



EESTI MAAÜLIKOOL

Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut
Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetool

Pavel Sahharov

**FERMENTERI TÖÖPÕHIMÕTE JA
KASUTUSVÕIMALUSED MIKROBIOLOOGIAS**

WORKING PRINCIPLES OF FERMENTER AND ITS
APPLICATION IN MICROBIOLOGY

Bakalaureusetöö

Toiduainete tehnoloogia õppekava

Juhendajad: nooremprofessor Helena Andreson, PhD

Maarja Abel, BSc

Tartu 2021

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Autor: Pavel Sahharov		Õppekava: Toiduainete tehnoloogia	
Pealkiri: Fermenteri tööpõhimõte ja kasutusvõimalused mikrobioloogias			
Lehekülgi: 66	Jooniseid: 10	Tabeleid: 7	Lisaid: 1
<p>Osakond / Õppetool: Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetool ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: 1.7. Toiduteadused, Toiduainete ja jookide tehnoloogia T430 Juhendaja(d): nooremprofessor Helena Andreson, PhD; Maarja Abel, BSc Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu 2021</p>			
<p>Fermentereid ehk bioreaktoreid kasutatakse laialdaselt erinevates valdkondades, sealhulgas näiteks teaduslaborites mitmesuguste mikrobioloogiliste protsesside uurimiseks. Ka Eesti Maaülikooli Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetooli mikrobioloogia laboris on Applikon <i>my-Control</i> 2 L mahutavusega fermenter, millel seni puudus varasem kasutuskogemus, kuid mis omab suurt potentsiaali erinevateks rakendusteks nii mikrobioloogias kui ka toiduteaduses laiemalt.</p> <p>Bakalaureusetöö eesmärk on anda põhjalik ülevaade fermenterite tööpõhimõtetest, kasutusalaadest ning eksperimentaalse töö alusel koostada Applikon <i>my-Control</i> fermenteri kasutusjuhend. Eksperimentaalse töö jaoks kasutati fermenteri riist- ja tarkvara kahe pärmikultuuri kasvatamisel, et jälgida fermentatsiooniprotsessi kulgu ja hinnata seadme töö stabiilsust.</p> <p>Eksperimentaalses osas jälgiti fermenteri erinevate seguri kiiruste (100-300 rpm) mõju pärmiliikide <i>Saccharomyces pastorianus</i> ja <i>Saccharomyces bayanus</i> rakkude arvule, kaalule ja kasvusöötme pH väärtusele fermentatsiooniprotsessi käigus. Leiti, et <i>S. pastorianus</i>'e kasvatamiseks sobisid kõik valitud segamiskiirused 100-300 rpm, kuid suurim pärmirakkude arvu muutus registreeriti segamiskiiruse 200 rpm kasutamisel ($10,58 \pm 0,08$ log rakku/L). <i>S. bayanus</i>'e rakkude arvu määramine biomassi anduriga ebaõnnestus pärmi poolt moodustatud biokile tõttu, aga kaalu muutuse põhjal järeldati, et <i>S. bayanus</i>'e kasv toimus samuti kõige aktiivsemalt segamiskiiruse 200 rpm juures.</p> <p>Mõlema pärmi fermentatsiooniprotsessi käigus toimus esialgu kasvusöötme pH langus ning hiljem selle tõus. <i>S. pastorianus</i> kultuuri kasutamisel langes pH kuni 40. tunnini, aga <i>S. bayanus</i>'e fermentatsiooniprotsessi käigus langes pH minimaalseima väärtuseni juba 16 tundi pärast pärmi söötmesse lisamist. <i>S. bayanus</i>'e pH väärtuse muutused olid prominentsemad segamiskiiruse 300 rpm juures.</p> <p>Eksperimentide käigus saadud tulemused tõestasid Applikon <i>my-Control</i> seadme töö stabiilsust. Lisaks koostati katsete läbiviimise käigus Applikon <i>my-Control</i> 2 L fermenteri detailne kasutusjuhend, mis hõlbustab seadme edaspidist kasutamist erinevate katsete läbiviimisel.</p>			
Märksõnad: Applikon <i>my-Control</i> , pärmid, segamiskiirus, kasutusjuhend			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Bachelor's Thesis	
Author: Pavel Sahharov		Curriculum: Food technology	
Title: Working principles of fermenter and its application in microbiology			
Pages: 66	Figures: 10	Tables: 7	Appendixes: 1
Department / Chair: Chair of Food Science and Technology Field of research and (CERC S) code: 1.7 Food Sciences, Food and drink technology T430 Supervisors: assistant professor Helena Andreson, PhD; Maarja Abel, BSc Place and date: Tartu 2021			
<p>Fermenters, also known as bioreactors, are widely used in various fields, such as, e.g., research laboratories to investigate various microbiological processes. The laboratory of the Chair of Food Science and Technology of the Estonian University of Life Sciences has a new Applikon <i>my</i>-Control fermenter, have so far not had any user-experience by stuff, but has great potential for various applications in microbiology and food science in general.</p> <p>The aim of this Bachelor's thesis is to provide a thorough overview of the operating principles and applications of fermenters in general and to compile the operating manual for the Applikon <i>my</i>-Control fermenter based on the experiments. For experimental work, current fermenter hardware and software technologies were used to grow two types of yeast, monitor the progress of the fermentation process and assess the stability of the equipment.</p> <p>In the experimental part, the effect of different stirrer agitation speeds (100-300 rpm) on the number of cells of <i>Saccharomyces pastorianus</i> and <i>Saccharomyces bayanus</i>, their weight and the overall pH of the growth medium were evaluated during the fermentation process. Stirring speeds of 100-300 rpm were found to be suitable for growing <i>S. pastorianus</i>, but the largest change in the number of yeast cells was recorded at a stirring speed of 200 rpm (10.58 ± 0.08 log cells/L). <i>S. bayanus</i> cell counting with the biomass sensor failed, however, due to its biofilm forming ability, but based on the changes in weight, it was determined that <i>S. bayanus</i> growth was also most active at a stirring speed of 200 rpm.</p> <p>During the fermentation process of both types of yeast, the pH of the growth medium initially decreased and later increased. During <i>S. pastorianus</i> growth, the pH was decreasing until the 40-hour mark, but during the fermentation process of <i>S. bayanus</i>, the pH dropped to a minimum as early as 16 hours after the addition of the yeast to the medium. Changes in the pH of <i>S. bayanus</i> were more prominent at an increased stirring speed of 300 rpm.</p> <p>The results of the experiments showed the stability of the Applikon <i>my</i>-Control. In addition, a detailed user manual for the Applikon <i>my</i>-Control was compiled in order for the device to be used for various continual tests.</p>			
Keywords: Applikon <i>my</i> -Control, yeast, agitation speed, manual			

SISUKORD

LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Fermenteri üldiseloomustus.....	7
1.2 Fermenteri tüübid	8
1.2.1 Fermenter mehaanilise segamisega	8
1.2.2 <i>Bubble Column</i> fermenter	10
1.2.3 <i>Airlift</i> fermenter	11
1.3 Fermentatsioonistrateegiad.....	11
1.4 Applikon <i>my-Control</i> fermenter	14
1.5 Fermentatsiooniprotsessid	14
1.6 Fermenteri kasutusala.....	18
1.6.1 Alkohoolsete jookide ja äädika tootmine	18
1.6.2 Hapupiimatoodete tootmine	19
1.6.3 Vitamiinide, ensüümide ja pigmentide tootmine	20
1.6.4 Biokütuse tootmine	21
1.6.5 Taime- ja loomarakkude kasvatamine	22
1.7 Mikroorganismide kasvutingimused fermenteris	22
2. MATERJAL JA METOODIKA.....	26
2.1 Eesmärk ja ülesanded	26
2.2 Mikroobikultuuride ettevalmistamine	26
2.3 Kasvusöötme ettevalmistamine	27
2.4 Fermenteri ettevalmistamine	27
2.5 Pärmide kasvatamine	28
2.6 Statistiline analüüs	28
3. TULEMUSED JA ARUTELU	29
3.1 <i>Saccharomyces pastorianus</i> rakkude arvu muutus.....	29
3.2 <i>Saccharomyces bayanus</i> rakkude arvu muutus	31
3.3 pH muutus pärmide kasvulahuses	33
KOKKUVÕTE	37
KASUTATUD KIRJANDUS	39
LISAD	47
Lisa 1. Applikon <i>my-Control</i> fermenteri kasutusjuhend	48

LÜHENDID

ATP	adenosiindifosfaat
BHK 21	rakuliin, beebi hamstri neeru rakud (<i>Baby Hamster Kidney</i>)
CHO	rakuliin, Hiina hamstri munasarjarakud (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
HEK 293	rakuliin, inimese neeru embrüonaalsed rakud (<i>Human Embryonic Kidney</i>)
LAB	piimhappebakterid (<i>Lactic Acid Bacteria</i> , ingl. k.)
NAD	nikotiinamiid adeniin dinukleotiid
YPD	<i>Yeast Extract–Peptone–Dextrose</i> universaalsööde pärmidele

SISSEJUHATUS

Käärimine ehk fermentatsioon on protsess, mida inimesed on kasutanud pikka aega. Meie eelkäijad jälgisid ja uurisid käärimisprotsessi, et toota pika säilivusajaga maitserohkeid tooteid. Fermenteerimist kasutatakse laialdaselt alkoholsete jookide ning taimset ja loomset (kala, piim, liha) päritolu toitude valmistamisel, aga ka biotehnoloogia ja keemia valdkondades, näiteks etanooli, atsetooni, butanooli ja organiliste hapete tootmiseks.

Fermentatsiooniprotsessi läbiviimisel on oluline kontrollida mikroobide kasvutingimusi, et valitud mikroobikultuur paljuneks ja tegutseks võimalikult edukalt. Tooraine kääritamise intensiivsus mikroobide poolt sõltub mitmesugustest teguritest: temperatuurist, pH-st, erinevate toitainete kättesaadavusest, gaaside sisaldusest jms. Mainitud faktorite kontrollimist võimaldab fermenteri ehk bioreaktori kasutamine, mida saab rakendada ka mikroobikultuuri biomassi kasvatamiseks. Fermenteri kasutaja saab ise fermentatsiooniprotsessi juhtida, sätestada vajalikke parameetreid, jälgida neid kontrolleri abil ja muuta, kui protsessi parameetrid kalduvad optimaalsetest tingimustest kõrvale. Peamine keerukus fermenteri kasutamisel seisneb mikroobide jaoks optimaalsete kasvutingimuste leidmises ning fermenteri tööprotsesside ja rakendamise võimaluste tundmises.

Bakalaureusetöö eesmärk on anda kirjanduse põhjal ülevaade fermenteri ehitusest ja maailmas kasutusel olevatest fermentatsioonitehnoloogiatest ning eksperimentaalse töö alusel koostada Applikon *my-Control* mehaanilise segamisega fermenteri (*Applikon Biotechnology*, Holland) kasutusjuhend. Bakalaureusetöö eksperimentaalses osas teostati fermentatsiooniprotsesside jälgimiseks ja seadme töö stabiilsuse hindamiseks fermentatsioonikatsed kahe pärmiliigiga: *Saccharomyces pastorianus* ja *Saccharomyces bayanus*. Valides tarkvara abil fermenteris erinevaid segamiskiiruseid, jälgiti kogu fermentatsiooniprotsessi käigus olemasolevate andurite abil rakkude arvu ja pH muutust, et teada saada, kas ja kuidas seguri segamiskiirus neid parameetreid mõjutab. Bakalaureusetöö loob aluse EMÜ Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetooli laboris olemasoleva uue seadme edasiseks edukaks kasutamiseks ja uute protokollide arendamiseks nii pärmseente kui teiste mikroorganismide tarbeks.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Fermenteri üldisloomustus

Fermenter ehk bioreaktor on seade, mis võimaldab luua ja säilitada steriilseid optimaalseid fermentatsiooniks vajalikke tingimusi, lisada toitained, eemaldadaprodukte ning liita lisaseadmeid proovide võtmiseks, steriliseerimiseks, soojendamiseks, jahutamiseks, aeratsiooniks jne (McNaught & Wilkinson, 2009). Fermenteri kasutamisel rakendatakse mikroobide erinevaid omadusi (näiteks nende ensüüme ja metabolismiradasid), et saada produkte, mida on võimalik kasutada energia tootmiseks, farmakoloogia-, materjali-, keemia- ja toidutehnoloogiates (Singh *et al.*, 2017). Fermenteris toimuvate bioloogiliste protsesside käigus muudetakse erinevate mikroorganismide (bakterite ja seente) abil kompleksed substraadid lihtaineteks (Pandey *et al.*, 2000). Mikroobsete protsesside tagajärjel võivad moodustuda ka kõrvalproduktid ehk sekundaarsed metaboliidid, millel on tähtis praktiline väärtus erinevates valdkondades, näiteks toidulisandite tootmises toiduainete tehnoloogias (Kallscheuer *et al.*, 2019).

Esimese maailmasõja ajal arendas Chaim Weizmann'i poolt juhitud uurimismeeskond atsetooni tootmise meetodit, kasutades selleks *Clostridium acetobutylicum*'i kääritamisevõimet (Reinharz, 1985). Hiljem viis see esimese suure aseptilise fermenteri loomise ja kasutamiseni. Saastumine oli tõsine probleem, eriti suuremahulise tootmise algusaastatel, sest etanooli fermenteerimiseks vajaliku steriilsuse saavutamine oli atmosfäärirõhul võimatu ja sobilikke anumaid oli raske kätte saada. Probleemi lahendamiseks otsustati välja töötada meetodid ja luua seadmed fermentatsiooniprotsesside läbiviimiseks steriilses keskkonnas (Stanbury *et al.*, 2016). De Becze ja Liebmann (1944) olid esimesed, kes kasutasid pärmimassi tootmiseks fermenterit, mille maht oli suurem kui 20 L.

Kõik fermenterid on heterogeensed ehk nende sees on võimalik kasutada kahte või enamat faasi, nii vedelat, gaasilist kui tahket (Klasson *et al.*, 1991). Optimaalsed tingimused on hädavajalikud efektiivseks massi, kuumuse ja impulsi ülekandmiseks ühest faasist teise

(Oldshue, 1985). Korrektseks fermentatsiooniprotsessi läbiviimiseks peab fermenter tagama:

- võimaluse segada räumassi söötmega, et soodustada mikroobikultuuri kasvu;
- aeratsiooni (aeroobsed fermenterid) – hapnikuga varustamise;
- võimaluse mikroobide kasvutingimusi (temperatuur, pH, rõhk, aeratsioon, toitmine, vedeliku kogus) kontrollida;
- steriilsuse ja steriilse keskkonna hoidmise;
- võimaluse rakkude või söötme eemaldamiseks (pidevaks fermentatsiooniks) (Stanbury *et al.*, 2016).

Fermenteri suurus, maht ja disain sõltuvad eesmärgist. Laboratoorsed fermenterid on enamasti väiksed (1 – 50 L), kuid tööstuslikud fermenterid on kuni 500 000 L (Jagani *et al.*, 2010). Tööstuslikud fermenterid jaotatakse tavaliselt kahte kategooriasse: aeroobsed ja anaeroobsed. Aeroobsed fermenterid vajavad fermentatsiooni läbiviimiseks lisaseadmeid, näiteks spargerit (Yoshida, 1982). Kaasaegsed fermenterid on tavaliselt ühendatud arvutiga, mis võimaldab mugavalt jälgida fermentatsiooniprotsessi kulgu ja koguda andmeid (Sabari & Sharma, 2018).

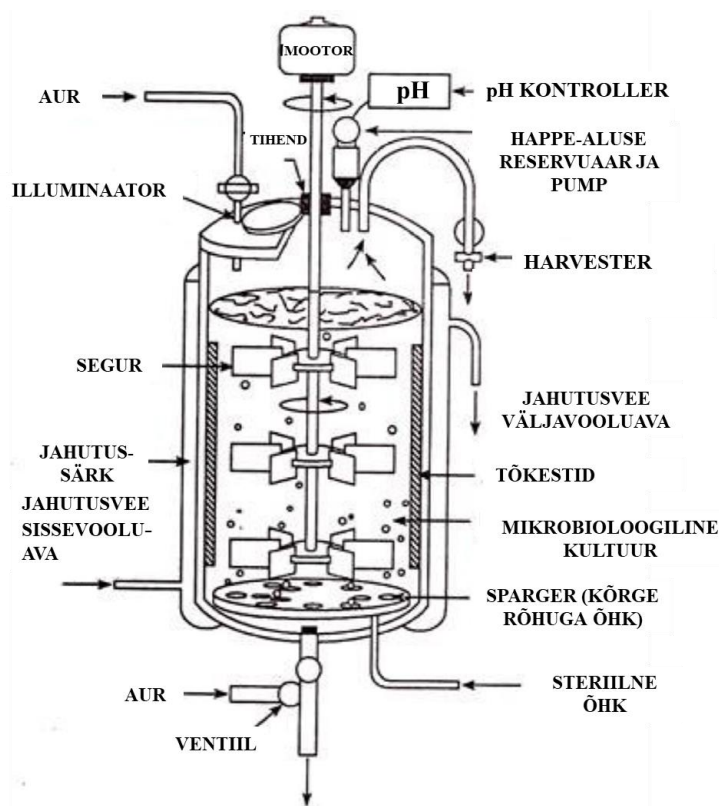
1.2 Fermenteri tüübid

Fermenter on kompleksne seade, mida võib liigitada erinevalt sõltuvalt selle ehitusest, kasutusviisist, keskkonna säilitamise viisist jne. Kombineerides omavahel erinevaid fermenteri osi, võib saada unikaalse ja omapärase aparraadi (Doran, 2013). Toiduainetetööstuse valdkonnas on kõige enam levinud fermenter mehaanilise segamisega, *airlift* fermenter ja *bubble column* fermenter (Stanbury *et al.*, 2016).

1.2.1 Fermenter mehaanilise segamisega

Mehaanilise segamisega fermenter (Joonis 1) on roostevabast terasest kinnine anum, mis on varustatud soojusvahetussärgiga, mille sisse lastakse auru (steriliseerimiseks) või külma vett (jahutamiseks) (Jagani *et al.*, 2010). Soojusvahetussärk on vajalik, sest söötme steriilsuse

tagamine ja temperatuuri kontrollimine on fermentatsiooniprotsessi läbiviimisel kohustuslikud (Singh *et al.*, 2014).



Joonis 1. Fermenter mehaanilise segamisega (modifitseeritud Medina, 2019 põhjal).

Aereerimise eesmärk on varustada mikroorganisme hapnikuga. Aereerimissüsteemi kaks põhiosa on segur ja sparger, mis tagavad, et segamine oleks pidav ja ühtlane (Yoshida, 1982). Sparger on augustatud metallist rõngas, mille kaudu lastakse söötmesse rõhu all steriilset gaasi, mis difusiooni teel satub söötmesse (Karimi *et al.*, 2013). Segur jaotab gaasimullid ja kultuuri vedelsöötmes ühtlaselt laiali, kindlustades mikroobidele hapniku ja toitainete kättesaadavuse. Seguri suurus ja võimsus sõltuvad fermenteri tüübist ning mõned suuremad fermenterid vajavad rohkem kui ühte segurit. (McDonough, 1997)

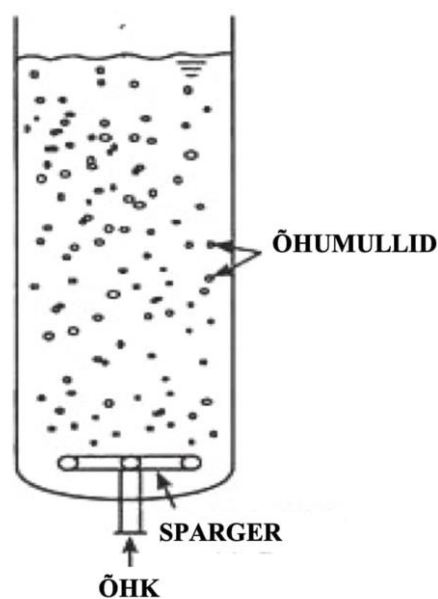
Tõkestid on metallist plaadid, mille suurus on ligikaudu 1/10 fermenteri diameetrist ning mis olles kinnitatud radiaalselt fermenteri seintele, takistavad söötmekeerise tekkimist ja soodustavad aeratsiooni (Walker & Holdsworth, 1958).

Harvesteri, mis koosneb *harvest* (proovivõtmise) torust ja *sample* (proovi) voolikust, kasutatakse aseptiliseks kultuuriproovide võtmiseks (Seifert & Matteau, 1988).

Fermentatsiooni ajal toimuvad protsessid võivad muuta kasvukeskkonna mikroobide jaoks ebasoodsaks. Parameetrite säilitamiseks kasutatakse kontrollseadmeid, mis võimaldavad numbriliste andmete (pH, toitumine, hapnikusisaldus, rakumass ja ainete kontsentratsioon) jälgimist ja muutmist. (Singh *et al.*, 2014)

1.2.2 *Bubble Column* fermenter

Bubble Column fermenter on silindriline anum, mis on varustatud spargeriga (Joonis 2). Sparger puhub gaasi läbi vedeliku, mille tõttu toimub kultuuri segamine, kuid erinevalt teistest fermenteritest ei tekita mullid tugevat survet ega lõhu söödet (kui tegu on pooltahke söötmega) (Lübbert, 2000).

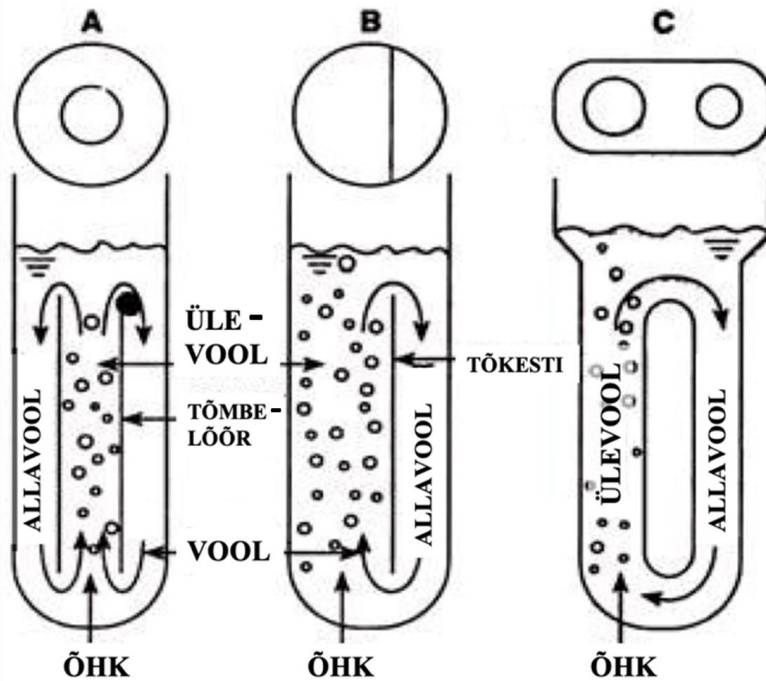


Joonis 2. *Bubble Column* fermenter (modifitseeritud Medina, 2019 põhjal).

Fermenteri eelisteks on hea soojuse ja massi ülekanne, lihtne opereerimine ja puhastamine ning odav kasutamine. Liikuvate osade puudumine muudab fermenteri vastupidavaks. (Singh *et al.*, 2014)

1.2.3 Airlift fermenter

Airlift fermenteris kasutatakse kokkusuurutud gaasi võimet paisuda. Gaas puhutakse läbi vedeliku ning kuna anum on jaotud kaheks tsooniks (Joonis 3), tekib vool, mille tõttu toimub kultuuri segamine. (Chen, 1990)



Joonis 3. Airlift fermenter. A: gaas suunatakse anuma keskel läbi tõmbelõõri; B: anum on jaotatud tõkesti abil kaheks tsooniks; C: anum on ringikujuline (modifitseeritud Chisti & Moo-Young, 2003 põhjal).

Fermenteri eelised on lihtne opereerimine ja puhastamine, odav kasutus, hea soojuse ja massi ülekande ning liikuvate osade puudumine, mis muudab fermenteri vastupidavaks (Singh *et al.*, 2014).

1.3 Fermentatsioonistrateegiad

Fermenteri tööprintsip sõltub substraadi lisamise viisist ning on vajalik fermentatsiooniprotsessi paremaks kontrollimiseks (McNeil & Harvey, 2008).

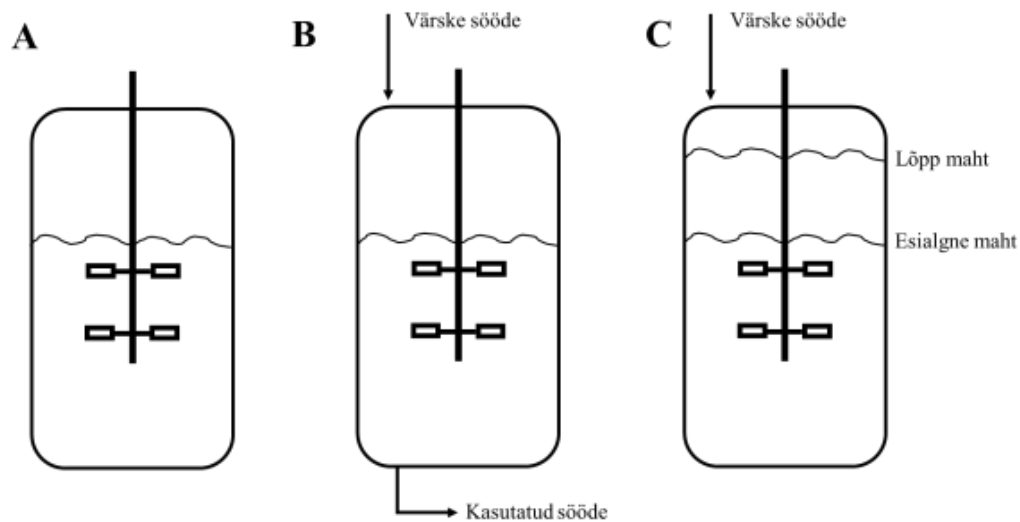
Fermenteerimisel suureneb mikroobide hulk ja tekivad jääkproduktid, samas kui substraadi hulk ja selle saadavus väheneb (Holzapfel, 1997). Erinevate fermentatsioonistrateegiatega ehk tehnoloogiliste lähenemistega (Tabel 1) abil viiakse fermentatsioon läbi nii, et protsess toimuks võimalikult efektiivselt. Näiteks, etanooli tootmiseks on otstarbekas valida viis, mis võimaldab suurema koguse produkti saamist. Zohri *et al.* (2017) kirjeldasid, kuidas fermentatsioonistrateegia valikust sõltub etanooli lõplik kogus. Uuriti *Saccharomyces cerevisiae* fermenteerimise efektiivsust melassis ja leiti, et antud tingimustes on kõige sobilikum kasutada pidevat fermentatsioonistrateegiat, sest antud strateegia aitab vähendada etanooli akumulereerumist. Tulemustest järeldus, et kasutades eesmärgile kohast strateegiat, on võimalik fermentatsiooniprotsessi inhibeerivate tegurite mõju vähendada.

Tabel 1. Erinevate fermentatsioonistrateegiatega eelised ja puudused (modifitseeritud Kushwaha *et al.*, 2018; Willaert *et al.*, 1996 põhjal)

Fermentatsioonistrateegiad	Eelised	Puudused
Perioodiline (<i>batch</i> , ingl. k.)	Seadme lihtne ehitus, sobilik väiketootmiseks	Masin vajab täitmist ja puhastamist iga katse läbiviimiseks; fermentatsioonitingimused muutuvad pidevalt; ei sobi suuremahuliseks tootmiseks
Pidev (<i>continuous</i> , ingl. k.)	Suur tootlikkus; toote kvaliteet on parem, sest fermentatsioonitingimused on ühtlased (pidev söötme lisamine tagab toitainete olemasolu; pidev kasutatud söötme ja produkte väljavool vähendab inhibitsiooni)	Vajab rohkem hooldust ja kontrolli fermentatsiooniprotsessi läbiviimiseks
Poolpidev (<i>fed-batch</i> , ingl. k.)	Parim fermentatsioonitingimuste kontroll, kõige rohkem kasutakse biotehnoloogiliste protsesside läbiviimiseks	Madalam tootlikkus võrreldes pideva strateegiaga; raskesti optimeeritav

Perioodiline ehk *batch* fermentatsioonistrateegia on ühekordne fermentatsioon „kinnises“ süsteemis, kuhu alguses lisatakse kasvusööde ja mikroobikultuur ning produkti kogutakse fermentatsiooniprotsessi lõpus (Joonis 4A) (Xin *et al.*, 2019). Strateegiat kasutatakse enamasti biotehnoloogias, näiteks mikroorganismide fermentatsioonitingimuste uurimiseks, et fermentatsiooniprotsessi arendada ja optimeerida. Linville *et al.* (2013) kirjeldasid *Clostridium thermocellum* ja selle mutantse tüve tolerantsust erinevate kasvu inhibeerivate produktide suhtes, mis tekivad fermentatsiooniprotsessi ajal. Uurimisrühm kasutas *batch*

fermentatsioonistrateegiat, mis võimaldas saada kiirema tulemuse kasutades vähem ressursse.



Joonis 4. Fermentatsioonistrateegiad. A: perioodiline ehk *batch* fermentatsiooniprotsess; B: pidev ehk *continuous* fermentatsiooniprotsess; C: poolpidev ehk *fed-batch* fermentatsiooniprotsess (modifitseeritud Abbott *et al.*, 2013; Reddy *et al.*, 2017; Soccol *et al.*, 2013 põhjal).

Pidev ehk *continuous* fermentatsioonistrateegia võimaldab fermenterisse pidevalt kasvusöödet juurde lisada ning fermentatsiooniprodukte ja heitsöödet eemaldada (joonis 4B). Toitainete kontsentratsiooni säilitatakse pidevalt (Singh *et al.*, 2014). Strateegiat kasutatakse sageli suurtes tööstustes, näiteks äädika või etanooli tootmiseks (Li *et al.*, 2014).

Poolpidev ehk *fed-batch* fermentatsioonistrateegia on kombineeritud protsess, kus värsket söödet lisatakse süsteemi fermentatsiooniprotsessi ajal ning fermentatsiooniprodukti kogutakse protsessi lõpus (joonis 4C) (Abbott *et al.*, 2013). Võrreldes *batch* strateegiaga (joonis 4A) saadakse parem toote väljatulek (Longobardi, 1994). *Fed-batch* strateegia suurim puudus on pidev optimeerimise vajadus, kuna iga mikroorganismi jaoks on vaja leida sobiv söötme lisamise intervall ja lisatava söötme kogus. Strateegiat kasutatakse erinevates valdkondades: aminohapete, antibiootikumide, vitamiinide, ensüümide, orgaaniliste hapete ja ka polümeeride tootmiseks (Xin *et al.*, 2019).

1.4 Applikon *my-Control* fermenter

Applikon *my-Control* (Applikon Biotechnology, Holland) on mehaanilise segamisega fermenter, mis koosneb kahest osast: autoklaavitavast klaasfermenterist, mille maht on 2 L ja kontrollersüsteemist *my-Control*. Klaas on otstarbekas materjal – see võimaldab anuma autoklaavimist ning puhastamine pärast protseduuri läbiviimist on mugav ja tõhus. Fermenter on kompaktne ja täiesti suletud – seda saab kasutada ka anaeroobsete mikroorganismide paljundamiseks. Klaasist fermenter on varustatud soojusvahetussärgi, mehaanilise seguri ja spargeriga ning seda võib kasutada perioodilise, poolpideva ja pideva fermentatsiooniprotsessi läbiviimiseks. (Applikon, 2017)

Bioreaktori juurde kuuluv kontroller *my-Control* on üks kaasaegsemaid fermenteri kontrollereid. Kontroller on äravõetav ja seda saab kasutada ka fermenterite jaoks, mille maksimaalne maht on 3 L. Süsteem võimaldab kiiresti ümber lülituda rakkude ja mikroobide kasvatamise erinevate konfiguratsioonide vahel ning jälgida ja juhtida fermentatsiooniprotsesse läbi arvuti või telefoni juhtmevabalt. Kontrolleri abil on võimalik muuta pH-d, temperatuuri ja erinevate gaaside (nt. O₂) sisaldust ning lisaks edastab kontroller teavet vahu tekkimise ja söötme taseme muutumise kohta. *My-Control* pakub võimalust lisada fermenterisse vedelikke ja gaase. (*My-Control*, 2017)

Applikon *my-Control* fermenterit on varasemalt kasutatud näiteks Hiina hamstri munasarjarakkude (CHO) kasvatamiseks (Goey *et al.*, 2019), pidevaks vesiniku ja metaani tootmiseks agaavi taimest (Montiel Corona & Razo-Flores, 2018) ja polühüdrosübutüraati produtseerivate bakterite kultiveerimiseks (Johnson *et al.*, 2010).

1.5 Fermentatsiooniprotsessid

Fermentatsioon on metaboolne protsess, mille käigus mikroorganismid muudavad enda poolt produtseeritud ensüümide abil orgaanilised substraadid hapete derivaatideks, gaasideks või alkoholiks (Sinha *et al.*, 2010; Speight, 2017).

Sõltuvalt süsinikuallikast ja toodetavast produktist liigitatakse fermentatsiooniprotsessid:

- propioonhappeline käärimine;
- aminohappeline käärimine;

- piimhappeline käärimine;
- seguhappeline käärimine;
- 2,3-butaandioolkäärimine;
- vöihappeline käärimine;
- glütserool-püruvaatkäärimine;
- etanoolkäärimine (Ciani *et al.*, 2013).

Tänapäeval viiakse erinevaid fermentatsiooniprotsesse läbi fermenterites suurtes mastaapides, kasutades arenenud kultuure ja kontrollitud tingimusi, et saada maksimaalne produkti kogus.

Propioonhappelise käärimise substraadiks võivad olla glükoos või piimhape, millest tekivad produktidena propioonhape, etaanhape ja CO₂ (Hsu & Yang, 1991; Swick & Wood, 1960). Toiduainete valdkonnas kasutatakse propioonhapet konservandina juustude ja pagaritoodete säilitamiseks, kuna propioonhape pidurdab hallitusseente kasvu (Tirosh *et al.*, 2019). Propioonhappelist käärimist kasutatakse Šveitsi tüüpi juustu tootmises selleks, et juustule moodustuksid sellele iseloomulikud suured augud ja kergelt pähkline maitse. (Fröhlich-Wyder *et al.*, 2017). Propioonhapet toodetakse suurtes kogustes kasutades fermentereid. Protsessi võivad läbi viia *Propionibacterium* spp. ja *Clostridium propionicum* (Stowers *et al.*, 2014).

Aminohappelise käärimise läbiviimine on tugevalt seotud erinevate bakterite ellujäämisega juhul, kui keskkonnas puuduvad elektronaktseptorid nagu hapnik, nitraat ja sulfaat (Barker, 1981). *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp. ja mõned teised anaeroobid on võimelised käärutama aminohappeid. Aminohappeline käärimine võimaldab näiteks *Clostridium* perekonna liikidel tekitada energiamolekuli ATP-d (*adenosine triphosphate*, ingl. k.) isegi siis, kui keskkonnas puuduvad fermenteerimiseks sobivad süsinikuallikad. (Fonknechten *et al.*, 2010)

Piimhappelisel käärimisel glükoos oksüdeeritakse kas homofermentatiivse, heterofermentatiivse või bifiduse raja (*the bifid shunt*, ingl. k.) kaudu (Axelsson & Ahrné, 2000). Homofermentatiivset piimhappekäärimist viivad läbi näiteks *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp. ja *Lactobacillus* spp. Glükolüüsi rajas tekib suhkrust piimhape (Tamime & Robinson, 1999). Heterofermentatiivne piimhappekäärimine on iseloomulik *Leuconostoc* spp., *Oenococcus* spp., *Weissella* spp. ja

heterofermentatiivsetele *Lactobacillus* liikidele. Fermentatsiooniproduktidena tekivad piimhape, etanool/atsetaat ja CO₂ (Björkroth & Holzapfel, 2006; Tanasupawat *et al.*, 2000). Bifiduse raja kaudu toimuv käärimine on heterofermentatiivne piimhappeline käärimine, mida viivad läbi perekonna *Bifidobacterium* liigid (Fushinobu, 2010) ning mille produktideks on piimhape ja atsetaat (Pessione, 2012). Piimhappeline käärimine on oluline protsess hapupiimatoodete (jogurti, juustu, hapukoore), kääritatud köögiviljade (hapukapsa ja *kimchi*) ja hapuleiva tootmiseks ning silo stabiliseerimiseks (Kongo, 2013; Urbonaviciene *et al.*, 2015).

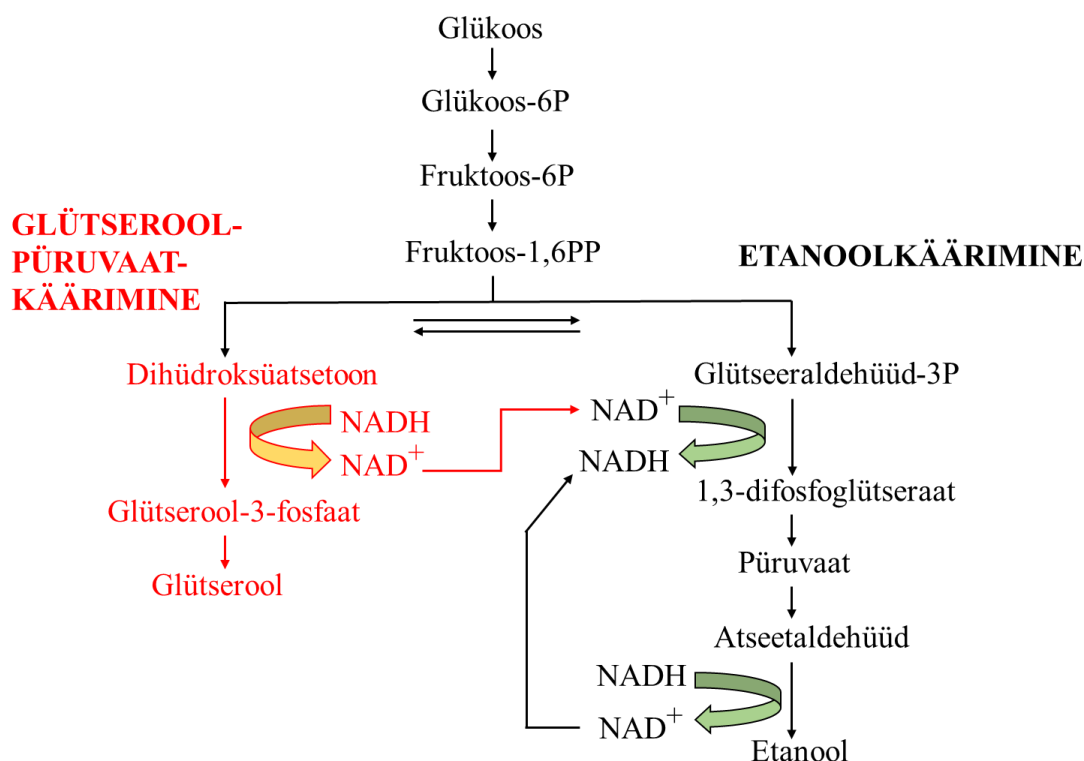
Seguhappeline käärimine on iseloomulik *Enterobacteriaceae* sugukonnale: *Citrobacter* spp., *Escherichia* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. ja lisaks ka mõnedele anaeroobsetele seentele (Brock *et al.*, 2000). Käärimissubstraadiks võivad olla mono- ja disahhariidid, polüalkoholid ja polüsahhariidid. Protsessi produktidena tekivad piim-, metaan-, merevaik- ja etaanhape, CO₂ ning H₂. (Ciani *et al.*, 2013). Protsessi kasutatakse biokütuse (Farrell *et al.*, 2006) või bioplastiku (Nagarajan *et al.*, 2016) tootmiseks kasutades fermentereid.

Butaandioolkäärimise rada alustatakse püruvaadist ning produktidena tekivad 2,3-butaandiool, gaas ja happed. (Wood *et al.*, 2005). Protsessi viivad läbi *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp. ja *Serratia* spp. (Deák & Farkas, 2013).

Võihappeline käärimine on iseloomulik mõnedele obligaatsetele anaeroobidele, kes suuremas osas on *Clostridium* perekonna liigid. Glükolüüsi rada kasutades võivad nad oksüdeerida suhkrut, amüloosi ja pektiini püruvaadiks. Raja lõpp-produktideks on võihape, butanool, isopropanool, CO₂ ja H₂ (Vandák *et al.*, 1995). Võihappelist käärimisprotsessi kasutati laialdaselt Esimese maailmasõja ajal atsetooni tootmiseks (Krabben, 2014). Praegu toodetakse võihappelise käärimise abil näiteks silo, kui pH on piisavalt madal (Kung & Shaver, 2001).

Glütserool-püruvaatkäärimine toimub samaaegselt etanoolkäärimisega suhkruvaeses keskkonnas ja selle produktina tekib glütserool (Joonis 5) (Scanes *et al.*, 1998). NAD (nikotiinamiid adeniin dinukleotiid) on koensüüm, mis vastutab erinevate ensüümide aktiivsuse eest ja see esineb kas redutseeritud (NADH) või oksüdeeritud vormis (NAD⁺) (Luttik *et al.*, 1998). Püruvaadi molekuli muutumisega etanooliks kaasneb NAD⁺ kasutamine ja seejärel selle puudus. Glütserool-püruvaadi raja olulisus seisneb NAD

taastamises. (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Protsessi võivad viia läbi osmotolerantsed pärmseened nagu *Candida stellata*, *Torulopsis magnoliae* ja *S. cerevisiae* (Ciani *et al.*, 2013). Glütserool-püruvaatkäärimise protsessis tekkivat glütserooli kasutatakse näiteks farmakoloogias solvendina ja see on oluline komponent silmatilkades (Mortensen *et al.*, 2017).



Joonis 5. Glütserool-püruvaat- ja etanoolkäärimise rajad (modifitseeritud Ciani *et al.*, 2013 põhjal).

Etanoolkäärimine (Joonis 5) on kõige levinum käärimisprotsess, mis viiakse läbi kasutades pärmseeni (nt. *S. cerevisiae*) või baktereid (nt. *Zymomonas mobilis*) (Yang *et al.*, 2007). Käärimisprotsessi käigus muudavad mikroobid suhkrud etanooliks, CO₂-ks ja teisteks kõrvalproduktideks.

Etanoolkäärimist kasutatakse näiteks õlle, siidri, veini ja leiva tootmisel. Suuremahulise etanooli tootmise probleemiks on protsessi efektiivsuse säilitamine, sest sünteesitud etanool pidurdab glükoosi transporti ja mikroorganismide metabolismi (Zhang *et al.*, 2015). *S. cerevisiae* on ekspluateeritavaim liik, kuna ta on vastupidav nii madala pH kui ka suure etanoolisisalduse suhtes.

1.6 Fermenteri kasutusala

Fermentereid on kasutatud erinevate produktide saamiseks rohkem kui 5000 aastat. Tuhandeid aastaid tagasi olid fermentatsioonitehnoloogiad vähe arenenud ja puudusid piisavad teadmised fermentatsiooniprotsessidest: fermenterid olid lihtsa ehitusega ning fermentatsioonitingimused ei olnud nii täpselt kontrollitud. (Hofmann, 1988). Tänapäeva teaduse kiire arenemine soodustab fermenterite kasutamise populaarsuse tõusu erinevates valdkondades: toiduainete tööstuses, farmaatsias, energia tootmises ning laborites, kus uuringud põhinevad rakukultuuri kasvatamisel (Erickson, 2019).

1.6.1 Alkohoolsete jookide ja äädika tootmine

Alkohoolseid jooke toodetakse kasutades etanoolkäärimist, mille käigus fermenteeritakse teravilju, puuvilju või teisi süsinikuallikaid (Olaniran *et al.*, 2017; Pretorius & Høj, 2005). Alkoholi tarbimine on laialdaselt levinud ja tegemist on suure tööstusharuga, mis vajab pidevat arendamist ja mikroorganismide uurimist. Uurimis- ja arendustegevuse läbiviimiseks kasutatakse tihti fermentereid. Kasutades Applikon *my-Control* fermenterit, on uuritud fermentatsiooniprotsessi kineetikat *Saccharomyces pastorianus* näitel. Brickwedde *et al.* (2017) uurisid, kuidas on võimalik suurendada laager tüüpi õlle väljatulekut. Uurimise tulemusena arendati *S. pastorianus* uus tüvi, mis oli võimeline lagundama maltotrioosi kiiremini ja suuremas koguses kui *wild-type* ehk metsiktüüpi *S. pastorianus*.

Õlut toodetakse enamasti teraviljadest (odrast või teraviljade segust) ning seda maitsestatakse humalaga (Bokulich & Bamforth, 2013). Teravilju idandatakse selleks, et saada linnased – ilma idandamiseta käärimisprotsess ei toimu, sest tähtsaks peab lagunema suhkruteks (maltoosiks ja dekstriiniks), millest saab toota etanooli (Gupta *et al.*, 2010). Valmis õlle omadusi mõjutavad mitmed faktorid: fermentatsiooni temperatuur, aeg ja pärmi tüvi – *Torulaspora delbrueckii* kasutatakse nisuõlle tootmiseks (Canonico *et al.*, 2016), *S. cerevisiae* ale tootmiseks (Olaniran *et al.*, 2017).

Veini toodetakse viinamarjadest või teistest puuviljadest. Traditsioonilisel viisil veini valmistamisel käärivad viinamarjades loomulikult esinevad pärmid (perekondade *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia* ja *Pichia* liigid) suhkrust etanooliks, kuid tööstuslikul tasemel lisatakse pärmid (nt. *Saccharomyces* liigid) eraldi (Pretorius & Høj, 2005). Valmis veini maitseomadused sõltuvad viinamarjade suhkrusisaldusest, fermentatsioonisaajast ja veini alkoholisisaldusest (Morata, 2018). Veinitootmise arendamiseks kasutatakse fermentereid, näiteks Morales *et al.* (2015) uurisid, kas on võimalik vähendada suhkrust katabolismi, et veini alkoholisisaldus väheneks. Kasutades Applikon MiniBio (*Applikon Biotechnology*, Holland) fermenterit, kasvatati *Metschnikowia pulcherrima* ja *S. cerevisiae* erineva hapnikusisalduse juures ja leiti, et mõlema pärmiliigi kasvatamine 25% lahustunud hapniku sisalduse juures mõjutas esimese 48 tunni jooksul fermentatsiooniprotsessi nii, et alkoholisisaldus vähenes, kuid äädikhape sisaldus suurenes.

Äädikat toodetakse etanoolist, kasutades perekond *Acetobacter* liike. Toorainena võib kasutada ükskõik, millist alkoholi sisaldava toodet (Lynch *et al.*, 2019). Protsessi käigus tekib aeroobses keskkonnas etanoolist äädikhape. Valmis äädika parameetrid sõltuvad keskkonnafaktoritest (temperatuur, pH, veeaktiivsus), toitainetest (süsinikuallikas) ja mikrobioloogilisest mitmekesisusest tooraines (Emire, 2012). Alternatiivne äädika tootmise viis on *Pleurotus pulmonarius*, *Volvariella volvacea* ja *S. cerevisiae* kasutamine, kus kasvukeskkonnana kasutatakse 10% glükoosi lahust (Mat Isham *et al.*, 2019).

1.6.2 Hapupiimatoodete tootmine

Hapupiimatoodete omadused sõltuvad tootmise käigus kasutatavatest mikroorganismidest (Tabel 2). Hapupiimatooteid toodetakse kasutades kas ainult LAB (*lactic acid bacteria*, ingl.k ehk piimhappebakterid) (jogurt, pett, naturaalselt fermenteeritud piim jne) või korraga nii LAB kui ka pärme (keefir, kumõss) (Karelson *et al.*, 2001).

Tabel 2. Põhilised mikroorganismid hapupiimatootedes

Toode	Mikroorganismid	Allikas
Juust	<ul style="list-style-type: none">• <i>Lactococcus</i> sp.;• <i>Leuconostoc</i> sp.;• <i>Lactobacillus</i> spp.;• <i>Entrococcus</i> spp.;• <i>Debaryomyces</i> sp.;• <i>Penicillium</i> sp.	(Quigley <i>et al.</i> , 2011)
Jogurt	<ul style="list-style-type: none">• <i>Lactobacillus</i> spp.;• <i>Bifidobacterium</i> spp.;• <i>Streptococcus</i> spp.	(Tamime & Robinson, 1999)
Keefir	<ul style="list-style-type: none">• <i>Lactococcus</i> sp.;• <i>Leuconostoc</i> sp.;• <i>Lactobacillus</i> spp.;• <i>Candida</i> sp.;• <i>Saccharomyces</i> spp.	(Bernardeau <i>et al.</i> , 2006)
<i>Dahi</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Lactococcus</i> sp.;• <i>Leuconostoc</i> sp.;• <i>Lactobacillus</i> spp.;• <i>Streptococcus</i> spp.;• <i>Weissella</i> sp.;• <i>Saccharomycopsis</i> sp.;• <i>Candida</i> sp.	(Harun-ur-Rashid <i>et al.</i> , 2007)
Kumõss	<ul style="list-style-type: none">• <i>Lactobacillus</i> spp.;• <i>Saccharomyces</i> spp.	(Wu <i>et al.</i> , 2009)

Käärimine pikendab piimatoodete säilimisaega ning protsessi käigus moodustunud keemilised ühendid (nt. piimhape) annavad tootele omapärase maitse (Anagnostopoulos & Tsaltas, 2019).

Hapupiimatoodete tootmist uuritakse ja parandatakse ka tänapäeval. Varasemalt on kirjeldatud, kuidas kasutades 3 L ez-Control (*Applikon Biotechnology*, Holland) fermenterit viidi läbi katseseeriad, et uurida segamise mõju jogurti tootmises. Leiti, et segamine suurendab fermentatsiooniprotsessi ajal *Lactobacillus bulgaricus* rakkude arvu, kuid mõjutab negatiivselt valmistoode sensoorseid omadusi (Aguirre-Ezkauriatza *et al.*, 2008).

1.6.3 Vitamiinide, ensüümide ja pigmentide tootmine

Vitamiinid on erineva keemilise koostisega asendamatud toitained, mida on vaja metaboolsetes protsessides väga väikestes kogustes (Combs & McClung, 2017). Tänapäeval toodetakse paljud vitamiinid (nt. A, D₃, E, K ja B rühma vitamiinid) ja pigmendid (nt.

beetakaroteen) kasutades ainult bioreaktoreid. Tootmise jaoks kasutatakse rohelist (nt. *Dunaliella salina*, *D. bardawil*) ja siniseid (nt. *Spirulina*) mikrovetikaid, seeni (nt. *Phaffia rhodozyma*, *S. cerevisiae*) ja baktereid (nt. *Flavobacterium meningosepticum*) (Vandamme, 1992).

Kasutades bioreaktoreid, toodetakse ka ensüüme suurtes mastaapides, kuna ensüümid on leidnud viimasel ajal rakendust paljudes valdkondades. Ensüüme kasutatakse pagaritoodete valmistamisel (amülaas, proteaas, lipaas jne) (Miguel *et al.*, 2013), jookide tootmisel (amülaas, tsellulaas jne) (Uzuner & Cekmecelioglu, 2019), piimatoodete valmistamisel (katalaas, glükoosoksüdaas, laktopüroksüdaas jne) (Khan & Selamoglu, 2020), tärklise töötlemisel (amülaas, glükoamülaas jne) (Creative Enzymes, 2018) ja ka toidu säilitusainena (katalaas, glükoosoksüdaas, lipaas jne) (Raveendran *et al.*, 2018).

1.6.4 Biokütuse tootmine

Fermentatsiooniprotsesside kasutamine võimaldab saada kütust võrreldes fossiilkütusega odavamalt ja ökoloogilisemalt. Fermenteerimise teel saadud kütus võib olla kas vedel (bioetanool, biobutanool) või gaasiline (biogaas, biovesinik). (Demirbas, 2009)

Bioetanooli saadakse erinevatest taimse päritoluga toorainetest. Tähtsaks või tselluloos lagunevad heksoosiks ja pentoosiks, mille järel neid kääratakse, et saada etanool. Ettevõtetes kasutatakse bioetanooli tootmiseks *S. cerevisiae* ja *Zymomonas* liike (nt. *Z. mobilis*). (Liu *et al.*, 2008)

Butanooli tootmiseks fermenteeritakse suhkru- ja tärkliserikast toorainet, kasutades *Clostridium* liike. Tänapäeval esineb tootmise efektiivsusega probleeme, mille lahendamiseks arendatakse uusi mikroobiliike. (Xue *et al.*, 2019)

Biovesinik on puhtaim biokütus, kuna kütuse kasutamisel saadakse lõpp-produktina vesi, ilma süsihappegaasi moodustumiseta (Vignais & Billoud, 2007). Biovesinikku toodetakse erinevatest suhkru- või tärkliserikastest tootmisjääkidest, aga ka põllumajanduse kõrvalsaadustest. Fermentatsiooni võivad läbi viia *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* ja *Clostridium butyricum*. (Hallenbeck & Ghosh, 2009)

Biogaas on metaani ja süsihappegaasi segu, mida saadakse orgaaniliste jääkide lagunemise käigus (Youssef *et al.*, 2007). Tootmisprotsess koosneb mitmetest etappidest, milles osalevad erinevad mikroorganismid: *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Fusobacterium* jne. Substraadiks on sageli põllumajanduslikud jäägid, loomade väljaheited ja reovesi (He *et al.*, 2019).

1.6.5 Taime- ja loomarakkude kasvatamine

Fermentereid kasutatakse lisaks fermentatsiooniprotsesside läbiviimisele ka rakukultuuride kasvatamiseks. Taimerakkude kasvatamine on protsess, mis huvitab paljusid biotehnoloogia valdkonna teadlasi. Taimerakud on võimelised tootma ainulaadseid ühendeid (alkaloidid, antotsüaanid), mida ei suuda sünteesida bakterid ega loomarakud. Taimekultuurist saadud steroide ja alkaloidide kasutatakse pigmentidena või farmaatsias. Lisaks on võimalik kasutada taimerakke, et sünteesida soovitud valke ja saada kuntslikke seemneid põllumajanduse jaoks. (Furusaki & Takeda, 2017)

Loomarakkude kasvatamine fermenterites mängib olulist rolli farmaatsiatoodete tootmises, rakuteraapias ja ka koetehnoloogias (Fenge & Lüllau, 2005). Fermenterites kasvatatakse edukalt mitmesuguseid loomarakke, mahtudes kuni 10 000 L: Hiina hamstri munasarjarakke (CHO), beebi hamstri neeru rakke (BHK 21), inimese neeru embrüonaalseid rakke (HEK 293) (Taya & Kino-oka, 2011).

1.7 Mikroorganismide kasvutingimused fermenteris

Fermenter on süsteem, kus toimuvad erinevad bioloogilised protsessid nagu mikroorganismide kasv, ensümaatilised ja keemilised reaktsioonid (Erickson, 2019). Fermenteri sisekeskkonna tingimused peavad olema optimaalsed, et ülalmainitud reaktsioonid toimuksid efektiivselt. Optimaalsete tingimuste uurimine, sobiliku fermenteri tüübi ja konfiguratsiooni leidmine on üliolulised, kuna neil on suurim mõju rakkude kasvule, metabolismile ja erinevate ühendite tootmisele. Kaasaegsed fermenterid võimaldavad kasutajal kontrollida kogu protsessi ajal aereerimist, pH-d, temperatuuri, segamiskiirust ja toitainete lisamist (Zhong, 2011).

Temperatuur on üks olulisematest parameetritest fermentatsiooniprotsessi läbiviimisel. Mikroorganisme klassifitseeritakse sageli vastavalt optimaalsele kasvutemperatuurile: termofiilid (>50 °C), mesofiilid (20-50 °C) või psührofiilid (<20 °C). Optimaalsest temperatuurist madalama temperatuuri valik põhjustab kasvukiiruse langust. Liiga kõrge temperatuuri valikut aga on iseloomustatud rakkude surma ning produkti väljatuleku ja kvaliteedi langusega. (Shuler *et al.*, 2017)

Enamus mikroorganisme kasvab kõige edukamalt pH vahemikus 5-7. Fermentatsiooniprotsessi käigus võib pH muutuda, kuna rakkude kasvuga kaasneb substradi tarbimine ning metaboliitide vabanemine söötme sisse. (Zhong, 2011) Metabolismi käigus assimileerivad rakud aktiivselt näiteks lämmastikku, mis omakorda suurendab vesinikioonide hulka. Ühe mooli assimileeritud lämmastiku asemel tekib üks mool vesinikioone, mis põhjustavad pH langust. (Castrillo *et al.*, 1995) Looma rakukultuurid on pH muutuse suhtes mikroorganismidest tundlikumad, mistõttu nõuab nende kasvatamine pidevat ja täpset pH kontrolli, mis aga mikroorganismide kasvatamise puhul ei ole tavaliselt nii oluline (Zhong, 2011).

Segamise eesmärk on tagada toitainete ühtlane jaotumine söötmes ning takistada toksiliste metaboliitide akumulereerumist. Temperatuuri, pH ja substratide kontsentratsiooni kontrolli täpsus sõltuvad õigesti sätestatud segamise kiirusest ja intensiivsusest. (Oniscu *et al.*, 2001)

Aeroobse kultuuri kasvatamiseks on vaja tagada ühtlane aereerimine. Sageli on hapniku ühtlane jaotamine probleemiks, kuna võrreldes suurema osaga toitainetest, mis on vajalikud rakkude kasvuks ja on vees lahustavad, on hapnik ainult osaliselt lahustuv. Hapniku puudujääk takistab rakkude paljunemist ja produkti moodustamist. (Ahlert, 1996)

Tänapäeval on suurenenud probiootikume sisaldavate toodete populaarsus (Sreekumar *et al.*, 2010) ning tänu sellele on LAB kultiveerimistehnoloogia oluliselt arenenud ja paranenud. Suurim probleem piimhappelise käärimise ajal seisneb selles, et piimhape, mis on üks fermentatsiooniprotsessi produktidest, inhibeerib LAB paljunemist, kuna kasvukeskkond muutub liiga happeliseks (Abdel-Rahman *et al.*, 2013). Antud probleemi prooviti lahendada kasutades *fed-batch* fermentatsioonistrateegiat ja pH kontrollimist (Lee *et al.*, 2007), kuid Cui *et al.* (2016) pH kontrollkatsete tulemused näitasid meetodi ebaefektiivsust. Tabel 3 on näidatud teaduskirjanduses varasemalt esitatud optimaalsed tingimused erinevate LAB kasvatamiseks fermenteris.

Tabel 3. Optimaalsed tingimused piimhappebakterite kasvatamiseks

Mikroob	t, °C	pH	Segamiskiirus, rpm	Söötmekoostis, g/l	Autorid
<i>Lactobacillus plantarum</i>	34-42	5,2-6,4	200	<ul style="list-style-type: none"> • MgSO₄·7H₂O, 0,2; • MnSO₄·H₂O, 0,04; • peptoon, 15; • pärmiekstrakt, 5; • laktoos, 140 	(Brinques <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lactobacillus casei</i>	35-38	5,6-6,4	200	<ul style="list-style-type: none"> • MgSO₄·7H₂O, 0,2; • MnSO₄·4H₂O, 0,05; • naatriumatsetaat, 0,5; • KH₂PO₄, 1,5; • glükoos, 20; • pärmiekstrakt, 4 	(Hujanen <i>et al.</i> , 2001)
<i>Lactobacillus brevis</i>	30	5,5-5,8	200	<ul style="list-style-type: none"> • MnSO₄·4H₂O, 0,18; • KH₂PO₄, 3,9; • glükoos, 35; • fruktoos, 10; • pärmiekstrakt, 15; • Tween-80, 1,0 	(Jung & Lovitt, 2010)
<i>Bifidobacterium longum</i>	37	5,8	180	<ul style="list-style-type: none"> • MgSO₄·7H₂O, 1,4; • KH₂PO₄, 3,9; • (NH₄)₂SO₄, 10; • glükoos, 10; • fruktoos, 5; • pärmiekstrakt, 30; 	
<i>Oenococcus oeni</i>	28	4,8	100	<ul style="list-style-type: none"> • MgSO₄·7H₂O, 0,5; • MnSO₄·4H₂O, 0,05; • glükoos, 35; • fruktoos, 10; • pärmiekstrakt, 15; • (NH₄)₂SO₄, 0,5; • KH₂PO₄, 3,9; • naatriumatsetaat, 8,8; • L-tsisteiin, 1 	

Suurim probleem pärmseente kasvatamisel on toksiliste kõrvalproduktide (etanooli ja atsetetaldehüüdi) teke (Bauer *et al.*, 1999). Enamasti puututakse probleemiga kokku siis, kui rakumassi toodetakse suurtes kogustes (Hensing *et al.*, 1995; van Dijken *et al.*, 1993). Tabel 4 on toodud optimaalsed tingimused pärmseente kasvatamiseks fermenteris erinevate kirjandusallikate põhjal.

Tabel 4. Optimaalsed tingimused pärmseente kasvatamiseks

Mikroob	t, °C	pH	Segamiskiirus, rpm	Söötme koostis, g/l	Autorid
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30-40	4-6	200	<ul style="list-style-type: none">• KH₂PO₄, 10;• (NH₄)₂SO₄, 4;• MgSO₄, 0,8;• pärmiekstrakt, 2;• glükoos, 10	(Kopsahelis <i>et al.</i> , 2012; Narendranath & Power, 2005; Salari & Salari, 2017)
<i>Torula</i> sp.	34	5,5	250	<ul style="list-style-type: none">• Sahharoos, 300;• pärmiekstrakt, 10;• KH₂PO₄, 3;• CuSO₄·5H₂O, 0,01;	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	30	5	200	<ul style="list-style-type: none">• KH₂PO₄, 3;• (NH₄)₂SO₄, 5;• MgSO₄·7H₂O, 0,5;• glükoos, 10	(Fonseca <i>et al.</i> , 2007)
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	30	4-6	300-370	<ul style="list-style-type: none">• Ksüloos, 100;• (NH₄)₂SO₄, 3;• MgSO₄, 0,1;• K₂HPO₄, 6;• Na₂HPO₄, 3;• pärmiekstrakt, 1;• CaCl₂·2H₂O, 0,147;• sidrunhape, 0,0069;• FeCl₃, 0,01;• MnSO₄·H₂O, 0,0034;• ZnSO₄·7H₂O, 0,0043;• CuSO₄·5H₂O, 0,00025	(Pappu & Gummadi, 2016)

Tänapäeval uuritakse väga aktiivselt nii konventsionaalsete liikide kui ka uute tüvede kasvuks optimaalseid tingimusi: uuritakse erinevate fermenteri parameetrite mõju rakkude lõplikule arvule ning lõpp-produkti kogusele. Kasutades väiksemahulistes fermenterites mikroobikultuuride uurimistest saadud teadmisi, on võimalik edukalt arendada suuremahulist tootmist.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1 Eesmärk ja ülesanded

Bakalaureusetöö eesmärk oli anda ülevaade fermenteri tööpõhimõttest ja kasutamisest ning eksperimentaalse töö alusel koostada Applikon *my-Control* mehaanilise segamisega fermenteri (*Applikon Biotechnology*, Holland) kasutusjuhend.

Bakalureusetöö ülesanded:

1. tutvuda erinevate teadusartiklitega ning koostada ülevaade fermenterite ehitusest, tüüpidest, fermentatsioonistrateegiatest, tuua välja fermenterite põhilised kasutusala ja kasutamise kitsaskohad;
2. seadme töö stabiilsuse hindamiseks planeerida ja teostada katsed pärmseentega *Saccharomyces pastorianus* ja *Saccharomyces bayanus*: määrata rakkude arv pärast erineva segamiskiiruse valimist ning jälgida pH muutust fermentatsiooniprotsessi käigus;
3. koostada Applikon *my-Control* fermenteri kasutusjuhend.

2.2 Mikroobikultuuride ettevalmistamine

EMÜ Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia laboris asuva Applikon *my-Control* mehaanilise segamisega, autoklaavitava, 2 L fermenteri (*Applikon Biotechnology*, Holland) töösse rakendamiseks ning selle tööpõhimõtete ja kasutusvõimaluste väljaselgitamiseks kasutati pärmseeni *Saccharomyces pastorianus* (*SafLager W-34/70*, *Fermentis*, Prantsusmaa) ja *Saccharomyces bayanus* (*Lalvin EC-1118*, *Lallemand Inc*, Kanada).

Katsete läbiviimiseks vajalik pärmide kogus arvutati vastavalt pakenditel olevatele juhiste (Tabel 5).

Tabel 5. Katsete läbiviimisel kasutatud pärmide kogused

Pärmikultuur	Rakkude kogus pakis, rakku/g	Soovituslik kogus fermenteerimiseks, g/L	Fermenterisse lisatud kogus, g	Fermenterisse lisatud rakkude kogus, rakku/L
<i>S. pastorianus</i>	6×10^9	0,8-1	0,8	4.8×10^9
<i>S. bayanus</i>	5×10^6	0,25	0,25	1.25×10^6

Pärmirakkude aktiveerimiseks lisati neile 10 mL destilleeritud vett ning inkubeeriti 1 tund temperatuuril 25 °C. Pärmes loksutati käsitsi iga 15 minuti tagant.

2.3 Kasvusöötme ettevalmistamine

Pärmseente kasvusöötmena kasutati YPD (*Yeast Extract–Peptone–Dextrose*, ingl. k.) vedelsöödet (bakterioloogiline peptoon 20 g/L, glükoos 20 g/L, pärmiekstrakt 10 g/L; *Sigma-Aldrich*, Saksamaa). YPD söötme pulber segati 1 L destilleeritud veega ning kuumutati kuni kuivkomponentide lahustumiseni. Söötmesse lisati 1 mL vahustamisvastast ainet (*VinoFerm anti-foam, Brouwland*, Belgia).

2.4 Fermenteri ettevalmistamine

Applikon *my-Control* fermenterisse valati ettevalmistatud YPD vedelsööde. Fermenter suleti kaanega, keerates sellel vastakuti olevaid mutreid samaaegselt. Fermenteri kaanel paiknevate otsikute külge ühendati vastavalt juhendile (Lisa 1. Applikon *my-Control* fermenteri kasutusjuhend) spargeri ja harvesteri voolikud. Voolikute otsad ja kaanel paiknevad lahtised avad (kolmikühendus, soojusvaheti avad) suleti vati ja alumiiniumfooliumist moodustatud nõ. korkidega. Fermenterisse asetati biomassi andur, mille teine ots suleti metallkaanega. Vastavalt masina juhendile (Lisa 1. Applikon *my-Control* fermenteri kasutusjuhend) kalibreeriti pH andur kasutades standardlahuseid (pH 4 ja 7). Andurid (pH, dO₂ ja redoksreaktsioon) paigaldati fermenterisse läbi kaane ning keerati kinni. Kondensaatori ehitusse kuuluva õhu väljalaskeava külge kinnitati filtriga voolik.

Fermenter koos YPD söötmelega autoklaaviti (*Nüve OT 90L, Nüve*, Türgi) 15 minutit temperatuuril 121 °C. Pärast autoklaavimist võeti fermenter autoklaavist välja ja asetati töölaual kontrolleriga (*Applikon my-Control, Applikon Biotechnology*, Holland) ühendatud

kaalule. Voolikute küljest eemaldati korgid ja klambrid. Kondensaator ja soojusvaheti ühendati veevoolikute abil vastavalt juhendile (Lisa 1. Applikon *my-Control* fermenteri kasutusjuhend) veekonsooliga (*Applikon Biotechnology*, Holland). Spargeri voolik ning pH, dO₂ ja redoksreaktsiooni andurid ühendati *my-Control* kontrolloriga, biomassi andur ühendati biomassi kontrolloriga (*proBE 3000*, *BugLab LLC*, Ameerika Ühendriigid). Fermenteri anuma ümber pandi soojusvahetussärk, termomeetri ava sisse lisati vesi ja sellesse asetati termomeeter. Seejärel paigaldati seguri peale mootor. Kasutades tarkvara, sätestati pärmikultuurile sobilik kasvutemperatuur, seguri kiirus ja termoregulatsiooni parameetrid.

2.5 Pärmide kasvatamine

Pärmide *S. pastorianus* ja *S. bayanus* kasvatamiseks valiti kasvutemperatuur tootja poolt etteantud optimaalsete väärtuste põhjal (vastavalt 15 °C ja 26 °C). Aeratsiooni eesmärgil lisati fermenterisse õhku 1 vvm (L/L/minut).

Mõlemat kultuuri kasvatati kolmes korduses, kasutades kolme erinevat segamiskiirust: 100, 200 või 300 rpm (rootoripööret minutis). Kokku teostati 18 fermenteerimiskatset, millest iga katse kestis 64 tundi. Rakkude arvu, kaalu ja pH näitude muutused registreeriti iga 8 tunni järel *Chrome Remote Desktop* abil.

2.6 Statistiline analüüs

Eksperimentide käigus kogutud tulemuste analüüsimiseks kasutati programmi *Microsoft Office Excel*. Katsetulemuste omavahelise erinevuse hindamiseks arutati kolmest kordusest aritmeetiline keskmine ning leiti standardhälve. Rakkude arvud tabelites ja graafikutel on esitatud logaritmilisel kujul.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 *Saccharomyces pastorianus* rakkude arvu muutus

Pärmirakkude üldarvu muutust hinnati biomassianduriga (*proBE 3000*, BugLab LLC, Ameerika Ühendriigid) eesmärgiga saada teada, kuidas mõjutab erinev seguri kiirus mikroobide kasvu fermenteris.

Tabel 6 on toodud *S. pastorianus*'e kolme katse keskmised rakkude arvud koos standardhälbega seguri kiirustel 100, 200 ja 300 rpm. On näha, et pärmid kasvasid terve katseperioodi jooksul. Pärmirakkude arv muutus kõige enam, kui kasutati segamiskiirust 200 rpm: 9,68 log rakku/L kuni $10,58 \pm 0,08$ log rakku/L. Segamiskiirused 100 rpm ja 300 rpm võimaldasid rakkude arvu kasvu umbes sama koguseni, vastavalt: $10,57 \pm 0,02$ log rakku/L ja $10,54 \pm 0,01$ log rakku/L.

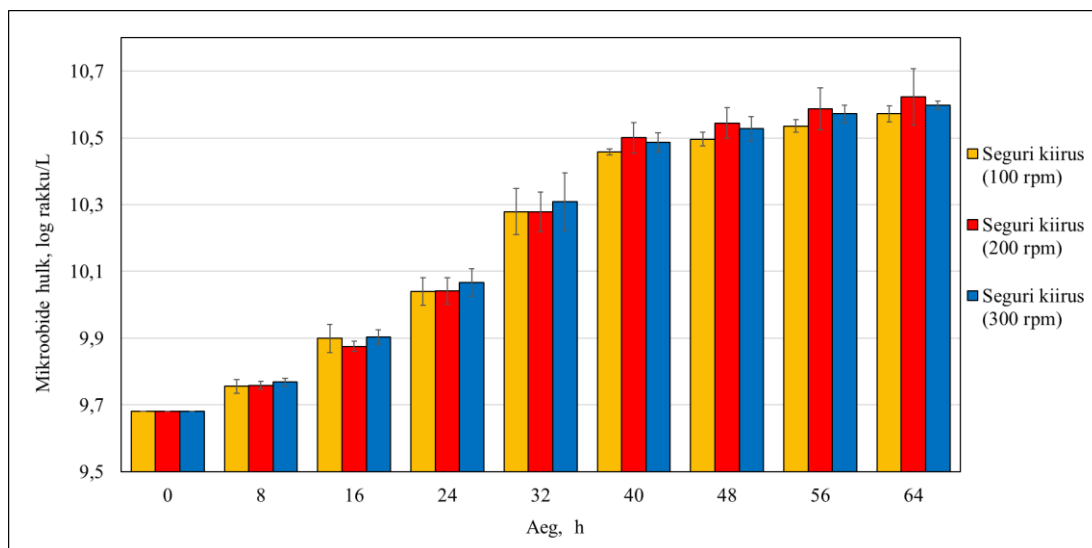
Tabel 6. *Saccharomyces pastorianus*'e rakkude arvu muutus fermenteris erinevatel seguri kiirustel

Seguri kiirus (rpm)	<i>S. pastorianus</i> 'e rakkude arvu muutus 64 h jooksul log rakku/l (standardhälve)								
	0	8	16	24	32	40	48	56	64
100	9,68	9,76 (0,02)	9,90 (0,04)	10,04 (0,04)	10,28 (0,07)	10,46 (0,01)	10,50 (0,02)	10,54 (0,02)	10,57 (0,02)
200	9,68	9,73 (0,01)	9,85 (0,02)	9,99 (0,04)	10,20 (0,06)	10,45 (0,05)	10,48 (0,05)	10,53 (0,06)	10,58 (0,08)
300	9,68	9,77 (0,01)	9,91 (0,02)	10,04 (0,04)	10,28 (0,09)	10,46 (0,03)	10,49 (0,04)	10,52 (0,03)	10,54 (0,01)

Andmetest on võimalik järeldada, et valitud tingimustel (aeratsioon 1 vvm, muutuv pH, temperatuur 15 °C) sobisid *S. pastorianus* pärm kasvatamiseks kõik segamiskiirused (100-300 rpm), aga võttes arvesse katsete arvulisi tulemusi on võimalik eeldada, et 200 rpm on nendest segamiskiirusest kõige sobivam. Käesoleva töö tulemus on kooskõlas kirjanduse andmetega, kus tuvastati, et *S. cerevisiae* jaoks optimaalne segamiskiiruse vahemik on 180-250 rpm (Cripwell *et al.*, 2019; Salari & Salari, 2017; Shafaghat *et al.*, 2010).

Pärmide kasv ei saa toimuda pidevalt sama kiirusega. Nagu teistel mikroorganismidel, on ka pärmidel erinevad kasvufaasid. Pärast rakkude lisamist söötmesse algab esimene kasvufaas ehk lag-faas. Lag-faasis toimub rakkude kohanemine uute tingimustega ja metaboliitide sünteesimine, kuid rakud aktiivselt ei paljune. Teine faas – logaritmiline ehk eksponentsiaalne kasvufaas on faas, kus toimub rakkude intensiivne paljunemine. Logaritmilise faasi pikkus sõltub toitainete ning kõrvalproduktide kontsentratsioonist. Faasi lõpus väheneb jagunevate rakkude arv ja toimub üleminek statsionaarsesse kasvufaasi. Statsionaarses kasvufaasis on rakkude paljunemiskiirus sarnane nende suremiskiirusele, ehk rakkude arv ajas enam eriti ei muutu. Rakud võivad olla statsionaarses faasis pikka aega, kuni tingimuste muutumiseni. Viimane faas on surmafaas, mida iseloomustab rakkude arvu vähenemine. (O’Connor, 2021)

Selleks, et visuaalselt paremini hinnata, kas ja kuidas toimub kasvufaaside üleminek pärmil *S. pastorianus*, koostati graafik (Joonis 6) kasutades Tabel 6 olevat informatsiooni.



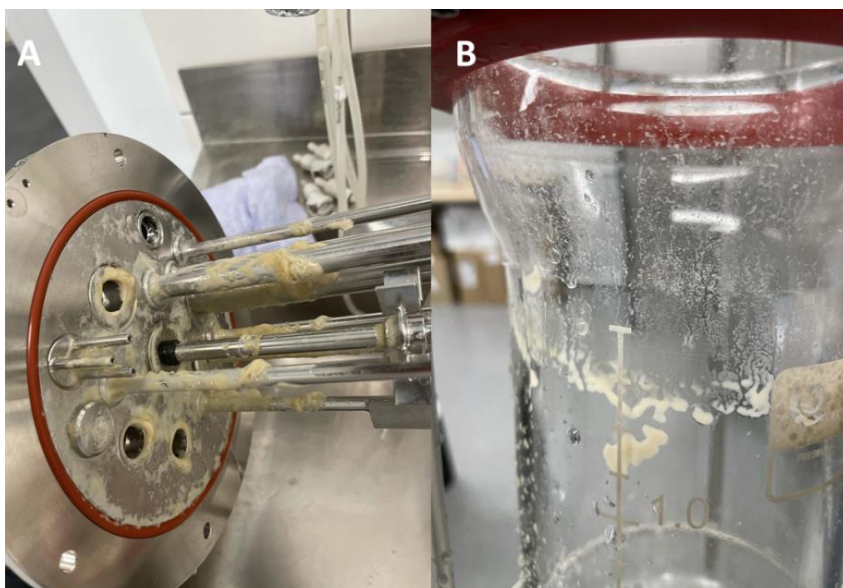
Joonis 6. *Saccharomyces pastorianus*’e keskmine rakkude arvu muutus fermenteri seguri erinevate kiiruste kasutamisel.

Graafikult on näha, et esimese 8 tunni jooksul mikroobide hulk eriti ei muutunud. Arvatavasti oli pärmikultuur veel lag-faasis. Alates 8. tunnist pärast pärmide lisamist söötmesse kuni 40. tunnini toimus aktiivne pärmirakkude hulga suurenemine. Sellest võib järeldada, et ajavahemikus 8-40 tundi toimus logaritmiline ehk eksponentsiaalne kasvufaas.

Ajavahemikus 40-64 tundi, muutus graafik platoole sarnaseks, mis tähendab, et mikroobide hulk eriti enam ei muutunud ja *S. pastorianus* rakud olid statsionaarses kasvufaasis.

3.2 *Saccharomyces bayanus* rakkude arvu muutus

S. bayanus üldarvu muutust jälgiti sarnaselt *S. pastorianus* pärmile. Ootamatult selgusid katsete ajal aga teatud eripärad. Märkati, et andurite, seguri ja teiste metallist osade pinnad ning klaasanum olid kaetud biokilega (Joonis 7). Teadusartiklite uurimisel selgus, et *S. bayanus* on biokilet moodustav pärm (Imura *et al.*, 1980), mis tähendab, et pärmide rakud kleepuvad omavahel kokku, raskendades seejuures ka biomassi anduri kasutamist. Biomassi anduriga tulemuste registreerimiseks peavad aga pärmide rakud olema söötmega ühtlaselt segatud, et neid oleks võimalik üksteisest kergesti eristada.



Joonis 7. Biokile moodustumine *S. bayanus* pärmil kasvatamisel fermenteris. A: biokile metallosadel; B: biokile klaasanuma peal.

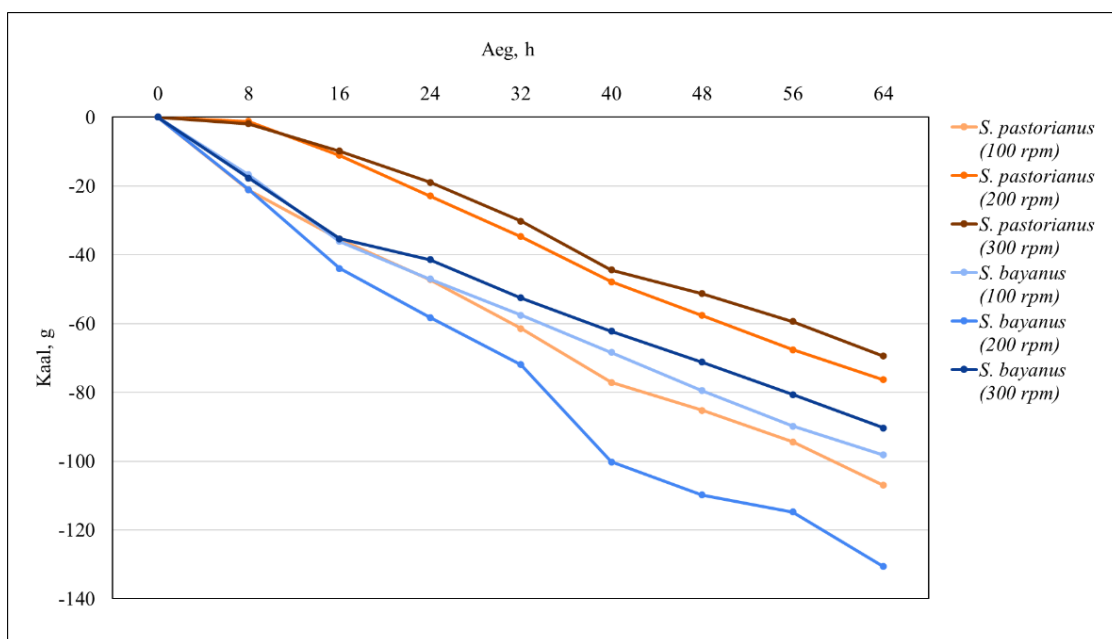
S. bayanus'e rakkude arvu muutused fermenteri seguri kiiruste 100, 200 ja 300 rpm kasutamisel on toodud Tabel 7. Standardhälve katse tulemuste vahel on suur, kuna biokile moodustumine takistas korrektset tulemuste registreerimist biomassi anduriga. Esialgne rakkude arv oli 6,10 log rakku/L. Lõplik rakkude arv oli 100 rpm kasutamisel $7,09 \pm 0,36$ log rakku/L, 200 rpm juures $6,88 \pm 0,33$ log rakku/L ja 300 rpm juures $6,97 \pm 0,37$ log

rakku/L. Saadud andmetest on raske järeldada, kuidas segamiskiirus pärmi kasvukiirust mõjutas.

Tabel 7. *Saccharomyces bayanus*'e rakkude arvu muutus fermenteris erinevatel seguri kiirustel

Seguri kiirus (rpm)	<i>S. pastorianus</i> 'e rakkude arvu muutus 64 h jooksul log rakku/l (standardhälve)								
	0	8	16	24	32	40	48	56	64
100	6,10	6,39 (0,13)	6,91 (0,32)	6,95 (0,34)	7,01 (0,35)	7,04 (0,35)	7,04 (0,33)	7,06 (0,33)	7,09 (0,36)
200	6,10	6,25 (0,11)	6,67 (0,27)	6,74 (0,28)	6,78 (0,29)	6,82 (0,30)	6,83 (0,29)	6,86 (0,31)	6,88 (0,33)
300	6,10	6,27 (0,12)	6,67 (0,30)	6,81 (0,36)	6,86 (0,39)	6,88 (0,40)	6,93 (0,42)	6,94 (0,39)	6,97 (0,37)

Arvestades ülalmainitud raskusi fermenteris *S. bayanus*'e kasvatamisega, täpsemalt biokile moodustumisega, otsustati kasutada pärmide kasvuprotsessi jälgimiseks rakkude kaalu muutust. Kaalu jälgimine võimaldab tuvastada biomassi suurenemist kasvuprotsessi ajal. Joonis 8 on näidatud kaalu muutus *S. pastorianus*'e ja *S. bayanus*'e kasvatamisel kogu fermenteerimisperioodi jooksul.



Joonis 8. Pärmide kaalu muutus fermenteris erinevate segamiskiiruste juures 64 h jooksul.

Kaalu näitajaid jälgiti mõlema pärmil iga segamiskiiruse kasutamisel ainult ühes katses katseseeria kohta, mille tõttu andmed on esitatud ilma standardhälbeta. Sel juhul on võimalik hinnata ainult kasvutrendi. Kaalu jälgides tuvastati, et *S. bayanus*'e kaalu muutuse trend oli sarnane *S. pastorianus* pärmile. Lisaks märgati, et *S. bayanus*'e kaal muutus suuremal määral, millest võib eeldada, et kasv toimus aktiivsemalt.

Joonis 8 järelduste põhjal võib oletada, et kasvutingimused olid sobilikud *S. bayanus* paljunemiseks ning rakkude arvu määramisega esinenud raskused olid tugevalt seotud biokile moodustamisega, mille tagajärjel biomassi andur ei suutnud õigesti mõõtmisi teostada. Kaalu põhjal võib aga järeldada, et kasutades segamiskiirust 200 rpm, saavutati *S. bayanus* rakkude suurim kaalu muutus ja tõenäoliselt suurim rakkude arv. Tulevikus saab teostada kontrollkatsed, et selgitada välja *S. bayanus*'e optimaalne segamiskiirus, kuid rakkude arvu muutuse hindamiseks võiks kasutada biomassi anduri asemel külvamismeetodit. Mehaanilise segamisega fermenter ei ole sobilik *S. bayanus*'e kasvatamiseks pärmile iseloomuliku biokile moodustamise omaduse tõttu.

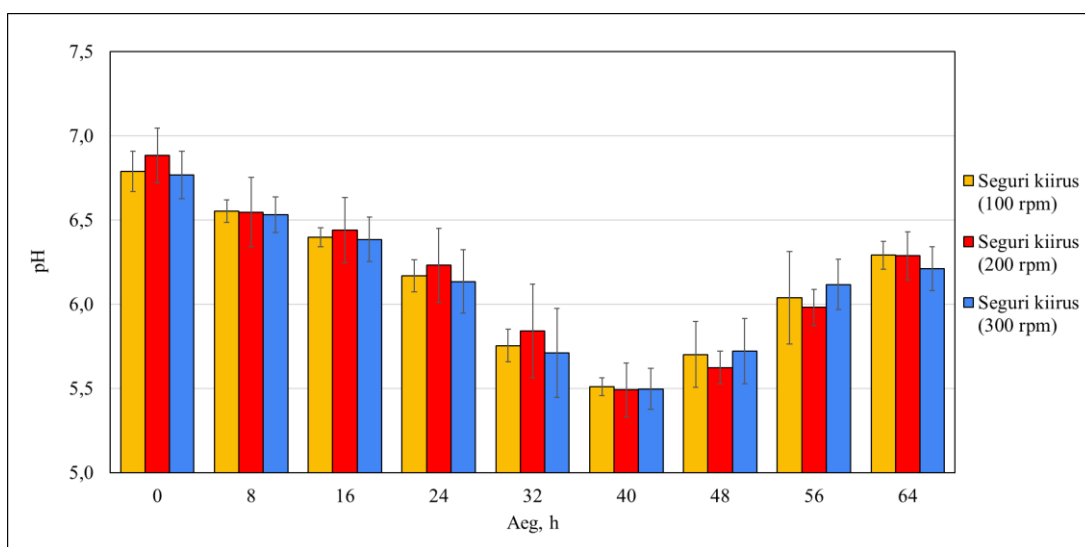
3.3 pH muutus pärmide kasvulahuses

pH on üks olulisematest parameetritest, mis mõjutab fermentatsiooniprotsessi efektiivsust ja pärmide kasvukiirust. Igal pärmil on kasvuks optimaalne pH vahemik, näiteks *S. cerevisiae* puhul võib pH varieeruda 4-6 vahel, kuid see on tugevas seoses temperatuuri, hapniku olemasolu ja pärmiliiigiga (Narendranath & Power, 2005). Käesolevas töös ei olnud püsiva pH hoidmine eesmärgiks, mistõttu algne pH sõltus söötme pH-st ($6,5 \pm 0,3$) ja spontaansed muutused olid seotud pärmil metabolismi muutustega erinevates kasvufaasides.

Töös selgus, et *S. pastorianus*'e logaritmiline kasvufaas toimus ajavahemikus 8-40 tundi, mis tähendab, et selle ajavahemiku jooksul toimus aktiivne rakkude paljunemine ja fermentatsiooniproductide süntees ning sellega kaasnes pH väärtuse langemine (Joonis 9). Minimaalne pH väärtus tuvastati 40 tundi pärast pärmil lisamist söötmesse. Erinevate segamiskiiruste kasutamisel oli kõigi kolme katseseeria minimaalne pH väärtus keskmiselt $5,5 \pm 0,1$. Saadud tendents on kooskõlas kirjanduse andmetega. Teadusartiklitest saadi teada, et fermentatsiooniprotsessi algust on iseloomustatud pH langemisega. pH langust põhjustab aktiivne püroviinmarihappe teke glükoosi lagunemise tagajärjel (Huang *et al.*, 2015). Lisaks

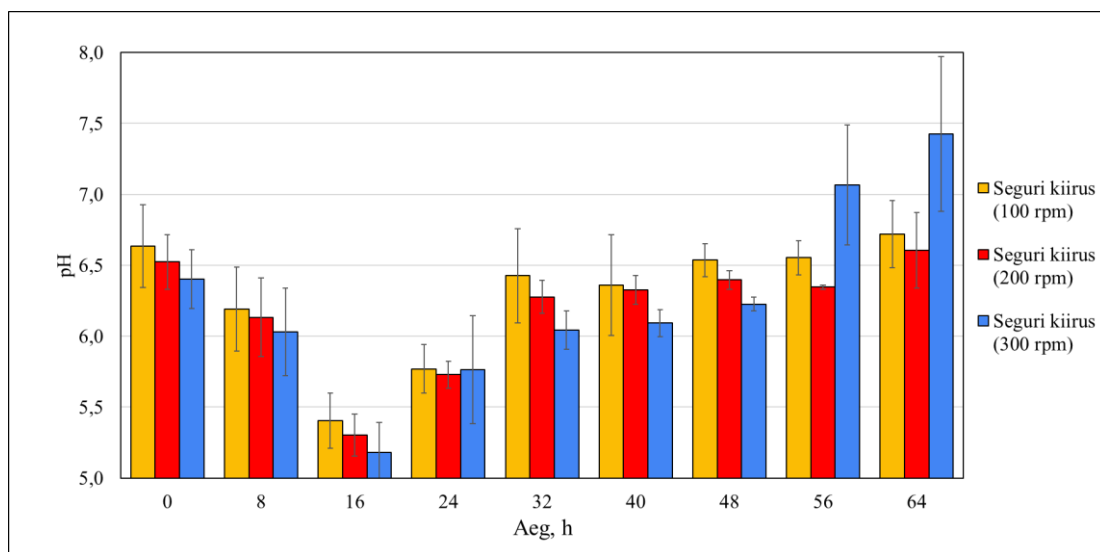
sünteesitakse paralleelselt püroviinmarihappega teisi happeid (nt. äädik-, piim-, merevaikhape), kuid sünteesitud hapete kogus (ning ka pH langemise määr) sõltub suurel määral valitud pärmide tüvest ning fermentatsioonitingimustest (Coote & Kirsop, 1976). Olulisimaks põhjuseks pH langemisel fermentatsiooniprotsessi alguses peetakse vesinikioonide teket. Aktiivne pärmide paljunemine on seotud söötmes oleva lämmastiku tarbimisega. Lämmastiku kontsentratsioon ei mõjuta otseselt pH-d, kuid lämmastiku tarbimisega kaasneb pärmide poolt vesinikioonide moodustamine, mis omakorda mõjutab pH väärtust. (Castrillo *et al.*, 1995)

Ajavahemikus 40-64 tundi pärast pärmide lisamist söötmesse tuvastati pH väärtuse suurenemine. Joonis 9 on näidatud, et erinevate segamiskiiruste kasutamisel oli kõigi kolme katseseeria maksimaalne pH väärtus keskmiselt $6,26 \pm 0,05$. Tuvastatud pH väärtuse tõus sarnaneb teadusartiklitest saadud andmetega. Teoreetiliselt, etanoolkäärimise käigus muudetakse fermentatsiooniprotsessi alguses sünteesitud püroviinmarihape etanooliks ja CO₂. Püroviinmarihappe kasutamine ja etanooli kogunemine fermenteeris põhjustavad edaspidist pH suurenemist. (Huang *et al.*, 2015) Akin *et al.* (2008) uurisid seda hüpoteesi *S. cerevisiae* näitel ja leidsid, et etanooli kontsentratsiooni suurenemine korreleerus pH väärtuse suurenemisega. Samasugune pH muutuse tendents esines iga valitud segamiskiiruse kasutamisel, mis omakorda tähendab, et valitud kiirused olid sobilikud *S. pastorianus* pärmirakkude paljunemiseks ning metaboolsed protsessid toimusid sarnaselt, vaatamata valitud kiirusele.



Joonis 9. pH muutus *S. pastorianus*'e kasvatamisel fermenteri seguri kiiruste 100, 200, 300 rpm kasutamisel.

S. bayanus'e kasvatamisel fermenteris langes söötmelahuse pH protsessi alguses sarnaselt *S. pastorianus* pärmiga ning seejärel toimus pH väärtuse suurenemine (Joonis 10). Erinevalt *S. pastorianus* 'est jõudis pH minimaalse väärtuseni varem, 16 tundi pärast *S. bayanus* pärmilisamist söötmesse ning pH tõusmise trend sai alguse pärast 24 tunnist kasvuaega. Erinevate segamiskiiruste kasutamisel oli kõigi kolme katseseeria minimaalne pH väärtus keskmiselt $5,3 \pm 0,11$ ja maksimaalne väärtus $6,92 \pm 0,44$, mis tuvastati fermentatsiooni lõpus. Iga segamiskiiruse kolme katseseeria standardhälbed on suured, mistõttu on väga raske hinnata segamiskiiruse mõju pH muutusele, kuid võib oletada, et 300 rpm puhul pH väärtuse langus fermentatsiooniprotsessi alguses ($5,18 \pm 0,21$) ning pH tõus protsessi lõpus ($7,43 \pm 0,55$) olid kõige prominentsemad. Võib eeldada, et segamiskiirus 300 rpm suurendab *S. bayanus*'e lämmastiku metabolismi ning võimet sünteesida ühendeid, mis mõjutavad pH väärtust (püroviinmarihape ja teised happed, etanool) (Akin *et al.*, 2008; Castrillo *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2015).



Joonis 10. pH muutus *S. bayanus*'e kasvatamisel fermenteri seguri kiiruste 100, 200, 300 rpm kasutamisel.

Bakalaureusetöö käigus ei õnnestunud näidata erinevate segamiskiiruste mõju pH väärtusele, aga teadusartiklites on varasemalt näidatud, et segamiskiiruse ja pärmide poolt sünteesitud ühendite kontsentratsioonide vahel on seos olemas. Rollero *et al.* (2018) võrdlesid *S. cerevisiae* poolt sünteesitud ainete kontsentratsioone staatilise fermentatsiooniprotsessi ajal ning seguri kasutamisega ja leidsid, et ilma segamiseta sünteesivad pärmid vähem happeid (propioon-, isovõi-, isovaleriaanhapet) ning vähem

alkohole (propanooli, isobutanooli). Segamine suurendas pärmirakkude poolt lämmastiku metabolismi, mis omakorda suurendas ülalmainitud ainete sünteesi. Tulevikus on võimalik katseid korrata mõlema pärmiga, kasutades ka teisi seguri kiiruseid ja teostada analüüsid (nt. kromatograafia abil), et leida, millised ühendid mõjutavad pH väärtust ja kuidas pH on seotud erinevate ühendite kontsentratsioonidega.

KOKKUVÕTE

Bakalaureusetöös anti teadusartiklite põhjal ülevaade fermenterite ehitusest, tüüpidest ja tööpõhimõtetest, kirjeldati fermentatsioonistrateegiaid ja fermenterite kasutusalasid ning näidati fermentatsioonitingimuste kontrollimise olulisust. Bakalaureusetöö katsete läbiviimisel kasutati mehanilise segamisega 2 L fermenterit Applikon *my-Control* ning seadme jaoks koostati detailne kasutusjuhend. Eksperimentaalses osas uuriti erinevate segamiskiiruste mõju *S. pastorianus*'e ja *S. bayanus*'e kasvule (rakkude arvule) ning jälgiti spontaanset pH muutust protsessi käigus. Eksperimentide käigus registreeriti rakkude arvu muutused ja pH väärtused iga 8 tunni järel 64 tunni jooksul pärast pärmide lisamist kasvusöötmesse.

S. pastorianus rakkude arv suurenes kogu katseperioodi jooksul ning pärmide kasvatamiseks sobisid kõik katseteks valitud segamiskiirused 100-300 rpm. Suurim pärmirakkude üldarvu muutus oli segamiskiiruse 200 rpm juures: kuni $10,58 \pm 0,08$ log rakku/L. *S. pastorianus* pärmide üleminek lag-faasist eksponentsiaalsesse faasi toimus 8 tundi pärast pärmide lisamist söötmesse ning eksponentsiaalne faas kestis 40. tunnini. Kasvukiiruse aeglustumise põhjal järeldati, et ajavahemikus 40-64 tundi läksid *S. pastorianus* rakud üle statsionaarse kasvufaasi.

S. bayanus rakkude arvu määramine biomassi anduriga ebaõnnestus biokile moodustumise tõttu. Pärmide kasvu hindamiseks kasutati kaalu. Selgus, et ka *S. bayanus*'e kasv toimus aktiivsemalt segamiskiiruse 200 rpm juures.

Mõlema pärmide fermentatsiooniprotsessi iseloomustas esialgne pH langus ning edasine pH tõus. *S. pastorianus*'e puhul toimus pH langus kuni 40. tunnini, samas kui *S. bayanus*'e puhul langes pH minimaalse väärtuseni varem – 16 tundi pärast pärmide lisamist söötmesse. *S. pastorianus* puhul oli pH muutuse tendents samasugune iga valitud kiiruse jaoks, aga *S. bayanus*'e pH väärtuse muutused olid prominentsemad segamiskiiruse 300 rpm juures. Tõenäoliselt on nende muutuste põhjus fermentatsiooniproductide süntees pärmide poolt suuremas koguses, kuid sellise hüpoteesi tõendamiseks on vaja analüüsida söötmelahuses olevaid ühendeid.

Võttes arvesse *S. bayanus* omadust moodustada biofilmi, järeldati, et mehaanilise segamisega fermenter ei ole sobilik antud pärmide kasvatamiseks. Mehaanilise segamisega fermenteri kasutamine biofilmi moodustavate pärmide kasvatamiseks on problemaatiline ning võib eeldada, et eksperimentide läbiviimiseks on sobilikumad teist tüüpi fermenterid, näiteks fermentereid membraaniga, mis võimaldavad pärmirakkudel kleepuda membraani külge.

Käesoleva bakalaureusetöö käigus koostatud kirjanduse ülevaadet fermenterite olemuse ning kasutamise kohta saab kasutada järgmistes uuringutes. Vaatamata sellele, et katsete käigus kogutud andmed ei võimaldanud teha selgeid järeldusi segamiskiiruse mõjust pärmide rakkude arvule ja pH muutustele, on saadud andmed oluliseks lähtekohaks katsete disaini optimeerimiseks ning uurimistöö jätkamiseks. Eksperimentaalsed andmed tõestasid Applikon *my-Control* seadme töö stabiilsust. Katsete läbiviimise tulemusena koostati Applikon *my-Control* detailne kasutusjuhend koos piltidega, mis võimaldab seadet edasi kasutada erinevate uuringute läbiviimiseks.

Tulevikus on plaanis jätkata fermentatsioonitingimuste mõju uurimisega, katsetades pH hoidmist optimaalses vahemikus ning erinevate kasvusõotmete ja lisakomponentide kasutamist. Huvipakkuvaks teemaks on fermentatsiooniprotsessi käigus sünteesitud produktide kindlakstegemine ning nende kontsentratsioonide määramine.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abbott, M. S. R., Harvey, A. P., Perez, G. V., & Theodorou, M. K. (2013). Biological processing in oscillatory baffled reactors: Operation, advantages and potential. *Interface Focus*, 3(1), 20120036. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2012.0036>
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), 877–902. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Aguirre-Ezkauriatza, E. J., Galarza-González, M. G., Uribe-Bujanda, A. I., Ríos-Licea, M., López-Pacheco, F., Hernández-Brenes, C. M., & Alvarez, M. M. (2008). Effect of Mixing During Fermentation in Yogurt Manufacturing. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4454–4465. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1140>
- Ahlert, R. C. (1996). Bioreaction engineering principles. Jens Nielsen and John Villadsen, editors, Plenum Press, New York, NY, (1994), 456 Pages, [ISBN No.: 0.306-44688-X], U.S. List Price: \$79.50. *Environmental Progress*, 15(3), F9–F10. <https://doi.org/10.1002/ep.670150306>
- Akin, H., Brandam, C., Meyer, X.-M., & Strehaiano, P. (2008). A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47(11), 1986–1993. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.11.014>
- Anagnostopoulos, D. A., & Tsaltas, D. (2019). Fermented Foods and Beverages. In *Innovations in Traditional Foods* (pp. 257–291). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00010-1>
- Applikon. (2017). *My-Control for Autoclavable Bioreactors 1–3 L*.
- Axelsson, L., & Ahmè, S. (2000). Lactic Acid Bacteria. In F. G. Priest & M. Goodfellow (Eds.), *Applied Microbial Systematics* (pp. 367–388). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4020-1_13
- Barker, H. A. (1981). Amino Acid Degradation by Anaerobic Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 50(1), 23–40. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.50.070181.000323>
- Bauer, J., Luttik, M. A., Flores, C. L., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., & Niederberger, P. (1999). By-product formation during exposure of respiring *Saccharomyces cerevisiae* cultures to excess glucose is not caused by a limited capacity of pyruvate carboxylase. *FEMS Microbiology Letters*, 179(1), 107–113. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08715.x>
- Bernardeau, M., Guguen, M., & Vernoux, J. P. (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: Long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4), 487–513. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x>
- Björkroth, J., & Holzapfel, W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 267–319). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_9
- Bokulich, N. A., & Bamforth, C. W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 77(2), 157–172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>
- Brickwedde, A., van den Broek, M., Geertman, J.-M. A., Magalhães, F., Kuijpers, N. G. A., Gibson, B., Pronk, J. T., & Daran, J.-M. G. (2017). Evolutionary Engineering in Chemostat Cultures for Improved Maltotriose Fermentation Kinetics in *Saccharomyces pastorianus* Lager Brewing Yeast. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01690>
- Brinques, G. B., do Carmo Peralba, M., & Ayub, M. A. Z. (2010). Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(2), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0665-1>

- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2000). *Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Canonica, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology*, *56*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>
- Castrillo, J. I., de Miguel, I., & Ugalde, U. O. (1995). Proton production and consumption pathways in yeast metabolism. A chemostat culture analysis. *Yeast (Chichester, England)*, *11*(14), 1353–1365. <https://doi.org/10.1002/yea.320111404>
- Chen, N. Y. (1990). The Design of Airlift Fermenters for use in Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *8*(1), 379–396. <https://doi.org/10.1080/02648725.1990.10647875>
- Chisti, Y., & Moo-Young, M. (2003). Bioreactors. In R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)* (pp. 247–271). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00067-3>
- Ciani, M., Comitini, F., & Mannazzu, I. (2013). Fermentation. In B. Fath (Ed.), *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)* (pp. 310–321). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00693-X>
- Combs, G. F., & McClung, J. P. (2017). Chapter 3—General Properties of Vitamins. In G. F. Combs & J. P. McClung (Eds.), *The Vitamins (Fifth Edition)* (Fifth Edition, pp. 33–58). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802965-7.00003-4>
- Coote, N., & Kirsop, B. H. (1976). Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, *82*(3), 149–153. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1976.tb03739.x>
- Creative Enzymes. (2018). *Application of Enzymes in Starch Processing*. https://www.creative-enzymes.com/resource/application-of-enzymes-in-starch-processing_59.html
- Cripwell, R. A., Rose, S. H., Favaro, L., & van Zyl, W. H. (2019). Construction of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for the efficient consolidated bioprocessing of raw starch. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 201. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1541-5>
- Cui, S., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2016). High-density culture of *Lactobacillus plantarum* coupled with a lactic acid removal system with anion-exchange resins. *Biochemical Engineering Journal*, *115*, 80–84.
- De Bece, G., & Liebmann, A. J. (1944). Aeration in the Production of Compressed Yeast. *Industrial & Engineering Chemistry*, *36*(10), 882–890. <https://doi.org/10.1021/ie50418a004>
- Deák, T., & Farkas, J. (2013). *Microbiology of Thermally Preserved Foods: Canning and Novel Physical Methods*. DEStech Publications, Inc.
- Demirbas, A. (2009). Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*, *86*, S108–S117. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.04.036>
- Doran, P. M. (2013). Chapter 14—Reactor Engineering. In P. M. Doran (Ed.), *Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)* (pp. 761–852). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00014-9>
- Emire, S. (2012). Vinegar Production Technology – An Overview. *Beverage and Food World*, 29–32.
- Erickson, L. E. (2019). 3.55—Bioreactors for Commodity Products☆. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (pp. 683–689). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00191-9>
- Farrell, A., Plevin, R., Turner, B., Jones, A., O'Hare, M., & Kammen, D. (2006). Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. *Science (New York, N.Y.)*, *311*, 506–508. <https://doi.org/10.1126/science.1121416>
- Fenge, C., & Lüllau, E. (2005). Cell Culture Bioreactors. In *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies* (pp. 173–242). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780849351068-9>
- Fonknechten, N., Chaussonnerie, S., Tricot, S., Lajus, A., Andreesen, J. R., Perchat, N., Pelletier, E., Gouyvenoux, M., Barbe, V., Salanoubat, M., Le Paslier, D., Weissenbach, J., Cohen, G. N., & Kreimeyer, A. (2010). *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation: revisiting

- its metabolism through its genome sequence. *BMC Genomics*, *11*, 555. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-555>
- Fonseca, G. G., Gombert, A. K., Heinzle, E., & Wittmann, C. (2007). Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Research*, *7*(3), 422–435. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00192.x>
- Fröhlich-Wyder, M.-T., Bisig, W., Guggisberg, D., Jakob, E., Turgay, M., & Wechsler, D. (2017). Chapter 35—Cheeses With Propionic Acid Fermentation. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 889–910). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00035-1>
- Furusaki, S., & Takeda, T. (2017). 2.36—Bioreactors for Plant Cell Culture☆. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (pp. 519–530). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09076-2>
- Goey, C. H., Bell, D., & Kontoravdi, C. (2019). CHO cell cultures in shake flasks and bioreactors present different host cell protein profiles in the supernatant. *Biochemical Engineering Journal*, *144*, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.02.006>
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N., & Gallagher, E. (2010). Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(3), 318–328. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x>
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: The way forward? *Trends in Biotechnology*, *27*(5), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.004>
- Harun-ur-Rashid, Md., Togo, K., Ueda, M., & Miyamoto, T. (2007). Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk “Dahi” in Bangladesh. *Pakistan Journal of Nutrition*, *6*(6), 647–652. Scopus.
- He, C., Mu, Y., Liu, X., Yan, Z., & Yue, Z. (2019). 3.09—Biogas☆. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (pp. 110–127). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00154-3>
- Hensing, M. C., Rouwenhorst, R. J., Heijnen, J. J., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1995). Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *67*(3), 261–279. <https://doi.org/10.1007/BF00873690>
- Hofmann, H. (1988). Chemical Reaction and Reactor Engineering. Herausgeg. Von J. J. Carberry und A. Varma. Marcel Dekker, Inc., New York—Basel 1987. 1088 S., zahlr. Abb. Geb., US-\$ 1.50.–. *Chemie Ingenieur Technik*, *60*(1), 31–31. <https://doi.org/10.1002/cite.330600108>
- Holzappel, W. (1997). Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control*, *8*(5), 241–258. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(97\)00017-0](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(97)00017-0)
- Hsu, S. T., & Yang, S. T. (1991). Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: Effects of pH. *Biotechnology and Bioengineering*, *38*(6), 571–578. <https://doi.org/10.1002/bit.260380603>
- Huang, H., Qureshi, N., Chen, M.-H., Liu, W., & Singh, V. (2015). Ethanol Production from Food Waste at High Solids Content with Vacuum Recovery Technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(10), 2760–2766. <https://doi.org/10.1021/jf5054029>
- Hujanen, M., Linko, S., Linko, Y., & Leisola, M. (2001). Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *56*, 126–130. <https://doi.org/10.1007/s002530000501>
- Iimura, Y., Hara, S., & Otsuka, K. (1980). Cell Surface Hydrophobicity as a Pellicle Formation Factor in Film Strain of *Saccharomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *44*(6), 1215–1222. <https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10864130>
- Jagani, H., Hebbar, K., Gang, S. S., & Raj, P. V. (2010). *An Overview of Fermenter and the Design Considerations to Enhance Its Productivity*. 41.
- Johnson, K., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Research*, *44*(7), 2141–2152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.031>

- Jung, I., & Lovitt, R. W. (2010). A comparative study of the growth of lactic acid bacteria in a pilot scale membrane bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(9), 1250–1259. <https://doi.org/10.1002/jctb.2424>
- Kallscheuer, N., Classen, T., Drepper, T., & Marienhagen, J. (2019). Production of plant metabolites with applications in the food industry using engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.008>
- Karelson, M., Erin, A., Klvet, T., Mahla, T., Olkonen, A., Kihu, J., Kukk, M., Leola, A., Laht, T.-M., Elias, P., Mandel, A., Laikoja, K., Sarand, R.-J., Kiis, A., Prn, M., Trk, K.-T., Olmet, R., Joa, R., Prn, J., ... Olkonen, A. (Eds.). (2001). *Piimanduse ksiraamat*. Eesti Pllumajanduslikooli kirjastus.
- Karimi, A., Golbabaee, F., Mehrnia, M. R., Neghab, M., Mohammad, K., Nikpey, A., & Pourmand, M. R. (2013). Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 10(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1735-2746-10-6>
- Khan, U., & Selamoglu, Z. (2020). Use of Enzymes in Dairy Industry: A Review of Current Progress. *Archives of Razi Institute*, 75(1), 131–136. <https://doi.org/10.22092/ari.2019.126286.1341>
- Kim, K.-A., Noh, B., Lee, J.-K., Kim, S.-Y., Park, Y.-C., & Oh, D.-K. (2000). Optimization of culture conditions for erythritol production by *Torula* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 69–74.
- Klasson, K. T., Ackerson, M. D., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L. (1991). Bioreactor design for synthesis gas fermentations. *Fuel*, 70(5), 605–614. [https://doi.org/10.1016/0016-2361\(91\)90174-9](https://doi.org/10.1016/0016-2361(91)90174-9)
- Kongo, J. M. (2013). Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. <https://doi.org/10.5772/55937>
- Kopsahelis, N., Bosnea, L., Bekatorou, A., Tzia, C., & Kanellaki, M. (2012). Alcohol production from sterilized and non-sterilized molasses by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on brewer's spent grains in two types of continuous bioreactor systems. *Biomass and Bioenergy*, 45, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.015>
- Krabben, P. (2014). *Acetone production during the First World War*. 41, 74–77.
- Kung, L., & Shaver, R. (2001). *Interpretation and Use of Silage Fermentation Analysis Reports*. 3(13), 5.
- Kushwaha, D., Srivastava, N., Mishra, I., Upadhyay, S., & Mishra, P. (2018). Recent trends in biobutanol production. *Reviews in Chemical Engineering*, 35. <https://doi.org/10.1515/revce-2017-0041>
- Lee, B. B., Tham, H. J., & Chan, E. S. (2007). Fed-batch fermentation of lactic acid bacteria to improve biomass production: A theoretical approach. *Journal of Applied Sciences*, 7(15), 2211–2215.
- Li, T., Chen, X., Chen, J., Wu, Q., & Chen, G.-Q. (2014). Open and continuous fermentation: Products, conditions and bioprocess economy. *Biotechnology Journal*, 9(12), 1503–1511. <https://doi.org/10.1002/biot.201400084>
- Linville, J. L., Rodriguez, M., Mielenz, J. R., & Cox, C. D. (2013). Kinetic modeling of batch fermentation for *Populus* hydrolysate tolerant mutant and wild type strains of *Clostridium thermocellum*. *Bioresource Technology*, 147, 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.086>
- Liu, Z. L., Saha, B. C., & Slininger, P. J. (2008). Lignocellulosic biomass conversion to ethanol by *Saccharomyces*. *Bioenergy*, 17–36.
- Longobardi, G. P. (1994). Fed-batch versus batch fermentation. *Bioprocess Engineering*, 10(5), 185–194. <https://doi.org/10.1007/BF00369529>
- Lbbert, A. (2000). Bubble Column Bioreactors. In K. Schgerl & K.-H. Bellgardt (Eds.), *Bioreaction Engineering: Modeling and Control* (pp. 247–273). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59735-0_9
- Luttik, M. A. H., Overkamp, K. M., Ktter, P., De Vries, S., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH

- dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *Journal of Biological Chemistry*, 273(38), 24529–24534. Scopus. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24529>
- Lynch, K. M., Zannini, E., Wilkinson, S., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2019). Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 587–625. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12440>
- Mat Isham, N. K., Mokhtar, N., Fazry, S., & Lim, S. J. (2019). The development of an alternative fermentation model system for vinegar production. *LWT*, 100, 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.065>
- McDonough, R. J. (1997). Agitation in fermenters and bioreactors. In E. Goldberg (Ed.), *Handbook of Downstream Processing* (pp. 357–416). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1563-3_15
- McNaught, A., & Wilkinson, A. (2009). Fermenter. In *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (2.1.0). IUPAC. <https://doi.org/10.1351/goldbook.F02338>
- McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). Practical fermentation technology. In *Practical fermentation technology* (pp. 14–15). Wiley.
- Medina, R. (2019). Fermentation Technology. In *Fermentation Technology* (pp. 105–110). EDTECH.
- Miguel, Â. S. M., Martins-Meyer, T. S., Figueiredo, É. V. da C., Lobo, B. W. P., & Dellamora-Ortiz, G. M. (2013). Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. In *Food Industry*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/53168>
- Montiel Corona, V., & Razo-Flores, E. (2018). Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresource Technology*, 249, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., & Gonzalez, R. (2015). The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(9), 3993–4003. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6321-3>
- Morata, A. (2018). *Red Wine Technology*. Academic Press.
- Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Domenico, A. D., Dusemund, B., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Leblanc, J.-C., Lindtner, O., Moldeus, P., Mosesso, P., Parent-Massin, D., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., Wright, M., ... Lambré, C. (2017). Re-evaluation of glycerol (E 422) as a food additive. *EFSA Journal*, 15(3), e04720. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4720>
- My-Control. (2017). Applikon Biotechnology. <https://www.applikon-biotechnology.com/en/products/process-control/my-control/>
- Nagarajan, V., Mohanty, A. K., & Misra, M. (2016). Perspective on Polylactic Acid (PLA) based Sustainable Materials for Durable Applications: Focus on Toughness and Heat Resistance. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(6), 2899–2916. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00321>
- Narendranath, N. V., & Power, R. (2005). Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of Lactobacilli and Saccharomyces cerevisiae during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2239–2243. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2239-2243.2005>
- O'Connor, C. M. (2021). *Yeast growth phases*. <https://bio.libretexts.org/@go/page/17512>
- Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P., & Pillay, B. (2017). Flavour-active volatile compounds in beer: Production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/jib.389>
- Oldshue, J. Y. (1985). Transport phenomena, reactor design and scale-up. *Biotechnology Advances*, 3(2), 219–237. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(85\)90293-9](https://doi.org/10.1016/0734-9750(85)90293-9)
- Oniscu, C., Galaction, A.-I., & Ungureanu, F. (2001). Modelling of mixing for anaerobic stirred bioreactors. *Chemical Physics Letters - CHEM PHYS LETT*, 2001, 84–93.
- Pandey, A., Soccol, C., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-Bioprocess and products. *Process Biochemistry*, 35, 1153–1169. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)

- Pappu, J. S. M., & Gummadi, S. N. (2016). Multi response optimization for enhanced xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. *3 Biotech*, *6*(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0467-x>
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: Lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>
- Pretorius, I. S., & Høj, P. B. (2005). Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(2), 83–108. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00281.x>
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *150*(2), 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technology and Biotechnology*, *56*(1), 16–30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
- Reddy, S. M., Girisham, S., & Babu, G. N. (2017). *Applied Microbiology (Agriculture, Environmental, Food and Industrial Microbiology)*. Scientific Publishers.
- Reinharz, J. (1985). Science in the Service of Politics: The Case of Chaim Weizmann during the First World War. *The English Historical Review*, *100*(396), 572–603. JSTOR.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). Biochemistry of Alcoholic Fermentation and Metabolic Pathways of Wine Yeasts. In *Handbook of Enology* (pp. 53–77). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470010363.ch2>
- Rollero, S., Roberts, S., Bauer, F., & Divol, B. (2018). Agitation impacts fermentation performance as well as carbon and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* under winemaking conditions: Influence of agitation on yeast metabolism. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *24*. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12338>
- Sabari, G., & Sharma, A. A. (2018). Fundamentals of bioanalytical techniques and instrumentation. In *Fundamentals of bioanalytical techniques and instrumentation* (II, pp. 468–469). PHI Learning Pvt. Ltd.
- Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician*, *9*(1), 3592–3597. <https://doi.org/10.19082/3592>
- Scanes, K. T., Hohmann, S., & Prior, B. A. (1998). Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Relevance to Wine: A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *19*(1), 17–24. <https://doi.org/10.21548/19-1-2239>
- Seifert, G. K. E., & Matteau, P. P. (1988). An automatic aseptic bioreactor sampling system. *Biotechnology and Bioengineering*, *32*(7), 923–926. <https://doi.org/10.1002/bit.260320713>
- Shafaghat, H., Najafpour, G. D., Rezaei, S. P., & Sharifzadeh, M. (2010). Optimal growth of *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 24860) on pretreated molasses for ethanol production: Application of response surface methodology. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, *16*(2), 199–206.
- Shuler, M. L., Kargi, F., & DeLisa, M. (2017). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall. <https://books.google.ee/books?id=UnbwygAACAAJ>
- Singh, J., Kaushik, N., & Biswas, S. (2014). *Bioreactors – Technology & Design Analysis*.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>
- Sinha, N. K., Hui, Y. H., Evranuz, E. O., Siddiq, M., & Ahmed, J. (2010). *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*. 788.
- Soccol, C. R., Pandey, A., & Larroche, C. (2013). *Fermentation processes engineering in the food industry*. CRC Press.
- Speight, J. G. (2017). Chapter 3—Industrial Organic Chemistry. In J. G. Speight (Ed.), *Environmental Organic Chemistry for Engineers* (pp. 87–151). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804492-6.00003-4>

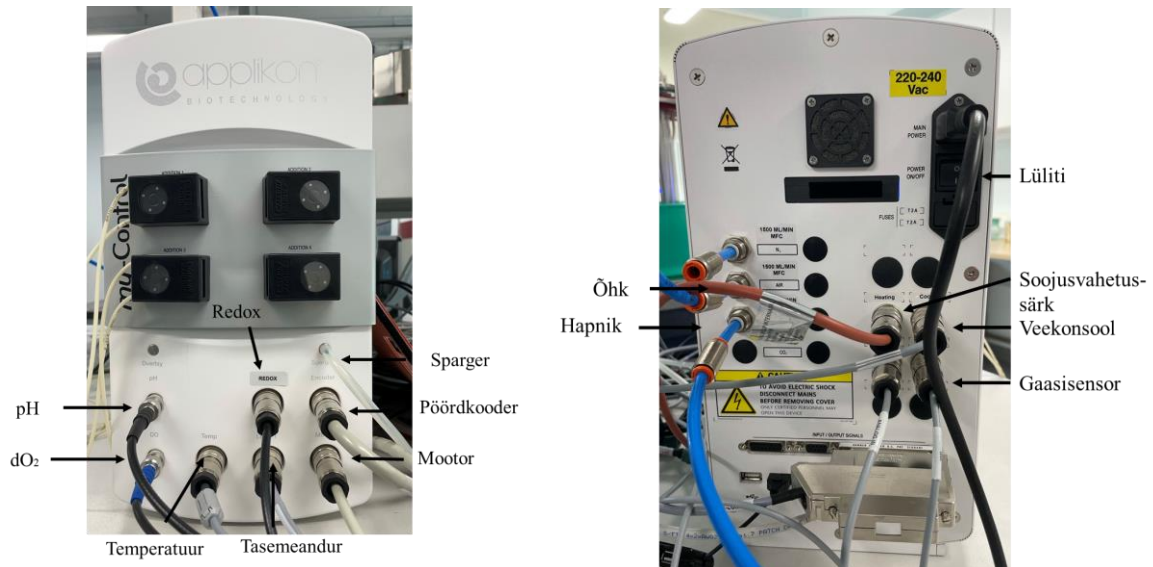
- Sreekumar, G., Krishnan, S., & Prathipa, R. (2010). *Studies on the Effects of End Product Inhibition over Lactic Acid Bacteria under High Cell Density Cultivation Process*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Studies-on-the-Effects-of-End-Product-Inhibition-Sreekumar-Krishnan/88144334c9618e83c474500a0963f337d542109a>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2016). Principles of Fermentation Technology. In *Principles of Fermentation Technology* (pp. 18–19). Butterworth-Heinemann.
- Stowers, C. C., Cox, B. M., & Rodriguez, B. A. (2014). Development of an industrializable fermentation process for propionic acid production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *41*(5), 837–852. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1423-6>
- Swick, R. W., & Wood, H. G. (1960). The role of transcarboxylation in propionic acid fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *46*(1), 28–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.46.1.28>
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (1999). *Yoghurt: Science and Technology*. Woodhead Publishing.
- Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S., & Komagata, K. (2000). *Lactobacillus acidipiscis* sp. Nov. And *Weissella thailandensis* sp. Nov., isolated from fermented fish in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50 Pt 4*, 1479–1485. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1479>
- Taya, M., & Kino-oka, M. (2011). 2.37—Bioreactors for Animal Cell Cultures. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (pp. 531–540). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00086-0>
- Tirosh, A., Calay, E., Tuncman, G., Claiborn, K., Inouye, K., Eguchi, K., Alcalá, M., Rathaus, M., Hollander, K., Ron, I., Livne, R., Heianza, Y., Qi, L., Shai, I., Garg, R., & Hotamisligil, G. (2019). The short-chain fatty acid propionate increases glucagon and FABP4 production, impairing insulin action in mice and humans. *Science Translational Medicine*, *11*, eaav0120. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav0120>
- Urbonaviciene, D., Viskelis, P., Bartkiene, E., Juodeikiene, G., & Vidmantiene, D. (2015). The Use of Lactic Acid Bacteria in the Fermentation of Fruits and Vegetables—Technological and Functional Properties. *Biotechnology*. <https://doi.org/10.5772/59938>
- Uzuner, S., & Cekmecelioglu, D. (2019). Chapter 3—Enzymes in the Beverage Industry. In M. Kuddus (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 29–43). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00003-7>
- van Dijken, J. P., Weusthuis, R. A., & Pronk, J. T. (1993). Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *63*(3–4), 343–352. <https://doi.org/10.1007/BF00871229>
- Vandák, D., Tomáška, M., Zígová, J., & Sturdík, E. (1995). Effect of growth supplements and whey pretreatment on butyric acid production by *Clostridium butyricum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *11*(3), 363. <https://doi.org/10.1007/BF00367124>
- Vandamme, E. J. (1992). Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *53*(4), 313–327. <https://doi.org/10.1002/jctb.280530402>
- Vignais, P. M., & Billoud, B. (2007). Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chemical Reviews*, *107*(10), 4206–4272. <https://doi.org/10.1021/cr050196r>
- Walker, J. A. H., & Holdsworth, H. (1958). *Biochemical Engineering* (edited by Steel, R.) p. 259. Heywood, London.
- Willaert, R. G., Baron, G. V., & De Backer, L. (1996). *Immobilised living cell systems*.
- Wood, B. E., Yomano, L. P., York, S. W., & Ingram, L. O. (2005). Development of Industrial-Medium-Required Elimination of the 2,3-Butanediol Fermentation Pathway To Maintain Ethanol Yield in an Ethanologenic Strain of *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnology Progress*, *21*(5), 1366–1372. <https://doi.org/10.1021/bp050100e>
- Wu, R., Wang, L., Wang, J., Li, H., Menghe, B., Wu, J., Guo, M., & Zhang, H. (2009). Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. *Journal of Basic Microbiology*, *49*(3), 318–326. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800047>
- Xin, F., Dong, W., Dai, Z., Jiang, Y., Yan, W., Lv, Z., Fang, Y., & Jiang, M. (2019). Chapter 9—Biosynthetic Technology and Bioprocess Engineering. In S. P. Singh, A. Pandey, G. Du, & S.

- Kumar (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 207–232). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64085-7.00009-5>
- Xue, C., Wu, Y., Gu, Y., Jiang, W., Dong, H., Zhang, Y., Zhao, C., & Li, Y. (2019). 3.07 - Biofuels and Bioenergy: Acetone and Butanol☆. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (pp. 79–100). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00152-X>
- Yang, S.-T., Liu, X., & Zhang, Y. (2007). Chapter 4—Metabolic Engineering – Applications, Methods, and Challenges. In S.-T. Yang (Ed.), *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 73–118). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-44452114-9/50005-0>
- Yoshida, F. (1982). Chapter 1—Aeration and Mixing in Fermentation. In G. T. Tsao (Ed.), *Annual Reports on Fermentation Processes* (Vol. 5, pp. 1–34). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-040305-9.50005-4>
- Youssef, N., Simpson, D. R., Duncan, K. E., McInerney, M. J., Folmsbee, M., Fincher, T., & Knapp, R. M. (2007). In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1239–1247.
- Zhang, Q., Wu, D., Lin, Y., Wang, X., Kong, H., & Tanaka, S. (2015). Substrate and Product Inhibition on Yeast Performance in Ethanol Fermentation. *Energy & Fuels*, 29(2), 1019–1027. <https://doi.org/10.1021/ef502349v>
- Zhong, J.-J. (2011). 2.21—Bioreactor Engineering. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (pp. 257–269). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00077-X>
- Zohri, A.-N., Ragab, S.W, Mekawi, M.I., & Mostafa, O. A. A. (2017). Comparison Between Batch, Fed-Batch, Semi-Continuous and Continuous Techniques for Bio-Ethanol Production from a Mixture of Egyptian Cane and Beet Molasses. *Egyptian Sugar Journal*, 9, 89–111.

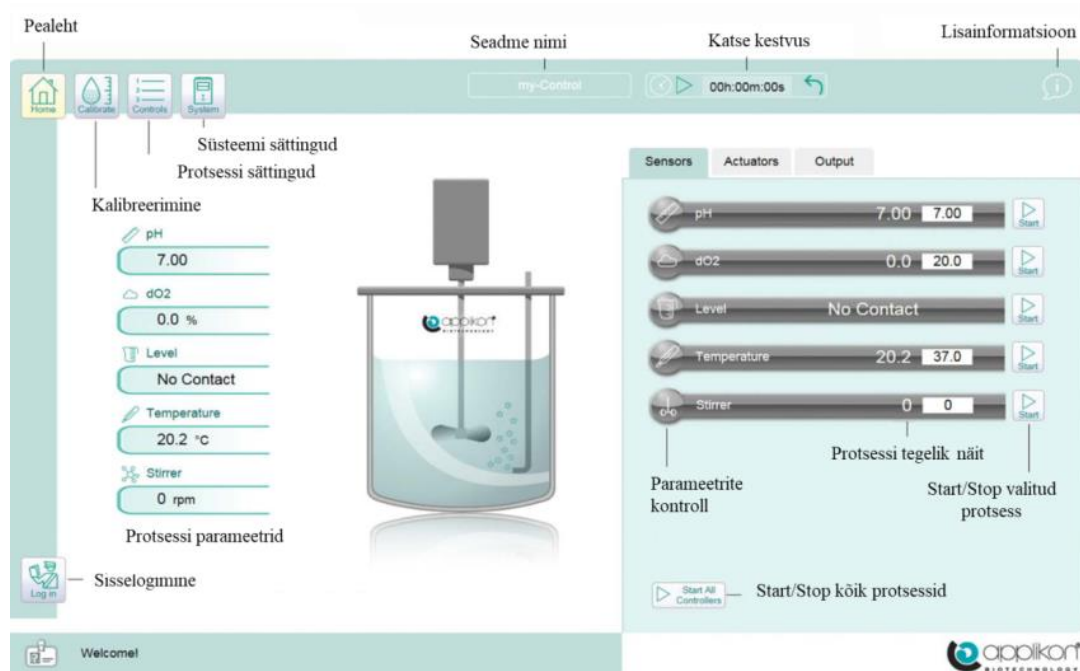
LISAD

Lisa 1. Applikon *my-Control* fermenteri kasutusjuhend

Seadme esi- ja tagapaneelid



Tarkvara



1. Lülitada seade sisse, kasutades *my-Control* kontrolleri tagumisel küljel olevat lüliti.
2. Enne dO₂ anduri kasutamist jätta andur polariseeruma 6 tunniks. Selleks ühendada andur töötava *my-Control* kontrolleri külge.
3. Siseneda *my-Control* kontrolleri tarkvarasse kasutades „*Log in*“ nuppu.
 - 3.1. Valida „*System Engineer*“

3.2. Lahtris „Please select an engineer“ valida „Engineer“. Sisestada salasõna.

4. Eemaldada pH anduri otsast säilituslahust sisaldav otsik. Pesta pH andur destilleeritud veega. Keerata pH anduri otsas paiknev kaitsekork lahti ning ühendada andur kontrolleri esipaneelis oleva pH juhtmega. Kalibreerida pH andur kasutades kalibreerimislahuseid ja fermenteri tarkvara:

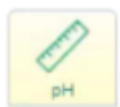
4.1. Vajutada tarkvaras „Kalibreerimine“ (*Calibrate*) nuppu.



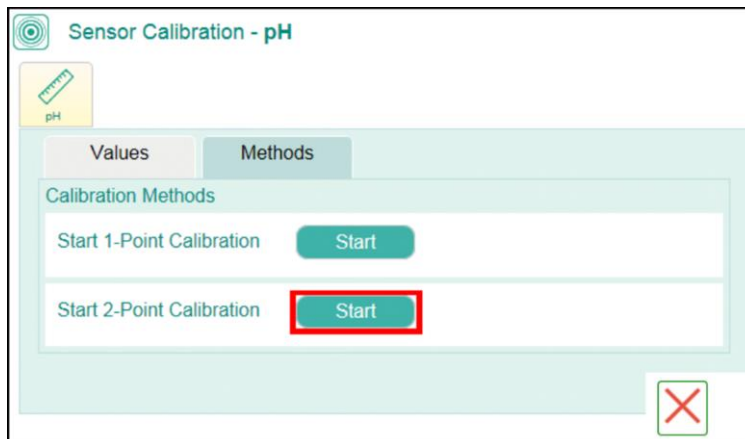
4.2. Valida „Sensor“ menüü.



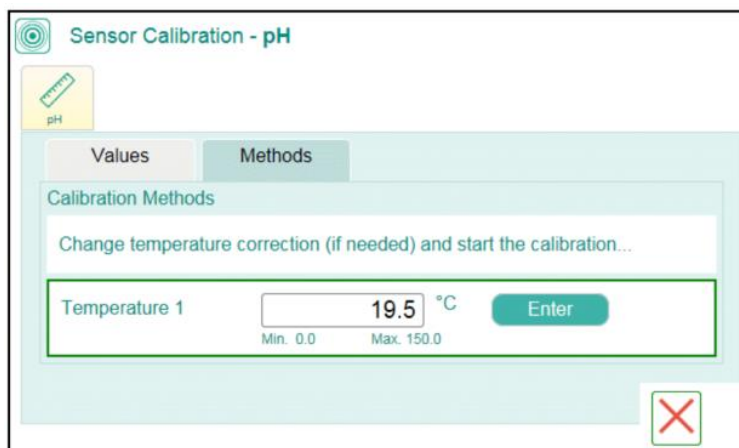
4.3. Valida pH menüü.



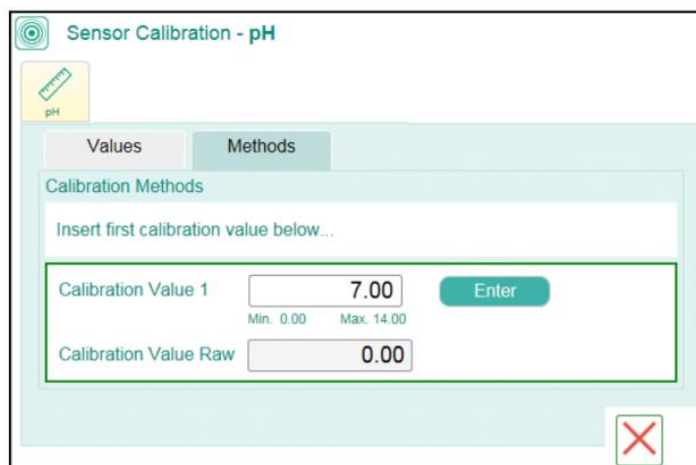
4.4. Valida „Methods“ → „2 step calibration“ → „Start“.



4.5. Mõõta esimese kalibreerimislahuse temperatuur. Sisestada temperatuuri näit ja vajutada „Enter“.



4.6. Sisestada esimese kalibreerimislahuse pH väärtus „Calibration Value 1“ lahtrisse. Asetada pH andur kalibreerimislahusesse ja vajutada „Enter“. Oodata, kuni kalibreerimisprotsess lõpeb.



4.7. Mõõta teise kalibreerimislahuse temperatuur, sisestada temperatuuri näit ja vajutada „Enter“.

The screenshot shows the 'Sensor Calibration - pH' interface. At the top, there are icons for pH, dO2, Temperatu, and Analog In. Below these are tabs for 'Values', 'Methods', and 'Sample'. The 'Methods' tab is active, showing 'Calibration Methods' with the instruction 'Change temperature correction (if needed) and start the calibration...'. A text box labeled 'Temperature 2' contains the value '19.5 °C'. Below the text box are 'Min. 0.0' and 'Max. 150.0' labels. An 'Enter' button is to the right of the text box. A red 'X' icon is in the bottom right corner.

4.8. Sisestada teise kalibreerimislahuse pH väärtus „Calibration Value 2“ lahtrisse. Loputada pH andur destilleeritud veega ja kuivatada hoolikalt paberrätikuga. Asetada pH andur kalibreerimislahusesse. Vajutada „Enter“ ning oodata, kuni kalibreerimisprotsess lõpeb.

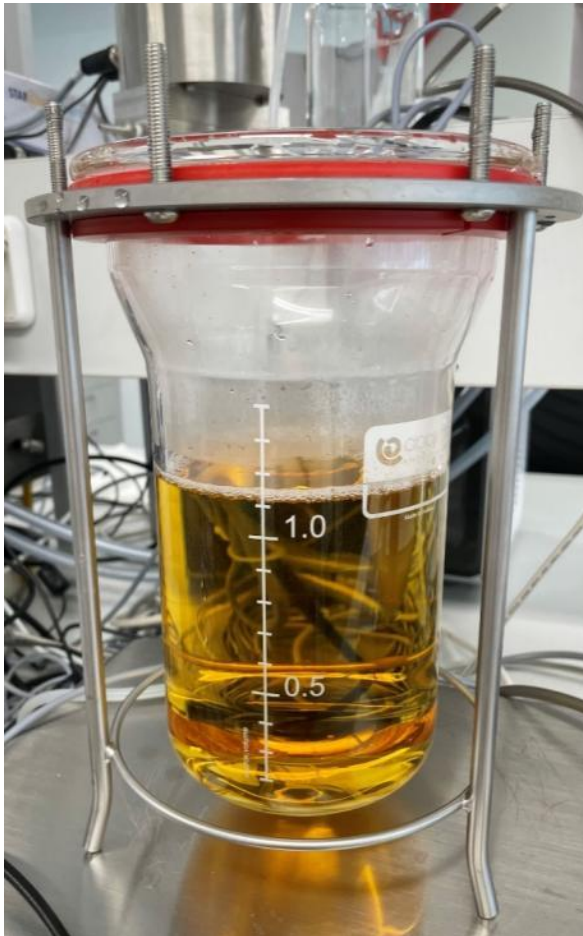
The screenshot shows the 'Sensor Calibration - pH' interface. The 'Methods' tab is active, showing 'Calibration Methods' with the instruction 'Insert second calibration value below...'. A text box labeled 'Calibration Value 2' contains the value '4.00'. Below the text box are 'Min. 0.00' and 'Max. 14.00' labels. An 'Enter' button is to the right of the text box. Below this, a text box labeled 'Calibration Value Raw' contains the value '174.61'. A red 'X' icon is in the bottom right corner.

4.9. Ilmunud aknas vajutada „Accept“ nupule.

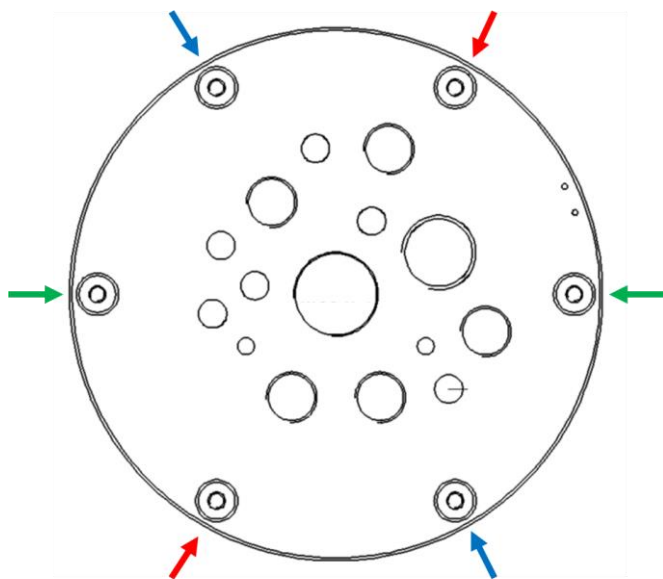
The screenshot shows the 'Sensor Calibration - pH' interface. The 'Values' tab is active, showing 'Calibration Values'. There are two rows of input fields: 'Slope' with value '1.00' and 'Raw Values' with value '58.16'; 'Offset' with value '0.00' and 'Raw Values' with value '0.00'. Below these are 'Min.' and 'Max.' labels for each. An 'Accept' button is below the 'Accept Slope and Offset?' text. Below that, an 'Actual Sample Value' text box contains '3.99' and a 'Calculate Correction' button. Below this, a 'Sample Correction Value' text box contains '0.00'. At the bottom right, there are green checkmark and red 'X' icons.

4.10. Eemaldada pH anduri otsast juhe ning asetada anduri otsale kaitsekork tagasi.

5. Täita fermenter söötmega.



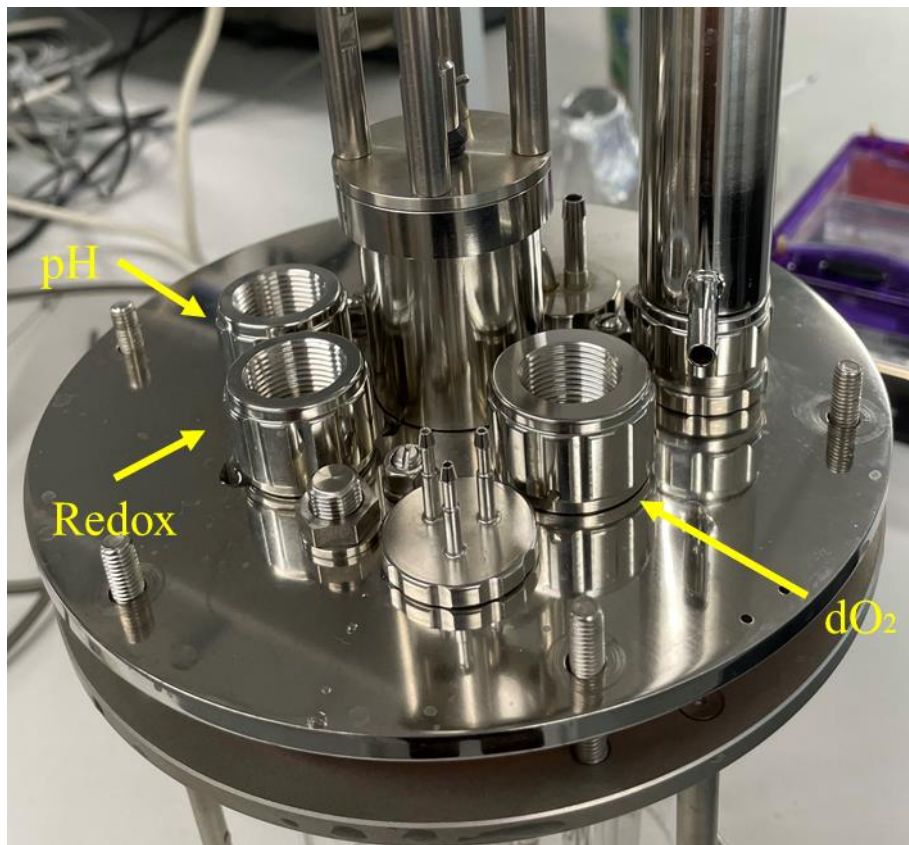
6. Asetada fermenterile kaas peale. Kinnitada mutrid, keerates samaaegselt kahte teineteise vastas olevat mutrit.



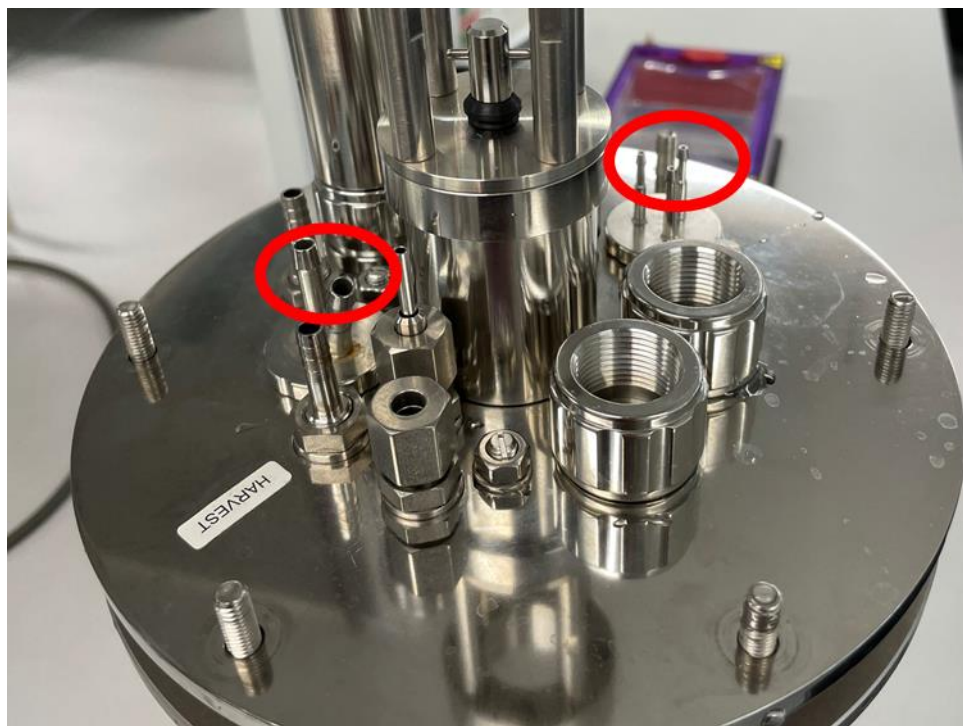
Mutrid kaane peal

7. Eemaldada dO_2 anduri otsast kaitsekate ja Redox anduri otsast säilituslahust sisaldav otsik.

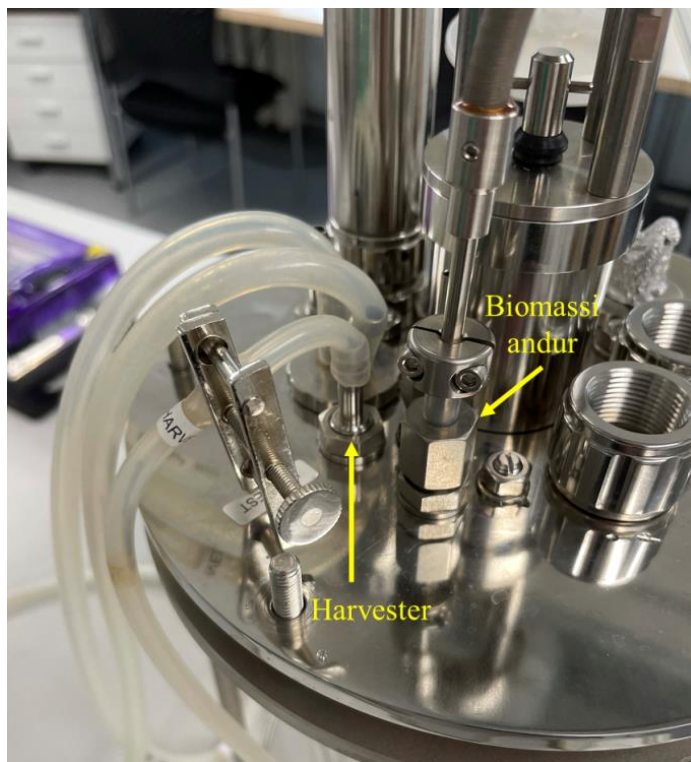
8. Asetada pH, dO₂ ja Redox andurid fermenteri kaane vastavatesse avadesse.



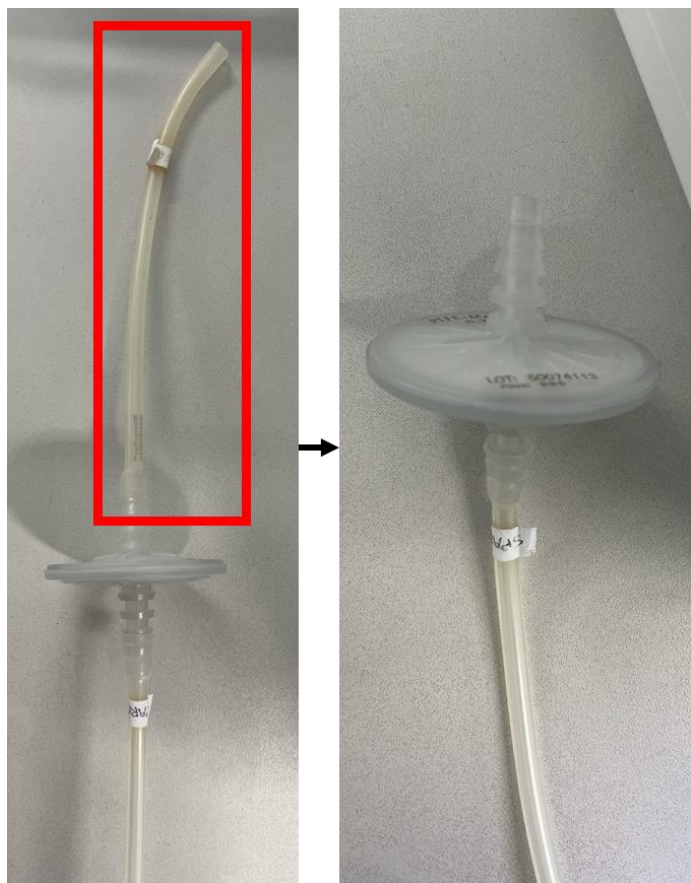
9. Katta joonisel punasega tähistatud avad vati ja fooliumiga.



10. Asetada biomassi andur vastava ava sisse. Ühendada harvesteri voolik fermenteri kaanel paikneva vastava avaga ja sulgeda harvesteri voolik klambriga.



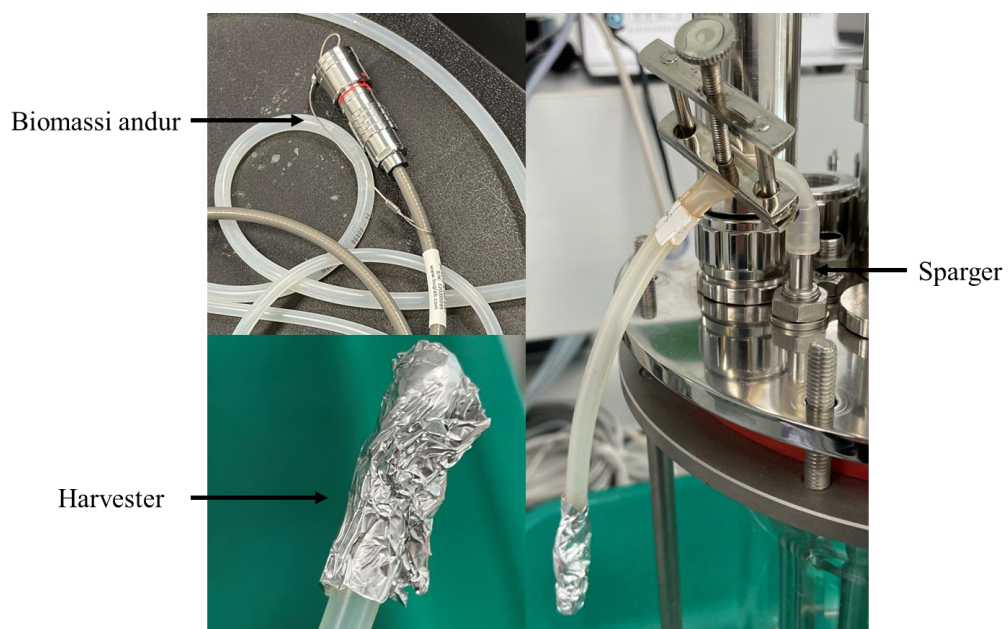
11. Võtta spargeri vooliku küljest märgitud osa lahti.



12. Ühendada spargeri voolik fermenteri kaanel paikneva vastava avaga ja sulgeda spargeri voolik klambriga.



13. Sulgeda harvesteri ja spargeri voolikute otsad vati ja fooliumiga. Sulgeda biomassi anduri juhtme ots olemasoleva kaanega.



14. Ühendada kondensaatori ehitusse kuuluva õhu väljaskeeva külge voolik koos filtriga.
Seda ava ei tohi sulgeda!



15. Autoklaavida fermenter koos söötme ja lisatarvikutega temperatuuril 121 °C, 15 min.



16. Võtta fermenter autoklaavist välja.

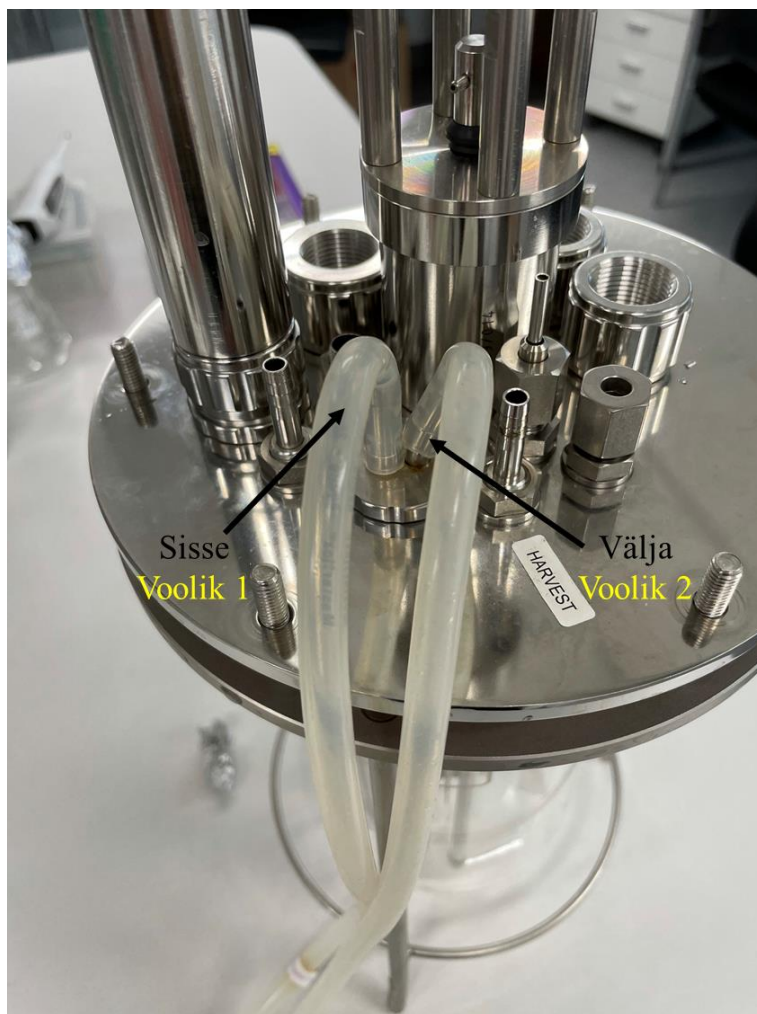
17. Paigaldada fermenteri ümber soojusvahetussärk.



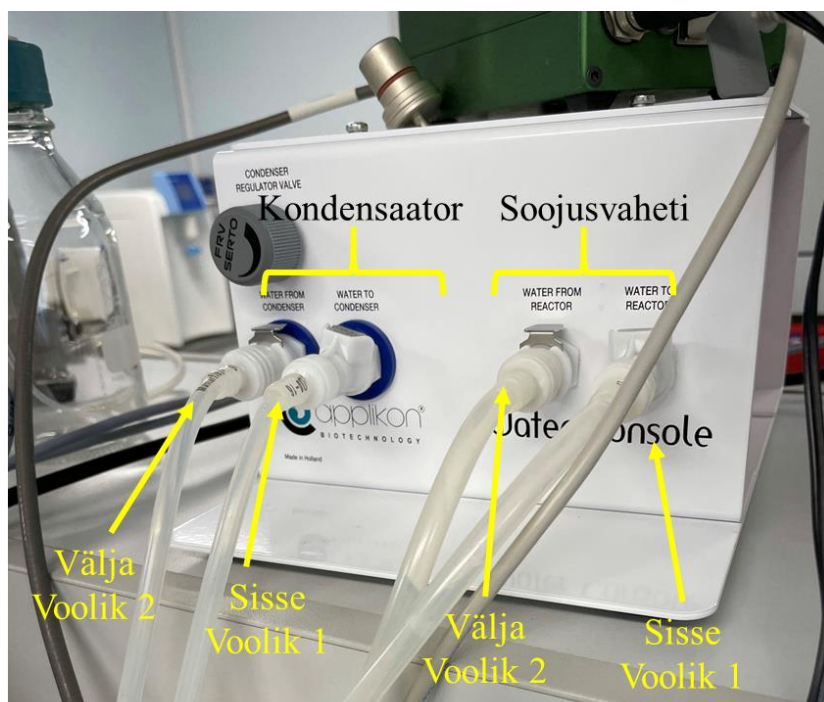
18. Ühendada kondensaatori külge veevoolikud.



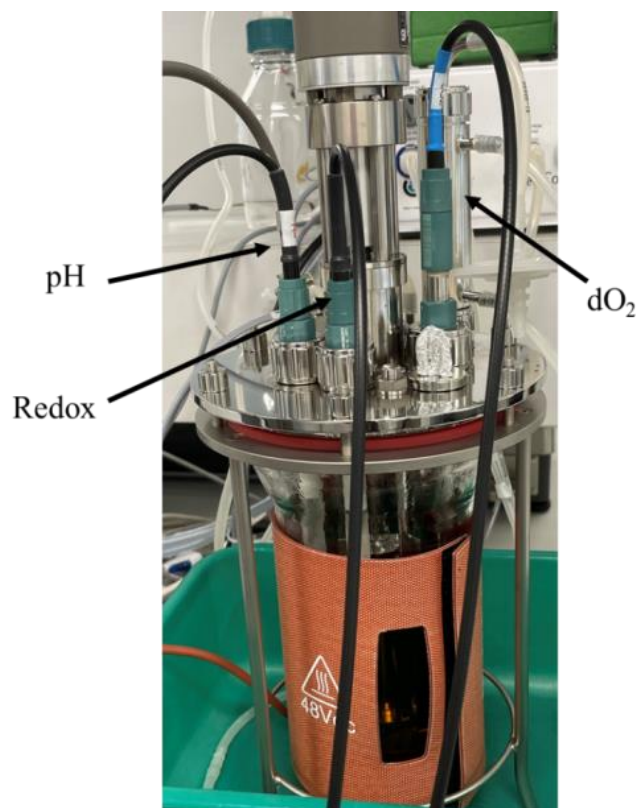
19. Ühendada soojusvaheti külge veevoolikud.



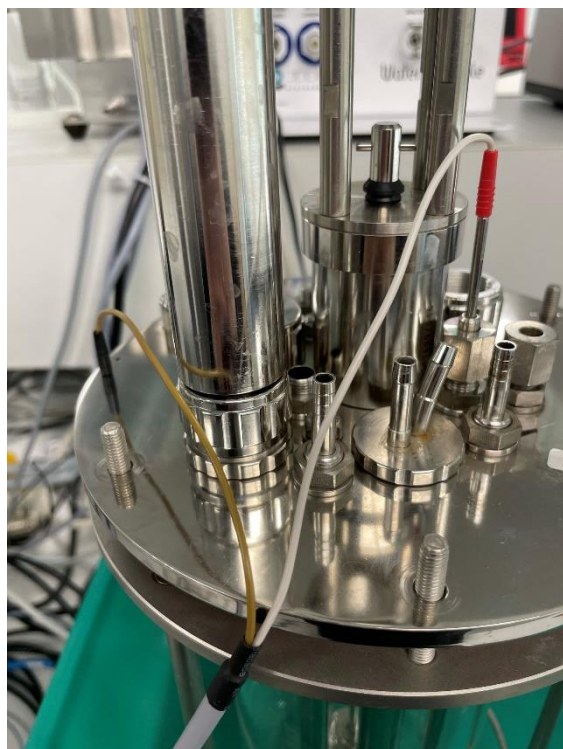
20. Ühendada kondensaatori ja soojusvaheti voolikute otsad veekonsooliga.



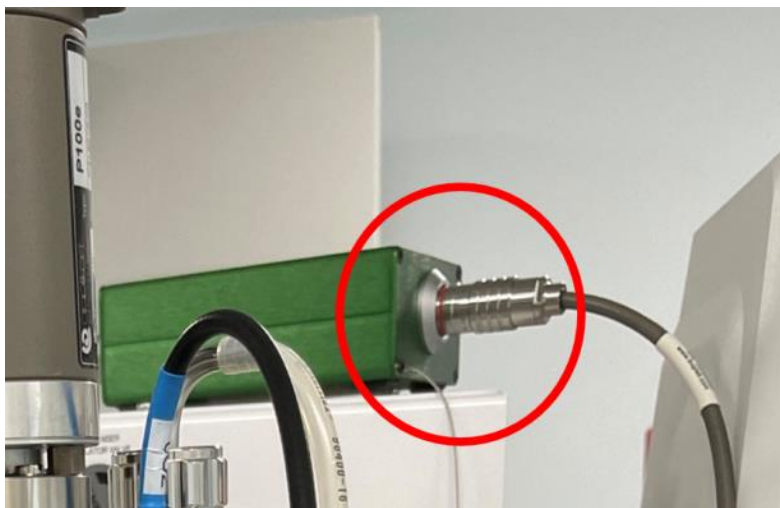
21. Ühendada pH, dO₂ ja Redox juhtmed vastavate anduritega. Veenduda, et andurite juhtmed on ühendatud kontrolleri esipaneeliga.



22. Ühendada tasemeandur.



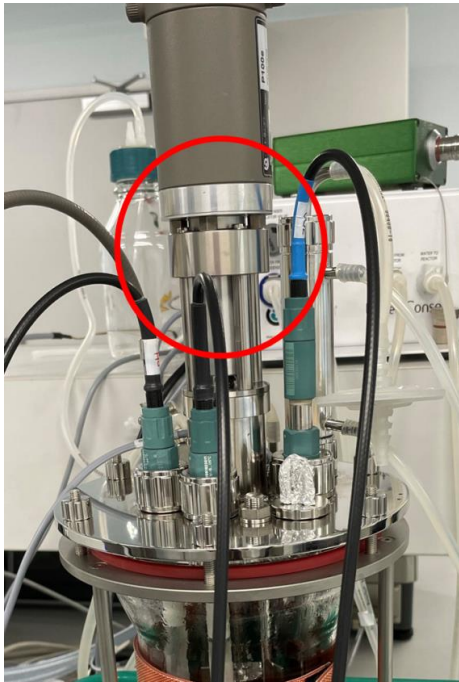
23. Ühendada biomassi anduri juhe biomassi mõõtmisseadmega.



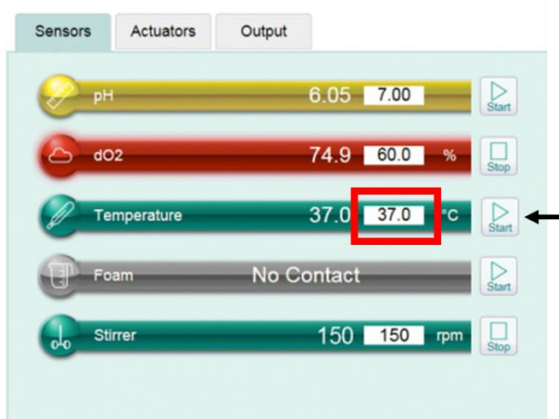
24. Täita termomeetri ava veega ning asetada sellesse termomeeter. Veenduda, et termomeetri juhe on ühendatud seadme esipaneeliga.



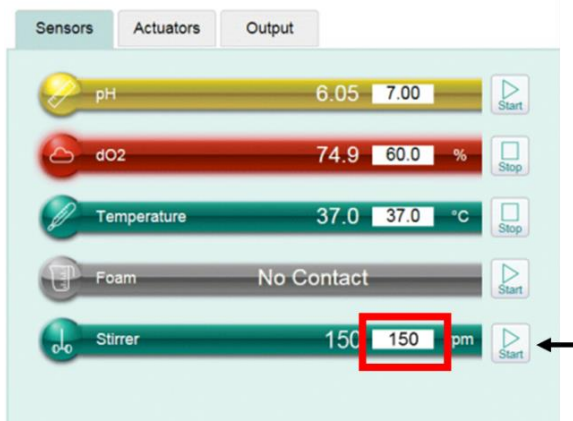
25. Asetada seguri mootor seguri peale.



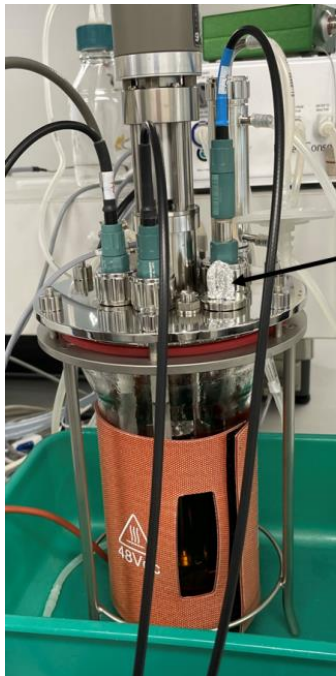
26. Kasutades tarkvara, sisestada temperatuuriväljale sobilik temperatuur. Vajutada „*Start*“.



27. Sisestada sobilik seguri kiirus. Kui söötme temperatuur on jõudnud soovitud väärtuseni, lülitada segur sisse, vajutades „*Start*“ nuppu.



28. Lisada valitud mikroorganismid fermenterisse steriilselt pipeti või süstla abil kolmikühenduse ava kaudu. Mikroobide lisamiseks eemaldada kolmikühenduse avadelt vatt ja foolium. Pärast mikroobide lisamist, asetada vatt ja foolium avadele tagasi. Mikroobide lisamiseks võib kasutada ka teisi meetodeid.



Kultuuri lisamise
ava

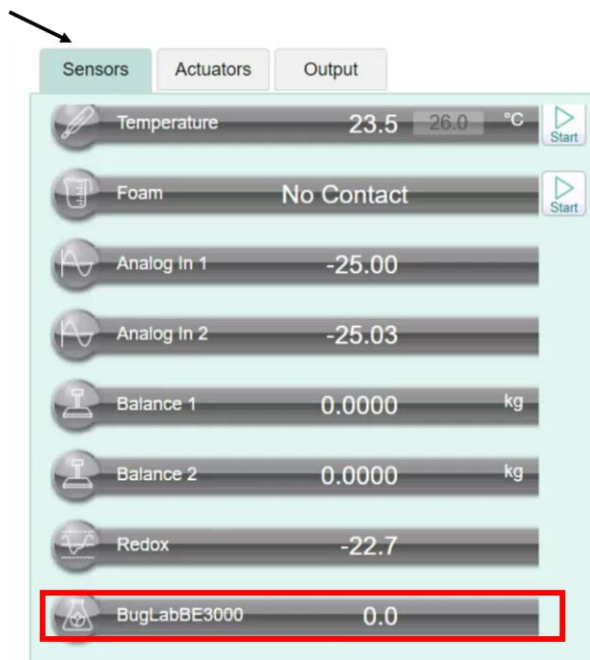
29. Määrata sobilik õhu kogus. Valida tarkvaras „Actuators“ ja vajutada „Air MFC“.
Sisestada ilmunud aknasse soovitud õhu maht (ml/min) ning vajutada „Start“ nuppu.

Sensors	Actuators	Output
	Alkali Pump	59.14 ml/min Σ 21.38 ml
	Acid Pump	62.41 ml/min Σ 12.76 ml
	Antifoam	29.37 ml/min Σ 1.74 ml
	TC	48 %
	N2 MFC	0.00 ml/min Σ 0.00 ml
	Air MFC	0.00 L/min Σ 0.00 L
	O2 MFC	0.00 L/min Σ 0.00 L
	CO2 MFC	0.00 ml/min Σ 0.00 ml
	MFC 5	0.00 ml/min Σ 0.00 ml
	MFC 6	0.00 ml/min Σ 0.00 ml

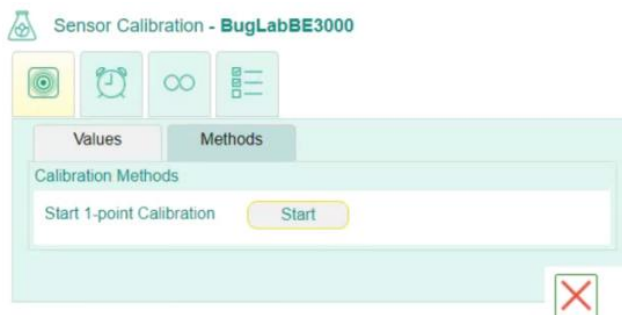
reset



30. Vajutada tarkvaras „Sensors“ nupp ja valida biomassi anduri menüü.



30.1. Valida „Methods“ → „1 step calibration“ → „Start“.

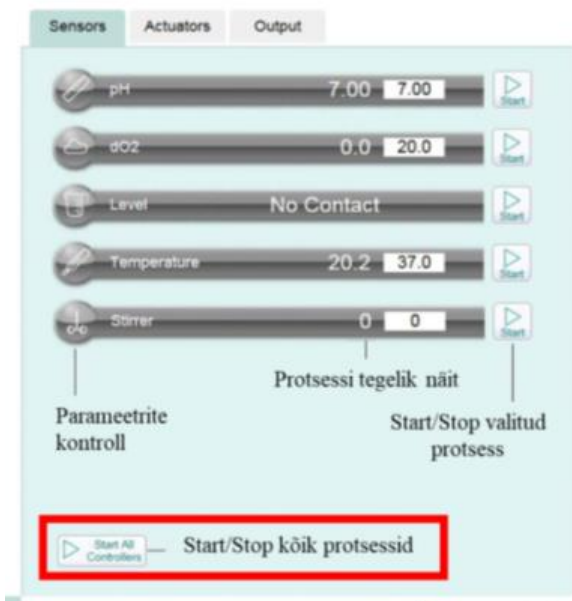


30.2. Sisestada ilmunud aknasse esialgne, fermenterisse lisatud rakkude kogus ja vajutada „Enter“. Oodata kalibreerimisprotsessi lõppemist.

30.3. Ilmunud aknas vajutada „Accept“ nuppu.

Fermenteri puhastamine

1. Vajutada „Start/Stop kõik protsessid“ nuppu.

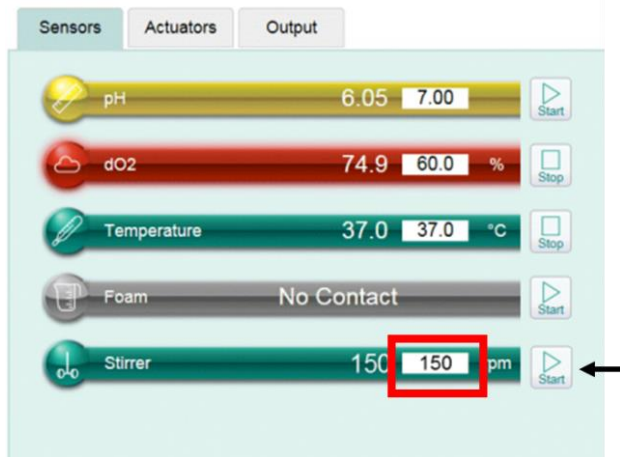


2. Valida tarkvaras „Actuators“ ja vajutada „Air MFC“. Ilmunud aknasse sisestada õhu maht 0 ml/min. Vajutada „Start“.



3. Ühendada fermenteri kaane küljest lahti kõik andurid ja voolikud ning seguri mootor seguri küljest.
4. Võtta kõik andurid fermenteri anumast välja.
5. Keerata fermenteri kaane kinnitusmutrid lahti.

6. Tõsta kaas anumalt maha.
7. Valada mikroobe sisaldav sööde anumast välja.
8. Pesta anum ja andurid veega, loputada destilleeritud veega ja kuivatada paberrätikuga.
9. Lisada fermenterisse 1 L destilleeritud vett ja KOH (5,611 g/L).
10. Asetada fermenteri kaas fermenterle.
11. Ühendada seguri mootor seguriga.
12. Sisestada tarkvarasse segamiskiirus 200 rpm ja vajutada „*Start*“.



13. Segamise/puhastamise protsess kestab 30 minutit.
14. Vajutada seguri peatamiseks „*Stop*“ nuppu.
15. Eemaldada seguri mootor segurilt.
16. Eemaldada fermenterilt kaas.
17. Valada lahus fermenterist välja.
18. Loputada anum destilleeritud veega.

**Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning
juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, Pavel Sahharov,

sünniaeg 01.04.1993,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö Fermenteri tööpõhimõtte ja kasutusvõimalused mikrobioloogias, mille juhendajad on nooremprofessor Helena Andreson, PhD ja Maarja Abel, BSc

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____

(allkiri)

Tartu, 24.05.2021

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

Helena Andreson

24.05.2021

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)

Maarja Abel

24.05.2021

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)