

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**FERMENTĀCIJAS APSTĀKĻU OPTIMIZĀCIJA INULĪNA  
KONVERSIJAI BIOETANOLĀ, IZMANTOJOT RAUGU  
*KLUYVEROMYCES MARXIANUS***

Bakalaura darbs

Autors: Arta Priede

Stud. apl. Nr. ap12122

Darba vadītājs: Mag. biol. Jekaterīna Lukjaņenko

RĪGA 2015

## SATURA RĀDĪTĀJS

KOPSAVILKUMS .....	3
SUMMARY .....	4
IEVADS .....	5
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	6
1.1. Bioetanolis un tā ražošanas pamatprincipi.....	6
1.2. Etanola fermentācijai nepieciešamie apstākļi .....	8
1.3. Etanola fermentācijai izmantojamie mikroorganismi.....	9
1.4. Rauga <i>Kluyveromyces marxianus</i> raksturojums .....	11
1.5. Izejvielas etanola fermentācijai.....	12
1.6. Inulīns .....	14
1.7. Inulināze.....	15
2. MATERIĀLI UN METODEDES .....	17
2.1. Materiāli.....	17
2.2. Metodes.....	21
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	24
3.1. <i>Kluyveromyces marxianus</i> celmu DSM 5422 un DSM 5418 biomasas un etanola iznākumu salīdzinājums.....	24
3.2. Temperatūras un aerācijas ietekme uz bioetanola un biomasas veidošanos <i>K.</i> <i>marxianus</i> DSM 5422.....	26
3.3. Substrāta koncentrācijas un fermentācijas temperatūras ietekme uz bioetanola un biomasas veidošanos <i>K. marxianus</i> DSM 5422.....	31
SECINĀJUMI .....	38
PATEICĪBAS .....	39
LITERATŪRAS SARAKSTS .....	40

## KOPSAVILKUMS

Darba mērķis bija apskatīt dažādu fermentācijas apstākļu ietekmi uz inulīna konversiju bioetanolā ar raugu *Kluyveromyces marxianus*. Pētījumā tika salīdzināti divi *K.marxianus* celmi DSM 5418 un DSM 5422. Celms *K. marxianus* DSM 5422 uzrādīja labākus augšanas un etanola produktivitātes rādītājus inulīnu saturošās barotnēs. Tika veikti daudzfaktoru eksperimenti, kuros aplūkota fermentācijas temperatūras, substrāta koncentrācijas un aerācijas ietekme uz etanola un biomasas biosintēzes rādītājiem inulīna barotnēs. Novērtēta minēto faktoru savstarpējā iedarbība. Konstatēts, ka visoptimālākie apstākļi etanola producēšanai no inulīna ar *K.marxianus* DSM 5422 ir pie 30°C temperatūras, 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> aerācijas un inulīna barotnes koncentrācijas 150 g/l.

Šī darba veikšanai tika apgūtas sekojošas eksperimentālās metodes: kopējo cukuru noteikšana, glikozes un fruktozes noteikšana enzimatiski, *K.marxianus* kultivēšana, fermentācija un paraugu sagatavošana etanola noteikšanai ar HPLC.

Pētījumi tika veikti LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā, Ogļhidrātu biokonversijas laboratorijā, laika posmā no 2014.gada septembra līdz 2015.gada februārim.

Atslēgvārdi: inulīns, topinambūrs, *Kluyveromyces marxianus*, fermentācija, bioetanol, raugs, biomasa

## SUMMARY

The task of this work was to observe influence of different fermentation parameters on inulin conversion to bioethanol by yeast *Kluyveromyces marxianus*. Two *K. marxianus* strains DSM 5418 and DSM 5422 were investigated. Best growth and ethanol production parameters were obtained by *K. marxianus* DSM 5422. Fermentation temperature's, substrate concentration's and aeration's influence on ethanol and biomass production parameters on inulin substrates using multifactorial experiments were observed. Manted factors interection was estimated. It was observed that most optimal fermentation temperature for *K. marxianus* DSM 5422 is 30° C, aeration rate is 0.2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> and inulin concentration in medium is 150 g/l.

During the work, the folowing experimental methods were mastered: total sugar determination, glucose and fructose enzymatic determination, *K.marxianus* cultivation, fermentation and sample preparation for ethanol determination with HPLC.

Researches were done in the University of Latvia, Institute of Microbiology and Biotechnology, Carbohydrate bioconversion laboratory, in period of time from September 2014 to February 2015.

Keywords: inulin, Jerusaleme artichoke, *Kluyveromyces marxianus*, fermentation, bioethanol, biomass

## IEVADS

Etanols ir plaši izmantots izejmateriāls gan pārtikas ražošanā, gan rūpniecībā. Pārtikas ražošanā etanolu galvenokārt izmanto alkoholisko dzērienu gatavošanai, savukārt rūpniecībā etanolu izmanto biodegvielas ražošanai u.c.

Mūsdienās ir aktuālas problēmas, kas saistītas ar vides piesārņojumu, kā arī neatjaunojamo resursu izsīkums. Kā viens no neatjaunojamiem resursiem ir nafta. Naftas produktus – benzīnu un dīzeļdegvielu var aizstāt ar dažādām alternatīvām, piemēram, biodīzeli un bioetanolu. Sabiedrībā arvien plašāk izplatās ideja par alternatīvo degvielu izmantošanu ikdienā. Lai palielinātu bioetanolā ražošanas efektivitāti un padarītu to ekonomiski pieejamāku ikvienam pasaules iedzīvotājam, tiek optimizēti dažādi fermentācijas apstākļi, kā arī meklētas visizdevīgākās izejvielas.

Viena no izejvielām, kuru var izmantot etanola producēšanai ir inulīns. Inulīns kā auga rezerves ogļhidrāts ir plaši izplatīts. Liels daudzums inulīna ir topinambūru bumbuļos, aptuveni 11-20 %. Topinambūrs ir plaši izplatīts, daudzgadīgs augs, kurš nav prasīgs pret augšanas apstākļiem. Šim augam nav nepieciešams liels minerālvielu un ūdens daudzums augsnē, kā arī tas ir pielāgojies augšanai ziemeļu klimatā. Topinambūrs satur augstu bioetanolā fermentācijai izmantojamo vielu daudzumu un tas nav prasīgs pret augšanas apstākļiem, tādejādi viegli kultivējams. Šo pozitīvo iezīmju dēļ, topinambūru var uzskatīt par piemērotu izejvielu bioetanolā iegūšanai.

Darba mērķis – optimizēt fermentācijas apstākļus inulīna konversijai bioetanolā, izmantojot netradicionālos raugus *Kluyveromyces marxianus*, kas spēj tieši utilizēt inulīnu. Pētījumam tika izvirzīti šādi darba uzdevumi:

- Salīdzināt *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418 un DSM 5422 celmu etanola un biomasas sintēzes rādītājus, inulīnu saturošās modeļbarotnēs;
- Noskaidrot inulīna fermentācijas parametru (temperatūras, aerācijas un substrāta koncentrācijas) ietekmi uz etanola un biomasas sintēzi, kā arī novērtēt to savstarpējo mijiedarbību.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Bioetanolis un tā ražošanas pamatprincipi

Par bioetanolu dēvē etanolu, kurš iegūts raudzējot biomasu, un kuru izmanto kā biodegvielu. Bioetanolis daudzās valstīs ir ieguvis popularitāti kā alternatīva dīzeļdegvielai un benzīnam. Laika posmā no 2000.- 2007. gadam bioetanola ražošanas apjomi ir trīskāršojušies, proti, no 17 miljardiem litru līdz 52 miljardiem litru gadā. Vislielākā bioetanola producētājvalsts 2011.gadā bija ASV, gada laikā saražojot 13 900 galonu (~526 115 litru) bioetanola (Onuki et.al., 2008). Otra lielākā valsts, kura producē bioetanolu ir Brazīlija. Šīs abas valstis ir arī lielākās bioetanola patērētājas. ASV bioetanolu galvenokārt iegūst no kukurūzas, bet Brazīlijā no cukurniedrēm. Eiropas valstīs bieži bioetanolu producē no cukurbietēm, kur tām ir atbilstoši augšanas apstākļi.

Parasti bioetanolu kā degvielu izmanto dažādu koncentrāciju maisījumos kopā ar benzīnu. Latvijā bioetanolu benzīnam pievieno līdz pat 5%, tādējādi izvairoties no automašīnas dzinēja pielāgošanas. Bioetanolā ir augsts skābekļa saturs (34%) un liels oktāna skaitlis, tādēļ pievienojot to benzīnam uzlabojas degvielas kvalitāte un degvielas sadegšana dzinējā notiek pilnīgāk (Kalniņš, 2005). Turklāt, pievienojot bioetanolu benzīnam, atmosfērā nonāk mazāks daudzums nepilnīgās sadegšanas produkti.

Viens litrs bioetanola ir līdzvērtīgs 0,66 litriem benzīna (Kalniņš, 2005).

Etanola ražošanas procesam izšķir šādus etapus:

1. izejvielu sagatavošana;
2. pārcukurošana (ja nepieciešams);
3. vienkāršo cukuru fermentācija;
4. etanola attīrīšana (parasti destilācija);
5. etanolu nesaturošo galaproduktu izdalīšana (ja nepieciešams) (Lyons et.al., 1995).

Ja izejvielas ir melase, cukurbietes vai sūkalas, kuras jau satur metabolizējamus cukurus, tad nav nepieciešama substrātu hidrolīze. Ja izejvielas satur cukura polimērus, piemēram, tādas izejvielas kā celuloze, hemiceluloze vai ciete, tad tās nepieciešams depolimerizēt līdz fermentējamiem cukuriem. Šajā procesā cukura polimērs tiek sadalīts monocukuros. Šim procesam izmanto hidrolīzi ar skābi vai fermentatīvo hidrolīzi. Fermentatīvo hidrolīzi veic pievienojot pārcukurojošo fermentu fermentatorā vai atsevišķā traukā (Lyons et.al.,1995).

Vienkāršo cukuru fermentācija ir process, kura laikā raugi vai citi mikroorganismi utilizē cukuru un izdala etanolu. Šim procesam jānodrošina optimālākie apstākļi un tas rūpīgi



izmantošanai etanola attīrīšanai ir arī savi mīnusi – dažus savienojumus nav iespējams oksidēt un tie pēc apstrādes vēl joprojām atradīsies etanola sastāvā (Onuki et.al., 2008).

Pēc vajadzības etanola nesaturošos galaproduktus var izmantot lopbarībā. Destilācijas galaprodukti satur minerālvielas un proteīnus, kā arī augstvērtīgas raugu šūnas un to metabolītus, kuri veidojas etanola fermentācijas laikā (Rausch and Belyea, 2006).

### **1.1.2. Etanola veidošanās, raugu metabolisms**

Anaerobos apstākļos raugi pa Embdena-Meijerhofa jeb glikolītisko ceļu konvertē glikozi etanolā. Šis Embdena-Meijerhofa ceļš tiek izmantots, lai raugi konvertētu cukurus enerģijā. Glikolīzes procesā rodas pirovīnogskābe (piruvāts), kura ir svarīgs starpprodukts mikroorganismu vielmaiņā. Spirta rūgšanā no piruvāta, fermenta piruvātdekarboksilāzes klātbūtnē veidojas acetaldehīds, no kura savukārt ferments alkoholdehidrogenāze veido etilspirtu. Asimilētie cukuri veido starpproduktus, kas nepieciešami raugu šūnu augšanai un beigu produktus (lielākā daudzumā) – etanolu un oglekļa dioksīdu. Šo procesu pilnībā nodrošina rauga šūnās esošie fermenti. Pilnā reakciju ciklā rodas 2 moli etanola, bet praktiski, fermentācijā produkta iznākums ir 90 % - 95 % no teorētiskā. Tas skaidrojams ar to, ka rauga šūnām jāutilizē vērtīgas vielas biomasā, kā arī jānodrošina citas nepieciešamās bioķīmiskās reakcijas (Najafpour and Lim, 2002).

### **1.2. Etanola fermentācijai nepieciešamie apstākļi**

Anaerobos apstākļos raugi fermentācijas procesā no cukura veido etanolu un oglekļa dioksīdu. Raugu augšanai savukārt nepieciešams skābeklis. Tipiskais skābekļa daudzums barotnēs ir no 0,05 līdz 0,10 mm Hg (Najafpour and Lim, 2002).

Ja raugam ir pieejams liels daudzums skābekļa un ir etiķskābo baktēriju klātbūtne, etanols var tikt oksidēts līdz etiķskābei. Šis process gan nav vēlams etanola ražošanai, bet to izmanto augļu etiķa ražošanai.

Raugiem ir dažādi augšanas temperatūras optimumi, minimumi un maksimumi. Lielāka daļa raugu, ko izmanto rūpniecībā ir mezofīli un spēj augt temperatūras diapazonā no 0°C līdz 50°C. Optimālākie apstākļi šo raugu augšanai ir pie 20°C - 30°C temperatūras. *S. cerevisiae* temperatūras maksimums, pie kura raugs spēj veikt fermentāciju ir 35°C - 43°C, tas ir atkarīgs gan no rauga celma, gan no barotnē esošā oglekļa avota, vides osmotiskā spiediena, etanola koncentrācijas, skābekļa pieejamības un citiem faktoriem (Walker, 1998).

*S.cerevisiae* ir ne-osmotoleranti raugi, tiem piemērota vide ir ar ūdens potenciālu no -1,0 līdz -5,6 Mpa (Walker, 1998). Ja cukuru saturs vidē ir 10% - 15%, tad tas var inhibēt raugu augšanu un vairošanos. Tomēr etanola ražošanā izmantojamie raugu celmi spēj veikt fermentāciju arī ja vides cukura saturs ir 40 % ( Board, 1983).

Lielākā daļa no raugiem spēj augt pH diapazonā no 4,5 līdz 6,5. Tie var augt arī skābākā vidē, līdz pH 3,0 un sārmainākā vidē, līdz pH 8,0. Raugi ir jutīgāki pret zemu pH, ja vidē ir neorganiskās skābes, piemēram, pienskābe un etiķskābe (Walker, 1998).

### **1.3. Etanola fermentācijai izmantojamie mikroorganismi**

#### **1.3.1. Etanola fermentācija izmantojot raugus *Saccharomyces spp.***

Raugi *Saccharomyces cerevisiae* un *Saccharomyces uvaru* ir tradicionāli raugi, kurus izmanto, lai ražotu etanolu industriāli. *Saccharomyces cerevisiae* izmanto klasiskajās pārtikas fermentācijās – alus, vīna, maizes, sakē, etanola, raugu ekstrakta, vitamīnu ražošanā. To izmanto arī, lai ražotu glicerolu, invertāzi, bioetanolu degvielai un dzīvnieku barību. Alkoholisko dzērienu ražošanai izmanto dažādas *S.cerevisiae* variācijas, populārākās no tām ir *S.cerevisiae* var.*vini* un *S.cerevisiae* var. *carlsbergensis*. Visi celmi no *Saccharomyces* ģints fermentē glikozi un daži no tiem spēj fermentēt arī citus oglekļa hidratātus - saharozi, maltozi un rafinozi (Walker, 1988).

Dabā *S.cerevisiae* sastopams ziedu nektārā, uz augu lapām un augļiem. Šis raugs galvenokārt vairojas nesimetriski daloties jeb pumpurojoties, bet askus tas veido tikai nelabvēlīgos apstākļos (Walker, 1988).

#### **1.3.2. Etanola fermentācija izmantojot raugu *Kluyveromyces spp.***

Bioetanola ražošanā pēdējā laikā nozīmi iegūst arī netradicionālie raugi, kā, piemēram, *Kluyveromyces marxianus* un *Kluyveromyces lactis*. Šo raugu priekšrocība ir spēja tieši utilizēt tādus substrātus kā laktoze un inulīns. *Kluyveromyces spp.* izmanto bioetanola ražošanā no piena sūkalu laktozes. Šie raugi ir arī perspektīvi etanola ražosanaī no inulīnu saturošiem substrātiem, jo tie spēj producēt inulināzi (Singh and Gill, 2006). Inulināze ir enzīms, kas sašķeļ inulīnu par fruktozi. Salīdzinājumā ar citiem *Kluyveromyces* ģints pārstāvjiem, *K. marxianus* piemīt vislabākās īpašības, lai ar tā palīdzību varētu producēt bioetanolu gan no laktozi saturošiem substrātiem, gan no inulīna saturošiem substrātiem (Fonseca et.al., 2008). Raugs *K. marxianus* spēj producēt etanolu virs 40°C temperatūras un tā

maksimāla augšanas temperatūra var būt 47°C (Anderson et.al., 1986), 49°C (Hughes et.al., 1984) vai pat 52°C (Banat et.al., 1992), atkarībā no rauga celma.

Agrāk etanola fermentācija tika pēfīta izmantojot divas kultūras: *Asperigillus niger*, kura hidrolizēja inulīnu un tad, lai fermentētu cukurus par etanolu, tika izmantota kultūra *Saccharomyces cerevisiae* (Ge and Zhang, 2005). Etanols tika fermentēts arī no jauktām kultūrām ar *Kluyveromyces fragilis* un *Zymomonas mobilis* vai *S.cerevisiae* (Szambelam et.al., 2004). Etanola iegūšanai no divām atsevišķām kultūrām ir daudz mīnusu, proti, katrai kultūrai nepieciešami individuāli augšanas apstākļi, kurus nevar pielāgot vienā laikā. Lielākā priekšrocība etanola fermentācijai, izmantojot raugu *K. marxianus*, ir tāda, ka nav nepieciešamas divas kultūras, tādejādi var pielāgot nepieciešamos augšanas apstākļus.

Lai producētu etanolu ar raugu *K. marxianus* ir izmantotas dažādas metodes: periodiskās kultūras ar paaugstinātu substrāta koncentrāciju (Barron et.al., 1996), periodiskos procesus ar piebarošanu (Gough et.al., 1998), nepārtrauktas fermentācijas sistēmas (Love et al., 1998), membrānu bioreaktori (Tin and Mawson, 1993), divu pakāpju fermentācija (Banat et al., 1996), imobilizācija ar  $\beta$ -galaktozidāzi (Hahn-Hagerdal, 1985), kalcija alginātā imobilizētas šūnas (Ferguson et al., 1998), poli kriogēlā imobilizētas šūnas (Gough et al., 1998), vienlaicīgus pārcukurošanas un fermentācijas procesus, pievienojot enzīmus (Kadar et.al., 2004), heterologu celulāžu gēnu klonēšanu (Hong et.al., 2007) un miksētu kultūru izmantošana (Ward et.al., 1995).

### **1.3.3. Etanola fermentācija izmantojot baktērijas**

Vairākām baktērijām (piem. *Enterobacteriaceas*, *Spirochaeta*, *Bacteroides*, utt.) ir raksturīga raugiem līdzīga glikozes konvertācija Embdena-Meijerhofa ceļā ar etanolu kā gala produktu (Baratti et.al., 1988). No etanolu ražojošām baktērijām perspektīva ir Gram-negatīvā baktērija *Zymomonas mobilis*, kura konvertē cukurus, tādus kā glikoze, fruktoze un saharoze, izmantojot Entnera-Dudorova ceļu (Montenecourt et.al., 1985). Ir vairākas priekšrocības izmantojot *Z. mobilis*, salīdzinot ar *S. cerevisiae* etanola ražošanai. Glikozes barotnē tā aug ātrāk par raugiem un uzrāda augstāku produktivitāti fermentācijas laikā (Rogers et al., 1986). Bet ir arī vairāki trūkumi *Z. mobilis* izmantošanai bioetanola ražošanā – ierobežotais substrātu loks, blakusproduktu (sorbitols, acetons, glicerols, etiķskābe, fruktozes polimērs levāns) veidošanās (Viikari and Berry, 1988). Šobrīd baktērija *Z. mobilis* industriālā ražošanā netiek izmantota. Etanola producēšanas process ar šīm baktērijām ir realizēts tikai laboratorijas vai pilotiekārtu līmenī.

#### 1.4. Rauga *Kluyveromyces marxianus* raksturojums

Raugu *Kluyveromyces marxianus* 1880. gadā pirmo reizi aprakstīja E.C.Hansens, tajā brīdī rauga nosaukums bija *Saccharomyces marxianus* - nosaukts par godu Marksam, cilvēkam, kurš izdalīja šo raugu no vīnogām (Lodder and Kreger-van Rij, 1952). Šobrīd *Kluyveromyces marxianus* izšķir 15 celmus. *K. marxianus* ir homotalisks hemiascomicētu raugs, kuru izdala no piena produktiem (Lane et.al., 2011). Raugam *K. marxianus* ir piešķirts GRAS (generally recognized as safe – vispārēji atzīts par drošu) statuss, kas nozīmē, ka to droši var izmantot gan farmācijas, gan pārtikas proteīnu ražošanai.

*K. marxianus* piemīt tādas īpašības, kuru dēļ šo raugu bieži izmanto biotehnoloģijā. *K. marxianus* piemīt spēja asimilēt cukurus, it īpaši laktozi un inulīnu, ļoti straujš augšanas ātrums, termotolerance ar spēju augt līdz 52°C augstā temperatūrā un liela sekretorā kapacitāte (Fonseca et.al., 2008). *K. marxianus* ir universāls un to var izmantot dažādu savienojumu producēšanai. Galvenokārt to izmanto etanola producēšanai no dažādiem substrātiem. Tas spēj producēt enzīmus  $\beta$ -galaktozidāzes un pektināzes, kā arī tas spēj producēt inulināzi, kura attiecīgi spēj hidrolizēt augos esošo fruktānu - inulīnu (Lane and Morrissey, 2010). *K. marxianus* var izmantot arī šūnu proteīnu, laktāzes un lipāzes ražošanai (Fonseca et.al., 2007). Raugam *K. marxianus* ir liels potenciāls biotehnoloģiju nozarē un tas tiek arvien vairāk pētīts, lai uzlabotu tā īpašības.

Piena sūkalas – blakusprodukts, kuram nav tālāka pielietojuma, ir kļuvis par vienu no ekonomiski izdevīgākajiem substrātiem, kuru *K. marxianus* var izmantot, lai producētu gan biomasu, gan etanolu. Rauga biomasu var izmantot kā barību dzīvniekiem vai arī no tās iegūt ekstraktu, kuru izmantot pārtikas ražošanas rūpniecībā. Savukārt etanola producēšana no sūkalām, izmantojot raugu *K. marxianus* ir ekonomiski izdevīga, jo sūkalas, kā blakusprodukts, tiek pilnīgi izmantots, nevis izmests atkritumos.

Raugš *Kluyveromyces marxianus* ir respiro-fermentatīvs raugs un tas spēj ģenerēt enerģiju Krebsa ciklā ar oksidatīvo fosforilēšanu vai ar etanola fermentāciju (Lane and Morrissey, 2010). Raugs *K. marxianus* nespēj augt pilnīgi anaerobos apstākļos un etanola veidošanās ir cieši saistīta ar skābekļa daudzuma ierobežojumu (Visser et.al., 1990). Krebtrī efekts ir novērojams, kad cukura koncentrācija ir augsta, šūna no piruvāta sāk producēt etanolu, kaut gan enerģija ir daudz mazāka, par to, kura tiktu saņemta no Krebsa cikla (Lane and Morrissey, 2010). Krebtrī efekta mehānisms vēl nav līdz galam izpētīts. Visdrīzāk tas atkarīgs no enzīmu daudzuma glikolīzē, glikozes represijas no Krebsa cikla enzīmiem un reducēšanās balansējošu metabolisko reakciju ekspresijas (Merico et.al., 2007). *K. marxianus* tiek raksturots kā Krebtrī negatīvs raugs, kurš vispirms vada enerģiju caur Krebsa ciklu.

Tomēr pastāv atšķirības starp *K. marxianus* celmiem, daži celmi tiek atzīti par Krebrī pozitīviem (Lane and Morrissey, 2010). Tādejādi var izskaidrot kādēļ daži *K.marxianus* celmi spēj ļoti labi producēt etanolu, bet daži nevar.

Raugam *K. marxianus* ir viens no vislielākajiem augšanas ātrumiem, salīdzinot ar citiem eikariotu mikroorganismiem (Groeneveld et.al., 2009). *K. marxianus* starp celmiem ir atšķirīgi augšanas parametri un ir novērota arī atšķirība starp laboratorijām, kurās tiek pētīts viens un tas pats celms (Fonseca et al., 2007).

No rauga *K. marxianus* var iegūt dažādus enzīmus - inulināzi,  $\beta$ -galaktozidāzi,  $\beta$ -glikozidāzi, endopoligalaktouronāzes kā arī proteīnu fosfatāzes, karboksipeptidāzes un aminopeptidāzes (Fonseca et.al., 2008). *Kluyveromyces spp.* spēj producēt arī aromātiskos savienojumus, tādus kā augļu esterus, karboksilskābes, ketonus, furānus un alkoholus (Fabre et.al., 1995). No visiem šiem savienojumiem vispieprasītākais ir 2-fenil etanols, kuram piemīt rožu ziedu aromāts (Leclercq-Perlat et.al., 2004). Šim alkoholam piemīt īpašības, kuras ietekmē produktu kvalitāti, piemēram, vīnam, negāzētajiem dzērieniem vai raudzētajiem pārtikas produktiem. Tas tiek pievienots arī saldējumam, bezalkoholiskajiem dzērieniem, želatīnam, pudiņiem un košļājamajām gumijām (Wittmann et.al., 2002). *K. marxianus* tiek izmantots arī kā oligonukleotīdu (lieto kā garšas pastiprinātājus pārtikas produktiem), oligosaharīdu (lieto kā prebiotiskus) un oligopeptīdu avots (Belem and Lee, 1999).

*K. marxianus* raugam ir atklāta arī laktāta dehidrogenāzes aktivitāte (Pecota et.al., 2007) un termostabilā endo- $\beta$ -1,4 glukanāzes, celobiohidrolāzes un  $\beta$ -glikozidāzes aktivitāte (Hong et.al., 2007).

## **1.5. Izejvielas etanola fermentācijai**

Mūsdienās etanola fermentācijai izmanto daudz dažādus substrātus. Izšķir četrus tipus: cukura, cietes, celulozes un polifruktānus saturoši substrāti.

### **1.5.1. Izejvielas, kas satur mono un disaharīdus**

Kā cukuru substrātus izmanto cukurniedres, cukurbietes, melasi, augļus, kurus var uzreiz pārstrādāt etanolā. Visbiežāk izmantojamais cukura avots etanola fermentācijai ir melase. Melase satur aptuveni 35-40 w% saharozes, 15-20 w% invertcukurus (glikoze un fruktoze), un 28-35 w% piemaisījumus bez cukura (Najafpour and Lim, 2002).

Etanola fermentācijai raugi var izmantot arī laktozi, pazīstamākais laktozes avots ir sūkalas. Sūkalas kā substrāts rūpnieciskai izmantošanai ir ekonomiski efektīvs, jo sūkalas ir

blakusprodukts piena produktu ražošanā, tātad nav jāiegulda papildu finansējums, speciāli audzējot vai citā veidā iegūstot substrātu etanola fermentācijai. Siera un biezpiena produktu ražošanā sūkalas rodas ļoti lielā daudzumā – saražojot 1 kg siera veidojas aptuveni 9 litri sūkalu. Lai nepiesārņotu vidi, tās var izmantot etanola ražošanai. Raugi, kurus visbiežāk izmanto etanola fermentācijai no laktozes, ir *Kluyveromyces spp.* (Fonseca et.al., 2008). *Saccharomyces cerevisiae* var izmantot laktozes konversijai pēc iepriekšējas laktozes fermentatīvas hidrolīzes par glikozi un galaktozi, tomēr lielākai daļai *Saccharomyces cerevisiae* celmu ir lēna galaktozes utilizācija.

### **1.5.2. Cietes izejvielas**

Cietes substrāti ir dažādi graudi, kartupeļi, kā arī dažādi sakņaugi, kuri pirms fermentācijas jāhidrolizē ar enzīmiem, lai iegūtu cukurus, kurus varētu izmantot etanola fermentācijai. Mūsdienās lielākā daļa pārtikā izmantojamā etanola, kurš ražots rūpnīcā, ir no cietes izejvielas - graudiem. Ciete tiek konvertēta glikozē enzimatiski, izmantojot diastāzi, kura atrodas dīgstošos graudos, vai izmantojot sēņu amilāzi. Cietes substrāts var būt mieži, rudzi un citi graudi, gan neizdziedēti, gan izdziedēti. Ja par etanola izejvielu izmanto miežus, tad jābūt īpaši uzmanīgiem, jo mieži satur 1% - 4% polisaharīda šķiedru, beta-glikānu. Beta-glikāns ir ļoti viskozs un var radīt pārstrādes problēmas. Arī rudzi satur vielas, kas rada nopietnas viskozitātes problēmas (Lyons et.al., 1995).

### **1.5.3. Celulozes izejvielas**

Kā celulozes substrātus izmanto koksni un tās atkritumus, lauksaimniecības atkritumus un atkritumus, kas paliek pāri no papīra ražošanas. Celulozes substrāti tāpat kā cietes substrāti, pirms fermentācijas jāpārveido piemērotos cukuros, parasti izmantojot neorganiskās skābes. Neorganisko skābju izmantošanai ir savi mīnusi- tās noārda daudz liekus cukurus. Kā alternatīvu skābēm var izmantot enzīmus (Najafpour and Lim, 2002).

### **1.5.4. Polifruktānus saturošas izejvielas**

Polifruktānus saturoši substrāti ir inulīns, kurš atrodas dažādos augos, piemēram, topinambūrā. Topinambūrs (*Helianthus tuberosus* L.) ir daudzgadīgs augs, kurš pieder kurvjziežu dzimtai un ir cēlies no Ziemeļamerikas. Topinambūri sastāv no 11 - 20 % ogļhidrātiem, no kuriem 70 - 90 % ir inulīns - lineārs D-fruktozes polimērs ar sastāvā esošu

D-glikozi, kuru var ļoti viegli hidrolizēt ar inulināzi (Szambelan et.al., 2004). Topinambūru bumbuļu sastāvā ir inulīns, fruktooligosaharīdi, cukuri (galvenokārt fruktoze), celuloze, hemiceluloze un fruktāni (Kays and Nottingham, 2008). Inulīns tompinambūru bumbuļos nonāk no auga augšdaļas. Topinambūru stumbra vidus daļā, lignīnu saturošajos audos, biežāk ir sastopams inulīns ar lielāku polimerizācijas pakāpi. Tāpat inulīns ir sastopams arī topinambūru ziedu pumpuros (Kays and Nottingham, 2008). Tātad topinambūru bumbuļi nav vienīgais šī auga orgāns, ko var izmantot kā substrātu etanola iegūšanai.

Topinambūri var augt augsnē, kura nav uzturvielām bagāta, kur, piemēram, kukurūza un sojas pupiņas nespēj augt, kā arī tie augot patērē ļoti maz enerģijas un tiem nav nepieciešama liela apūdeņošana vai mēslošana (Kays and Nottingham, 2008). Šo iemeslu dēļ topinambūrs ir ļoti laba alternatīva biomasas iegūšanai, lai varētu ražot bioetanolu.

## 1.6. Inulīns

Inulīns ir polifruktāns, kurš sastāv no lineārām  $\beta$ -2,1- polifruktozes saitēm un ar D-glikozes atlikumu. Tas ir sastopams kā rezerves ogļhidrāts daudzās augu dzimtās – liliju, graudzāļu, amariļļu un kurvjziežu. Divas sugas, no kurām šobrīd iegūst rūpniecībā izmantojamo inulīnu, pieder pie kurvjziežu dzimtas un tās ir – topinambūrs (*Helianthus tuberosus*) un cigoriņš (*Cichorium intybus*) (Leroy et.al., 2010). Topinambūri akumulē aptuveni 50 - 70 g/kg inulīna uz savu svaigo masu. Tādejādi uz vienu hektāru topinambūri spēj saražot aptuveni 5,4 tonnas inulīna (Li and Chan-Halbrecht, 2009). Inulīns ir plaši sastopams augu valstī, kopumā tas dabiski veidojas vairāk nekā 36 000 augos visā pasaulē. Piemēram, daži no šādiem augiem ir ķiploki, sparģeļi un pienenes, bet jāņem vērā, ka inulīna sastāvs šajos augos ir ievērojamāki mazāks, tādēļ to izmantošana rūpnieciskai inulīna ieguvei nav izdevīga. Inulīna polimerizācijas pakāpe (*DP – degree of polymerization*) ir atkarīga no dažādiem faktoriem - paša auga īpašībām; klimata; augšanas apstākļiem; veģetācijas perioda, kurā augs novākts; kā un cik ilgi tas tiek uzglabāts pēc novākšanas (Leroy et.al., 2010). Pēdējā laikā inulīna izmantošana ir kļuvusi populāra, jo tas ir atjaunojams, lēts izejmateriāls etanola fermentācijai, fruktozes sīrupa iegūšanai un citu ķīmisko savienojumu producēšanai (Chi et.al., 2010).

### 1.6.1 Inulīna izmantošana dažādu savienojumu iegūšanai

Etanols kā neatjaunojamās degvielas alternatīva ir ieguvis lielu popularitāti tādās valstīs kā ASV, Brazīlija, Ķīna un Indija. Lai arī citās valstīs nākotnē varētu izmantot atjaunojamo degvielu – bioetanolu, ir svarīgi izvērtēt dažādus bioetanolā iegūšanas aspektus. Svarīga ir bioetanolā ieguves izmantošanai vajadzīgo cukuru avotu izmaksas. Šobrīd populārākie izejmateriāli bioetanolā producēšanai ir cukurniedres, ciete un lignoceluloze (Li and Chan-Halbrecht, 2009). Šie cukura avoti ir izdevīgi, bet to fermentācijas procesam ir nepieciešamākas sarežģītākas darbības, nekā, piemēram, izmantojot inulīnu. Inulīna šķelšanas enzīms inulināze spēj to uzreiz šķelt par fruktozi un gliukozi, tādējādi to uzreiz var konvertēt etanolā. Raugs *S.cerevisiae* inulināzi producēt nespēj, bet tas ir vispopulārākais raugs, kuru izmanto etanolā ražošanai. Lai producētu etanolu no inulīna saturošiem substrātiem, vislabāk izvēlēties raugu *K. marxianus*, kurš spēj gan producēt inulināzi, gan konvertēt cukurus etanolā. Bet diemžēl ir pierādīts, ka *K. marxianus* salīdzinājumā ar *S. cerevisiae* spēj producēt daudz mazāku etanolā daudzumu, tādēļ tas rūpniecībā netiek tik bieži izmantots (Lane and Morrissey, 2010). Mikroorganismi, kuri arī spēj producēt inulināzi ir atsevišķi *Aspergillus niger* mutanti un *Pichia guilliermondii* celmi (Chi et al., 2010).

Mūsdienās inulīns ir kļuvis populārs ne tikai kā izejmateriāls etanolā ražošanai, bet no tā tiek iegūti arī dažādi ķīmiskie savienojumi. Inulīnu izmanto fruktozes sīrupa iegūšanai, inuloligosaharīdu producēšanai, citronskābes iegūšanai, 2,3-butāndiols iegūšanai, pienskābes un dažādu cukuru alkoholu iegūšanai (Chi et al., 2010).

### 1.7. Inulināze

Raugos enzīms, kurš ir atbildīgs par inulīna šķelšanu, ir nespecifiskā  $\beta$ -fruktozidāze (inulināze; 2,1-D-fruktānfruktānolāze), kura atbrīvo fruktozes molekulas no cukuriem ar  $\beta(2,1)$ -saišu fruktozes vienībām nereducējošajā galā (Fuchs et al., 1985). Dabiski inulināzes substrāti ir inulīns, saharoze un levāns. Salīdzinājumā ar invertāzi, inulināzei ir dažādas priekšrocības izmantošanai pārtikas rūpniecībā. Izšķir ekso-inulināzi un endo-inulināzi. Ekso-inulināze katalizē fruktozes atlikuma atšķelšanu no nereducējošā inulīna molekulas gala. Savukārt endo-inulināze hidrolizē inulīna iekšējās saites, tādējādi iegūstot inulotriozī, inulotetrozi un inulopentozī (Chi et al., 2009). Enzīms inulināze, kas izdalās kultūras šķīdumā, ir dimērs, bet inulināze, kas glabājas sūnas sienā, ir tetramērs (Rouwenhorst et al., 1990).

Enzīma inulināzes aktivitāte ir atkarīga gan no temperatūras, gan no vides pH. Visaugstāko aktivitāti uz saharozes substrāta inulināze uzrāda pie 70°C temperatūras, bet inulīna substrātā pie 50°C temperatūras. Virs 70°C temperatūras enzīma aktivitāte inulīna substrātā netika novērota, bet saharozē enzīma darbība vēl joprojām bija augsta. Inulināzes aktivitāti ietekmē arī pH. Uz inulīna substrāta augstāka enzīma aktivitāte bija pie lielāka pH, turpretī, enzīma optimālai aktivitātei uz saharozes substrāta nepieciešams zemāks pH (Rouwenhorst et al., 1988). Citā pētījumā (Cazetta et.al., 2010) tika parādīts, ka optimālākie apstākļi inulināzes producēšanai ir pie pH 5,0; aerācijas 1,0 l/l\*min<sup>-1</sup> un 10 g/l<sup>-1</sup> saharozes koncentrācijas barotnē.

*K. marxianus* ekstracelulārā inulināze, kas sastopama gan šūnas sienīnā, gan kultūras šķīdumā sastāv no vienādām subvienībām, kurā ir 64-kDa polipeptīdi, kuri satur 26 % - 37 % ogļhidrātu molekulāro masu (Rouwenhorst et al., 1988).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Mikroorganismi:

- *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422
- *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418

#### 2.1.2. Laboratorijas trauki :

- Mērkolbas
- Koniskās kolbas ar vates aizbāžņiem
- Vārglāzes
- Stikla nūjiņa
- Pipete (20µl, 200µl, 1000µl, 5ml)
- Mērcilindri

#### 2.1.3 Vienreizējās lietošanas materiāli

1.tabula Vienreizējās lietošanas materiāli

Table 1. Disposable materials

	<b>Materiāla nosaukums</b>	<b>Ražotājs</b>	<b>Piegādātājs</b>
1.	Acryl-Cuvettes	Sarstedt; Aktiegesellschaft&Co; D-51588 Numbrechet, Vācija	Sarstedt pārstāvniecība Latvijā
2.	Mikrostobriņi	Sarstedt; Aktiegesellschaft&Co; D-51588 Numbrechet, Vācija	Sarstedt pārstāvniecība Latvijā

### 2.1.4. Reaģenti, barotnes, buferi

2.tabula Reaģenti

Table 2. Reagents

1.	Heksokinase	Roche, Vācija
2.	Phosphoglucose – Isomerase (PGI)	Roche, Vācija
3.	Adenosine-5'-triphosphate (ATP)	Roche, Vācija
4.	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	Roche, Vācija
5.	$\beta$ -NADP	Roche, Vācija
6.	Imidazol	Sigma, ASV
7.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Реахим, PSRS
8.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Реахим, PSRS
9.	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Реахим, PSRS
10.	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Реахим, PSRS
11.	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Реахим, PSRS
12.	NaOH	Реахим, PSRS
13.	Rauga ekstrakts	SIA Enola, Vācija
14.	Sucrose	Реахим, PSRS
15.	Inulin	Dion Bioline, Latvija
16.	Fructozyme	Novozyme, Dānija

### Barotnes

3.tabula Agara barotne raugam *Kluyveromyces marxianus* (1 litrs)

Table 3. Agar culture medium for yeast *Kluyveromyces marxianus* (1 liter)

Reaģents	Koncentrācija, (g/l)
Rauga ekstrakts	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,4
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5
Agars	50

Uzpilda ar destilētu ūdeni līdz 1 litram.

Barotnes sējmateriāla iegūšanai *Kluyveromyces marxianus*

4.tabula Saharozes barotne(1 litrs).

Table 4. Sucrose culture medium(1 liter)

<b>Reāģents</b>	<b>Koncentrācija, (g/l)</b>
Rauga ekstrakts	5
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
Saharoze 5% (laktoze 5%)	50

Uzpilda ar destilētu ūdeni līdz 1 litram.

Fermentācijas substrāts

5.tabula Inulīna barotne (1 litrs).

Table 5. Inulin culture medium ( 1 liter)

<b>Reāģents</b>	<b>Koncentrācija, (g/l)</b>
Rauga ekstrakts	5
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
Inulīns 10%	100

Uzpilda ar destilētu ūdeni līdz 1 litram.

**Buferi**

Imidazola buferis (1 litrs) :

- imidazols 6,82 g
- MgCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O 1,02g

Uzpilda ar destilētu ūdeni līdz 1 litram.

Mērīšanas buferis glikozes un fruktozes enzimatiskajai noteikšanai (25ml):

- $\beta$ -NADP -39mg
- ATP – 15mg
- Glikozes-6-P-dehidrogenāze -75 $\mu$ l

vai

- NAD – 34,7 mg
- ATP – 15 mg
- Glikozo-6-P.dehidrogenāze (*Leuconostoc mesenteroides*) – 70  $\mu$ l

Uzpilda līdz 25 ml ar imidazola bufera šķīdumu.

Reaģentus izšķīdina destilētā ūdenī un noregulē pH ar 6n HCl līdz 6,9 un pievieno destilētu ūdeni, lai kopīgais tilpums būtu 1 litrs.

### **2.1.5. Iekārtas**

- Spektrofotometrs: Libra S22, Bichrom Ltd, Cambridge, Lielbritānija
- pH-metrs: Microprocessor pH Meter pH211, HANNA instruments, Rumānija
- Svari : BOECO, Boeckel & Co, Vācija
- Fermentatori: Sartorius Stedim , Sartorius AG, Vācija
- Autoklāvs: Стерилизатор паровой ГК – 100-36, PSRS
- Centrifūga: Hermle Z383K, Vācija
- Termobloks: Thermo Block TDB-120, Dry Block Heating Thermostats, BIOSAN, Latvija
- Hromatogrāfs, Agilent 1100, Vācija

### **2.1.6. Datorprogrammas**

- Microsoft Office Word 2010
- Microsoft Office Excel 2010
- Statgraphics Plus (Manugistics, Inc., US)
- Mathcad (Cambridge Mass., US)

## **2.2. Metodes**

### **2.2.1. Rauga biomasas daudzuma noteikšana**

Biomasas noteikšanai no parauga ņem alikvotu daudzumu un ievieto kivetē. Paraugu atšķaida ar ūdeni, lai mērāmais OD būtu 0,05 - 0,2 robežās. References kivetē iepilda destilētu ūdeni. Kiveti ar paraugu liek spektrofotometrā un nolasa optisko blīvumu pie 600nm. Optisko blīvumu pareizina ar atšķaidījumu un koeficientu pārrēķina uz biomasas koncentrāciju gramos litrā.

### **2.2.2. Kopējo cukuru satura noteikšana**

#### Hidrolizēšana

50 ml kolbā ielej 2,5 ml analizējamā šķidruma, 2,1 ml koncentrētas sālsskābes un 20 ml destilēta ūdens. Kolbu aptin ar foliju un uz 10 minūtēm liek ūdens vannā pie 78°C, lai notiktu cukuru inversija. Pēc tam šķīdumu strauji atdzesē līdz istabas temperatūrai, neitralizē ar 4M NaOH līdz pH 6,0-7,0. Ar destilētu ūdeni uzpilda kolbu līdz 50 ml.

#### Cukuru noteikšana ar fruktozīmu

Mikrostobriņā ievieto 1ml analizējamā šķidruma un piepilina 10 µl Fructozyme. Mikrostobriņu liek termoblokā 60°C temperatūrā un atstāj uz trīs stundām.

### **2.2.3. Glikozes un fruktozes satura noteikšana**

Glikozes un fruktozes satura noteikšana tika veikta enzimatiski, izmantojot Libra S22 spektrofotometru.

#### Darba gaita:

1. Kontroles kivetē ievieto 1000 µl mērīšanas bufera.
2. Spektrofotometru uzstāda uz 340 nm un nomēra sākotnējo absorbciju kivetē ar 1000 µl mērīšanas buferi.
3. Nākamajā kivetē ievieto 10 µl parauga, kas satur ne vairāk par 1% glikozes + fruktozes un 990 µl mērīšanas bufera.
4. Spektrofotometrā nomēra sākotnējo absorbciju paraugam.
5. Kivetē, kurā atrodas paraugs, pievieno 1 µl fermenta heksokināzi un mēra līdz konstantai absorbcijai.

6. Turpina darbības ar to pašu kivetī, kurā atrodas paraugs, pievienojot 2  $\mu$ l fermenta Fosfoglikoizomerāzi un mēra līdz konstantai absorbcijai.

#### Aprēķini:

Ja parauga tilpums ir bijis 10  $\mu$ l, tad aprēķina formula ir šāda:

$$C(\text{mmol/l}) = \Delta A \times 100 / 6,28, \text{ kur}$$

C- glikozes vai fruktozes koncentrācija paraugos (mmol/l);

$\Delta A$  – absorbcijas starpība (starpība starp sākuma un beigu absorbciju)

#### Glikozes un fruktozes noteikšanas princips :

1. D-glikoze + ATF – heksokināze --> glikozes-6-fosfāts + ADF
2. D-fruktoze + ATF – heksokināze --> fruktozes-6-fosfāts + ADF
3. Fruktozes-6-fosfāts – fosfoglikoizomerāze --> glikozes-6-fosfāts
4. Glikozes-6-P +  $\text{NADP}^+$  - glikozes-6-fosfātdehidogenāze --> 6-fosfātglukonāts +  $\text{NADPH} + \text{H}^+$

Paraugam pievienojot heksokināzi vienlaicīgi notiek pirmās divas reakcijas.

Pēc tam glikozes-6-fosfāts oksidējas līdz 6-fosfoglukonātam, reducējot  $\text{NADP}^+$  līdz  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ .

Absorbcijas spektra maksimums  $\text{NADPH}$  ir 340 nm, tātad veicot mērījumus pie šī viļņa garuma ir iespējams noteikt  $\text{NADPH}$  daudzumu, kas ir ekvivalents glikozes daudzumam. Tālāk seko fosfoglikoizomerāzes pievienošana, kura izomerizē fruktozes-6-fosfātu līdz glikozes-6-fosfātam. Tad glikozes-6-fosfāts oksidējas līdz 6-fosfoglukonātam, reducējot  $\text{NADP}^+$  līdz  $\text{NADPH}$  un  $\text{H}^+$ .

#### **2.2.4. Mikroorganismu kultivēšana un fermentācija**

##### *Kluyveromyces marxianus* sējmateriāla sagatavošana

Sējmateriālu iegūst ar mikrobioloģiskās cilpas palīdzību no agara barotnes paņemot nelielu daudzumu (vienu koloniju) rauga šūnu masu un ienesot to laktozes 5% šķidrā barotnē. Tad barotnes ar rauga šūnām tiek kultivētas termostatā 24 stundas, 35°C temperatūrā, pie 200 apgriezieniem.

Pēc diennakts laktozes barotnē, izaugušās rauga šūnas pārsēj, iepriekš sagatavotā un nosterilizētā, saharozes 5% barotnē. Tad barotnes tiek termostatā, 35°C temperatūrā, pie 200 apgriezieniem un atstāj uz diennakti.

## Fermentācija

Pirms fermentācijas notiek fermentatoru sagatavošana – sterilizēšana autoklāvā (parasti kopā ar inulīnu saturošo barotni + barotnei tiek pievienots antifoam, lai novērstu putu veidošanos). Nākamais solis ir inokulēšana – sējmateriāla pievienošana barotnei, fermentatorā. Tiek iestādīti fermentācijas parametri, kas tiek automātiski regulēti fermentācijas laikā – pH, temperatūra, maisīšanas ātrums, aerācija. Vides pH tiek regulēts ar 10% KOH šķīdumu.

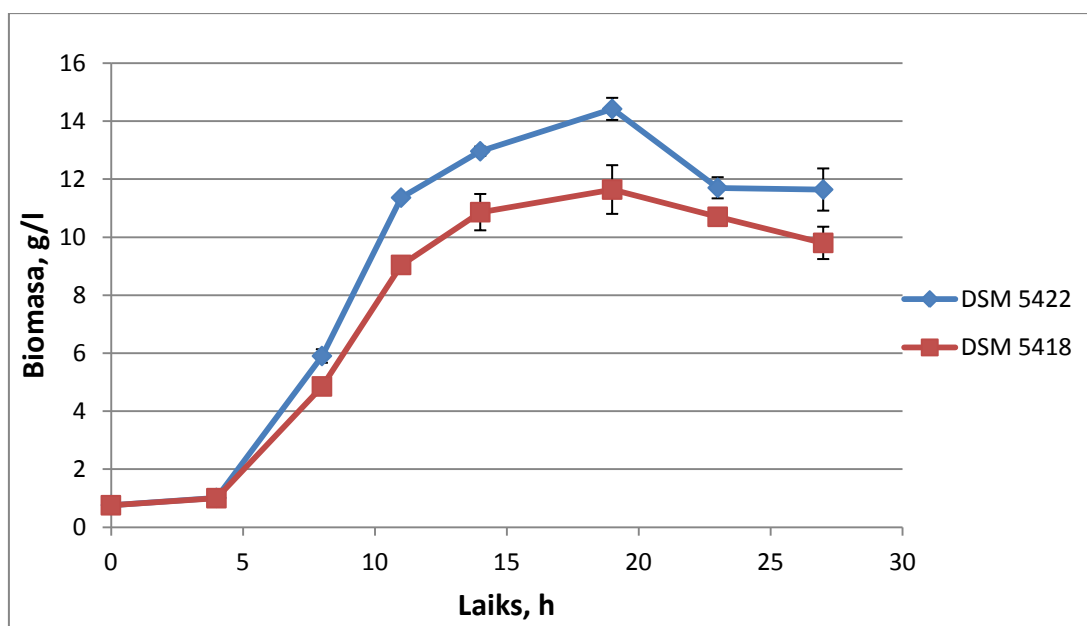
### **2.2.5. Etanola noteikšana fermentācijas paraugos**

Etanols paraugos tika noteikts ar augstefektīvās šķidrums hromatogrāfijas (HPLC) metodi, izmantojot Agilent 1100 hromatogrāfu. Kolonna Asahipak SH1011 (garums 300 mm, i.d. 8 mm). Signāla detekcija ar refrakcijas detektoru. Kolonnas temperatūra 50 °C, mobilā fāze 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> plūsmas ātrums 0,6 ml/min, parauga tilpums 5 µl. Paraugi pirms analīzēm tika centrifugēti pie 8000 rpm 10 minūtes, pēc tam filtrēti caur celulozes acetāta filtru, ar poru diametru 0,45 µm.

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1. *Kluyveromyces marxianus* celmu DSM 5422 un DSM 5418 biomasas un etanola iznākumu salīdzinājums

Salīdzināšanai tika izvēlēti divi *K. marxianus* celmi. Celms DSM 5418 jau iepriekš minēts literatūrā kā celms ar augstu inulīnāzes aktivitāti, fermentācijās uz inulīna substrāta (Yuan et.al., 2008). Savukārt *K. marxianus* DSM 5422 minēts kā celms ar augstiem etanola un biomasas sintēzes rādītājiem uz laktozi saturošiem substrātiem (Vincenzi et.al., 2014), bet maz aplūkota šī celma bioetanola sintēze uz inulīna substrāta. Izvēlējamies salīdzināt šo divu celmu biomasas iznākumus un etanola producēšanas rādītājus, lai izvērtētu, kurš no celmiem ir produktīvāks inulīnu saturošās barotnēs. Fermentācijas tika veiktas barotnēs ar inulīna koncentrāciju 135 g/l (1.,2 attēls). Abi celmi uzrāda līdzīgu specifisko augšanas ātrumu, bet biomasas iznākums celmam DSM 5422 ir lielāks. Rauga *K. marxianus* celms DSM 5422 sasniedza augstāku biomasas koncentrāciju (14,4 g), nekā celms DSM 5418 (11,6 g/l). 1.attēlā var redzēt, ka abi celmi ap 19 stundu ir sasnieguši savu augšanas maksimumu.

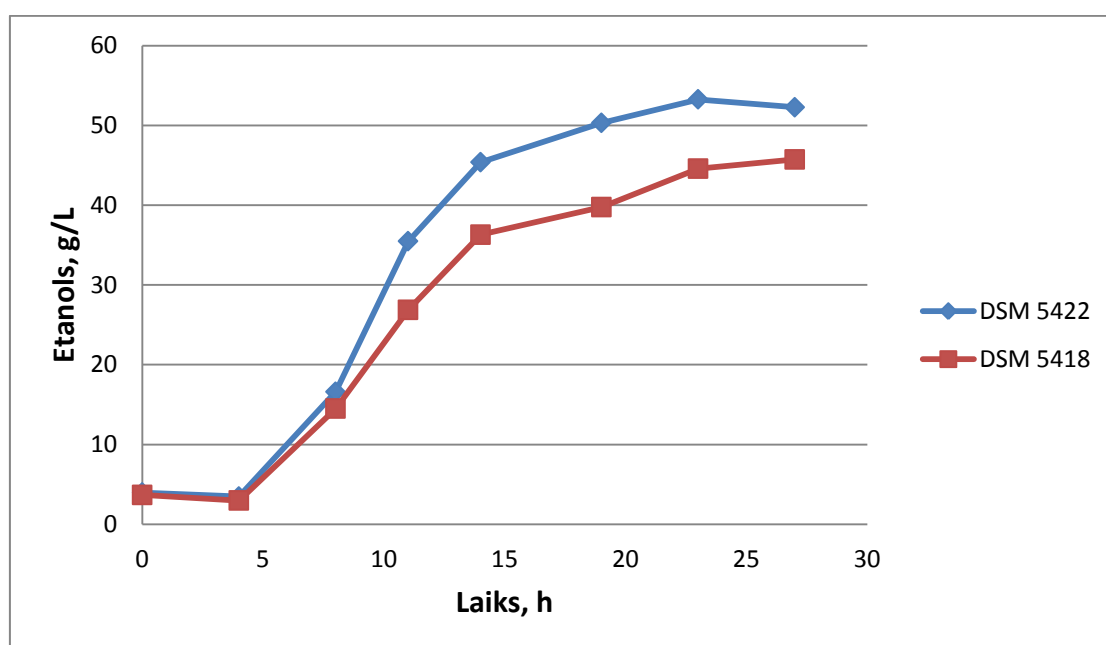


**1.attēls.** *K. marxianus* biomasas pieaugums atkarībā no laika. Inulīna sākuma koncentrācija barotnēs 135 g/l, fermentācijas temperatūra 35°C, maisīšanas ātrums 400 rpm, pH= 5,0. Aerācija 0,25 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

**Figure 1.** *K. marxianus* biomass increase versus time. Inulin medium concentration 135 g/l, fermentation temperature 30°C, stirring speed 400 rpm, pH= 5,0. Aeration 0,25 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

Savukārt etanola maksimālā koncentrācija tika sasniegta 24-26 stundā. Literatūras datos (Yuan et.al., 2008) minēts, ka *K. marxianus* celmam DSM 5418 ir liels potenciāls bioetanola producēšanai no inulīna. Bet izrietot no šī eksperimenta rezultātiem (skatīt 2.attēls), pie dotajiem fermentācijas apstākļiem augstākus etanola producēšanas rādītājus uzrādīja celms DSM 5422. Celmam DSM 5422 etanola iznākums ir 0,40 g/g inulīna. Savukārt celmam DSM 5418 etanola iznākums ir 0,34 g/g inulīna.

Tā kā mūsu eksperimentos *K. marxianus* DSM 5422 uzrādīja labākus biomasas un etanola biosintēzes rādītājus un zinātniskajā literatūrā nav daudz informācijas par šī celma inulīna utilizāciju, turpmākajiem eksperimentiem inulīna fermentācijas parametru optimizācijai tika izmantots šis celms.



**2.attēls.** *K. marxianus* producētā etanola koncentrācijas pieaugums atkarībā no laika. Inulīna sākuma koncentrācija barotnēs 135 g/l, fermentācijas temperatūra 35°C, maisīšanas ātrums 400 rpm, pH = 5,0. Aerācija 0,25 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

**Figure 2.** *K. marxianus* produced ethanol concentration increase versus time. Inulin medium concentration 135 g/l, fermentation temperature 30°C, stirring speed 400 rpm, pH= 5,0. Aeration 0,25 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

### 3.2. Temperatūras un aerācijas ietekme uz bioetanola un biomasas veidošanos *K. marxianus* DSM 5422

No literatūras zināms, ka optimālākā temperatūra, vairums raugu, augšanai un etanola producēšanai ir ap 30°C (Walker, 1998). Savukārt *Kluyveromyces marxianus* literatūrā minēts kā termotolerants raugs, kas spēj augt pie temperatūras līdz pat 52 °C (Fonseca et.al., 2008). Tādēļ šim eksperimentam tika izvēlētas divas dažādas temperatūras 30°C un 40°C. Etanola producēšanai svarīgs faktors ir aerācija. Lai noteiktu pie kādas aerācijas etanola producēšana raugam *K. marxianus* norit visefektīvāk, tika izvēlēti trīs dažādi aerācijas lielumi: 1,4; 0,8; un 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. Inulīna koncentrācija barotnēs bija 90 g/l. Maisīšanas ātrums 400 rpm. Vides pH tika uzturēts nemainīgs pH= 5,0. Neatkarīgo mainīgo faktoru kombinācijas dotas 1. tabulā.

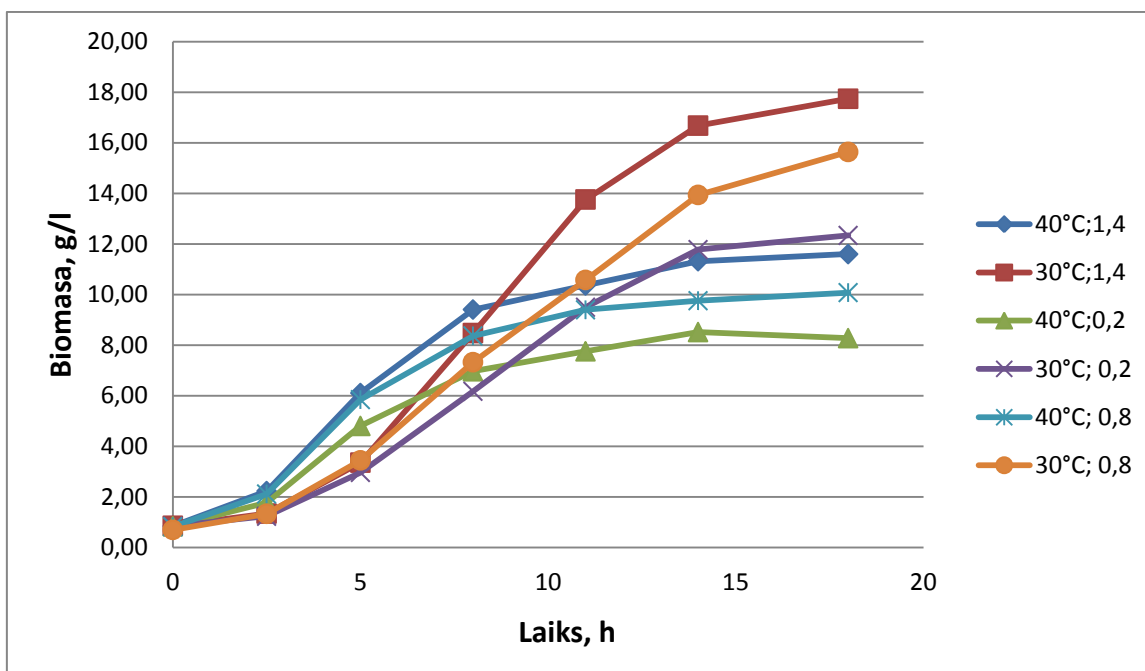
**1.tabula.** Faktoreksperimenta neatkarīgo mainīgo - fermentācijas temperatūra un aerācijas intensitātes kombinācijas

**Table 1.** The independent variables of factor experiment – combination of fermentation temperature and aeration rate

Temperatūra, °C Temperature, °C	Aerācija, l·l <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> Aeration, l·l <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>
40	1,4
30	1,4
40	0,2
30	0,2
40	0,8
30	0,8

Visaugstākās biomasas koncentrācijas ir pie 30°C temperatūras (skatīt 3.attēls), pie visiem trijiem aerācijas režīmiem. Paši augstākie biomasas rādītāji ir pie 30°C temperatūras un lielākās aerācijas 1,4 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, to var izskaidrot ar to, ka rauga biomasas augšanai ir nepieciešams liels skābekļa daudzums un temperatūra ap 30°C ir optimāla rauga augšanai, pie augstākas temperatūras rauga šūnām var veidoties temperatūras šoks. Fermentatoros, kur temperatūra tika iestatīta uz 40°C, ir zemāki biomasas rādītāji. Viszemākā biomasas koncentrācija ir fermentatorā ar 40°C temperatūru un viszemāko aerāciju 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>.

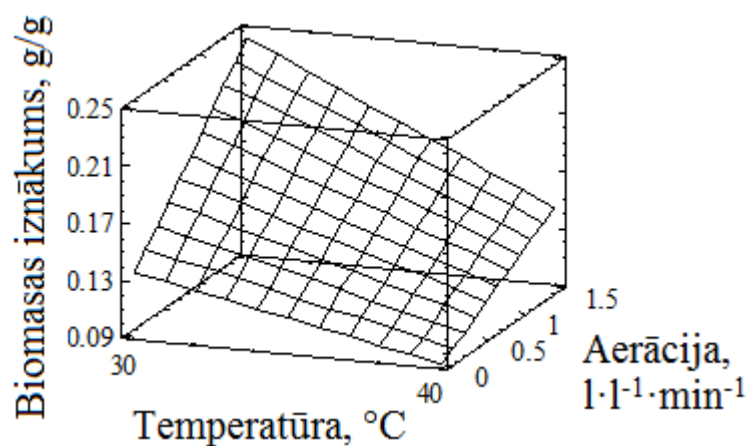
Ceturtajā attēlā dota atbildes virsma un tās vienādojums biomasas iznākumam no patērētā substrāta. Redzams, ka dotajā temperatūras un aerācijas diapazonā aerācijai ir pozitīva ietekme uz biomasas iznākumu, savukārt paaugstinātas temperatūras efekts ir negatīvs. Ir novērojama abu faktoru mijiedarbība – aerācijas pozitīvais efekts ir izteiktāks pie zemākām temperatūrām.



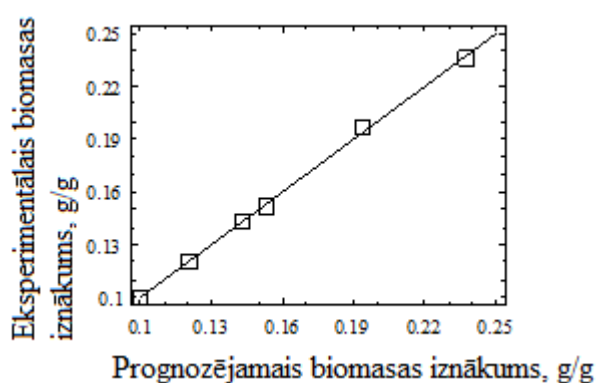
**3.attēls.** *K. marxianus* biomasas pieaugums atkarībā no laika. Inulīna sākuma koncentrācija barotnē 90 g/l, fermentācijas temperatūra 30°C un 40°C, maisīšanas ātrums 400 rpm, pH= 5,0. Aerācija 1,4; 0,8; 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

**Figure 3.** *K. marxianus* biomass increase versus time. Inulin medium concentration 90 g/l, fermentation temperature 30°C and 40°C, stirring speed 400 rpm, pH= 5,0. Aeration 1,4; 0,8; 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

A



B

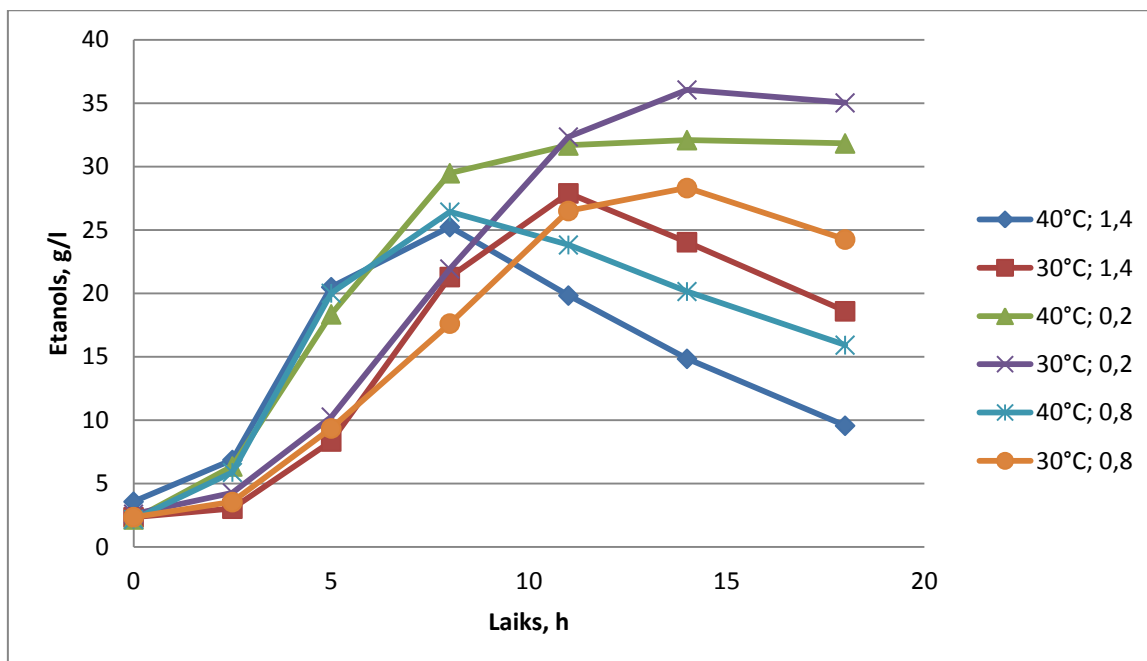


**4.attēls. A:** Atbildes virsmas lauks parāda biomasas iznākumu no patērētā substrārta atkarībā no temperatūras ( $X_1$ ) un aerācijas ( $X_2$ ), inulīna barotnē, fermentācijas 14 stundā. Modeļa vienādojums:  $Y_{x/s} = 0,266741 - 0,00439902 \cdot X_1 + 0,18269 \cdot X_2 - 0,00364359 \cdot X_1 X_2$

**B:** Eksperimentāli iegūtie atkarīgie mainīgie pret prognozējamiem

**Figure 5. A:** Response surface plot showing biomass results depending on temperature ( $X_1$ ) and aeration ( $X_2$ ) changes, in the inulin medium, at 14th hour of fermentation.

**B:** The observed versus predicted plot for the values of depended variable. The model equation:  $Y_{x/s} = 0,266741 - 0,00439902 \cdot X_1 + 0,18269 \cdot X_2 - 0,00364359 \cdot X_1 X_2$



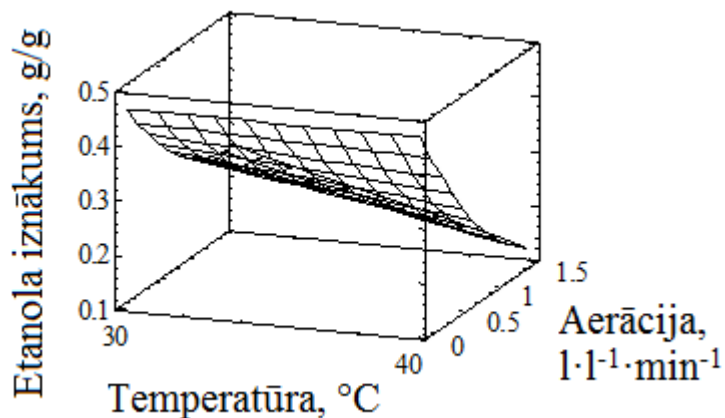
**5.attēls.** *K. marxianus* producētā etanola koncentrācijas pieaugums atkarībā no laika. Inulīna sākuma koncentrācija barotnēs 90 g/l, fermentācijas temperatūra 30°C un 40°C, maisīšanas ātrums 400 rpm, pH = 5,0. Aerācija 1,4; 0,8; 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

**Figure 4.** *K. marxianus* produced ethanol concentration increase versus time. Inulin medium concentration 90 g/l, fermentation temperature 30°C and 40°C, stirring speed 400 rpm, pH= 5,0. Aeration 1,4; 0,8; 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

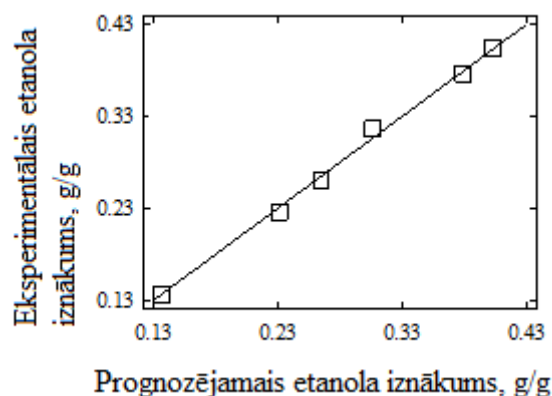
Vislielākā etanola koncentrācija tika sasniegta fermentatorā, kur temperatūra bija 30°C un aerācija 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> (skatīt 5. attēls). Šajā fermentatorā etanola iznākums ir vislielākais - aptuveni 70 % no teorētiskā iznākuma. Etanola producēšanai raugam nepieciešami gandrīz anaerobi apstākļi, tādēļ augstākās etanola koncentrācijas novērojamas pie zemākajiem aerācijas rādītājiem. Tomēr raugs *K.marxianus* nespēj augt pilnīgi anaerobos apstākļos, tā etanola sintēze ir cieši saistīta ar skābekļa daudzuma ierobežojumu (Visser et al., 1990). Savukārt vismazākais etanola daudzums ir fermentatoros, kuros ir intensīvāka aerācija, jo tad pievadīto skābekli rauga šūnas izmanto biomasas producēšanai. Attēlā (skatīt 5.attēls) var redzēt, ka aptuveni 14. stundā viss substrāts ir patērēts un etanola koncentrācija vairs nepieaug. Raugs *K. marxianus* spēj producēt etanolu arī temperatūrā virs 40°C (Fonseca et.al., 2008), bet šajā eksperimentā var redzēt, ka optimālākie apstākļi etanola sintēzei ir pie 30°C temperatūras.

Sestajā attēlā dota atbildes virsma un tās vienādojums etanola iznākumam no patērētā substrāta. Dotajā temperatūras un aerācijas diapazonā aerācijai ir negatīva ietekme uz etanola iznākumu, novērojama abu faktoru mijiedarbība un aerācijas efekts ir izteiktāks pie lielākām temperatūrām. Negatīvie temperatūras efekti uz etanola iznākumu ir nelieli un tie izpaužas pie paaugstinātas aerācijas.

A



B



**6.attēls. A:** Atbildes virsmas lauks parāda etanola iznākumu no patērētā substrāta atkarībā no temperatūras ( $X_1$ ) un aerācijas ( $X_2$ ), inulīna barotnē, fermentācijas 14 stundā. Modeļa vienādojums:  $Y_{p/s} = 0,466302 - 0,00919533 \cdot X_1 X_2 + 0,0939648 \cdot (X_2)^2$

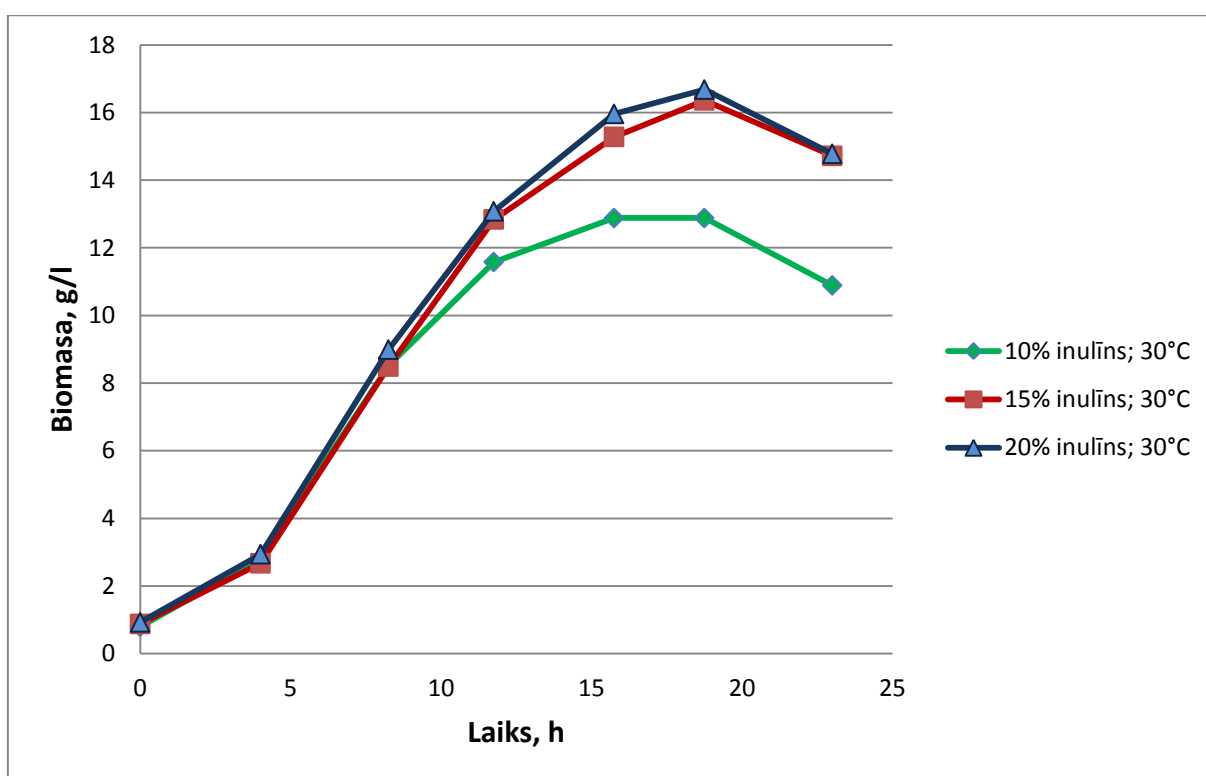
**B:** Eksperimentāli iegūtie atkarīgie mainīgie pret prognozējamiem

**Figure 6. A:** Response surface plot showing ethanol yield depending on temperature ( $X_1$ ) and aeration ( $X_2$ ) at 14th hour of fermentation

**B:** The observed versus predicted plot for the values of depended variable. The model equation:  $Y_{p/s} = 0,466302 - 0,00919533 \cdot X_1 X_2 + 0,0939648 \cdot (X_2)^2$

### 3.3. Substrāta koncentrācijas un fermentācijas temperatūras ietekme uz bioetanola un biomasas veidošanos *K. marxianus* DSM 5422

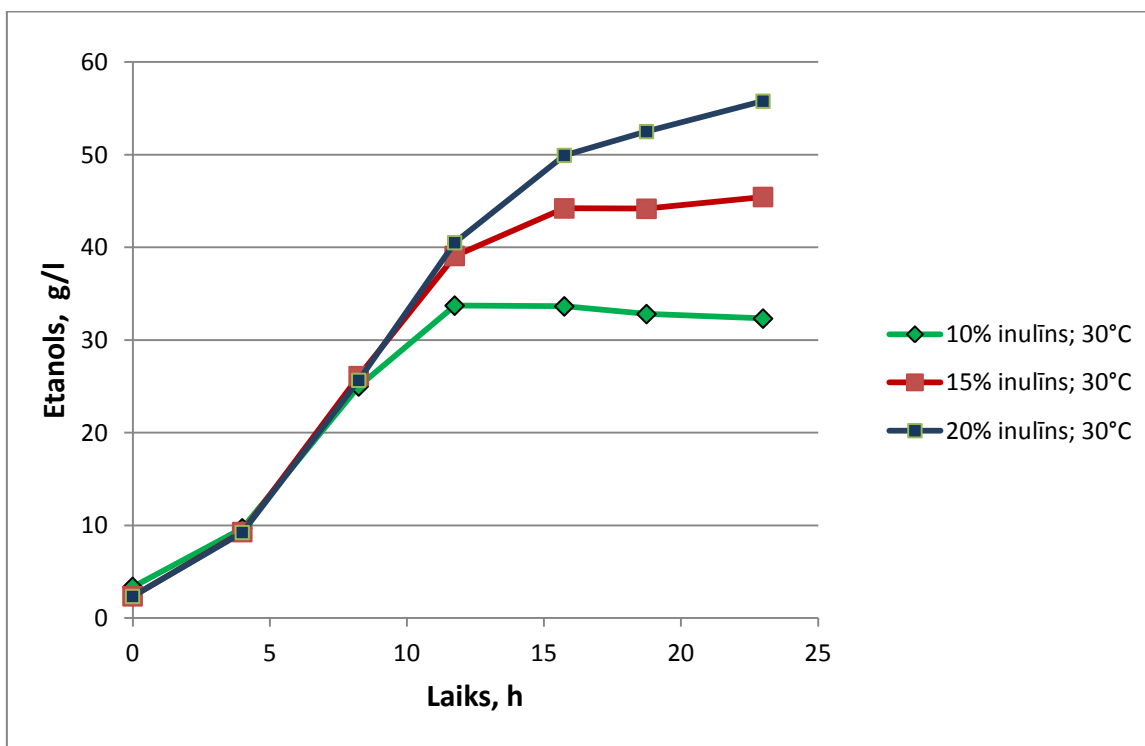
Iepriekšējā eksperimentā tika noskaidrots, ka etanolu vislabāk ir iegūt pie mazas aerācijas, tādēļ inulīna koncentrācijas ietekme uz etanola un biomasas sintēzes rādītājiem tika pētīta pie konstantas aerācijas intensitātes  $0,2 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Inulīna koncentrācija barotnē tika mainīta diapazonā no 100 līdz 200 g/l. Vides pH uzturēts nemainīgs  $\text{pH}= 5,0$ . Maisīšanas ātrums 400 rpm. Var novērot, ka maksimāli sasniegtā biomasas koncentrācija pieaug, palielinot substrāta koncentrāciju no 100 līdz 150 g/l, tomēr tālākais pieaugums pie inulīna koncentrācijas 200 g/l ir nebūtisks (skatīt 7.attēls). Iemesls varētu būt gan inhibīcija ar substrātu, gan inhibīcija ar metabolisma produktiem, tai skaitā etanolu.



**7.attēls.** *K. marxianus* biomasas pieaugums atkarībā no laika. Inulīna sākuma koncentrācija barotnē 100 g/l, 150 g/l un 200 g/l. Fermentācijas temperatūra 30°C, maisīšanas ātrums 400 rpm,  $\text{pH}= 5,0$ . Aerācija  $0,2 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

**Figure 7.** *K. marxianus* biomass increase versus time. Inulin medium concentration 100 g/l, 150 g/l and 200 g/l. Fermentation temperature 30°C, stirring speed 400 rpm,  $\text{pH}= 5,0$ . Aeration  $0,2 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

Kā var redzēt 8. attēlā, augstāka etanola beigu koncentrācija tika sasniegta fermentatoros, kuros inulīna koncentrācija bija 200 g/l. Vidējais etanola producēšanas ātrums inulīna barotnēs ar koncentrāciju 100 un 150 g/l bija vienāds ap  $2,8 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Pie augstākas inulīna koncentrācijas tas samazinājās līdz  $2,4 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Tomēr jāatzīmē, ka pie augstām inulīna koncentrācijām netiek patērēts viss substrāts. Pie inulīna koncentrācijas 200 g/l fermentācijas beigās vidē bija palicis vēl 9,29 g/l kopīgo fermentējamo cukuru. Etanola iznākums, rēķinot no ielikta substrāta, bija zemāks pie augstām inulīna koncentrācijām – 58 % no teorētiski iespējamā etanola iznākuma, pie inulīna koncentrācijas 100 g/l un 49 % no teorētiskā pie inulīna koncentrācijas 200 g/l. Tomēr industriālam etanola ražošanas procesam svarīgs rādītājs ir etanola beigu koncentrācija fermentācijas vidē, jo tālākais etanola destilācijas process, pie zemām etanola koncentrācijām, ir neizdevīgs energoresursu patēriņa ziņā.



**8.attēls.** *K. marxianus* producētā etanola koncentrācijas pieaugums atkarībā no laika. Inulīna sākuma koncentrācija barotnē 100 g/l, 150 g/l un 200 g/l. Fermentācijas temperatūra 30°C, maisīšanas ātrums 400 rpm, pH= 5,0. Aerācija  $0,2 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

**Figure 8.** *K. marxianus* produced ethanol concentration increase versus time. Inulin medium concentration 100 g/l, 150 g/l and 200 g/l. Fermentation temperature 30°C, stirring speed 400 rpm, pH= 5,0. Aeration  $0,2 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

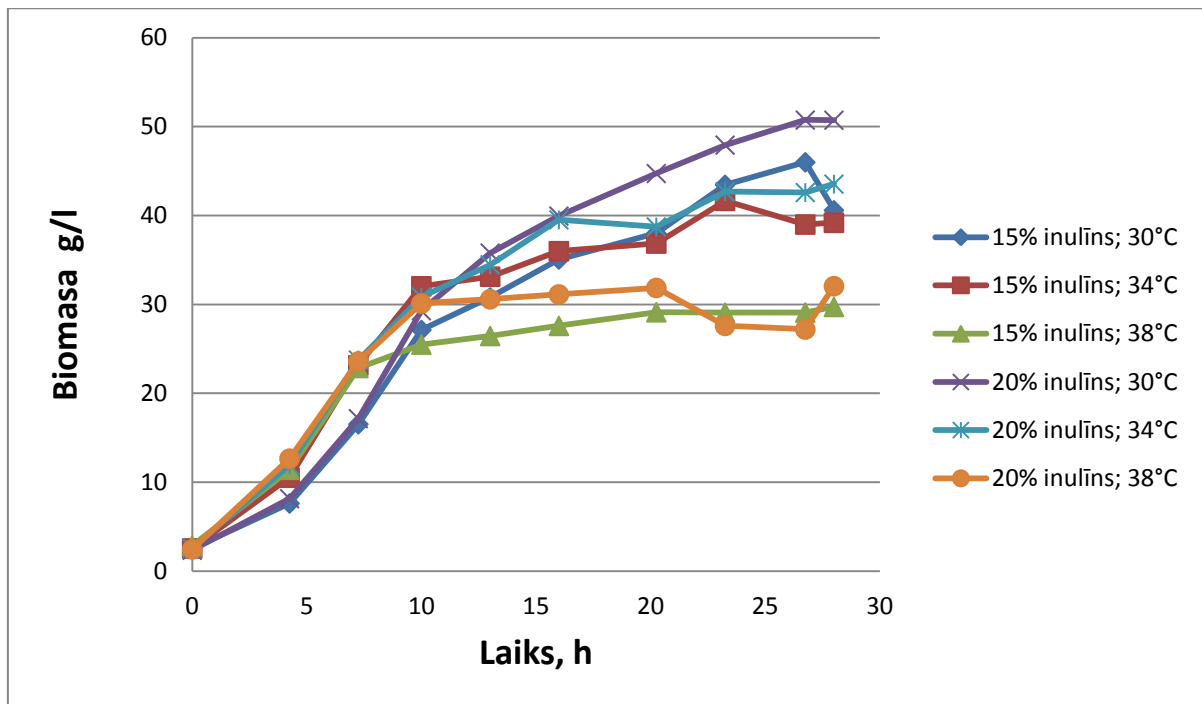
Tika veikts divfaktoru eksperiments, vienlaicīgi mainot gan substrāta koncentrāciju, gan temperatūru. Tika izraudzītas trīs temperatūras, vērtības diapazomā no 30 °C līdz 38 °C, un tika izvēlētas divas inulīna koncentrācijas - 150 un 200 g/l. Šādas substrāta koncentrācijas tika izvēlētas tādēļ, ka etanola beigu koncentrācija augstāka ir pie lielākām substrāta koncentrācijām un no praktiskās pielietojšanas viedokļa šis koncentrācijas diapazons būtu piemērotāks etanola producēšanai. Aerācija tika uzturēta konstanta  $0,2 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , maisīšanas ātrums 400 rpm. Vides pH tika uzturēts nemainīgs pH= 5,0. Abu mainīgo faktoru kombinācijas dotas 2. tabulā.

**2.tabula.** Faktoreksperimenta neatkarīgo mainīgo - fermentācijas temperatūra un inulīna koncentrācijas kombinācijas

**Table 2.** The independent variables of factor experiment – combination of fermentation temperature and inulin concentration

Temperatūra, °C	Inulīna koncentrācija barotnē
30	150 g/l
34	150 g/l
38	150 g/l
30	200 g/l
34	200 g/l
38	200 g/l

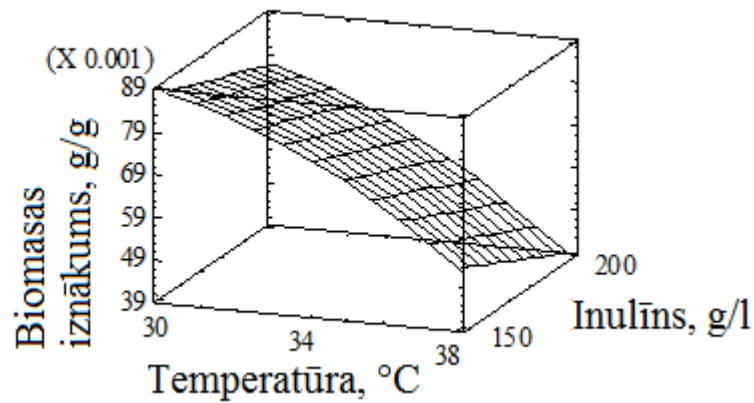
Visaugstākā biomasas koncentrācija (skatīt 9.attēls) ir fermentatorā ar temperatūru 30°C un inulīna koncentrāciju 200 g/l, kā tas ir arī iepriekšējos eksperimentos (skatīt 7.attēls). Savukārt viszemākie biomasas rādītāji ir pie 38°C temperatūras un inulīna koncentrācijas barotnē 150 g/l. Kā redzams no atbildes virsmas un to aprakstošā vienādojuma (skatīt 10. attēls) paaugstinot temperatūru, biomasas iznākums no patērēta substrāta samazinās visā skatītajā substrāta koncentrācijas diapazonā. Arī inulīna koncentrācijai ir negatīva ietekme uz biomasas iznākumu. Tāpat novērojama arī neliela abu faktoru mijiedarbība, inulīna koncentrācijas negatīva ietekme uz biomasas iznākumu ir izteiktāka pie augstākām temperatūram.



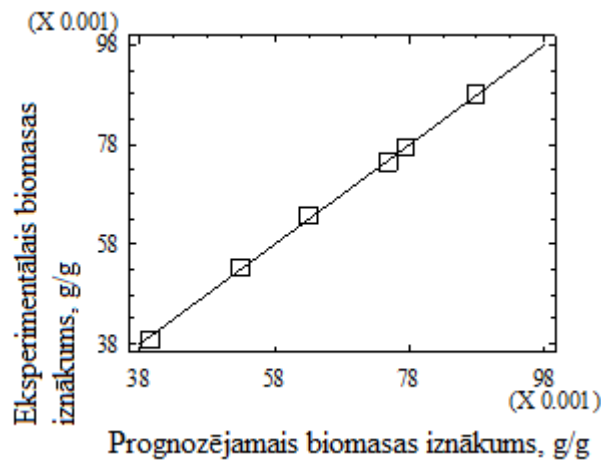
**9.attēls.** *K. marxianus* biomasas pieaugums atkarībā no laika. Inulīna sākuma koncentrācija barotnē 150 g/l, 200 g/l. Fermentācijas temperatūra 30°C , 34°C un 38°C, maisīšanas ātrums 400 rpm, pH = 5,0. Aerācija 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

**Figure 9.** *K. marxianus* biomass increase versus time. Inulin medium concentration 150 g/l, 200 g/l. Fermentation temperature 30°C , 34°C un 38°C, stirring speed 400 rpm, pH= 5,0. Aeration 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

A



B



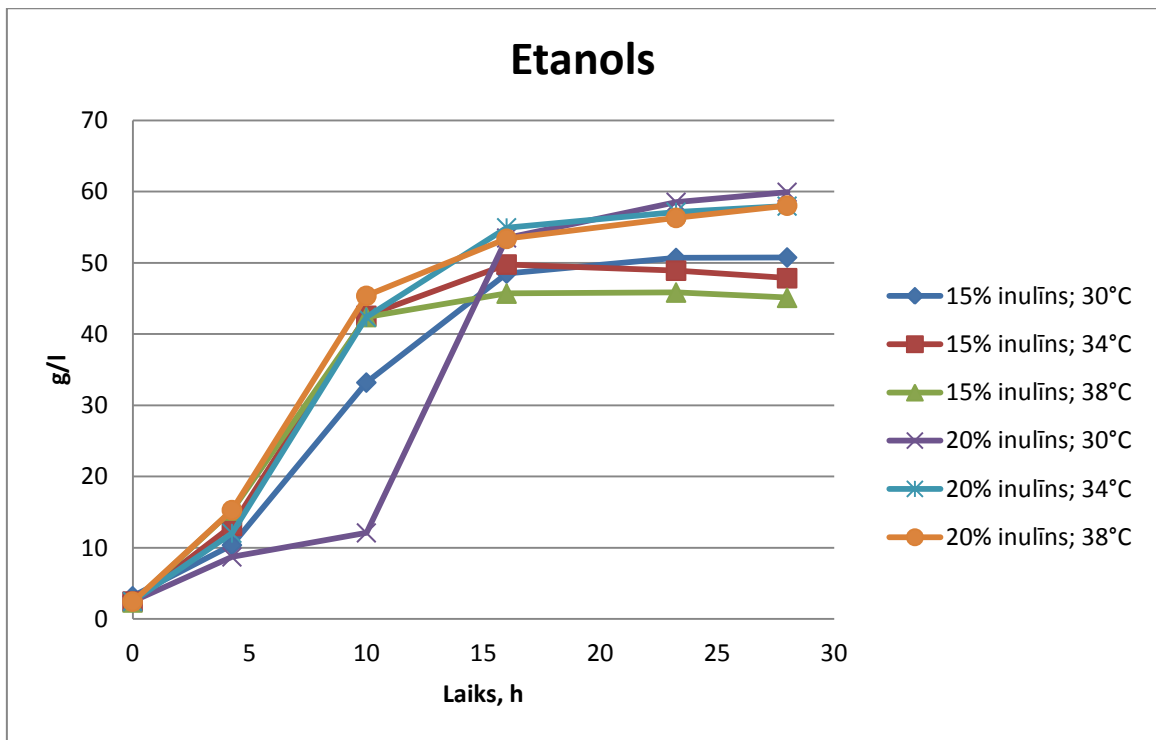
**10.attēls. A:** Atbildes virsmas lauks parāda biomasas iznākumu atkarībā no temperatūras (X2) un inulīna koncentrācijas barotnē (g/l) (X1), fermentācijas 27 stundā. Modeļa vienādojums:  

$$Y_{xs} = -0.105963 + 0.0160844 \cdot X_2 - 0.000285878 \cdot (X_2)^2 - 0.00000695937 \cdot X_1 X_2$$
  
**B:** Eksperimentāli iegūtie atkarīgie mainīgie pret prognozējamiem

**Figure 10. A:** Response surface plot showing biomass results depending on temperature (X2) and inulin concentration (g/l) (X1) changes, in the inulin medium, after 27th hour of fermentation. The model equation:

$$Y_{xs} = -0.105963 + 0.0160844 \cdot X_2 - 0.000285878 \cdot (X_2)^2 - 0.00000695937 \cdot X_1 X_2$$

**B:** The observed versus predicted plot for the values of depended variable

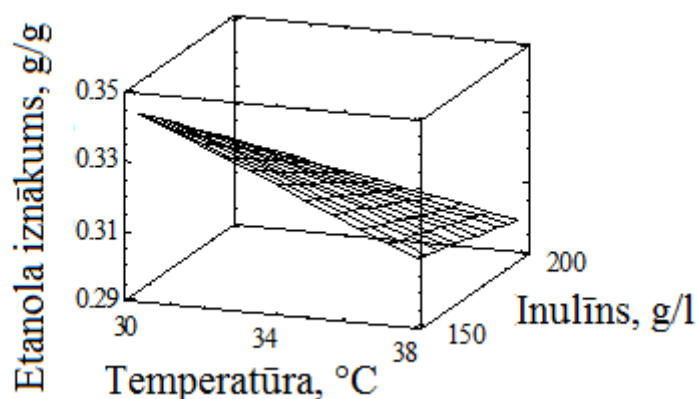


**11.attēls.** *K. marxianus* producētā etanola koncentrācijas pieaugums atkarībā no laika. Sākotnējā inulīna koncentrācija barotnē 150 g/l, 200 g/l. Fermentācijas temperatūra 30°C , 34°C un 38°C, maisīšanas ātrums 400 rpm, pH = 5,0. Aerācija 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

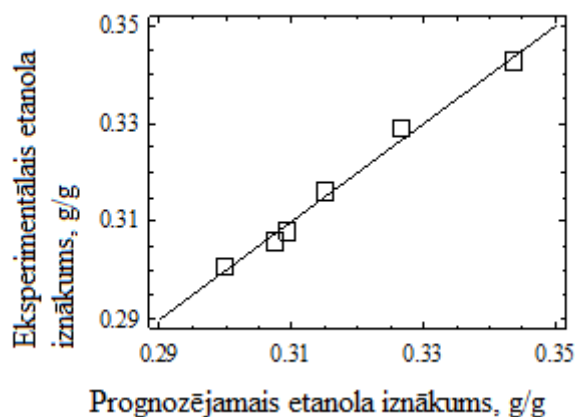
**Figure 11.** *K. marxianus* produced ethanol concentration increase versus time. Inulin medium concentration 150 g/l, 200 g/l. Fermentation temperature 30°C , 34°C un 38°C, stirring speed 400 rpm, pH= 5,0. Aeration 0,2 l·l<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

Līdzīgi, kā iepriekšējā eksperimentā, augstākā etanola koncentrācija fermentācijas beigās tika sasniegta pie augstākām inulīna koncentrācijām (skatīt 11. attēls). Šī sakarība saglabājas arī pie paaugstinātas temperatūras. Savukārt augstākie etanola iznākumi no patērētā substrāta ir pie zemākas temperatūras un zemākas substrāta koncentrācijas. Respektīvi, no etanola iznākuma viedokļa labākie apstākļi etanola biosintēzei būtu inulīna koncentrācija 150 g/l un temperatūra 30°C. Vērojama ir arī abu faktoru mijiedarbība (skatīt 12. attēls). Temperatūras efekts ir izteiktāks pie zemākām substrāta koncentrācijām, savukārt inulīna koncentrācijas efekts uz etanola iznākumu vairāk izpaužas pie zemākas temperatūras.

A



B



**12.attēls. A:** Atbildes virsmas lauks parāda etanola iznākumu no patērētā substrāta atkarībā no temperatūras (X2) un inulīna koncentrācijas barotnē (g/l) (X1), fermentācijas 27 stundā

**B:** Eksperimentāli iegūtie atkarīgie mainīgie pret prognozējamiem. Modeļa vienādojums:

$$Y_{ps} = 0.772654 - 0.00199647 \cdot X1 - 0.0114323 \cdot X2 + 0.0000474627 \cdot X1X2$$

**Figure 12. A:** Response surface plot showing ethanol results depending on temperature (X2) and inulin concentration (g/l) (X1) changes, in the inulin medium, after 27th hour of fermentation

**B:** The observed versus predicted plot for the values of depended variable. The model equation:  $Y_{ps} = 0.772654 - 0.00199647 \cdot X1 - 0.0114323 \cdot X2 + 0.0000474627 \cdot X1X2$

## SECINĀJUMI

1. Inulīna konversijai bioetanolā piemērotākais *K. marxianus* celms ir DSM 5422, jo tas uzrāda labākus etanola un biomasas rādītājus, salīdzinājumā ar *K. marxianus* celmu DSM 5418.
2. Etanola producēšanai optimālā aerācija ir  $0,2 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , savukārt biomasas producēšanai  $1,4 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .
3. Etanola iegūšanai no inulīna rekomendējamā substrāta koncentrācija būtu 150 g/l. Pie zemākas substrāta koncentrācijas ir rūpnieciskam procesam pārāk zema etanola koncentrācija, savukārt pie augstākām substrāta koncentrācijām samazinās etanola iznākums no substrāta.
4. Optimāla fermentācijas temperatūra etanola un biomasas producēšanai ir 30 °C.
5. Fermentācijas temperatūrai ir izteiktāka ietekme uz biomasas augšanu, salīdzinot ar etanola producēšanu.

## PATEICĪBAS

Autore izsaka pateicību Jekaterīnai Lukjaņenko, par darba vadīšanu, konsultācijām un palīdzību metožu apgūvē. Armandam Vīgantam par konsultācijām un Agnesei Kokinai par palīdzību metožu apgūvē.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

Anderson P.J., McNeil K., Watson K. (1986) High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Appl Environ Microbiol* 51:1314 -1320

Banat I.M., Nigam P., Marchant R. (1992) Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. *World J Microbiol Biotechnol* 8:259-263

Banat I.M., Singh D., Marchant R. (1996) The use of a thermotolerant, fermentative *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast strain for ethanol production. *Acta Biotechnol* 16:215-223

Baratti J., Brestic-Goachet N., Favela E., Michel G., Preziosi L. (1988) Ethanol production using *Zymomonas mobilis*. *Energy from Biomass* 4:352-355

Barron N., Marchant R., McHale L., McHale A.P. (1996) Ethanol production from cellulose at 45°C using batch-fed system containing alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *World J Microbiol Biotechnol* 12:103-104

Belem M.A.F., Lee B.H. (1999) Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Proc Biochem* 34:501-509

Board R.G. (1983) *A Modern Introduction to Food Microbiology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

Cazetta M.L., Monti R., Contiero J. (2010) Effects of Culture Conditions on the Production of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Braz. Arch. Biol. Technol*, v.53, n.3:pp. 701-707

Chi Z.M., Chi Z., Zhang T., Liu G., Yue L. (2009) Inulinase- expressing microorganisms and applications of inulinases. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:211-220

Chi Z.M., Zhang T., Cao T.S., Liu X.Y., Cui W., Zhao C.H. (2010) Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology* 102:4295-4303

- Fabre C.E., Duviols V.J., Blanc P.J., Goma G. (1995) Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett* 17:1207-1212
- Ferguson P., Mulholland H., Barron N., Brady D., McHale A.P. (1998) Sucrose-supplemented distillery spent-wash as a medium for production of ethanol at 45°C by free and alginate-immobilized preparations of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Bioproc Eng* 18:257-259
- Fonseca G.G., Gombert A.K., Heinzle E., Wittmann C. (2007) Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Res* 7:422-435
- Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A.K. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:339-354
- Fuchs A., de Bruijn J.M., Nideveld C.J. (1985) Bacteria and yeasts as possible candidates for the production of inulinases and levanases. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol Serol* 51:333-351
- Ge X.Y., Zhang W.G. (2005) A shortcut to the production of high ethanol concentration from Jerusalem artichoke tubers. *Food Technol Biotechnol* 3:241-246
- Gough S., Barron N., Zubov A.L., Lozinsky V.I., McHale A.P. (1998) Production of ethanol from molasses at 45°C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate gels and poly (vinyl alcohol) cryogel. *Bioproc Eng* 19:87-90
- Groeneveld P., Stouthamer A.H., Westerhoff H.V. (2009) Super life- how and why 'cell selection' leads to the fastest-growing eukaryote. *FEBS J.* 276:254-270
- Hahn-Hagerdal B. (1985) Comparison between immobilized *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae* coimmobilized with  $\beta$ -galactosidase, with respect to continuous ethanol production from concentrated whey permeate. *Biotechnol Bioeng* 27:914-916
- Hong J., Wang Y., Kumagai H., Tamaki H. (2007) Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *J Biotechnol* 130:114-123

- Hughes D., Tudrosaen N.J., Moye C.J. (1984) The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett* 6:1-6
- Kadar Z.S., Szengyel Z.S., Reczey K. (2004) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind Crops Prod* 20:103-110
- Kays S.J., Nottingham S.F. (2008) *Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke Helianthus tuberosus L.*, Taylor&Francis Group, LLC
- Lane M.M., Morrissey J.P. (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews* 24:17-26
- Lane M.M., Burke N., Karreman R., Wolfe K.H., O'Byrne C.P., Morrissey J.P. (2011) Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 100:507-519
- Leclercq-Perlat M.N., Corrieu G., Spinnler H.E. (2004) Comparison of volatile compounds produced in model cheese medium deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*. *J Dairy Sci* 87:1545-1550
- Leroy G., Grongnet J.F., Mabeau S., Le Corre D., Baty-Julien C. (2010) Changes in inulin and soluble sugar concentration in artichokes (*Cynara scolymus L.*) during storage. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1203–1209.
- Li S.Z., Chan- Halbrendt C. (2009) Ethanol production in (the) People's Republic of China: Potential and technologies. *Applied Energy* vol.86, s.1, pp: S162-S169
- Lodder J., Kreger-van Rij N.J.W. (1952) *The yeasts: a taxonomic study*. NHPC, Amsterdam
- Love G., Gough S., Brady D., Barron N., Nigam P., Singh D., Marchant R., McHale A.P. (1998) Continuous ethanol fermentation at 45°C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Immobilized in calcium alginate and kissiris. *Bioproc Eng* 18:187-189

Lyons T.P., Kesall D.R., Murtagh J.E. (1995) *The Alcohol Textbook*. Nottingham University Press.

Merico A., Sulo P., Piskur J., Compagno C. (2007) Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J.* 274:976-989

Montenecourt B.S., Demain A.L., Solomon N.A. (1985) *Zymomonas*, a unique genus of bacterium, in *Biology of Industrial Microorganisms*, Benjamin/Cummings Publishing, Menlow Park, Calif., 261

Najafpour G.D., Lim J.K. (2002) Evolution and Isolation of Ethanol Producer Strain SMP-6, Regional Symposium on Chemical Engineering

Onuki Shinnosuke M.S., Koziel J.A., van Leeuwen J.H., Jenks W.S., Grewell D., Cai L. (2008) Ethanol production, purification and analysis techniques: a review. An ASABE meeting presentation, paper number 085136, Rhode Island Convention Center

Pecota D.C., Rajgarhia V., da Silva N.A. (2007) Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *J Biotechnol* 127:408-416

Rausch K.D. and Belyea R.L. (2006) The future of coproducts from corn processing. *Applied Biochem and Biotechnol* 128:47-85

Rogers P.L., Strzelecki A.T., Goodman A.E. (1986). Commercial potential of *Zymomonas* process for ethanol production. *Found. Biotechnol. Industr. Ferm. Res.* 4:63-79

Rouwenhorst R.J., Visser L.E., van der Baan A.A., Scheffers W.A., van Dijken J.P. (1988) Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl and Environ Microbiol* 54:1131-1137

Rouwenhorst R.J., Hensing M., Verbakel J., Scheffers W.A., van Dijken J.P. (1990) Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl and Environ Microbiol* 56:3337-3345

Singh P., Gill P.K. (2006) Production of inulinase: recent advances. *Food Technol Biotechnol* 44:151-162

Szambelan K., Nowak J., Czarnecki Z. (2004) Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. *Biotechnol Lett* 26:845-848

Tin C.S.F., Mawson A.J. (1993) Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. *Proc Biochem* 28:217-221

Viikari L., Berry D.R. (1998) Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 7:237-261

Vincenzi A., Maciel M.J., Burlani E.L., Oliviera E.C., Volpato G., Lehn D.N., Volken de Souza C.F. (2014) Ethanol Bio-Production from Ricotta Cheese Whey by Several Strains of the Yeast *Kluyveromyces*. *American Journal of Food Technology*, 9:281-291

Visser W., Scheffers W.A., Batenburg-van der Vegte W.H., van Dijken J.P. (1990) Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 56:3785-3792

Walker G.M. (1998) *Yeast Physiology and Biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester, UK

Ward C., Nolan A.M., O'Hanlon F., McAree T., Barron N., McHale L., McHale A.P. (1995) Production of ethanol at 45°C on starch-containing media by mixed cultures of the thermotolerant, ethanol-producing yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 and the thermophilic filamentous fungi *Talaromyces emersonii* CBS 813,70. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:408-411

Wittmann C., Hans M., Bluemke W. (2002) Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* 19:1351-1363

Kalniņš A. (2005), *Biodegviela: ražošanas un izmantošanas iespējas Latvijā*. Rīga.

Bakalaura darbs „Fermentācijas apstākļu optimizācija inulīna konversijai bioetanolā, izmantojot raugu *Kluyveromyces marxianus*”, izstrādāts LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Arta Priede

25.05.2015.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Mag. biol. Jekaterīna Lukjaņenko

25.05.2015.

Recenzents: Dr. biol. Reinis Rutkis

25.05.2015.

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē

25.05.2015.

Metodiķe:

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē 01.06.2015.

Vērtējums:

Komisijas sekretāre: