**Atskaite par veiktajām darbībām 10. periodā 01.07.2019-30.09.2019.**

1. **Furfurola, lipīdu un etanola iegūšana no hemicelulozes C5- cukuriem**
   1. **Aktivitāte: Rapšu salmu priekšapstrādes pētījumi**

Projekta 10. periodā darba mērķis bija: Rapšu salmu hemiceluložu polisaharīdu hidrolīze un pentožu monosaharīdu dehidratācijas produktu iznākuma izmaiņu izpēte atkarībā no priekšapstrādes procesa tehnoloģiskiem 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 10. periodā bija paredzēts izpētīt rapšu salmu lignocelulozes ķīmiskā sastāva un iznākuma izmaiņas atkarībā no pentožu dehidratācijas procesa parametriem:

1) lignocelulozes iznākuma izmaiņas;

2) lignocelulozes sastāva izmaiņas;

3) pētniecības rezultātu publiskas pieejamibas nodrošinašana.

Rezultātā ir izpētīta lignocelulozes ķīmiskā sastāva un iznākuma izmaiņas atkarībā no katalizatora koncentrācijas un katalizatora daudzuma izmaiņām, kā arī no temperatūras izmaiņām un atkarībā no procesa ilguma. Turpinās eksperimentālais darbs pie celulozes satura izmaiņas izpētes lignocelulozes paraugos un celulozes depolimerizācijas pakāpes izmaiņām atkarībā no priekšapstrādes procesa parametriem.

* 1. **Hemicelulozes C5-cukuru pielietojums lipīdu mikrobioloģiskai iegūšanai**

Darba gaitā tika turpināti pētījumi ar dažādu lipīdsintezejošo *Vanrija humicola*, *Buckleyzyma aurantiaca*, *Solicoccozyma terricola*, *Naganisha albida,* raugu celmiem. Raugu biomasa tika audzēta uz ksilozes sintētiskās barotnes ar paaugstinātu cukura saturu un C-5 cukuriem no rapšu salmu hidrolizāta. Tika veikti eksperimenti ar furfurola, 5-HMF un fenola savienojumu detoksikācijas no C5 hidrolizātiem. Šim nolūkam tika izmantotas dažādu marku (tipu) aktivētās ogles (kokogles, OLB, BC 3, 4 C). Tika veikta lipīdu ekstrakcija no natīvām un dehidratētām raugu šūnām. Taukskābju metilēšana tika veikta lai noteikt taukskābju saturu ar gāzu hromatogrāfijas metodi. Neitrālo lipīdu un fosfolipīdu saturs noteikts ar plānslāņu hromatogrāfijas metodi.

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

Tika turpināti eksperimenti ar ģenētiski modificētu raugu *Ogataea polimorpha* celmiem, kas spēj fermentēt C5-ogļhidrātus (ksilozes un C5-hidrolizātus) ar etanola veidošanos. Veiksmīgai rauga fermentācijai tika veikti eksperimenti ar hidrolizātu sākotnējo detoksikāciju, izmantojot mikrobioloģiskās metodes. Tika noteikts rauga biomasas pieaugums un spēja sintezēt etanolu uz hidrolizātiem pēc to sākotnējās detoksikācijas.

**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 rapšu salmu hidrolizātā fermentēto raugu izmantošanas iespējām karstuma šoka proteīnu Hsp 70 sintēzē. Raugi *Saccharomyces cerevisiae* fermentēti pie atšķirīga stundu skaita, atšķirīgām temperatūrām – 30°C un 37°C un atšķirīga aerācijas līmeņa. Eksperimentos izmantots gan natīvs gan dehidratēts raugs. Labākie paraugi pēc etanola sintēzes līmeņa, tika atlasīti un dezintegrēti. Paraugos noteikts proteīnu daudzums un tie uznesti uz SDS gēla. Proteīnu Hsp 70 detekcija notika izmantojot Western Blotting metodi.

Papildus tam turpināti eksperimenti ar raugu imobilizāciju uz dažādu veidu nesējiem. Par nesējiem izmantoti šamots, hidroksilapatīts un rapšu salmi. Pārbaudīta uz šiem nesējiem imobilizēto raugu fermentācijas spēja līdz pat piektajam ciklam, ar mērķi iegūt etanolu. Darbs veikts ar svaigi izaudzētu natīvu raugu biomasu, to šķīdumā inkubējot termostatā pie 100 apgr. un 30°C 1stundu. Tad inkubācijas šķīdumā nosaka rauga atlikumu ar sausā svara metodi. Veicot atkārtotu nesēju atmazgāšanu un arī šajā šķīdumā nosakot rauga atlikumu. Nesējus pirms fermentācijas izžāvē 24 stundas pie 30°C. Fermentācija ar imobilizētiem nesējiem tiek veikta iepriekš sagatavotā hidrolizātā, kurš iegūts no saņemtajiem substrātiem. Pēc katra fermentācijas cikla nesēji tiek žāvēti termostatā. Šķīdums, kurā notikusi fermentācija tiek sagatavots etanola noteikšanai.

**2.2.** **Etanola rauga atlikumu pielietojums**

Turpinot pētījumus par rauga *Saccharomyces cerevisiae* biomasas pielietošanu vides biotehnoloģiskajos procesos (2.2.aktivitāte), veica eksperimentu sēriju ar mērķi noteikt benzalkonija hlorīda (BAC) ietekmi uz antibiotiku rezistences rašanos aktīvo dūņu (AD) baktērijās, un pievienotā rauga biomasas lomu šajā procesā. Ir zināms, ka četraizvietotie amonija savienojumi, tajā skaitā BAC, veicina antibiotiku rezistences rašanos baktērijās. Eksperimentos salīdzināja dažādu testētu paraugu inhibīcijas zonas rādiusu ciprofloksacīna klātbūtnē. Inhibīcijas zonu rādiuss testētajos paraugos bija atšķirīgs, galvenokārt, atkarībā no šķidrās fāzes sastāva dūņu paraugos. Variantam ar sintētiskajiem notekūdeņiem inhibīcijas zonas rādiuss bija būtiski (p<0.05) mazāks, nekā AD ar reālajiem notekūdeņiem. Šo starpību var izskaidrot ar baktēriju kopienas sastāva izmaiņām sintētisko notekūdeņu klātbūtnē. Pievienojot rauga *S. cerevisiae* biomasu aktīvajām dūņām sintētiskajos notekūdeņos, tika konstatēta tendence palielināties baktēriju antibiotiku rezistencei testētos apstākļos. Iegūtie dati norāda uz nepieciešamību novērtēt iespējamos riskus, kuri ir saistīti ar rauga biomasas pielietošanu notekūdeņu attīrīšanas procesos.

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

**3. 1. Aktivitāte: Lignīna izmantošana sēņu kultivēšanas uzlabošanai.**

*Lentinula edodes* un *Ganoderma lucidum* izmantošana rapšu salmu atlikumu biodegradācijā dod iespēju iegūt izejmateriālu, no kura var izdalīt bioaktīvas vielas un iegūt lignīnu degradējošus enzīmus. Sēņu audzēšanas procesā svarīgi ir iegūt gan ekstracelulāros fermentus, gan arī sēņu biomasu, kuras sastāvā ir augstvērtīgi proteīni, kā arī daudzas bioloģiski aktīvas vielas, ieskaitot savienojumus ar antioksidatīvām īpašībām. Sēnes tiek kultivētas dziļumkultūrās iesala barotnēs pie dažādiem aerācijas režīmiem (rpm0 un rpm140), ar vai bez rapšu salmu lignīna piedevas. Sēņu biomasa tiek iegūta, atdalot sēņu micēliju no substrāta, centrifugējot un skalojot to ar destilētu ūdeni un žāvējot + 48oC.

Gan *L.edodes*, gan *G.lucidum* micēlija biomasas iznākums bezpiedevu barotnēs ir apmēram 2 reizes lielāks, audzējot sēnes ar aerāciju nekā kultivējot micēliju stacionāri. Pievienojot lignīnu kultivēšanas substrātam, tāpat kā agarizētajās barotnēs arī dziļumkultūrās novēro būtisku sēņu micēlija masas pieaugumu pie abiem kultivēšanas režīmiem (rpm0 un rpm140). Lai iegūtu precīzus datus par biomasas pieaugumu aerētajās kultūrās grūtības sagādā sēņu micēlija atdalīšana no lignīna daļiņām. Stacionārajos apstākļos sēņu micēlija lielākā masa aug uz barotnes virsmas un kultivēšanas beigās to ir vieglāk atdalīt no lignīnu saturošās barotnes. *G. lucidum* tika novērots straujāks biomasas pieaugums un lielāka rezultātā iegūtā micēlija biomasa gan stacionārā (3,1± 0,4 reizes) gan kultivēšanas procesā ar aerāciju (3,5 ± 0,7 reizes) nekā audzejot *L.edodes* 3565 tādos pašos apstākļos.

**3. 2. Aktivitāte: Proteīnu un bioloģiski aktīvo komponentu daudzumu salīdzinājums sēņu biomasā to iegremdētās kultūras fermentācijas apstākļos.**

Lignīna biokonversija ar lignīndegradējošo baltās trupes sēņu palīdzību dod iespēju iegūt gan vērtīgu biomasu no kuras potenciāli izdalīt bioloģiski aktīvus savienojumus (polisaharīdus, lipīdus, proteīnus utt). Tā kā bazidiomicētēm ir ārkārtīgi izturīgs šūnapvalks, efektīva starpšūnu olbaltumvielu ekstrakcija ir galvenais solis sēņu proteoma pētījumos. Pēc inkubācijas micēlija biomasu savāc filtrējot un noskalojot ar destilētu ūdeni. Olbaltumvielas tika ekstraģētas ar dažādiem buferiem.

Veikti micēlija biomasas sastāva pētījumi, lai noskaidrotu lignīna piedevu ietekmi uz proteīnu koncentrāciju izmaiņām. Olbaltumvielu koncentrācija *L. edodes* un *G.lucidum* micēlija biomasā, supernatantos un karsta ūdens ekstraktos tika noteikta, izmantojot Pierce 660nm Protein Assay reaģentu. Ārpusšūnas proteīni izolēti no *L.edodes* un *G.lucidum* kultivēšanas barotnes, pēc liofilizācijas paraugi iekoncentrēti A-buferī un analizēti izmantojot 10% denaturējošo poliakrilamīda gēla elektroforēzi. Krāsojot ar Protein Silver Stain Kitu varam salīdzināt proteīnu spektru, proteīnu molekulmasas un koncentrācijas.

Olbaltumvielu spektrs mainās atkarībā no sēņu audzēšanai izmantotā substrāta. Hidrolizēto rapšu salmu lignīna un Mn2+ pievienošana kultivēšanas barotnei ietekmē proteīnu spektru un koncentrāciju. Barotnēs ar lignīna piedevām kultivējot sēņu micēliju stacionāros apstākļos proteīnu koncentrācija kultivēšanas vidē pieauga 3-3,5 reizes, bet audzējot aerācijas režīmā 1,9-2,2 reizes.

**3. 3. Aktivitāte: Lignīna izmantošana medicīnisko sēņu lakāzi saturoša enzīmu kompleksa sintēzei.**

Baltās trupes sēnes veģetatīvā micēlija augšanas stadijā producē ekstracellulāros enzīmus, kas ir iesaistīti lignīna degradācijas procesos: lakāzes un peroksidāzes.

Agarizētās barotnēs tiek veikti skrīninga standarta krāsu testi lignīnolitisko fermentu aktivitātes kvalitatīvai noteikšanai. Mangāna peroksidāzes aktivitāti agarizētajās barotnes nosaka ar indikatoro reaģentu N,N,N’,N”tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD, reakcijas maisījums MnP klātbūtnē iegūst tumši violetu nokrāsu). Kopējo peroksidāžu aktivitātes noteikšanai izmanto pyrogallolu (dzeltenbrūns krāsojums ). Lignīna peroksidāzes aktivitātes konstatēšanai barotnēm tiek pievienota krāsviela AzurB (zila krāsojuma atkrāsošanās). Lakāzes konstatēšanai izmanto ABTS (zaļš krāsojums). Salīdzinātas micēlija diametra un iekrāsošanās zonu izmaiņas sēņu micēlija inkubācijas laikā. Tika veikti eksperimenti lignīna peroksidāzes aktivitātes konstatēšanai divos *G.lucidum* celmos (3515 un 9621), tos audzējot agarizētajās iesala barotnēs ar AzurB krāsvielu. Vizuāli redzams, ka lignīns paātrina micēlija augšanu, bet tā kā lignīna pievienošana barotnei to nokrāso tumšā krāsā, tas apgrūtina izsekot krāsu izmaiņām, kas liecinātu par lignīna peroksidāzes aktivitātes parādīšanos. Arī samazinot lignīna piedevas koncentrāciju barotnē no 2% līdz 0,5% - nedeva gaidītos rezultātus. Bezpiedevu barotnē krāsu izmaiņas redzamas jau 11. dienā. 14. dienā zaļganu krāsojumu novēro arī micēlijam, gan lignīnsaturošās barotnēs, gan kontrolē, kas liecina par lignīna peroksidāzes aktivitāti.

Skrīninga rezultātā konstatējām, ka *G. lucidum* 9621 satur visus trīs pētījumā aplūkotos ligninolītiskos enzīmus – lakāzi (Lac), lignīna peroksidāzi (LiP) un mangāna peroksidāzi (MnP), taču *L.edodes* 3565 satur tikai lakāzi un mangāna peroksidāzi.

Noteikta un salīdzināta dažādu glabāšanas apstākļu ietekme uz sēņu lakāzes fermentu kompleksa aktivitātes izmaiņām. Fermentu aktivitātes saglabāšanai būtiska nozīme ir glabāšanas temperatūrai, sēņu kultivēšanas apstākļiem un sēņu sugai. Pētījumā izmantoti trīs glabāšanas režīmi: +4oC, -20oC un +4oC pēc liofilizācijas.

Žāvēšana saldējot, kas arī zināma kā liofilizācija vai kriožāvēšana ir dehidrācijas process, ko parasti izmanto, lai saglabātu ātri bojājošos paraugus. Žāvēšanas procesā, samazinot vides spiedienu, sasaldētais ūdens sublimējas tieši no cietā uz gāzes stāvokli*.*  Liofilizācijas procesa laikā produkts tiek žāvēts nevis karsējot, bet sasaldējot zem pazemināta spiediena, tāpēc fermentiem nevajadzētu būtiski zaudēt savu aktivitāti, bet mūsu pētījumā tiek novērots fermentu aktivitātes kritums uzglabāšanas laikā liofilizētajos paraugos. Liofilizētos paraugus ir iespējams sakoncentrēt, lai veiktu lakāzi saturošā enzīmu kompleksa Zymograma analīzi. Tika noteikta lakāzes aktivitāte pirms un pēc saldēšanas un liofilizācijas un salīdzināta ar ledusskapī glabātiem paraugiem. Glabājot *G.lucidum* sēņu supernatantu paraugus ledusskapī +4oC, to lignīnolītisko fermentu aktivitāte 3 mēnēšu laikā pakāpeniski samazinās līdz aptuveni 75% no sākotnējās vērtības, bet *L.edodes* saglabā tikai 24%. Savukārt sasaldēto *G.lucidum* paraugu fermentu aktivitāte pēc gada bija 28-35 % no sākotnējās vērtības, bet *L.edodes -*26-30% .

Liofilizētiem sēņu supernatantiem fermentatu aktivitātes saglabāšanās ir atkarīga no kultivēšanas apstākļiem. Stacionāros apstākļos kultivētām sēnēm supernatantos fermentu aktivitāte liofilizētiem paraugiem saglabājas labāk. Liofilizētiem, stacionāri audzētiem paraugiem  *G.lucidum* lakāzes aktivitāte bija 89-90 % no sākotnējās vērtības.

**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**

Tiek turpināta dziļumkultūrās ½ MEB barotnē ar 2% lignīna piedevu savairotu *L. edode*s 3565 un *G. lucidum* 9621 biomasu ekstraktu bioloģiskās aktivitātes izpēte drozofilas modelī.

Lai papildus novērtētu doto ekstraktu iespējamo genotoksisko aktivitāti, veikts SMART jeb somatisko mutāciju un rekombinācijas tests (SMART) un uzsākta atsevišķu šūnu gēla elektroforēze jeb “komētas” tests. Ekstraktu grupās, izmantojot SMART testu, netika novērota genotoksiska ietekme.

Priekšizpētes eksperimentos novērots superoksīda dismutāzes (SOD) un katalāzes (CAT) pieaugums ar *L. edodes* augļķermeņu ekstraktu barotiem kāpuriem pēc pakļaušanas 50 mM H2O2. Izmatojot doto eksperimenta dizainu, uzsākta SOD un CAT noteikšana kāpuros, kas saņēmuši dziļumkultūrās savairotu *L. edodes* un *G. lucidum* micēlija biomasu ekstraktus.

*L. edodes* augļķermeņu ekstraktu grupās novērota mazāka imago letalitāte septiskas infekcijas gadījumā un intensīvāks melanizācijas process. Iegūti pirmie rezultāti par dziļumkultūrās savairotu *L. edodes* un *G. lucidum* biomasu ekstraktu ietekmi uz kāpuru melanizācijas reakcijas intensitāti un imago letalitāti *Staphylococcus sp.* septiskas infekcijas gadījumā.

**5.** **Pētniecības rezultātu publiskas pieejamības nodrošināšana.**

Pētniecības rezultātu publiskai pieejamībai pārskata periodā tiek gatavotas divas publikācijas par tēmu:

1. Furfural as Potential feedstock for Polymer Production: Conformity of the Catalytic Activity of Salt in the Pretreatment Process;
2. Differential Catalysis of Depolymerisation and Dehydration Reactions: Producing Furfural from Plant Biomass.

Tās tiks iesniegtas publicēšanai žurnālā - “Journal of Renewable Materials”

Ar šādiem nosaukumiem ir sagatavota mutiskā prezentācija un postera prezentācija dalībai starptautiksā konferencē: “[The 10th Conference on Green Chemistry and Nanotechnologies in Polymeric Materials (GCNPM 2019)](http://www.techscience.com/JRM/special/spec1.html" \t "_blank)”, kas notiks Rīgā no 9 līdz 11 oktobrim.