

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**SOFOROLIPĪDU RAŽOŠANA NO LIPĪDIEM  
BAGĀTIEM PĀRTIKAS ATKRITUMIEM AR  
*STARMERELLA BOMBICOLA***

Bakalaura darbs

Autore: Līva Kristiāna Lukaša

Stud. apl. Nr.: 1119089

Darba vadītāja: Mg. biol. Ieva Bērziņa

Konsultanti: Dr. biol. Jānis Liepiņš, Dr. sc. ing. Elīna Dāce

Recenzents: Dr. biol. Armands Vīgants

RĪGA 2022

## KOPSAVILKUMS

Soforolipīdi ir biovirsmaktīvo vielu veids, kuru iespējams ražot mikrobiāli no dažādiem lipīdiem bagātiem substrātiem, tai skaitā atkritumiem. Šajā darbā noteica soforolipīdu ražošanai ar *Starmerella bombicola* piemērotāko lipīdiem bagātu atkritumu veidu, ņemot vērā titru, virsmaktīvās īpašības un ražošanas procesa ietekmi uz vidi. Soforolipīdu ražošanai izmantoja periodisko kultivēšanu bez piebarošanas. Lielāko soforolipīdu titru ( $41.57 \pm 1.07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ieguva, izmantojot rapšu eļļu no fritētavas ar pievienotu glikozi. Ražošanas procesam ar rapšu eļļu no fritētavas un pievienotu glikozi bija vismazākā ietekme uz vidi. Virsmaktīvās īpašības bija vienlīdz labas visiem soforolipīdiem, kas iegūti fermentācijās ar pievienotu glikozi.

Atslēgas vārdi: soforolipīdi, pārtikas atkritumi, periodiskā kultivēšana, aprites cikla analīze.

## SUMMARY

Sophorolipids are a type of biosurfactant which can be produced microbially from different lipid-rich substrates, including waste streams. In this work, the most suitable lipid-rich waste stream for sophorolipid production with *Starmerella bombicola* was assessed based on titer, surface active properties and the environmental impact caused by the production process. Sophorolipids were produced using batch fermentation. The largest sophorolipid titer ( $41.57 \pm 1.07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was obtained using waste cooking oil from frying with added glucose. The sophorolipid production process with waste cooking oil from frying with added glucose had the smallest environmental impact. The surface activities of all sophorolipids obtained in fermentations where glucose was added, were equally high.

Keywords: sophorolipids, food waste, batch fermentation, life cycle analysis.

# SATURS

|   |    |
|---|----|
| Ievads.....   | 6  |
| 1. Literatūras apskats .....  | 7  |
| 1.1. <i>Starmerella bombicola</i> vispārējs raksturojums .....                      | 7  |
| 1.2 Soforolipīdu īpašības un biosintēze .....                                       | 8  |
| 1.3 Soforolipīdu ražošana.....  | 10 |
| 1.3.1. Substrāti .....  | 10 |
| 1.3.2. Kultivēšanas apstākļi.....   | 13 |
| 1.4 Soforolipīdu ražošanas ietekme uz vidi .....                                    | 14 |
| 2. Materiāli un metodes .....   | 16 |
| 2.1 Materiāli .....   | 16 |
| 2.1.1 Iekārtas un mērinstrumenti.....   | 16 |
| 2.1.2 Ķīmiskās vielas un reaģenti .....   | 16 |
| 2.1.3 Lietojumprogrammas .....  | 16 |
| 2.2 Metodes .....   | 17 |
| 2.2.1 Rauga šūnu periodiskā kultivēšana .....                                       | 17 |
| 2.2.2 Šūnu skaita noteikšana .....  | 17 |
| 2.2.3 Soforolipīdu kvantificēšana fermentācijas vidē .....                          | 17 |
| 2.2.4 Lipīdu koncentrācijas noteikšana fermentācijas vidē .....                     | 18 |
| 2.2.5 Soforolipīdu virsmaktīvo īpašību novērtēšana ar stalagmometrijas metodi ..... | 18 |
| 2.2.6 Aprites cikla analīze.....  | 19 |
| 2.2.7 Datu apstrāde un statistiskā analīze.....                                     | 19 |
| 3. Rezultāti.....   | 21 |
| 3.1 Soforolipīdu koncentrācijas novērtēšana .....                                   | 21 |
| 3.2 Lipīdu un glikozes patēriņa noteikšana.....                                     | 23 |
| 3.3 Soforolipīdu virsmaktīvo īpašību novērtēšana.....                               | 25 |
| 3.4 Šūnu skaita noteikšana .....  | 26 |
| 3.5 Soforolipīdu ražošanas ietekmes uz vidi novērtējums .....                       | 27 |

|   |    |
|---|----|
| 4. Diskusija .....  | 29 |
| 4.1 Soforolipīdu koncentrācijas novērtēšana .....             | 29 |
| 4.2 Lipīdu un glikozes patēriņa noteikšana .....              | 31 |
| 4.3 Soforolipīdu virsmaktīvo īpašību novērtējums .....        | 32 |
| 4.4 Šūnu skaita noteikšana .....                              | 34 |
| 4.5 Soforolipīdu ražošanas ietekmes uz vidi novērtējums ..... | 34 |
| 4.6 Tālākie pētījumu virzieni .....                           | 35 |
| 5. Secinājumi .....   | 36 |
| 6. Pateicības .....   | 37 |
| 7. Literatūras saraksts .....                                 | 38 |
| Pielikumi.....  | 44 |

## IEVADS

Virsmaktīvās vielas tiek plaši izmantotas dažādās rūpniecības nozarēs kā emulgatori, detergenti, virsmas spraiguma samazinātāji, mitrinātāji, putotāji, solubilizētāji un biezinātāji. Biovirsmaktīvās vielas iegūst no atjaunojamiem bioloģiskas izcelsmes resursiem, izmantojot mikroorganismus (Thavasi & Banat 2019). Atšķirībā no sintētiskajām virsmaktīvajām vielām, tās ir ar zemāku toksiskuma līmeni un rada mazāku negatīvo slodzi uz vidi – tās viegli sadalās gan aerobā, gan anaerobā vidē (Madihalli & Doble 2019).

Soforolipīdi (SL) ir biovirsmaktīvās vielas, kuras mikroorganismi spēj sintezēt vislielākajā daudzumā (Paulino et al. 2016), tomēr tās tik un tā ir apmēram 20-30 reizes dārgākas par sintētiskajām virsmaktīvajām vielām (Dierickx et al. 2022). Sintētiskās barotnes sastāvdaļas un SL attīrīšanas process veido apmēram 60% no kopējām ražošanas izmaksām. Šīs izmaksas būtu iespējams samazināt, izmantojot lētākus substrātus, piemēram, atkritumproduktus, un optimizējot kultivācijas apstākļus (Ma et al. 2020).

Katrs Eiropas iedzīvotājs gadā vidēji rada 8 L lietotas cepamās eļļas (Liepins et al. 2021). Tātad lipīdiem bagāti pārtikas atkritumi ir lielā daudzumā pieejams substrāts, taču šo atkritumu ķīmiskais sastāvs ir ļoti heterogēns. Tāpēc nepieciešams individuāli pārbaudīt katra šīs grupas substrāta piemērotību SL ražošanā. Substrāta izvēlē jāņem vērā ne tikai tādi procesa ienesīgumu ietekmējoši faktori kā iegūstamais SL titrs un to fizikāli-ķīmiskās īpašības, bet arī ražošanas procesa ietekme uz vidi. To ir iespējams novērtēt, izmantojot aprites cikla analīzes metodi (Hu et al. 2021a).

**Darba mērķis:** pārbaudīt dažādu lipīdiem bagātu pārtikas atkritumu piemērotību soforolipīdu ražošanai ar raugu *Starmarella bombicola* un novērtēt šī ražošanas procesa ietekmi uz vidi.

### **Darba uzdevumi:**

1. Veikt periodisko kultivēšanu ar *S. bombicola*, izmantojot dažādus lipīdiem bagātus pārtikas atkritumus,
2. Noteikt periodiskās kultivēšanas laikā iegūto soforolipīdu koncentrāciju,
3. Noteikt periodiskās kultivēšanas laikā patērēto lipīdu un/vai glikozes koncentrāciju,
4. Novērtēt iegūto soforolipīdu virsmaktīvās īpašības ar stalagmometrijas metodi,
5. Veikt aprites cikla datu analīzi soforolipīdu ražošanas procesiem no dažādiem lipīdiem bagātiem pārtikas atkritumiem, lai salīdzinātu šo procesu ietekmi uz vidi.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. *Starmarella bombicola* vispārējs raksturojums

*Starmarella bombicola* ir fakultatīvi aeroba asku sēne. Tā veģetatīvi vairojas pumpurojoties, taču dzimumvairošanās procesā katra rauga šūna veido vienu askusporu (De Graeve et al. 2018). Šīs sugas raugi ir fruktofilī. Spēju efektīvi uzņemt fruktozi nodrošina fruktozes transporteris (Ffz1), kas iegūts no citas sēņu sugas horizontālās gēnu pārnese rezultātā (Gonçalves et al. 2019). Nav zināma neviena *S. bombicola* izraisīta saslimšana, tomēr šī suga vēl nav oficiāli atzīta kā ‘Generally Regarded as Safe’ (GRAS) (De Graeve et al. 2018; Liepins et al. 2021).

*S. bombicola* pirmo reizi izolēja 1954. gadā no savvaļas ziedu nektāra. Sākotnēji šīs rauga sugas nosaukums bija *Torulopsis bombicola*, vēlāk to pārklasificēja par *Candida bombicola*. 2012. gadā rauga suga ieguva tagadējo nosaukumu – *Starmarella bombicola* (De Clercq et al. 2021). Raugs *S. bombicola* dabā vēl sastopams ģints *Bombus* kukaiņu medū un uz šo kukaiņu ķermeņa (De Graeve et al. 2018). Pastāv hipotēze, ka kukaiņi dod priekšroku ziediem, kuros atrodas raugi, jo tie var veikt polisaharīdu transformēšanu par vienkāršākiem, kukaiņiem sagremojamiem ogļhidrātiem (Ciesielska et al. 2014).

Tā kā *S. bombicola* dabīgā vide ir bagāta ar cukuriem, šis raugs spēj augt barotnē ar lielu cukura koncentrāciju (Van Bogaert et al. 2011), taču augšana ievērojami samazinās 400 g·L<sup>-1</sup> cukura koncentrācijā un gandrīz pilnībā apstājas 600 g·L<sup>-1</sup> koncentrācijā (De Clercq et al. 2021). Šīs sugas raugiem piemīt spēja uzņemt arī dažādus hidrofobus savienojumus, tai skaitā taukskābes, garķēžu spirtus, alkānus un hidroksilētas taukskābes. Kaut gan *S. bombicola* nav patogēna suga, tā ir rezistenta pret lielu daudzumu dažādu antimikrobiālo savienojumu, piemēram, fleomicīnu, G418 un zeocīnu (Claus et al. 2022).

Pateicoties aktīvam lipīdu metabolismam, *S. bombicola* spēj uzkrāt gan iekššūnas lipīdus, gan ražot un izvadīt ārējā vidē virsmaktīvus savienojumus soforolipīdus (SL) (De Graeve et al. 2018; Liepins et al. 2021). *S. bombicola* literatūrā tiek pieminēta gandrīz tikai saistībā ar šiem savienojumiem. Lai gan vairāku desmitu gadu garumā ir izvirzītas dažādas hipotēzes par SL dabiskajām funkcijām, tikai nesen dažas no tām tika eksperimentāli pierādītas (De Clercq et al. 2021).

Patī nozīmīgākā SL funkcija ir ārējās oglekļa rezerves, kuras organisms var izmantot bada apstākļos. Vidē pieejamais ogleklis tiek iekļauts sarežģītākas struktūras molekulās (soforolipīdos), padarot to grūtāk pieejamu citiem mikroorganismiem. Turklāt SL antimikrobiālā aktivitāte atvairā citus mikroorganismus un neļauj tiem izmantot *S. bombicola* uzkrātās rezerves. Kā mazāk svarīga SL funkcija ir minēta hidrofobu oglekļa avotu emulģēšana, kas atvieglo to uzņemšanu šūnā (De Clercq et al. 2021). Tādējādi SL ražošana *S. bombicola*

dod priekšrocības, kas uzlabo šīs sugas izdzīvošanas iespējas un palīdz konkurēt par vidē esošajiem substrātiem ar citiem organismiem.

## 1.2 Soforolipīdu īpašības un biosintēze

Soforolipīdi ir viens no biovirsmaktīvo vielu veidiem, kurus producē mikroorganismi. Atšķirībā no sintētiskajām virsmaktīvajām vielām, biovirsmaktīvajām vielām piemīt zemāks toksiskuma līmenis un tās ir vieglāk biodegradējamās (Madihalli & Doble 2019). Tās ir iespējams iegūt no atjaunojamiem resursiem (Thavasi & Banat 2019), kā arī tās ir izturīgas pret augstām temperatūrām, dažādām pH vērtībām un jonu koncentrācijām (Paulino et al. 2016).

Biovirsmaktīvās vielas spēj samazināt šķīduma virsmas spraigumu, taču tās var arī pielietot kā putotājus, detergentus, emulgatorus, solubilizētājus, mitrinātājus, biezinātājus, antimikrobiālus līdzekļus, līdzekļus pret bioplēvē, pretsalīpes līdzekļus (Thavasi & Banat 2019).

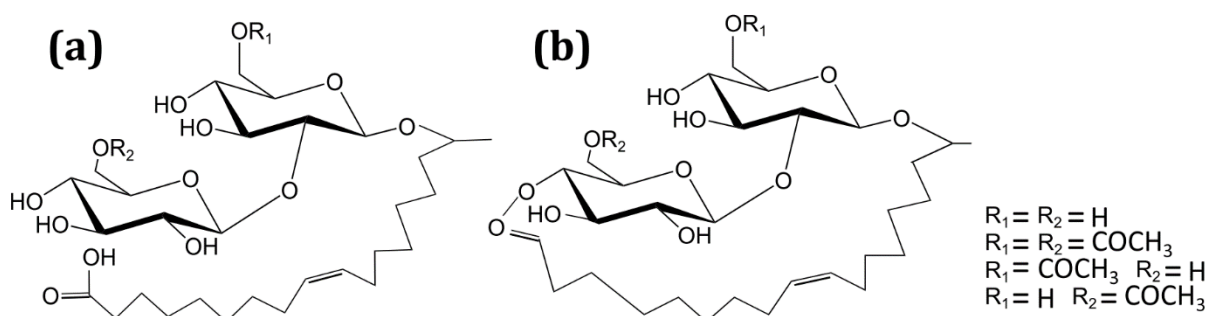
Virsmaktīvās vielas efektivitāti virsmas spraiguma samazināšanā nosaka tās kritiskā micellu koncentrācija (jo mazāka kritiskā micellu koncentrācija, jo efektīvāka virsmaktīvā viela) (Thavasi & Banat 2019). Kritiskā micellu koncentrācija ir lielums, kas raksturo to, pie kādas virsmaktīvo vielu koncentrācijas šīs vielas molekulas sāk veidot micellas, kas nodrošina to virsmaktīvās īpašības (De et al. 2015). Pēc kritiskās micellu koncentrācijas sasniegšanas šķīduma virsmas spraigums būtiski nemainās (McGiffen et al. 2014).

Tāpat kā pārējās biovirsmaktīvās vielas, arī SL ir sekundārie metabolīti, kuri tiek producēti stacionārajā fāzē (Lodens et al. 2020). Visi līdz šim atklātie SL producējošie mikroorganismi pieder pie *Starmarella* monofilētiskās grupas, izņemot *Pseudohyphozyma bogoriensis* (Dierickx et al. 2022).

SL ir amfifilas molekulas un šāda molekulas uzbūve piešķir tiem raksturīgās virsmaktīvās īpašības. To hidrofilo daļu veido soforoze – glikozes disaharīds, kas savienots ar  $\beta$ -1,2 glikozīdisko saiti (Marchant & Banat 2012). Soforoze var būt mono-acetilēta, di-acetilēta vai neacetilēta (acetilēšana notiek pie 6' un 6'' oglekļa atomam piesaistītajām hidroksilgrupām) (Jeziarska et al. 2018). SL hidrofobo daļu veido taukskābe, kas visbiežāk sastāv no 16 vai 18 oglekļa atomiem un var saturēt vienu, divas vai nevienu dubultsaiti (Ashby & Solaiman 2019; Glens & Cooper 2006; Marchant & Banat 2012).

SL tiek ražoti kā divu strukturāli atšķirīgu molekulu tipu maisījums: skābes un laktonu tipa (Drakontis & Amin 2020; Glens & Cooper 2006). Skābes tipa SL ir brīva taukskābe, savukārt laktonu tipa SL taukskābes karboksilgrupa veido estera saiti ar hidroksilgrupu pie soforozes 4'', 6'' vai 6' oglekļa atoma (Lourith & Kanlayavattanukul 2009). Abu tipu struktūrformulas redzamas 1. attēlā. Lielākā daļa *S. bombicola* ražoto SL ir di-acetilēti laktonu tipa SL ar oleīnskābi (C18:1) hidrofobajā daļā, taču to sastāvs var mainīties atkarībā no

kultivēšanas apstākļiem un pieejamā substrāta (Dierickx et al. 2022). SL ar dažādām struktūrām piemīt atšķirīgas īpašības (De Clercq et al. 2021). Skābes tipa SL piemīt labāka šķīdība ūdenī un tie veido vairāk putu (Ciesielska et al. 2014). Taču laktonu tipa SL piemīt augstāka antimikrobiālā aktivitāte (De Clercq et al. 2021).

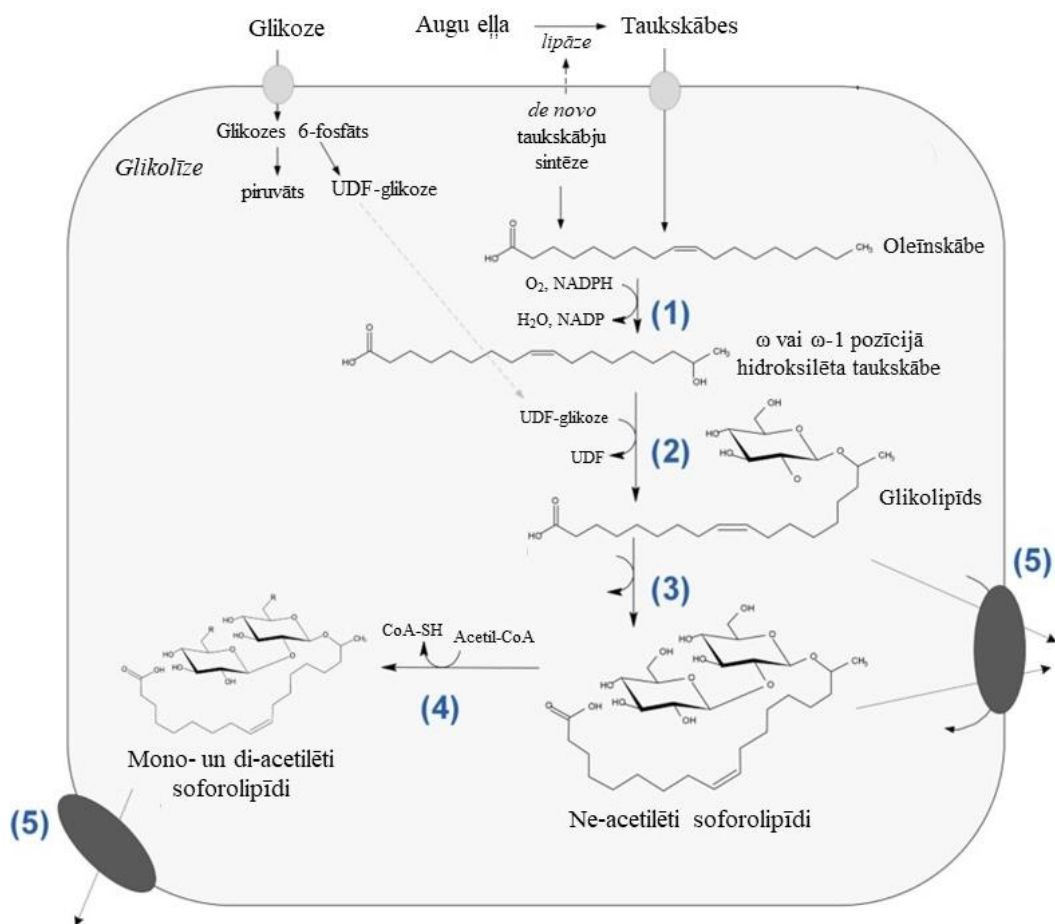


1. attēls. (a) Skābes tipa un (b) laktonu tipa sofrorolipīdu vispārīgās struktūrformulas. Attēls no Claus et al. (2022).

Figure 1. General structural formulas of (a) acidic and (b) lactonic sophorolipids. Figure from Claus et al. (2022)

Šūnas iekšienē SL sintēzi nodrošina četri enzīmi: citohroma P450 monooksigenāze, divas glikoziltransferāzes un acetiltransferāze. SL pārvietošanu uz ārējo vidi veic SL transporteris (Lodens et al. 2020). Nesen tika atklāts vēl viens SL transporteris, kuru kodējošais gēns atrodas ārpus SL biosintēzes gēnu klastera (Claus et al. 2022). Ārpus šūnas SL sintēzes procesā piedalās arī enzīms laktonu esterāze (Ciesielska et al. 2014).

SL biosintēzes pirmajā solī citohroma P450 monooksigenāze termināli vai subtermināli hidroksilē taukskābi (Van Bogaert et al. 2013). Šis enzīms prioritāri kā substrātu izmanto oleīnskābi (C18:1) (Huang et al. 2014). Pēc tam glikoziltransferāze I hidroksilētās taukskābes hidroksilgrupai pievieno glikozes molekulu, kas ir aktivēta ar uridīndifosfātu (UDF). Glikoziltransferāze II pie pirmās glikozes molekulas pievieno otru ar uridīndifosfātu aktivētu glikozes molekulu. Pēc šiem soļiem ir sintezēta neacetilēta skābes tipa SL molekula. Vēl SL molekulai var tikt pievienotas acetilgrupas, kuru pievienošanu katalizē acetiltransferāze (Van Bogaert et al. 2011). SL laktonizēšanos nodrošina laktonu esterāze (Ciesielska et al. 2014; Liepins et al. 2021). Ja tiek izslēgts laktonu esterāzes gēns, ir iespējams iegūt *S. bombicola* celmu, kas ražo tikai skābes tipa SL (Ciesielska et al. 2014). SL biosintēzes ceļš redzams 2. attēlā.



2. attēls. Soforolipīdu biosintēze. (1) Citohroma P450 monooksigenāze, (2) glikoziltransferāze I, (3) glikoziltransferāze II, (4) acetiltransferāze, (5) soforolipīdu transporteri. Attēlā nav parādīta soforolipīdu laktonizēšana, kas notiek ārpus šūnas. Attēls ar izmaiņām no Baccile et al. (2017).

Figure 2. Sophorolipid biosynthesis. (1) cytochrome P450 monooxygenase, (2) Glucosyltransferase I, (3) glucosyltransferase II, (4) acetyltransferase, (5) sophorolipid transporter. Figure excludes sophorolipid lactonisation, which occurs outside the cell. Figure with changes from Baccile et al. (2017).

Pašā SL biosintēzes gēnu klasterī nav atrodami regulatorie elementi (Van Bogaert et al. 2013). Ar SL biosintēzi saistīto gēnu ekspresija tiek regulēta ar telomēru pozīcijas efektu, kas atgriezeniski represē ekspresiju telomēru tuvumā esošiem gēniem (Lodens et al. 2020). Klastera enzīmu sintēzi ierosina arī augsta C/N attiecība. Pagaidām SL biosintēzes regulācijas mehānismi ir tikai daļēji noskaidroti. Jaunatklātā SL transportera gēna ekspresijas regulācija nav saistīta ar SL biosintēzes klastera gēnu ekspresijas regulāciju, jo tas atrodas citā hromosomā (Claus et al. 2022).

### 1.3 Soforolipīdu ražošana

#### 1.3.1. Substrāti

Vislielākais SL daudzums tiek producēts periodiskajā kultūrā ar piebarošanu, izmantojot divus oglekļa avotus – hidrofilu un hidrofobu (Davila et al. 1994). SL ražošanai kā hidrofilo

oglekļa avotu visbiežāk izmanto glikozi, saharozi vai glicerīnu. Biežāk izmantotie hidrofobie oglekļa avoti ir rapšu eļļa, saulespuķu eļļa ar paaugstinātu oleīnskābes saturu un oleīnskābe (Dierickx et al. 2022).

Kad hidrofobais substrāts pārsvarā sastāv no poli-nepiesātinātām taukskābēm, vairākums SL ir skābes tipa. Pretējais tiek novērots, kad substrātā vairāk ir stearīnskābe (C18:0) un oleīnskābe (C18:1), - producētie SL pārsvarā ir laktonu tipa. Vislielākais SL titrs tiek sasniegts ar lipīdu substrātiem, kuru sastāvā ir C16 un C18 taukskābes, piemēram, oleīnskābe, jo tās var tikt tiešā veidā iekļautas SL molekulā (Claus et al. 2022; Davila et al. 1994). A.M. Davila et al. (1994) apgalvo, ka tas neattiecas uz poli-nepiesātinātām taukskābēm, kuras, neskatoties uz taukskābes ķēdes garumu, netiek tieši iekļautas SL molekulās; tās tiek oksidētas līdz CO<sub>2</sub>. Savukārt, citā pētījumā novērots, ka SL maisījuma sastāvā ir arī SL, kuru hidrofobo daļu veido taukskābe ar divām dubultsaitēm (Hu & Ju 2001). Ja izmantoto taukskābju oglekļa ķēde ir īsāka par 16 oglekļa atomiem, vispirms jānotiek elongācijai, lai to varētu iekļaut SL molekulās, kas palēnina SL ražošanas ātrumu (Davila et al. 1994).

Nelietotas augu eļļas sastāv pārsvarā no piesātinātām un poli-nepiesātinātām taukskābēm (Awogbemi et al. 2019). Savukārt, informācija par lietotas cepamās eļļas sastāvu dažādos literatūras avotos atšķiras, piemēram, vienā pētījumā konstatēts, ka lietota cepamā eļļa satur tikai piesātinātas un mono-nepiesātinātas taukskābes (Awogbemi et al. 2019), citā pētījumā lietotas cepamās eļļas sastāvā bija 60% mono-nepiesātinātas, 26% poli-nepiesātinātas un 8% piesātinātas taukskābes (Chhetri et al. 2008). Lietoto eļļu atšķirīgais sastāvs varētu būt skaidrojams ar to, ka pētījumos izmantoto eļļu sastāvā ir vairākas augu eļļas (kā arī tauki), dažādās proporcijās. Kā arī lietotas cepamās eļļas sastāvu ietekmē tas, cik ilgi, kādā temperatūrā un kādam mērķim (piemēram, vistas vai kartupeļu cepšanai) to izmantoja (Cherubini et al. 2021).

Tādi substrāti kā augu eļļas un glikoze ir ne tikai dārgi, bet arī konkurē ar to pielietojumiem pārtikā. Tāpēc notiek jaunu SL ražošanai piemērotu substrātu meklējumi (Ingham & Winterburn 2022). Iepriekš minētā lietotā cepamā eļļa ir viens no šādiem hidrofobiem substrātiem.

SL sastāvā tieši iekļaujamo taukskābju sastāvs dažādās nelietotās un lietotās eļļās un taukos attēlots 1. tabulā. Redzams, ka gan lietotā, gan nelietotā rapšu eļļā šādu taukskābju saturs ir ievērojami lielāks, nekā pārējās minētajās eļļās un taukos.

1. tabula. Dažādu eļļu un tauku taukskābju sastāvs (%). Iekļautas tikai taukskābes, kuras visbiežāk sastopamas soforolipīdu molekulas sastāvā (Davila et al. 1994). N – nelietota eļļa, L – lietota eļļa.

Table 1. Fatty acid composition (%) of various oils and fats. Only fatty acids, which make up the sophorolipid molecule most often, were included (Davila et al. 1994). N – unused oil, L – used oil.

| <b>Eļļa vai tauki</b>                | <b>Palmitīn-<br/>skābe<br/>C16:0</b> | <b>Palmitoleīn-<br/>skābe<br/>C16:1</b> | <b>Stearīn-<br/>skābe<br/>C18:0</b> | <b>Oleīn-<br/>skābe<br/>C18:1</b> | <b>Atsauce</b>            |
|--------------------------------------|--------------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Saulespuķu eļļa (N)                  | 32.21                                | -                                       | 9.27                                | -                                 | (Awogbemi et al. 2019)    |
| Saulespuķu eļļa (L)                  | 0.36                                 | -                                       | -                                   | 0.80                              |                           |
| Palmu eļļa (N)                       | -                                    | -                                       | 2.67                                | -                                 | (Awogbemi et al. 2019)    |
| Palmu eļļa (L)                       | 40.21                                | -                                       | -                                   | 14.39                             |                           |
| Rapšu eļļa (N)                       | 4.82                                 | 0.25                                    | 1.94                                | 61.56                             | (Aniołowska et al. 2016)  |
| Rapšu eļļa (L)                       | 7.17                                 | 0.27                                    | 2.83                                | 63.62                             |                           |
| Vistas zemādas tauki*                | 22.97                                | 1.99                                    | 4.86                                | 35.99                             | (Paszkievicz et al. 2020) |
| Tauki pēc vistas cepšanas            | 23.137                               | 6.382                                   | 7.79                                | 16.741                            | (Sharma et al. 2021)      |
| Tauku un eļļu maisījums pēc cepšanas | 15.714                               | 2.207                                   | 7.154                               | 26.48                             | (Sharma et al. 2021)      |

\*no jēlas vistas gaļas

Kaut gan lietotas eļļas arī satur SL molekulā tieši iekļaujamas taukskābes, iegūto SL titrs parasti ir mazāks, ja kā substrātu izmanto lietotu cepamo eļļu (nevis nelietotu eļļu), jo tā satur dažādus savienojumus, piemēram, peroksīdus, hidroperoksīdus, ketonus, aldehīdus un skābes, kas var inhibēt SL producēšanu (Kim et al. 2021), piemēram, A. Mannu et al. (2019) lietotā cepamajā eļļā identificēja 46 dažādus gaistošus organiskos savienojumus. Lietotai cepamajai eļļai raksturīgas zemākas pH vērtības, nekā nelietotai augu eļļai, kas arī var negatīvi ietekmēt SL ražošanu, ja vien pH netiek regulēts (Awogbemi et al. 2019).

Kā piemēru lētām hidrofilām substrātiem var minēt melasi. Cukurniedru melases sastāvā ir apmēram 550 g·L<sup>-1</sup> saharozes un 50 g·L<sup>-1</sup> glikozes un fruktozes. Tāpēc tā var būt piemērots hidrofilais substrāts SL ražošanai (Wongsirichot et al. 2021). Izmantojot cukurniedru melasi kā hidrofilo substrātu un sojas pupiņu eļļu kā hidrofobo substrātu fermentācijas procesā bioreaktorā, iegūti 63.7 g·L<sup>-1</sup> SL. Jāpiebilst, ka šī fermentācija ilga tikai 5 dienas un parasti šādas fermentācijas ir garākas (Daverey & Pakshirajan 2009). Periodiskās kultivēšanas procesā ar piebarošanu, izmantojot oleīnskābi kā hidrofobo substrātu un sojas melasi kā hidrofilo substrātu, izdevies iegūt SL titru, kas ir 75% no titra, ko iespējams iegūt, ja tādos pašos apstākļos melases vietā izmanto glikozi (Solaiman et al. 2007).

### 1.3.2. Kultivēšanas apstākļi

Kultivēšanas process, kura laikā tiek ražoti SL, parasti ilgst 8-14 dienas (Dierickx et al. 2022), +24-30 °C temperatūrā (Ingham & Winterburn 2022; Vedaraman & Venkatesh 2010), un šajā procesā visbiežāk izmanto *S. bombicola* ATCC 22214 celmu (Liepins et al. 2021; Wongsirichot et al. 2021).

Tiek uzskatīts, ka SL ražošanas process ir efektīvs, ja SL iznākums uz tilpuma vienību ir 1-2.5 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (Wongsirichot et al. 2021). No periodiskās kultūras ar piebarošanu ir iespējams iegūt 3.7 reizes lielāku SL titru, nekā no periodiskās kultivēšanas bez piebarošanas. J.H. Kim et al. (2021) bez piebarošanas ieguva 84.8 g·L<sup>-1</sup> SL, bet ar piebarošanu – 315.6 g·L<sup>-1</sup> SL, kas ir lielākais līdz šim sasniegtais titrs, izmantojot lietotu cepamo eļļu kā substrātu (Kim et al. 2021).

Lielāko literatūrā sastopamo SL titru (623 g·L<sup>-1</sup>) izdevies sasniegt 42 dienas garā periodiskās kultivēšanas procesā ar piebarošanu, izmantojot rapšu eļļu un glikozi kā substrātus. Iegūt šādu SL titru un veikt tik garu fermentācijas procesu izdevās, pateicoties autoru izstrādātajai *in situ* tehnoloģijai SL atdalīšanai no fermentācijas vides (Dolman et al. 2017).

Palielinoties biomasas koncentrācijai, palielinās SL titrs (Dierickx et al. 2022), taču pārāk liela biomasas koncentrācija var ierobežot šūnām pieejamo skābekļa koncentrāciju (To et al. 2022). Tomēr M.H. To et al. (2022) pētījumā inokulāta koncentrācijai (2-6% (v/v)) nebija būtiskas ietekmes uz SL titru. Iespējams, ka variācija biomasas koncentrācijā šajā pētījumā nebija pietiekami liela, lai novērotu atšķirību SL titrā.

Ievērojama ietekme uz iegūto SL titru ir arī hidrofobā substrāta koncentrācijas izmaiņām. Izmantojot rapšu eļļas koncentrāciju, kas zemāka par 50 mL·L<sup>-1</sup>, iegūtais SL titrs ievērojami samazinās (Ingham & Winterburn 2022). Arī M.H. To et al. (2022) novēroja, ka, eļļas koncentrācijai palielinoties, palielinās arī SL titrs, taču SL producēšana sākas agrāk, ja eļļas koncentrācija ir zemāka. Tomēr izmantotais eļļas daudzums nevar būt pārāk liels, jo tas var pasliktināt skābekļa difūziju fermentācijas vidē, kā arī liels daudzums brīvo taukskābju var būt toksisks šūnām (Ingham & Winterburn 2022).

SL ražošanā liela nozīme ir arī C/N attiecībai. Ja C/N attiecība ir liela (8-9), tad SL specifiskais producēšanas ātrums ir liels, taču biomasas koncentrācija ir zema. Gan optimālu SL iznākumu, gan optimālu biomasas koncentrāciju nodrošina vidēja C/N attiecība (4.5-5) (Dierickx et al. 2022). Izvēlētais slāpekļa avots ietekmē iegūto SL struktūru tipu proporcijas. Piemēram, kad amonija nitrāts vai peptons tiek izmantots kā slāpekļa avots, SL produkta sastāvā neparādās laktonu tipa SL (To et al. 2022).

Atsevišķiem metāla jonu savienojumiem ar sulfāta sāļiem arī ir ietekme uz *S. bombicola* augšanu un/vai SL ražošanu. MgSO<sub>4</sub> palielina laktonu tipa SL proporciju, FeSO<sub>4</sub> palielina skābes tipa SL proporciju, savukārt, CuSO<sub>4</sub> palielina kopējo saražoto SL koncentrāciju 2.16

reizes. Tomēr šo jonu ietekme var būt atšķirīga, izmantojot dažādas barotnes (Dierickx et al. 2022).

Arī pH regulācijas metodei (ja pH vispār tiek regulēts) ir ietekme uz SL titru. Konstatēts, ka pH regulācijai SL ražošanas procesā labāk izmantot KOH, nekā NaOH, jo SL titrs KOH gadījumā bija ievērojami lielāks ( $140 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (KOH) un  $102 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (NaOH)). Savukārt, regulējot pH ar amonija acetāta buferi, vispār nebija novērojama šūnu augšana (To et al. 2022).

Lielāka SL daudzuma iegūšanai tiek izmantota ne tikai kultivēšanas apstākļu optimizācija, bet arī mikroorganismu ģenētiskās inženierijas metodes. Piemēram, SL titru par 50% izdevās palielināt, veicot delēciju enzīma taukskābju acil-CoA sintēzes gēnam (*Afaa1*), kas nodrošina brīvo taukskābju aktivēšanu. Tādējādi tika bloķēta taukskābju degradācija  $\beta$ -oksidācijas ceļā un palielināts uzņemto taukskābju īpatsvars, kas tiek iekļautas SL molekulas sastāvā (Jeziarska et al. 2019).

Kā var secināt no visiem iepriekš minētajiem SL ražošanu ietekmējošiem faktoriem, vairumā pētījumu SL ražošana tiek veikta, pielietojot fermentācijas ar šķidro barotni, taču atsevišķos gadījumos tikusi izmantota arī cietfāzes fermentācija, kas dod iespēju izmantot lētus cietos substrātus un ļauj izvairīties no barotnes putošanās fermentācijas laikā. Piemēram, izmantojot mango kauliņu oleīnskābes frakciju un eļļas izspaidas kā hidrofobos substrātus, cietfāzes fermentācijā sasniegtais SL titrs bija aptuveni 3 reizes lielāks, nekā fermentācijā ar šķidro barotni, izmantojot tos pašus substrātus (Ma et al. 2020).

#### **1.4 Soforolipīdu ražošanas ietekme uz vidi**

Kā aprakstīts iepriekš, SL ražošanai iespējams pielietot dažādus substrātus, kultivēšanas metodes un barotnes piedevas. Optimālās parametru kombinācijas izvēlei jāņem vērā ne tikai procesa ienesīgumu ietekmējoši faktori kā iegūstamais SL titrs un SL fizikāli-ķīmiskās īpašības, bet arī šī procesa ietekme uz apkārtējo vidi. To ir iespējams izdarīt, izmantojot aprites cikla analīzes (*life cycle analysis* (LCA)) metodi (Hu et al. 2021a).

LCA izmanto, lai kvantificētu ietekmi uz vidi, ko atstāj kāds process, pakalpojums vai kāda produkta aprites cikla posms (piemēram, ražošana un/vai lietošana). Kvantificēšana balstās uz ieejošo (materiālu un enerģijas) un izejošo (emisiju un atkritumu) plūsmu analīzi. LCA iespējams iedalīt četros soļos: mērķa un ietvara (*scope*) izvirzīšana, aprites cikla modeļa izveidošana, iekļaujot tajā datus par visām ieejošajām un izejošajām plūsmām (*life cycle inventory*), visu plūsmu ietekmes nozīmīguma novērtēšana (*life cycle impact assesment*) un rezultātu interpretācija (de Lapuente Díaz de Otazu et al. 2022; Goedkoop et al. 2013; Kopsahelis et al. 2018). Atkarībā no izvirzītā mērķa un ietvara LCA iespējams iekļaut (vai neiekļaut) izejmateriālu iegūšanas, produkta ražošanas, izplatīšanas, lietošanas un aprites cikla beigu (atkritumu) posma analīzi (Hu et al. 2021b). Ietekmes nozīmīguma novērtēšanai tiek

izmantotas dažādas ietekmes kategorijas, piemēram, ūdens patēriņš, fosilo resursu noplicināšana, minerālu resursu noplicināšana, aramzemes platības izmantošana, toksicitāte cilvēkiem, ekotoksicitāte, eutrofikācija, augsnes paskābināšanās, ozona slāņa noplicināšana un klimata pārmaiņas (Hu et al. 2021a).

Analizējot SL ražošanas procesu, konstatēts, ka tieši SL ražošanas fermentācijas fāze atstāj vislielāko ietekmi uz vidi (Baccile et al. 2017; Hu et al. 2021a; Kopsahelis et al. 2018). Fermentācijā izmantotā glikoze un rapšu eļļa (hidrofilais un hidrofobais oglekļa avots) veido 87% no visa ražošanas procesa ietekmes (Dierickx et al. 2022). Šī negatīvā ietekme rodas substrātu ražošanas procesā, jo tiek izmantots liels ūdens daudzums un elektrība, kuru bieži vien iegūst no neatjaunojamiem resursiem (Baccile et al. 2017). Tādēļ būtu vēlams SL ražošanā izmantot ražošanas blakusproduktus vai patēriņa atkritumproduktus, piemēram, melasi un lietotu cepamo eļļu. Ietekmi iespējams samazināt arī veicot SL ražošanas procesa optimizāciju, lai iegūtu lielāku SL titru, kas samazinātu enerģijas patēriņu vienas SL vienības iegūšanai (Hu et al. 2021b).

Ietekmes kategorijās “kaitējums ekosistēmām” un “resursu izmantošana” SL uzrāda ļoti līdzīgus rezultātus kā dažādas sintētiskās virsmaktīvās vielas (Baccile et al. 2017). Tas nozīmē, ka SL ražošana no pirmās paaudzes atjaunojamiem resursiem videi rada līdzvērtīgu kaitējumu kā virsmaktīvo vielu iegūšana no fosilajiem resursiem. Kādā pētījumā konstatēts, ka SL ražošanai ir par 22.7% lielāka ietekme uz vidi, nekā biovirsmaktīvo vielu ramnolipīdu ražošanai. Šādas atšķirības galvenais cēlonis ir tas, ka SL ražošanas process ir garāks un tāpēc enerģijas patēriņš šim procesam ir lielāks (Kopsahelis et al. 2018).

Līdz šim veikto pētījumu skaits par SL ražošanas ietekmi uz vidi ir neliels. Lai iegūtu visaptverošu informāciju par atšķirīgu SL ražošanas procesu ietekmi uz vidi, nepieciešams veidot ciešu sadarbību starp aprites cikla modelētājiem un pētniekiem, kuri veic ar SL ražošanu saistītus eksperimentus (Hu et al. 2021a).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1 Materiāli

#### 2.1.1 Iekārtas un mērinstrumenti

- Centrifūga Heraeus Multifuge X1R (Thermo Fisher, ASV);
- Autoklāvs CertoClav MultiControl 2 (CertoClav, Austrija);
- Šūnu skaitītājs LUNA-FX7 (Logos Biosystems, Dienvidkoreja);
- Analītiskie svāri KERN ABJ 120-4M (KERN & Sohn GmbH, Vācija);
- Vakuuma iztvaicēšanas ierīce Concentrator plus/ Vacufuge® plus (Eppendorf, Vācija);
- Mikroplašu lasītājs Tecan Infinite 200M Pro (Tecan Austria GmbH, Austrija);
- Kratītājs – inkubators Environmental Shaker –incubator ES-20 (BIOSAN, Latvija);
- Kratītājs – inkubators Incubator Shaker Series I 26 (New Brunswick Scientific, Vācija);
- Velkmes skapis Waldner AIRFLOW CONTROLLER AC3 (Waldner, ASV);
- Laminārās plūsmas skapis FlowFast V 12P (Via Vespucci, Itālija);
- Termostats Thermo Block TDB-120 (BIOSAN, Latvija);
- Stikla kapilārs ar statīvu;

#### 2.1.2 Ķīmiskās vielas un reaģenti

- NaOH, ≥98% (Erba Lachema, Čehija);
- D-(+)-Glikozes monohidrāts, 99.0% (Sigma Aldrich, Francija);
- Antrons (Sigma Aldrich, Vācija);
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 98% (Merck KGaA, Vācija);
- 3,5-dinitrosalicilskābe (Serva Feinbiochemica, Vācija);
- Heksāns (Sigma Aldrich, Vācija),
- Akridīna oranžais/propīdija jodīds (Aligned Genetics, Dienvidkoreja),
- Nātrija kālija tartrāta tetrahidrāts, ≥99.9% (Sigma Aldrich, Vācija);

#### 2.1.3 Lietojumprogrammas

- Microsoft Excel v16.0 (Microsoft Corporation, ASV);
- R v4.0.3 (R Core Team 2021);
- RStudio v1.4.1103 (RStudio Team 2022);
- RStudio paketes: readxl v1.3.1 (Wickham & Bryan 2019), ggplot2 (Wickham 2016), ggpmisc v0.4.5 (Aphalo 2021), ggpubr v0.4.0 (Kassambara 2020), dplyr v1.0.7 (Wickham et al. 2021), openxlsx v4.2.5 (Schauberger & Walker 2021), tidyverse (Wickham et al. 2019);
- Tecan i-control v2.0.10.0 (Tecan Austria GmbH, Austrija);
- SimaPro 9.3 (PRÉ Sustainability B.V., Nīderlande).

## 2.2 Metodes

### 2.2.1 Rauga šūnu periodiskā kultivēšana

Visos fermentācijas eksperimentos izmantoja raugu *Starmerella bombicola* DSM 27465. *S. bombicola* kultūru uzturēja uz YPD (yeast peptone dextrose) agara platēm +4° C (skat. barotnes sastāvu 1. pielikumā).

Rauga šūnu kultivēšanai nepieciešamos materiālus un barotnes pirms izmantošanas sterilizēja autoklāvā, +121 °C, 15 minūtes. Stikla mēģenē piecos mL SD (synthetic defined) barotnes (skat. barotnes sastāvu 2. pielikumā) ar 20 g·L<sup>-1</sup> glikozes inokulēja vienu *S. bombicola* koloniju un kultivēja 24 stundas, +30 °C, 200 rpm. Pēc tam 100 mL SD barotnes ar 20 g·L<sup>-1</sup> glikozes inokulēja ar pieciem mL šūnu kultūras un kultivēja 24-48 stundas, +30 °C, 180 rpm. Ar iegūto biomasu inokulēja koniskās kolbas, kas saturēja SD barotni bez pievienota slāpekļa avota ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) un vienu vai divus dažādus oglekļa avotus. Izmantoja šādas oglekļa avotu kombinācijas:

- nelietotu rapšu eļļu (10% (v/v)) un glikozi (60 g·L<sup>-1</sup>);
- ar lipīdiem bagātus pārtikas atkritumus\* (10% (v/v)) un glikozi (60 g·L<sup>-1</sup>);
- nelietotu rapšu eļļu (10% (v/v));
- ar lipīdiem bagātus pārtikas atkritumus (10% (v/v)).

Periodisko kultivēšanu veica 10 dienas, +30 °C, 180 rpm, ar trīs bioloģiskajiem atkārtojumiem.

### 2.2.2 Šūnu skaita noteikšana

Vispirms 27 μL fermentācijas vides parauga pievienoja 3 μL akridīna oranžā/propīdija jodīda krāsvielas. Tad 10 μL pagatavotā parauga-krāsvielas maisījuma iepildīja šūnu skaitītājam paredzētos mikroskopijas slaidos. Šūnu skaitīšanu veica fluorescences režīmā ar iestatītu šūnu izmēru no 1 līdz 5 μL. Šūnu skaitīšanu veica divos tehniskajos atkārtojumos.

### 2.2.3 Soforolipīdu kvantificēšana fermentācijas vidē

Kursa darba ietvaros tika konstatēts, ka antrona-sērskābes metode ir piemērotākā SL koncentrācijas noteikšanai ar lipīdiem bagātā fermentācijas vidē. Tāpēc antrona-sērskābes metodi izmantoja šajā darbā, lai noteiktu kopējo ogļhidrātu koncentrāciju (tai skaitā SL molekulā esošās soforozes koncentrāciju) bezšūnu fermentācijas vidē. Tā kā fermentācijās pievienoja arī glikozi, tās noteikšanai bija nepieciešams izmantot vēl citu metodi, kura ir nejutīga pret SL sastāvā esošo soforozi. Šim nolūkam izmantoja dinitrosalicilskābes (DNS) metodi.

---

\* Izmantotie lipīdiem bagātie pārtikas atkritumi bija rapšu eļļa no fritētavas, rapšu eļļa no zivju kombināta, saulespuķu eļļa no mājsaimniecības, vistas tauki no grila un dzīvnieku tauki no žāvētavas.

Šajā darbā izmantoja A. Leyva et al. (2008) aprakstīto antrona-sērskābes metodi ar modifikācijām. Metodes veikšanai nepieciešamo reaģentu pagatavoja, izšķīdinot antronu (0.2% (w/v) koncentrācijā) 75% sērskābē. Visas darbības, kas iekļauj sērskābi saturošu šķīdumu izmantošanu, veica velkmes skapī ar cimdkiem, aizsargbrillēm un halātu.

Reakcijas maisījums sastāvēja no 30  $\mu\text{L}$  divreiz destilēta ūdens, 5  $\mu\text{L}$  analizējamā fermentācijas parauga, 165  $\mu\text{L}$  antrona-sērskābes reaģenta. Šo maisījumu saturošo 96 lauciņu mikroplati karsēja 100 °C, 10 minūtes. Pēc šķīduma atdzesēšanas to samaisīja ar daudzkanālu mikropipeti un ar mikroplašu lasītāju nomērīja absorbciju pie 630 nm viļņu garuma. Kā standartvielu izmantoja glikozi.

Lai noteiktu koncentrāciju cukuriem, kas nav SL sastāvā (reducējošajiem cukuriem), izmantoja 96 lauciņu mikroplatei pielāgotu DNS metodi (Gonçalves et al. 2010). Lai pagatavotu nepieciešamo reaģentu, izšķīdināja 0.5 g 3,5-dinitrosalicilskābes 25 mL destilēta ūdens, tad pievienoja 10 mL 2 N NaOH un 15 g nātrija kālija tartrāta tetrahidrāta. Pēc tam pievienoja papildus destilētu ūdeni tā, lai reaģenta kopējais tilpums būtu 50 mL.

Reakcijas maisījums sastāvēja no 25  $\mu\text{L}$  analizējamā fermentācijas parauga un 25  $\mu\text{L}$  DNS reaģenta. Šo maisījumu saturošo 96 lauciņu mikroplati karsēja 100 °C, 10 minūtes. Pēc šķīduma atdzesēšanas reakcijas maisījumam pievienoja 200  $\mu\text{L}$  divreiz destilēta ūdens, samaisīja ar daudzkanālu mikropieti un ar mikroplašu lasītāju nomērīja absorbciju pie 540 nm viļņu garuma. Abu metožu gadījumā katram paraugam veica divus tehniskos atkārtojumus.

Lai noteiktu fermentācijas vidē esošās soforozes koncentrāciju, vispirms ar DNS metodi iegūto rezultātu atņēma no rezultāta, kas iegūts ar antrona-sērskābes metodi. Šādi ieguva glikozes molāro koncentrāciju, kuru izdala ar divi, lai iegūtu soforozes koncentrāciju.

#### **2.2.4 Lipīdu koncentrācijas noteikšana fermentācijas vidē**

Lai noteiktu fermentācijas vidē atlikušo lipīdu koncentrāciju, veica ekstrakciju ar heksānu. Vispirms mēģenē ievietoja 1-2 mL bezšūnu fermentācijas vides paraugu un pievienoja tādu pašu daudzumu heksāna. Maisījumu samaisīja ar vorteksa maisītāju un centrifugēja pie 6000 rpm, piecas minūtes. Pēc tam ar mikropipeti pārnesa heksāna fāzi uz iepriekš nosvērtu stikla mēģeni un iztvaicēja heksānu ar vakuuma iztvaicēšanas ierīci D-AL režīmā 45 °C, 1-2 stundas (atkarībā no tilpuma). Pēc iztvaicēšanas mēģenes nosvēra.

#### **2.2.5 Soforolipīdu virsmaktīvo īpašību novērtēšana ar stalagmometrijas metodi**

Kursa darba ietvaros tika noskaidrots, ka stalagmometrijas metode ir piemērota SL virsmaktīvo īpašību novērtēšanai. Tāpēc šo metodi izmantoja arī šajā darbā, lai noteiktu SL spēju samazināt SD barotnes virsmas spraigumu. Mērījumus veica ar *S. bombicola* fermentācijas paraugu supernatantiem, kas iegūti pēc 10 garas fermentācijas. Supernatantus

atšķaidīja ar SD barotni, kuru izmantoja fermentācijā. Šo barotni izmantoja arī kā standartšķīdumu.

Stalagmometram ir divas atzīmes. Ar gumijas uzgali stalagmometrā iesūca analizējamo šķīdumu tā, lai tā menisks atrastos virs stalagmometra augšējās atzīmes. Stalagmometru vertikāli ievietoja statīvā, lai šķīdums no tā izpilētu. Pilienus skaitīja, kamēr šķīduma līmenis atradās starp abām stalagmometra atzīmēm, tādējādi nosakot pilienu skaitu, kas atbilst šķīduma tilpumam starp tām. Ar katru analizējamo šķīdumu veica trīs atkārtotus mērījumus. Pirms katra mērījuma ar jaunu šķīdumu stalagmometru vienu reizi izskaloja ar šo šķīdumu.

Virsmas spraigumu aprēķināja pēc formulas:

$$\sigma = \frac{\sigma_0 \rho n_0}{\rho_0 n},$$

kur  $\sigma_0$  – standartšķīduma virsmas spraigums ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ),

$\rho$  – pētāmā šķīduma blīvums ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),

$n_0$  – standartšķīduma pilienu skaits,

$\rho_0$  – standartšķīduma blīvums ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),

$n$  – pētāmā šķīduma pilienu skaits.

### 2.2.6 Aprites cikla analīze

Šajā darbā veiktās LCA mērķis bija salīdzināt ietekmi uz vidi SL ražošanas procesiem, kuros izmantotas dažādu substrātu kombinācijas. LCA veica tikai SL ražošanas posmam neiekļaujot nepieciešamo izejmateriālu un enerģijas ražošanas posmu un SL aprites cikla beigu posmu. Kā funkcionālo vienību izmantoja 1 kg saražotu SL. LCA veica, izmantojot ReCiPe 2016 Endpoint (H) V1.06 / World (2010) H/A metodi.

Veicot analīzi neņēma vērā barotnei pievienoto vitamīnu un metālu ietekmi uz vidi, jo to izmantotais daudzums ir ļoti mazs. Kā arī datu bāzēs nav atrodamā aprites cikla analīzes veikšanai nepieciešamā informācija par šīm sastāvdaļām. Izvirzīja pieņēmumu, ka šķīdrie atkritumi, kas paliek pāri pēc SL iegūšanas, nonāk notekūdeņos. Kā arī pieņēma, ka kratītājā – inkubatorā vienlaicīgi atrodas 3 L fermentācijas vides.

### 2.2.7 Datu apstrāde un statistiskā analīze

Datus apkopoja tabulās, izmantojot MS Excel. Datus apkopoja attēlos ar lietojumprogrammu R, izmantojot RStudio, ar funkciju ggplot2(). Tajos redzamās vērtības atspoguļo vidējās vērtības no visiem veiktajiem atkārtojumiem. Visiem mērījumiem aprēķināja standartnovirzes, izmantojot funkciju sd(). Visus statistiskos testus arī veica ar lietojumprogrammu R, izmantojot RStudio. Kalibrācijas līknēm veica regresijas analīzi, izmantojot funkciju lm(). Atšķirību būtiskumu starp vērtībām stalagmometrijas datos novērtēja, izmantojot dispersijas analīzi un TukeyHSD testu, lai novērtētu atšķirību starp atsevišķām datu

grupām. Gadījumos, kad dispersijas nebija homogēnas izmantoja Vilksona testu neatkarīgām paraugkopām. Ja bija nepieciešams salīdzināt divu paraugkopu datus, izmantoja neatkarīgu paraugkopu t-testu. Visus statistiskos testus veica pie būtiskuma līmeņa  $\alpha=0.05$ .

### 3. REZULTĀTI

Eksperimenta gaitā veica vairākas fermentācijas ar raugu *S. bombicola*, kur kā hidrofobo substrātu izmantoja nelietotu rapšu eļļu (NRE) vai dažādus lipīdiem bagātus pārtikas atkritumus: rapšu eļļu no fritētavas (FRE), rapšu eļļu no zivju kombināta (ZRE), saulespuķu eļļu no mājsaimniecības (SE), vistas taukus no grila (VT) un dzīvnieku taukus no žāvētavas (DzT). Pusē no fermentācijām kā hidrofilo substrātu izmantoja glikozi. Pārējās fermentācijās nepievienoja hidrofilu substrātu.

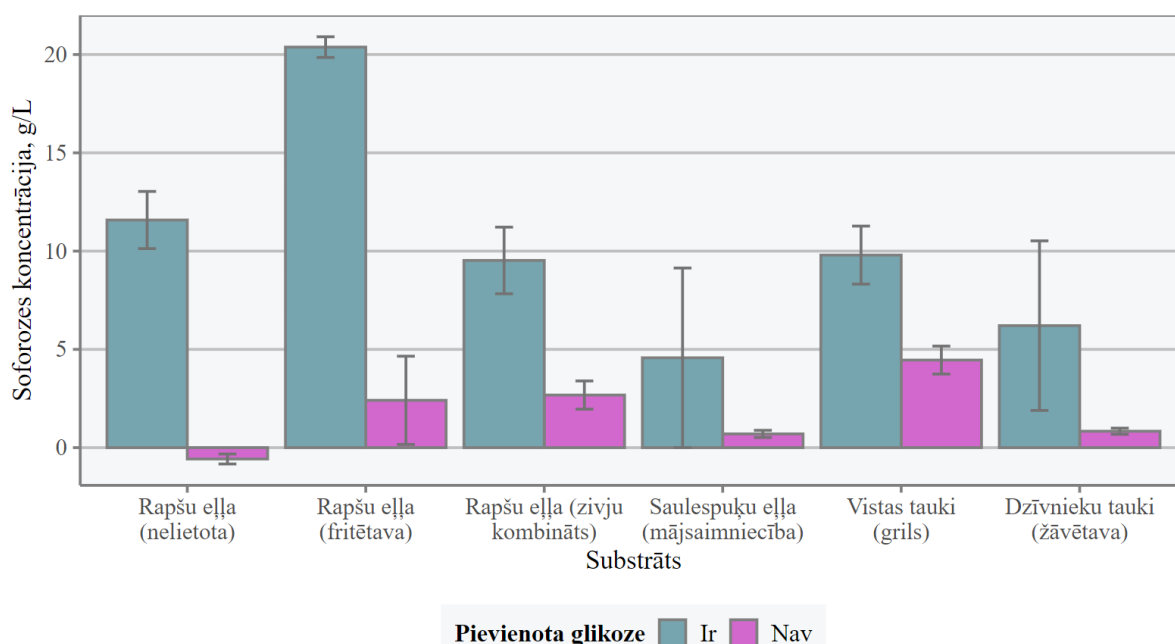
Desmit dienu garo fermentāciju laikā vairākas reizes paņēma paraugus, kuriem noteica šūnu skaitu. Pēdējās dienas paraugiem noteica arī SL koncentrāciju (izteiktu kā SL hidrofilās daļas - soforozes koncentrāciju), pārpalikušo lipīdu un glikozes koncentrāciju un barotnes virsmas spraiguma samazināšanas spēju.

Izmantojot iegūtos datus, veica aprites cikla analīzi (LCA), lai noteiktu perspektīvāko lipīdiem bagāto atkritumu veidu SL ražošanai ar iespējami mazāku ietekmi uz vidi.

#### 3.1 Soforolipīdu koncentrācijas novērtēšana

Fermentācijas vidē esošo SL koncentrāciju noteica, izmantojot antrona-sērskābes metodes un DNS metodes kombināciju. Ar antrona-sērskābes metodi noteica kopējo ogļhidrātu koncentrāciju (kurā ietilpst arī SL hidrofilā daļa), savukārt, ar DNS metodi noteica reducējošo cukuru koncentrāciju.

3. attēlā redzamas SL hidrofilās daļas koncentrācijas, kas iegūtas, izmantojot dažādus hidrofobos substrātus ar vai bez pievienotas glikozes. SL koncentrācija bija statistiski būtiski lielāka fermentāciju variantos ar pievienotu glikozi ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(6.03)}=3.61$ ,  $p=0.01$ ). SL koncentrācijas, kas iegūtas fermentācijās bez pievienotas glikozes, savstarpēji būtiski neatšķiras ( $\alpha=0.05$ ,  $p\geq 0.12$ ).



3. attēls. Soforolipīdu koncentrācija fermentācijas 10. dienā. Parādīta soforolipīdu hidrofilās daļas koncentrācija. Kļūdu stabiņi apzīmē standartnovirzes.

Figure 3. Sophorolipid concentration on 10th day of fermentation. Concentration of the sophorolipid hydrophilic moiety is shown. Error bars represent standard deviation.

Fermentācijā ar FRE un glikozi iegūtais SL daudzums ir statistiski būtiski lielāks, nekā visās pārējās fermentācijās ( $\alpha=0.05$ ,  $p<0.01$ ). Fermentācijas variantos ar glikozi un NRE, ZRE, VT, DzT iegūtā SL koncentrācija savstarpēji nav būtiski atšķirīga ( $\alpha=0.05$ ,  $p\geq 0.08$ ). Pastāv statistiski būtiska ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.02$ ) atšķirība starp SL koncentrācijām fermentācijās ar NRE un SE (ar pievienotu glikozi). NRE gadījumā šī vērtība ir lielāka. Fermentācijā ar NRE bez glikozes iegūtā SL koncentrācija būtiski neatšķiras no nulles ( $\alpha=0.05$ ,  $t_2=-3.93$ ,  $p=0.06$ ).

Lai salīdzinātu šajā darbā iegūto SL titru ar titru, kāds iegūts citos pētījumos, nepieciešams SL soforozes daļas koncentrāciju pārrēķināt uz SL koncentrāciju gramos uz litru barotnes. Kādā pētījumā noteica no glikozes un sojas pupiņu eļļas iegūta SL maisījuma struktūru kompozīciju. Šis SL maisījums sastāvēja no skābes un laktonu tipa SL, kuru hidrofobo daļu veidoja C16 un C18 taukskābes, kas bija gan piesātinātas, gan mono-, gan di-nepiesātinātas (Hu & Ju 2001). Šis sastāvs atbilst literatūrā aprakstītajam biežākajam SL struktūru sastāvam (Ashby & Solaiman 2019; Glenns & Cooper 2006; Marchant & Banat 2012), tāpēc šajā darbā SL koncentrāciju aprēķināja pēc koeficienta (2.04 g SL uz 1 g soforozes), kas atbilst šim sastāvam (Hu & Ju 2001) (2. tabula). Protams, šos aprēķinātos titrus nevar uzskatīt par precīziem, jo nenoteica taukskābju sastāvu fermentācijās iegūtajiem SL, un tas var būt atšķirīgs no Y. Hu & L.K. Ju (2001) eksperimentāli noteiktā.

2. tabulā redzami arī SL producēšanas ātrumi. Lielākais producēšanas ātrums bija fermentācijā ar FRE un glikozi.

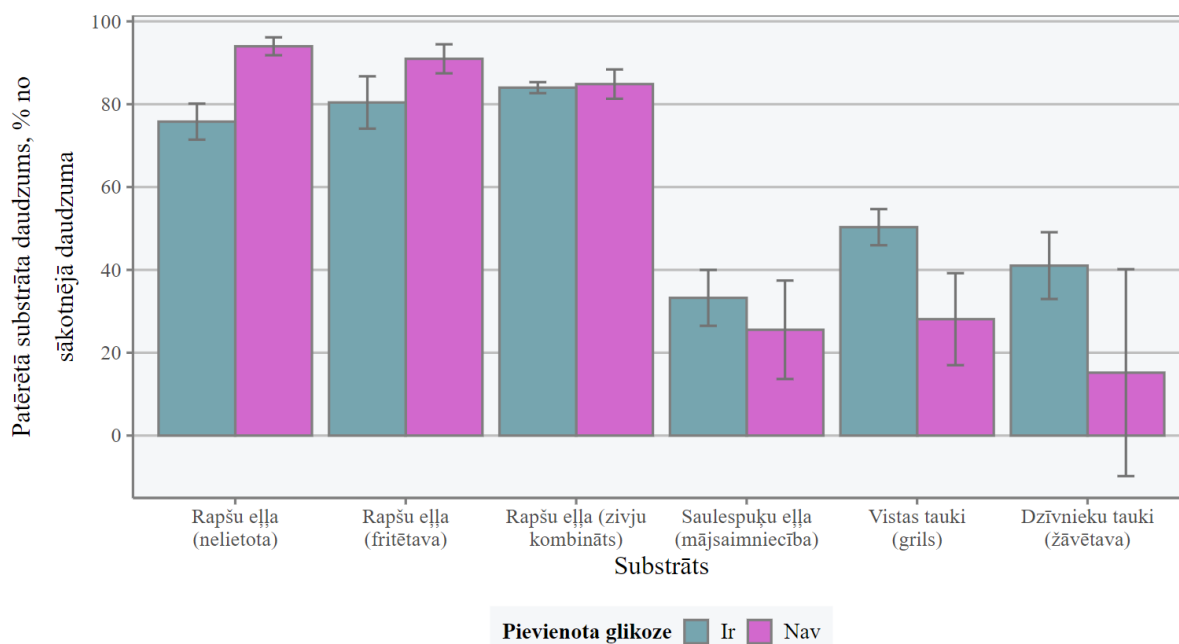
2. tabula. Pēc koeficienta (2.04 g soforolipīdu uz 1 g soforozes) aprēķinātais soforolipīdu titrs un soforolipīdu producēšanas ātrums. Koeficients no Y. Hu & L.K. Ju (2001).

Table 2. Calculated sophorolipid titer based on a coefficient (2.04 g sophorolipids per 1 g of sophorose) and productivity of sophorolipid synthesis. Coefficient from Y. Hu & L.K. Ju (2001).

| Substrāts                        | Pievienota glikoze | Soforolipīdu titrs, g·L <sup>-1</sup> | Soforolipīdu producēšanas ātrums, g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> |
|----------------------------------|--------------------|---------------------------------------|--|
| Rapšu eļļa (nelietota)           | Nav                | -1.18±0.52                            | -  |
| Rapšu eļļa (nelietota)           | Ir                 | 23.62±2.97                            | 0.10±0.01  |
| Rapšu eļļa (fritētava)           | Nav                | 4.91±4.58                             | 0.02±0.02  |
| Rapšu eļļa (fritētava)           | Ir                 | 41.57±1.07                            | 0.17±0.00  |
| Rapšu eļļa (zivju kombināts)     | Nav                | 5.46±1.46                             | 0.02±0.01  |
| Rapšu eļļa (zivju kombināts)     | Ir                 | 19.43±3.46                            | 0.08±0.01  |
| Saulespuķu eļļa (mājsaimniecība) | Nav                | 1.43±0.37                             | 0.01±0.00  |
| Saulespuķu eļļa (mājsaimniecība) | Ir                 | 9.32±9.32                             | 0.04±0.04  |
| Vistas tauki (grils)             | Nav                | 9.09±1.45                             | 0.04±0.01  |
| Vistas tauki (grils)             | Ir                 | 19.98±3.01                            | 0.08±0.01  |
| Dzīvnieku tauki (žāvētava)       | Nav                | 1.70±0.32                             | 0.01±0.00  |
| Dzīvnieku tauki (žāvētava)       | Ir                 | 12.66±8.80                            | 0.05±0.04  |

### 3.2 Lipīdu un glikozes patēriņa noteikšana

Fermentācijas beigās noteica, kādu daļu no sākotnēji pievienotajiem substrātiem *S. bombicola* bija patērējusi (4. attēls). Lipīdu koncentrāciju noteica, veicot ekstrakciju ar heksānu. Glikozes koncentrāciju nomērīja ar DNS metodi.



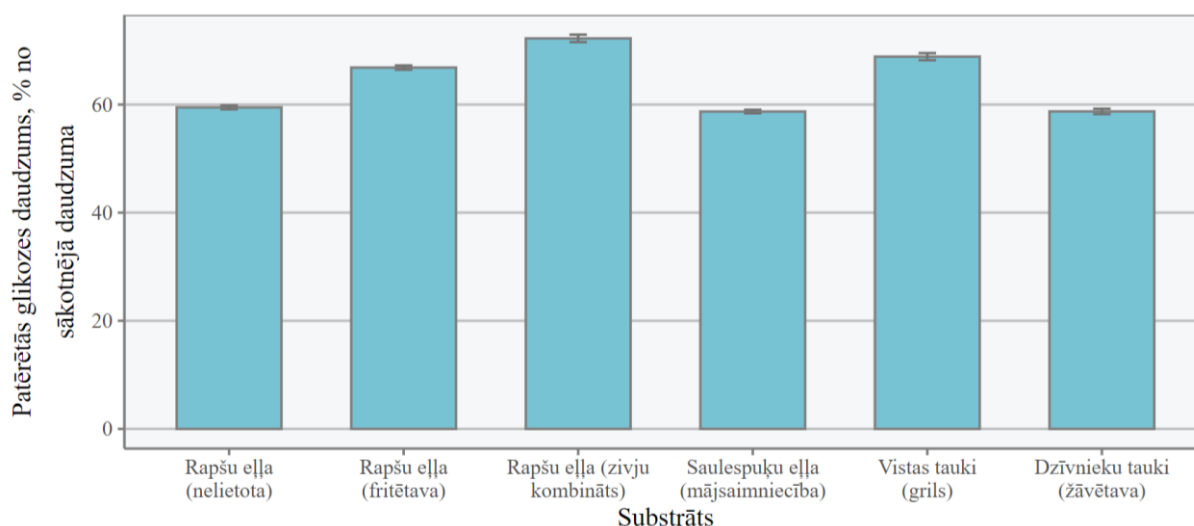
4. attēls. Fermentācijas laikā patērētais lipīdu daudzums procentos no sākotnēji pievienotā daudzuma. Kļūdu stabiņi apzīmē standartnovirzes.

Figure 4. Amount of lipids consumed during fermentation as a percentage of initial amount of lipids. Error bars represent standard deviation.

Lipīdu patēriņš starp variantiem, kur bija un nebija pievienota glikoze, nav būtiski atšķirīgs ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(44.37)}=1.49$ ,  $p=0.14$ ). Starp fermentācijas variantiem ar NRE, FRE un ZRE patērēto lipīdu daudzums būtiski neatšķiras ( $\alpha=0.05$ ,  $p\geq 0.17$ ). Arī lipīdu patēriņš starp variantiem ar SE, VT un DzT būtiski neatšķiras ( $\alpha=0.05$ ,  $p>0.05$ ).

Lielākais SL iznākums uz gramu lipīdu bija fermentācijā ar FRE un pievienotu glikozi ( $0.54\pm 0.04$  g·g<sup>-1</sup>). Tālāk seko fermentācija ar VT un glikozi ( $0.40\pm 0.03$  g·g<sup>-1</sup>), VT bez glikozes ( $0.37\pm 0.16$  g·g<sup>-1</sup>), NRE un glikozi ( $0.34\pm 0.02$  g·g<sup>-1</sup>), DzT un glikozi ( $0.34\pm 0.06$  g·g<sup>-1</sup>), SE ar glikozi ( $0.31\pm 0.06$  g·g<sup>-1</sup>), ZRE un glikozi ( $0.25\pm 0.00$  g·g<sup>-1</sup>). Ļoti mazi iznākumi bija vairumā fermentāciju bez glikozes pievienošanas: ar SE kā substrātu iznākums bija  $0.08\pm 0.05$  g·g<sup>-1</sup>, ar ZRE –  $0.07\pm 0.00$  g·g<sup>-1</sup>, ar FRE –  $0.06\pm 0.00$  g·g<sup>-1</sup>, ar DzT –  $0.04\pm 1.75$  g·g<sup>-1</sup>.

5. attēlā redzams glikozes patēriņš fermentācijas variantiem, kur bija pievienoti 60 g·L<sup>-1</sup> glikozes. Visos variantos patērējās aptuveni 60% no pievienotās glikozes vai vairāk.



5. attēls. Fermentācijas laikā patērētais glikozes daudzums procentos no sākotnēji pievienotā daudzuma. Kļūdu stabiņi apzīmē standartnovirzes.

Figure 5. Amount of glucose consumed during fermentation as a percentage of initial amount of glucose. Error bars represent standard deviation.

Statistiski būtiska atšķirība nepastāv starp variantiem, kur kā hidrofobo substrātu izmantoja NRE, DzT un SE ( $\alpha=0.05$ ,  $p\geq 0.36$ ), ZRE un VT ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.17$ ). Pārējie varianti ir savstarpēji atšķirīgi ( $\alpha=0.05$ ,  $p<0.01$ ).

Vislielākais SL iznākums uz gramu glikozes bija fermentācijai ar FRE ( $1.09\pm 0.02$  g·g<sup>-1</sup>). Tad seko fermentācijas ar NRE ( $0.68\pm 0.01$  g·g<sup>-1</sup>), ZRE ( $0.48\pm 0.02$  g·g<sup>-1</sup>), VT ( $0.47\pm 0.02$  g·g<sup>-1</sup>), DzT ( $0.37\pm 0.02$  g·g<sup>-1</sup>) un SE ( $0.27\pm 0.01$  g·g<sup>-1</sup>).

### 3.3 Soforolipīdu virsmaktīvo īpašību novērtēšana

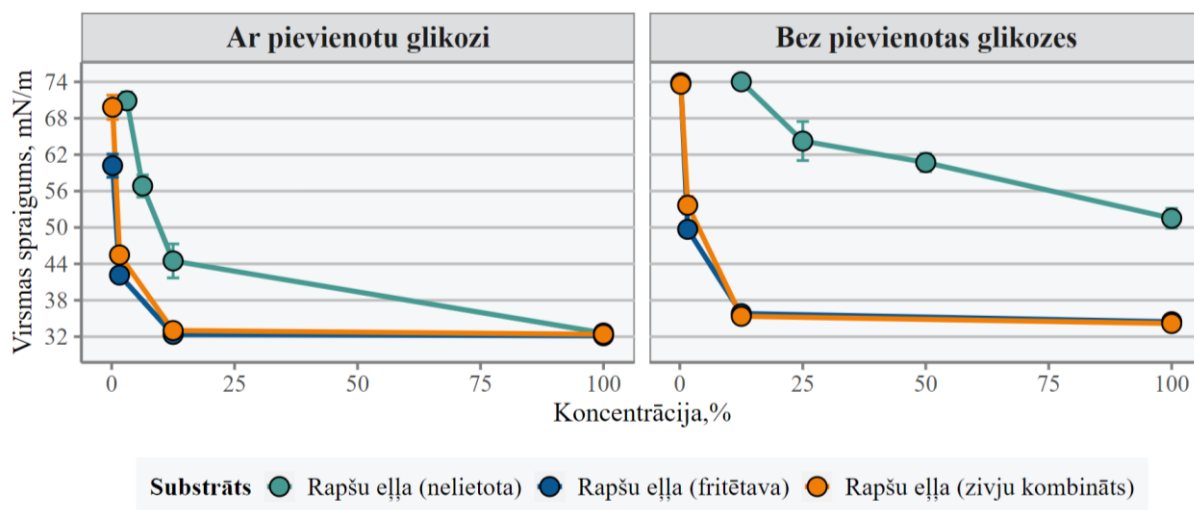
Šajā darbā novērtēja vienu no SL virsmaktīvajām īpašībām: virsmas spraiguma samazināšanas spēju. To izdarīja, izmantojot stalagmometrijas metodi.

6. attēlā redzams, ka visvājākā virsmas spraiguma samazināšanas spēja ir fermentācijas paraugam, kur kā substrāts izmantota NRE bez glikozes (virsmas spraiguma samazinājums līdz  $52\pm 1.6$  mN·m<sup>-1</sup>).

Paraugš no fermentācijas ar NRE un glikozi barotnes virsmas spraigumu samazināja līdz  $33\pm 0.2$  mN·m<sup>-1</sup>. Ja kā substrātu izmantoja FRE bez un ar glikozi, barotnes virsmas spraigums samazinājās attiecīgi līdz  $34\pm 0.2$  mN·m<sup>-1</sup> un  $32\pm 0.2$  mN·m<sup>-1</sup>. Paraugš no fermentācijas ar ZRE bez un ar glikozi barotnes virsmas spraigumu samazināja attiecīgi līdz  $34\pm 0.4$  mN·m<sup>-1</sup> un  $32\pm 0.3$  mN·m<sup>-1</sup>.

Pastāv statistiski būtiska atšķirība maksimālajā virsmas spraiguma samazināšanas spējā starp fermentācijas paraugiem, kur izmantoja tikai hidrofobo substrātu un kur izmantoja attiecīgo hidrofobo substrātu un arī hidrofilo substrātu ( $\alpha=0.05$ ,  $p<0.01$ ). Izmantojot gan hidrofobu, gan hidrofilu substrātu, virsmas spraigums samazinājās lielākā mērā. Statistiski

būtiska atšķirība nepastāv starp virsmas spraiguma samazināšanas spēju visiem fermentācijas paraugiem, kuriem bija pievienota glikoze ( $\alpha=0.05$ ,  $p\geq 0.88$ ). Arī paraugiem no fermentācijas ar FRE bez glikozes un ZRE bez glikozes nepiemīt statistiski būtiski atšķirīga virsmas spraiguma samazināšanas spēja ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.98$ ).



6. attēls. Virsmas spraiguma atkarība no fermentācijas vides parauga koncentrācijas šķīdumā. Kļūdu stabiņi apzīmē standartnovirzes.

Figure 6. Dependence of surface tension on concentration of fermentation medium sample in solution. Error bars represent standard deviation.

Kritiskās micellu koncentrācijas (KMK) noteikšanai novilkta divas lineāras tendences līknes: caur punktiem, kas atbilst straujam virsmas spraiguma samazinājumam, un caur punktiem, kuros ir sasniegts minimālais virsmas spraigums un tas vairs nemainās vai mainās minimāli. Šo abu tendences līkņu krustpunkts atbilst KMK vērtībai (Cámara et al. 2019). Šajā darbā KMK izteica, kā fermentācijas parauga koncentrāciju analizētajā šķīdumā (%).

Paraugiem, kas iegūti fermentācijās ar NRE ar un bez glikozes, nav iespējams noteikt KMK. 6. attēlā redzams, ka līknēm, kas atbilst šīm fermentācijām, nav tāda posma, kurā virsmas spraigums mainās minimāli. Tāpēc KMK nav nosakāma.

KMK paraugam, kur kā substrātu izmantoja FRE, ir  $2.39\pm 0.07\%$ . Kad kā substrātus izmantoja FRE un glikozi, šī vērtība ir  $2.36\pm 0.09\%$ . Savukārt, paraugos no fermentācijas ar ZRE bez un ar pievienotu glikozi, KMK ir respektīvi,  $2.88\pm 0.13\%$  un  $2.32\pm 0.07\%$ .

### 3.4 Šūnu skaita noteikšana

Šūnu skaitu noteica, izmantojot šūnu skaitītāju, kura darbība balstīta uz fluorescences mikroskopijas principu.

Kaut gan 3. pielikumā parādīto datu izkliede vietām ir liela, redzams, ka *S. bombicola* šūnas spēj izdzīvot visu lipīdiem bagātu atkritumu klātbūtnē.

Statistiski būtiska atšķirība nepastāv starp dzīvo šūnu skaitu fermentācijas sākumā variantos ar NRE, un variantiem ar FRE ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(22)}=1.12$ ,  $p=0.27$ ), ZRE ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(22)}=1.65$ ,  $p=0.11$ ). Taču fermentācijas variantos ar NRE sākotnējais dzīvo šūnu skaits bija statistiski būtiski lielāks, nekā fermentācijās ar SE ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(11.50)}=3.10$ ,  $p=0.01$ ), VT ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(11.04)}=3.39$ ,  $p=0.01$ ), DzT ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(11.27)}=3.15$ ,  $p=0.01$ ).

Dzīvu šūnu skaits fermentācijas beigās, kur kā substrātu izmantoja FRE, būtiski neatšķīrās no šūnu skaita, kad izmantoja NRE ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(22)}=0.69$ ,  $p=0.50$ ). No dzīvo šūnu skaita fermentācijā ar NRE, būtiski neatšķīrās arī šūnu skaits fermentācijā ar VT ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(22)}=-1.56$ ,  $p=0.13$ ). Dzīvo šūnu koncentrācija fermentācijas beigās, kad kā substrātu izmantoja NRE, bija būtiski lielāka, nekā fermentācijā ar ZRE ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(15.08)}=2.91$ ,  $p=0.01$ ). Savukārt, pēdējās dienas dzīvo šūnu koncentrācija fermentācijā ar NRE, bija būtiski mazāka, nekā fermentācijās ar SE ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(16.28)}=-3.09$ ,  $p<0.01$ ) un DzT ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(22)}=-7.68$ ,  $p<0.01$ ).

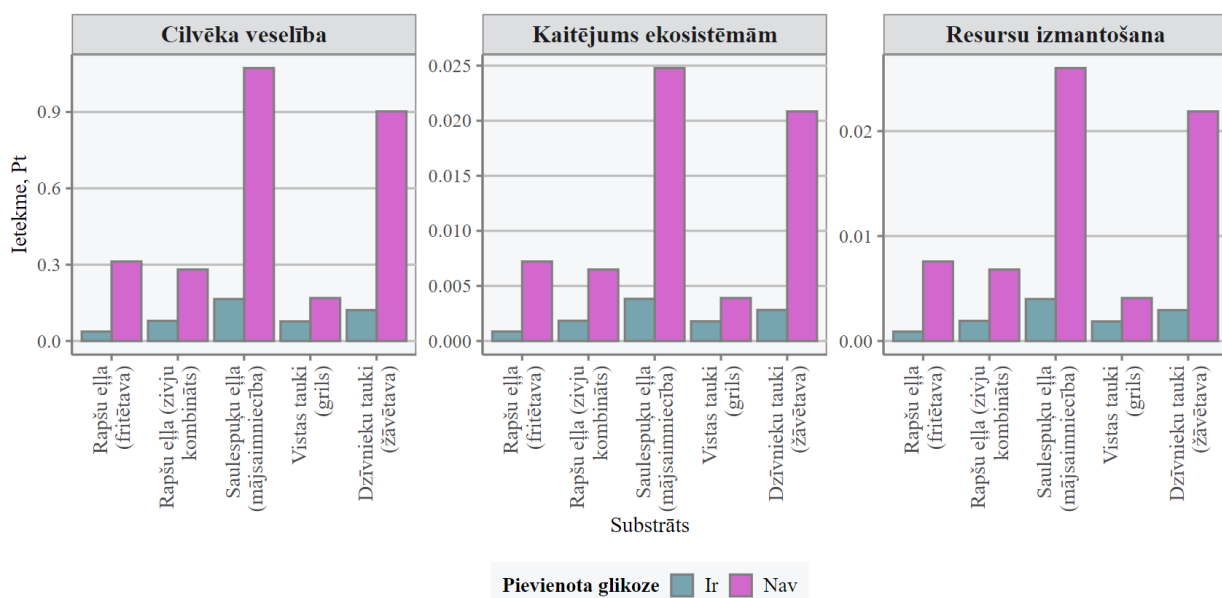
Dzīvo šūnu skaits fermentācijas sākumā būtiski neatšķīrās starp variantiem, kur bija un nebija pievienota glikoze ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(52.99)}=-0.63$ ,  $p=0.53$ ). Arī fermentācijas beigās šo šūnu skaitu neietekmēja tas, vai barotnei bija pievienota glikoze vai ne, jo dzīvo šūnu skaits starp šādām fermentācijām nebija būtiski atšķirīgs ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(70)}=0.26$ ,  $p=0.80$ ).

### **3.5 Soforolipīdu ražošanas ietekmes uz vidi novērtējums**

Ietekmi uz vidi SL ražošanas procesiem novērtēja, veicot aprites cikla analīzi. Ražošanas procesus ar dažādiem substrātiem salīdzināja pēc to radītās ietekmes vairākās kategorijās. 7. attēlā parādītas trīs no tām.

Fermentācijās ar lipīdiem bagātiem pārtikas atkritumiem vislielāko daļu no ietekmes (ap 100%) uz vidi SL ražošanas procesā izraisa elektroenerģijas izmantošana piemērotas vides temperatūras uzturēšanai un maisīšanai, kas nodrošina skābekļa un barības vielu apmaiņu fermentācijas laikā. Savukārt, NRE gadījumā vislielāko ietekmes daļu (57.72%) veidoja rapšu sēklu audzēšana rapšu eļļas iegūšanai (dati nav parādīti). Aprites cikla analīzi neveica SL ražošanas procesam, kurā kā substrātu izmantoja NRE bez pievienotas glikozes, jo šajā procesā iegūto SL koncentrācija būtiski neatšķīrās no nulles (skat. 3.1 nodaļu).

7. attēlā parādīta SL ražošanas ietekme uz vidi trīs ietekmes kategorijās (cilvēka veselība, kaitējums ekosistēmām, resursu izmantošana), ja kā substrātus fermentācijā izmantoja lipīdiem bagātus pārtikas atkritumus ar vai bez pievienotas glikozes. Visās trīs kategorijās ietekme ražošanas procesiem, kuros izmantoja glikozi, būtiski neatšķīras no ietekmes, ko rada procesi bez pievienotas glikozes ( $\alpha=0.05$ ,  $t_{(31)}=-0.89$ ,  $p=0.38$ ).



7. attēls. Soforolipīdu ražošanas no lipīdiem bagātiem pārtikas atkritumiem radītais kaitējums dažādās kategorijās. Pt – punkts ir mērvienība, kas apzīmē daļu no visas populācijas izraisītās ietekmes uz vidi, ko atstāj viens cilvēks gada laikā.

Figure 7. Damage caused by sophorolipid production using lipid-rich food waste streams in different categories. Pt – a point is a unit, that represents the share of the entire population’s environmental impact, which is caused by one person in a year.

SL ražošanas process rada statistiski būtiski lielāku kaitējumu kategorijā “cilvēka veselība”, nekā kategorijās “kaitējums ekosistēmām” un “resursu izmantošana” ( $\alpha=0.05$ ,  $p<0.01$ ). Radītā ietekme kategorijās “kaitējums ekosistēmām” un “resursu izmantošana” būtiski neatšķiras ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.99$ ).

## 4. DISKUSIJA

### 4.1 Soforolipīdu koncentrācijas novērtēšana

SL koncentrācija fermentācijā ar NRE bez pievienotas glikozes ir negatīva. Tā kā tā ir ļoti tuvu nullei, to var pieņemt kā mērījumu kļūdu, kas varētu būt radusies, savienojot divas spektrofotometrijas metodes: antrona-sērskābes metodi kopējo oglekļa dioksīdu noteikšanai un DNS metodi - reducējošo cukuru noteikšanai. *S. bombicola* šajā fermentācijā SL neražoja vai, ņemot vērā barotnes virsmas spraiguma samazinājuma datus, ražoja minimālā daudzumā.

Vislielākā SL koncentrācija iegūta fermentācijā ar FRE un glikozi kā substrātiem. Šī koncentrācija ir gandrīz divas reizes lielāka, nekā fermentācijā ar NRE iegūtā. Arī SL producēšanas ātrums fermentācijā ar FRE ir daudz lielāks, nekā pārējās fermentācijās (skat. 2. tabulu). Šis novērojums nesakrīt ar literatūrā atrodamo informāciju, jo parasti SL titrs, izmantojot lietotu augu eļļu kā substrātu, ir mazāks, nekā, ja izmanto tādu pašu nelietotu eļļu, jo lietotas eļļas satur SL sintēzi inhibējošus savienojumus (Kim et al. 2021).

SL titrs no fermentācijas ar NRE un glikozi ir pielīdzināms titram no visām fermentācijām ar lipīdiem bagātiem atkritumiem un glikozi (izņemot ar FRE un SE). Tas nozīmē, ka šajos substrātos arī nav sastopami SL sintēzi inhibējoši savienojumi. Taču SL titrs ar SE un glikozi bija būtiski mazāks nekā ar NRE un glikozi. Tātad SE iespējams satur SL sintēzi inhibējošus savienojumus vai arī SL titrs ir zemāks, jo saulespuķu eļļa satur mazāk taukskābju, kuras var tiešā veidā tikt iekļautas SL molekulā (skat. 1. tabulu). 3. pielikumā var redzēt, ka šūnu skaits fermentācijās ar SE laika gaitā palielinās. Tas nozīmē, ka šūnu kultūra neatrodas stacionārajā fāzē, kurā parasti notiek SL biosintēze (Lodens et al. 2020). Šis var būt vēl viens iemesls, kāpēc iegūtais SL titrs bija zems. To pašu var teikt arī par fermentācijām, kur kā hidrofobo substrātu izmantoja VT un DzT. Arī šajās fermentācijās šūnu skaits laika gaitā palielinās, un SL titrs ir ievērojami mazāks, nekā fermentācijā ar FRE. Iespējams, ka šajos atkritumu veidos atradās kādi slāpekļa avoti, kas veicināja šūnu dalīšanos un kavēja SL sintēzi. Ja fermentācijas vide satur daudz slāpekļa, tad vajadzētu veikt garākas fermentācijas, lai slāpekļa avots būtu patērēts un būtu sasniegta stacionārā fāze, kad notiek SL sintēze.

Visās fermentācijās bez pievienotas glikozes iegūts līdzīgi zems SL titrs, kas ir ievērojami zemāks par titru, kas iegūts, pievienojot fermentācijas videi glikozi. Līdzīgi šī darba rezultātiem arī M.H. To et al. (2022) konstatēja, ka SL titrs palielinās, palielinoties pievienotās glikozes koncentrācijai (sakarība novērojama ar glikozes koncentrācijām līdz  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

J.H. Kim et al. (2021) periodiskajā kultivēšanā bez piebarošanas, izmantojot 10% (w/v) nenoteikta sastāva lietotu cepamo eļļu un  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  glikozi kā substrātus, ieguva  $84.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  SL, kas ir ievērojami vairāk, nekā šajā darbā iegūtie SL titri. Šo atšķirību var izskaidrot ar to, ka J.H. Kim et al. (2021) fermentāciju veica bioreaktorā, kur bija kontrolēta ne tikai temperatūra

un maisīšanas ātrums, bet arī skābekļa koncentrācija un pH. Šie faktori noteikti uzlaboja iegūto titru.

G.L. Maddikeri et al. (2015) periodiskajā kultivēšanā bioreaktorā bez piebarošanas, izmantojot  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  lietotu cepamo eļļu un  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  glikozi kā substrātus, ieguva  $21.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  SL. Kaut gan fermentācija veikta bioreaktorā, kur bija iespējams regulēt dažādus parametrus, iegūtais titrs ir daudz zemāks, nekā J.H. Kim et al. (2021) veiktajā fermentācijā. SL titru ietekmē ne tikai iepriekš minētie bioreaktorā kontrolējamie parametri, bet arī slāpekļa koncentrācija, hidrofobā substrāta koncentrācija un atsevišķu mikroelementu koncentrācija (Dierickx et al. 2022; Ingham & Winterburn 2022). Iespējams, ka G.L. Maddikeri et al. (2015) fermentācijā kāds no šiem citiem apstākļiem nebija optimāls.

Šajā darbā veiktajā fermentācijā ar FRE un pievienotu glikozi iegūtais SL titrs ir apmēram divas reizes lielāks, nekā G.L. Maddikeri et al. (2015) pētījumā aprakstītais. G.L. Maddikeri et al. (2015) pētījumā sasniegtais SL titrs ir diezgan līdzīgs titriem, kas iegūti fermentācijās ar NRE, ZRE, VT (visos gadījumos ar pievienotu glikozi).

V. Shah et al. (2007) periodiskajā kultivēšanā bez piebarošanas ar lietotu cepamo eļļu ( $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) un glikozi ( $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) kā substrātiem ieguva  $30\pm 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  SL. Šis titrs ir mazāks, nekā šajā darbā veiktajā fermentācijā ar FRE un glikozi iegūtais.

T. Minucelli et al. (2017) pēc veiktas optimizācijas periodiskās kultivēšanas procesā ar  $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  vistas taukiem un  $77.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  glikozi kā substrātiem ieguva  $39.81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  SL. Tas ir vairāk, nekā šajā darbā iegūtais titrs, izmantojot šādus pašus substrātus. Taču jāņem vērā, ka šī darba ietvaros neveica fermentācijas apstākļu optimizāciju.

Daudzviet 3. attēlā redzamajās koncentrācijās novērojamas lielas standartnovirzes. Atsevišķos gadījumos pēc centrifugācijas SL nogulsnes atradās zem šūnām, tāpēc tās nebija iespējams pievienot bezšūnu paraugam. Šajā gadījumā noteiktā SL koncentrācija ir zemāka par patieso. Taču iespējams arī pretējais, ja antrona-sērskābes metodē izmantojamā paraugā iekļūst šūnas. Izmantojot šo metodi, šūnas tiktu hidrolizētas un to sastāvā esošie cukuri tiktu pieskaitīti pie kopējas ogļhidrātu koncentrācijas. Tādā gadījumā noteiktā SL koncentrācija būtu lielāka par patieso.

Vēl jāpiebilst, ka nav zināms, vai fermentācijās izmantotie lipīdiem bagātie atkritumi saturēja cukurus. Piemēram, dzīvnieku izcelsmes lipīdi var saturēt glikogēnu un lipīdi, kuros cepti augu izcelsmes produkti, var saturēt cieti. Ar šajā darbā izmantotajām metodēm nebija iespējams atsevišķi noteikt šādu cukuru klātbūtni. Antrona-sērskābes metode nosaka visus ogļhidrātus, savukārt, DNS metode nosaka tikai reducējošos cukurus. Ja lipīdiem bagātie substrāti saturēja cukurus, šajā darbā pieņemts, ka šo cukuru koncentrācija bija neliela.

Produktivitāte efektīvam SL ražošanas procesam ir vismaz  $1-2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , taču šādu produktivitāti bijis iespējams sasniegt tikai bioreaktoros, izmantojot periodisko kultivēšanu ar piebarošanu (Wongsirichot et al. 2021). Šajā darbā produktivitāte bija zemāka, taču tā nav salīdzināma ar maksimālajiem literatūrā atrodamajiem lielumiem, jo kultivāciju veica kolbās bez piebarošanas.

#### 4.2 Lipīdu un glikozes patēriņa noteikšana

4. attēlā redzams, ka visi izmantotie rapšu eļļu veidi bija patērēti daudz lielākā mērā, nekā pārējie lipīdu substrāti. Tomēr SL iznākums uz gramu substrāta, izmantojot šīs eļļas kā substrātu, nav ievērojami lielāks (izņemot FRE gadījumā), nekā no pārējiem substrātiem.

Noteiktais eļļas patēriņš visos gadījumos var būt neprecīzs, jo homogēnu paraugu ievākšana ir problemātiska. Pēc tam, kad kolbas saturs ir samaisīts, tajā esošie lipīdi uzpeld atpakaļ uz virsmas pāris sekunžu laikā, tāpēc parauga ievākšana jāveic ļoti ātri. Tajā pašā laikā to nevar darīt pārāk ātri, citādi pipetē nokļūst gaiss. Pat ja paraugus izdevās ievākt homogēni, ar tiem pirms lipīdu koncentrācijas noteikšanas veica arī citus testus, kuriem bija nepieciešama tikai daļa no katra parauga. Ja cenšoties paņemt daļu no parauga to kārtīgi nesamaisa, var izmainīties lipīdu un pārējās barotnes proporcija. Vēl visus paraugus centrifugē, lai atbrīvotos no šūnām. Pēc centrifugēšanas pārnesot paraugu no viena trauka uz citu, var neizdoties saglabāt proporciju starp lipīdiem un pārējām barotnes sastāvdaļām. No paraugu homogenitātes problēmām varētu izvairīties, veicot ekstrakciju ar heksānu visam kolbas saturam vai atdalot lipīdus no pārējā kolbas satura ar dalāmo piltuvi.

Nepublicēti HPLC dati no šo pašu fermentāciju paraugiem parāda, ka fermentācijas beigās ar trīs šajā darbā minētajām rapšu eļļām un glikozi glicerīna koncentrācija bija no 11.88 līdz  $12.47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (skat. 4. pielikumu). Pieņemot, ka viss glicerīns radies lipāzēm šķēļot triglicerīdus, var salīdzināt šos datus ar datiem, kas iegūti no ekstrakcijas ar heksānu. Izmantojot taukskābju proporcijas nelietotai rapšu eļļai no M. Aniołowska et al. (2016), bija iespējams aprēķināt, kādai rapšu eļļas koncentrācijai atbilst nomērītās glicerīna koncentrācijas. Pēc aprēķiniem iegūtās pārpalikušās rapšu eļļas koncentrācijas bija no 120.73 līdz  $126.67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Tās ir lielākas, nekā sākotnēji pievienotās eļļas koncentrācijas (no 92.74 līdz  $96.43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Šajā gadījumā *S. bombicola* glicerīnu noteikti nepatērēja, jo barotnē bija arī glikoze, kas nebija pilnībā patērēta un ir prioritārs substrāts (Wongsirichot et al. 2021). Lielās aprēķinātās eļļas koncentrācijas (līdz ar to arī lielās glicerīna koncentrācijas) var izskaidrot ar to, ka *S. bombicola* spēj arī ražot glicerīnu. Fermentācijā, kas ilga 48 stundas, *S. bombicola* saražoja aptuveni  $2-3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  glicerīna (Canonica et al. 2016). Iespējams, ka šajā darbā veiktajās fermentācijās tika ražots glicerīns un vairums pievienoto rapšu eļļu bija patērētas.

Šādus pašus aprēķinus veica arī ar glicerīna datiem no fermentācijām ar rapšu eļļām bez pievienotas glikozes. Fermentācijā ar NRE patērējās  $0.43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  triglicerīdu, ar FRE –  $16.70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  triglicerīdu, ar ZRE –  $20.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  triglicerīdu. Aprēķinātā patērētās eļļas koncentrācija ir zemāka par 4. attēlā redzamo. Tā kā šajās fermentācijās nebija pievienots hidrofilais substrāts, *S. bombicola* varēja izmantot glicerīnu kā oglekļa avotu. Tas varētu izskaidrot to, kāpēc pēc ekstrakcijas ar heksānu noteiktā patērētās eļļas koncentrācija ir daudz lielāka, nekā pēc fermentācijas vidē esošās glicerīna koncentrācijas aprēķinātā. Var secināt, ka glicerīna koncentrācija fermentācijas beigās nav labs rādītājs patērēto triglicerīdu koncentrācijas novērtēšanai, ja fermentācijas vidē nav pievienots cits hidrofilais substrāts.

Nav novērojamas nekādas sakarības starp glikozes patēriņu un SL ražošanu. Kaut gan fermentācijā ar NRE un glikozi iegūtais SL titrs ir būtiski lielāks, nekā fermentācijā ar SE un glikozi, šajos fermentācijas variantos patērētais glikozes daudzums nav būtiski atšķirīgs. Tas apstiprina literatūrā aprakstīto novērojumu, ka no vides uzņemtā glikoze netiek tieši iekļauta SL molekulas sastāvā. Soforoze veidojas no glikoneoģenēzes ceļā sintezētām glikozes molekulām (Van Bogaert et al. 2011). Fermentācijas varianti, kuros šūnu skaits laika gaitā palielinājās (skat. 3. pielikumu), bija ar mazu SL iznākumu uz gramu glikozes. Var secināt, ka šajās fermentācijās liela daļa glikozes tika izmantota biomasas veidošanai.

Tāpat kā SL titrs un producēšanas ātrums, arī SL iznākums uz gramu glikozes un uz gramu lipīdu bija vislielākais fermentācijas variantam ar FRE un pievienotu glikozi.

### 4.3 Soforolipīdu virsmaktīvo īpašību novērtējums

Barotnes virsmas spraiguma samazināšanas spēju nebija iespējams noteikt fermentācijas vides paraugiem, kur kā substrātu izmantoja SE, VT un DzT, jo SL veidoja fermentācijas vidē nešķīstošas nogulsnes. Ja SL nav izšķīduši, tad tie nevar veidot micellas un tāpēc šķīduma virsmas spraigums nevar samazināties līdz minimālajai vērtībai. 5. pielikumā parādīti attēli ar SL nogulsnēm šajos fermentācijas vides paraugos. Tā kā nebija iespējams noteikt šo fermentācijas vides paraugu virsmas spraiguma samazināšanas spēju, arī KMK nebija nosakāma.

Atšķirības starp maksimālo virsmas spraiguma samazinājumu fermentācijas vidēm, kurās kā substrātu izmantoja dažādas rapšu eļļas ar vai bez pievienotas glikozes, bija būtiskas. Pēc šiem rezultātiem var spriest, ka glikozes klātbūtnē ražotie SL spēj virsmas spraigumu samazināt lielākā mērā. R.N. Glenns & D.G. Cooper (2006) pierādīja, ka laktonu tipa SL, it īpaši acetilēti laktonu tipa SL, spēj samazināt šķīduma virsmas spraigumu lielākā mērā, nekā skābes tipa SL. Iespējams, ka tad, kad ir pieejama glikoze *S. bombicola* vairāk producē laktonu tipa SL.

Arī fermentācijas vidē pārpalikusī glikoze nelielā mērā var ietekmēt barotnes virsmas spraigumu, taču glikozes klātbūtne nevis samazina šķīduma virsmas spraigumu, bet gan to

palielina. Kādā pētījumā noskaidrots, ka 8.8% (w/w) glikozes pievienošana palielina ūdens virsmas spraigumu par  $0.7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (Docoslis et al. 2000). Pārpalikušās glikozes daudzums šajā darbā veiktajās fermentācijās bija pārāk mazs, lai radītu ievērojamu ietekmi uz barotnes virsmas spraigumu.

Literatūrā atrodamās vērtības, līdz kādām SL spēj samazināt ūdens šķīduma virsmas spraigumu ir starp  $32.1$  un  $36.5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (Daverey & Pakshirajan 2009; Van Bogaert et al. 2011; Vedaraman & Venkatesh 2010; Wadekar et al. 2012). Šajā darbā iegūtie rezultāti ietilpst šajā intervālā.

Kā minēts iepriekš, NRE gadījumā KMK neizdevās noteikt. Līknēm, kas atbilst šiem paraugiem (6. attēls), nav novērojams posms, kurā virsmas spraiguma vērtība mainās minimāli.

Fermentācijā ar NRE bez glikozes iegūtais SL titrs bija vienāds ar nulli vai bija ļoti mazs. Tā kā barotnes virsmas spraigums ir samazinājies, var spriest, ka ar NRE kā substrātu iegūtais SL titrs nebija vienāds ar nulli. Vēl ir iespējams, ka šī fermentācijas vide saturēja taukskābes, kas arī spēj samazināt virsmas spraigumu. Nātrija oleāta šķīdumam  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  koncentrācijā pie pH 4 virsmas spraigums ir aptuveni  $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Taču pie pH 4-6 nātrija oleāts veido nogulsnes pat tik zemās koncentrācijās kā  $0.003 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Atrafi & Pawlik 2016). Nevienā paraugā, kur kā substrātu izmantoja kādu no rapšu eļļām, kas satur daudz oleīnskābes, nebija novērojamas nogulsnes, tāpēc var pieņemt, ka brīvo taukskābju koncentrācija nebija pietiekami liela, lai ietekmētu šķīduma virsmas spraigumu. Ja nogulsnes paraugos bija tik mazos daudzumos, ka tās nebija redzamas, tad visticamāk pēc centrifugēšanas nogulsnes nosēstos virs vai zem biomasas slāņa un nenonāktu bezšūnu fermentācijas paraugā, kuram noteica virsmas spraigumu.

Savukārt, nav iespējams pateikt, vai fermentācijas paraugs ar NRE un pievienotu glikozi 100% koncentrācijā sasniedza minimālo barotnes virsmas spraigumu, jo nav redzami vismaz divi punkti, starp kuriem virsmas spraiguma vērtība ievērojami nemainās. Lai noskaidrotu, vai šajā punktā sasniegta minimālā barotnes virsmas spraiguma vērtība, būtu nepieciešams veikt virsmas spraiguma mērījumu ar vismaz vienu atšķaidījumu, kur fermentācijas parauga koncentrācija ir starp 12.5% un 100%.

Visas noteiktās KMK nevar uzskatīt par precīzām, jo punktu skaits, caur kuriem novilkta tendences līknes šo koncentrāciju noteikšanai, ir ļoti mazs. Rezultātu precizitāti būtu iespējams uzlabot, veicot virsmas spraiguma mērījumus ar lielāku skaitu dažādu koncentrāciju šķīdumiem. Kā arī šādu neattīrītu vielu KMK vērtības ir augstākas kā tādām pašām vielām ar augstu tīrības pakāpi (Kłosowska-Chomiczewska et al. 2017).

#### 4.4 Šūnu skaita noteikšana

Šūnu skaita datus vērojama liela izkliede. Tam var būt vairāki iemesli, piemēram, šūnām vajadzētu uz mikroskopijas slaida atrasties vienā plaknē. Iespējams, ka visas šūnas nepagūst nosēsties līdz slaida apakšai, jo tās ir salīdzinoši mazas (apmēram 2 μm diametrā).

Būtisko atšķirību starp sākotnējo dzīvo šūnu skaitu fermentācijas variantos ar NRE un variantos ar SE, VT un DzT var izskaidrot ar to, ka ar pēdējiem trīs substrātiem veica fermentācijas eksperimentu citā laikā, tāpēc arī šūnu suspensija, ar kuru inokulēja barotni, bija ar atšķirīgu šūnu koncentrāciju.

Neskatoties uz to, ka sākotnējais dzīvo šūnu daudzums fermentācijās ar iepriekš minētajiem substrātiem bija mazāks, nekā fermentācijā ar NRE, dzīvo šūnu skaits šo fermentāciju beigās nebija būtiski atšķirīgs vai bija pat lielāks, nekā fermentācijās ar NRE. Šūnu skaits fermentācijai ar FRE, gan tās beigās, gan sākumā nebija būtiski atšķirīgs no fermentācijas ar NRE. Šie dati liecina par to, ka šie lipīdiem bagātie pārtikas atkritumu veidi veido labvēlīgu vidi šūnu augšanai un tajos nav augšanu inhibējoši savienojumi. Iespējams, ka šajos lipīdu atkritumos bija augšanai nepieciešami savienojumi, piemēram, aminoskābes, kas var nodrošināt šūnas ar slāpekli, kas barotnei nebija pievienots.

Pretēju secinājumu var izdarīt par ZRE, jo dzīvo šūnu koncentrācija fermentāciju beigās, izmantojot šo eļļu kā substrātu, bija mazāka, nekā fermentācijās ar NRE. Iespējams, ka ZRE satur augšanu inhibējošus savienojumus.

Dzīvo šūnu koncentrācijas fermentācijās, kur pievienoja vai nepievienoja glikozi, nebija būtiski atšķirīgas ne fermentācijas sākumā, ne beigās. Tas nozīmē, ka glikozei nebija ietekmes uz šūnu augšanu.

#### 4.5 Soforolipīdu ražošanas ietekmes uz vidi novērtējums

Salīdzinot 7. attēlā redzamos datus ar SL koncentrācijas datiem (2. tabula, 3. attēls), var redzēt, ka ietekmes uz vidi lielums ir apgriezti proporcionāls SL titram. Tas ir, jo lielāks ir iegūtais SL titrs, jo mazāka ir ražošanas procesa ietekme uz vidi. Tāpēc var secināt, ka SL ražošanu ar vismazāko ietekmi uz vidi var veikt, izmantojot FRE un glikozi kā substrātus.

No trīs apskatītajām ietekmes kategorijām SL ražošanas process radīja vislielāko kaitējumu kategorijā "cilvēka veselība". SL ražošana var kaitēt cilvēka veselībai, jo iegūstot SL ražošanai nepieciešamo elektroenerģiju, rodas emisijas.

Šajā darbā konstatēts, ka lielākā daļa no SL ražošanas procesa ietekmes uz vidi rodas izmantotās elektroenerģijas dēļ. Tāpēc būtu vēlams palielināt elektroenerģijas izmantošanas efektivitāti, tas ir, optimizēt fermentācijas apstākļus, lai palielinātu iegūto SL titru. Tādējādi būtu iespējams iegūt lielāku SL daudzumu, izmantojot tādu pašu elektroenerģijas daudzumu. SL titru palielināt būtu iespējams arī, izmantojot periodisko kultivēšanu ar piebarošanu. J.H.

Kim et al. (2021) ieguva 3.7 reizes lielāku SL titru periodiskajā kultivēšanā ar piebarošanu, nekā periodiskajā kultivēšanā bez piebarošanas tādos pašos apstākļos.

#### 4.6 Tālākie pētījumu virzieni

Turpmākos pētījumos noteikti vajadzētu izmantot FRE kā hidrofobo substrātu, jo, ņemot vērā visus iepriekš minētos aspektus, šis substrāts ir perspektīvākais SL ražošanai no visiem pārbaudītajiem substrātiem. Fermentācijās būtu jāizmanto arī hidrofilis substrāts, jo šajā darbā pierādīja, ka SL titrs glikozes klātbūtnē ir daudz lielāks, nekā bez glikozes pievienošanas. Tāpat kā NRE, arī glikozi varētu aizvietot ar kādu pārtikas atkritumu veidu, piemēram, melasi, kā tas ir darīts citos pētījumos (Daverey & Pakshirajan 2009; Solaiman et al. 2007). Glikozes aizvietošana ar melasi ļautu ne tikai samazināt SL ražošanas izmaksas, bet arī samazināt SL ražošanas procesa ietekmi uz vidi. Pilotmēroga eksperimentā, kur kā substrātus izmantoja glikozi un rapšu eļļu, vislielāko daļu no ietekmes uz vidi radīja tieši šo abu substrātu izmantošana, nevis elektroenerģijas izmantošana kā tas bija šajā darbā (Dierickx et al. 2022).

Turpmāk vajadzētu veikt periodisko kultivēšanu ar piebarošanu, jo tā ir iespējams iegūt ievērojami lielāku SL titru, nekā periodiskajā kultivēšanā bez piebarošanas (Kim et al. 2021). Lai palielinātu SL titru, būtu nepieciešams arī optimizēt fermentācijas apstākļus un pievienoto substrātu koncentrācijas. To iespējams izdarīt, izmantojot atbildes virsmas (*response surface*) metodoloģiju vai multiplo lineāro regresiju (Ingham & Winterburn 2022; To et al. 2022).

Vēl būtu jāatrod piemērota SL attīrīšanas metode, jo vairumam pielietojumu SL būtu derīgi tikai attīrītā veidā. Šobrīd visbiežāk izmantotā metode SL attīrīšanai ir ekstrakcija ar organisku šķīdinātāju (vairumā gadījumu – ar etilacetātu). Šī metode ir ne tikai ar zemu efektivitāti, bet arī palielina SL ražošanas procesa ietekmi uz vidi, jo šķīdinātājus izmanto lielā daudzumā (attiecībā pret iegūto produktu) un tie ir toksiski (Liepins et al. 2021). Tāpēc šim nolūkam nepieciešams izstrādāt jaunu metodi.

## 5. SECINĀJUMI

1. Vispiemērotākais lipīdiem bagāto pārtikas atkritumu veids soforolipīdu ražošanai ir rapšu eļļa no fritētavas, jo ar šo eļļu kā hidrofobo substrātu un glikozi kā hidrofilo substrātu ir iespējams iegūt vislielāko soforolipīdu titru un iznākumu uz gramu substrāta.

2. Soforolipīdus ar labāku virsmas spraiguma samazināšanas spēju ir iespējams iegūt fermentācijās ar pievienotu hidrofobu un hidrofilu substrātu.

3. Saulespuķu eļļa no mājsaimniecības, vistas tauki no grila un dzīvnieku tauki no žāvētavas satur slāpekļa avotus tādā daudzumā, kas veicina šūnu augšanu un vienlaicīgi kavē soforolipīdu sintēzi.

4. Ietekmes uz vidi lielums ir apgriezti proporcionāls iegūtajam soforolipīdu titram: ietekme samazinās, palielinoties soforolipīdu titram.

5. Vismazāko ietekmi uz vidi rada soforolipīdu ražošanas process, kurā kā substrātus izmanto rapšu eļļu no fritētavas un glikozi.

## 6. PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību darba vadītājam Ievai Bērziņai par palīdzību metožu apgūvē un par darba zinātniskās kvalitātes uzlabošanu. Pateicos konsultantam Jānim Liepiņam par palīdzību metožu izvēlē un padomiem darba rakstīšanā. Paldies konsultantei Elīnai Dācei par darba zinātniskās kvalitātes uzlabošanu un palīdzību terminoloģijas izvēlē. Pateicos Karīnai Bāliņai par aprites cikla modeļa izveidošanu.

Bakalaura darbs izstrādāts ar Eiropas Reģionālās attīstības fonda projekta “Lipīdu atkritumu ilgtspējīga valorizācija: mikroorganismu pielietošana bio-virsmaktīvo vielu ražošanā” (Nr.1.1.1.1/19/A/047) atbalstu.

## 7. LITERATŪRAS SARAKSTS

- Aniłowska M., Zahran H., Kita A. 2016. The effect of pan frying on thermooxidative stability of refined rapeseed oil and professional blend. - *Journal of Food Science and Technology*, 53 (1): 712–720.
- Aphalo P. J. 2021. ggpmisc: Miscellaneous Extensions to “ggplot2.” <https://cran.r-project.org/package=ggpmisc>
- Ashby R. D., Solaiman D. K. Y. 2019. Sophorolipids: Unique Microbial Glycolipids with Vast Application Potential. In *Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications* (pp. 28–55). CRC Press.
- Atrafi A., Pawlik M. 2016. Surface tension and gas dispersion properties of fatty acid solutions. - *Minerals Engineering*, 85: 138–147.
- Awogbemi O., Onuh E. I., Inambao F. L. 2019. Comparative study of properties and fatty acid composition of some neat vegetable oils and waste cooking oils. - *International Journal of Low Carbon Technologies*, 14 (3): 417–425.
- Baccile N., Babonneau F., Banat I. M., Ciesielska K., Cuvier A. S., Devreese B., Everaert B., Lydon H., Marchant R., Mitchell C. A., Roelants S., Six L., Theeuwes E., Tsatsos G., Tsotsou G. E., Vanlerberghe B., Van Bogaert I. N. A., Soetaert W. 2017. Development of a Cradle-to-Grave Approach for Acetylated Acidic Sophorolipid Biosurfactants. - *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5 (1): 1186–1198.
- Câmara J. M. D. A., Sousa M. A. S. B., Barros Neto E. L., Oliveira M. C. A. 2019. Application of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial-enhanced oil recovery (MEOR). - *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 9 (3): 2333–2341.
- Canonica L., Comitini F., Oro L., Ciani M. 2016. Sequential Fermentation with Selected Immobilized Non-Saccharomyces Yeast for Reduction of Ethanol Content in Wine. - *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Cherubini V., Lamastra F. R., Bragaglia M., Nanni F. 2021. Waste cooking oils as processing aids for eco-sustainable elastomeric compounding. - *Progress in Rubber, Plastics and Recycling Technology*, .
- Chhetri A. B., Watts K. C., Islam M. R. 2008. Waste Cooking Oil as an Alternate Feedstock for Biodiesel Production. - *Energies (Basel)*, 1 (1): 3–18.
- Ciesielska K., Van Bogaert I. N., Chevineau S., Li B., Groeneboer S., Soetaert W., Van de Peer Y., Devreese B. 2014. Exoproteome analysis of *Starmerella bombicola* results in the discovery of an esterase required for lactonization of sophorolipids. - *Journal of Proteomics*, 98: 159–174.

- Claus S., Jezierska S., Elbourne L. D. H., Van Bogaert I. 2022. Exploring the transportome of the biosurfactant producing yeast *Starmerella bombicola*. - *BMC Genomics*, 23 (1): 1–17.
- Daverey A., Pakshirajan K. 2009. Production, Characterization, and Properties of Sophorolipids from the Yeast *Candida bombicola* using a Low-cost Fermentative Medium. - *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158 (3): 663–674.
- Davila A. M., Marchal R., Vandecasteele J. P. 1994. Sophorose lipid production from lipidic precursors: Predictive evaluation of industrial substrates. - *Journal of Industrial Microbiology*, 13 (4): 249–257.
- De Clercq V., Roelants S. L. K. W., Castelein M. G., De Maeseneire S. L., Soetaert W. K. 2021. Elucidation of the natural function of sophorolipids produced by *starmerella bombicola*. - *Journal of Fungi*, 7 (11).
- De Graeve M., De Maeseneire S. L., Roelants S. L. K. W., Soetaert W. 2018. *Starmerella bombicola*, an industrially relevant, yet fundamentally underexplored yeast. - *FEMS Yeast Research*, 18 (7): 1–13.
- de Lapuente Díaz de Otazu R. L., Akizu-Gardoki O., de Ulibarri B., Iturrondobeitia M., Minguez R., Lizundia E. 2022. Ecodesign coupled with Life Cycle Assessment to reduce the environmental impacts of an industrial enzymatic cleaner. - *Sustainable Production and Consumption*, 29: 718–729.
- De S., Malik S., Ghosh A., Saha R., Saha B. 2015. A review on natural surfactants. - *RSC Advances*, 5 (81): 65757–65767.
- Dierickx S., Castelein M., Remmery J., De Clercq V., Lodens S., Baccile N., De Maeseneire S. L., Roelants S. L. K. W., Soetaert W. K. 2022. From bumblebee to bioeconomy: Recent developments and perspectives for sophorolipid biosynthesis. - *Biotechnology Advances*, 54 (March 2021): 107788.
- Docoslis A., Giese R. F., van Oss C. J. 2000. Influence of the water–air interface on the apparent surface tension of aqueous solutions of hydrophilic solutes. - *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 19 (2): 147–162.
- Dolman B. M., Kaisermann C., Martin P. J., Winterburn J. B. 2017. Integrated sophorolipid production and gravity separation. - *Process Biochemistry*, 54: 162–171.
- Drakontis C. E., Amin S. 2020. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. - *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 48: 77–90.
- Glenns R. N., Cooper D. G. 2006. Effect of substrate on sophorolipid properties. - *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83 (2): 137–145.
- Goedkoop M., Oele M., Leijting J., Ponsioen T., Meijer E. 2013. Introduction to LCA with SimaPro. PRe consultants.

- Gonçalves C., Rodriguez-Jasso R. M., Gomes N., Teixeira J. A., Belo I. 2010. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. - *Analytical Methods*, 2 (12): 2046–2048.
- Gonçalves C., Ferreira C., Gonçalves L. G., Turner D. L., Leandro M. J., Salema-Oom M., Santos H., Gonçalves P. 2019. A New Pathway for Mannitol Metabolism in Yeasts Suggests a Link to the Evolution of Alcoholic Fermentation. - *Frontiers in Microbiology*, 10 (November): 1–15.
- Hu X., Subramanian K., Wang H., Roelants S. L. K. W., Soetaert W., Kaur G., Lin C. S. K., Chopra S. S. 2021a. Bioconversion of Food Waste to produce Industrial-scale Sophorolipid Syrup and Crystals: dynamic Life Cycle Assessment (dLCA) of Emerging Biotechnologies. - *Bioresource Technology*, 337 (April): 125474.
- Hu X., Subramanian K., Wang H., Roelants S. L. K. W., To M. H., Soetaert W., Kaur G., Lin C. S. K., Chopra S. S. 2021b. Guiding environmental sustainability of emerging bioconversion technology for waste-derived sophorolipid production by adopting a dynamic life cycle assessment (dLCA) approach. - *Environmental Pollution*, 269: 116101.
- Hu Y., Ju L.-K. 2001. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. - *Enzyme and Microbial Technology*, 29 (10): 593–601.
- Huang F.-C., Peter A., Schwab W. 2014. Expression and characterization of CYP52 genes involved in the biosynthesis of sophorolipid and alkane metabolism from *Starmerella bombicola*. - *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (2): 766–776.
- Ingham B., Winterburn J. 2022. Developing an understanding of sophorolipid synthesis through application of a central composite design model. - *Microbial Biotechnology*, .
- Jeziarska S., Claus S., Ledesma-Amaro R., Van Bogaert I. 2019. Redirecting the lipid metabolism of the yeast *Starmerella bombicola* from glycolipid to fatty acid production. - *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46 (12): 1697–1706.
- Jeziarska S., Claus S., Van Bogaert I. 2018. Yeast glycolipid biosurfactants. - *FEBS Letters*, 592 (8): 1312–1329.
- Kassambara A. 2020. ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots. <https://cran.r-project.org/package=ggpubr>
- Kim J.-H., Oh Y.-R., Hwang J., Kang J., Kim H., Jang Y.-A., Lee S.-S., Hwang S. Y., Park J., Eom G. T. 2021. Valorization of waste-cooking oil into sophorolipids and application of their methyl hydroxyl branched fatty acid derivatives to produce engineering bioplastics. - *Waste Management (Elmsford)*, 124: 195–202.
- Kłosowska-Chomiczewska I. E., Mędrzycka K., Hallmann E., Karpenko E., Pokynbroda T., Macierzanka A., Jungnickel C. 2017. Rhamnolipid CMC prediction. - *Journal of Colloid and Interface Science*, 488: 10–19.

- Kopsahelis A., Kourmentza C., Zafiri C., Kornaros M. 2018. Gate-to-gate life cycle assessment of biosurfactants and bioplasticizers production via biotechnological exploitation of fats and waste oils. - *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93 (10): 2833–2841.
- Leyva A., Quintana A., Sánchez M., Rodríguez E. N., Cremata J., Sánchez J. C. 2008. Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: Method development and validation. - *Biologicals*, 36 (2): 134–141.
- Liepins J., Balina K., Soloha R., Berzina I., Lukasa L. K., Dace E. 2021. Glycolipid biosurfactant production from waste cooking oils by yeast: Review of substrates, producers and products. - *Fermentation*, 7 (3).
- Lodens S., Roelants S. L. K. W., Luyten G., Geys R., Coussement P., de Maeseneire S. L., Soetaert W. 2020. Unraveling the regulation of sophorolipid biosynthesis in *Starmerella bombicola*. - *FEMS Yeast Research*, 20 (3).
- Lourith N., Kanlayavattanakul M. 2009. Natural surfactants used in cosmetics: Glycolipids. - *International Journal of Cosmetic Science*, 31 (4): 255–261.
- Ma X., Meng L., Zhang H., Zhou L., Yue J., Zhu H., Yao R. 2020. Sophorolipid biosynthesis and production from diverse hydrophilic and hydrophobic carbon substrates. - *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104 (1): 77–100.
- Maddikeri G. L., Gogate P. R., Pandit A. B. 2015. Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. - *Chemical Engineering Journal*, 263: 479–487.
- Madihalli C., Doble M. 2019. Microbial Production and Applications of Mannosylerythritol, Cellobiose and Trehalose Lipids. In *Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications* (pp. 81–105). CRC Press.
- Mannu A., Vlahopoulou G., Urgeghe P., Ferro M., Del Caro A., Taras A., Garroni S., Rourke J. P., Cabizza R., Petretto G. L. 2019. Variation of the Chemical Composition of Waste Cooking Oils upon Bentonite Filtration. - *Resources (Basel)*, 8 (2): 108.
- Marchant R., Banat I. M. 2012. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? - *Biotechnology Letters*, 34 (9): 1597–1605.
- McGiffen M., Shrestha A., Fennimore S. A. 2014. Chemical Control Methods. In S. A. Fennimore & C. A. Bell (Eds.), *Principles of Weed Control 4th Edition* (pp. 89–133). California Weed Science Society.
- Minucelli T., Ribeiro-Viana R. M., Borsato D., Andrade G., Cely M. V. T., de Oliveira M. R., Baldo C., Celligoi M. A. P. C. 2017. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and Its Potential Application in Soil Bioremediation. - *Waste and Biomass*

- Valorization, 8 (3): 743–753.
- Paszkievicz W., Muszyński S., Kwiecień M., Zhyla M., Świątkiewicz S., Arczewska-Włosek A., Tomaszewska E. 2020. Effect of Soybean Meal Substitution by Raw Chickpea Seeds on Thermal Properties and Fatty Acid Composition of Subcutaneous Fat Tissue of Broiler Chickens. - *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 10 (3): 533.
- Paulino B. N., Pessôa M. G., Mano M. C. R., Molina G., Neri-Numa I. A., Pastore G. M. 2016. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. - *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (24): 10265–10293.
- R Core Team. 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- RStudio Team. 2022. RStudio: Integrated Development Environment for R. <http://www.rstudio.com/>
- Schauberger P., Walker A. 2021. openxlsx: Read, Write and Edit xlsx Files. <https://cran.r-project.org/package=openxlsx>
- Shah V., Jurjevic M., Badia D. 2007. Utilization of Restaurant Waste Oil as a Precursor for Sophorolipid Production. - *Biotechnology Progress*, 23 (2): 512–515.
- Sharma P., Usman M., Salama E. S., Redina M., Thakur N., Li X. 2021. Evaluation of various waste cooking oils for biodiesel production: A comprehensive analysis of feedstock. - *Waste Management*, 136 (August): 219–229.
- Solaiman D. K. Y., Ashby R. D., Zerkowski J. A., Foglia T. A. 2007. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. - *Biotechnology Letters*, 29 (9): 1341–1347.
- Thavasi R., Banat I. 2019. Introduction to Microbial Biosurfactants. In R. Thavasi & I. Banat (Eds.), *Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications* (p. 1). CRC Press.
- To M. H., Wang H., Lam T. N., Kaur G., Roelants S. L. K. W., Lin C. S. K. 2022. Influence of bioprocess parameters on sophorolipid production from bakery waste oil. - *Chemical Engineering Journal*, 429 (September 2021): 132246.
- Van Bogaert I. N. A., Holvoet K., Roelants S. L. K. W., Li B., Lin Y. C., Van de Peer Y., Soetaert W. 2013. The biosynthetic gene cluster for sophorolipids: A biotechnological interesting biosurfactant produced by *Starmerella bombicola*. - *Molecular Microbiology*, 88 (3): 501–509.
- Van Bogaert I. N. A., Zhang J., Soetaert W. 2011. Microbial synthesis of sophorolipids. - *Process Biochemistry*, 46 (4): 821–833.
- Vedaraman N., Venkatesh N. 2010. The effect of medium composition on the production of

- sophorolipids and the tensiometric properties by *Starmerella bombicola* MTCC 1910. - Polish Journal of Chemical Technology, 12 (2): 9–13.
- Wadekar S., Kale S., Lali A., Bhowmick D., Pratap A. 2012. Sophorolipid production by *starmerella bombicola* (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects of activated earth treatment of the waste oils. - JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society, 89 (6): 1029–1039.
- Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L. D., François R., Grolemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T. L., Miller E., Bache S. M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D. P., Spinu V., ... Yutani H. 2019. Welcome to the {tidyverse}. - Journal of Open Source Software, 4 (43): 1686.
- Wickham H., Bryan J. 2019. *readxl: Read Excel Files*. <https://cran.r-project.org/package=readxl>
- Wickham H., François R., Henry L., Müller K. 2021. *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. <https://cran.r-project.org/package=dplyr>
- Wongsirichot P., Ingham B., Winterburn J. 2021. A review of sophorolipid production from alternative feedstocks for the development of a localized selection strategy. - Journal of Cleaner Production, 319 (August): 128727.

## **PIELIKUMI**

## Cietās YPD (yeast peptone dextrose) barotnes sastāvs

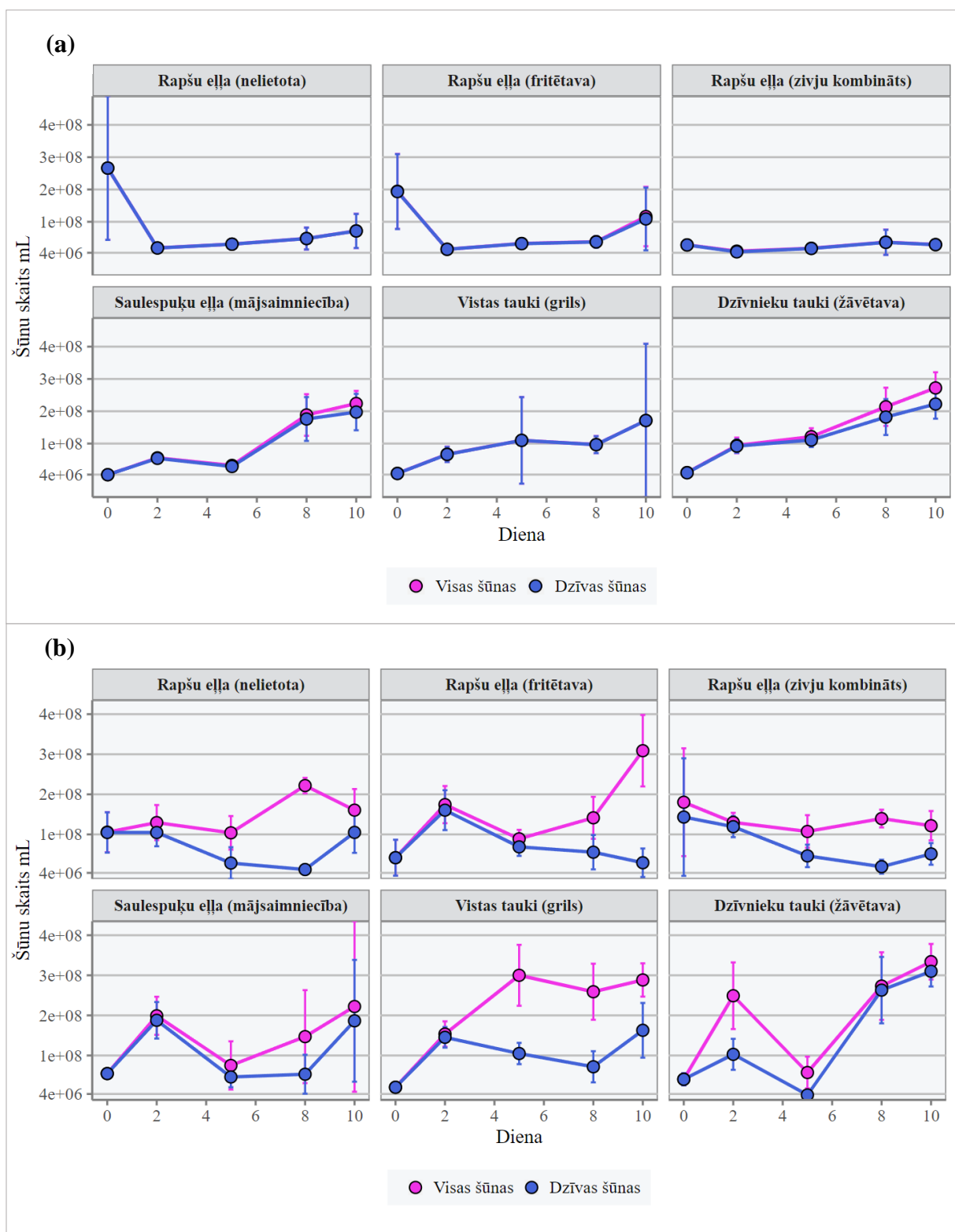
| <b>Sastāvdaļa</b>                          | <b>Koncentrācija, g·L<sup>-1</sup></b> | <b>Ražotājs</b> | <b>Valsts</b> |
|--|--|-----------------|---------------|
| Rauga ekstrakts,<br>bakterioloģiska tīrība | 10.0                                   | BioLife         | Latvija       |
| Peptons,<br>bakterioloģiska tīrība         | 20.0                                   | BioLife         | Latvija       |
| Agars, bakterioloģiska<br>tīrība           | 20.0                                   | BioLife         | Latvija       |
| D-(+)-glikozes<br>monohidrāts, 99.0%       | 21.82                                  | Sigma Aldrich   | Francija      |
| Tetraciklīns, ≥98.0%                       | 2.5×10 <sup>-3</sup>                   | Sigma Aldrich   | Vācija        |

## SD (synthetic defined) barotnes sastāvs

| Sastāvdaļa  | Koncentrācija, g·L <sup>-1</sup> | Ražotājs                              | Valsts   |
|---|----------------------------------|---------------------------------------|----------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , ≥99.0%        | 5.0                              | Merck KGaA                            | Vācija   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 99.5%                         | 1.0                              | Sigma-Aldrich                         | Vācija   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O,<br>≥98.0%                | 0.5                              | Sigma Aldrich                         | Vācija   |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O, 94%                      | 0.1                              | Sigma Aldrich                         | Vācija   |
| NaCl  | 0.1                              | LSTK                                  | Latvija  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                                  | 5.0×10 <sup>-4</sup>             | Реахим                                | Krievija |
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O,<br>≥98.0%                | 4.0×10 <sup>-5</sup>             | Sigma Aldrich                         | Vācija   |
| KI, ≥99.5%  | 1.0×10 <sup>-4</sup>             | Merck KGaA                            | Vācija   |
| FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O, 97%                      | 2.0×10 <sup>-4</sup>             | Sigma Aldrich                         | Vācija   |
| MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O                            | 4.0×10 <sup>-4</sup>             | Реахим                                | Krievija |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O,<br>99.99% | 2.0×10 <sup>-4</sup>             | Sigma Aldrich                         | Vācija   |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O, 99%                      | 4.0×10 <sup>-4</sup>             | Sigma Aldrich                         | Vācija   |
| Biotīns, ≥99%   | 2.0×10 <sup>-6</sup>             | Sigma Chemical<br>Company             | ASV      |
| Kalcija pantotenāts   | 4.0×10 <sup>-4</sup>             | Sigma Aldrich                         | Vācija   |
| Folijskābe, ≥97%  | 2.0×10 <sup>-6</sup>             | Sigma Aldrich                         | Ķīna     |
| Inozitols   | 2.0×10 <sup>-3</sup>             | Sigma Chemical<br>Company             | ASV      |
| Niacīns   | 4.0×10 <sup>-4</sup>             | Sigma Aldrich                         | Ķīna     |
| p-aminobenzoskābe,<br>99%                                       | 2.0×10 <sup>-4</sup>             | Sigma Chemical<br>Company             | ASV      |
| Piridoksīna<br>hidrohlorīds, ≥98%                               | 4.0×10 <sup>-4</sup>             | SERVA<br>Feinbiochemica<br>Heidelberg | Vācija   |
| Riboflavīns, ≥98%   | 2.0×10 <sup>-4</sup>             | AppliChem GmbH                        | Vācija   |
| Tiamīna hidrohlorīds,<br>≥99%                                   | 4.0×10 <sup>-4</sup>             | Sigma Aldrich                         | Vācija   |
| Tetraciklīns, ≥98.0%  | 2.5×10 <sup>-3</sup>             | Sigma Aldrich                         | Vācija   |

3. pielikums.

Šūnu skaita izmaiņas barotnē (a) bez pievienotas glikozes un (b) ar pievienotu glikozi ( $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) fermentācijas laikā. Kļūdu stabiņi apzīmē standartnovirzes.

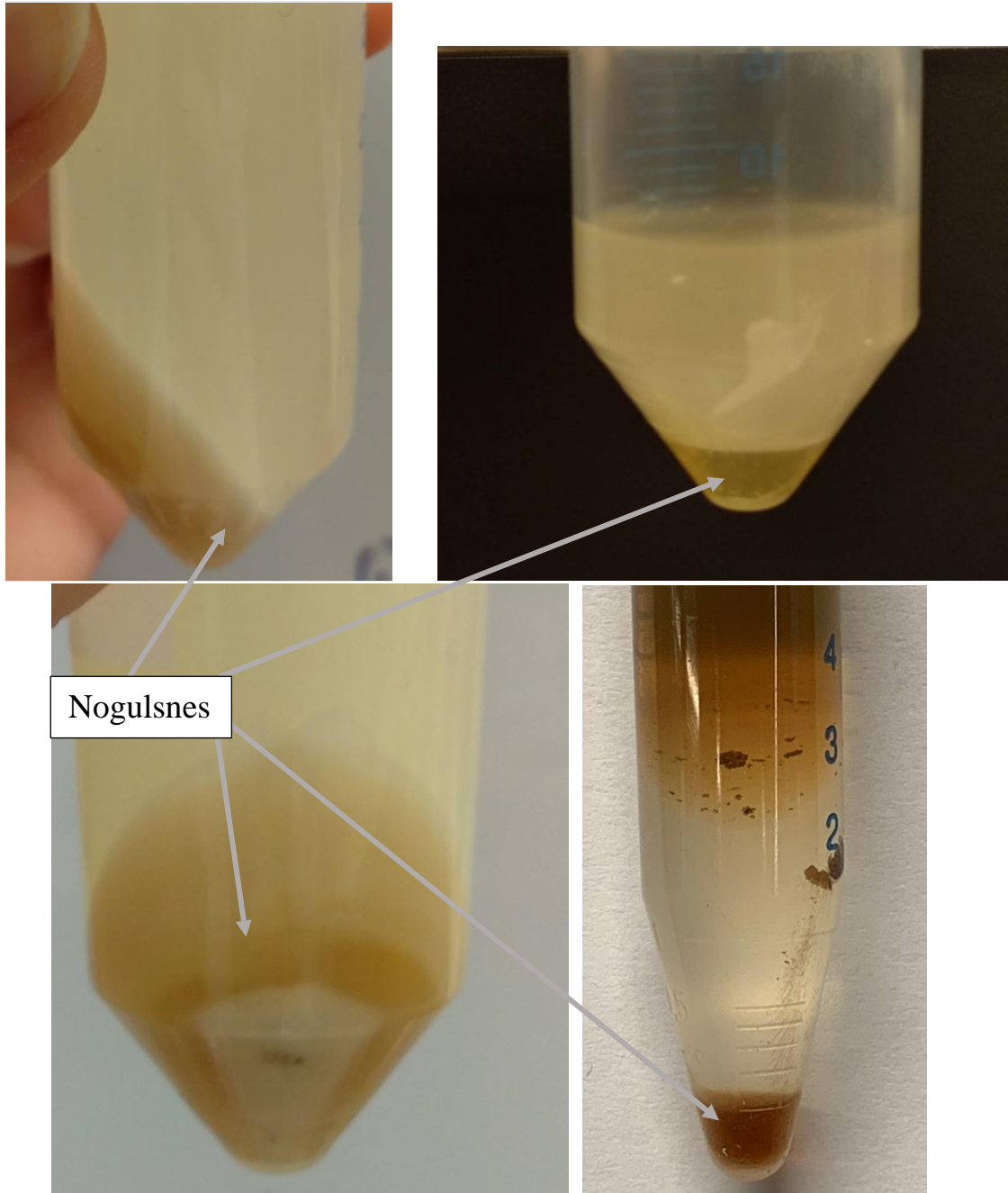


## 4. pielikums

Glicerīna koncentrācija fermentācijas beigās un pēc rapšu eļļas taukskābju sastāva (Aniołowska et al. 2016) aprēķināta glicerīna koncentrācijai atbilstošā triglicerīdu koncentrācija.

| <b>Hidrofobais substrāts</b> | <b>Pievienota glikoze</b> | <b>Glicerīna koncentrācija<br/>g·L<sup>-1</sup></b> | <b>Triglicerīdu koncentrācija,<br/>g·L<sup>-1</sup></b> |
|------------------------------|---------------------------|---|---|
| Rapšu eļļa (nelietota)       | Nav                       | 0.04  | 0.43  |
| Rapšu eļļa (nelietota)       | Ir                        | 12.01   | 122.07  |
| Rapšu eļļa (fritētava)       | Nav                       | 1.64  | 16.70   |
| Rapšu eļļa (fritētava)       | Ir                        | 11.88   | 120.73  |
| Rapšu eļļa (zivju kombināts) | Nav                       | 1.98  | 20.08   |
| Rapšu eļļa (zivju kombināts) | Ir                        | 12.47   | 126.67  |

5. pielikums.  
Soforolipīdu nogulsnes fermentācijas vides paraugos.



Bakalaura darbs „Soforolipīdu ražošana no lipīdiem bagātiem pārtikas atkritumiem ar *Starmerella bombicola*” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

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

Autors: Līva Kristiāna Lukaša *paraksts* 01.06.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Msc. biol. Ieva Bērziņa *paraksts* 01.06.2022.

Recenzents: *paraksts* Dr. biol. Armands Vīgants

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 01.06.2022.

Lietvede: ..... *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr.      , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: