

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

2-FENILETANOLA BIOSINTĒZE AR RAUGU  
*KLUYVEROMYCES LACTIS* LAKTOZI SATUROŠOS  
SUBSTRĀTOS

Bakalaura darbs

Autors: Lidiya Aksjonova

Stud. apl. nr.: la14054

Darba vadītājs: Msc. biol. Kristiāna Kovtuna

Darba recenzents: Dr. biol. Reinis Rutkis

Katedras vadītājs: Dr. habil. biol. Indriķis Muižnieks

RĪGA 2018

## KOPSAVILKUMS

Fermentācijas procesā raugi spēj sintezēt aromātiskus savienojumus, tāpēc fermentācija ar raugiem ir alternatīva metode dabīgā 2-feniletanola iegūšanai.

Darba mērķis bija izpētīt rauga *Kluyveromyces lactis* izmantošanas iespējas 2-feniletanola biosintēzē laktozi saturošos substrātos.

Darbā tika noteikts piemērotākais *K. lactis* celms 2-feniletanola biosintēzei, tika izpēta barotnes sastāva ietekme uz 2-PE producēšanu, 2-PE sintēzes dinamika fermentācijas laikā, *K. lactis* DSM 70799 2-feniletanola tolerance, kā arī tika veikta divfāžu ekstraktīvā fermentācija ar rapšu eļļu.

Darbā tika aplūkoti trīs rūpniecībā izmantojami *K. lactis* celmi, no kuriem *K. lactis* DSM 70799 uzrādīja augstāko 2-feniletanola koncentrāciju. Augstāks 2-PE iznākums tika iegūts audzējot to laktozes barotnē, tāpēc kā substrātu 2-feniletanola producēšanai var izmantot siera sūkalas un piena permeātu, kas satur laktozi. Feniletanols ir toksisks raugiem un šūnu augšanas inhibēšanas sākas, pievienojot 2,04 g/L 2-PE. Toksiskuma samazināšanai un iznākuma palielināšanai var veikt divfāžu ekstraktīvo fermentāciju ar eļļas pievienošanu.

Darba izstrādes laikā apgūtās metodes: raugu kultivēšanas metodes, divfāžu ekstraktīvā fermentācija, biomasas noteikšana ar spektrofotometru un mikroplašu lasītāju – inkubatoru, 2-PE noteikšana ar augstefektīvo šķidrums hromatogrāfijas (*HPLC*) metodi, kā arī cukuru enzimatiskā noteikšana.

Atslēgvārdi: divfāžu fermentācija, 2-feniletanols, 2-feniletanola biosintēze, *Kluyveromyces lactis*, laktoze.

## SUMMARY

The yeasts are capable to synthesize aromatic compounds, therefore fermentation by yeast is an alternative method for the production of natural 2-phenylethanol.

The aim of this work was to investigate the use of yeast *Kluyveromyces lactis* in the biosynthesis of 2-phenylethanol in lactose containing medium.

We determined the most suitable *K. lactis* strain for 2-phenylethanol biosynthesis, investigated the effect of medium composition on 2-PE production, dynamics of 2-PE synthesis during fermentation, *K. lactis* DSM 70799 2-phenylethanol tolerance, and two-phase extractive fermentation with rapeseed oil was performed.

In this work three industrially used *K. lactis* strains were used. From these strains *K. lactis* DSM 70799 produced the highest 2-phenylethanol concentration. The higher 2-PE concentration was obtained in lactose medium, therefore, as a substrate for the production of 2-phenylethanol, can be used lactose containing cheese whey and milk permeate. Phenylethanol is toxic to yeasts and inhibition of cell growth begins by adding 2,04 g/L of 2-PE. To reduce the toxicity and increase the amount of produced 2-PE, two-phase extractive fermentation with the addition of oil can be performed.

Methods mastered during the research: yeast cultivation methods, two-phase fermentation, biomass determination with spectrophotometer and multimode micro plate reader – incubator, determination of 2-PE with HPLC chromatograph and enzymatic determination of sugars.

Key words: lactose, *Kluyveromyces lactis*, 2-phenylethanol, 2-phenylethanol biosynthesis, two-phase fermentation.

## SATURS

KOPSAVILKUMS .....	2
SUMMARY .....	3
SATURS .....	4
IEVADS .....	5
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	6
1.1. <i>Kluyveromyces</i> spp. ....	6
1.1.1. <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	6
1.2. Feniletanols.....	7
1.2.1. Feniletanols dabiskajos avotos .....	8
1.2.2. Feniletanola ķīmiskā sintēze.....	8
1.2.3. Feniletanola biotehnoloģiskā ražošana .....	9
1.2.4. Feniletanolu producējošie mikroorganismi .....	10
1.3. Laktozi saturoši substrāti .....	11
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	13
2.1. Materiāli .....	13
2.1.1. Mikroorganismu celmi .....	13
2.1.2. Laboratorijas trauki.....	13
2.1.3. Materiāli .....	13
2.1.4. Iekārtas.....	14
2.1.5. Reāģenti .....	14
2.1.6. Barotnes .....	14
2.2. Metodes .....	15
2.2.1. Sējmateriāla sagatavošana .....	15
2.2.2. Fermentācija.....	15
2.2.3. Divfāžu ekstraktīvā fermentācija ar rapšu eļļu .....	16
2.2.4. Biomasas noteikšana ar spektrofotometru .....	16
2.2.5. Mikroorganismu kultivēšana un biomasas noteikšana ar mikroplašu lasītāju – inkubātoru.....	16
2.2.6. Cukuru enzimatiskā noteikšana .....	17
2.2.7. 2-feniletanola noteikšana ar augstefektīvo šķidrums hromatogrāfijas metodi (HPLC – HighPerformanceLiquidChromatography) .....	18
2.2.8. Datu analīze .....	18
3. REZULTĀTI .....	19
4. DISKUSIJA .....	26
SECINĀJUMI .....	30
PATEICĪBAS.....	31
LITERATŪRAS SARAKSTS .....	32

## IEVADS

2-feniletanols (2-PE) ir ķīmiskais savienojums, kam piemīt rožu ziedlapu smarža. Pateicoties savai smaržai 2-feniletanols ir viena no plašāk pielietojamām smaržvielām dažādās rūpniecības nozarēs – to izmanto parfimērijas, kosmētikas līdzekļu un pārtikas produktu ražošanā. 2-PE ir iespējams sintezēt ķīmiski un iegūt dabiskā veidā no augu ziedu ēteriskām eļļām. Ķīmiski ražotā 2-feniletanola izmantošana pārtikas produktos un kosmētikas līdzekļos ir ierobežota, jo sabiedrībā pieaug pieprasījums pēc dabiskās izcelsmes produktiem, bet dabisko 2-PE no ziedu ēteriskām eļļām nav iespējams iegūt lielos daudzumos un produkta iegūšanas process ir dārgs, tāpēc ir jāmeklē alternatīvas dabiskā 2-feniletanola iegūšanai (Etschmann *et al.* 2002; Scognamiglio *et al.* 2012).

Dabīgā veidā 2-feniletanolu var iegūt fermentācijā, izmantojot mikroorganismus. Galvenie mikroorganismi, kas spēj producēt 2-PE ir raugi. Tie sintezē 2-feniletanolu Erliha ceļā, kā prekursoru izmantojot aminoskābi L-fenilalanīnu, taču tas sadārdzina šo procesu.

*Kluyveromyces* ģints raugi spēj producēt dažādus aromātiskus savienojumus, tajā skaitā arī 2-feniletanolu. *Kluyveromyces lactis* ir viena no 2-feniletanolu producējošām rauga sugām. Raugam ir piešķirts GRAS statuss, kas ļauj to droši izmantot biotehnoloģijā. *K. lactis* spēj fermentēt laktozi, un šī īpašība tiek uzskatīta par priekšrocību, salīdzinot ar citām rauga sugām. Kā substrātu 2-feniletanola biosintēzei var izmantot siera ražošanas blakusproduktus – siera sūkalas un piena permeātu, kas ir ar zemu ekonomisko vērtību, taču satur laktozi lielās koncentrācijās. Lai nodrošinātu ekonomiski pamatotu 2-feniletanola rūpniecisku biotehnoloģisku ražošanu, nepieciešams atrisināt virkni problēmu, kas sevī ietver mērķprodukta palielināšanu un izejmateriālu izmaksu samazināšanu.

Darba mērķis – izpētīt rauga *Kluyveromyces lactis* spēju sintezēt 2-feniletanolu, izmantojot laktozi saturošos substrātos.

Darba uzdevumi:

1. Salīdzināt *K. lactis* DSM 70799, DSM 4394 un DBVPG 6829 celmu spējas producēt 2-feniletanolu.
2. Noteikt oglekļa avota veida ietekmi uz producētā 2-feniletanola biosintēzes parametriem.
3. Novērtēt oglekļa avota un L-fenilalanīna koncentrācijas ietekmi uz 2-PE producēšanu.
4. Noteikt 2-feniletanola sintēzes dinamiku fermentācijas laikā.
5. Noteikt *K. lactis* 2-feniletanola toleranci.
6. Salīdzināt 2-PE iznākumu parastajā un divfāžu ekstraktīvā fermentācijā.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. *Kluyveromyces* spp.

*Kluyveromyces* ģinti pirmo reizi aprakstīja van der Walt 1956. gadā (van der Walt 1956). Pašlaik *Kluyveromyces* spp. tiek klasificēta sešās sugās - *K. marxianus*, *K. lactis*, *K. dozhanskii*, *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* un *K. wickerhamii*. *K. lactis* tiek iedalīts divās varietātēs: *lactis* un *drosophilarum*. Visām sešām sugām no *Kluyveromyces* spp. ir kopīgas morfoloģiskās un fizioloģiskās īpašības. *Kluyveromyces* spp. pieder pie asku sēnēm (*Ascomycota*), tie vairojas, veidojot askus, kas satur no vienas līdz četrām askusporām. Kopīgas fizioloģiskas iezīmes visām sešām sugām ir spēja asimilēt galaktozi, utilizēt kadaverīnu, L-lizīnu un etilamīnu kā slāpekļa avotu (Belloch *et al.* 2011).

*Kluyveromyces* spp. ir piešķirts GRAS (*Generally Recognized As Safe*) statuss, kas ļauj izmantot šos raugus rūpnieciskajā ražošanā (Witmann *et al.* 2002). *Kluyveromyces* spp. plaši izmanto biotehnoloģijā etanola, raugu biomasas un pienskābes ražošanā no siera sūkalām, kas ir siera ražošanas blakusprodukts (Mahmood 2015). *Kluyveromyces* spp. ir Krebtri-negatīvi raugi. Krebtri efekts ir parādība, kad augstajās glikozes un skābekļa koncentrācijās notiek fermentācija nevis elpošana. Krebtri-pozitīviem raugiem, piemēram, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentācija notiek pat pilnībā aerobos apstākļos. *Kluyveromyces* spp. ir Krebtri-negatīvi raugi, kas nozīmē, ka pat augstajās glikozes koncentrācijās un aerobos apstākļos tie iegūst enerģiju caur elpošanu un neproducē etanolu. Pateicoties šādai īpašībai, *Kluyveromyces* spp. spēj strauji palielināt biomasu un augt lielā šūnu blīvumā, ja tos pavairo aerobajos apstākļos rūpnieciskajās barotnēs ar augstu cukuru koncentrāciju (González-Siso *et al.* 2000; Liti *et al.* 2001; Souto-Maior *et al.* 2009). *Kluyveromyces* spp. producē dažādus aromātiskus savienojumus, piemēram, esterus, karbonskābes, ketonus, furānus, spirtus u.c. savienojumus. Komerciāli nozīmīgākais savienojums, ko producē *Kluyveromyces* spp., ir 2-feniletanols, kam piemīt rožu smarža (Fonseca *et al.* 2008).

### 1.1.1. *Kluyveromyces lactis*

*Kluyveromyces lactis* sugai ir divas varietātes – *K. lactis* var. *lactis* un *K. lactis* var. *drosophilarum*. Taksonomiskā atšķirība starp varietātēm ir balstīta uz to fizioloģiskām un ekoloģiskām īpašībām (Naumova *et al.* 2004). Galvenā atšķirība starp varietātēm ir tāda, ka *K. lactis* var. *drosophilarum* nespēj fermentēt laktozi, atšķirībā no *K. lactis* var. *lactis*, kam ir nepieciešamie gēni laktozes fermentācijas norisei (Naumov *et al.* 2006).

*K. lactis*, tāpat kā *K. marxianus*, ir laktozi fermentējošs raugs. To bieži izolē no piena produktiem, tādiem kā fermentēts piens, siers, jogurts (Lane and Morrissey 2010). *K. lactis* spēj asimilēt laktozi pateicoties laktozes permeāzei, kuru kodē LAC12 gēns, un  $\beta$ -galaktozidāzei, kuru kodē LAC4 gēns. Šo gēnu klātbūtne ļauj raugam uzņemt laktozi un hidrolizēt to līdz glikozei un galaktozei. (Gellissen and Hollenberg 1997; Gombert *et al.* 2016; Rubio-Teixeira 2006). Pēc laktozes hidrolīzes glikoze tiek iesaistīta glikolīzē, bet galaktoze tiek metabolizēta Leloir ceļā (Yadav *et al.* 2015). Leloir ceļš ir enzimatisku reakciju virkne, kuru rezultātā veidojas glikozes-1-fosfāts (Seiboth *et al.* 2007).

*K. lactis* spēj augt arī uz tādiem cukuriem kā glikoze, saharoze un maltoze. Šis raugs nespēj augt strikti anaerobos apstākļos (Rodicio and Heinisch 2013). *K. lactis* ir respirofermentatīvs raugs, un spēj iegūt enerģiju caur oksidatīvo fosforilēšanu Krebsa ciklā vai fermentatīvi. *K. lactis* klasificē kā Krebtri-negatīvu raugu, jo aerobos apstākļos tas dod priekšroku metabolismam caur Krebsa ciklu un enerģijas iegūšanai caur elpošanu, bet šī rauga genomā ir gēni, kas nepieciešami Krebtri efekta norisei un etanola producēšanai (Gombert *et al.* 2016; González-Siso *et al.* 2000; Lane and Morrissey 2010).

*K. lactis* plaši izmanto biotehnoloģijā, it īpaši proteīnu producēšanā (Spohner *et al.* 2016). Šis raugs producē gan intracelulāros, gan sekretētos proteīnus, un pateicoties tam, ka *K. lactis* ir piešķirts GRAS statuss, šos proteīnus pielieto pārtikas rūpniecībā un farmācijā. *K. lactis* ir nozīmīgs laktāzes jeb  $\beta$ -galaktozidāzes producētājs.  $\beta$ -galaktozidāze ir enzīms, kas hidrolizē laktozi, tāpēc to izmanto bezlaktozes produktu ražošanā. Komerciāli nozīmīgi proteīni, kurus producē, izmantojot *K. lactis*, ir arī liellopu himozīns, ko izmanto siera ražošanā, inulināze un fosfolipāze B (Ooyen *et al.* 2006; Pereira-Rodríguez *et al.* 2012; Spohner *et al.* 2016).

## 1.2. Feniletanols

2-feniletanols (2-feniletilspirts,  $\beta$ -feniletilspirts, fenetilspirts, benzil karbinols; saīsināti 2-PE) ir augstākais spirts, kam piemīt rožu ziedlapu smarža. Ķīmiskā formula  $C_8H_{10}O$ . Pateicoties savai smaržai, 2-feniletanols ir viena no visbiežāk izmantojamām un viena no komerciāli svarīgākajām smaržvielām, ko izmanto dažādās rūpniecības nozarēs. Rožu smarža ir plaši pielietojama un pieprasīta, tāpēc 2-PE kā aromatizētāju lielos daudzumos izmanto smaržu (parfīmērijas), dekoratīvās kosmētikas, šampūnu, ziepju, kā arī sadzīves tīrīšanas un mazgāšanas līdzekļu ražošanā. (Etschmann *et al.* 2002; Wang *et al.* 2013; Scognamiglio *et al.* 2012). 2-PE ir atrodams sierā, vīnā, maizē un olīveļļā. 2-PE ir galvenais savienojums, kas piešķir smaržu vīnam un alum, ka arī augļiem un dārzeņiem. To izmanto saldējuma un citu

saldumu pagatavošanā kā aromatizētāju. Vērtīgi aromātiskie savienojumi ir arī 2-feniletanola esteri, piemēram, feniletilacetāts (Chen *et al.* 2011; Etschmann *et al.* 2002; Mameeva *et al.* 2008). 2-PE tiek izmantots kā izejviela citu aromātisko vielu sintēzei un atvasinājumu ražošanai. Šie atvasinājumi tiek izmantoti medikamentu, kā arī augsta blīvuma degvielas ražošanā (Wang *et al.* 2013; Etschmann *et al.* 2002).

### 1.2.1. Feniletanols dabiskajos avotos

Augi spēj sintezēt 2-PE dabiskā ceļā. Tas ir sastopams hiacinšu, narcīšu un jasmīnu ēteriskajās eļļās, bet 2-PE koncentrācija ziedos parasti ir zema. Lielākās koncentrācijās 2-PE ir sastopams rožu ēteriskajā eļļā. Atkarībā no rožu šķirnes 2-PE koncentrācija rožu eļļā var sasniegt līdz 60%. 2-PE augiem piešķir ne tikai smaržu – tam piemīt antimikrobiālās īpašības, kā arī tam ir nozīme augu vairošanās procesā, jo pateicoties raksturīgajai vielas smaržai, tiek pievilināti kukaiņi, kas apputeksnē augus. Pārtikas produkti, kurus iegūst fermentācijas rezultātā, arī satur 2-feniletanolu. Tādi produkti ir, piemēram, maize, vīns, siers un sojas mērce. (Etschmann *et al.* 2002; Chen *et al.* 2011).

2-feniletanolsaugos sintezējas no L-fenilalanīna, kas ir prekursors 2-PE biosintēzei. Specifisks enzīms piridoksal-5`-fosfāt-atkarīgā aromātisko aminoskābju dekarboksilāze (AADC) pārvērš L-fenilalanīnu fenilacetaldehīdā (PAld), kas, darbojoties fenilacetaldehīd reduktāzēm, tālāk tiek pārvērsts 2-feniletanolā (Chen *et al.* 2011; Hirata *et al.* 2012).

2-feniletanola ekstrakcija no augiem ir ļoti dārga. Dabiskais 2-PE ir 250 reizes dārgāks par ķīmiski ražotu 2-PE. Tā kā dabiskās izcelsmes feniletanola iegūšana ir dārgs process, iegūtais savienojuma daudzums ir neliels un to nav iespējams iegūt rūpnieciskos mērogos, tāpēc lielākā daļa 2-feniletanola tiek ražota ķīmiski (Hwang *et al.* 2009; Mei *et al.* 2009).

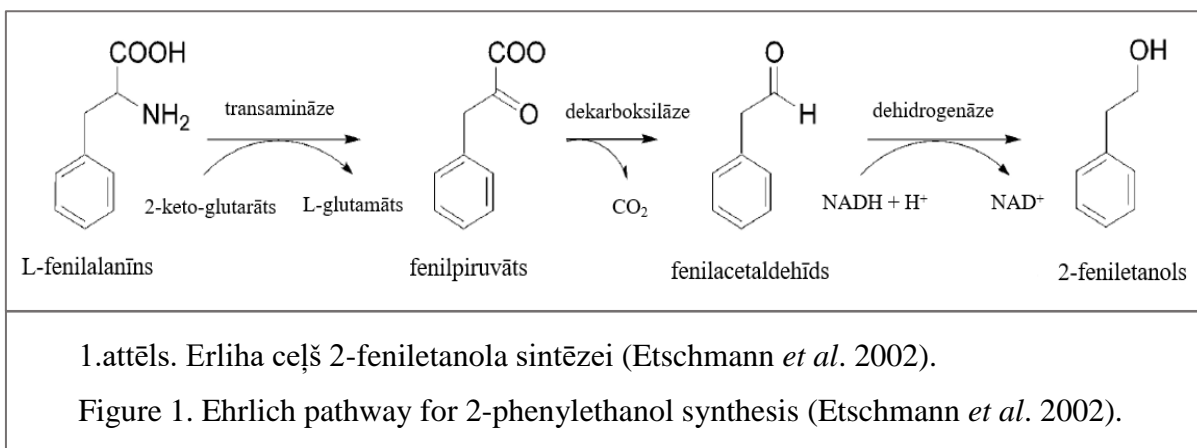
### 1.2.2. Feniletanola ķīmiskā sintēze

Pašlaik 2-PE sintēzei tiek izmantotas trīs komerciāli nozīmīgas ķīmiskās reakcijas:(1) Frīdela-Krafta reakcija, kur etilēnoksīds reaģē ar benzolu alumīnija hlorīda klātbūtnē; (2) stirola oksīda katalītiskās reducēšanas reakcija;(3) propilēnoksīda veidošanās reakcija, kur 2-PE veidojas kā blakusprodukts (Etschmann *et al.* 2002). Ķīmiski ražots 2-PE ir daudz lētāks nekā dabiski producēts 2-PE, kas iegūts no augiem, bet ķīmiskajos procesos rodas problēmas ar produkta attīrīšanu. Lai iegūtu augstākās kvalitātes 2-PE, tas ir jāattīra no nevēlamiem blakusproduktiem, kas var pasliktināt 2-PE organoleptiskās īpašības. Šis attīrīšanas process bieži vien ir dārgs un tas ir viens no 2-PE ķīmiskās ražošanas trūkumiem. Kā arī feniletanola sintēzei izmantojamās izejvielas ir bīstamas apkārtējai videi un cilvēka veselībai (Mei *et al.*

2009; Etschmann *et al.* 2002). Kaut arī no ķīmijas viedokļa no dabiskiem avotiem iegūtais feniletanols neatšķiras no ķīmiski sintezētās molekulas, priekšroka ir tomēr 2-PE, kas iegūts dabiski, jo tirgū ir liels pieprasījums pēc precēm un vielām, kam ir dabiska jeb organiska izcelsme. Visvairāk tas attiecas uz pārtikas produktiem un kosmētikas līdzekļiem, jo patērētājiem ir svarīgi, lai šiem produktiem pievienotās piedevas būtu dabiskas. Tā kā dabiski veidotais 2-PE ir dārgs un to ir grūti iegūt lielos daudzumos, bet ķīmiski sintezēta 2-PE ražošana var kaitēt cilvēka veselībai un videi, ir jāmeklē alternatīvie 2-PE iegūšanas ceļi (Serra *et al.* 2005; Mei *et al.* 2009; Etschmann *et al.* 2002).

### 1.2.3. Feniletanola biotehnoloģiskā ražošana

Biotehnoloģijas metodes ir alternatīvs veids dabiska 2-feniletanola iegūšanai. Galvenā biotehnoloģiskā metode 2-PE ražošana ir fermentācija, izmantojot raugus. Raugi sintezē 2-PE normālā metabolisma rezultātā, bet savienojuma gala koncentrācija ir zema. Lai iegūtu lielāku 2-PE iznākumu, fermentācijas barotnēm pievieno aminoskābi L-fenilalanīnu, kas ir slāpekļa avots un prekursors 2-feniletanola biosintēzei. 2-PE veidošanās no L-fenilalanīna raugos notiek caur Erliha ceļu (Hwang *et al.* 2009). Liels 2-PE daudzums veidojas, ja fermentācijas barotnē L-fenilalanīns ir vienīgais slāpekļa avots. 2-PE biosintēze raugos caur Erliha ceļu notiek trijos galvenajos enzimatiskajos posmos. Pirmajā posmā L-fenilalanīns tiek transaminēts fenilpiruvātā. Tālāk fenilpiruvāts tiek dekarboksilēts līdz fenilacetaldehīdam, reakciju katalizē fenilpiruvāta dekarboksilāze. Trešajā Erliha ceļa posmā fenilacetaldehīds tiek reducēts 2-feniletanolā, to katalizē dehidrogenāze. Saražotais 2-PE tālāk var būt pārvērsts fenilaldehīdā un fenilacetātā. Šo spirta veidošanos no aminoskābes pirmo reizi aprakstīja Erlihs 1907. gadā (Wittmann *et al.* 2002; Etschmann *et al.* 2002; Hua and Xu 2011; Lyubomirov Ivanov *et al.* 2013). 2-feniletanols var būt sintezēts ne tikai L-fenilalanīna biokonversijas ceļā, bet arī var būt veidots *de novo* sintēzes rezultātā. *De novo* sintēze notiek caur Šikimāta ceļu: eritrozo-4-fosfāts (erythrose-4-phosphate), kas veidojas glikolīzes rezultātā, un fosfoenolpiruvāts, kas veidojas pentožu fosfāta ceļā, tiek pārvērsti fenilpiruvātā. Tālāk fenilpiruvāts tiek dekarboksilēts līdz fenilacetaldehīdam un dehidrogenēts līdz 2-feniletanolam. Feniletanola biosintēze *de novo* caur Šikimāta ceļu nav efektīva, jo glikolīzi un pentožu fosfāta ceļu raugi izmanto galvenokārt šūnu augšanai nevis 2-PE sintēzei. Tāpēc šajā ceļā izveidotā 2-PE daudzums ir mazs un ir atkarīgs no šūnu augšanas. Caur Erliha ceļu ir iespējams iegūt lielāku feniletanola iznākumu, salīdzinot ar Šikimāta ceļu (Angelov and Gotcheva 2012; Etschmann *et al.* 2002).



#### 1.2.4. Feniletanolu producējošie mikroorganismi

2-feniletanolu spēj producēt baktērijas *Microbacterium* sp. un *Brevibacterium linens* (Jollivet *et al.* 1992), sēnes *Phellinus igniarius*, *P. laevigatus*, *P. tremulae* (Collins 1978), *Ischnoderma benzoinum* (Fabre *et al.* 1998), *Geotrichum penicillatum* (Janssens *et al.* 1988), bet saražotā feniletanola daudzums ir mazs: *I. benzoinum* -280 mg/l feniletanola 20 dienās, *G. penicillatum* – 0,0142 mg/l 99 h laikā (Etschmann *et al.* 2002). 2-feniletanolu spēj producēt arī *Aspergillus niger* – celms CMICC 298302 spēj producēt 1,375 2-PE 9 dienās no 6 g/l L-fenilalanīna (Lomascolo *et al.* 2001).

Galvenie feniletanolu producējošie mikroorganismi ir raugi. Šo mikroorganismu izmantošana 2-PE ražošanā ir izdevīga, jo nav nepieciešama dārga un sarežģīta produkta attīrīšana, jo 2-PE ir raugu metabolīts, kas tiek sintezēts un izdalīts fermentācijas vidē (Mameeva *et al.* 2008). 2-feniletanolu spēj producēt daudzi raugi, bet produkta iznākuma daudzums dažādām ģintīm, sugām un celmiem atšķiras. Feniletanola biosintēzi ietekmē fermentācijas apstākļi: temperatūra, pH, aerācija, kratīšanas amplitūda, kā arī izmantojamā substrāta veids un koncentrācija (Querol and Fleet 2006). Saražotā 2-PE daudzums ir atkarīgs no barības vielām, kas tiek izmantoti fermentācijas laikā, visvairāk tas attiecas uz slāpekļa avotiem (Etschmann *et al.* 2002). Ir izpētīts, ka *K. lactis*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *Pichia anomala*, *P. fermentans*, *P. membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Clavispora lusitaniae*, *Schizosaccharomyces pombe* dažādos kultivēšanas apstākļos spēj sintezēt 453 mg/l līdz 1,7 g/l 2-feniletanola. Pašlaik nozīmīgākie un biežāk izmantojamie 2-PE producētāji ir *S. cerevisiae* un *K. marxianus* (Huang *et al.* 2000; Etschmann *et al.* 2002; Mameeva *et al.* 2008). Kultivējot *S. cerevisiae* ar piebarošanu, tas spēj producēt 4,5 g/l 2-feniletanola, kā galveno izejvielu izmantojot L-fenilalanīnu (Eshkol *et al.* 2009).

2-feniletanols ir raugiem toksisks savienojums. Uzkrājoties barotnē fermentācijas laikā, tas inhibē sūnu augšanu un tāpēc tiek kavēta arī tālākā feniletanola sintēze. 2-PE iedarbojas uz

rauga šūnu plazmatisko membrānu, bojā to, samazina cukuru un aminoskābju uzņemšanu, samazina elpošanas spējas. Dažādiem mikroorganismiem feniletanols ir toksisks dažādos daudzumos. *K. marxianus* augšanu pilnīgi inhibē 2,0 g/l 2-PE. Savukārt raugam *S. cerevisiae* tādā pašā efektu izraisa 4,0 g/l 2-PE (Eshkol *et al.* 2009; Etschmann *et al.* 2002; Fabre *et al.* 1998). Lai ražošanas procesā iegūtu lielāku produkta iznākumu, ir nepieciešams samazināt feniletanola toksisko iedarbību uz rauga šūnām. To var panākt ar feniletanola atdalīšanu no fermentācijas vides. Šim mērķim biotehnoloģijā tiek izmantotas dažādas *in situ* produkta aizvākšanas (ISPR - *in situ* product removal) metodes, kas pamatojas uz ātru produkta aizvākšanu no producējošām šūnām produkta sintēzes laikā, tādējādi novēršot produkta mijiedarbību ar šūnām un barotnes komponentiem. Viena no ISPR metodēm, ko var pielietot feniletanola aizvākšanai no fermentācijas vides, ir ekstrakcijas fermentācija ūdensorganiskajā divfāžu sistēmā. Šī metode pamatojas uz feniletanola hidrofobitāti (Stark *et al.* 2003). Rauga šūnas un substrāts atrodas ūdens fāzē, bet feniletanols uzkrājas citā fāzē, kas nesavienojas ar ūdens fāzi. Šī fāze parasti ir organisks šķīdinātājs, kurā produkts šķīst labāk nekā ūdens fāzē. Grūtības var rasties organiskā šķīdinātāja izvēlē, jo tam jāpiemīt noteiktām īpašībām – tam ir jābūt ar labām ekstrakcijas spējām un ar zemu šķīdību ūdens fāzē, blīvumam ir jābūt atšķirīgam no ūdens fāzes blīvuma, ir jābūt ķīmiski stabilam un mikroorganismiem netoksiskam, kā arī svarīgi ir ekonomiskie aspekti un izmantošanas spējas (Lemos *et al.* 2017).

### 1.3. Laktozi saturoši substrāti

Biotehnoloģijā fermentācijas procesiem tiek izmantoti dažādi substrāti. Liela uzmanība tiek pievērsta blakusproduktiem, kas lielos daudzumos kā atkritumi tiek iegūti rūpniecībā, un kurus var izmantot kā substrātus vērtīgu produktu iegūšanai.

Laktoze ir potenciāls substrāts bioetanola ražošanai (Liu *et al.* 2016). Lielu daudzumu laktozes satur siera sūkalas, kas ir siera un kazeīna ražošanas blakusprodukts (Parashar *et al.* 2016).

Sūkalas ir šķidrums, kas tiek atdalīts no siera pēc piena koagulācijas (Suárez *et al.* 2009). Sūkalas satur apmēram 80-90% no kopējā piena daudzuma, kā arī saglabā 50% uzturvielu no sākotnējā piena (Bylund 1995). Sūkalu galvenās sastāvdaļas ir laktoze (4-5%, w/v) un proteīni (0,8-0,9%, w/v) (Patel 1983). To sastāvā ir arī tauki (0,4-0,5% w/v) un minerālie sāļi (8-10% w/v) (Guimarães *et al.* 2010). Atkarībā no procesa, ko izmanto kazeīna precipitācijai, sūkalas var iedalīt divās grupās: saldās sūkalas (pH 6-7), kuras iegūst, ražojot

cietos sierus, un skābās sūkalas ( $\text{pH} < 5,0$ ), kas veidojas, ražojot biezpienu (González Siso 1996; Guimarães *et al.* 2010).

Ražojot 1 kg siera, tiek iegūts apmēram 9 kg sūkalu (Kosikowski 1979). Apmēram 50% no visa pasaulē saražotā sūkalu daudzuma tiek apstrādāta un pārveidota dažādos pārtikas produktos (González-Siso 1996). Sūkalu žāvēšanas procesā tiek iegūti siera sūkalu pulveri, kurus galvenokārt izmanto dzīvnieku barošanai, kā arī tie tiek pievienoti tādiem pārtikas produktiem kā saldējumi, kūkas, piena izstrādājumi. Pārtikā izmanto arī sūkalu proteīnus, kurus atdala no sūkalām ultrafiltrācijas vai diafiltrācijas rezultātā (Guimarães *et al.* 2010). Ultrafiltrācijas rezultātā veidojas arī sūkalu permeāts (Robinson 1994). Sūkalu permeāts ir šķidrums, kas veidojas ultrafiltrācijas procesā, atdalot proteīnus no sūkalām. Tas satur laktozi, sāļus, NPN (slāpekli saturoši savienojumi, kas nav proteīni) un ūdeni (Parashar *et al.* 2016). Savukārt piena permeāts, kas pēc sastāva ir līdzīgs sūkalu permeātam, tiek iegūts koncentrējot pienu, ar ultrafiltrācijas palīdzību, pirms siera ražošanas. Piena permeāta galvenā sastāvdaļa ir laktoze, kā arī tas satur minerālus, vitamīnus, sūkalu proteīnus un ūdeni (Wang *et al.* 2009).

Siera sūkalas tiek uzskatītas par atkritumproduktiem. Tā ir liela vides problēma, jo katru gadu tiek saražoti ievērojams daudzums siera sūkalu un tās ir nepieciešams utilizēt. Siera sūkalas, sūkalu un piena permeātssaturdaudz organisko vielu (Mostafa 2001). Šiem produktiem ir augsts bioloģiskā skābekļa patēriņš (BSP5, skābekļa daudzums, kādu aerobās baktērijas patērē notekūdeņos esošo organisko vielu oksidēšanai piecās dienās) un augsts ķīmiskā skābekļa patēriņš (ĶSP skābekļa daudzums, kāds nepieciešams notekūdeņos esošo organisko vielu oksidēšanai ar stipru ķīmisko oksidētāju) augstā laktozes satura dēļ. Siera sūkalām BSP ir 30-50 g L<sup>-1</sup> un ĶSP ir 60-80 g L<sup>-1</sup> (Guimarães *et al.* 2010). Savukārt sūkalu permeāta BSP ir 40-48 g L<sup>-1</sup> un ĶSP ir 80-95 g L<sup>-1</sup> (Parashar *et al.* 2016). Līdzīgi kā sūkalupermeātam, arī piena permeātām BSP un ĶSP vērtības ir lielas, līdz ar to tie ir ievērojami apkārtējās vides piesārņotāji (Parashar *et al.* 2016; Wang *et al.* 2009).

Pašlaik tiek meklēti jaunas alternatīvassūkalu un permeāta pielietošanai, lai samazinātu slodzi uz apkārtējo vidi. Viena no alternatīvām ir fermentācijas procesi, kur siera sūkalas un permeātu izmanto kā laktozi saturošus substrātus. Tādā veidā no lēta substrāta, kas ir kaitīgs apkārtējai videi, ir iespējams iegūt komerciāli vērtīgus produktus, tādus kā etanols, biogāze, organiskās skābes, aminoskābes, vitamīni, polisaharīdi, enzīmi un citi bioprodukti, kuru ražošanai tiek izmantoti mikroorganismi, kas spēj fermentēt laktozi no siera sūkalām. (Rubio-Teixeira 2006; Guimarães *et al.* 2010). Piemēram, *Kluyveromyces* spp. izmanto etanola iegūšanai no siera sūkalu laktozes, bet etanola iznākums parasti ir zems 2,5 līdz 4,2% (vol/vol) (Parashar *et al.* 2016).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Mikroorganismu celmi

- *Kluyveromyces lactis* DSM 70799, DSM 4394 iegūti no Leibniz-Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Vācijā, DBVPG 6829 iegūts no Industrial Yeast Collection DBVPG – Department of Agricultural, Food and Environmental Science, University of Perugia.

#### 2.1.2. Laboratorijas trauki

- Erlenmeijera kolbas ar vates aizbāžņiem (50 mL, 300 mL)
- Vārglāzes
- Mērcilindri
- Mēģenes ar vates aizbāžņiem
- Stikla nūjiņa
- Pipetes (20 µL, 1000 µL, 5 mL, 10 mL)
- Daudzkanālu pipetes (100 µL, 300 µL)

#### 2.1.3. Materiāli

1.tabula  
Laboratorijas materiāli.  
Table 1  
Laboratory tools.

Materiāla nosaukums	Ražotājs	Ražotājvalsts
Akrila kivetes	Sarstedt	Vācija
Polistirola kivetes		
Stobriņi (15 mL, 50 mL)		
Mikrostobrini (1 mL)		
96-lauciņu plate		

#### 2.1.4. Iekārtas

2.tabula  
Laboratorijas iekārtas.  
Table 2  
Laboratory equipment.

Iekārtas nosaukums	Ražotājs	Ražotājvalsts
Svari	BOECO	Vācija
Magnētiskais maisītājs	Biosan MSH 300	Latvija
Analītiskie sviri	BOECO	Vācija
Vorteks	Biosan Microspin FV-2400	ASV
UV laminārs	FlowFast V	Itālija
Spektrofotometrs	Biochrom Libra S22	Anglija
Termostats kratītājs	Biosan ES 20	Latvija
Centrifūga 2	Eppendorf 5810 R	Vācija
Autoklāvs	Sonyo Labo Autoclave	Japāna
Mikroplašu lasītājs – inkubātors	Tecan Infinite 200 pro	Šveice
HPLC hromatogrāfs	Agilent 1100	ASV

#### 2.1.5. Reāģenti

Rauga ekstrakts iegādāts no Biolife (Itālija), L-fenilalanīns no Redwells Group (Lielbritānija). Pārējie reāģenti iegādāti no Sigma-Aldrich.

#### 2.1.6. Barotnes

Barotņu pagatavošanai visus nepieciešamos reāģentus nosver, ieber vārglāzē un izšķīdina destilētajā ūdenī. Barotnes autoklavē. Cukuru šķīdumus pagatavo atsevišķi, autoklavē un tad pievieno pārējai barotnei.

3.tabula  
YPD barotne celmu uzturēšanai.  
Table 3  
YPD medium for maintenance of cultures.

Reāģents	Svars (g/L)
Rauga ekstrakts	10,0
Peptons	20,0
Agars	18,0
Glikoze	20,0

4.tabula

Pussintētiskās 5% glikozes barotnes sastāvs sējmateriāla sagatavošanai.

Table 4

Composition of the semi-synthetic 5% glucose nutrient medium for preparation of inoculum.

Reaģents	Svars (g/L)
Rauga ekstrakts	5,0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,0
Glikoze	50,0

Sējmateriāla sagatavošanai izmanto 50 mL pussintētiskās 5% glikozes barotnes.

5.tabula

Pussintētiskās barotnes sastāvs, lai noteiktu optimālo *K. lactis* celmu un substrātu 2-feniletanola biosintēzei.

Table 5

Composition of the semi-synthetic nutrient medium for determining the optimal *K. lactis* strain and substrate for 2-phenylethanol biosynthesis.

Reaģents	Svars (g/L)
Rauga ekstrakts	5,0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,0
Glikoze/laktoze	100,0
L-fenilalanīns	10,0

## 2.2. Metodes

### 2.2.1. Sējmateriāla sagatavošana

Rauga šūnu kultūras tiek uzglabātas –80°C temperatūrā, 20% glicerīna un 0,7% NaCl šķīdumā. Rauga celmu uzturēšanai izmanto YPD agara barotni. Sterilos apstākļos koloniju ar mikrobioloģiskās cilpas palīdzību pārnes pussintētiskajā 5% laktozes šķidrā barotnē un audzē kolbās 24 stundas +30°C temperatūrā ar kratīšanas amplitūdu 180 apgriezieni minūtē.

### 2.2.2. Fermentācija

Rauga sējmateriālu pārlej sterilā 50 mL stobriņā, centrifugē un atmazgā ar destilētu ūdeni. Sterilos apstākļos substrātam pievieno 1/10 daļu no kopīgā tilpuma sējmateriāla.

Substrāta un mikroorganismu maisījumu kultivē Erlenmeijera kolbās ar vates aizbāžņiem +30°C temperatūrā ar kratīšanas amplitūdu 180 apgriezieni minūtē.

### **2.2.3. Divfāžu ekstraktīvā fermentācija ar rapšu eļļu**

Lai fermentācijas laikā aizvāktu feniletanolu no fermentācijas vides un samazināt tā toksisko iedarbību uz rauga šūnām, tika veikta divfāžu ekstraktīvā fermentācija ar rapšu eļļu - substrāta un mikroorganismu maisījumam sterilos apstākļos pievieno 1/5 daļu no kopīgā tilpuma rapšu eļļas. Maisījumu kultivē Erlenmeijera kolbās ar vates aizbāžņiem +30°C temperatūrā ar kratīšanas amplitūdu 180 apgriezieni minūtē.

### **2.2.4. Biomasas noteikšana ar spektrofotometru**

Biomasu nosaka pēc šūnu suspensijas optiskā blīvuma (OD), ko nosaka ar spektrofotometra palīdzību. Spektrofotometrs mēra, cik liela gaismas enerģijas daļa izgājusi cauri pētāmajam paraugam vai arī tikusi tajā absorbēta. Gaismas avots padod gaismas staru, kas iziet cauri monohromatoram. Monohromators sadala ienākošo gaismas staru dažādos viļņa garumos (spektrā). Tad viļņu garuma selektors pārraida tikai vienu konkrēto izvēlēto viļņa garumu. Izvēlētā viļņa garuma diapazons iziet cauri kivetēi ar pētāmo paraugu, daļa gaismas tiek absorbēta. Neabsorbētās gaismas intensitāti (caurlaidību) uztver fotorezistors. Rezultāta izvades ierīce attēlo absorbcijas vērtību.

Fermentācijā iegūtos paraugus samaisa ar vorteksa palīdzību, atšķaida ar destilēto ūdeni un nomēra optisko blīvumu. Optisko blīvumu mēra pie 600 nm viļņa garuma attiecībā pret references kivetēi ar destilēto ūdeni. Spektrofotometrā mērīšanas diapazons ir 0,05 – 0,200. Aprēķina biomasas koncentrāciju. Viena optiskā blīvuma vienība atbilst 0,3 g/L biomasas (Kovtuna 2015).

### **2.2.5. Mikroorganismu kultivēšana un biomasas noteikšana ar mikroplašu lasītāju – inkubatoru**

Toleranci nosaka ar Tecan Infinite 200 pro aparātu. Kultivēšanu veic 23 stundas, +30°C temperatūrā ar kratīšanas amplitūdu 3,5 mm ik pa 8,2 minūtēm. Optiskais blīvums mērīts pie 600 nm 9,6 minūšu intervālā. Eksperiments veikts 96 lauciņu platē.

### 2.2.6. Cukuru enzimatiskā noteikšana

Laktozes un glikozes koncentrācija fermentācijas vidē tika noteikta enzimatiski ar spektrofotometra palīdzību.

Glikozes noteikšanas princips: paraugam pievienojot heksokināzi, veidojas glikozes-6-fosfāts, kas tālāk oksidējas līdz 6-fosfoglukonātam, reducējot  $\text{NADP}^+$  līdz  $\text{NADPH}$  un  $\text{H}^+$ . Ar spektrofotometru nosaka  $\text{NADPH}$  daudzumu. Mērījumus veic pie 340 nm, jo tas ir  $\text{NADPH}$  absorbcijas spektra maksimums. Izmērītais  $\text{NADPH}$  daudzums ir vienāds ar glikozes daudzumu paraugā.

Darba gaitaglikozes noteikšanai:

1. Kivetē (kvarca vai akrilāta) ievieto 10  $\mu\text{l}$  parauga, kas satur ne vairāk par 1% glikozes+fruktozes un 990  $\mu\text{l}$  mērīšanas bufera.
2. Kontroles kivetē ievieto 1000  $\mu\text{l}$  mērīšanas bufera.
3. Nomēra pie 340 nm sākotnējo absorbciju ar spektrofotometru.
4. Kivetē, kur atrodas paraugs, pievieno 1  $\mu\text{l}$  fermenta heksokināzi un mēra līdz konstantai absorbcijas.

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

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

C – glikozes koncentrācija paraugos (mmol/l);

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

Laktozes noteikšanas princips: paraugam pievienojot  $\beta$ -galaktozidāzi, laktoze tiek sašķelta uz monosaharīdiem – D-glikozi un D-galaktozi. Tālāk enzīms galaktozmutarotāze (GaIM) katalizē  $\alpha$ -D-galaktozes pārvēršanos  $\beta$ -D-galaktozē.  $\beta$ -galaktozes dehidrogenāzes klātbūtnē  $\text{NAD}^+$  oksidē  $\beta$ -D-galaktozi, kā rezultātā veidojas D-galakturonskābe,  $\text{NADH}$  un  $\text{H}^+$ . Reakcijās izveidotā  $\text{NADH}$  daudzumu nosaka ar spektrofotometru, pie 340 nm, jo tas ir  $\text{NADH}$  absorbcijas spektra maksimums. Iegūtā  $\text{NADH}$  absorbcijas vērtība ir stehiometriskā ar laktozes daudzumu paraugā.

Darba gaita laktozes noteikšanai:

1. Kivetē ievieto 100 $\mu\text{l}$  parauga un pievieno 100 $\mu\text{l}$   $\beta$ -galaktozidāzes.
2. Tajā pašā kivetē pievieno 1,00 mL destilēta ūdens, 100 $\mu\text{l}$  bufera un 50 $\mu\text{l}$   $\text{NAD}^+$  un nomēra absorbciju ( $A_1$ ) pie 340 nm.
3. Tajā pašā kivetē pievieno 10 $\mu\text{l}$  galaktozmutarotāzes (GaIM) un  $\beta$ -galaktozes dehidrogenāzes ( $\beta$ -GaIDH) šķīdumu un mēra līdz konstantai absorbcijai ( $A_2$ ).

4. Tādas pašas reakcijas paralēli veic arī kontroles kivetē, nepievienojot paraugu.

Aprēķina formula:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{paraugs}} - (A_2 - A_1)_{\text{kontrolē}}$$

$$C = \frac{2,72 \times 342,3}{6300 \times 1 \times 0,2} \times \Delta A = 0,7389 \times \Delta A, \text{ kur}$$

C – laktozes koncentrācija paraugos (g/L)

### **2.2.7. 2-feniletanola noteikšana ar augstefektīvo šķidrums hromatogrāfijas metodi (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)**

2-feniletanols tika noteikts ar augstefektīvo šķidrums hromatogrāfiju (HPLC). Hromatogrāfija ir vielu atdalīšanas process, kurā parauga maisījums sadalās starp divām fāzēm, viena no kurām ir kustīga, bet otra nekustīga. Šīs divas fāzes ir iespējams iegūt, jo molekulas pārvietojas ar dažādiem ātrumiem. Eluējamās savienojumus kustīgā fāzē pārvieto uz detektoru, kas to īpašības pārveido Gausa līknēs. Līknes mēdz saukt par joslām. Šo joslu kopumu no viena parauga sauc par hromatogrammu. Joslas laukums un augstums ir proporcionāli ievadītā parauga daudzumam. Joslas lielums, ko rada komponents zināmā koncentrācijā, ir izmantojams nezināmās koncentrācijas parauga noteikšanai. Parauga koncentrācijas noteikšanai izmanto kalibrācijas grafiku, kas iegūts no joslu laukumiem vai augstumiem, kas izmērīti šķīdumiem ar precīzi zināmu koncentrāciju.

Pirms analīzes paraugus ar fermentācijas vidi nocentrifugē, iegūto supernatantu izfiltrē caur celulozes-acetāta filtru ( $\varnothing$  0,45  $\mu\text{m}$ ) un ievieto trauciņos.

Tehniskie parametri un apstākļi:

- kolonna – Aminex HPX – 87 H, 300 x 7,8 mm;
- detekcija - refrakcijas indeksa detektors;
- mobilā fāze – 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- mobilās fāzes plūsma – 0,6 mL/min;
- kolonnas temperatūra – 45°C;
- parauga tilpums – 20  $\mu\text{L}$ .

### **2.2.8. Datu analīze**

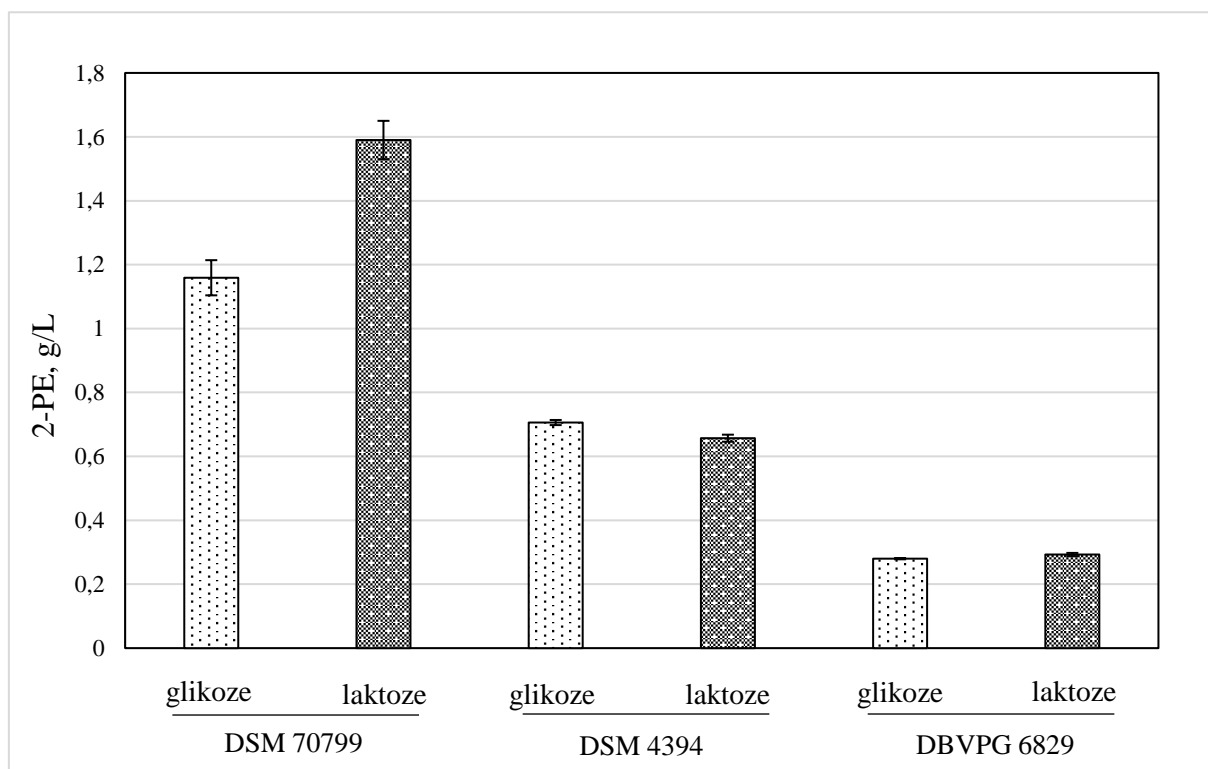
Iegūto datu matemātiskā analīze tika veikta izmantojot MS Excel 2016. Vairāku faktoru ietekmes analīze un atbildes virsmas grafika konstruēšana tika veidota ar Statgraphics Centurion XV Version 15.1.02.

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. Substrāta un *Kluyveromyces lactis* celma ietekme uz 2-feniletanola biosintēzi

Lai noskaidrotu, kurš *K. lactis* celms ir vispiemērotākais 2-feniletanola biosintēzei, un kāda substrāta izmantošanai var dot vislielāko feniletanola iznākumu, tika veikta fermentācija ar *K. lactis* celmiem DSM 70799, DSM 4394, DBVPG 6829. Ar katru celmu fermentācija tika veikta uz pussintētiskajām 10% glikozes un pussintētiskajām 10% laktozes barotnēm, visām barotnēm pievienojot 10 g/L L-fenilalanīna. Fermentācijas tika veiktas termostatā kratītājā +30°C temperatūrā ar 180 apgriezieniem minūtē. Paraugi tika ņemti pēc 24 fermentācijas stundām.

Salīdzinot visus eksperimentā izmantotos celmus, lielākais 2-feniletanola iznākums (g/L) tika novērots DSM 70799 celmam (2. attēls), utilizējot gan glikozi, gan laktozi saturošu substrātu. Feniletanola iznākums DSM 70799 celmam bija lielāks, audzējot raugu laktozi saturošajā barotnē – 1,59 g/L, salīdzinot ar iznākumu glikozes barotnē – 1,29 g/L (laktozes barotnē iznākums ir par 18,87% lielāks, nekā glikozes barotnē). Barotnes sastāvs neietekmēja saražotā 2-feniletanola daudzumu DSM 4394 un DBVPG 6829 celmu gadījumā. Balstoties uz šiem rezultātiem, tālākajiem eksperimentiem tika izmantots *K. lactis* DSM 70799 celms.



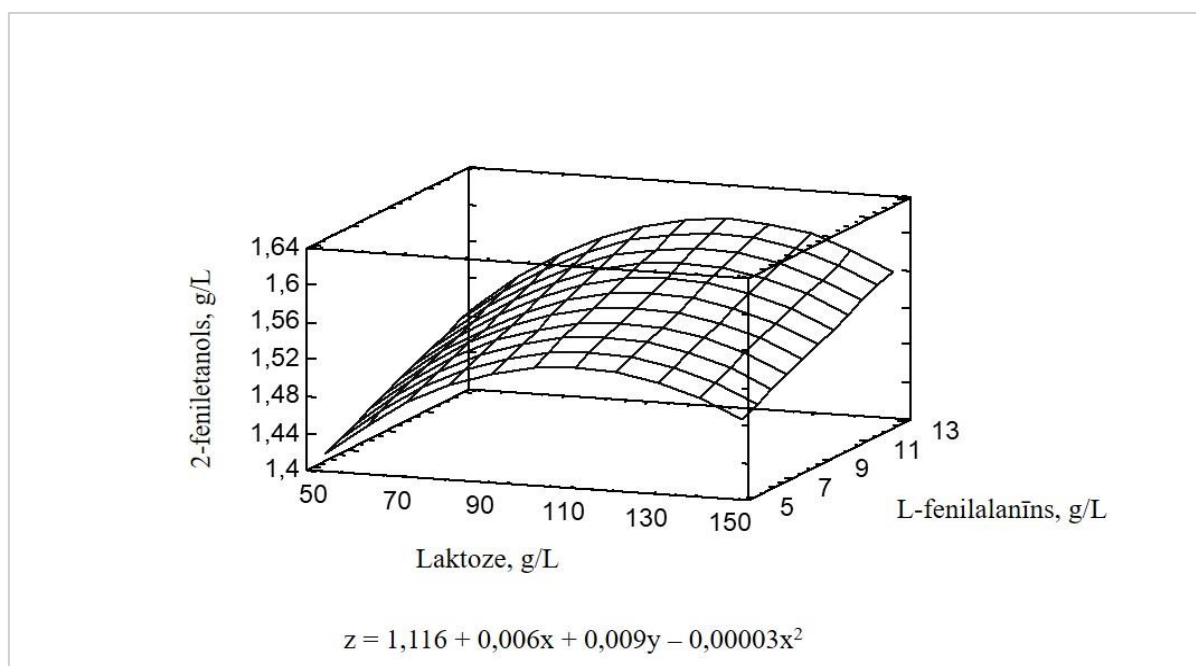
2.attēls. Substrāta un *K. lactis* celmu DSM 70799, DSM 4394, DBVPG 6829 ietekme uz 2-feniletanola koncentrāciju (g/L) fermentācijā kolbās pussintētiskajās 10% glikozes un 10% laktozes barotnēs ar 10 g/L L-fenilalanīna pie 180 apgriezieniem minūtē +30°C temperatūrā

pēc 24 stundu fermentācijas; kļūdu nogriežņiem piešķirtas standartnoviržu vērtības no 3 bioloģiskajiem atkārtojumiem.

Figure 2. The effect of substrate and *K. lactis* strains DSM 70799, DSM 4394, DBVPG 6829 on 2-phenylethanol concentration (g/L) in flask fermentation on semi-synthetic 10% glucose and 10% lactose mediums with 10 g/L L-phenylalanine at +30°C with 180 revolutions per minute after 24 h of fermentation; data presented is an average from three biological replicates, with error bars representing standard deviations.

### 3.2. Laktozes un L-fenilalanīna koncentrācijas ietekme uz *K. lactis* DSM 70799 celma 2-feniletanola biosintēzi

Lai noskaidrotu, kā mainās *K. lactis* DSM 70799 producētā 2-feniletanola koncentrācija beigās atkarībā no laktozes un L-fenilalanīna koncentrācijas barotnē, tika veikts divfaktoru eksperiments. Kā mainīgie faktori eksperimentā tika izmantotas dažādas laktozes (50; 100; 150 g/L) un L-fenilalanīna (5; 7,5; 12,5 g/L) koncentrācijas. Fermentācijas tika veiktas 24 stundas +30°C temperatūrā pie 180 apgriezieniem minūtē.



3.attēls. Atbildes virsma divfaktoru eksperimentam, kur neatkarīgie mainīgie ir dažādas laktozes un L-fenilalanīna koncentrācijas barotnē un atkarīgais mainīgais ir *K. lactis* DSM 70799 producētā 2-feniletanola koncentrācija (g/L). Fermentācija tika veikta 24 stundas +30°C temperatūrā pie 180 apgriezieniem minūtē. Virsmas vienādojums:  $z = 1,116 + 0,006x + 0,009y - 0,00003x^2$  ( $z = 2\text{-PE}$  koncentrācija,  $x =$  laktozes koncentrācija,  $y =$  L-fenilalanīna koncentrācija).

Figure 3. Response surface plot for two factor experiment, where independent variables are lactose and L-phenylalanine concentrations in medium and dependent variable is *K. lactis* DSM 70799 produced 2-phenylethanol concentration (g/L). Fermentations were carried out 24 h at +30°C with 180 revolutions per minute. Surface equation:  $z = 1,116 + 0,006x + 0,009y - 0,00003x^2$  ( $z = 2\text{-PE}$  concentration,  $x =$  lactose concentration,  $y =$  L-phenylalanine concentration).

Pēc rezultātiem ir redzams (3. attēls), ka pieaugot laktozes un L-fenilalanīna koncentrācijai, producētā 2-feniletanola daudzums palielinās. Saražotā 2-feniletanola maksimālais daudzums tiek sasniegts pie laktozes koncentrācijas 110 g/L, taču pie augstākām laktozes koncentrācijām ir novērojams negatīvs efekts. Pie izmantotajām L-fenilalanīna koncentrācijām maksimālais 2-PE daudzums netika sasniegts. No virsmas vienādojuma redzams, ka nav novērojama abu faktoru mijiedarbība.

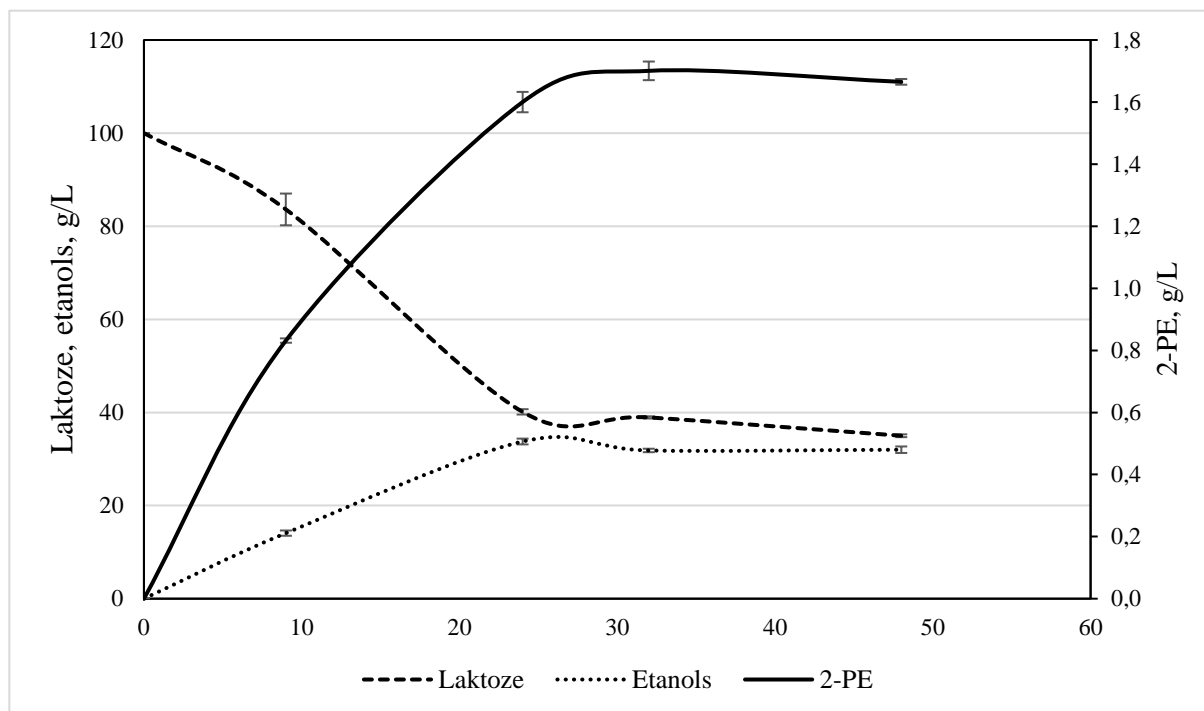
### **3.3. *Kluyveromyces lactis* DSM 70799 celma 2-feniletanola un laktozes dinamika fermentācijas laikā**

Eksperiments tika veikts ar mērķi noteikt patērētās laktozes un saražotā 2-feniletanola dinamiku fermentācijas laikā. Fermentācijas tika veiktas uz pussintētiskajām 10% laktozes barotnēm ar 10 g/L L-fenilalanīna +30°C temperatūrā pie 180 apgriezieniem minūtē. Lai noteiktu laktozes un 2-PE dinamiku, paraugi tika ņemti 0., 9., 24., 32. un 48. fermentācijas stundā.

Attēlā nr. 4 ir redzamas laktozes, etanola un 2-PE koncentrāciju izmaiņu dinamika. DSM 70799 celms pēc 9 stundu fermentācijas bija patērējis 16,39% no sākotnējās laktozes koncentrācijas un saražotā 2-feniletanola daudzums strauji palielinājās līdz 0,83 g/L. Jau 24. fermentācijas stundā laktozes koncentrācija barotnē samazinājās par 59,87%, savukārt 2-feniletanola koncentrācija fermentācijas vidējā bija 1,60 g/L. Visaugstākā saražotā 2-feniletanola koncentrācija tika sasniegta 32. fermentācijas stundā – 1,70 g/L. Pēc 32. stundas laktozes koncentrācija barotnē samazinās lēni, ja salīdzina ar fermentācijas sākumu (4. attēls). Līdzīga tendence ir arī 2-feniletanola daudzuma izmaiņām fermentācijas beigās. Pēc 48. fermentācijas stundas 2-feniletanola koncentrācija bija 1,67 g/L. Savukārt laktozes daudzums barotnē bija samazinājies par 65%, salīdzinot ar sākuma koncentrāciju. Pēc rezultātiem ir redzams, ka fermentācijas beigās raugs nav līdz galam patērējis visu laktozi, neskatoties uz to, ka fermentācijas vidē vēl ir pieejams oglekļa avots. Tas var būt saistīts ar 2-feniletanola toksiskumu. Iespējams, ka tas feniletanola daudzums, kas tika saražots barotnē, inhibēja producējošo šūnu augšanu un 2-feniletanols vairs netika sintezēts.

Viens no *Kluyveromyces* spp. vielmaiņas blakusproduktiem fermentācijas laikā ir etanols, kas spēj inhibēt rauga šūnu augšanu un ietekmēt 2-feniletanola sintēzi. Etanola daudzuma izmaiņām barotnē ir līdzīga tendence kā 2-PE sintēzei fermentācijas laikā. Fermentācijas sākumā, samazinoties laktozes koncentrācijai, etanola daudzums palielinās: 9. fermentācijas stundā – 14,08 g/L, 24. stundā – 33,76 g/L. Brīdī, kad laktozes koncentrācija

vairs gandrīz nemainās, etanola koncentrācija, līdzīgi kā 2-feniletanola koncentrācija, nepalielinās. Etanola koncentrācija 48 stundā ir 32,00 g/L. Kopumā, saražotā etanola daudzums barotnē bija lielāks nekā 2-PE koncentrācija



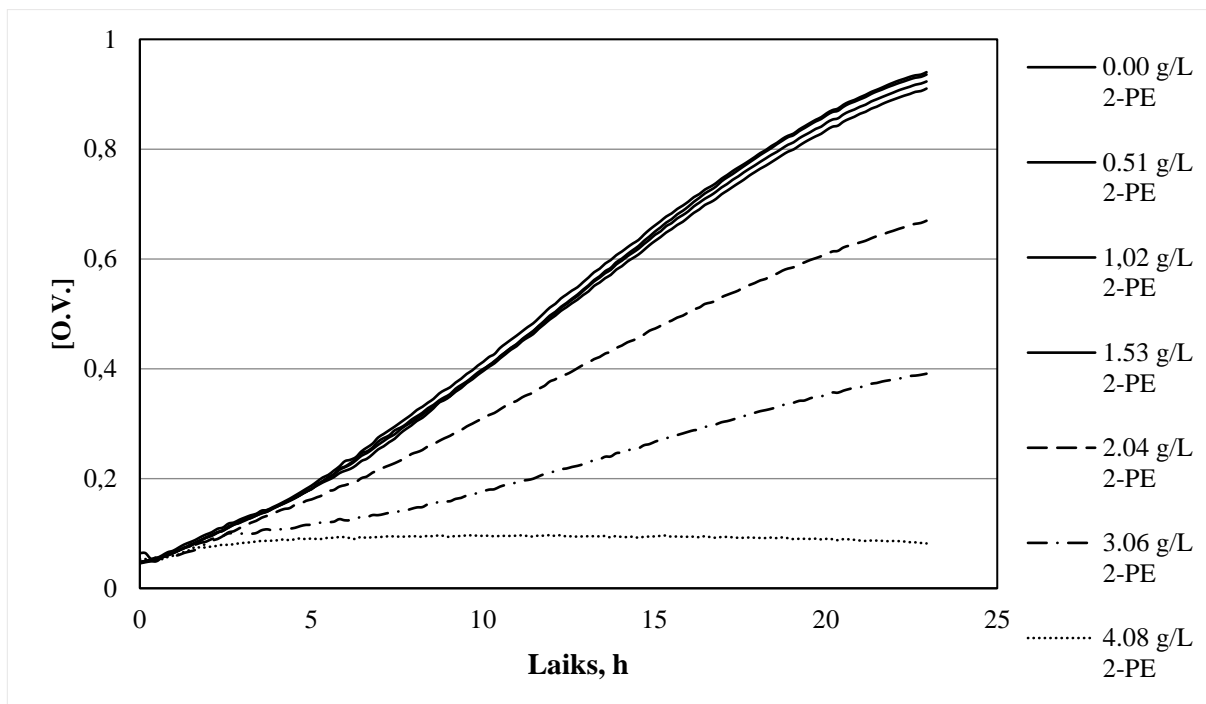
4.attēls. Laktozes, saražotā 2-feniletanola un etanola (g/L) dinamika *K. lactis* DSM 7099 celmam fermentācijai kolbās pussintētiskajā 10% laktozes barotnē ar 10 g/L L-fenilalanīna pie 180 apgriezieniem minūtē +30°C temperatūrā; kļūdu nogriežņiem piešķirtas standartnoviržu vērtības no 3 bioloģiskiem atkārtojumiem.

Figure 4. The dynamics of lactose, produced 2-phenylethanol and ethanol (g/L) by *K. lactis* DSM 70799 in flasks fermentation at semisynthetic 10% lactose medium with 10 g/L L-phenylalanine at +30°C with 180 revolutions per minute after 24 h of fermentation; data presented is an average from three biological replicates, with error bars representing standard deviations.

### 3.4. *Kluyveromyces lactis* DSM 70799 2-feniletanola tolerance

Balstoties uz iepriekšējā pētījuma rezultātiem, kur tika noskaidrots, ka, sasniedzot 2-feniletanola koncentrāciju 1,70 g/L, produkts vairs netiek sintezēts pat, ja barotnē ir pieejama laktoze, tika veikts eksperiments ar mērķi noskaidrot kādās koncentrācijās 2-feniletanols inhibē *K. lactis* celma DSM 70799 augšanu. Fermentācija tika veikta 2% laktozes pussintētiskajā barotnē 96 lauciņu platē, izmantojot mikroplašu lasītāju-inkubatoru Tecan Infinite 200 pro. Eksperimentuveica 23 stundas +30°C temperatūrā ar kratīšanas amplitūdu 3,5 mm ik pa 8,2 minūtēm. Optiskais blīvums mērīts pie 600 nm 9,6 minūšu intervālā.

Lai pārbaudītu rauga toleranci, barotnei tika pievienots 2-feniletanols dažādās koncentrācijās – 0,00 g/L; 0,51 g/L; 1,02 g/L; 1,53 g/L; 2,04 g/L; 3,06 g/L; 4,08 g/L. Attēlā nr. 5 ir parādītas rauga *K. lactis* DSM 70799 augšanas līknes.



5.attēls. *K. lactis* DSM 70799 augšanas izmaiņas fermentācijā 96 lauciņu platē 2% pussintētiskajā laktozes barotnē, pievienojot 2-feniletanolu 0 g/L; 0,51 g/L; 1,02 g/L; 1,53 g/L; 2,04 g/L; 3,06 g/L; 4,08 g/L koncentrācijās, pie kratīšanas amplitūdas 3,5 mm ik pa 8,2 minūtēm 30°C temperatūrā, mērot optisko blīvumu pie 600 nm 9,6 minūšu intervālā; standartnoviržu vērtības ir intervālā no 0 līdz 0,02.

Figure 5. The changes in the growth of *K. lactis* DSM 70799 in fermentation on 2% lactose semi-synthetic medium with added 2-phenylethanol (0,00 g/L; 0,51 g/L; 1,02 g/L; 1,53 g/L; 2,04 g/L; 3,06 g/L; 4,08 g/L). Fermentations were carried out in 96-well plate at 30°C for 23 h, shaken with amplitude 3,5 mm every 8,2 min and optical density readings (OD<sub>600</sub>) were taken every 9,6 min. Standard deviations are between 0 to 0,02.

Pievienojot 2-PE 0,51 g/L; 1,02 g/L un 1,53 g/L koncentrācijā, izmaiņas DSM 70799 celma augšanā netiek novērotas, salīdzinot ar kontroli (0g/L 2-PE). Tas nozīmē, ka šādās koncentrācijās rauga augšana netiek traucēta un, iespējams, 2-feniletanols šūnām nav toksisks. Palielinot 2-PE koncentrāciju, augšanas ātrums samazinās. Pievienojot 2-feniletanolu koncentrācijā 2,04 g/L, augšanas ātrums samazinās par 21,74%, un šūnu biomasa fermentācijas beigās ir par 28,72% zemāka, salīdzinot ar kontroli. Savukārt palielinot 2-PE koncentrāciju līdz 3,06 g/L, augšanas ātrums samazinās par 26,21% un biomasas daudzums ir jau par 58,51% mazāks nekā kontrolei. Rauga šūnu augšana pilnībā tiek inhibēta, ja 2-

feniletanola koncentrācija ir 4,08 g/L. Šādā 2-PE koncentrācijā nav novērojams biomasas pieaugums visas fermentācijas laikā.

### 3.5. *Kluyveromyces lactis* DSM 70799 celma divfāžu ekstraktīvā fermentācija ar rapšu eļļu

Feniletanols ir toksisks rauga šūnām, tāpēc ir nepieciešams atdalīt to no fermentācijas vides un tādā veidā samazināt inhibējošo iedarbību uz producējošām šūnām un palielināt produkta daudzumu. Šim mērķim *K. lactis* DSM 70799 celmam tika veikta divfāžu ekstraktīvā fermentācija ar rapšu eļļu. Fermentācija tika veikta 10% laktozes pussintētiskajā barotnē ar 10 g/L L-fenilalanīna un 1/5 daļu no kopīgā tilpuma rapšu eļļas. Tika veikta arī kontrole – fermentācija tādos pašos apstākļos bez eļļas pievienošanas. Kultivēšanu veica kolbās +30°C temperatūrā pie 180 apgriezieniem minūtē. Paraugi tika ņemti 24. un 48. fermentācijas stundā. Feniletanolam ir novērota lielāka šķīdība eļļā nekā ūdens fāzē (Stark et al. 2003), līdz ar to lielākā daļa saražotā 2-PE uzkrājas eļļas fāzē. Pēc fermentācijas eļļas fāze un ūdens fāzē atdalītas un analizētas atsevišķi.

Sakumā fermentācija tika veikta 100 mL Erlenmeijera kolbās. Dati par kopējo 2-PE daudzumu barotnē (gan eļļas, gan ūdens fāzē) ir apkopoti 7. tabulā. Pēc 24 stundu fermentācijas 2-feniletanola koncentrācija kontroles variantā bija 1,18 g/L. Savukārt barotnei pievienojot eļļu, produkta daudzums sasniedza 0,75 g/L, kas ir par 36,44% zemāks nekā kontroles variantā. Šajā eksperimentā neizdevās iegūt vēlamo rezultātu, jo divfāžu fermentācijā tika iegūts mazāks 2-feniletanola daudzums, salīdzinot ar kontroli.

7.tabula.

Rezultāti kontroles un divfāžu ekstraktīvai fermentācijai 100 mL kolbās pēc 24 h.

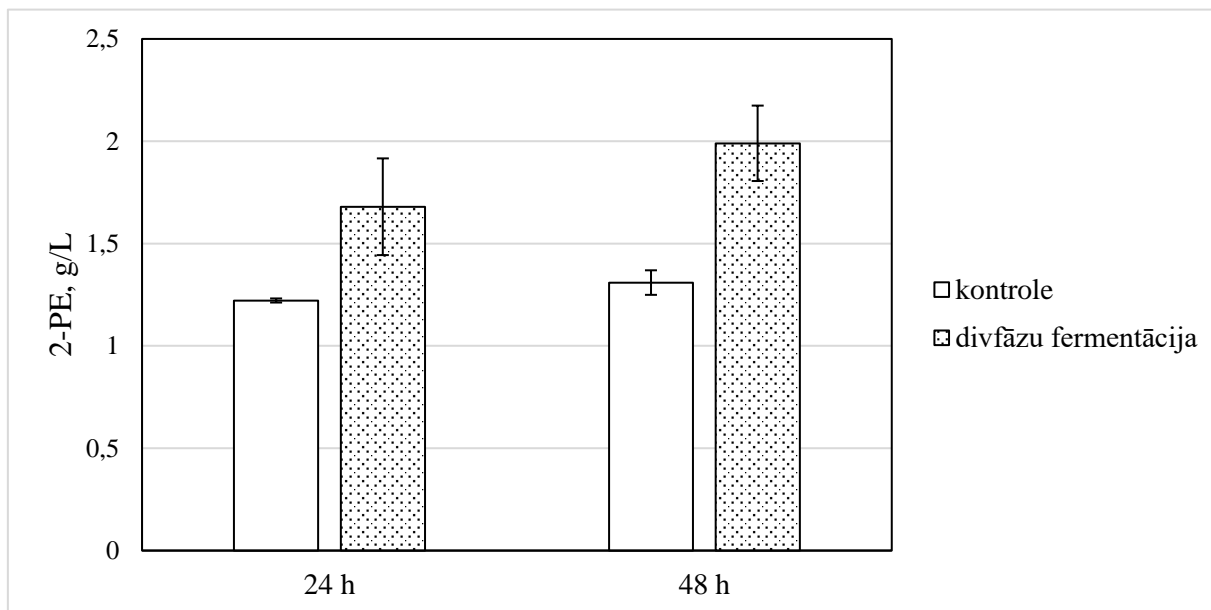
Table 7

Results of control and two-phase extractive fermentation in 100 mL flasks after 24 h.

	2-PE, g/L
Kontrole	1,18 ± 0,04
Divfāžu ekstraktīvā fermentācija	0,75 ± 0,01

Iespējams, ka, barotnei pievienojot eļļu, tiek traucēta aerācija šūnām, tāpēc eksperiments tika atkārtots lielāka tilpuma (300 mL) kolbās, tādējādi palielinot fermentācijas vides virsmas laukumu (6. attēls). Pēc 24 h kontroles variantā 2-PE daudzums bija 1,22 g/L. Pēc 48 h tā daudzums palielinājās līdz 1,31 g/L. Divfāžu fermentācijā pēc 24 h 2-PE iznākums bija 1,68

g/L. Pēc 48 h 2-feniletanola koncentrācija palielinājās līdz 1,99 g/L, kas ir par 34,17% lielāks nekā kontrolei.



6.attēls. Feniletanola iznākums (g/L) *K. lactis* DSM 70799 celmam 10% laktozes pussintētiskajā barotnē ar 10 g/L L-fenilalanīna bez eļļas (kontrolē) un divfāzu sistēmā ar 1/5 daļu no kopīgā tilpuma rapšu eļļas pēc 24 un 48 h fermentācijas. Fermentācija veikta kolbās 30°C temperatūrā pie 180 apgriezieniem minūtē; kļūdu nogriežņiem piešķirtas standartnoviržu vērtības no 3 bioloģiskajiem atkārtojumiem.

Figure 6. The yield of phenylethanol of *K. lactis* DSM 70799 strain on 10% lactose semi-synthetic medium with 10 g/L L-phenylalanine without oil (control) and with added 1/5 rapeseed oil after 24 and 48 h of fermentation. Fermentations were carried out in flasks at 30°C with 180 revolutions per minute; data presented is an average from three biological replicates, with error bars representing standard deviations.

## 4. DISKUSIJA

Producētā 2-feniletanola daudzumu var ietekmēt vairāki faktori: fermentācijā izmantotā rauga suga un celms, oglekļa un slāpekļa avots un tā koncentrācija, kā arī fermentācijas apstākļi – temperatūra, vides pH, aerācija u.c. (Uzunovet *al.* 2011), tāpēc 2-PE ražošanas procesā ir svarīgi novērtēt visus šos ietekmējošos faktorus un to mijiedarbību.

Viens no veiktajiem eksperimentiem parādīja, ka producētā 2-feniletanola daudzums ir atkarīgs no izvēlēta rauga celma. *Kluyveromyces lactis* DSM 70799 celms spēj producēt lielāku 2-feniletanola daudzumu nekā *K. lactis* DSM 4394 un DBVPG 6829. Vienas sugas celmos bieži tiek novērota augsta ģenētiskā diverģence (Steenselset *al.* 2014), tāpēc katram celmamvar būt izteiktas atšķirības starp fermentācijā sintezētajām vielām un to daudzumu. Agrākajos pētījumos tika konstatētas atšķirības esteru un spirtu producēšanā, atkarībā no izmantotā rauga celma. Lurton *et al.* (1995) secināja, ka *Saccharomyces cerevisiae* eksponē atšķirības gaistošu savienojumu producēšanā fermentācijas laikā, un saistīja to, ka dažādi celmi atšķiras pēc genotipa, un tāpēc tiem var atšķirties arī metabolisma norise. Salīdzinot *S. cerevisiae* celmus, saražotā 2-feniletanola koncentrācija fermentācijas vidē var atšķirties pat par 46,64% (Lurton *et al.* 1995). Līdzīgi ir arī ar pētītajiem *K. lactis* celmiem. Iespējams, dažādiem celmiem novērojamas atšķirībassintezētajās vielās, tāpēc fermentācijas vides sastāvs un vielu koncentrācija tajā var atšķirties vienas rauga sugas robežās. Ar *K. lactis* DSM 70799 saražotais 2-PE daudzums bija 1,59 g/L (uz laktozes barotnes). Vienā no pētījumiem *Kluyveromyces marxianus* tika iegūti 1,4 g/L 2-PE, izmantojot glikozes barotni (Fabre *et al.* 1998). Augstāks 2-PE iznākums – 2,6 g/L, tika iegūts, izmantojot dažādus *Saccharomyces cerevisiae* celmus (Stark *et al.* 2002). Kaut gan ar *S. cerevisiae* iegūtais 2-PE iznākums ir lielāks, salīdzinot ar *Kluyveromyces* spp. raugiem, ir svarīgi pieminēt, ka *S. cerevisiae* nespēj utilizēt laktozi. *S. cerevisiae* neproducē  $\beta$ -galaktozidāzi, tāpēc arī tieša laktozes utilizēšana šim raugam nav iespējama. Risinājums šai problēmai var būt kofermentācija ar  $\beta$ -galaktozidāzi, kas hidrolizē laktozi par glikozes un galaktozes molekulām, un tālāk *S. cerevisiae* patērē tās kā oglekļa avotus, bet šāda pieeja samazina fermentācijas procesa efektivitāti, jo  $\beta$ -galaktozidāzes izmantošana palielina izmaksas, kā arī *S. cerevisiae* vāji utilizē galaktozi. Iespējams veikt arī fermentācijas ar mikroorganismu kultūru maisījumiem, kur sākumā vienam organismam piemīt augsta ekstracelulāra  $\beta$ -galaktozidāzes aktivitāte, līdz ar to, laktozes hidrolīzes produkti ir pieejami organismam, kas spēj producēt 2-feniletanolu. Šādu procesu ir grūti optimizēt, tāpēc vienkāršāk ir izmantot laktozi utilizējošu mikroorganismu, kas spēj producēt 2-feniletanolu. Apkopojot mūsu un citu pētījumu

rezultātus, *K. lactis* DSM 70799 celms ir daudzsološs mikroorganisms 2-feniletanola producēšanā.

Dažādu pētījumu rezultātu salīdzināšana ir ierobežota, jo veiktie eksperimenti atšķiras pēc fermentācijas apstākļiem, izmantotām barotnēm un mikroorganismiem. Jāatzīst, ka mūsu darbā trūkst L-fenilalanīna noteikšanas analītika, kas ļautu spriest par aminoskābes patēriņu fermentācijas laikā, ka arī ļautu salīdzināt datus ar citiem pētījumiem par 2-PE iznākumu no L-fenilalanīna. Turpmākiem pētījumiem būtu nepieciešams veikt L-fenilalanīna daudzuma noteikšanu paraugos, piemēram, enzimatiski vai ar augstefektīvo jonu apmaiņas hromatogrāfijas metodi (*High Performance Anion Exchange Chromatography*).

*K. lactis* DSM 70799 celmam lielāks producētā 2-PE daudzums bija barotnē, kura oglekļa avots bija laktoze, nevis glikoze. Pārējiem eksperimenta izmantotajiem celmiem 2-PE iznākumu ogļhidrāta veids neietekmēja. Iepriekšējie pētījumi parāda, ka oglekļa un slāpekļa avota veids ietekmē producētā aromātiskā savienojuma daudzumu. Fabre *et al.* (1998) izpētīja, ka *K. marxianus* raugam augstākais 2-PE iznākums ir augot uz glikozes barotnes. Savukārt uz saharozes, galaktozes un laktozes barotnes produkta iznākums bija apmēram 17% mazāks nekā glikozes barotnē. Spēja utilizēt laktozi ir viena no galvenajām *K. lactis* priekšrocībām, salīdzinot ar citām raugu sugām, kas pārsvarā asimilē citus cukurus. Šī *K. lactis* īpašība dod iespēju 2-feniletanola ražošanas procesos izmantot laktozi saturošus substrātus, kam ir zema vērtība. Tādā veidā fermentācijām var izmantot siera sūkalas un piena permeātu, kas ir siera ražošanas blakusprodukts ar augstu laktozes koncentrāciju. Tāda ražošana būs ekonomiski izdevīga, jo no zemas vērtības izejvielām tiks iegūts vērtīgs produkts – 2-feniletanols.

Tā kā rauga spēju producēt 2-feniletanolu ietekmē ne tikai rauga celms, bet arī substrāts, tika veikts divfaktoru eksperiments, kura mērķis bija noteikt laktozes un L-fenilalanīna ietekmi uz saražotā 2-PE daudzumu. Rezultāti parādīja, ka optimāla laktozes koncentrācija 2-PE producēšanai ir aptuveni 110 g/L, savukārt optimālā L-fenilalanīna koncentrācija šajā eksperimentā netika noteikta, jo pie izvēlētām koncentrācijām maksimālais 2-PE daudzums netika sasniegts, tāpēc šī eksperimenta modeļa uzlabošanai būtu nepieciešams izmantot lielākas L-fenilalanīna koncentrācijas.

Feniletanola iznākums ir atkarīgs no producenta augšanas, tāpēc ir svarīgi, lai barotnē tiktu uzturēts pietiekams cukuru daudzums, kas nepieciešams šūnu augšanai un metabolītu sintēzei. Laktozes un saražotā 2-PE dinamika parāda, ka raugam patērējot cukuru, mērķprodukta koncentrācija barotnē palielinās, bet aptuveni 26. stundā 2-feniletanols vairs netiek sintezēts, neskatoties uz to, ka fermentācijas vidē vēl ir laktoze. Tas nozīmē, ka tika traucēta šūnu augšana. Feniletanols ir rauga šūnām toksisks savienojums, un, uzkrājoties barotnē, tas inhibē šūnu augšanu, kā rezultātā 2-PE sintēze tālāk nenotiek. Fermentācijas laikā

tiek producēts ne tikai 2-feniletanols, bet arī citi metabolīti, kas arī var negatīvi ietekmētrauga šūnas. Fermentācijas laikā barotnē tika sintezēts arī etanols, kam 2-feniletanola klātbūtnē piemīt sinerģistisks inhibējošs efekts uz šūnām, līdz ar to tiek kavētaaugstu 2-PE koncentrāciju sasniegšana (Stark *et al.* 2002). Spirtinegatīvi ietekmēcukuru un aminoskābju transportu caur plazmatisko membrānu. Membrānas caurlaidība palielinās, tādējādi tiek paātrināta pasīvo jonu un mazo metabolītu difūzija caur membrānu (Etschmann *et al.* 2003).

*K. lactis* DSM 70799 2-feniletanola tolerances eksperiments parādīja, ka šūnu augšana samazinās sākot ar 2-feniletanola pievienošanu koncentrācijā 2,04 g/L. Savukārt pēc mūsu iepriekšējā eksperimenta rezultātiem, kur tika noteikta patērētās laktozes un saražotā 2-PE dinamika, 2-feniletanolasintēze apstājas, sasniedzot 1,70 g/L 2-PE koncentrāciju. Tāda 2-PE koncentrācija nav pilnīgi toksiska DSM 70799 celmam. Šie rezultāti apstiprina faktu, ka inhibējošā ietekme uz rauga šūnām ir arī citiem metabolītiem, kas veidojas barotnē. Mūsu gadījumā fermentācijas barotnē tika konstatēta arī etanola klātbūtne. Tā kā barotnē esošā 2-feniletanola koncentrācija nav toksiska raugam, tad, iespējams, kopā ar etanolu tika sasniegts toksiskuma līmenis, kas pilnībā inhibēja producējošo šūnu augšanu un 2-PE sintēzi. Pēc Stark (2001) un Fabre *et al.* (1998)*K. marxianus* laboratorijas celms tiek pilnīgi inhibēts pie 2 g/L 2-PE koncentrācijas, bet *S. cerevisiae* raugam pilnīgi toksisks ir 4g/L 2-PE. Feniletanola koncentrācija 2,6 g/L spēj pilnīgi inhibēt *K. marxianus* CBS 600 augšanu (0,89 g/L 2-PE samazina tā augšanas ātrumu par 20%) (Etschmann *et al.* 2003). Dažādiem celmiem jutība pret spirtiem ir atšķirīga, tāpēc mērķprodukta palielināšanai ir nepieciešams izmantot celmu, kas spēj tolerēt pēc iespējas lielākas toksisko savienojumu koncentrācijas.

Pastāv dažādas metodes, kas ļauj aizvākt nofermentācijas vides 2-feniletanolu un tādā veidā palielināt produkta koncentrāciju. Viena no metodēm ir divfāžu ekstraktīvā fermentācija ar eļļas pievienošanu barotnei (Stark *et al.* 2003). Sākumā, metodes izmēģinājumam, tika veikta fermentācija 100 mL Erlenmeijera kolbās. Rezultāts bija negatīvs, jo pievienojot eļļu 2-PE daudzums bija mazāks nekā kontroles variantā. Iespējams, ka eļļas slānis virs barotnes ūdens fāzes samazināja skābekļa piekļuvi rauga šūnām un negatīvi ietekmēja to augšanu, tāpēc arī iegūtā 2-PE koncentrācija bija mazāka nekā kontrolei. Eksperiments tika atkārtots, izmantojot 300 mL kolbas. Lielāka tilpuma kolbām ir lielāks virsmas laukums, un kratot tās fermentācijas laikā, tiek palielināta aerācija un šūnas tiek nodrošinātas ar pietiekamu skābekļa daudzumu. Divfāžu ekstraktīvajā fermentācijā, izmantojot 300 mL kolbas, tika iegūta lielāka 2-PE koncentrācija (1,99 g/L), salīdzinot ar kontroli. Rezultāti pierāda, ka divfāžu ekstraktīvā fermentācija ir efektīva metode un to var izmantot 2-PE ražošanā, bet, lai iegūtu labāku rezultātu, būtu ieteicams veikt fermentācijas fermentatorā, lai noskaidrotu optimālo maisīšanas un aerācijas režīmu. Nepieciešams arī meklēt jaunus organiskos šķīdinātājus,

kurus izmantot eļļas vietā, jo eļļas atdalīšana no ūdens fāzes ir diezgan problemātiska un laikietilpīga. Arī iegūtā 2-feniletanola ekstrahēšana un attīrīšana no eļļas fāzes ir sarežģīta. Citu pētnieku rezultāti arī pierāda to, ka, izmantojot divfāžu ekstraktīvo fermentāciju, var palielināt 2-PE iznākumu. Piemēram, Stark *et al.* (2002) pētījumā tika iegūts, ka kultivējot *S. cerevisiae* periodiskajā kultūrā, maksimālais 2-feniletanola daudzums ir 2,6 g/L, bet kultivējot šo raugu optimizētajā periodiskajā kultūrā ar piebarošanu, tieksasniegts līdz 3,8 g/L 2-PE. Savukārt divfāžu ekstraktīvajā fermentācijā ar piebarošanu, kā organisko fāzi izmantojot oleīnskābi, šim pašam raugam 2-PE koncentrācija palielinās līdz 12,6 g/L (Stark *et al.* 2002).

## SECINĀJUMI

1. Ar *Kluyveromyces lactis* DSM 70799 celmu tika sasniegta augstāka 2-feniletanola koncentrācija, salīdzinot ar citiem (*K. lactis* DSM 4394, DBVPG 6829) pētījumā izmantotajiem celmiem.
2. *K. lactis* DSM 70799 celmam producētā 2-PE koncentrācija laktozes barotnē ir par 19% lielāka nekā glikozes barotnē.
3. Laktozes un L-fenilalanīna koncentrācijas ietekmē 2-feniletanola iznākumu – produkta maksimālais daudzums tiek sasniegts, ja laktozes koncentrācija barotnē ir 110 g/L, taču optimālā L-fenilalanīna koncentrācija netika noteikta.
4. *K. lactis* DSM 70799 augšanas ātrums sāk samazināties sākot ar 2-feniletanola koncentrāciju 2,04 g/L; šūnu augšana pilnībā tiek inhibēta, pievienojot 4,08 g/L 2-feniletanola.
5. Divfāzu ekstraktīvā fermentācijā ar *K. lactis* DSM 70799 pēc 48 h 2-feniletanola daudzums bija par 34,17% lielāks nekā fermentācijā bez eļļas.

## PATEICĪBAS

Izsaku pateicību darba vadītājam Kristiānai Kovtunai par darba vadīšanu un palīdzību metožu apgūvē, kā arī Armandam Vīgantam un Jekaterīnai Martinovai par sniegtajām konsultācijām darba izstrādes laikā un Reinim Rutkim par darba recenzēšanu.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Angelov A. D., Gotcheva V. 2012. Biosynthesis of 2-phenylethanol by yeast fermentation. – Food Science, Engineering and Technologies: 490–495.
2. Belloch C., Querol A., Barrio E. 2011. *Kluyveromyces* spp. – Yeasts and Molds: 754–764.
3. Bylund G. 1995. Dairy processing handbook. Sweden: Tetra Pak processing systems AB: 331–352.
4. Chen X., Kobayashi H., Sakai M., Hirata H., Asai T., Ohnishi T., Baldermann S., Watanabe N. 2011. Functional characterization of rose phenylacetaldehyde reductase (PAR), an enzyme involved in the biosynthesis of the scent compound 2-phenylethanol. – Journal of Plant Physiology, 168: 88–95.
5. Collins R. P. 1978. The production of volatile compounds by filamentous fungi. – Developments in industrial microbiology, 20: 239–245.
6. Eshkol E., Sendovski M., Bahalul M., Katz-Ezov T., Kashi Y., Fishman A. 2009. Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. – Journal of Applied Microbiology, 106: 534–542.
7. Etschmann M. M. W., Bluemke W., Sell D., Schrader J. 2002. Biotechnological production of 2-phenylethanol. – Applied Microbiology and Biotechnology, 59: 1–8.
8. Etschmann M. M. W., Sell D., Schrader J. 2003. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. – Biotechnology Letters, 25: 531–536.
9. Fabre C. E., Blanc P. J., Goma G. 1998. Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. – Biotechnology Progress, 14: 270–274.
10. Fonseca G. G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A. K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. – Applied Microbiology and Biotechnology, 79: 339–354.

11. Gellissen G., Hollenberg C. P. 1997. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. – *Gene*, 190: 87–97.
12. Gombert A. K., Madira Jr. J. V., Cerdán M. E., González-Siso M. I. 2016. *Kluyveromyces marxianus* as a host for heterologous protein synthesis. – *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (12): 1–18.
13. González-Siso M. I. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57: 1–11.
14. González-Siso M. I., Freire-Picos M. A., Ramil E., González-Domínguez M., Rodríguez Torres A., Cerdán M. E. 2000. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. – *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 699–705.
15. Guimarães M. R. P., Teixeira A. J., Domingues L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. – *Biotechnology Advances*, 28: 375–384.
16. Hirata H., Ohnishi T., Ishida H., Tomida K., Sakai M., Hara M., Watanabe N. 2012. Functional characterization of aromatic amino acid aminotransferase involved in 2-phenylethanol biosynthesis in isolated rose petal protoplasts. – *Journal of Plant Physiology*, 169: 444–451.
17. Hua D., Xu P. 2011. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. – *Biotechnology Advances*, 29: 654–660.
18. Huang C. JR., Lee S. L., Chou C. C. 2000. Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as affected by some medium components. – *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (2): 142–147.
19. Hwang J. Y., Park J., Seo J. H., Cha M., Cho B. K., Kim J., Kim B. G. 2009. Simultaneous synthesis of 2-phenylethanol and L-homophenylalanine using aromatic transaminase with yeast Ehrlich pathway. – *Biotechnology and Bioengineering*, 102 (5): 1323–1329.
20. Janssens L., de Pooter H. L., Vandamme E. J., Schamp N. M. 1988. Bio-synthesis of esters by *Geotrichum penicillatum*. – Schreirer P. (ed.), *Bioflavour*, 87: 453–463.

21. Jollivet N., Bézenger M. C., Vayssier Y., Belin J. M. 1992. Production of volatile compounds in liquid cultures by six strains of coryneform bacteria. – *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 790–794.
22. Kosikowski F. V. 1979. Our industry today. Whey utilization and whey products. – *Journal of Dairy Science*, 62 (7): 1149–1160.
23. Kovtuna K. 2015. Rauga *Kluyveromyces marxianus* biomasas producēšana laktozi saturošos substrātos. Bakalaura darbs. Rīga, Latvijas Universitāte.
24. Lane M. M., Morrissey J. P. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. – *Fungal Biology Reviews*, 24: 17–26.
25. Lemos D. A., Sonego J. L. S., Boschiero M. V., Araujo E. C. C., Cruz A. J. G., Badino A. C. 2017. Selection and application of nontoxic solvents in extractive ethanol fermentation. – *Biochemical Engineering Journal*, 127: 128–135.
26. Liti G., Wardrop F. R., Cardinali G., Martini A., Walker G. M. 2001. Differential responses to antimycin A and expressions of the Crabtree effect in selected *Kluyveromyces* spp. – *Annals of Microbiology*, 51: 235–243.
27. Liu J. J., Zhang G. C., Oh E. J., Pathanibul P., Turner T. L., Jin Y. S. 2016. Lactose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of fermenting cellobiose. – *Journal of Biotechnology*, 234: 99–104.
28. Lomascolo A., Lesage-Meessen L., Haon M., Navarro D., Antona C., Faulds C., Marcel A. 2001. Evaluation of the potential of *Aspergillus niger* species for the bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol. – *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 99–102.
29. Lurton L., Snackers G., Roulland C., Galy B. 1995. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. – *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67: 485–491.
30. Lyubomirov Ivanov S., Yankova Petrova V., Ivanova Pisareva E., Vengelova kujumdzieva A. 2013. Ehrlich pathway study in *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* yeasts. – *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27 (5): 4103–4110.

31. Mahmood K. T. 2015. Biomass production from *Kluyveromyces* spp. by using cheese whey. – Journal of Zankoi Sulaimani, 17 (4): 85–94.
32. Mameeva O. G., Nagornaya S. S., Podgorsky V. S. 2008. Screening of 2-phenylethanol producers among yeasts from the genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*. – Mikologiya I Fitopatologiya, 42 (2): 185–191.
33. Mei J., Min H., Lu Z. 2009. Enhanced biotransformation of L-phenylalanine to 2-phenylethanol using an in situ product adsorption technique. – Process Biochemistry, 44: 886–890.
34. Mostafa N. A. 2001. Production of acetic acid and glycerol from salted and dried whey in a membrane cell recycle bioreactor. – Energy Conversion and Management, 42: 113–1142.
35. Naumova E. S., Sukhotina N. N., Naumov G. I. 2004. Molecular-genetic differentiation of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives. – FEMS Yeast Research, 5: 263–269.
36. Naumov G. I., Naumova E. S., Barrio E., Querol A. 2006. Genetic and molecular study of the inability of the yeast *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilum* to ferment lactose. – Microbiology, 75 (3): 248–252.
37. Ooyen A. J. J., Dekker P., Huang M., Olsthoorn M. M. A., Jacobs D. I., Colussi P. A., Taron C. H. 2006. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. – FEMS Yeast Research, 6: 381–392.
38. Parashar A., Jin Y., Mason B., Chae M., Bressler D. C. 2016. Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. – Journal of Dairy Science, 99 (3): 1859–1867.
39. Patel G. B. 1983. Fermentation of lactose by *Bacteroides polypragmatus*. – Canadian Journal of Microbiology, 29 (1): 120–128.
40. Pereira-Rodríguez Á., Fernández-Leiro R., González-Siso M. I., Cerdán M. E. 2012. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. – Journal of Structural Biology, 177: 392–401.

41. Querol A., Fleet G. 2006. The Yeast Handbook: Yeasts in food and beverages. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 285–318.
42. Robinson R. K. 1994. Modern dairy technology 2nd edition. UK: Department of Food Science and Technology, University of Reading: 490 pp.
43. Rodicio R., Heinisch J. J. 2013. Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. – *Yeast*, 30: 165–177.
44. Rubio-Teixeira M. 2006. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces LAC* genes. – *Biotechnology Advances*, 24: 212–225.
45. Scognamiglio J., Jones L., Letizia C. S., Api A. M. 2012. Fragrance material review on phenylethyl alcohol. – *Food and Chemical Toxicology*, 50: 224–239.
46. Seiboth B., Pakdaman B. S., Hartl L., Kubicek C. P. 2007. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. – *Fungal Biology Reviews*, 21 (1): 42–48.
47. Serra S., Fuganti C., Brenna E. 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. – *TRENDS in Biotechnology*, 23 (4): 193–198.
48. Souto-Maior A. M., Runquist D., Hanh-Hagerdal. 2009. Crabtree-negative characteristics of recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. – *Journal of Biotechnology*, 143: 119–123.
49. Spencer J. F. T., Ragout de Spencer A. L., Laluce C. 2002. Non-conventional yeasts. – *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 147–156.
50. Spohner S. C., Schaum V., Quitmann H., Czermak P. 2016. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. – *Journal of Biotechnology*, 222: 104–116.
51. Stark D. 2001. Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Lausanne, Switzerland: EPFL.
52. Stark D., Munch T., Sonnleitner B., Marison I. W., von Stockar U. 2002. Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. – *Biotechnology Progress*, 18: 514–523.

53. Stark D., Kornmann H., Munch T., Sonnleither B., Marison I. W., von Stockar U. 2003. Novel type of in situ extraction: use of solvent containing microcapsules for the bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. – *Biotechnology and Bioengineering*, 83 (4): 376–385.
54. Steensels J., Snoek T., Meersman E., Nicolino M. P., Voordeckers K., Verstrepen K. J. 2014. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. – *FEMS Microbiology Reviews*, 38: 947–995.
55. Suárez E., Lobo A., Alvarez S., Riera F. A., Álvarez R. 2009. Demineralization of whey and milk ultrafiltration permeate by means of nanofiltration. – *Desalination*, 241: 272–280.
56. Uzunov Z. G., Petrova Y. V., Lyubomirov Ivanov S., Vangelova Kujumdzieva A. 2011. *In silico* study of ARO genes involved in the Ehrlich pathway: comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. – *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25 (4): 133–137.
57. van der Walt J. P. 1956. *Kluyveromyces* – a new yeast genus of the *Endomycetales*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 33: 265–272.
58. Wang Q., Song Y., Jin Y., Liu H., Zhang H., Sun Y., Liu G. 2013. Biosynthesis of 2-phenylethanol using tobacco waste as feedstock. – *Biocatalysis and Biotransformation*, 31 (6): 292–298.
59. Wang S., Chandrasekhara Rao N., Qiu R., Moletta R. 2009. Performance and kinetic evaluation of anaerobic moving bed biofilm reactor for treating milk permeate from dairy industry. – *Bioresource Technology*, 100: 5641–5647.
60. Witmann C., Hans M., Bluemke W. 2002. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. – *Yeast*, 19: 1351–1363.
61. Yadav J. S. S., Yan S., Pilli S., Kumar L., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. 2015. Cheese whey: a potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. – *Biotechnology Advances*, 33 (6): 756–774.