

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

SŪKALU KĀ ALTERNATĪVA SUBSTRĀTA  
NOVĒRTĒJUMS BAKTERIĀLĀS CELULOZES  
IEGŪŠANAI

Maģistra darbs

Autors: Sergejs Koļesovs

Stud. apl. Nr. sk19084

Darba vadītājs: *Dr. biol.* Pāvels Semjonovs

RĪGA 2021

## Saturs

Kopsavilkums .....	3
Summary.....	4
Ievads.....	5
1. Literatūras apskats .....	8
1.1. Bakteriālā celuloze .....	8
1.2. Bakteriālās celulozes iegūšanas un tās producentu kultivācijas metodes.....	10
1.2.1. Statiskā kultivācija – ar vai bez piebarošanas .....	10
1.2.2. Kultivēšana bioreaktoros ar maisīšanu un skābekļa pievadīšanu.....	11
1.3. Bakteriālās celulozes izmantošanas potenciāls.....	13
1.3.1. Pārtikas rūpniecība .....	13
1.3.2. Iepakojumu materiāli.....	13
1.3.3. Biomedicīna.....	13
1.3.4. Citas nozares.....	14
1.4. Izaicinājumi bakteriālās celulozes iegūšanā un komercializācijā.....	14
1.5. Alternatīvie substrāti bakteriālās celulozes ražošanai .....	15
1.6. Sūkalas kā alternatīva izejviela biotehnoloģiskajos procesos .....	15
1.7. Sūkalas kā substrāts bakteriālās celulozes iegūšanai.....	17
1.8. Maģistra darba tēmas aktualitātes pamatojums .....	20
2. Materiāli un metodes .....	21
2.1. Materiāli .....	21
2.2. Metodes .....	22
3. Rezultāti.....	27
3.1. Bakteriālas celulozes producentu efektivitātes novērtējums sūkalu barotnēs .....	27
3.2. Sūkalu kā bakteriālas celulozes substrāta efektivitātes novērtējums.....	30
3.3. Sūkalu barotnes pirmsapstrādes un sastāva modificēšanas ietekme uz BC sintēzi.....	33
3.3.1. Sūkalu koncentrācijas ietekme .....	33
3.3.2. Termiskās apstrādes ietekme .....	35
3.3.3. Hidrolītiskās apstrādes ietekme .....	38
3.3.4. Piedevu ietekme.....	41
4. Diskusija .....	44
5. Secinājumi .....	51
Pateicības .....	52
Literatūras saraksts .....	53
Pielikumi.....	60

## Kopsavilkums

Bakteriāla celuloze (BC) ir biopolimērs ar plašu pielietojuma potenciālu, sākot no pārtikas rūpniecības un biomedicīnas līdz elektronikai un kosmētikai. Neskatoties uz to, BC rūpnieciskā ražošana joprojām ir saistīta ar zināmām grūtībām. Viena no tām ir bakteriālo barotņu augstās izmaksas, kas var sasniegt pat 30% no ražošanas izmaksām. Ražošanas izmaksu samazināšanai kā alternatīvu augšanas vidi var izmantot rūpniecības un lauksaimniecības blakusproduktus, tostarp sūkalas. Pētījumi šajā jomā ir joprojām fragmentāri un nepietiekami. Šajā pētījumā sūkalas tika novērtētas kā alternatīvs substrāts BC iegūšanai. Iegūtie rezultāti liecina, ka lielāku BC sintēzi ( $1,95 \pm 0,15$  g/L, sausais svars) uz sūkalām nodrošina producenta celms *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463, kas ir par 40 – 50% mazāks nekā uz mākslīgās standarta *Hestrin-Schramm* (HS) barotnes. Sūkalu enzimatiskā pirmsapstrāde būtiski palielina BC sintēzi līdz  $2,41 \pm 0,04$  g/L. Melases kā piedevas pievienošana palielina BC sintēzi uz nehidrolizētām sūkalām līdz  $2,7 \pm 0,02$  g/L. Izvērtējot rezultātus ir jāsecina, ka sūkalas ir perspektīvs substrāts BC iegūšanai un tālākie pētījumi ir nepieciešami, lai optimizētu BC iegūšanas tehnoloģiskos raksturlielumus tām. Maģistratūras pētījumu ietvaros iegūti rezultāti ir izmantoti publikācijas sagatavošanai starptautiski recenzējamajā žurnālā: Kolesovs S., Semjonovs P. 2020. Production of bacterial cellulose from whey – current state and prospects. – Applied Microbiology and Biotechnology, 104: 7723–7730.

**Atslēgas vārdi:** bakteriāla celuloze, sūkalas, *Komagataeibacter*, biopolimēri, etiķskābes baktērijas.

## Summary

BC is a biopolymer with many potential uses starting from biomedicine and food industry to electronics and cosmetics. Despite all the potential applications BC production is associated with several difficulties. One of them is high costs of bacterial growth media, that can reach up to 30% of total production costs. In order to decrease production costs, use of alternative growth media should be considered, for instance, of industrial or agricultural by-products including whey. There are several studies dedicated on evaluation of BC production by using whey or lactose-based substrates as an alternative medium for BC producing bacterial growth. However, the data remain very insufficient. In this work whey was evaluated as an alternative growth media for BC synthesis. Data show that the highest BC production on whey was reached by *K. rhaeticus* P-1463 strain ( $1,95 \pm 0,15$  g/L, dry weight), which is about 40 – 50 % lower than BC production on standard HS media with glucose as carbon source. Also, it has been shown that whey enzymatical pre-treatment increased BC synthesis to  $2,41 \pm 0,04$  g/L. Moreover, addition of molasses as an additive increased BC synthesis up to  $2,7 \pm 0,02$  g/L. It has been shown that whey still quite a challenging remains substrate for BC production and further research is required. The results obtained in course of Master's research are published in the international peer-reviewed journal (Scopus): Kolesovs S., Semjonovs P. (2020). Production of bacterial cellulose from whey – current state and prospects. – Applied Microbiology and Biotechnology, 104: 7723–7730.

**Key words:** bacterial cellulose, whey, *Komagataeibacter*, biopolymers, acetic acid bacteria.

## Ievads

Bakteriāla celuloze (BC) ir perspektīvs biopolimers ir izcilām mehāniskām īpašībām un plašu pielietojanas spektru, kas potenciāli var aizstāt vairākus sintētiskus un videi nedraudzīgus produktus. Šo materiālu var izmantot vairākās nozarēs, piemēram, biomedicīnā, pārtikā, iepakojumu materiālos, ūdens attīrīšanā vai elektronikā (Azeredo et al. 2019; Blanco Parte et al 2020). Par rūpnieciski perspektīviem galvenokārt tiek uzskatīti BC producentu celmi no tādām etiķskābes baktēriju (EB) ģintīm, kā *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* un *Komagataebacter* (Gullo et al. 2018).

Neskatoties uz plašu potenciālo pielietojuma spektru BC komercializācija joprojām ir apgrūtināta augstu ražošanas izmaksu dēļ (Ul-Islam et al. 2015). Ir zināms, ka izmaksas, kas ir saistītas ar sintētiskas barotnes izmantošanu var sasniegt aptuveni 30% no kopējam ražošanas izmaksām (Revin et al. 2018). Alternatīvo substrātu, piemēram, sūkalu izmantošana var ievērojami samazināt kopējas ražošanas izmaksas (Jozala et al. 2015). Pie kam ir jāatzīmē, ka sūkalas ir problemātisks piena rūpniecības blakusprodukts, kas ir saistīts ar potenciāli lielu vides kaitējumu, jo pasaulē tikai ap 50% to tilpuma tiek lietderīgi un videi nekaitīgi pārstrādāti, Savukārt pārēja daļa nonāk apkārtēja vidē, kur nodara lielu kaitējumu bioloģiskajai daudzveidībai (Panghal et al. 2018), vai labākajā gadījumā rada ražotājam būtiskas izmaksas tās utilizējot atbilstoši pastāvošajam regulējumam. Sūkalu izmantošana BC iegūšanas procesā var ievērojami samazināt BC ražošanas izmaksas, ka arī samazināt sūkalu degradējošo ietekmi uz apkārtējo vidi.

Šobrīd joprojām ir visai maz pētījumu par BC iegūšanu uz sūkalām un to sastāva optimizēšanas iespējām ar nolūku palielināt BC produktivitāti un samazināt tās ražošanas izmaksas (Revin et al. 2018; Kolesovs and Semjonovs 2020). Trūkst arī pētījumu efektīvu BC producentu atlasei vai ģenētiskai modifikācijai to izmantošanai sūkalu biokonversijā. Papildus turpmāk ir nepieciešams izvērtēt sūkalu sastāva modifikācijas iespējas, piemēram, termiskas pirmsapstrādes metodes, augšanas faktoru piedevu un / vai atšķirīgu sūkalu hidrolīzes paņēmienu ietekmi uz BC iznākumiem. Daļa no šī plašā pētījumu loka ir eksperimentāli novērtēta un iekļauta šajā maģistra darbā, vienlaicīgi dodot arī padziļināti pamatotu ievirzi tālāku pētījumu īstenošanā. Maģistra darba izstrādes gaitā ir sagatavots un publicēts starptautiski recenzējamajā žurnālā (*Scopus*) raksts pētījumu tēmā: Kolesovs S., Semjonovs P. 2020. Production of bacterial cellulose from whey – current state and prospects. – Applied Microbiology and Biotechnology, 104: 7723–7730.

Kā arī, ir apstiprināts publicēšanai raksts lauksaimniecības un pārtikas pārstrādes nozares žurnālā Semjonovs P., Zikmanis P., Kolesovs S., (2021) No sūkalām līdz bioplastmasai. – Saimnieks, 6 (*in press*).

Pētījumu aktualitāte ir aprobēta nozares starptautiskajās konferencēs:

1. Bacterial cellulose production on whey – an overview of prospects. S. Kolesovs, K. Neiberts, M. Rukliša, P. Semjonovs. 79<sup>th</sup> International Scientific Conference of the University of Latvia “Innovative and applied research in Biology”, 05.02.2021, Rīga, mutisks referāts;
2. Pārtikas plēves jeb ēdamais pārklājums, ko mēs par tām zinām? K. Juhņeviča-Radenkova, V. Radenkovs, D. Segliņa, P. Semjonovs, S. Koļesovs, P. Zikmanis. LLU Lauksaimniecības fakultātes, Latvijas Agronomu biedrības un Latvijas Lauksaimniecības un meža zinātņu akadēmijas organizētā zinātniski praktiskā konference „Līdzsvarota lauksaimniecība 2021”. 25.02.2021 – 26.02.2021, Jelgava, tēzes, 34. lpp;
3. Edible coatings for berries: an innovative, perspective and environmentally friendly approach to berry storage. K. Juhņeviča-Radenkova, V. Radenkovs, D. Segliņa, I. Krasnova, P. Semjonovs, S. Koļesovs, P. Zikmanis, M. Rukliša. 78<sup>th</sup> International Scientific Conference of the University of Latvia “Innovative and applied research in Biology”, Rīga, mutisks referāts, tēzes, (2): 23-24.

Darbs tiek izstrādāts no 2020. gada janvāra līdz 2021. gada maijam LU Bioloģijas Institutā ES līdzfinansētu projektu ietvaros:

1. “Bionoārdamo polimēru iegūšana no atjaunojamiem resursiem augļu aizsargplēvju un iepakojuma materiālu izstrādei”, kas, sadarbojoties zinātniekiem, lauksaimniekiem un ražošanas uzņēmumiem, paredz biopolimēru pārklājumu un iepakojuma materiālu iegūšanu, izmantojot lauksaimnieciskās un pārtikas pārstrādes ražošanas blakusproduktus, optimizējot kultivācijas vides sastāvu un tehnoloģiskos režīmus;
2. “Biopolimēru tehnoloģijas prototipēšana nanostrukturētu izstrādājumu iegūšanai no ražošanas blakusproduktiem”. Darbības programmas “Izaugsme un nodarbinātība” 1.2.1. specifiskā atbalsta mērķa “Palielināt privātā sektora investīcijas P&A” 1.2.1.2. pasākums “Atbalsts tehnoloģiju pārneses sistēmas pilnveidošanai”.

**Darba mērķis:** Novērtēt sūkalas kā alternatīvu substrātu BC iegūšanai.

**Darba uzdevumi:**

- Novērtēt BC sintēzes efektivitāti dažādiem producentu celmiem sūkalu barotne, atlasot efektīvāku turpmākiem pētījumiem;

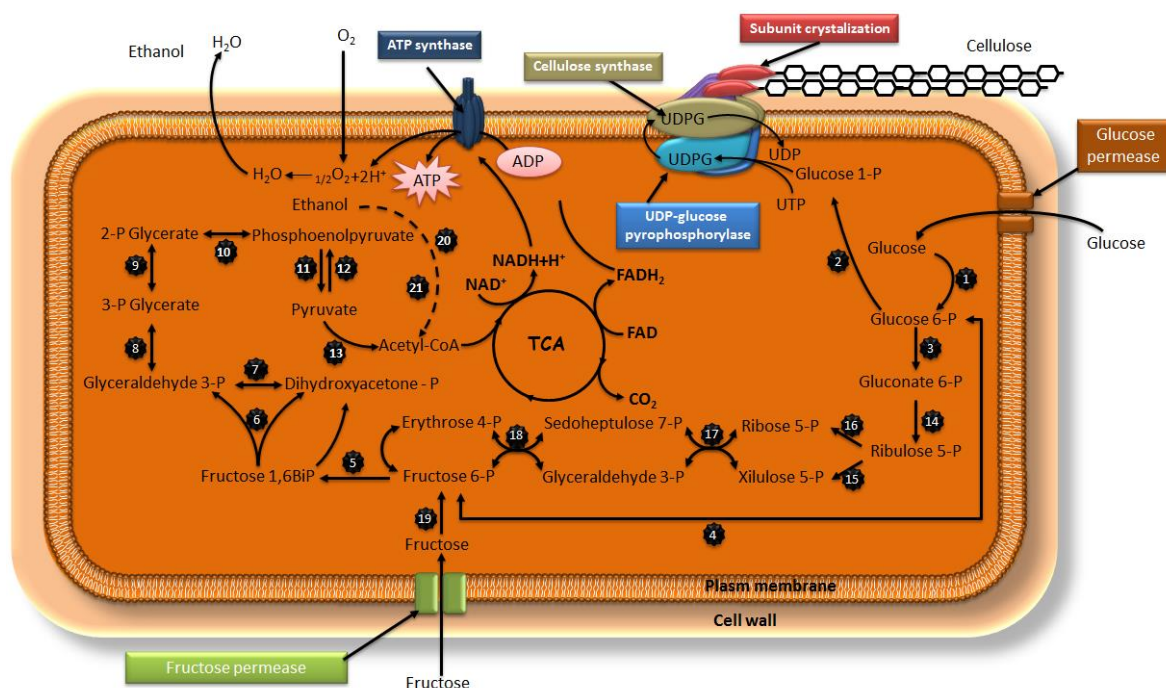
- Salīdzināt siera sūkalu barotni ar mākslīgām standarta barotnēm, kuras tiek izmantotas BC iegūšanai;
- Modificēt siera sūkalu barotni, lai palielinātu BC iznākumu, novērtējot sūkalu pirmsapstrādes, hidrolītiskās apstrādes un piedevu ietekmi uz BC sintēzes efektivitāti.

# 1. Literatūras apskats

## 1.1. Bakteriālā celuloze

Biomateriāli un biopolimēri iegūst ievērojamu nozīmi kā perspektīvi un videi draudzīgi materiāli, kuriem saskatāms plašs pielietojums dažādās jomās (Yadav et al. 2015). Viens no šādiem polimēriem ir BC – eksopolisaharīds, kuru spēj sintezēt *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sacrina*, *Dicjeya*, *Rhodobacter* un citu ģinšu baktērijas (Azeredo et al. 2019). Tomēr par galvenajiem un rūpnieciski perspektīviem BC producentiem tiek uzskatītas aerobas EB, pie kurām pieder *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* un *Komagataebacter* baktēriju ģintis (Gullo et al. 2018).

Tiek uzskatīts, ka BC tiek sintezēta, kā iespējamais baktēriju paš aizsardzības mehānisms no UV stariem un palīdzot tām atrasties uz gaisa un šķidrumsaskarsmes vietas, lai nodrošinātu tām nepieciešamā skābekļa labāku pieejamību (Reiniati et al. 2017). BC biosintēzes procesā notiek glikozes 6-fosfāta polimerizācija par  $\beta$ -1,4-glikāna ķēdēm (1. attēls), kam seko šīs ķēdes (protofibrillas) ekstracelulāra sekrēcija. Ķēdēm savstarpēji veidojot ūdeņraža saites, protofibrillas kristalizējas, kas noved pie BC mikrofibrillas veidošanās (Lustri et al. 2015).



1. attēls, EB *Gluconacetobacter xylinus* metabolisma shēma un BC sintēzes ceļš (Lustri et al. 2015).

Figure 1, Metabolism scheme and BC synthesis pathway of acetic acid bacteria *Gluconacetobacter xylinus* (Lustri et al. 2015).

Ir zināms, ka BC piemīt augstāka tīrība, salīdzinot ar augu celulozi, tā nesatur lignīnu, pektīnu un hemicelulozi. Augstākā tīrība tādējādi padara BC par tehnoloģiski perspektīvu tīrās celulozes avotu. Augu un BC fizikālo un mehānisku īpašību salīdzinājums ir apkopots 1. tabulā Turklāt BC biotehnoloģiskā ražošana samazina nepieciešamību iznīcināt mežus lai iegūtu augu izcelsmes celulozi, vai arī pārmērīgi izmantot lauksaimniecības zemes (Huang et al. 2014).

1. tabula

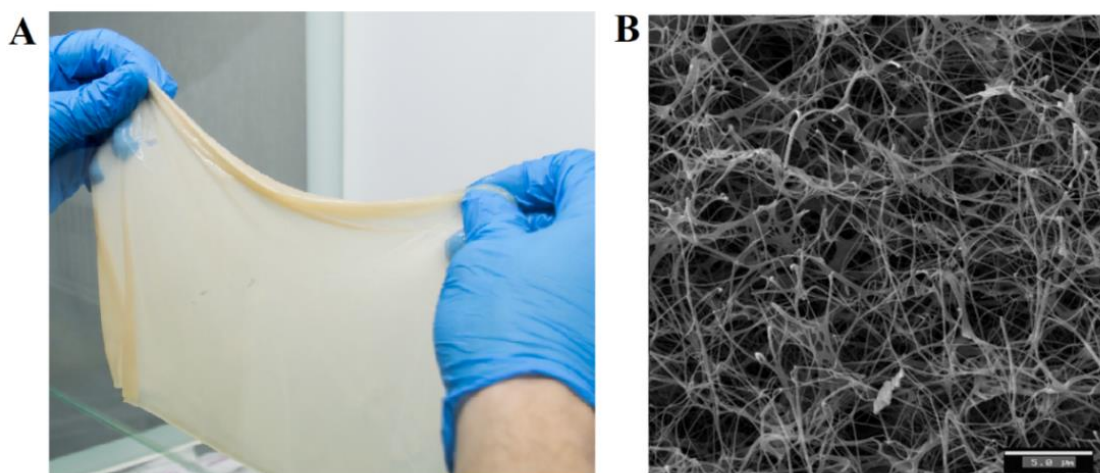
Augu celulozes un BC fizikālo un mehānisko īpašību salīdzinājums (Klemm et al. 2005; Chawla et al. 2009; Park et al. 2009).

Table 1

Comparison of plant-derived cellulose and BC physical and mechanical properties (Klemm et al. 2005; Chawla et al. 2009; Park et al. 2009).

Raksturlielumi	Augu izcelsmes celuloze	Bakteriālā celuloze
Šķiedru diametrs: protofibrillas un mikrofibrillas, nm	3,5 – 6 2500 – 10000	1,5 – 4 25 – 100
Polimerizācijas pakāpe	13000 – 14000	16000 – 20000
Kristāliskums, %	40 – 45	70 – 80
Porainība	Vidēja	Augsta
Vispārējā strukturālā organizācija	Pārsvārā amorfa	Pārsvārā ģeometriski definēta, 3D tīklveida, kristāliskā
Ūdens absorbcijas līdzsvars, %	~ 50	> 95
Stiepes izturība, MPa	~ 120	200 – 300
Elastības īpašības: Junga modulis, MPa	20 – 30	79 – 88

BC ir pazīstama ar tādām īpašībām, kā augsta tīrība, elastība, augsta ūdens noturības spēja, mehāniskā izturība, augsta polimerizācijas pakāpe, hidrofilītāte, augsta kristalizācijas pakāpe, tīklveida 3D nanomatrixas struktūra, augsta biosaderība (Azeredo et al. 2019; Gorgieva and Trček 2019; Blanco Parte et al. 2020). Turklāt BC šķiedru struktūra var kalpot par kompozītmateriālu matricu, tādējādi palielinot tā noderīgas īpašības, piemēram, hidrofobitāti, elastību, paaugstināt mehānisko izturību, kā arī antibakteriālas, magnētiskas un vadītspējas īpašības, kas nepiemīt pašai BC (Ul-Islam et al. 2015).



2. attēls. (A) *K. rhaeticus* P-1463 sintezēta BC plēve pēc 10 dienām statiskās kultivācijas; (B) BC mikrošķiedras skenejošas elektronu mikroskopijas (SEM) attēls (Torres et al. 2012).

Figure 2. (A) BC film synthesized by *K. rhaeticus* P-1463 after 10 days of cultivation; (B) SEM micrograph BC microfibrils (Torres et al. 2012).

## 1.2. Bakteriālās celulozes iegūšanas un tās producentu kultivācijas metodes

BC var iegūt, izmantojot statisko periodisko kultivāciju tai skaitā ar piebarošanu (angl. *fed-batch*) un dziļumfermentācijas metodi ar skābekļa pievadīšanu un maisīšanu, sintezējot bioreaktoros (Azeredo et al. 2019). Tālāk tiek īsi aplūkotas augstākminētās BC iegūšanas metodes.

### 1.2.1. Statiskā kultivācija – ar vai bez piebarošanas

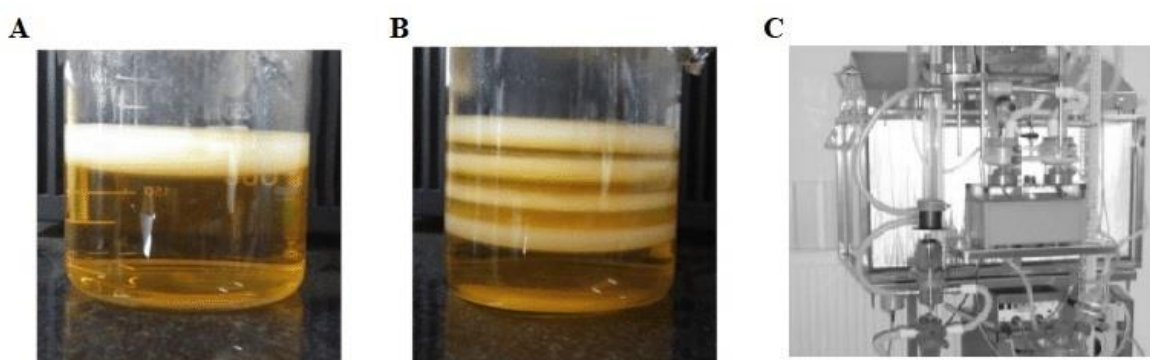
Statiskā periodiskā kultivācija metode ir vienkāršākais kultivācijas process, kas visbiežāk tiek izmantots BC ražošanai salīdzinoši zemu izmaksu dēļ (Lin et al. 2020). BC sintezējošā kultūra tiek inokulēta traukā ar lielu virsmu, kur BC sintēze notiek uz barotnes virsmas, dēļ baktēriju ģenerētas CO<sub>2</sub> burbuļu inkorporācijas BC plēvē. Izmantojot šo kultivācijas metodi, BC plēves parasti pieņem trauka formu, kas tiek izmantots. Tas ir noderīgi, kad ir nepieciešams iegūt konkrētas formas BC plēves, piemēram, šāda pieeja tiek izmantota reģeneratīvajās medicīnas materiālu iegūšanai. Kultivācijas laiks parasti aizņem 5 – 20 dienas. Izmantojot statisko kultivācijas metodi, svarīgs faktors BC iznākumā ir barotnes virsmas / šķīduma tilpuma attiecība. Jo lielāka ir tā attiecība, jo efektīvāk tiek izmantota barotne, un lielāka BC plēve tiek sintezēta (Czaja et al. 2004; Lin et al. 2020).

Par galveno trūkumu statiskajai kultivācijas metodei var uzskatīt salīdzinoši ilgāku BC sintēzes laiku un zemu BC iznākumu, kas ierobežo šīs metodes izmantošanu industriālajos mērogos. Statiskajā kultūrā izveidojusies BC plēve var traucēt O<sub>2</sub> piekļuvei baktērijām, ka arī

barības vielu daudzums barotnē tiek pakāpeniski izlietots, samazinot BC sintēzi (Dubey et al. 2018).

Lai palielinātu statiskas kultivācijas metodes efektivitāti, var izmantot piebarošanas kultivācijas metodi. Tā ir statiskās kultivācijas metodes modifikācija, kad pēc noteiktā kultivācijas laika kultūrai tiek pievienota papildus svaiga barotne. Parasti pēc līdzīga veida piebarošanas, veidojas jauns BC slānis. Pētījumi rāda, ka piebarošanas metode palīdz palielināt BC iznākumu  $Y_{P/S}$  no substrāta vienības 2 – 3 reizēs (Chen et al. 2013; Dubey et al. 2018).

Tiek izstrādāti dažādi bioreaktori, ar mērķi uzlabot statiskās kultivācijas metodi. Viens no šādiem bioreaktoriem ir aerosola bioreaktors. Šajā bioreaktorā augšanas barotne tiek izsmidzināta uz reaktora iekšējās virsmas (angl. *distribution box*), kam seko BC plēves sintēze un papildus barotnes pievienošana. Izmantojot šo metodi, ir iespējams iegūt līdz 9 g/L sausas BC dienā (Hornung et al. 2007). Tomēr, šīs metodes vēl nav komerciāli pieejamas un ir saistītas ar augstām ražošanas un ekspluatācijas izmaksām.



3. attēls. BC statiskās kultivācijas metodes: (A) statiskā periodiskā kultivācija; (B) periodiskā kultivācija ar piebarošanu (Dubey et al. 2018); (C) BC iegūšana, izmantojot aerosola bioreaktoru (Hornung et al. 2007).

Figure 3. BC static cultivation methods: (A) static cultivation; (B) fed-batch cultivation; (Dubey et al. 2018); (C) BC synthesis using aerosol bioreactor (Hornung et al. 2007).

### 1.2.2. Kultivēšana bioreaktoros ar maisīšanu un skābekļa pievadīšanu

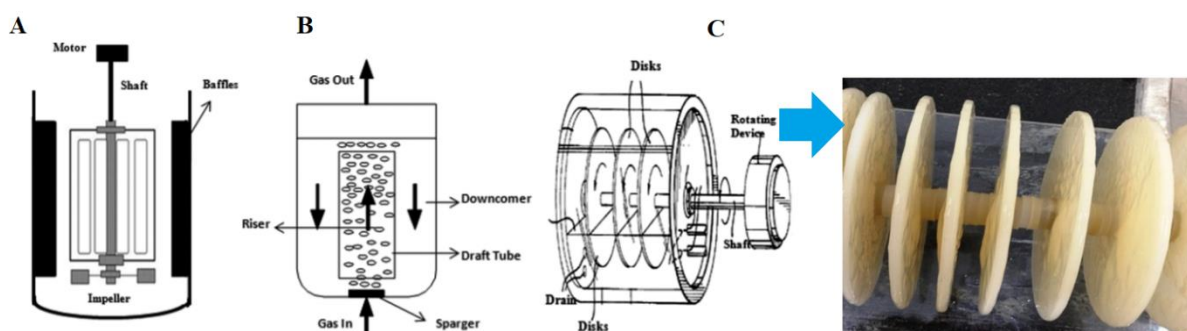
Šīs metodes palīdz nodrošināt labāku  $O_2$  piekļuvi baktērijām palielinot BC iznākumu no substrāta vienības, salīdzinot ar statisko periodisko kultivāciju (Blanco Parte et al. 2020). Papildus, izmantojot šo metodi ir iespējams iegūt dažāda veida BC, piemēram, hidrogēlus, ka arī dažāda izmēra lodīšu vai zvaigžņveida BC. Parasti BC struktūra ir atkarīga no rotācijas režīma (Sani and Dahman 2010).

Neskatoties uz to, ka BC sintēze parasti ir lielāka, kad tiek izmantota maisīšanas vai skābekļa / gaisa piespiedu pievadīšana, ar to ir saistīti vairāki trūkumi. Pirmais trūkums ir

saistīts ar producenta potenciālu mutāciju varbūtības pieaugumu. Izmantojot šādas metodes, daļa producenta šūnu var zaudēt spēju sintezēt BC (BC negatīvo mutantu veidošanās), kas noved pie ievērojamiem zaudējumiem. Lai samazinātu BC-negatīvo mutantu rašanos, tika piedāvāts pievienot barotnei etanolu, kas samazina mutantu veidošanos (Toyosaki et al. 1995; Son et al. 2001). Otrais trūkums ir BC kristāliskuma un polimerizācijas pakāpes samazināšanās, salīdzinot ar statisko kultivāciju (Watanabe et al. 1998). Trešais trūkums ir ievērojami lielāks enerģijas patēriņš maisīšanai skābekļa / gaisa piespiedu pievadīšanai, salīdzinot ar statisko vai statisko piebarošanas kultivāciju, kas neprasa lielu enerģijas patēriņu (Chen et al. 2013).

Šīs metodes īstenojamas, izmantojot dažādas konstrukcijas bioreaktorus (Blanco Parte et al. 2020). Pašlaik eksistē vairāki bioreaktoru tipi, kas ir piemēroti BC sintēzei: bioreaktors ar maisītāju (angl. *stirred-tank*), gaisa pacelšanas (angl. *airlift*), rotācijas disku bioreaktors (Blanco Parte et al. 2020). Bioreaktorā ar maisīšanu O<sub>2</sub> tiek efektīvāk piegādāts baktērijām. Gaisa pacelšanas bioreaktorā O<sub>2</sub> piegāde tiek nodrošināta no reaktora apakšas, tam ceļoties uz augšu šūnām tiek pievadīts skābeklis. Process ir enerģētiski efektīvāks nekā bioreaktorā ar maisītāju (Sani and Dahman 2010).

Rotācijas disku bioreaktorā BC plēve veidojas uz speciāliem diskiem, kas ir iegremdēti barotnē. Neskatoties uz to, ka var panākt lielāku BC sintēzi, tehnoloģija rotācijas disku bioreaktoram joprojām atrodas prototipa līmenī (Soleimani et al. 2021). Līdzīgi kā ar aerosola bioreaktoru šo reaktoru galvenais trūkums ir salīdzinoši ir augstas konstrukcijas un ekspluatācijas izmaksas.



4. Attēls. Bioreaktori ar maisīšanu skābekļa / gaisa piespiedu pievadīšanu (A) Bioreaktors ar maisītāju; (B) gaisa pacelšanas bioreaktors (C) BC veidošanas process rotācijas disku bioreaktorā (Sani and Dahman 2010; Soleimani et al. 2021).

Figure 4. Agitated BC cultivation in bioreactors. (A) Stirred-tank bioreactor; (B) airlift-bioreactor; (C) BC synthesis on rotary disc bioreactor surface (Sani and Dahman 2009; Soleimani et al. 2021).

### **1.3. Bakteriālās celulozes izmantošanas potenciāls**

Iepriekš minēto fizikālo īpašību dēļ BC ir daudz potenciālu pielietojumu vairākās jomās, un to var izmantot, lai iegūtu augstas kvalitātes videi draudzīgus produktus. Plašākais BC pielietojums saskatāms pārtikas rūpniecībā, iepakojšanas materiālos un biomedicīnā (Azeredo et al. 2019).

#### **1.3.1. Pārtikas rūpniecība**

Pārtikas rūpniecībā BC var izmantot kā funkcionalizētu pārklājumu produktiem, kas spēj palielināt to uzglabāšanas laiku, kā arī uztura bagātinātāju pacientiem ar kuņģa-zarnu trakta traucējumiem, aptaukošanos, sirds un asinsvadu slimībām un diabētu (Cho and Almeida; Shi et al. 2014). BC pārtikas pārklājumi ļautu ievērojami samazināt konservantu un citu ķīmisko savienojumu izmantošanu pārtikā (Rydz et al. 2018). Turklāt ir plaši zināms, ka diētas ar augstu tauku saturu var kaitēt cilvēku veselībai. Savukārt BC emulsijas var izmantot kā potenciālu tauku aizstājēju pārtikas produktos, piemēram, kūkās un saldējumā, nezaudējot taukvielām raksturīgās organoleptiskās un tehnoloģiskās funkcijas, vienlaicīgi samazinot produkta kaloritāti (Azeredo et al. 2019). Turklāt BC ir gremošanas trakta mikrobiotai draudzīgs produkts, kas uzlabo cilvēka imūnsistēmu, samazina iekaisuma procesus un holesterīna līmeni asinīs (Holscher 2017), tā ir “vispārēji atzīta par drošu” (angl. *generally recognized as safe*, GRAS statuss) (Shi et al. 2014). BC izmantošanas piemērs pārtikā ir *Nata de Coco*, ko tradicionāli iegūst, raudzējot kokosriekstu pienu ar EB un iegūstot BC saturošu želejveida produktu (Phong et al. 2017).

#### **1.3.2. Iepakojumu materiāli**

BC var izmantot arī iepakojuma materiālu sastāvā, kas būtu videi draudzīgi un biodegradējamai salīdzinājumā ar plastmasām, kuras joprojām galvenokārt tiek iegūtas no naftas produktiem, nav biodegradējamās un ir kaitīgs videi un cilvēkam (Proshad et al. 2017). Ņemot vērā BC mehāniskās īpašības, tā ir daudzsološa alternatīva videi draudzīgu, izturīgu iepakojuma materiālu ražošanai, un nākotnē tai ir potenciāls aizstāt fosilās izcelsmes plastmasas biodegradējamu iepakojšanas kompozītmateriālu sastāvā.

#### **1.3.3. Biomedicīna**

BC ir plašs potenciāls pielietojums biomedicīnā: piemēram, funkcionalizētie brūču pārsienamie materiāli, mākslīga āda un asinsvadi, audu inženierijas matricas, nervu segumi, fasciju, saistaudu, kaulu un skrimšļu protezēšanā un ķirurģijā (Wan et al. 2011; Picheth et al. 2017). Jau ir zināms, ka brūču ārstēšanā BC plēves efektīvi nodrošina audu reģenerācijai labvēlīgus apstākļus (Gorgieva and Trček 2019). Šīm brūču apstrādes materiāliem var pievienot antibakteriālus līdzekļus, lai samazinātu infekcijas risku (Rouabhia et al. 2014). BC var

apvienot ar dažāda veida zālēm un nodrošināt matricu kontrolētai zāļu pievadīšanai ievainojuma vietai (Pavaloiu et al. 2014; Ullah et al. 2016). Turklāt dažādas sintētiskās protēzes bieži nav bioloģiski saderīgas un var izraisīt organismā atgrūšanas reakcijas, turpretī uz protēzes uz BC bāzes ir bioloģiski saderīgas un veicina šūnu proliferāciju, asinsvadu veidošanu BC protēžu iekšpusē nodrošinot matricas funkciju, (Ul-Islam et al. 2015).

#### 1.3.4. Citas nozares

Elektronikā dažādiem BC kompozītmateriāliem ir potenciāls būt par videi draudzīgam materiālam elastīgu ekrānu (Ummartyotin et al. 2011), gaismas diožu (Legnani et al. 2008), mitruma un gāzu sensoru (Hu et al. 2011) ražošanā. Elastīgās BC plēves ar magnetīta ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanodaļiņām var izmantot magnētiskās rezonanses attēlu veidošanā (Ul-Islam et al. 2015).

Ir ziņots, ka kosmetoloģijā BC produkti jau tiek izmantoti kā sejas ādas kopšanas maskas, galvenokārt pateicoties tā spējai mitrināt ādu un netoksicitātei. Šādas maskas tiek izmantotas arī, lai mitrinātu pacienta ādu pirms operācijām (Ullah et al. 2016).

BC potenciāli var izmantot kā imobilizācijas platformu ķīmiskajā rūpniecībā. Eksperimenti rāda, ka BC izmantošana enzīmu imobilizācijai ļāva uzlabot rūpniecisko lipāžu īpašības salīdzinājumā ar brīvajām lipāzēm (Sheldon and van Pelt 2013). Ir ziņots, ka BC imobilizētās lipāzes uzrāda uzlabotu aktivitāti gan skābos, gan sārmainos apstākļos, kā arī augstāku aktivitāti temperatūrā līdz  $30^\circ\text{C}$ , ļaujot samazināt enerģijas patēriņu ražošanas procesos (Cai et al. 2018).

Turklāt BC var izmantot filtrācijas membrānās, lai nodrošinātu porainu grafēna oksīda tīklu, tās uzrāda labu mehānisko izturību, stabilitāti ūdenī un jonu caurlaidību, tādējādi ļaujot to atzīt par perspektīvām ūdens attīrīšanā (Fang et al. 2016).

#### 1.4. Izaicinājumi bakteriālās celulozes iegūšanā un komercializācijā

Neskatoties uz visām BC pielietošanas priekšrocībām, tās rūpnieciskā ražošana joprojām ir problemātiska, kas kavē tās sekmīgu komercializāciju. Vairāki uzņēmumi ir mēģinājuši komercializēt BC, bet lielākoties mēģinājumi bija neveiksmīgi. Deviņdesmitajos gados daži Japānas uzņēmumi un Japānas Nacionālais institūts sadarbojās, lai izveidotu BC ražotni. Tomēr efektīvu fermentācijas sistēmu trūkuma dēļ BC komerciālā ražošana netika panākta. Turklāt Brazīlijas uzņēmums *BioFill Produtos Bioetecnológicos* izmantoja BC, lai veidotu dažādus biomedicīnas produktu prototipus. Tomēr BC iegūšana tika pārtraukta, jo pāreja uz liela mēroga ražošanu nebija veiksmīga (da Gama and Dourado 2018). Joprojām ir tikai daži BC komercializācijas mēģinājumi vainagojās panākumiem. Kā jau minēts iepriekš, *Nata de Coco* ir BC izmantošanas piemērs pārtikā, kas tiek īstenots kopš 1954. gada un ko raksturo diezgan

lieli ražošanas apjomi, kaut arī samērā zems ieņēmumu līmenis un renabilitāte (Blanco Parte et al. 2020). Uzņēmums *Jonsons & Jonsons* 20. gadsimta 80. gados uzsāka mēģinājumu BC komercializēt plašā mērogā. Pētījumi galvenokārt tika veikti biomedicīnas jomā. Neskatoties uz vairāku patentu un BC produkcijas prototipu izgatavošanu, uzņēmums nerasniedza komerciālas ražošanas mērogu, iespējams, ražošanas procesu lielu kapitāla un ražošanas izmaksu dēļ. 1996. gadā *Xylos Corporation* ieguva tiesības izmantot šos patentus un 2001. – 2003. gadā tirgoja vairākus brūču apstrādes līdzekļus. 2012. gadā šo biznesu nopirka uzņēmums *Lochmann & Rauscher*, kas turpina BC produkta ražošanu līdz šai dienai. Polijas zinātnieki no Lodzas Tehniskās universitātes 2006. gadā publicēja rezultātus par BC pielietojumu dažādas pakāpes apdegumu klīniskajā ārstēšanā. Pēc kāda laika tehnoloģiju nopirka Polijas uzņēmums *BOWIL Biotech Ltd.*, kas ir uzsācis BC brūču pārsiešanas materiālu un kosmētikas līdzekļu ražošanu, tirgojot tos ar tirdzniecības nosaukumu *CELMAT*<sup>®</sup> (da Gama un Dourado 2018).

### **1.5. Alternatīvie substrāti bakteriālās celulozes ražošanai**

Kā jau minēts, BC izstrādājumu komercializāciju ir grūti panākt to samērā augstu ražošanas izmaksu dēļ. Viena no lielākajām problēmām ir standarta BC augšanas barotnes augstās izmaksas, kas var sasniegt līdz 30% no procesa ražošanas izmaksām (Rivas et al. 2004). Lai samazinātu ražošanas izmaksas, ir jāoptimizē ražošanas process un īpaši BC augšanas substrātu izmaksas. Viens no iespējamiem risinājumiem ir alternatīvu zemu izmaksu oglekļa avotu izmantošana barotnēs (Jozala et al. 2015; Lin et al. 2020). Tāpēc par perspektīviem tiek uzskatīti pētījumi par rūpniecības blakusproduktu un lauksaimniecības atlikumu izmantošanu BC ražošanā, piemēram, jēlglicerīns, kas paliek pāri biodīzeļdegvielas ražošanas procesos, augļu pārstrādes blakusprodukti, melases, un sūkalas (Jozala et al. 2015).

Tomēr ar alternatīvu un lētāku oglekļa avotu izmantošanu, ir saistīti vairāki ierobežojumi jo tas ietekmē ne tikai BC produktivitāti, bet arī tādas tās īpašības kā kristāliskums, O<sub>2</sub> un H<sub>2</sub>O caurlaidība un polimerizācijas pakāpe. Turklāt augšanas barotnes prasības un BC produktivitāte ļoti variē starp EB sugām un celmiem (Jozala et al. 2015; Salari et al. 2019).

### **1.6. Sūkalas kā alternatīva izejviela biotehnoloģiskajos procesos**

Ir atzīts, ka starp lauksaimniecības un rūpniecības blakusproduktiem, sūkalas ir vienas no problemātiskākajām ņemot vērā to ietekmi uz vidi, lielus apjomus un relatīvi mazās efektīvas valorizācijas iespējas (Zotta et al. 2020). Piena ražošana un pārstrāde visā pasaulē strauji pieaug, pārsniedzot 10% ik pēc četriem gadiem. Piena produktu pārstrādes laikā tikai 10 – 20% piena apjoma tiek pārveidoti par vēlamo gala produktu (siers, kazeīns, biezpiens, jogurts utt.) t.i.

80 – 90% sastāda sūkalas (Panghal et al. 2018). Pasaulē sūkalu apjomi gadā sasniedz aptuveni  $180 - 190 \times 10^6$  tonnas (Baldasso et al. 2011). Sūkalu sausās masas lielāko daļu jeb 70% sastāda laktoze (kā arī, nelieli daudzumi glikozes, galaktozes, laktulozes un arabinozes). Piena sūkalu labi zināmu augsto bioloģisko vērtību attiecina uz olbaltumvielu (galvenokārt albumīnu un globulīnu), aminoskābju, vitamīnu ( $B_6$  un  $B_{12}$ ), pienskābes un citronskābju, minerālu, piemēram, kalcija, magnija, fosfora saturu, kā arī citi nenozīmīgi bioloģiski aktīvi savienojumu klātbūtni (Revin et al. 2018). No visiem piena rūpniecības blakusproduktiem sūkalas rada vislielāko vides piesārņojumu (Prazeres et al. 2012).

Sūkalu galvenā problēma ir tā, ka tikai aptuveni 50% no šī blakusprodukta tiek atbilstoši utilizēti vai pārstrādāti, bet pārējie tiek uzskatīti par atkritumiem, jo trūkst efektīvu turpmāko pārstrādes tehnoloģiju. Sūkalas rada lielu organisko slodzi, tāpēc tai ir nopietna piesārņojuma ietekme uz vidi un jo īpaši uz ūdeņiem. Sūkalām ir raksturīgs liels bioķīmiskā skābekļa patēriņš un ķīmiskā skābekļa patēriņš – attiecīgi  $27 - 60 \text{ kg/m}^3$  un  $50 - 102 \text{ kg/m}^3$ . Tas liecina par sūkalu augstu noturību pret oksidēšanos jeb noārdīšanos bioloģisko vai ķīmisko oksidējošo aģentu ( $O_2$  – ekvivalenti) iedarbībā (Panghal et al. 2018). To nosaka lielā organisko vielu, īpaši laktozes ( $39 - 60 \text{ kg/m}^3$ ) koncentrācija, kurus noārdīšanās ir apgrūtināta, rezultātā radot nopietnas problēmas gan piena rūpniecībai, gan ārējai videi.

Izšķir divu veidu sūkalas (3. tabula): saldpiena un skābpiena. Saldpiena sūkalas ar pH  $5,6 - 6,3$  rodas siera ražošanas procesā, ja tiek izmantoti piena recināšanas fermenti, piemēram, himozīns vai pepsīns. Savukārt skābpiena sūkalas ar pH  $4,4 - 4,6$  atdalās skābpiena sieru un biezpiena ražošanā, kad pienu sarecina ar pienskābi, kas veidojas, pienskābes baktērijām pārraudzējot laktozi (Kaur et al. 2020).

2. tabula

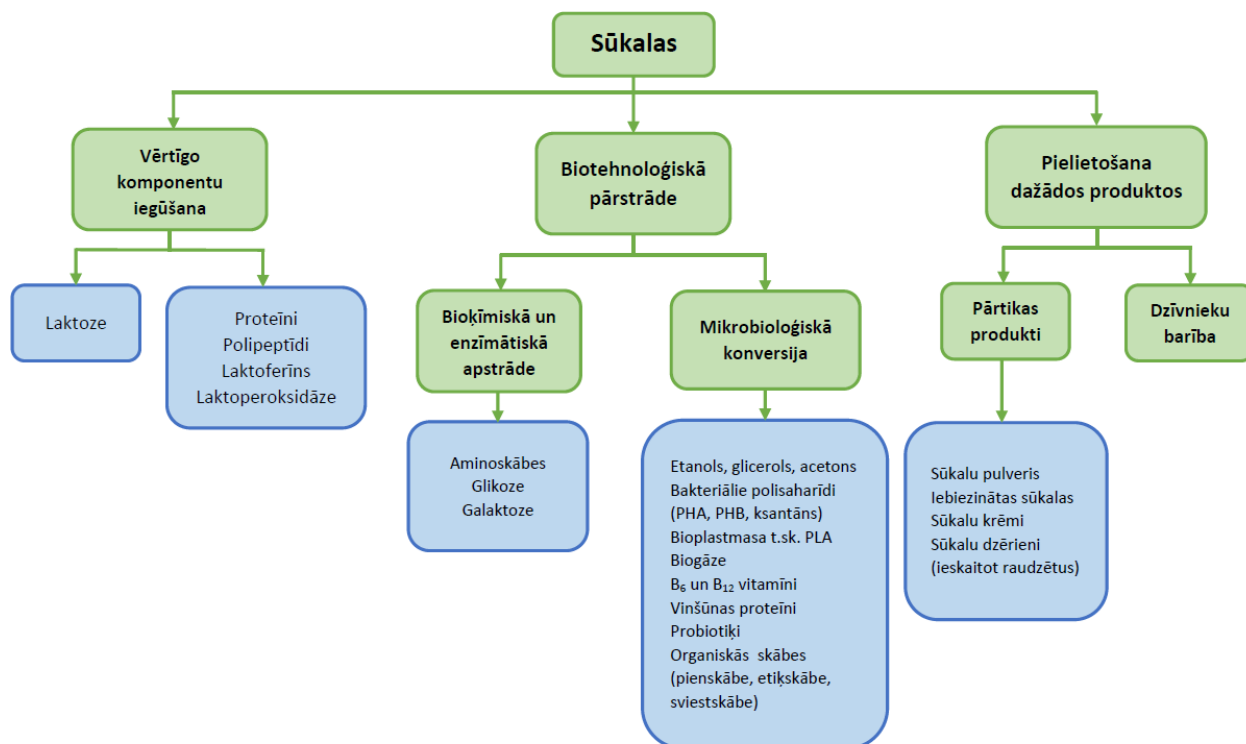
Saldpiena un skābpiena sūkalu salīdzinājums (Kaur et al. 2020).

Table 2

Comparison of sweet and cheese whey (Kaur et al. 2020).

Sastāvs	Saldpiena sūkalas (siera sūkalas), g/L	Skābpiena sūkalas, g/L
Kopējā sausna	63 – 70	63 – 70
Laktoze	46 – 52	44 – 46
Proteīni	6 – 10	6 – 8
Laktāti	2	6,4
Kalcijs	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fosfāti	1 – 3	2 – 4,5
Hlorīdi	1,1	1,1
pH	6 – 7	<5

Pēdējās desmitgadēs tika veikti vairāki pētījumi ar mērķi atrast jaunas sūkalu valorizācijas metodes un samazinātu sūkalu piesārņojošo iedarbību uz apkārtējo vidi (Koutinas et al. 2009). Sūkalas satur cukuru, kas padara to piemērotu dažādu biotehnoloģisko produktu rūpnieciskai ražošanai (Prazeres et al. 2012). Sūkalu valorizācijai ir vairākas mūsdienīgas pieejas, kas apkopotas 5. attēlā. Papildus 5. attēlā minētajiem pielietojumiem ilgtspējīgu risinājumu sūkalu valorizācijai var sniegt, izmantojot to kā lētu fermentācijas vidi daudzveidīgu biopolimēru un citu bioaktīvu savienojumu ražošanai (Zotta et al. 2020), ieskaitot arī BC.



5. attēls. Sūkalu valorizācijas mūsdienīgas iespējas (Semjonovs et al 2021).

Figure 5. Contemporary methods of whey valorisation (Semjonovs et al 2021).

### 1.7. Sūkalas kā substrāts bakteriālās celulozes iegūšanai

Šobrīd joprojām ir salīdzinoši maz pētījumu, kuros sūkalas tika novērtētas kā BC ražošanas substrāts. Pētījumā *Gluconabacter sucrofermentans* B-11267 celms tika izmantots, lai novērtētu sūkalas kā alternatīvu substrātu BC iegūšanai (Revin et al. 2018). Eksperimenti parādīja, ka *G. sucrofermentans* uz sūkalām sintezēja 5,45 g/L BC (sausais svars), kas ir vairāk, salīdzinot ar BC sintēzi uz standarta HS barotnes (2,14 g/L). Produkta maksimālais veidošanās ātrums notika fermentācijas procesa pirmajā dienā. Šajā laikā laktozes daudzums samazinājās no 42,1 g/L līdz 22,4 g/L, norādot, ka šis celms varēja izmantot laktozi kā oglekļa avotu. Šajā pētījumā tika parādīts, ka sūkalas ir samērā labs alternatīvs oglekļa avots, pateicoties

galvenokārt celma spējas hidrolizēt laktozi. Tomēr pēc audzēšanas sūkalās tika novērotas izmaiņas BC mikromorfoloģijā un kristāliskumā, salīdzinot ar iegūtu standarta HS barotnē. Izmantojot elektronmikroskopiju, tika noteikts, ka BC mikrofibrilu platums ir 60 – 90 nm un 100 – 180 nm – uz HS standarta barotnes un sūkalām, attiecīgi. Tika konstatēts, ka kristāliskuma indekss BC iegūtai uz sūkalām bija zemāks (50,2%) nekā HS (79,9%) barotnē, tādējādi domājams, ka samazinot arī tās mehānisko izturību un padarot to mazāk piemērotu izmantošanai tādos izstrādājumos, kur šīs īpašības ir kvalitāti noteicošas. Tomēr vienlaicīgi tika arī parādīts, ka audzēšana sūkalās neietekmē BC ķīmisko struktūru (Revin et al. 2018). Ir jāsecina, ka BC augšanas barotnes mainīšana, izmantojot alternatīvus C substrātus, piemēram, sūkalas, ražošanas procesa laikā var izraisīt BC mikrostruktūras izmaiņas, tādējādi ietekmējot vēlamā galaprodukta fizikālās un mehāniskās īpašības (piemēram, kristāliskuma indeksu, polimerizācijas pakāpi, molekulasu, ūdens noturības spēju, skābekļa un ūdens caurlaidības ātrumu) (Jozala et al. 2015; Gorgieva and Trček 2019).

Citā pētījumā tika salīdzināts BC iznākums *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582 celmam, piena sūkalās salīdzinājumā ar standarta HS barotni, kā arī ar barotnēm, kas satur citus alternatīvus substrātus, piemēram, bojātus augļus, kā arī bojātus augļus un sūkalu maisījumus dažādās proporcijās. Eksperimenti parādīja, ka, izmantojot sūkalu barotni, tika iegūts zemāks BC sausais svars (25 mg/ml, slapjais svars), salīdzinot ar standarta HS barotni (30,8 mg/ml) un attiecīgi bojāto augļu barotni (60,2 mg/mL). Tika uzsvērts, ka *G. xylinus* ATCC 53582 vislabāk metabolizē monosaharīdus, piemēram, fruktozi un glikozi. Tika konstatēts, ka šādas jauktās barotnes nav efektīvākas, salīdzinot ar bojātu augļu substrātu bez sūkalu klātbūtnes, tādējādi sūkalām bija konstatēta negatīva ietekme uz BC sintēzi, ko gan varētu skaidrot arī ar citiem faktoriem (piem. ūdens aktivitāti, inhibitoru klātbūtni u.c., kas pētījumā netika aplūkoti). Kā jau iepriekš minēts, galvenais C avots sūkalās ir laktoze, kas ir disaharīds un nav viegli metabolizējams *G. xylinus* (Jozala et al. 2015) un citām EB kultūras.

Dažos pētījumos tika novērots, ka sūkalu un laktozi saturošu barotņu izmantošana bija saistīta ar salīdzinoši zemu BC produkciju. Vienā pētījumā tika konstatēts, ka *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 neefektīvi metabolizēja laktozi. Baktērijas spēja iegūt tikai 1,6 g/L BC, audzējot laktozē, savukārt, audzējot saharozē, tā spēja saražot 4,9 g/L BC (Tsouko et al. 2015). Citā pētījumā *Acetobacter xylinum* spēja sintezēt 1,62 g/L BC, audzējot uz laktozes. Salīdzinājumam – šis celms sasniedza maksimālo BC produkciju uz fruktozes 7,38 g/L (Embuscado et al. 1994).

Pārējie pētījumi rāda, ka laktoze nenodrošina ievērojamu BC sintēzi. Ir parādīts, ka siera sūkalu permeāts nenodrošina *Acetobacter xylinum* 10821 un *Acetobacter xylinum* 23700 BC sintēzi ievērojamu (Thompson and Hamilton 2000). Cits pētījums parādīja zemu BC sintēzes

līmeni *Gluconacetobacter sacchari*, kas izolēts no tējas sēnes dzēriena, uz HS barotnēm kas modificētas aizstājot glikozi ar laktozi (0,31 g/L) un siera sūkalu barotnē bez papildu piedevām (0,08 g/L). BC sintēzes līmeņi bija zemāki salīdzinājumā ar standarta HS barotnēm pēc 96 h kultivēšanas, kur tika sasniegti 2,7 g/L (Carreira et al. 2011). Līdzīgi, cits pētījums parādīja, ka *Gluconacetobacter xylinus* K3 sintezēja vien 0,07 g/L sausas BC uz laktozes (Nguyen et al. 2008). Turklāt citā pētījumā tika konstatēts, ka *G. xylinus* ATCC 53524 sasniedza 0,09 g/L BC produkciju uz galaktozes (Mikkelsen et al. 2009). Minimālā BC klātbūtne laktozes un sūkalu saturošā barotnē citā pētījumā tika attiecināta uz sējmateriāla paliekām vai brīvās glikozes izdalīšanos laktozes hidrolīzes ietekmē (Carreira et al. 2011). Zemu BC produkciju sūkalās vai laktozi saturošā barotnē var izraisīt *lacZ* gēna trūkums, kas ir atbildīgs par  $\beta$ -galaktozidāzes enzīmu, kas nodrošina laktozes hidrolīzi glikozes un galaktozes monomēros (Thompson un Hamilton 2001; Battad-Bernardo et al. 2004).

Kā risinājums tika ierosināta rekombinantā EB celma izveide, kas spētu hidrolizēt laktozi un sintezēt BC. Ievietojot *lacZ* gēnu (kodē  $\beta$ -galaktozidāzi), tika izveidots *Acetobacter xylinum* rekombinantais celms, tādējādi padarot par iespējamu laktozes hidrolīzi (Battad-Bernardo et al. 2004). Šis gēns kodē vienu no trim fermentiem, kas atbild par *Escherichia coli* spēju metabolizēt laktozi. Konstruētais vektors mini-Tn10:*lacZ*:*kan* tika ievietots *A. xylinus* savvaļas tipa celmā ar nejausās transpozona mutāģenēzes ceļā, tādējādi izveidojot celmu ar spēju patērēt laktozi un sintezēt BC, iegūstot to sintezējošo celmu *A. xylinus* ITz3. Konstatēts, ka *lacZ* gēns tika ievietots baktērijas hromosomā. Celms saglabāja hromosomā ievietota gēna stabilitāti neselektīvā barotnē pēc vairāk nekā 60 paaudzēm. Mutantu celms 1,82 g/L sintezēja BC sūkalu substrātā, kas nozīmē 28 reizes lielāku BC produkcijas pieaugumu, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu (Battad-Bernardo et al. 2004). Neskatoties uz to, BC iznākums joprojām nebija pietiekami liels, lai ieviestu šo celmu komerciālā BC ražošanā.

Cita pieeja BC sintēzes efektīvizēšanai ir varētu būt sūkalu sākotnējā hidrolītiskā apstrāde. To var panākt ar divām metodēm: enzimatisku hidrolīzi, pievienojot  $\beta$ -galaktozidāzes fermentu laktozi saturošai barotnei, vai skābu hidrolīzi, ko var panākt, pievienojot skābi enzīma vietā (Amaro et al. 2019) un vēlāk barotni neitralizējot līdz kultūrai optimālajam līmenim. Enzimātiskās pirmsapstrādes lietderīgums tika pārbaudīts izmantojot  $\beta$ -galaktozidāzi sūkalu hidrolītiskajai apstrādei. Rezultāti parādīja, ka šāda siera sūkalu enzimatiskā pirmsapstrāde uzlaboja *G. xylinus* PTCC 1734 BC sintēzi līdz 3,55 g/L, kas, pēc autoru konstatējuma, bija būtiski augstāka par neapstrādātām sūkalām un augstāka par standarta barotnē HS barotnē (3,2 g/L) sasniegto (Salari et al. 2019). Cits pētījums apskata BC iegūšanu uz sūkalu permeāta, izmantojot  $\beta$ -galaktozidāzes enzīmu. Šajā pētījumā *Komagataeibacter xylinus* DSM 2325 sintezēja 6,77 g/L BC uz enzimatiski apstrādātā sūkalu permeāta (Rollini et al. 2020). Tomēr,

neraugoties uz efektivitāti, enzimatiskā pirmsapstrāde ievērojami palielina ražošanas izmaksas (Amaro et al. 2019). Turklāt tika novērotas izmaiņas BC mikrostruktūrā, salīdzinot ar standarta barotnēm, tā, BC kristāliskuma indekss uz sūkalām bija 61,86%, kas ir būtiski zemāks par konstatētu BC kristāliskuma indeksu no enzimatiski neapstrādātās standarta HS barotnes (79,07%) (Salari et al. 2019).

### 1.8. Maģistra darba tēmas aktualitātes pamatojums

Ņemot vērā to, ka BC komerciālās ražošanas procesam jābūt maksimāli vienkāršam un rentablam, sūkalas var uzskatīt par lētāku substrātu BC ražošanai, papildus samazinot vides piesārņojumu ar piena pārstrādes blakusproduktiem. Tomēr pašlaik ziņotā BC sintēze uz sūkalām vai laktozi saturošām barotnēm joprojām ir salīdzinoši zema – kas, atsaucoties uz pieejamiem literatūras avotiem – nepārsniedz  $8,09 \pm 0,41$  g/L (Semjonovs et al. 2017a), un BC sintēze dažādiem celmiem ievērojami atšķiras. Tāpēc ir nepieciešams intensificēt pētījumus, ar mērķi novērtēt BC producentu celmus, kas būtu piemēroti sūkalu fermentācijai, tostarp ņemot vērā arī uz sūkalām sintezētās BC fizikālas īpašības. Lai sūkalas varētu kalpot par efektīvu BC sintēzes substrātu, ir jāpielieto EB celmi ar aktīviem *lacZ* gēniem, kas nodrošina laktozes hidrolīzi (Battad-Bernardo et al. 2004), un / vai jāveic sūkalu hidrolītiska pirmsapstrāde. Neskatoties uz spēju hidrolizēt laktozi, EB turpmākam metabolismam parasti izmanto tikai glikozi, atstājot galaktozi neasimilētu (Mikkelsen et al. 2009). Celmu meklēšana, kas asimilē gan glikozi, gan galaktozi, būtiski ietekmē un tādējādi paaugstinātu BC ražošanas efektivitāti. Citu problēmu varētu saistīt nevis ar laktozes metabolismu, bet ar nepietiekamu sūkalu olbaltumvielu hidrolīzi. Relatīvi vāja proteāžu aktivitāte (Bossi et al. 2006) var būt nepietiekama, lai EB varētu iegūt visas nepieciešamās augšanas vielas no sūkalām, piemēram, N, kas ierobežo BC sintēzi. Šis jautājums joprojām paliek neizpētīts. Kaut arī sūkalas var nodrošināt lētāku C avotu BC sintēzei nekā parastās sintētiskās barotnes, tā izmantošana var izraisīt dažu vēlamo BC īpašību zaudēšanu, tādu īpašību, kas ir būtiskas konkrēta galaprodukta kvalitātei. Ir jākonstatē, ka sūkalas šobrīd var atzīt par diezgan problemātisku alternatīvu augšanas substrātu rūpnieciskai BC ražošanai. Tomēr turpmāki pētījumi var uzlabot izredzes atrast lētāku alternatīvu augšanas substrātu rūpnieciskai BC ražošanai, kā arī sūkalu valorizācijas efektivitātes paaugstināšanai.

## 2. Materiāli un metodes

### 2.1. Materiāli

#### Izmantotas mikroorganismu kultūras:

- *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463
- *Komagataeibacter hansenii* B-22
- *Komagataeibacter hansenii* DSM 5602

#### Siera sūkalas

Siera sūkalas tika saņemtas no A/S *Rankas Piens*. Sūkalu sastāvs ir apkopots 3. tabulā. Neapstrādāto sūkalu sastāva analīzes tika veiktas SIA *J. S. HAMILTON* laboratorijā. Laktoze, glikozes un galaktozes koncentrācija tika noteikta, izmantojot laktozes un tās monomēru – glikozes un galaktozes enzīmatiskās kontroles reaģentu komplektus (Megazyme, Īrija).

3. tabula

Siera sūkalu sastāvs.

Table 3

The composition of cheese whey.

Sastāvs	Mērvienība	Koncentrācija
Laktoze	g/L	47 – 49
Glikoze	g/L	0,8 – 1,1
Galaktoze	g/L	0,3 – 0,4
Proteīni	g/L	8
Tauki	g/100 g	0,8
Mg	mg/100 g	7,83
K	mg/100 g	164
Na	mg/100 g	48,1
Ca	mg/100 g	38,7

#### Melase

Cukurbiešu melase tika saņemta no SIA *Latvijas Lauku Serviss* un ir raksturojama ar šādiem rādītājiem: kopēja sausna, 80%; saharoze, 47,3%; proteīni, 6,2%; pelni 16,62%; kopējas minerālvielas 1,9 g/100 g; pH 8,3.

#### Barotnes

4. tabula

Mikroorganismu kultivācijas barotnes.

Table 4

Cultivation media.

Barotnes nosaukums	Sastāvs
Standarta HS barotne (Harrigan 1998)	Glikoze, 20 g/L, (Sigma-Aldrich, ASV) Rauga ekstrakts, 5 g/L (Biolife, Itālija) Liellopu gaļas bakterioloģiskais peptons, 5 g/L (Biolife, Itālija) Citronskābe, 1,15 g/L (Enola, Čehija) MgSO <sub>4</sub> , 0,2 g/L (REAHIM, PSRS) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,7 (REAHIM, PSRS)
Manitola barotne (Oikawa et al. 1995)	Manitols, 15 g/L (Sigma-Aldrich, ASV) Liellopu gaļas bakterioloģiskais peptons, 5 g/L Rauga ekstrakts 20 g/L
Modificētas sūkalu barotnes	
Sūkalas ar rauga ekstraktu	Sūkalas ar rauga ekstraktu, 5 g/L
Sūkalas ar peptonu	Sūkalas ar liellopu gaļas bakterioloģisko peptonu, 5 g/L (Sigma-Aldrich, ASV) 5 g/L
Sūkalas ar NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sūkalas ar NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 g/L (REAHIM, PSRS)
Sūkalas ar melasi	Sūkalas ar melasi 20 mL/L, kas atbilst ~20 g/L saharozes koncentrācijai

Eksperimentālajos nolūkos HS barotnes sastāvs tika modificēts, glikozi, aizstājot ar galaktozi (Enola, Čehija) vai laktozi (Enola, Čehija) 20 g/L koncentrācijā.

## 2.2. Metodes

### Barotņu sagatavošana

Visas barotnes tika autoklavētas +121°C 15 min, izmantojot (VK-30, TZMOI, PSRS). Nepieciešamības gadījumā pH tika regulēts ar 1M HCl vai 1M NaOH pievienošanu līdz pH 6,0 ± 0,1 (Harrigan 1998), izmantojot pH metru (HI2211 pH/ORP meter, Hanna instruments, ASV).

### Sūkalu apstrāde – standarta procedūra

1. Sūkalas karsē 10 minūtes +90°C, lai panāktu proteīna izgulsnēšanos;
2. Pēc kasēšanas sūkalas centrifugē 8 000 rpm 10 min (FC5816, OHAUS, Vācija), lai atdalītu izgulsnējušos proteīnus. Tas nodrošina proteīnu kopkoncentrācijas samazināšanu no ~8 g/L līdz ~3 g/L;
3. Pēc centrifugēšanas, sūkalu supernatantu sterilizē autoklavā +121°C 15 min;
4. Iegūtai sūkalu barotnei ievērojot sterilitātes prasības regulē pH līdz 6,0 ± 0,1.

## **Modificēta sūkalu barotnes pirmsapstrāde eksperimentālos nolūkos**

- Sūkalas karsē 30 min +60°C, kas atbilst zemas temperatūras pasterizēšanas procedūrai (Lau et al. 1991). Sūkalu barotne netiek autoklavēta;
- Sūkalas karsē 1 min +80°C, kas atbilst augstas temperatūras pasterizēšanas procedūrai (Barrett et al. 1999). Sūkalu barotne netiek autoklavēta;
- Sūkalas autoklavē +121°C 15 minūtes, izmantojot standarta procedūru.

## **Sējmateriāla sagatavošana**

1. Laminārajā plūsmas boksā (BAVnp-01-“Laminar S”-1,2, Lorica, Krievija) ievērojot sterilitāti, 50 mL barotnes pārnes ar seroloģisko pipeti 100 mL koniskajā kolbā;
2. Barotnei pievieno 5 mL atbilstošas kultūras sējmateriāla (10%), kas iepriekš uzglabāta –18°C ar 10% glicerīna piedevu;
3. Sējmateriālu turpmākiem eksperimentiem audzē izmantojot orbitālo kratītāju-inkubatoru (ES-20, Biosan, Latvija) ar rotācijas intensitāti 150 rpm, 24 h, +30°C temperatūrā.

## **BC producentu kultivēšana**

1. Ievērojot sterilitāti, 50 mL barotnes tika pārnestas ar seroloģisko pipeti 300 mL koniskajās kolbās. Lai nodrošinātu pietiekamu atkārtojumu skaitu, katram pētāmajam lielumam tika veikti vismaz seši atkārtojumi. Eksperimenta gaitā, ņemot vērā eksperimentā izmantotu nelielu barotnes daudzumu (50 mL), tika ievērota optimāla barotnes virsmas un tilpuma attiecība 50 mL / 75 cm<sup>2</sup> (Ruka et al. 2012);
2. Eksperimentos sējmateriālu pievieno 5% koncentrācijā;
3. BC producenti tiek kultivēti statiski termostatā (BD56, Binder, Šveice) +30°C temperatūrā, 10 diennaktis, tās eksponenciālās augšanas fāzes posma ietvaros (Harrigan 1998).

## **Paraugu noņemšana eksperimenta gaitā**

No kolbām noņem 3 mL paraugus, lai noteiktu pH, ka arī cukuru (glikoze, laktoze, galaktoze), manitola un organisko skābju koncentrācijas (etiķskābe, glikonskābe). Paraugus analizē pirmajā (eksperimenta sākumā), piektajā un 10. eksperimenta dienā.

### **BC paraugu sagatavošana tās iznākuma noteikšanai**

1. Eksperimenta beigās BC plēves ar pinceti izņem no kolbām un pārnes varglāzēs ar 300 mL +30°C destilēta H<sub>2</sub>O;
2. Vārglāzes ievieto kratītājā uz 15 min ar 150 rpm;
3. Pēc skalošanas cikla beigām ūdeni nomaina un procesu atkārto vēl divas reizes;
4. Pēc trešās skalošanas reizes ūdens varglāzē tika nomainīts uz iepriekš sagatavotiem 200 mL 0,1 M NaOH, un BC plēves tiek karsētas 20 min +90°C temperatūrā, lai atbrīvotos no biomasas un barotnes paliekām (Semjonovs et al. 2017a);
5. 0,1 M NaOH nomaina uz destilēto H<sub>2</sub>O, un atkārto skalošanas procedūru vēl divas reizēs līdz pH paliek neitrāls.

### **BC sausā svara noteikšana**

1. Izmantojot pinceti, BC paraugus izņem no vārglāzes un nosusināti starp filtrpapīra loksnēm 10 min laikā.
2. Izmantojot svarus (Kern PLS, Kern, Vācija) nosver svarglāzes, tajos ievieto BC paraugus;
1. BC sauso svaru nosaka gravimetriski (bez vākiem) izmantojot žāvskapi (2B-151,OZMO, PSRS); +105°C temperatūrā, pēc 24 h, to aprēķinot pēc formulas (Harrigan 1998):

$$BC \text{ sausais svars} = S_1 - S_0$$

kur,  $S_1$  – svarglāzes svars kopā ar izkaltēto BC, g/L;

$S_0$  – svarglāzes svars bez BC, g/L.

BC sausais svars tiek kontrolēts visos paraugos.

### **Sūkalu enzimatiskā hidrolīze**

1. Pēc sūkalu standarta pirmsapstrādes, to pH pazemina līdz pH 5, kas atbilst optimālām līmenim šī enzīma aktivitātei (Das et al. 2015); 250 mL sūkalu pievieno 0,83 mL β-galaktozidāzes enzīma (35 U/mL; Megazyme, Īrija), lai panāktu pietiekamu enzīma aktivitāti (Das et al. 2015; Rollini et al. 2020);
2. Inkubē 180 min, +35 °C temperatūra, uz kratītāja pie 120 rpm;
3. Uzkaršē līdz +80°C, lai inaktivētu β-galaktozidāzes enzīmu;
4. Pirms barotnes sterilizēšanas (+121°C 15 min) pH noregulē uz 7,0;
5. Pēc sterilizēšanas barotnes pH pazemina līdz pH 6, izmantojot 1 M HCl.

### Sūkalu skābā hidrolīze

1. Pēc sūkalu standarta apstrādes, tām pievieno 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> līdz ir sasniegts pH 1,0;
2. Kolbas inkubē termostatā +80°C temperatūrā 90 vai 180 min, iz pēc 10 min tās sakratot (Coughlin and Nickerson 1975);
3. Pēc hidrolīzes beigām kolbas strauji atdzesē un to saturu pazemina neitralizē līdz pH 7,0, izmantojot 10 M NaOH;
4. Hidrolizētas sūkalas tiek autoklavētas, tad pH pazemina līdz pH 6,0 ± 0,1, izmantojot 0,1 M HCl.

### Produktu iznākuma noteikšana

Produktu iznākums (no substrāta vienības) tika noteikts pēc formulas:

$$Y_{P/S} = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1} \times 100\%$$

kur, Y<sub>P/S</sub> – iznākums no patērētā substrāta;

P<sub>0</sub> – BC sausais svars eksperimenta sākumā, g/L (tika pieņemts par 0);

P<sub>1</sub> – BC sausais svars eksperimenta beigās, g/L;

S<sub>0</sub> – substrāta koncentrācija barotnē eksperimenta sākumā, g/L;

S<sub>1</sub> – substrāta koncentrācija barotnē eksperimenta beigās, g/L.

(Бекер и др. 1990)

### BC produktivitātes noteikšana

BC produktivitāte (dienās) tika noteikta pēc formulas:

$$Q_x = \frac{X_1 - X_0}{t}$$

kur, Q<sub>x</sub> – BC produktivitāte dienās;

X<sub>0</sub> – BC sausais svars eksperimenta sākuma, g/L (tika pieņemts par 0);

X<sub>1</sub> – BC sausais svars eksperimenta beigās g/L;

t – kultivācijas ilgums, dienas.

(Бекер и др. 1990)

## Proteīnu koncentrācijas noteikšana sūkalās

Proteīnu koncentrācija sūkalās nosaka, izmantojot Bredforda reaģenta krāsu reakciju (Kruger 2009), krāsu reakcijas intensitāti kontrolējot ar spektrofotometru (UV5Bio, Mettler Toledo, Šveice).

## Ogļhidrātu un manitola koncentrācijas noteikšana paraugos

- HS barotnes paraugiem tika noteikta glikoze koncentrācija, izmantojot glikozes enzimatiskās noteikšanas reaģentu komplektus (ENRK) – *D-glucose assay procedure K-GLUC 08/18* (GOPOD-format, Megazyme, Īrija) (Anonymous 2021a);
- Sūkalu paraugiem tika noteiktas laktoze, glikoze un galaktozes koncentrācijas. Laktozes un galaktozes koncentrācijas tika noteiktas, izmantojot ENRK pēc–*Lactose & D-galactose (Rapid) assay procedure K-LACGAR 03/20* (Megazyme, Īrija) (Anonymous 2021b);
- Sūkalu un melases barotnēs tika noteiktas laktozes, glikozes, galaktozes un saharozes koncentrācijas. Saharozes koncentrācija tika noteikta, izmantojot ENRK pēc – *Sucrose, D-fructose and D-glucose assay procedure K-SUFRG 04/18* (Megazyme, Īrija) (Anonymous 2021c);
- Manitola barotnē tika noteikta manitola koncentrācija, izmantojot ENRK pēc – *D-mannitol assay procedure K-MANOL* (Megazyme, Īrija) (Anonymous 2021d).

## Organisko skābju koncentrācijas noteikšana paraugos

Visiem paraugiem tika noteiktas organiskās skābes koncentrācijas, izmantojot Megazyme ENRK kontrolei, darbojoties pēc metodoloģijas:

- Etiķskābes noteikšana, izmantojot ENRK pēc – *Acetic acid assay procedure K-ACET 04/18* (Megazyme, Īrija) (Anonymous 2021e);
- Glikonskābes noteikšana – *D-gluconic acid / D-glucono-δ-lactone assay procedure K-GATE 04/20* (Megazyme, Īrija) (Anonymous 2021f).

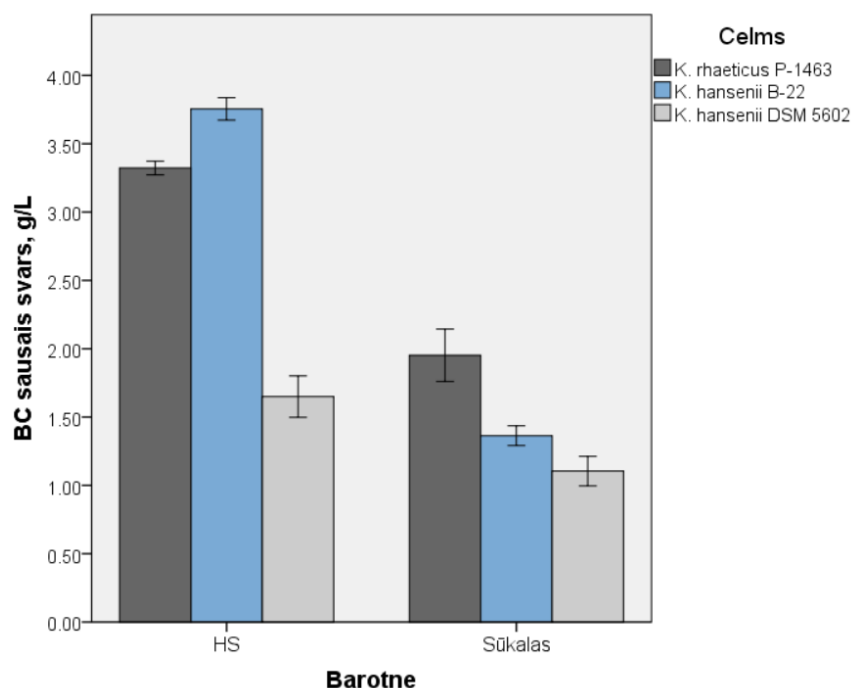
## Datu statistiskā apstrāde

Datu statistiskā analīze un attēlu veidošana tika veikta, izmantojot JASP (JASP Team, 2020; JASP (Version 0.14.1)) un SPSS (BM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0.) datu analīzes programmas. Statistiskai analīzei tika izmantota ANOVA un t-tests pie būtiskuma līmeņa  $p = 0,05$ .

### 3. Rezultāti

#### 3.1. Bakteriālas celulozes producentu efektivitātes novērtējums sūkalu barotnēs

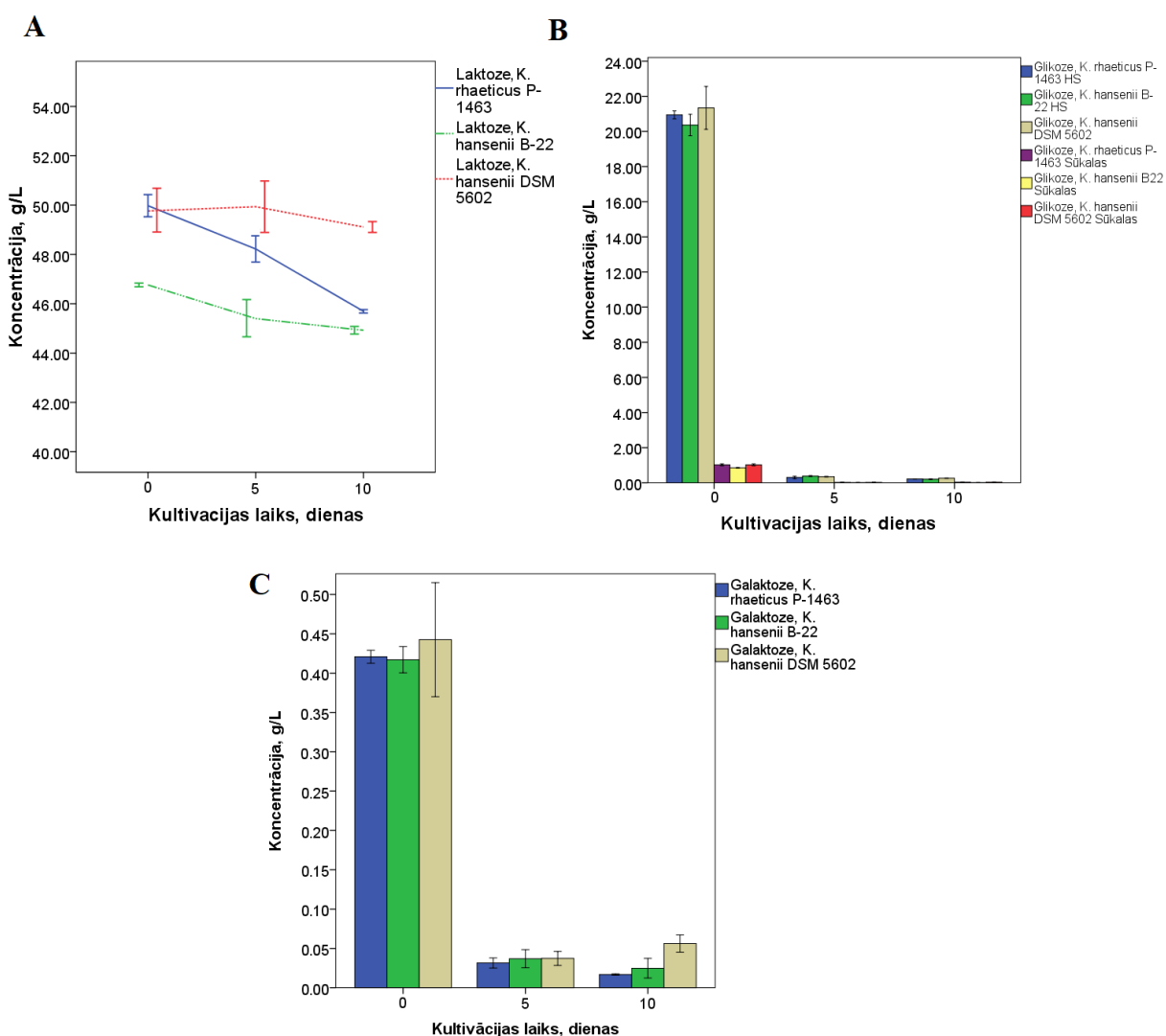
Pirmajā eksperimentā tika novērtēti vairāki BC sintezējošie EB celmi, lai noteiktu to piemērotību BC iegūšanai kā substrātu izmantojot sūkalas. Tika savstarpēji salīdzināts BC iznākums trim celmiem (*K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602) uz standarta HS un sūkalu barotnēm. Datu statistiskā analīze parādīja, ka vislielākā BC sintēze uz sūkalām novērojama *K. rhaeticus* P-1463 celmam, kas atbilst  $1,95 \pm 0,15$  g/L (sausais svars) (6. attēls). Vislielākā BC sintēze tika novērota standarta HS barotnē, kur glikoze kalpo par C avotu, *K. hansenii* B-22 celmam ( $3,76 \pm 0,07$  g/L). Salīdzinot BC iznākumu no substrāta vienības ( $Y_{P/S}$ ) uz HS un sūkalu barotnēm tika konstatēts, ka uz sūkalām *K. rhaeticus* P-1463 iznākums ievērojami lielāks ( $Y_{P/S} = 15,85\%$  uz HS un  $34,32\%$  uz sūkalām), savukārt *K. hansenii* B-22 iznākums sasniedz  $18,46\%$  un  $47,72\%$ , attiecīgi. Visaugstākais BC iznākums no substrāta uz sūkalām tika novērots *K. hansenii* DSM 5602 celmam ( $Y_{P/S} = 7,73\%$  uz HS un  $54,46\%$  uz sūkalām).



6. attēls. BC sintēze uz standarta HS barotnes un sūkalām, izmantojot dažādus celmus – *K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602, pēc 10 kultivācijas dienām.

Figure 6. BC synthesis by the strains *K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602) on standard HS and whey medium, after 10 days of cultivation.

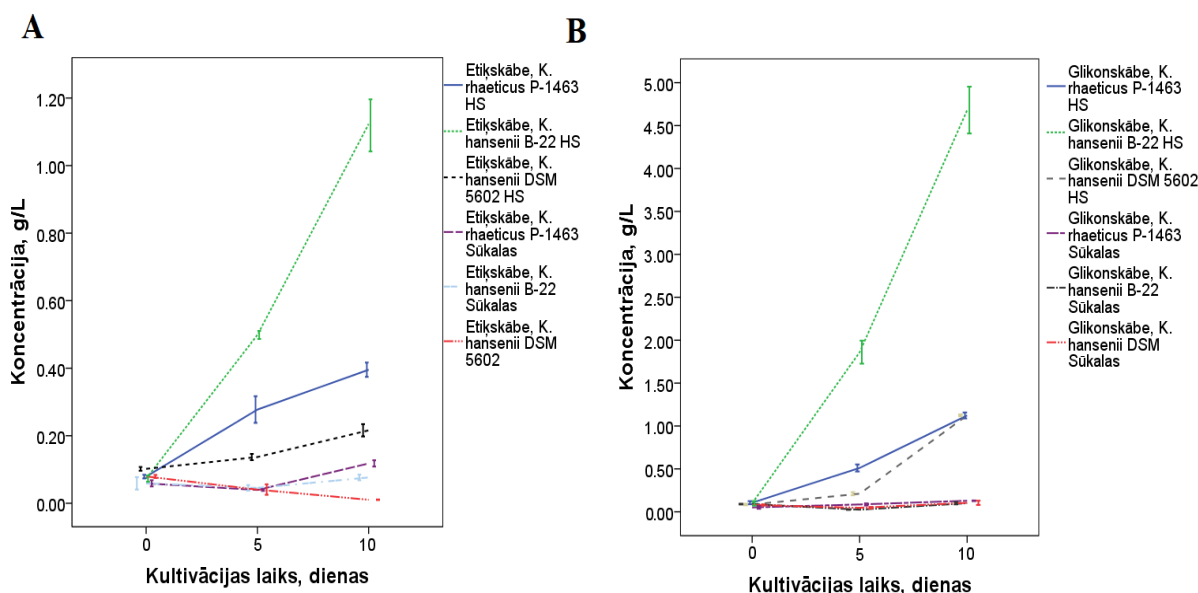
Ogļhidrātu (laktozes, glikozes un galaktozes) koncentrācijas izmaiņas ir redzamas 7. attēlā. Analizējot laktozes un tās hidrolīzes produktu koncentrācijas izmaiņas, var secināt, ka vislielākais laktozes patēriņš sūkalu barotnē tika novērots *K. rhaeticus* P-1463 (no  $49,97 \pm 0,35$  g/L līdz  $45,69 \pm 0,05$  g/L). Eksperimentu gaitā *K. rhaeticus* P-1463 celmam tika patērēti aptuveni 8,6% no barotnē esošās laktozes. Pēc eksperimentā iegūtajiem datiem var redzēt, ka *K. rhaeticus* P-1463 celms sūkalu barotnē 10 dienu laikā glikozes un galaktozes koncentrācijas samazinājās no  $1,02 \pm 0,4$  līdz  $0,03 \pm 0,01$  glikozei un no  $0,42 \pm 0,01$  līdz  $0,02 \pm 0,01$  g/L galaktozei.



7. attēls. (A) Laktozes koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnē eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602); (B) Glikozes koncentrācijas izmaiņas standartā HS un sūkalu barotnē eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602); (C) Galaktozes koncentrācijas izmaiņas standartā HS un sūkalu barotnē (*K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602).

Figure 7. (A) Changes of lactose concentration in whey medium during the experiment (*K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602); (B) Changes of glucose concentrations in standard HS and whey media during the experiment (*K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602); (C) Changes of galactose concentrations in standard HS and whey media during the experiment (*K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602).

Organisko skābju izmaiņas ir apkopotas 8. attēlā. Pēc iegūtiem datiem var redzēt, ka HS barotnē tika novērota ievērojami lielāka organisko skābju uzkrāšanās eksperimenta laikā nekā sūkalu barotnēs. *K. rhaeticus* P-1463 celmam etiķskābes koncentrācija būtiski palielinājās no  $0,06 \pm 0,01$  g/L līdz  $0,12 \pm 0,01$  g/L un glikonskābes koncentrācija palielinājās no  $0,05 \pm 0,01$  g/L līdz  $0,13 \pm 0,01$  g/L. Lielāka skābju produkcija tika konstatēta uz HS barotnes – *K. hansenii* B-22 celmam etiķskābes pieaugums sastādīja no  $0,07 \pm 0,01$  g/L līdz  $1,12 \pm 0,07$  g/L un glikonskābei  $0,1 \pm 0,02$  g/L un  $4,68 \pm 0,21$  g/L, attiecīgi.



8. attēls. Organisko skābju (etiķskābe un glikonskābe) koncentrācijas izmaiņas *K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602 celmiem eksperimenta laikā.

Figure 8. Changes of organic acids (acetic acid and gluconic acid) concentration *K. rhaeticus* P-1463, *K. hansenii* B-22, *K. hansenii* DSM 5602 during the experiment.

Proteīnu koncentrācijas samazināšanās nehidrolizētu sūkalu barotnē netika konstatēta nevienam pētāmajam celmam. Eksperimenta laikā proteīnu koncentrācijas barotnē palika nemainīgas ap  $3,21 \pm 0,12$  g/L visiem trim pētāmajiem celmiem.

Balstoties uz iegūtiem datiem, tālākiem eksperimentiem tika izvēlēts *K. rhaeticus* P-1463 celms dēļ savas spējas ievērojami efektīvāk sintezēt BC uz sūkalu barotnes.

### 3.2. Sūkalu kā bakteriālas celulozes substrāta efektivitātes novērtējums

Otrajā eksperimentā sūkalu barotne tika salīdzināta ar HS barotni un alternatīvu manitola barotni. Eksperimenta sākumā tika pārbaudīts, vai izvēlētais BC producenta celms (*K. rhaeticus* P-1463) spēj izmantot laktozi un galaktozi kā vienīgus C avotus modificētajā HS barotnē (5. tabula). Tika konstatēts, ka *K. rhaeticus* P-1463 celms izmanto laktozi un galaktozi kā vienīgo C avotu, sasniedzot  $2,85 \pm 0,04$  g/L un  $2,1 \pm 0,02$  g/L BC pēc 10 kultivācijas dienām.

5. tabula

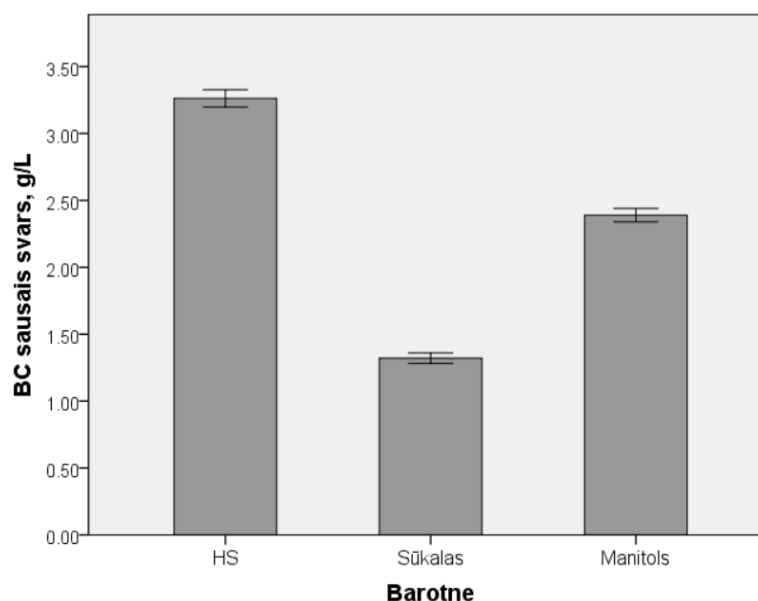
BC sintēze uz standarta un modificētām HS barotnēm (*K. rhaeticus* P-1463).

Table 5

BC production on standard and modified HS media (*K. rhaeticus* P-1463).

Barotne	BC sausais svars, g/L	Produktivitāte $Q_X$ , g/L/d
Standarta HS barotne ar glikozi	$3,68 \pm 0,03$	0,37
Modificētā HS barotne ar laktozi	$2,85 \pm 0,04$	0,29
Modificētā HS barotne ar galaktozi	$2,1 \pm 0,02$	0,21

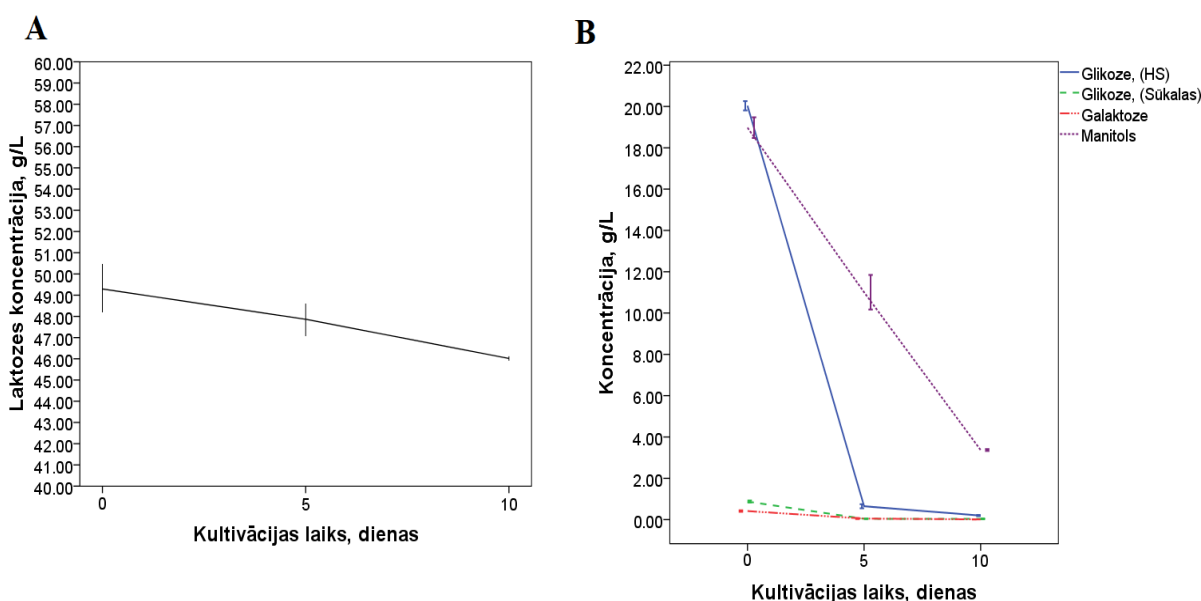
Eksperimenta otrajā daļā sūkalu barotne tika salīdzināta ar standarta HS barotni ar glikozi un manitola barotni. BC sausais svars *K. rhaeticus* P-1463 celmam dažādās barotnēs tika apkopots 9. attēlā. Eksperimentā ir konstatēts, ka sūkalu barotnes izmantošana nodrošina ievērojami zemāko ( $p < 0,001$ ) BC sauso svaru ( $1,32 \pm 0,04$  g/L) salīdzinājumā ar HS ( $3,26 \pm 0,06$  g/L) un manitola ( $2,39 \pm 0,05$  g/L) barotnēm. BC  $Y_{P/S} = 29,23\%$  bija ievērojami lielāka nekā HS (16,28%) un manitola (15,31%) barotnē.



9. attēls. BC sintēze dažādās barotnēs – standarta HS, sūkalu un manitola, pēc 10 kultivācijas dienām (*K. rhaeticus* P-1463).

Figure 9. BC synthesis on the standard HS, whey, and mannitol growth media, after 10 days of cultivation (*K. rhaeticus* P-1463).

Oglekļa avotu (laktozes, glikozes, galaktozes un manitola) koncentrācijas izmaiņas eksperimenta laikā ir apkopotas 10. attēlā. Cukuru izmaiņas sūkalu barotnē ir līdzīgas pirmajam eksperimentam, t.i. galaktoze un glikoze tika patērētas jau pirmajās eksperimenta dienās (līdz piektajai dienai). Savukārt, laktozes patēriņš bija aptuveni 6,3%. Eksperimenta dati rāda, ka manitola koncentrācija barotnē pazeminājās no  $18,97 \pm 0,53$  g/L līdz  $3,36 \pm 0,03$  g/L.

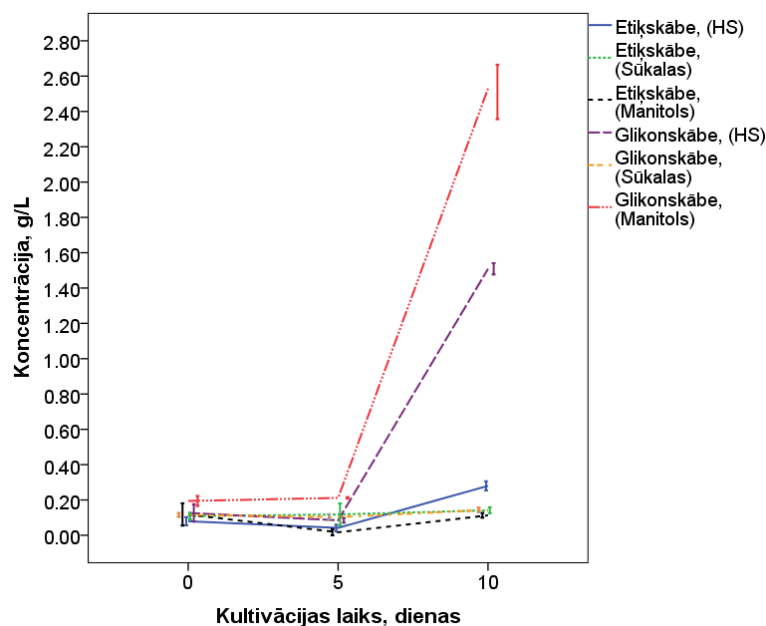


10. attēls (A) Laktozes koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnē eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Monosaharīdu (glikozes un galaktozes) un manitola koncentrācijas izmaiņas standartā HS, sūkalu un manitola barotnē eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463).

Figure 10. (A) Changes in lactose concentration in the whey medium during the experiment (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Changes in monosaccharides (glucose and galactose) and mannitol concentrations in the standard HS, whey, and mannitol media during the experiment (*K. rhaeticus* P-1463).

Organisko skābju koncentrāciju izmaiņas ir apkopotas 11. attēlā. Sūkalu barotnē tika novērota minimāla, bet statistiski būtiska organisko skābju uzkrāšanās. Savukārt, manitola barotnē būtiski palielinājās glikonskābes koncentrācija no  $0,19 \pm 0,01$  g/L līdz  $2,53 \pm 0,01$  g/L, kas bija lielāka nekā HS barotnē ( $1,51 \pm 0,01$  g/L). Visizteiktākā etiķskābes uzkrāšanās tika novērota HS barotnē ( $0,28 \pm 0,01$  g/L). Aprēķinot organisko skābju iznākumu  $Y_{PS}$  no patērēta substrāta vienības, tika konstatēts, ka organisko skābju iznākums sūkalu barotnē ir zemāks

( $Y_{P/S} = 4,89\%$ ), salīdzinājumā ar skābju iznākumu HS (8,4%) un manitola barotnēs (14,92%) attiecīgi. Šāda tendence tika konstatēta visos eksperimentos.



11. attēls. Organisko skābju (etiķskābe un glikonskābe) koncentrācijas izmaiņas standarta HS, sūkalu un manitola barotnē eksperimenta gaitā (*K. rhaeticus* P-1463).

Figure 11. Changes in organic acid (acetic acid and gluconic acid) concentration in the standard HS, whey, and mannitol media during the experiment (*K. rhaeticus* P-1463).

Līdzīgi kā pirmajā eksperimentā proteīnu koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnē netika konstatētas ( $3,15 \pm 0,08$  g/L).

pH izmaiņas eksperimenta laikā tika apkopotas 6. tabulā. Var konstatēt, ka pH samazinājums sūkalu barotnē nebija tik straujš (pH  $5,72 \pm 0,03$ ) salīdzinot ar HS (pH  $3,54 \pm 0,02$ ) un manitola (pH  $3,24 \pm 0,02$ ) barotnēm.

6. tabula

pH izmaiņas kultivācijas laikā (*K. rhaeticus* P-1463).

Table 6

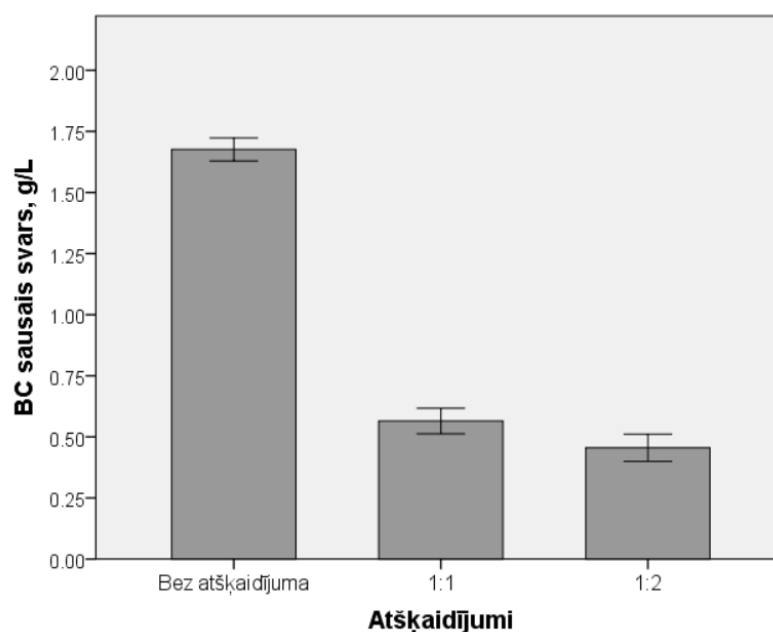
Changes of pH during fermentation with *K. rhaeticus* P-1463.

Barotne	pH		
	Eksperimenta sākumā	5. diena	10. diena
HS	$5,97 \pm 0,01$	$3,92 \pm 0,03$	$3,54 \pm 0,02$
Sūkalas	$6,03 \pm 0,02$	$5,84 \pm 0,02$	$5,72 \pm 0,03$
Manitols	$6,04 \pm 0,01$	$4,38 \pm 0,01$	$3,24 \pm 0,02$

### 3.3.Sūkalu barotnes pirmsapstrādes un sastāva modificēšanas ietekme uz BC sintēzi

#### 3.3.1.Sūkalu koncentrācijas ietekme

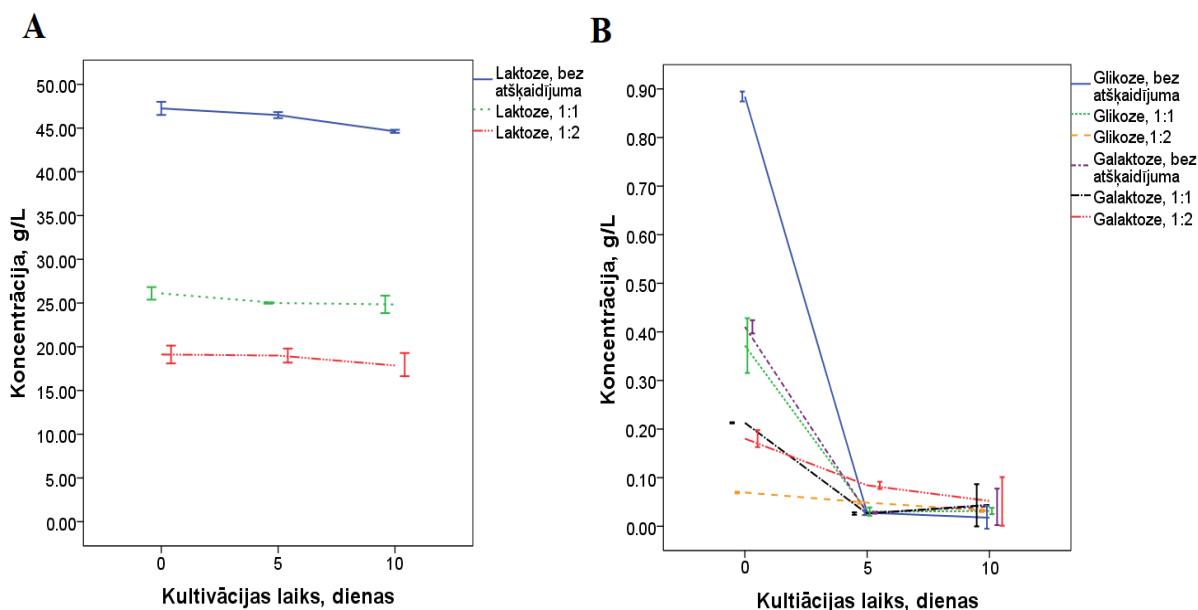
Eksperimentā tika pārbaudīts, vai sūkalu atšķaidīšana ietekmēs BC sintēzi, jo augsta laktozes koncentrācija sūkalās potenciāli var inhibēt baktērijas augšanu un samazināt BC iznākumus (Khudair et al. 2018). Eksperimenta gaitā tika konstatēts, ka sūkalu atšķaidīšana būtiski samazināja BC iznākumu no  $1,68 \pm 0,05$  g/L neatšķaidītajās sūkalās līdz  $0,57 \pm 0,05$  g/L (1:1 atšķaidījums) un  $0,46 \pm 0,05$  g/L (1:2 atšķaidījums) (12. attēls).  $Y_{P/S}$  neatšķaidītajās sūkalas bija 43,75 % un attiecīgi 32,03 % (1:1 atšķaidījums) un 31,45 % (1:2 atšķaidījums).



12. attēls. *K. rhaeticus* P-1463 BC sintēze atkarībā no sūkalu barotnes atšķaidījuma 10 dienu kultivācijas laikā.

Figure 12. Influence of whey medium dilution on BC synthesis, after 10 days of cultivation (*K. rhaeticus* P-1463).

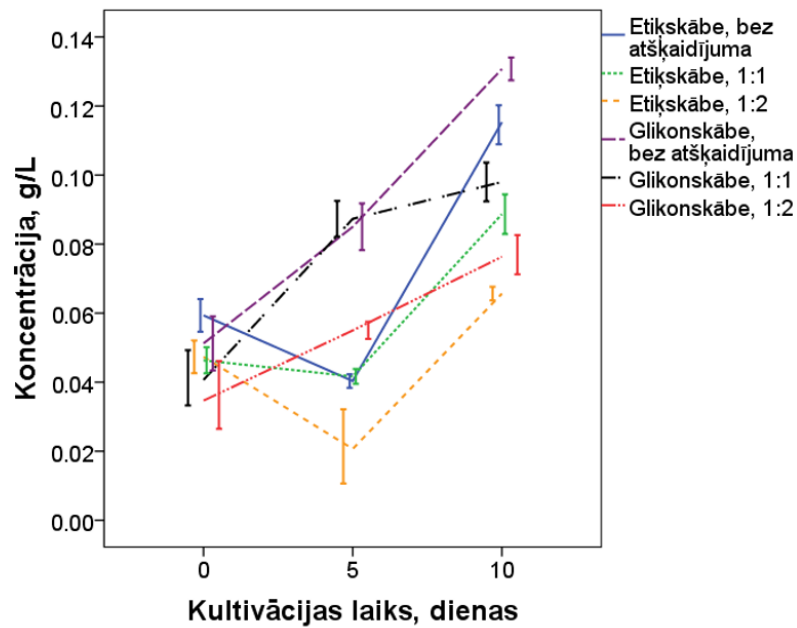
Ogļhidrātu koncentrācijas izmaiņas tika apkopotas 13. attēlā. Cukuru patēriņš eksperimenta laikā neatšķaidītajā barotnē ir līdzīgs iepriekšējiem eksperimentiem (7. un 10. attēls). Atšķaidītajos paraugos netika novērota būtiskās laktozes koncentrācijas izmaiņas ( $p > 0,05$ ).



13. attēls. (A) Laktozes koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnē eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463) atkarībā no atšķaidījuma; (B) Monosaharīdu (glikozes un galaktozes) koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnēs eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463) atkarībā no atšķaidījuma.

Figure 13. (A) Influence of whey media dilution on changes in lactose concentration during fermentation with *K. rhaeticus* P-1463; (B) Influence of whey media dilution on changes in monosaccharides (glucose and galactose) concentrations during fermentation with *K. rhaeticus* P-1463.

Līdzīgi kā iepriekšējos eksperimentos, sūkalu barotnē bija novērotas minimālas statistiski būtiskas ( $p > 0,05$ ) organisko skābju koncentrācijas izmaiņas. Šīs izmaiņas ir apkopotas 14. attēlā. Vislielākā koncentrācija tika novērota neatšķaidītajos paraugos, kur tika sasniegtas  $0,11 \pm 0,01$  g/L etiķskābes un  $0,13 \pm 0,01$  g/L glikonskābes koncentrācijas. Būtiskas ( $p > 0,05$ ) proteīnu koncentrācijas izmaiņas šī eksperimenta gaitā netika konstatētas nevienā no paraugu grupām.



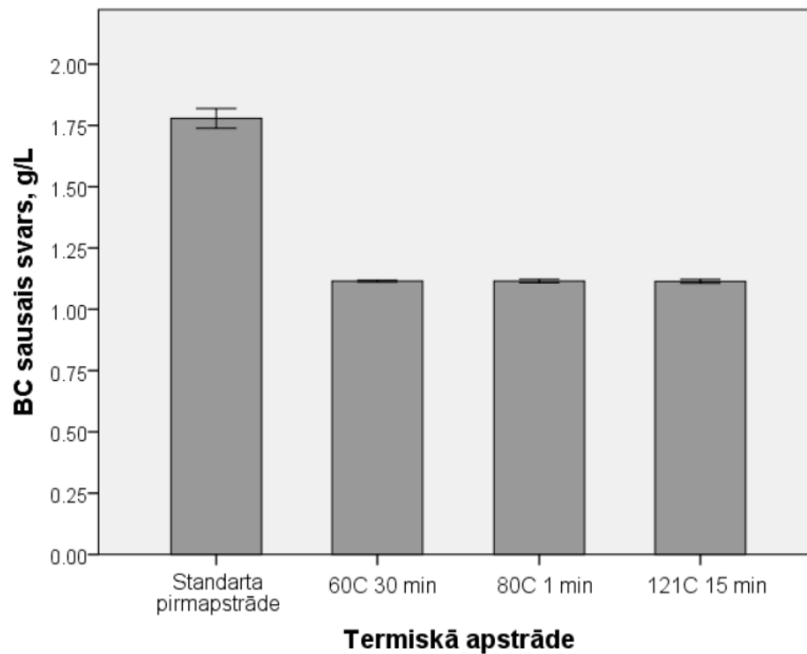
14. attēls. Organisko skābju (etiķskābe un glikonskābe) koncentrācijas izmaiņas eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463) atkarībā no sūkalu barotnes atšķaidījuma.

Figure 14. Influence of whey media dilution on changes in organic acids (acetic acid and gluconic acid) concentrations during fermentation with *K. rhaeticus* P-1463.

Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, tālākajos eksperimentos sūkalu barotnes sagatavošanas laikā sūkalas netika atšķaidītas.

### 3.3.2. Termiskās apstrādes ietekme

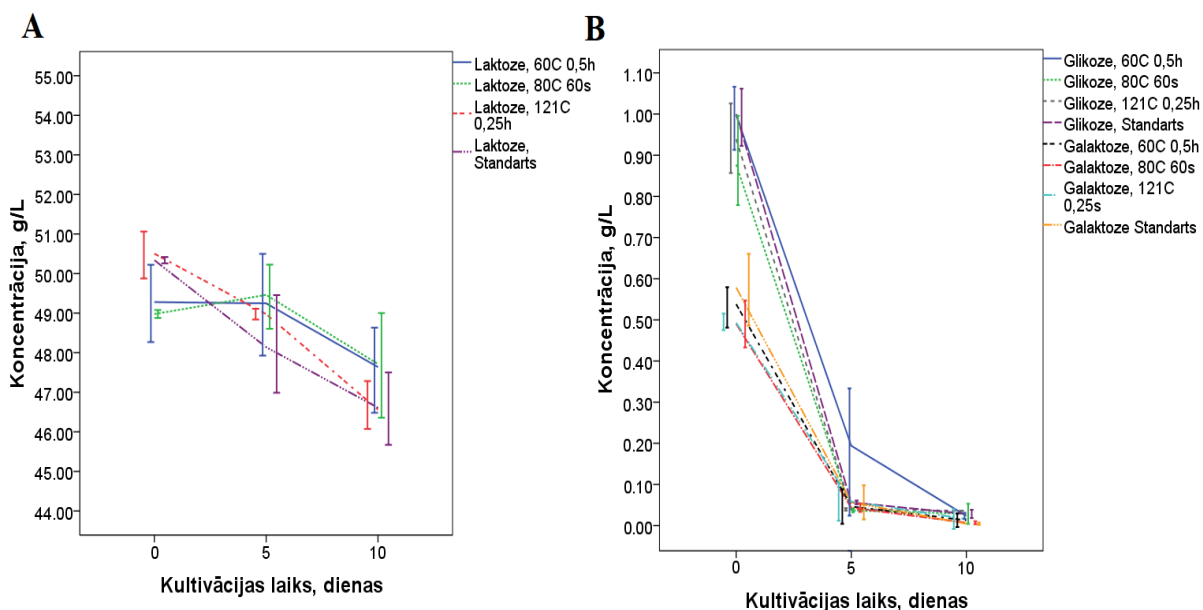
Šajā eksperimenta tika novērtēta BC sintēzes intensitāte atkarībā no barotnes sterilizēšanas procedūras (pirmsapstrādes). BC sausā svara rezultāti ir apkopoti 15. attēlā. Vislielākais BC sausais svars ir novērots standarta sūkalu termiskas pirmsapstrādes metodikas pielietošanas gaitā un sastāda  $1,78 \pm 0,04$  g/L. Datu statistiskā analīze parādīja ka BC sintēzē paraugiem ar šādiem apstrādes režīmiem – 60°C 30 min; 80°C 1 min un 121°C 15 min nebija novērotas savstarpēji būtiskas atšķirības ( $p > 0,05$ ).



15. attēls. BC sintēze atkarībā no sūkalu termiskās pirmsapstrādes metodes pēc 10 kultivācijas dienām (*K. rhaeticus* P-1463).

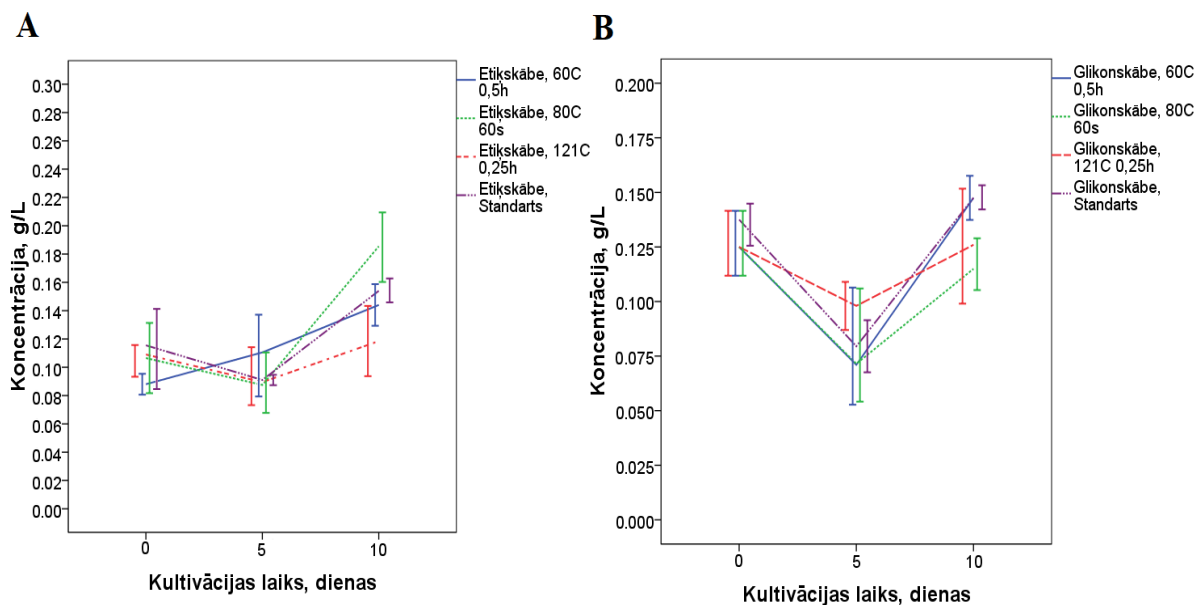
Figure 15. Influence when thermal pre-treatment on BC synthesis after 10 days of fermentation with *K. rhaeticus* P-1463.

Laktozes, glikozes un galaktozes analīžu rezultāti ir apkopotas 16. attēlā. Būtiskās laktozes koncentrācijas izmaiņas tika novērotas tikai standarta pirmsapstrādes paraugu grupai ( $p = 0,045$ ). Laktozes patēriņa izmaiņas pārējās grupas bija minimālās un nav statistiski ticami savstarpēji atšķirīgas ( $p > 0,05$ ). Glikozes un galaktozes patēriņš ir līdzīgs pārējiem eksperimentiem. Organisko skābju izmaiņas ir apkopotas 17. attēlā. Datu statistiskā analīze parādīja, ka būtiskas skābju izmaiņas tika konstatētas tikai sūkalu standarta pirmsapstrādes paraugiem. Savukārt, pārējiem paraugiem netika konstatētas būtiskas izmaiņas organisko skābju koncentrācijās ( $p > 0,05$ ).



16. attēls. (A) Laktozes koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnēs eksperimenta laikā atkarībā no termiskas pirmsapstrādes (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Monosaharīdu (glikozes un galaktozes) koncentrācijas izmaiņas atkarībā no termiskās pirmsapstrādes eksperimenta laikā (*K. rhaeticus* P-1463).

Figure 16. (A) Influence of thermal whey media pre-treatment on changes in lactose concentration during the experiment (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Influence of thermal whey media pre-treatment on changes in monosaccharides (glucose and galactose) concentrations during the experiment (*K. rhaeticus* P-1463).



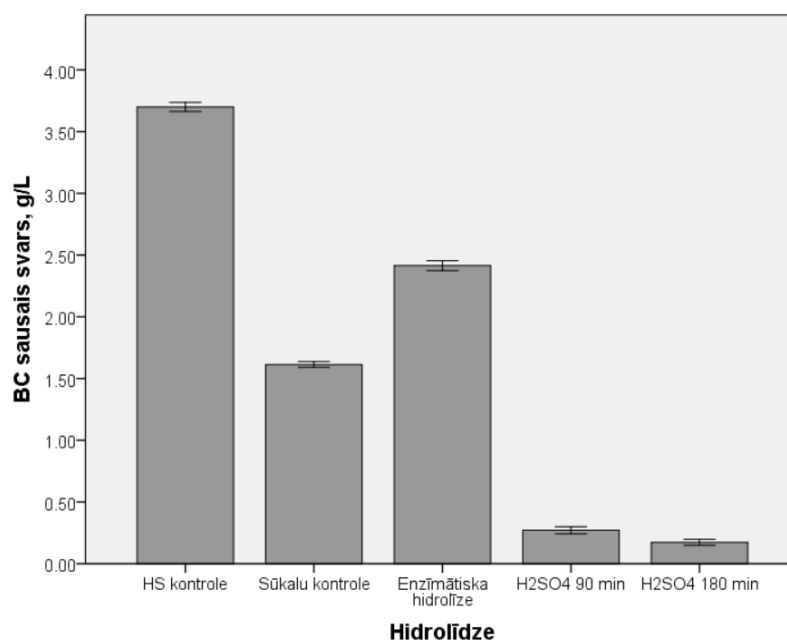
17. attēls. Organisko skābju (etiķskābe un glikonskābe) koncentrācijas izmaiņas fermentācijas (*K. rhaeticus* P-1463) laikā atkarībā no termiskās pirmsapstrādes.

Figure 17. Influence of whey thermal pre-treatment on changes in organic acids (acetic acid and gluconic acid) concentrations during fermentation (*K. rhaeticus* P-1463).

Proteīnu analīze parāda, ka standarta sūkalu pirmsapstrādes procedūra samazina proteīnu koncentrāciju barotnē no ~8 līdz ~3,2 g/L. Savukārt, pielietojot citus pirmsapstrādes paņēmienus proteīnu koncentrācijas palika 7,8 – 8,1 g/L robežās, tas ir nav būtiski mainījušas. Tālākajos eksperimentos tika izmantota standarta sūkalu pirmsapstrādes procedūra.

### 3.3.3. Hidrolītiskās apstrādes ietekme

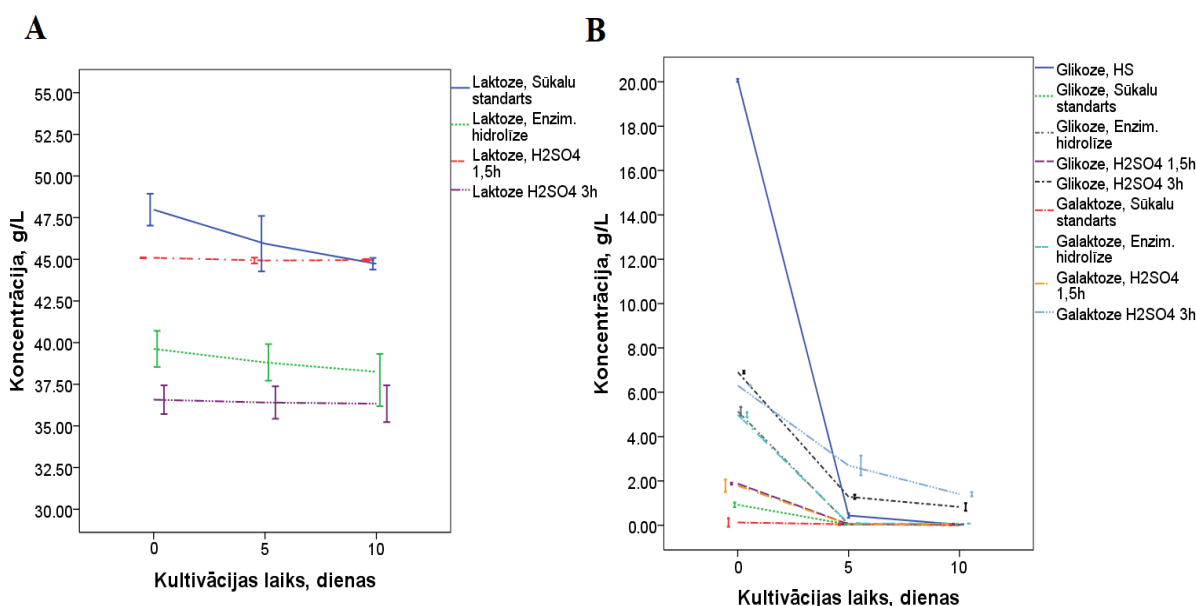
Šajā eksperimentā tika pārbaudīts, vai sūkalu hidrolīze uzlabos BC sintēzi. Rezultāti tika apkopoti 18. attēlā. Rezultāti liecina, ka BC sausais svars uz sūkalu barotnēm bija vislielākais gadījumā, kad tika pielietota enzimatiskās pirmsapstrādes metode ( $2,41 \pm 0,04$  g/L). Sūkalu kontroles paraugiem BC sausais svars sasniedza  $1,61 \pm 0,03$  g/L. Savukārt, paraugiem, kur tika veikta skābes hidrolīze – BC sausais svars bija ievērojami zemāks nekā sūkalu kontroles grupai, t.i.  $0,27 \pm 0,02$  g/L  $H_2SO_4$  1,5 h paraugu grupai un  $0,173 \pm 0,02$  g/L  $H_2SO_4$  3 h paraugu grupai. Aprēķinot BC iznākumu no substrāta vienības var secināt, ka enzimatiskā hidrolīze samazināja produktivitāti līdz 20,93% salīdzinājumā ar sūkalu kontroles (bez papildus apstrādes) grupas paraugu produktivitāti (36,42%). BC iznākums no substrāta  $Y_{P/S}$  skābes hidrolīzes paraugiem bija 7,41% ( $H_2SO_4$ , 1,5 h) un 1,51% ( $H_2SO_4$ , 3 h).



18. attēls. BC sintēze (*K. rhaeticus* P-1463) atkarībā no sūkalu hidrolīzes metodes pēc 10 kultivācijas dienām.

Figure 18. BC synthesis upon whey hydrolytic pre-treatment after 10 days of cultivation (*K. rhaeticus* P-1463).

No 19. attēla var redzēt, ka enzimatiskā pirmsapstrāde palielināja glikozes koncentrāciju barotnē līdz  $5,14 \pm 0,15$  g/L, ka arī galaktozes daudzumu barotnē līdz  $4,99 \pm 0,09$  g/L. Laktozes koncentrācija šajā barotnē hidrolīzes rezultātā samazinājās līdz  $39,62 \pm 0,83$  g/L. Enzimātiskās hidrolīzes ceļā palielinot brīvas glikozes un galaktozes koncentrāciju barotnē bija iespējams palielināt BC produktivitāti ( $Q_x = 0,27$  g/L/d). Paraugos, kur tika veikta enzimatiskā hidrolīze fermentācijas gaitā tika patērēta visa brīva glikoze un galaktoze. Ir svarīgi atzīmēt, ka glikozes un galaktozes koncentrācijas paaugstinājās arī skābas hidrolīzes grupām. Tomēr tur BC sintēzes intensitāte bija būtiski mazāka salīdzinot ar kontroles paraugiem. Ar  $H_2SO_4$  trīs stundas hidrolizētajiem eksperimenta gaitā paraugos netika patērēta visa brīva glikoze ( $6,9 \pm 0,05$  g/L no līdz  $0,82 \pm 0,13$  g/L) un galaktoze (no  $6,3 \pm 0,01$  līdz  $1,4 \pm 0,08$  g/L).

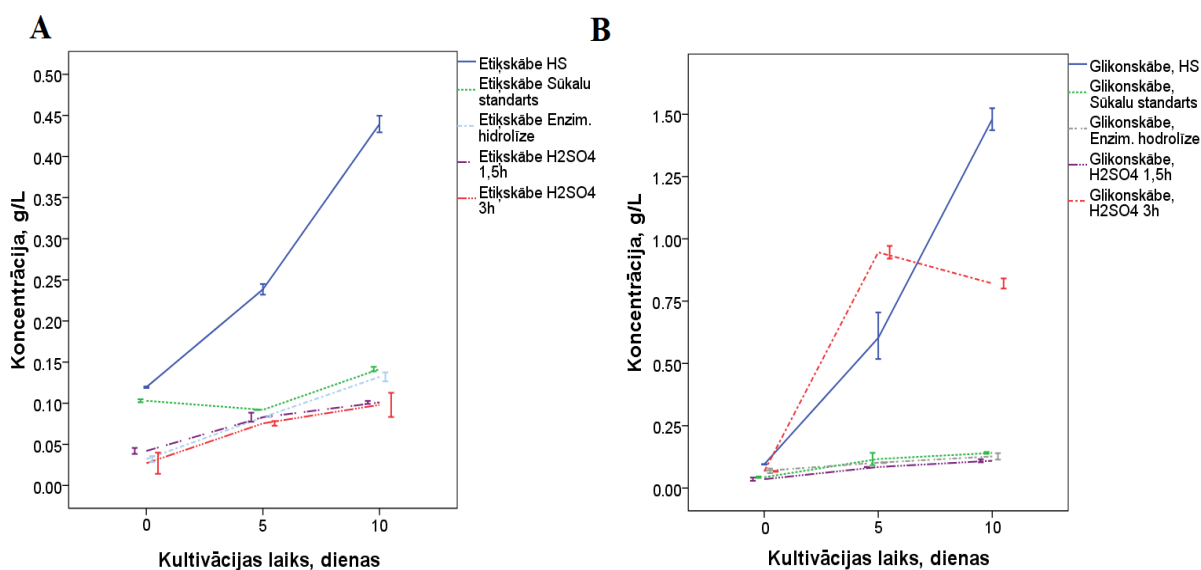


19. attēls (A) Sūkalu hidrolītiskās apstrādes paņēmiena ietekme uz laktozes koncentrācijas izmaiņām eksperimenta gaitā (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Sūkalu hidrolītiskās apstrādes paņēmiena ietekme uz monosaharīdu (glikozes un galaktozes) koncentrācijas izmaiņām eksperimenta gaitā. (*K. rhaeticus* P-1463).

Figure 19. (A) Influence of whey media thermal pre-treatment on changes in lactose concentration during the experiment (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Influence of whey media thermal pre-treatment on changes in monosaccharides (glucose and galactose) concentrations during fermentation with (*K. rhaeticus* P-1463).

Organisko skābju koncentrāciju izmaiņas ir apkopotas 20. attēlā. Kopumā sūkalu hidrolīze neietekmēja skābju koncentrācijas izmaiņas tendences. Vienīgi var atzīmēt

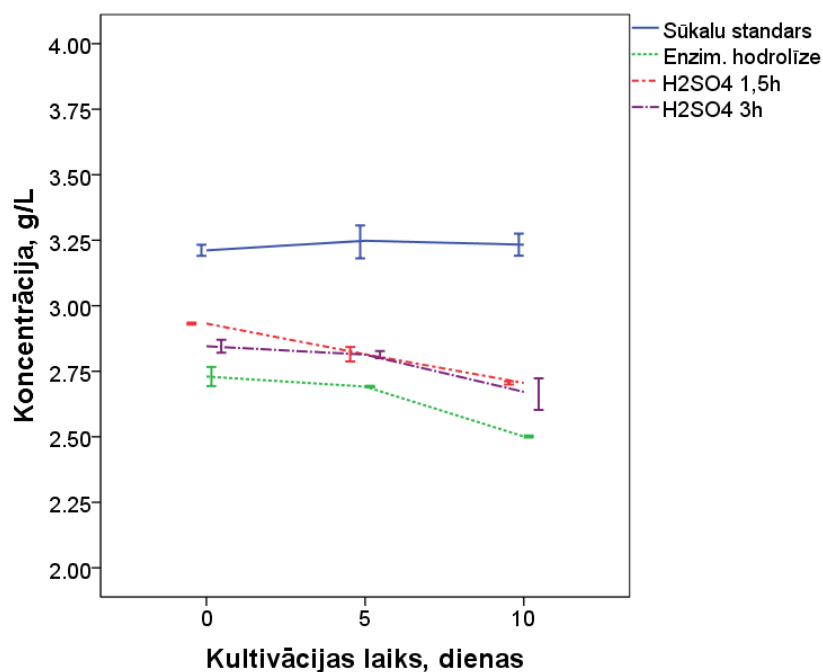
glikonskābes koncentrācijas izmaiņas  $\text{H}_2\text{SO}_4$  trīs stundu hidrolīzes paraugiem no  $0,06 \pm 0,01$  g/L līdz  $0,82 \pm 0,01$  g/L.



20. attēls. Sūkalu hidrolītiskās apstrādes paņēmiena ietekme uz etiķskābes koncentrācijas izmaiņām eksperimenta gaitā (*K. rhaeticus* P-1463); (B) Sūkalu hidrolītiskās apstrādes paņēmiena ietekme uz glikonskābes koncentrācijas izmaiņām eksperimenta gaitā (*K. rhaeticus* P-1463).

Figure 20. (A) Influence of whey media thermal pre-treatment on changes in acetic acid concentration during fermentation with *K. rhaeticus* P-1463 in hydrolysed whey media; (B) Influence of whey media thermal pre-treatment on changes in gluconic acid concentration during fermentation with *K. rhaeticus* P-1463 in hydrolysed whey media.

Ir svarīgi atzīmēt, ka šajā eksperimenta salīdzinot ar ir iepriekšējiem tika novērota proteīnu koncentrācijas samazināšanās fermentācijas gaitā. Proteīnu koncentrācijas izmaiņas ir apkopotas 21. attēlā. Var redzēt, ka salīdzinājumā ar kontroles grupu, enzimatiskas hidrolīzes grupai proteīnu koncentrācija ( $p = 0,02$ ) samazinājās no  $2,73 \pm 0,03$  g/L līdz  $2,5 \pm 0,01$  g/L, kas atbilst aptuveni 8,4% proteīnu patēriņam.

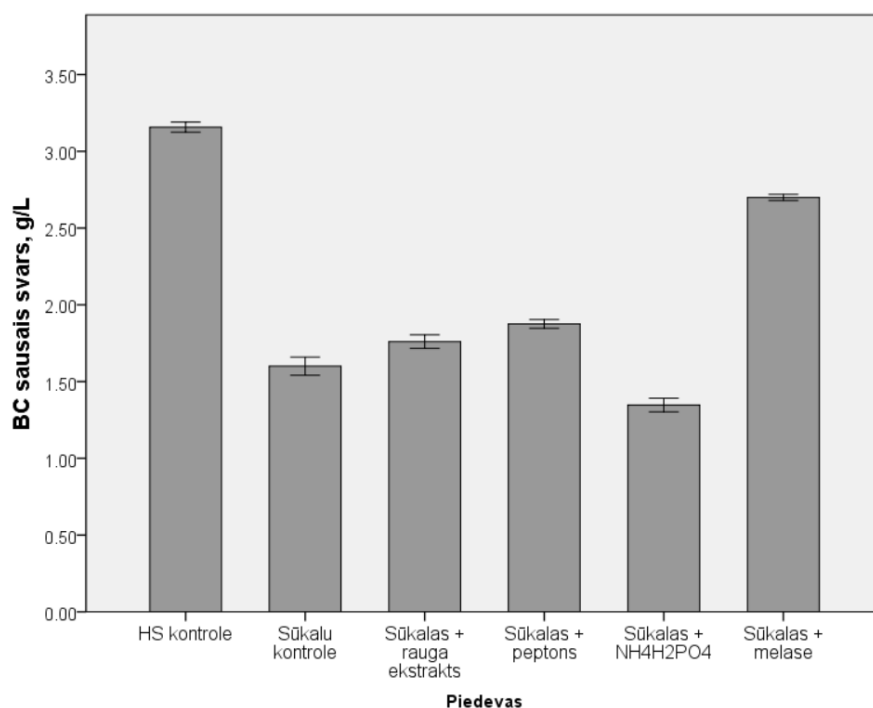


21. attēls. Sūkalu hidrolītiskās apstrādes paņēmiena ietekme uz proteīnu koncentrācijas izmaiņām eksperimentu laikā (*K. rhaeticus* P-1463).

Figure 21. Influence of whey media thermal pre-treatment on changes in protein concentration during the experiment. (*K. rhaeticus* P-1463).

### 3.3.4. Piedevu ietekme

Ekspimenta gaitā tika pārbaudīts vai augšanas faktoru piedevas varētu palielināt BC sintēzi. Iegūti rezultāti tika apkopoti 22. attēlā. Pēc iegūtiem rezultātiem var redzēt, ka BC sintēze uz sūkalu barotnes kas papildināta ar melasi bija visaugstākā ( $2,7 \pm 0,02$  g/L). BC  $Y_{P/S}$  bija viszemākais paraugiem ar pievienotu  $NH_4H_2PO_4$  ( $1,35 \pm 0,04$  g/L). BC iznākums  $Y_{P/S}$  kombinētajā sūkalu / melases barotnē bija 21,88%, kas ir mazāks par iznākumu kontroles sūkalu barotnē bez pievienotām piedevām (32,24%).

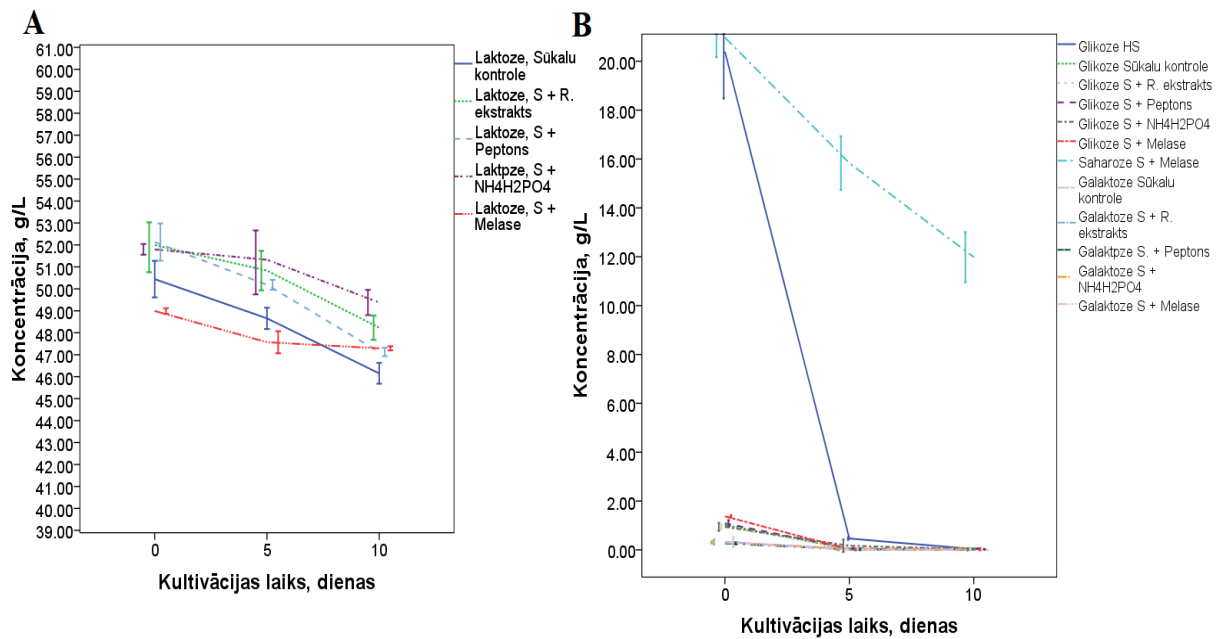


22. attēls. Barotnes bagātināšanas (rauga ekstrakts, peptons, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, melase) ietekme uz BC sintēzi pēc 10 kultivācijas dienām (*K. rhaeticus* P-1463).

Figure 22. Influence of whey supplementation (with yeast extract, peptone, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and molasses) on BC synthesis after 10 days of cultivation (*K. rhaeticus* P-1463).

Cukuru patēriņš eksperimentā laikā ir apkopots 23. attēlā. Šajā eksperimentā tika pārbaudīta papildus saharozes (no melases) koncentrācijas un melases sastāvā esošo augšanas faktoru ietekme uz BC sintēzi. 23.B attēlā var redzēt, ka fermentācijas gaitā saharozes koncentrācija kombinētajā sūkalu un melases barotnē samazinājās no  $20,98 \pm 0,64$  g/L līdz  $11,98 \pm 0,79$  g/L.

Pārējās barotnes tika konstatēts līdzīgs cukuru patēriņš kā iepriekšējos eksperimentos.



23. attēls (A) Laktozes koncentrācijas izmaiņas sūkalu barotnē (*K. rhaeticus* P-1463) eksperimenta laikā atkarībā no piedevām (rauga ekstrakts, peptons, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, melase); (B) Monosaharīdu (glikozes un galaktozes) koncentrācijas izmaiņas (*K. rhaeticus* P-1463) standarta HS un sūkalu barotnē eksperimenta laikā atkarībā no piedevām (rauga ekstrakts, peptons, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, melase).

Figure 23. (A) Changes in lactose concentration in the whey medium (*K. rhaeticus* P-1463) during the experiment depending on the supplements (yeast extract, peptone, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, molasses) added; (B) Changes in monosaccharides (glucose and galactose) concentrations in standard HS and whey medium during fermentation with *K. rhaeticus* P-1463 depending on the supplements (yeast extract, peptone, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, molasses) added.

## 4. Diskusija

Eksperimentu gaitā tika pētītas sūkalas kā potenciāli lēta un perspektīva alternatīva dārgākām BC sintēzes barotnēm. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, var secināt, ka sūkalas var kalpot kā alternatīvā barotne BC sintēzei. *K. rhaeticus* P-1463 celms uzrādīja vislielāko BC iznākumu ( $1,95 \pm 0,15$  g/L), salīdzinot ar citiem pētījumā izmantotajiem celmiem. Eksperimentu laikā iegūtie *K. rhaeticus* P-1463 BC sintēzes dati ir apkopoti biotehnoloģisko rādītāju tabulā (7. tabulā).

7. tabula

BC sintēzes biotehnoloģiskie rādītāji uz sūkalām (*K. rhaeticus* P-1463).

Table 7

Biotechnological indicators for BC producer *K. rhaeticus* P-1463 on whey.

Barotne	BC sausais svars, g/L	BC iznākums no substrāta ( $Y_{P/S}$ ), %	BC produktivitāte ( $Q_x$ ), g/L/d
Standarta HS barotne	$3,32 \pm 0,04$	16,6	0,33
Sūkalu barotne (bez pirmsapstrādes)	$1,95 \pm 0,15$	34,32	0,2
Sūkalu barotne ar enzimatisku hidrolīzi	$2,41 \pm 0,4$	20,93	0,24
Sūkalu un melases kombinēta barotne	$2,7 \pm 0,02$	21,88	0,27

Salīdzinot ar literatūras avotiem, *K. rhaeticus* P-1463 uzrada samērojami labus rezultātus sūkalu barotnē bez pirmsapstrādes (8. tabula).

8. tabula

BC sintēze (sausais svars) uz sūkalām vai laktozi saturošām barotnēm (pēc literatūras avotiem).

Table 8

BC synthesis (dry weight) on whey or lactose containing media as reported in literature sources.

Celms	Barotne	BC iznākums, g/L	Avots
<i>K. xylinus</i> DSM 2325	Sūkalu permiāts pēc enzīmāniskās hidrolīzes ar $\beta$ -galaktozidāzi	6,77	(Rollini et al. 2020)
<i>G. sucrofermentans</i> B-11267	Sūkalas	5,45	(Revin et al. 2018)
<i>G. xylinus</i> PTCC 1734	Sūkalas pēc enzīmāniskās hidrolīzes ar $\beta$ -galaktozidāzi	3,55	(Salari et al. 2019)
<b><i>K. rhaeticus</i> P-1463</b>	<b>Sūkalas</b>	<b>1,95</b>	-
<b><i>K. rhaeticus</i> P-1463</b>	<b>Sūkalas pēc enzīmāniskās hidrolīzes ar <math>\beta</math>-galaktozidāzi</b>	<b>2,41</b>	-
<i>K. sucrofermentans</i> DSM 15973	Sūkalu barotne	1,6	(Tsouko et al. 2015)

<i>G. sacchari</i>	Sūkalu barotne	0,08	(Carreira et al. 2011)
<i>G. xylinus</i> K3	Laktozes barotne	0,07	(Nguyen et al. 2008)

Salīdzinot ar citām alternatīvajām barotnēm, piemēram, jēlglicerīnu, melasi, ābolu sulu, sūkalas, salīdzinoši, neuzrada labākus rezultātus (9. tabula). Salīdzinot šajā pētījumā iegūtus rezultātus ar literatūras avotiem, var konstatēt, ka vairākos pētījumos BC sintēze uz sūkalām bija salīdzinoši zema (Thompson and Hamilton 2000; Battad-Bernardo et al. 2004; Nguyen et al. 2008).

9. tabula

BC iznākums izmantojot rūpniecības un lauksaimniecības izejvielas vai blakusproduktus (Kolesovs and Semjonovs, 2020).

Table 9

BC production using industrial waste and agricultural raw materials or by-products (Kolesovs and Semjonovs 2020).

Barotne	Celms	BC iznākums, sausais svars, g/L	Informācijas avots
<b>Sūkalu barotne (bez pirmsapstrādes)</b>	<b><i>K. rhaeticus</i> P-1463</b>	<b>1,95</b>	-
<b>Sūkalas pēc enzimatiskās hidrolīzes ar <math>\beta</math>-galaktozidāzi</b>	<b><i>K. rhaeticus</i> P-1463</b>	<b>2,41</b>	-
Sūkalas	<i>G. sucrofermentans</i> B-11267	5,45	(Revin et al. 2018)
Kukurūzas stiebru sula	<i>A. xylinum</i> NRRL B-42	6,7	(Cerrutti et al. 2016)
Vinogu spiedpaliekas	<i>G. xylinus</i> NRRL B-42	8,0	(Vazquez et al. 2013)
Spirta šķiedenis	<i>Gluconacetobacter oboediens</i>	8,9	(Jahan et al. 2018)
Apelsīnu sula	<i>A. xylinum</i> NBRC 13693	5,9	(Kurosumi et al. 2009)
Abolu sula	<i>A. xylinum</i> NBRC 13693	3,9	(Kurosumi et al. 2009)
Ananasu sula	<i>A. xylinum</i> NBRC 13693	3,9	(Kurosumi et al. 2009)
Melase	<i>A. xylinum</i> BPR2001	5,3	(Bae and Shoda 2004)
Glicerīns	<i>G. xylinus</i> CGMCC no. 2955	5,97	(Zhong et al. 2013)
Auzu enzimatiskais hidrolizāts	<i>A. xylinus</i> ATCC 23770	8,3	(Chen et al. 2013)
Kokosriekstu piens ( <i>Nata de Coco</i> )		712,9 (slapja BC)	(Phong et al. 2017)

Kā redzams, lielākā BC sintēzes intensitāte tika sasniegta tajās barotnēs, kur bija klātesošie brīvie cukuri, saharoze, ka arī daudzveidīgi, kaut arī nedefinētie, augšanas papildus faktori, kas nāca no dabiskas izcelsmes ražošanas vai lauksaimniecības blakusproduktiem un

izejvielām. Tiek atzīmēts, ka laktoze ir problemātisks C avots, un BC producenti patērē to lēnāk nekā glikozi vai saharozi (Jozala et al. 2015). Kas visticamāk ir saistīts ar *lacZ* gēna trūkumu, kas ir atbildīgs par  $\beta$ -galaktozidāzes enzīma produkciju un laktozes šķelšanu (Battad-Bernardo et al. 2004). Ņemot vērā to, ka šajā pētījumā tika novērota laktozes šķelšana, var pieļaut, par *lacZ* gēna esamību *K. rhaeticus* P-1463 genomā (7. attēls). Tomēr laktozes patēriņš eksperimenta laikā bija ievērojami zemāks nekā *G. sucrofermentans* B-11267, kas pirmajā kultivācijas dienā spēja samazināt laktozes koncentrāciju barotnē no 42,1 g/L līdz 22,4 g/L (Revin et al. 2018). *K. rhaeticus* P-1463 celma genoma sekvencēšana dotu pilnu ainu par gēniem, kas iesaistīti laktozes metabolismā. Tostarp, uz doto brīdi ir bijis maz mēģinājumu veidot ģenētiski modificētus BC producentu celmus. Ka potenciāls risinājums laktozi saturošu substrātu izmantošanas efektivitātes uzlabošanai varētu būt ģenētiskas inženierijas metožu izmantošana. Ievietojot producenta genomā gēnus, kas atbild par laktozes šķelšanu un proteāzes aktivitāti, var panākt lielāku BC ražu (Battad-Bernardo et al. 2004).

Svarīgi atzīmēt, ka paildzinot kultivācijas laiku virs izvēlētajām 10 dienām, BC sintēze uz pētāmās barotnes ir augstāka, Salīdzinot ar BC sintēzes intensitāti ar literatūras avotiem, ir jāatzīmē, ka būtu lietderīgi salīdzināt nevis iegūto BC sauso svaru, bet, piemēram, produktivitāti ( $Q_x$ ), t.i. BC produktivitāti dienā vai stundā, jo kultivācijas laiks vairākos pētījumos atšķiras (no divām līdz 40 kultivācijas dienām), tomēr ne vienmēr publikācijās pārstāvēti dati un eksperimentu apstākļu atšķirības ļauj to veikt. Literatūras avotu analīze un šī darba rezultāti rāda, ka ir svarīgi turpināt pētīt BC sintezējošus celmus ar mērķi atlasīt efektīvākus BC producentus.

Pētījumā tika parādīts, ka BC sintēze uz sūkalām ir zemāks salīdzinot ar standarta HS barotni un citiem alternatīviem oglekļa avotiem, piemēram, ar manitolu vai glicerīnu (Oikawa et al. 1995; Zhong et al. 2013). BC sausa sausais svars uz sūkalām joprojām paliek par 40 – 50 % mazāks par iznākumu uz standarta HS barotnes. Neskatoties uz to, ka sūkalas ir lēts substrāts, to izmantošana ir problemātiska mazas BC produktivitātes dēļ. Eksperimentu laikā arī tika parādīts, ka manitola barotne var kalpot, kā laba alternatīva HS standarta barotnei ( $2,39 \pm 0,05$  g/L) (9. attēls). Tika parādīts, ka *G. xylinus* ATCC 53524 sintezēja 3,37 g/L BC uz manitola barotnes (Mikkelsen et al. 2009), tomēr šobrīd joprojām trūkst pētījumu saistībā ar BC sintēzi uz manitola kā oglekļa avota un būtu nepieciešams optimizēt manitola barotni ar mērķi palielināt BC produktivitāti uz šīs barotnes.

Ir zināms, ka BC sintēze ir būtiski atkarīga no barotnes virsmas uz kuras attīstās BC plēve un barotnes tilpuma attiecības, proti skābekļa pieejamības BC veidošanai. Šis labi zināms parametrs nav ticis izvērtēts šajā pētījumu stadijā maģistra darba ietvaros, izvēloties kā optimālu literatūras avotos norādītu attiecību – 50 mL / 75 cm<sup>2</sup> (Ruka et al. 2012), kā arī nav

ņemts vērā BC produktivitātes aprēķinos. Kā jau minēts iepriekš, ilgāks kultivācijas laiks nodrošinātu lielāku BC sauso svaru, bet ne vienmēr produktivitāti ( $Q_x$ ).

Pievēršot uzmanību metabolītu izmaiņām barotnēs, *K. rhaeticus* P-1463 10 dienu kultivācijas laikā patērēja aptuveni 7 – 8% no sūkalu barotnes esošas laktozes. Palielinot kultivācijas ilgumu, ir iespējams palielināt arī laktozes patēriņu. Svarīgs novērojums, ka visos eksperimentos baktēriju kultivācijas laikā tika patērēta galaktoze (7.C attēls). Iepriekšējos pētījumos *K. rhaeticus* P-1463 celms bija spējīgs sintezēt BC uz galaktozes, sasniedzot 0,79 g/L un  $Y_{P/S}$  8,2% (Semjonovs et al. 2017b). Neizslēdzot citu skaidrojumu iespējamību, kuri pārbaudāmi tālākos pētījumos, tas varētu nozīmēt, ka baktērijai ir raksturīgs laktozes transports iekššūnas telpā ar tālāko laktozes šķelšanu līdz glikozei un galaktozei. Ar to varētu izskaidrot, kāpēc barotnē netika novērota galaktozes uzkrāšanās, kā tām vajadzētu būt novērojamam, kad baktērijas ārpusšūnas enzīmi šķeltu laktozi, primāri patērējot glikozi, savukārt galaktoze uzskartos barotnē, līdz nebūs patērēta ievērojama daļa no brīvās glikozes. Šādas hipotēzes verificēšanai ir nepieciešams to eksperimentāli apstiprināt turpmākajos pētījumos. Visticamāk visas sūkalu barotnē esošie brīvie monosaharīdi tiek iztērēti pirmajās eksperimenta dienās un tikai tad baktērijas sāk šķelt laktozi (7. attēls). Vienlaicīgi ir viennozīmīgi konstatēts (5. tabula), ka *K. rhaeticus* P-1463, izmanto galaktozi un laktozi kā vienīgus C avotus maksimālajā HS barotnē. Tomēr, citā pētījumā tika parādīts, ka *G. xylinus* ATCC 53524 neasimilē galaktozi, un nav novērota BC producēšana uz galaktozes barotnes, neskaitot 0,09 g/L, kas, domājams ir saistāms ar sējmateriāla palieku klātbūtni analizējamajā kultūršķidrumā (Mikkelsen et al. 2009), kas liecina par šīs tehnoloģiski svarīgas īpašības specifiskumu konkrētajam producenta celmam. Lai būtu iespējams iegūt viennozīmīgi interpretējamus datus par ogļhidrātu metabolisma ceļiem, tiek turpināti *K. rhaeticus* P-1463 metabolisma pētījumi, ieskaitot arī šī celma genoma struktūras izpēti izpētes turpmākos posmos.

Salīdzinot organisko skābju (etiķskābes un glikonskābes) sintēzi uz HS un sūkalu barotnēm, var konstatēt, ka uz sūkalu barotnes etiķskābes un glikonskābes uzkrāšanās notika ievērojami lēnāk (8. attēls). BC sintēze notiek paralēli šūnu biomasas sintēzei (Hornung et al. 2007), kā redzams 6. attēlā BC sintēze ir mazāka sūkalu barotnē, mazāka ir arī skābju sintēze (8. attēls). Spriežot pēc pH mērījumiem, var konstatēt, ka sūkalu barotnē pH kritums notika lēnāk nekā HS barotnē (no  $5,97 \pm 0,01$  līdz  $3,54 \pm 0,02$ ) nesamazinoties zem  $\text{pH} = 5,72 \pm 0,03$ . Tas ir saistīts ar mazāku organisko skābju sintēzi sūkalu barotnē. Rēķinot produktu iznākumu ( $Y_{P/S}$ ), sūkalu barotnē notiek efektīvāka substrāta konversija par BC salīdzinājuma ar HS vai manitola barotnēm, vienlaicīgi, organisko skābju iznākums no substrāta sūkalu barotnē (4,89%) ir zemāks, salīdzinot ar skābju iznākumu no substrāta vienības HS un manitola barotnēs (8,4 %

un 14,92% attiecīgi). Tas varētu liecināt par to, ka, kaut arī sūkalu barotnē BC sintēze ir mazāka, tomēr substrāts tiek patērēts efektīvāk tieši BC sintēzei, nevis organisko skābju sintēzei.

Šobrīd trūkst pētījumu par sūkalas pirmsapstrādes iespējām ar mērķi uzlabot BC sintēzi (Kolesovs and Semjonovs 2020). Bieži trūkst datu par sūkalas esošo vielu koncentrācijām, piemēram, laktozes, galaktozes un proteīnu koncentrācijām. Svarīgi atzīmēt, ka sūkalu sastāvs ir diezgan mainīgs, kas var būtiski ietekmēt eksperimenta rezultātus. Dati par sūkalu sākotnējo sastāvu ne vienmēr ir pārstāvēti pat tajās nedaudzās publikācijās, kas šajā tēmā ir pieejamas (Jozala et al. 2015). Dažreiz arī informācija par sūkalu pirmsapstrādes procedūrām ir nepilnīga, kas arī var ietekmēt BC produktivitātes salīdzinošo izvērtējumu.

Eksperimentu laikā tika konstatēts, ka, lai panāktu lielāku BC ražu, ir svarīgi veikt sūkalu pirmsapstrādi. Liels proteīnu saturs barotnē traucē BC sintēzei (sūkalu termiskās priekšapstrādes eksperimentos), ka arī proteīni var iesaistīties BC struktūrā, kas nav vēlams veidojot produktus no BC. Ir parādīts, ka svarīgs faktors, kas ietekme BC iznākumu ir proteīnu koncentrācija barotnē, kas var mainīties atkarībā no pirmsapstrādes procedūras. Sūkalu termiskās pirmsapstrādes eksperimentā standarta pirmsapstrādes metode, kad sūkalas sākuma tika karsētas, tās centrifugētas un beigās autoklavētas, parādīja savu efektivitāti, jo tika novērots lielākas BC sausais svars ( $1,78 \pm 0,04$  g/L) (15. attēls). Standarta pirmsapstrādes procedūras rezultātā proteīnu koncentrācija samazinās no  $\sim 8$  līdz  $\sim 3$  g/L, kas veicināja BC veidošanos, salīdzinājumā ar citām pirmsapstrādes metodēm (15. attēls). Proteīnu koncentrācija bija vienīgais parametrs, kas izmainījās sūkalu standarta pirmsapstrādes rezultātā. Piena pārstrādes ražošanas mērogos izdalītus proteīnus potenciāli var izmantot citu produktu veidošanai, piemēram iegūstot kazeīnu, sūkalu olbaltumvielu koncentrātus u.c.

Sūkalu hidrolītiskā pirmsapstrāde parādīja, ka enzimatiskā hidrolīze var būtiski palielināt BC sauso svaru (līdz  $2,41 \pm 0,04$  g/L). Arī citos pētījumos ir secināts, ka sūkalu laktozes enzimatiskā pirmsapstrāde ar  $\beta$ -galaktozidāzes enzīmu palielina BC sauso svaru (Das et al. 2015; Salari et al. 2019) (8. tabula). BC iznākums  $Y_{P/S}$  enzimatiskās hidrolīzes gadījumā bija zemāks (20,93%) nekā sūkalu kontroles paraugam (36,42%) ar standarta pirmsapstrādi bez piedevām. Ņemot vērā to, ka organisko skābju produkcija enzimatiski apstrādātajiem paraugiem nebija lielāka par skābju produkciju sūkalu kontroles paraugiem, iespējams, ka BC produktivitāte bija zemāka dēļ tā, ka substrāts tika patērēts vairāk biomasas vai eksperimenta gaitā nekontrolētu metabolītu veidošanai. Eksperimenta laikā tika konstatēts, ka laktozes koncentrācija enzimatiskās hidrolīzes rezultātā samazinājās no  $47,98 \pm 0,74$  līdz  $39,62 \pm 0,83$  g/L, kas atbilst aptuveni 17,43 % hidrolizētas laktozes (19. attēls). No tā var secināt, ka sūkalu hidrolīzes pakāpe bija relatīvi zema, kas liek turpināt pētījumus sūkalu enzimatiskās hidrolīzes procesa optimizēšanai, kas savukārt nodrošinātu lielāku BC sintēzi.

Tomēr ir jāatzīmē, ka enzimatiskā pirmsapstrāde rūpnieciskos ražošanas mērogos ir samērā dārga (Rollini et al. 2020), un varētu būtiski palielinātu BC ražošanas izmaksas, ja šīs papildus izmaksas neatsver būtiski lielāku BC sintēzi. Šobrīd literatūrā šīs metodes izmantošana BC iegūšanai nav pietiekami labi aprakstīta, tāpēc tiek turpināti maģistra darba ietvaros uzsākti pētījumi. Cita metode, kas varētu uzlabot laktozes hidrolīzi sūkalās ir tās hidrolītiskā apstrāde ar skābēm. Eksperimentā tika izmantota H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, un divi dažādi apstrādes laiki: 1,5 stunda un trīs stundas. Hidrolīzes rezultātā 1,5 stundu grupai laktozes koncentrācija barotnē samazinājās no 47,98 ± 0,74 līdz 45,09 ± 0,01 g/L, kas atbilst aptuveni 6,4% hidrolizētas laktozes. Otrajā grupā hidrolīzes pakāpe sasniedza 25%, laktozei samazinoties līdz 36,62 g/L. Tas ir augstāka hidrolīzes pakāpe, kas tika sasniegta eksperimentu gaitā. Var konstatēt, ka ilgāks hidrolīzes laiks noved pie augstākas hidrolizācijas pakāpes. Neskatoties uz to, skāba hidrolīze parādīja zemāku BC iznākumu salīdzinājuma ar enzimatisko hidrolīzi un kontroles paraugiem. Trīs stundu hidrolīzes grupā 10. dienā pat netika patērēti visi monosaharīdi. Tas varētu būt saistīts ar to, ka H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ir agresīva skābe, kas šim mērķim nav labi piemērota. Neitralizējot šo skābi, barotnē varēja izveidoties pārāk augsta sāļu koncentrācija, kas inhibēja baktērijas augšanu un BC sintēzi. Tiek turpināti pētījumi dažādu, tostarp organisko skābju (piemēram, pienskābe vai etiķskābe) ietekmes noteikšanai uz sūkalu hidrolīzes procesu (koncentrācijas, pH līmenis, laiks, temperatūra) – tāda režīma atrašanai kas nodrošinās maksimālus BC iznākumus. Viens no iemesliem pieticīgajam BC iznākumam pēc sūkalu hidrolītiskās apstrādes ar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varētu būt Maillarda reakcijas produktu rašanās, kuras pamatā ir aminoskābju un cukuru savstarpēja reakcija, kas var traucēt baktērijām metabolizēt barotnē esošus oglekļa avotus (Einarsson et al. 1983). Tuvākajos eksperimentos plānots izmantot zemāku hidrolīzes temperatūru, palielinot hidrolīzes laiku. Kā jau teikts, literatūras dati liecina, ka enzimatiskā hidrolīze palīdz sašķelt laktozi līdz glikozei un galaktozei, palielinot BC iznākumu (Das et al. 2015), tomēr uz doto brīdi trūkst datu par skābju hidrolīzes izmantošanu ar mērķi iegūt BC uz sūkalu barotnes.

Eksperimentāli tika noteikta piedevu ietekme uz sūkalu barotni. Tika konstatēts, ka liellopu gaļas bakterioloģiskais peptons, rauga ekstrakts un melase ievērojami palielina BC sintēzi, savukārt NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pievienošana to samazināja, salīdzinot ar kontroles paraugiem (22. attēls). It īpaši labi BC sausa svara pieaugumu var redzēt sūkalu un melases kombinētajā barotnē (2,7 ± 0,02 g/L). Tas ir augstākais BC iznākums uz sūkalām, kas tika panākts uz sūkalu barotnes šo eksperimentu ietvaros. Augstāks BC sausais svars šajā grupā varētu būt saistīts ar to, ka izmainījās C/N attiecība barotnē, ka arī tika ievadīti papildus augšanas faktori (Rouabhia et al. 2014). Melasē esoša saharoze tika izmantota kā galvenais C avots (23. attēls) un sūkalās esošas aminoskābes kā N avots. Domājams arī, *K. rhaeticus* P-1463 efektīvāk hidrolizē saharozi salīdzinot ar laktozi. Melase ir cukura ražošanas blakusprodukts lauksaimniecības ar plašām

pielietošanas iespējām biotehnoloģijās, kā arī lopkopībā (Keshk et al. 2006). Šo divu ražošanas blakusproduktu izmantošana varētu ne tikai samazināt BC ražošanas izmaksas, bet arī samazināt vides piesārņojumu, ko abas šīs vielas rada ja tiek utilizētas neefektīvi. Pētījumi ar optimālas C / N attiecības noteikšanu sūkalu / melases barotnei turpinās, jo sagaidāms, ka tas var ievērojami palielināt BC iznākumu (Zhong, 2013).  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  izmantošana samazināja BC sintēzi. Potenciāli  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  varēja kalpot kā lēta piedeva sūkalu barotnei, tomēr arī citā pētījumā konstatēts, ka šī savienojuma pievienošana pazemināja BC iznākumu (Yodsuwan et al. 2012).

Uz doto brīdi turpinās BC iegūšana uz HS un sūkalām ar mērķi noteikt un salīdzināt iegūta materiāla fizikālas un mehāniskās īpašības, jo ir zināms, ka substrāts var būtiski ietekmēt tās, piemēram, sūkalu izmantošana kā substrātu, var samazināt BC kristāliskuma indeksu un to mehānisko izturību (Revin et al. 2018). Fizikālo un mehānisko īpašību izmaiņas var lielā mērā ietekmēt vēlama galaprodukta īpašības.

Kopumā var konstatēt kā sūkalas, neveicot to pirmsapstrādi vai/un sastāvā optimizēšanu ir samērā problemātisks BC sintēzes avots. BC iznākums uz sūkalām ir ievērojami zemāks nekā uz glikozi vai manitolu saturošām barotnēm (HS). Neskatoties uz to, iznākums  $Y_{P/S}$  sūkalu barotnē ir augstāks nekā standarta HS un manitola barotnēs. Tika konstatēts, ka enzimatiskā hidrolīze uzlaboja BC sintēzi, tomēr ņemot vērā, ka enzīmu izmantošana rūpnieciskos procesos rada samērā lielas papildus ražošanas izmaksas, tā atrisinās galveno problēmu, kas ir saistīta ar BC augstām ražošanas izmaksām vienīgi gadījumā, ja šīs izmaksas atsver ievērojami augstāki BC iznākumi. Šobrīd tiek turpināti pētījumi skābju hidrolīzes procesa optimizēšanai, kas domājams, ļaus palielināt BC iznākumu, vienlaicīgi pārmērīgi nepalielinot ražošanas izmaksas. Savukārt, melases izmantošana, kas arī ir pārtikas rūpniecības blakusprodukts, varētu ievērojami palielināt BC veidošanos pateicoties izmaiņām C / N attiecībā, vieglāk asimilējamu cukuru un papildus augšanas faktoru pieejamībai. Šobrīd tiek turpināti pētījumi sūkalu kombinēto barotņu sastāva un pirmsapstrādes procedūru optimizēšanai.

## 5. Secinājumi

1. Starp izvērtētajiem BC producējošiem celmiem *K. rhaeticus* P-1463 celms ir vislabāk piemērots BC iegūšanai uz sūkalām;
2. *K. rhaeticus* P-1463 izmanto galaktozi un laktozi kā vienīgos C substrātus mākslīgajā HS barotnē, kā arī sūkalās BC sintēzei;
3. Sūkalas kā alternatīvā barotne ir piemērotas BC iegūšanai, kaut arī nodrošina par aptuveni 40 – 50% mazāku BC produktivitāti  $Q_X$  nekā standarta HS barotnē ar glikozi;
4. BC iznākums  $Y_{P/S}$  no patērēta substrāta vienības sūkalu barotnē bez piedevām un hidrolīzes paņēmieni pielietošanas bija augstāks nekā uz standarta HS barotnes par 40 – 50 %;
5. BC produktivitāti  $Q_X$  var būtiski uzlabot (par 33,2%), veicot sūkalu pirmsapstrādi, tai skaitā tās pakļaujot enzimatiskajai pirmsapstrādei ar  $\beta$ -galaktozidāzi, kā arī pievienojot papildus augšanas faktorus, kur vislabāko efektivitāti (par 40,8%) nodrošina melases pievienošana.

## **Pateicības**

Izsaku pateicību *Dr. biol.* Pāvelam Semjonovam par ievirzīšanu un atbalstu šo pētījumu īstenošanā, kā arī pārējiem laboratorijas kolēģiem par palīdzību pētniecības procesa praktisku jautājumu risināšanā.

## Literatūras saraksts

- Amaro T.M.M.M., Rosa D., Comi G., Iacumin L. 2019. Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. – *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Anonymous 2021a – D-glucose assay procedure K-GLUC 08/18 (GOPOD-format) – Determination key: <https://www.megazyme.com/d-glucose-assay-kit>.
- Anonymous 2021b – Lactose & D-galactose (Rapid) assay procedure K-LACGAR 03/20 – Determination key: <https://www.megazyme.com/lactose-galactose-assay-kit>.
- Anonymous 2021c – Sucrose, D-fructose and D-glucose assay procedure K-SUFRG 04/18 – Determination key: <https://www.megazyme.com/d-mannitol-assay-kit>.
- Anonymous 2021d – D-mannitol assay procedure K-MANOL – Determination key: <https://www.megazyme.com/sucrose-fructose-d-glucose-assay-kit>.
- Anonymous 2021e – Acetic acid assay procedure K-ACET 04/18 – Determination key: <https://www.megazyme.com/acetic-acid-assay-kit-acs-manual-format>.
- Anonymous 2021f – D-gluconic acid / D-glucono- $\delta$ -lactone assay procedure K-GATE 04/20 – Determination key: <https://www.megazyme.com/d-gluconic-acid-d-glucono-delta-lactone>.
- Azeredo H.M.C., Barud H., Farinas C.S., Vasconcellos V.M., Claro A.M. 2019. Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. – *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3.
- Bae S., Shoda M. 2004. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. – *Biotechnology Progress*, 20:1366–1371.
- Baldasso C., Barros T.C., Tessaro I.C. 2011. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. – *Desalination*, 278: 381–386.
- Barrett N.E., Grandison A.S., Lewis M.J. 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. – *Journal of Dairy Research*, 66: 73–80.
- Battad-Bernardo E., McCrindle S.L., Couperwhite I., Neilan B.A. 2004. Insertion of an *E. coli lacZ* gene in *Acetobacter xylinus* for the production of cellulose in whey. – *FEMS Microbiology Letters*, 231: 253–260.
- Blanco Parte F.G., Santoso S.P., Chou C.C., Verma V., Wang H.T., Ismadji S., Cheng K.C. 2020. Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. – *Critical Reviews in Biotechnology*, 10: 1–18.
- Bossi A., Bonizzato L., Zapparoli G. 2006. Acidic extracellular proteases from microorganisms of fairly acidic niche. – *Protein and Peptide Letters* 13: 737–741.
- Cai Q., Hu C., Yang N., Wang Q., Wang J., Pan H., Hu Y., Ruan C. 2018. Enhanced activity and stability of industrial lipases immobilized onto spherelike bacterial cellulose. –

- International Journal of Biological Macromolecules, 109: 1174–1181.
- Carreira P., Mendes J.A.S., Trovatti E., Serafim L.S., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Neto C.P. 2011. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. – *Bioresource Technology*, 102: 7354–7360.
- Cerrutti P., Roldán P., García R.M., Galvagno M.A., Vázquez A., Foresti M.L. 2016. Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: Importance of fermentation time on pellicle characteristics. – *Journal of Applied Polymer Science*, 133: 1–9.
- Chawla P.R., Bajaj I.B., Survase S.A., Singhal R.S. 2009. Microbial cellulose: fermentative production and applications. – *Food Technology and Biotechnology*, 47: 107–124.
- Chen L., Hong F., Yang X., Han S. 2013. Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. – *Bioresource Technology*, 135: 464–468.
- Cho S., Almeida N. 2017. *Dietary Fiber and Health*. – CRC Press, Boca Raton, 557 pp.
- Coughlin J.R., Nickerson T.A. 1975. Acid-Catalyzed Hydrolysis of Lactose in Whey and Aqueous Solutions. – *Journal of Dairy Science*, 58: 169–174.
- Czaja W., Romanovicz D., Brown R. malcolm 2004. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. – *Cellulose*, 11: 403–411.
- da Gama F.M.P., Dourado F. 2018. Bacterial NanoCellulose: What future? – *BioImpacts*, 8: 1–3.
- Das B., Roy A.P., Bhattacharjee S., Chakraborty S., Bhattacharjee C. 2015. Lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase enzyme: Optimization using response surface methodology. – *Ecotoxicology of Environmental Safety*, 121: 244–252.
- Dubey S., Singh J., Singh R.P. 2018. Biotransformation of sweet lime pulp waste into high-quality nanocellulose with an excellent productivity using *Komagataeibacter europaeus* SGP37 under static intermittent fed-batch cultivation. – *Bioresource Technology*, 247: 73–80.
- Einarsson H., Snygg B.G., Eriksson C. 1983. Inhibition of Bacterial Growth by Maillard Reaction Products. – *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 31: 1043–1047.
- Embuscado M.E., Marks J.S., BeMiller J.N. 1994. Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. – *Topics in Catalysis*, 8: 407–418.
- Fang Q., Zhou X., Deng W., Zheng Z., Liu Z. 2016. Freestanding bacterial cellulose-graphene oxide composite membranes with high mechanical strength for selective ion permeation. – *Scientific Reports*, 6: 1–11.
- Gorgieva S., Trček J. 2019. Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. – *Nanomaterials*, 9: 1–20.

- Gullo M., China S. La, Falcone P., Giudici P. 2018. Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives. – *Applied Microbiology and Biotechnology*, 6885–6898.
- Harrigan W.F. 1998. *Laboratory methods in food microbiology*. – San Diego Academic Press, 532 pp.
- Holscher H.D. 2017. Dietary Fiber and Prebiotics and the Gastrointestinal Microbiota. – Hannah D. Holscher, PhD, RD Assistant Professor of Nutrition and Human Microbiome \* Department of Food Science and Human Nutrition and Division of Nutritional Sciences, University of Ill, 1–23.
- Hornung M., Ludwig M., Schmauder H.P. 2007. Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: A novel aerosol bioreactor working on a fed batch principle (Part 3). – *Engineering in Life Sciences*, 7: 35–41.
- Hu W., Chen S., Liu L., Ding B., Wang H. 2011. Formaldehyde sensors based on nanofibrous polyethyleneimine/bacterial cellulose membranes coated quartz crystal microbalance. – *Sensors and Actuators B Chem*, 157: 554–559.
- Huang Y., Zhu C., Yang J., Nie Y., Chen C., Sun D. 2014. Recent advances in bacterial cellulose. – *Cellulose*, 21:1–30.
- Jahan F., Kumar V., Saxena R.K. 2018. Distillery effluent as a potential medium for bacterial cellulose production: A biopolymer of great commercial importance. – *Bioresource Technology*, 250: 922–926.
- Jozala A.F., Pértile R.A.N., dos Santos C.A., de Carvalho Santos-Ebinuma V., Seckler M.M., Gama F.M, Pessoa A. 2015. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. – *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 1181–1190.
- Kaur R., Panwar D., Panesar P.S. 2020. Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products. – *Food Industry Wastes*, 275–302.
- Keshk S.M.A.S., Razek T.M.A., Sameshima K. 2006. Bacterial cellulose production from beet molasses. – *African J Biotechnol*, 5: 1519–1523.
- Khudair A.Y., Salman J.A.S., Ajah H.A. 2018. Production of levan from locally *Leuconostoc mesenteroides* isolates. – *Journal of Pharmaceutical Scientific Research*, 10: 3372–3378.
- Klemm D., Heublein B., Fink H.P., Bohn A. 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. – *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22): 3358–3393.
- Kolesovs S., Semjonovs P. 2020. Production of bacterial cellulose from whey – current state and prospects. – *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 7723–7730.

- Koutinas A.A., Papapostolou H., Dimitrellou D., Kopsahelis N., Katechaki E., Bekatorou A., Bosnea L.A. 2009. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. – *Bioresource Technology*, 100: 3734–3739.
- Kruger N.J. 2009. The Bradford Method. – *Basic Protein and Peptide Protocols*, 17–24.
- Kurosumi A., Sasaki C., Yamashita Y., Nakamura Y. 2009. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. – *Carbohydrate Polymers*, 76: 333–335.
- Lau K.Y., Barbano D.M., Rasmussen R.R. 1991. Influence of Pasteurization of Milk on Protein Breakdown in Cheddar Cheese During Aging. – *Journal of Dairy Science*, 74: 727–740.
- Legnani C., Vilani C., Calil V.L., Barud H.S., Quirino W.G., Achete C.A., Ribeiro S.J.L., Cremona M. 2008. Bacterial cellulose membrane as flexible substrate for organic light emitting devices. – *Thin Solid Films*, 517: 1016–1020.
- Lin D., Liu Z., Shen R., Chen S., Yang X. 2020. Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. – *International Journal of Biological Macromolecules*, 158: 1007–1019.
- Lustri W.R., Barud H.G. de O., Barud H. da S., Peres M.F.S., Gutierrez J., Tercjak A., de Oliveira O.B., Ribeiro S.J.L. 2015. Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications. – *Cellul - Fundam Asp Curr Trends*.
- Mikkelsen D., Flanagan B.M., Dykes G.A., Gidley M.J. 2009. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. – *Journal of Applied Microbiology*, 107: 576–583.
- Nguyen V.T., Flanagan B., Gidley M.J., Dykes G.A. 2008. Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. – *Current Microbiology*, 57: 449–453.
- Oikawa T., Ohtori T., Ameyama M. 1995. Production of Cellulose from D-Mannitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59: 331–332.
- Panghal A., Patidar R., Jaglan S., Chhikara N., Khatkar S.K., Gat Y., Sindhu N. 2018. Whey valorization: current options and future scenario – a critical review. – *Nutritional Food Science*, 48: 520–535.
- Park J.K., Jung J.Y., Khan T. 2009. Bacterial cellulose. – *Handbook of Hydrocolloids*, 724–739.
- Pavaloiu R.D., Stoica A., Stroescu M., Dobre T. 2014. Controlled release of amoxicillin from bacterial cellulose membranes. – *Central European Journal of Chemistry*, 12: 962–967.
- Phong H.X., Lin L.T., Thanh N.N., Long B.H., Dung N.T.P. 2017. Investigating the conditions for nata-de-coco production by newly isolated *Acetobacter* sp. – *American Journal of*

Food Science and Nutrition, 4: 1–6.

- Picheth G.F., Pirich C.L., Sierakowski M.R., Woehl M.A., Sakakibara C.N., de Souza C.F., Martin A.A., da Silva R., de Freitas R.A. 2017. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. – International Journal of Biological Macromolecules, 104: 97–106.
- Prazeres A.R., Carvalho F., Rivas J. 2012. Cheese whey management: A review. – Journal of Environmental Management, 110: 48–68.
- Proshad R., Kormoker T., Islam M.S., Haque M.A., Rahman M.M., Mithu M.M.R. 2017. Toxic effects of plastic on human health and environment: A consequences of health risk assessment in Bangladesh. – International Journal of Health, 6: 1.
- Reiniati I., Hrymak A.N., Margaritis A. 2017. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. – Critical Reviews in Biotechnology, 37: 510–524 .
- Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M. 2018. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. – Brazilian Journal of Microbiology, 49: 151–159.
- Rivas B., Moldes A.B., Domínguez J.M., Parajó J.C. 2004. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. – International Journal of Food Microbiology, 97: 93–98.
- Rollini M., Musatti A., Cavicchioli D., Bussini D., Farris S., Rovera C., Romano D., De Benedetti S., Barbiroli A. 2020. From cheese whey permeate to Sakacin-A/bacterial cellulose nanocrystal conjugates for antimicrobial food packaging applications: a circular economy case study. – Scientific Reports, 10: 1–14.
- Rouabhia M., Asselin J., Tazi N., Messaddeq Y., Levinson D., Zhang Z. 2014. Production of biocompatible and antimicrobial bacterial cellulose polymers functionalized by RGDC grafting groups and gentamicin. – ACS Applied Materials and Interfaces, 6: 1439–1446.
- Ruka D.R., Simon G.P., Dean K.M. 2012. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. – Carbohydrate Polymers, 89: 613–622.
- Rydz J., Musioł M., Zawidlak-w B., Sikorska W. 2018. Polymers for Food Packaging Applications AM Biopolymers for food design. Academic Press, London, 431–467
- Salari M., Sowti Khiabani M., Rezaei Mokarram R., Ghanbarzadeh B., Samadi Kafil H. 2019. Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. – International Journal of

Biological Macromolecules, 122: 280–288.

- Sani A., Dahman Y. 2010. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. – Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85: 151–164.
- Semjonovs P., Ruklisha M., Paegle L., Saka M., Treimane R., Skute M., Rozenberga L., Vikele L., Sabovics M., Cleenwerck I. 2017a. Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. – Applied Microbiology and Biotechnology, 101: 1003–1012.
- Semjonovs P., Ruklisa M., Paegle L., Saka M., Treimane R., Patetko A., Linde R. 2017b. *Komagataeibacter rhaeticus* P-1463 producer of bacterial cellulose – European patent specification.
- Semjonovs P., Zikmanis P., Kolesovs S. 2021. No sūkalām līdz bioplastmasai. – Saimnieks, 6 (iespiešanās).
- Sheldon R.A., van Pelt S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. – Chemical Society Reviews, 42: 6223–6235 .
- Shi Z., Zhang Y., Phillips G.O., Yang G. 2014. Utilization of bacterial cellulose in food. – Food Hydrocolloids, 35: 539–545.
- Soleimani A., Hamed S., Babaeipour V., Rouhi M. 2021. Design, construction and optimization a flexible bench-scale rotating biological contactor (RBC) for enhanced production of bacterial cellulose by *Acetobacter Xylinium*. – Bioprocess Biosystem Engenering.
- Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp.A9 in shaking cultures. – Biotechnology and Applied Biochemistry, 33: 1.
- Thompson D.N., Hamilton M.A. 2000. Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. – 22 nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 208: 526.
- Torres F., Commeaux S., Troncoso O. 2012. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. – Journal of Functional Biomaterieals, 3: 864–878.
- Toyosaki H., Naritomi T., Seto A., Matsuoka M., Tsuchida T., Yoshinaga F. 1995. Screening of Bacterial Cellulose-producing *Acetobacter* Strains Suitable for Agitated Culture. – Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59: 1498–1502.
- Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandala I., Papanikolaou S., Paloukis F., Alves V., Koutinas A. 2015. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. – International Journal of Molecular Science, 16: 14832–14849.
- Ul-Islam M., Khan S., Ullah M.W., Park J.K. 2015. Bacterial cellulose composites: Synthetic

- strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields. – *Biotechnological Journal*, 10: 1847–1861.
- Ullah H., Santos H.A., Khan T. 2016 Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. – *Cellulose*, 23: 2291–2314.
- Ummartyotin S., Juntaro J., Sain M., Manuspiya H. 2011. Si-O barrier technology for bacterial cellulose nanocomposite flexible displays. – *Carbohydrate Polymers*, 86: 337–342.
- Vazquez A., Foresti M.L., Cerrutti P., Galvagno.2013. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. – *Journal of Polymers and the Environment*, 21: 545–554.
- Wan Y., Gao C., Han M., Liang H., Ren K., Wang Y., Luo H. 2011. Preparation and characterization of bacterial cellulose/heparin hybrid nanofiber for potential vascular tissue engineering scaffolds. – *Polymers of Advanced Technology*, 22: 2643–2648.
- Watanabe K., Tabuchi M., Morinaga Y., Yoshinaga F. 1998. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. – *Cellulose*, 5: 187–200.
- Yadav P., Yadav H., Shah V.G., Shah G., Dhaka G. 2015. Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: A systematic review. – *Journal of Clinical Diagnostic Research*, 9: 21–25.
- Yodsuwan N., Owatworakit A., Ngaokla A., Tawichai N., Soykeabkaew N. 2012. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Bacterial Cellulose Production for Bionanocomposite Materials. – *Sch Sci Mae Fah Luang Univ Technol Instruments Center*, 2005–2010.
- Zhong C., Zhang G.C., Liu M., Zheng X.T., Han P.P., Jia S.R. 2013. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. – *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 6189–6199.
- Zotta T., Solieri L., Iacumin L., Picozzi C., Gullo. 2020. Valorization of cheese whey using microbial fermentations. – *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Бекер М., Лиепиньш Г., Райпулис Е. 1990. Биотехнология. – Москва, Агропромиздат, 334 с.

# Pielikumi

1. pielikums

Dokumentāra lapa

Maģistra darbs “Sūkalu kā alternatīva substrāta novērtējums bakteriālās celulozes iegūšanai” izstrādāts LU Bioloģijas Institutā.

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

Autors: Sergejs Koļesovs

31.05.2021

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: *Dr. biol.* Pāvels Semjonovs

31.05.2021

Recenzents:

prof., *Dr biol.* Uldis Kalnenieks

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 31.05.2021

Lietvede:

Darbs aizstāvēts Bioloģijas maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot Nr.           , vērtējums

Komisijas sekretārs/e