growth of *B.lactis* is facilitated during the fermentation period and *B.lactis* viability in fermented milk samples during

their shelf life. The amount of *B.lactis* in the samples after fermentation, maturation as well as at the end of the term in the product was $10^8 - 10^9$ cfu·ml⁻¹, which was significantly higher than the prescribed therapeutic minimum for bifidobacteria – 10^6 cfu·g⁻¹. As the optimum lactulose concentration for *B.lactis* reproduction during fermentation time of milk and for provision of its viability during shelf life of the sample is considered 2%, and that for inulin is 4%.

2. The changes of lactose and prebiotics content during milk fermentation

Martinez-Villaluenga et al. (2006) have indicated that *B.lactis* is characterized by a pronounced ability to ferment lactulose in concentrations from 0.5% to 2%, Özer et al. (2005), in turn, have stressed that lactulose, if compared with inulin, assimilate *Bifidobacterium bifidum* BB-02 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 more effectively. Taking into consideration these authors' conclusions and many contradictory data in literature, the content of lactose, lactulose and inulin in milk was determined before and after fermentation.

The content of lactose in milk before and after fermentation with added prebiotics is shown in Figures 8 and 9.

The obtained results confirm the conclusions mentioned in literature that bifidobacteria poorly assimilate lactose (Modler, 1994). As it is seen in Figure 8, during the fermentation period bifidobacteria have been able to utilize $0.42 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ of lactose in control sample. In the milk samples with lactulose, in turn, the changes of lactose content depend on the added lactulose concentration, i.e. by increasing the added lactulose concentration, lactose assimilation decreases during the milk fermentation process. It is reported in literature that lactose assimilation depends on the added bifidobacteria species, and with the higher assimilation ability are *B.bifidum*, *B.breve* and *B.infantis* (Lamoureux et al., 2002). It is possible to facilitate the process by adding prebiotics. In order to evaluate the effect of lactulose concentration on lactose assimilation in the samples, a dispersion analysis was applied. The obtained results show that different lactulose concentrations do not have the significant effect on the ability of bifidobacteria to assimilate lactose ($p > 0.05$) during fermentation. Evaluating the decrease of lactose content in the analyzed samples and control, and comparing the initial lactose content in milk, it should be considered as significant ($p < 0.05$). That could be explained by *B.lactis* properties. This bifidobacteria species is adapted in milk (Klein et al., 1998), consequently *B.lactis* is able to grow in milk and use lactose as a nutrient for the cell energy metabolism.

Similar to fermented milk samples with lactulose, the lactose assimilation decreases together with the increase of inulin concentration (up to 4%) in milk (Figure 9).

In the sample with 5% of inulin, lactose assimilation a little increases, however, there are not established significant differences between the fermented milk samples with 2 %, 3 % and 4% of inulin and with control samples ($p>0.05$).

The lactose content in milk samples with inulin and control before and after fermentation (Figure 9) was established as significant ($p<0.05$). However, it should be remarked that lactose assimilation depends on the type and concentration of the added prebiotics. In literature can find indications about the ability of bifidobacteria to assimilate lactulose (Özer et al., 2005) and derivatives of raffinose (Martinez-Villaluenga et al., 2006). When evaluating results, it should be taken into consideration that *B.lactis* is adapted in milk; consequently the speed of its multiplication in milk is higher than the other bifidobacteria species. That does explain the decrease of lactose content in fermented milk samples.

The research also analyzes the lactulose and inulin content before and after milk fermentation in order to be able to find out regularities among lactose, lactulose or inulin assimilation in milk under the influence of *B.lactis*. The content of lactulose in milk before and after fermentation is reflected in Figure 10.

The obtained results show that bifidobacteria are able to ferment up to 50% of lactulose in the product, except milk sample with 5% of lactulose where there was a decrease of lactulose by 2/3. It should be remarked that in the 5% concentration of lactulose there was established also the highest *B.lactis* amount in samples at the end of fermentation ($1 \cdot 10^9$ cfu·ml⁻¹). When the lactulose concentration increases, the lactulose assimilation also increases in milk and resulting in the increase of *B.lactis* in samples that indicates to a mutual interaction. The obtained results confirm conclusions mentioned in literature about the bifidogenic effect of lactulose (Palframan et al., 2002; Bouhnik et al., 2004) and bifidobacteria ability to assimilate lactulose (Saarela et al., 2005).

The changes of lactulose content are significant ($p<0.05$). Consequently, a conclusion can be drawn that *B.lactis* possesses ability to assimilate lactulose. That relates to conclusions found in literature that bifidobacteria better multiply in the presence of lactulose (Rycroft et al., 2001). Kontula et al. (1999), in turn, indicated that several microorganisms of the large intestine, including also bifidobacteria, are able to utilize lactulose and lactitol.

When comparing the changes of lactose and lactulose content in the fermented milk samples, it is apparent that *B.lactis* is able better to assimilate lactulose (the content of assimilated lactulose increases from 47% to 66%) in comparison with lactose (the content of assimilated lactose is from 9% to 31%). Evaluating the obtained data, it could be concluded that *B.lactis* in combination with lactulose is suitable for the development of a synbiotic dairy product.

The content of inulin in milk before and after fermentation is given in Figure 11. The obtained results confirm that bifidobacteria poorly assimilate inulin (10–20%). It is reported in literature that *B.lactis* can not assimilate inulin (Semjonovs et al., 2004). Biedrzycka and Bielecka (2003) have indicated that the ability of bifidobacteria to assimilate inulin is depend on the polymerization degree and the degree of purity. The inulin assimilation decreases together with the increase of inulin polymerization degree and the degree of purity.

That does explain the results of inulin assimilation degree in fermented milk samples.

The obtained results confirm that lactulose and inulin are able to stimulate the multiplication of *B.lactis* in milk but most suitable substrate for growing of bifidobacteria in milk is lactulose.

3. The evaluation of the content of biologically active compounds in the synbiotic fermented milk product

3.1. The content of B group vitamins in the synbiotic fermented milk product

During the fermentation process bifidobacteria are able to synthesize water soluble vitamins, however, the each species of *Bifidobacterium* genus these abilities are different. Consequently, *Bifidobacterium lactis* ability to synthesize vitamins B₁, B₂, B₆ and B₁₂, as well as how the content of synthesized vitamins was influenced by the type and concentration of the added prebiotics were studied.

The content of vitamins B₁, B₂, B₆ and B₁₂ in fermented milk samples depending on the added lactose and inulin concentration and in control sample is presented in Figures 12, 13, 14 and 15.

The results of the research (Figure 12) show that the content of **vitamin B₁** significantly increases in fermented milk samples by adding lactulose ($p\text{-value}=0.0001<0.05$) and inulin ($p\text{-value}=0.0032<0.05$). There is not the significant influence of the prebiotic type on the content of vitamin B₁ in fermented milk ($p\text{-value}=0.48>0.05$). Comparing the obtained results (Figure13) with the content of vitamin B₁ in milk mentioned in literature (0.4 mg·kg⁻¹) (Горбарева, 1984; Chandan, 1997; Milk quality, 1999), it is seen that in control there is a radical decrease of the content of vitamin B₁ (0.21 mg·kg⁻¹). That could be explained by vitamins B₁, B₆, B₉, B₁₂ and PP that are necessary for the growth of bifidobacteria (Deguchi et al., 1985). The radical decrease of the content of vitamins, is possible to diminish or even prevent by adding prebiotics. Besides, the differences between milk and control may be explained by the influence of thermal treatment where the concentration of the studied vitamin decreases by 20% (Milk quality, 1999).

The obtained results show evidence that prebiotics facilitate production of vitamin B₁ and significantly increases its concentration in the final product.

Analyzing the content of **vitamin B₂** in the fermented milk samples with prebiotics (Figure 13), similar tendencies can be observed as it is with vitamin B₁.

The presence of lactulose ($p\text{-value}=0.069<0.05$) significantly increased the content of vitamin B₂ in fermented milk samples. The type of prebiotics has not the significant effect ($p\text{-value}=0.422>0.05$) on the content of vitamin B₂ in fermented milk samples.

Comparing the obtained results with the content of vitamin B₂ in milk which is indicated in literature (1.5-1.7 mg·kg⁻¹) (Горбарова, 1984; Chandan, 1997; Milk quality, 1999), it is apparent that with certain concentrations of prebiotics it is possible to increase the content of vitamin B₂ in fermented milk samples even up to two times. That relates to the studies reported in literature on the ability of bifidobacteria to synthesize water soluble vitamins, including vitamins of group B (Deguchi et al., 1985). This should be evaluated as a positive aspect if you take into consideration that during the thermal treatment the content of vitamin B₂ in milk decreases. It follows that in the presence of certain prebiotics, it is possible to regain or even significantly increase the content of vitamin B₂ in the sample.

The results of **vitamin B₆** in fermented milk samples with prebiotics (Figure 14) show that the higher indices are reached in milk samples with prebiotics in certain concentrations – for lactulose from 1% to 3% (0.51 to 0.60 mg·l⁻¹) and for inulin from 1% to 4% (0.49 to 0.58 mg·l⁻¹).

In the higher lactulose and inulin concentration (5%), the content of vitamin B₆ is 0.30 mg·l⁻¹ and 0.28 mg·l⁻¹, respectively. It is remarkably lower than that of control (0.42 mg·l⁻¹). As it is known, the content of dry matter ranges from 11% to 14% (Ozola, Ciproviča, 2002) in milk, but in fermented milk samples it ranges from 14% to 18% if prebiotics are added in concentrations up to 5% (Fluckiger, 1982). If the content of dry matter is significantly increased, the water activity in the product is changed and multiplication of microorganisms is inhibited, particularly Gram-positive ones. *B.lactis* abilities to produce vitamin B₆ decrease if 5% of lactulose or inulin is added. The content of vitamin B₆ decreases in these samples up to 0.28 and 0.30 mg·l⁻¹, respectively.

By applying t-test, it was established that neither presence of lactulose ($p\text{-value}=0.35>0.05$) nor inulin ($p\text{-value}=0.210.05$) influence significantly the content of vitamin B₆ in fermented milk samples. If the obtained results are compared (Figure 15) with the vitamin B₆ content in milk that in literature is reported from 0.4 to 0.6 mg·l⁻¹ (Горбарова, 1984; Chandan, 1997; Milk quality, 1999), it is apparent that it is possible to increase the content of vitamin B₆ in fermented milk by adding lactulose in concentrations to 3% and inulin to 4%. Despite the fact mentioned in literature that bifidobacteria needs vitamin B₆ to reproduce successfully (Deguchi et al., 1985; Ballongue, 2004), the results of the present investigation have shown that it is possible to increase the

vitamin B₆ content in fermented milk by adding prebiotics. The conclusion can be drawn that *B.lactis* possesses abilities to produce vitamin B₆ resulting in compensation or increase of vitamin B₆ that was used for *B.lactis* growing.

The content of vitamin B₁₂ in fermented milk samples with prebiotics is presented in Figure 15.

The obtained results (Figure 15) have shown that the content of vitamin B₁₂ in fermented milk samples with different concentrations of lactulose and inulin decreases, with the exception of the milk sample with 3% of lactulose. In higher prebiotic concentrations (4% to 5% lactulose and 3% to 5% inulin) the content of vitamin B₁₂ in fermented milk samples decreases up to 0.01 mg·l⁻¹. The decrease of vitamin B₁₂ may be explained similar to vitamin B₆ because bifidobacteria needs vitamins for growing and multiplication, including B₁₂ (Ballongue, 2004). It follows that during the milk fermentation period vitamin B₁₂ synthesis is essentially less in comparison with its usage for providing the life processes of bifidobacteria cells. Also, taking into consideration the different amount of *B.lactis* in fermented milk samples with and without prebiotics, the clear tendency can be marked – if the higher is the amount of *B.lactis* in milk samples the lower is vitamin B₁₂ concentration there.

The results of dispersion analysis have shown that the concentration has the significant effect on the vitamin B₁₂ content in fermented milk ($p < 0.05$). There are significant differences between control and fermented milk samples with prebiotics in concentrations of 4% to 5%; so the increased concentrations of prebiotics suppress the vitamin B₁₂ synthesis in fermented milk.

In all, the results of the research have shown that it is possible to reach a significant increase of vitamin B₂ content in fermented milk samples by adding prebiotics.

3.2. The content of amino acids in the synbiotic fermented milk product

Lactic acid bacteria can also synthesize amino acids; that is determined by the proteolytic character of lactic acid bacteria (Simova et al., 2006). As it is known, these qualities of microorganisms are genetically determined. At the same time it should be pointed out that proteolytic properties of bifidobacteria are very poor (Sgorbati et al., 1995). In literature, however, there are scientific research achievements indicating to the abilities of bifidobacteria to synthesize the considerable amount of amino acids (Matteuzi et al., 1995; Ballongue, 2004). That is why, within the framework of this research, the amino acid content was detected in fermented milk products with prebiotics. The changes of content of the essential amino acids in fermented milk samples with lactulose are shown in Table 3.

When evaluating the content of essential amino acids in fermented milk samples with lactulose, it is apparent that the added lactulose concentration affects the amino acid content in the product. The similar conclusion appears to

that is mentioned in research by Ballongue (2004) that not only *Bifidobacterium bifidum* is able to produce valine and threonine in a remarkable amount but also *Bifidobacterium bifidum* is able to synthesize threonine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, and lysine in the presence of prebiotics. The amino acid content in fermented milk samples depends on the concentration of the added lactulose. As the obtained research results have shown, the optimum lactulose concentration in which the highest indices and the total sum of essential amino acids were established was 2%.

The results of dispersion analysis have shown that there were significant differences of isoleucine, leucine and lysine, where the obtained *p-values* are less than 0.05.

In the fermented milk samples with inulin, the essential amino acid content was similar to or significantly less than in control sample regarding to the leucine, phenylalanine and lysine content ($p < 0.05$).

Evaluating the sum of the essential amino acid content in samples with and without prebiotics, it should be stressed that their content was higher in the milk sample with 2% of lactulose ($1.111 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) in comparison with milk ($1.090 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). The results of the experiments relate to Palframan et al. (2002) investigations that the best bifidogenic effect is reached in 2% concentration.

In order to evaluate the ability of *B.lactis* to synthesize the essential amino acids in certain concentrations, they have been compared with other amino acid amounts synthesized by different lactic acid bacteria strains that are reported in literature (Table 4).

Evaluating the data of Table 4, it is obvious that *B.lactis*, compared with other lactic acid bacteria, is able to produce more threonine, methionine, tyrosine and lysine ($p < 0.05$). Matteuzi et al. (1978) also have indicated in their research that *B.bifidum* is able to synthesize threonine up to $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. This is also observed in the sum of amino acids: *B.lactis* synthesizes a larger amount of essential amino acids than such strains of lactic acid bacteria as *L.helveticus* MP12, *L.lactis* C15 and *S.thermophilus* T15.

Evaluation of non-essential amino acid content in fermented milk samples with different concentrations of lactulose shows evidence of the tendency similar to that of essential amino acids. Namely, the added lactulose concentrations have the positive effect on the content of non-essential amino acids. As to the sum of non-essential acids, it is established that the highest amount is reached in the sample with 2% lactulose ($1.718 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). However, the results of dispersion analysis have shown that there are no significant differences between control and fermented milk samples with lactulose regarding to the amount of non-essential amino acids.

In fermented milk samples with inulin, the amount of non-essential amino acids was similar to or significantly smaller than in control sample concerning the agrinine content ($p < 0.05$)

Summarizing the obtained results of the content of amino acids in fermented milk samples with prebiotics suggest that it is possible to facilitate the proteolytic properties of bifidobacteria by adding lactulose. The presence of inulin, in its turn, did not influence significantly neither non-essential nor essential amino acid content in fermented milk samples, except leucine, phenylalanine, lysine and arginine, where significant differences were established. The higher concentration of these amino acids was obtained in control sample. *B.lactis* proteolytic properties were compared with other lactic acid bacteria, and it was found out that *B.lactis* was able to produce threonine, methionine, tyrosine and aspartic acid in large amounts that enriched the nutritional value of the product.

4. *B.lactis* influence on the cholesterol content in the synbiotic fermented milk product

In scientific investigations there are achievements that consumption of fermented dairy products significantly decreases the cholesterol level in blood serum (Mann, Spoerry, 1974; Gomes et al., 1999). Manning and Gibson (2004) have indicated the ability of lactic acid bacteria to decrease the total and LDL cholesterol level in blood. However, the mechanism how it happens is not quite clear yet. As it is known, cholesterol is included in the membrane of fat globules, and it makes up to 95% out of the total sterol content (Jensen, Clark, 1988). The cholesterol content in milk is within the range from $0.09 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ to $0.22 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, on average $0.16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Piironen et al., 2002; Paura et al., 2003). The cholesterol content in milk is possible to decrease by using lactic acid bacteria. However, the effect of lactic acid bacteria is not constant; there is possible both the significant decrease of cholesterol content and also unchangeable cholesterol content that depends mainly on the species of bacteria (Obermann, Libudzisz, 1998). Pereira and Gibson's research has confirmed that depending on the species of bacteria the decrease of the cholesterol content is possible from 0.4 % to 47% in the selective culture mediums. Ziarro et al. (2007) have indicated that *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in fermented milk are able to assimilate cholesterol from 18% to 38%. Consequently, within the framework of this research, the effect of prebiotics on the cholesterol content in fermented milk samples was studied. The content of cholesterol in milk and in fermented milk samples with prebiotics is shown in Figure 16.

The results of the research have shown that it is possible to achieve a considerable decrease of the cholesterol content if *B.lactis* is used for milk fermentation. The obtained results have confirmed the statement expressed in literature about the ability of lactic acid bacteria, including bifidobacteria, to decrease the cholesterol content in milk (Daly et al., 1998). Consequently, it may be maintained, that *B.lactis* is able to influence the cholesterol content in fermented milk. Evaluating the influence of prebiotics on the cholesterol

content in fermented milk samples (Figure 16) it is obvious that the influence depends on the type of the used prebiotics and their concentrations. A parallel may be drawn with that described in literature. Delzenne et al. (1999) have indicated to ability of inulin to suppress the synthesis of triglycerides, so decreasing the cholesterol level in blood.

The results of dispersion analysis have shown that the type of prebiotics has no significant influence ($p>0.05$) on the cholesterol content in milk. Prebiotic concentrations, in their turn, affect significantly the cholesterol content in fermented milk. Significant differences were established between control and fermented milk sample with 4 % lactulose ($p<0.05$). The obtained results lead to the conclusion that the considerable decrease of the cholesterol content may be reached by milk fermentation from $16.0 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ to $12.1 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, respectively. This positive tendency is possible to facilitate by using prebiotics and decreasing the cholesterol content in fermented milk to $9.5 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$. The parallel may be drawn with Roberfroid's (1993) conclusions that if 2.5% of fructo-oligosaccharides are added to yogurt then it is possible to facilitate the decrease of cholesterol in blood. Similar tendencies were obtained in the research where the cholesterol content in fermented milk samples was significantly decreased by adding lactulose, and confirmed achievements reported in literature about the *B.lactis* ability to assimilate cholesterol during the fermentation of milk.

5. The quality indices of synbiotic fermented milk product

Working out new products, a great importance, often even a decisive importance is attached to their sensory profile. Consequently, the fermented milk products with prebiotics and control were sensory evaluated.

The obtained results have shown that it is possible not only to improve the nutritional value of the product but also to increase the level of delight of the product, "taste + aroma" and also the intensity of consistency. However, higher indices were obtained of fermented milk samples with lactulose. It goes together with the mentioned facts in literature that yoghurt with added lactulose syrup was estimated higher than that without lactulose (Kulikausiene, 2004).

Taking into consideration that the concentration of the added prebiotics has affected the product consistency, the study included also the evaluation of viscosity of the product, its changes under the influence of different prebiotics and their concentrations.

The apparent viscosity of fermented milk samples with prebiotics and control are shown in Figure 17.

The obtained results have shown that the apparent viscosity is lower in fermented milk samples with prebiotics and control than in other fermented dairy products mentioned in literature (Domaga et al., 2004).

This radical difference from the literature data might be explained by the fact that in the present research *B.lactis* was used as the starter culture, whereas for the evaluated products described in literature homofermentative lactic acid bacteria starter culture was used. That creates a higher viscosity in the final product providing the intensive hydrolysis of lactulose and coagulation of casein.

The dispersion analysis established that there were no significant differences of the apparent viscosity among fermented milk samples with lactulose and inulin, their concentrations and control ($p>0.05$). Penna et al. (2006) have indicated in their research that the product viscosity depends on the dry matter content: if dry matter increases, viscosity also increases. The contrary tendency was observed in fermented milk samples with lactulose of this investigation: by increasing the lactulose concentration to 5%, the apparent viscosity decreased from 1444 mPa s (4% lactulose) to 1101 mPa s. The high proportion of carbohydrates, various carbohydrates in the product make the lactic acid bacteria choose easier hydrolysable compounds. In addition, during the fermentation of carbohydrates different organic substances are produced which influence the casein coagulation, isoelectric point size, etc. The milk fermentation process and also viscosity of the obtained product are affected by the product composition. By increasing the sugar content, the fermentation process is prolonged, and a product with more liquid consistency is obtained. This conclusion should be referred also to lactulose and inulin.

The changes of the apparent viscosity in fermented milk samples with prebiotics also were analyzed during storage, and measurements were made on day 1, 2, 5, 6, and 7 of storage. The obtained results are reflected in Figures 18 and 19.

The obtained results (Figure 19) have shown that the different added lactulose concentrations influence the product apparent viscosity during its shelf life.

In fermented milk samples with lactulose, there were observed the decrease of the apparent viscosity on day 5 or 6 of shelf life, except the sample with 5% of lactulose where the significant increase of the apparent viscosity was observed.

The obtained data were contrary to those in literature mentioned: Kulikauskiene (2004) indicates that lactulose syrup added in 2.5% concentration did not influence significantly the yoghurt apparent viscosity during shelf life. The differences between the obtained results and those in literature given might be explained by the usage of different starter cultures, because in this study *B.lactis* single culture was used, whereas Kulikauskiene (2004) had used a multiculture, namely, yoghurt culture.

The results of dispersion analysis have shown that the shelf life has the significant effect on the apparent viscosity of the product ($p\text{-value}=0.14<0.05$). The lactulose concentration, in its turn, did not have a significant effect on the apparent viscosity of fermented milk samples ($p>0.05$).

The obtained results have shown that the different inulin concentrations influence the apparent viscosity of fermented milk samples during shelf life. In fermented milk samples with 1%, 2% and 4% of inulin, there was observed an increase of the apparent viscosity during shelf life. The highest apparent viscosity was established in the sample with 4% of inulin. It corresponds to that described in literature: by increasing the inulin concentration in yoghurt to 4%, its viscosity also increases (Kip, 2006). Moreover, the parallel may be drawn with the results of investigations on the bifidogenic effect of inulin which was established at 4 % concentration in this study.

The results of dispersion analysis have shown that both the concentration of prebiotics ($p=0.04<0.05$) and shelf life ($p=0.003<0.05$) have a significant influence on the apparent viscosity of the product. The lowest apparent viscosity of fermented milk samples with inulin was established on day 1 and 7 of shelf life. As to concentration, the fermented milk sample with 4% of inulin differed significantly, and the apparent viscosity was the highest.

The obtained results have shown that fermented milk samples with prebiotics are referred to pseudoplastic liquefactionable liquids of share force where deviation from the Newton's liquids depends on the concentration of prebiotics.

CONCLUSIONS

1. The analyzed different lactulose and inulin concentrations were able to influence significantly the increase of the colony forming units of *Bifidobacterium lactis* (from 10^3 to 10^9 cfu·ml⁻¹) during milk fermentation and ensured their viability in synbiotic fermented milk product during its shelf life.
2. The colony forming units of *Bifidobacterium lactis* after fermentation, maturation and at the end of shelf life were significantly higher ($p<0.05$) than the prescribed therapeutic minimum of bifidobacteria – 10^6 cfu·g⁻¹.
3. *Bifidobacterium lactis* is characterized as being able to assimilate lactulose to 66% in comparison with remarkably lower assimilation level of lactose (to 37%) and inulin (to 20%). Lactulose should be considered as the most suitable substrate for growing of *Bifidobacterium lactis* and for ensuring their viability in the synbiotic fermented milk product.
4. It is found out that peculiarities of one bifidobacteria species may not be referred to all genres.
5. The added different concentrations of prebiotics significantly influenced the content of synthesized vitamins B₁ and B₂ ($p<0.05$), whereas they did not have a significant effect of vitamins B₆ and B₁₂ concentration ($p>0.05$) in synbiotic fermented milk product.

6. During fermentation *Bifidobacterium lactis* produced remarkable concentrations of threonine, methionine, tyrosine, lysine and aspartic acid ($p < 0.05$). The content of synthesized essential amino acids significantly differed in synbiotic fermented milk samples with lactulose.
7. *Bifidobacterium lactis* in the presence of certain lactulose and inulin concentrations is able to assimilate up to 25–40% of cholesterol in milk.
8. The added different concentrations of lactulose significantly increase the degree of liking of fermented milk samples at the sensory evaluation of products.
9. Prebiotics and their concentrations influence the sensory properties and the apparent viscosity of analysed fermented milk samples.
10. The optimum concentration of lactulose is 2%, inulin – 4%, which is confirmed by the colony forming units of *Bifidobacterium lactis*, concentrations of vitamins B₁ and B₂ and essential amino acids in fermented milk samples.