

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

FIZIKĀLI – ĶĪMISKĀS PIRMAPSTRĀDES UN
ENZIMĀTISKĀS HIDROLĪZES EFEKTIVITĀTES
PAAUGSTINĀŠANA BIOETANOLA RAŽOŠANAI NO
LIGNOCELULOZES SUBSTRĀTA

Maģistra darbs

Autore: Ieva Bērziņa

Stud. apl. Nr. ib18085

Darba vadītāja: Dr. sc. ing. Linda Mežule

Recenzente: Dr. biol. Linda Rozenfelde

RĪGA 2020

Saturs

Ievads	6
1. Literatūras apskats.....	7
1.1. Globālais enerģijas pieprasījums un ar to saistītās problēmas.....	7
1.2. Globālā sasilšana un klimata pārmaiņas	8
1.3. Atjaunīgā enerģija un transporta sektors Latvijā	10
1.4. Pirmās un otrās paaudzes biodeģvijas.....	12
1.5. Bioetanola ražošana no lignocelulozes sustrāta.....	13
1. Pirmapstrādes metodes	14
2. Hidrolīze	15
3. Fermentācija	16
2. Metodika.....	17
2.1. Materiāli.....	17
2.1.1. Mikroorganismi.....	17
2.1.2. Ķīmiskas vielas, reaģenti, substrāti, barotnes	17
2.1.3. Iekārtas	18
2.2.1. Sēņu kultivēšana un enzīmu šķīdumu iegūšana	18
2.2.2. Biomasas ievākšana un sagatavošana	19
2.2.3. Pirmapstrāde ar slāpekļa gāzes eksplozīvu dekompresiju.....	20
4. Enzimātiskā hidrolīze	21
5. Fermentācija	21
6. Glikozes un etanola koncentrācijas noteikšana	21
7. Reducējošo ogļhidrātu koncentrācijas noteikšana.....	21
8. Celulāžu aktivitātes noteikšana	22
9. Datu apstrāde un statistiskā analīze	23
3. Rezultāti un diskusija	24
3.1. Neattīrītu celulāžu iegūšana no sēnēm <i>Trichoderma reesei</i> un <i>Irpex lacteus</i>	24

3.2.	Enzīmu aktivitātes novērtējums.....	25
3.3.	Biomases pirmapstrāde ar slāpekļa gāzes eksplozīvu dekompresiju.....	26
3.4.	Hidrolīzes apstākļu uzlabošana.....	32
3.5.	Galvenā diskusija	33
4.	Secinājumi.....	35
5.	Pateicības.....	36
	Literatūras saraksts.....	37

KOPSAVILKUMS

Bioetanola ražošanai no lignocelulozes substrāta īpaši nozīmīgi ir pirmie soļi – pirmapstrāde un hidrolīze. Ir pētītas daudzas fizikālās, ķīmiskās un bioloģiskās pirmapstrādes metodes un enzimatiskās hidrolīzes parametri.

Šajā darbā veikts miežu salmu un siena pirmapstrādes ar eksplozīvu dekompresiju (izmantojot N₂) gāzi novērtējums, kā arī hidrolīzes optimālās temperatūras novērtējums.

Rezultāti sakrīt ar literatūrā minēto, ka pirmapstrādes optimālā temperatūra ir 150° C. Tomēr ņemot vērā samērā nelielo pieaugumu, vismaz daļā eksperimentu pirmapstrādi var aizvietot ar enzimatiskās hidrolīzes temperatūras paaugstināšanu, ietaupot enerģijas patēriņu.

Biomasu, kuru ir grūti izmantot etanola iegūšanai, var izmantot kā substrātu sēņu kultivēšanai enzīmu iegūšanā.

Atslēgvāri: bioetanolis, lignoceluloze, pirmapstrāde, enzimatiskā hidrolīze.

SUMMARY

The first two steps – pretreatment and hydrolysis - in producing bioethanol from lignocellulosic biomass are essential, as they ground the outcome for next ones – fermentation and distillation. Therefore these steps are intensively studied and many physical, chemical and biological routes developed. Yet there is a need to adjust the optimal treatment for each type of biomass.

In this work I evaluate the effect of explosive decompression pretreatment applied on barley straw and hay, as well as optimal hydrolysis temperature evaluation is presented.

The key findings are consistent with literature that the optimal pretreatment temperature is 150° C. Meanwhile, it is doubtful that the energy required for this kind of pretreatment is justifiable, based on ethanol yield increase after fermentation. Moreover, in case with enzyme from *Trichoderma reesei* it is shown that glucose yield increase after hydrolysis is easy achievable with increase of hydrolysis temperature for 10 - 20° C.

These findings confirm that for each type of biomass there is a need for optimal pretreatment method and hydrolysis conditions.

Keywords: bioethanol, lignocellulose, enzymatic hydrolysis, physio-chemical pretreatment.

IEVADS

Klimata izmaiņas mūsdienās ir viena no aktuālākajām problēmām, tomēr sabiedrībā pretrunīgi vērtēts temats (Poortinga *et al* 2011). Aizvien pieaugošo likumu skaits, kas vērsti uz SEG emisiju samazināšanu liecina, ka ir vēl daudz darāmā, lai ar piesārņojumu saistītos riskus mazinātu.

Liela nozīme gaidāmajām pārmaiņām enerģētikas sektorā ir jaunām tehnoloģijām un atjaunīgai enerģijai. Transporta sektorā, kurš sastāda 29% no kopējām SEG emisijām Latvijā, fosilajām degvielām par perspektīvu alternatīvu tiek uzskatītas otrās paaudzes biodegvielas. Biodegvielu izmantošana nosaka Eiropas Parlaments un Eiropas Savienības Padome (2009).

Biodegvielai kā fosilās degvielas aizstājējai ir jābūt ilgtspējīgai, un lielu daļu no biodegvielas oglekļa pēdas veido tieši ražošanas laikā radītās tiešās un netiešās ietekmes. Tieši tādēļ notiek intensīvi pētījumi un procesa optimizācija, lai padarītu biodegvielas konkurētspējīgas tirgū. Otrās paaudzes bioetanolu var tikt ražots no visa veida biomasas, kuras sastāvā ir augu biopolimērs - lignoceluloze. Šajā darbā aplūkota biomasas fizikāli-ķīmiskā pirmapstrāde N_2 gāzi un veikta enzimatiskās hidrolīzes apstākļu optimizācijas.

Mērķis: Ar eksplozīvas dekompresijas pirmapstrādi un hidrolīzes apstākļu optimizāciju palielināt glikozes un reducējošo ogļhidrātu daudzumu pēc hidrolīzes un etanola daudzumu pēc fermentācijas.

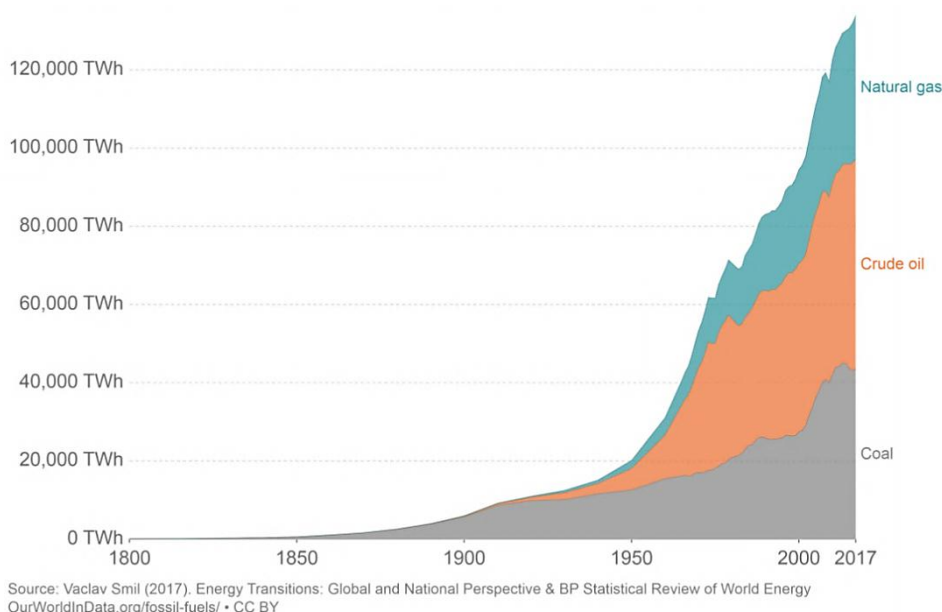
Lai sasniegtu mērķi, ir izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- iegūt neattīrītus enzīmu šķīdumus ar proteīnu izgulsnēšanas metodi no sēnēm *Trichoderma reesei* un *Irpex lacteus*.
- Veikt miežu salmu un siena pirmapstrādi ar slāpekļa gāzes eksplozīvu dekompresiju 125°, 150° un 175° C temperatūrā.
- Novērtēt substrāta pirmapstrādes efektivitāti, veicot biomasas enzimatisko hidrolīzi un fermentāciju
- Veikt hidrolīzes apstākļu uzlabošanu, izvērtējot temperatūras ietekmi uz iegūto glikozes un reducējošo ogļhidrātu daudzumu

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Globālais enerģijas pieprasījums un ar to saistītās problēmas

Pirmās industriālās revolūcijas laikā (18. gs. otrā puse - 19. gs. vidus) notika tautsaimniecības pārkārtošanās no lauksaimniecībā balstītas ekonomikas uz centralizētu, mašīnizētu preču ražošanu. Attīstījās pilsētas un cilvēku migrācija uz tām. Rūpnīcu skaita pieauguma rezultātā 19. gs. sākumā tika pilnveidots tvaika dzinējs un jau 19. gs. vidū sākās uz tvaika dzinējiem balstītu transportlīdzekļu komerciāla ražošana. Lai tos darbinātu, bija nepieciešams lēts kurināmais. To nodrošināja ogļrūpniecība (Allen 2009). Akmeņogļu pieprasījums 19. un 20. gadsimtā nerimstoši aug, turklāt tvaika dzinēju intensīvai izmantošanai paralēli notiek iekšdedzes dzinēju attīstība, līdz ar to pieaug arī naftas pārstrādes produktu pieprasījums.



1. attēls. Globālais fosilās enerģijas (dabaszgāze, jēlnafta, akmeņogles) patēriņš kopš industriālās revolūcijas sākuma. Mūsdienās jēlnafta sastāda lielāko daļu jeb 39% no fosilo enerģijas resursu pieprasījuma (Ritchie and Roser 2020).

Figure 1. Changes in global consumption of fossil fuel (natural gas, crude oil, coal) from the start of industrial revolution. Today crude oil compiles 39% of global demand of fossil fuel (Ritchie and Roser 2020).

Pateicoties zinātnes, medicīnas, tehnoloģiju un masu produkcijas attīstībai 19. gs., aug arī cilvēku vēlme pēc komforta un labklājības (Allen 2009). Populācijas nemitīgais pieaugums un ekonomiskā izaugsme, kā arī prognozētais kāpums nākotnē vēl vairāk akcentē

enerģijas resursu lomu cilvēka ikdienā un sabiedrības attīstībā kopumā (Höök and Tang 2013).

Par neatjaunojamo resursu pārāk ātru izsaimniekošanu un tam loģiski sekojošu enerģētikas krīzi zinātnieki brīdināja jau 20. gs. pirmajā pusē (Hubbert 1949). Parādās pirmie pētījumi arī par CO₂ izmešu saistību ar globālo sasilšanu un antropogēno faktoru ietekmi uz klimatu (Arrhenius 1896). Šīm prognozēm sākotnēji nepievērš lielu uzmanību, taču 20. gs. otrajā pusē pētnieku vidū aug viedokļu vienprātība un 1988. gadā tiek dibināta Klimata pārmaiņu starpvaldību padome (Intergovernmental Panel on Climate Change).

1.2. Globālā sasilšana un klimata pārmaiņas

Klimata pārmaiņu starpvaldību padomes (turpmāk tekstā - IPCC) mērķis ir apkopot, analizēt un nodrošināt publiski pieejamu, zinātnisku informāciju par klimata izmaiņām, vērtējot antropogēno faktoru ietekmi un izstrādāt vadlīnijas likumdevējiem. IPCC Piektais novērtējuma ziņojums iznācis 2014. gadā un tā pamatā ir trīs darba grupu analītisks novērtējums, kas balstīts uz jaunākajiem zinātniskajiem pētījumiem. Novērtējumā teikts, ka cilvēka ietekme uz klimatu ir tieša un šobrīd novērojamais antropogēnas izcelsmes siltumnīcas efekta gāzu (turpmāk tekstā - SEG) līmenis atmosfērā ir augstāks nekā jebkad. Pēdējās trīs desmitgades ir bijušas siltākās kopš 19.gs. vidus (IPCC 2014).

Palielināts SEG emisiju īpatsvars atmosfērā izraisa siltumnīcas efektu, kā rezultātā pakāpeniski paaugstinās Zemes virsmas vidējā temperatūra (Yang *et al* 2019). Tomēr SEG īpatsvars atmosfērā ietekmē ne tikai virsmas vidējo temperatūru – tā paaugstināšanās aizsāk daudzu secīgu notikumu ķēdi, kuras atsevišķus posmus var novērot jau šobrīd (Kron *et al* 2019; Yuste *et al* 2019; Chen *et al* 2017; Coumou and Rahmstorf 2012). Par globālās sasilšanas sekām tiek uzskatīti šādi notikumi: jūras līmeņa celšanās un okeāna paskābināšanās; plūdu, ekstrēmu aikapstākļu un mežu ugunsgrēku biežāka izplatība, kā arī daudzu sugu dzīvotņu ekoloģisko apstākļu izmaiņas, kā rezultātā tiek apdraudēta sugas tālāka pastāvēšana (Antonioli *et al* 2017; Nilsson *et al* 2012, Vermeer and Rahmstorf 2009). Ne mazāk svarīgs aspekts ir atmosfēras piesārņojuma negatīvā ietekme uz cilvēka veselību un globālās sasilšanas izraisītie draudi saimnieciskajai darbībai (Yang *et al* 2019; REN21 2019; Conti 2011).

Klimata pārmaiņu starpvaldību padome ir izveidojusi četrus nākotnes SEG emisiju modeļus, aprakstot uz teorētiskām zināšanām un pētījumiem balstītus turpmākos scenārijus

par vides un klimata izmaiņām. Precīzu izmešu daudzumu nav iespējams prognozēt, jo tas atkarīgs ne tikai no populācijas pieauguma un ekonomiskās izaugsmes, bet arī tehnoloģiju attīstības, likumdošanas un veiktajiem preventīvajiem pasākumiem. Tomēr aplēses liecina, ka vidējā Zemes virsmas temperatūra pieaugs par 3.7 – 4.8° C salīdzinājumā ar pirmsindustriālā laikmeta temperatūru, ja līdztekus esošiem emisiju mazinošiem pasākumi netiks īstenoti vēl citi. Pēc zinātnieku prognozēm Zeme virsmas un atmosfēras zemāko slāņu sasilšana par 4° C radīs liela apjoma sugu izmiršanu un reģionālus draudus pārtikas ieguves un rūpniecības nozarei (IPCC 2014; Schmidhuber and Tubiello 2007). No četriem izveidotajiem IPCC modeļiem ir tikai viens, kur temperatūras paaugstināšanos iespējams ierobežot līdz 2° C. Šis modelis paredz samazināt antropogēnu SEG emisiju daudzumu līdz 2050. gadam par 40 – 70% un emisiju daudzumu tuvu nullei vai mazāk līdz 2100. gadam. Daudzas modeļa simulācijas nespēj saglabāt temperatūras pieaugumu zem 2° C, ja emisiju mazināšanas pasākumi tiks atlikti vai tehnoloģiju un bioenerģijas attīstība – aizkavēta (IPCC 2014, Vermeer and Rahmstorf 2009).

IPCC speciālajā izlaidumā (2018) ziņots, ka noteiktu izmaiņu mērogu dabā var mazināt, līdz gadsimta beigām vidējās temperatūras kāpumu noturot 1.5° C robežās. Dažas pārmaiņas nav novēršamas, piemēram, jūras līmeņa celšanās un ledāju kušana. Citas, piemēram, ekosistēmu degradāciju un sugu izmiršanu, ir iespējams mazināt. Šobrīd vidējā virsmas temperatūra ir cēlusies jau par 1° C. Lai nepārsniegtu 1.5° C robežu, SEG emisijas jāsamazina par 45% līdz 2030. gadam, salīdzinot ar 2010. gadu, sasniedzot nulle emisiju 2050. gadā.

Globālajai sasilšanai mūsdienās tiek pievērsta pastiprināta uzmanība ne tikai valstu, organizāciju un apvienību līmenī, bet arī individuāli, pilsoniskās aktivitātes formā (REN21 2019). Tāpat kā klimata pārmaiņas, arī sabiedrības neviennozīmīgā attieksme pret tām ir kompleksa problēma – to ietekmē vairāki faktori, kas var būt gan iekšēji, gan ārēji. V. Portinga (Portinga *et al* 2011) savā pētījumā raksta, ka klimata pārmaiņu noliedzēji vairāk sastopami vecāka gadagājuma cilvēku vidū, no zemāka sociāli - ekonomiskā slāņa un ar tradicionālām vērtībām. Tomēr starpnacionāls pētījums (Tranter and Booth 2015) pierāda, ka šie faktori ne vienmēr ir noteicošie un būtiska korelācija konstatēta tikai starp klimata pārmaiņu noliegumu un cilvēka dzimumu, politisko piederību, kā arī konkrētās valsts CO₂ izmešu līmeni. Abos pētījumos secināts, ka klimata pārmaiņu absolūtu noliedzēju skaits nav liels – biežāk ir sastopama neziņa un šaubas par klimata pārmaiņu nozīmīgumu, to apmēru vai antropogēno izcelsmi. Saskaņā ar Eurobarometra datiem, 93% aptaujāto eiropiešu (n = 27 655) globālo sasilšanu uzskata par nopietnu problēmu (Eurobarometer 2019). Aptaujas rezultāti liecina, ka Latvijas sabiedrības izpratnes un emisiju mazinošu pasākumu atbalsta līmenis ir

starp zemākajiem Eiropas Savienībā. Atkārtota anketēšana tomēr liecina, ka izpratnes līmenis pēdējo gadu laikā ir audzis.

Neskatoties uz pētījumu rezultātu dažādību, jaunākās paaudzes iesaistīšanās vides problēmu un globālu jautājumu risināšanā ir vairāk manāma (Katherine *et al* 2020, VARAM 2019). Tas daļēji apstiprināts pētījumos, ir plaši atspoguļots medijos un nevardarbīgu protestu akciju virkne Eiropas Savienībā pēdējo gadu laikā ir veicinājusi lēmumu pieņemšanu ilgtspējīgas attīstības virzienā (Eiropas Komisijas stratēģiskais plāns 2050. gadam) (REN21 2019; Fisher 2019; Weber 2008). Jaunākās sabiedrības daļas aktīvu iesaisti vides un klimata jautājumu risināšanā skaidro ar kolektīvās pieredzes veidošanos, noteiktai paaudzei piedzīvojot konkrētajam laika periodam raksturīgus notikumus.

Sabiedrības attieksme globālās sasilšanas un to izraisīto klimata pārmaiņu jautājumā ir svarīga, jo no tās ir daļēji atkarīgs atjaunīgās enerģijas un inovatīvu tehnoloģiju pieprasījums un patēriņš. Preču un pakalpojumu patēriņa, kā arī cilvēku paradumu maiņa ir minēta kā viens no instrumentiem antropogēno SEG emisiju mazināšanai (IPCC 2014).

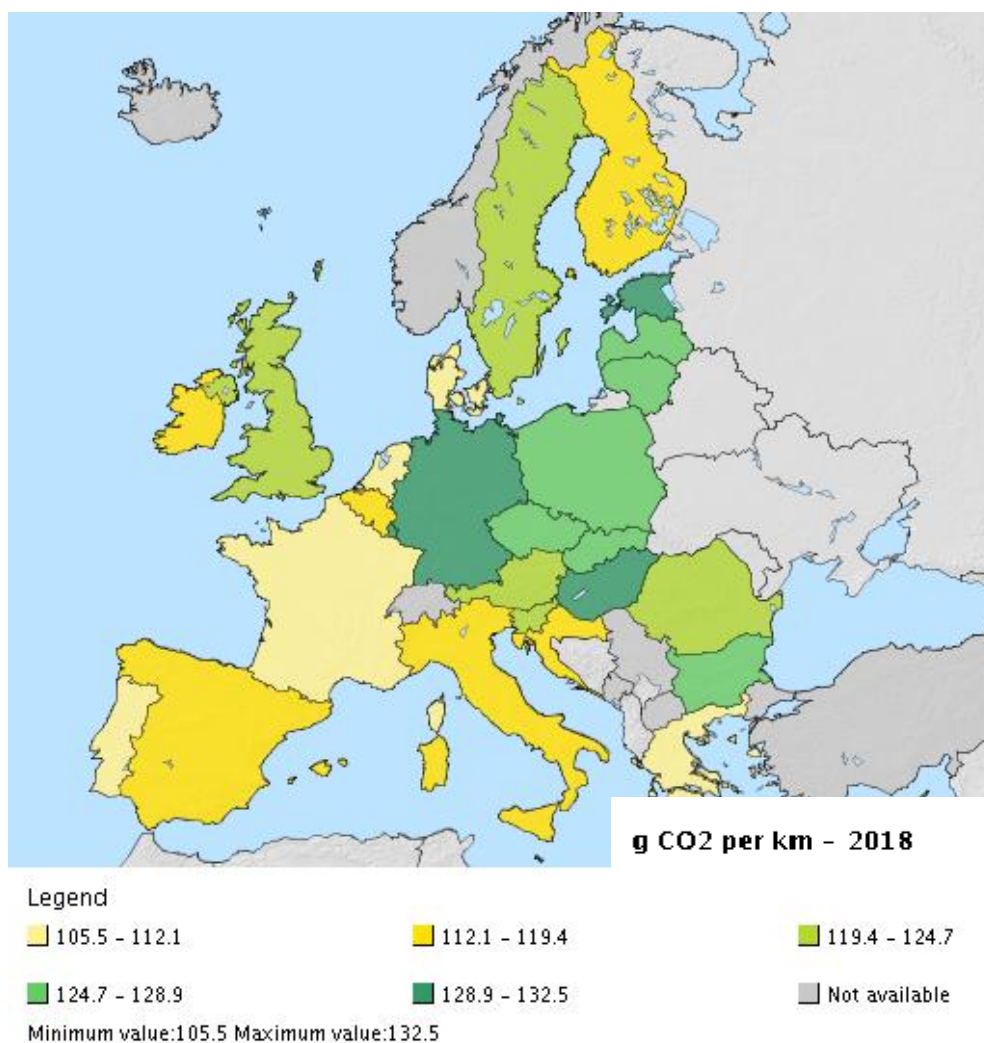
1.3. Atjaunīgā enerģija un transporta sektors Latvijā

Globālajai enerģijas krīzei ir nepieciešami starpdisciplināri risinājumi, tomēr jaunu tehnoloģiju attīstība un pāreja uz atjaunīgo enerģiju ir vieni no galvenajiem klimatneitrālas ekonomikas sasniegšanai nepieciešamajiem instrumentiem (Waisman *et al* 2019; IPCC 2018).

Atjaunīgā enerģija ir enerģija, kas iegūta no atjaunojamiem vai neizsīkstošiem resursiem (EEA 2004). Par bioenerģiju sauc enerģiju, kas iegūta no nesen dzīvojoša, organiska materiāla un lopkopības atkritumiem. Eiropas Savienība dalībvalstīm saistošā direktīvā uzstādīja kopēju mērķi 2020. gadā sasniegt 20 % atjaunojamo energoresursu īpatsvaru energopatēriņā un obligātu minimālo mērķi visām dalībvalstīm panākt 10 % biodegvielas īpatsvaru benzīna un dīzeļdegvielas patēriņā (Eiropas Parlaments un Eiropas Savienības Padome 2009). Eiropas Savienības uzstādītais kopējais mērķis visticamāk tiks pārsniegts – jau 2018. gadā atjaunīgās enerģijas īpatsvars bija 18.9% (Eurostat 2020).

Tomēr Direktīvā ir noteikts vienlīdzīgs atjaunīgās enerģijas īpatsvara palielinājums starp dalībvalstīm, pamatojoties uz to IKP un jau esošo atjaunīgās enerģijas patēriņu. Latvijai noteiktais sasniedzamais īpatsvars ir 40% no kopējā energopatēriņa, kas sasniegts 2018. gadā, ierindojot Latviju Eiropas Savienības valstu saraksta trešajā vietā, tūlīt aiz Zviedrijas (54.6 %) un Somijas (41.2 %) (Eurostat 2020^a).

Turpretī 10% atjaunīgās enerģijas īpatsvars transporta sektorā attiecas uz visām dalībvalstīm, nodrošinot degvielas specifiskāciju saskaņību un tās pieejamību Savienības līmenī (Eiropas Parlaments un Eiropas Savienības Padome 2009). šis noteiktais mērķis vēl nav sasniegts - 2018. gadā atjaunīgās enerģijas īpatsvars transporta sektorā bija 4.73% (CSP 2020), turklāt transporta sektors ir otrais lielākais SEG emisiju avots Latvijā, radot 29 % no kopējām 2017. gada emisijām. Visvairāk emisiju rada pasažieru automašīnas, no kurām 80 % ir vecākas par 10 gadiem (VARAM 2019).



2. attēls. Jaunu pasažieru automašīnu vidējais CO₂ izmešu līmenis Eiropas Savienībā uz vienu patērēto kilometru (Eurostat 2020^b).

Figure 2. Average CO₂ emissions per km from new passenger cars in European Union (Eurostat 2020^b).

1.4. Pirmās un otrās paaudzes biodegvielas

Otrās paaudzes biodegvielas ir šķidri un gāzveida kurināmie, kas iegūti no pārtikā neizmantojamām kultūrām, lauksaimniecības, mežsaimniecības, lopkopības un pilsētvides atkritumiem vai blakusproduktiem (Mousdale 2008). To galvenā atšķirība no pirmās paaudzes biodegvielām ir tās ilgtspējības princips, kas bāzējas izejvielu izvēlē. Pirmās paaudzes biodegvielas tiek ražotas no pārtikā izmantojamām lauksaimniecības kultūrām, tādām kā cukurniedrēm, kukurūzas un rapša, un saskaras ar sekojošām problēmām:

1. Papildus lauksaimniecību kultūru audzēšana lielās platībās rada tiešas zemes lietošanas izmaiņas, kas palielina kopējo CO₂ izmešu līmeni biodegvielas ražošanas procesā (IPCC 2012).
2. Konkurence ar pārtikas tirgu un pārtikā izmantojamo lauksaimniecības kultūru iespējamais cenu kāpums, pakļaujot nepietiekama uztura riskam nabadzīgākos un sociāli neaizsargātākos sabiedrības slāņus. Šī iemesla dēļ pirmās paaudzes biodegvielu industriāla ražošana nav ētiski atbalstāma (Murphy *et al* 2011; Eiropas Parlaments un Eiropas Savienības Padome 2009).
3. Vairākas problēmas, kas saistītas ar industriālās lauksaimniecības praksi, attiecināmas arī uz pirmās paaudzes biodegvielām. Skepsi par šo biodegvielu ilgtspējību raisa lielais ūdens, mēslošanas līdzekļu un pesticīdu patēriņš, kā arī bioloģiskās daudzveidības samazināšanās draudi (Fang 2013).

Lai izvairītos no minētajām problēmām, pēdējā desmitgadē arvien lielāka uzmanība pievērsta otrās paaudzes biodegvielām, to izpētei un ražošanas tehnoloģijām (VARAM 2019; IPCC 2012; Eiropas Parlaments un Eiropas Savienības Padome 2009). Arī ar šo biodegvielu ražošanu saistīti vēl līdz galam neatbildēti jautājumi. Tā, piemēram, nav skaidras netiešās zemes lietošanas izmaiņas (Mohr and Raman 2013; Murphy *et al* 2011); rit diskusijas par izejvielu pieejamību (Bryngemark 2019) un piegāžu sistēmu efektivitāti (Ahmed and Sarkar 2018; Hombach *et al* 2016), kā arī atklāts ir jautājums par ražošanas regulējošo likumu pastarpināti veidotu konkurenci ar pārtikas tirgu, netieši ietekmējot lauksaimniecības kultūru cenu kāpumu (Thompson and Meyer 2013).

Tomēr Eiropas Parlaments un Eiropas Savienības Padome (2009) nosaka, ka veidam, kādā tiek ražotas biodegvielas, ir jābūt ilgtspējīgam, un bioloģiskās daudzveidības samazināšanās tā rezultātā nav pieņemama. Vienlaikus tiek izteikts atbalsts jaunām tehnoloģijām, īpaši uzsverot otrās paaudzes biodegvielu komerciālas pieejamības nepieciešamību, norādot uz industrijas attīstības ieguvumiem:

1. Biodegvielu attīstība stiprina valstu enerģētisko neatkarību, sekmē iekšzemes kopprodukta pieaugumu un samazina enerģijas importa nepieciešamību.
2. Biodegvielu industrijas attīstība rada jaunas darba vietas vietējā mērogā un veicina kopienu attīstību.
3. Otrās paaudzes biodegvielu ražošanas sajūgšana ar pārtikas industriju samazina tiešas zemes lietošanas izmaiņas un kopējo CO₂ izmešu apjomu.

Ekonomiskajos novērtējumos un matemātiskajos modeļos norādīts uz problēmām, kas liedz pilnvērtīgi izvērtēt biodegvielu ražošanas ietekmi uz ekonomiku un vidi. Kā galvenās problēmas minētas empīrisku datu trūkums un svārstīgā likumdošana valstu un starpvalstu līmenī. Nākotnē ir iespējami vairāki biodegvielu izmantošanas un ražošanas attīstības scenāriji (Fang 2013; Murphy *et al* 2011). Kopumā biodegvielu SEG emisiju līmeņi ir zemāki nekā fosilajām degvielām un otrās paaudzes biodegvielas tiek uzskatītas par perspektīvām un mūsdienīgām tehnoloģijām, kas neprasa lielus esošo transportlīdzekļu pielāgojumus (VARAM 2019).

1.5. Bioetanola ražošana no lignocelulozes sustrāta

Bioetanolis ir otrās paaudzes biodegviela, kas tiek ražota no lignocelulozes biomasas – salmiem, skaidām, daudzgadīgām, pārtikā neizmantojamām graudzālēm u.c. resursiem. Lignoceluloze ir dabā plaši izplatīts biopolimērs un tas sastopams augu šūnapvalkos, piešķirot tiem mehānisko izturību. Lignoceluloze sastāv galvenokārt no celulozes, hemicelulozes un lignīna, kas ir savstarpēji saistīti ciešā struktūrā (Betts *et al* 1991).

Celuloze ir ķīmiski inerta, ūdenī nešķīstoša viela ar kristāliskām īpašībām. Tās pamatvienība ir cellobioze, kas sastāv no diviem ar β -(1,4)-glikozīdsaitēm saistītiem glikozes atlikumiem. Tie ir izkārtoti paralēli, veidojot garu, lineāru polimēru. Celulozes molekulas sakārtotas saišķos pa 10 - 15, kuras, kārtojoties tālāk grupās pa 40, veido profibrillas. No profibrillām veidojas mikrofibrilas. Šķiedras savstarpēji ir saistītas ar ūdeņraža saitēm un Van der Vālsa spēkiem (Jeffries 1987 cit. pēc Betts *et al* 1991). Celulozes relatīvais saturs sausā substrātā variē atkarībā no augu sugas, vecuma un citiem pazīmēm. Parasti tie ir 25 - 55% no sausnes.

Celulozi, atšķirībā no cietes, ir grūti hidrolizēt. Tomēr tās kristāliskajā struktūrā ir sastopami amorfi posmi, kur parasti iesākas hidrolīze. Celulozes hidrolīzi apgrūtina arī apkārt esošais hemicelulozes un lignīna slānis (Jeffries 1987 cit. pēc Betts *et al* 1991).

Hemicelulozei ir sazarota struktūra un tā sastāv no pentožu atlikumem, kas dažādām augu sugām ir mainīgi. Sazarotās ķēdes var būt monosaharīdi, disaharīdi un īsi oligosaharīdi. Hemiceluloze pārsvarā sastāv no šādiem ogļhidrātu atlikumiem: D-ksilozes, L-arabinozes, D-galaktozes, L-galaktozes un D-mannozes. Hemicelulozes sastāvs sausā substrātā variē no 25 – 50 %.

Lignīns ir neregulārs fenilpropanoīdu polimērs. Tas aizsargā celulozi un hemicelulozi no bioķīmiskiem, fiziskiem un mehāniskiem bojājumiem, piemēram, UV staru gaismas un oksidatīvā stresa (Betts *et al* 1991). Lignīnam ir nejauša trīsdimensionāla struktūra, kurai nav raksturīgas atkārtotošas pamatvienības. Savienojumi starp monomēriem ir ļoti stabili - pārsvarā ēteriskās jeb C-O-C vai C-C saites.

Zālaugos un grauzdāļu stiebrs ir vairāk hemicelulozes nekā, piemēram, koksnē. Salmos ir vērojama lielāka monomēru vienveidība (Fan *et al* 1982 cit. pēc Betts *et al* 1991), kas no ražošanas tehnoloģiju viedokļa ir svarīgi, ļaujot piemeklēt optimālus saharifikācijas un fermentācijas apstākļus, pēc tam pielietojot tos lielākā apjomā.

Neskaitot ražošanas procesā radītās SEG emisijas, kviešu salmu etanola tipiskais SEG emisiju ietaupījums ir 87%, salīdzinājumā ar fosilajām degvielām, bet koksnes atlieku etanola SEG emisiju ietaupījums - 80 % (VARAM 2019). Tomēr lignocelulozes strukturālo īpašību dēļ biomasu etanola ražošanai nevar izmantot uzreiz. Tam ir nepieciešami vairāki sagatavošanas posmi. Parasti vispirms veic biomasas pirmapstrādi, kurai tālāk seko hidrolīze. Uz šo posmu efektivitātes balstīts arī nākamo soļu - fermentācijas un destilācijas - iznākums.

1. Pirmapstrādes metodes

Pirmapstrādes galvenais mērķis ir atvieglot enzīmu pieeju celulozei hidrolīzes laikā, sagraujot lignocelulozes struktūru (Raud *et al* 2016). Biomasas pirmapstrādes metodes nosacīti iedala fizikālajās, ķīmiskajās un bioloģiskajās, tomēr tās tiek savstarpēji jauktas, meklējot dabai nekaitīgākos risinājumus, optimālu pieeju dažādiem substrātiem un zemākās enerģijas ietilpības metodes. Pirmapstrādes laikā rodas dažādi inhibējoši blakusprodukti, kas var pazemināt hidrolīzes un fermentācijas efektivitāti. Piemēram, no hemicelulozes veidojas alifātiskās skābes un furfuols, no lignīna - dažādi fenolu atvasinājumi. Inhibitoru veidošanās ir liela mērā atkarīga no substrāta un pirmapstrādes veida (Jönsson *et al* 2013).

Fizikālās metodes ietver biomasas smalcināšanu, malšanu, kā arī pielieto temperatūru un spiedienu. Biomasas smalcināšana ir enerģijietilpīga, tomēr efektīva metode, kura, palielinot substrāta virsmas laukumu un samazinot celulozes polimerizācijas pakāpi, uzlabo

hidrolīzes efektivitāti (Mezule *et al* 2016). Biomasas smalcināšanu apvieno arī citām metodēm, piemēram, tvaika eksploziju vai apstarošanu ar mikroviļņiem (Rooni *et al* 2017).

Ķīmiskā pirmapstrāde ir plaši pielietota metode un tās laikā izmanto koncentrētas un atšķaidītas skābes, sārmus un organiskos šķīdinātājus. Tas ir samērā efektīvs pirmapstrādes veids, taču sadārdzina biodegvielu ražošanu, veido inhibitorus un ir nepieciešami korozijas izturīgi materiāli pirmapstrādes reaktoriem. Tā netiek uzskatīta par labai draudzīgu metodi (Tutt *et al* 2012; Rooni *et al* 2017).

Fizikāli – ķīmiskās pirmapstrādes metodes izmanto dažādas gāzes, piemēram, CO₂, SO₂ un N₂, un, apvienojot tās ar spiedienu un temperatūru, slēgtos reaktoros tiek izraisīts straujš spiediena kritums (eksplozīva dekompresija), tādējādi sagraujot lignocelulozes struktūru (Raud *et al* 2016).

Bioloģiskā pirmapstrāde ir labai draudzīga metode, jo izmanto dabā sastopamas, lignocelulozi degradējošas koksnes trupes sēnes un mērenas temperatūras. Tomēr šāda pirmapstrāde ir pārāk ilga un tādēļ netiek uzskatīta par efektīvu rūpnieciskiem nolūkiem (Seifert 2013).

2. Hidrolīze

Hidrolīzes laikā tiek samazināta celulozes polimerizācijas pakāpe un šķeltas β-(1,4)-glikozīdsaites starp glikozes monomēriem. Par perspektīvu tiek uzskatīta enzimatiskā hidrolīze, izmantojot no sēnēm vai baktērijām iegūtus celulāžu enzīmus (Jönsson *et al* 2013).

Enzimātiskās hidrolīzes pētījumi aizsākās 20. gs 50. gados, kad amerikāņu pētnieks Elwin T. Reese no karavīru kokvilnas uniformām izolēja sēni, kas mitruma un siltuma ietekmē bija degradējusi to dabīgās šķiedras (Ryu and Mandels 1980). Radās interese par sēnes pielietojumu biotehnoloģijā un līdz mūsdienām toreiz atklātā sēne - *Trichoderma reesei* - ir intensīvi pētīta, izmantojot arī ģenētiskās inženierijas metodes (Tao *et al* 2020). Komerciālu enzīmu ražošanai visbiežāk izmanto sēnes *Trichoderma reesei* un *Aspergillus niger*.

Celulāzes ir ekstracelulāri enzīmi, ko ražo sēnes un baktērijas. Celulāžu enzīmi darbojas sinerģiski un to aktivitāti regulē vidē pieejamais substrāts (Gupta *et al* 2014). Hidrolīzes efektivitāti ietekmē vairāki faktori, piemēram, temperatūra, pH, substrāta daudzums, kā arī pirmapstrādes un hidrolīzes laikā radušies inhibitori (Mezule *et al* 2019; Jönsson *et al* 2013).

3. Fermentācija

Heksožu fermentācijai parasti izmanto raugu *Saccharomyces cerevisiae*. Tā kā aptuveni trešdaļu lignocelulozes substrāta sastāda hemiceluloze, pastāv liela interese par pentožu fermentāciju, lai paaugstinātu iegūto etanola daudzumu (Song *et al* 2019).

Fermentāciju var veikt atsevišķi vai kopā ar hidrolīzi. Vienlaicīga hidrolīze un fermentācija no vides aizvāc cellobiozi, kas ir celulāžu inhibitors (Jönsson *et al* 2013).

2. METODIKA

2.1. Materiāli

2.1.1. Mikroorganismi

Irpex lacteus IBB 104

Trichoderma reesei ATCC 13631

Saccharomyces cerevisiae

2.1.2. Ķīmiskas vielas, reaģenti, substrāti, barotnes

Agars (Oxoid, Apvienotā Karaliste)

Amonija nitrāts NH_4NO_3 (Sigma-Aldrich, Vācija)

Amonija sulfāts $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck KGaA, Vācija)

Cinka sulfāta monohidrāts $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Scharlau, Spānija)

D-glikoze (Sigma-Aldrich, Vācija)

Dekstroze (Oxoid, Apvienotā Karaliste)

Dzelzs (II) sulfāta heptahidrāts $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Scharlau, Spānija)

Etanola reaģents (Analox Instruments, Apvienotā Karaliste)

Etanola standartšķīdums (Analox Instruments, Apvienotā Karaliste)

Fenols $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ (Enola, Latvija)

Filtrpapīrs Whatman® Grade 1 (Merck KGaA, Vācija)

Glikozes reaģents (Analox Instruments, Apvienotā Karaliste)

Glikozes standartšķīdums (Analox Instruments, Apvienotā Karaliste)

Kalcija hlorīds CaCl_2 (Sigma-Aldrich, Vācija)

Karbamīds $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (Scharlau, Spānija)

Kālija dihidrogēnfosfāts KH_2PO_4 (AnalaR Normapur®, Beļģija)

Kālija hidrogēnfosfāts K_2HPO_4 (Fluka BioChemika, Šveice)

Kālija nātrija tartrāts $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Vācija)

Kobalta hlorīda heksahidrāts $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Scharlau, Spānija)

Magnija sulfāta heptahidrāts $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fluka BioChemika, Šveice)

Mangāna (II) hlorīda tetrahidrāts $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fluka Biochemika, Šveice)

Nātrija citrāts $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7$ (Sigma-Aldrich, Vācija)

Nātrija hidroksīds NaOH (Sigma-Aldrich, Vācija)

Nātrija metabisulfīts $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Sigma-Aldrich, Vācija)

Proteāzes peptons (Oxoid, Apvienotā Karaliste)

Rauga ekstrakts (Oxoid, Apvienotā Karaliste)

Sālsskābe HCl (Sigma-Aldrich, Vācija)

Viscozyme® L (Sigma-Aldrich, Vācija)

3,5-dinitrosalicilskābe (O₂N)₂C₆H₂-2-(OH)CO₂H (Sigma-Aldrich, Vācija)

2.1.3. Iekārtas

Autoklāvs HS-9041 (Hanshin, Dienvidkoreja)

Analizators Analox GL6 (Analox Instruments, Apvienotā Karaliste)

Bioloģiskās drošības skapis Standard Class II (Kojair, Somija)

Centrifūga FRONTIER™ 5000 FC5718R (Ohaus, Vācija)

Inkubators ar kratītāju Innova® 43 (Eppendorf, Vācija)

Mehāniskās dzirnavas ar asmeni Grindomix GM200 (Retch, Vācija)

Pirmapstrādes reaktors (Parr Instrument Company, ASV)

Redzamās gaismas - UV staru spektrofotometrs GENESYS™ 140/150 (Thermo Scientific, ASV)

Svari AEJ 220-4M (Kern, Vācija)

Vorteks V-1 plus (Biosan, Latvija)

2.1.4. Lietojumprogrammas

Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, ASV)

R 3.5.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Austrija)

RStudio 1.2.5042 (RStudio, Inc., ASV)

VISIONlite 5 (Thermo Scientific, ASV)

2.2. Metodes

2.2.1. Sēņu kultivēšana un enzīmu šķīdumu iegūšana

Ar sterilu āķīti no agarizētas barotes izgriež sēnes micēlija gabaliņus un pārnes sterilā 100 ml šķidrā barotnē (pH 5.8) 250 ml kolbās. Sēnes kultivē inkubatorā ar kratītāju 30° C temperatūrā 72h (*I. lacteus*) un 48h (*T. reesei*) pie 150 apgr/min. Barotņu sastāvs aprakstīts 1. tabulā.

1. tabula. Barotņu sastāvs sēņu kultivēšanai.

Table 1. Medium components for fungi cultivation.

Barotnes komponenti	Agarizēta barotne, g/L	Šķidrā barotne, g/L
KH ₂ PO ₄	0.80	0.80
K ₂ HPO ₄	0.20	0.40
NH ₄ NO ₃	2.00	2.00
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.50	0.50
Rauga ekstrakts	3.00	2.00
Dekstroze	5.00	10.0
Agars	18.00	-

Pēc noteiktā laika 10 ml sēņu kultūras inokulē 100 ml sterilā bazālajā barotnē ar lignocelulozes substrātu (4% w/v). Barotnes sastāvs uz litru destilēta ūdens – 2.00 g KH₂PO₄; 1.40 g (NH₄)₂SO₄; 0.30 g MgSO₄ · 7H₂O; 0.30 g CaCl₂; 0.30 g CH₄N₂O; 0.25 g rauga ekstrakts; 1.00 g proteāzes peptons; 1 ml mikroelementu šķīdums (495 ml destilēta ūdens; 5 ml konc. HCl; 4.60 g FeSO₄ · 7H₂O; 1.78 g ZnSO₄ · H₂O; 1.83 g CoCl₂ · 6H₂O, 0.89g MnCl₂ · 4H₂O) (Mandels and Weber 1969). Ja nepieciešams, sēnes micēliju homogenizē mehāniskajās dzirnavās (4 000 apgr/min 40sek).

Sēņu kultūras inkubē 5 dienas 30° C pie 150 apgr/min. Pēc noteiktā laika mēra barotnes pH un atdala šķidro frakciju no saaugušā sēnes micēlija un substrāta ar kaprona audumu. Atlikušās nogulsnes šķīdumā nosēdina ar centrifūgēšanu (10 min 6800 g). Supernatantam pievieno (NH₄)₂SO₄ attiecībā 1:2 (w/v) un novieto ledusskapī (+ 4° C) uz 48h. Pēc noteiktā laika veic proteīnu daļiņu nosēdināšanu, suspensiju vēlreiz centrifūgējot. Supernatantu dekantē un nogulsnes izšķīdina 0.05 M nātrija citrāta šķīdumā.

Iegūto enzīmu šķīdumu aktivitāti novērtē, izmantojot filtrapīra noteikšanas metodi un veicot 24 h hidrolīzi, izvērtējot iegūto reducejošo ogļhidrātu un glikozes daudzumu.

2.2.2. Biomasas ievākšana un sagatavošana

Eksperimentos izmantotā biomasas - siens un miežu salmi - tika ievākti 2019. gada vasarā (jūnijā un augustā) un izžāvēti līdz mitruma līmenim 10%. Siens ievākts Latvijā no daļēji dabiska zālāja, savukārt mieži auguši Tartu apriņķī un to salmi iegūti kā pārtikas rūpniecības blakusprodukts. Biomasas sastāva (2. tabula) noteikšana veikta Igaunijas Dzīvības Zinātņu Universitātes Augu Bioķīmijas laboratorijā.

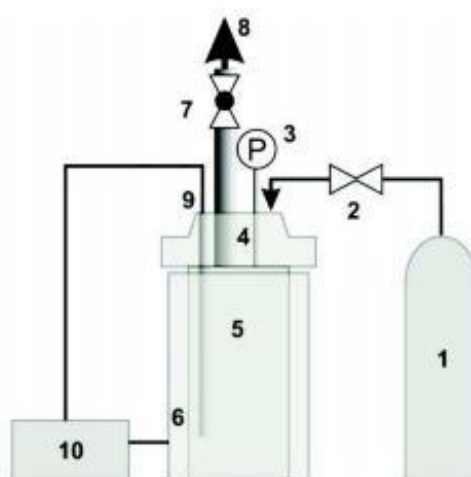
2. tabula. Eksperimentos izmantoto biomasu polimēru attiecība.

Table 2. Relative composition of polymers in plant biomasses.

Polimērs	Polimēra sastāvs sienā (%)	Polimēra sastāvs miežu salmos (%)
Hemiceluloze	14.78 ± 1.02	32.61 ± 0.53
Celuloze	33.56 ± 0.36	45.73 ± 0.21
Lignīns	6.46 ± 0.37	5.25 ± 0.00

2.2.3. Pirmapstrāde ar slāpekļa gāzes eksplozīvu dekompresiju

Pirmapstrādi veic sienam un miežu salmiem 125° C, 150° C un 175° C temperatūrā paaugstināta spiediena apstākļos. Reaktora traukā 15 g biomasas samaisa ar destilētu ūdeni (400 ml), noslēdz reaktora nodalījumu ar vāku un cieši nostiprina to ar skrūvēm. Reaktora nodalījumā pievieno N₂ gāzi, sasniedzot 30 bar spiedienu. Ar keramisko sildītāju karsē biomasu līdz nepieciešmajai temperatūrai. Temperatūra rektorā tiek mērīta ar termopāri un kontrolēta ar kontrolierīci. Sasniedzot vajadzīgo temperatūru, noņem keramisko sildītāju un 80° C temperatūrā veic eksplozīvu dekompresiju, strauji atverot spiediena izlaides vārstu. Pirmapstrādes sistēmas shēma atveidota 3. attēlā.



3. attēls. Pirmapstrādes sistēmas shēma (Raud *et al* 2016). 1 – slāpekļa gāzes balons, 2 – spiediena kontroles vārsts, 3 – manometrs, 4 – reaktora vāks, 5 – reaktora trauks, 6 – keramikas kontaktsildītājs, 7 – spiediena izlaides vārsts, 8 – ventilācijas sistēma, 9 – termopāris, 10 – temperatūras kontrolierīce.

Figure 3. A schematic drawing of pretreatment system (Raud *et al* 2016). 1 – nitrogen tank, 2 – pressure control valve, 3 – manometer, 4 – reactor vessel cap, 5 – reactor vessel, 6 – ceramic contact heater, 7 – pressure release valve, 8 – ventilation system, 9 – thermocouple, 10 – temperature controller unit.

Negatīvās kontroles veiktas ar biomasas suspensiju vārīšanu atmosfēras spiedienā (5 min) un bez tās. Visi eksperimenti atkārtoti divreiz.

4. Enzimātiskā hidrolīze

Pēc pirmapstrādes suspensiju pārnes 1 L koniskajā kolbā un atdzesē līdz $\sim 40^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Tad pievieno 10 ml 0.05 M nātrija citrātu un 5 ml enzīmu šķīdumu. Uzpilda ar destilētu ūdeni līdz 500 ml atzīmei. Veicot hidrolīzi mazākā tilpumā, enzīma, substrāta un nātrija citrāta proporcijas saglabā tādas pašas. Hidrolīzi veic 30°C temperatūrā inkubatorā ar kratītāju 24 h (250 apgr/min 1 L kolbām, 150 apgr/min 250 ml kolbām).

5. Fermentācija

Pēc hidrolīzes 250 ml suspensijas inokulē ar 5 ml rauga *Saccharomyces cerevisiae* kultūru. Fermentāciju veic, neatdalot suspensijā esošo substrātu vai enzīmus. Rauga kultūru 24 h pirms fermentācijas kultivē peptona – rauga ekstrakta barotnē ar glikozi (10 g/l). Fermentāciju veic 30°C temperatūrā pie 150 apgr/min zema skābekļa apstākļos, kolbas noslēdzot ar fermentācijas cauruli aprīkotu gumijas korķi. Paraugus etanola koncentrācijas noteikšanai noņem pēc 24h un 48 h.

6. Glikozes un etanola koncentrācijas noteikšana

Glikozes un etanola noteikšana paraugos veikta ar elektro-ķīmisko analizatoru Analox GL6 atbilstoši ražotāja norādījumiem.

7. Reducējošo ogļhidrātu koncentrācijas noteikšana

Reducējošo ogļhidrātu koncentrāciju paraugos nosaka kalorimetriski ar dinitrosalicilskābes reaģenta metodi (Miller 1959, Ghose 1987).

Sākumā izveido glikozes standartšķīdumu sēriju ar zināmām koncentrācijām (1 – 7 g/L). Stikla mēģenēs pievieno 100 μl standartšķīduma (vai analizējamo paraugu bez cietām daļiņām un nogulsniem), 100 μl 0.05 M nātrija citrāta un 600 μl dinitrosalicilskābes reaģenta (1.06 g 3,5-dinitrosalicilskābe; 1.98 g nātrija hidroksīds; 36 g kālija nātrija tartrāts; 0.83 g nātrija metabisulfīts; 760 μl fenols, 142 ml destilēta ūdens). Negatīvās kontroles mēģenē parauga vietā pievieno 100 μl destilēta ūdens.

Mēģenes liek vāroša ūdens vannā (5 min), pēc tam strauji atdzesē un katrā mēģenē pievieno 4 ml destilēta ūdens. Absorbciiju vērtības nolasa pie viļņu garuma $\lambda = 540\text{nm}$, atņemot negatīvās kontroles absorbciiju.

Glikozes šķīdumu standartlīkni izveido izmantojot programmas VisionLite iegūtās funkcijas vai Microsoft Excel vidē. Pēc iegūtā funkcijas vienādojuma un analizējamo paraugu absorbciju vērtībām aprēķina reducējošo ogļhidrātu koncentrāciju šķīdumā.

8. Celulāžu aktivitātes noteikšana

Kopējo celulāžu aktivitāti nosaka, izmantojot celulozes filtrpapīru un izsakot to FPU vienībās (Ghose 1987). Metode balstās uz laikā noteiktu celulozes enzimātisku saharifikāciju, iegūto glikozes daudzumu nosakot kalorimetriski ar dinitrosalicilsābes reaģentu.

Sākumā izveido glikozes standartu (1 – 3.5 mg/0.5 ml) un enzīma atšķaidījumu sērijas, izmantojot 0.05 M nātrija citrāta šķīdumu. Enzīmu atšķaidījumus jāveido tā, lai rezultātā iegūtu aptuveni 2 mg/0.5 ml glikozes.

Mēģenēs liek sarullētu celulozes filtrpapīra strēmeli (0.05 g), pievieno 1 ml 0.05 M nātrija citrāta šķīdumu un 0.5 ml attiecīgā enzīma atšķaidījuma. Katram enzīma atšķaidījumam izveido negatīvo kontroli bez filtrpapīra un papildus kontroli ar filtrpapīru un 1.5 ml 0.05 M nātrija citrāta.

Lai izveidotu glikozes šķīdumu standartlīkni, mēģenēs pievieno 1 ml 0.05 M nātrija citrātu un 0.5 ml glikozes attiecīgā atšķaidījuma.

Mēģenes liek karsta ūdens (50° C) vannā uz 60 minūtēm. Pēc tam katrā mēģenē pievieno 3 ml dinitrosalicilskābes reaģenta un liek vāroša ūdens vannā uz piecām minūtēm, pēc tam strauji atdziest. Spektrofotometra kivetē iepilda 2.5 ml destilēta ūdens un 200 µl šķīduma no mēģenes, vienmērīgi pipetējot, samaisa ar ūdeni iegūstot vienmērīgu šķīduma krāsu. Nolasa šķīdumu absorbcijas pie viļņu garuma $\lambda = 540$ nm. Enzīmu atšķaidījumu absorbcijām atņem negatīvo kontroļu absorbcijas. No glikozes standartšķīdumu koncentrācijām un to iegūtajām absorbciju konstruē standartlīkni. Grafikā atliek arī enzīmu atšķaidījumu sērijas absorbcijas, uz y ass atliekot to atšķaidījumus. Nosaka enzīma atšķaidījumu, pie kuras glikozes koncentrācija ir 2 mg/0.5 ml un aprēķina celulāžu aktivitāti pēc vienādojuma:

$$FPU = \frac{0.37}{\text{enzīma koncentrācija atšķaidījumā}} \text{ vienības/ml}$$

9. Datu apstrāde un statistiskā analīze

Datu apkopošanai un attēlošanai izmantota programma Microsoft Excel (Microsoft Corporation 2016). Datu attēlošanai un statistiskai analīzei izmantota programmas R versija 3.5.1 (R Core Team 2018) un papildus paketes readxl 1.1.0 (Wickham and Bryan 2018^a), ggplot2 3.0.0 (Wickham H 2016), ggthemes 4.2.0 (Arnold 2019), cowplot 0.9.3 (Wilke 2018) un scales 1.0.0 (Wickham 2018^b).

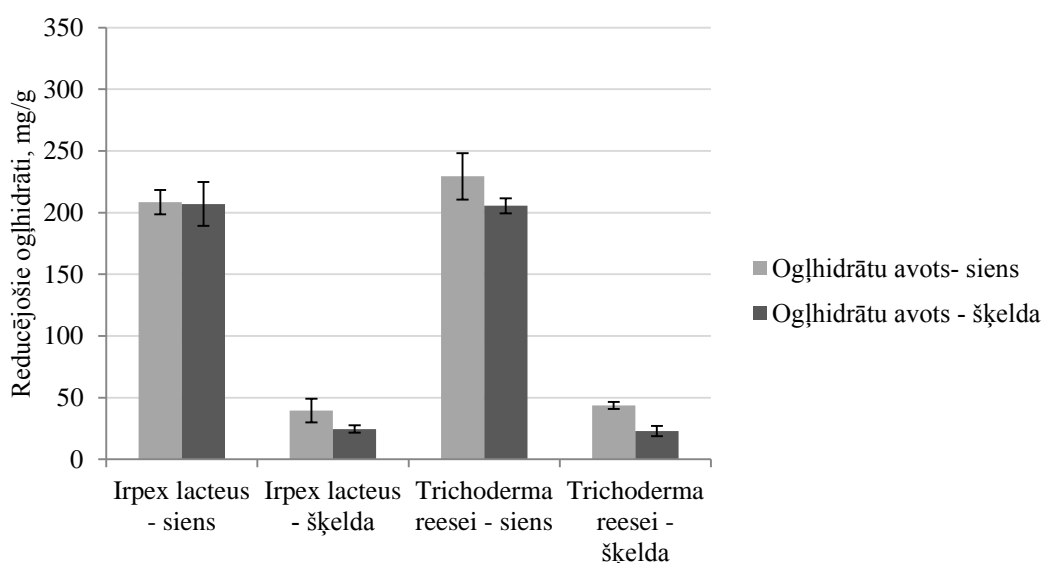
Paraugkopu vērtību sadalījuma atbilstību normālsadalījumam novērtē ar Šapīro - Vilka normalitātes testu. Saistītu paraugkopu dispersiju salīdzināšanai izmanto F testu un vidējo aritmētisko salīdzināšanai - t testu ($\alpha = 0.05$). Faktoru ietekmju novērtēšanai izmanto daudzfaktoru dispersijas analīzi ($\alpha = 0.05$).

Visi eksperimenti atkārtoti divreiz. Glikozes, etanola un reducējošo ogļhidrātu rezultāti ir divu paralēlu mērījumu vidējā vērtība.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Neattīrītu celulāžu iegūšana no sēnēm *Trichoderma reesei* un *Irpex lacteus*

Lai veiktu biomasas enzmātisku hidrolīzi, sākotnēji tika iegūti neattīrīti celulāžu enzīmu šķīdumi no lignocelulozi degradējošām sēnēm *Trichoderma reesei* un *Irpex lacteus*, kā tas aprakstīts metodēs. Par ogļhidrātu avotu barotnē tika izmantoti divi substrāti – siens un šķelda. Pēc enzīmu izgulsnēšanas iegūtie enzīmu šķīdumi tika pārbaudīti, veicot siena un šķeldas 24 h hidrolīzi (4. attēls).



4. attēls. Iegūto enzīmu šķīdumu no sēnēm *Irpex lacteus* un *Trichoderma reesei* hidrolītiska pārbaude. Ar gaiši pelēku apzīmēti hidrolīzes rezultāti, kas veikti ar enzīmu šķīdumiem, kuru iegūšanas laikā sēnes kultivētas barotnē ar ogļhidrātu avotu - siens, ar tumši pelēku – šķelda.

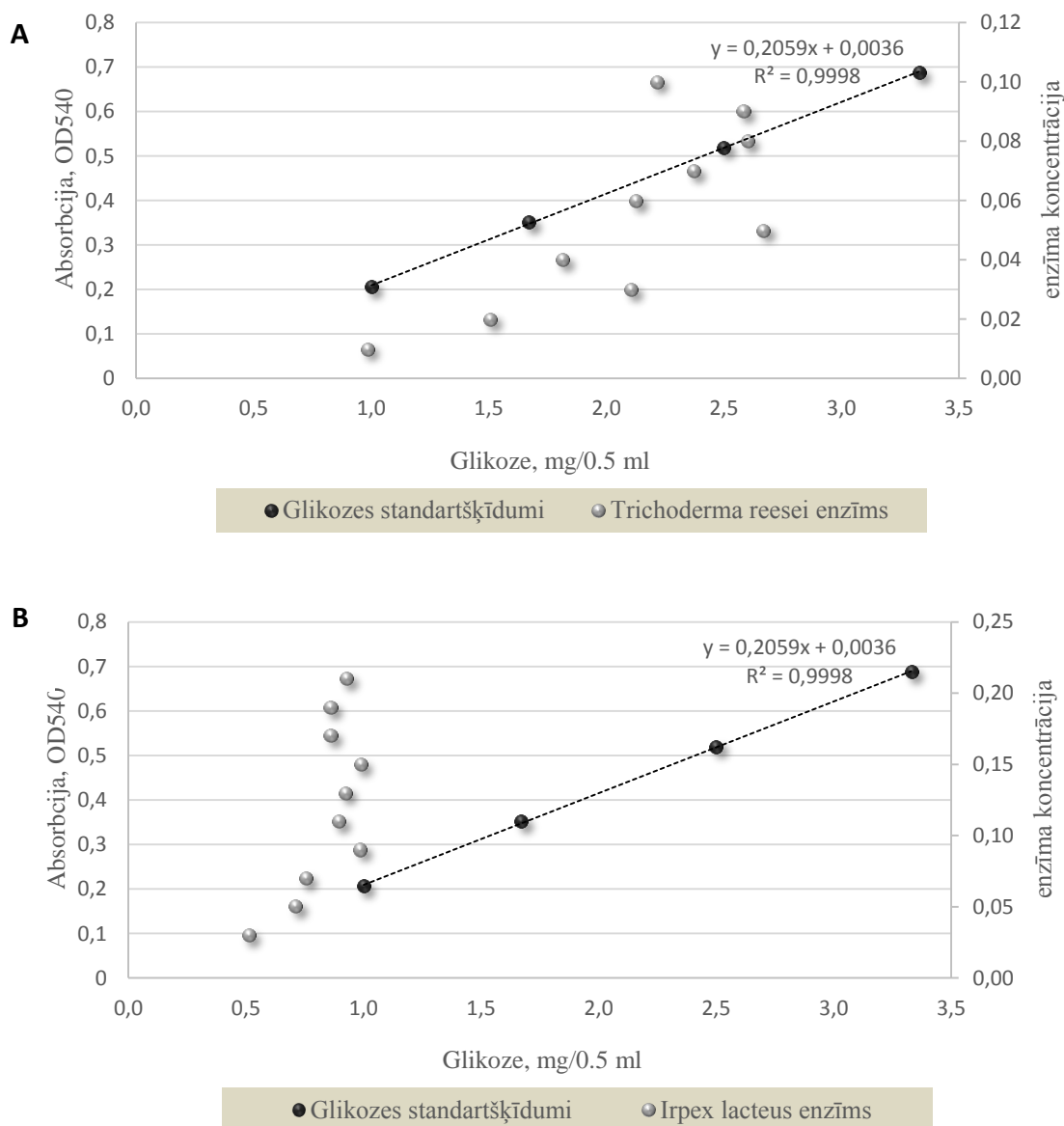
Figure 4. Hydrolytic evaluation of crude enzymes obtained from fungi *Irpex lacteus* and *Trichoderma reesei*. Light grey columns indicates enzymes obtained from fungi cultivated in medium with hay as carbohydrate source, dark grey columns – fungi cultivated in medium with grinded wood chips as carbohydrate source.

Ceturtajā attēlā redzams, ka no siena visos variantos hidrolīzē iegūts līdzīgs reducējošo ogļhidrātu daudzums - 200 – 230 mg/g substrāta. No šķeldas iegūtais reducējošo ogļhidrātu daudzums ir niecīgs - tas nepārsniedz 50 mg/g substrāta. Turklāt, enzīmu efektivitāte nav atkarīga no tā, kāds substrāts izmantots sēņu kultivēšanai par ogļhidrātu avotu (gaiši pelēkās un tumši pelēkās kolonnas). Literatūrā aprakstīti dažādi substrāti, kas kalpo par celulāžu enzīmu inducētāju sēnēs, piemēram, luffa, ziloņzāle, cukurniedres (Verma *et al* 2018; Scholl *et al* 2015; Cunha *et al* 2012). Šajā gadījumā eksperimenti liecina, ka starp iegūto enzīmu

efektivitāti hidrolīzē nav statistiski būtiskas atšķirības ($p = 0.054$) neatkarīgi no sēņu kultivēšanas laikā izmantotā substrāta.

3.2. Enzīmu aktivitātes novērtējums

Lai izteiktu iegūto enzīmu šķīdumu kopējo celulāžu aktivitāti FPU vienībās, tika veikta filtrpapīra noteikšanas metode, kas balstīta uz laikā noteiktu iegūtu reducējošo ogļhidrātu daudzuma no tīras celulozes (Ghose 1987). Iegūtie rezultāti attēloti 5. attēlā.



5. attēls. Neattīrītu enzīmu šķīdumu no sēnēm *Trichoderma reesei* (A) un *Irpex lacteus* (B) celulāžu aktivitātes novērtējums, izmantojot filtrpapīra noteikšanas metodi (Ghose 1987).

Figure 5. Evaluation of cellulolytic activity for crude enzyme solutions obtained from fungi *Trichoderma reesei* (A) and *Irpex lacteus* (B) using filter paper assay (Ghose 1987).

Iegūtā enzīma šķīduma no sēnes *Trichoderma reesei* atšķaidījums, pie kura iegūts 2 mg/0.5 ml reducējošo ogļhidrātu, ir 0.024 un tālāk aprēķina celulāžu aktivitāti pēc vienādojuma:

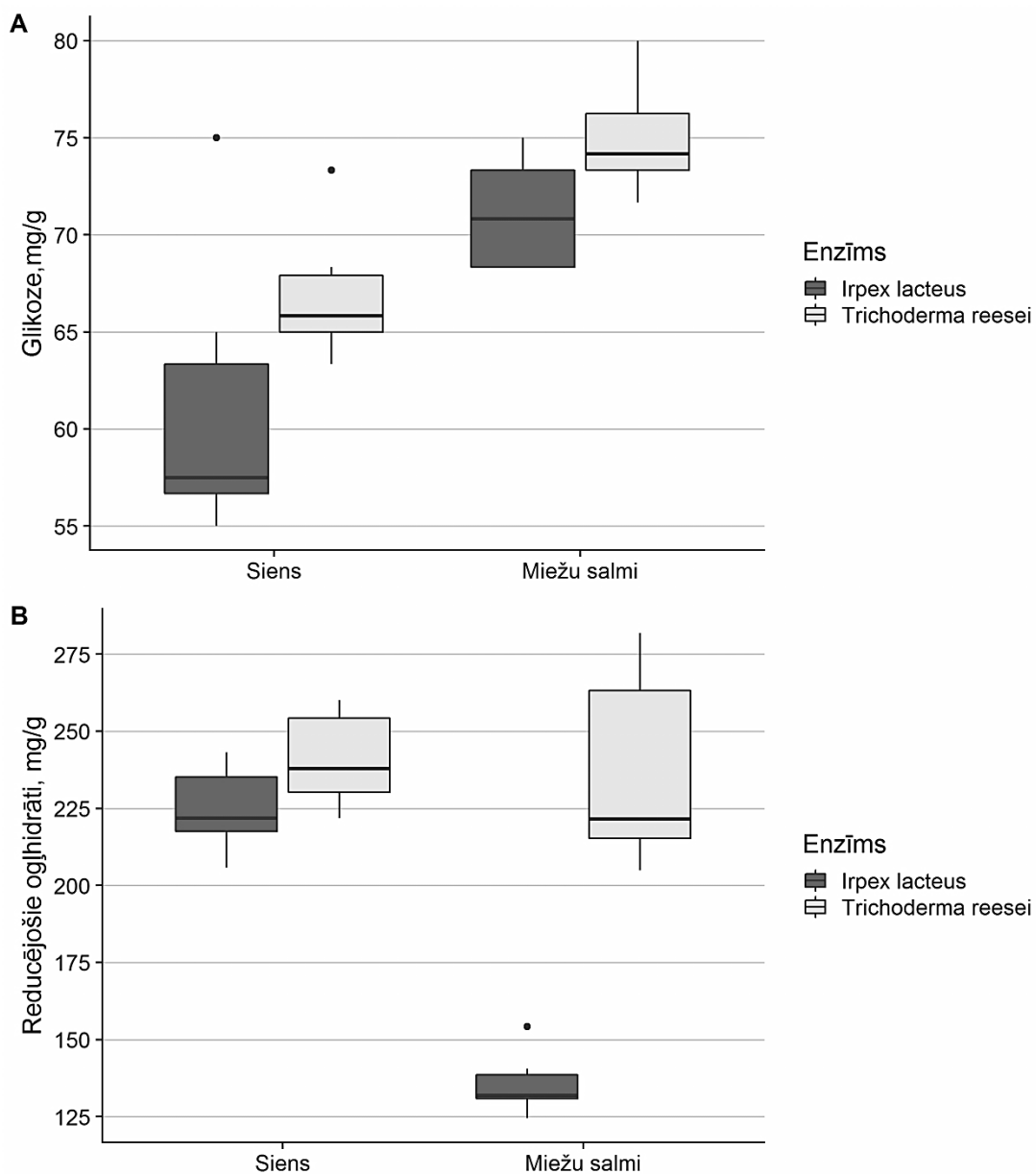
$$FPU = \frac{0.37}{0.024} = 15.4 \text{ vienības/ml} .$$

Ar enzīmu šķīdumu no sēnes *Irpex lacteus* maksimālais reducējošo ogļhidrātu daudzums (1 mg/0.5 ml) tika sasniegts pie enzīma atšķaidījuma 0.09, un mazāk koncentrēti šķīdumi nerezultējās lielākā reducējošo ogļhidrātu iznākumā. Tomēr vizuāli bija novērojama celulozes filtrpapīra degradācija, pie koncentrētākiem šķīdumiem palielinoties duļķainībai. Iegūt teorētiskās atšķaidījumu vērtības ar trenda līnijas ekstrapolēšanu nevar, jo celulāžu aktivitāti nevar raksturot ar lineāru sakarību (Ghose 1987).

Enzīmu šķīdumam no sēnes *Irpex lacteus* celulāžu aktivitāti iespējams varētu noteikt, metodi modificējot un reducējošo ogļhidrātu daudzuma noteikšanai izmantojot kādu citu, nevis kalorimetrisku metodi. Var izmantot arī CMC vienības vai noteikt atsevišķu enzīmu aktivitāti (Ghose 1987).

3.3. Biomasas pirmapstrāde ar slāpekļa gāzes eksplozīvu dekompresiju

Pirmapstrāde sienam un miežu salmiem veikta, lai sagrautu lignocelulozes struktūru un atvieglotu enzīmu pieeju celulozei hidrolīzes laikā (Raud *et al* 2016). Pirmapstrādes efektivitāti novērtē, mērot glikozes un reducējošo ogļhidrātu daudzumu paraugos pēc 24 h enzimātiskās hidrolīzes ar laboratorijā iegūtiem enzīmu šķīdumiem no sēnēm *Trichoderma reesei* un *Irpex lacteus*. Ar Tukey tipa kastveida un nogriežņu procentiņu diagrammu novērtē vērtību izkliedi katram no variantiem un to, vai ir redzamas atšķirības starp izmantotajiem substrātiem un enzīmiem (6. attēls).



6. attēls. Glikozes (A) un reducējošos ogļhidrātu (B) daudzums apstrādātai biomasai pēc 24h enzimatiskās hidrolīzes ar laboratorijā iegūtiem enzīmiem no sēnēm *Trichoderma reesei* un *Irpex lacteus*.

Figure 6. Glucose and reducing carbohydrate yields after 24h hydrolysis with enzymes obtained in laboratory from fungi *Trichoderma reesei* and *Irpex lacteus*.

Grafikā redzamās galējās vērtības tiek pieņemtas kā reāli novērojumi, jo tās minimāli pārsniedz nogriežņu maksimālo diapazonu ($Q3 + 1.5 \text{ IQR}$). To var izraisīt nelielas atšķirības paraugšanā vai datu ievākšanā (mērparātu kļūdas).

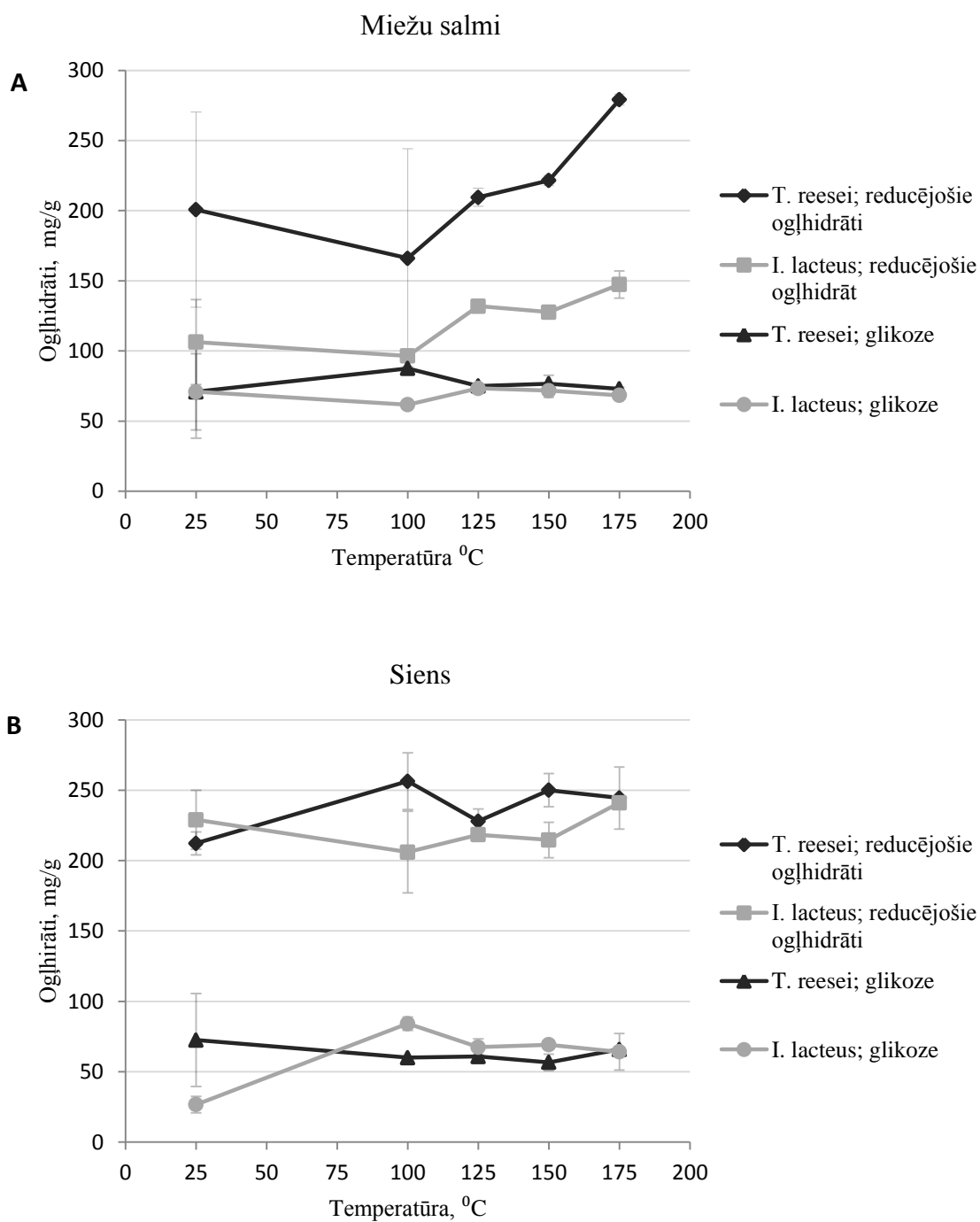
Paraugkopu vērtību sadalījums būtiski neatšķiras no normālā sadalījuma ($p > 0.05$) un to dispersijas ir homogēnas ($p > 0.05$).

Sestajā attēlā (A) redzams, ka nedaudz lielāks glikozes daudzums iegūts salmu hidrolīzē, savukārt reducējošo ogļhidrātu (B) daudzums starp substrātiem ir līdzīgs, visu variantu mediānām, izņemot salmu hidrolīzes ar enzīmu šķīdumu no *Irpex lacteus*, variējot 220 – 240 mg/g robežās.

Apstrādātu salmu hidrolīzē ieguva vidēji par $12.4\% \pm 1.5\%$ vairāk glikozes nekā apstrādāta siena hidrolīzē. Ņemot vērā substrātu sastāva atšķirības (salmos par 26,6% vairāk celulozes), salmu hidrolīzē glikozē tika pārvērsti 16% no substrātā esošās celulozes un 19% - siena hidrolīzē. Tomēr tā ir salīdzinoši neliela daļa no visas substrātā pieejamās celulozes. Lai novērtētu iegūto enzīmu efektivitāti ar eksplozīvas dekompresijas apstrādātas biomasas hidrolīzē, tiek salīdzināti pieejamie dati par līdzīgiem pētījumiem ar komerciāliem enzīmiem.

I. Bērziņa (nepubl. dati) ar enzīmu Viscozyme L apstrādāta siena hidrolīzē ieguva 108.0 ± 13.0 mg/g glikozes, tātad tika pārvērsti $32.2\% \pm 3.9\%$ no pieejamās celulozes un 102.4 ± 18.4 mg/g glikozes jeb pārvērstas $22.4\% \pm 3.7\%$ celulozes salmu hidrolīzē. Savukārt M. Raud darbā ar salmiem un enzīmu Accellerase 1500 (Raud *et al* 2016) ieguva 190 – 300 mg/g glikozes, kas atbilst pārvērstiem 41 – 65% no salmos pieejamās celulozes. Lai gan pievienotais enzīmu daudzums ir līdzīgs visos eksperimentos (0.3 – 0.33 ml/g), pētījumos ar enzīmu Accellerase 1500 hidrolīze tika veikta augstākā - + 50° C temperatūrā.

Veiktajos eksperimentos visvairāk glikozes tika iegūts miežu salmu hidrolīzē ar enzīmu šķīdumu no sēnes *Trichoderma reesei* - 76.7 ± 7.03 mg/g; vismazāk – siena hidrolīzē ar enzīmu šķīdumu no sēnes *Irpex lacteus* - 63.2 ± 7.95 mg/g.



6. Attēls. Glikozes un reducējošo ogļhidrātu daudzums pēc 24 h hidrolīzes atkarībā no pirmapstrādes laikā sasniegtās maksimālās temperatūras.

Figure 6. Glucose and carbohydrate yields after 24 h enzymatic hydrolysis depending on maximum temperature reached in the pretreatment step.

M. Raud darbā par eksplozīvas dekompresijas pirmapstrādi izmantojot N₂ gāzi (Raud *et al* 2016) secina, ka iegūtais glikozes daudzums pēc 24 h salmu hidrolīzes ar enzīmu

Accelerase 1500 strauji pieaug (218%), pirmapstrādes temperatūru palielinot no 100° C līdz 150° C. Minēto temperatūru ietvaros šajos eksperimentos neliels pieaugums konstatēts tikai reducējošo ogļhidrātu daudzumā - 12.4 ± 1.0 %.

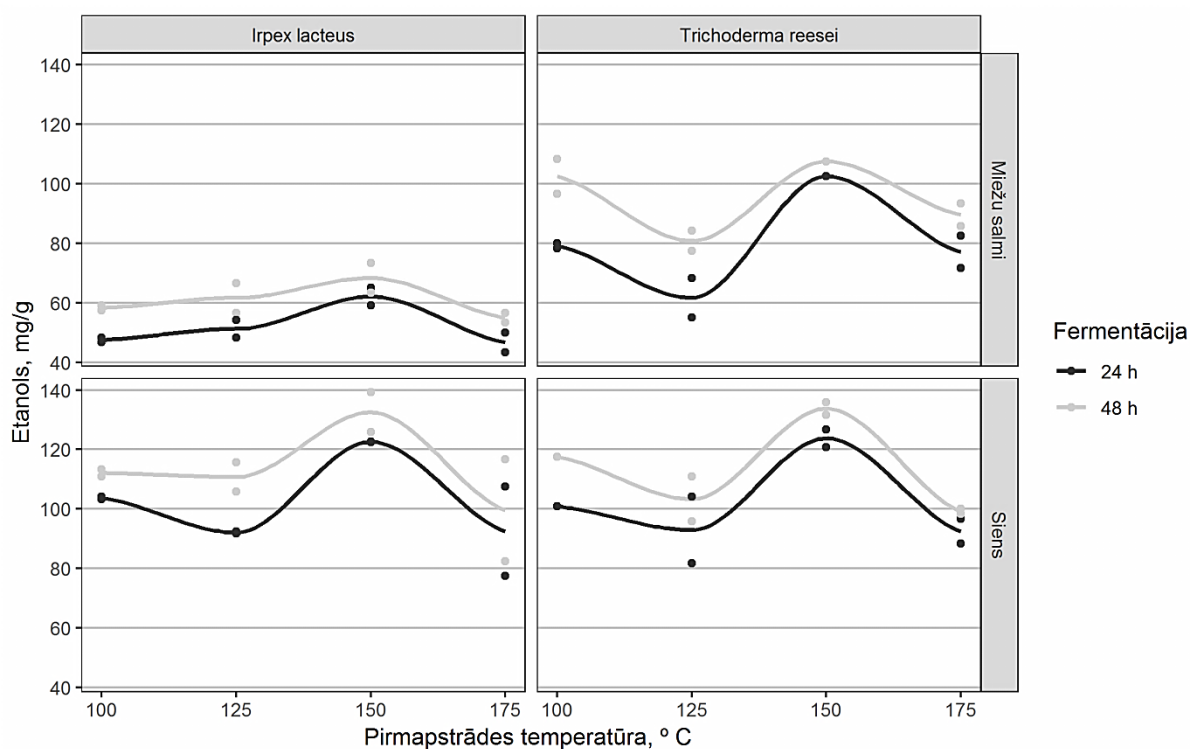
Pīrsona korelācijas tests starp pirmapstrādes temperatūru un reducējošo ogļhidrātu/ glikozes rezultātiem pēc hidrolīzes uzrādīja statistiski būtisku korelāciju tikai salmu hidrolīzē ar enzīmu šķīdumu no *Irpex lacteus* (reducējošo ogļhidrātu daudzums) ($r = 0.67$, $p = 0.034$). 6. attēlā (A) redzams reducējošo ogļhidrātu pieaugums atkarībā no temperatūras arī salmu hidrolīzē ar enzīmu *Trichoderma reesei* ($r = 0.47$), tomēr pie būtiskuma līmeņa $\alpha = 0.05$ tas nav statistiski būtisks ($p = 0.167$). Kontroles variantos (25° C un 100° C) salmu hidrolīzē, kur netika izmantota eksplozīvas dekompresijas pirmapstrāde, redzamas lielas standartnovirzes. Tas varētu liecināt, ka augstā temperatūra pirmapstrādes laikā garantē lielāku vides sterilitāti un drošāku saharifikācijas iznākumu, kas ir būtiski liela apjoma ražošanai. Tomēr siena hidrolīzē tik lielas standartnovirzes nav vērojamas.

Lai salīdzinātu abus hidrolīzē izmantotos enzīmu šķīdumus, tika veikta paraugkopu vidējo aritmētisko salīdzināšana ar t testu. Starp abiem enzīmiem statistiski būtiska atšķirība konstatēta tikai salmu hidrolīzes reducējošo ogļhidrātu daudzumā ($p < 0.0001$).

Lai novērtētu temperatūras, enzīma un eksplozīvas dekompresijas ietekmi uz reducējošo ogļhidrātu un glikozes daudzumu pēc enzīmātiskas hidrolīzes, tika izmantota daudzfaktoru dispersijas analīze ($\alpha = 0.05$). Statistiski būtiska ietekme uz glikozes iznākumu pēc hidrolīzes ir konstatēta pielietotajam enzīmam ($p = 0.016$) un enzīma un temperatūras kopējai ietekmei ($p = 0.007$) Statistiski būtiska ietekme uz reducējošo ogļhidrātu daudzumu konstatēta tika pielietotajam enzīmam ($p = 0.017$).

Ņemot vērā, ka gan M. Raud eksperimentos, kuros novērots liels glikozes pieaugums, paaugstinot pirmapstrādes temperatūru no 100° C līdz 150° C, gan šī darba ietvaros veiktajos eksperimentos izmantots līdzīgs daudzumu enzīma uz gramu substrāta (0.3 – 0.33 ml/g), taču izmantotie enzīmi būtiski atšķiras (komerciāli pieejams un laboratorijā iegūts, neattīrīts enzīmu šķīdums), turpmākajos eksperimentos var palielināt enzīmu šķīdumu daudzumu. Iespējams, tas labāk atspoguļotu pirmapstrādes ietekmi uz hidrolīzes efektivitāti.

Lai spētu pilnīgi novērtēt eksplozīvas dekompresijas pirmapstrādes ietekmi bioetanola ieguvē no lignocelulozes biomasas, tika veikta iegūto hidrolizātu 48 h fermentācija ar raugu *Saccharomyces cerevisiae* (7. attēls).



7. attēls. Etanola daudzums pēc 24 h un 48 h hidrolizātu fermentācijas ar raugu *Saccharomyces cerevisiae*.

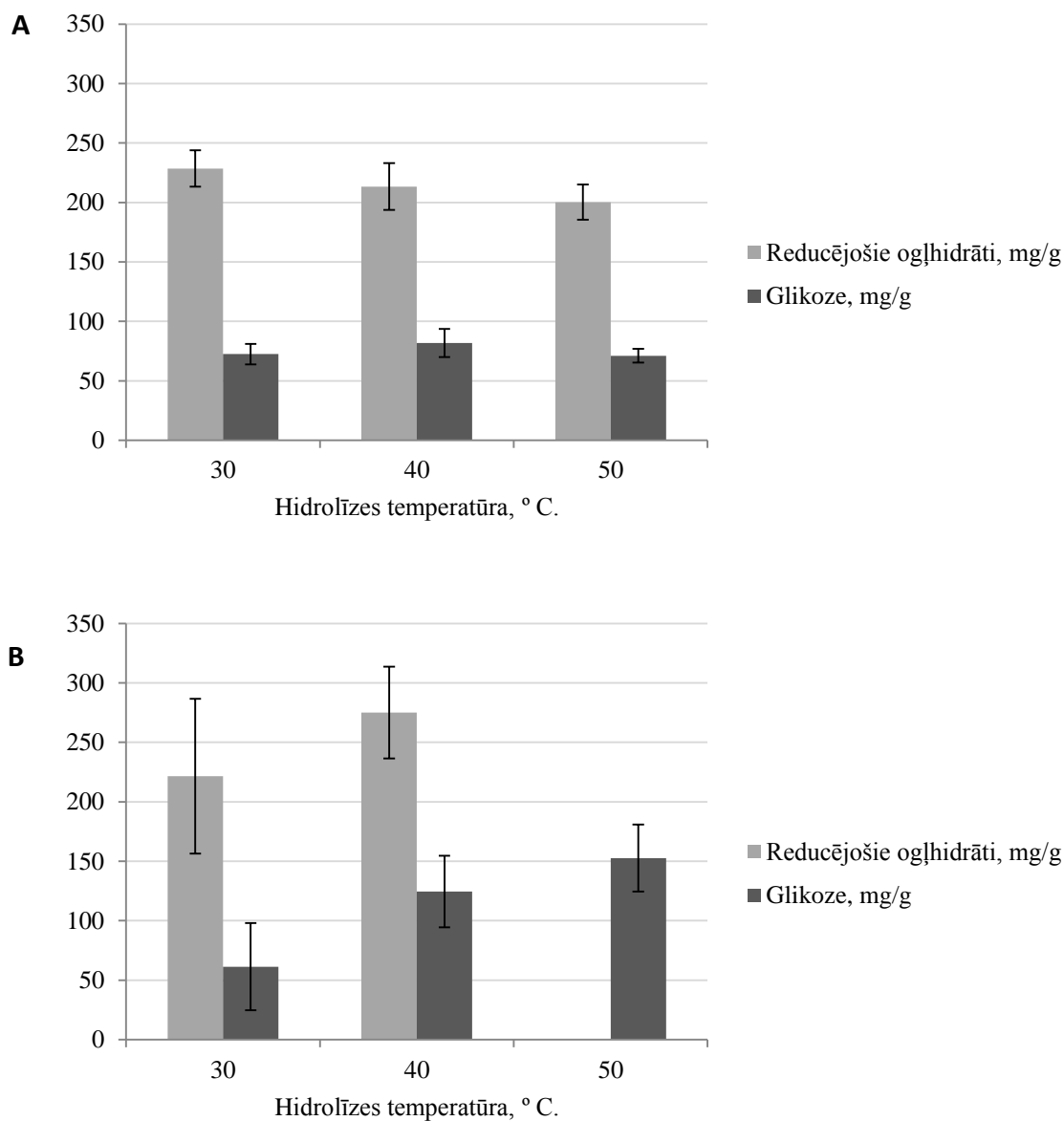
Figure 7. Ethanol yield after 24 h and 48 h fermentation of hydrolysates with yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Septītajā attēlā vērojams, ka kopumā vairāk etanola iegūts siena hidrolizātu fermentācijā. Paraugkopu vidējo aritmētisko salīdzināšana ar t testu apstiprina statistiski būtisku atšķirību starp salmu hidrolizātu fermentācijas rezultātiem atkarībā no hidrolizē izmantotajiem enzīmiem ($p < 0.0001$), no kā var spriest, ka iegūtais enzīmu šķīdums no sēnes *Irpex lacteus* salmu hidrolizē ir mazefektīvs. Var novērot atšķirības arī iegūtajā etanola daudzumā starp izmantotajiem substrātiem - statistiski būtiska atšķirība fermentācijas rezultātos vērojama gan ar *Trichoderma reesei* enzīmu iegūtajos hidrolizātos, gan ar *Irpex lacteus* enzīmu iegūtajos hidrolizātos ($p < 0.0001$).

Statistiski būtiska korelācija starp iegūto etanola daudzumu un pirmapstrādes temperatūru nav novērojama nevienā no gadījumiem ($p > 0.05$), tomēr redzams, ka M. Raud pētījumā novērotā optimālā pirmapstrādes temperatūru šajos gadījumā novēro jau fermentācijā, nevis pēc 24 h hidrolīzes (Raud *et al* 2016), tomēr pieaugums ir mērens, un iegūts 5 – 30 % (19.0 ± 8.3 %) lielāks etanola daudzums ar 150° C grādu pirmapstrādi, salīdzinot ar kontroli (100° C).

3.4. Hidrolīzes apstākļu uzlabošana

Tika veikta hidrolīzes optimālas temperatūras novērtēšana, izmantojot laboratorijā iegūtus enzīmu šķīdumus no sēnēm *Irpex lacteus* un *Trichoderma reesei*. Glikozes un reducējošo ogļhidrātu daudzums pēc 24 h hidrolīzes attēlots 8. attēlā.



8. attēls. Glikozes un reducējošo ogļhidrātu daudzums pēc 24 h hidrolīzes ar enzīmu šķīdumiem no sēnes *Irpex lacteus* (A) un *Trichoderma reesei* (B) atkarībā no hidrolīzes temperatūras.

Figure 8. Glucose and reducing carbohydrate yields after 24 h hydrolysis with crude enzymes obtained from fungi *Irpex lacteus* (A) and *Trichoderma reesei* (B) depending on temperature applied during hydrolysis.

Statistiski būtiska korelācija ($\alpha = 0.05$) starp hidrolīzes temperatūru un reducējošo ogļhidrātu ($r = 0.46$, $p = 0.023$) un glikozes ($r = 0.75$, $p < 0.0001$) daudzumu konstatēta enzīmu šķīdumam no sēnes *Trichoderma reesei*. Savukārt hidrolīzē ar enzīmu šķīdumu no sēnes *Irpex lacteus* reducējošo ogļhidrātu rezultāti liecina par statistiski būtisku negatīvu korelāciju ($r = -0.58$, $p = 0.0002$) ar hidrolīzes temperatūru, savukārt glikoze rezultātiem netiek konstatēta būtiska korelācija ($p = 0.74$). Līdz ar to secināms, ka enzīmu šķīdumam no sēnes *Trichoderma reesei* optimālā hidrolīzes temperatūra ir $+ 50^{\circ} \text{C}$, savukārt enzīmu šķīdumam no sēnes *Irpex lacteus* - $+ 30^{\circ} \text{C}$.

3.5. Galvenā diskusija

Latvija, tāpat kā citas valstis mērenajā klimata joslā, ir bagāta ar dažādiem biomasas resursiem. Eiropas Parlaments un Eiropas Savienības Padome (2009) mudina otrās paaudzes biodegvielu attīstību kā daļu no atjaunīgās enerģijas politikas un ilgtermiņa vīziju Eiropas Savienībai. Otrās paaudzes biodegvielu ražošana stiprina valstu enerģētisko neatkarību, rada jaunas darbavietas vietējā mērogā un samazina gaisa piesārņojumu ar SEG emisijām. Transporta joma Latvijā ir atbildīga par 29% no kopējā SEG emisiju līmeņa (VARAM 2019; Eiropas Parlaments un Eiropas Savienības Padome 2009).

Šajā darbā tika novērtēta biomasas eksplozīvas dekompresijas pirmapstrāde ar N_2 gāzi un enzīmātiskās hidrolīzes apstākļi, izmantojot laboratorijā iegūtus enzīmu šķīdumus no lignocelulozi degradējošām sēnēm *Trichoderma reesei* un *Irpex lacteus*.

Darbā secināts, ka iegūtie enzīmi ir efektīvi siena un salmu hidrolīzē (200 – 280 mg/g), taču mazefektīvi šķeldas hidrolīzē (4. un 6. attēls), kur iegūts zem 50 mg/g reducējošo ogļhidrātu. Ņemot vērā Eiropas Parlamenta un Eiropas Savienības Padomes (2009) ieteikumus par izmantotās biomasas diversifikāciju bioetanolā ražošanai, šķeldu ir iespējams izmantot enzīmu iegūšanai no sēnēm, kur statistiski būtiska atšķirība starp izmantotajiem ogļhidrātu avotiem sēņu kultivēšanas laikā netika konstatēta (4. attēls).

Izvērtējot trīs dažādas pirmapstrādes temperatūras, tika secināts, ka optimālā temperatūra ir 150°C , kas sakrīt ar līdzīgiem pētījumiem (Raud *et al* 2016). Statistiskie testi neuzrādīja rezultātu būtisku korelāciju ar pirmapstrādes temperatūru. Tam par iemeslu var būt dažādi faktori:

1. Salīdzinoši neliels novērojumu skaits
2. Etanola pieaugums atkarībā no temperatūras nav pārāk liels ($19.0 \pm 8.3 \%$)

3. Etanola pieaugums atkarībā no pirmapstrādes temperatūras nav lineārs, bet gan zvanveida, vislielāko etanola daudzumu sasniedzot pie 150° C.

Pirmapstrādes novērtējumam ir nepieciešams veikt gan hidrolīzi, gan fermentāciju, jo pēc 24 h hidrolīzes maksimālais efekts vēl nav novērojams (6. un 7. attēls).

Vislabākie rezultāti iegūti siena hidrolizātu fermentācijā ar pirmapstrādes temperatūru 150° C, iegūstot 120 – 140 mg/g etanola. Ņemot vērā samērā nelielo pieaugumu salīdzinājumā ar 100° C kontrolēm, eksplozīvas dekompresijas pirmapstrādes pielietošana siena hidrolīzei ar laboratorijā iegūtiem enzīmiem ir diskutabla, ņemot vērā pirmapstrādes laikā patērēto enerģijas daudzumu. Turklāt, kā 8. attēlā (B) redzams, reducējošo oglekļa hidratu un glikozes pieaugumu hidrolīzē viegli var panākt ar hidrolīzes temperatūras paaugstināšanu par 10° - 20° C. Tomēr ar enzīmu no sēnes *Irpex lacteus* efektivitātes paaugstināšanās netika novērota. Tas ir arī mazefekīvs salmu hidrolīzē (50 – 60 mg/g etanola).

Kā minēts iepriekš, pirmapstrādes ietekme ir novērojama visos fermentācijas gadījumos. Eksperimentos ar komerciāliem enzīmiem (Raud *et al* 2016) pierādīts, ka ar šo metodi var panākt pat par 218% lielāku glikozes pieaugumu salmu hidrolīzē. Iegūtie rezultāti vēlreiz apstiprina literatūrā minēto, ka katram biomasas veidam ir nepieciešama pielāgota pirmapstrāde un hidrolīze, kas ir atkarīga arī no hidrolīzes laikā izmantotā enzīma.

Eksperimentos ar enzīmu šķīdumu no *Trichoderma reesei* netika izmantota hidrolīzes optimālā temperatūra. Sagaidāms, ka tādā gadījumā etanola pieaugums būtu lielāks. Pieļaujams, ka palielinot enzīma koncentrāciju, uzlabotos hidrolīzes un fermentācijas rezultāti.

4. SECINĀJUMI

1. Biomasu, kuru ir grūti izmantot bioetnola ražošanai zemās efektivitātes dēļ (šķeldu), ir iespējams izmantot enzīmu iegūšanai no lignocelulozi degradējošām sēnēm, izmantojot to kā ogļhidrātu avotu celulāžu enzīmu inducēšanai.
2. Lai novērtētu eksplozīvas dekompresijas pirmapstrādes nozīmi etnola ieguvē no lignocelulozes biomasas, ir nepieciešama gan 24 h hidrolīze, gan vienlaicīga hidrolīze un fermentācija.
3. Ar eksplozīvas dekompresijas apstrādātas biomasas sašķeltais celulozes daudzums pēc 24 h hidrolīzes stipri variē atkarībā no pielietotā enzīma – sākot ar 20%, izmantojot laboratorijā iegūtus neattīrītus enzīmu šķīdumus, turpinot ar 30% sašķeltas celulozes ar komerciālu enzīmu Viscozyme L un 40 - 60% sašķeltas celulozes ar komerciālu enzīmu Accelerase 1500.
4. Turpinot hidrolīzi vienlaicīgi ar fermentāciju, ir iespējams iegūt lielāku etnola daudzumu, nekā aprēķinātais relatīvais celulozes saharifikācijas daudzums.
5. Enzīmu šķīdums no sēnes *Irpex lacteus* ir mazefektīvs salmu hidrolīzē.
6. Ar eksplozīvas dekompresijas apstrādātas biomasas hidrolizātu fermentācijas dati liecina, ka literatūrā minētā pirmapstrādes maksimālā efektivitāte pie 150° C ir novērota arī šajos eksperimentos.
7. Visaugstākie rezultāti apstrādātas biomasas hidrolīzē un fermentācijā iegūti ar sienu. Etnola rezultātus enzīma no sēnes *Trichoderma reesei* gadījumā vēl var paaugstināt, izmantojot optimālu hidrolīzes temperatūru.
8. Izmantojot enzīmu šķīdumu no sēnes *Trichoderma reesei*, optimālā hidrolīzes temperatūra ir +50° C, bet enzīmu šķīdumam no sēnes *Irpex lacteus* - +30° C.
9. Katram substrāta veidam ir nepieciešams pielāgot pirmapstrādes un hidrolīzes apstākļus. Etnola pieaugums apstrādāta siena hidrolīzē ar laboratorijā iegūtiem enzīmu šķīdumiem nav tik liels, lai attaisnotu izmantoto enerģijas daudzums pirmapstrādes posmā.

5. PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību darba vadītājai Lindai Mežulei, recenzentei Lindai Rozenfeldei, kā arī kolēģiem – Mārtiņam Strodam par palīdzību fermentācijas datu iegūšanā un Vahur Rooni par palīdzību ar biomasas pirmapstrādes sistēmu. Izsaku lielu pateicību Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes mācībspēkiem par profesionālu pieeju darbā ar studentiem un sniegtajām zināšanām, kas palīdzēja darba izstrādes laikā.

LITERATŪRAS SARAKSTS

Ahmed W., Sarkar B. 2018. Impact of carbon emissions in a sustainable supply chain management for a second generation biofuel. – *Journal of Cleaner Production*, 186: 807–820.

Allen R. C. 2009. *The British Industrial Revolution in global perspective*. New York: Cambridge University press, 344 pp.

Antonioli F., Anzidei M., Amorosi A., Lo Presti V., Mastronuzzi G., Deiana G., De Falco G., Fontana A., Fontolan G., Lisco S., Marsico A., Moretti M., Orrù P. E., Sannino G. M., Serpelloni E., Vecchio A. 2017. Sea-level rise and potential drowning of the Italian coastal plains: Flooding risk scenarios for 2100. – *Quaternary Science Reviews*, 158: 29–43.

Arnold J. B. 2019. ggthemes: Extra Themes, Scales and Geoms for 'ggplot2'. R package version 4.2.0. <https://CRAN.R-project.org/package=ggthemes>.

Arrhenius S. 1896. On the influence of carbonic acid in the air upon the temperature of the ground. – *Philosophical Magazine and Journal of Science*, 5 (41): 237–276.

Betts W. B., Dart R. K., Ball A. S., Pedlar S. L. 1991. Biosynthesis and Structure of Lignocellulose. – *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*, 139–155.

Bryngemark E. 2019. Second generation biofuels and the competition for forest raw materials: A partial equilibrium analysis of Sweden. – *Forest Policy and Economics*, 109: 102022.

Chen F., Zhang W., Ma J., Yang Y., Zhang S., Chen R 2017. Experimental study on the effects of underground CO₂ leakage on soil microbial consortia. – *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 63: 241–248.

Conti S. 2011. Heat Wave and Mortality of the Elderly. – *Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition)*: 477–484.

Coumou D., Rahmstorf S. 2012. A decade of weather extremes. – *Nature Climate Change*, 2: 491–496.

Cunha F. M., Esperanca M. N., Zangirolami T.C., Badino A.C., Farinas C. S. 2012. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. – *Bioresource Technology*, 112: 270–274.

CSP 2020. Atjaunīgo energoresursu (AER) īpatsvars. <https://data1.csb.gov.lv:443/sq/36794>

- Hombach L. E., Cambero C., Sowlati T., Walther G. 2016. Optimal design of supply chains for second generation biofuels incorporating European biofuel regulations. – *Journal of Cleaner Production*, 133: 565–575.
- Höök M., Tang X. 2013. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change – A review. – *Energy Policy*, 52: 797–809.
- IPCC 2012. *Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation: Special Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. New York: Cambridge University press, 1075 pp.
- IPCC 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Geneva: IPCC, 151 pp.
- IPCC 2018: *Summary for Policymakers*. In: *Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty*. In Press.
- Jönsson L. J., Alriksson B., Nilvebrant N. O. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. – *Biotechnology for Biofuels*, 6: 16.
- Katharine L., Gjersoe N., O'Neill S., Barnett J. 2020. Youth perceptions of climate change: A narrative synthesis. – *WIREs Climate Change*, 11(3): 24 pp.
- Kron W., Löw P., Kundzewicz Z.W. 2019. Changes in risk of extreme weather events in Europe. – *Environmental Science and Policy*, 100: 74–83.
- Mandels M., Weber J. 1969. The Production of Cellulases. – *Advances in Chemistry*, 95: 391–413.
- Mezule L., Strods M., Dalecka B. 2016. Influence of mechanical pre-treatment on fermentable sugar production from lignocellulosic biomass. – *Agronomy Research*, 14 (6): 1427–1434.
- Mezule, L., Berzina, I., Strods, M. 2019. The impact of substrate–enzyme proportion for efficient hydrolysis of hay. – *Energies*, 12 (18): 3526–3534.

- Microsoft Corporation. 2016. Microsoft Excel, Redmond, Washington.
- Miller G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. – *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426–428.
- Mohr A., Raman S. 2013. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. – *Energy Policy*, 63: 114–122.
- Mousdale D. M. 2008. *Biofuels: Biotechnology, Chemistry, and Sustainable Development*. Boca Raton: CRC Press, 404 pp.
- Nilsson G. E., Dixon D. L., Domenici P., McCormick M. I., Sørensen C., Watson S.A., Munday P. L. 2012. Near-future carbon dioxide levels alter fish behaviour by interfering with neurotransmitter function. – *Nature Climate Change*, 2: 201–204.
- Poortinga W., Spence A., Whitmarsh L., Capstick S., Pidgeon N. F. 2011. Uncertain climate: An investigation into public scepticism about anthropogenic climate change. - *Global Environmental Change*, 21: 1015–1024.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Raud M., Rooni V., Kikas T. 2016. Explosive decompression pretreatment: nitrogen vs. compressed air. – *Agronomy Research*, 14 (2): 569–578.
- REN21. 2019. *Renewables in cities 2019 global status report*. Paris: REN21 Secretariat, 135pp.
- Ritchie H., Roser M. 2020. *Fossil Fuels*. – *Our World In Data*. <https://ourworldindata.org/fossil-fuels>.
- Rooni V., Raud M., Kikas T. 2017. Technical solutions used in different pretreatments of lignocellulosic biomass: a review. – *Agronomy Research*, 15 (3): 848–858.
- Ryu D. D. Y., Mandels M. 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. – *Enzyme and Microbial Technology*, 2: 91–102.
- Schmidhuber J., Tubiello F. N. 2007. Global food security under climate change. – *PNAS*, 104 (50): 19703–19708.

- Scholl A. L., Menegol D., Pitarelo A. P., Fontana R. C., Filho A. Z., Ramos L. P., Pinheiro Dillon A. J., Cammasola M. 2015. Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. – *Industrial Crops and Products*, 70: 280–291.
- Seifert T. 2013. *Bioenergy from wood: sustainable production in the tropics*. London: Springer Science & Business Media, 266 pp.
- Song Y., Cho E. J., Park C. S., Oh C. H, Park B. J., Bae H. J. 2019. A strategy for sequential fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* in bioethanol production from hardwoods. – *Renewable Energy*, 136: 1281–1289.
- Tao Y., Yang L., Ying L., Lai C., Huang C., Li X., Yong Q. 2020. Novel approach to produce biomass-derived oligosaccharides simultaneously by recombinant endoglucanase from *Trichoderma reesei*. – *Enzyme and Microbial Technology*, 134: 109481.
- Thompson W., Meyer S. 2013. Second generation biofuels and food crops: Co-products or competitors? – *Global Food Security*, 2: 89–96.
- Tranter B., Booth K. 2015. Scepticism in a changing climate: A cross-national study. – *Global Environmental Change*, 33: 154–164.
- Tutt M., Kikas T., Olt J. 2012. Influence of different pretreatment methods on bioethanol production from wheat straw. – *Agronomy Research, Biosystems Engineering Special Issue 1*, 269–276.
- VARAM 2019. Stratēģija Latvijas oglekļa maziētelpīgai attīstībai līdz 2050. gadam. http://www.varam.gov.lv/lat/likumdosana/normativo_aktu_projekti/klimata_parmainu_joma/?doc=26231
- Verma N., Kumar V., Bansal M. C. 2018. Utility of *Luffa cylindrica* and *Litchi chinensis* peel, an agricultural waste biomass in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state cultivation. – *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16: 483–492.
- Vermeer M., Rahmstorf S. 2009. Global sea level linked to global temperature. – *PNAS*, 106(51): 21527–21532.
- Weber T. 2008. Nonviolence Theory and Practice. – *Encyclopedia of Violence, Peace, & Conflict (Second Edition)*: 1362–1372.

- Waisman H., De Coninck H., Rogelj J. 2019. Key technological enablers for ambitious climate goals: Insights from the IPCC special report on global warming of 1.5 °C. - *Environmental Research Letters*, 14(11): 111001
- Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. R package version 3.0.0. Springer-Verlag, New York.
- Wickham H., Bryan J. 2018^a. *readxl: Read Excel Files*. R package version 1.1.0. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>.
- Wickham H. 2018^b. *scales: Scale Functions for Visualization*. R package version 1.0.0. <https://CRAN.R-project.org/package=scales>.
- Wilke C. O. 2018. *cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for 'ggplot2'*. R package version 0.9.3. <https://CRAN.R-project.org/package=cowplot>.
- Yang D., Zhang H., Li J. 2019. Changes in concentrations of fine and coarse particles under the CO₂-induced global warming. – *Atmospheric Research*, 230: 104637.
- Yuste J. C., Flores-Rentería D., García-Angulo D., Hereş A. M., Bragă C., Petritan A. M., Petritan I. C. 2019. Cascading effects associated with climate-change-induced conifer mortality in mountain temperate forests result in hot-spots of soil CO₂ emissions. – *Soil Biology and Biochemistry*, 133: 50–59.

Maģistra darbs „Fizikāli – ķīmiskās pirmapstrādes un enzimatiskās hidrolīzes efektivitātes paaugstināšana bioetanolā ražošanai no lignocelulozes substrāta” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

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

Autore: Ieva Bērziņa

05.06.2020.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Dr. sc. ing. Linda Mežule

05.06.2020.

Recenzente: Dr. biol. Linda Rozenfelde

05.06.2020.

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 05.06.2020.

Lietvede

Darbs aizstāvēts Bioloģijas maģistra gala pārbaudījumu komisijas sēdē

prot Nr , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: