

Latvijas Lauksaimniecības universitāte  
*Latvia University of Life Sciences and Technologies*  
Pārtikas tehnoloģijas fakultāte  
*Faculty of Food Technology*



Mg.sc.ing. **Inga Šarenkova** 

**LAKTOBIONSKĀBES IEGUVES BIOTEHNOLOĢISKIE RISINĀJUMI**

***THE BIOTECHNOLOGICAL SOLUTIONS FOR LACTOBIONIC ACID  
PRODUCTION***

Promocijas darba KOPSAVILKUMS  
zinātniskā doktora grāda zinātnes doktors (Ph.D.)  
pārtikas un dzērienu tehnoloģijās iegūšanai

**SUMMARY**  
*of the Doctoral thesis for acquiring a Doctor of Science (Ph.D.)  
in Food and Beverage Technologies*

Jelgava  
2022

**Promocijas darba vadītājs / *Scientific supervisor:***

LLU profesore / LLU professor *Dr.sc.ing.* **Inga Ciproviča**

**Promocijas darba konsultants / *Scientific consultant:***

Oviedo universitātes (Spānija) profesors / Oviedo University (Spain) professor  
*Dr. Manuel Rendueles de la Vega*

**Darba recenzenti / *Official reviewers:***

Vadošā pētniece / *Leading researcher* *Dr.sc.ing.* **Vita Šterna** – Agroresursu un ekonomikas institūts / *Institute of Agricultural Resources and Economics;*

Vadošais pētnieks / *Leading researcher*, Rūpnieciskās mikrobioloģijas un Pārtikas biotehnoloģijas laboratorijas vadītājs / *Head of the Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology*, *Dr. biol.* **Pāvels Semjonovs** – Latvijas universitāte / *University of Latvia;*

Vadošais pētnieks / *Leading researcher* *Dr.sc.ing.* **Vitālijs Radenkovs** – Dārzkopības institūts / *Institute of Horticulture.*

**Promocijas darba aizstāvēšana notiks** Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas un dzērienu tehnoloģijas nozares promocijas padomes atklātajā sēdē 2022. gada 16. jūnijā Pārtikas tehnoloģijas fakultātes 216. auditorijā, Rīgas ielā 22a, Jelgavā.

*The defence of the doctoral thesis in an open session of the Promotion Board of the Food and Beverage Technology of Latvia University of Life Sciences and Technologies will be held on 16<sup>th</sup> June, 2022 in auditorium 216 at the Faculty of Food Technology, Rīgas Street 22a, Jelgava.*

**Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties** LLU Fundamentālajā bibliotēkā, Lielajā iela 2, Jelgavā un portālā (pieejams: [www.kopkatalogs.lv](http://www.kopkatalogs.lv)).  
Atsauksmes sūtīt Pārtikas un dzērienu tehnoloģijas nozares promocijas padomes sekretārei, profesorei *Dr.sc.ing.* **I. Beitānei** (Rīgas iela 22a, Jelgava LV-3004, e-pasts: [ilze.beitane@llu.lv](mailto:ilze.beitane@llu.lv)).

*The doctoral thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Life Sciences and Technologies, Liela Street 2, Jelgava, and on the internet ([www.kopkatalogs.lv](http://www.kopkatalogs.lv)). References should be sent to professor *Dr.sc.ing.* **I. Beitane**, the Secretary of the Promotion Board of Food and Beverage Technology at the Faculty of Food Technology, Rīgas Street 22a, Jelgava LV-3004, Latvia or e-mail: [ilze.beitane@llu.lv](mailto:ilze.beitane@llu.lv).*

## SATURS

<b>PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE .....</b>	<b>4</b>
<b>ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA.....</b>	<b>6</b>
<b>MATERIĀLI UN METODEDES .....</b>	<b>9</b>
<b>REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....</b>	<b>19</b>
1. pH ietekme laktobionskābes ieguvē.....	19
2. Sūkalu sausnas satura ietekme laktobionskābes ieguvē.....	20
3. Dažādu sāļu ietekme laktobionskābes ieguvē.....	21
4. Dažādas izcelsmes sūkalu fermentēšanas salīdzinājums kontrolētā un nekontrolētā pH kolbās un bioreaktorā.....	22
5. Dažādas izcelsmes sūkalu kombināciju pārbaude laktobionskābes ieguvei.....	25
6. Laktobionskābes ieguve, atkārtoti pievienojot baktēriju biomasu.....	26
7. Attīrīšanas posmā iegūtie produkti.....	31
<b>SECINĀJUMI.....</b>	<b>35</b>

## CONTENT

<b>TOPICALITY OF THE RESEARCH .....</b>	<b>36</b>
<b>APPROBATION OF THE RESEARCH.....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>39</b>
<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>41</b>
1. Effect of pH on lactobionic acid production.....	41
2. Effect of whey solids on lactobionic acid production.....	41
3. Effect of different salts on lactobionic acid production.....	42
4. Comparison of different whey fermentation at controlled and uncontrolled pH in flasks and bioreactor.....	43
5. Comparison of different whey for lactobionic acid production.....	44
6. Production of lactobionic acid by re-addition of bacterial biomass.....	44
7. Products obtained after purification.....	47
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>49</b>

## PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Laktobionskābes potenciāls dažādās tautsaimniecības nozarēs un tās augošais pieprasījums tirgū, rosina meklēt risinājumus efektīvai vielas ieguvei, lietojot izmaksu ziņā lētas, viegli pieejamas un otreiz pārstrādājamas izejvielas.

Komerציālā laktobionskābe tiek ražota ķīmiskā sintēzē, lietojot cēlmetāla katalizatorus un ievērojamus enerģijas resursus. No visām iespējamajām laktobionskābes iegūšanas metodēm, fermentatīvā oksidēšana ļauj izmantot lētākas izejvielas, piemēram, sūkalas. Apzinot dažādās laktobionskābes ieguves metodes, to priekšrocības un trūkumus, vislielāko interesi izraisa *Pseudomonas taetrolens* izmantošana laktobionskābes ieguvei. *Pseudomonas taetrolens* darbības rezultātā iegūtie produkti ir droši pārtikā, kā arī pētnieciskie rezultāti apstiprina to spēju vairoties siera sūkalās un konvertēt laktozi laktobionskābē. Tomēr fermentatīvajā oksidēšanā svarīgs ir ne tikai fermentācijas, bet arī laktobionskābes izdalīšanas posms, kas šo metodi padara laikietilpīgāku nekā ķīmiskās sintēzes metodēs iegūto. Izdalīšanas posmā tiek lietotas 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.

Mūsdienās sūkalu pārstrādē 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. Biezpiena sūkalu izmantošana dažādu produktu ražošanā līdz šim nav apzināta kā efektīva, lielā substrāta skābuma, organisko skābju un ievērojamā fosfātu un citrātu satura dēļ. Apkopojot informāciju par biezpiena sūkalu sastāvu, *Pseudomonas taetrolens* augšanai nepieciešamajiem parametriem, esošās zināšanas un pētniecisko darbu pieredzi biezpiena sūkalu mikrobiālajā fermentācijā, tām ir potenciāls tikt izmantotām laktobionskābes ieguvei.

Tehnoloģiskie risinājumi laktobionskābes iegūšanai vēl joprojām nav pietiekami izpētīti, tādējādi šeit paveras plašs zinātniskais lauks fundamentāliem pētījumiem un jaunām atziņām.

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

Pētījuma hipotēze aizstāvāma 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 **mērķis** ir pētīt biezpiena sūkalu fermentācijas iespējas ar *Pseudomonas taetrolens* laktobionskābes ieguvei.

Darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi **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.

Promocijas darba izstrāde līdzfinansēta no:

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



"Zinātniskās kapacitātes stiprināšana LLU"

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

NACIONĀLAIS  
ATTĪSTĪBAS  
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA

Eiropas Sociālais  
fonds

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

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



PROJEKTU LĪDZFINANSĒ  
EIROPAS SAVIENĪBA

ELFLA

EIROPAS LAUKSAIMNIECĪBAS FONDS LAUKU ATTĪSTĪBAI:  
EIROPA INVESTĒ LAUKU APVIDOS

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

1. Pirmo reizi Latvijā veikti pētījumi 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.

## ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA

**Pētījumu rezultāti apkopoti un publicēti 6 zinātniskajos izdevumos, ieskaitot 4 publikācijas, kas indeksētas starptautiskās citēšanas datubāzēs SCOPUS un Web of Science. / *The research results have been summarised and published in 6 scientific publications, including 4 publications indexed in the international citation databases SCOPUS and Web of Science.***

**Publikācijas, kas indeksētas starptautiskajās datu bāzēs SCOPUS un Web of Science / *Publications indexed in international citation database SCOPUS and Web of Science:***

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
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
3. **Sarenkova I.**, Ciprovica I., Cinkmanis I. (2019) The effect of concentrated whey solids on lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens*. Conference *Proceedings of 13<sup>th</sup> Baltic conference on food science and technology „Food. Nutrition. Well-Being” and NEEFOOD 2019 5<sup>th</sup> North and East European Congress on Food*, Jelgava: LLU, p. 250 – 254. DOI: 10.22616/FOODBALT.2019.030
4. **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

**Publikācijas recenzētos zinātniskajos izdevumos / *Publications in peer reviewed scientific issues:***

1. **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

2. **Sarenkova I.**, Ciprova 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

**Par rezultātiem ziņots** 7 starptautiskajās zinātniskajās konferencēs Latvijā, Igaunijā, Spānijā un Francijā / *The results of the research work have been presented at 7 international scientific conferences in Latvia, Estonia, Spain and France:*

1. **Sarenkova I.**, Saez Orviz S., Ciprova I., Rendueles M., Diaz M. (2021) Acid whey suitability for lactobionic acid production. *14<sup>th</sup> Baltic Conference on Food Science and Technology FoodBalt 2021*, 3-5.05.2021., Tallina, Igaunija. (Mutisks ziņojums/ *Oral presentation*).
2. **Sarenkova I.**, Saez Orviz S., Ciprova I., Rendueles M., Diaz M. (2020) Lactobionic acid production from acid whey under different fermentative conditions. *6<sup>th</sup> International conference on Food and Agricultural engineering ICFAE 2020*, 13-15.04.2020., Barcelona, Spānija. (Mutisks ziņojums/ *Oral presentation*).
3. **Sarenkova I.**, Ciprova I., Cinkmanis I. (2019) 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. (Mutisks ziņojums/ *Oral presentation*).
4. **Sarenkova I.**, Ciprova I., Cinkmanis I. (2019) The study of the effect of acid whey pH on lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens*. *10<sup>th</sup> International conference "Biosystems Engineering"*, 08.-10.05.2019., Igaunija, Tartu. (Stenda referāts / *Poster presentation*).
5. **Sarenkova I.**, Ciprova I., I. Cinkmanis. (2019) The effect of concentrated whey solids on lactobionic acid production by *Pseudomonas taetrolens*. *13<sup>th</sup> Baltic conference on food science and technology „Food. Nutrition. Well-Being” and NEEFOOD 2019 5<sup>th</sup> North and East European Congress on Food*, 02-03.05.2019., LLU, Jelgava, Latvija. (Mutisks ziņojums/ *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, Spānija. (Stenda referāts / *Poster presentation*).
7. **Sarenkova I.**, Ciprova I. Review: The current status and future perspectives of lactobionic acid production. *International conference "Research for Rural Development 2018"*, 16-18.05.2018., LLU, Jelgava, Latvija. (Mutisks ziņojums / *Oral presentation*).

Promocijas darba rezultāti prezentēti **doktorantu izglītojošosursos** / *The results of the research work have been presented in **PhD courses**:*

1. “Valorisation of vegetal waste and by-products: An eminent source of natural bioactive ingredients”, 09.12.-11.12.2020., Tartu, Igaunija.
2. “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” / *The results have been presented at the “Vidzeme Innovation Week 2022” and the international food fair “Riga Food 2020”.*



# MATERIĀLI UN METODEDES

## Pētījuma laiks un vieta

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 un Citometrijas laboratorijās, pilotražotnē (Spānija), Oviedo universitātes Ķīmijas un vides inženierijas katedras Bioprocesu, ūdens kvalitātes un izmēģinājumu rūpnīcas laboratorijās (Spānija).

## Materiālu raksturojums

Pētījumā lietotas:

- 1) *Pseudomonas taetrolens* - iegādātas stikla ampulās sublimētā veidā 40% glicerolā, uzglabāšanas apstākļi mīnus 20 °C. Optimālā temperatūra 30 °C, pētījumiem lietotie celmi:
  - ✓ LMG 2336 (Beļģijas koordinētā mikroorganismu kolekcija, Beļģija);
  - ✓ NCIB 9396 (Nacionālā mikroorganismu kultūru kolekcija, Anglija);
  - ✓ DSM 21104 (Vācijas mikroorganismu un sūnu kultūru kolekcija, Vācija).
- 2) sūkalas (uzglabātas -20 °C) skatīt 1. tabulā.

1. tabula / Table 1

### Darbā lietoto sūkalu raksturojums / Parameters of whey used in the research

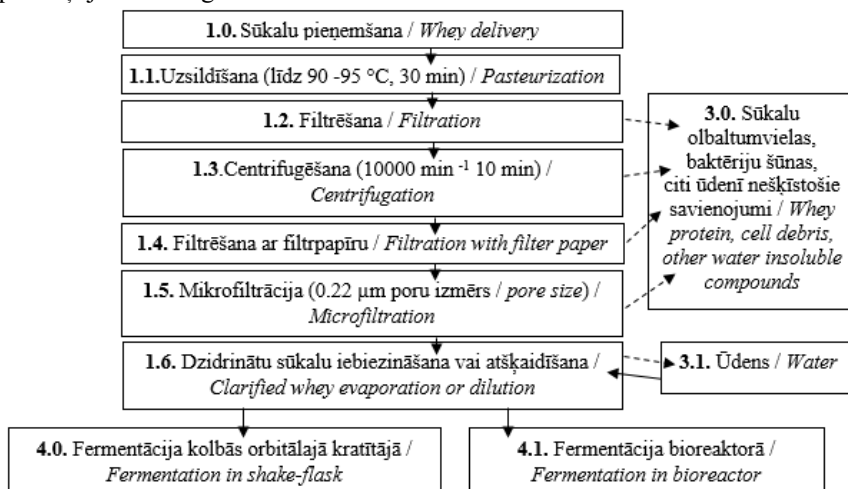
Parametri / Parameters	Biezpiena sūkalas / Acid whey	Skābpiena siera ražošanā iegūtās sūkalas / Whey from the manufacture of acid coagulated cheese	Siera sūkalas / Sweet whey
Ražotājs / Manufacturer	A/S / LTD "Tukuma piens", Latvija / Latvia	"Ca Sanchu", Asturias, Spānija / Spain	"ILAS S.A.", Asturias, Spānija / Spain
Laktoze / Lactose, %	4.47 ± 0.02	5.60 ± 0.13	6.20 ± 0.12
Olbaltumvielas / Proteins, %	0.38 ± 0.01	0.23 ± 0.08	0.12 ± 0.03
Tauki / Fats, %	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Sausnas saturs / Total solids, %	4.90 ± 0.09	5.92 ± 0.08	6.44 ± 0.05
pH	4.75 ± 0.01	4.67 ± 0.01	6.34 ± 0.01

## Pētījuma struktūra

Pētījumi veikti divos etapos:

- 1) laktozes biokonversija laktobionskābē;
- 2) laktobionskābes attīrīšana un izdalīšana.

Laktobionskābes ieguves process sākas ar sūkalu apstrādi (1. att.). Sūkalas karsētas 90–95 °C, izturot 30 minūtes, sūkalu olbaltumvielu denaturācijai. Sūkalu olbaltumvielas atdalītas filtrējot. Dzidrinātas sūkalas filtrētas caur filtrpapīru (poru izmērs ~ 2 μm) un mikrofiltrācijas ierīces polivinilidēna difluorīda (PVDF) membrānām (ar 0.22 μm poru izmēriem) (Millipore, Masačūsetsa, ASV), baktēriju un dažādu citu piemaisījumu atdalīšanai. Dzidrinātas sūkalas pildītas sterilos stikla traukos, lai izvairītos no ārējā vides piesārņojuma un iegūtu tīru substrātu.



1. att. Sūkalu apstrāde un sagatavošana fermentācijai /

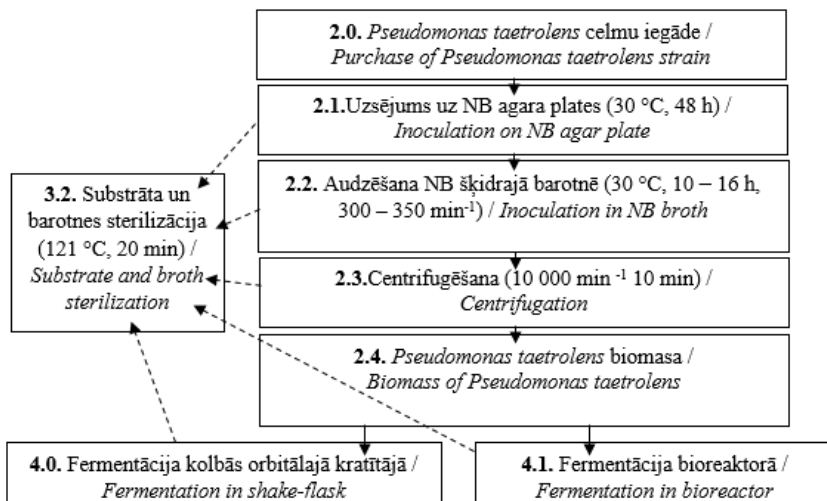
Fig. 1. Whey treatment and preparation for fermentation

*Pseudomonas taetrolens* celmu sagatavošana uzsējumiem (2. att.). Pirms eksperimenta tiek aktivizētas 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. Baktērijas ar cilpas palīdzību tiek ienestas barotnē (sastāvs 20 g L<sup>-1</sup> barojošais agars, 5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 5 g L<sup>-1</sup> peptons, 2 g L<sup>-1</sup> rauga un 1 g L<sup>-1</sup> gaļas ekstrakts), turpmāk NB barotne. To inkubē 30 °C temperatūrā 48 h.

Pēc inkubācijas no Petrī plates ar cilpiņu (10 μL tilpums) baktērijas tiek pārnestas 500 mL kolbā, kurā ir 100 mL šķidrā barības vielu barotne (sastāvs

5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 5 g L<sup>-1</sup> peptons, 2 g L<sup>-1</sup> rauga un 1 g L<sup>-1</sup> gaļas ekstrakts), turpmāk NB šķidrā barotne.

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<sup>-1</sup>. Pēc inkubācijas substrātu salej sterilos konusveida trauciņos un centrifugē 10 000 min<sup>-1</sup> 10 min, lai nostādinātu izaugušās *Pseudomonas taetrolens* šūnas.



2. att. *Pseudomonas taetrolens* aktivizēšana fermentācijai /  
Fig. 2. *Pseudomonas taetrolens* activation for fermentation

Atdalītās baktērijas pievieno dzidrinātām sūkalām. Ja eksperimentā izmanto iebiezinātas sūkalas, tās ietvaicē „Rising Film evaporator FT22” (Armfield, Anglija) iekārtā. Pirms fermentācijas procesa dzidrināto sūkalu sastāvs tiek analizēts ar MilcoScan™ Mars (Foss, Dānija) vai augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju.

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

Veiktā eksperimenta detalizētāks izklāsts ir apkopots 2. tabulā.

**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 <sup>-1</sup> )	Fermentācijas norise / Fermentation process	Apraksts / Description
<b>a</b>	pH ietekme laktobionskābes ieguvē / <i>Effect of pH on lactobionic acid production</i>	Biezpiena sūkalas / Acid whey	NCIB 9396, DSM 21104	4	Kolbās / Shake-flask	Fermentācijas process veikts 30 °C 48 h, maisot 220 min <sup>-1</sup> . Fermentācijas sākumā pH iebiezinātos (30 ± 1 % sausas) sūkalu paraugos stabilizēts ar 6 M NaOH. / <i>The fermentation process was performed at 30 °C for 48 h with stirring at 220 min<sup>-1</sup>. At the beginning of the fermentation, the pH of the concentrated (30 ± 1% dry matter) whey samples was adjusted with 6 M NaOH.</i> Substrāta sastāvs / <i>Content of substrate</i> : laktoze / <i>lactose</i> 26.12 ± 0.12%; tauki / <i>fat</i> 0.01 ± 0.01%, olbaltumvielas / <i>protein</i> 0.48 ± 0.02%, pH 4.25 ± 0.01.
<b>b</b>	Sūkalu sausas saturas ietekme laktobionskābes ieguvē / <i>Effect of whey solids on lactobionic acid production</i>	Biezpiena sūkalas / Acid whey	NCIB 9396, DSM 21104	2	Kolbās / Shake-flask	Fermentācijas process veikts 30 °C 48 h, maisot 220 min <sup>-1</sup> . / <i>The fermentation process was performed at 30 °C for 48 h with stirring at 220 min<sup>-1</sup>.</i> Substrāta sastāvs / <i>Content of substrate</i> : laktoze / <i>lactose</i> 4.47 ± 0.02%, olbaltumvielas / <i>protein</i> 0.38 ± 0.01%, tauki / <i>fat</i> 0.01 ± 0.01%, kopējais sausas saturs / <i>total solid concentration</i> 4.90 ± 0.09%, pH 4.75 ± 0.01. Substrāta paraugi tika iebiezināti līdz dažādam sausas saturam / <i>Samples are concentrated till solids concentration: 5%, 10%, 20%, 30% un 40%.</i>
<b>c</b>	Dažādu sāļu ietekme laktobionskābes ieguvē / <i>Effect of different salts on lactobionic acid production</i>	Biezpiena sūkalas / Acid whey	NCIB 9396, DSM 21104	2	Kolbās / Shake-flask	Fermentācijas process veikts 30 °C 48 h, maisot 230 min <sup>-1</sup> . / <i>The fermentation process was performed at 30 °C for 48 h with stirring at 230 min<sup>-1</sup>.</i> Substrāta sastāvs / <i>Content of substrate</i> : laktoze / <i>lactose</i> 8.49 ± 0.12%; tauki / <i>fat</i> 0.01 ± 0.01%, olbaltumvielas / <i>protein</i> 0.88 ± 0.03%, kopējais sausas saturs / <i>total solid concentration</i> 10.09 ± 0.81%, pH 4.29 ± 0.01. Substrātam pievienoti šādi sāļi / <i>Salts added to substrate: MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>

2. tabulas turpinājums / Continuation of Table 2

Sērija / Series	Eksperimenta nosaukums / Title of experiment	Substrāts / Substrate	Pseudomonas taetrolens celmi / strains	Biomases daudzums / Amount of biomass, % (v v <sup>-1</sup> )	Fermentācijas norise / Fermentation process	Apraksts / Description
<b>d</b>	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 / Bioreactor and shake-flask	Fermentācijas process veikts bioreaktorā 30 °C 72 h, maisot 350 min <sup>-1</sup> un pievadot 1.5 L min <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> . Fermentācijas process veikts kolbās 30 °C 72 h, maisot 350 min <sup>-1</sup> . / The fermentation process was performed in a bioreactor at 30 °C for 72 h with stirring at 350 min <sup>-1</sup> and 1.5 L min <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> . The fermentation process was performed in a shake-flask at 30 °C for 72 h with stirring at 350 min <sup>-1</sup> . Siera sūkalu 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 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.
<b>e</b>	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	Bioreaktorā / Bioreactor	Fermentācijas process veikts 30 °C 48 h, maisot 350 min <sup>-1</sup> un pievadot 1.5 L min <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> . Visiem paraugiem fermentēšanas laikā nepārtraukti stabilizēts pH ar 6 M NaOH (lidz 6.5). / The fermentation process was performed at 30 °C for 48 h with stirring at 350 min <sup>-1</sup> and 1.5 L min <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> . The pH was continuously adjusted with 6 M NaOH during fermentation. Siera sūkalu 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 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.
<b>f</b>	Laktobionskābes ieguve, atkārtoti pievienojot baktēriju biomasu / Production of lactobionic acid by re-addition of bacterial biomass	Biezpiena sūkalas / Acid whey	LMG 2336	10, 30	Bioreaktorā / Bioreactor	Fermentācijas process veikts 30 °C 72 h, maisot 350 min <sup>-1</sup> un pievadot 1.5 L min <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> . Visiem paraugiem fermentēšanas laikā stabilizēts pH ar 6 M NaOH līdz 6.5. / The fermentation process was performed at 30 °C for 72 h with stirring at 350 min <sup>-1</sup> and 1.5 L min <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> . The pH was adjusted with 6 M NaOH during fermentation. Substrāta sastāvs / Content of substrate: laktoze / lactose 4.2 ± 0.14%, olbaltumvielas / protein 0.14 ± 0.04%, tauki / fat 0.01 ± 0.01% un pH 4.57 ± 0.06.

Pēc fermentēšanas procesa kolbās paraugiem netika īstenoti attīrīšanas un laktobionskābes izdalīšanas posmi nepietiekamā analizējamā parauga apjoma dēļ. Pēc fermentācijas (2. tabula f sērija) substrāts tika novirzīts uz laktobionskābes attīrīšanu un izdalīšanu, skatīt 3. tabulu.

3. tabula / Table 3

**Laktobionskābes ieguvei lietotās attīrīšanas un izdalīšanas metodes / Purification and recovery methods used to obtain lactobionic acid**

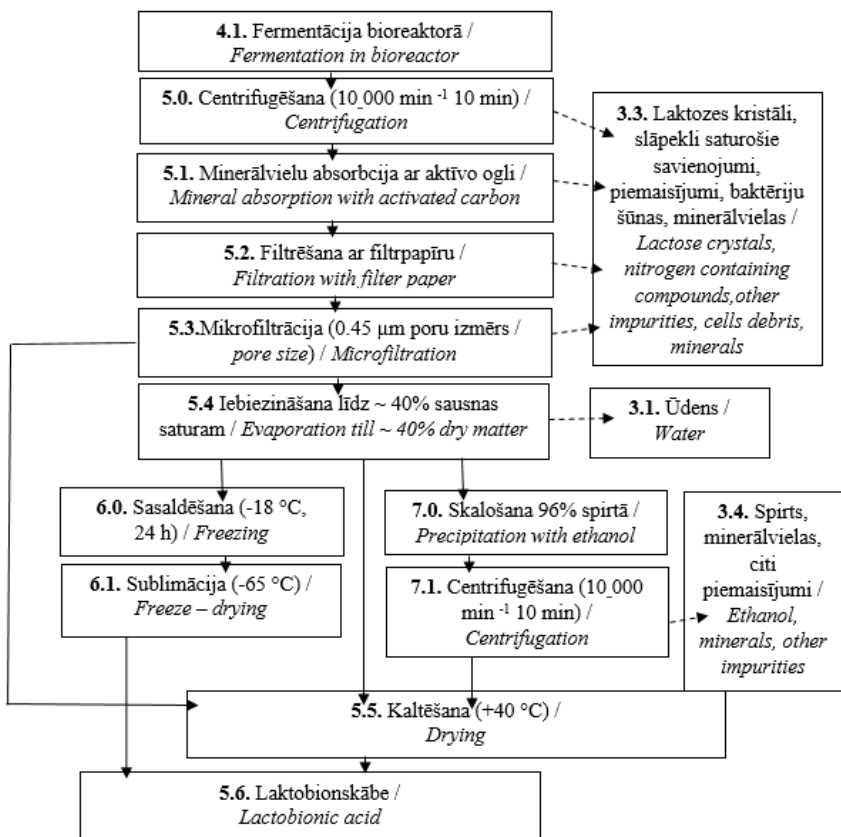
Parauga kods / Sample code	Centrifugēšana / Centrifugation	Minerālvielu absorbcija ar aktīvo ogli / Mineral adsorption with activated carbon	Filtrēšana un mikrofiltrācija / Filtration and microfiltration	Iebiezināšana / Evaporation	Skalošana ar 96% etilspirtu / Precipitation with ethanol	Kaltēšana /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

✓ – lietotā attīrīšanas un izdalīšanas metode laktobionskābi saturošam paraugam

Pēc fermentēšanas bioreaktorā paraugi attīrīti centrifugējot, filtrējot caur filtrpapīru un veicot minerālvielu absorbciju ar aktīvo ogli un mikrofiltrējot (0.45 µm poru izmērs), lai iegūtu gaišu, caurspīdīgu šķīdumu (3. att.).

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

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



3. att. Laktobionskābes izdalīšana /  
Fig. 3. Lactobionic acid recovery

Kaltēšanas procesu izmantoja iebiezinātu paraugu, arī mikrofiltrētu paraugu tālākai apstrādei. Abus paraugus plānā slānī (līdz 3 mm) kaltēja termostātā 40 °C temperatūrā līdz nemainīgai masai.

Skalošanai ar etilspirtu izmantoja iebiezinātu sūkalu paraugu (~40% sausnas saturs). Iebiezinātajam paraugam pievienoja etilspirtu, lai kristalizējas paraugā esošā laktobionskābe. Paraugu centrifugēja 10 000 min<sup>-1</sup> 10 min, lai izdalītu laktobionskābes kristālus, kurus kaltēja 40 °C temperatūrā.

Izstrādes posmos noteiktie un kontrolētie parametri uzskaitīti 4. tabulā.

4. tabula / Table 4

**Nosakāmie un kontrolējamie parametri laktobionskābes ieguvē /  
Determined and controlled parameters in lactobionic acid production**

Posms* / Stage	Nosakāmie un kontrolējamie parametri / Determined and controlled parameters	Sērija** / Series
1.	Sausnas saturs / Total solids, %	a,b,c,d,e,f
	pH	a,b,c,d,e,f
	Laktozes koncentrācija / Concentration of lactose, %	a,b,c,d,e,f
	Tauku koncentrācija / Concentration of fat, %	a,b,c,d,e,f
	Olbaltumvielu koncentrācija / Concentration of protein, %	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 <sup>-1</sup>	d,e,f
1.5.	Spiediens / Pressure, Pa	d,e,f
1.6.	Laktozes koncentrācija / Concentration of lactose, g L <sup>-1</sup>	a,b,c,d,e,f
	pH	a,b,c,d,e,f
	Olbaltumvielu koncentrācija / Concentration of protein, g L <sup>-1</sup>	a,b,c,d,e,f
2.1.	Sausnas saturs / Concentration of total solids, %	a,b,c,d,e,f
	Temperatūra / Temperature, °C	a,b,c,d,e,f
2.2.	Laiks / Time, h	a,b,c,d,e,f
	Temperatūra / Temperature, °C	a,b,c,d,e,f
	Laiks / Time, h	a,b,c,d,e,f
2.3.	Maisīšanas intensitāte / Intensity of stirring, min <sup>-1</sup>	a,b,c,d,e,f
	Laiks / Time, min	a,b,c,d,e,f
3.2.	Maisīšanas intensitāte / Intensity of stirring, min <sup>-1</sup>	a,b,c,d,e,f
	Temperatūra / Temperature, °C	a,b,c,d,e,f
4.	Laiks / Time, h	a,b,c,d,e,f
	Laktobionskābes koncentrācija / Concentration of lactobionic acid, g L <sup>-1</sup>	a,b,c,d
	Laktozes koncentrācija / Concentration of lactose, g L <sup>-1</sup>	a,b,c,d
	pH	a,b,c,d
	Temperatūra / Temperature, °C	a,b,c,d
	Šūnu masa / Dry cell weight, g L <sup>-1</sup>	c,d
	Dzīvotspējīgo šūnu skaita noteikšana / Viable cells, KVV / CFU 1 mL <sup>-1</sup>	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 koncentrācija / Concentration of lactobionic acid, g L <sup>-1</sup>	d,e,f
	Laktozes koncentrācija / Concentration of lactose, g L <sup>-1</sup>	d,e,f
	pH	d,e,f
	Temperatūra / Temperature, °C	d,e,f
	Šūnu masa / Dry cell weight, g L <sup>-1</sup>	d,e,f



4. tabulas turpinājums / *Continuation of Table 4*

Posms* / <i>Stage</i>	Nosakāmie un kontrolējamie parametri / <i>Determined and controlled parameters</i>	Sērija** / <i>Series</i>
4.1	Dzīvotspējīgo šūnu skaits / <i>Viable cells, KVV / CFU 1 mL<sup>-1</sup></i>	f
	Baktēriju fizioloģiskais stāvoklis (metaboli aktīvas, bojātas un mirušas šūnas) / <i>Physiological status of bacteria (metabolically active, damaged and dead cells), %</i>	f
	Šūnu optiskais blīvums / <i>Optical density, 600 nm</i>	d,e,f
	Izšķīdušais skābeklis / <i>Dissolved oxygen, %</i>	d,e,f
5.	Apgriezienu skaits / <i>Rotation, min<sup>-1</sup></i>	d,f
	Laiks / <i>Time, min</i>	d,f
5.1.	Krāsas intensitāte CIE L*a*b* krāsu sistēma / <i>Intensity of color</i>	d
5.4.	Sausnas saturs / <i>Concentration of total solids, %</i>	d,f
5.5.	Temperatūra / <i>Temperature, °C</i>	f
5.6.	Krāsas intensitāte CIE L*a*b* krāsu sistēma / <i>Intensity of color</i>	f
	Laktozes koncentrācija / <i>Concentration of lactose, g L<sup>-1</sup></i>	e,f
	Laktobionskābes koncentrācija / <i>Concentration of lactobionic acid, g L<sup>-1</sup></i>	e,f
	pH	f
	Šķīdība ūdenī / <i>Solubility in water, s</i>	f
6.	Olbaltumvielu koncentrācija / <i>Concentration of protein, %</i>	e,f
	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.	Apgriezienu skaits / <i>Rotation, min<sup>-1</sup></i>	f
	Laiks / <i>Time, min</i>	f

\*Posmi norādīti 1., 2. un 3. attēlā / *Stages are shown in Fig.1., 2. and 3.;*

\*\* Eksperimentu plānojums dots 2. tabulā. Katram eksperimentam ir piešķirts sērijas apzīmējums / *Experimental design is shown in Table 2. Each experiment has an assignment series.*

**Pētījumā veikto analīžu metodes**

Noteikto rādītāju analīžu metodes ir apkopotas 5. tabulā.

5. tabula / *Table 5*

**Pētījumā izmantotās analīžu metodes /  
*Analytical methods used in the study***

Nr. / <i>No</i>	Rādītāji / <i>Indices</i>	Metodes, standarti, iekārtas un formulas / <i>Methods, standards, equipment and equations</i>
1.	pH	LVS ISO 5546:2010
2.	Olbaltumvielu saturs / <i>The concentration of protein</i>	LVS EN ISO 8968-5:2002 Kjeldāla metode / <i>Kjeldahl method</i>
3.	Sausnas saturs / <i>Solids, Brix%</i>	LVS 249:2000
4.	Analizējamo paraugu, suspensiju un atšķaidījumu sagatavošana / <i>Preparation of test samples, suspensions and dilutions</i>	ISO 6887-4:2017

5. tabulas turpinājums / *Continuation of Table 5*

Nr. / No	Rādītāji / <i>Indices</i>	Metodes, standarti, iekārtas un formulas / <i>Methods, standards, equipment and equations</i>
5.	Dzīvotspējīgo šūnu skaits / <i>Viable cells, KVV / CFU 1mL<sup>-1</sup></i>	ISO 4833-1:2013
6.	Laktobionskābes un laktoze koncentrācija / <i>The concentration of lactobionic acid and lactose</i>	AEŠH / <i>HPLC</i> : Agilent 1200, Agilent Technologies Inc. (Coregel-ION 300), Shimadzu LC – 20 Prominence (Alltech NH <sub>2</sub> )
7.	Baktēriju fizioloģiskā stāvokļa noteikšana / <i>Physiological status of bacteria</i>	Multiparametriskā plūsmas citometrija / <i>Multiparametric flow cytometry (FCM)</i> (Beckman Coulter, Cytoflex-5, USA) (Garcia <i>et al.</i> , 2017)
8.	Izšķīdušais skābeklis / <i>Dissolved oxygen</i>	Polarogrāfiski ar elektrodu / <i>Polarographically with electrode (InPro 6830, Mettler Toledo, Switzerland)</i> (Alonso <i>et al.</i> , 2014)
9.	Baktēriju vairošanās intensitāte / <i>Intensity of bacteri growth</i>	Spektrofotometriski / <i>Spectrophotometric</i> (Thermo Scientific Helios Gamma UVG, England) (Alonso <i>et al.</i> 2014)
10.	Šūnu masa / <i>Dry cell weight</i>	Gravimetriskā metode / <i>gravimetric method</i>
11.	Krāsas analīze / <i>Determination of color</i>	CIE L*a*b* sistēmā ar / <i>system with „Lovibond® LC100” (Tintometer® group, China)</i> (Purnama <i>et al.</i> , 2015)
12.	Laktobionskābes šķīdība ūdenī / <i>Lactobionic acid solubility in water</i>	Aprēķināts pēc formulas / <i>Calculated by equation</i> (Delagustin <i>et al.</i> 2019)
13.	Laktobionskābes iznākums / <i>Yield of lactobionic acid, %</i>	Aprēķināts pēc formulas / <i>Calculated by equation</i> (Alonso <i>et al.</i> , 2011)
14.	Īpatnējais augšanas ātrums / <i>Growth rate, μ (h<sup>-1</sup>)</i>	Aprēķināts pēc formulas / <i>Calculated by equation</i> (Shuler & Kargi, 2002, Alonso <i>et al.</i> , 2017)
15.	Vielas koncentrācijas noteikšana tilpuma vienībā / <i>Volumetric productivity, WP</i>	Aprēķināts pēc formulas / <i>Calculated by equation</i> (Prasirtsak <i>et al.</i> , 2019)
16.	Biomasa produktivitāte / <i>Biomass productivity, WX</i>	Aprēķināts pēc formulas / <i>Calculated by equation</i> (Hempel <i>et al.</i> , 2002)
17.	Kopējā krāsu atšķirība ΔE / <i>Total color intensity difference, ΔE</i>	Aprēķināts pēc formulas / <i>Calculated by equation</i> (Mokrzycki & Tatol, 2012)
18.	Specifiskais laktobionskābes sintēzes ātrums / <i>The specific lactobionic acid production rate, qLBA</i>	Aprēķināts pēc formulas / <i>Calculated by equation</i> (Alonso <i>et al.</i> , 2017)
19.	Iegūtās biomasas attiecība pret patērēto laktozi / <i>The ratio of biomass produced with respect to the concentration of lactose consumed, Y<sub>X/S</sub></i>	Aprēķināts pēc formulas / <i>Calculated by equation</i> (Kargi., 2009)
20.	Laktobionskābes koncentrācijas noteikšana produktos / <i>Lactobionic acid concentration determination in products</i>	Aprēķināts pēc formulas / <i>Calculated by equation</i> (Ngiam <i>et al.</i> , 2001)
21.	Laktobionskābes reģenerācijas noteikšana / <i>Lactobionic acid recovery determination</i>	Aprēķināts pēc formulas / <i>Calculated by equation</i> (Borges da Silva <i>et al.</i> , 2011)

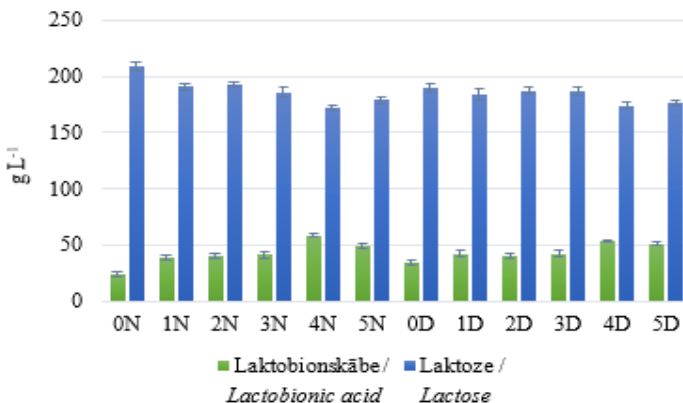
## Datu matemātiskā apstrāde

Datu analīzei lietota Microsoft Excel 2010 programmatūra. Statistiskās analīzes veiktas, izmantojot dispersijas analīzi (ANOVA) un t-testu ar būtiskuma līmeni ( $p < 0.05$ ). Hromatogrāfijas dati apstrādāti ar ChemStation (Agilent) programmatūru, bet plūsmas citometrijas dati apstrādāti, izmantojot CytExpert (Beckman Coulter) programmatūru.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

### 1. pH ietekme laktobionskābes ieguvē

Eksperimentā tika skaidrots optimālais biezpiena sūkalu pH, kurā vairojas *Pseudomonas taetrolens* NCIB 9396 un DSM 21104 celmi. Laktozes un laktobionskābes saturs paraugos pēc fermentācijas atainots 4. attēlā.



4. att. Laktobionskābes iznākums dažādu pH ietekmē / Fig. 4. Lactobionic acid yield affected by the different pH

Paraugu apzīmējums / Sample designation: skaitlis pie apzīmējuma x asi norāda sākotnējo substrāta pH / The number shows the initial pH 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

Augstāko rezultātu uzrādīja 4N paraugs ( $58.47 \pm 2.03 \text{ g L}^{-1}$  laktobionskābes), tam sekoja 4D paraugs ( $53.67 \pm 1.02 \text{ g L}^{-1}$  laktobionskābi). Mazāki rezultāti tika noteikti 0N paraugam –  $23.97 \pm 1.83 \text{ g L}^{-1}$  un 0D paraugam –  $34.66 \pm 1.82 \text{ g L}^{-1}$ . Rezultāti pierādīja, ka biezpiena sūkalās *Pseudomonas taetrolens* laktozi efektīvāk konvertē laktobionskābē, ja vides pH ir 6.5. Eksperiments par pH ietekmi uz laktobionskābes ieguvu pierādīja, ka *Pseudomonas taetrolens* spēj konvertēt biezpiena sūkalās esošo laktozi laktobionskābē, bet nepietiekami. Ir nepieciešams pielāgot fermentācijas substrāta pH ap 6.5 fermentācijas laikā, ja

šādā pH *Pseudomonas taetrolens* efektīvāk veicina laktozes biokonversiju laktobionskābē. Skābā vide kavē *Pseudomonas taetrolens* darbību, kas ir iemesls, kāpēc netiek sasniegti augstāki laktobionskābes rezultāti, salīdzinot ar siera sūkalām.

## 2. Sūkalu sausnas saturs ietekme laktobionskābes ieguvē

Eksperimenta mērķis bija izpētīt biezpiena sūkalu sausnas saturs ietekmi uz *Pseudomonas taetrolens* NCIB 9396 un DSM 21104 augšanu un laktozes oksidāciju laktobionskābē (LBA). Lielākais laktobionskābes iznākums tika sasniegts paraugos N5%, D5%, N10%, D10%, N20% un D20% (skat. 6. tabulu). Būtiskas atšķirības ( $p > 0.05$ ) starp šiem paraugiem laktobionskābes iznākumā netika konstatētas.

6. tabula / Table 6

### Sausnas saturs ietekme uz laktozes un laktobionskābes saturu paraugos / The influence of solids concentration on lactose and lactic acid concentration in samples

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

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  $p > 0.05$ .

Paraugu apzīmējums / Sample designation: burts apzīmē baktēriju celmu / the letter indicates the strain of bacteria: N = NCIB 9396; D = DSM 21104. 5%, 10%, 20%, 30%, 40% - apzīmē sūkalu sausnas saturu paraugā / numbers indicate the concentration of whey solids.

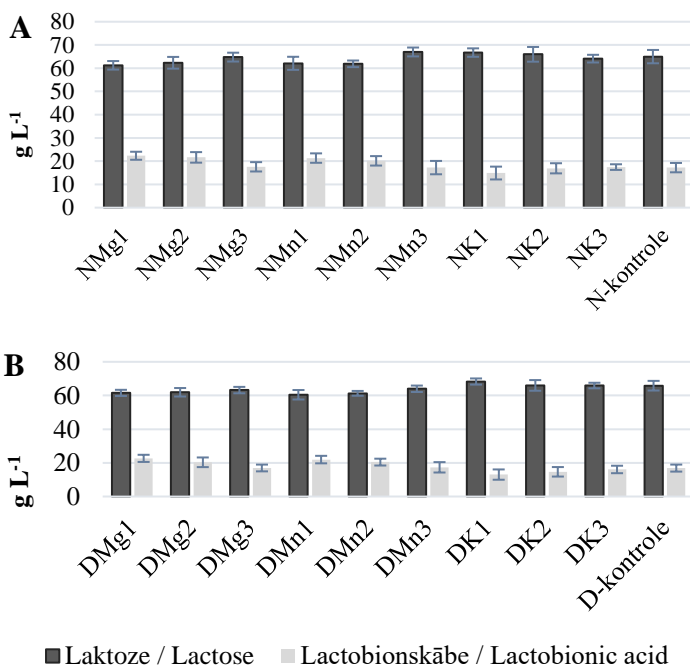
Iegūtie rezultāti parādīja, ja paraugu sausnas saturs ir 5%, 10% un 20%, iegūtās laktobionskābes iznākumā nav būtisku atšķirību. Ja sūkalu sausnas saturs paraugos pārsniedz 20%, ir novērojams laktobionskābes iznākuma samazinājums.

Rezultāti apliecina, ka laktobionskābes iznākums ir mazāks paraugos ar sausnas saturu virs 20%. Mijamoto u.c. (2000) ir konstatējuši, ka

laktobionskābes sintēzes ātrums ir lielāks paraugos ar 150 nekā ar 200 g L<sup>-1</sup> laktozes. Murakami u.c. (2003) secināja, ka liels sausnas saturs sūkalās var samazināt laktozes absorbcijas ātrumu *P.taetrolens* šūnu membrānā, arī liels sausnas saturs substrātā var izraisīt mikroorganismu producēto enzīmu inaktivāciju.

### 3. Dažādu sāļu ietekme laktobionskābes ieguvē

Eksperimenta mērķis bija izpētīt, vai, pievienojot papildu sāļus (barības vielas baktēriju augšanai) biežpiena sūkalām, uzlabosies baktēriju vairošanās un laktozes konversija laktobionskābē. Laktozes un laktobionskābes saturs paraugos pēc fermentācijas atainots 5. attēlā.



#### 5. att. Laktobionskābes un laktozes saturs paraugos fermentācijas beigās

(A) *P. taetrolens* NCIB 9396, (B) *P. taetrolens* DSM 21104 /

Fig. 5. Concentration of lactobionic acid and lactose at the end of fermentation

(A) *P. taetrolens* NCIB 9396, (B) *P. taetrolens* DSM 21104

Paraugu apzīmējums / Sample designation: kontrolle=paraugs bez sāļu pievienošanas / sample with no salt added; burts apzīmē lietoto baktērijas celmu / the letter indicates the strain of bacteria:

N = NCIB 9396; D = DSM 21104. Līdzās baktēriju celmam apzīmēts pievienotais sāļu katjons / the letter indicates added salt cation: Mg = MgSO<sub>4</sub>; Mn = MnSO<sub>4</sub>; K = K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Skaitlis norāda pievienotās vielas koncentrāciju/ The number indicates the amount of added salts: 1 = 0.01%;

2 = 0.005%; 3 = 0.001%.

Būtiskas atšķirības netika konstatētas ( $p > 0.05$ ) starp N-kontroles un NMg3, NMn2, NMn3, NK1, NK2, NK3 paraugiem (5. att. (A)) kā arī starp D-kontroles un DMg2, DMg3, DMn2, DMn3, DK1, DK2, DK3 paraugiem (5. att. (B)). Savukārt starp N-kontroles un NMg1, NMg2, NMn1 paraugiem ir noteiktas būtiskas atšķirības ( $p < 0.05$ ), kā arī starp D-kontroles, DMg1 un DMn1 paraugiem ir konstatēta būtiska atšķirība ( $p < 0.05$ ).

Mg<sup>2+</sup> un Mn<sup>2+</sup> jonu klātbūtne substrātā pozitīvi ietekmē *Pseudomonas taetrolens* vairošanos, sekmējot laktozes oksidāciju laktobionskābē. K<sup>+</sup> jonu klātbūtne nav ietekmējusi laktobionskābes biokonversiju.

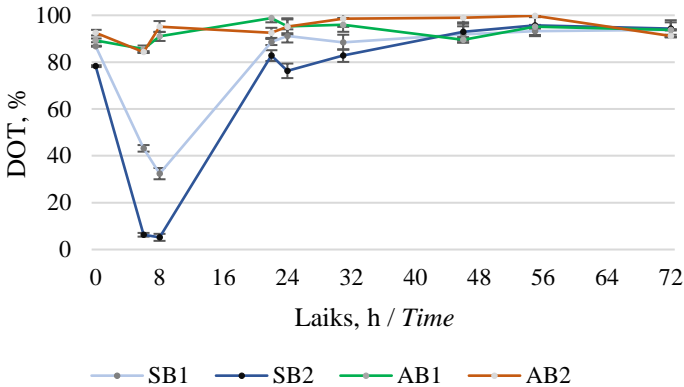
Zinātniskajā literatūrā nav atspoguļoti pētījumi par sāļu ietekmi uz *Pseudomonas taetrolens* aktivitāti. Ir informācija, ka Mg<sup>2+</sup> jonu trūkums substrātā var izraisīt šķiedrainas baktēriju struktūras veidošanos, kavējot šūnu dalīšanos un augšanu. Baktēriju augšana Mg<sup>2+</sup> jonu klātbūtnē ir skaidrojama ar atziņu, ka magnijam ir ietekme uz vielmaiņas procesu norisi šūnās un to dalīšanās veicināšanu. Mg<sup>2+</sup> joni stabilizē arī nukleīnskābes (DNS un RNS) un piedalās peptīdu hidrolīzē. Tie ir nepieciešami baktēriju producēto enzīmu funkcijām. Mn<sup>2+</sup> 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 *Pseudomonas taetrolens* vairošanai ir nepieciešami Mg<sup>2+</sup> un Mn<sup>2+</sup> joni un to klātbūtne substrātā veicina lielāku laktobionskābes iznākumu. Iegūtie rezultāti bija ievērojami mazāki, kādus iegūst no siera sūkalām (Giorgi *et al.*, 2018; Goderska *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2017, 2015; 2013b; 2012a; 2012b; 2011; Miyamoto *et al.*, 2000).

#### **4. Dažādas izcelsmes sūkalu fermentēšanas salīdzinājums kontrolētā un nekontrolētā pH kolbās un bioreaktorā**

Eksperimenta mērķis bija izpētīt baktēriju spēju biezpiena un siera sūkalās oksidēt laktozi laktobionskābē, arī salīdzināt laktobionskābes ieguves iespējas bioreaktorā ar fermentāciju kolbās, kā arī izprast pH pielāgošanas nozīmi.

Izšķīdušā skābekļa saturs (DOT) substrātā bija saistīts ar baktēriju vairošanās fāzi, kā novērots 6. attēla datos. DOT tika noteikts tikai paraugiem bioreaktorā, jo bioreaktors ir aprīkots ar skābekļa elektrodu, bet, fermentējot kolbās, šāda iespēja nebija. Siera sūkalu paraugos (SB1 un SB2) fermentācijas sākumā tika konstatēts ievērojams izšķīdušā skābekļa satura samazinājums, kam sekoja pieaugums līdz piesātinātībai, norādot uz laktozes oksidēšanās procesu.



### 6.att. Izšķīdušā skābekļa saturs siera un biezpiena sūkalu fermentācijas laikā bioreaktorā /

Fig. 6. Time-course graphic of DOT in sweet whey and acid whey during fermentation in a bioreactor

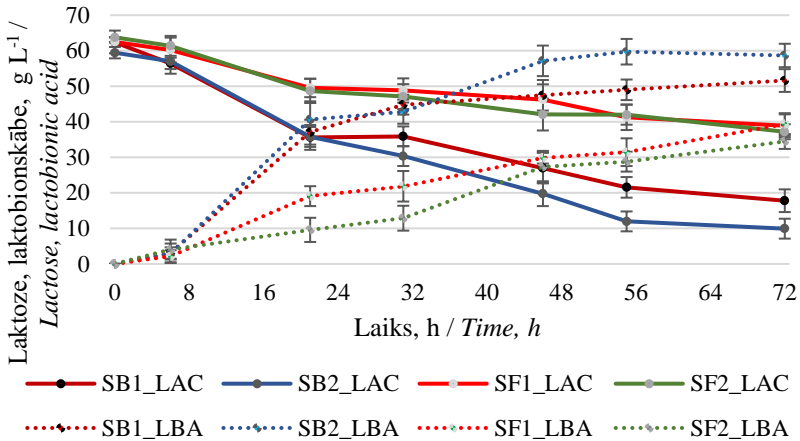
Paraugu apzīmējums / Sample designation: S = siera sūkalu paraugi / sweet whey samples; A = biezpiena sūkalu paraugi / acid whey samples; B = fermentācija bioreaktorā / fermentation in bioreactor. Skaitļu apzīmējumi / The number indications: 1 = pH noteikts tikai fermentācijas sākumā / pH was measured only at the beginning of fermentation; 2 = pH stabilizēts līdz 6.5 fermentācijas laikā / The pH was adjusted during fermentation to 6.5.

Tika noteikta būtiska atšķirība minimālajā DOT, kas sasniegts fermentācijas vidē. Baktēriju vairošanās eksponenciālajā fāzē tika sasniegts minimālais DOT siera sūkalās (sausna 6%) ar regulētu pH 6.5, salīdzinot ar 85% biezpiena sūkalās bez pH pielāgošanas. 6. attēlā ir redzams, ka *Pseudomonas taetrolens* biezpiena sūkalu paraugos (AB1 un AB2) vāji patērēja pieejamo skābekli, jo DOT vērtības bija tuvu piesātinājuma līmenim.

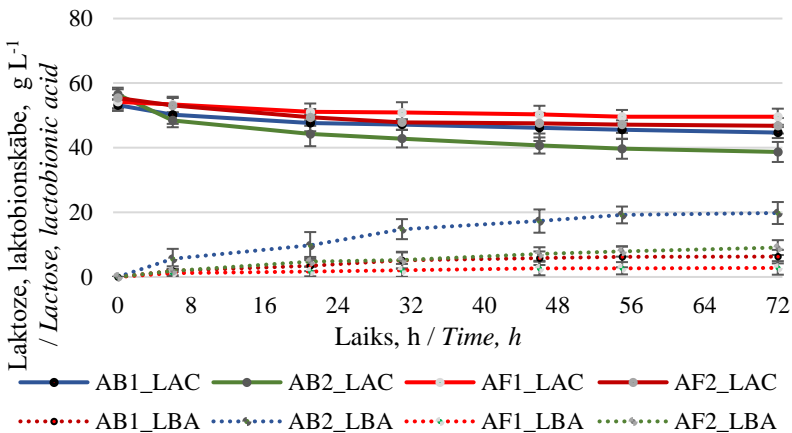
Laktozes oksidēšanās intensitātes atšķirības laktobionskābē starp siera (A) un biezpiena (B) sūkalām ir redzamas 7. attēlā.

Lielākā laktozes konversija laktobionskābē tika sasniegta SB2 paraugā, izmantojot siera sūkalas, bioreaktorā kontrolētā 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 ražošanu. Fermentējot paraugus nekontrolētā vides pH, tas turpina samazināties, radušās laktobionskābes dēļ, un apgrūtina *Pseudomonas taetrolens* augšanu, vienlaicīgi laktozes biokonversiju laktobionskābē. Šī iemesla dēļ fermentācijas laikā pH ir jāuztur aptuveni 6.5, lai nodrošinātu optimālu vidi *Pseudomonas taetrolens* augšanai, laktobionskābes biosintēzei un šūnu metabolismam.

**A**



**B**



7. att. Laktozes (LAC) un laktobionskābes (LBA) satura izmaiņas fermentācijas laikā (A) siera sūkalās, (B) biezpiena sūkalās /

Fig. 7. Time-course graphic of lactose (LAC) and lactobionic acid (LBA) during fermentation in (A) sweet whey, (B) acid whey

Paraugu apzīmējums / Sample designation: S = siera sūkalu paraugi / sweet whey samples; A = biezpiena sūkalu paraugi / acid whey samples; F = fermentācija kolbā / fermentation in shake-flask; B = fermentācija bioreaktorā / fermentation in bioreactor. Skaitļu apzīmējumi / The number indications: 1 = pH noteikts tikai fermentācijas sākumā / pH was measured only at the beginning of fermentation; 2 = pH stabilizēts līdz 6.5 fermentācijas laikā / The pH was adjusted during fermentation to 6.5.

Iegūtās laktobionskābes saturs paraugos bioreaktorā 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) ir apstiprinājuši laktobionskābes iznākumu no 46 līdz 100% siera sūkalās, izmantojot *Pseudomonas taetrolens*.

Pētījumā tika pierādīta pH pielāgošanas nepieciešamība fermentācijas procesā. Šie rezultāti skaidri demonstrē biežpiena sūkalu vājo piemērotību laktobionskābes ieguvei, jo *Pseudomonas taetrolens* nespēj tik labi vairoties tajās, salīdzinot ar siera sūkalām. Lai panāktu efektīvāku laktozes biokonversiju laktobionskābē, izmantojot biežpiena sūkalas, ir nepieciešams izziņāt, kas ietekmē baktēriju vairošanos tajās. Ir nepieciešams izstrādāt jaunu pieeju biežpiena sūkalu fermentācijai, lai iegūtu lielāku iznākumu.

## 5. Dažādas izcelsmes sūkalu kombināciju pārbaude laktobionskābes ieguvei

Eksperimenta mērķis bija vērtēt biežpiena un siera sūkalu kombinācijas, *Pseudomonas taetrolens* vairošanās optimizācijai. Tika gatavoti trīs paraugi, vienā dominēja biežpiena sūkalas, otrā biežpiena un siera sūkalas bija vienādās attiecībās un trešā paraugā dominēja siera sūkalas. Iegūtie laktobionskābes iznākumi ir proporcionāli siera sūkalu īpatsvaram paraugā, jo vairāk siera sūkalu, lielāks laktobionskābes iznākums (skat. 7. tabula).

7. tabula / Table 7

**Laktobionskābes un laktozes saturs paraugos pēc 48 h fermentācijas bioreaktorā 30 °C temperatūrā / Lactobionic acid and lactose concentration after 48 h of the fermentation in a bioreactor at 30 °C**

Parametrs / Parameters	Fermentācijas substrāta sastāvs / Content of fermentation substrate		
	75% biežpiena sūkalas / acid whey : 25% siera sūkalas /sweet whey	50% biežpiena sūkalas / acid whey : 50% siera sūkalas / sweet whey	25% biežpiena sūkalas / acid whey : 75% siera sūkalas / sweet whey
Laktoze / Lactose, g L <sup>-1</sup>	42.01 ± 1.40	34.21 ± 1.30	12.43 ± 1.10
Laktobionskābe / Lactobionic acid, g L <sup>-1</sup>	6.74 ± 1.10	18.86 ± 0.90	39.03 ± 0.90

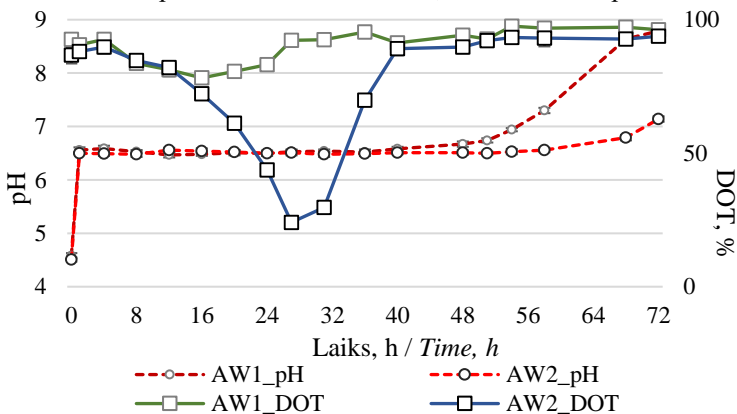
Iegūtie rezultāti apstiprināja, ka biežpiena sūkalu sastāvs kavē laktobionskābes biosintēzi, tāpēc ir nepieciešams noskaidrot cēloņus

nepietiekamai *Pseudomonas taetrolens* vairošanai un laktozes biokonversijai laktobionskābē.

## 6. Laktobionskābes ieguve, atkārtoti pievienojot baktēriju biomasu

Eksperimenta mērķis bija izpētīt baktēriju vairošanās likumsakarības biezpiena sūkalās, pievienojot 10% baktēriju biomasu fermentācijas sākumā (AW1) vai pievienojot 10% baktēriju biomasu fermentācijas sākumā, pēc 12 un 24 fermentācijas stundām (AW2).

pH un izšķīdušā skābekļa (DOT) saturs ja substrātā tika kontrolēts pēc bioreaktora monitorā atspoguļotās informācijas, to dinamika apkopota 8. 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 līdz 6.5 ar 6 M NaOH. 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.

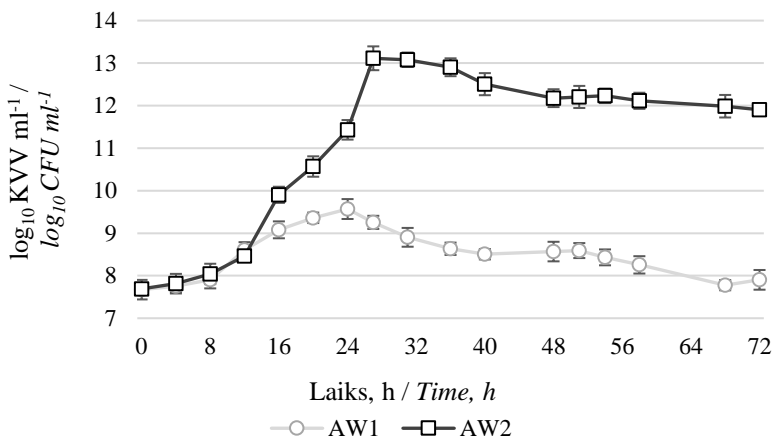


### 8. att. pH un izšķīdušā skābekļa satura izmaiņas substrātos fermentācijas laikā /

Fig. 8. Time-course graphic of pH and DOT in substrates during fermentation  
 Paraugu apzīmējums / Sample designation: AW1 = biezpiena sūkalu paraugam pievienota 10% baktēriju biomasu fermentācijas sākumā / acid whey was inoculated with 10% inoculum at the beginning of the fermentation process; AW2 = biezpiena sūkalu paraugā pievienota 10% baktēriju biomasu fermentācijas sākumā, pēc 12 un 24 fermentācijas stundām/ acid whey was inoculated with 10% inoculum at the beginning and after 12 and 24 hours of 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 oksidēšanās procesā pH samazinās, jo rodas laktobionskābe. Baktēriju atmiršana veicina lielāku slāpekļa savienojumu klātbūtni substrātos, kas izraisa pH palielināšanos. To var skaidrot arī ar *Pseudomonas taetrolens* spēju producēt proteolītiskos enzīmus (Alonso *et al.*, 2011). 8. attēlā var redzēt, ka *Pseudomonas taetrolens* nemaz nepatērē pieejamo skābekli AW1 paraugā, salīdzinot ar AW2 paraugu, jo DOT vērtības ir ļoti tuvu piesātinājuma līmenim. Izšķīdušais skābekļa saturs ir cieši saistīts ar baktēriju vairošanās fāzi (9. attēls). Izšķīdušais skābeklis tiek patērēts, kamēr baktērijas ir eksponenciālajā fāzē. AW2 paraugā tika atkārtoti pievienota baktēriju biomasa, tāpēc arī izšķīdušā skābekļa koncentrācija samazinājās vairāk nekā AW1 paraugam. *Pseudomonas taetrolens* ir aerobas, to vairošanai ir nepieciešams skābeklis, un baktērijām vairojoties, tās vairāk patērē substrātā izšķīdušo skābekli. Skābekļa padevei ir svarīga loma baktēriju metabolītu producēšanā un šūnu augšanā (Lozano *et al.*, 2011). DOT līmenis samazinājās līdz 78.2% AW1 paraugā un līdz 24.1% AW2 paraugā, kas liecina, ka baktērijas AW1 paraugā vairojās labāk, ja baktēriju biomasa tiek pievienota atkārtoti.



### 9. att. *Pseudomonas taetrolens* KVV skaita izmaiņas paraugos, fermentējot substrātu bioreaktorā /

Fig. 9. Time-course profile of *Pseudomonas taetrolens* CFU changes in samples during fermentation in a bioreactor

Paraugu apzīmējums / Sample designation: AW1 = biezpiena sūkalu paraugam pievienota 10% baktēriju biomasa fermentācijas sākumā / acid whey was inoculated with 10% inoculum at the beginning of the fermentation process; AW2 = biezpiena sūkalu paraugā pievienota 10% baktēriju biomasa fermentācijas sākumā, pēc 12 un 24 fermentācijas stundām/ acid whey was inoculated with 10% inoculum at the beginning and after 12 and 24 hours of fermentation

*Pseudomonas taetrolens* vairošanās līkņu atšķirības abiem paraugiem var redzēt 9. attēlā. AW1 paraugā dzīvotspējīgās baktērijas 24 stundās sasniedz maksimumu, t.i.  $3.7 \cdot 10^9$  KVV mL<sup>-1</sup>, bet AW2 paraugā 27 stundu laikā –  $1.3 \cdot 10^{13}$  KVV mL<sup>-1</sup>. Baktēriju augšanas līknes kāpums AW2 paraugam ir

straujāks laikā no 12 līdz 14 h arī no 24 līdz 26 h, laikā, kad biomasa ir atkārtoti pievienota.

Lai analizētu laktobionskābes ieguves procesa efektivitāti, tika noteikti fermentācijas procesu raksturojoši parametri, kas apkopoti 8. tabulā. Tie ievērojami atšķirās 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.

8. tabula / Table 8

**Biezpiena sūkalu fermentācijas procesa raksturojošo parametru kopsavilkums /**

*Summary of values acquired in acid whey fermentation process*

Paraugs / Sample	AW1	AW2
$\mu$ , h <sup>-1</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>b</sup>
$\mu_{max.}$ , h <sup>-1</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>b</sup>
Lag fāzes ilgums / Time of Lag phase, h	16 <sup>a</sup>	14 <sup>b</sup>
WP, g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.02 <sup>b</sup>
qLBA, g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.60 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.03 <sup>b</sup>
Optiskais blīvums / Optical density, 600 nm	2.99 ± 0.02 <sup>a</sup>	6.87 ± 0.09 <sup>b</sup>
<i>Pseudomonas taetrolens</i> , log <sub>10</sub> KVV / CFU mL <sup>-1</sup>	9.57 ± 0.17 <sup>a</sup>	13.14 ± 0.23 <sup>b</sup>
$Y^{X/S}$ , g g <sup>-1</sup>	0.035 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.034 ± 0.004 <sup>a</sup>
WX, g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.010 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.027 ± 0.001 <sup>b</sup>
Šūnu masa / Dry cell weight, g L <sup>-1</sup>	0.56 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.18 <sup>b</sup>
Fermentācijas laiks / Fermentation time, h	72 <sup>a</sup>	48 <sup>b</sup>
LBA koncentrācija / Concentration of LBA, %	29.70 ± 1.60 <sup>a</sup>	99.85 ± 0.10 <sup>b</sup>

$\mu$  – īpatnējais augšanas ātrums / *specific growth rate*;  $\mu_{max}$  – maksimālais īpatnējais augšanas ātrums / *maximum specific growth rate*; qLBA – specifiskais laktobionskābes producēšanas ātrums / *specific lactobionic acid production rate*;  $Y^{X/S}$  – saražotā biomasa attiecībā pret patērēto laktozes saturu fermentācijas laikā / *The amount of biomass produced in relation to the amount of lactose consumed during fermentation*; WX – biomasas produktivitāte fermentācijas laikā / *biomass productivity of the fermentation process*; WP – laktobionskābes saturs tilpuma vienībā fermentācijas laikā / *lactobionic acid productivity of the fermentation process*;

Paraugu apzīmējums / *Sample designation*: AW1 = biezpiena sūkalu paraugam pievienota 10% baktēriju biomasa fermentācijas sākumā / *acid whey was inoculated with 10% inoculum at the beginning of the fermentation process*; AW2 = biezpiena sūkalu paraugā pievienota 10% baktēriju biomasa fermentācijas sākumā, pēc 12 un 24 fermentācijas stundām/ *acid whey was inoculated with 10% inoculum at the beginning and after 12 and 24 hours of fermentation*;

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

Īpatnējais *Pseudomonas taetrolens* augšanas ātrums AW2 ir lielāks nekā AW1 paraugam, sasniedzot maksimālo īpatnējo augšanas ātrumu 0.27 h<sup>-1</sup>. Laktobionskābes un baktēriju biomasas produktivitāte AW2 paraugam bija ievērojami lielāka. Specifiskais laktobionskābes producēšanas ātrums 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

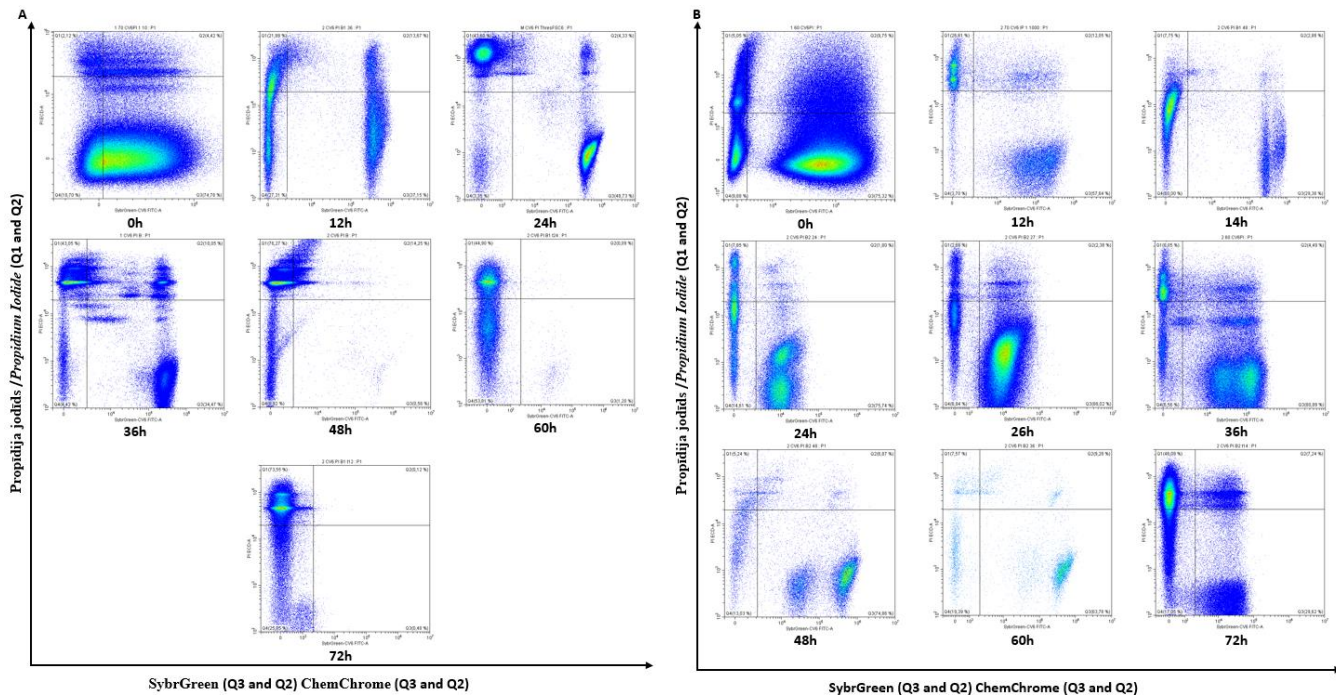
substrātā ir vairāk metaboliski aktīvu baktēriju, tad paraugā būs arī lielāka šūnu masa, optiskais šūnu blīvums un dzīvotspējīgo baktēriju KVV skaits, kas arī pierādījās AW2 parauga rezultātos.

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

*Pseudomonas taetrolens* šūnu funkcionalitāte analizēta ar plūsmas citometriju. Pēc 12 stundu fermentācijas AW1 parauga grafiks (10. attēls (A)) pierāda baktēriju šūnu lielāku propīdija jodīda (PI) uzņemšanas spēju, salīdzinājumā ar AW2 paraugu (10. attēls (B)). Tas apstiprina, ka biezpiena sūkalu vide ietekmē baktēriju membrānas caurlaidību. AW1 paraugā baktēriju populācija bija dzīvotspējīga tikai fermentācijas sākumā, savukārt AW2 paraugā dzīvotspējīgo baktēriju populācija saglabājās līdz pat fermentācijas beigām. 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.

Arī iepriekšējos eksperimentos no biezpiena sūkalām ieguva mazāk nekā 32% laktobionskābes no biokonvertētās laktozes satura. Šis eksperiments pierāda, ka baktērijas vāji pielāgojas biezpiena sūkalu videi, pat nodrošinot vidi ar skābekli un optimālu pH to augšanai. Atkārtoti pievienojot *Pseudomonas taetrolens* biomasu, baktērijas vairojās ātrāk un veiksmīgāk laktozi konvertē laktobionskābē.

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



10. att. *Pseudomonas taetrolens* šūnas (metaboliski aktīvas, bojātas un mirušas) fermentācijas procesā (A) AW1 paraugā un (B) AW2 paraugā / Fig. 10. Dot plots representing *Pseudomonas taetrolens* heterogeneity during fermentation process (A) in sample AW1 (B) in sample AW2.

Paraugu apzīmējums / Sample designation: AW1 = biezpiena sūkalu paraugam pievienota 10% baktēriju biomasa fermentācijas sākumā / acid whey was inoculated with 10% inoculum at the beginning of the fermentation process; AW2 = biezpiena sūkalu paraugā pievienota 10% baktēriju biomasa fermentācijas sākumā, pēc 12 un 24 fermentācijas stundām/ acid whey was inoculated with 10% inoculum at the beginning and after 12 and 24 hours of fermentation

Literatūrā nav atrodami 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, šādā 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 biežpiena sūkalās, kā rezultātā vidē masveidā tiek inhibētas pētāmās baktērijas. Tomēr neliela daļa šūnu lēnām sāk pielāgoties un izdzīvot, kas norāda uz biežpiena 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.

Šī pētījuma rezultāti pierādīja, ka biežpiena sūkalas var izmantot kā substrātu mikrobioloģiskajā fermentācijā un atkārtota baktēriju biomasas pievienošana var uzlabot baktēriju augšanas potenciālu biežpiena sūkalās.

## 7. Attīrīšanas posmā iegūtie produkti

Eksperimenta mērķis bija izdalīt maksimāli tīru laktobionskābi. Tika analizēta laktobionskābes koncentrācija produktā, krāsas intensitāte, pH, šķīdība ūdenī un produkta vizuālais izskats (9. tabula), lai salīdzinātu paraugu atbilstību un tīrību ar komerciālo laktobionskābi (Sigma-Aldrich, ASV).

Iegūtajos paraugos laktobionskābes saturs ir ļoti tuvs komerciālajai laktobionskābei. Laktobionskābes saturs C paraugā ( $95 \pm 2$  %) ir vistuvāk komerciālajai laktobionskābei. B paraugs satur mazāk laktobionskābes nekā citi paraugi, tas varētu būt saistīts ar parauga sīrupveida konsistenci, kas skaidro būtiskās atšķirības ( $p < 0.05$ ) no citiem analizētajiem paraugiem.

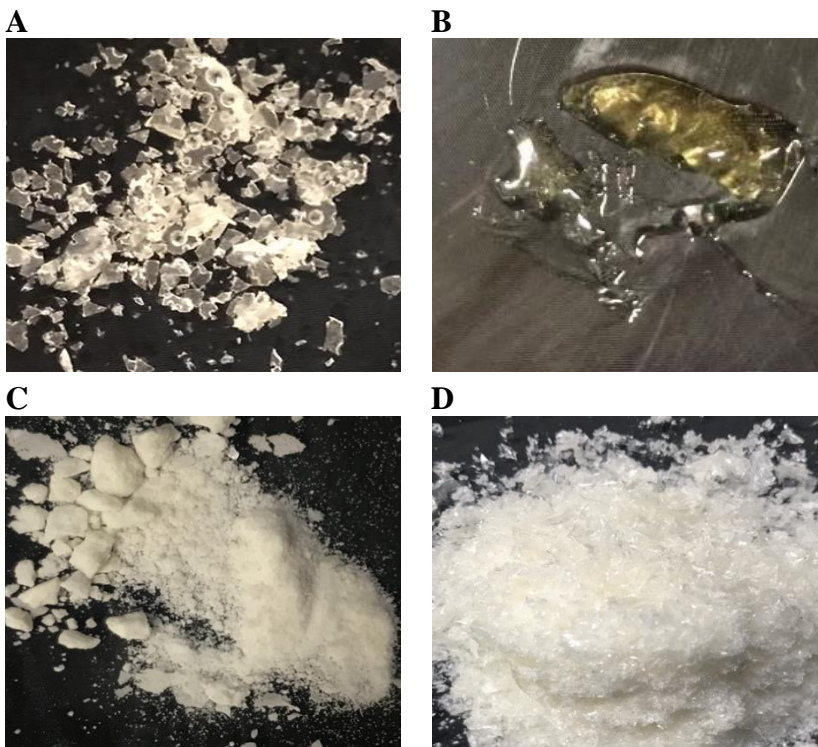
C paraugs ir vistuvāk komerciālajai laktobionskābei pēc pH, lai gan visiem laktobionskābes paraugiem pH būtiski atšķīrās no komerciālās laktobionskābes ( $p < 0.05$ ). Delagustin *et al.*, (2019) norādīja, ka laktobionskābes (iegūta pēc skalošanas ar etilspirtu) un komerciālās laktobionskābes (Sigma-Aldrich)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

## Iegūtās laktobionskābes raksturojums / Description of obtained lactobionic acid

Parauga kods / Sample code	Iegūtā produkta apraksts (vizuāls novērtējums) / Product description (visual assessment)	Neiepakota produkta uzglabāšana telpas temperatūrā (vizuāls novērtējums) / Unpacked product storage in room temperature (visual assessment)	LBA koncentrācija, % / LBA concentration	pH (10% šķīduma / solution)	Produkta šķīdība, laiks, s / Product solubility	Kopējā krāsu intensitātes atšķirība $\Delta E_{ab}$ / Total color intensity difference
A	Gaiši dzeltenas nokrāsas birstošs kristālveidīgs produkts / Light yellow shade, free-flowing crystalline product.	Ļoti higroskopisks, ātri uzņem mitrumu un zaudē birstamību, veidojas sīrupveidīgs produkts / Very hygroscopic, loses its fluidity, absorbs moisture quickly and a syrup-like product is formed.	90 ± 2 <sup>a,c</sup>	3.48 ± 0.08 <sup>a</sup>	31 ± 3 <sup>a</sup>	22.60 ± 0.94 <sup>a</sup>
B	Dzeltenas nokrāsas sīrupveida produkts (vizuāli atgādina medu) / Yellow syrup (visually reminiscent of honey).	Uzglabājot neiepakotu telpas temperatūrā, tas saglabā savu konsistenci / When stored unpacked at room temperature, it retains its consistency	85 ± 3 <sup>a</sup>	4.27 ± 0.12 <sup>b</sup>	118 ± 2 <sup>c</sup>	20.00 ± 1.42 <sup>b</sup>
C	Gaišs, balts birstošs pulverveida produkts / Light, white-colored fluid powder-like product	Uzglabājot neiepakotu telpas temperatūrā, tas saglabā savu konsistenci / When stored unpacked at room temperature, it retains its consistency.	95 ± 2 <sup>b</sup>	3.05 ± 0.09 <sup>c</sup>	109 ± 3 <sup>d</sup>	2.95 ± 0.23 <sup>c</sup>
D	Gaišs, balts, birstošs kristālveidīgs produkts / Light, white colored fluid crystalline product.	Ļoti higroskopisks, ātri uzņem mitrumu un zaudē birstošā produkta konsistenci. Kristāli salīp kopā, veidojot cietu masu / Hygroscopic, absorbs moisture quickly and loses the consistency of the fluid product. The crystals stick together and form a solid mass.	94 ± 2 <sup>b,c</sup>	3.22 ± 0.08 <sup>c</sup>	23 ± 4 <sup>b</sup>	15.97 ± 1.22 <sup>d</sup>
“Sigma-Aldrich”-	Balts, birstošs kristālveidīgs produkts / White-colored fluid crystalline product	Hidroskopiska. Novērojama kristālu salīšana / Hygroscopic. The crystals stick together.	-	2.32 ± 0.01 <sup>d</sup>	31 ± 4 <sup>ab</sup>	-

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 ( $p < 0.05$ );





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

*Fig. 11. Samples of lactobionic acid (A) sample A; (B) sample B; (C) sample C; (D) sample D*

Pēc vizuālā novērtējumā komerciālajai laktobionskābei vistuvākais ir D paraugs, kas iegūts sublimācijā (11. attēls).

A un D paraugiem šķīdība ūdenī ir līdzvērtīga komerciālajai laktobionskābei ( $p > 0.05$ ), savukārt B un C paraugiem bija nepieciešams 3 līdz 4 reizes ilgāks laiks, lai paraugs pilnībā tiktu izšķīdināts ( $p < 0.05$ ). B paraugam ir sīrupveida konsistence, līdz ar to virsma, kura ir saskarsmē ar ūdeni, ir mazāka. Savukārt C paraugs ir blīvāks, līdzīgi kā B paraugam virsmas laukuma saskare ar ūdeni ir mazāka nekā A un D paraugiem. Delagustin *et al.* (2019) pētījumā konstatēts, ka izšķīdinot 1 g laktobionskābes 1 – 10 mL ūdens, to var klasificēt kā pilnībā šķīstošu vielu un saskaņā ar "British Pharmacopeia Commission" (2009) laktobionskābe ir ūdenī viegli šķīstošs savienojums. 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 pierādīja, ka laktobionskābe viegli šķīst ūdenī.

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

Visos laktobionskābes paraugos netika konstatēta olbaltumvielu un laktozes klātbūtne. Minerālvielas, vitamīni, šūnu atliekas, ūdens un citi savienojumi noteikti netika.

Komerציārajai laktobionskābei tika novērota kristālu salipšana pēc 24 h uzglabāšanas telpas temperatūrā (9. tabula). Līdzīga tendence tika novērota A un D paraugiem, savukārt B un C paraugi saglabāja savu struktūru 24 stundu uzglabāšanas laikā. Delagustin *et al.*, (2019) konstatēja, ka laktobionskābes fizikālās īpašības mainās uzglabāšanā, ūdens satura pieauguma dēļ. 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. Bisinella *et al.*, (2017) pētījumā, lietojot rentgenstaru difraktometriju, tika analizēti neiepakotas laktobionskābes paraugi uzglabāšanas laikā. Pētījumā laktobionskābes kristāliskās formas izmaiņas skaidrotas 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 saīsināt produkta uzglabāšanas laiku.

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

## SECINĀJUMI

1. No visām iespējamajām laktobionskābes iegūšanas metodēm, fermentatīvā oksidēšana ļauj izmantot sūkalas laktobionskābes ieguvei.
2. Neapstrādātas biežpiena sūkalas ir mazāk piemērotas laktobionskābes sintēzei, salīdzinot ar siera sūkalām.
3. Ar plūsmas citometrijas, koloniju veidojošo vienību, šūnu optiskā blīvuma un masas analizēm ir pierādīts, ka biežpiena sūkalās *Pseudomonas taetrolens* nespēj efektīvi vairoties zemās to metaboliskās aktivitātes un ātrās šūnu bojāejas dēļ.
4. *Pseudomonas taetrolens* mazo aktivitāti biežpiena sūkalās sekmē  $\text{Na}^+$  jonu klātbūtne, pievienojot NaOH vides neutralizācijai.
5. Biežpiena sūkalas var piemērot laktobionskābes sintēzei, fermentācijas laikā periodiski pievienojot *Pseudomonas taetrolens* biomasu, un sasniegt pilnīgu laktozes biokonversiju laktobionskābē.
6. Pētījums pierādīja vides pH, sausnas satura,  $\text{Mn}^{2+}$  un  $\text{Mg}^{2+}$  jonu klātbūtnes un skābekļa pievades nozīmi, fermentējot biežpiena 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 biežpiena sūkalām, bet tās tīrības un drošības jautājumi ir padziļināti jāpēta.
9. Promocijas darbā izvirzītā hipotēze ir apstiprināta, pētījumā ir pierādīts, ka biežpiena sūkalas var piemērot laktobionskābes ieguvei mikrobiālajā fermentācijā.

## TOPICALITY OF THE RESEARCH

Growing market demand and wide potential of lactobionic acid in various sectors call for the search for opportunities and solutions for the efficient extraction of the substance using low-cost, easily accessible, and recyclable raw materials.

Commercial lactobionic acid is produced by chemical synthesis, which requires precious metal catalysts and large energy resources. Of all lactobionic acid production methods, only enzymatic oxidation advantages to use cheaper raw materials, such as whey. Usage of *Pseudomonas taetrolens* for the production of lactobionic acid is of the greatest interest by considering the advantages and disadvantages of the lactobionic acid production methods, because *Pseudomonas taetrolens* metabolites 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, electro dialysis, precipitation with ethanol, etc.) are used to extract pure lactobionic acid from the fermented substrate.

Today, manufacturers are focusing more on the extraction of whey protein and its application in the production of functional foods. The major compound of whey dry matter, namely lactose, is not fully utilised. Scientists and manufacturers are looking for ways to use whey ingredients to make high-value products. The use of acid whey in the production of various products has so far not been identified as effective due to the high acidity of the substrate, the organic acids, and the high content of 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 by *Pseudomonas taetrolens* usage to convert lactose into lactobionic acid.

Technological solutions for the production of lactobionic acid have not been sufficiently studied, thus opening up a wide scientific area for research and new insights in this field.

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

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

The following research tasks were set to achieve the aim of the doctoral thesis:

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 **novelty** of the thesis:

- For the first time in Latvia, research has been carried out on the production of lactobionic acid in microbial fermentation using acid whey, and achieving complete bioconversion of lactose into lactobionic acid.
- The suitability of acid whey for the oxidation of lactose in lactobionic acid with *Pseudomonas taetrolens* has been evaluated.
- Experimental data on lactobionic acid purification methods and their effectiveness make it possible to meet the purity criteria for the substance.

The **economic significance** of the thesis:

- The technology developed in the research is able to be adjusted in production;
- A solution has been found for the use of acid whey in the production of value-added products.

The study has been financially supported by 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”.

## **APPROBATION OF THE RESEARCH**

**The research results have been summarised and published** in 6 scientific articles, including 4 publications indexed in the international citation databases SCOPUS and Web of Science (see the list on page 6).

**The results of the research work have been presented at** 7 international scientific conferences in Latvia, Estonia, Spain, and France, as well as at the international food industry fair “Riga Food” in 2020 (see the list on page 7).

## MATERIALS AND METHODS

### Time and place of the research

The study has been carried out 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, Nutrition laboratory, and the Scientific laboratory of chemistry of natural substances. Also, research has been done in the laboratories of Scientific and Technological Resources in 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).

### Characteristics of materials

The object of the study was:

- 1) *Pseudomonas taetrolens*, stored in glass ampoules lyophilised in 40% glycerol, storage conditions at -20 °C. Bacteria are light in colour with a yellow tinge. Optimal growth temperature 30 °C, strains used for research:
  - ✓ LMG 2336 (the Belgian Coordinated Collection of Microorganisms, Belgium);
  - ✓ NCIB 9396 (National Collection of Type Cultures, England);
  - ✓ DSM 21104 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany).
- 2) Whey (stored -20 °C), see Table 1.

### Research structure

The research was performed in two stages:

- Fermentation of lactose to lactobionic acid;
- Lactobionic acid purification and recovery.

The lactobionic acid extraction process begins with whey processing (Fig. 1). The whey is heated at 90 – 95 °C for 30 minutes, promoting the denaturation of the whey protein. Whey proteins are separated by filtration. The clarified whey is filtered through a filter paper (pore size ~ 2 µm) and a microfiltration device equipped with a 0.22 µm pore polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Massachusetts, USA) to obtain clarified whey and to remove bacteria and other insoluble impurities. The clarified whey is filled in a sterile glass container to avoid external contamination and to obtain a clear substrate.

Preparation of *Pseudomonas taetrolens* strains for inoculation is shown in Fig. 2. Bacteria are inoculated before the experiment so that the bacterial biomass is fresh and active during the experiment. All preparation processes are performed with sterile substances and materials sterilised in an autoclave at 121 °C for 20 minutes. As well, preparation of samples (whey, bacteria) for

fermentation is performed in a sterile environment – a laminar flow box, so that other microorganisms do not enter the samples. The bacteria are inoculated into the nutrient broth medium (composition 20 g L<sup>-1</sup> biological agar, 5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 5 g L<sup>-1</sup> peptone, 2 g L<sup>-1</sup> yeast, and 1 g L<sup>-1</sup> meat extract) with a loop. The agar plates are incubated at 30 °C for 48 h.

After incubation from the agar plate with a loop (10 µL volume), the bacteria are transferred to a 500 mL flask containing 100 mL of liquid NB medium (5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 5 g L<sup>-1</sup> peptone, 2 g L<sup>-1</sup> yeast, and 1 g L<sup>-1</sup> meat extract).

The medium is incubated on an orbital shaker (New Brunswick Sci., NJ, USA or ES-20, Biosan, Latvia) at 30 °C for 10-16 h with a sample mixing intensity of 220 – 350 min<sup>-1</sup>. After incubation, the substrate is poured into sterile conical flasks and centrifuged at 10 000 min<sup>-1</sup> for 10 min to settle the grown cells of *Pseudomonas taetrolensis*.

The separated bacteria are added to the clarified whey. If concentrated whey is used in the experiment, whey is evaporated in a Rising Film evaporator FT22 (Armfield, England). Prior to the fermentation process, the whey composition is analysed by MilcoScan™ Mars (Foss, Denmark) or high-performance liquid chromatography.

Samples prepared for the experiment are fermented in flasks using an orbital shaker or in a Bio Flo 110 (New Brunswick Scientific, NJ, USA) bioreactor.

A more detailed description of the experiment performed in the study is summarised in Table 2.

After the fermentation process in the flasks, the samples were not subjected to purification or recovery steps of lactobionic acid due to insufficient sample size to be analysed. After the fermentation process in the bioreactors (Table 2; f series), the samples were purified by centrifugation, filtration through filter paper and absorption of minerals on activated carbon, microfiltration (0.45 µm pore size) to obtain a light, transparent product (Fig. 3 and Table 3).

Several methods are used to isolate lactobionic acid: freeze-drying, precipitation with 96% ethanol, and drying of the samples.

An evaporated sample (~ 40% dry matter content) is used for freeze-drying. The sample is filled around 100 – 200 mL in 500 mL flasks. The flasks were stored in a freezer (-18 °C, 24 hours for complete freezing). The sample in the flasks was dried under vacuum at -65 °C until dry, free-flowing crystals were obtained with freeze-drying (Telstar Cryodos - 80, Model 2007, Spain).

The drying process was used for further processing of the micro-filtered sample and also for evaporated sample. Both samples were dried in a thin layer in a thermostat at 40 °C.

A concentrated whey (~ 40% total solid content) was used for precipitation with ethanol. Ethanol is added to the concentrated sample and stirred to crystallise the lactobionic acid in the sample. After precipitation, the sample is



centrifuged at  $10\,000\text{ min}^{-1}$  for 10 min to separate crystals of lactobionic acid. The suspension is discarded and the crystals are dried at  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

The parameters listed in Table 4 were analysed and controlled during the research.

### **Methods of analysis performed in the research**

The analytical methods used in the study are summarised in Table 5.

### **Data analysis**

In the research part of the work, figures and tables were created and calculations were performed using MS Excel for Windows 2010 software. Analysis of variance (ANOVA), t-test were used for the data interpretation with a significance level ( $p < 0.05$ ). Acquisition and analysis of HPLC data were processed using ChemStation (Agilent) software, while flow cytometry data were processed using CytExpert software (Beckman Coulter)

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **1. Effect of pH on lactobionic acid production**

The aim of the experiment was to determine the optimal pH of acid whey at which *Pseudomonas taetrolens* NCIB 9396 and DSM 21104 can grow.

The highest result was shown by sample 4N with obtained  $58.47 \pm 2.03\text{ g L}^{-1}$  lactobionic acid, followed by sample 4D with obtained  $53.67 \pm 1.02\text{ g L}^{-1}$  lactobionic acid. The lowest results were determined for samples 0N –  $23.97 \pm 1.83\text{ g L}^{-1}$  and 0D –  $34.66 \pm 1.82\text{ g L}^{-1}$ . The results showed that *Pseudomonas taetrolens* was more efficient in converting lactose into lactobionic acid at pH 6.5 in acid whey. An experiment on the effect of pH on lactobionic acid production showed that *Pseudomonas taetrolens* is able to convert lactose into lactobionic acid in acid whey. It is necessary to adjust the pH of the substrate to around 6.5 and recommended to adjust pH during the fermentation. The acidic environment inhibits the ability of *Pseudomonas taetrolens* to convert lactose into lactobionic acid. The low pH of the acid whey could be the reason why higher results for lactobionic acid are not achieved, as it is in the studies using sweet whey.

### **2. Effect of whey solids on lactobionic acid production**

The aim of the experiment was to investigate the effect of acid whey solids on the *Pseudomonas taetrolens* NCIB 9396 and DSM 21104 growth and on the oxidation of lactose into lactobionic acid. The highest yields of lactobionic acid were obtained in samples N5%, D5%, N10%, D10%, N20%, and D20%

(see Table 6). No significant differences ( $p>0.05$ ) were found in the lactobionic acid concentration between these samples.

The obtained results showed that if the total solids of the samples were 5%, 10%, and 20%, there was no significant difference in the yield of lactobionic acid. If the total solids exceed 20%, a decrease of lactobionic acid yield was observed.

The results showed that the yield of lactobionic acid was lower in the samples with total solids of more than 20%. Mijamoto *et al.* (2000) found that the production rate of lactobionic acid was higher in samples with 150 than with 200 g of L<sup>-1</sup> lactose. Murakami *et al.* (2003) concluded that the high solid content in whey may reduce the rate of lactose absorption in the cell membranes, and high solid content in the substrate may also lead to the inactivation of enzymes produced by microorganisms.

### **3. Effect of different salts on lactobionic acid production**

The aim of the experiment was to investigate whether the addition of inorganic salts (nutrients for bacterial growth) to acid whey should improve bacterial growth and lactose conversion into lactobionic acid.

No significant differences were found ( $p>0.05$ ) between N-control and NMg3, NMn2, NMn3, NK1, NK2, NK3 samples (Fig. 5 A) and between D-control and DMg2, DMg3, DMn2, DMn3, DK1, DK2, DK3 samples (Fig. 5 B). In turn, there were significant differences between N-control and NMg1, NMg2, NMn1 samples ( $p<0.05$ ) and also between D-control, DMg1, and DMn1 samples ( $p<0.05$ ).

In turn, there was a significant difference because the presence of Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> ions has a positive effect on the growth of *Pseudomonas taetrolens*, which promotes the oxidation of lactose into lactobionic acid. The presence of K<sup>+</sup> ions did not affect the bioconversion of lactobionic acid.

There are no found studies in the scientific literature on the effects of salts on the activity of *Pseudomonas taetrolens*. It is reported that the lack of Mg<sup>2+</sup> ions in the substrate can lead to the formation of a fibrous bacterial structure, inhibiting cell division and growth. The growth of bacteria in the presence of Mg<sup>2+</sup> ions can be explained by the finding that magnesium has an effect on the metabolism of cells and their division. Mg<sup>2+</sup> ions also stabilise nucleic acids (DNA and RNA) and participate in peptide hydrolysis. Mn<sup>2+</sup> ions are required for the functions of enzymes produced by bacteria. Mn<sup>2+</sup> ions are involved in RNA polymerase activity, inducing the activity of lactase, xylose isomerase, manganese catalase, manganese superoxide dismutase, and NADH oxidase. Manganese ions can also increase the pH range of enzyme activity (Gunsalus & Stanier, 2013).

The study has confirmed that  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  ions are required for the growth of *Pseudomonas taetrolens* and their presence in the substrate contributes to a higher yield of lactobionic acid. The results obtained, despite the addition of salts, still did not achieve the same results 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)

#### **4. Comparison of different whey fermentation at controlled and uncontrolled pH in flasks and bioreactor**

The aim of the experiment was to study the ability of bacteria to oxidise lactose into lactobionic acid in acid whey compared to sweet whey; also to compare the possibilities of lactobionic acid production in a bioreactor with fermentation in shake-flasks, as well as to understand the importance of pH adjustment.

Dissolved oxygen tension (DOT) in the substrate was related to the bacterial growth phase as observed in Fig. 6. DOT was determined only for samples in the bioreactor, as the bioreactor is equipped with an oxygen electrode, but DOT was not determined in shake-flasks fermentation. In the sweet whey samples (SB1 and SB2), a significant decrease in the dissolved oxygen concentration was observed at the beginning of the fermentation, followed by an increase to saturation, indicating a process of lactose oxidation.

A significant difference in the minimum DOT was achieved in the fermentation substrate. In the exponential phase of bacterial growth, a minimum DOT of 6% was achieved in sweet whey with pH 6.5 adjusted, compared to 85% in acid whey without pH adjustment. *Pseudomonas taetrolens* in acid whey samples (AB1 and AB2) poorly consumed the available oxygen because the DOT values were close to saturation level.

Oxidation intensity of lactose into lactobionic acid in sweet whey (A) and acid whey (B) are shown in Fig. 7.

The highest conversion of lactose into lactobionic acid was achieved in the SB2 sample using sweet whey in the bioreactor and with controlled pH. Significant differences were found between samples of the fermentations of acid whey and sweet whey. The yield of lactobionic acid was significantly lower in the acid whey samples. Significant differences were found also in the lactobionic acid yield between samples fermented in the bioreactor and shake-flasks. Better results were obtained by the fermentation in the bioreactor because the input of oxygen promoted the growth of bacteria and the production of lactobionic acid.

Fermentation of the samples with uncontrolled pH of the substrate continues to decrease in pH due to the lactobionic acid formed and inhibits the growth of *Pseudomonas taetrolens*. Thus, the pH should be maintained at approximately 6.5 during fermentation to provide an optimal medium for *Pseudomonas*

*taetrolens* growth, lactobionic acid biosynthesis, and also for the metabolism of the cells.

The results showed that the concentration of lactobionic acid in the bioreactor samples was as follows: 72.05% SB1, 91.24% SB2, 8.98% AB1, 31.24% AB2, moreover, significant differences were found between these samples ( $p < 0.05$ ). Higher lactobionic acid concentration was obtained in the sweet whey samples, but lactose was not effectively oxidised in the acid whey samples.

The results of studies by other scientists (Alonso *et al.*, 2012a, 2012b, 2013a, 2017; Giorgi *et al.*, 2018) have confirmed the concentration of lactobionic acid from 46 to 100% in sweet whey by using *Pseudomonas taetrolens*.

The study confirmed the importance of oxygen for the fermentation process and the production of the final product. The importance of pH stabilisation in the fermentation process was demonstrated. These results clearly demonstrate the unsuitability 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. In order to achieve a more efficient bioconversion of lactose into lactobionic acid using acid whey, the issues affecting the growth of bacteria in acid whey should be further investigated. A new approach to acid whey fermentation should achieve higher lactobionic acid yields.

## **5. Comparison of different whey for lactobionic acid production**

The aim of the experiment was to determine the possibility of a combination of acid and sweet whey to optimise the growth of *Pseudomonas taetrolens*. Three samples were prepared, one with predominantly acid whey, the other, acid and sweet whey were in equal proportions, and the third sample was dominated by sweet whey. The lactobionic acid yield obtained is proportional to the amount of sweet whey in the sample, the sweeter the whey, the higher lactobionic acid yield (Table 7).

The results confirmed that the presence of acid whey inhibits lactobionic acid production, so in-depth studies with acid whey should be analysed for the causes of insufficient growth of *Pseudomonas taetrolens* and bioconversion of lactose into lactobionic acid.

## **6. Production of lactobionic acid by re-addition of bacteria biomass**

The aim of the experiment was to study the regularities of bacterial growth in acid whey by adding 10% bacterial biomass at the beginning of the fermentation process (AW1) or by adding 10% bacterial biomass at the beginning of the fermentation process, after 12 and 24 hours of fermentation (AW2).

The pH and dissolved oxygen tension (DOT) of the substrate were controlled according to the information displayed on the bioreactor monitor, result dynamics are summarised in Fig. 8. This is necessary to have successful growth efficiency of *Pseudomonas taetrolens*. Based on these parameters, the activity of bacteria growth in the substrate can be approximately determined. Both samples' pH was 4.57 during the first fermentation minutes until the pH was adjusted to 6.5 with 6 M NaOH. The results showed that the pH increased during the fermentation process (after 40 hours for the AW1 and after 58 hours for the AW2 sample), but during the rest of the process it was maintained at pH 6.5 to obtain optimal bacterial growth dynamics. The pH was no longer controlled when it exceeded 6.5.

After 40 h of fermentation, significant differences were observed in pH values between both samples ( $p < 0.05$ ). At the end of the fermentation, the pH reached 8.76 in AW1 and 7.14 in AW2 samples. During the oxidation of lactose, the pH decreases due to the production of lactobionic acid. The presence of higher nitrogen compounds in substrates contributes to bacterial death, which causes an increase in pH. This can also be explained by the *Pseudomonas taetrolens*' ability to produce proteolytic enzymes (Alonso *et al.*, 2011). *Pseudomonas taetrolens* did not consume any available oxygen in the AW1 sample compared to the AW2 sample, because the DOT values are very close to the saturation level (Fig. 8). The dissolved oxygen tension is closely related to the bacterial growth phase (Fig. 9). Dissolved oxygen is consumed while the bacteria are in the exponential phase. Bacterial biomass was re-added to the AW2 sample, so the dissolved oxygen tension also decreased more than in the AW1 sample. *Pseudomonas taetrolens* is aerobic, and requires oxygen to multiply, and as bacteria multiply, they consume more dissolved oxygen in the substrate. Oxygen supply plays an important role in the production of bacterial metabolites and cell growth (Lozano *et al.*, 2011).

The DOT level decreased to 78.2% in the AW1 sample and to 24.1% in the AW2 sample, suggesting that bacteria in the AW1 sample multiplied better when the bacterial biomass was re-added again.

The differences in the *Pseudomonas taetrolens* growth in both samples can be observed in Fig. 9. Viable bacteria reach a maximum within 24 hours in the AW1 sample  $3.7 * 10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>, but in the AW2 sample within 27 hours  $1.3 * 10^{13}$  CFU mL<sup>-1</sup>. The increase of the bacterial growth curve for the AW2 sample is faster between 12 and 14 h and between 24 and 26 h when the biomass was re-added.

All parameters were significantly different for AW2 and AW1 samples, except for  $Y_{X/S}$ , which was the same for both samples ( $p < 0.05$ ).  $Y_{X/S}$  indicates how much bacterial biomass is consumed per gram of biosynthesised lactobionic acid.

The specific growth rate of *Pseudomonas taetrolens* for sample AW2 is higher than for sample AW1, reaching a maximum specific growth rate of

0.27 h<sup>-1</sup> for sample AW2, while for sample AW1 it is only 0.08 h<sup>-1</sup>. The productivity of lactobionic acid and bacterial biomass was significantly higher for the AW2 sample. The specific production rate of lactobionic acid shows how much lactobionic acid can be obtained from 1 g of bacterial biomass per hour. The obtained results were close, but a higher value was determined for the sample AW2. It confirms that the AW2 sample contained more metabolically active bacteria than the AW1 sample. If there are more metabolically active bacteria in the substrate, then the sample will also have a higher dry cell weight, optical cell density, and CFU of viable bacteria, which was also shown in the AW2 sample.

The growth of *Pseudomonas taetrolens* in acid whey is limited, the oxidation process of lactose is slow, so the re-addition of bacterial biomass helps to achieve the same results as it is in other studies (Alonso *et al.*, 2017;2015; 2013b; 2012a; 2012b; 2011; Giorgi *et al.*, 2018; Goderska *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2000) using sweet whey.

The functionality of *Pseudomonas taetrolens* cells was analysed by flow cytometry. After 12 hours of fermentation, the graph of sample AW1 (Fig. 10 A) shows a higher PI (Propidium iodide) uptake capacity of bacterial cells compared to sample AW2 (Fig. 10 B), confirming that the acid whey environment affects the permeability of the bacterial cell membrane. In sample AW1, the bacterial population was only viable at the beginning of fermentation, while in sample AW2, the population of viable bacteria remained until the end of fermentation, as additional bacterial biomass was added to the sample after 12 and 24 hours of fermentation. Interestingly, in both samples, the number of damaged cells (cells whose survival is threatened) is small compared to viable and dead cells, suggesting that bacteria in whey are rapidly dying.

In previous experiments with acid whey, less than 32% of the lactobionic acid yield was obtained, thus this experiment proves that the bacteria are unable to adapt and grow in the acid whey, even providing a substrate with oxygen and optimal pH for bacterial growth. By re-adding *Pseudomonas taetrolens* biomass, the bacteria multiplied faster and lactose biosynthesis into lactobionic acid is successful.

When analysing the growth of *Pseudomonas taetrolens* in acid whey, it is assumed that the growth is influenced by Na<sup>+</sup> ions. The pH of the acid whey is low; to be adjusted to 6.5, 6 M NaOH is added. As a result, acid whey sample contains more Na<sup>+</sup> than sweet whey sample. Studies have been shown to inhibit the growth of gram-negative (including *Pseudomonas taetrolens*) bacteria in the presence of Na<sup>+</sup> and/or Cl<sup>-</sup> ions. As a result, the bacterial cell shell readily transports these ions into the cell, and the osmotic pressure in the cell changes, affecting cell viability. Scientists have found that the activity of *Pseudomonas aeruginosa* JCM5962 (T) and other enzymes of the *Pseudomonas* spp. (lipase and collagenase) decreases when the medium is high Na<sup>+</sup> ions concentration (Sachan *et al.*, 2017; Gautam & Azmi 2017; Matula & Macleod 1969).

There are no scientifically based data on *Pseudomonas taetrolens* in the literature, but information on *Pseudomonas aeruginosa* strains is available. It has been studied that the cells of these bacteria are inhibited by a high concentration of sea salt in a medium, but over time they are able to adapt in the medium, being able to survive for several years. Such adaptation is considered phenotypic rather than genetic (Elabed *et al.*, 2019). This adaptability could also be compared to the growth of *Pseudomonas taetrolens* in acid whey, resulting in mass inhibition of the bacteria under study in such a substrate. However, a small proportion of the cells slowly begin to adapt and survive, indicating the potential of acid whey to produce lactobionic acid. By adding additional bacterial biomass, to which some bacteria have already adapted, they find synergies with each other, adapt to the substrate, and continue to multiply, promoting the bioconversion of lactose into lactobionic acid.

The results of this study showed that acid whey can be used as a substrate for microbiological fermentation and repeated addition of bacterial biomass can improve the growth potential of bacteria in acid whey.

## **7. Products obtained after purification**

The aim of the experiment was to extract maximally pure lactobionic acid from the fermentation substrate. The concentration of lactobionic acid in the product, colour intensity, pH, water solubility and visual appearance of the product was analysed (Table 9) to compare the suitability and purity of the samples with commercial lactobionic acid from Sigma-Aldrich.

The concentration of lactobionic acid in the samples obtained is very close to that of commercial lactobionic acid (Sigma-Aldrich indicates that their product contains >97% lactobionic acid). The concentration of lactobionic acid in sample C ( $95 \pm 2\%$ ) corresponds to commercial lactobionic acid. Sample B contains less lactobionic acid than other samples, it could be related to the consistency of the sample as syrup, the concentration of lactobionic acid differs significantly ( $p < 0.05$ ) from the other analysed samples.

In terms of pH, sample C is closest to the commercial pH of lactobionic acid, although the pH of all lactobionic acid samples differed significantly from that of commercial lactobionic acid ( $p < 0.05$ ). Delagustin *et al.*, (2019) reported that the pH of lactobionic acid (obtained after precipitation with ethanol) and commercial lactobionic acid (also Sigma-Aldrich) remained around 2.5. Similar results were published by Carra (2012), who found that the pH of the freeze-dried lactobionic acid product was 2.96 and that of the commercial lactobionic acid (Sigma-Aldrich) was 3.04. Cardoso *et al.*, (2019) reported that the pH of lactobionic acid was 2.37 (10% solution). Sample B has the highest pH among all samples ( $p < 0.05$ ), the main reason could be the higher water content in this sample.

By visual assessment, the closest to commercial lactobionic acid is sample D obtained by freeze-drying (Fig. 11).

Samples A and D have the same solubility in water as commercial lactobionic acid ( $p > 0.05$ ), while samples B and C took 3 to 4 times longer to dissolve completely in water ( $p < 0.05$ ). Sample B has a syrup-like consistency so that the surface in contact with water is smaller. Sample C, on the other hand, is denser and, like sample B, has less contact with the surface area with water than samples A and D. Delagustin *et al.*, (2019) found that 1 g of lactobionic acid is dissolved in 1 to 10 mL of water, classifying lactobionic acid as a completely soluble substance and a readily water-soluble compound according to the British Pharmacopeia Commission (2009). Cardoso *et al.*, (2019) have reported that the water solubility of lactobionic acid is 10 g per 100 mL<sup>-1</sup>. Lactobionic acid is poorly soluble in organic solvents such as methanol, ethanol, and glacial acetic acid (Gutierrez *et al.*, 2015; Cardosos *et al.*, 2019). All samples obtained showed that lactobionic acid was readily soluble in water.

All samples of lactobionic acid were in crystalline form, except for sample B. The consistency of sample B was obtained by a crystallisation method in which the sample was firstly evaporated and then dried so that the layer of the sample was thick and the surface to be evaporated was small compared with sample A, which was dried in the liquid state. Wilkinson *et al.*, (2018) have also confirmed that syrup-like and gel products dry longer than liquid products.

Protein and lactose were not detected in all lactobionic acid samples. The remaining components in the lactobionic acid samples could be minerals, vitamins, cell debris, water, and other compounds, but no further analysis was performed to determine these compounds.

For commercial lactobionic acid, structural changes were observed after 24 h of storage at room temperature (Table 7). The crystals of lactobionic acid are hygroscopic and crystallisation was observed. A similar trend was observed for samples A and D, while samples B and C retained their structure during 24 hours of storage. Delagustin *et al.*, (2019) found that the physical properties of lactobionic acid changed from powdered to gel after 6 months of storage, resulting in an increase in water content of approximately 12%. In addition, water retention is associated with the hygroscopic nature of lactobionic acid (Yu & Van Scott, 2004). Shendurse & Khedkar, (2016) have also emphasised that lactobionic acid is a hygroscopic compound and can form a gel by binding water from the environment. X-ray diffractometry was used in a study by Bisinella *et al.*, (2017), which analysed samples of lactobionic acid stored unpacked. This contributed to the change in the crystalline form of lactobionic acid, which was explained by the hygroscopicity of lactobionic acid. Cardoso *et al.*, (2019) reported that the water content of lactobionic acid must be up to 4.68% to qualify as a powdered substance. Higher water content can create a gel-like structure and shorten the shelf life of the product.



Samples would need to be further purified from minerals, vitamins and other trace elements in order to compete with the purity and safety criteria for chemically synthesised lactobionic acid and to be safe for use in the food industry.

## 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  $\text{Na}^+$  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  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  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.

Mg.sc.ing. Inga Šarenkova

e-pasts / *e-mail*: inga.sarenkova@inbox.lv

Latvijas Lauksaimniecības universitāte / *Latvia University of Life Sciences and Technologies*

Pārtikas tehnoloģijas fakultāte / *Faculty of Food Technology*

Rīgas iela 22a, Jelgava, LV-3004, Latvija / *Rigas Street 22a, Jelgava, LV-3004, Latvia*