

Latvijas Lauksaimniecības Universitāte

Pārtikas tehnoloģijas fakultāte

Pārtikas tehnoloģijas katedra



Mg.sc.ing. Inga Šarenkova ^{id}

promocijas darbs

LAKTOBIONSKĀBES IEGUVES BIOTEHNOLOĢISKIE RISINĀJUMI
THE BIOTEHNOLOGICAL SOLUTIONS FOR LACTOBIONIC ACID PRODUCTION

Zinātnes doktora (Ph.D) zinātniskā grāda iegūšanai

pārtikas un dzērienu tehnoloģijās

Promocijas darba vadītāja

Prof. *Dr.sc.ing.* Inga Ciproviča

Promocijas darba konsultants

Prof. *Dr.* Manuel Rendueles de la Vega

Promocijas darba autors

Mg.sc.ing. Inga Šarenkova

JELGAVA

2022

ANOTĀCIJA

Pētījumi veikti laika posmā no 2017. līdz 2022. gadam Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas tehnoloģijas fakultātes Mikrobioloģijas zinātniskajā laboratorijā, Piena produktu pilotražotnē, Augļu un dārzeņu pārstrādes cehā, Procesu un iekārtu laboratorijā, Zinātniskajā laboratorijā, Uzturzinātnes laboratorijā un Dabas vielu ķīmijas zinātniskajā laboratorijā, arī Oviedo universitātes Zinātnisko un tehnoloģisko resursu nodaļas Pārtikas tehnoloģijas, Citometrijas laboratorijās un pilotražotnē (Spānija), Oviedo universitātes Ķīmijas un vides inženierijas katedra Bioprocetu, ūdens kvalitātes un izmēģinājumu rūpnīcas laboratorijās (Spānija).

Promocijas darba hipotēze: biezpiena sūkalas var piemērot laktobionskābes ieguvei mikrobiālajā fermentācijā.

Promocijas darba hipotēzi pierāda ar **aizstāvamām tēzēm**.

1. Biezpiena sūkalu sastāvs ir piemērots *Pseudomonas taetrolens* vairošanai;
2. Laktozes koncentrācija biezpiena sūkalās ir pietiekama laktobionskābes sintēzei;
3. Biezpiena sūkalu atšķirīgais pH ir pielāgojams *Pseudomonas taetrolens* vairošanai un ietekmē baktēriju metabolisko aktivitāti un laktozes biokonversiju laktobionskābē;
4. Ar izstrādātās tehnoloģijas palīdzību ir iespējams iegūt tautsaimniecībā izmantojamu laktobionskābi.

Promocijas darba mērķis: pētīt biezpiena sūkalu fermentācijas iespējas ar *Pseudomonas taetrolens* laktobionskābes ieguvei.

Promocijas darba uzdevumi.

1. Apkopot pieejamo zinātnisko literatūru par laktobionskābes ieguves metodēm un izvērtēt to efektivitāti;
2. Izvēlēties tehnoloģiskos risinājumus ekonomiskai laktobionskābes ieguvei no biezpiena sūkalām;
3. Vērtēt laktozes satura izmaiņas substrāta fermentācijas laikā;
4. Analizēt fermentēšanas parametru ietekmi maksimālai laktobionskābes ieguvei;

Darbs strukturēts 3 nodaļās.

1. nodaļa. Literatūras apskats ar promocijas darba tēmas teorētisko pamatojumu. Laktobionskābes raksturojums un pielietojums. Laktobionskābes ieguves iespējas. *Pseudomonas taetrolens* laktozes biokonversijas iespējas. Laktobionskābes attīrīšanas iespējas. Biezpiena sūkalu piemērotība laktobionskābes ieguvei.

2. nodaļa. Promocijas darbā lietoto materiālu, metožu un datu matemātiskās apstrādes raksturojums.

3. nodaļa. Pētījumu rezultāti par pH ietekmi uz laktobionskābes ieguvi. Sūkalu sausnas satura ietekme uz laktobionskābes ieguvi. Dažādu sāļu ietekme uz laktobionskābes ieguvi. Dažādas izcelsmes sūkalu fermentēšanas salīdzinājums kontrolētā un nekontrolētā pH kolbās un bioreaktorā. Dažādas izcelsmes sūkalu kombināciju pārbaude laktobionskābes ieguvei. Laktobionskābes ieguve, pievienojot atkārtoti baktēriju biomasu. Attīrīšanas posmā iegūtās laktobionskābes novērtējums.

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā, darba apjoms 113 lpp, ieskaitot 50 attēlus, 15 tabulas un 3 pielikumus. Darba izstrādei izmantoti 163 informācijas avoti.

Promocijas darba izstrāde līdzfinansēta ar LLU pētniecības programmas „Zinātniskās kapacitātes stiprināšana LLU” projekta Nr. Z23 “Laktobionskābes ieguves biotehnoloģiskie risinājumi”, ESF projekta Nr. ES32 "LLU pāreja uz jauno doktorantūras finansēšanas modeli" atbalstu” un ELFLA projekta Nr.19-00-A01612-000007 "Ekonomiski pamatota sūkalu pārstrāde jauniem produktiem pārtikai un lopbarībai" finansiālu atbalstu.



Latvijas
Lauksaimniecības
universitāte

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA
Eiropas Sociālais
fonds

"Zinātniskās kapacitātes stiprināšana LLU"

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



PROJEKTU LĪDZFINANSĒ
EIROPAS SAVIENĪBA



EIROPAS LAUKSAIMNIECĪBAS FONDS LAUKU ATTĪSTĪBAI:
EIROPA INVESTĒ LAUKU APVIDOS

Zinātniskā darba aprobācija

Pētījumu rezultāti apkopoti un publicēti 6 izdevumos angļu valodā.

Publikācijas izdevumos:

1. Sarenkova I., Saez Orviz S., Rendueles M., Ciprovica I., Zagorska J., Diaz M. (2022) Downstream approach routes for the purification and recovery of lactobionic acid. *Foods*, Vol. 11(4), p. 583. DOI: 10.3390/foods11040583 (Indeksēts SCOPUS)
2. Sarenkova I., Saez Orviz S., Ciprovica I., Rendueles M., Diaz M. (2022) Lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens* in a fed-batch bioreactor using acid whey as substrate. *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 75(2), p. 361 – 371. DOI: 10.1111/1471-0307.12841 (Indeksēts SCOPUS)
3. Sarenkova I., Saez Orviz S., Ciprovica I., Rendueles M., Diaz M. (2021) Lactobionic Acid Production from Acid Whey under Different Fermentative Conditions. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, Vol. 8(2), p. 35 – 40. DOI: 10.18178/joaat.8.2.35-40
4. Sarenkova I., Ciprovica I., Cinkmanis I. (2019) Effect of different salts on *Pseudomonas taetrolens* ability to lactobionic acid production. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, Vol. 13(7), p. 208 – 213. DOI: 10.5281/zenodo.3346720
5. Sarenkova I., Ciprovica I., Cinkmanis I. (2019) The effect of concentrated whey solids on lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens*. *Conference Proceedings. FOODBALT 2019. 13th Baltic Conference on Food Science and Technology "FOOD, NUTRITION, WELL-BEING"*, p. 250 – 254. DOI: 10.22616/FOODBALT.2019.030 (Indeksēts WEB OF SCIENCE)
6. Sarenkova I., Ciprovica I. (2018) Review: The current status and future perspectives of lactobionic acid production. *Proceedings of the international conference "Research for Rural Development 2018"*. Jelgava, 2018. – Vol. 1, p. 233 – 239. DOI: 10.22616/rrd.24.2018.037 (Indeksēts SCOPUS)

Pētījuma rezultāti prezentēti starptautiskajās zinātniskajās konferencēs:

1. Sarenkova I., Saez Orviz S., Ciprovica I., Rendueles M., Diaz M. Acid whey suitability for lactobionic acid production. *FoodBalt 2021*. 3 – 5.05.2021., Tallina, Igaunija. Mutiskais ziņojums.
2. Sarenkova I., Saez Orviz S., Ciprovica I., Rendueles M., Diaz M. Lactobionic acid production from acid whey under different fermentative conditions, *6th International*

- conference on Food and Agricultural engineering ICFAE 2020. 13 – 15.04.2020., Barcelona, Spānija. Mutiskais ziņojums;*
3. Sarenkova I., Ciprova I., Cinkmanis I. Effect of different salts on *Pseudomonas taetrolens* ability to lactobionic acid production. *International Conference on Food Science and Nutrition. 27 – 28.08.2019., Parīze, Francija. Mutiskais ziņojums;*
 4. Sarenkova I., Ciprova I., Cinkmanis I. The study of the effect of acid whey pH on lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens*, *10th international conference “Biosystems Engineering”*. 08 – 10.05.2019., Igaunija, Tartu. Stenda referāts;
 5. Sarenkova I., Ciprova I., Cinkmanis I. The effect of concentrated whey solids on lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens*. Starptautiskā zinātniskā konference “*FoodBalt 2019 and NEEFood 2019*”. 02 – 03.05. 2019., LLU, Jelgava, Latvija. Mutiskais ziņojums;
 6. Ciprova I., Sarenkova I. The potential of acid whey for lactobionic acid production. Food Factor Conference (*Established, emerging and exploratory food science and technology*). 8 – 9.11.2018., Torremolinos, Malaga, Spānija. Stenda referāts;
 7. Sarenkova I., Ciprova I. Review: The current status and future perspectives of lactobionic acid production”, starptautiskā zinātniskā konference “*Research for Rural Development 2018*”. 16 – 18.05.2018., LLU, Jelgava, Latvija. Mutiskais ziņojums.

Promocijas darba izstrāde prezentēta doktorantu **izglītojošos cursos** “Valorisation of vegetal waste and by-products: An eminent source of natural bioactive ingredients” (09.12. – 11.12.2020., Tartu, Igaunija) un “Sustainable Nordic and Baltic Food – Technologies, Quality, and Health” (28.04. – 1.05.2019., Jelgava, Latvija).

Promocijas darba pētījuma rezultāti prezentēti “Vidzemes inovāciju nedēļa 2022” un starptautiskajā **pārtikas izstādē** “Riga Food 2020”.

ANNOTATION

The study has been carried out in the period from 2017 to 2022 in the research laboratories of the Latvia University of Life Sciences and Technologies: Scientific laboratory of microbiology, Dairy pilot-plant, Pilot-plant for fruit and vegetable processing, Laboratory of processes and equipment, Laboratory of nutrition and Scientific laboratory of chemistry of natural substances. Also, the research has been done in the laboratories of Scientific and Technological Resources at the University of Oviedo (Spain): food technology, cytometry and pilot-plant, as well as in the laboratories of the Department of Chemical and Environmental Engineering at the University of Oviedo (Spain).

The hypothesis of the doctoral thesis: acid whey is suitable for lactobionic acid production by microbial fermentation.

The hypothesis of the doctoral thesis is approved by the **defended theses**.

1. The composition of acid whey is suitable for the growth of *Pseudomonas taetrolens*;
2. The lactose concentration in acid whey is sufficient for lactobionic acid production;
3. The acid whey pH is adjustable for *Pseudomonas taetrolens* growth and modified conditions of the substrate have an influence on the metabolic activity of bacteria and lactose conversion into lactobionic acid;
4. The developed lactobionic acid technology is suitable for its application on a commercial scale.

The objective of the doctoral thesis is to study the possibility of acid whey fermentation with *Pseudomonas taetrolens* for lactobionic acid production.

The tasks of the doctoral thesis are.

1. To compile the available scientific resources on lactobionic acid production methods and their efficiency;
2. To choose technological solutions for economical lactobionic acid production from acid whey;
3. To evaluate the changes of lactose concentration during substrate's fermentation;
4. To analyse the effect of fermentation parameters on higher lactobionic acid production.

The thesis is performed into three chapters.

Chapter 1. Review of the literature with the theoretical substantiation of the studied problem. Characteristics and application of lactobionic acid. Possibilities of lactobionic acid production. *Pseudomonas taetrolens* lactose bioconversion ability. Possibilities of lactobionic acid purification. Acid whey suitability for lactobionic acid production.

Chapter 2. Characteristics of materials and methods used in the study, mathematical data processing.

Chapter 3. Results on an effect of pH on lactobionic acid production. Effect of whey solids concentration on lactobionic acid production. Effect of different salts on lactobionic acid production. Comparison of different whey fermentation at controlled and uncontrolled pH in flasks and bioreactor. Comparison of different whey for lactobionic acid production. Production of lactobionic acid by re-addition of bacteria biomass. Products obtained after purification.

The doctoral thesis is written in Latvian, on 113 pages, it includes 15 tables, 50 figures, 163 literature sources, and 3 appendices.

The study has been financially supported by the grants:

- Strengthening Research Capacity in the Latvia University of Life Sciences and Technologies. Project No Z23 "The biotechnological solutions for lactobionic acid production";

- Latvia University of Life Sciences and Technologies Transition to the New Doctoral Funding Model. European Social Fund Project No. ES32;
- Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia project No 19-00-A01612-000007 “Economically justified processing of whey for new food and feed”.



Latvijas
Lauksaimniecības
universitāte

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA
Eiropas Sociālais
fonds

"Zinātniskās kapacitātes stiprināšana LLU"

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



PROJEKTU LĪDZFINANSĒ
EIROPAS SAVIENĪBA



EIROPAS LAUKSAIMNIECĪBAS FONDS LAUKU ATTĪSTĪBAI:
EIROPA INVESTĒ LAUKU APVIDOS

Approbation of the Research Work

The study results have been **published** in the six peer-reviewed issues:

1. Sarenkova I., Saez Orviz S., Rendueles M., Ciprovica I., Zagorska J., Diaz M. (2022) Downstream approach routes for the purification and recovery of lactobionic acid. *Foods*, Vol. 11(4), p. 583. DOI: 10.3390/foods11040583 (Indexed in SCOPUS)
2. Sarenkova I., Saez Orviz S., Ciprovica I., Rendueles M., Diaz M. (2022) Lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens* in a fed-batch bioreactor using acid whey as substrate. *International Journal of Dairy Technology*. Vol. 75(2), p. 361 – 371. DOI: 10.1111/1471-0307.12841 (Indexed in SCOPUS)
3. Sarenkova I., Saez Orviz S., Ciprovica I., Rendueles M., Diaz M. (2021) Lactobionic Acid Production from Acid Whey under Different Fermentative Conditions. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, Vol. 8(2), p. 35 – 40. DOI: 10.18178/joaat.8.2.35-40
4. Sarenkova I., Ciprovica I., Cinkmanis I. (2019) Effect of different salts on *Pseudomonas taetrolens* ability to lactobionic acid production. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, Vol. 13(7), p. 208 – 213. DOI: 10.5281/zenodo.3346720
5. Sarenkova I., Ciprovica I., Cinkmanis I. (2019) The effect of concentrated whey solids on lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens*. *Conference Proceedings. FOODBALT 2019. 13th Baltic Conference on Food Science and Technology "FOOD, NUTRITION, WELL-BEING"*, p. 250 – 254. DOI: 10.22616/FOODBALT.2019.030 (Indexed in WEB OF SCIENCE)
6. Sarenkova I., Ciprovica I. (2018) Review: The current status and future perspectives of lactobionic acid production. Proceedings of the international conference “*Research for Rural Development 2018*”. Jelgava, 2018. – Vol. 1, p. 233 – 239. DOI: 10.22616/rrd.24.2018.037 (Indexed in SCOPUS)

The **results** of the research have been **presented** at the international scientific conferences:

1. Sarenkova I., Saez Orviz S., Ciprovica I., Rendueles M., Diaz M. Acid whey suitability for lactobionic acid production. *FoodBalt 2021*. 3 – 5.05.2021., Tallinn, Estonia. Oral presentation;
2. Sarenkova I., Saez Orviz S., Ciprovica I., Rendueles M., Diaz M. Lactobionic acid production from acid whey under different fermentative conditions, *6th International conference on Food and Agricultural engineering ICFAE 2020*. 13 – 15.04.2020., Barcelona, Spain. Oral presentation;

3. Sarenkova I., Ciprova I., Cinkmanis I. Effect of Different Salts on *Pseudomonas taetrolens* Ability to Lactobionic Acid Production, *International Conference on Food Science and Nutrition*. 27 – 28.08.2019., Paris, France. Oral presentation;
4. Sarenkova I., Ciprova I., Cinkmanis I. The study of the effect of acid whey pH on lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens*. *10th international conference "Biosystems Engineering"*. 08 – 10.05.2019., Estonia, Tartu. Poster presentation;
5. Sarenkova I., Ciprova I., Cinkmanis I. The effect of concentrated whey solids on lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens*, "*FoodBalt 2019 and NEEFood 2019*". 02 – 03.05. 2019., LLU, Jelgava. Oral presentation;
6. Ciprova I., Sarenkova I. "The potential of acid whey for lactobionic acid production" Food Factor Conference [*Established, emerging and exploratory food science and technology*]. 8 – 9.11.2018., Torremolinos, Malaga, Spain. Poster presentation;
7. Sarenkova I., Ciprova I. "Review: The current status and future perspectives of lactobionic acid production". International scientific conference "*Research for Rural Development 2018*". 16 – 18.05.2018., LLU, Jelgava. Oral presentation.

The results of the research work have been presented in **PhD courses** "Valorisation of vegetal waste and by-products: An eminent source of natural bioactive ingredients" (09.12. – 11.12.2020., Tartu, Estonia) and "Sustainable Nordic and Baltic Food – Technologies, Quality, and Health" (28.04. – 1.05.2019., Jelgava, Latvia).

The results have been presented at the "Vidzeme Innovation Week 2022" and the **international food fair** "Riga Food 2020".

SATURS / CONTENT

Darbā ievietoto tabulu saraksts / <i>List of inserted tables used in the thesis</i>	10
Darbā ievietoto attēlu saraksts / <i>List of inserted figures used in the thesis</i>	11
Promocijas darbā lietoto apzīmējumu, saīsinājumu un terminu skaidrojums / <i>The explanation of abbreviation and nomenclature used in doctoral thesis</i>	16
Ievads / <i>Introduction</i>	18
1. Literatūras apskats / <i>Review of literature</i>	20
1.1. Laktobionskābes raksturojums un pielietojums / <i>Characteristics and application of lactobionic acid</i>	20
1.2. Laktobionskābes ieguves iespējas / <i>Possibilities of lactobionic acid production</i> ..	25
1.3. <i>Pseudomonas taetrolens</i> laktozes biokonversijas iespējas / <i>Pseudomonas taetrolens lactose bioconversion ability</i>	31
1.4. Laktobionskābes attīrīšanas iespējas / <i>Possibilities of lactobionic acid purification</i>	33
1.5. Biezpiena sūkalu piemērotība laktobionskābes ieguvei / <i>Acid whey suitability for lactobionic acid production</i>	35
Literatūras apskata kopsavilkums	38
<i>Summary of literature review</i>	38
2. Materiāli un metodes / <i>Materials and methods</i>	40
2.1. Pētījuma norises laiks un vieta / <i>Time and place of the research</i>	40
2.2. Pētījumā izmantoto materiālu raksturojums / <i>Materials</i>	40
2.3. Laktobionskābes ieguves tehnoloģija / <i>Lactobionic acid production technology</i> ...	41
2.4. Pētījumā izmantotās analīžu metodes / <i>Methods of research</i>	53
2.5. Datu matemātiskā apstrāde / <i>Mathematical data processing</i>	62
3. Rezultāti un diskusija / <i>Results and discussion</i>	63
3.1. pH ietekme laktobionskābes ieguvē / <i>Effect of pH on lactobionic acid production</i>	63
3.2. Sūkalu sausas saturas ietekme laktobionskābes ieguvē / <i>Effect of whey solids on lactobionic acid production</i>	65
3.3. Dažādu sāļu ietekme laktobionskābes ieguvē / <i>Effect of different salts on lactobionic acid production</i>	68
3.4. Dažādas izcelsmes sūkalu fermentēšanas salīdzinājums kontrolētā un nekontrolētā pH kolbās un bioreaktorā / <i>Comparison of different whey fermentation at controlled and uncontrolled pH in flasks and bioreactor</i>	73
3.5. Dažādas izcelsmes sūkalu kombināciju pārbaude laktobionskābes ieguvei / <i>Comparison of different whey for lactobionic acid production</i>	80
3.6. Laktobionskābes ieguve, atkārtoti pievienojot baktēriju biomasu / <i>Production of lactobionic acid by re-addition of bacterial biomass</i>	81
3.7. Attīrīšanas posmā iegūtie produkti / <i>Products obtained after purification</i>	88

3. nodaļas kopsavilkums	96
Summary of Chapter 3.	96
Secinājumi	97
<i>Conclusions</i>	98
Literatūras saraksts / <i>List of information sources</i>	99
Pielikumi / <i>Appendices</i>	109

Darbā ievietoto tabulu saraksts / *List of inserted tables used in the thesis*

Tabulas Nr. / <i>Number of Table</i>	Tabulas nosaukums / <i>Title of table</i>	Lpp / <i>page</i>
1.1.	Laktobionskābes fizikāli-ķīmiskie rādītāji / <i>Physically-chemical indicators of lactobionic acid</i>	20
1.2.	Laktobionskābes pielietojums pārtikā / <i>Lactobionic acid application in food</i>	22
1.3.	Kopsavilkums par nozīmīgākajiem patentiem laktobionskābes lietojumam pārtikā / <i>Summary of most relevant patents related to the use of lactobionic acid in food</i>	24
1.4.	Kopsavilkums par mikroorganismu izmantošanu laktobionskābes ieguvei / <i>Summary of the use of microorganisms for lactobionic acid production</i>	28
1.5.	Laktobionskābes izdalīšanas metodes / <i>Lactobionic acid recovery methods</i>	34
1.6.	Siera un biezpiena sūkalu sastāvs / <i>Sweet and acid whey composition</i>	36
1.7.	Vidējais vitamīnu saturs sūkalās / <i>The average vitamin concentration of whey</i>	36
1.8.	Biezpiena sūkalu sastāvs un kvalitātes rādītāji / <i>Composition and quality of acid whey</i>	37
2.1.	Pētījuma ietvaros veikto eksperimentu kopsavilkums / <i>Summary of experiments</i>	48
2.2.	Pētāmajos paraugos pielietotie laktobionskābes attīrīšanas un izdalīšanas posmi / <i>Lactobionic acid purification and recovery steps used in the test samples</i>	51
2.3.	Nosakāmie un kontrolētie parametri laktobionskābes ieguvē / <i>Determinable and controlled parameters of lactobionic acid production</i>	51
2.4.	Fluorescējošo krāsvielu darba šķīdumu sagatavošana / <i>Preparation of fluorescent dyes working solutions</i>	56
3.1.	Laktozes un laktobionskābes saturs paraugos / <i>Lactose and lactobionic acid concentration in samples</i>	67
3.2.	Biezpiena sūkalu fermentācijas procesā iegūto datu kopsavilkums / <i>Summary of values acquired in acid whey fermentation process</i>	84
3.3.	Laktobionskābes raksturojums / <i>Description of lactobionic acid</i>	90

Darbā ievietoto attēlu saraksts / *List of inserted figures used in the thesis*

Attēla Nr. / <i>Number of Figure</i>	Attēla nosaukums / <i>Title of figure</i>	Lpp / <i>page</i>
1.1.	Laktobionskābes pielietojuma pārskats / <i>An overview of lactobionic acid applications</i>	21
1.2.	Laktobionskābe ēdamajos apvalkos / <i>Edible films with lactobionic acid</i>	23
1.3.	Laktozes elektrokatalītiskā oksidēšana / <i>Electrocatalytic oxidation of lactose</i>	26
1.4.	Shematiska laktobionskābes ieguves diagramma, izmantojot mikrobioloģisko fermentāciju / <i>Schematic diagram of the lactobionic acid production by microbial fermentation</i>	27
1.5.	Shematiska diagramma LBA ieguvei, izmantojot enzimatisko metodi (bezšūnu (A) vai šūnu (B) biokatalīze) / <i>Schematic diagram for the production of lactobionic acid via enzymatic synthesis through cell-free (A) or whole-cell (B) biocatalysis</i>	30
1.6.	Laktozes oksidēšana laktobionskābē ar nepārtrauktu celobiozes dehidrogenāzes aktivitātes atjaunošanu un lakāzes katalizētu reducēšanu / <i>Oxidation of lactose in lactobionic acid with the continuous restoration of cellobiose dehydrogenase activity and catalyzed reduction of laccase</i>	31
1.7.	<i>Pseudomonas taetrolens</i> kolonijas barojošajā agarā / <i>Pseudomonas taetrolens colonies in nutrient broth agar</i>	32
1.8.	Shematiska biokatalītiskā laktozes oksidācija laktobionskābē, izmantojot <i>Pseudomonas taetrolens</i> / <i>Schematic bioconversion of lactose to lactobionic acid using Pseudomonas taetrolens</i>	33
1.9.	Aktīvās ogles poru izmēri / <i>Pore size of activated carbon</i>	35
2.1.	Laktobionskābes ieguves shēma: (a) sūkalu apstrāde un sagatave fermentācijai; (b) <i>Pseudomonas taetrolens</i> uzsēšana un sagatave fermentācijai; (c) laktobionskābes ieguve / <i>Lactobionic acid production: (a) whey treatment and preparation for fermentation; (b) Pseudomonas taetrolens inoculation and preparation for fermentation; (c) lactobionic acid recovery</i>	43
2.2.	Sūkalu olbaltumvielu denaturācija, karsējot / <i>Protein denaturation process by heating</i>	44
2.3.	Sūkalu mikrofiltrācija ar PVDF membrānām / <i>Whey microfiltration with PVDF membranes</i>	44
2.4.	<i>Pseudomonas taetrolens</i> LMG 2336 kolonijas NB agarā / <i>Pseudomonas taetrolens LMG 2336 colonies on NB agar</i>	45
2.5.	Substrāta centrifugēšana / <i>Centrifugation of substrate</i>	45
2.6.	Fermentācijas process bioreaktoros (Bio Flo 110, New Brunswick Scientific, ASV) / <i>Fermentation in bioreactors</i>	46
2.7.	Mikrofiltrācijas process / <i>Process of microfiltration</i>	46
2.8.	Sublimācijas process / <i>Process of freeze-drying</i>	47

Attēla Nr. / Number of Figure	Attēla nosaukums / Title of figure	Lpp / page
2.9.	Laktozes un laktobionskābes noteikšana ar Agilent 1200 šķidrums hromatogrāfu / <i>Determination of lactose and lactobionic acid by Agilent 1200 liquid chromatograph</i>	54
2.10.	Laktobionskābes un laktozes kalibrācijas šķidrums hromatogramma Agilent 1200 šķidrums hromatogrāfā / <i>Chromatogram of lactobionic acid and lactose calibration solution by Agilent 1200 liquid chromatograph</i>	54
2.11.	Ogļhidrātu kalibrācijas šķidrums hromatogramma Shimadzu LC – 20 šķidrums hromatogrāfā / <i>Chromatogram of the carbohydrate calibration solution by Shimadzu LC – 20 liquid chromatograph</i>	55
2.12.	Laktobionskābes kalibrācijas šķidrums hromatogramma Shimadzu LC – 20 šķidrums hromatogrāfā / <i>Chromatogram of the lactobionic acid calibration solution by Shimadzu LC – 20 liquid chromatograph</i>	55
2.13.	Plūsmas citometrijas punktveida diagrammas piemērs / <i>Example of flow cytometry dot plot</i>	57
2.14.	Kjeltec™ 2200 destilācijas iekārta / <i>Kjeltec™ 2200 distillation equipment</i>	58
2.15.	Paraugu sagatavošana šūnu masas noteikšanai pirms centrifugēšanas / <i>Preparation of dry cell weight samples before centrifugation</i>	59
2.16.	Lovibond® krāsu analizators / <i>Lovibond® Color Analyzer</i>	59
2.17.	CIE L*a*b* krāsu sistēma / <i>CIE L*a*b* color system</i>	60
3.1.	pH izmaiņas fermentācijas laikā paraugiem (A) ar <i>P. taetrolens</i> NCIB 9396, un (B) ar <i>P. taetrolens</i> DSM 21104, 30 °C temperatūrā 48 h / <i>Time-course profile of pH changes in samples (A) with P. taetrolens NCIB 9396 and (B) with P. taetrolens DSM 21104 during cultivation at 30 °C for 48 h</i>	63
3.2.	Laktobionskābes iznākums dažāda pH ietekmē / <i>Lactobionic acid yield affected by the different pH</i>	64
3.3.	pH izmaiņas fermentācijas laikā paraugiem (A) ar <i>P. taetrolens</i> NCIB 9396, un (B) ar <i>P. taetrolens</i> DSM 21104, 48 h, 30 °C temperatūrā / <i>Time-course profile of pH changes in samples (A) with P. taetrolens NCIB 9396 and (B) with P. taetrolens DSM 21104 during cultivation at 30°C 48 h</i>	65
3.4.	KVV skaita izmaiņas fermentācijas laikā paraugos (A) ar <i>P. taetrolens</i> NCIB 9396, un (B) ar <i>P. taetrolens</i> DSM 21104 / <i>Time-course profile of CFU changes in samples (A) with P. taetrolens NCIB 9396 and (B) with P. taetrolens DSM 21104 during fermentation</i>	66
3.5.	pH izmaiņas substrātos fermentācijas laikā dažādu sāļu ietekmē (A) <i>P. taetrolens</i> NCIB 9396, (B) <i>P. taetrolens</i> DSM 21104 / <i>Time-course graphic of pH in substrates during cultivation at different salt concentrations (A) P. taetrolens NCIB 9396, (B) P. taetrolens DSM 21104</i>	69

Attēla Nr. / Number of Figure	Attēla nosaukums / Title of figure	Lpp / page
3.6.	KVV skaita izmaiņas fermentācijas laikā dažādu sāļu ietekmē (A) <i>P. taetrolens</i> NCIB 9396, (B) <i>P. taetrolens</i> DSM 21104 / Time-course graphic of colony forming units (CFU) in substrates during cultivation at the presence of different salts (A) <i>P. taetrolens</i> NCIB 9396, (B) <i>P. taetrolens</i> DSM 21104	70
3.7.	<i>P. taetrolens</i> šūnu masas izmaiņas kontroles paraugos fermentācijas laikā / Time-course graphic of <i>P. taetrolens</i> dry cell weight in control samples during cultivation	71
3.8.	Laktobionskābes un laktozes saturs paraugos fermentācijas beigās (A) <i>P. taetrolens</i> NCIB 9396, (B) <i>P. taetrolens</i> DSM 21104 / Lactobionic acid and lactose concentration after fermentation with (A) <i>P. taetrolens</i> NCIB 9396, (B) <i>P. taetrolens</i> DSM 21104	72
3.9.	pH izmaiņas paraugos fermentācijas laikā (A) siera sūkalās, (B) biezpiena sūkalās / Time-course graphic of pH in different substrates (A) sweet whey, (B) acid whey during fermentation	74
3.10.	<i>P. taetrolens</i> vairošanās fermentācijas laikā dažādos substrātos (A) siera sūkalās – pēc optiskā blīvuma analīzes, (B) siera sūkalās – pēc šūnu masas analīzes, (C) biezpiena sūkalās – pēc optiskā blīvuma un (D) biezpiena sūkalās – pēc šūnu masas / Time-course graphic of <i>P. taetrolens</i> growth during fermentation in different substrates (A) sweet whey by optical density, (B) sweet whey by dry cell weight, (C) acid whey by optical density, (D) acid whey by dry cell weight	75
3.11.	Izšķīdušā skābekļa saturs siera un biezpiena sūkalās fermentācijas laikā bioreaktorā / Time-course graphic of DOT in sweet whey and acid whey during fermentation in a bioreactor	76
3.12.	Laktozes (LAC) un laktobionskābes (LBA) satura izmaiņas fermentācijas laikā dažādos substrātos (A) siera sūkalās, (B) biezpiena sūkalās / Time-course graphic of lactose (LAC) and lactobionic acid (LBA) in different substrates (A) sweet whey, (B) acid whey during fermentation	77
3.13.	Parauga krāsu maiņa pirms un pēc apstrādes ar aktīvo ogli / Discoloration of the sample before and after treatment with activated carbon	78

Attēla Nr. / Number of Figure	Attēla nosaukums / Title of figure	Lpp / page
3.14.	Krāsu intensitātes izmaiņas AB 2 paraugā pirms un pēc attīrīšanas ar aktīvo ogli / <i>Changes of color intensity in AB 2 sample before and after activated carbon treatment</i>	78
3.15.	Laktobionskābes un laktozes saturs paraugos pēc 72 h fermentācijas bioreaktorā (A) siera sūkalās ar nekontrolētu pH, (B) siera sūkalās ar pielāgotu pH 6.5, (C) biezpiena sūkalās ar nekontrolētu pH, (D) biezpiena sūkalas ar pielāgotu pH 6.5 / <i>Lactobionic acid and lactose concentration in cell free samples after 72 h of fermentation in bioreactor (A) sweet whey with uncontrolled pH, (B) sweet whey with adjusted pH, (C) acid whey with uncontrolled pH, (D) acid whey with adjusted pH</i>	79
3.16.	Laktobionskābes un laktozes saturs paraugos pēc 48 h fermentācijas bioreaktorā 30 °C temperatūrā. (A) 75% biezpiena un 25% siera sūkalas, (B) 50% biezpiena un 50% siera sūkalas, (C) 25% biezpiena un 75% siera sūkalas / <i>Lactobionic acid and lactose concentration after 48 h of the fermentation in a bioreactor at 30 C. (A) 75% acid whey and 25% sweet whey (B) 50% acid whey and 50% sweet whey, (C) 25% acid whey 75% sweet whey</i>	80
3.17.	pH un izšķīdušā skābekļa satura izmaiņas substrātos fermentācijas laikā / <i>Time-course graphic of pH and DOT in substrates during fermentation</i>	81
3.18.	<i>P. taetrolens</i> KVV skaita izmaiņas paraugos, fermentējot bioreaktoros / <i>Time-course profile of P. taetrolens CFU changes in samples during fermentation in bioreactors</i>	82
3.19.	<i>P. taetrolens</i> vairošanās, šūnu optiskais blīvums un šūnu masa paraugos fermentācijas laikā (A) AW1 un (B) AW2 paraugi / <i>Time-course profile of P. taetrolens growth represented as optical density and dry cell weight in (A) AW1 and (B) AW2 samples during fermentation</i>	83
3.20.	Laktozes (LAC) un laktobionskābes (LBA) satura izmaiņas fermentācijas procesā / <i>Time-course graphic of lactose (LAC) and lactobionic acid (LBA) concentration during fermentation</i>	83
3.21.	<i>P. taetrolens</i> šūnas (metaboliski aktīvas, bojātas un mirušas) fermentācijas procesā (A) AW1 paraugā (B) AW2 paraugā / <i>Dot plots representing P. taetrolens heterogeneity during fermentation process (A) in sample AW1 (B) in sample AW2</i>	86

Darbā ievietoto attēlu saraksta turpinājums /
Continuation of list of inserted figures used in the thesis

Attēla Nr. / Number of Figure	Attēla nosaukums / Title of figure	Lpp / page
3.22.	Šūnu fizioloģiskais stāvoklis, fermentējot substrātu bioreaktorā (A) AW1 paraugs un (B) AW2 paraugs / <i>Cell subpopulation physiology during fermentation in a bioreactor (A) sample AW1 and (B) sample AW2</i>	87
3.23.	Laktobionskābes paraugi (A) A paraugs; (B) B paraugs; (C) C paraugs; (D) D paraugs / <i>Samples of lactobionic acid (A) sample A; (B) sample B; (C) sample C; (D) sample D</i>	93
3.24.	Komerčiālās laktobionskābes (LBA), laktozes (LAC) un laktobionskābes paraugu krāsas intensitātes rezultāti (A) L* baltās – melnās krāsas intensitāte, (B) a* sarkanās - zaļās krāsas intensitāte, (C) b* dzeltenās-zilās krasas intensitāte / <i>Results of color analysis of comercial lactobionic acid (LBA), lactose (LAC) and lactobionic acid samples (A) L* intensity of white-black color, (B) a* intensity of red-green color, (C) b* intensity of yellow-blue color</i>	95

**Promocijas darbā lietoto apzīmējumu, saīsinājumu un terminu skaidrojums /
The explanation of abbreviation and nomenclature used in doctoral thesis**

[α] ²⁰ _D	Īpatnējā rotācija 20 °C temperatūrā / <i>Specific rotation at 20 °C temperature</i>
μL	Mikrolitri / <i>Microliters</i>
μm	Mikrometri / <i>Micrometers</i>
AEŠH / HPLC	Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija / <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
CV6	ChemChrome V6 šķīdums +dejonizēts ūdens / <i>ChemChrome V6 solution + deionized H₂O</i>
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe / <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOT	Izšķīdušā skābekļa saturs / <i>Dissolved oxygen tension</i>
EN	Eiropas standards / <i>European standards</i>
FAD	Flavīna adenīna dinukleotīds / <i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FADH ₂	Reducēts flavīna adenīna dinukleotīds / <i>Reduced flavin adenine dinucleotide</i>
FCM	Multiparametriskā plūsmas citometrija / <i>Flow Cytometry</i>
FCS	Plūsmas citometrijas standarts / <i>Flow Cytometry Standard</i>
FDA	ASV Pārtikas un zāļu pārvalde / <i>US Food and Drug Administration</i>
g g ⁻¹ h ⁻¹	Grami gramā stundā / <i>Grams per gram in hour</i>
g L ⁻¹ h ⁻¹	Grami litrā stundā / <i>Grams per litre in hour</i>
g L ⁻¹	Grami litrā / <i>Grams per liter</i>
g mol ⁻¹	Grami molā / <i>Grams per mole</i>
h	Stunda / <i>Hour</i>
H ₂ O	Ūdens / <i>Water</i>
ISO	Starptautiskā standartizācijas organizācija / <i>International Organization for Standardization</i>
IU	Starptautiskā vienība / <i>International Unit</i>
IUPAC	Starptautiskā teorētiskās un lietišķās ķīmijas savienība / <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K ⁺	Kālija joni / <i>Potassium ions</i>
kcal g ⁻¹	Kilokalorijas gramā / <i>Kilocalories per gram</i>
kg m ⁻³	Kilograms uz kubikmetru / <i>Kilogram per cubic metre</i>
KVV/ CFU	Koloniju veidojošās vienības / <i>Colony forming units</i>
L min ⁻¹	Litri minūtē / <i>Liters per minute</i>
LAC	Laktoze / <i>Lactose</i>
LBA	Laktobionskābe / <i>Lactobionic acid</i>
LVS	Latvijas valsts standarts / <i>Latvian national standard</i>
mg L ⁻¹	Miligrami litrā / <i>Milligram per liter</i>
mg mL ⁻¹	Miligrami mililitrā / <i>Milligram per milliliter</i>
mg	Miligrami / <i>Milligrams</i>
Mg ²⁺	Magnija joni / <i>Magnesium ions</i>
min	Minūtes / <i>Minutes</i>
mL min ⁻¹	Mililitri minūtē / <i>Milliliters per minute</i>
mL	Mililitri / <i>Milliliters</i>
mm	Milimetri / <i>Millimeters</i>
mM	Milimolārs / <i>Milimolar</i>
Mn ²⁺	Mangāna joni / <i>Manganese ions</i>
NaCl	Nātrijs hlorīds / <i>Sodium chloride</i>
NaOH	Nātrija hidroksīds / <i>Sodium hydroxide</i>

**Promocijas darbā lietoto apzīmējumu, saīsinājumu un terminu skaidrojumu turpinājums /
*Continuation of the explanation of abbreviation and nomenclature used in doctoral thesis***

NB	Barojošais bulijons / <i>Nutrient broth</i>
NH ₂	Aminogrupa / <i>Amino group</i>
nm	Nanometrs / <i>Nanometre</i>
O ₂	Skābeklis / <i>Oxygen</i>
°C	Celsija grādi / <i>Celsius degree</i>
Pa	Paskāls / <i>Pascal</i>
pH	Negatīvais logaritms no ūdeņraža jonu saturs / <i>The negative logarithm of hydrogen ion concentration</i>
PI	Propīdija jodīds / <i>Propidium iodide</i>
PVDF	Polivinilidēna difluorīds / <i>Polyvinylidene difluoride</i>
RID	Refrakcijas indeksa detektors / <i>Refractive index detector</i>
s	Sekunde / <i>Second</i>
°T	Tērnera grādi / <i>Therner degree</i>
UV	Ultravioletā gaisma / <i>Ultraviolet light</i>
v v ⁻¹	Tilpums tilpumā / <i>Volume per volume</i>
Wp	Produkta produktivitāte tilpuma vienībā / <i>Product productivity per unit volume</i>
Wx	Biomases produktivitāte / <i>Biomass productivity</i>
µg kg ⁻¹	Mikrogrami kilogramā / <i>Microgram per kilogram</i>

IEVADS / INTRODUCTION

Laktobionskābes ieguve no pārtikas blakusproduktiem kļūst par perspektīvu risinājumu, lai īstenotu tautsaimniecības pieaugošo pieprasījumu pēc šā produkta. Sūkalas ir izmaksu ziņā efektīva izejviela laktobionskābes ražošanai. Mūsdienās ražotāji vairāk fokusējas uz sūkalu olbaltumvielu izdalīšanu un to pielietojumu funkcionālu pārtikas produktu ražošanā. Lielākā sūkalu sausas sastāvdaļa, proti, laktoze netiek pilnvērtīgi izmantota. Zinātnieki un ražotāji meklē iespējas, kā izmantot sūkalu sastāvdaļas augstvērtīgu produktu ieguvei. Viens no pēdējo gadu atklājumiem ir sūkalu laktozes izmantošana, lai iegūtu laktobionskābi augošā farmācijas, biomedicīnas, pārtikas, kosmētikas un ķīmijas nozaru pieprasījuma izpildei. Tehnoloģiskie risinājumi laktobionskābes ieguvei nav pietiekami izpētīti, tādējādi šeit paveras plašs zinātniskais lauks fundamentāliem pētījumiem un jaunām atziņām šajā jomā.

Promocijas darba mērķis: pētīt biezpiena sūkalu fermentācijas iespējas ar *Pseudomonas taetrolens* laktobionskābes ieguvei.

Pētnieciskā hipotēze: biezpiena sūkalas var piemērot laktobionskābes ieguvei mikrobiālajā fermentācijā.

Ievērtējot promocijas darba mērķi un izvirzīto pētījuma hipotēzi, definēti **pētnieciskie uzdevumi**.

1. Apkopot pieejamo zinātnisko literatūru par laktobionskābes ieguves metodēm un Izvērtēt to efektivitāti;
2. Izvēlēties tehnoloģiskos risinājumus ekonomiskai laktobionskābes ieguvei no biezpiena sūkalām;
3. Vērtēt laktozes satura izmaiņas substrāta fermentācijas laikā;
4. Analizēt fermentēšanas parametru ietekmi maksimālai laktobionskābes ieguvei;

Pētījuma hipotēze pierādāma ar šādām **tēzēm**.

1. Biezpiena sūkalu sastāvs ir piemērots *Pseudomonas taetrolens* vairošanai;
2. Laktozes koncentrācija biezpiena sūkalās ir pietiekama laktobionskābes sintēzei;
3. Biezpiena sūkalu atšķirīgais pH ir pielāgojams *Pseudomonas taetrolens* vairošanai un ietekmē baktēriju metabolisko aktivitāti un laktozes biokonversiju laktobionskābē;
4. Ar izstrādātās tehnoloģijas palīdzību ir iespējams iegūt tautsaimniecībā izmantojamu laktobionskābi.

Promocijas darba **novitāte** un **zinātniskais nozīmīgums**.

1. Pirmo reizi Latvijā veikti pētījumi par laktobionskābes ieguvei mikrobiālajā fermentācijā, izmantojot biezpiena sūkalas un sasniedzot 100% laktozes biokonversiju laktobionskābē.
2. Pētīta un izvērtēta biezpiena sūkalu piemērotība laktozes oksidācijai laktobionskābē ar *Pseudomonas taetrolens*.
3. Eksperimentu rezultātā iegūtās atziņas par laktobionskābes attīrīšanas metodēm un to efektivitāti rada iespējas nodrošināt vielai noteiktos tīrības kritērijus.

Promocijas darba **tautsaimnieciskā nozīme**.

1. Pētījumā izstrādātā tehnoloģija ir pielāgojama ražošanā;
2. Rasts risinājums biezpiena sūkalu pielietojumam produktu ar pievienoto vērtību ražošanai.

Promocijas darba izstrāde līdzfinansēta ar:

LLU pētniecības programmas „Zinātniskās kapacitātes stiprināšana LLU” projekta Nr. Z23 “Laktobionskābes ieguves biotehnoloģiskie risinājumi”;



"Zinātniskās kapacitātes stiprināšana LLU"

ESF projekta Nr. ES32 "LLU pāreja uz jauno doktorantūras finansēšanas modeli";

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA
Eiropas Sociālais
fonds

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

ELFLA projekta Nr.19-00-A01612-000007 "Ekonomiski pamatota sūkalu pārstrāde jauniem produktiem pārtikai un lopbarībai" atbalstu.



PROJEKTU LĪDZFINANSĒ
EIROPAS SAVIENĪBA



EIROPAS LAUKSAIMNIECĪBAS FONDS LAUKU ATTĪSTĪBAI:
EIROPA INVESTĒ LAUKU APVIDOS

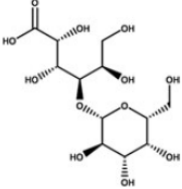
1. LITERATŪRAS APSKATS / REVIEW OF LITERATURE

1.1. Laktobionskābes raksturojums un pielietojums / *Characteristics and application of lactobionic acid*

Laktobionskābe ir polihidroksiskābe, kas satur divas hidroksilgrupas katrā molekulā (Cardoso *et al.*, 2019). Tā veidojas laktozes oksidācijā (Gutierrez, Hamoudi & Belkacemi, 2012). Laktobionskābe satur galaktozes molekulu, kas savienota ar glikonskābes molekulu, veidojot ēterim līdzīgu savienojumu. Tai ir raksturīga 8 hidroksilgrupu klātbūtne (Armarego & Chai, 2009). Laktobionskābes fizikāli-ķīmiskie rādītāji ir apkopoti 1.1. tabulā.

1.1. tabula / *Table 1.1*

Laktobionskābes fizikāli-ķīmiskie rādītāji (Alonso *et al.*, 2013b; Pleissner *et al.*, 2017; Gutierrez, Hamoudi & Belkacemi, 2012; Pharmanostrā, 2017) / *Physically-chemical indicators of lactobionic acid*

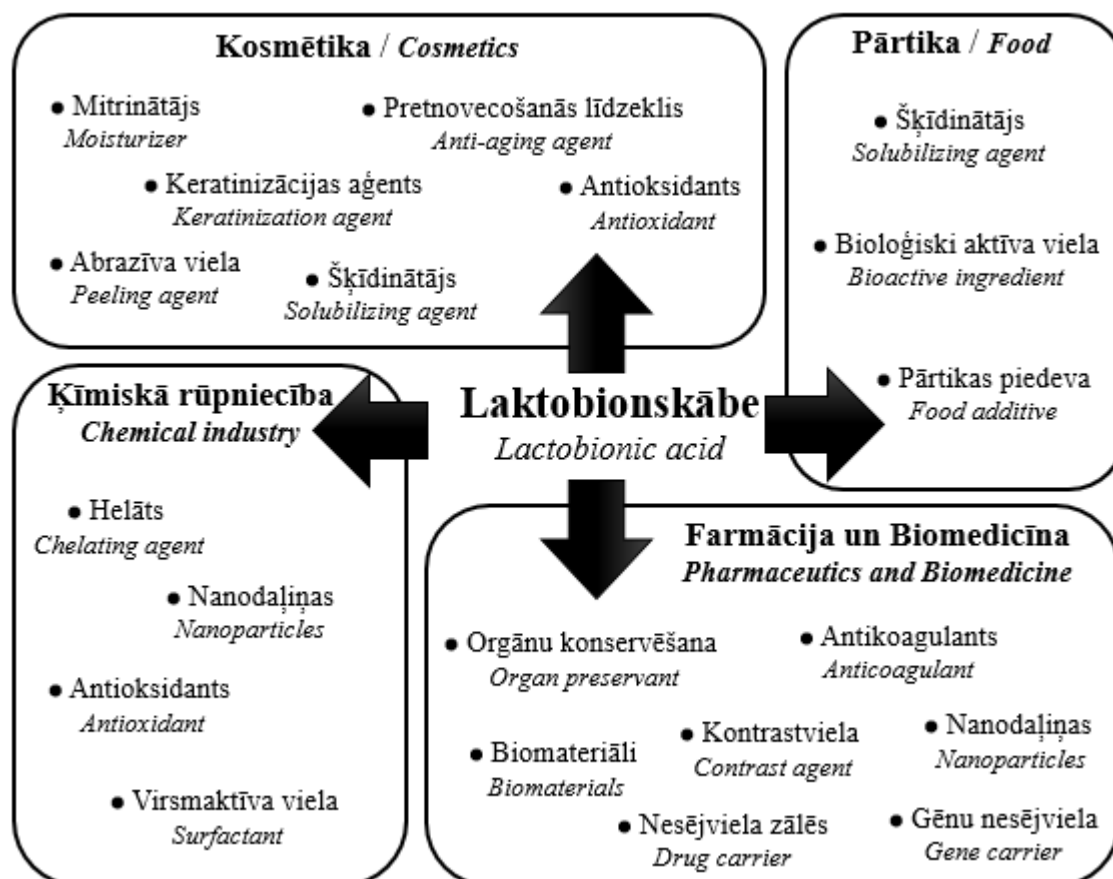
Fizikāli-ķīmiskie rādītāji / <i>Physico-chemical parameters</i>	Raksturojums, lielums / <i>Characteristics, values</i>
Struktūrformula / <i>Structural formula</i>	
Sistemātiskais nosaukums / <i>Systematic name</i>	4-O-β-D-galaktopiranozil-D-glikonskābe / <i>4-O-β-D-galactopyranosyl-D-gluconic acid</i>
IUPAC nosaukums / <i>IUPAC nomenclature</i>	(2R,3R,4R)-2,3,5,6-tetrahidroksi-4-[[2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)-2-tetrahidropirani]oksi]heksānskābe / <i>2R,3R,4R)-2,3,5,6-Tetrahydroxy-4-[[2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-tetrahydropyranyl]oxy]hexanoic acid</i>
Molekulārā formula / <i>Molecular formula</i>	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂
Molmasa / <i>Molecular weight</i> , g mol ⁻¹	358.30
Fizikālais stāvoklis / <i>Physical state</i>	Cieta viela / <i>Solid</i>
Izskats / <i>Appearance</i>	Kristālisks, birstošs pulveris / <i>Crystalline, free-flowing powder</i>
Smarža / <i>Odour</i>	Viegli saldēna smarža / <i>Slightly sweet odour</i>
Garša / <i>Taste</i>	Salda, nedaudz skābena / <i>Sweet, slightly sour</i>
Krāsa / <i>Colour</i>	Balta vai viegli dzeltena / <i>White or slightly yellow</i>
Ūdens saturs / <i>Water content</i> , %	ne vairāk kā 4.68
Kušanas temperatūra / <i>Melting point</i> , °C	+128 – +130

1.1. tabulas turpinājums / *Continuation of Table 1.1*

Fizikāli-ķīmiskie rādītāji / <i>Physico-chemical parameters</i>	Raksturojums, lielums / <i>Characteristics, values</i>
Šķīdība / <i>Solubility</i>	Labi šķīst ūdenī, nedaudz šķīst bezūdens etanolā un metanolā, slikti šķīst etiķskābē / <i>Freely soluble in water, slightly soluble in anhydrous ethanol and methanol, poorly soluble in acetic acid</i>
$[\alpha]_D^{20}$	+ 53° – + 22.6°
Skābes disociācijas konstante / <i>Acid dissociation constant, 25 °C pKa</i>	3.6
pH (10% šķīdums / <i>solution</i>)	2.37
Šķīdība ūdenī / <i>Solubility in water, mg mL⁻¹</i>	100

No uztura viedokļa šo vielu var uzskatīt par mazkaloriju saldinātāju, tai ir 2 kcal g⁻¹ (Schaafsma, 2008). Laktobionskābe griež polarizēto gaismu pulksteņa rādītāja virzienā (Delagustin *et al.*, 2019).

Pateicoties laktobionskābes universālajām īpašībām, tai ir liels potenciāls farmācijas, pārtikas, kosmētikas un ķīmiskās rūpniecības nozarēs (skat. 1.1. att.), to var izmantot kā antioksidantu, helātu, mitrumuzturētāju, emulgatoru pārtikas, farmācijas un kosmētikas produktu ražošanā (Ganzle, Haase & Jelen, 2008).

1.1. att. Laktobionskābes pielietojuma pārskats (Alonso *et al.*, 2013b) /*Fig. 1.1. An overview of lactobionic acid applications*

Laktobionskābe tiek izmantota orgānu saglabāšanai pirms transplantācijas, kas pazīstama ar nosaukumu "Viskonsīnas universitātes šķīdums". Laktobionskābi izmanto ķīmijterapijā,

īpaši aknu karcinomas pacientiem (Pleissner *et al.*, 2017). Laktobionskābi lieto arī magnētiskajā rezonansē kā kontrastvielu, arī aknu vēža šūnu skrīningā. Kosmētikas industrijā laktobionskābi izmanto preparātos ādas novecošanās procesu kavēšanai, arī ādas kopšanas līdzekļos. Turklāt tai piemīt mitrinošas īpašības, saglabājot ādas elastību, un antioksidanta īpašības, kas novērš brīvo radikāļu un UV gaismas izraisītas novecošanas pazīmes ādā (Tasic-Kostov *et al.*, 2010). Laktobionskābe tiek izmantota arī tīrīšanas līdzekļu ražošanā. Tā piešķir putu stabilitāti, nodrošina tīrīšanas un emulgēšanas efektivitāti, arī ūdens mīkstināšanas īpašības. Pārsvārā laktobionskābes pielietojums ķīmiskajā rūpniecībā ir kā virsmas aktīvai vielai, to izmanto kā piedevu pretkorozijas pārklājumos un kā sintētisko amīdu reaģentu (Gutierrez *et al.*, 2012). Laktobionskābei ir arī konservējošas īpašības, kas paver plašāku tās potenciālu pārtikā. Šis savienojums jau mazās koncentrācijās uzrāda lielas antibakteriālas īpašības, nemainot produktam piešķirto garšu, aromātu vai krāsu. Laktobionskābe var sagraut baktēriju šūnupvalku, kā arī ietekmēt olbaltumvielu sintēzi šūnā (Kang *et al.*, 2020).

Laktobionskābes izmantošana pārtikas produktu ražošanā pasaulē ir jaunums, turklāt *in vivo* testi ir tikai pirmsākumā (Marques *et al.*, 2019; Alonso 2018). FDA (ASV Pārtikas un zāļu pārvalde) norāda, ka kalcija laktobionāts ir drošs patēriņam un ir apstiprinājusi kalcija laktobionāta pielietojumu (kā konservants) pārtikas produktu ražošanā (FDA, 2017). Eiropas Savienība vēl nav apstiprinājusi laktobionskābes lietošanu pārtikā. Apstiprinājums lietošanai pārtikā ir noraidīts 2009. gadā (Eiropas Komisija, 2009; Cardoso *et al.*, 2019), taču Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestāde turpina apzināt vielas īpašības, jo pietrūkst laktobionskābes novērtējuma par ilgtermiņa ietekmi uz veselību (Gutierrez *et al.*, 2012). Potenciālais laktobionskābes izmantošanas veids pārtikas produktos ir pārtikas piedevas statusā: siera, arī dzērienu ražošanā kā konservantam un desertos kā recinātājam. Nozīmīga ir laktobionskābes kā nesējvielas funkcija kalcija asimilācijai (Pleissner *et al.*, 2017).

Pēdējos gados laktobionskābes, kā potenciālās pārtikas piedevas, īpašības ir analizētas no dažādiem funkcionālajiem aspektiem, ievērtējot tās garšas pastiprinātāja, stabilizētāja, skābes, recinātāja, saldinātāja un mitrumuzturētāja īpašības, turklāt laktobionskābei ir arī funkcionālās īpašības, veicina minerālvielu asimilāciju, ir bifidogēnais faktors, u.c. (Gutierrez *et al.*, 2012; Marques 2019; Alonso *et al.*, 2013a). Laktobionskābe var uzlabot pārtikas produktu kvalitāti un drošību (Chen *et al.*, 2017; Mukherjee *et al.*, 2015). Laktobionskābes izmantošanas iespējas pārtikā ir apkopotas 1.2. tabulā.

1.2. tabula / Table 1.2.

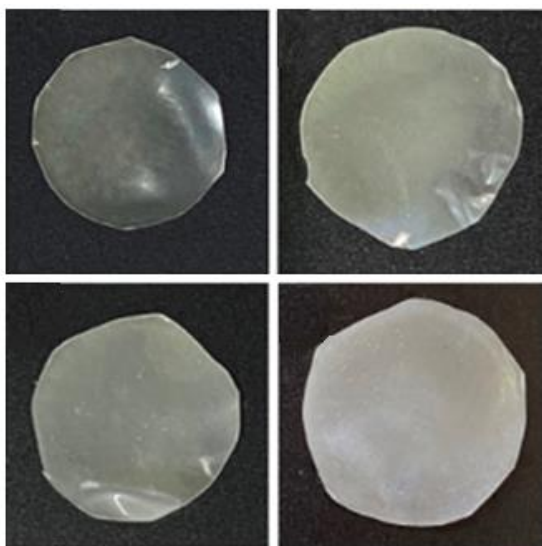
**Laktobionskābes pielietojums pārtikā /
Lactobionic acid application in food**

Pielietošanas veids / <i>Application</i>	Atsauce / <i>Reference</i>
Antioksidants / <i>Antioxidants</i>	FDA, 2017; Baldwin <i>et al.</i> , 2004
Stabilizētājs / <i>Stabilizer</i>	FDA, 2017
Recinātājs / <i>Gelling agent</i>	FDA, 2017
Skābuma regulētājs / <i>Acidifier agent</i>	Faergemand <i>et al.</i> , 2012
Maizes sacietēšanas kavētājs / <i>Aging inhibitor (for bread)</i>	Oe & Kimura, 2011
Kalcija absorbcijas veicinātājs / <i>Calcium carrier</i>	Oe & Kimura, 2008; Pleissner <i>et al.</i> , 2017
Mitrumuzturētājs (gaļas produktos) / <i>Water holding capacity agent (in meat products)</i>	Nielsen, 2009
Lipīdu oksidācijas kavētājs / <i>Retarding of lipid oxidation</i>	Baldwin <i>et al.</i> , 2004
Pildviela (siera ražošanā) / <i>Filler (in cheese production)</i>	Pleissner <i>et al.</i> , 2017
Garšas pastiprinātājs / <i>Flavour enhancer</i>	Walter & Begli, 2011

Laktobionskābi var izmantot lauksaimniecības dzīvnieku ēdināšanā, piemēram, dējējvistām, lai uzlabotu dējības rādītājus un veicinātu ar barību uzņemtā kalcija biopeejamību. Pēdējā īpašība nozīmīga olas čaumalas kvalitātei (Kimura, 2006).

Laktobionskābes iekļaušana pārtikā var veicināt kalcija vai citu minerālvielu asimilāciju, radot pozitīvu ietekmi veselībai (Baldwin *et al.*, 2007). Eksperimenti, kurus veica Oe un līdzautori, ir parādījuši, ka kalcija absorbcija žurkām, kuras baroja ar laktobionskābi bagātinātu barību, bija augstāka nekā žurkām, kas tika barotas ar kontroles barību (Oe *et al.*, 2008). Ir izstrādāts arī piena dzēriens, kas satur laktobionskābi. Lielākais japāņu piena pārstrādes uzņēmums “Megmils Snow” jau 2012. gadā ir veiksmīgi uzsācis laktobionskābi saturošu funkcionālu pienu produktu ražošanu un pārdošanu (Alonso *et al.*, 2013b). Japānā tiek ražots “Caspian sea yogurt” jogurts, kas tiek pozicionēts kā ļoti veselīgs produkts zarnu trakta darbībai. Jogurts ir tik populārs, ka iedzīvotāji to gatavo arī mājas apstākļos. Fermentācijai iegādājas “Fujicco” (Hyogo, Japāna) *Lactococcus lactis subsp. cremoris* un *Acetobacter orientalis* sugas saturošu ieraugu. Ierauga sastāvā esošā *Acetobacter orientalis* enzīmi piena fermentācijas laikā oksidē laktozi laktobionskābē (Kiryu *et al.*, 2009; 2012).

Laktobionskābei ir prebiotikas īpašības (Schaafsma, 2008; Goderska, 2019; Saez-Orviz *et al.*, 2021a). Šo īpašību dēļ pētniece Saez-Orviz ir izstrādājusi ēdamos apvalkus pārtikas produktiem ar laktobionskābi, iekļaujot apvalkos arī *Lactobacillus pantarum*, tā piešķirot apvalkiem gan prebiotisku, gan probiotisku iedarbību (1.2. att.). Šāda apvalka lietošana uzturā veicinātu labvēlīgo baktēriju darbību zarnu traktā un nodrošina veselīgu zarnu mikrobiomu (Saez-Orviz *et al.*, 2020; 2021b; 2022).



Lactobacillus pantarum,
laktobionskābe / *lactobionic acid*,
želatīns / *gelatine*



Lactobacillus pantarum,
laktobionskābe / *lactobionic acid*,
olu dzeltenuma proteīns / *egg yolk protein*

1.2. att. **Laktobionskābe ēdamajos apvalkos** (Saez-Orviz *et al.*, 2021b; 2022) /

Fig. 1.2. Edible films with lactobionic acid

Lielākie rūpnieciskās laktobionskābes ražotāji ir (Affertsholt, 2007; Alonso *et al.*, 2015):

- Solvay (Vācija);
- Frieslandcampina Domo (Jaunzēlande);
- Sandoz (Vācija);
- Reliable Biopharmaceutical Corp (Amerikas Savienotās Valstis);
- U.S. Dairy Ingredient Comp. (Amerikas Savienotās Valstis).

Nozīmīgākie patenti laktobionskābes lietošanai pārtikā ir uzskaitīti 1.3. tabulā.

1.3. tabula / Table 1.3.

**Kopsavilkums par nozīmīgākajiem patentiem laktobionskābes lietojumam pārtikā /
Summary of most relevant patents related to the use of lactobionic acid in food**

Uzņēmums/ Company	Patenti / Patents	Procesa apraksts / Description of process
SIA Unitika	<p>1. Maizes sacietēšanas kavēšana (J.P. Patent No JP2011177121A, 2010) (Kimura & Oe, 2011) / <i>Aging inhibitor for bread</i></p> <p>2. Laktobionskābi saturošs piena dzēriens ar minerālvielu absorbciju veicinošu darbību (J.P. Patent No. JP2008245587A, 2007). (Kimura <i>et al.</i>, 2007) / <i>Lactobionic acid-containing milk beverage which has mineral absorption-promoting action</i></p>	<p>1. Maize, kas gatavota no kviešu miltiem un bagātināta ar 0,005 % laktobionskābes, ilgāk saglabājas svaiga / <i>Bread made with wheat flour enriched of 0.005 parts by weight of lactobionic acid inhibits aging according to the sensory panel.</i></p> <p>2. Šī metode ietver etiķskābes baktēriju pievienošanu pienam, kam seko fermentācija ar pienā esošās laktozes oksidāciju laktobionskābē / <i>This method includes acetic acid bacteria addition into milk, followed by fermentation to convert the lactose contained in the milk into LBA</i></p>
Leprino Foods	<p>1. Siera ražošana ar tiešu piena paskābināšanu (U.S. Paten No. US20110097441A1, 2004a) (Merrill & Singh 2004a) / <i>Cheesemaking with direct acidification</i></p> <p>2. Kaltēts aldobionskābju produkts (U.S. Patent No. US8021704B2, 2004b) (Merrill & Singh 2004b) / <i>Dried aldobionic acids product</i></p>	<p>1. pH samazināšanai pievieno laktobionskābi, kam seko ierauga pievienošana, lai sasniegtu pH 5.1 – 5.7 / <i>Lactobionic acid is added to standardize pH and is followed by addition of microbial starter to complete the acidification process reaching pH 5.1 – 5.7.</i></p> <p>2. Aldobionskābju produkts tiek ražots no vājpiena. Ultrafiltrātram pievieno oksidoreduktāzi, pārveidojot laktozi laktobionskābē un palielinot reducējošo cukuru saturu. Produktu kaltē izsmidzināšanas kaltē / <i>Aldobionic acids product is produced with skimmed milk. Oxidoreductase was added to the permeate, converting lactose to lactobionic acid, and increasing the oxidation of reducing sugars. The mixture was spray dried.</i></p>
Solazyme, Inc.	<p>Uzturvielu maisījumi no mikroaļģēm (U.S. Patent No. US20090274736A1, 2006) (Dillon <i>et al.</i>, 2006) un (U.S Patent No. US20070167396A1, 2006) (Dillon, Somanchi & Rao, 2006) / <i>Nutraceutical compositions from microalgae</i></p>	<p><i>Porphyridium</i> ģints mikroaļģes, kas kultivētas laktobionskābes kā vienīgā oglekļa avota klātbūtnē, tiek pievienotas nespecifiskam pārtikas sastāvam. Mikroaļģu šūnu homogenāts dzērienos vai emulsijās darbojas kā biezinātājs, stabilizētājs un emulgators. Produkts sekmē holesterīna līmeņa samazināšanos asinīs. / <i>Porphyridium species microalgae were cultivated with LBA as a carbon source, added to a non-specific food. Microalgae cell homogenate acts as a thickener, stabilizer and emulsifier in beverages or emulsions. The product helps lower blood cholesterol.</i></p>

1.3. tabulas turpinājums / *Continuation of Table 1.3*

Uzņēmums / <i>Company</i>	Patenti / <i>Patents</i>	Procesa apraksts / <i>Description of process</i>
Kraft Foods	<p>1. Kalcija piedevas izveide nespecifiskiem pārtikas produktiem un dzērieniem (U.S. Patent No. 7781002B2, 2010). (Baldwin <i>et al.</i>, 2010) / <i>Calcium enhancement in nonspecific food and beverages</i></p> <p>2. Augļu sulas ar kalcija laktobionātu (U.S. Patent No. WO2006036791A1, 2006). (Nielsen, 2006) / <i>Fruit juices comprising calcium lactobionate</i></p>	<p>1. Laktobionskābes (29 g) un ūdens (250 mL) šķīdumam pievieno kalcija hidroksīdu (5 g), papildus arī citronskābi (3 g). Piedevas pH ir ap 6.0 / <i>Lactobionic acid (29 g), 250 mL water added with calcium hydroxide (5 g), with further addition of citric acid (3 g). The final pH of the calcium complex is about 6.0.</i></p> <p>2. Kalcija laktobionātu iegūst no piena ultrafiltrāta, fermentējot laktozi laktobionskābē un papildus pievienojot kalcija hidroksīdu / <i>Calcium lactobionate is prepared from milk permeate by enzymatic oxidation of lactose and calcium hydroxide addition.</i></p>
Novozymes A/S	<p>1. Jogurtiem pievieno oksidāzes, lai pārvērstu laktozi laktobionskābē (U.S. Patent WO 2003037093A1, 2004) (Lynglev, 2004) / <i>Yogurts containing oxidases to convert lactose into lactobionic acid</i></p> <p>2. Ūdens saistīšanas līdzeklis zivs produktos (U.S. Patent 20120308698 A1, 2012) (Nielsen, 2012) / <i>Water retention agent in meat products</i></p>	<p>1. Jogurtam pievienots ieraugs un enzīmi. Oksidāzi iegūst no <i>Microdochium nivale</i> / <i>Starter cultures and enzymes added to the yogurt. The oxidase is produced by the fungus Microdochium nivale</i></p> <p>2. Tika pievienota laktobionskābe (25 g) 75 g zivju. Zivis tika sasaldētas un atlaidinātas, lai analizētu ūdens zudumus / <i>Lactobionic acid (25 g) was added to 75 g of fish meat, frozen and thawen to measure water loss.</i></p>

Saskaņā ar 2017. gada ziņojumu par laktobionskābes tirgu (Dhananjay, 2017) galvenās laktobionskābes tirdzniecības valstis ir Amerikas Savienotās Valstis, Vācija, Ķīna, Japāna un Indija. Pašlaik komerciāli ražoto laktobionskābi lieto medicīniskiem, rūpnieciskiem un pētniecības mērķiem, kopumā gadā saražojot aptuveni 15 tūkstošus tonnu (Affertsholt, 2007; Cardoso *et al.*, 2019). Tiek minēts, ka plašās izmantojamības dēļ laktobionskābes ražošanas vērtība ar katru gadu pieaug (Cardoso *et al.*, 2019; Kruschitz & Nidetzky, 2020).

Ievērtējot laktobionskābes plašo potenciālu dažādās tautsaimniecības nozarēs, ir stratēģiski meklēt iespējas un risinājumus efektīvai šīs vielas ieguvei, lietojot izmaksu ziņā lētas un otreizēji pārstrādājamas izejvielas.

1.2. Laktobionskābes ieguves iespējas / *Possibilities of lactobionic acid production*

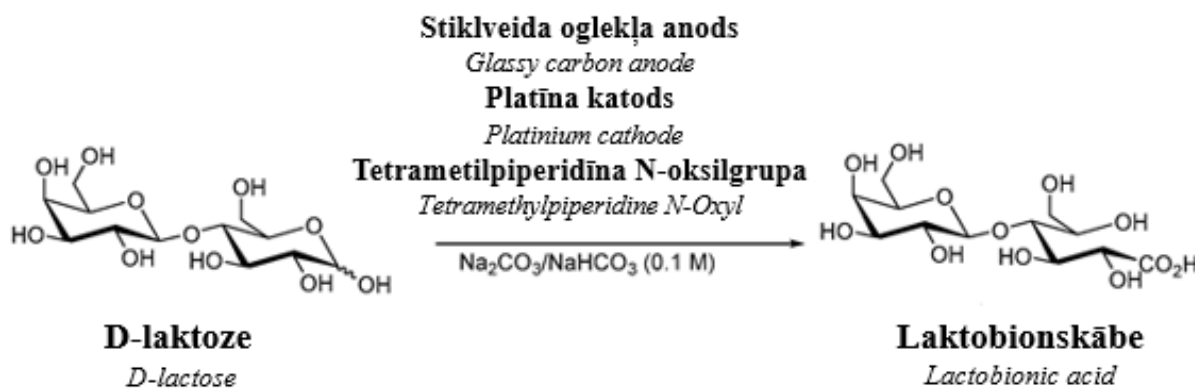
Biotehnoloģiskās (fermentatīvā oksidēšana, biokatalītiskā oksidēšana) un ķīmiskās metodes (elektroķīmiskā un katalītiskā oksidēšana) var izmantot laktobionskābes ieguvei (Nordkvist, Nielsen & Villadsen, 2007a).

- Elektroķīmiskā un katalītiskā laktozes oksidēšana.

Fisher un Meyer (1889) pirmie apstiprināja laktobionskābes sintēzi ķīmiskā ceļā. Laktobionskābe tika iegūta laktozes oksidācijā ar bromu (Fisher & Mayer, 1889). Rūpnieciski laktobionskābi iegūst ķīmiskā sintēzē, kuras īstenošanai nepieciešami cēlmetāla katalizatori un lieli enerģijas resursi, oksidējot laktozi ar bromu, jodu vai elektrokatalītiski, oksidējot to

sārmainā vidē ar platīna (piemērs 1.3. att.) un zelta elektrodiem (Pleissner *et al.*, 2017; Kuusisto *et al.*, 2007).

Klasiskā laktobionskābes iegūšanas metode ir datēta ar 1930. gadu, kurā (Isbels, 1933) laktobionskābi ieguva ar elektroķīmisko metodi, izmantojot rafinētu laktozi. Gutierrez *et al.* apstiprināja, ka lielāko laktobionskābes iznākumu (vairāk nekā 90%) var iegūt elektroķīmiskā oksidācijā. Zelta elektrodi ir vispiemērotākie katalizatori cukuru oksidēšanai (Gutierrez, Hamoudi & Belkacemi, 2011). Galvenais savienojums laktozes elektroķīmiskā oksidēšanā ir laktons, kas tālāk tiek hidrolizēts laktobionskābē (Pleissner *et al.*, 2017).



1.3. att. **Laktozes elektrokatalītiskā oksidēšana** (Vedovato *et al.*, 2020) /

Fig. 1.3. Electrocatalytic oxidation of lactose

Pirmais veiksmīgi īstenotais laktobionskābes ieguves process katalītiskā laktozes oksidācijā ar palādijs un bismuta-palādijs katalizatoriem veikts 1990. gadā (Hendriks, Kušters & Marins, 1990).

- Fermentatīvā laktozes oksidēšana.

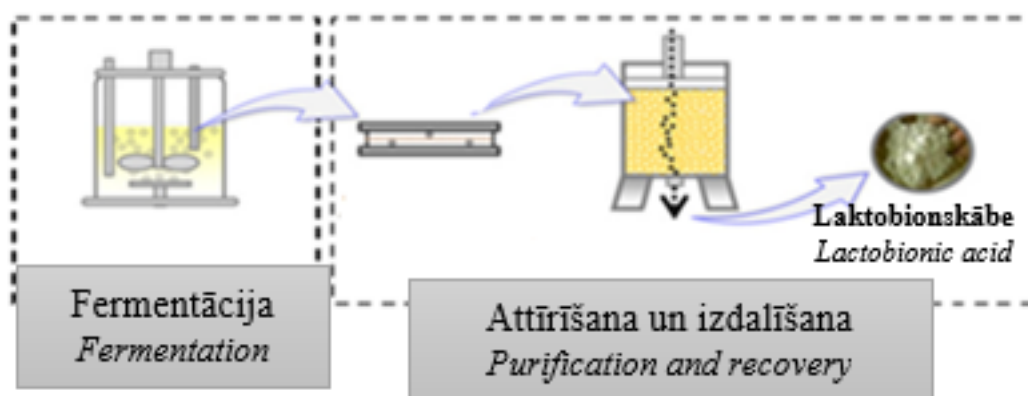
Biotehnoloģiskie procesi ir daudzsološas alternatīvas ķīmiskās sintēzes procesam, lai nākotnē ilgtspējīgā veidā pārvarētu resursu izsīkšanas problēmas. Biotehnoloģijas iespējas ļauj izmantot lētus un atjaunojamus resursus plaša sortimenta bioloģisko savienojumu ražošanai. Ir pierādīts, ka atjaunojamie resursi, piemēram, lauksaimniecības blakusprodukti, pārtikas ražošanas blakusprodukti vai atkritumprodukti, ir efektīvi oglekļa un/vai slāpekļa avoti. Laktobionskābes komerciālai nozīmei palielinoties, tās biotehnoloģiskajai ražošanai tiek pievērsta arvien lielāka uzmanība. Iespēja izmantot atjaunojamus un/vai atkritumproduktus laktobionskābes ieguvei vēl vairāk palielina interesi gan no vides, gan no ražošanas efektivitātes viedokļa (Pleissner *et al.*, 2017).

Ir pētīti dažādi mikroorganismi, kuri spēj oksidēt laktozi laktobionskābē, to vidū:

- *Pseudomonas taetrolens* (Alonso, Rendueles & Diaz, 2011);
- *Pseudomonas aeruginosa* (Stodola & Lockwood, 1947);
- *Acetobacter orientalis* (Kiryu *et al.*, 2012);
- *Burkholderia cepacia* (Murakami *et al.*, 2003);
- *Halobacterium saccharovororum* (Tomlinson, Strohm & Hochstein, 1978);
- *Escherichia coli* (Han *et al.*, 2022).

No iepriekšminētajiem mikroorganismiem, tikai *Pseudomonas taetrolens* tiek pētīta laktobionskābes ieguvei laktozes oksidācijas ceļā, skatīt 1.3. nodaļu “*Pseudomonas taetrolens* laktozes biokonversijas spējas”.

Laktobionskābes ieguves pamatprocess, izmantojot mikrobioloģisko fermentāciju, ir atainots 1.4. attēlā.



1.4. att. Shematiska laktobionskābes ieguves diagramma, izmantojot mikrobioloģisko fermentāciju (Alonso *et al.*, 2013b) /

Fig. 1.4. Schematic diagram of the lactobionic acid production by microbial fermentation

No visiem mikroorganismiem, kuri spēj oksidēt laktozi, tikai *Pseudomonas taetrolens* un *Acetobacter orientalis* ir piemērotas tādu galaproduktu ieguvei, kurus var izmantot pārtikas produktu ražošanā (West, 2004; Kiryu *et al.*, 2012; Saez-Orviz *et al.*, 2022). *Pseudomonas aeruginosa* un *Burkholderia cepacia* ir patogēni, kas padara tās nepiemērotas lietošanai pārtikā (Pleissner *et al.*, 2017). Laktozes oksidēšana, izmantojot *Acetobacter orientalis*, rada iespēju iegūt laktobionskābi no 97 līdz 99%, izmantojot substrātu ar baktērijām nepieciešamām barības vielām, taču iegūtais produkts netiek pozicionēts kā drošs izmantošanai pārtikas produktos (Kiryu *et al.*, 2012). Laktobionskābes iegūšana no laktozes, izmantojot filamentos raugus, sasniedz tikai 50% no iespējamā iznākuma 120 stundu fermentācijā (Pedruzzi, Borges de Silva, & Rodrigues, 2011; Malvessi *et al.*, 2013). Laktozes oksidācijas spēja piemīt arī sarkanajām aļģēm ap pH 5, tās spēj oksidēt dažādus ogļhidrātus (Alonso, Rendueles & Diaz, 2011; Murakami *et al.*, 2003). Nesenā pētījumā tika atklāts, ka arī *Alcaligenes faecalis* spēj producēt laktobionskābi (Oh & Eom, 2022).

Izmantojot jebkuru no biotehnoloģiskajām metodēm, produkcijas iznākumam jābūt vismaz 50 līdz 100 g L⁻¹, lai sasniegtu salīdzināmu produkta koncentrāciju ar ķīmiskajā sintēzē iegūto (Pollard & Woodley, 2007).

Ar dažādu mikroorganismu palīdzību iegūtās laktobionskābes iznākums dažādos pētījumos ir apkopots 1.4. tabulā.

Laktobionskābes ieguvē galvenā izejviela ir laktoze. Fermentēšanas procesā iegūstot laktobionskābi, svarīga ir arī skābekļa klātbūtne. Izmantojot mikroorganismus, maksimālais iznākums, kādā laktoze tiek pārvērsta laktobionskābē, ir 100%. Ir svarīgi izvēlēties atbilstošus mikroorganismus, substrātu, fermentēšanas parametrus un veidu, lai sasniegtu maksimumu. Lielākais laktobionskābes iznākums (līdz 98%) ar specifisko laktobionskābes ražošanas ātrumu 1.73 g g⁻¹ h⁻¹ tika sasniegts 24 stundu fermentācijas procesā, iegūstot laktobionskābi no sūkalām, kas apstiprināja laktozes biokonversijas ar *Pseudomonas taetrolens* nozīmīgumu (Alonso, Rendueles, & Diaz, 2017).

**Kopsavilkums par mikroorganismu izmantošanu laktobionskābes ieguvei /
Summary of the use of microorganisms for lactobionic acid production**

Mikroorganismi / <i>Microorganisms</i>	Substrāts / <i>Substrate</i>	Fermentēšanas stratēģija / <i>Fermentation method</i>	Fermentēšanas laiks / <i>Fermentation time, h</i>	LBA saturs / <i>Titer of LBA, g L⁻¹</i>	Specifiskais ražošanas ātrums / <i>Specific productivity, g g⁻¹ h⁻¹</i>	Biomassas produktivitāte / <i>Productivity of biomass, g L⁻¹ h⁻¹</i>	LBA iznākums / <i>Yield, %</i>	Atsauce / <i>Reference</i>
<i>Pseudomonas graveolens</i>	Laktoze / <i>Lactose</i>	NP rotējošās mucās / <i>in rotating drums</i>	165	-	-	-	75	Stodola & Lockwood, 1947
<i>Pseudomonas sp. LS131</i>	Laktoze, sāļi, peptons / <i>Lactose, salts, peptone</i>	BP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	155	290	-	1.87	90	Miyamoto et al., 2000
<i>Burkholderia cepacia</i>	Laktoze, sāļi, peptons, rauga ekstrakts, glikoze / <i>Lactose, salts, peptone, yeast extract, glucose</i>	BP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	50	178	-	3.56	85	Meiberg et al., 1990
<i>Burkholderia cepacia no.24</i>	Laktoze, sāļi, peptons, rauga ekstrakts / <i>Lactose, salts, peptone, yeast extract</i>	BP kratot kolbu / <i>In shake-flask</i>	240	400	-	1.67	100	Murakami et al., 2003
<i>Burkholderia cepacia no.24</i>	Laktoze, sāļi, kukurūzas mitrās malšanas blakusprodukts, rauga ekstrakts / <i>Lactose, salts, corn steep liquor, yeast extract</i>	NP kratot kolbu / <i>In shake-flask</i>	27	150	-	5.55	~ 100	Murakami et al., 2006
<i>Zymomonas mobilis</i>	Laktoze / <i>Lactose</i>	NP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	22	125	0.80	5.80	100	Pedruzzi et al., 2011
<i>Zymomonas mobilis</i>	Laktoze, fruktoze / <i>Lactose, fructose</i>	NP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	24	182	0.30	7.60	78	Malvessi et al., 2013

1.4. tabulas turpinājums / Continuation of Table 1.4

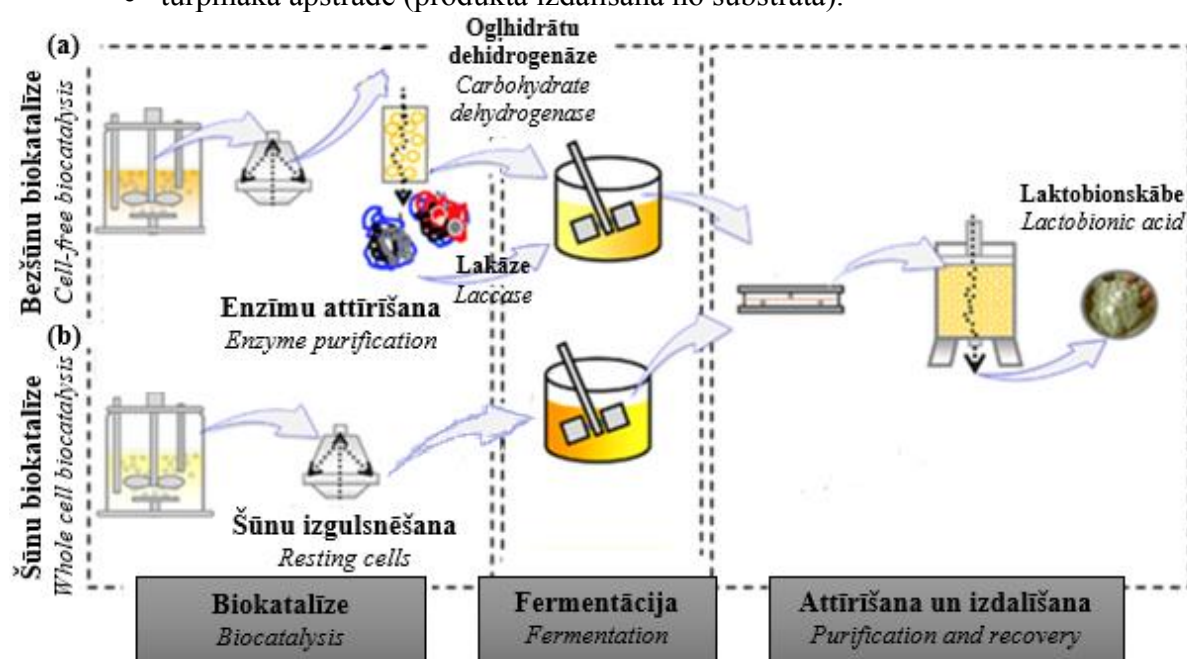
Mikroorganismi / <i>Microorganisms</i>	Substrāts / <i>Substrate</i>	Fermentēšanas stratēģija / <i>Fermentation method</i>	Fermentēšanas laiks / <i>Fermentation time, h</i>	LBA saturs / <i>Titer of LBA, g L⁻¹</i>	Specifiskais ražošanas ātrums / <i>Specific productivity, g g⁻¹ h⁻¹</i>	Biomasa produktivitāte / <i>Productivity of biomass, g L⁻¹ h⁻¹</i>	LBA iznākums / <i>Yield, %</i>	Atsauce / <i>Reference</i>
<i>Acetobacter orientalis</i>	Rauga ekstrakts, polipeptons, D-glikoze, laktoze, sāļi / <i>Yeast extract, polypeptone, D-glucose, lactose, salts</i>	NP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	72	49	-	0.54	98	Kiryu <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Sūkalas / <i>Whey</i>	NP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	58	42	0.56	0.70	100	Alonso <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Sūkalas / <i>Whey</i>	NP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	30	42	0.94	1.27	100	Alonso <i>et al.</i> , 2012a
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Sūkalas / <i>Whey</i>	NP kratot kolbu / <i>In shake-flask</i>	60	42	0.42	0.70	100	Alonso <i>et al.</i> , 2012b
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Koncentrētas sūkalas / <i>Concentrated whey</i>	NP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	48	78	1.02	1.63	100	Alonso <i>et al.</i> , 2013a
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Koncentrētas sūkalas / <i>Concentrated whey</i>	BP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	80	164	1.40	2.05	82	Alonso <i>et al.</i> , 2013a
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Sūkalas / <i>Whey</i>	NP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	24	49	1.73	2.04	98	Alonso <i>et al.</i> , 2017
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Sūkalas + glikoze / <i>Whey + glucose</i>	BP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	48	78	2.15	1.28	98	Alonso <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Sūkalas + glicerols / <i>Whey + glycerol</i>	BP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	48	65	1.65	0.93	82	Alonso <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Sūkalas + laktoze / <i>Whey + lactose</i>	BP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	48	100	2.05	1.40	100	Alonso <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Sūkalas / <i>Whey</i>	NP bioreaktorā / <i>In bioreactor</i>	48	34	-	-	85	Giorgi <i>et al.</i> , 2018

NP – papildus vielas raudzēšanas laikā netiek pievienotas (izņemot var tikt pievienots skābeklis) / *no additional substances are added during fermentation (except that oxygen may be added)*; BP – papildus vielas raudzēšanas laikā tiek pievienotas (piemēram, periodiski tiek pievienota laktoze kā barības viela mikroorganismiem) / *additional substances are added during fermentation (example: lactose is added periodically as a nutrient to microorganisms)*; LBA iznākums = Laktobionskābe/Laktoze (Cik daudz laktobionskābes ieguva no pieejamās laktozes) / *Yield = Lactobionic acid/Lactose (How much lactobionic acid was obtained from the available lactose)*.

- Biokatalītiskā laktozes oksidēšana.

Šo procesu vispirms pārbaudīja Lin ar līdzautoriem (Lin *et al.*, 1993), atklājot, ka tā nodrošina lielāku laktobionskābes iznākumu, salīdzinot ar mikrobioloģisko fermentāciju. Tomēr ir nepieciešami specifiski un kontrolēti apstākļi, kas padara procesu sarežģītāku. Laktozes oksidāciju laktobionskābē īsteno, izmantojot īpašus enzīmus. Laktobionskābes enzimatiskā ieguve apkopota 1.5. attēlā (Pleissner *et al.*, 2017), ietverot šādus posmus:

- pelējumu vai baktēriju pavairošana;
- enzīmu attīrīšana;
- laktozes biotransformācija (fermentācija);
- turpmākā apstrāde (produkta izdalīšana no substrāta).



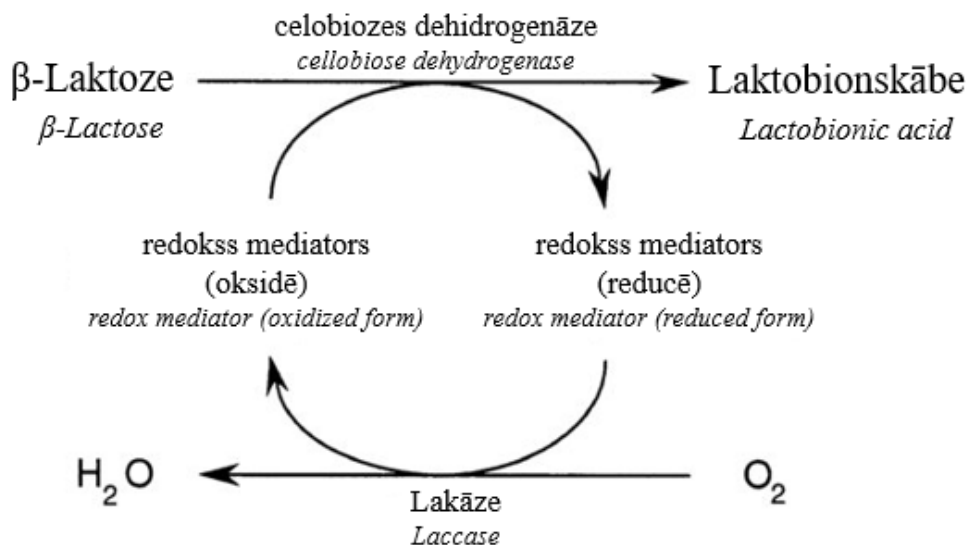
1.5. att. Shematiska diagramma LBA ieguvei, izmantojot enzimatisko metodi (bezšūnu (a) vai šūnu (b) biokatalīze) (Alonso *et al.*, 2013b) /

Fig. 1.5. Schematic diagram for the production of lactobionic acid via enzymatic synthesis through cell-free (a) or whole-cell (b) biocatalysis

Ir veikti pētījumi laktobionskābes iegūšanai, lietojot daudzveidīgus enzīmus un iegūstot no 96 līdz 100% laktobionskābes, papildus izmantojot 2,6 – dihlorindofenolu vai 2,2'-etilbenzotiazolīn-6-sulfonskābi red-oks potenciāla nodrošināšanai. Šajos pētījumos pielietotie enzīmi:

- celobiozes dehidrogenāze (iegūta no *Sclerotium rolfsii*, *Trametes versicolor* vai *Myriococcum thermophilum*) + lakāze (iegūta no *Trametes pubescens*) (Ludwig *et al.*, 2004; Baminger *et al.*, 2001; Dhariwal *et al.*, 2006; Splechna *et al.*, 2001; Maischberger *et al.*, 2008; Van Hecke *et al.*, 2009a; 2009b; 2011);
- ogļhidrātu oksidāze (iegūta no *Microdochium nivale*) + katalāze (Catazyme® (Novozymes)) (Hua *et al.*, 2007; Budtz *et al.* 2007; Nordkvist *et al.*, 2007b);
- glikozes-fruktozes oksidoreduktāze (iegūta no *Zymomonas mobilis*) + ditiotreitols un liellopu seruma albumīns (Satory *et al.*, 1997);
- laktozi oksidējošs enzīms (iegūts no *Paraconiothyrium spp. KD-3*) (Kiryu *et al.*, 2008);
- laktozi oksidējošs enzīms (iegūts no *Paraconiothyrium spp. KD-3*) + katalāze (*Aspergillus niger*) (Murakami *et al.*, 2008).

Enzimātiskas reakcijas piemērs aplūkojams 1.6. attēlā, kur tiek izmantota celobiozes dehidrogenāze (*S. rolfssii*) + lakāze (*T. pubescens*) un redokss potenciāla nodrošināšanai 2,6-dihlorindofenols (Splechtna *et al.*, 2001).



1.6. att. Laktozes oksidēšana laktobionskābē ar nepārtrauktu celobiozes dehidrogenāzes aktivitātes atjaunošanu un lakāzes katalizētu reducēšanu (Splechtna *et al.*, 2001) /
 Fig. 1.6. Oxidation of lactose in lactobionic acid with the continuous restoration of cellobiose dehydrogenase activity and catalyzed reduction of laccase

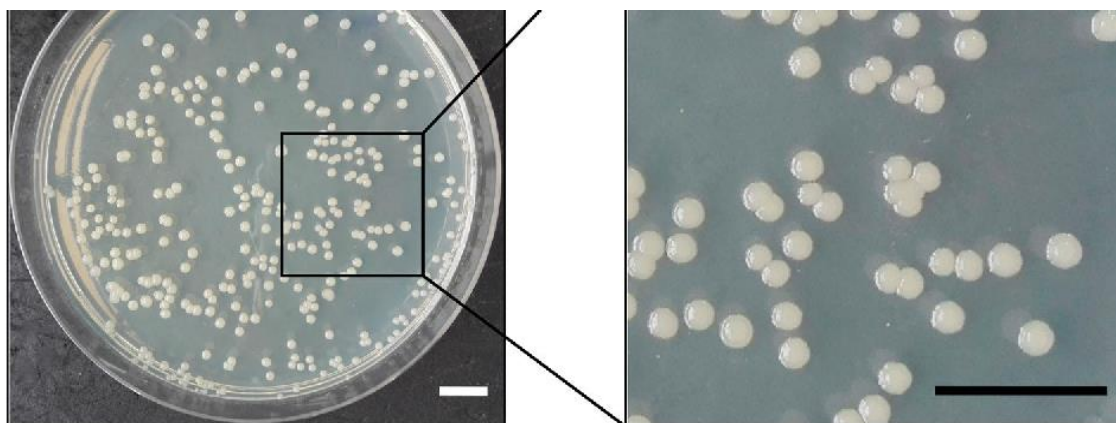
Enzimātiskā metodē iegūst augstāku produktivitāti un laktobionskābes iznākumu nekā mikrobioloģiskajā fermentācijā. Diemžēl enzīmi ir diezgan nestabili ražošanas procesā (Nordkvist *et al.*, 2007b). 2009. gadā “Novozymes” sāka ražot enzīmu maisījumu LactoYIELD™ ar mērķi pārveidot laktozi laktobionskābē. Ražotājs gan nav aprakstījis enzīmu sastāvu, tikai norādījis, ka tie ir laktozes-oksīdāzes grupas enzīmi (Novozymes, 2009). Enzimātisko transformāciju var veikt tikai ar rafinētu laktozi.

No visām iespējamajām laktobionskābes iegūšanas metodēm fermentatīvā oksidēšana ļauj izmantot lētākas izejvielas, piemēram, sūkalas (Pleissner *et al.*, 2017), kas apstiprina to potenciālu laktobionskābes ieguvei. Ievērtējot dažādās laktobionskābes ieguves metodes, to priekšrocības un trūkumus, promocijas darba izstrādē uzmanība un vērība veltīta mikroorganismu (*Pseudomonas taetrolens*) izmantošanai laktobionskābes ieguvei.

1.3. *Pseudomonas taetrolens* laktozes biokonversijas iespējas / *Pseudomonas taetrolens* lactose bioconversion ability

Pseudomonas ģints sugas ir aerobas, sporas neveidojošas, gramnegatīvas nūjiņveida baktērijas, kas ir taisnas vai nedaudz izliektas, 0.5 – 1.0 μ m diametrā un 1.5 – 5.0 μ m garas. Tās ir kustīgas, pārvietojas, izmantojot vienu vai vairākas viciņas. Tām ir ļoti izteikta aerobā elpošanas vielmaiņa, bet dažos gadījumos nitrāti tiek izmantoti kā alternatīva, kas ļauj tām augt anaerobā vidē (UK Standards for Microbiology Investigations, 2015). Lielākā daļa sugu ir oksidāzes pozitīvas (Benkert *et al.*, 2008). Šīs ģints pārstāvjus raksturo spēja augt vienkāršos neitrālas reakcijas apstākļos. *Pseudomonas* spp. kolonijas var būt bezkrāsainas, bet bieži sastopamas ar baltu, pelēcīgi baltu, krēmveida un dzeltenu pigmentāciju (skatīt 1.7. attēlu), kurā atainotas *Pseudomonas taetrolens* kolonijas agara platēs. Fluorescējošas kolonijas var viegli novērot ultravioletajā gaismā (UK Standards for Microbiology Investigations, 2015). *Pseudomonas taetrolens* optimālā augšanas temperatūra ir 30 °C (Alonso *et al.*, 2017), tās var

izdzīvot 4 – 5 °C temperatūrā dažas nedēļas. Pārnēsot jaunā barības vidē, tās turpina aktīvi vairoties (Palleroni, Pieper & Moore, 2010).



1.7. att. *Pseudomonas taetrolens* kolonijas barojošajā agarā
(Garcia, Rendueles & Diaz, 2017) /

Fig. 1.7. *Pseudomonas taetrolens* colonies in nutrient broth agar

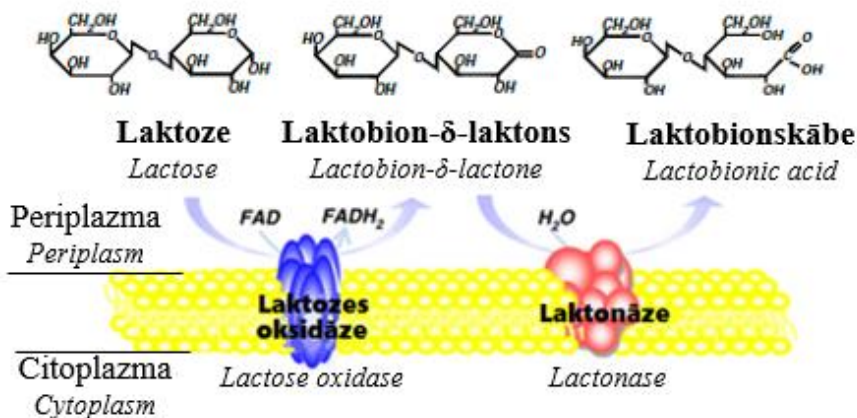
Parasti *Pseudomonas* spp. pavairo bioreaktorā vai kolbās orbitālajā kratītājā, jo maisīšana nodrošina barības vielu kontaktu šūnām un atvieglo skābekļa uzņemšanu. Tās ir jutīgas lielā sāls koncentrācijā un galējos pH, kā rezultātā samazinās to vairošanās spējas (Palleroni, Pieper & Moore, 2010). *Pseudomonas taetrolens* parasti atrod dabiski sabojājušos produktos (West, 2004).

Stodola un Lockwood bija pirmie, kas konstatēja, ka ir *Pseudomonas* ģints celmi, kuri spēj producēt laktobionskābi, oksidējot laktozi. Viņi pirmie atklāja, ka mikrobioloģiskajā ceļā ir iespējams iegūt laktobionskābi. No pētītajām 15 *Pseudomonas* ģints sugām tikai *Pseudomonas graveolens* (šodien dēvētas par *Pseudomonas taetrolens*) uzrādīja spēju oksidēt laktozi laktobionskābē. 165 stundu laikā rotējošajās mucās 75% no sākotnējās laktozes tika pārvērsti laktobionskābē (Stodola & Lockwood, 1947).

Ir veikti vairāki pētījumi, fermentējot siera sūkalas ar *Pseudomonas taetrolens*:

- ir pētīta sūkalu sausnas ietekme, atklājot, ka laktobionskābes ieguve palielinās, palielinoties sūkalu sausnas saturam. Pētījumā tika pētīti paraugi ar 5% līdz 20% sausnas saturu (Miyamoto, Ooi & Kinoshita, 2000);
- noteikts, ka *Pseudomonas taetrolens* biomasa ietekmē laktobionskābes produktivitāti. Ja sākotnēji biomasas saturs ir augstāks, tad arī laktobionskābes produktivitāte pieaug (Alonso, Rendueles & Diaz, 2013a);
- piemērota pH uzturēšana fermentācijā, ir galvenais faktors. *Pseudomonas taetrolens* vairošanās samazinās, ja pH ir mazāks par 6, un tas negatīvi ietekmē laktobionskābes iznākumu. Nelabvēlīgi *Pseudomonas taetrolens* augšanu un laktobionskābes iznākumu ietekmē arī pH virs 7 (Alonso, Rendueles & Diaz, 2013a);
- turklāt skābekļa piegāde fermentācijā, tāpat kā pH uzturēšana ir otrs faktors, kas būtiski ietekmē iznākumu. Alonso *et al.* (2012a) ir izpētījuši, ka laktobionskābes ražošanu nelabvēlīgi ietekmē pārmērīga skābekļa klātbūtne;
- papildus Alonso *et al.* (2012a) ir izpētījuši, ka liels (vairāk nekā 350 min⁻¹) maisītāja apgriezīnu skaits nelabvēlīgi ietekmē laktozes oksidāciju ar *Pseudomonas taetrolens*. Ir atklāts, ka intensīva maisīšana ražošanas procesā samazina laktobionskābes iznākumu, pat, ja baktēriju vairošanās progresē (Alonso, Rendueles & Diaz, 2012a);
- pētīts kā dažāda viļņa garumus un gaismas intensitāti var izmantot kā modeli, lai uzlabotu *Pseudomonas taetrolens* producēto enzīmu spēju laktozi konvertēt laktobionskābē, izmantojot siera sūkalas (Shu, Tseng & Jaiswal, 2017).

Laktobionskābes biotehnoloģiskās ieguves pamatā ir laktozes oksidēšana, izmantojot mikroorganismus vai specifiskus enzīmus. Galvenais reakcijas mehānisms ietver: laktobion- δ -laktona starpprodukta iegūvi, kuru tālāk hidrolizē laktobionskābē (Nakano *et al.*, 2010). *Pseudomonas spp.* sugas producē enzīmus, kuri laktozi oksidē laktobionskābē (skat. 1.8. att.), šūnu membrānas dehidrogenāze katalizē šo biotransformāciju (Alonso *et al.*, 2013b).



1.8. att. **Shematiska biokatalītiskā laktozes oksidācija laktobionskābē, izmantojot *Pseudomonas taetrolens*** (Alonso *et al.*, 2013) /
Fig. 1.8. Schematic bioconversion of lactose to lactobionic acid using *Pseudomonas taetrolens*

Laktozes dehidrogenāze katalizē laktozi laktobion- δ -laktonā, kas tālāk laktonāzes iedarbībā tiek hidrolizēts laktobionskābē. *Pseudomonas taetrolens* šūnas satur flavīna adenīna dinukleotīdu (koenzīms), kas ir cieši saistīts ar hemoproteīna elektronu pārnese sistēmu. Šis flavoproteīns, kas lokalizēts *Pseudomonas taetrolens* šūnu makrodaļiņu frakcijā, neizmanto skābekli kā tiešo elektronu akceptoru un nodrošina šūnas optimālu darbību pH 5.6. Turklāt izdalīts enzīms var oksidēt vairākas aldoses, piemēram, maltozi un glikozi. Savukārt laktonāzes optimālais pH ir 6.5 – 6.7 (Alonso *et al.*, 2013b). Reakcija notiek pH 6 un temperatūras diapazonā no 25 līdz 50 °C. Laktozes oksidācijas rezultātā var veidoties laktobionskābe vai tās sāļi. Ja tiek iegūti sāļi, tad izmanto attīrīšanu (piemēram, jonu apmaiņas hromatogrāfiju), lai iegūtu tīru laktobionskābi (Gutierrez, Hamoudi & Belkacemi, 2013).

1.4. Laktobionskābes attīrīšanas iespējas / *Possibilities of lactobionic acid purification*

Laktobionskābes ieguves metodes ar mikroorganismu un enzīmu izmantošanu ir saistītas ar sarežģītiem un dārgiem attīrīšanas procesiem, salīdzinājumā ar ķīmisko sintēzi. No ražošanas viedokļa biotehnoloģiskās metodes ir liels izaicinājums zinātniekiem, lai nodrošinātu izdevīgu un ātru laktobionskābes iegūvi, un tās būtu spējīgas konkurēt ar ķīmisko sintēzi (Alonso, Rendueles & Diaz, 2017; Gupta *et al.*, 2017; Kruschitz & Nidetzky, 2020). Attīrīšanas posmi var veidot līdz pat 50% no ražošanas izmaksām, tāpēc liela interese zinātnieku vidū ir par membrānu tehnoloģiju pielietošanu attīrīšanai (Kumar & Babu, 2008).

Attīrīšanas process galvenokārt ir atkarīgs no izmantotās metodes un substrāta sastāva (Kruschitz & Nidetzky, 2020). Gadu gaitā attīrīšanas un atdalīšanas metodes ir attīstījušās. Biotehnoloģiski iegūtās laktobionskābes attīrīšanu var īstenot ar dažādām metodēm: ekstrakciju, adsorbciju vai izgulsnēšanu, izmantojot jonu apmaiņas sveķus (Pedruzzi, Borges de Silva & Rodrigess, 2008; Illanes *et al.*, 2016). Virzot substrātu caur jonu apmaiņas sveķiem, var iegūt tīru laktobionskābi ar nenozīmīgu kalcija jonu klātbūtni. Citas tehnoloģijas: elektrodialīze (Perettia, Silveiraa & Zeni, 2009), ietvaicea un kristalizācija ir piemērotas

laktobionskābes izdalīšanai no substrāta (Jones, Vestal & Chi, 2002). Pirmais mēģinājums attīrīt fermentācijas procesā iegūto laktobionskābi bija ekstrakcija ar etanolu (Stodola & Lockwood, 1947). Etanola izmantošana ir piemērota, jo laktobionskābe etanolā nešķīst, turklāt izgulsnēšanu etanolā var veikt vairākas reizes, iegūstot pēc iespējas tīrāku laktobionskābi (Delagustin *et al.*, 2017; Armarego & Chai, 2009).

Dažu attīrīšanas metožu efektivitāte pētījumos ir apkopota 1.5. tabulā.

1.5. tabula / Table 1.5.

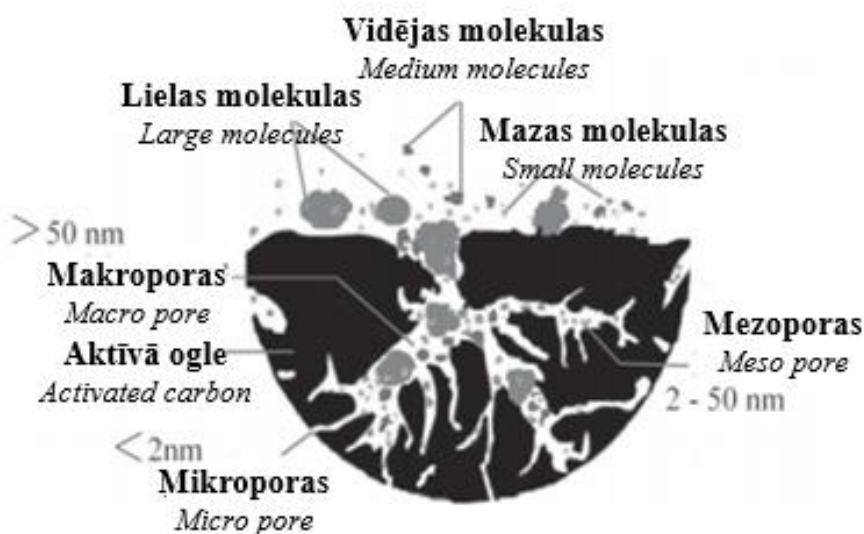
**Laktobionskābes izdalīšanas metodes /
Lactobionic acid recovery methods**

Metode / Method	Substrāts / Substrate	LBA saturs substrātā / LBA concentration, g L ⁻¹	LBA izdalīšana no substrāta / Recovery of LBA, %	Atsauce / Reference
Kristalizācija + jonu apmaiņas hromatogrāfija / Crystallization + ion exchange chromatography	Sintētisks šķīdums / Synthetic solution	200	79	Jones & Ho, 2002
Jonu apmaiņas hromatogrāfija / Ion exchange chromatography	Sintētisks šķīdums / Synthetic solution	50	100	Pedruzzi <i>et al.</i> , 2008
Jonu apmaiņas hromatogrāfija / Ion exchange chromatography	Sintētisks šķīdums / Synthetic solution	40	100	Splechna <i>et al.</i> , 2001
Apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija / Reversed phase high performance liquid chromatography	Biokonversijas substrāts / Bioconversion broth	125	100	Borges da Silva <i>et al.</i> , 2011
Elektrodialīze / <i>Electrodialysis</i>	Biokonversijas substrāts / Bioconversion broth	20	39	Peretti <i>et al.</i> , 2009

No visām attīrīšanas metodēm visefektīvākā ir jonu apmaiņas hromatogrāfija, ar tās palīdzību var iegūt tīru laktobionskābi (Alonso, Rendueles & Diaz, 2013b). Hromatogrāfijas metodes ļauj frakcionēt ogļhidrātu šķīdumu, iegūstot atsevišķus produktus ar tīrību $\geq 99\%$ (Kruschitz & Nidetzky, 2020). Bez iepriekšminēto metožu izmantošanas, var papildus lietot attīrīšanu ar aktīvo ogli. Adsorbēcija ir viena no fizikālajām metodēm, lai atdalītu izšķīdušos piemaisījumus no dažādiem šķīdumiem.

Adsorbējošā aktīvā ogle ir poraina un adsorbēcija notiek uz poru daļiņu iekšējām sienām. Aktīvās ogles poras izmēri atšķiras un tās spēj adsorbēt tikai noteikta izmēra molekulas. Aktīvā ogle efektīvāk adsorbē savienojumus, kuriem ir liela molmasa un zema šķīdība. Šo īpašību iemesls ir tāds, ka adsorbēcija vislabākā ir savienojumiem ar līdzīgu struktūru un elektronu sadalījumu. Tā kā aktīvajai oglei ir liela molmasa, tā efektīvi absorbē materiālus ar līdzīgām īpašībām. Aktīvās ogles adsorbēcija ir visefektīvākā organisko vielu atdalīšanā, ievērtējot savienojuma sastāvu (satur ūdeņraža un oglekļa atomus) (Bubanale & Shivashankar, 2017; Sulyman *et al.*, 2017).

Aktīvās ogles absorbcijas spēja galvenokārt ir atkarīga no tās struktūras, skat 1.9. attēlu (Bubanale & Shivashankar, 2017).



1.9. att. Aktīvās ogles poru izmēri (Sulyman *et al.*, 2017) /
Fig. 1.9. Pore size of activated carbon

Ievērtējot absorbcijas ar aktīvo ogli potenciālu, tālākajā laktobionskābes tehnoloģijas izstrādē šis apstrādes veids tiek pārbaudīts, efektivitātes izvērtēšanai.

1.5. Biezpiena sūkalu piemērotība laktobionskābes ieguvei / *Acid whey suitability for lactobionic acid production*

Sūkalas satur laktozi, olbaltumvielas, minerālvielas, taukus, vitamīnus, organiskās skābes un citas vielas (Mano *et al.*, 2020; Chandrapala *et al.*, 2017; Onwulata & Huth, 2008).

Sūkalas iedala divās grupās (Rojas & Torres, 2013; Газалиев и д., 2014):

- siera sūkalas – iegūst siera ražošanas procesā;
- biezpiena sūkalas – iegūst skābpiena sieru, biezpiena un kazeīna ražošanā.

Sūkalas augstās uzturvērtības dēļ tiek plaši izmantotas dažādās pārtikas rūpniecības jomās (Królczyk *et al.*, 2016), taču, tās tiek saražotas daudz vairāk, nekā tiek pārstrādātas, tāpēc tās bieži tiek novadītas kanalizācijā (Zotta *et al.*, 2020; Rocha-Mendoza *et al.*, 2021). Biezpiena sūkalu novadīšana kanalizācijā bez apstrādes rada nopietnas vides piesārņojuma problēmas, jo tām ir augsts ķīmiskais ($\sim 70\,000 \text{ mg L}^{-1}$), arī bioloģiskais skābekļa patēriņa koeficients ($\sim 40\,000 \text{ mg L}^{-1}$) (Macwan *et al.*, 2016). Sūkalu pārstrādes izmaksas ir lielas, tās ietekmē kopīgās pārstrādes izmaksas uzņēmumā, īpaši energoresursus (Macwan *et al.*, 2016). Biezpiena, kazeīna un grieķu jogurta ražošanas laikā, kā blakusprodukts tiek iegūtas sūkalas ar atšķirīgu sastāvu un kvalitātes rādītājiem (Sarenkova *et al.*, 2022). Parasti deviņus litrus sūkalas iegūst no katra saražotā produkta kilograma (Panesar *et al.*, 2010).

Sūkalu veidi atšķiras arī ar minerālvielu sastāvu un saturu. Biezpiena sūkalās to ir vairāk, jo daļa koloidālā kalcija pāriet tajās. Sūkalu sastāvs ir atkarīgs no pamatprodukta ražošanas un koncentrēšanas metodēm. Biezpiena sūkalas, salīdzinājumā ar siera sūkalām, satur lielāku sāļu saturu un mazāk olbaltumvielu (1.6. tabula), tomēr atšķirīgās ķīmiskās īpašības apgrūtina biezpiena sūkalu izmantošanu un ierobežo to tālāko pielietojumu (Mano *et al.*, 2020; Lievore *et al.*, 2015; Bédas *et al.*, 2017; Chandrapala *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2016; Nishanthi *et al.*, 2017; Brown, 2008).

Siera un biezpiena sūkalu sastāvs (Brown, 2008; Rojas & Torres, 2013; Газалиев и д., 2014; Kravtsov *et al.*, 2020) /
Sweet and acid whey composition

Sastāvdaļa / Compound	Siera sūkalas / Sweet whey	Biezpiena sūkalas / Acid whey
Sausna / Dry matter, g L ⁻¹	67.00	59.80
Olbaltumvielas / Protein, g L ⁻¹	6.20	5.80
Laktoze / Lactose, g L ⁻¹	52.90	46.90
Tauki / Fats, g L ⁻¹	0.20	0.50
Minerālvielas / Minerals, g L ⁻¹	4.10	5.40
Fosfors / Phosphorus, g L ⁻¹	0.46	0.55
Kalcijs / Calcium, g L ⁻¹	0.47	0.86
Kālijs / Potassium, g L ⁻¹	1.50	1.26
Magnijs / Magnesium, g L ⁻¹	0.08	0.09
Nātrijs / Sodium, g L ⁻¹	0.58	0.39
Hlors / Chlorine, g L ⁻¹	1.00	2.25
Vidējais pH / Average pH	5.9 (min 5.6)	4.7 (max 5.1)
Skābums / Acidity, T°	15 – 20	50 – 85
Bļivums / Density, kg m ⁻³	1018 – 1027	1019 – 1026

Sūkalas satur neolbaltumvielu slāpekli saturošus savienojumus, to vidū aminoskābes, urīnviela, purīna bāzes, kreatīns un amonjaks. Aminoskābes sūkalās rodas kā olbaltumvielu hidrolīzes produkti piena fermentācijā un brīvās aminoskābes, kuras pāriet sūkalās no piena (Газалиев и д., 2014).

Sūkalās pāriet lielākā daļa ūdenī un nedaudz arī taukos šķīstošo vitamīnu. Siera sūkalās ir mazāks ūdenī šķīstošo vitamīnu saturs, salīdzinot ar biezpiena sūkalām. Vitamīnu saturs sūkalās uzglabāšanas laikā samazinās (Газалиев и д., 2014). Vidējais vitamīnu saturs sūkalu sausnā ir attēlots 1.7. tabulā.

Vidējais vitamīnu saturs sūkalās
(Газалиев и д., 2014; Menchik *et al.*, 2019; Bleoussi *et al.*, 2020) /
The average vitamin concentration of whey

Vitamīni / Vitamins	Daudzums / Amount
Askorbīnskābe / Ascorbic acid, mg (100 g) ⁻¹	0.10 – 5.20
Tiamīns / Thiamine, mg (100 g) ⁻¹	0.04 – 0.10
Riboflavīns / Riboflavin, mg (100 g) ⁻¹	0.04 – 0.15
Piridoksīns / Pyridoxine, mg (100 g) ⁻¹	0.001 – 0.052
Folskābe / Folic acid, µg (100 g) ⁻¹	0.1– 1.2
Nikotīnskābe / Nicotinic acid, mg (100 g) ⁻¹	0.11 – 0.12
Pantotēnskābe / Pantothenic acid, mg (100 g) ⁻¹	0.25 – 0.46
Holīns / Choline, mg (100 g) ⁻¹	14 – 18
Biotīns / Biotin, µg (100 g) ⁻¹	1.51– 2.65
Kobalamīns / Cobalamin, µg (100 g) ⁻¹	0.10 – 2.90
Retinols / Retinol, IU (100 g) ⁻¹	0.01 – 0.04

Sūkalas ir B₁₂ vitamīna avots, jo pārstrādes procesos lielākā daļa B grupas vitamīnu pāriet tajās (Onwulata & Huth, 2008). Vitamīnu saturs sūkalās palielina produkta vērtību, vienlaikus ir barības vielas mikroorganismiem, sūkalas fermentējot. Biezpiena sūkalas bagātīgi satur organiskās skābes: pienskābi, citronskābi, nukleīnskābes, etiķskābi, skudrskābi, propionskābi

un sviestskābi. Pienskābe veidojas pienskābes baktēriju darbības rezultātā, fermentējot laktozi, un nedaudz sastopama arī dabīgā veidā sūkalās (Газалиев и д., 2014).

Sūkalās ir arī fermenti, kā viens no raksturīgākajiem ir laktoperoksidāze (Onwulata & Huth, 2008). Sūkalu sastāvs un īpašības ir atšķirīgas, to ietekmē arī ražotais produkts (siers, biezpiens) un paņēmieni sūkalu izdalīšanai (ultrafiltrācija, masas atsildīšana, u.c.). Tiek minēts, ka biezpiena sūkalu ražošana Eiropas Savienībā ir 40 miljoni tonnu gadā, savukārt grieķu jogurta un biezpiena ražošanā ik gadu rodas miljardiem kilogramu šī blakusprodukta. Lielais biezpiena sūkalu daudzums, ko rada piena nozare, ir izraisījis arvien plašāku izpēti par tā izmantošanas metodēm (Zotta *et al.*, 2020; Rocha-Mendoza *et al.*, 2021). Sūkalas pēc to sastāva ir bioloģiski vērtīgs produkts (Wyatt, 2014), tās izmantošana pievienotās vērtības produktos ir aktuāla ikvienam sūkalu veidam.

Turklāt laktozes lielā saturs sūkalās un lētās substrāta izmaksas veicina pētījumus par jaunu risinājumu meklēšanu, lai iegūtu pievienotās vērtības produktus laktozes atvasinājumiem, tādiem kā laktitols, laktosukroze, laktobionskābe un galakto-oligosaharīdi (Ganzle, Haase & Jelen, 2008). Viena no perspektīvākajām biezpiena sūkalu izmantošanas metodēm ir fermentācija, tā samazina biezpiena sūkalu bioloģisko skābekļa patēriņu par 90 – 95% (Rocha-Mendoza *et al.*, 2021).

Sūkalu sastāvu ietekmē sezonālitate, vasaras un ziemas periodā iegūto biezpiena sūkalu sastāva rezultāti ir apkopoti 1.8. tabulā.

1.8. tabula / Table 1.8.

**Biezpiena sūkalu sastāvs un kvalitātes rādītāji (Черников, Базарнова 2014) /
Composition and quality of acid whey**

Nosakāmais rādītājs / Parameter	Ziemā iegūtas sūkalas / Whey obtained in winter	Vasarā iegūtas sūkalas / Whey obtained in summer
Sausnas saturs / Dry matter, %	5.7 ± 0.1	6.8 ± 0.1
Olbaltumviels / Proteins, %	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Laktoze / Lactose, %	3.6 ± 0.1	4.2 ± 0.1
Skābums / Acidity, °T	58.0 ± 1.0	50.0 ± 1.0
pH	4.2 ± 0.1	4.8 ± 0.1
Kalcijs / Calcium, mg L ⁻¹	51.2 ± 2.0	70.5 ± 2.0

Iegūtie rezultāti pierāda, ka ziemā iegūtās sūkalās ir mazāks sausas, tostarp olbaltumvielu, laktozes un kalcija saturs. Ziemā iegūtās sūkalas ir skābākas nekā vasarā iegūtās (Черников & Базарнова 2014). Biezpiena sūkalām zemā pH dēļ ir nepieciešama pilnīga vai daļēja skābuma neitralizācija, lai novērstu fizikāli-ķīmisko un sensoro īpašību izmaiņas ražotajiem produktiem (Mier *et al.*, 2008; Sahar *et al.*, 2020). Sūkalu sastāva izmaiņas ir jāņem vērā arī jaunu produktu izstrādē, tostarp laktobionskābes ieguvē.

Piena pārstrādes nozares mērķis ir līdzās klasiskajiem, patērētājiem ierastajiem piena produktiem, radīt jaunus produktus ar augstu pievienoto vērtību, arī gūt ienākumus, kas iegūti no piena ražošanas blakusproduktiem, tostarp sūkalām (Mano *et al.*, 2020). Tieši zemās sūkalu izmaksas un lielā laktozes saturs tajās ir iedvesmojušas zinātniekus jaunu pārstrādes procesu izpētei vērtīgu laktozes produktu iegūšanai un to pielietošanai pārtikas, ķīmijas un farmācijas rūpniecībā (Ganzle, Haase & Jelen, 2008). Daudzi pētnieki ir mēģinājuši sūkalas pārstrādāt etanolā, pienskābē, izdalīt fosfolipīdus un lipāzes, iegūt citronskābi, glikozes-galaktozes sīrupu, galakto-oligosaharīdus, u.c. Lai plaši izmantotu šādas tehnoloģijas un ekonomiski pamatotu biezpiena sūkalu izmantošanu, ir jāturpina pētījumi, kuri sekmīgi tiek īstenoti visā pasaulē (Ramazon *et al.*, 2019; Zolnere *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 1992; Plessas *et al.*, 2007; Taskin *et al.*, 2015; Yalcin *et al.*, 2009; Arslan *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2014).

Sūkalas ir lēts izejmateriāls laktobionskābes ieguvei, kuru var īstenot ar mikroorganismu palīdzību, attīstot komerciālo ražošanu. Efektīva un ilgtspējīga laktobionskābes ieguve tiek pamatota ar *Pseudomonas taetrolens* enzimatisko potenciālu (Alonso *et al.*, 2011; 2012; 2013a;

2017; Delagustin *et al.*, 2019). Līdz šim visi veiktie pētījumi par laktobionskābes ieguvei, tiek īstenoti ar siera sūkalām. Arī publicētie zinātniskie darbi, pētījumu rezultātu apskati ir veltīti siera sūkalu kā fermentācijas substrāta izmantošanai (Giorgi *et al.*, 2018; Goderska *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2017; 2015; 2013b; 2012a; 2012b; 2011; Miyamoto *et al.*, 2000). Biezpiena sūkalu izmantošana laktobionskābes ieguvei mikrobiālajā sintēzē nav apzināta kā efektīva, baktēriju nepietiekamās vairošanas dēļ, lielā substrāta skābuma, organisko skābju un ievērojamā skābo sāļu (fosfāti un citrāti) satura dēļ. Apkopojot informāciju par sūkalu sastāvu, biezpiena sūkalām ir potenciāls, lai kļūtu par piemērotu substrātu efektīvai laktobionskābes ieguvei.

Literatūras apskata kopsavilkums

Laktobionskābes plašais potenciāls dažādās tautsaimniecības nozarēs un tā augošais pieprasījums tirgū rosina meklēt iespējas un risinājumus efektīvai šīs vielas ieguvei, lietojot izmaksu ziņā lētas, viegli pieejamas un otrreizēji pārstrādājamas izejvielas. Mūsdienās zinātnieku vidū ir aktuāli rast iespējas no lētiem izejmateriāliem ražot augstas vērtības produktus.

Komerciālā laktobionskābe tiek ražota ķīmiskā sintēzē, kuras īstenošanai nepieciešami cēlmetāla katalizatori un lieli enerģijas resursi. No visām iespējamajām laktobionskābes iegūšanas metodēm fermentatīvā oksidēšana ļauj izmantot lētākas izejvielas, piemēram, sūkalas. Ievērtējot dažādās laktobionskābes ieguves metodes, to priekšrocības un trūkumus, vislielāko interesi izraisa mikroorganismu (*Pseudomonas taetrolens*) izmantošana laktobionskābes ieguvei, jo *Pseudomonas taetrolens* darbības rezultātā iegūtie produkti ir atzīti par drošiem pārtikā, kā arī vairāki pētījumi apstiprina, ka tās spēj vairoties siera sūkalās un konvertēt laktozi laktobionskābē. Tomēr fermentatīvajā oksidēšanā svarīgs ir ne tikai fermentācijas posms, bet arī laktobionskābes izdalīšanas posms, kas šo metodi padara laikietilpīgāku nekā ķīmiskās sintēzes metodes. Izdalīšanas posmā tiek pielietotas dažādas attīrīšanas metodes (centrifugēšana, mikrofiltrācija, sublimācija, ietvaice, jonu apmaiņas hromatogrāfija, kristalizēšana, elektrodialīze, skalošana ar etanolu u.c.), lai no izmantotā substrāta izdalītu maksimāli tīru laktobionskābi.

Biezpiena sūkalu izmantošana dažādu produktu ražošanā līdz šim nav apzināta kā efektīva, lielā substrāta skābuma, organisko skābju un ievērojamā skābo sāļu (fosfāti un citrāti) satura dēļ, bet, apkopojot informāciju par biezpiena sūkalu sastāvu, *Pseudomonas taetrolens* augšanai nepieciešamajiem parametriem, esošās zināšanas un pētniecisko darbu pieredzi par biezpiena sūkalu mikrobioloģisko fermentāciju, biezpiena sūkalām ir potenciāls, lai kļūtu par piemērotu substrātu efektīvai laktobionskābes ieguvei.

Summary of literature review

Growing market demand and potential for lactobionic acid in various sectors, like the food, pharmaceutical, chemical and cosmetics industries, call for the search for opportunities and solutions for the efficient extraction of this substance using low-cost, easily accessible and recyclable raw materials. Nowadays, it is actually for researchers to search for opportunities to develop high-value compounds, such as lactobionic acid, from cheap raw materials.

*Commercial lactobionic acid is produced by chemical synthesis, which requires precious metal catalysts and large energy resources. Of all lactobionic acid obtaining methods, only enzymatic oxidation advantages use cheaper raw materials, such as whey. The use of microorganisms (*Pseudomonas taetrolens*) for the production of lactobionic acid is of the greatest interest when considering the advantages and disadvantages of the lactobionic acid production methods, because *Pseudomonas taetrolens* produced products are recognised as safe for human consumption and several studies confirm that *Pseudomonas taetrolens* converts*

lactose into lactobionic acid. However, not only the fermentation stage is important in enzymatic oxidation, but also the lactobionic acid recovery stage, which makes this method more time consuming than methods of chemical synthesis. In the recovery stage, various purification methods (centrifugation, microfiltration, freeze-drying, evaporation, ion-exchange chromatography, crystallisation, electrodialysis, precipitation with ethanol, etc.) are used to extract the maximum pure lactobionic acid from the fermented substrate.

*The use of acid whey in the production of various products has so far not been shown to be effective due to the high acidity of organic acids and acid salts (phosphates and citrates). The composition of acid whey, knowledge and research experience on microbiological fermentation of acid whey, shows that acid whey has the potential to become a suitable substrate for the efficient production of lactobionic acid with *Pseudomonas taetrolens*' ability to convert lactose into lactobionic acid.*

2. MATERIĀLI UN METODEDES / *MATERIALS AND METHODS*

2.1. Pētījuma norises laiks un vieta / *Time and place of the research*

Pētījums veikts laika posmā no 2017. gada novembra līdz 2022. gada janvārim. Eksperimenti veikti:

Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas tehnoloģijas fakultātē:

- Mikrobioloģijas zinātniskajā laboratorijā, kurā sagatavotas izejvielas un materiāli, kultivētas baktērijas, analizējamiem paraugiem noteikts pH, veikta paraugu fermentācijas izpēte, pētīta baktēriju morfoloģija.
- Piena produktu pilotažotnē, kurā iegūtas dzidrinātas sūkalas, ar termisko metodi atdalot sūkalu olbaltumvielas.
- Augļu un dārzeņu pārstrādes cehā, kurā noteikts sausnas saturs analizējamiem paraugiem.
- Procesu un iekārtu laboratorijā, kurā veikta sūkalu ietvaice.
- Zinātniskajā laboratorijā, kurā paraugi centrifugēti un svērti, lai noteiktu šūnu masu.
- Uzturzinātnes laboratorijā, kurā veikta slāpekļa savienojumu satura noteikšana.
- Dabas vielu ķīmijas zinātniskajā laboratorijā, kurā noteikta laktobionskābes un laktozes saturs analizējamajos paraugos.

Oviedo Universitātē (Spānijā):

Zinātnisko un Tehnoloģisko resursu nodaļā:

- Pārtikas tehnoloģijas laboratorijā, kurā veikta paraugu fermentēšana bioreaktoros, ietvaice, laktozes un laktobionskābes satura noteikšana, paraugu mikrofiltrācija, paraugu sublimācija, olbaltumvielu satura noteikšana.
- Citometrijas laboratorijā, kurā pētīts baktēriju fizioloģiskais stāvoklis fermentēšanas laikā.
- Pilotažotnē, kurā veikta sūkalu pasterizācija un iegūtas dzidrinātas sūkalas, ar termisko metodi atdalītas sūkalu olbaltumvielas, īstenota laktobionskābes paraugu sublimācija.

Ķīmijas un vides inženierijas katedrā:

- Bioprocusu laboratorijā, kurā veikta baktēriju audzēšana, sterilizēti priekšmeti un sagatavoti materiāli, veikta fermentācija kolbās, sūkalu mikrofiltrācija, noteikts optiskais blīvums, pH, veikta šūnu biomasas svēršana, centrifugēšana.
- Ūdens kvalitātes laboratorijā, kurā centrifugēti un kaltēti paraugi, izdalīta laktobionskābe ar jonu apmaiņas hromatogrāfiju.
- Pilotažotnē, kurā centrifugētas sūkalas un paraugiem pēc fermentācijas noteikts sausnas saturs.

2.2. Pētījumā izmantoto materiālu raksturojums / *Materials*

Pētījuma izpildei izmantotas:

- sūkalas (uzglabātas -20 °C):
 - biezpiena sūkalas (A/S “Tukuma piens”, Latvija):
Laktoze $4.47 \pm 0.02\%$; olbaltumvielas $0.38 \pm 0.01\%$, tauki $0.01 \pm 0.01\%$, sausnas saturs $4.90 \pm 0.09\%$ un pH 4.75 ± 0.01 ;
 - skābpiena siera ražošanā iegūtās sūkalas (“Ca Sanchu”, Asturias, Spānija):
Laktoze $5.6 \pm 0.13\%$; olbaltumvielas $0.23 \pm 0.08\%$, tauki $0.01 \pm 0.01\%$, sausnas saturs $5.92 \pm 0.08\%$ un pH 4.67 ± 0.01 ;
 - siera sūkalas (“ILAS S.A.”, Asturias, Spānija):

Laktoze $6.2 \pm 0.12\%$; olbaltumvielas $0.12 \pm 0.03\%$, tauki $0.01 \pm 0.01\%$, sausas saturs $6.44 \pm 0.05\%$ un pH 6.34 ± 0.01 .

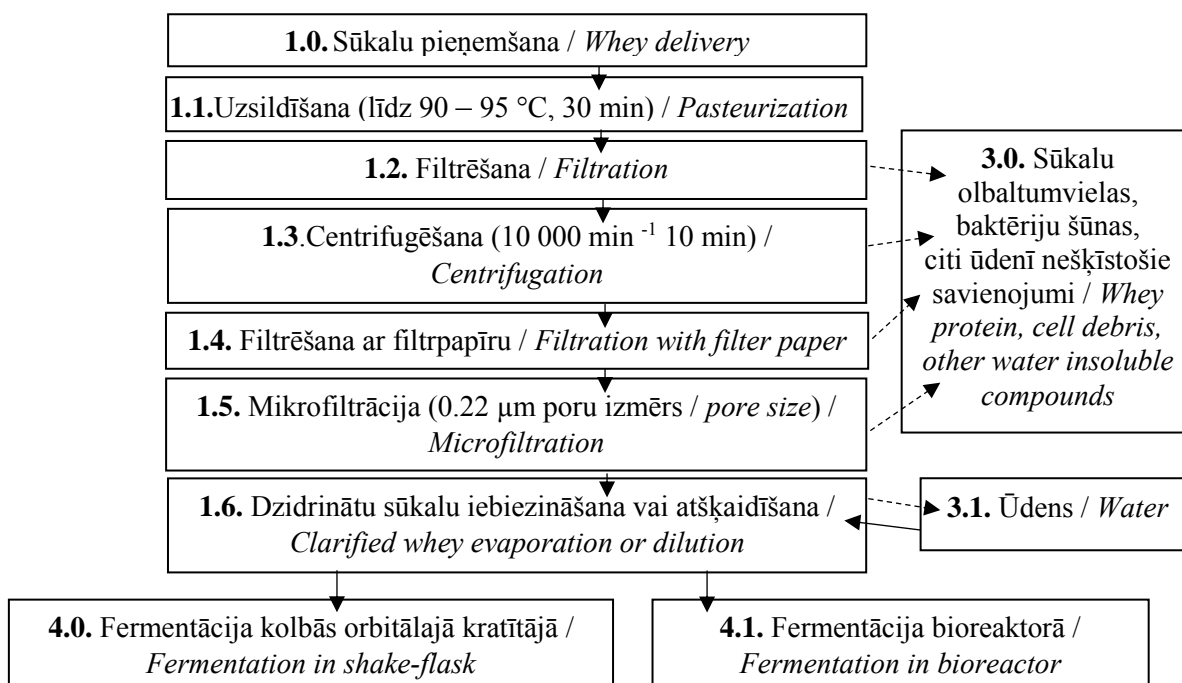
- *Pseudomonas taetrolens*, kuras iegādātas stikla ampulās sublimētā veidā 40% glicerolā, uzglabāšanas apstākļi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Baktērijas gaišas krāsas ar dzeltenu nokrāsu. Optimālā augšanas temperatūra $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pētījumiem lietotie celmi:
 - LMG 2336 (the Belgian Coordinated Collection of Microorganisms, Beļģija);
 - NCIB 9396 (England National Collection of Type Cultures, Anglija);
 - DSM 21104 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Vācija).

Pētījuma īstenošanai izmantotie reaģenti apkopoti 1. pielikumā.

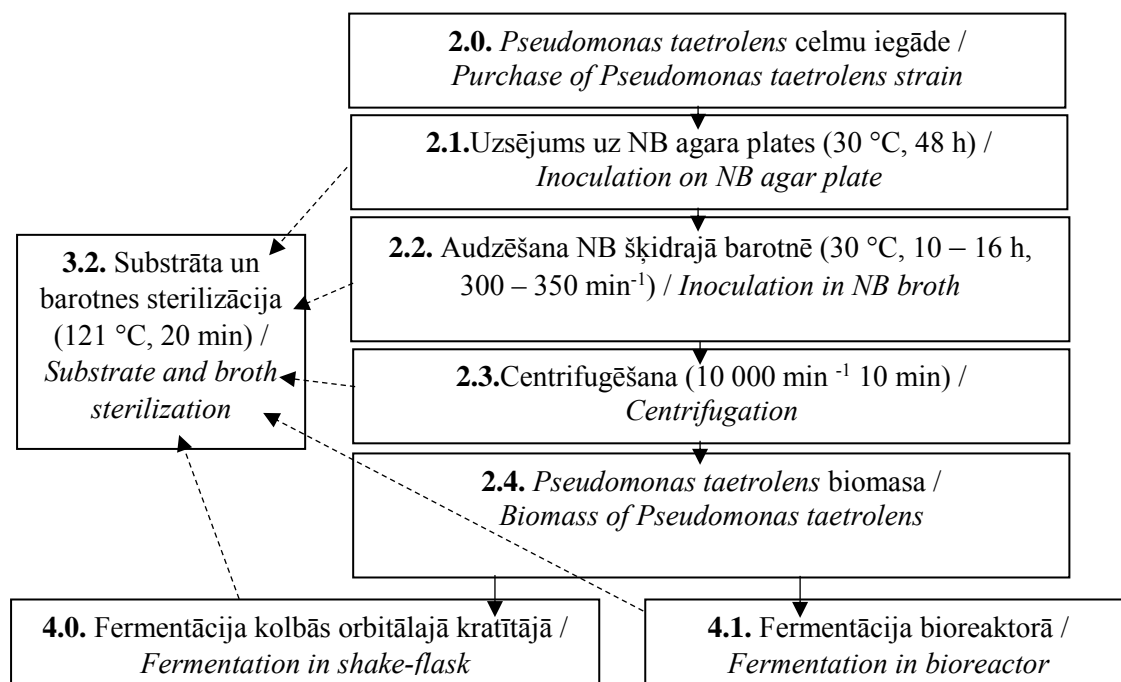
2.3. Laktobionskābes ieguves tehnoloģija / *Lactobionic acid production technology*

Laktobionskābes ieguves shēma ir attēlota 2.1. attēlā, bet procesa vizualizācija attēlota 2. un 3. pielikumā.

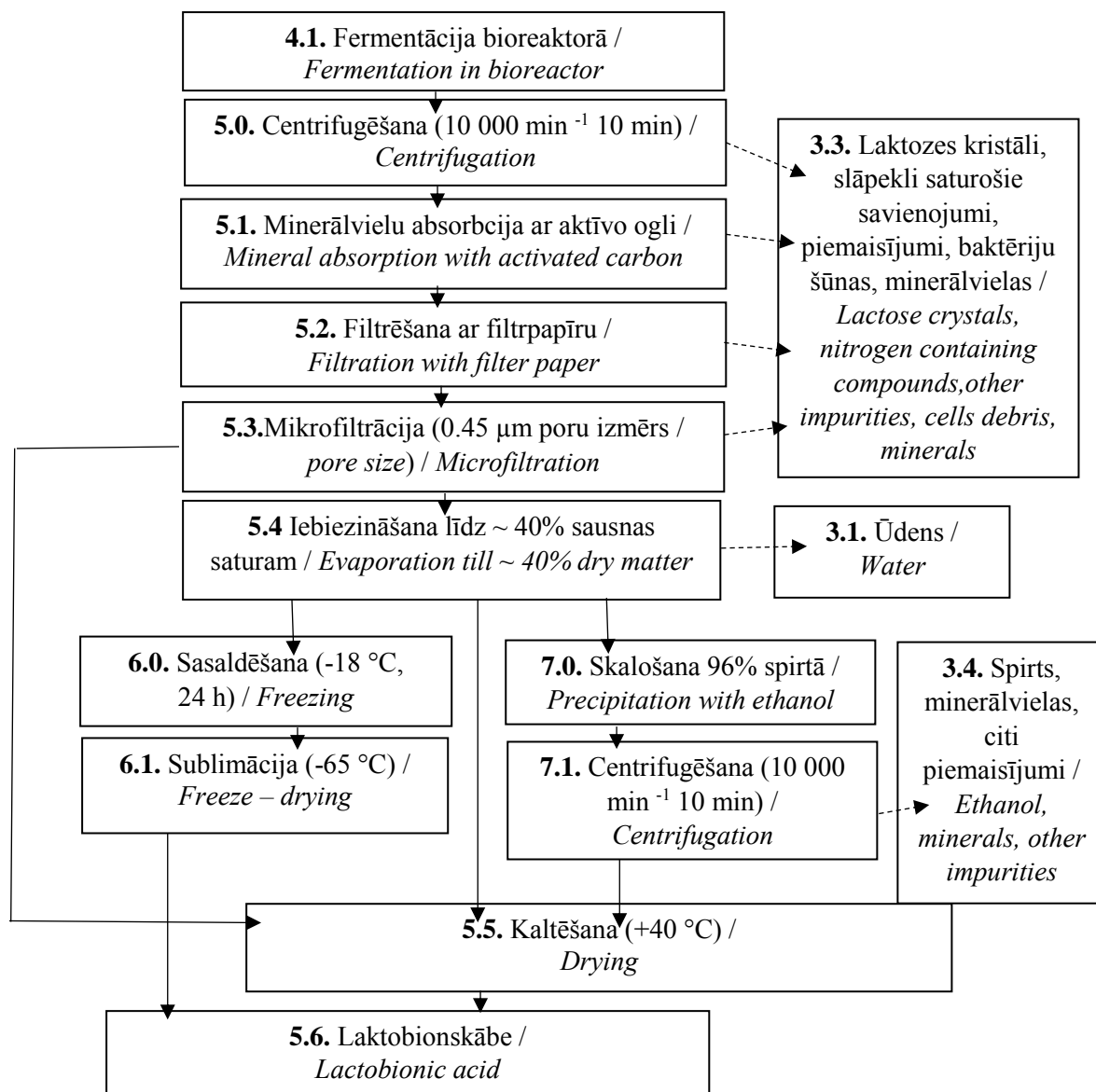
(a) Sūkalu apstrāde un sagatave fermentācijai.



(b) *Pseudomonas taetrolens* uzsēšana un sagatave fermentācijai.



(c) Laktobionskābes ieguve pēc fermentācijas.



2.1. att. Laktobionskābes ieguves shēma: (a) sūkalu apstrāde un sagatave fermentācijai; (b) *Pseudomonas taetrolens* uzsēšana un sagatave fermentācijai; (c) laktobionskābes ieguve /

Fig. 2.1. Lactobionic acid production: (a) whey treatment and preparation for fermentation; (b) Pseudomonas taetrolens inoculation and preparation for fermentation; (c) lactobionic acid recovery

Laktobionskābes ieguves process sākas ar sūkalu apstrādi. Sūkalas uzkaršē līdz 90 – 95 °C un iztur 30 minūtes, veicinot sūkalu olbaltumvielu denaturāciju (2.2. att.).



2.2. att. Sūkalu olbaltumvielu denaturācija, karsējot /
Fig. 2.2. Protein denaturation process by heating

Sūkalu olbaltumvielas atdala filtrējot. Dzidrinātas sūkalas filtrē caur filtrpapīru (poru izmērs ~ 2 μm) un mikrofiltrācijas ierīci, kas aprīkota ar 0.22 μm poru polivinilidēna difluorīda (PVDF) membrānu (Millipore, Masačūsetsa, ASV), dzidrinātu sūkalu ieguvei un baktēriju un dažādu citu piemaisījumu atdalīšanai (2.3. att.). Dzidrinātas sūkalas tiek pildītas sterilā stikla traukā, lai izvairītos no ārējā vides piesārņojuma un iegūtu tīru substrātu.



2.3. att. Sūkalu mikrofiltrācija ar PVDF membrānām /
Fig. 2.3. Whey microfiltration with PVDF membranes

Pseudomonas taetrolens celmu sagatavošana uzsējumiem. Pirms eksperimenta tiek uzsētas baktērijas, lai eksperimenta laikā baktēriju biomasa būtu svaiga un aktīva. Visus sagatavošanas procesus veic ar sterilām vielām un materiāliem, kas sterilizēti autoklāvā 121 °C temperatūrā 20 minūtes, kā arī paraugu sagatavošanu (sūkalas, baktērijas) fermentācijai veic sterilā vidē – laminārā skapī, lai pētāmajos paraugos neiekļūtu citi mikroorganismi. Baktērijas ar cilpas palīdzību tiek ienestas NB barotnē (sastāvs 20 g L⁻¹ bioloģiskais agars, 5 g L⁻¹ NaCl, 5 g L⁻¹ peptons, 2 g L⁻¹ rauga un 1 g L⁻¹ gaļas ekstrakts). Agara plati inkubē 30 °C temperatūrā 48 h.

Pēc inkubācijas no agara plates (2.4. attēls) ar cilpiņu (10 μL tilpums) baktērijas tiek pārnestas 500 mL kolbā, kurā ir 100 mL šķidrā NB barotne (sastāvs 5 g L^{-1} NaCl, 5 g L^{-1} peptons, 2 g L^{-1} rauga un 1 g L^{-1} gaļas ekstrakts).



2.4. att. *Pseudomonas taetrolens* LMG 2336 kolonijas NB agarā /
Fig. 2.4. *Pseudomonas taetrolens* LMG 2336 collonies on NB agar

Barotni inkubē orbitālajā kratītājā (New Brunswick Sci., NJ. USA vai ES-20, Biosan, Latvija) 30 °C temperatūrā 10 – 16 h, parauga maisīšanas intensitāte 220 – 350 min^{-1} . Pēc inkubācijas substrātu salej sterilos konusveida trauciņos (2.5. attēls) un centrifugē 10 000 min^{-1} 10 min, lai nostādinātu izaugušās *Pseudomonas taetrolens* šūnas.



2.5. att. **Substrāta centrifugēšana** /
Fig. 2.5. *Centrifugation of substrate*

Atdalītās baktērijas pievieno dzidrīnātām sūkalām. Ja eksperimentā izmanto koncentrētas sūkalas, tās ietvaicē „Rising Film evaporator FT22” (Armfield, Anglija) iekārtā. Pirms fermentācijas procesa dzidrīnāto sūkalu sastāvs tiek analizēts ar MilcoScanTM Mars (Foss, Denmark) vai augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju.

Eksperimentam sagatavotie paraugi tiek fermentēti kolbās, izmantojot orbitālo kratītāju, vai Bio Flo 110 (New Brunswick Scientific, NJ, ASV) bioreaktorā (2.6. attēls). 500 mL kolbās iepilda 100 mL pētāmā parauga, bet bioreaktoros 1 litru pētāmā parauga.



2.6. att. **Fermentācijas process bioreaktoros** (Bio Flo 110, New Brunswick Scientific, ASV)
/ Fig. 2.6. Fermentation in bioreactors

Veiktā eksperimenta detalizētāks izklāsts ir apkopots 2.1. tabulā.

Pēc fermentēšanas procesa norises kolbās paraugiem netika īstenoti attīrīšanas un laktobionskābes izdalīšanas posmi nepietiekamā analizējamā parauga apjoma dēļ. Pēc fermentēšanas procesa norises bioreaktoros paraugi attīrīti, centrifugējot, filtrējot caur filtpapīru un veicot minerālvielu absorbciju ar aktīvo ogli, mikrofiltrējot (0.45 μm poru izmērs), lai iegūtu gaišu, caurspīdīgu produktu (2.7. attēls).



2.7. att. **Mikrofiltrācijas process** /
Fig. 2.7. Process of microfiltration

Laktobionskābes izdalīšanai izmantoja vairākas metodes: sublimāciju (2.8. attēls), skalošanu ar 96% etilspirtu un paraugu kaltēšanu.



2.8. att. **Sublimācijas process /**
Fig. 2.8. Process of freeze-drying

Sublimācijai izmanto iebiezinātu paraugu (~ 40% sausnas saturs). Paraugs ir iepildīts ~ 100 – 200 mL tilpumā 500 mL kolbās. Kolbas ar paraugu tika uzglabātas saldētavā (-18 °C, diennakti, lai produkts pilnībā sasalst). Kolbās esošais paraugs tika kaltēts vakuumā -65 °C temperatūrā līdz sausu, birstošu kristālu iegūšanai (Telstar cryodos – 80, Model 2007, Spānija).

Parauga kaltēšanas procesu izmantoja iebiezinātu paraugu, arī mikrofiltrētu paraugu tālākai apstrādei. Abus paraugus plānā slānī (līdz 3 mm) kaltēja termostatā 40 °C temperatūrā.

Skalošanai ar etanolu izmantoja iebiezinātu sūkalu paraugu (~ 40% sausnas saturs). Iebiezinātam paraugam pievieno etilspirtu un maisa, lai kristalizējas paraugā esošā laktobionskābe, pēc tam paraugu centrifugē $10\,000\text{ min}^{-1}$ 10 min, lai izdalītu laktobionskābes kristālus. Suspensiju nolej, bet kristālus kaltē 40 °C temperatūrā termostatā.

2.1. tabula / Table 2.1.

Pētījuma ietvaros veikto eksperimentu kopsavilkums / Summary of experiments

Sērija / Series	Eksperimenta nosaukums / Title of experiment	Substrāts / Substrate	<i>Pseudomonas taetrolens</i> celmi / strains	Biomases daudzums, / Amount of biomass, % (v v ⁻¹)*	Fermentācijas norise / Fermentation process	Apraksts / Description	Paraugu apzīmējums / Sample designation	Apzīmējumu skaidrojums / Explanation of designation
a	pH ietekme laktobionskābes ieguvē / Effect of pH on lactobionic acid production	Biezpiena sūkalas / Acid whey	NCIB 9396, DSM 21104	4	Kolbās / Shake-flask	Fermentācijas process veikts 30 °C, 48 h ar maisīšanu 220 min ⁻¹ . Fermentācijas sākumā pH iebiezinātos (30±1 % sausnas) sūkalu paraugos stabilizēts ar 6 M NaOH. / The fermentation process was performed at 30 °C for 48 h with stirring at 220 min ⁻¹ . At the beginning of the fermentation, the pH of the concentrated (30 ± 1% dry matter) whey samples was adjusted with 6 M NaOH. Substrāta sastāvs / Content of substrate: laktoze / lactose 26.12 ± 0.12%; tauki / fat 0.01 ± 0.01%, olbaltumvielas / protein 0.48 ± 0.02%, pH 4.25 ± 0.01. Eksperimentā tika izlaisti 1.3. un 1.5. substrāta sagatavošanas posmi un 5.0 – 5.5., 6., 7. un 8. attīrīšanas posmi / Substrate preparation steps 1.3 and 1.5. and purification steps 5.0 to 5.5, 6, 7 and 8.were omitted from the experiment	0N, 1N, 2N, 3N, 4N, 5N, 0D, 1D, 2D, 3D, 4D, 5D, Kontrolē	Skaitlis pie parauga apzīmējuma ir sākotnējais substrāta pH / The number next to the sample designation is the initial pH value of the substrate: 0 = pH 4.25 1 = pH 5.0 2 = pH 5.5 3 = pH 6.0 4 = pH 6.5 5 = pH 7.0 Burts apzīmē lietoto baktēriju celmu / The letter indicates the strain of bacteria: N = NCIB 9396; D = DSM 21104 Kontrolē = paraugs, kuram nav pievienotas baktērijas / sample with no bacteria added.
b	Sūkalu sausnas ietekme laktobionskābes ieguvē / Effect of whey solids on lactobionic acid production	Biezpiena sūkalas / Acid whey	NCIB 9396, DSM 21104	2	Kolbās / Shake-flask	Fermentācijas process veikts 30 °C, 48 h ar maisīšanu 220 min ⁻¹ / The fermentation process was performed at 30 °C for 48 h with stirring at 220 min ⁻¹ Substrāta sastāvs / Content of substare: laktoze / lactose 4.47 ± 0.02%, olbaltumvielas / protein 0.38 ± 0.01%, tauki / fat 0.01 ± 0.01%, kopējais sausnas saturs / total soli content 4.90 ± 0.09%, pH 4.75 ± 0.01. Substrāta paraugi tika iebiezināti līdz dažādiem sausnas saturiem / Substrate concentration: 5%, 10%, 20%, 30% un 40%. Eksperimentā tika izlaisti 1.3. un 1.5. substrāta sagatavošanas posmi un 5.0 – 5.5., 6., 7. un 8. attīrīšanas posmi / Substrate preparation steps 1.3 and 1.5. and purification steps 5.0 to 5.5, 6, 7 and 8.were omitted from the experiment	N 5%, N 10%, N 20%, N 30%, N 40%, D 5%, D 10%, D 20%, D 30%, D 40%.	Burts apzīmē baktēriju celmu / The letter indicates the strain of bacteria: N = NCIB 9396; D = DSM 21104 Skaitļi 5%, 10%, 20%, 30%, 40% apzīmē sūkalu sausnas saturu paraugā / Numbers indicates concentration of whey

2.1. tabulas turpinājums / Continuation of Table 2.1.

Sērija / Series	Ekspierimenta nosaukums / Title of experiment	Substrāts / Substrate	<i>Pseudomonas taetrolens</i> celmi / strains	Biomasa daudzums, / Amount of biomass, % (v v ⁻¹)*	Fermentācijas norise / Fermentation process	Apraksts / Description	Paraugu apzīmējums / Sample designation	Apzīmējumu skaidrojums / Explanation of designation
c	Dažādu sāļu ietekme laktobionskābes ieguvē / Effect of different salts on lactobionic acid production	Biezpiena sūkalas / Acid whey	NCIB 9396, DSM 21104	2	Kolbās / Shake-flask	Fermentācijas process veikts 30 °C, 48 h ar maisīšanu 230 min ⁻¹ / The fermentation process was performed at 30 °C for 48 h with stirring at 230 min ⁻¹ Substrāta sastāvs / Content of substrate: laktoze / lactose 8.49 ± 0.12%; tauki / fat 0.01 ± 0.01%, olbaltumvielas / protein 0.88 ± 0.03%, kopējais sausnas saturs / total solid content 10.09 ± 0.81%, pH 4.29 ± 0.01. Substrātam pievienoti šādi sāļi / Salts added to substrate: MgSO ₄ , MnSO ₄ , K ₂ HPO ₄ Ekspierimentā tika izlaisti 1.3. un 1.5. substrāta sagatavošanas posmi un 5.0 – 5.5., 6., 7. un 8. attīrīšanas posmi / Substrate preparation steps 1.3 and 1.5. and purification steps 5.0 to 5.5, 6, 7 and 8. were omitted from the experiment	NMg1, NMg2, NMg3, NMn1, NMn2, NMn3, NK1, NK2, NK3, N-kontrolle, DMg1, DMg2, DMg3, DMn1, DMn2, DMn3, DK1, DK2, DK3, D-kontrolle	Kontrolle = paraugs bez sāļu pievienošanas / sample with no salt added; Burts apzīmē baktērijas celmu / The letter indicates the strain of bacteria: N = NCIB 9396 D = DSM 21104 Burts līdzās baktēriju celmam apzīmē pievienoto sāļu katjonu / The letter indicates added salt cation: Mg = MgSO ₄ ; Mn = MnSO ₄ ; K = K ₂ HPO ₄ Skaitlis norāda pievienotās vielas koncentrāciju / The number indicates concentration of substance added: 1 = 0.01%; 2 = 0.005%; 3 = 0.001%
d	Dažādas izcelsmes sūkalu fermentēšanas salīdzinājums kontrolētā un nekontrolētā pH kolbās un bioreaktorā / Comparison of different whey fermentation at controlled and uncontrolled pH in flasks and bioreactor	Biezpiena sūkalas, Siera sūkalas / Acid whey, sweet whey	LMG 2336	10	Bioreaktorā un kolbās / Bio-reactor and shake-flask	Fermentācijas process veikts bioreaktorā 30 °C, 72 h ar maisīšanu 350 min ⁻¹ un pievadot 1.5 L min ⁻¹ O ₂ . Fermentācijas process veikts kolbās 30 °C, 72 h ar maisīšanu 350 min ⁻¹ / The fermentation process was performed in bioreactor at 30 °C for 72 h with stirring at 350 min ⁻¹ and 1.5 L min ⁻¹ O ₂ . The fermentation process was performed in shake-flask (30 °C for 72 h and stirring at 350 min ⁻¹). Siera sūkalu substrāta sastāvs / Content of sweet whey: laktoze / lactose 6.2 ± 0.12%; tauki / fat 0.01 ± 0.01%, olbaltumvielas / protein 0.12 ± 0.03%, pH 6.34 ± 0.01 Biezpiena sūkalu substrāta sastāvs / Content of acid whey: laktoze / lactose 5.6 ± 0.13%; tauki / fat 0.01 ± 0.01%, olbaltumvielas / protein 0.23 ± 0.08%, pH 4.67 ± 0.01.. Ekspierimentā veikti visi posmi, izņemot 7. un 8. posmu, ar sublimāciju iegūstot laktobionskābes kristālus / All steps were performed in the experiment (except steps 7 and 8) to obtain lactobionic acid by freeze-drying	SF1, SF2, SB1, SB2, AF1, AF2, AB1, AB2	Burtu apzīmējumi / The letter indications: S= siera sūkalu paraugi / sample with sweet whey; A = biezpiena sūkalu paraugi / sample with acid whey; F = fermentācija kolbā / fermentation in shake-flask; B = fermentācija bioreaktorā / fermentation in bioreactor. Skaitļu apzīmējumi / The number indications: 1 = pH kontrolēts tikai fermentācijas sākumā / pH was controlled only at the beginning of fermentation; 2 = pH stabilizēts līdz 6.5 visā fermentācijas laikā / The pH was stabilized to 6.5 during fermentation

2.1. tabulas turpinājums / Continuation of Table 2.1.

Sērija / Series	Ekspierimenta nosaukums / Title of experiment	Substrāts / Substrate	<i>Pseudomonas taetrolens</i> celmi / strains	Biomasa daudzums, / Amount of biomass, % (v/v)*	Fermentācijas norise / Fermentation process	Apraksts / Description	Paraugu apzīmējums / Sample designation	Apzīmējumu skaidrojums / Explanation of designation
e	Dažādas izcelsmes sūkalu kombināciju pārbaude laktobionskābes ieguvei / Comparison of different whey for lactobionic acid production	Biezpiena sūkalas, siera sūkalas / Acid whey, sweet whey	LMG 2336	10	Bio-reaktorā / Bio-reactor	Fermentācijas process veikts 30 °C, 48 h ar maisīšanu 350 min ⁻¹ un pievadot 1.5 L min ⁻¹ O ₂ . Visiem paraugiem nepārtraukti fermentēšanas laikā ar 6 M NaOH stabilizēts līdz pH 6.5. / The fermentation process was performed at 30 °C for 48 h with stirring at 350 min ⁻¹ and 1.5 L min ⁻¹ O ₂ . All samples were adjusted to pH 6.5 with 6 M NaOH during fermentation Siera sūkalu substrāta sastāvs / Content of sweet whey: laktoze / lactose 6.10 ± 0.11%; tauki / fat 0.01 ± 0.01%, olbaltumvielas / protein 0.09 ± 0.01%, pH 6.17 ± 0.01 Biezpiena sūkalu substrāta sastāvs / Content of acid whey: laktoze / lactose 5.3 ± 0.03%; tauki / fat 0.01 ± 0.01%, olbaltumvielas / protein 0.17 ± 0.09%, pH 4.46 ± 0.01. Ekspierimentā tika izlaisti 5.0 – 5.5., 6., 7. un 8. attīrīšanas posmi/ Purification steps 5.0 - 5.5, 6, 7 and 8 were omitted in the experiment	A75S25, A25S75, A50S50	Burti apzīmē / The letter indications: A = biezpiena sūkalas / acid whey; S = siera sūkalas / siera sūkalas. Skaitļi norāda siera un biezpiena sūkalu attiecības substrātā attiecīgi 25%, 50% vai 75%. / The numbers indicate the ratio of sweet and acid whey in the substrate: 25%, 50% or 75% respectively
f	Laktobionskābes ieguve, atkārtoti pievienojot baktēriju biomasu / Production of lactobionic acid by re-addition of bacterial biomass	Biezpiena sūkalas / Acid whey	LMG 2336	10, 30	Bio-reaktorā / Bio-reactor	Fermentācijas process veikts 30 °C, 72 h ar maisīšanu 350 min ⁻¹ un pievadot 1.5 L min ⁻¹ O ₂ . Visiem paraugiem fermentēšanas laikā ar 6 M NaOH stabilizēts pH līdz 6.5./ The fermentation process was performed at 30 °C for 72 h with stirring at 350 min ⁻¹ and 1.5 L min ⁻¹ O ₂ . All samples were adjusted to pH 6.5 with 6 M NaOH during fermentation Substrāta sastāvs / Content of substrate: pH 4.57 ± 0.06, laktoze / lactose 4.2 ± 0.14%, olbaltumvielas / protein 0.14 ± 0.04%, tauki / fat 0.01 ± 0.01%. Ekspierimentā izpildīti visi laktobionskābes tehnoloģiskajā shēmā (2.1. attēls) ietvertie posmi, iegūstot laktobionskābes kristālus un/vai sirupveidīgu masu / All the steps (Figure 2.1) were performed, obtaining lactobionic acid product	AW1, AW2	AW1 = biezpiena sūkalu paraugam pievienota 10% baktēriju biomasa Inokulācija veikta tikai fermentācijas procesa sākumā / Acid whey was inoculated with 10% (v/v) inoculum at the beginning of the fermentation process; AW2 = biezpiena sūkalu paraugā pievienota 10% baktēriju biomasa fermentācijas procesa sākumā, pēc 12 un 24 fermentācijas stundām/ Acid whey was inoculated with 10% (v/v) inoculum at the beginning of the experiment, with 10% (v/v) inoculum at 12 h and with 10% (v/v) inoculum at 24 h after fermentation started

* Biomasa iznākums parāda baktēriju audzi šķidrās barotnes tilpumā (mL), pievienojot 100 mL fermentējamā substrāta / The biomass yield shows the growth of bacteria in a defined volume of liquid medium (mL) by adding 100 mL of fermentable substrate.

Pēc fermentācijas procesa (2.1. tabula f sērija) izpildes substrāts tika novirzīts uz laktobionskābes attīrīšanas un izdalīšanas posmiem, skatīt 2.2. tabulu.

2.2. tabula / Table 2.2.

**Pētāmajos paraugos pielietotie laktobionskābes attīrīšanas un izdalīšanas posmi /
Lactobionic acid purification and recovery steps used in the test samples**

Parauga kods / Sample code	Centrifugēšana / Centrifugation	Minerālvielu absorbcija ar aktīvo ogli / Mineral absorption with activated carbon	Filtrēšana un mikrofiltrācija / Filtration and microfiltration	Iebiezināšana / Evaporation	Skalošana ar 96% etilspirtu / Precipitation with ethanol	Kaltēšana / Drying	Sublimācija / Freeze-drying
A	✓	✓	✓	-	-	✓	-
B	✓	✓	✓	✓	-	✓	-
C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
D	✓	✓	✓	✓	-	-	✓

✓ – lietotā attīrīšanas un izdalīšanas metode laktobionskābi saturošam paraugam

Laktobionskābes ieguves dažādos posmos noteikti un kontrolēti 2.3. tabulā apkopotie parametri.

2.3. tabula / Table 2.3.

Nosakāmie un kontrolētie parametri laktobionskābes ieguvē / Determinable and controlled parameters of lactobionic acid production

Procesa posms* / Stage of the process	Nosakāmie un kontrolējamie parametri / Determined and controlled parameters	Sērija** / Series
1.	Sausnas saturs / Content of total solids, %	a,b,c,d,e,f
	pH	a,b,c,d,e,f
	Laktozes saturs / Concentration of lactose, %	a,b,c,d,e,f
	Tauku saturs / Concentration of fat, %	a,b,c,d,e,f
	Olbaltumvielu saturs / Concentration of protein, %	a,b,c,d,e,f
	Temperatūra / Temperature, °C	a,b,c,d,e,f
1.1.	Temperatūra / Temperature, °C	a,b,c,d,e,f
	Laiks / Time, h	a,b,c,d,e,f
1.3.	Laiks / Time, min	d,e,f
	Maisīšanas intensitāte / Intensity of stirring, min ⁻¹	d,e,f
1.5.	Spiediens / Pressure, Pa	d,e,f
1.6.	Laktozes saturs / Concentration of lactose, g L ⁻¹	a,b,c,d,e,f
	pH	a,b,c,d,e,f
	Olbaltumvielu saturs / Concentration of protein, g L ⁻¹	a,b,c,d,e,f
	Sausnas saturs / Content of total solids, %	a,b,c,d,e,f

2.3. tabulas turpinājums / Continuation of Table 2.3.

Procesa posms* / Stage of the process	Nosakāmie un kontrolējamie parametri / Determined and controlled parameters	Sērija** / Series
2.1.	Temperatūra / Temperature, °C	a,b,c,d,e,f
	Laiks / Time, h	a,b,c,d,e,f
2.2.	Temperatūra / Temperature, °C	a,b,c,d,e,f
	Laiks / Time, h	a,b,c,d,e,f
	Maisīšanas intensitāte / Intensity of stirring, min ⁻¹	a,b,c,d,e,f
2.3.	Laiks / Time, min;	a,b,c,d,e,f
	Maisīšanas intensitāte / Intensity of stirring, min ⁻¹	a,b,c,d,e,f
3.2.	Temperatūra / Temperature, °C	a,b,c,d,e,f
	Laiks / Time, h	a,b,c,d,e,f
4.	Laktobionskābes saturs / Concentration of lactobionic acid, g L ⁻¹	a,b,c,d
	Laktozes saturs / Concentration of lactose, g L ⁻¹	a,b,c,d
	pH	a,b,c,d
	Temperatūra / Temperature, °C	a,b,c,d
	Šūnu masa / Dry cell weight, g L ⁻¹	c,d
	Dzīvotspējīgo šūnu skaita noteikšana / Content of viable cells, KVV / CFU 1 mL ⁻¹	a,b,c
	Optiskais blīvums / Optical density, 600 nm	d
	Tilpums / Volume, mL	a,b,c,d
	Laiks / Time, h	a,b,c,d
4.1.	Laktobionskābes saturs / Concentration of lactobionic acid, g L ⁻¹	d,e,f
	Laktozes saturs / Concentration of lactose, g L ⁻¹	d,e,f
	pH	d,e,f
	Temperatūra / Temperature, °C	d,e,f
	Šūnu masa / Dry cell weight, g L ⁻¹	d,e,f
	Dzīvotspējīgo šūnu skaits / Content of viable cells, KVV / CFU mL ⁻¹	f
	Baktēriju fizioloģiskais stāvoklis (metaboli aktīvas, bojātas un mirušas šūnas) / Physiological status of bacteria (metabolite active, damaged and dead cells), %	f
	Šūnu optiskais blīvums / Optical density, 600 nm	d,e,f
	Izšķīdušā skābekļa saturs / Dissolved oxygen tension, %	d,e,f
5.	Apgriezienu skaits / Rotation, min ⁻¹	d,f
	Laiks / Time, min	d,f
5.1.	Krāsas intensitāte CIE L*a*b* krāsu sistēma / Intensity of color	d
5.4.	Sausnas saturs / Content of total solids, %	d,f
5.5.	Temperatūra / Temperature, °C	f

2.3. tabulas turpinājums / *Continuation of Table 2.3.*

Procesa posms* / <i>Stage of the process</i>	Nosakāmie un kontrolējamie parametri / <i>Determined and controlled parameters</i>	Sērija** / <i>Series</i>
5.6.	Krāsas intensitāte CIE L*a*b* krāsu sistēmā / <i>Intensity of color</i>	f
	Laktozes saturs / <i>Concentration of lactose, g L⁻¹</i>	e,f
	Laktobionskābes saturs / <i>Concentration of lactobionic acid, g L⁻¹</i>	e,f
	pH	f
	Šķīdība ūdenī / <i>Solubility in water, s</i>	f
	Olbaltumvielu saturs / <i>Concentration of protein, %</i>	e,f
6.	Temperatūra / <i>Temperature, °C</i>	d,f
	Laiks / <i>Time, h</i>	d,f
6.1.	Temperatūra / <i>Temperature, °C</i>	d,f
	Laiks / <i>Time, h</i>	d,f
7.	Tilpums / <i>Volume, mL</i>	f
7.1.	Apgrīzību skaits / <i>Rotation, min⁻¹</i>	f
	Laiks / <i>Time, min</i>	f

*Procesa posmi norādīti 2.1. attēlā / *Stage of process is shown in Fig. 2.1;*

** Eksperimentu plānojums 2.1. tabulā. Katram eksperimentam ir piešķirts sērijas apzīmējums / *Experimental design is shown in Table 2.1. Each experiment has an assignment series.*

2.4. Pētījumā izmantotās analīžu metodes / *Methods of research***pH noteikšana**

pH noteikšana veikta atbilstoši LVS ISO 5546:2010 „Kazeīni un kazeināti – pH noteikšana (References metode)” standarta metodikai. pH noteikšanu paraugiem veica piecos atkārtojumos, aprēķinot vidējo vērtību. Noteikšanai lietoja pH metru „WTW series inolab” (Vācija) vai “InLab® Expert Pro-ISM” (METTLER TOLEDO, Šveice) ar mērījuma kļūdu $\text{pH} \pm 0.001$. pH metru kalibrē ar kalibrācijas šķīdumiem pH 10.00, pH 7.00 un pH 4.01.

Sausnas satura noteikšana

Sausnas satura noteikšana paraugiem veikta atbilstoši LVS 249:2000 standartam „Cukuri - Analīžu metodes - Kopīgās sausas noteikšana (Refraktometriskā metode)”.

Sausnas satura noteikšanai izmantoja refraktometru „Kruss” (Vācija) vai “WYA-15 ABBE Refractometer” (Spānija). Refraktometrus pirms mērījuma kalibrē ar dejonizētu ūdeni. Sausnas satura noteikšanu veic piecos atkārtojumos, aprēķinot vidējo vērtību. Iekārtas mērījuma kļūda ir $\pm 0.1\%$.

Laktobionskābes un laktozes satura noteikšana

Pirms laktobionskābes un laktozes satura noteikšanas visi paraugi tiek attīrīti no piemaisījumiem un baktēriju šūnām. Paraugus centrifugē $10\ 000\ \text{min}^{-1}$ 10 min. Pēc centrifugēšanas suspensiju attīra, filtrējot to caur $0.45\ \mu\text{m}$ membrānfiltru, un filtrātu analizē tālāk. Laktozes un laktobionskābes satura noteikšanai izmantota augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija (AEŠH), lietojot:

1. Agilent 1200, Agilent Technologies Inc.(CA,USA) laktozes un laktobionskābes satura noteikšanai.

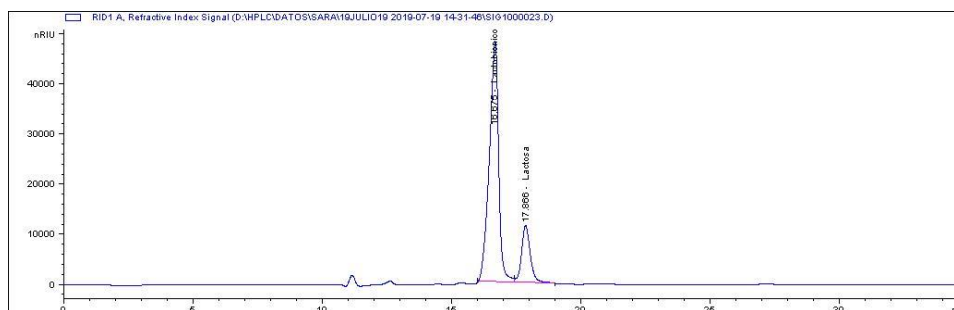


2.9. att. Laktozes un laktobionskābes noteikšana ar Agilent 1200 šķidruma hromatogrāfu / Fig. 2.9. Determination of lactose and lactobionic acid by Agilent 1200 liquid chromatograph

Parametri:

- detektors: RID;
- kolona: Coregel-ION 300;
- kustīgā fāze: sērskābe (0.450 mM, pH 3.1);
- kolonas krāsns temperatūra: 75 °C;
- parauga tilpums: 20 µL;
- plūsmas ātrums: 0.3 mL min⁻¹.

Noteikšanas metode ir izstrādāta Oviedo Universitātes (Spānija) pēc firmas “ApexScientific” (Īrija) rekomendācijām.



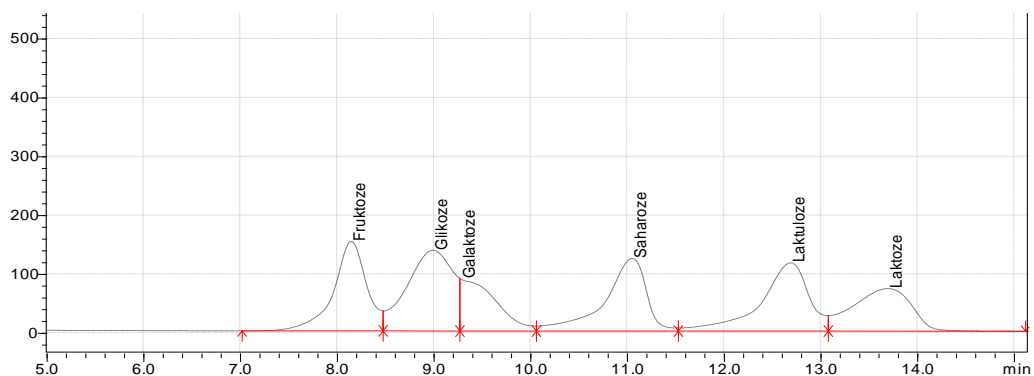
2.10. att. Laktobionskābes un laktozes kalibrācijas šķidruma hromatogramma Agilent 1200 šķidruma hromatogrāfā / Fig. 2.10. Chromatogram of lactobionic acid and lactose calibration solution by Agilent 1200 liquid chromatograph

Pamatšķidruma gatavošana. Iesver 10 mL mērkolbā 0.4000 ± 0.0002 g laktozes un 1.2000 ± 0.0002 g laktobionskābes, uzpilda ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei un labi samaisa.

2. Shimadzu LC – 20 Prominence (Japāna) hromatogrāfs laktozes satura noteikšanai.

Parametri:

- detektors: RID - 10A;
- kolona: Alltech NH₂, 4.6 mm · 250 mm, sorbenta daļiņu diametrs 5 µm;
- eluēšanas veids: izokrātisks;
- kustīgā fāze: acetonitrils (CH₃CN) 75:25 dejonizēts ūdens (H₂O);
- kolonas krāsns temperatūra: + 30 °C;
- parauga tilpums: 10 µL;
- plūsmas ātrums: 1.0 mL min⁻¹.



2.11. att. Oglhidrātu kalibrācijas šķīduma hromatogramma Shimadzu LC – 20 šķīduma hromatogrāfā /

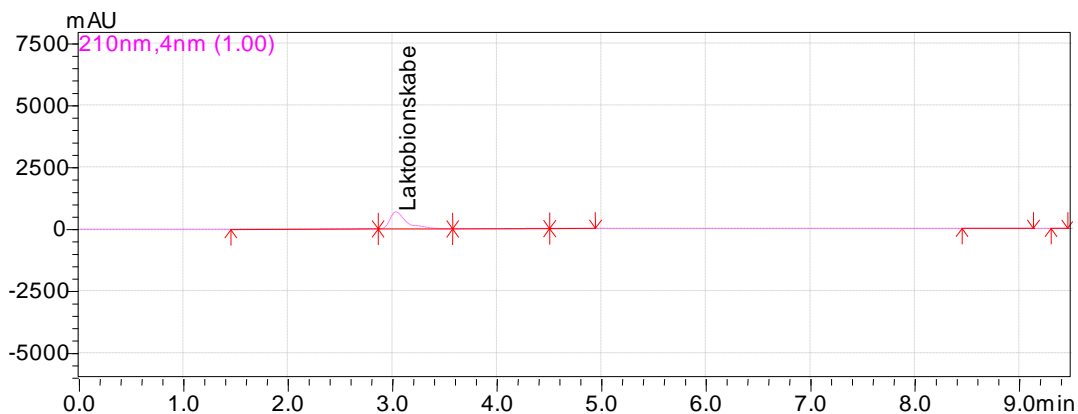
Fig. 2.11. Chromatogram of the carbohydrate calibration solution by Shimadzu LC – 20 liquid chromatograph

Pamatšķīduma pagatavošana. Iesver 10 mL mērkolbā 0.4000 ± 0.0002 g fruktozes, glikozes, galaktozes, saharozes, laktulozes un laktozes, uzpilda ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei un labi samaisa (iegūtā šķīduma masas saturs 40 g L^{-1}). Ar šo metodi nosaka laktozes koncentrāciju paraugā, bet var noteikt arī glikozes, fruktozes, saharozes, galaktozes un laktulozes koncentrāciju. Oglhidrātu noteikšanas metode ir izstrādāta Latvijas Lauksaimniecības universitātes Ķīmijas katedrā, pamatojoties uz firmas Shimadzu ieteikumiem.

3. Shimadzu LC – 20 Prominence (Japāna) hromatogrāfs laktobionskābes satura noteikšanai.

Parametri:

- detektors: DAD SPD-M20A;
- kolona: YMC C18, 4.6 mm x 250 mm, sorbenta daļiņu izmērs 5 μm ;
- kolonas krāsns temperatūra: + 40 °C;
- kustīgā fāze: 14.36 g KH_2PO_4 + uzpilda ar dejonizēto ūdeni līdz 1.5 litriem + 1.15 mL H_3PO_4 + 20 mL acetonitrila;
- eluēšanas veids: izokrātiskais režīms;
- parauga tilpums: 10 μL ;
- plūsmas ātrums: 1.0 mL min^{-1} ;
- viļņa garums: 210 nm.



2.12. att. Laktobionskābes kalibrācijas šķīduma hromatogramma Shimadzu LC – 20 šķīduma hromatogrāfā /

Fig. 2.12. Chromatogram of the lactobionic acid calibration solution by Shimadzu LC – 20 liquid chromatograph

Kalibrācijas šķīduma gatavošana. Iesver 3.5 g laktobionskābes, pārnes 100 mL mērkolbā un uzpilda ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei un labi samaisa. Laktobionskābes noteikšanas metode ir izstrādāta Latvijas Lauksaimniecības universitātes Ķīmijas katedrā, pamatojoties uz firmas Shimadzu ieteikumiem.

Laktozes un laktobionskābes satura noteikšanu paraugiem veic trijos atkārtojumos.

Laktozes saturs sūkalu paraugos pirms eksperimenta uzsākšanas noteikta ar MilcoScan™ Mars (Foss, Dānija) analizatoru. Laktozes noteikšanu veic piecos atkārtojumos.

Baktēriju fizioloģiskā stāvokļa noteikšana

Mikroorganismu fizioloģisko stāvokli analizē ar multiparametrisko plūsmas citometriju (FCM) (Beckman Coulter, Cytoflex-5, ASV). Analīzi veic, lai atšķirtu metaboliski aktīvās, mirušās un bojātās šūnas paraugos. Alonso *et al.* (2014), Foladori *et al.*, (2009) un Garcia *et al.*, (2017) publicētajos darbos ir norādīts, ka analizējamos paraugus centrifugē 10 min ar 10 000 min⁻¹. Suspensiju nolej, bet koncentrētās šūnas divas reizes skalo ar fosfāta buferšķīdumu un pirms plūsmas citometrijas analīzes sagatavotos paraugus 2 s iztur ultraskaņas vannā, lai izkliedētu baktēriju šūnas savā starpā. Kopējais šūnu skaits tiek noteikts, iekrāsojot 200 µL analizējamā parauga ar 6 µL SYBRgreen (Life Technologies Corporations, Oregon, ASV) darba šķīdumu un inkubējot 15 min telpas temperatūrā tumsā. Metabolisko aktivitāti nosaka, iekrāsojot 200 µL analizējamā parauga ar 7.5 µL propīdija jodīda (PI) un 8 µL CV6 darba šķīduma, paraugus inkubē 15 min telpas temperatūrā tumsā. SYBRgreen, PI un CV6 darba šķīdumu gatavošana īstenota pēc ķīmisko vielu ražotāju rekomendācijām, metodika apkopota 2.4. tabulā.

PI un CV6 izmanto kā fluorescējošo krāsvielu kombināciju krāsošanas procedūrā (PI/CV6). Analīzes veiktas ar plūsmas ātruma iestatījumu (3000 – 4000 notikumi s⁻¹). PI uzņemšanas pakāpe ļauj novērtēt šūnu membrānas integritāti; ja membrāna ir bojāta, tad PI iekļūst šūnā un saistās ar nukleīnskābēm. Plūsmas citometrijas analīzē tika izmantots FCS kanāls, kas ļauj analizēt rezultātus, koncentrējoties uz baktēriju izmēriem.

2.4. tabula / Table 2.4.

Fluorescējošo krāsvielu darba šķīdumu gatavošana / *Preparation of fluorescent dyes working solutions*

Darba šķīdumu apzīmējums / <i>Designation of working solutions</i>	Sagatavošana / <i>Preparation</i>
SYBRgreen	2 µL SYBRGreen + 198 µL TE (500 µL 1M trihlorīds / <i>trichloride</i> + 49.5 mL sterils, dejonizēts ūdens / <i>sterile, deionized water</i> + 18.61 mg etilēndiamīntetraetiķskābe / <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , pH 8.0)
PI	14 µL sagatavots šķīdums / <i>prepared solution</i> (1 mg propīdija jodīda / <i>propidium iodide</i> + 1000 µL sterils, dejonizēts ūdens / <i>sterile, deionized water</i>) + 860 µL sterils, dejonizēts ūdens / <i>sterile, deionized water</i>
CV6	50 µL ChemChrome V6 + 450 µL sterils, dejonizēts ūdens / <i>sterile, deionized water</i>

Pirms paraugu analīzes tika sagatavoti *Pseudomonas taetrolens* šūnu kontrolparaugi, lai izveidotu šūnu citometrijas blīvuma punktveida diagrammu. Punktveida laukumi (2.13. att.) ir apkopoti Q1, Q2, Q3 un Q4 kvadrantos. Apakšējā labajā kvadrantā (Q3) redzamas dzīvotspējīgās šūnas, kas spējīgas vairoties. Bojātās šūnas tiek parādītas augšējā labajā kvadrantā (Q2), savukārt mirušās šūnas parādās augšējā kreisajā kvadrantā (Q1) un nenokrāsotās šūnas apakšējā kreisajā kvadrantā (Q4).

Q1 Mirusās šūnas / <i>Dead</i> <i>cells</i> (Pi)	Q2 Bojātās šūnas (PI +CV6/SYBRGreen) / <i>Damaged cells</i>
Neiekrāsotās šūnas / <i>Unstained</i> <i>cells</i> Q4	Metaboliski aktīvās šūnas (CV6 vai SYBRGreen) / <i>Metabolically active</i> <i>cells</i> Q3

2.13. att. **Plūsmas citometrijas punktveida diagrammas piemērs /**
Fig. 2.13. Example of flow cytometry dot plot

Kontroles paraugu sagatavošana: *Pseudomonas taetrolens* audzē 10 stundas 30 °C temperatūrā šķidrā barotnē, barotnes saturu maisot 350 min⁻¹. Tika sagatavoti paraugi ar dzīvajām, mirušajām šūnām un šūnu maisījumu (dzīvās + mirušās šūnas), lai precīzāki būtu analizējamo paraugu rezultāti. No barotnes tika ņemtas dzīvās šūnas, mirušās šūnas tika iegūtas, apstrādājot dzīvo šūnu paraugu 90 °C temperatūrā 45 min un pēc apstrādes, paraugu ievietojot ledusūdenī. Tika izveidoti paraugu maisījumi, kas satur 50% dzīvo un 50% mirušo šūnas. Ar fluorescējošajiem šķīdumiem neiekrāsotās un iekrāsotās šūnas izmantotas kā kontrole.

Dzīvotspējīgo šūnu skaita noteikšana

Dzīvotspējīgo šūnu skaits noteikts ar uzsēšanas metodi NB agarā (sastāvs 20 g L⁻¹ bioloģiskais agars, 5 g L⁻¹ NaCl, 5 g L⁻¹ peptons, 2 g L⁻¹ rauga un 1 g L⁻¹ gaļas ekstrakts). Analizējamo paraugu, suspensiju un atšķaidījumu sagatavošana pēc ISO 6887-4:2017. Koloniju veidojošās vienības (KVV) tika saskaitītas ar koloniju skaitītāju (Acolyte 7510 /SYN, Synbiosis, Anglija) pēc paraugu inkubācijas 48 h 30 °C temperatūrā.

Izšķīdušā skābekļa satura noteikšana

Izšķīdušā skābekļa saturs tika noteikts polarogrāfiski (InPro 6830, Mettler Toledo, Šveice). Elektrodu, ievietojot paraugā, nolasa izšķīdušā skābekļa koncentrāciju. Pirms ievietošanas paraugā, elektrodu kalibrē. Izšķīdušā skābekļa saturs tika noteikta tikai bioreaktorā fermentētajiem paraugiem automātiski, pievienojot elektrodu bioreaktora sistēmai (Alonso *et al.*, 2014).

Baktēriju vairošanās intensitātes noteikšana

Baktēriju vairošanās intensitāte paraugos tika noteikta spektrofotometriski, nosakot optisko šūnu blīvuma mērījumu 600 nm viļņu garumā (Thermo Scientific Helios Gamma UVG, Anglija). 1 mL parauga iepilda centrifūgas stobriņā un cenrifugē 10 000 – 13 000 min⁻¹ 10 min. Pēc centrifugēšanas dzidro šķidrumu nolej un stobriņā pievieno 1 mL 0.6% NaCl šķīdumu un samaisa, lai šūnas izkliedējas NaCl šķīdumā. Iekārtas kalibrēšanai un kontrolei tiek izmantots tīrs 0.6% NaCl šķīdums (Alonso *et al.*, 2012). Mērījumus veic piecos atkārtojumos.

Olbaltumvielu satūra noteikšana

Slāpekļa savienojumu klātbūtne paraugos noteikta atbilstoši LVS EN ISO 8968-5:2002 standartam „Olbaltumvielu satūra noteikšana”. Kjeldāla metode. Analīzēs tika izmantota Kjeltec™ 2200 (2.14. attēls) vai Kjeltec™ 21 iekārta (FOSS, Zviedrija).



2. 14. att. **Kjeltec™ 2200** destilācijas iekārta /
Fig. 2.14. Kjeltec™ 2200 distillation equipment

Slāpekļa savienojumu saturu aprēķina pēc 1. formulas:

$$x = \frac{(a - b) \cdot k \cdot 14.007 \cdot f \cdot 100}{c}, \quad (1)$$

kur:

- x – olbaltumvielu saturs, %;
- a – 0.1 M HCl tilpums, mL, kas izlietots parauga titrēšanai;
- b – 0.1 M HCl tilpums, mL, kas izlietots kontroles parauga titrēšanai;
- c – iesvars, mg;
- f – slāpekļa satūra pārvēršanas faktors olbaltumvielu saturā, 6.38;
- k – skābes šķīduma molaritāte, 0.1.

Slāpekļa savienojumu klātbūtnes noteikšana pamatojas uz olbaltumvielu slāpekļa mineralizāciju līdz amonija savienojumiem, no kuriem to izdala kā amonjaku un uztver ar noteiktas molaritātes skābi. Attitrējot sārma pārpalikumu ar attiecīgās molaritātes skābi, atrod saistīto amonjaka daudzumu. Uztverto amonjaku attitrē ar 0.1 M HCl līdz šķīduma krāsa mainās no zaļganai līdz sārtai krāsai (Ciproviča & Zagorska, 2012; Goulding *et al.*, 2020).

Šūnu masas noteikšana

Šūnu masas noteikšanu veic gravimetriski. Nosaka, izmantojot 1 mL šķidra parauga, kuru iepilda konusveida trauciņos (2.15.attēls).



2.15. att. **Paraugu sagatavošana šūnu masas noteikšanai pirms centrifugēšanas /**
Fig. 2.15. Preparation of dry cell weight samples before centrifugation

Paraugus centrifugē ar 10 000 – 13 000 min⁻¹ 10 min, šķidrumu nolej traukā un nogulsņējušās šūnas dehidrē, kaltējot 40 °C temperatūrā līdz nemainīgam svaram. Paraugus atdzesē eksikatorā un nosver (Alonso *et al.*, 2012). Šūnu masas noteikšanu paraugiem veic trijos atkārtojumos un aprēķina vidējo vērtību.

Krāsas noteikšana

Krāsu intensitāti nosaka L*a*b* sistēmā ar analizatoru „Lovibond® LC100” (Tintometer® group, Ķīna) (2.16. attēls).



2.16. att. **Lovibond® krāsu analizators /**
Fig. 2.16. Lovibond® Color Analyzer

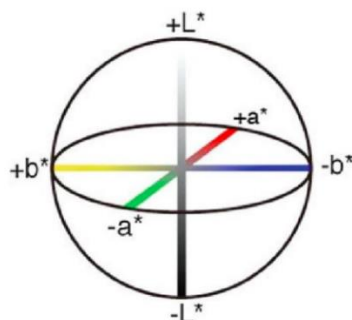
Kopējā krāsu atšķirība delta E (ΔE) vienmēr ir pozitīva un tiek aprēķināta pēc 2. formulas. Šī formula parāda atšķirību starp divu produktu krāsām, lai noteiktu neatbilstības un palīdzētu lietotājiem efektīvāk kontrolēt produktu krāsu (Mokrzycki & Tatol, 2012).

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{(L_2 - L_1)^2 + (a_2 - a_1)^2 + (b_2 - b_1)^2}, \quad (2)$$

kur:

L₂, a₂, b₂ – analizējamā parauga nosakāmie parametri;
L₁, a₁, b₁ – standartparauga parametri.

$L^*a^*b^*$ sistēmā ir izmantotas trīs perpendikulāras asis, kur negatīvā a^* vērtība atspoguļo zaļās krāsas intensitāti, pozitīvā a^* vērtība raksturo sarkanās krāsas intensitāti, negatīvā b^* vērtība atspoguļo zilās krāsas intensitāti, pozitīva b^* vērtība raksturo dzeltenās krāsas intensitāti, bet L^* ir baltās un melnās jeb gaišās un tumšās intensitātes rādītājs (2.17. attēls).



2.17. att. CIE $L^*a^*b^*$ krāsu sistēma (Purnama *et al.*, 2015) /
Fig. 2.17. CIE $L^*a^*b^*$ color system

Iekārtu kalibrē pirms krāsu intensitātes noteikšanas paraugiem. Paraugus salej vienādos tilpumos caurspīdīgos trauciņos un tos ievieto pie analizatora sensora. Trauciņam aizver vāciņu, lai apkārtējās krāsas un gaismas maiņa neietekmē parauga krāsu. Katram paraugam veic septiņus atkārtojumus un aprēķina vidējo vērtību.

Laktobionskābes šķīdība ūdenī

Laktobionskābes šķīdību nosaka, pievienojot 0.1 g iegūtās laktobionskābes 10 ml dejonizētā ūdenī +20 °C temperatūrā un maisot 150 min⁻¹ līdz tā pilnībā izšķīst. Iegūtā produkta šķīdība tika noteikta pēc laika (Delagustin *et al.*, 2019). Katram paraugam veic piecus atkārtojumus un aprēķina vidējo vērtību.

Īpatnējā augšanas ātruma noteikšana

Īpatnējo augšanas ātrumu μ (h⁻¹) izsaka kā regresijas līknes slīpumu starp $\ln(x/x_0)$ atkarībā no laika noteiktā intervālā, skatīt 3. formulu (Shuler & Kargi, 2002; Alonso *et al.*, 2017):

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x}{x_0}\right)}{t - t_0}, \quad (3)$$

kur:

- x – biomasas saturs t , g L⁻¹;
- x_0 – biomasas saturs t_0 , g L⁻¹;
- t – eksponenciālās fāzes beigas, h;
- t_0 – eksponenciālās fāzes sākums, h.

Vielas satura noteikšana tilpuma vienībā

Vielas saturs tilpuma vienībā (WP (g L⁻¹ h⁻¹)) ir laktobionskābes saturs tilpuma vienībā, kas iegūts noteiktā laika vienībā, to aprēķina pēc 4. formulas (Prasirtsak *et al.*, 2019):

$$WP = \frac{P}{t_{end} + t}, \quad (4)$$

kur:

- P – saražotās laktobionskābes saturs, g L⁻¹;
- t_{end} – lag fāzes laiks, h;
- t – fermentēšanas ilgums, h.

Biomasa produktivitātes noteikšana

Biomasa produktivitāte WX ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) tiek aprēķināta pēc 5. formulas (Hempel *et al.*, 2002):

$$WX = \frac{x}{t_{\text{end}} + t}, \quad (5)$$

kur:

x – procesa laikā saražotais baktēriju biomasas daudzums, g L^{-1} .

Specifiskā laktobionskābes ražošanas ātruma noteikšana

Specifiskais laktobionskābes ražošanas ātrums $qLBA$ ($\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) tiek aprēķināts pēc 6. formulas (Alonso *et al.*, 2017), dalot vielas koncentrāciju tilpuma vienībā WP ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ar vidējo biomasas daudzumu ΔX fermentācijas laikā:

$$qLBA = \frac{WP}{\Delta X}, \quad (6)$$

Saražotās biomasas attiecība pret patērētās laktozes koncentrāciju

Saražotās biomasas attiecība pret patērēto laktozes koncentrāciju fermentācijas laikā $Y_{X/S}$ ($\text{g šūnas g substrāta}^{-1}$) aprēķināta, izmantojot 7. formulu (Kargi, 2009):

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_{t_0}}{S_{t_0} - S_t}, \quad (7)$$

kur:

X_{t_0} – sākotnējā biomasas saturs, g L^{-1} ;

X_t – biomasas saturs noteiktā laikā t , g L^{-1} ;

S_{t_0} – substrāta sākotnējā saturs, g L^{-1} ;

S_t – substrāta saturs noteiktā laikā t , g L^{-1} .

Laktobionskābes iznākums

Laktobionskābes iznākums tika aprēķināts procentos, pamatojoties uz sākotnējās laktozes koncentrāciju, kas fermentācijā oksidētā laktobionskābē, skatīt 8. formulu (Alonso *et al.*, 2011):

$$\text{LBA iznākums} = \frac{m_{LBA}}{m_{LAC}} \times 100, \quad (8)$$

kur:

m_{LBA} – laktobionskābes saturs fermentācijas beigās, g L^{-1} ;

m_{LAC} – laktozes saturs fermentācijas sākumā, g L^{-1} .

Laktobionskābes satura noteikšana produktos

Laktobionskābes saturs iegūtajos laktobionskābes paraugos (A, B, C vai D paraugs 2.2. tabula) tika izteikta procentos, dalot tūrās laktobionskābes masu (noteikta ar AEŠH) ar kopējo parauga masu (iegūtais produkts pēc attīrīšanas un izdalīšanas posmiem), un iegūto skaitli reizinot ar 100, skatīt 9. formulu (Ngiam *et al.*, 2001):

$$\text{LBA koncentrācija, \%} = \frac{LBA_{HPLC}}{LBA_{\text{produkts}}} \times 100, \quad (9)$$

kur:

LBA_{produkts} – laktobionskābes produkta masa, g;

LBA_{HPLC} – laktobionskābes saturs laktobionskābes produktā pēc AEŠH analīzēm, g.

Laktobionskābes reģenerācijas iznākums

Izdalītā laktobionskābe no fermentācijas substrāta tika aprēķināta procentos, dalot laktobionskābes koncentrāciju, kas iegūta pēc laktobionskābes attīrīšanas un izdalīšanas posmiem, ar laktobionskābes koncentrāciju fermentācijas beigās substrātā, un šo skaitli reizinot ar 100, skatīt 10. formulu. Laktobionskābes reģenerācijas iznākums parādīja, cik daudz laktobionskābes iegūst attīrīšanas un izdalīšanas procesu izpildes laikā (Borges da Silva *et al.*, 2011):

$$LBA \text{ reģenerācija, \%} = \frac{LBA_{pēc}}{LBA_{pirms}} \times 100, \quad (10)$$

kur:

LBA_{pirms} – laktobionskābes saturs fermentācijas substrātā pirms attīrīšanas un izdalīšanas posmu izpildes, $g L^{-1}$;

$LBA_{pēc}$ – iegūtās laktobionskābes saturs pēc attīrīšanas un izdalīšanas posmiem, $g L^{-1}$.

2.5. Datu matemātiskā apstrāde / *Mathematical data processing*

Datu analīze tika veikta ar Microsoft Excel 2010 programmatūru. Iegūtajiem rezultātiem aprēķināta vidējā aritmētiskā vērtība un standartnovirze. Statistiskās analīzes veiktas, izmantojot dispersijas analīzi (ANOVA) un t-testu ar būtiskuma līmeni ($p < 0.05$). AEŠH datu iegūšana un analīze tika apstrādāta ar ChemStation (Agilent) programmatūru, bet plūsmas citometrijas dati apstrādāti, izmantojot programmatūru CytExpert (Beckman Coulter).

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA / RESULTS AND DISCUSSION

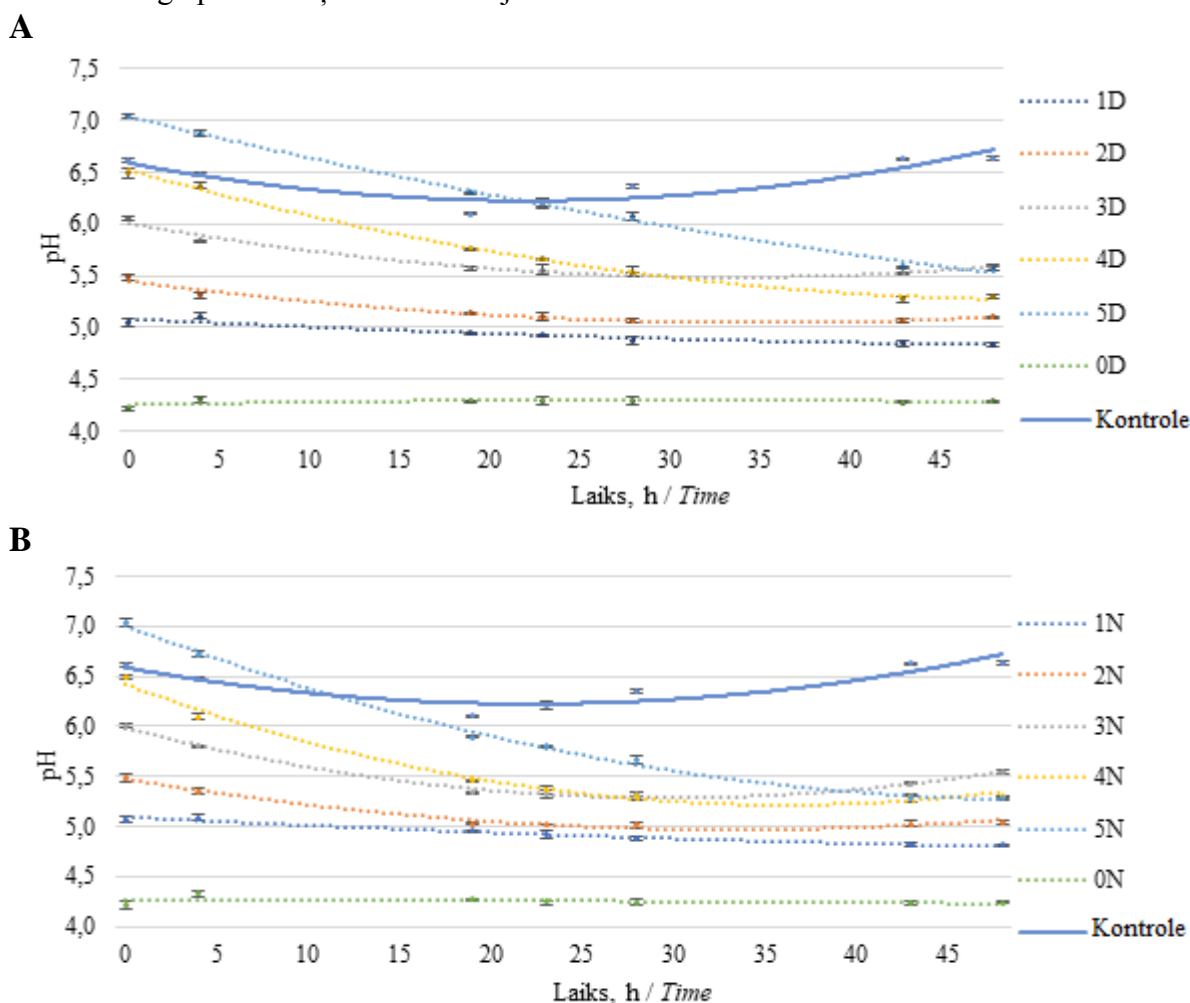
Rezultātu nodaļā apkopoti eksperimentu gaitā iegūtie rezultāti un sniegts informatīvs kopsavilkums.

3.1. pH ietekme laktobionskābes ieguvē / Effect of pH on lactobionic acid production

Eksperimenta mērķis bija noskaidrot optimālo biezpiena sūkalu pH, kurā darbojas *Pseudomonas taetrolens* NCIB 9396 un DSM 21104.

pH izmaiņas paraugu fermentācijas laikā

Paraugu pH izmaiņas fermentācijas laikā ir attēlotas 3.1. attēlā.



3.1. att. pH izmaiņas fermentācijas laikā paraugiem (A) ar *P. taetrolens* NCIB 9396 un (B) ar *P. taetrolens* DSM 21104, 30 °C temperatūrā 48 h /

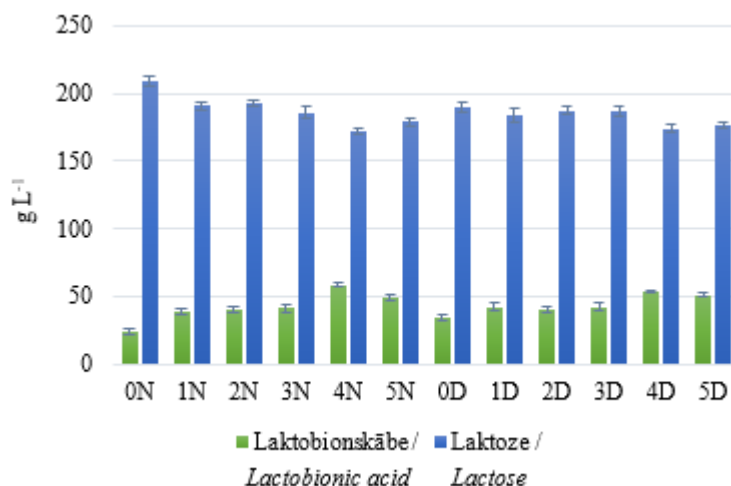
Fig. 3.1. Time-course profile of pH changes in samples (A) with *P. taetrolens* NCIB 9396 and (B) with *P. taetrolens* DSM 21104 during cultivation at 30 °C for 48 h

Iegūtie rezultāti parādīja, ka substrātu pH fermentācijas procesā lēnām samazinās, izņemot kontroles, 0N un 0D paraugus. Starp visiem paraugiem fermentācijas procesa beigās ir konstatētas būtiskas atšķirības pH ($p < 0.05$). Var novērot, ka kontroles paraugā pH praktiski nemainās, kas pierāda, ka baktēriju vairošanos ietekmē substrāta pH fermentācijas laikā. 4N un 5N paraugos pH samazinājās straujāk, sasniedzot zemāko pH. To pašu var novērot 3.1. attēlā (B), ka 4D un 5D paraugos pH kritās ātrāk nekā citiem paraugiem. To varētu skaidrot ar

Pseudomonas taetrolens enzīmu darbību, proti, laktozes oksidāzes optimālais pH ir 5.6, bet laktonāzes optimālais pH ir 6.5 – 6.7 (Alonso *et al.*, 2013). 4N, 5N, 4D un 5D paraugi bija sasnieguši optimālo pH enzīmu darbībai, tāpēc arī *Pseudomonas taetrolens* aktīvāk veikusi laktozes biokonversiju laktobionskābē, ko apliecina straujais pH samazinājums.

Laktobionskābes iznākums

Rezultāti parādīja, ka starp 1N, 2N, 3N, 1D, 2D un 3D paraugiem nav būtisku atšķirību ($p > 0.05$) laktobionskābes saturā, tas nozīmē, ka substrāta pH robežās no 5 līdz 6 vienādi ietekmē laktobionskābes ražošanu, lietojot abus *Pseudomonas taetrolens* celmus (skat. 3.2. attēls).



3.2. att. **Laktobionskābes iznākums dažāda pH ietekmē /**
Fig. 3.2. Lactobionic acid yield affected by the different pH

Augstāko rezultātu uzrādīja 4N paraugs ar $58.475 \pm 2.033 \text{ g L}^{-1}$ laktobionskābes, tam sekoja 4D paraugs ar $53.678 \pm 1.025 \text{ g L}^{-1}$ laktobionskābes. Mazāks saturs tika noteikta 0N paraugam – $23.973 \pm 1.831 \text{ g L}^{-1}$ un 0D paraugam – $34.666 \pm 1.822 \text{ g L}^{-1}$. Rezultāti pierādīja, ka biezpiena sūkalās *Pseudomonas taetrolens* efektīvāk konvertē laktozi laktobionskābē, ja vides pH ir 6.5. Abi *Pseudomonas taetrolens* celmi *NCIB 9396* un *DSM 21104* darbojās līdzīgi, netika novērotas izteiktas atšķirības.

3.1. nodaļas kopsavilkums

Eksperiments par pH ietekmi uz laktobionskābes ieguvu pierādīja, ka *Pseudomonas taetrolens* spēj konvertēt biezpiena sūkalās esošo laktozi laktobionskābē. Ir nepieciešams regulēt fermentācijas substrāta pH ap 6.5, ieteicams visā fermentācijas laikā, jo šādā pH *Pseudomonas taetrolens* veicina laktozes konversiju laktobionskābē. Skābā vide kavē *Pseudomonas taetrolens* spēju konvertēt laktozi laktobionskābē. Iemesls varētu būt zems biezpiena sūkalu pH, kāpēc netiek sasniegti augstāki laktobionskābes rezultāti, kā tas ir pētījumos ar siera sūkalām.

Summary of Chapter 3.1.

An experiment on the effect of pH on lactobionic acid provided that in acid whey, substrate Pseudomonas taetrolens can convert lactose into lactobionic acid. It is necessary to adjust the pH to around 6.5 of the fermentation substrate and to adjust it during the whole fermentation because at this pH, Pseudomonas taetrolens promotes the conversion of lactose

into lactobionic acid. The acidic circumstances in the substrate inhibit *Pseudomonas taetrolens*' ability to convert lactose into lactobionic acid. This may be due to the low pH of the acid whey, which is why higher lactobionic acid results are not achieved, as they are in studies with sweet whey.

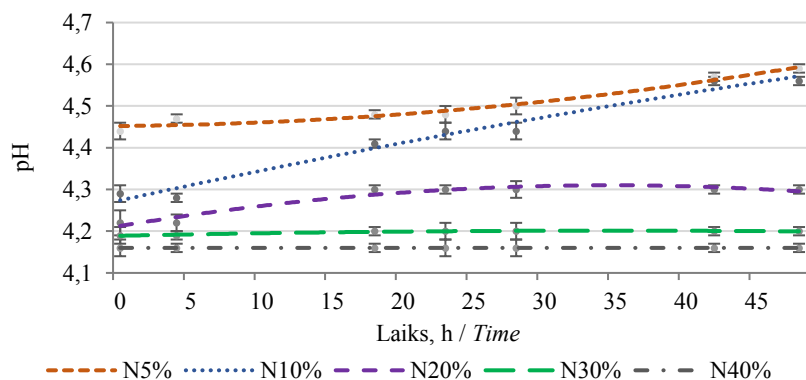
3.2. Sūkalu sausnas saturs ietekme laktobionskābes ieguvē / *Effect of whey solids on lactobionic acid production*

Eksperimenta mērķis bija izpētīt biežpiena sūkalu sausnas saturs ietekmi uz *Pseudomonas taetrolens* NCIB 9396 un DSM 21104 augšanu un laktozes oksidāciju laktobionskābē.

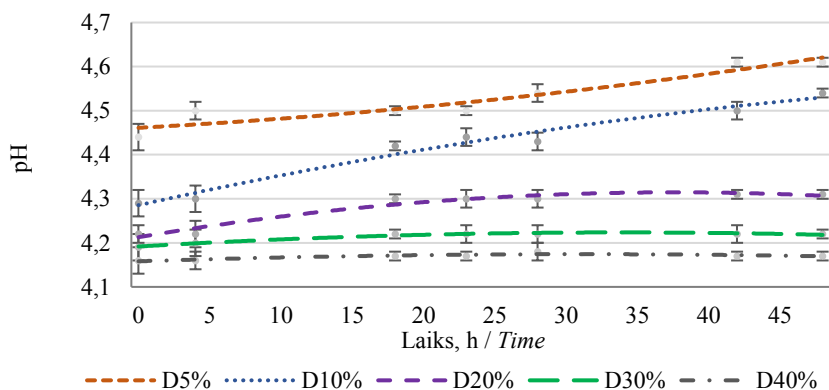
pH izmaiņas fermentācijas procesā

Fermentācijas procesa laikā tika kontrolēts pH (3.3. attēls). Rezultāti parādīja, ka pH fermentācijas procesā pieaug lēnām. Procesā beigās būtiskas atšķirības ($p > 0.05$) netika konstatētas starp paraugiem N 5% un D 5%, N 10% un D 10%, N 20% un D 20%, N 30% un D 30%, N 40% un D 40%. Tas pierāda, ka abi baktēriju celmi nodrošina līdzīgas pH izmaiņas substrātā ar noteiktu sausnas saturu.

A



B



3.3. att. pH izmaiņas fermentācijas laikā paraugiem (A) ar *P. taetrolens* NCIB 9396, un (B) ar *P. taetrolens* DSM 21104, 48 h, 30 °C temperatūrā /

*Fig. 3.3. Time-course profile of pH changes in samples (A) with *P. taetrolens* NCIB 9396 and (B) with *P. taetrolens* DSM 21104 during cultivation at 30 °C 48 h*

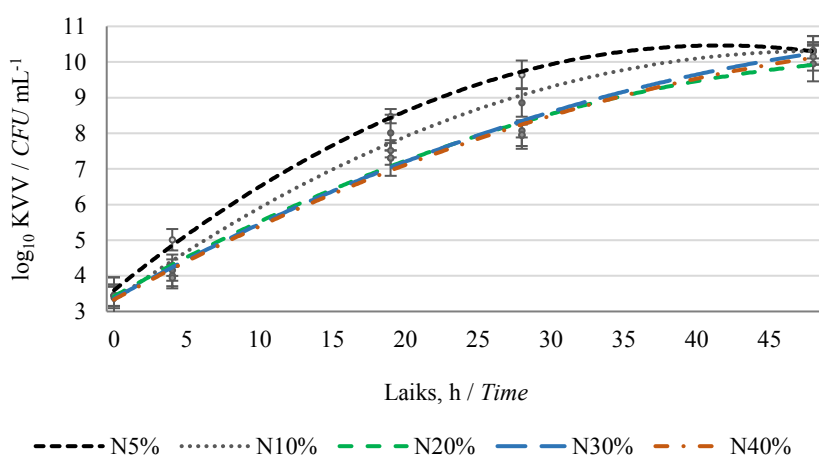
Sākumā pH bija atšķirīgs starp paraugiem, jo paraugiem bija atšķirīga sausna. pH bija lielāks paraugos ar mazāku sausnas saturu un, otrādi, mazāks ar lielāku sausnas saturu. Tika novērots, ka paraugos ar mazāku sausnas saturu pH izmainās ātrāk. pH visos paraugos bija robežās no 4.16 līdz 4.61. Giorgi un līdzautori (2018) ir konstatējuši, ka mazākais substrāta pH

4.2 tiek sasniegts laktozes oksidēšanas procesā ar *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104, izmantojot ķīmiski tīru laktozi. Alonso *et al.* (2017) novēroja, ka, fermentējot siera sūkalu ultrafiltrātu ar *Pseudomonas taetrolens* LMG 2336 72 stundas 30 °C temperatūrā kolbās, mazākais pH, kas sasniegts substrātā ir 3.6. pH samazinās laktozes oksidēšanās procesā, bet slāpekļa savienojumu klātbūtne substrātā veicina pH palielināšanos robežās no 0.01 līdz 0.27. To varētu izskaidrot ar *Pseudomonas taetrolens* spēju producēt proteolītiskos enzīmus, kas šķel olbaltumvielas, arī nedzīvo baktēriju šūnapvalka proteīnus, un substrātā pieaug slāpekļa savienojumu saturs, palielinot pH (Alonso *et al.*, 2011).

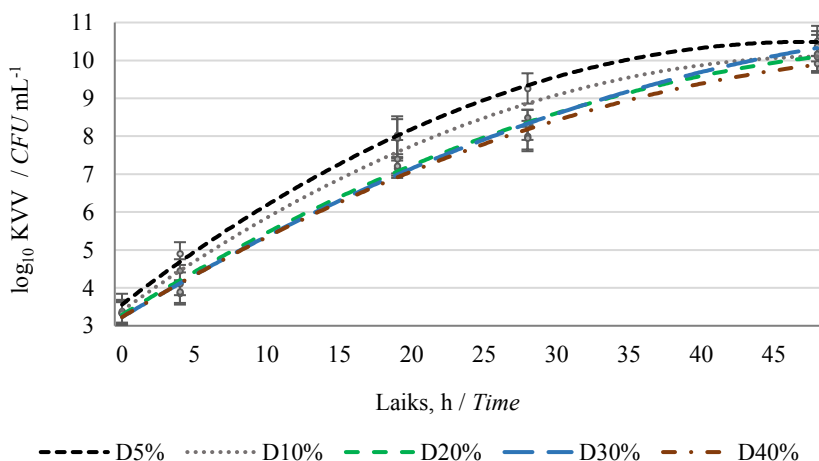
Baktēriju vairošanās fermentācijas procesā

Pseudomonas taetrolens NCIB 9396 un DSM 21104 vairojas visos paraugos un fermentācijas laikā sasniedz ap 10^{10} KVV mL^{-1} (3.4. attēls). Fermentācijas procesa beigās starp visiem paraugiem nebija būtisku atšķirību koloniju veidojošo vienību skaitā ($p > 0.05$).

A



B



3.4. att. Baktēriju KVV skaita izmaiņas fermentācijas laikā paraugos (A) ar *P. taetrolens* NCIB 9396, un (B) ar *P. taetrolens* DSM 21104 /

Fig. 3.4. Time-course profile of CFU changes in samples (A) with *P. taetrolens* NCIB 9396 and (B) with *P. taetrolens* DSM 21104 during fermentation

Pseudomonas taetrolens celmi atšķirīgā biezpiena sūkalu sausnas saturā vairojas līdzīgi. Gorderska u.c. (2014) secināja, ka, kultivējot *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104 24 h siera sūkalās (pH 6.5, laktozes saturs 30 g L^{-1}), tika sasniegta 10^7 KVV mL^{-1} , pievienojot 5% tīrkultūras, un 10^9 KVV mL^{-1} , pievienojot 25% tīrkultūras. Giorgi un līdzautori (2018)

konstatēja, ka maksimālais koloniju veidojošo vienību skaits 10^9 KVV mL^{-1} tika sasniegts 48 stundu fermentācijā ar *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104 substrātā, kas saturēja 10 g L^{-1} laktozi.

3.4. attēlā var redzēt, ka *Pseudomonas taetrolens* straujāk vairojas paraugos ar 5 un 10 % sausas, bet KVV visos paraugos fermentācijas beigās bija vienāds. Tas norāda, ka *Pseudomonas taetrolens* nepieciešams vairāk laika, lai varētu adaptēties un sākt vairoties paraugos ar lielāku sausas saturu.

Laktobionskābes iznākums

Lielākais laktobionskābes iznākums tika sasniegts paraugos N5%, D5%, N10%, D10%, N20% un D20% (skat. 3.1. tabulu). Būtiskas atšķirības ($p > 0.05$) starp šiem paraugiem laktobionskābes koncentrācijā konstatētas netika.

3.1. tabula / Table 3.1.

**Laktozes un laktobionskābes saturs paraugos /
Lactose and lactic acid concentration in samples**

Paraugs / Sample	Fermentācijas sākumā / Before fermentation	Fermentācijas beigās / After fermentation		LBA iznākums/ LBA yield, %*
	Laktoze / Lactose, g L^{-1}	Laktoze / Lactose, g L^{-1}	Laktobionskābe / Lactic acid, g L^{-1}	
N5%	45.5 ± 1.4	37.4 ± 2.1	9.1 ± 1.2	20.0 ± 1.3^a
D5%	45.2 ± 2.1	38.0 ± 1.8	8.5 ± 1.2	18.8 ± 1.9^a
N10%	84.3 ± 1.2	65.0 ± 2.6	17.2 ± 0.8	20.4 ± 1.4^a
D10%	84.5 ± 0.8	65.8 ± 1.2	16.9 ± 1.4	20.0 ± 1.2^a
N20%	182.5 ± 1.9	148.1 ± 3.2	39.8 ± 0.9	21.8 ± 1.7^a
D20%	182.7 ± 2.0	152.2 ± 1.9	41.3 ± 1.8	22.6 ± 1.9^a
N30%	268.0 ± 1.4	229.2 ± 2.4	46.1 ± 0.6	17.2 ± 1.1^b
D30%	267.7 ± 0.9	231.0 ± 2.1	43.9 ± 1.3	16.4 ± 1.3^b
N40%	372.6 ± 1.6	315.5 ± 2.1	51.8 ± 1.2	13.9 ± 1.1^c
D40%	370.9 ± 1.3	302.0 ± 2.3	58.6 ± 1.3	15.8 ± 1.1^{bc}

*LBA iznākums aprēķināts procentos no sākotnējā laktozes satura / LBA yield was shown as the % of converted lactose; Rezultāti, kas norādīti ar vienu un to pašu burtu, savā starpā būtiski neatšķiras ($p > 0.05$) / Means followed by the same letters do not differ at $p > 0.05$.

Iegūtie rezultāti parādīja, ja paraugu sausas saturs ir 5%, 10% un 20%, iegūtās laktobionskābes iznākumā nav būtisku atšķirību. Ja sūkalu sausas saturs paraugos pārsniedz 20%, ir novērojams laktobionskābes iznākuma samazinājums.

Rezultāti apliecina, ka laktobionskābes iznākums ir mazāks paraugos ar kopējo sausas saturu virs 20%. Pleisners un līdzautori (2017) apstiprināja, ka laktobionskābes producēšanas potenciāls palielinās, pieaugot sūkalu sausas saturam. Eksperimentējot ar paraugu, kas satur 200 g L^{-1} laktozes (fermentācijas laikā pH virs 5.0), 180 h fermentācijas laikā ar *Pseudomonas taetrolens* tika iegūti 197 g L^{-1} laktobionskābes. Mijamoto u.c. (2000) ir konstatējuši, ka laktobionskābes iznākums bija lielāks paraugos ar 150 nekā ar 200 g L^{-1} laktozes. Murakami u.c. (2003) secināja, ka liels sausas saturs sūkalās var samazināt laktozes absorbcijas ātrumu šūnu membrānā, arī liels sausas saturs substrātā var izraisīt mikroorganismu producēto enzīmu inaktivāciju.

Goderska u.c. (2014), analizējot 50 h fermentācijas procesu 30 °C temperatūrā ar *Pseudomonas taetrolens*, ieguva 15.79 g L⁻¹ laktobionskābes no 30.29 g L⁻¹ laktozes. Mayamoto *et al.* (2000) sasniedza 90% laktobionskābes iznākumu ar *Pseudomonas taetrolens*. Alonso *et al.* (2012) ieguva 100% laktobionskābes iznākumu no siera sūkalām 60 h fermentācijā ar *Pseudomonas taetrolens*. Skābā vide kavē *Pseudomonas taetrolens* spēju konvertēt laktozi laktobionskābē. Iemesls varētu būt zems biezpiena sūkalu pH, kāpēc netiek sasniegti augstāki laktobionskābes rezultāti, kā pētījumos, kur lietotas siera sūkalas.

3.2. nodaļas kopsavilkums

Eksperiments par sūkalu sausnas satura ietekmi parādīja, ka sūkalu sausna ietekmē *Pseudomonas taetrolens* sintezētās laktobionskābes koncentrāciju. Ja sūkalu sausnas saturs substrātā ir lielāks par 20%, ir novērojams laktobionskābes iznākuma samazinājums. Visefektīvāk laktoze tiek konvertēta laktobionskābē substrātā ar mazāku sausnas saturu.

Summary of Chapter 3.2.

An experiment on the effect of acid whey solids showed that whey solids affect the production of lactobionic acid by Pseudomonas taetrolens. A decrease in the yield of lactobionic acid is observed if the solids content of the whey in the substrate is more than 20%. As a result, lactose is most efficiently converted into lactobionic acid with lower whey solids in the substrate.

3.3. Dažādu sāļu ietekme laktobionskābes ieguvē / *Effect of different salts on lactobionic acid production*

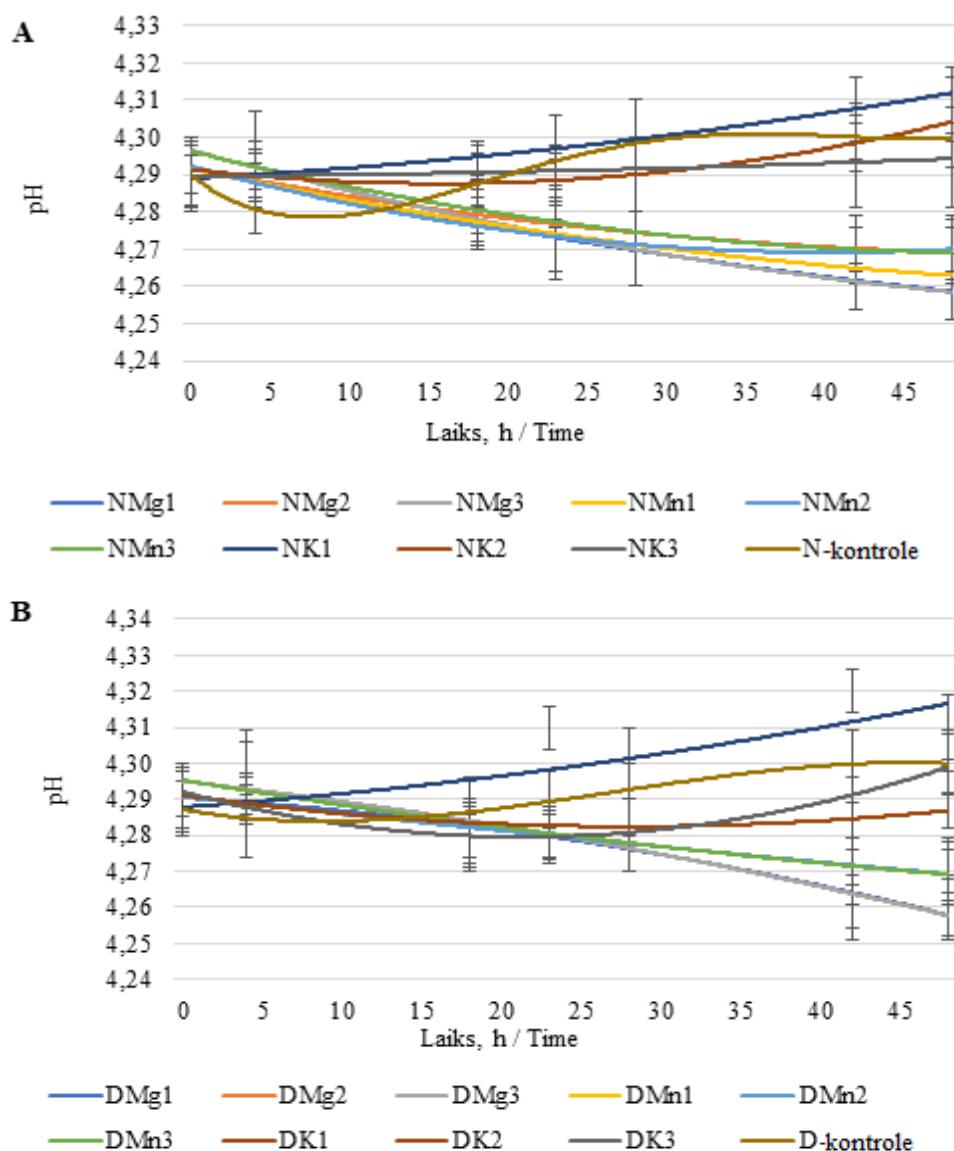
Eksperimenta mērķis bija izpētīt, vai, pievienojot papildu sāļus (barības vielas baktēriju augšanai) biezpiena sūkalām, mainīsies baktēriju vairošanās un laktozes konversija laktobionskābē.

pH izmaiņas fermentācijas procesā

Fermentācijas sākumā pH visiem paraugiem bija 4.29 (skat. 3.5. attēlu). Iegūtie rezultāti parādīja, ka paraugos, kas satur MnSO₄ un MgSO₄*7H₂O, pH lēnām samazinājās, bet pārējos palielinājās.

Procesa beigās būtiskas atšķirības (p>0.05) netika konstatētas starp paraugiem, kuriem pievienoti MnSO₄ un MgSO₄*7H₂O (NMg1, NMg2, NMg3, DMg1, DMg2, DMg3, NMn1, NMn2, NMn3, DMn1, DMn2, DMn3). Tas parāda, ka abi celmi nodrošina līdzīgas pH izmaiņas šajā pētījumā.

Tika novērots, ka pH palielinās paraugos, kuriem netika pievienoti sāļi un paraugos ar K₂HPO₄. 3.5. attēlā (A), salīdzinot NK1, NK2 un NK3 paraugus ar N-kontroles paraugu, nozīmīgas atšķirības (p>0.05) netika konstatētas. 3.5. attēlā (B), salīdzinot DK1, DK2 un DK3 paraugus ar D-kontroles paraugu, nozīmīgas atšķirības (p>0.05) arī netika konstatētas. K₂HPO₄ klātbūtne neietekmē *Pseudomonas taetrolens* vairošanos, savukārt MnSO₄ un MgSO₄*7H₂O klātbūtne, vērtējot pH izmaiņas, ietekmē *Pseudomonas taetrolens* augšanu.



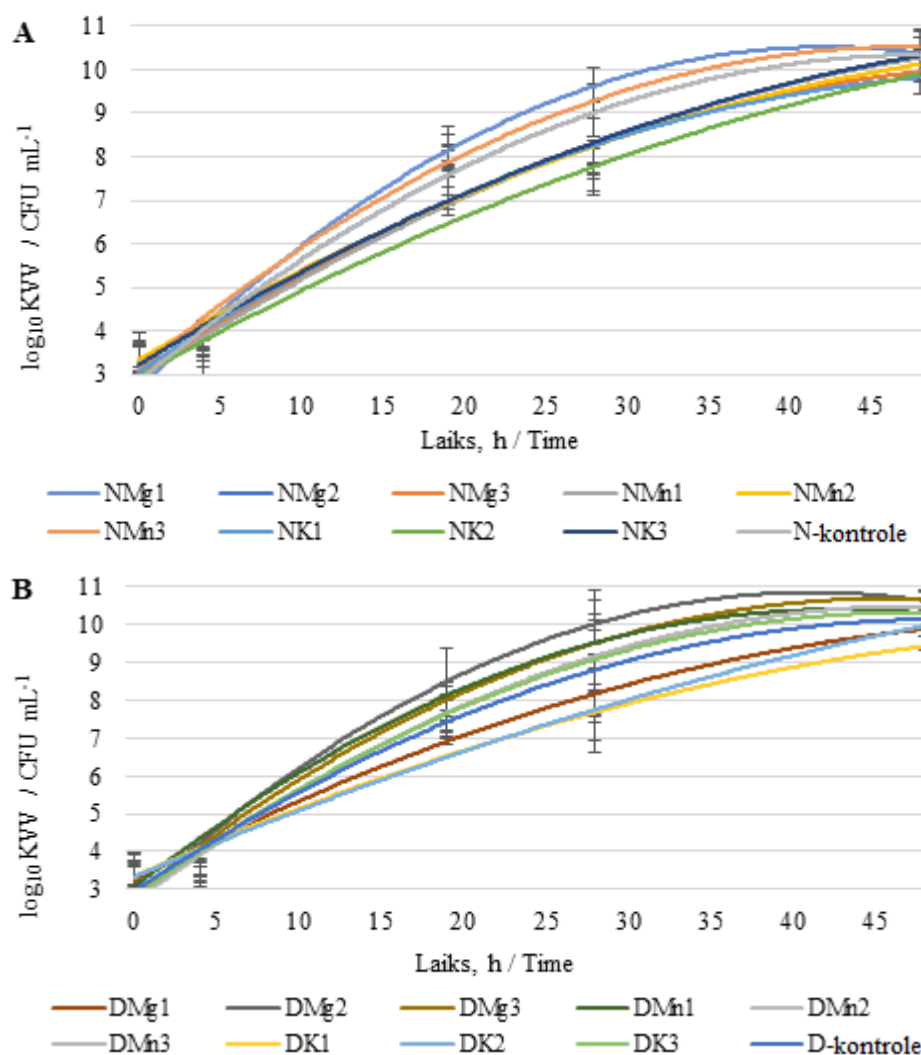
3.5. att. pH izmaiņas substrātos fermentācijas laikā dažādu sāļu ietekmē (A) *P. taetrolens* NCIB 9396, (B) *P. taetrolens* DSM 21104 /

Fig. 3.5. Time-course graphic of pH in substrates during cultivation at different salt concentrations (A) *P. taetrolens* NCIB 9396, (B) *P. taetrolens* DSM 21104

pH izmaiņas fermentācijas procesā ar *Pseudomonas taetrolens* siera sūkalās ir analizētas vairākos pētījumos (Alonso *et al.*, 2011; 2012; 2012a; 2013b; Giorgi *et al.*, 2018). Pētījumos ar siera sūkalām pH samazinās ļoti strauji, jo laktobionskābes veidošanās palielina substrata skābumu. Zemākais pH siera sūkalās, laktozei oksidējoties laktobionskābē, ir 3.6. Parasti pH siera sūkalās samazinās laktozes oksidēšanās procesā, tikai dažbrīd ir konstatēts, ka pH var arī nedaudz palielināties. Slāpekļa savienojumu klātbūtne veicina pH palielināšanos.

Baktēriju vairošanās fermentācijas laikā

Pseudomonas taetrolens DSM 21104 un NCIB 9396 vairojās visos pētītajos paraugos fermentācijas laikā un sasniedz ap 10^{10} KVV mL⁻¹ (3.6. attēls). Starp paraugiem fermentācijas procesa beigās nebija būtisku atšķirību ($p > 0.05$).



3.6. att. KVV skaita izmaiņas fermentācijas laikā dažādu sāļu ietekmē (A) *P. taetrolens* NCIB 9396, (B) *P. taetrolens* DSM 21104 /

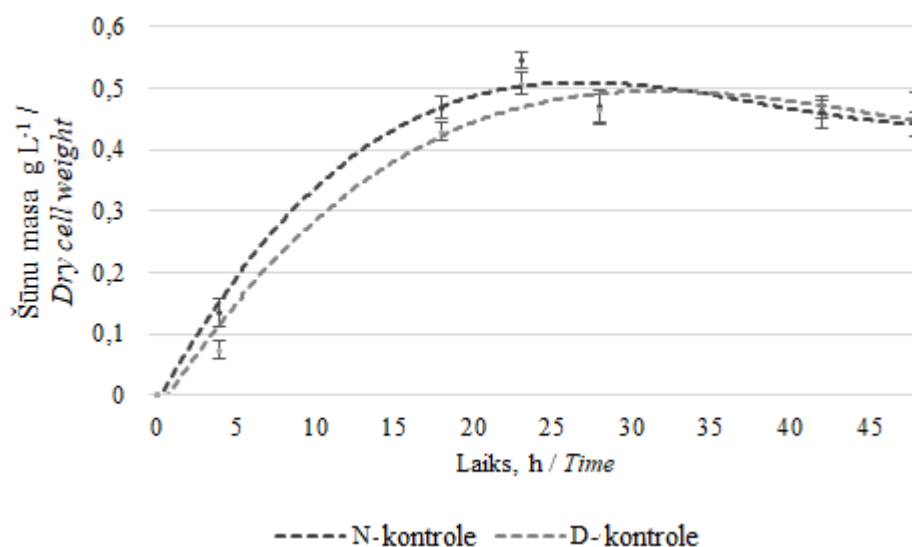
Fig. 3.6. Time-course graphic of colony forming units (CFU) in substrates during cultivation at the presence of different salts (A) P. taetrolens NCIB 9396, (B) P. taetrolens DSM 21104

3.6. attēlā ir redzams, ka baktērijas fermentācijas procesā ir eksponenciāli vairojušās. Baktēriju vairošanās dinamika ir līdzīga 3.4. attēlotajai, kurā tika pētīta sūkalu sausnas ietekme uz laktobionskābes biokonversiju.

Pētījumos ir analizēts *Pseudomonas taetrolens* KVV skaits sūkalās (Giorgi *et al.*, 2018; Gorderska *et al.*, 2014). Autori ir secinājuši, ka siera sūkalās *Pseudomonas taetrolens* sasniedz 10^7 līdz 10^{10} KVV mL^{-1} un kādu laiku paliek nemainīgā koncentrācijā (stacionārā fāze), līdz KVV skaits sāk samazināties (šūnu atmiršanas fāze). Zinātnieki ir akcentējuši, ka KVV skaits ir atkarīgs no pievienotās tīrkultūras apjoma, pH un fermentācijas laika, kā arī no substrāta sastāva. Ir noskaidrots, ka *Pseudomonas taetrolens* siera sūkalās stacionāro fāzi sasniedz 30 h laikā. Veiktajā pētījumā pat pēc 30 stundām baktērijas ir eksponenciālajā fāzē, kas demonstrē turpmāku KVV skaita pieaugumu. Var secināt, ka skābā vidē *Pseudomonas taetrolens* nepieciešams vairāk laika, lai sasniegtu stacionāro fāzi.

Baktēriju skaita izmaiņas fermentācijas procesā

Pētījuma ietvaros tika noteikta šūnu masa (3.7. attēls), lai novērtētu *Pseudomonas taetrolens* celmu NCIB 9396 un DSM 21104 augšanas dinamiku biezpiena sūkalās bez sāļu pievienošanas.



3.7. att. *P. taetrolens* šūnu masas izmaiņas kontroles paraugos fermentācijas laikā / Fig. 3.7. Time-course graphic of *P. taetrolens* dry cell weight in control samples during cultivation

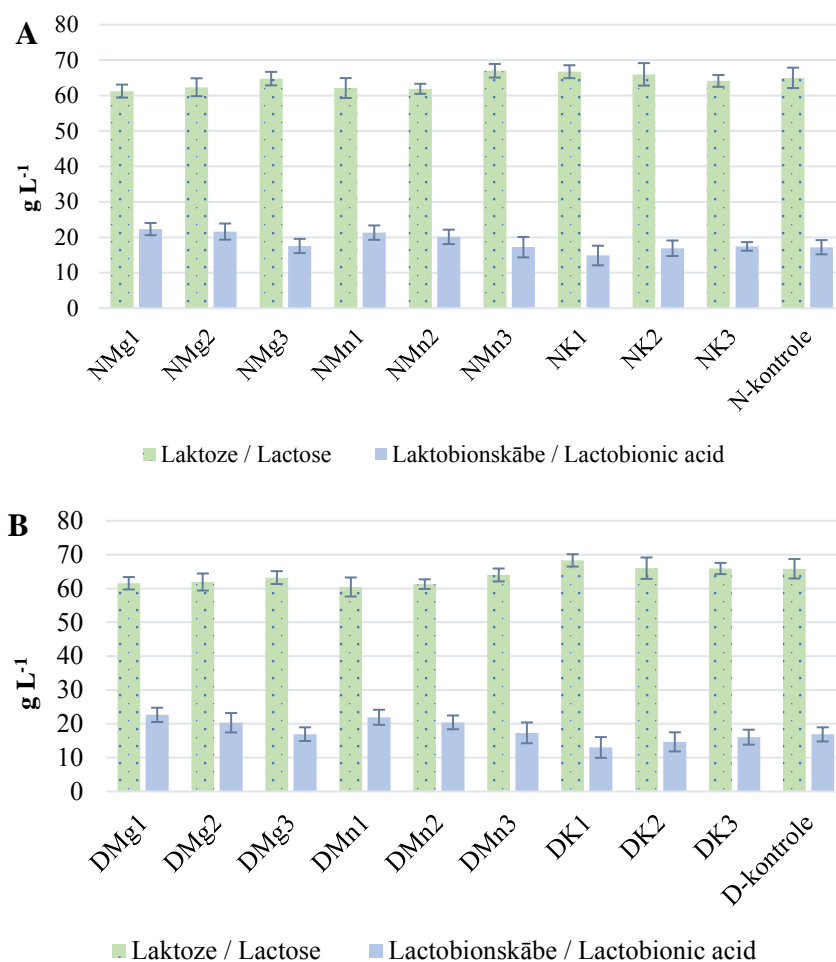
Biezpiena sūkalu paraugos baktērijas sasniedza lielāko šūnu masu 23 h fermentācijas laikā. Paraugā ar *Pseudomonas taetrolens* NCIB 9396 tika iegūta lielāka šūnu masa (0.545 g L^{-1}), bet paraugā ar *Pseudomonas taetrolens* DSM 21104 mazāka (0.507 g L^{-1}), starp abiem paraugiem bija būtiskas atšķirības ($p < 0.05$). Pēc 28 stundām abos paraugos vairs netika novērotas būtiskas atšķirības ($p > 0.05$). *Pseudomonas taetrolens* NCIB 9396 biezpiena sūkalās vairojas ātrāk nekā DSM 21104, bet pēc 28 stundu fermentācijas abi celmi vairojušies, sasniedzot līdzīgus rezultātus.

Pseudomonas taetrolens šūnu vairošanās sūkalās ir analizēta vairākos pētījumos (Alonso *et al.*, 2011; 2013a; 2013b). Ir konstatēts, ka siera sūkalās (substrāta pH 6.5) maksimālā sasniedzamā *Pseudomonas taetrolens* šūnu masa pēc 20 h fermentācijas ir līdz pat 1.8 g L^{-1} . Ir veikts pētījums, kurā maksimālā iegūtā *Pseudomonas taetrolens* šūnu masa ir 0.55 g L^{-1} , ja siera sūkalās fermentācijas laikā pH ir ap 4.5. Rezultāti ir līdzīgi šajā pētījumā iegūtajiem, bet atšķirība ir izmantotā substrāta veidā un pH.

Lai iegūtu lielāku *Pseudomonas taetrolens* šūnu masu, būtu nepieciešams pievienot vairāk ūrkultūras un regulēt pH līdz 6.5 visu fermentācijas laiku.

Laktobionskābes iznākums

Laktobionskābes un laktozes iznākums paraugos pēc 48 h fermentācijas $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā ir parādīts 3.8. attēlā. Laktobionskābes iznākums bija robežās no 13.02 līdz 21.65 g L^{-1} , pārrēķinot, tas ir 15.46 līdz 25.71% no sākotnējā laktozes satura.



3.8. att. **Laktobionskābes un laktozes saturs paraugos fermentācijas beigās (A) *P. taetrolens* NCIB 9396, (B) *P. taetrolens* DSM 21104 /**

Fig. 3.8. Lactobionic acid and lactose concentration after fermentation with (A) *P. taetrolens* NCIB 9396, (B) *P. taetrolens* DSM 21104

Būtiskas atšķirības netika konstatētas ($p > 0.05$) starp N-kontroles un NMg3, NMn2, NMn3, NK1, NK2, NK3 paraugiem (3.8. att. (A)). Savukārt starp N-kontroles un NMg1, NMg2, NMn1 paraugiem ir būtiska atšķirība ($p < 0.05$).

Būtiskas atšķirības ($p > 0.05$) starp D-kontrole un DMg2, DMg3, DMn2, DMn3, DK1, DK2, DK3 paraugiem netika konstatētas (3.8. att. (B)). Turklāt starp D-kontroles, DMg1 un DMn1 paraugiem ir būtiska atšķirība ($p < 0.05$), jo Mg^{2+} un Mn^{2+} jonu klātbūtne pozitīvi ietekmē *Pseudomonas taetrolens* vairošanos, kas sekmē laktozes oksidāciju laktobionskābē. K^+ jonu klātbūtne nav ietekmējusi laktobionskābes biokonversiju.

Zinātniskā literatūrā nav pieejamu pētījumu par sāļu ietekmi uz *Pseudomonas taetrolens* aktivitāti. Ir informācija, ka Mg^{2+} jonu trūkums substrātā var izraisīt šķiedrainas baktēriju struktūras veidošanos, kavējot šūnu dalīšanos un augšanu. Baktēriju augšana Mg^{2+} jonu klātbūtnē ir skaidrojama ar atziņu, ka magnijam ir ietekme uz vielmaiņas procesu norisi šūnās un to dalīšanos. Mg^{2+} joni stabilizē arī nukleīnskābes (DNS un RNS) un piedalās peptīdu hidrolīzē. Mn^{2+} joni ir nepieciešami baktēriju producēto enzīmu funkcijām. Mn^{2+} joni ir iesaistīti RNS polimerāzē, ierosina laktāzes, ksilozes izomerāzes, mangāna katalāzes, mangāna superoksīda dismutāzes un NADH oksidāzes aktivitāti. Mangāna joni var palielināt arī enzīmu aktivitātes pH diapazonu (Gunsalus & Stanier, 2013). Pētījums ir apstiprinājis, ka mikroorganismu vairošanai ir nepieciešami Mg^{2+} un Mn^{2+} joni un to klātbūtne substrātā veicina lielāku laktobionskābes iznākumu.

3.3. nodaļas kopsavilkums

Ekspērimētā biezpiena sūkalas tika bagātinātas ar dažādiem sāļiem. Pētījums ir apstiprinājis, ka *Pseudomonas taetrolens* vairošanai ir nepieciešami Mg^{2+} un Mn^{2+} joni un to klātbūtne substrātā veicina lielāku laktobionskābes iznākumu. Iegūtie rezultāti nesasniedza līdzvērtīgus rezultātus, kādi tie ir ar siera sūkalām citos pētījumos (Giorgi *et al.*, 2018; Goderska *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2017; 2015; 2013b; 2012a; 2012b; 2011; Miyamoto *et al.*, 2000).

Summary of Chapter 3.3.

*In this experiment acid whey substrate was supplemented with various salts. The study has confirmed that Mg^{2+} and Mn^{2+} ions are required for the growth of *Pseudomonas taetrolens* and salts presence in the substrate contributes to a higher yield of lactic acid. Obtained results despite the addition of salts still did not achieve the same results as with sweet whey in other studies (Giorgi *et al.*, 2018; Goderska *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2017; 2015; 2013b; 2012a; 2012b; 2011; Miyamoto *et al.*, 2000).*

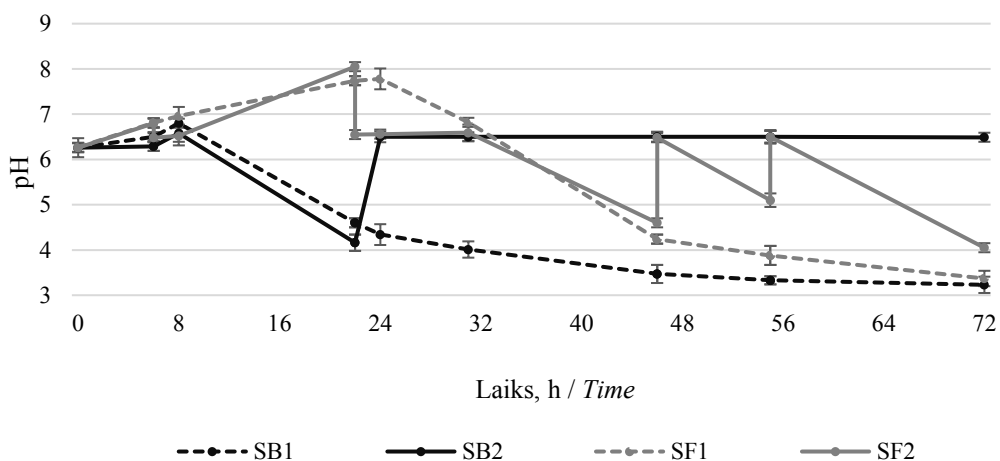
3.4. Dažādas izcelsmes sūkalu fermentēšanas salīdzinājums kontrolētā un nekontrolētā pH kolbās un bioreaktorā / Comparison of different whey fermentation at controlled and uncontrolled pH in flasks and bioreactor

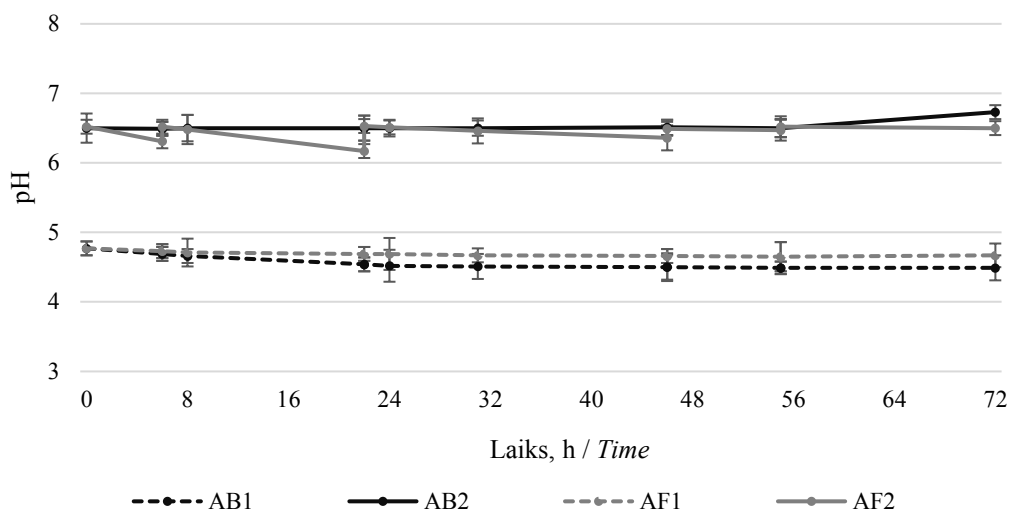
Ekspērimēta mērķis bija izpētīt baktēriju spēju biezpiena sūkalās oksidēt laktozi laktobionskābē, salīdzinot ar siera sūkalām; arī salīdzināt laktobionskābes ieguves iespējas bioreaktorā ar fermentāciju kolbās, kā arī izprast pH stabilizēšanas nozīmi.

pH izmaiņas fermentācijas laikā

pH izmaiņas fermentācijas laikā attēlotas 3.9. attēlā. 3.9. attēls (A) parāda pH izmaiņas siera sūkalu paraugos un 3.9. attēls (B) biezpiena sūkalu paraugos.

A



B

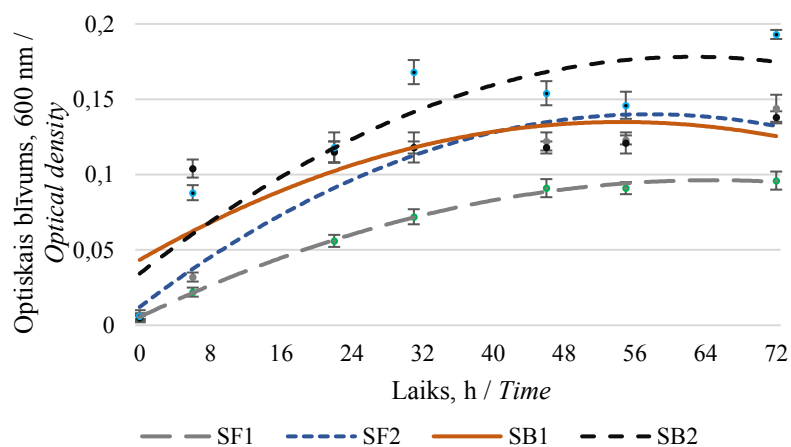
3.9. att. pH izmaiņas paraugos fermentācijas laikā (A) siera sūkalās, (B) biezpiena sūkalās /

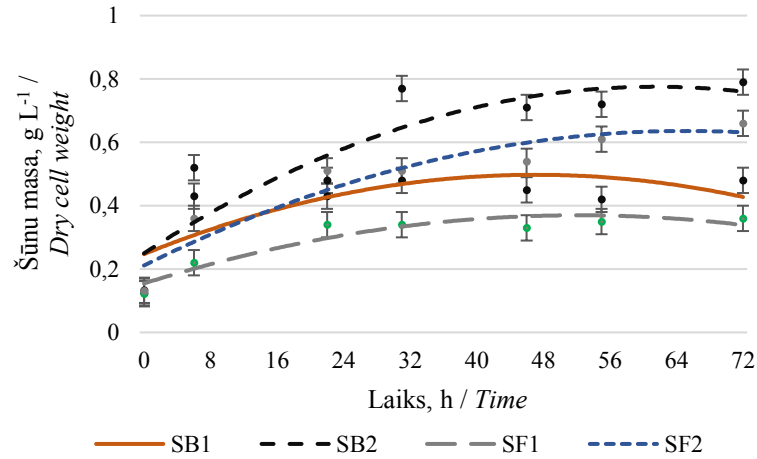
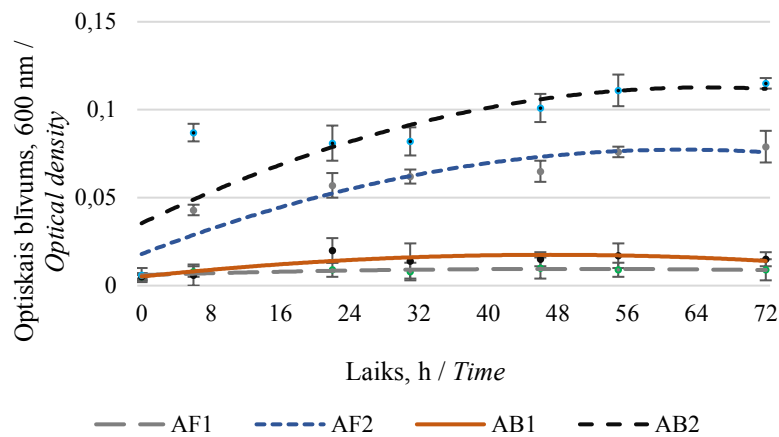
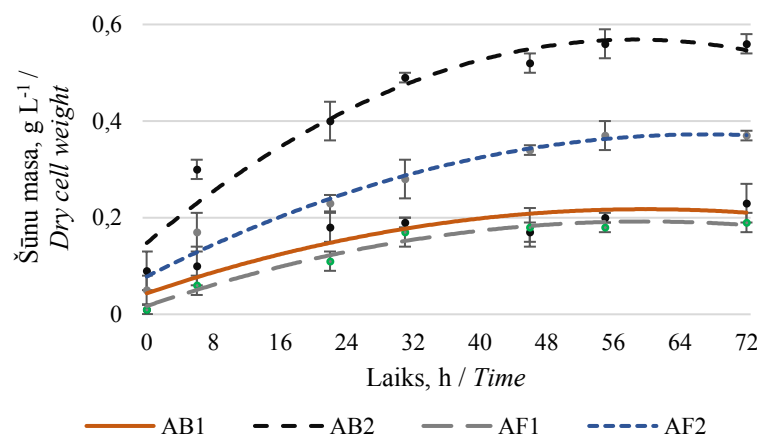
Fig. 3.9. Time-course graphic of pH in different substrates (A) sweet whey, (B) acid whey during fermentation

Var novērot, ka sākotnēji siera sūkalu paraugos (3.9. attēlā (A)) pH nedaudz palielinās, jo baktērijas pielāgojas substrātam, producējot nukleīnskābes, un tikai pēc tam sāk vairoties un oksidēt laktozi laktobionskābē, ko apstiprina pH samazināšanās. Fermentācijas beigās starp SB1 un SF1 paraugiem netika novērotas būtiskas atšķirības ($p > 0.05$). 3.9. attēlā (B) paraugu pH mainījās lēnām, acīmredzot baktērijas nespēja pielāgoties skābajā vidē. Ja pH periodiski tiek stabilizēts līdz 6.5, var novērot straujāku pH samazināšanos siera sūkalu paraugos, salīdzinot ar biezpiena sūkalu paraugiem (paraugi SF2 un AF2). Procesa beigās starp AB1 un AF1 paraugiem netika konstatētas būtiskas atšķirības ($p > 0.05$), biezpiena sūkalās pH izmaiņas fermentācijas laikā bija līdzīgas bioreaktorā un kolbās.

Baktēriju vairošanās fermentācijas laikā

Par baktēriju vairošanās efektivitāti var spriest arī pēc optiskā blīvuma un šūnas masas. Siera sūkalu paraugos *Pseudomonas taetrolens* vairojas labāk nekā biezpiena sūkalu paraugos (3.10. attēls).

A

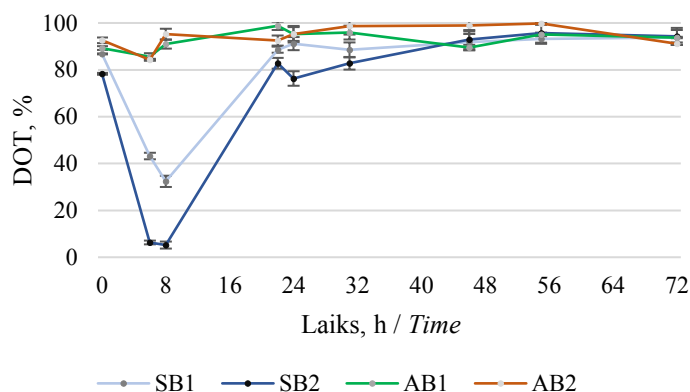
B**C****D**

3.10. att. *P. taetrolens* vairošanās fermentācijas laikā dažādos substrātos (A) siera sūkalās – pēc optiskā blīvuma analīzes, (B) siera sūkalās – pēc šūnu masas analīzes, (C) biezpiena sūkalās – pēc optiskā blīvuma un (D) biezpiena sūkalās – pēc šūnu masas / Fig. 3.10. Time-course graphic of *P. taetrolens* growth during fermentation in different substrates (A) sweet whey by optical density, (B) sweet whey by dry cell weight, (C) acid whey by optical density, (D) acid whey by dry cell weight

Labāk baktērijas vairojas vidē ar kontrolētu pH. Fermentācijas procesā bija būtiskas atšķirības starp AB1 un AF1 paraugiem ($p < 0.05$), abos paraugos tika novērota ļoti lēna baktēriju augšana, gan optiskais blīvums, gan šūnu masa bija maza, kas pierāda, ka

Pseudomonas taetrolens vairošanās skābā vidē ir ierobežota. Alonso *et al.* (2012) pētījumā ir norādījis, ka *Pseudomonas taetrolens* laktozes biosintēze siera sūkalās ar regulētu pH robežās no 4.0 līdz 4.5 kavē laktobionskābes veidošanos, savukārt ar pH no 6.0 līdz 6.5 veicina šūnu proliferāciju, kā rezultātā baktēriju vairošanās ātrums ir lielāks nekā citā pH (Alonso *et al.*, 2012a).

Izšķīdušā skābekļa saturs (DOT) substrātā bija saistīts ar baktēriju vairošanās fāzi, kā novērots 3.11. attēlā. DOT tika noteikts tikai paraugiem bioreaktorā, jo bioreaktors ir aprīkots ar skābekļa elektrodu, bet, fermentējot kolbās, šāda funkcija nebija iespējama. Siera sūkalu paraugos (SB1 un SB2) fermentācijas sākumposmā tika konstatēts ievērojams izšķīdušā skābekļa satura samazinājums, kam sekoja pieaugums līdz piesātinātībai, kas norāda uz laktozes oksidēšanās procesa sākumu.



3.11.att. **Izšķīdušā skābekļa saturs siera un biezpiena sūkalās fermentācijas laikā bioreaktorā /**

Fig. 3.11. Time-course graphic of DOT in sweet whey and acid whey during fermentation in a bioreactor

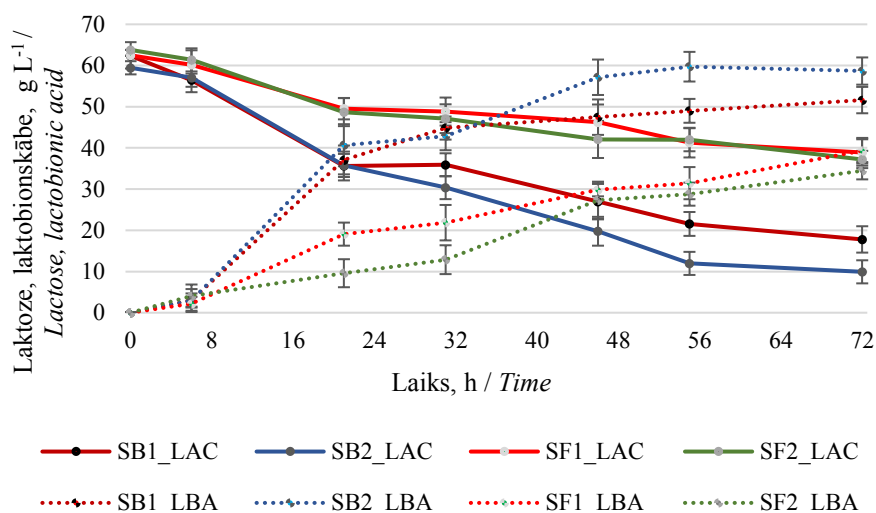
Turklāt tika noteikta būtiska atšķirība minimālajā DOT, kas sasniegts fermentācijas vidē. Baktēriju vairošanās fāzē tika sasniegts minimālais DOT 6% siera sūkalās ar kontrolētu pH (pH 6.5), salīdzinot ar 85%, kas iegūts, biezpiena sūkalās ar nepielāgotu pH. 3.11. attēlā ir redzams, ka *Pseudomonas taetrolens* biezpiena sūkalu paraugos (AB1 un AB2) vāji patērēja pieejamo skābekli, jo DOT vērtības bija tuvu piesātinājuma līmenim. Arī šajā pētījumā ir noskaidrots, ka *Pseudomonas taetrolens* augšana biezpiena sūkalās ir ierobežota.

Laktobionskābes iznākums

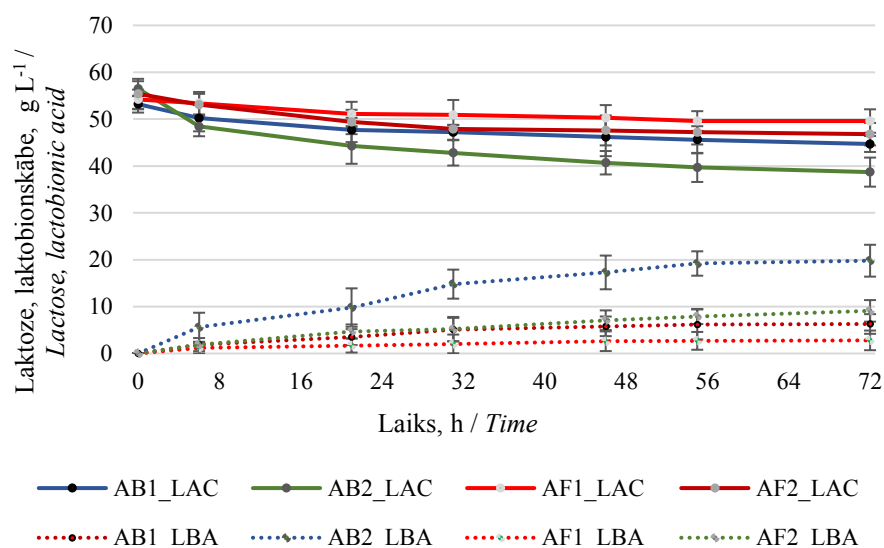
Laktozes oksidēšanas intensitātes atšķirības laktobionskābē starp siera (A) un biezpiena sūkalām ir redzamas 3.12. attēlā (B).

Augstākā laktozes konversija laktobionskābē tika sasniegta SB2 paraugā, izmantojot siera sūkalas, bioreaktorā pielāgotā pH. Tika konstatētas būtiskas atšķirības biezpiena un siera sūkalu fermentācijā. Biezpiena sūkalu paraugos laktobionskābes iznākums bija būtiski mazāks. Tika konstatētas būtiskas atšķirības iznākumā, fermentējot paraugus bioreaktorā un kolbās. Labāki rezultāti tika iegūti bioreaktorā, jo papildus skābekļa pievadīšana sekmēja baktēriju augšanu un laktobionskābes sintēzi. Fermentējot paraugus nepielāgotā vides pH, tas vēl vairāk samazinās radušās laktobionskābes dēļ, ir apgrūtināta *Pseudomonas taetrolens* augšana, vienlaicīgi arī laktozes biokonversija. Šī iemesla dēļ fermentācijas laikā pH ir jāuztur aptuveni 6.5 robežās, lai nodrošinātu optimālu vidi *Pseudomonas taetrolens* augšanai, laktobionskābes biosintēzei un šūnu metabolismam.

A

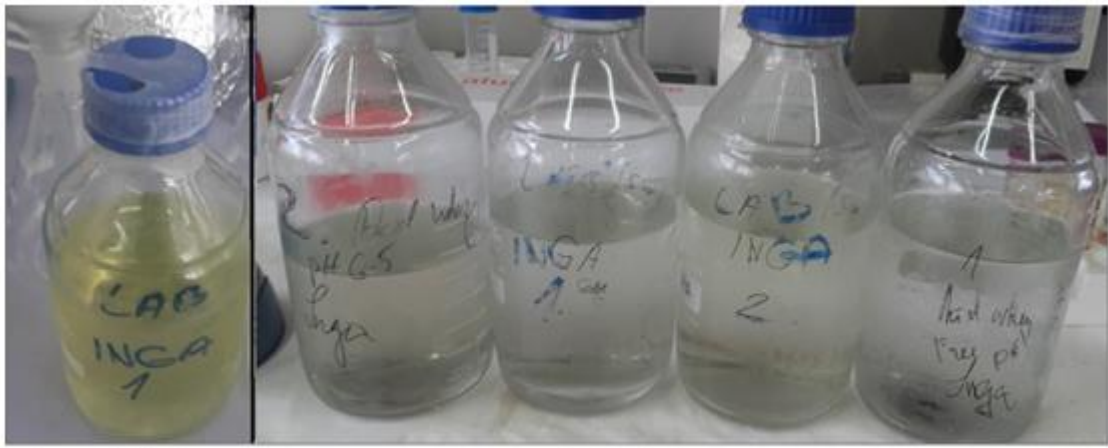


B



3.12. att. Laktozes (LAC) un laktobionskābes (LBA) satura izmaiņas fermentācijas laikā dažādos substrātos (A) siera sūkalās, (B) biezpiena sūkalās /
 Fig. 3.12. Time-course graphic of lactose (LAC) and lactobionic acid (LBA) in different substrates (A) sweet whey, (B) acid whey during fermentation

Pēc fermentācijas substrāti ir jāattīra, ko veica ar centrifugēšanu, adsorbciju ar aktīvo ogli un mikrofiltrēšanu. Centrifugēšana sadala maisījuma sastāvdaļas pēc blīvuma vai daļiņu izmēra, tāpēc šo attīrīšanas posmu ir svarīgi izmantot uzreiz pēc fermentācijas procesa, lai atdalītu lielāko daļu *Pseudomonas taetrolens* biomasas no fermentētā substrāta (Todaro, 2014). Lai no substrātiem izdalītu sintezēto produktu, ir jāveic substrāta apstrāde ar aktīvo ogli. Tā rezultātā substrāta krāsa mainās no dzeltenas uz caurspīdīgu, kas vizuāli novērojams 3.13. attēlā.

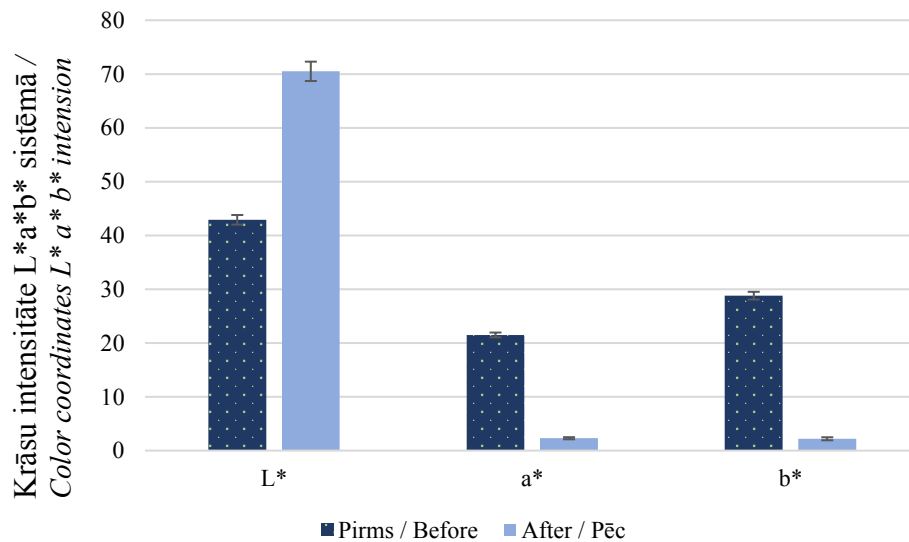


Pirms / Before

Pēc / After

3.13. att. Parauga krāsu maiņa pirms un pēc apstrādes ar aktīvo ogli /
 Fig. 3.13. *Discoloration of the sample before and after treatment with activated carbon*

AB2 parauga krāsu izmaiņas pirms un pēc attīrīšanas ir apkopotas 3.14. attēlā.

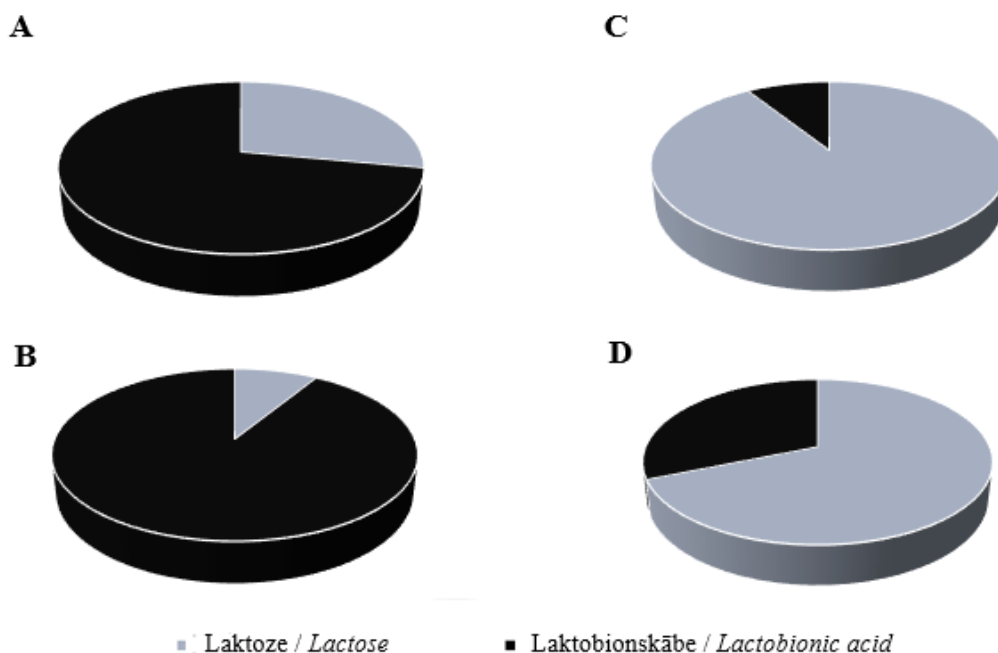


3.14. att. Krāsu intensitātes izmaiņas AB2 paraugā pirms un pēc attīrīšanas ar aktīvo ogli /

Fig. 3.14. *Changes of color intensity in AB2 sample before and after activated carbon treatment*

Paraugs AB2 kļuva gaišāks un zaudēja manāmo sarkano un dzelteno krāsas intensitāti (3.14. attēls). Iegūtās atšķirības ir būtiskas ($p < 0.05$), attīrīšana ar aktīvo ogli palīdz iegūt tīrāku galaproduktu. Sulaymon un Abood (2014) pētījumā pierādīja, ka dzeltenā nokrāsa notekūdeņos tika noņemta ar aktīvās ogles adsorbciju, iegūstos caurspīdīgu ūdeni. Aktīvā ogle tiek izmantota cukurniedru sulas nevēlamās krāsas pigmentu noņemšanai, un pētījumos secināts, ka aktīvā ogle var būt arī labs atkrāsošanas līdzeklis citronskābes fermentācijas substrātam (Sun, Jianchun & Xu, 2009). Adsorbcija ar aktīvo ogli palīdz iegūt tīrāku produktu un atbrīvoties no nepiemērotas krāsas pigmentiem, tāpēc šis posms ir nozīmīgs laktobionskābes attīrīšanas procesā pēc fermentācijas. Pilnīga biomasas atdalīšana tiek veikta ar mikrofiltrāciju. Arī Saez-Orviz *et al.* (2022) ir pierādījuši, ka mikrofiltrācijas process spēj atdalīt pat *Pseudomonas taetrolens* izdalītos endotoksīnus no siera sūkalu substrāta pēc fermentācijas. Tas pierāda, ka iegūtais laktobionskābes produkts ir drošs lietošanai pārtikā, ja tiek īstenota substrāta mikrofiltrācija.

Attīrītais filtrāts tika sagatavots sublimācijai, iegūstot baltus, sīkus kristālus. Iegūtais produkts tālāk analizēts, lai noteiktu tā sastāvu (skat. 3.15. attēls).



3.15. att. Laktobionskābes un laktozes saturs paraugos pēc 72 h fermentācijas bioreaktorā (A) siera sūkalās ar nekontrolētu pH, (B) siera sūkalās ar pielāgotu pH 6.5, (C) biežpiena sūkalās ar nekontrolētu pH, (D) biežpiena sūkalas ar pielāgotu pH 6.5 / Fig. 3.15. Lactobionic acid and lactose concentration in cell free samples after 72 h of fermentation in bioreactor (A) sweet whey with uncontrolled pH, (B) sweet whey with adjusted pH, (C) acid whey with uncontrolled pH, (D) acid whey with adjusted pH

Iegūtajos paraugos olbaltumvielas netika konstatētas, kas norāda uz attīrīšanas efektivitāti. Iegūtie paraugi sastāvēja no laktozes un laktobionskābes maisījuma. Rezultāti parādīja, ka paraugos laktobionskābes saturs bija šāds: 72.05% SB1, 91.24% SB2, 8.98% AB1, 31.24% AB2, turklāt tika konstatētas būtiskas atšķirības iegūtās skābes satura ziņā starp šiem paraugiem ($p < 0.05$). Ievērojams laktobionskābes saturs tika iegūts siera sūkalu paraugos, bet biežpiena sūkalu paraugos laktoze netika efektīvi oksidēta laktobionskābē. Citu zinātnieku pētījumu rezultāti (Alonso *et al.*, 2012a; 2012b; 2013a; 2017; Giorgi *et al.*, 2018) par siera sūkalu pielietojumu ir apstiprinājuši laktobionskābes iznākumu no 46 līdz 100%, izmantojot *Pseudomonas taetrolens*. Autori ir izmantojuši dažādas tīrkultūras un substrāta piedevas, stratēģijas mikroorganismu kultivēšanai un atšķirīgus pH.

3.4. nodaļas kopsavilkums

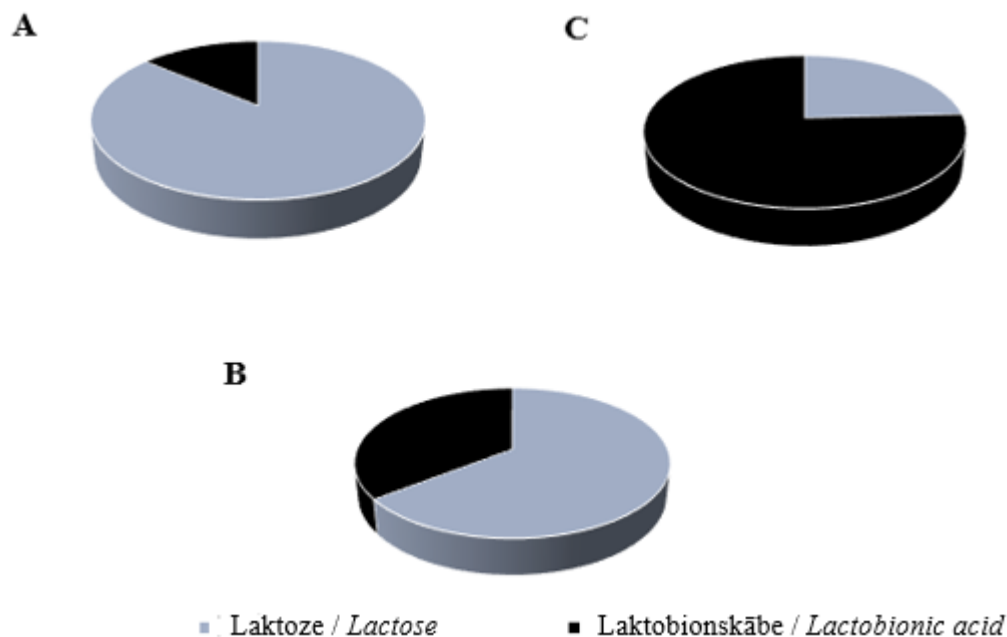
Pētījumā tika apstiprināts skābekļa nozīmīgums fermentācijas procesa norisei un galaprodukta ieguvei. Tika pierādīta pH stabilizācijas nepieciešamība fermentācijas procesā. Šie rezultāti skaidri demonstrē biežpiena sūkalu vājo piemērotību laktobionskābes ieguvei ar *Pseudomonas taetrolens*, jo baktērijas nespēj tik labi vairoties biežpiena sūkalās, salīdzinot ar siera sūkalām. Lai panāktu efektīvāku laktozes biokonversiju laktobionskābē, izmantojot biežpiena sūkalas, ir nepieciešami pētījumi, lai izziņātu jautājumus, kas ietekmē baktēriju vairošanos biežpiena sūkalās. Ir nepieciešams izstrādāt jaunu pieeju biežpiena sūkalu fermentācijai, lai sasniegtu lielāku laktobionskābes iznākumu.

Summary of Chapter 3.4.

This study confirmed the importance of oxygen for the fermentation process and the production of the final product, and also the importance of pH adjustment in the fermentation process. These results demonstrate the weak suitability of acid whey for the production of lactobionic acid with *Pseudomonas taetrolens*, as the bacteria are less able to multiply in acid whey than in sweet whey. To achieve a more efficient bioconversion of lactose into lactobionic acid using acid whey, research is needed to investigate the issues affecting the growth of *Pseudomonas taetrolens* in acid whey. A new approach is needed for acid whey fermentation to achieve higher lactobionic acid yields.

3.5. Dažādas izcelsmes sūkalu kombināciju pārbaude laktobionskābes ieguvei / *Comparison of different whey for lactobionic acid production*

Eksperimenta mērķis bija noteikt biezpiena un siera sūkalu kombinācijas iespējamību, *Pseudomonas taetrolens* vairošanās optimizācijai. Tika gatavoti trīs paraugi, vienā dominēja biezpiena sūkalas, otrā biezpiena un siera sūkalas bija vienādās proporcijās un trešajā paraugā dominēja siera sūkalas. Iegūtie laktobionskābes iznākumi ir proporcionāli siera sūkalu īpatsvaram paraugā, jo vairāk siera sūkalu, lielāks laktobionskābes iznākums (skat. 3.16. attēls).



3.16. att. Laktobionskābes un laktozes saturs paraugos pēc 48 h fermentācijas bioreaktorā 30 °C temperatūrā (A) 75% biezpiena un 25% siera sūkalas, (B) 50% biezpiena un 50% siera sūkalas, (C) 25% biezpiena un 75% siera sūkalas /
Fig. 3.16. Lactobionic acid and lactose concentration after 48 h of the fermentation in a bioreactor at 30 °C. (A) 75% acid whey and 25% sweet whey, (B) 50% acid whey and 50% sweet whey, (C) 25% acid whey 75% sweet whey

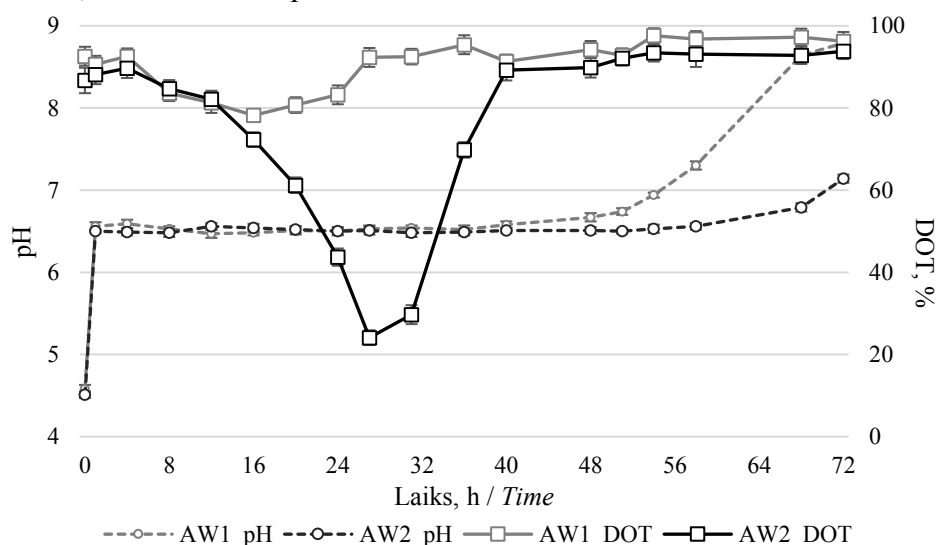
Iegūtie rezultāti apstiprināja, ka biezpiena sūkalu klātbūtne kavē laktobionskābes iegūvi, tāpēc ir nepieciešami padziļināti pētījumi ar biezpiena sūkalām, lai analizētu cēloņus nepietiekamai *Pseudomonas taetrolens* vairošanai un laktozes biokonversijai laktobionskābē.

3.6. Laktobionskābes ieguve, atkārtoti pievienojot baktēriju biomasu / *Production of lactic acid by re-addition of bacterial biomass*

Eksperimenta mērķis bija izpētīt baktēriju vairošanās likumsakarības biezpiena sūkalās.

pH un izšķīdušā skābekļa saturs izmaiņas fermentācijas laikā

pH un izšķīdušā skābekļa (DOT) saturs substrātā tika kontrolēts pēc bioreaktora monitorā atspoguļotās informācijas, to dinamika apkopota 3.17. attēlā. Tas ir nepieciešams, lai būtu skaidra *Pseudomonas taetrolens* vairošanās efektivitāte. Pēc šiem parametriem var aptuveni spriest par baktēriju darbību substrātā. Pirmajās fermentācijas minūtēs abu paraugu pH bija 4.57 līdz pH tika noregulēts ar 6 M NaOH līdz 6.5. Rezultāti parādīja, ka fermentācijas procesa laikā pH palielinās (pēc 40 stundām AW1 un pēc 58 stundām AW2 paraugam), bet pārējā procesa laikā tas tika uzturēts līdz pH 6.5, lai iegūtu optimālu baktēriju augšanas dinamiku. pH vairs netika kontrolēts, kad tā vērtības pārsniedza 6.5.

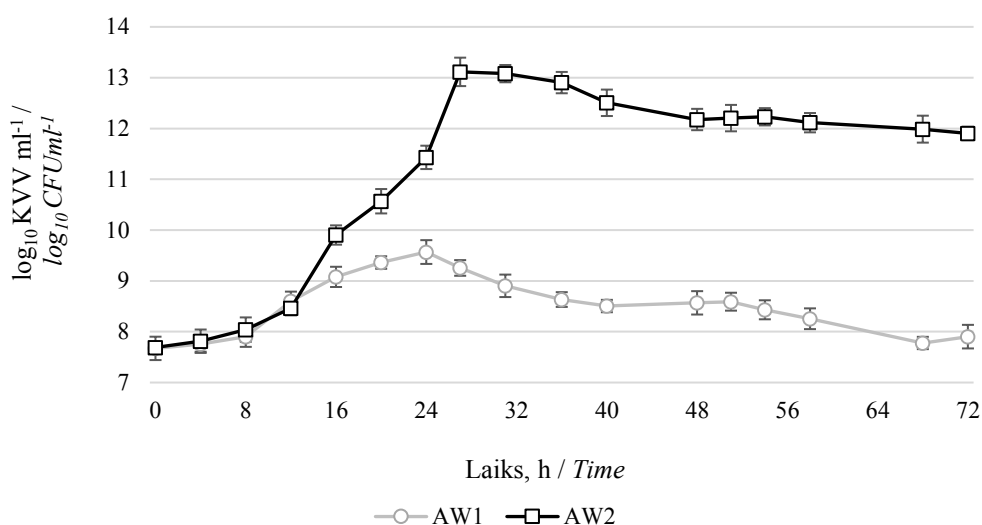


3.17. att. **pH un izšķīdušā skābekļa saturs izmaiņas substrātos fermentācijas laikā / Fig. 3.17. Time-course graphic of pH and DOT in substrates during fermentation**

Pēc 40 h starp abiem paraugiem tika novērotas būtiskas pH atšķirības ($p < 0.05$). Fermentācijas beigās pH sasniedza 8.76 AW1 un 7.14 AW2 paraugos. Laktozes oksidēšanas procesā pH samazinās, jo rodas laktobionskābe. Baktēriju atmiršana veicina lielāku slāpekļa savienojumu klātbūtni substrātos, kas izraisa pH paaugstināšanos. To var skaidrot arī ar *Pseudomonas taetrolens* spēju producēt proteolītiskos enzīmus (Alonso *et al.*, 2011). 3.17. attēlā var redzēt, ka *Pseudomonas taetrolens* nemaz nepatērē pieejamo skābekli AW1 paraugā, salīdzinot ar AW2 paraugu, jo DOT vērtības AW1 paraugam ir ļoti tuvu piesātinājuma līmenim. Izšķīdušā skābekļa saturs ir cieši sasaistīts ar baktēriju vairošanās fāzi (3.18. attēls). Izšķīdušais skābeklis tiek patērēts, kamēr baktērijas ir eksponenciālajā fāzē. AW2 paraugā baktēriju tīrkultūra tika pievienota atkārtoti, tāpēc arī izšķīdušā skābekļa saturs samazinājās vairāk nekā AW1 paraugam. *Pseudomonas taetrolens* ir aerobas, to vairošanai ir nepieciešams skābeklis, kā rezultātā, baktērijām vairojoties, tās vairāk patērē substrātā izšķīdušo skābekli. Skābekļa padevei ir svarīga loma baktēriju metabolītu producēšanā un šūnu augšanā (Lozano *et al.*, 2011). DOT saturs samazinājās līdz 78.2% AW1 paraugā un līdz 24.1% AW2 paraugā, kas liek secināt, ka baktērijas AW1 paraugā vairojās labāk, ja baktēriju biomasu tiek pievienota atkārtoti.

Baktēriju vairošanās fermentācijas laikā

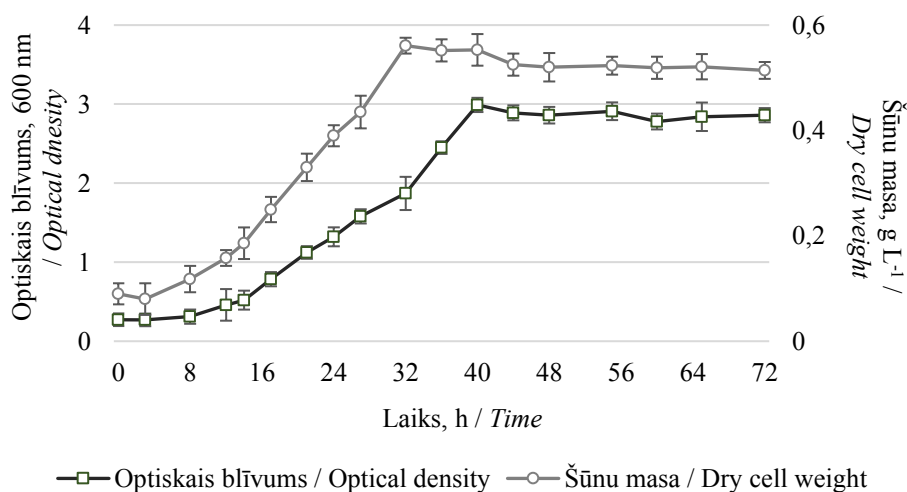
Tika pārbaudīts dzīvotspējīgo koloniju veidojošo vienību skaits (skat. 3.18. attēlu), baktēriju šūnu masa un optiskais šūnu blīvums (3.19. attēls) paraugiem, lai noteiktu baktēriju vairošanos un prognozētu laktobionskābes iznākumu biezpiena sūkalu paraugos.



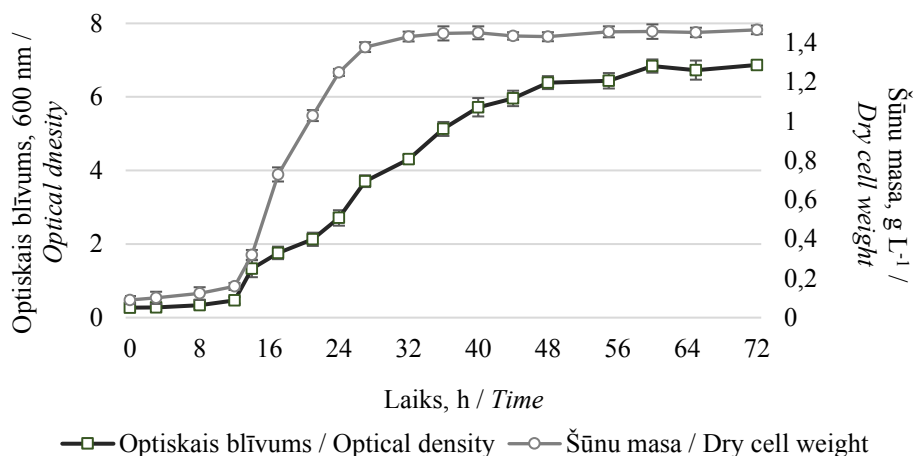
3.18. att. *P. taetrolens* KVV skaita izmaiņas paraugos, fermentējot bioreaktoros / Fig. 3.18. Time-course profile of *P. taetrolens* CFU changes in samples during fermentation in bioreactors

Pseudomonas taetrolens vairošanās līkņu atšķirības abiem paraugiem var redzēt 3.18. attēlā. AW1 paraugā dzīvotspējīgās baktērijas 24 stundās sasniedz maksimumu, t.i. $3.7 \cdot 10^9$ KVV mL⁻¹, bet AW2 paraugā 27 stundu laikā – $1.3 \cdot 10^{13}$ KVV mL⁻¹. Baktēriju augšanas līknes kāpums AW2 paraugam ir straujāks laikā no 12 līdz 14 h arī no 24 līdz 26 h, kad jauna baktēriju biomasa ir atkārtoti pievienota. Dzīvotspējīgo šūnu skaits ir cieši saistīts ar optiskā šūnu blīvuma un šūnu masas datiem (skat. 3.19. attēlu).

A



B



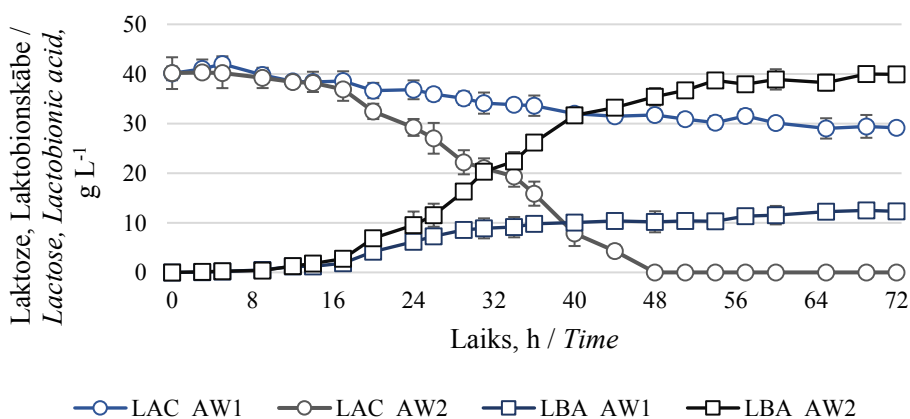
3.19. att. *P. taetrolens* vairošanās, šūnu optiskais blīvums un šūnu masa paraugos fermentācijas laikā (A) AW1 un (B) AW2 paraugi /

Fig. 3.19. Time-course profile of *P. taetrolens* growth represented as optical density and dry cell weight in (A) AW1 and (B) AW2 samples during fermentation

AW1 paraugā optiskais blīvums un šūnu masa līdz pat fermentācijas procesa beigām bija mazāka nekā AW2 paraugā, starp šiem rezultātiem bija būtiska atšķirība ($p < 0.05$). Fermentācijas pirmajās ~ 14 stundas starp paraugiem netika konstatēta būtiska atšķirība ($p > 0.05$) līdz atkārtotai biomasas pievienošanai AW2 paraugā. Maksimālais iegūtais optiskais blīvums un šūnu masa paraugos ir apkopota 3.2. tabulā. Iepriekšiegūtie rezultāti parādīja, ka baktērijas vairojas lēnām biezpiena sūkalās, bet *Pseudomonas taetrolens* biomasas pievienošana fermentācijas laikā palīdz baktēriju vairošanai, tās veiksmīgāk pielāgojas, sasniedzot līdzīgu šūnu masu, kā norādīts citu autoru pētījumos (Alonso *et al.*, 2011; 2012a; 2012b; 2013b; 2017) ar siera sūkalām. Baktēriju vairošanās iespēja dot netiešu norādi uz pozitīvu laktobionskābes ieguves bilanci. Ja baktērijas vairojas intensīvi, tad laktobionskābes biosintēze būs efektīva.

Laktobionskābes iznākums

Laktozes un laktobionskābes satura izmaiņu dinamika fermentācijas laikā ir attēlota 3.20. attēlā.



3.20. att. Laktozes (LAC) un laktobionskābes (LBA) satura izmaiņas fermentācijas procesā / Fig. 3.20. Time-course graphic of lactose (LAC) and lactobionic acid (LBA) concentration during fermentation

Pēc 16 fermentācijas stundām tika konstatētas būtiskas atšķirības starp paraugiem ($p < 0.05$). Ieguves process bija efektīvs, AW2 paraugs sasniedza 100% laktozes biokonversiju laktobionskābē 48 stundu laikā, savukārt AW1 paraugā pēc 72 stundu fermentācijas tika oksidēti tikai 29.7% no sākotnējās laktozes. Rezultāti parādīja atkārtotas baktēriju biomasas pievienošanas nozīmi baktēriju vairošanai, lai sasniegtu mērķi – pilnīga laktozes biosintēze laktobionskābē.

Fermentācijas procesa parametru analīze

Lai analizētu laktobionskābes ieguves procesa efektivitāti, tika noteikti dažādi fermentācijas procesu raksturojoši parametri, kas apkopoti 3.2. tabulā. Tie ievērojami atšķīrās AW2 un AW1 paraugiem, izņemot $Y_{X/S}$, kas abiem paraugiem bija vienāds ($p < 0.05$). $Y_{X/S}$ norāda cik baktēriju biomasas tiek patērēts viena grama laktobionskābes biosintēzei.

3.2. tabula / Table 3.2.

Biezpiena sūkalu fermentācijas procesa raksturojošo datu kopsavilkums / Summary of values acquired in acid whey fermentation process

Paraugš / Sample	AW1	AW2
μ , h^{-1}	0.06 ± 0.01^a	0.15 ± 0.01^b
μ_{max} , h^{-1}	0.08 ± 0.01^a	0.27 ± 0.01^b
Lag fāzes ilgums / Time of lag phase, h	16 ^a	14 ^b
WP, $g L^{-1} h^{-1}$	0.22 ± 0.01^a	0.74 ± 0.02^b
qLBA, $g^{-1} h^{-1}$	0.60 ± 0.02^a	0.73 ± 0.03^b
Optiskais blīvums / Optical density, 600 nm	2.99 ± 0.02^a	6.87 ± 0.09^b
<i>Pseudomonas taetrolens</i> , \log_{10} KVV / CFU mL^{-1}	9.57 ± 0.17^a	13.14 ± 0.23^b
$Y_{X/S}$, $g g^{-1}$	0.035 ± 0.002^a	0.034 ± 0.004^a
WX, $g L^{-1} h^{-1}$	0.010 ± 0.002^a	0.027 ± 0.001^b
Šūnu masa / Dry cell weight, $g L^{-1}$	0.56 ± 0.12^a	1.47 ± 0.18^b
Fermentācijas laiks / Fermentation time, h	72 ^a	48 ^b
LBA iznākums / Yield of LBA, %*	29.70 ± 1.6^a	99.85 ± 0.1^b

*Iznākums izteikts % no konvertētās laktozes satura laktobionskābē / yield was shown as the % of lactose converted into lactic acid; μ – īpatnējais augšanas ātrums / specific growth rate; μ_{max} – maksimālais īpatnējais augšanas ātrums / maximum specific growth rate; qLBA – specifiskais laktobionskābes producēšanas ātrums / specific lactic acid production rate; $Y_{X/S}$ – saražotās biomasas daudzums attiecībā pret patērēto laktozes saturu fermentācijas laikā / the amount of biomass produced in relation to the concentration of lactose consumed during fermentation; WX – biomasas produktivitāte fermentācijas laikā / biomass productivity of the fermentation process; WP – laktobionskābes saturs tilpuma vienībā fermentācijas laikā / lactic acid productivity of the fermentation process.

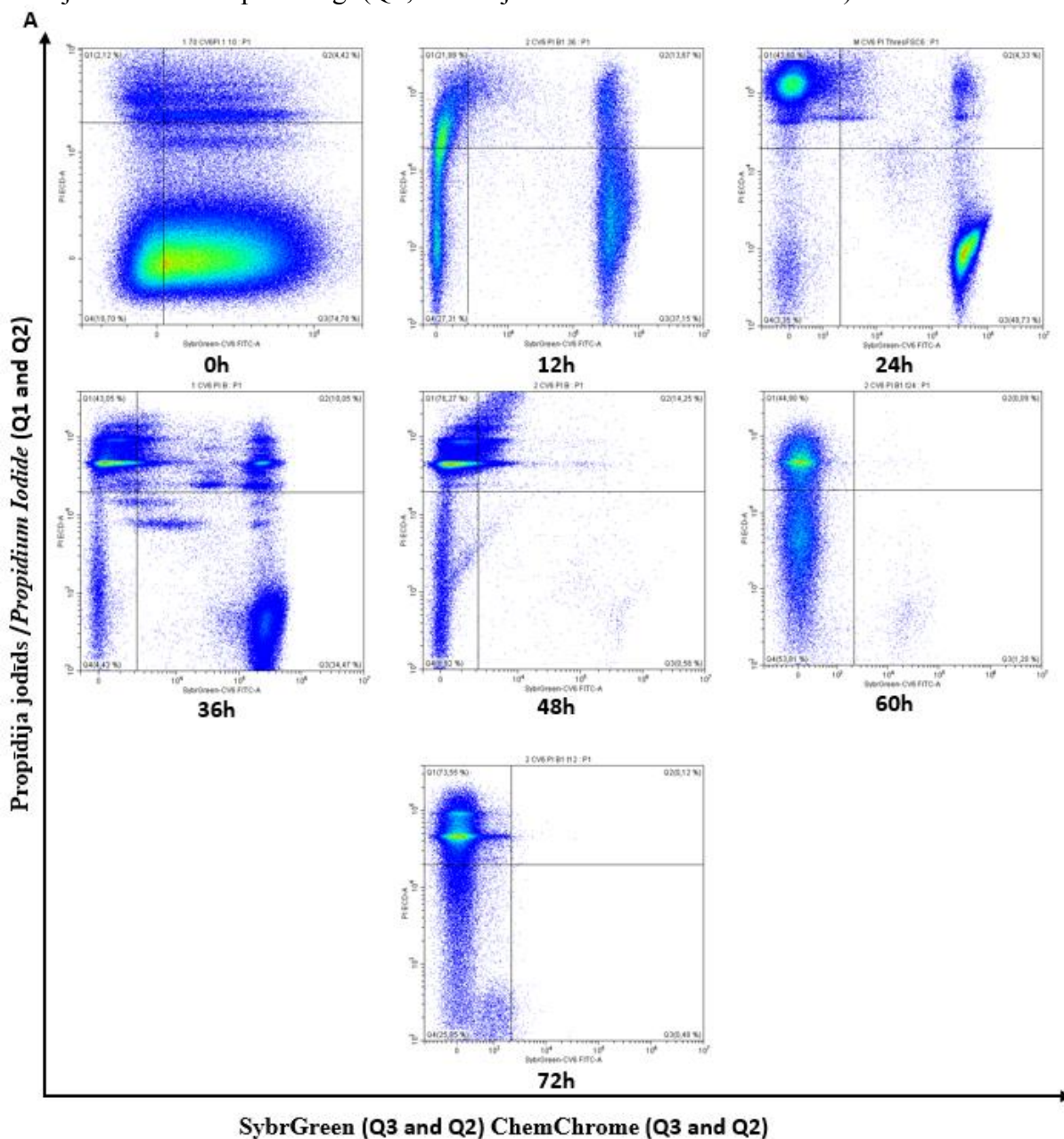
^{a,b}Rezultāti, kas norādīti ar vienu un to pašu burtu kolonnā, savā starpā būtiski neatšķiras ($p > 0.05$). Means in the same column followed by the same letters do not differ at $p > 0.05$.

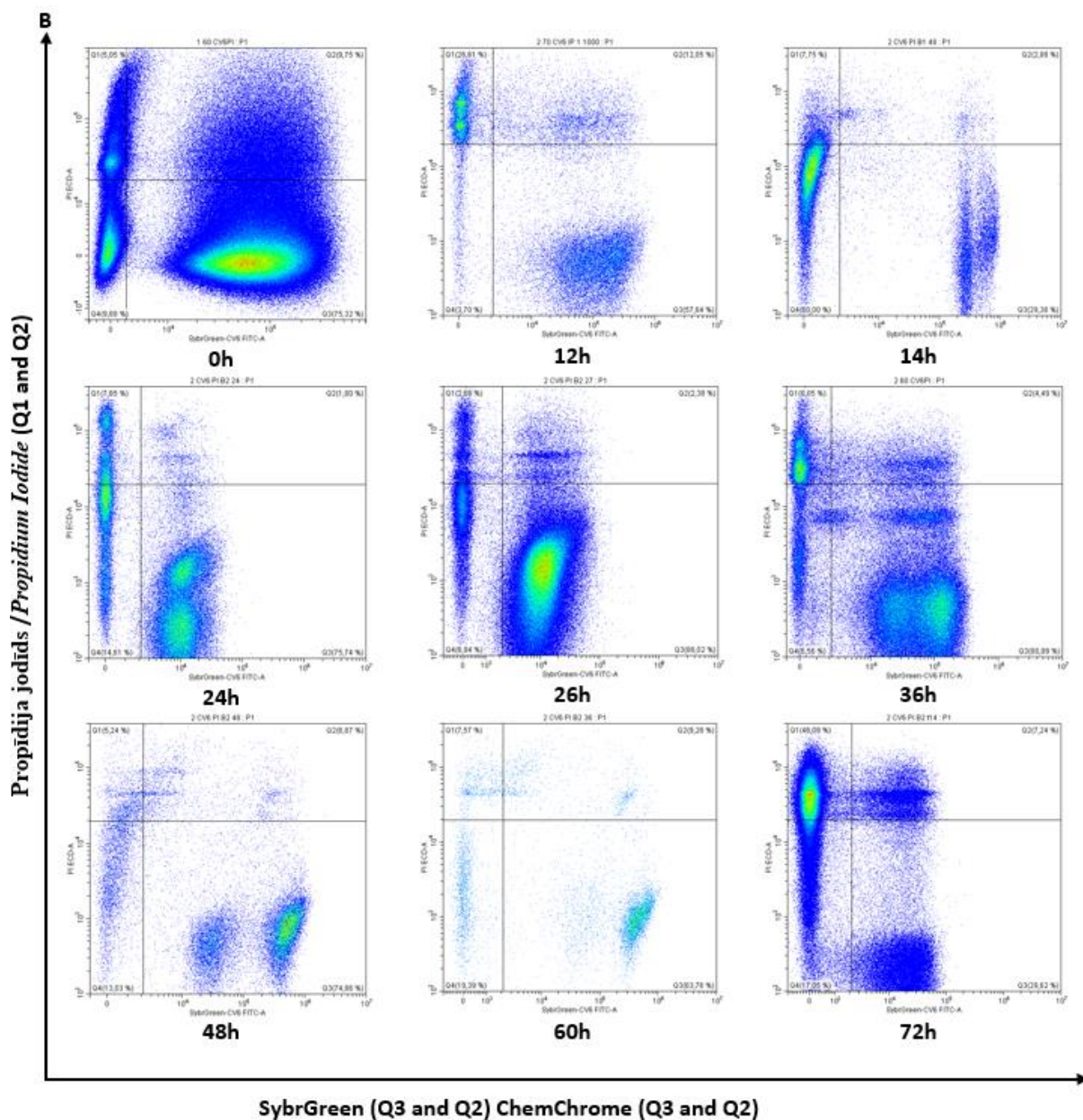
Īpatnējais *Pseudomonas taetrolens* augšanas ātrums AW2 paraugam ir lielāks nekā AW1 paraugam, sasniedzot maksimālo īpatnējo augšanas ātrumu $0.27 h^{-1}$ AW2 paraugā, savukārt AW1 paraugā – $0.08 h^{-1}$. Laktobionskābes saturs un baktēriju biomasas produktivitāte AW2 paraugam bija ievērojami augstāka. qLBA parāda, cik daudz laktobionskābes var iegūt no 1 g baktēriju biomasas stundā. Iegūtie rezultāti bija tuvi, bet lielāka vērtība noteikta AW2 paraugam. Tā apstiprina, ka AW2 paraugā bija vairāk metaboliski aktīvu baktēriju nekā AW1 paraugā. Ja substrātā ir vairāk metaboliski aktīvu baktēriju, tad paraugā būs arī lielāka šūnu

masa, optiskais šūnu blīvums un dzīvotspējīgo baktēriju KVV skaits, kas pierādījās AW2 parauga rezultātos.

Biezpiena sūkalās *Pseudomonas taetrolens* augšana ir ierobežota, laktozes oksidācijas process ir lēns, tāpēc baktēriju biomasas atkārtota pievienošana palīdz sasniegt tādus pašus rezultātus kā citos pētījumos (Alonso *et al.*, 2017; 2015; 2013b; 2012a; 2012b; 2011; Giorgi *et al.*, 2018; Goderska *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2000), izmantojot siera sūkalas un sasniedzot maksimālo laktobionskābes iznākumu.

Pseudomonas taetrolens šūnu funkcionalitāte analizēta ar plūsmas citometriju, dati apkopoti 3.21. attēlā. Sarkanie, dzeltenie, zaļie, gaiši zilie, tumši zilie punkti grafikā norāda šūnu blīvuma gradienta atkarību no parauga atšķaidījuma no augstākas līdz zemākai šūnu koncentrācijai. Katrs punkts attēlā attaino baktērijas vienību. Divkāršā šūnu krāsošanas priekšrocība ir iespēja atšķirt atmirušās šūnas (Q1, iekrāsojas ar PI) no dzīvām (Q3, iekrāsojas ar SYBR vai CV6), iespējas noteikt arī bojātās šūnas, kuras piemērotākos vairošanās apstākļos var atjaunoties un turpināt augt (Q2, iekrāsojas ar SYBR / PI vai CV6 / PI).





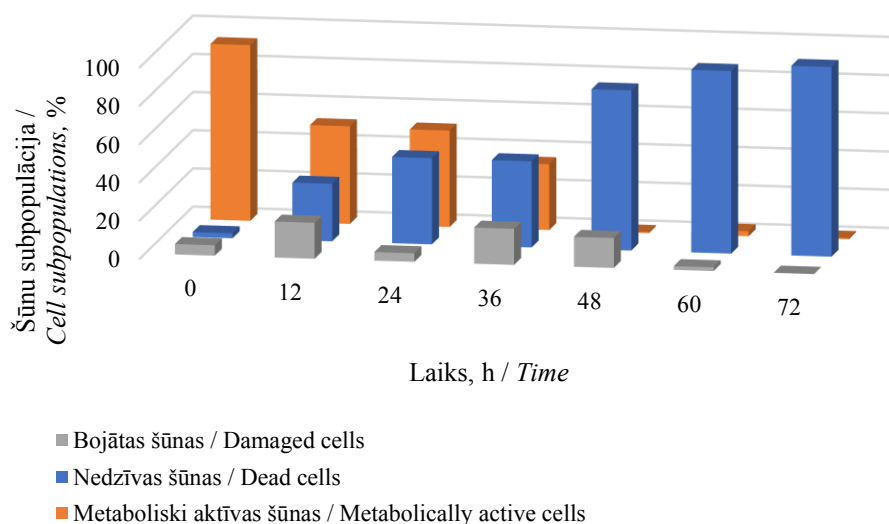
3.21. att. *P. taetrolens* šūnas (metaboliski aktīvas, bojātas un mirušas) fermentācijas procesā (A) AW1 paraugā un (B) AW2 paraugā /
 Fig. 3.21. Dot plots representing *P. taetrolens* heterogeneity during fermentation process (A) in sample AW1 (B) in sample AW2

Pēc 12 stundu fermentācijas AW1 parauga grafiks (3.21. attēls (A)) parāda baktēriju šūnu lielāku PI uzņemšanas spēju, salīdzinājumā ar AW2 paraugu (3.21. attēls (B)), kas apstiprina, ka biezpiena sūkalu vide ietekmē baktēriju šūnapvalka caurlaidību. AW1 paraugā baktēriju populācija bija dzīvotspējīga tikai fermentācijas sākumā, savukārt AW2 paraugā dzīvotspējīgo baktēriju populācija saglabājās līdz pat fermentācijas beigām. Interesants ir fakts, ka abos paraugos bojāto šūnu (šūnas, kuru izdzīvošana ir apdraudēta) skaits ir mazs, salīdzinot ar dzīvotspējīgām un atmirušām šūnām, tādējādi var secināt, ka baktērijas biezpiena sūkalās strauji iet bojā.

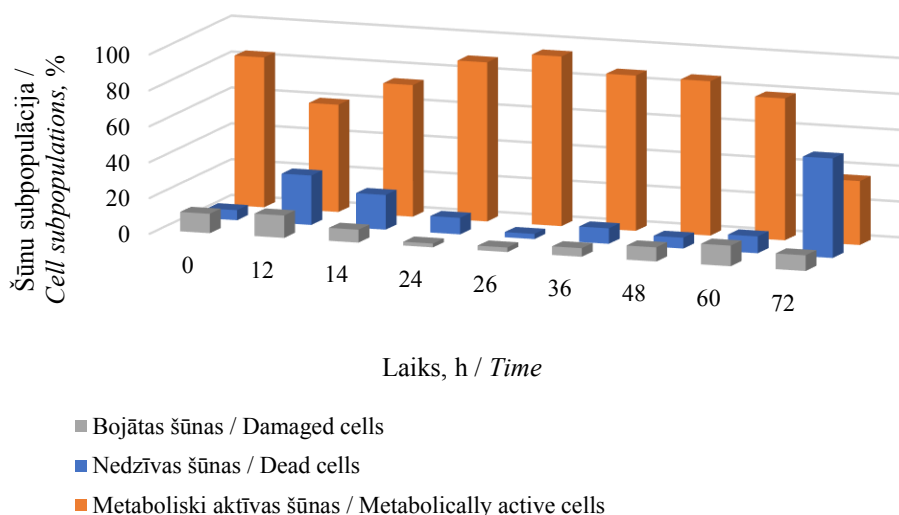
Baktēriju šūnu sadalījums pēc fizioloģiskā stavokļa paraugos procentuāli ir aplūkojams 3.22. attēlā. AW1 paraugā ir redzams cik strauji substrātā palielinās mirušo šūnu īpatsvars (3.22. attēls (A)), pēc 36 stundu fermentācijas paraugā ir tikai mirušas šūnas. Tas pierāda, ka *Pseudomonas taetrolens* uzreiz nespēj pielāgoties biezpiena sūkalu videi un metaboliski aktīvās šūnas strauji iet bojā, palielinot mirušo šūnu skaitu. Pretēja situācija ir vērojama AW2 paraugā (3.22. attēls (B)) visā fermentācijas laikā, kur dominē metaboliski aktīvas šūnas. AW2 paraugā

Pseudomonas taetrolens šūnu fizioloģiskais stāvoklis ir līdzvērtīgs, vairojoties siera sūkalu substrātā (Alonso *et al.*, 2012b). Tajā mazāko daļu veido mirušās šūnas, savukārt dzīvotspējīgās šūnas dominē, īpaši eksponencialā un stacionārā fāzē esošās.

A



B



3.22. att. **Šūnu fizioloģiskais stāvoklis, fermentējot substrātu bioreaktorā (A) AW1 paraugs un (B) AW2 paraugs /**

Fig. 3.22. Cell subpopulation physiology during fermentation in a bioreactor (A) sample AW1 and (B) sample AW2

Šī pētījuma rezultāti pierādīja, ka biezpiena sūkalas var izmantot kā substrātu mikrobioloģiskajā fermentācijā laktobionskābes ieguvei. 3.22. attēlā (B) var novērot, ka atkārtoti pievienojot baktēriju biomasu, dzīvotspējīgo šūnu daudzums palielinās pēc 12 un 24 fermentācijas stundām. Var arī saprast, ka 14 līdz 24 stundu fermentācijas laikā dzīvotspējīgo šūnu skaits substrātā palielinās, norādot, ka ar atkārtotu baktēriju biomasas pievienošanu var uzlabot baktēriju augšanas potenciālu biezpiena sūkalu vidē.

Arī iepriekšējos eksperimentos ar biezpiena sūkalām tika iegūts mazāk nekā 32% no biokonvertētās laktozes satura, tādējādi šis eksperiments pierāda, ka baktērijas nespēj pielāgoties un augt biezpiena sūkalu vidē, pat nodrošinot vidi ar skābekli un optimālu pH baktēriju augšanai. Atkārtoti pievienojot *Pseudomonas taetrolens* biomasu, baktērijas vairojās ātrāk (3.22. attēls (B)) un notiek veiksmīgāka laktozes biosintēze laktobionskābē (3.20. attēls).

Analizējot *Pseudomonas taetrolens* baktēriju vairošanos biezpiena sūkalās, tiek pieņemts, ka to augšanu ietekmē Na^+ joni. Biezpiena sūkalu pH ir zems, lai to pielāgotu līdz 6.5 tiek pievienots 6 M NaOH. Līdz ar to biezpiena sūkalās ir vairāk Na^+ nekā siera sūkalās. Ir veikti pētījumi, kas pierāda Gram-negatīvo (arī *Pseudomonas taetrolens*) baktēriju vairošanās kavēšanu, ja vidē ir Na^+ un / vai Cl^- joni. Tā rezultātā baktēriju šūnapvalks viegli transportē šos jonus šūnā un šūnā mainās osmotiskais spiediens, ietekmējot šūnu dzīvostpēju. Zinātnieki ir izpētījuši, ka *Pseudomonas aeruginosa JCM5962(T)* un citu *Pseudomonas* ģints sugu enzīmu (līpāzes un kolagenāzes) aktivitāte samazinās, ja barotnē ir liels Na^+ jonu saturs (Sachan *et al.*, 2017; Gautam & Azmi, 2017; Matula & Macleod, 1969).

Literatūrā nav atrodamī zinātniski pamatoti dati par *Pseudomonas taetrolens*, bet ir pieejama informācija par *Pseudomonas aeruginosa* celmiem. Ir izpētīts, ka šo baktēriju šūnas inhibē liela jūras sāls koncentrācija vidē, bet ar laiku tās spēj pielāgoties un adaptēties vidē, spējot izdzīvot pat vairākus gadus. Šāda adaptācija tiek uzskatīta par fenotipisku nevis ģenētisku (Elabed *et al.*, 2019). Šo pielāgošanās spēju varētu pielīdzināt arī *Pseudomonas taetrolens* vairošanai biezpiena sūkalās, kā rezultātā šādā vidē masveidā tiek inhibētas pētāmās baktērijas. Tomēr neliela daļa šūnu lēnām sāk pielāgoties un izdzīvot, kas norāda uz biezpiena sūkalu potenciālu laktobionskābes ieguvei. Pievienojot papildu baktēriju biomasu, kurā daļa baktēriju jau ir adaptējusies, tās savā starpā rod sinerģismu, pielāgojas videi un turpina vairoties, veicinot laktozes biokonversiju laktobionskābē.

3.6. nodaļas kopsavilkums

Pētījuma rezultāti pierādīja, ka biezpiena sūkalas var izmantot kā substrātu mikrobioloģiskajā fermentācijā laktobionskābes ieguvei. Laktoze biezpiena sūkalās tika pilnībā konvertēta laktobionskābē, ja *Pseudomonas taetrolens* biomasa tiek pievienota atkārtoti. Ar citometrijas analīzi tika pierādīta *Pseudomonas taetrolens* pielāgošanās spēja vairošanai biezpiena sūkalās. Pētījuma rezultāti atklāj *Pseudomonas taetrolens* pielāgošanās un adaptācijas spējas biezpiena sūkalās.

Summary of Chapter 3.6.

The results showed that acid whey can be used as a substrate for lactobionic acid production by microbiological fermentation. All lactose was converted into lactobionic acid in acid whey sample where Pseudomonas taetrolens biomass was re-added. Pseudomonas taetrolens showed the ability to proliferate in acid whey by cytometric analysis. The results of the study reveal the Pseudomonas taetrolens' ability to adapt to acid whey.

3.7. Attīrīšanas posmā iegūtie produkti / *Products obtained after purification*

Ekspimenta mērķis bija no fermentācijas substrāta izdalīt maksimāli tīru laktobionskābi. Tika analizēts laktobionskābes saturs produktā, krāsas intensitāte, pH, šķīdība ūdenī un produkta vizuālais izskats (3.3. tabula), lai salīdzinātu paraugu atbilstību un tīrību ar Sigma-Aldrich komerciālo laktobionskābi.

Iegūtajos paraugos laktobionskābes saturs (3.3. tabula), kas tika noteikta ar AEŠH, ir ļoti tuvs komerciālajai laktobionskābei (Sigma-Aldrich norāda, ka to produkts satur >97% laktobionskābes). Laktobionskābes saturs C paraugā ($95 \pm 2\%$) atbilst komerciālajai laktobionskābei. B paraugs satur būtiski ($p < 0.05$) mazāk laktobionskābes nekā citi paraugi, tas varētu būt saistīts ar parauga sīrupa konsistenci. C paraugs tika iegūts skalojot ar 96% etilspirtu un kaltējot 40 °C temperatūrā. Šādu metodi izmantoja Delagustin *et al.* (2019) pētījumā, pievienojot 70% etilspirtu un kaltējot paraugus 25 °C temperatūrā, iegūstot paraugu ar 93.71%

laktobionskābi. Laktobionskābes saturs $95 \pm 2\%$ tika iegūts, veicot adsorbciju ar aktīvo ogli pirms skalošanas ar etilspirtu (C paraugs), centrifugējot un mikrofiltrējot, tā iegūstot lielāku laktobionskābes iznākumu.

C paraugs pēc pH ir vistuvākais komerciālās laktobionskābes pH, lai gan visiem paraugiem pH būtiski atšķīrās no komerciālās laktobionskābes ($p < 0.05$). Delagustin *et al.* (2019) ziņoja, ka laktobionskābes (iegūta pēc skalošanas ar etilspirtu) un komerciālās laktobionskābes (arī Sigma-Aldrich) pH saglabājās ap 2.5. Līdzīgus rezultātus publicēja arī Carra (2012), konstatējot, ka ar sublimāciju iegūtajai laktobionskābei pH ir 2.96, bet komerciālajai laktobionskābei (Sigma-Aldrich) pH ir 3.04. Cardoso *et al.* (2019) ir ziņojis, ka laktobionskābes pH ir 2.37 (10% šķīdums). B paraugam ir visaugstākais pH starp visiem paraugiem ($p < 0.05$), galvenais iemesls varētu būt lielāks ūdens saturs paraugā.

A un D paraugiem ir tāda pati šķīdība ūdenī kā komerciālajai laktobionskābei ($p > 0.05$), savukārt B un C paraugiem bija nepieciešams 3 līdz 4 reizes ilgāks laiks, lai pilnībā to izšķīdinātu ūdenī ($p < 0.05$). B paraugam ir sīrupveida konsistence, līdz ar to virsma, kura ir saskarsmē ar ūdeni, ir mazāka. Savukārt C paraugs ir blīvāks un, līdzīgi kā B paraugam, virsmas laukuma saskare ar ūdeni ir mazāka nekā A un D paraugiem. Delagustin *et al.* (2019) pētījumā konstatēts, ka 1 g laktobionskābes tiek izšķīdināts 1 – 10 mL ūdens, kas ļauj laktobionskābi klasificēt kā pilnībā šķīstošu vielu. Saskaņā ar "British Pharmacopeia Commission" (2009) to klasificē kā ūdenī viegli šķīstošu savienojumu. Cardoso *et al.* (2019) ir norādījuši, ka laktobionskābes šķīdība ūdenī ir $10 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$. Laktobionskābe slikti šķīst organiskos šķīdinātājos, piemēram, metanolā, etanolā un ledus etiķskābē (Gutierrez *et al.*, 2015; Cardosos *et al.*, 2019). Visi iegūtie paraugi apstiprināja, ka laktobionskābe viegli šķīst ūdenī.

Pēc attīrīšanas un izdalīšanas posmiem C paraugam bija vismazākais laktobionskābes reģenerācijas iznākums nekā citiem paraugiem ($p < 0.05$), savukārt A, B un D paraugu iznākums būtiski neatšķīrās. Murakami *et al.* (2003) pētījumā laktobionskābi skaloja un izdalīja ar etilspirtu, kā rezultātā tika sasniegts 98% laktobionskābes reģenerācijas iznākums. Jones & Ho (2002) ierosināja optimizētu laktobionskābes izdalīšanas metodi, kas ietvēra kristalizācijas posmu, izdalīšanas posmu kombinācijā ar jonu apmaiņas procesu. Izdalīšanas posmā substrāts tika virzīts caur jonu apmaiņas sveķiem pirms sublimācijas procesa, kā rezultātā sasniegts 79% laktobionskābes iznākums. Pedruzzi *et al.* (2008), Splechtna *et al.* (2001) un Borges de Silva *et al.* (2011) pētījumos sasniedza 100% laktobionskābes iznākumu, izmantojot jonu apmaiņas hromatogrāfiju vai apgrieztās fāzes augstas izšķīrtspējas šķīduma hromatogrāfiju, Peretti *et al.* (2009) izmantoja elektrodialīzi, sasniedzot tikai 38.7% laktobionskābes iznākumu.

Laktobionskābes raksturojums / Description of lactobionic acid

Parauga kods (3.23. att.) / Sample code	Apstrādes metode / Recovery method	Produkta apraksts (vizuāls novērtējums) / Product description (visual assessment)	Neiekavota produkta uzglabāšana telpas temperatūrā (vizuāls novērtējums) / Unpacked product storage in room temperature (visual assessment)	LBA saturs / LBA concentration, %	pH (10% šķīduma / solution)	Produkta šķīdība, laiks / Product solubility, s**	Kopējā krāsu intensitātes atšķirība / Total color intensity difference, ΔE_{ab}^{***}	LBA reģenerācijas iznākums / Recovery of LBA, %
A	Produkta kaltēšana pēc mikrofiltrācijas 40 °C temperatūrā, produkts izklāts plānā kārtiņā, kaltējot / Drying at 40 °C of the product after microfiltration, the product was laid in a thin layer	Gaiši dzeltenas nokrāsas birstošs kristālveidīgs produkts / Light yellow shades, free-flowing crystalline product	Ļoti higroskopisks, ātri uzņem mitrumu un zaudē birstoša produkta konsistenci, veidojas sīrupveidīgs produkts / Very hygroscopic, loses its fluid consistency, absorbs moisture quickly and a syrup-like product is formed	90 ± 2 ^{a, c}	3.48 ± 0.08 ^a	31 ± 3 ^a	22.60 ± 0.94 ^a	89 ± 3 ^a
B	Iebiezināta produkta (sausnas saturs 40%) kaltēšana 40 °C temperatūrā / Drying of the concentrated product (40% total solid content) at 40 °C	Dzeltenas nokrāsas sīrupveida produkts (vizuāli atgādina medu) / Yellow syrup (visually reminiscent of honey)	Uzglabājot neiekavotu telpas temperatūrā, tas saglabā savu konsistenci / When stored unpacked at room temperature, it retains its consistency	85 ± 3 ^a	4.27 ± 0.12 ^b	118 ± 2 ^c	20.00 ± 1.42 ^b	87 ± 2 ^a
C	Iebiezināta (sausnas saturs 40%) produkta skalošana ar 96% etilspirtu ar tālāku kaltēšanu 40 °C temperatūrā, / Precipitation with 96% ethanol of the concentrated product (40% total solid content) with further drying at 40 °C	Gaišs, balts birstošs pulverveida produkts / Light, white colored fluid powder-like product	Uzglabājot neiekavotu telpas temperatūrā, tas saglabā savu konsistenci / When stored unpacked at room temperature, it retains its consistency	95 ± 2 ^b	3.05 ± 0.09 ^c	109 ± 3 ^d	2.95 ± 0.23 ^c	82 ± 2 ^b

3.3. tabulas turpinājums / Continuation of Table 3.3

Parauga kods (3.23. att.) / Sample code	Apstrādes metode / Recovery method	Produkta apraksts (vizuāls novērtējums) / Product description (visual assessment)	Neiepakota produkta uzglabāšana telpas temperatūrā (vizuāls novērtējums) / Unpacked product storage in room temperature (visual assessment)	LBA saturs, / LBA concentration, %	pH (10% šķiduma solution)*	Produkta šķīdība, laiks / Product solubility, s**	Kopējā krāsu intensitātes atšķirība / Total color intensity difference, ΔE_{ab} ***	LBA reģenerācijas iznākums / Recovery of LBA, %
D	Iebiezināta (~ 40% sausnas saturs) produkta sublimācija / <i>Freeze drying of concentrated (~ 40% total solid content) product</i>	Gaišs, balts, birstošs kristālveidīgs produkts / <i>Light, white colored fluid crystalline product</i>	Ļoti higroskopisks, ātri uzņem mitrumu un zaudē birstoša produkta konsistenci. Kristāli salīp kopā, veidojot cietu masu / <i>Hygroscopic, absorbs moisture quickly and loses the consistency of the fluid product. The crystals stick together and form a solid mass</i>	$94 \pm 2^{b,c}$	3.22 ± 0.08^c	23 ± 4^b	15.97 ± 1.22^d	87 ± 2^a
-	Komerciālā ķīmiski sintezētā laktobionskābe "Sigma-Aldrich" / <i>Commercial chemically synthesized lactobionic acid</i>	Balts, birstošs kristālveidīgs produkts / <i>White colored fluid crystalline product</i>	Hidroskopiska. Novērojama kristālu salīpšana. / <i>Hygroscopic. The crystals stick together</i>	-	2.32 ± 0.01^d	31 ± 4^{ab}	-	-

Rezultāti, kas norādīti ar vienu un to pašu burtu kolonnā, savā starpā būtiski atšķiras ($p < 0.05$) / *Different superscripts within a column (a, b, c, d) are significantly different ($p < 0.05$);*

*pH noteikts, 1 g produkta izšķīdinot 10 mL dejonizēta ūdens (10% šķīdums) / *pH was determined by dissolving 1 g of analysed product in 10 mL of deionised water (10% solution);*

**Produkta šķīdība noteikta, 0.1 g produkta pievienojot 10 mL dejonizētā ūdenī 20 °C temperatūrā, produktu maisot 150 min⁻¹ līdz pilnīgai šķīdībai / *Solubility was determined by adding 0.1 g of product in 10 mL of deionised water at a temperature of +20 °C, stirring the product at 150 rpm until the product was completely dissolved;*

***Kopējā krāsu intensitātes atšķirība – ΔE_{ab} aprēķināta, iegūtā produkta krāsu salīdzinot ar komerciālās laktobionskābes krāsu / *The total colour intensity difference ΔE_{ab} – was calculated by comparing the colour of the obtained product with the colour of commercial lactobionic acid.*

Laktobionskābes atšķiras arī vizuāli, produktu attēli ir apkopoti 3.24. att.

A



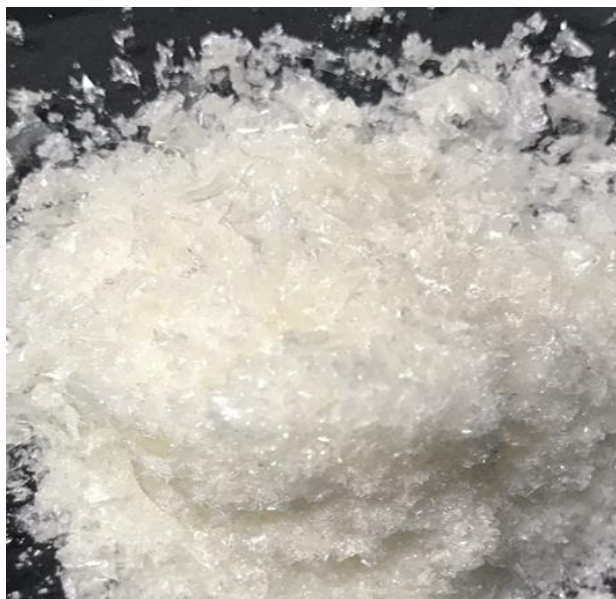
B



C



D



3.23. att. **Laktobionskābes paraugi (A) A paraugs; (B) B paraugs; (C) C paraugs; (D) D paraugs /**

Fig. 3.23. Samples of lactobionic acid (A) sample A; (B) sample B; (C) sample C; (D) sample D

Visi laktobionskābes paraugi bija kristāliskā formā, izņemot B paraugu. B parauga konsistence iegūta, izmantojot kristalizācijas metodi, kurā paraugs sākotnēji ietvaicēts un pēc tam kaltēts, līdz ar to parauga slānis bija biezs un iztvaicējamā virsma maza, salīdzinot ar A paraugu, kas kaltēts šķidrā stāvoklī. Arī Wilkinson *et al.* (2018) ir apstiprinājuši, ka sīrupveida un gēlveida produkti kalst ilgāk nekā šķidrie produkti.

Pēc vizuālā novērtējuma komerciālajai laktobionskābei vistuvākais ir D paraugs, kas iegūts sublimācijā.

Visos laktobionskābes paraugos netika konstatēta olbaltumvielu un laktozes klātbūtne. Pārējais sastāvs laktobionskābes paraugos varētu būt minerālvielas, vitamīni, šūnu atliekas, ūdens un citi savienojumi, taču papildu analīze šo savienojumu noteikšanai netika veikta.

Komerčiālajai laktobionskābei tika konstatētas struktūras izmaiņas pēc 24 h uzglabāšanas telpas temperatūrā (3.3. tabula). Laktobionskābes kristāli ir higroskopiski, tika novērota kristālu salīpšana. Līdzīga tendence novērota A un D paraugiem, savukārt B un C paraugi saglabāja savu struktūru 24 stundu uzglabāšanas laikā. Delagustin *et al.* (2019) atklāja, ka laktobionskābes fizikālās īpašības ir mainījušās no pulverveida uz gēlu pēc 6 mēnešu uzglabāšanas, novērojot ūdens satura pieaugumu par aptuveni 12%. Turklāt ūdens aizture ir saistīta ar laktobionskābes higroskopisko dabu (Yu & Van Scott, 2004). Arī Shendurse & Khedkar (2016) ir uzsvēruši, ka laktobionskābe ir higroskopisks savienojums un var veidot gēlu, saistot ūdeni no apkārtējās vides. Rentgenstaru difraktometrija tika pielietota Bisinella *et al.* (2017) pētījumā, kurā analizēti neiepakoti laktobionskābes paraugi uzglabāšanas laikā. Tas veicināja laktobionskābes kristāliskās formas izmaiņas, kuras tika skaidrots ar laktobionskābes higroskopiskumu. Cardoso *et al.* (2019) ziņoja, ka laktobionskābes ūdens saturam jābūt līdz 4.68%, lai to kvalificētu kā pulverveida vielu. Lielāks ūdens saturs var radīt gēlveida struktūru un sāisināt produkta uzglabāšanas laiku.

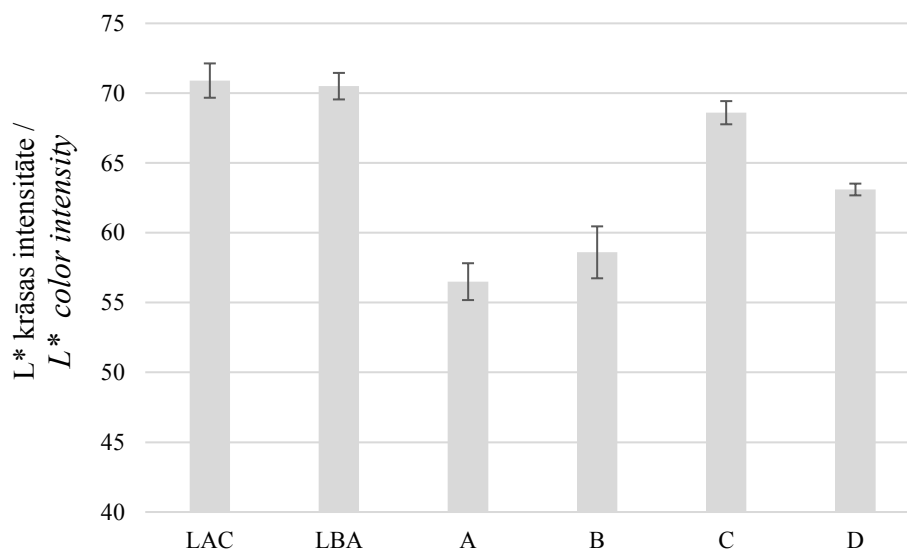
Laktobionskābi iegūst, oksidējot laktozi (Alonso *et al.*, 2013a), tādējādi iegūto laktobionskābes paraugu krāsa tika salīdzināta ar komerciālās laktozes un laktobionskābes krāsu. Produkta krāsa parāda, cik tīrs ir iegūtais produkts. Krāsas intensitātes salīdzinājums starp laktobionskābes paraugiem ir apkopots 3.24. attēlā.

3.24. attēlā (A) var novērot, ka A, B un D paraugi ir tumšāki nekā komerciālās laktozes un laktobionskābes paraugi ($p > 0.05$), bet C paraugs baltās krāsas intensitātē ir identisks

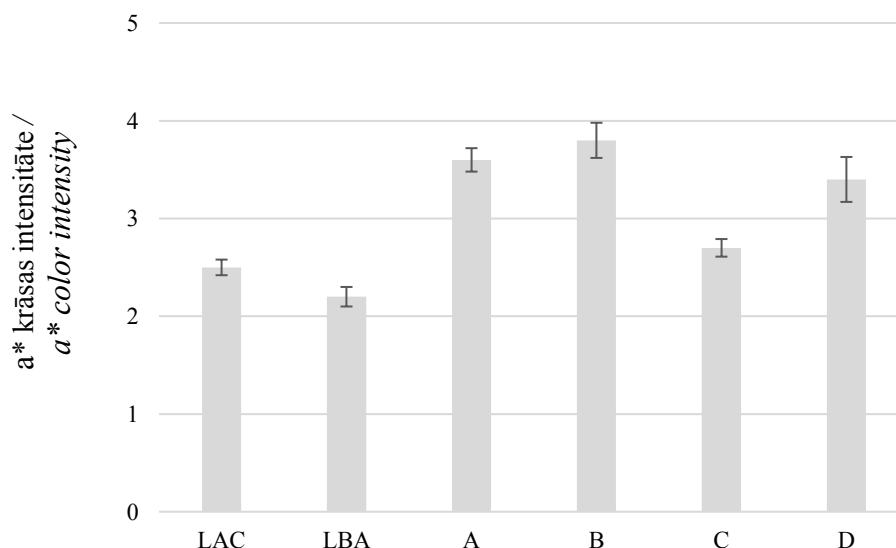
komerciālajiem laktobionskābes un laktozes paraugiem ($p < 0.05$). 3.24. attēlā (B) un (C) var novērot, ka visiem iegūtajiem laktobionskābes paraugiem ir lielāka sarkanās un dzeltenās krāsas intensitāte, salīdzinot ar komerciālās laktobionskābes un laktozes paraugiem ($p > 0.05$). Krāsu analīze parādīja, ka iegūtie paraugi satur piemaisījumus, kas tiem piešķir šo nokrāsu. Visās krāsu intensitātēs tuvākais komerciālās laktobionskābes paraugam ir C paraugs. Turklāt skalošana ar etilspirtu palīdz atbrīvoties no parauga neraksturīgās krāsas.

Nav atrasti publicēti rezultāti par laktobionskābes krāsu analīzi, taču Delagustin *et al.* (2019) ir minējis, ka mikrobiālajā fermentācijā iegūtā laktobionskābe ir balts kristālisks pulveris, turklāt autori norāda, ka stabilitātes testa laikā krāsa var mainīties no caurspīdīgas uz gaiši brūnu (Delagustin *et al.*, 2019). Arī Illanes *et al.* (2016) laktobionskābi klasificēja kā baltas krāsas kristalisku pulveri.

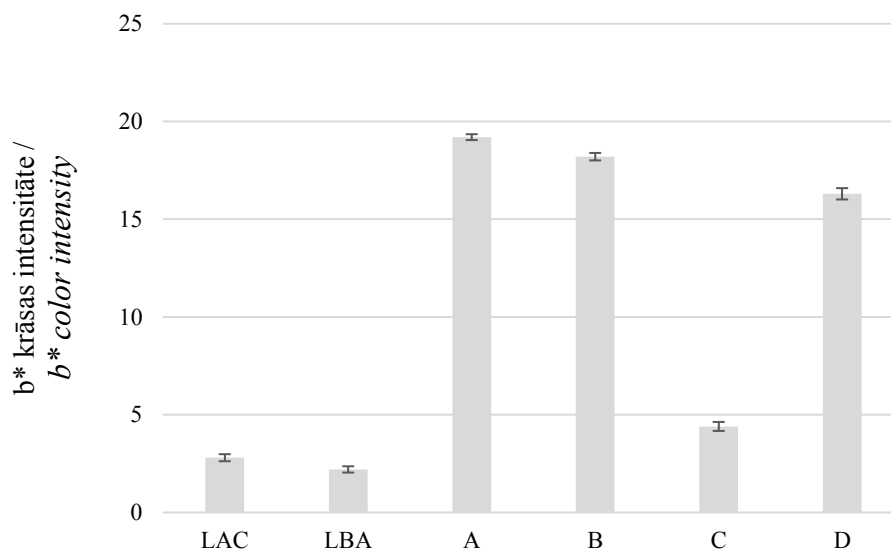
A



B



C



3.24. att. **Komerčiālās laktobionskābes (LBA), laktozes (LAC) un laktobionskābes paraugu krāsas intensitātes rezultāti (A) L^* baltās – melnās krāsas intensitāte, (B) a^* sarkanās – zaļās krāsas intensitāte, (C) b^* dzeltenās – zilās krāsas intensitāte /**
Fig. 3.24. Results of color analysis of comercial lactobionic acid (LBA), lactose (LAC) and lactobionic acid samples (A) L^ intensity of white – black color, (B) a^* intensity of red – green color, (C) b^* intensity of yellow – blue color*

Kopējās krāsas intensitātes ΔE_{ab} aprēķins parāda, ka C paraugs ir vistuvāk ķīmiski sintezētajam komerciālajam laktobionskābes paraugam (skat. 3.3. tabula). Tas pats tika novērots 3.24. att., kur katrā krāsu intensitātē vistuvākais komerciālajai laktobionskābei bija C paraugs. To pierāda arī laktobionskābes saturs produktā (3.3. tabula), kur C paraugs ir uzrādījis lielāku laktobionskābes iznākumu nekā citi paraugi.

Paraugus būtu nepieciešams papildus attīrīt no minerālvielām, vitamīniem un citiem mikroelementiem, lai tie varētu konkurēt ar ķīmiskā sintēzē iegūtās laktobionskābes tīrības un drošības kritērijiem un būtu droši izmantojami tautsaimniecībā.

3.7. nodalas kopsavilkums

Eksperimentā tika salīdzinātas vairākas attīrīšanas metodes, lai no fermentētā substrāta iegūtu pēc iespējas tīrāku laktobionskābes paraugu. Tika pielietota centrifugēšana, mikrofiltrācija, absorbcija ar aktīvo ogli, kristalizēšana, skalošana ar etilspirtu un sublimācija. Iegūtie laktobionskābes paraugi bija sīrupveida, pulverveida un kristāliski produkti. Vistuvāk komerciālajai laktobionskābei bija produkts, kas iegūts, skalojot ar etilspirtu. Skalošana ar etilspirtu nodrošināja nevēlamās dzeltenās nokrāsas maksimālu samazināšanos. Visi iegūtie produkti labi šķīst ūdenī un ir ar zemu pH, kā arī raksturojas ar lielu laktobionskābes koncentrāciju. Iegūtie produkti ir jāattīra no atlikušajiem mikroelementiem, lai tie varētu konkurēt ar komerciālo laktobionskābi un sasniegt līdzvērtīgu tīrības pakāpi.

Summary of Chapter 3.7.

In the experiment, several recovery methods were compared to obtain the lactobionic acid with the highest purity from the substrate. Centrifugation, microfiltration, absorption with activated carbon, crystallisation, precipitation with ethanol and freeze-drying methods were

used. Obtained lactobionic acid products were syrup-like, as powder and crystalline products. Obtained product by precipitation with ethanol corresponded most closely to commercial lactobionic acid. Precipitation with ethanol provided the maximum reduction of the undesired yellow colour. All the obtained products are well soluble in water and have low pH. Obtained products must be purified from the remaining trace elements so that they can compete with commercial lactobionic acid and achieve an equivalent degree of purity.

3. nodaļas kopsavilkums

Eksperimentu a, b, c, d un e (2.2. tabula) iegūtie rezultāti nedeva vēlamo laktobionskābes iznākumu, fermentējot biezpiena sūkalas. Neatkarīgi no tā, ka tika pielāgoti *Pseudomonas taetrolens* augšanas parametri – pH, substrāta sausnas saturs, dažādu sāļu pievienošana, fermentēšanas tehnika ar un bez papildu skābekļa pievades, rezultātā iegūts mazāks laktobionskābes saturs nekā no siera sūkalām (2.2. tabula d eksperiments) un citu autoru pētījumos (Giorgi *et al.*, 2018; Goderska *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2017; 2015; 2013b; 2012a; 2012b; 2011; Miyamoto *et al.*, 2000) publicētais.

Eksperimentā (2.2. tabula f eksperiments) ar atkārtotu baktēriju biomasas pievienošanu substrātam izdevās iegūt maksimālu laktozes biokonversiju laktobionskābē, rezultātā tika pierādīta promocijas darba hipotēze par biezpiena sūkalu piemērojamību laktobionskābes ieguvei. Pēc fermentācijas izdalītie un attīrītie laktobionskābes paraugi (3.23. att., 3.3. tabula) ir līdzīgi komerciālajai laktobionskābei, kas ir ķīmiski sintezēts augstas tīrības pakāpes produkts.

Promocijas darbā izstrādātie risinājumi aprobēti AS "Jaunpils pienotava" ar ELFLA projekta Nr.19-00-A01612-000007 "Ekonomiski pamatota sūkalu pārstrāde jauniem produktiem pārtikai un lopbarībai" atbalstu.

Summary of Chapter 3.

*The results obtained in experimental series a, b, c, d and e (Table 2.2) in the fermentation of acid whey did not give a remarkable yield of lactobionic acid. Despite the *Pseudomonas taetrolens* growth parameters adjustment, like pH, dry matter content of the substrate, addition of different salts, fermentation methods with and without additional oxygen supply, the final yield of lactobionic acid was still lower than obtained from sweet whey in experiment d (Table 2.2) and studies by other authors (Giorgi *et al.*, 2018; Goderska *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2017; 2015; 2013b; 2012a; 2012b; 2011; Miyamoto *et al.*, 2000).*

*In experiment f (Table 2.2), the maximum conversion of lactose to lactobionic acid was obtained by repeated addition of *Pseudomonas taetrolens* biomass to the substrate, as a result of which the suitability of acid whey for the production of lactobionic acid was demonstrated successfully. The samples of lactobionic acid recovered from acid whey substrates after fermentation (Figure 3.23, Table 3.3) are also very similar to commercially synthesised lactobionic acid and have close similar purity.*

The solutions developed in the doctoral thesis have been approved by SC "Jaunpils pienotava" with the financial support of project No. 19-00-A01612-000007 "Economically justified processing of whey for new food and feed" granted by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia.

SECINĀJUMI

1. No visām iespējamajām laktobionskābes iegūšanas metodēm, fermentatīvā oksidēšana ļauj izmantot sūkalas laktobionskābes ieguvei.
2. Neapstrādātas biezpiena sūkalas ir mazāk piemērotas laktobionskābes sintēzei, salīdzinot ar siera sūkalām.
3. Ar plūsmas citometrijas, koloniju veidojošo vienību, šūnu optiskā blīvuma un masas analīzēm ir pierādīts, ka biezpiena sūkalās *Pseudomonas taetrolens* nespēj efektīvi vairoties mazās to metaboliskās aktivitātes un ātrās šūnu bojāejas dēļ.
4. *Pseudomonas taetrolens* mazo aktivitāti biezpiena sūkalās sekmē Na^+ jonu klātbūtne, pievienojot NaOH vides neitralizācijai.
5. Biezpiena sūkalas var piemērot laktobionskābes sintēzei, fermentācijas laikā periodiski pievienojot *Pseudomonas taetrolens* biomasu, un sasniegt pilnīgu laktozes biokonversiju laktobionskābē.
6. Pētījums pierādīja vides pH, sausnas saturs, Mn^{2+} un Mg^{2+} jonu klātbūtnes un skābekļa piegādes nozīmi, fermentējot biezpiena sūkalas ar *Pseudomonas taetrolens* laktobionskābes ieguvei.
7. Lietderīgi fermentācijas procesu īstenot bioreaktoros vēlamā pH un skābekļa piegādes nodrošināšanai.
8. Ir iespējams biotehnoloģiski iegūt laktobionskābi no biezpiena sūkalām, bet tās tīrības un drošības jautājumi ir padziļināti jāpēta.
9. Promocijas darbā izvirzītā hipotēze ir apstiprināta, pētījumā ir pierādīts, ka biezpiena sūkalas var piemērot laktobionskābes ieguvei mikrobiālajā fermentācijā.

CONCLUSIONS

1. *Acid whey for the production of lactobionic acid can be used by fermentative oxidation among all the possible methods for obtaining lactobionic acid.*
2. *Raw acid whey is less suitable for the synthesis of lactobionic acid than sweet whey.*
3. *Flow cytometry, colony forming unit, cell optical density, and dry cell weight analysis have shown that *Pseudomonas taetrolens* is not able to reproduce efficiently in acid whey due to its low metabolic activity and rapid cell death.*
4. *The low activity of *Pseudomonas taetrolens* in acid whey is due to the presence of Na^+ ions, by adding NaOH to neutralise the substrate.*
5. *Acid whey can be applied to the synthesis of lactobionic acid by the re-addition of *Pseudomonas taetrolens* biomass during fermentation and to achieve complete bioconversion of lactose to lactobionic acid.*
6. *The study demonstrated the importance of substrate pH, total solid content, the presence of Mn^{2+} and Mg^{2+} ions, and oxygen uptake in the fermentation of acid whey with *Pseudomonas taetrolens* to produce lactobionic acid.*
7. *It is useful to carry out the fermentation process in bioreactors to ensure a suitable pH and oxygen supply.*
8. *It is possible to obtain lactobionic acid biotechnologically from acid whey, but its purity and safety should be studied in depth.*
9. *The hypothesis put forward in the doctoral thesis is confirmed: the study has shown that acid whey is suitable for the production of lactobionic acid by microbial fermentation.*

LITERATŪRAS SARAKSTS / LIST OF INFORMATION SOURCES

1. Affertsholt T. (2007) *Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives*. In Presentation at IDF Symposium lactose and its derivatives. Moscow, RU: 3A Business Consulting. Skatīts no: <https://authorzilla.com/xGQd7/market-developments-and-industry-challenges-for-lactose-and.html>
2. Alonso S. (2018) Exploiting the bioengineering versatility of lactobionic acid in targeted nanosystems and biomaterial. *Journal of Controlled Release*, Volume 287, pp. 216 – 234.
3. Alonso S., Herrero M., Rendueles M., Diaz M. (2014) Physiological heterogeneity in *Lactobacillus casei* fermentations on residual yoghurt whey. *Process Biochemistry*, Volume 49, pp. 732 – 739.
4. Alonso S., Rendueles M., Diaz M. (2011) Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions. *Bioresources Technology*, Volume 102, Issue 20, pp. 9730 – 9736.
5. Alonso S., Rendueles M., Diaz M. (2012b) Physiological heterogeneity of *Pseudomonas taetrolens* during lactobionic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 96, pp. 1465 – 1477.
6. Alonso S., Rendueles M., Diaz M. (2013a) Feeding strategies for enhanced lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresources Technology*, Volume 134, pp. 134 – 142.
7. Alonso S., Rendueles M., Diaz M. (2013b) Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. *Biotechnology Advances*, Volume 31, Issue 8, pp. 1275 – 1291.
8. Alonso S., Rendueles M., Diaz M. (2015) Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresource Technology journal*, Volume 196, pp. 314 – 323.
9. Alonso S., Rendueles M., Diaz M. (2017) Tunable decoupled overproduction of lactobionic acid in *Pseudomonas taetrolens* through temperature-control strategies. *Process Biochemistry*, Volume 58, pp. 9 – 16.
10. Alonso S., Rendueles M., Diaz M. (2012a) Role of dissolved oxygen availability on lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresource Technology*, Volume 109, pp. 140 – 147.
11. Armarego W. L., Chai C. L. L. (2009) *Purification of biochemicals and related products. Purification of laboratory chemicals*. 6th ed. Oxford: Elsevier Inc. pp. 577 – 708.
12. Arslan N. P., Aydogan M. N., Taskin M. (2016) Citric acid production from partly deproteinized whey under non-sterile culture conditions using immobilized cells of lactose-positive and cold-adapted *Yarrowia lipolytica* B9. *Journal of Biotechnology*, Volume 231, pp. 32 – 39.
13. Baldwin C., Akashe A., Zeller A. L., Marquez-Sanchez M. (2007) Mineral complexes of lactobionic acid and method of using for mineral fortification of food products. *United States Patent Application Pub. No.: US 2007/0026110 A1*;
14. Baldwin C., Akashe A., Zeller B., Marquez-Sanchez M., Koka, R. (2010) *U.S. Patent No. 7781002B2*. Washington, DC: US. Patent and Trademark Office.
15. Baldwin C., Akashe A., Dinwoodie R., Koka R., West L. G., Kortum O. (2004) *U.S. Patent No. 0170728*. United States Patent. Kraft Foods Group Brands LLC.
16. Baminger U., Ludwig R., Galhaup C., Leitner C., Kulbe K. D., Haltrich D. (2001) Continuous enzymatic regeneration of redox mediators used in biotransformation reactions employing flavoproteins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volume 11, pp. 541 – 550.

17. Bedas M., Tanguy G., Dolivet A., Méjean S., Gaucheron F., Garric G., Senard G., Jeantet R., Schuck P. (2017) Nanofiltration of lactic acid whey prior to spray drying: scaling up to a semi-industrial scale. *LWT - Food Science Technology*. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.), Volume 79, pp. 355 – 360.
18. Benkert B., Quack N., Schreiber K., Jaensch L., Jahn D., Schrobert M. (2008) Nitrate-responsive NarX-NarL represses arginine-mediated induction of the *Pseudomonas aeruginosa* arginine fermentation arc-DABC operon. *Microbiology*, Volume 154, pp. 3053 – 3060.
19. Bisinella R. Z. B., Ribeiro J. C. B., Oliveira C. S., Colman T. A. D., Schnitzler E., Masson M. L. (2017) Some instrumental methods applied in food chemistry to characterise lactulose and lactobionic acid. *Food Chemistry*, Volume 220, pp. 295 – 298.
20. Bleoussi R. T. M., Konfo C. T. R., Tchekessi C. C. K., Sachi P. A., Banon J. S. B., Djogbe A. A., Assogba K. T., Edwige D. A., Innocent B. Y. (2020) Nutritional quality and use of whey in human food for its valorization. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, Volume 08, Issue 1, pp. 284 – 293.
21. Borges da Silva E., Pedruzzi I., Rodrigues A. E. (2011) Simulated moving bed technology to improve the yield of the biotechnological production of lactobionic acid and sorbitol. *Journal of the International Adsorption Society*, Volume 17: pp. 145 – 58.
22. Brown M. (2008) *Chilled Foods: A Comprehensive Guide*. Woodhead publishing limited, England. – 688 pp.
23. Bubanale S., Shivashankar M. (2017) History, Method of Production, Structure and Applications of Activated Carbon. *International Journal of Engineering Research & Technology* (IJERT), Volume 6, Issue 06, pp. 495 – 498.
24. Budtz P., Vindelov J. T., Nielsen P. M., Ashie I., Nordkvist M. (2007) Enzymatic process for obtaining increased yield of lactobionic acid. *United States Patent Application Pub. No.: US 20070154595; 2007*.
25. Cardoso T., Marques C., Dagostin J. L. A., Masson M. L. (2019) Lactobionic Acid as a Potential Food Ingredient: Recent Studies and Applications. *Journal of Food Science*, Volume 84, Issue 7, pp. 1672 – 1681.
26. Carra S. (2012) Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis* Universidade de Caxias do Sul. Skatīts no: <https://repositorio.ucs.br/xmlui/handle/11338/668>
27. Chandrapala J., Duke M. C., Gray S. R., Weeks M., Palmer M., Vasiljevic T. (2017) Strategies for maximizing removal of lactic acid from acid whey – addressing the un-processability issue. *Separation and Purification Technology*, Volume 172, pp. 489 – 497.
28. Chen G. Q., Eschbach F. I. I., Weeks M., Gras S. L., Kentish S. E. (2016) Removal of lactic acid from acid whey using electrodialysis. *Separation and Purification Technology*, Volume 158, pp. 230 – 237.
29. Chen Tang H. W., Dou Z., Chen R., Hu Y., Chen W., *et al.* (2017) Antimicrobial effect of black pepper petroleum ether extract for the morphology of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Science & Technology*, Volume 54, Issue 7, pp. 2067 – 2076.
30. Ciprova I., Zagorska J. (2012) *Piens, tā pārstrāde*. Jelgava: LLU PTF. – 56 lpp.
31. Delagustin M. G., Goncalves E., Carra S., Barcellos T., Bassani V. L., da Silveira M. M., Malvessi E. (2017) Bioproduction and characterization of sodium, potassium, and calcium lactobionates. *Química Nova* Volume, Volume 40, Issue 9, pp. 1003 – 1008.
32. Delagustin M. G., Goncalves E., Carra S., Barcellos T., Bassani V. L., da Silveira M. M., Malvessi E. (2019) Sodium, potassium, calcium lactobionates, and lactobionic

- acid from *Zymomonas mobilis*: A novel approach about stability and stress tests. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 174, pp. 104 – 114.
33. Dhananjay S. (2017) Lactobionic acid market growth, size, trends and regional forecast from 2017 to 2022. Skatīts no: <https://www.linkedin.com/pulse/lactobionic-acid-market-growth-size-trends-regional-forecast-s/>
 34. Dhariwal A., Mavrov V., Schroeder I. (2006) Production of lactobionic acid with process integrated electrochemical enzyme regeneration and optimization of process variables using response surface methods (RSM). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volume 42, pp. 64 – 69.
 35. Dillon H. F., Somanchi A., Day A. G., Zaman A., Wolfson J. (2006) *U.S. Patent No. US20090274736A1*. Washington, DC: US. International application published under the patent cooperation treaty.
 36. Dillon H., Somanchi A., Rao K. (2006) *U.S. Patent No. US20070167396A1*. Washington, DC: US. International application published under the patent cooperation treaty.
 37. Elabed H., González-Tortuero E., Ibacache-Quiroga C., Bakhrouf A., Johnston P., Gaddour K., Blazquez J., Rodrigues-Rojas A. (2019) Seawater salt-trapped *Pseudomonas aeruginosa* survives for years and gets primed for salinity tolerance. *BMC Microbiology*, Volume 19, Issue 142.
 38. Faergemand M., Gilleladen C., Qvist K. B. (2012) Method for producing an acidified milk product. *United States Patent Application Pub. No.: US 20120045546 A1*.
 39. FDA (2017) *Code of Federal Regulations*, Title 21, 21 CFR 172.720. US Food and Drug Administration.
 40. Fisher E., Meyer J. (1889) Oxydation des milchzuckers. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, Volume 22, pp. 361 – 364.
 41. Foladori P., Bruni L., Tamburini S., Ziglio G. (2010) Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Research*, Volume 44, pp. 3807 – 3818.
 42. Ganzle M. G., Haase G., Jelen, P. (2008) Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, Volume 18, Issue 7, pp. 685 – 694.
 43. Garcia C., Manuel R., Diaz M. (2017) Microbial amensalism in *Lactobacillus casei* and *Pseudomonas taetrolens* mixed culture. *Bioprocess Biosystem Engineering*, Volume 40, Issue 7, pp. 1111 – 1122.
 44. Gautam M., Azmi W. (2017) Purification of Extracellular Collagenase from *Pseudomonas sp*: Remarkable Collagenolytic Activity. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, Volume 4, Issue 2, pp. 33 – 40.
 45. Giorgi S. D., Raddadi N., Fabbri A., Toschi T. G., Fava F. (2018) Potential use of ricotta cheese whey for the production of lactobionic acid by *Pseudomonas taetrolens* strains. *New Biotechnology Journal*, Volume 42, pp. 71 – 76.
 46. Goderska K. (2019) The antioxidant and prebiotic properties of lactobionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 103, pp. 3737 – 3751.
 47. Goderska K., Szwengiel A., Czarnecki Z. (2014) The utilization of *Pseudomonas taetrolens* to produce lactobionic acid. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Volume 173, pp. 2189 – 2197.
 48. Goulding D. A., Fox P. F., O'Mahony J. A. (2020) Chapter 2 - Milk proteins: An overview. In Boland M, Singh H (ed) *Milk Proteins From Expression to Food*, 3rd edn. Academic Press. Elsevier Inc. pp. 21 – 98.
 49. Gunsalus I. C., Stanier R. Y. (2013) *The Bacteria*. A treatise on structure and functions. Volume 4: The physiology of growth. Academic press, New York. Elsevier. – 474 p.

50. Gupta V. K., Treichel H., Shapaval V., Tuohy M. G., Oliveira L. A. (2017) Microbial functional foods and nutraceuticals, 1st edn. Chichester, UK: Wiley-Blackwell.
51. Gutierrez L. F., Hamoudi S., Belkacemi K. (2011) Selective production of lactobionic acid by aerobic oxidation of lactose over gold crystallites supported on mesoporous silica. *Applied Catalysis A: General*, Volume 402, pp. 94 – 103.
52. Gutierrez L. F., Hamoudi S., Belkacemi K. (2012) Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. *International Dairy Journal*, Volume 26, Issue 2, pp. 103 – 111.
53. Gutiérrez L. F., Bazinet L., Hamoudi S., Belkacemi K. (2013) Production of lactobionic acid by means of a process comprising the catalytic oxidation of lactose and bipolar membrane electrodialysis. *Separation and Purification Technology*, Volume 109, pp. 23 – 32.
54. Gutiérrez L. F., Hamoudi S., Belkacemi K. (2015) Production of lactobionic acid from its sodium salt solution by Ion-exchange on a commercial strong acid resin: Kinetic data and modeling. *Separation Science and Technology*, Volume 50, Issue 12, pp. 1890 – 1898.
55. Han J. H., Oh Y-R., Han S-W., Lee S. S., Eom G. T. (2022) Efficient Production of Lactobionic Acid Using Escherichia coli Capable of Synthesizing Pyrroloquinoline Quinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 70, Issue 6, pp. 1952 – 1970.
56. Hempel N., Petrick I., Behrendt F. (2002) Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, Volume 24, Issue 6, pp. 1407 – 1418.
57. Hendriks H. E. J., Kuster B. F. M., Marin G. B. (1990) The effect of bismuth on the selective oxidation of lactose on supported palladium catalysts. *Carbohydrate Research*, Volume 204, pp. 121 – 129.
58. Hua L., Nordkvist M., Nielsen P. M., Villadsen J. (2007) Scale-up of enzymatic production of lactobionic acid using the rotary jet head system. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 97, pp. 842 – 849.
59. Illanes A., Vera C., Wilson L. (2016) Enzymatic production of galacto-oligosaccharides. In: Illanes A, Guerrero C, Vera C, Wilson L, Conejeros R, Scott F (ed) Lactose-Derived Prebiotics: A Process Perspective. Academic Press, London, UK, pp. 111 – 189.
60. Isbell H. S. (1933) Preparation of calcium lactobionate and lactobionic α -lactone. Bureau of Standards. *Journal of Research*, Volume 11, pp. 713 – 717.
61. Jones W. E., Ho Y. (2002) Novel techniques for the preparation and crystallization of 4-o-Beta-D-galactopyranosyl-D-gluconic acid. *United States Patent Application Pub. No.: US 2002/0006884 A1*.
62. Jones W. E., Vestal N. Y., Chi Y. H. (2002) *U.S. Patent No. US0006884*. United States Patent. BioLife Solutions Inc.
63. Kang S., Kong F., Shi X., Han H., Li M., Guan B., Yang M., Cao X., Tao D., Zheng Y. (2020) Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Pseudomonas fluorescens* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its application on whole milk. *Food Control*, Volume 108, pp. 68 – 76.
64. Kargi F. (2009) Re-interpretation of the logistic equation for batch microbial growth in relation to Monod kinetics. *Letters in Applied Microbiology*, Volume 48, Issue 4, pp. 398 – 401.
65. Kimura T. (2006) Feed additive for laying hens and feed containing the additive. *European Patent Application Pub. No: EP 1731042 A1*.
66. Kimura T., Kiryu T., Kiso T., Murakami H., Nakano H., Oe K. (2007) *J.P. Patent No. JP2008245587A*. Japan.

67. Kimura T., Oe K. (2010) Aging inhibitor for bread. *J.P. Patent No. JP2011177121A*. Japan.
68. Kiryu T., Kiso T., Nakano H., Ooe K., Kimura T., Murakami H. (2009) Involvement of *Acetobacter orientalis* in the production of lactobionic acid in Caucasian yogurt ("Caspian Sea yogurt") in Japan. *Journal of Dairy Science*, Volume 92, Issue 1, pp. 25 – 34.
69. Kiryu T., Nakano H., Kiso T., Murakami H. (2008) Purification and characterization of a carbohydrate: acceptor oxidoreductase from *Paraconiothyrium* sp. that produces lactobionic acid efficiently. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 72, pp. 833 – 41.
70. Kiryu T., Yamauchi K., Masuyama A., Ooe K., Kimura T., Kiso T., *et al.* (2012) Optimization of lactobionic acid production by *Acetobacter orientalis* isolated from Caucasian fermented milk, "Caspian Sea yogurt". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 76, pp. 361–363.
71. Kravtsov V., Kulikova I., Mikhaylin S., Bazinet L. (2020) Alkalinization of acid whey by means of electrodialysis with bipolar membranes and analysis of induced membrane fouling. *Journal of Food Engineering*, Volume 277, pp. 1091 – 1098.
72. Krolczyk J. B., Dawidziuk T., Janiszewska-Turak E., Sołowiej B. (2016) Use of whey and whey preparations in the food industry - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, Volume 66, pp. 157 – 165.
73. Kruschitz A., Nidetzky B. (2020) Downstream processing technologies in the biocatalytic production of oligosaccharides. *Journal of Food Science*, Volume 43, 107568.
74. Kumar S., Babu B. V., (2008) Process intensification for separation of carboxylic acids from fermentation broths using reactive extraction. *Journal on Future Engineering and Technology*, Volume 3, pp. 21 – 28.
75. Kumar V., Ramakrishnan S., Teeri T., Knowles J. K. C., Hartley B. S. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* β -galactosidase grow on whey permeate. *Biotechnology*, Volume 10, pp. 82 – 85.
76. Kuusisto J., Tokarev A. V., Murzina E. V., Roslund M. U., Mikkola J. P., Murzin D. Y., *et al.* (2007) From renewable raw materials to high value-added fine chemicals-catalytic hydrogenation and oxidation of D-lactose. *Catalysis Today*, Volume 121, pp. 92–99.
77. Lievore P., Simoes D. R. S., Silva K. M., Drunkler N. L., Barana A. C., Nogueira A., Demiate I. M. (2015) Chemical characterization and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, Volume 52, pp. 2083 – 2092.
78. Lin S. F., Hu H. M., Inukal T., Tsai Y. C. (1993) Production of novel oligosaccharide oxidase by wheat bran solid-state fermentation. *Biotechnology Advances*, Volume 11, Issue 3, pp. 417 – 427.
79. Lozano E., Galindo E., Peña C. F. (2011) Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions. *Microbial Cell Factories*, Volume 10, pp. 1 – 13.
80. Ludwig R., Ozga M., Zámocky M., Peterbauer C., Kulbe K., Haltrich D. (2004) Continuous enzymatic regeneration of electron acceptors used by flavoenzymes: cellobiose dehydrogenase-catalyzed production of lactobionic acid as an example. *Biocatalysis and Biotransformation*, Volume 22, pp. 97 – 104.
81. Lynglev G. B. (2004) *U.S. Patent No. WO2003037093A1*. Washington, DC: US. International application published under the patent cooperation treaty.
82. Macwan S. R., Dabhi B. K., Parmar S. C., Aparnathi K. D. (2016) Whey and its utilization. *Int. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Volume 5, pp. 134 – 155.

83. Maischberger T., Nguyen T. H., Sukyai P., Kittl R., Riva S., Ludwig R., *et al.* (2008) Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. *Carbohydrate Research*, Volume 343, pp. 2140 – 2147.
84. Malvessi E., Carra S., Pasquali F. C., Kern D. B., da Silveira M. M., Ayub M. A. Z. (2013) Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Volume 40, pp. 1 – 10.
85. Mano J., Liu N., Hammond J. H., Currie D. H., Stephanopoulos G. (2020) Engineering *Yarrowia lipolytica* for the utilization of acid whey. *Metabolic Engineering*, Volume 57, pp. 43 – 50.
86. Marques C., Dagostin J. L. A., Masson M. L. (2019) Lactobionic Acid as a Potential Food Ingredient: Recent Studies and Applications. *Journal of Food Science*. Volume 84, Issue 7, pp. 1672 – 1681.
87. Matula T. I., Macleod R. A. (1969) Penetration of *Pseudomonas aeruginosa* by Sodium Chloride and Its Relation to the Mechanism of Optical Effects. *Journal of Bacteriology*, Volume 100, Issue 1, pp. 411 – 416.
88. Meiberg J. B. M., Bruinenberg P. M., Sloots B. A (1990) process for the fermentative oxidation of reducing disaccharides. *European Patent Application Pub. No.: EP19900200393*.
89. Menchik P., Zuber T., Zuber A., Moraru C. I. (2019) Short communication: Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate. *Journal of Dairy Science*, Volume 102, Issue 5, pp. 3978 – 3984.
90. Merrill R. K., Singh M. (2004a) *U.S. Patent No. US20110097441A1*. Washington, DC: US Patent and Trademark Office.
91. Merrill R. K., Singh M. (2004b) *U.S. Patent No. US8021704B2*. United States.
92. Mier M. P., Ibañez R., Ortiz I. (2008) Influence of process variables on the production of bovine milk casein by electrodialysis with bipolar membranes. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 40, pp. 304 – 311.
93. Miyamoto Y., Ooi T., Kinoshita S., (2000). Production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas* sp. LS13-1. *Biotechnology Letters*, Volume 22, pp. 427 – 430.
94. Mokrzycki W., Tatol M. (2012) Color difference Delta E - A survey. *Machine Graphics and Vision*, Volume 20, Issue 4, pp. 383 – 411.
95. Mukherjee R., Yun, J. W. (2015). Lactobionic acid reduces body weight gain in diet-induced obese rats by targeted inhibition of galectin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 463, Issue 4, pp. 1311 – 1316.
96. Murakami H., Kiryu T., Kiso T., Nakano H. (2006) Production of aldonic acids from monosaccharides by washed cells of *Burkholderia cepacia* and their calcium binding capability. *Journal of applied glycoscience*, Volume 53, pp. 277 – 289.
97. Murakami H., Kiryu T., Kiso T., Nakano H. (2008) Production of calcium lactobionate by a lactose-oxidizing enzyme from *Paraconiothyrium* sp. KD-3. *Journal of applied glycoscience*, Volume 55, pp. 127 – 132.
98. Murakami H., Seko A., Azumi M., Ueshima N., Yoshizumi H., Nakano H., *et al.* (2003) Fermentative production of lactobionic acid by *Burkholderia cepacia*. *Journal of applied glycoscience*, Volume 50, pp. 117 – 120.
99. Nakano H., Kiryu T., Kiso T., Murakami H. (2010). *Biocatalytic production of lactobionic acid*. In C. T. Hou & J. F. Shaw (Eds). *Biocatalysis and biomolecular engineering*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
100. Ngiam S. H., Zhou Y. H., Turner M. K., Titchener-Hooker N.J. (2001) Graphical method for the calculation of chromatographic performance in representing the trade-off between purity and recovery. *Journal of Chromatography A*, Volume 937, Issues 1 – 2, pp. 1 – 11.

101. Nielsen P. M. (2006) *U.S. Patent No. WO2006036791 A1*. Washington, DC: US. International application published under the patent cooperation treaty.
102. Nielsen P. M. (2012) *U.S. Patent No. 20120308698 A1*. Washington, DC: US. Patent and Trademark Office.
103. Nielsen P. M. (2009) *U.S. Patent No. US0214752*. United States Patent. Novozymes AS.
104. Nishanthi M., Vasiljevic T., Chandrapala J. (2017) Properties of whey proteins obtained from different whey streams. *International Dairy Journal*, Volume 66, pp. 76–83.
105. Nordkvist M, Nielsen P. M., Villadsen J. (2007) Oxidation of lactose to lactobionic acid by a *Microdochium nivale* carbohydrate oxidase: kinetics and operational stability. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 97, pp. 694 – 707.
106. Novozymes (2009) Press release. Danish biotech alliance behind enzyme master stroke. Skatīts no: <https://www.novozymes.com/en/news/news-archive/2009/02/45275>
107. Oe K., Kimura T. (2008) Mineral absorption promoter. *Japan Patent Application Pub. No.: JP2008303208*. Japan.
108. Oe K., Kimura T. (2011) Aging inhibitor for bread. *Japan Patent Application Pub. No.: JP2011177121*. Japan.
109. Oe K., Nishikawa Y., Kimura T., Kiryu T., Kiso T., Murakami H., *et al.* (2008) Oxidation of lactose to lactobionic acid by acetic acid bacteria. In: Abstract of the 2nd International Conference on Acetic Acid Bacteria. November 13., Nagoya.
110. Oh Y. R., Eom G. T. (2022) Efficient isolation of new lactobionic acid-producing microorganisms from environmental samples by colloidal calcium carbonate agar plate-based screening, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Volume 45, Issue 3, pp. 599 – 604.
111. Onwulata C., Huth P. (2008) *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. IFT Press, Willey-Blackwell. – 480 pp.
112. Palleroni N. J., Pieper D. H., Moore E. R. B. (2010) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 12 Microbiology of Hydrocarbon-Degrading Pseudomonas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 1788 – 1796.
113. Panesar P. S., Kennedy J. F., Knill C. J., *et al.* (2010) Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian archives of biology and technology*, Volume 53, Issue 1, pp. 219 – 226.
114. Pedruzzi I., da Silva E. A. B., Rodrigues A. E. (2011) Production of lactobionic acid from lactose/fructose substrate using GFOR/GL enzymes from *Zymomonas mobilis* cells: a kinetic study. *Enzyme Microb Technol*, Volume 49, pp. 183 – 191.
115. Pedruzzi I., da Silva, E. A. B., Rodrigues A. E. (2008) Selection of resins, equilibrium and sorption kinetics of lactobionic acid, fructose, lactose and sorbitol. *Purification Technology*, Volume 63, pp. 600 – 611.
116. Peretta F. A., Silveira M. M., Zeni, M. (2009). Use of electro dialysis technique for the separation of lactobionic acid produced by *Zymomonas mobilis*. *Desalination*, Volume 245, pp. 626 – 630.
117. Pharmanostrá (2017) *Certificado de análise Lote LA-17-041*, Brazil, pp. 1 – 2.
118. Pleissner D., Dietz D., van Duuren J. B. J. H., Wittmann C., Yang X., Lin C. S. K., Venus J. (2017) Biotechnological Production of Organic Acids from Renewable Resources. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 1 – 38.
119. Plessas S., Bosnea L., Psarianos C., Koutinas A. A., Marchant R., Banat I. M. (2007) Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresources Technology*, Volume 99, pp. 5951 – 5955.
120. Pollard D. J., Woodley J. M. (2007) Biocatalysis for pharmaceutical intermediates:

- the future is now. *Trends in Biotechnology*, Volume 25, pp. 66 – 73.
121. Prasirtsak B., Thitiprasert S., Tolieng V., Assabumrungrat S., Tanasupawat S., Thongchul N. (2019) D-Lactic acid fermentation performance and the enzyme activity of a novel bacterium *Terrilactibacillus laevilacticus* SK5–6. *Annals of Microbiology*, Volume 69, pp. 1537 – 1546.
 122. Purnama A., Mostavan A., Paternoster C., Mantovani D. (2015) Electroforming as a New Method for Fabricating Degradable Pure Iron Stent. *Advances in Metallic Biomaterials*, Volume 4, pp. 85 – 100.
 123. Rocha-Mendoza D., Kosmerl E., Krentz A., Zhang L., Badiger S., Miyagusuku-Cruzado G., Mayta-Apaza A., Giusti M., Jiménez-Flores R., García-Cano I. (2021) Invited review: Acid whey trends and health benefits. *Journal of Dairy Science*, Volume 104, Issue 2, pp. 1262–1275.
 124. Rojas E., Torres G. (2013) Isolation and recovery of glycomacropeptide from milk whey by means of thermal treatment. *Food Science and Technology (Campinas)*, Volume 33, Issue 1, pp. 14 – 20.
 125. Sachan S., Chandra V. Y., Yadu A., Singh A. (2017) Cobalt has Enhancing Effect on Extracellular Lipases Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* JCM5962(T). *International Journal of PharmTech Research*, Volume 10, Issue 1, pp. 45 – 49.
 126. Saez-Orviz S., Marcet I., Rendueles M., Diaz M. (2021b) Bioactive packaging based on delipidated egg yolk protein edible films with lactobionic acid and *Lactobacillus plantarum* CECT 9567: Characterization and use as coating in a food model. *Food Hydrocolloids*, Volume 119, 106849.
 127. Saez-Orviz S., Marcet I., Rendueles M., Diaz M. (2022) Preparation of Edible Films with *Lactobacillus plantarum* and Lactobionic Acid Produced by Sweet Whey Fermentation. *Membranes*, Volume 12, Issue 2, pp. 115.
 128. Saez-Orviz S., Passsannanti F., Gallo M., Cante R. C., Nigro F., Budelli A. L., Rendueles M., Nigro R., Diaz M. (2021a) Lactic Acid Bacteria Co-Encapsulated with Lactobionic Acid: Probiotic Viability during In Vitro Digestion. *Applied Sciences*, Volume 11, Issue 23, 11404.
 129. Saez-Orviz S., Puertas C., Marcet I., Rendueles M., Diaz M. (2020) Bioactive synbiotic coatings with lactobionic acid and *Lactobacillus plantarum* CECT 9567 in the production and characterization of a new functional dairy product. *Journal of Functional Foods*, Volume 75, Issues 1. pp. 8.
 130. Sahar T., Francisco S., Chen G. Q., Chen X., Bathurst K., Kentish S. E. (2020) Pilot Study on the Removal of Lactic Acid and Minerals from Acid Whey Using Membrane. *Technology. ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, Volume 8, Issue 7, pp. 2742 – 2752.
 131. Samadov R., Ciprova I., Majore K. Cinkmanis I. (2019) The optimization of acid whey permeate hydrolysis for glucose-galactose syrup production. 13th Baltic Conference on Food Science and Technology “FOOD. NUTRITION. WELL-BEING”. *Baltic Conference on Food Science and Technology: conference proceedings*, pp. 254 – 257.
 132. Sarenkova I., Saez-Orviz S., Ciprova I., Rendueles M., Diaz M. (2022) Lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens* in a fed-batch bioreactor using acid whey as substrate. *International Journal of Dairy Technology*.
 133. Satory M., Furlinger M., Haltrich D., Kulbe K. D., Pittner F., Nidetzky B. (1997) Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose– fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnology Letters*, Volume 19, pp. 1205 – 1208.
 134. Schaafsma G. (2008) Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, Volume 18, pp. 458 – 465.

135. Shendurse A. M., Khedkar C. D. (2016) Lactose. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F. (ed) Encyclopedia of Food and Health. Reference Module in Food Science, Volume 4, Academic Press. Elsevier Ltd. pp. 509 – 516.
136. Shu T. J., Shu C. H., Tseng K., Jaiswal R. (2017) Effects of light intensity and wavelength on the production of lactobionic acid from whey by *Pseudomonas taetrolens* in batch cultures. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Volume 93, Issue 6, pp. 1595 – 1600.
137. Shuler M. L., Kargi F. (2002) Bioprocess Engineering: Basic Concepts, 2nd Edition. Pearson. pp. – 576.
138. Silva M. D. A., Silva T. A. L., Campos-Takaki G. M., Salgueiro A. A., Tambourgi E.B. (2014) Stability of lipases produced by *Yarrowia lipolytica* in the presence of cheese whey. *Chemical Engineering Transactions*, Volume 37, pp. 703 – 708.
139. Splechtna B., Petzelbauer I., Baminger U., Haltrich D., Kulbe K. D., Nidetzky B. (2001) Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. *Enzyme and Microbial Technology*. Volume 29, Issues 6–7, pp. 434 – 440.
140. Stodola F. H., Lockwood L. B. (1947) The oxidation of lactose and maltose to bionic acids by *pseudomonas*. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 171, Issue 1, pp. 213 – 221.
141. Sulaymon A. H., Abood W. M. (2014) Removal of reactive yellow dye by adsorption onto activated carbon using simulated wastewater. *Desalination and Water Treatment*, Volume 52, pp. 16 – 18.
142. Sulyman M., Namiesnik J., Gierak A. (2017) Low-cost Adsorbents Derived from Agricultural By-products/Wastes for Enhancing Contaminant Uptakes from Wastewater: A Review. *Polish Journal of Environmental Studies*, Volume 26, Issue 2, pp. 479 – 510.
143. Sun K., Jian-chun J., Xu J. M. (2009) Decolorization and chemical regeneration of granular activated Carbon used in citric acid refining. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, Volume 23, Issue 1, pp. 29 – 36.
144. Talebi S., Suarez F., Chen G. Q., Chen X., Bathurst K., Kentish S. E. (2020) Pilot Study on the Removal of Lactic Acid and Minerals from Acid Whey Using Membrane Technology. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, Volume 8, Issue 7, pp. 2742 – 2752.
145. Tasic-Kostov M., Savic S., Lukic M., Tamburic S., Pavlovic M., Vuleta G. (2010) Lactobionic acid in a natural alkylpolyglucoside-based vehicle: assessing safety and efficacy aspects in comparison to glycolic acid. *Journal of Cosmetic Dermatology*, Volume 9, Issue 1, pp. 3 – 10.
146. Taskin M., Saghafian A., Aydogan M. N., Arslan N. P. (2015) Microbial lipid production by cold-adopted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, Volume 9, pp. 595 – 605.
147. Todaro C. M. (2014) Centrifugation. In: Vogel HC, Todaro CM (ed) Fermentation and Biochemical Engineering Handbook 3rd edn. William Andrew, Elsevier Inc.
148. Tomlinson G. A., Strohm M. P., Hochstein L. I. (1978) Metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria—identification of lactobionic acid as a product of lactose metabolism by *Halobacterium saccharovororum*. *The Canadian Journal of Microbiology*, Volume 24, Issue 8, pp. 898 – 903.
149. UK Standards for Microbiology Investigations (2015) Identification of *Pseudomonas* species and other NonGlucose Fermenters. *Bacteriology – Identification ID 17*, Issue 3. Issue date: 13.04.15, pp. 1 – 41.
150. Van Hecke W., Bhagwat A., Ludwig R., Dewulf J., Haltrich D., Van Langenhove H. (2009a) Kinetic modeling of a bi-enzymatic system for efficient conversion of

- lactose to lactobionic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 102, pp. 1475 – 1482.
151. Van Hecke W., Haltrich D., Frahm B., Brod H., Dewulf J., Van Langenhove H., *et al.* (2011) A biocatalytic cascade reaction sensitive to the gasliquid interface: modeling and upscaling in a dynamic membrane aeration reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volume 68, pp. 154 – 161.
 152. Van Hecke W., Ludwig R., Dewulf J., Auly M., Messiaen T., Haltrich D., *et al.* (2009b) Bubble-free oxygenation of a bioenzymatic system: effect on biocatalyst stability. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 102, pp. 122 – 131.
 153. Vedovato V., Vanbroekhoven K., Pant D., Helsen J. (2020) Electrosynthesis of Biobased Chemicals Using Carbohydrates as a Feedstock. *Molecules*, Volume 25, Issue 16, 3712.
 154. Walter T., Begli H. A. (2011) *U.S. Patent No. US20110244080*. United States Patent. Südzucker Aktiengesellschaft Mannheim/Ochsenfurt.
 155. West T. P. (2004) Regulation of pyrimidine nucleotide formation in *Pseudomonas taetrolens* ATCC 4683. *Microbiological Research*, Volume 159, pp. 29 – 33.
 156. Wilkinson A. C., Ormandy K., Bradley C. R., Hines J. (2018) Comparison of the efficacy and drying times of liquid, gel and foam formats of alcohol-based hand rubs. *Journal of Hospital Infection*, Volume 98, Issue 4, pp. 359 – 364.
 157. Wyatt M. (2014) *Whey Proteins: Functional Properties, Production and Health Benefits*. Nova Science Publishers, Inc. – 202 pp.
 158. Yalcin K., Bozdemir M. T., Ozbas Z. Y. (2009) Utilization of whey and grape must for citric acid production by two *Yarrowia lipolytica* strains. *Food Biotechnology*, Volume 23., pp. 266 – 283.
 159. Yu R. J., Van Scott E. J. (2004) Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. *Journal of cosmetic dermatology*, Volume 3, Issue 2, pp. 59 – 117.
 160. Zolnere K., Ciprovica I. (2019) Lactose hydrolysis in different solids content whey and milk permeates. 13th Baltic Conference on Food Science and Technology “FOOD. NUTRITION. WELL-BEING”. *Baltic Conference on Food Science and Technology: conference proceedings*, pp. 35 – 39.
 161. Zotta T., Solieri L., Iacumin L., Picozzi C., Gullo M. (2020) Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 104, pp. 2749 – 2764.
 162. Газалиев А. М., Ашимов Е. М., Кабиева С. К., Андреева А. П.; Мукубаев А. А. (2014) Новый продукт на основе молочной сыворотки. *Труды международной научно-практической конференции „Наука, образование и производство - ведущие факторы стратегии (Сагиновские чтения №6)”. Часть 3. УДК 637.344.8. – 3 с.*
 163. Черников Е. М., Базарнова Ю. Г. (2014) Состав и функциональные свойства творожной сыворотки в технологии фаршевых изделий. *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия „Процессы и аппараты пищевых производств” № 1. – 5 с.*

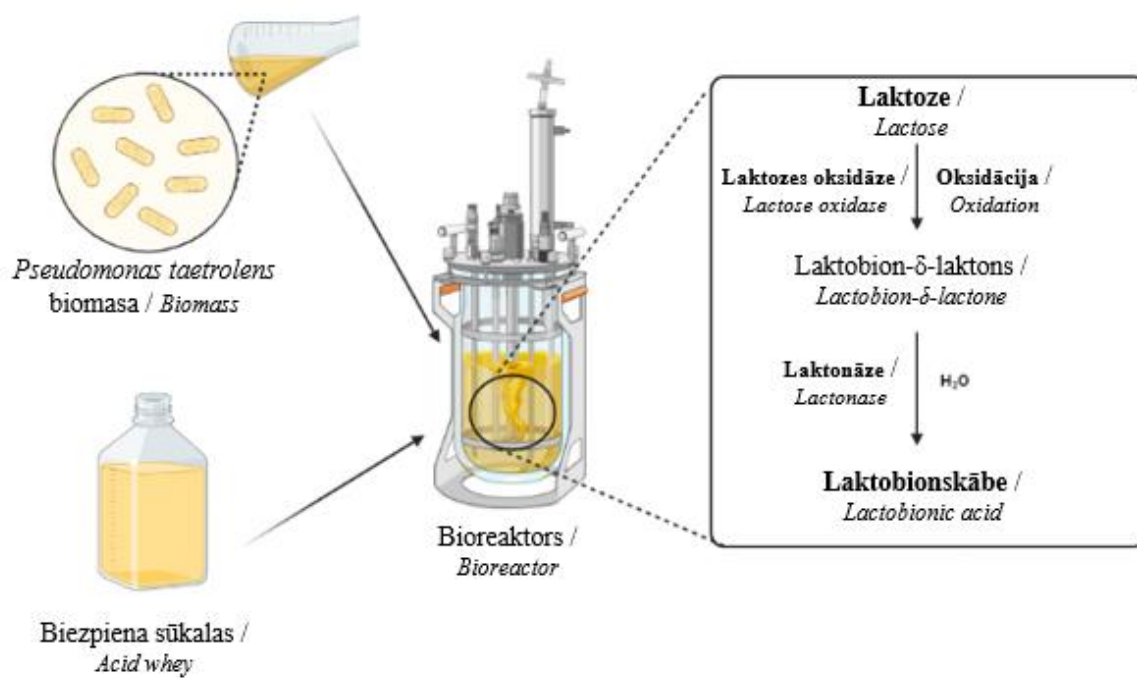
Pielikumi / *Appendices*

Reāģenti / Reagents

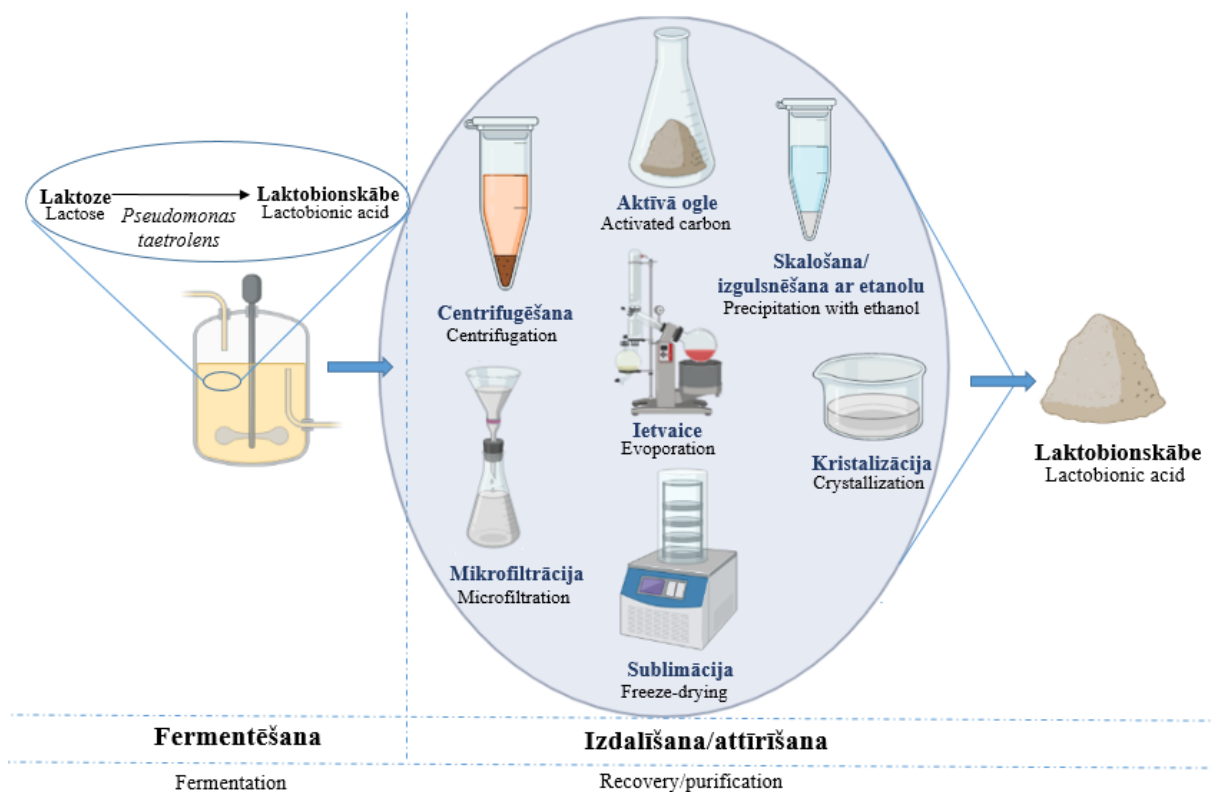
Nosaukums / Name	Ražotājs / Manufacturer	Valsts, vieta / Country, place	Pielietojums / Application
Aktīvā ogle / Activated carbon	„Ekros”, “Norit GAC 1240”	Krievija, Nīderlande / Russia, Netherland	Fermentējamā substrāta attīrīšanai / For purification of the substrate after fermentation
Nātrija hlorīds / Sodium chloride, NaCl	“Sigma-Aldrich”, “Chempur”	Šveice, Spānija / Switzerland, Spain	Barības viela substrātam un barotnes sastāvā. Spektrofotometrijas un citometrijas analīzei / Nutrient for substrate and compound for nutrient broth. For spectrophotometric and cytometric analysis
Gaļas peptons / Peptone from meat	“Sigma-Aldrich”, “Scharlau”	Francija, Spānija / France, Spain	Barības viela substrātam un barotnes sastāvā / Nutrient for substrate and compound for nutrient broth
Bakterioloģiskais agars / Bacteriological agar	“VWR Prolabo Chemicals”, “Scharlau”	Spānija / Spain	Barības viela substrātam un barotnes sastāvā / Nutrient for substrate and compound for nutrient broth
Gaļas ekstrakts / Meat extract	“Applichem Panreac”, “Scharlau”	Vācija, Spānija / Germany, Spain	Barības vielu substrātam un barotnes sastāvā / Nutrient for substrate and compound for nutrient broth
Rauga ekstrakts / Yeast extract	“Sigma Life Science”, “Scharlau”	Francija, Spānija / France, Spain	Barības viela substrātam un barotnes sastāvā / Nutrient for substrate and compound for nutrient broth
Putu dzēsējs / Antiform Y-30	“Sigma”	ASV / USA	Fermentēšanas procesā bioreaktorā / Fermentation process in a bioreactor
Laktobionskābe / Lactobionic acid, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂	“Sigma-Aldrich”, “Acros Organics”	ASV, Indija / USA, India	Augsti efektīva šķidrums hromatogrāfa kalibrēšanai, krāsas analīzē, šķīdības, pH salīdzināšanai ar iegūto laktobionskābi / For calibration of high performance liquid chromatography. Color, solubility and pH analysis comparison with the obtained lactobionic acid
Laktoze / Lactose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	“Pa Panreac”	Spānija / Spain	Augsti efektīva šķidrums hromatogrāfa kalibrēšanai / For the calibration of a highly efficient liquid chromatograph
Dinātrija hidrogenfosfāts / Disodium hydrogen phosphate Na ₂ HPO ₄	“Pa Panreac”	Spānija / Spain	Citometrijas analīzei / Cytometric analysis
Kālija dihidrogenfosfāts / Potassium dihydrogen phosphate, KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	“Pa Panreac”	Spānija / Spain	Citometrijas analīzei / Cytometric analysis

1. pielikuma turpinājums / *Continuation of appendix 1.*

Nosaukums / <i>Name</i>	Ražotājs / <i>Manufacturer</i>	Valsts, vieta / <i>Country, place</i>	Pielietojums / <i>Application</i>
Kālija hlorīds / <i>Potassium chloride, KCl</i>	“VWR ProLab Chemicals”	Spānija / <i>Spain</i>	Citometrijas analīzei / <i>Cytometric analysis</i>
Trizma [®] hidrohlorīda šķīdums / <i>hydrochloride solution, pH 7.6, 1 M, NH₂C(CH₂OH)₃ · HCl</i>	“Sigma”	ASV / <i>USA</i>	Citometrijas analīzei / <i>Cytometric analysis</i>
Formaldehīds / <i>Formaldehyde, 36% HCHO</i>	“VWR ProLab Chemicals”	Francija / <i>France</i>	Mikrofiltrācijas iekārtai / <i>For microfiltration equipment</i>
Nātrija hidroksīds / <i>Sodium hydroxide, NaOH</i>	“Pa Panreac”, “Chempur”	Spānija, Polija / <i>Spain, Poland</i>	Paraugu pH stabilizēšanai. Mikrofiltrācijas iekārtai / <i>To stabilize the pH of the samples. For microfiltration equipment</i>
Etilēndiamīntetraetiķskābe / <i>Ethylenediaminetetra-acetic acid, C₁₀H₁₆N₂O₈</i>	“Sigma”	Vācija / <i>Germany</i>	Citometrijas analīzei / <i>Cytometric analysis</i>
ChemCrome V6 CV6	“Biomerieux Chemunex [®] ”	Francija / <i>France</i>	Citometrijas analīzei / <i>Cytometric analysis</i>
Propīdija jodīds / <i>Propidium iodide, PI (in vitro gen)</i>	“Thermo Fisher Scientific”	ASV / <i>USA</i>	Citometrijas analīzei / <i>Cytometric analysis</i>
SYBR zaļš / <i>green, (SybrGreen)</i>	“Life Technologies Corporations”	ASV, Oregano / <i>USA, Oregano</i>	Citometrijas analīzei / <i>Cytometric analysis</i>
Sērskābe / <i>Sulfuric acid, 96% H₂SO₄</i>	“Emsure [®] ”	Vācija / <i>Germany</i>	Hromatogrāfijas analīzei, olbaltumvielu analīzei / <i>For chromatographic and protein analysis</i>
Borskābe / <i>Boric acid, H₃BO₃</i>	“Pa Panreac”	Spānija / <i>Spain</i>	Olbaltumvielu analīzei / <i>Protein analysis</i>
Fenoltaleīna šķīdums / <i>Phenolphthalein solution, 1%</i>	“Pa Panreac”	Spānija / <i>Spain</i>	Olbaltumvielu analīzei / <i>Protein analysis</i>
Sālsskābe / <i>Hydrochloric acid, 0.1 M, HCl</i>	“Pa Panreac”	Spānija / <i>Spain</i>	Olbaltumvielu analīzei / <i>Protein analysis</i>
Mangāna sulfāts / <i>Manganese sulphate, MnSO₄</i>	“Chempur”	Polija / <i>Poland</i>	Fermentācijas substrātam / <i>Fermentation substrate</i>
Magnija sulfāts / <i>Magnesium sulphate, MgSO₄ · 7H₂O</i>	“Chempur”	Polija / <i>Poland</i>	Fermentācijas substrātam / <i>Fermentation substrate</i>
Kālija hidroģenfosfāts / <i>Potassium hydrogen phosphate, K₂HPO₄</i>	“Chempur”	Polija / <i>Poland</i>	Fermentācijas substrātam / <i>Fermentation substrate</i>
Kjeldāla katalīzes tabletes / <i>Kjeldahl catalysis tablets, 2.5% CuSO₄ · 5H₂O + 2% Se</i>	“Pa Panreac”	Spānija / <i>Spain</i>	Olbaltumvielu analīzei / <i>Protein analysis</i>



**Laktozes biokonversija laktobionskābē (Sarenkova *et al.*, 2022) /
Lactose bioconversion into lactobionic acid**



**Laktobionskābes izdališanas un attīrīšanas metodes /
 Lactobionic acid recovery and purification methods**