

SUMMARY

The aim of this thesis was to determine conditions for producing high yields of acetoin in bioreactor using *Lactococcus lactis* strain IL1403 $\Delta dhABX$. Batch and fed-batch cultivation modes were used.

Important experiment parameters are final titer, productivity and conversion rate. Final titers of acetoin were 64.20 g/l and 65.77 g/l, average was 64.99 g/l. Productivities in fed-batch experiments were 2.32 g/l·h and 2.08 g/l·h, making the average 2.20 g/l. The average glucose to acetoin conversion rate was 69.17 % - 0.383 moles of sugar was converted to 0.264 moles of acetoin.

It can be concluded that:

- 1) Initial sugar concentration needs to be low, otherwise cells are confronted with high osmotic stress. Due to stress, acetoin production is halted and big proportion of the sugar is left unconsumed. Therefore, fed-batch fermentation is preferred over batch.
- 2) Cells are sensitive to high levels of acetoin and it starts to inhibit the cell metabolism. With laboratory evolution this obstacle could be conquered.
- 3) It is essential to establish aerobic conditions because this is foundation for producing acetoin. In anaerobic conditions formate is synthesized and some of potential acetoin is lost.
- 4) It is not sustainable to continue work with this strain, because it is too weak and can not compete with WT contamination. In the future, work with *Lactococcus lactis* strain IL1403 ΔdhA using the same fed-batch setup is recommended.

KOKKUVÕTE

Töö eesmärk oli kindlaks määrata tingimused bioreaktoris, milles *L. lactis* IL1403 $\Delta dhABX$ mutant toodaks kõige rohkem atsetoiini. Kasutati nii annuskultuuri kui ka poolperioodilist kultiveerimist.

Poolperioodilises kultiveerimises on oluline aine lõpp-saagis, produktiivsus ja lähteaine ja produkti moolide suhe. Atsetoiini lõpp-kontsentratsioonid olid 64.20 g/l ja 65.77 g/l, kahe katse keskmine on 64.99 g/l. Produktiivsused olid 2.32 g/l·h ja 2.08 g/l·h, mis teeb kahe katse keskmiseks 2.20 g/l·h. Keskmiselt konverteeriti 69.17 % suhkrut atsetoiiniks. Moolides arvutatuna, 0.383 moolist glükoosist sai 0.264 mooli atsetoiini.

Töö peamised järeldused on:

1. Algne suhkru kontsentratsioon peab olema madal, et rakkudel ei tekiks osmootset stressi. Liiga kõrge kontsentratsiooni korral jääb suur osa glükoosist söömata ja tekib vähem soovitud produkti – atsetoiini.
2. Kõrge atsetoiini kontsentratsioon reaktoris hakkab raku elutegevust ja atsetoiini tootmist inhibeerima. Inhibitsiooni vältimiseks tuleks kasutada laboratoorset evolutsiooni, mille käigus suurendatakse tüve tolerantsust atsetoiinile.
3. Aeroobsete tingimuste tagamine on atsetoiini tootmise aluskivi. Anaeroobsetes tingimustes toodetakse formiaati, mille tõttu atsetoiini saagis väheneb.
4. Tulevikus ei ole mõistlik jätkata tööd selle tüvega, sest tüvi on liiga haavatav välisele saastusele. Uurimistööd tasuks jätkata *Lactococcus lactis* IL1403 ΔdhA mutandiga poolperioodilises kultuuris.