



ERAF projekta Nr. 1.1.1.1/16/A/113 “Jaunas pieejas izstrādāšana vienlaicīgai bioetanola, furfuroļa un citu vērtīgu produktu bezatlikumu iegūšanai no vietējiem zemkopības pārpalikumiem”

Atskaite par veiktajām darbībām 11. periodā 01.10.2019-31.12.2019.

1. Furfuroļa, lipīdu un etanola iegūšana no hemicelulozes C5- cukuriem

1.1.1. Rapšu salmu priekšapstrādes pētījumi

Projekta 11. periodā darba mērķis bija: Lignocelulozes ķīmiskā sastāva un iznākuma izmaiņas atkarībā no pentožu dehidratācijas procesa parametriem. Aktivitātes “Rapšu salmu priekšapstrādes pētījumi” īstenošanai veica rapšu salmu katalītisko hidrolīzi, izmantojot unikālo eksperimentālo pilotiekārtu, ar kuras palīdzību iespējams izmainīt biomasas šūnapvalka mehānisko un ķīmisko struktūru, un padarīt to vieglāk pārstrādājamu ogļhidrātu monomēros. Mērķa īstenošanai 11. periodā bija paredzēts izpētīt celulozes satura izmaiņas atkarībā no pentožu dehidratācijas procesa parametriem:

- 1) celulozes satura izmaiņas;
- 2) pētniecības rezultātu publiskas pieejamības nodrošināšana.

Rezultātā ir izpētīta celulozes satura un iznākuma izmaiņas atkarībā no katalizatora koncentrācijas un katalizatora daudzuma izmaiņām, kā arī no temperatūras izmaiņām un atkarībā no procesa ilguma.

1.2. Hemicelulozes C5-cukuru pielietojums lipīdu mikrobioloģiskai iegūšanai

Darba gaitā tika turpināti pētījumi ar lipīdsintezējošo raugu celmiem no ģintīm *Solicoccozyma* un *Naganisha*. Eksperimentu gaitā tika veikta rauga šūnu neitrālo lipīdu, fosfolipīdu un taukskābju profila analīze ar plānslāņu- un gāzu hromatogrāfiju. Šajā pētījumā tika pārbaudīti arī lipīdsintezējošo raugu celmi no ģints *Lipomyces*, kas aug uz ksilozes barotnes un rapšu salmu lignocelulozes C5-hidrolizātem. Izpētīta iespēja izmantot sausā stāvoklī uzglabāto *Lipomyces* celmu kā sējmateriālu lipīdu producēšanai.

1.3.Hemicelulozes C5-cukuru pielietojums bioetanola iegūšanā ar ģenētiski konstruētu raugu celmu(-iem)

Turpināts pētījums ar ģenētiski modificētu raugu *Hansenula polymorpha* celmu un to spēju fermentēt ksilozi un rapšu salmu lignocelulozes hidrolizātu, kas satur C5-ogļhidrātus. Substrātu rūgšanas process tika veikts, izmantojot sauso raugu, lai izpētītu sausā rauga spēju uzturēt efektīvu bioetanola sintēzi.

2. Bioetanola iegūšana no hemicelulozes C6-cukuriem un lignocelulozes un etanola raugu atlikumu pielietojums

2.1. Bioetanola iegūšana no hemicelulozes C6-cukuriem un lignocelulozes

Turpināti eksperimenti ar raugu šūnu imobilizāciju uz dažādu veidu nesējiem. tādiem kā šamots, hidroksilapatīts un rapšu salmi. Pārbaudīta raugu maksimālo ciklu skaits līdz kuram var notikt fermentācija un iegūts etanols. Eksperimentos izmantots natīvs raugs, kas inkubēts šķīdumā pie 100 apgr. un 30°C 1stundu. Inkubācijas šķīdumā tiek noteikts rauga atlikums ar sausā svara metodi. Fermentācijas eksperimenti ar imobilizētiem nesējiem tiek veikti iepriekš sagatavotā hidrolizātā, kurš iegūts no saņemtajiem substrātiem un pēc katra fermentācijas cikla nesēji tiek žāvēti termostatā. Šķīdums, kurā notikusi fermentācija tiek izmantots etanola noteikšanai.

2.2. Etanola rauga atlikumu pielietojums

Rauga biomasu pēc etanola iegūšanas turpināja testēt dažādos biotehnoloģiskajos procesos vides attīrīšanas jomā. Šī posma eksperimentos testēja melasi saturošos notekūdeņus, kuri veidojas fermentācijas procesos. Melases notekūdeņu tumši brūnā krāsa un liels ŪSP (ķīmiskais slāpekļa patēriņš) melanoidīna un citu komponentu dēļ, padara šos rūpnieciskus atkritumus par nopietnu piesārņojuma avotu.

Rauga *Saccharomyces cerevisiae* kultūru pēc etanola iegūšanas inkubēja melases notekūdeņos 48 stundas pie 30 °C. Tika konstatēts, ka rauga šūnas var samazināt brūnās krāsas intensitāti pat līdz 24 %, salīdzinot ar sākotnējo intensitāti. Tomēr rauga efektivitāte šajā procesā ir atkarīga no barotnes sastāva, kurā ieguva biomasu etanola ražošanai.

Tāpat turpināti eksperimenti ar karstuma šoka proteīnu Hsp70 noteikšanu etanola raugos. Kā paraugi izvēlēti raugi, kura deva visaugstāko etanola iznākuma rezultātu pēc to

fermentācijas hidrolizātos. Noteikts arī β -glikānu daudzums šūnās, kuras ņemtas no fermentācijas, kas veiktas ar natīvu biomasu. β -glikāni detektēti spektrofotometriski izmantojot speciālu raugu glikānu enzimatiskās noteikšanas kitu.

3. Lignīna izmantošana medicīnisko sēņu kultivēšanas uzlabošanai un lakāzi saturoša enzīmu kompleksa sintēzei

3. 1. Lignīna izmantošana sēņu kultivēšanas uzlabošanai

Tiek pētīts *L.edodes* 3565 biomasas iznākums barotnē ar pievienotu hidrolizētu lignīnu palielināta tilpuma dziļumkultūras apstākļos bez aerācijas (rpm 0). Rezultāti liecina, ka lignīns stimulē sēņu fermentu sintēzi. Noteikta lignolītiskā kompleksa fermenta - lakāzes aktivitāte dinamikā (30 dienas).

3.2. Proteīnu un bioloģiski aktīvo komponentu daudzumu salīdzinājums sēņu biomasā to iegremdētās kultūras fermentācijas apstākļos

Lentinula edodes kultivēšanas barotnēs tika analizēti ārpusšūnas proteīni. No supernatanta iegūtie paraugi tika liofilizēti un 10 reizes iekonzentrēti A-buferī. Supernatanti analizēti izmantojot elektroforēzi natīvā 10% PAA gēlā. Veicot forēzi netiek pielietoti denaturējoši aģenti, tāpēc proteīni saglabā fermentatīvo aktivitāti un konformāciju. Lai noteiktu lakāzes un peroksidāzes fermentu aktivitāti poliakrilamīda gēla elektroforēzē, tika izmantots ABTS un TMPD (N, N, N', N' - tetrametilfenilēndiamīns) hromogēnais substrāts. Peroksidāzes aktivitāti vizualizē, inkubējot gēlu 50 mM nātrija acetāta buferšķīdumā pH 5.0, kas satur 0,125 mM H₂O₂ un 2 mM ABTS. Lakāzes aktivitātes skrīningam kā substrāts tika izmantots ABTS, kas reakcijā ar lakāzi veido tumši zaļu krāsojumu.

Tika novērtēta lakāzes aktivitāte *Lentinula edodes* un *Ganoderma lucidum* celmiem. Sēņu micēlijs tika kultivēts iesala ekstrakta barotnē ar rapšu salmu lignīna piedevu. Ekstracelulārie proteīnu spektri mainījās atkarībā no substrāta. Mainot kultivēšanas substrātu var ietekmēt lakāžu un peroksidāžu izoformu spektru un to intensitāti.

Analizējot *L. edodes* proteīnu spektru un intensitāti natīvajā PAGE gēlā redzam, ka proteīnu spektrs paliek nemainīgs, bet intensitāte mainās atkarībā no aerācijas apstākļiem. Analizējot *G. lucidum* kultivēšanas vides supernatantus redzam, ka atkarībā no kultivēšanas apstākļiem iegūstam atšķirīgu lakāzes zimogrammas ainu. Natīvajā

poliakrilamīda gēla elektroforēzē, aerācijas apstākļos kultivētai *G. lucidum*, novērojām trīs lakāzes izoformas, bet bez aerācijas audzētam micēlija supernatantam tikai vienu izoformu.

3.3. Lignīna izmantošana medicīnisko sēņu lakāzi saturoša enzīmu kompleksa sintēzei

Turpinās pētījumi par sēņu *L. edodes* 3565 un *G. lucidum* 9621 lakāzes aktivitātes izmaiņām supernatantos glabāšanas laikā pie -20°C un $+4^{\circ}\text{C}$ pie dažādiem kultivēšanas apstākļiem (rpm0 un rpm140). Tika analizēta ar un bez lignīna audzētu sēņu supernatantu ekstracelulārās lakāzes aktivitāte pirms un pēc fermentu paraugu sasaldēšanas un novērtēta saldēšanas ietekme uz tās aktivitāti.

3.4. *Drosophila melanogaster* pielietojums kā modeļorganismu priekš bioloģiski aktīvu un iespējami genotoksisku efektu konstatēšanas sēņu biomasā un ekstraktos pēc to audzēšanas lignīnu saturošā barotnē

Turpināta dziļumkultūrās ar 2% lignīna piedevu savairotu *L. edodes* 3565 un *G. lucidum* 9621 micēliju bioloģiskās aktivitātes izpēti *D. melanogaster* organismā, apskatot antioksidatīvo un imūno atbildi. Pēc kultivēšanas aerācijas apstākļos sēņu micēliju un lignīna substrātu tehniski nav iespējams atdalīt, tāpēc testos izmantoti ekstrakti, kas iegūti no micēlija un lignīna maisījuma. *D. melanogaster* kāpuriem ekstraktu grupās parādīta paaugstināta ūdeņraža peroksīda stresa rezistence, izmantojot kustību frekvences testu, antioksidatīvo enzīmu (superoksīda dismutāzes un katalāzes) aktivitātei saglabājoties kontroles grupas līmenī. *L. edodes* ekstrakta grupās kāpuriem novērota intensīvāka melanizācijas reakcija, salīdzinot ar kontroles grupu.

5. Pētniecības rezultātu publiskas pieejamības nodrošināšana

Iegūtie rezultāti regulāri tiek publicēti un atainoti LU portālā, kā arī pētniecības rezultātu publiskai pieejamībai pārskata periodā tika sagatavota un iesniegta zinātniskā publikācija, par tēmu:

- 1) Differential Catalysis of Depolymerisation and Dehydration Reactions: Producing Furfural from Plant Biomass.

Iesniegta publicēšanai žurnālā - "Journal of Renewable Materials".