

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

BALTĀS TRUPES SĒNES *LENTINULA EDODES*
IZMANTOŠANA LIGNOCELULOZI SATUROŠU
ATLIKUMU UTILIZĀCIJĀ

Maģistra darbs

Autors: Laura Okmane

Stud. apl. Nr. Lo12008

Darba vadītājs: Dr. h. biol., prof. Indriķis Muižnieks

Darba recenzents: Dr. h. biol., prof. Aleksandrs Rapoportš

RĪGA 2017

KOPSAVILKUMS

Darbā novērtēta lignocelulozi saturošu piedevu (kļavu lapas, dažādi apstrādāti kviešu salmi) ietekme uz *L. edodes* 3565 micēlija biomasas pieaugumu un ekstracelulārās lakāzes aktivitāti. Augstākā lakāzes aktivitāte (545.74 ± 135.92 U/mL) un lielākais micēlija biomasas gūvums (422.92 ± 31.52 mg/100 mL) iegūts šķidrās iesala ekstrakta barotnēs ar hemicelulozi un celulozi nesaturošu kviešu salmu piedevu (0.50%), inkubējot uz rotācijas kratītāja (140 rpm). Inkubācijas laikā novērots: 1) pakāpenisks lakāzes aktivitātes pieaugums neatkarīgi no piedevas; 2) vides pH samazināšanās. Maltas kļavu lapas novērtētas kā micēlija blīvumu un radiālo augšanu veicinoša piedeva neatkarīgi no pamatbarotnes. Maltas brūnaļģes novērtētas kā barotni bagātinoša piedeva agarizētās iesala ekstrakta barotnēs. Novērota kultivēšanas temperatūras ietekme uz lakāzes aktivitāti un micēlija biomasas pieaugumu.

Darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā Dr. biol., asoc. prof. Nataļjas Matjuškovas un Dr. h. biol., prof. Indriķa Muižnieka vadībā.

Atslēgvārdi: *Lentinula edodes*, micēlijs, lakāze, lignoceluloze, lignīns, kļavu lapas, kviešu salmi

SUMMARY

Effect of lignocellulose additives (wheat straw, maple leaves) on extracellular laccase activity and mycelium yield was evaluated. Highest laccase activity (545.74 ± 135.92 U/mL) and mycelium yield (422.92 ± 31.52 mg/100 mL) was obtained in malt extract on rotatory shaker (140 rpm) cultures with wheat straw additive (0.50%) which did not contain hemicellulose and cellulose. The following observations were made during the cultivation period: 1) laccase activity gradually rises independently of additives; 2) pH of the medium decreases. Ground maple leaves facilitated an increase in mycelium density and radial growth regardless of medium. Seaweed showed to be medium enriching additive on solid malt extract medium. The influence of temperature on laccase activity and mycelium yield was observed.

Master's thesis was developed in University of Latvia, Faculty of Biology, Department of Microbiology and Biotechnology in lead of Dr. biol., asoc. prof. Nataļja Matjuškova and Dr. h. biol., prof. Indriķis Muižnieks.

Keywords: *Lentinula edodes*, mycelium, laccase, lignocellulose, lignin, maple leaves, wheat straw

SATURS

KOPSAVILKUMS	2
SUMMARY	3
SATURS	4
IEVADS	6
1 LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1 Lignoceluloze.....	7
1.1.1 Lignocelulozes atlikumi.....	7
1.2 Koksni degradējošās sēnes.....	10
1.2.1 Baltās trupes sēnes	10
1.2.1.1 Ligninolītiskā sistēma.....	12
1.2.1.1.1 Lakāzes.....	12
1.3 Micēlijsēņu kultivēšana	14
1.3.1 <i>L. edodes</i>	15
1.3.1.1 <i>L. edodes</i> kultivēšana.....	16
2 MATERIĀLI UN METODES.....	18
2.1 Vielas un reaģenti, trauki, piederumi, iekārtas	18
2.2 Metodes.....	23
2.2.1 Micēlija kultivēšana uz agarizētām barotnēm.....	23
2.2.1.1 Diametra noteikšana	23
2.2.1.2 Lakāzes kvalitatīva noteikšana	23
2.2.2 Micēlija kultivēšana šķidrājās barotnēs	23
2.2.2.1 Barotņu filtrēšana un liofilizēšana.....	24
2.2.2.2 Lakāzes aktivitātes noteikšana.....	24
2.2.2.3 Lakāzes daudzuma noteikšana.....	24

2.2.3	Proteīnu analīze SDS-PAGE.....	25
2.2.4	Reaģentu pagatavošana.....	25
2.2.5	Datu apstrādes un analīzes metodes.....	26
3	REZULTĀTI	27
3.1	Micēlija kultivēšana agarizētās barotnēs	27
3.2	Micēlija kultivēšana šķidrās barotnēs	30
3.2.1	Lakāzes aktivitāte.....	30
3.2.2	Micēlija biomasa.....	34
4	DISKUSIJA	36
4.1	Micēlija kultivēšana agarizētās barotnēs	36
4.2	Micēlija kultivēšana šķidrās barotnēs	39
4.3	Turpmākie pētījumi.....	42
4.4	Kopsavilkums	42
	SECINĀJUMI.....	43
	PATEICĪBAS	44
	LITERATŪRAS SARAKSTS.....	45
	PIELIKUMI	53

IEVADS

Lignocelulozes atlikumi ir diez gan plaši izplatīti. Pēc to izcelsmes, tos iespējams iedalīt antropogēnos atlikumos (piemēram, kokapstrādes, lauksaimniecības pārpalikumi) un naturogēnos atlikumos (piemēram, nokritušās koku lapas).

Tikai daļa šo atlikumu tiek utilizēta vai sadedzināta. Piemēram, viens no kviešu salmu atlikuma izmantošanas veidiem ir celulozes un hemicelulozes izdalīšana bioetanolā un furfuroļa iegūšanai (Carrier et al. 2012). Lai arī šāda kviešu salmu izmantošana ir sava veida atkritumu pārstrādes veids, tā tik un tā nav bezatlikuma pārstrāde, jo utilizācijas paliekās atrodams grūti degradējams organisks polimērs – lignīns.

Lignīna degradāciju dabā galvenokārt veic baltās trupes sēnes, tādejā tās var izmantot lignīna biodegradēšanā arī biotehnoloģijā. *Lentinula edodes* ir baltās trupes sēne, kas ir spējīga noārdīt koksni un selektīvi degradēt lignīnu (Kuijk et al. 2016).

L. edodes (Berk.) Pegler, plašāk pazīstama kā šitakē sēne, ir baltās trupes sēne, kas lielākoties tiek kultivēta kā ēdama un medicīniska sēne. No tās micēlija iespējams izdalīt polisaharīdus ar imunomodulējošām īpašībām (He et al. 2012) un tā kultivēšanas laikā iegūt ligninolītiskus enzīmus (Elisashvili et al. 2015) biotehnoloģijai.

L. edodes izmantošana lignīna atlikumu biodegradēšanā ir veids kādā iegūt ne tikai sēņu masu, no kuras potenciāli izdalīt bioaktīvas vielas, bet iegūt arī tās producētos lignīnu degradējošos enzīmus, vienlaicīgi samazinot lignīna atlikumu.

Darba mērķis: Aprakstīt *L. edodes* DSM3565 micēlija augšanu uz lignocelulozes substrātiem.

Darba uzdevumi:

1. Salīdzināt *L. edodes* micēlija diametrālo augšanu agarizētās barotnēs ar un bez lignīnu saturošas piedevas.
2. Salīdzināt lignīnu saturošu substrātu un to koncentrāciju ietekmi uz *L. edodes* micēlija biomasas pieaugumu un ligninolītisko enzīmu aktivitāti šķidrās barotnēs.
3. Salīdzināt kultivēšanas režīma ietekmi uz *L. edodes* micēlija biomasas pieaugumu un ligninolītisko enzīmu aktivitāti šķidrās barotnēs.

1 LITERATŪRAS APSKATS

1.1 Lignoceluloze

Lignocelulozi veido augu šūnu sienu sastāvā esošās hemiceluloze un celuloze ciešā saistībā ar lignīnu. Šajā kompleksā lignīns nodrošina šūnu sienām papildu mehānisko izturību, ksilēmas šūnu ūdens necauraidību un aizsargbarjeru pret mikroorganismiem (Argyropoulos and Menachem 1997 cit. pēc. G. Ward et al. 2003).

Lignīns ir komplekss organiskais polimērs, kura struktūras pamatelementi ir fenilpropāna atvasinājumi. Augu valsts lignīnu var iedalīt trīs klasēs: kailsēkļu, segsēkļu un graudaugu. Tie savstarpēji atšķiras pēc fenilpropāna veidiem jeb monolignoliem. Ir trīs monolignolu veidi: koniferils, sinapils, *p*-kumarils. *Guaiacyl* lignīnu veido koniferil alkohola vienības, tas pārsvarā sastopams kailsēkļu koksne. *Guaiacyl-syringyl* lignīns satur koniferil un sinapil spirta monomērus un ir sastopams segsēkļu koksne. Graudaugu koksnes lignīna sastāvā ir pārsvarā *p*-kumarila spirta vienības. Lignīns ir heterogēns, amorfs, optiski neaktīvs, stipri zarots, ar vismaz 12 dažādām arilētera un oglekļa-oglekļa saitēm. Šāda struktūra ir grūti degradējama. Lielākā daļa bioloģisku makromolekulu ir lineāri polimēri, piemēram, celuloze, kuras vienības ir sasaistītas ar bieži atkārtotām saitēm, uz kurām arī ir vērsts degradācijas mehānisms šādiem savienojumiem. Lignīna polimēra sarežģītība padara to noturīgu pret enzimatisku hidrolīzi. Tā degradācijai ir jābūt oksidatīvai, nespecifiskai, nehidrolītiskai un ekstracelulārai (Kuitunen et al. 2011; Mansouri and Salvado 2006; Hatakka 1994; Higuchi 1990; Kirk and Farrell 1987). Lignīna degradācijai ir liela nozīme oglekļa apritē, jo lielākā daļa atjaunojamo oglekļa resursu ir lignīna vai celulozes un hemicelulozes veidā, bet, ņemot vērā lignīna biodegradācijas sarežģītību, arī celulozes un hemicelulozes bioloģiskā pieejamība ir zema (Arora 2003). Lignīna molekulārā struktūra nav precīzi definējama, tā sastāvs un struktūra ir atkarīga no auga sugas, augšanas apstākļiem un izdalīšanas procesa (Mansouri and Salvado 2006). Tikai daži organismi ir spējīgi degradēt lignīnu, visefektīvāk tā degradāciju veic sēnes: brūnās trupes, baltās trupes un mīkstās trupes sēnes (Goltapeh et al. 2013; Arora 2003).

1.1.1 Lignocelulozes atlikumi

Lignocelulozes atlikumus dabā var iedalīt divos veidos, atkarībā no to izcelsmes – antropogēnos un naturogēnos. Antropogēnie atlikumi ir pārpalikumi no lauksaimniecības,

kokapstrādes un citas apstrādājošās industrijas. Pie naturogēniem atkritumiem pieskaitāmi tādi sezonālie lignocelulozi saturošie atlikumi kā nokritušās koku lapas un jūras izskalošanās brūnaļģes.

Kļavu lapas ir organisks sezonāls atlikums, kurš lielākoties tiek uzskatīts par izvedamu atkritumu vai komposta sastāvdaļu. To sastāvā ir tādi makroelementi kā ogleklis, slāpeklis, fosfors, kālijs, kalcijs, magnijs, sērs un mikroelementi kā mangāns, cinks, nātrijs, dzelzs, hlors (Wilkaniec et al. 2012, Modrzewska et al. 2016). Kļavu lapu sastāvā ir arī celuloze, hemiceluloze, lignīns (Nunes et al. 2016, Jacob et al. 2010) un ūdenī šķīstoši fenola savienojumi (Nicolai 1988, Kuiters and Sarink 1986). To bagātīgais sastāvs ļauj izmantot tās kā barotni bagātinošu piedevu baltās trupes sēņu, piemēram, *Pleurotus ostreatus* (Maria-Florence and Balasundaran 2000) un *L. edodes* (Okmane et al. 2017), kultivēšanā.

Baltijas jūras krastos pavasaros un rudenos tiek izskalotas lielākoties brūnaļģes (*Fucus vesiculosus*) un sārtaļģes (*Furcellaria lumbricalis*). Tās tiek uzskatītas par sezonālo atkritumu. Izskaloto aļģu aizvākšana no piekrastēm ir vēlama, jo pūstošu aļģu uzkrāšanās bojā pludmales – smiltīs uzkrājušos organisko vielu dēļ tās aizaug ar augstākajiem augiem. Aļģes satur slāpekli, tāpēc var būt noderīgas kā mēslojums lauksaimniecībā. Tās satur arī celulozi (Black 1950) un dažas arī lignīnu (Martone et al. 2009), kas padara tās par potenciālu piedevu lignocelulozi vai celulozi degradējošu organismu kultivēšanā. Jūrmalas krastos bieži sastopamo brūnaļģu *F. vesiculosus* sastāvā lielākoties ir ogļhidrāti 45% – 70% un minerālvielas 15% – 30%, sastopami arī proteīni 5% – 8% un lipīdi 1% – 4%. To sastāvā esošās organiskās vielas ir algīnskābe, fukoidāni (sulfatēti polisaharīdi), mannitols, celuloze. Tajās atrodamas arī daudzas minerālvielas (K, Na, Ca, N, S, P, Mg) un mikroelementi (I, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni).

Kviešu salmi ir viens no bagātīgākajiem un lētākajiem labības atlikumiem Eiropā. Tā ķīmiskais sastāvs (0.5% slāpeklis, 29%–42% α -celuloze, 26%–32% hemiceluloze, 16%–23% lignīns, 1130–8230 ppm Ca, 3–6 ppm Cu, 21–175 ppm Fe, 9–128 ppm Mn, and 7–25 ppm Zn) padara to izmantojamu lopbarības, pārtikas, papīra un bioetanola iegūšanā (Salvachúa 2011).

Kviešu salmu ķīmiskā un fizikālā degradācija ir dārgs un neefektīvs process, tādēļ biomasas delignifikācijā pēdējā laikā tiek izstrādātas alternatīvas metodes, kurās izmanto baltās trupes sēnes. Hatakka (1983) veiktajos pētījumos *Pleurotus ostreatus* 35 dienu inkubācijas periodā konvertēja 35% kviešu salmu cukuros. Knežević et al. (2013) veiktajos eksperimentos *Ganoderma lucidum* un *Trametes versicolor* spēja degradēt 42% salmu 35 dienu inkubācijā. Lignocelulozes atkritumu priekšapstrāde ar baltās trupes sēņu ligninolītiskiem enzīmiem ne tikai mazinātu lignīna

pārpalikumu atlikumos (delignifētu tos), bet arī palielinātu kopējo celulozes iznākumu lignocelulozes hidrolīzē (Fang 2013; Siqueira et al. 2012).

Ik gadu tikai celulozes un papīra industrija vien producē aptuveni 50-60 metriskās tonnas lignīna. ASV Enerģijas Departamenta (U.S. *Department of Energy*) 2005. gada ziņojumā aprēķināts, ka 225 miljoni tonnu lignīna (ENG: *biorefinery lignin*) varētu tikt saražotas, iegūstot biodegvielu no 750 miljoniem tonnu lignocelulozi saturošu izejvielu (Perlack and Wright 2005). Tomēr komerciāli izmanto tikai divus procentus lignīna, atlikušo daļu visbiežāk sadedzina kā kurināmo celulozes un papīra rūpnīcās. Kilograms lignīna kā kurināmais ir sešas reizes lētāks nekā tad, ja to pielieto kā ķīmisku izejvielu (Macfarlane et al. 2009). Šobrīd pieejamie lignīna produkti galvenokārt ir zemas-vērtības lignosulfāti (~ viens miljons tonnu) un *kraft* lignīni (100 000 tonnu). Varētu teikt, ka lignīnu tirgus ir nonācis stagnācijā, tā apgrozība ir USD 300 miljoni gadā ar ļoti nelielām fluktuācijām (United Nations 2012).

Jaunas metodes lignīna šķelšanai un izmantošanai ir nepieciešamas, lai iegūtu augstākas pievienotas vērtības produktus un lignīns netiktu izmantots par kurināmo vien. Ņemot vērā tā grūti degradējamo struktūru, ir divi alternatīvi veidi, lai sašķeltu šo polimēru – bioloģisks un ķīmisks. Bioloģiskās degradācijas priekšrocība ir spējā kontrolēt procesu, izmantojot izvēlētus lignolītiskus mikroorganismus un enzīmus, tādā veidā izvairoties no nevēlamu blakusproduktu izveidošanās. Dabā efektīvu un selektīvu lignīna biodegradāciju galvenokārt veic baltās trupes sēnes. Biokatalītiskie procesi rada mazāku vides piesārņojumu nekā lignīna ķīmiska degradācija.

1.2 Koksni degradējošās sēnes

Dabā saprotrofās sēnes ir nedzīvu augu un dzīvnieku atlieku degradētāji, tādā veidā nodrošinot elementu aprites ciklus. Micēlijsēnes pārsvarā dominē koksnes un kritalu degradācijā, bet atšķirīgās dzīvotnēs dominējoši var būt citi organismi – tropiskās ekosistēmās tie ir termīti, bet mitrā vidē tās ir baktērijas (Rayner and Boddy 1988 cit pēc Arora 2003).

Micēlijsēnes ir nekustīgas, substrātu kolonizē hifu apikālās augšanas rezultātā. Baktērijām ir daudzveidīgākas savienojumu degradācijas sistēmas nekā sēnēm, tomēr sēņu micēlijs spēj invadēt un degradēt cietu substrātu. Micēlijs spēj absorbēt barības vielas tiešā kontaktā ar virsmu un penetrēt substrātu, radot mehānisku spiedienu uz to un producējot ekstracelulārus koksni degradējošus enzīmus. Micēlijs ir spējīgs nelielā mērā pārvietot hifas uz barības vielām bagātākiem rajoniem (Arora. 2003). Dabā koksnes un lignīna degradāciju galvenokārt veic micēlijsēnes, kuras pieskaitāmas pie brūnās, baltās vai mīkstās trupes sēnēm.

Brūnās trupes sēnes pārsvarā ir bazīdijsēnes (*Basidiomycota*), tās degradē šūnu sienu ogļhidrātus un modificē lignīnu, demetilējot to. Brūnās trupes sēnes aug galvenokārt šūnas lumenā, blakus sekundārajai sieniņai un izraisa vispārīgu, izkaisītu puvi. Šīs sēnes galvenokārt kolonizē skujkokus (Zabel and Morrell 1992; Eriksson et al. 1990).

Mīkstās trupes sēnes taksonomiski klasificē askusēnēs (*Ascomycota*) un nepilnīgi pazīstamās jeb anamorfās sēnēs (*Deuteromycota*). Tās ir aktīvas pie paaugstināta mitruma, kas ir nepiemērots baltās vai brūnās trupes sēnēm. Tās ir relatīvi nespecializētas celulolītiskas ģinšu *Chaetomium*, *Ceratocystis*, *Philadophora* u.c. sēnes, kas degradē celulozi un hemicelulozi un modificē lignīnu. Tās penetrē šūnu sekundāro sienu, radot cilindriskus caurumus, kuros var izaugt hifas. Puve sastopama tikai tajās auga vietās, kurām ir tiešs kontakts ar micēliju (Blanchette 1995; Zabel and Morrell 1992).

1.2.1 Baltās trupes sēnes

Baltās trupes sēnes ir taksonomiski heterogēna augstāko sēņu grupa, kurām raksturīga spēja depolimerizēt un mineralizēt lignīnu ar to producēto ekstracelulāro ligninolītisko enzīmu palīdzību. Lignīna degradācija tiek intensīvi pētīta galvenokārt saistībā ar papīra ražošanu, augsnes attīrīšanu un biodegvielas iegūšanu no lignocelulozes (Siqueira et al. 2012; Valentin et al. 2009; Winqvist et al. 2009; Messner and Srebotnik 1994). Lignīna degradācijas molekulārā bioloģija un enzīmolģija pārsvarā pētīta izmantojot baltās trupes sēni *Phanerochaete chrysosporium* (Sen et al. 2012; Kirk and Tien 1984), tomēr ligninolītiskie enzīmi tiek izdalīti arī no citām baltās trupes

sēnēm, to skaitā *Lentinus* ģints sugām, piemēram, *L. polychrous* (Phetsom et al. 2009 cit. pēc Fernández-Fernández 2013; Morozova et al. 2007; Messner and Srebotnik 1994).

Baltās trupes sēnes ir vienīgie zināmie organismi, kas pilnībā spēj degradēt lignīnu līdz ogļskābajai gāzei (CO₂) un ūdenim (H₂O). Tomēr tiek uzskatīts, ka lignīns nevar tikt degradēts kā vienīgais oglekļa un enerģijas avots. Lignīna degradācija ļauj sēnēm piekļūt celulozei un hemicelulozei, kas kalpo kā oglekļa un enerģijas galvenais avots (Leisola et al. 2012). Lielākā daļa baltās trupes sēņu specifiski degradē segsēkļu koksni, mazāka daļa spēj degradēt gan segsēkļus, gan kailsēkļus (*Pleurotus stipticus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma applanatum*, *Gloeoporus adustus*, *Grifola sulphurea*), bet atsevišķas sugas ekskluzīvi degradē tikai kailsēkļus (*Leptoporus borealis*, *Phellinus pini*, *Stereum sanguinolentum*) (Rypáček 1977).

Pēc delignifikācijas veida izšķir sugas, kuras selektīvi degradē lignīnu un sugas, kuras lignīnu degradē neselektīvi. Selektīvi degradējošās sugas sašķeļ koksnes lignīnu, atstājot koksne baltus, atsegtas celulozes fragmentus. Neselektīvi degradējošās sugas vienlaicīgi degradē gan lignīnu, gan celulozi. Ir sugas, kuras spēj izmantot abus delignifikācijas veidus (Blanchette 1995).

Baltās trupes sēnes kolonizē šūnas lumenu un izraisa šūnas sienu eroziju. Degradācija parasti ir lokalizēta šūnās, kuras skar hifas. Erozijs progresē, kad vienlaicīgi tiek degradēts gan lignīns, gan celulozes, tā rezultātā koksne rodas dobumi pildīti ar micēliju. Lignīna degradāciju pētīt ar elektronmikroskopu ir atklāts, ka lignīns tiek degradēts ekstracelulāri (Blanchette 2000 cit. pēc Arora 2003; Blanchette et al. 1987 cit. pēc Arora 2003).

Lignīna kompleksā uzbūve apgrūtina ligninolīzes pētīšanu, bet līdz ar jaunu lignīna struktūru atklāšanu (Morreel et al. 2010) izskan viedokļi par lignīna randomizētību un tā specifiskas struktūras neesamību (Leisola et al. 2012).

Līdz šim izmantotie dimēru modeļi, kuros atspoguļotas principiālās lignīna struktūras, ir bijuši noderīgi baltās trupes sēņu ligninolītiskās sistēmas raksturošanā. Tomēr šiem savienojumiem ir mazāks molekulārais svars nekā dabiskajam lignīnam un tie ir intracelulāri vieglāk metabolizējami. Ņemot vērā, ka dabiskais lignīns nav tik viegli metabolizējams, ir grūti pateikt, cik precīza ir eksperimentos novērotā ligninolītiskā aktivitāte. Ideālā gadījumā lignīna modeļiem jābūt makromolekulāriem, bet ar vienkāršāku struktūru nekā dabiskajam lignīna polimēram (Leisola et al. 2012; Kawai et al. 1995 cit. pēc Arora 2003).

1.2.1.1 Ligninolitiskā sistēma

Sēnes degradē lignīnu, izdalot enzīmus, kurus dēvē par lignināzēm. Tās var tikt iedalītas fenola oksidāzēs (lakāzes) un hēma peroksidāzēs (lignīna peroksidāzes, mangāna peroksidāzes, citas nespecifiskas peroksidāzes). Lakāzes izmanto skābekli par elektronu akceptoru, bet peroksidāzes izmanto ūdeņraža peroksīdu (H_2O_2) par ko-substrātu (ENG: *co-substrate*). Baltās trupes sēnes sekretē vienu vai vairākus no lignīnu modificējošiem enzīmiem.

Lignīna peroksidāzes (LiP) ir hēmu saturoši glikoproteīni, kuri katalizē nefenolisku lignīna savienojumu (piem., diarilpropāns) un daudzu fenola savienojumu (piem., gvajakols) H_2O_2 -atkarīgu oksidatīvu depolimerizāciju. LiP oksidē substrātu vairāku soļu elektronu pārnēsē veidojot brīvos radikāļus, piemēram, fenoksi radikāļus un veratril alkohola radikāļu katjonus. LiP ir augsts redoks potenciāls, tāpēc tai nav nepieciešams mediators, lai oksidētu nefenoliskus aromātiskus savienojumus (Wong 2009; Wang et al. 2008).

Mangāna peroksidāzes (MnP) ir ekstracelulāri glikoproteīni, kuri tiek sekretēti vairākās izoformās. Tās satur vienu hēma molekulu (dzelzs protoporfīrīns IX). Mangāna peroksidāze katalizē no ūdeņraža peroksidāzes atkarīgu Mn(II) oksidāciju par Mn(III), kurš pēc oksidācijas tiek atbrīvots no enzīma virsmas kopā ar oksalātu vai citiem helatoriem. Helatēts Mn(III) komplekss kalpo kā reaktīvs zema molekulārā svara red-oks mediators uz fenoliskiem substrātiem (Wong 2009; Wesenberg et al. 2003; Asgher et al. 2008).

Nespecifiskās peroksidāzes ir glikoproteīni ar hibrīda īpašībām – tās ir spējīgas oksidēt arī citu bazīdijsēņu peroksidāžu substrātus. Tās spēj oksidēt MnP substrātu un LiP substrātu, attiecīgi Mn(II) un veratrilspirtu. Nespecifiskās peroksidāzes oksidē arī fenolus un citus aromātiskos savienojumus (Wesenberg et al. 2003; Asgher et al. 2008; Ruiz-Duenas et al. 2009).

1.2.1.1.1 Lakāzes

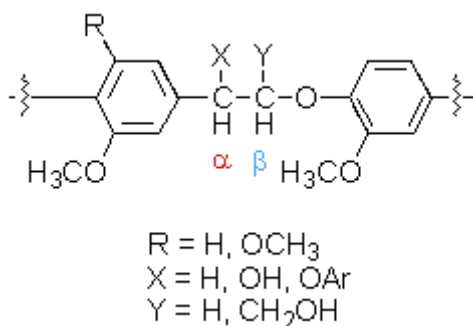
Lakāzes (benzēndiolu skābekļa oksidoreduktāzes, EC 1.10.3.2) ir varu saturoši glikoproteīnu monomēri vai polimēri, kas atrodami augstākajos augos, sēnēs un mikroorganismos.

Lielākā daļa sēņu producēto lakāžu ir monomēri, dimēri vai tetramēri. Monomērisko lakāžu molekulmasa parasti ir 60 – 110kDa ar glikozilēšanas pakāpi no 10% līdz 50% (Christopher et al. 2014).

Lielākā daļa baltās trupes sēņu producē vairāk par vienu lakāzes izozīmu, kuri variē pēc glikozilācijas pakāpes, aminoskābju sekvences, molekulmasas, izoelektriskā punkta (pI) un substrāta specifiskuma (Mansur et al. 2003).

Tās spēj oksidēt fenolus un citus substrātus, vienlaikus reducējot skābekli par ūdeni caur radikāļu-katalizētu reakcijas mehānismu. Lakāzes ir iesaistītas gan lignīna biosintēzē, gan tā degradācijā. Tām ir loma pigmenta veidošanā sēņu sporās, sēņu virulences faktoros un dzelzs metabolismā augos.

Lielākā daļa lakāžu aktīvajā centrā satur četrus vara jonus, kuri nodrošina elektrona pārneši no fenola savienojumiem un reducē skābekli par ūdeni. Šie vara joni tiek iedalīti trīs grupās pēc to magnētiskajām un spektroskopiskajām īpašībām (Messerschmidt and Huber 1990). Visi četri vara joni lakāzes dabiskajā formā ir pilnībā oksidēti (Cu^{2+}), kas ir iemesls tam, kāpēc lakāze spēj dekarboksilēt, demetilēt un demetoksilēt fenolskābes un metoksifenolskābes (d'Acunzo et al. 2002), kas savukārt ir nozīmīgs solis lignīna degradācijas uzsākšanā. Kad substrātu oksidē lakāze, tas zaudē vienu elektronu un visbiežāk izveido brīvu radikāli, kurš var tikt pakļauts tālākai oksidācijai vai neenzimātiskām reakcijām, piemēram, hidrācijai un polimerizācijai (Shraddha et al. 2011).



1. attēls. Lignīna struktūra (Hustad et al. 1996).

Lignīna degradācija ar fenoksi radikāļiem noved pie alfa-oglekļa saites šķelšanas vai saites šķelšanas, kas ir starp alfa un beta oglekļa atomu (1. att.). Šādā oksidācijā veidojas brīvais radikālis, kam centrā ir skābeklis, kuru var pārveidot par kvinonu otrā enzīmu katalizētā reakcijā. Kvinonu un brīvos radikāļus var polimerizēt (Thurston 1994).

Lakāzes katalizētās reakcijās var arī pievienot mediatorus nefenolu savienojumiem. Mediatori ir zemas molekulmasas organiski savienojumi, kurus spēj oksidēt lakāze. Aktīvie katjona radikāļi oksidē nefenola savienojumus, ko lakāze viena nespētu oksidēt (Brijwani et al. 2010). Visbiežāk izmantotie sintētiskie mediatori ir 1-hidroksibenzotriazols (HOBT), N-hidroksiftalimids (NHPI), 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolīna-6-sulfonāts, ABTS) un 3 hidroksiantranilskābe. ABTS klātbūtnē lakāze skābekli izmanto straujāk nekā HOBT klātbūtnē

(Shraddha et al. 2011). ABTS ir atzīts par labāko substrātu lakāzes aktivitātes noteikšanai (Ward et al. 2013).

1.3 Micēlijsēņu kultivēšana

Micēlijsēņu audzēšanas šķidrās barotnēs mērķis ir ne tikai biomasas iegūšana (Hatakka and Pirhonen 1985), bet arī daudzu ekonomiski un sociāli nozīmīgu metabolītu, piemēram, antibiotiku penicilīna un cefalosporīna, kā arī citronskābes producēšana (Gadd 1999 cit. pēc Gibbs et al. 2000; Elander and Lowe 1992 cit. pēc Gibbs et al. 2000).

Hifu morfoloģiju veido gan lineāri fragmenti, gan kompleksas, sīki zarotas struktūras. Atkarībā no kultivēšanas apstākļiem micēlija agregātu virsmas struktūra, blīvums un lielums var variēt vienas sugas ietvaros (Metz and Kossen, 1977 cit. pēc Gibbs et al. 2000; Cox et al. 1998 cit. pēc Gibbs et al. 2000).

Audzējot micēliju viskozās, neviendabīgās barotnēs, var veidoties barības vielu gradients, kurā var veidoties skābekļa (O_2) nepietiekamības apstākļi. Aerobi audzējot sēnes, liela nozīme ir skābekļa piekļūšanai hifu šūnām. Vienmērīgu skābekļa izkliedi barotnē panāk veicot barotņu aerāciju. Gibbs et al. (2000) apskata rakstā norādīts, ka skābekļa trūkums, audzējot aerobas sēnes, var samazināt vai pilnībā inhibēt to metabolītu produkciju. Tā, piemēram, samazinot skābekļa parciālo spiedienu (pO_2) zem 30%, penicilīna produkcija strauji krītas, tā tiek inhibēta zem 10% skābekļa piesātinājuma. Līdzīgi ir arī ar cefalosporīna sintēzi *Cephalosporium acremonium* un *Aspergillus niger* veikto citronskābes produkciju, kur ir nepieciešams attiecīgi vismaz 20% un 30% skābekļa piesātinājums barotnē. Jāatzīmē, ka ir metabolīti, kuru produkcijai vēlams zems pO_2 līmenis, piemēram, *P. chrysosporium*, *S. glaucanicum*, *S. commune*, *A. pullulans* un *A. persicinum* producētie eksopolisaharīdi.

Ja pH tiek kontrolēts ar skābes/sārma ievadīšanu, reaģenta pievienošana barotnēs jāveic nelielās devās un jānodrošina samaisīšanās, nehomogēna vide un barības vielu trūkums palielina stresa līmeni šūnām un var izraisīt celma deģenerāciju un/vai mutācijas (Humphrey, A. 1998.).

Objektīvai hifu morfoloģijas raksturošanai nepieciešami precīzi hifu garumu un zarojumu biežuma mērījumi. Micēlija agregātu (ENG: *clumps*) mērīšanai šķidrās barotnēs pārsvarā tiek izmantota šo micēliju fotouzņēmumu analīze. Tiek analizēts divdimensionāls attēls, kurā redzams trīsdimensionālais agregāts. Tiek mērīti perimetri un rādiusi, novērota forma, virsmas struktūra un blīvums (Cox et al., 1998; Tucker et al., 1992).

Micēlija morfoloģiju ietekmē micēlija agregātu savstarpējā mijiedarbība. Agregātu morfoloģija ietekmē arī barotnes reoloģiju (barotnes fizikālās īpašības), tā padara to viskozāku, tādējādi apgrūtinot barības vielu piekļuvi šūnām (Metz et al. 1979). Lodveida agregātu izveidošanās (pelletizācija, ENG: *pelletization*) process pagaidām nav detalizēti raksturots, bet viens no šo agregātu izveides iemesliem ir hifu mazāko agregātu aglomerācija. Pelletizāciju ietekmējošie faktori bieži ir celma specifiski, tomēr ir ievērota kultivēšanas apstākļu ietekme (Gibbs et al. 2000).

Dažu sēņu audzēšana lodveida agregātos samazina to producēto metabolītu daudzumu. Tas, iespējams, ir radušās barības vielu gradienta ietekmē: lai arī barotne tiek labi aerēta un ir barības vielām bagāta, šūnām lodveida agregātu iekšpusē būs traucēts transports. Bieži vien, blīvu lodveida agregātu centrs ir tukšs, jo notikusi hifu autolīze. Pētījumi ar *P. chrysogenum* rādīja, ka blīvi micēliju agregāti ar diametru mazāku par 400µm, sastāvēja tikai no metaboliski aktīvām šūnām (Schügerl et al. 1983).

1.3.1 *L. edodes*

Lentinula edodes (Berk.) Pegler plašāk pazīstama kā šitakē sēne (Shiitake), zeltītā ozolu sēne (Golden Oak Mushroom), melnā meža sēne (Black Forest Mushroom), melnā sēne (Black mushroom), Ķīnas sēne (Chinese mushroom) ir ēdama baltās trupes sēne, kas pieder bazīdijsēņu nodalījumam Basidiomycota, himēnijsēņu klasei Hymenomycetes, pūkaiņu rindai Triholomatales un pūkaiņu dzimtai Tricholomataceae (Pegler 1975).

L. edodes dabā sastopama Austrumāzijā, Dienvidaustrumāzijā, tās augšanai nepieciešams silts, mitrs klimats (Matjuškova un Raipulis 1999). To galvenokārt kultivē kā ēdamu sēni, bet tās imunitāti stimulējošo īpašību dēļ to pielieto arī tradicionālajā ķīniešu medicīnā (Kang 2013).

Šitakē kā visām himēnijsēnēm attīstības ciklā uz augļķermeņa himenoforiem veidojas himēnijs. Jaunām *L. edodes* sēnēm to zem cepurītes sedz plīvurs, kurš plīst, kad bazīdijsporas ir nobriedušas (Bisen et al 2010; Matjuškova un Raipulis 1999). *L. edodes* sporas (bazīdijsporas) ir haploidālas vienkodola sporas, kuru veidojošais orgāns ir bazīdija. Bazīdijas veidojas, palielinoties hifu galu šūnām.

Nobriedušas šitakē sēnes sporas to plānā apvalka dēļ iet bojā saules gaismā. Ja spora nokļuvusi uz atbilstoša substrāta, tā dīgst, veido hifas. Hifu masa palielinās un veido pirmējo micēliju. Šitakē sēnes augļķermeņa izveidei nepieciešama divu pretēju dzimumtipu sporu veidotu

hifu saplūšana jeb otrējā micēlija rašanās. Pirmējais micēlijs ir haploidāls (monokarions), tādēļ pats auglķermenis to nespēj veidot (Bisen et al. 2010; Matjuškova un Raipulis 1999).

L. edodes savā dzīves ciklā visilgāk atrodas otrējā micēlija formā, ieaugot koksne, lai uzņemtu un uzkrātu barības vielas auglķermeņa izveidei.

Auglķermenis veidojas tad, kad uzkrāts pietiekami daudz barības vielu. Auglķermeņa attīstība aizsākas ar mazu mezglu (primordiju) izveidi uz micēlija virsmas. Labos augšanas apstākļos no primordijiem izveidojas auglķermeņi (Przybylowiez and Donoghue 1990).

Šitakē sēnes satur B grupas vitamīnus (niacīns, riboflavīns, tiamīns, B-6, folāts), holīnu, vitamīnu D2, vitamīnu C, taukskābes (piesātinātās, mononepiesātinātās, polinepiesātinātās), minerālus (daudz kālija, fosfora, magnija) un neaizvietojamās aminoskābes (U.S. Department of Agriculture 2014, Aminuddin et al. 2013). Tās polisaharīdiem piemīt imunitāti modulējošas īpašības (He et al. 2012). Aktīvākais no šitakē sēnēm izdalītais polisaharīds ar imunostimulējošu iedarbību ir lentināns (Taguchi et al. 1985). Lentinānus un citus polisaharīdus ar lielu molekulāro svaru iegūst no micēlija ar karsta ūdens (90°C – 95°C) ekstrakciju (Miles and Chang 1997). Ekstraktus iegūst no svaigiem vai žāvētiem auglķermeņiem (Sasidharan et al. 2010), izmantojot karsta (HWE, ENG: *hot water extraction*) vai auksta ūdens metodi (CWE, *cold water extraction*). Metodes CWE modifikācija ir PWE (*pressure water extraction*), kas ietver polisaharīdu izdalīšanu pie 2.5-25.3 MPa ūdens spiediena (Lo et al. 2007). Sausa micēlija ekstraktiem tiek piedēvētas arī hepatoprotektīvas īpašības (Sasidharan et al. 2010). *L. edodes* micēlijs tiek kultivēts arī kā cinka avots uztura bagātinātājos (Turlo et al. 2007).

Baltās trupes sēnes ir spējīgas noārdīt lignocelulozes sastāvā esošo lignīnu, tādēļ to kultivēšanai ir nozīme arī biotehnoloģijā, lauksaimniecības atkritumu apstrādē un organiskā piesārņojuma pārstrādē, piemēram, aromātisko ogļūdeņražu degradācijā (Gąsecka et al. 2012; Petre et al. 2012). Lignīna noārdīšanai *L. edodes* izmanto divas lignināzes – mangāna peroksīdāzi un lakāzi (Forester et al. 1990 cit pēc Ward et al. 2003).

1.3.1.1 *L. edodes* kultivēšana

Sēnes kultivēšanai tradicionāli kā substrāts tiek izmantoti koka baļķi, bet mūsdienās biotehnoloģijā par substrātu izmanto arī koksnes pārstrādē radušos atkritumproduktus, piemēram, skaidas, skaidu un kliju maisījumus, un šķidru barotni (Raaska 1993).

Audzējot sēnes šķidrā barotnē, iespējams papildus iegūt to izdalītās bioloģiski aktīvās vielas, piemēram, polisaharīdus un lignocelulozi noārdošus enzīmus (Raaska 1993).

Ir zināmi mēģinājumi palielināt augļķermeņu masu, apstrādājot micēliju ar 50 – 100 kV stipru strāvu, kas rezultējās ar vairāk kā divas reizes lielāku masas iznākumu (Takaki et al. 2014).

Sēnēm atkarībā no sugas un kultivēšanas apstākļiem ir potenciāls producēt lielus daudzumus proteīnu. Sēnes labi pacieš zemu pH, mazu ūdens aktivitāti un augstu osmotisko spiedienu barotnē. Lai arī pH ietekme uz micēlija augšanu ir atkarīga no izmantotā organisma, optimāli apstākļi ir pie pH 4 – 7. Sēņu iegūšanai vispopulārākā metode ir kultivēšana uz cietām barotnēm, uz kurām augļķermeņu izveidei nepieciešami vairāki mēneši (Philippoussis et al. 2011).

Bioaktīvu vielu izdalīšanai sēnes parasti audzē šķidrās barotnēs kolbās ar vates-marles aizbāžņiem, temperatūrā no +20°C līdz +25°C gan kratītājā, gan bez papildu aerācijas. *L. edodes* micēlija diski tiek inokulēti dažāda sastāva barotnēs, visbiežāk tā ir kartupeļu-glikozes buljons (*potato dextrose broth*) vai iesala ekstrakta barotnes (Aminuddin et al. 2013).

Ir novērota šūnu metaboliskās aktivitātes samazināšanās un augšanas inhibīcija pie zema pH. Augsta pH ietekmē novērots zems biomasas iznākums, kas pēc Aminuddin et al. 2013 domām varētu būt saistīts ar augsta pH izraisītām kļūmēm šūnu metaboliskajā regulācijā un šūnu nāvi.

Baltās trupes sēņu lakāžu producēšana pieder pie sekundārā metabolisma, tā notiek stacionārās augšanas fāzes otrajā pusē un bieži ir saistīta ar slāpekļa trūkumu barotnē (Leatham and Kirk 1982). Tomēr *L. edodes* ir izņēmums, kas producē lakāzi arī pie augstām slāpekļa koncentrācijām (Buswell et al. 1995, Leatham and Kirk 1982). Aminuddin et al. veiktajos eksperimentos 2007. un 2013. gadā vērojama +25°C temperatūras veicinošā ietekme uz neaizvietojamo aminoskābju produkciju dažādās barotnēs.

2 MATERIĀLI UN METODEDES

2.1 Vielas un reaģenti, trauki, piederumi, iekārtas

L. edodes DSM 3565

Darbā izmantotais celms saņemts no Vācu Mikroorganismu un šūnu kultūru kolekcijas (DSMZ) un tiek glabāts LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā (Dr. biol., asoc. prof. N. Matjuškova).

Eksperimentos izmantotas iesala ekstrakta (ME, MEB, ½ MEB) un sintētiskās (S) barotnes.

1. Tabula
Barotnes, vielas un reaģenti
Table 1
Mediums, solutions and reagents

Barotnes, vielas, reaģenti	
Malt extract	LAB M, Lielbritānija
Malt extract broth	Biolife, Itālija
KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O MgSO ₄ *7H ₂ O NH ₄ NO ₃	Dažādi ražotāji, Attīrīšanas pakāpe ≥ 99%
Bacteriological agar HS	Conda Pronadisa, Spānija
Lignin, kraft	Sigma-Aldrich Chemistry, ASV
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) jeb ABTS (C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₆ S ₄)	Sigma-Aldrich, Kanāda
Dejonizēts ūdens	(Ultra pure, MiliPore)
Laccase, <i>Trametes versicolor</i>	Sigma-Aldrich, Kanāda
0.1M Na-acetāta buferis, pH 5.0: Nātrijs acetāts Ledus etiķskābe 10 N NaOH	Ražotājs: Sigma-Aldrich Chemistry, ASV.

Iesala ekstrakta barotnes	
<i>Malt extract broth</i> (MEB)	Malt Extract Broth 20 g izšķīdina 0.5 L destilēta ūdens, uzpilda ar destilētu ūdeni līdz 1L atzīmei. Ražotāja noteiktais pH 4.7±0.2. Autoklāvē 20 minūtes, 1 atm (121°C).
<u>Barotņu modifikācijas:</u>	
<i>Agarizēta MEB</i>	Malt Extract Broth 20 g un bacteriological agar 20 g izšķīdina 0.5 L destilēta ūdens, uzpilda ar ūdeni līdz 1L atzīmei. Ražotāja noteiktais pH 4.7±0.2. Autoklāvē 20 minūtes, 1 atm (121°C).
$\frac{1}{2}$ MEB:	Malt Extract Broth 10 g izšķīdina 0.5 L destilēta ūdens, uzpilda ar destilētu ūdeni līdz 1L atzīmei. Ražotāja noteiktais pH 4.7±0.2. Autoklāvē 20 minūtes, 1 atm (121°C).
$\frac{1}{2}$ MEB ar lignīnu saturošu piedevu. Lignīnu saturošo piedevu nepieciešamajā daudzumā (skat. 1. tabula) ieber kolbās, pievieno 75 mL šķidras $\frac{1}{2}$ MEB barotnes. Kolbas aizver ar vates-marles aizbāzni. Barotnes autoklāvē 20 minūtes, 1 atm (121°C).	Barotnes nosaukums, veids : Piedevas nosaukums, daudzums (g/100mL) $\frac{1}{2}$ MEB+l _c , šķidra : l _c , 0.25; 0.50; 1.33; 2.50 $\frac{1}{2}$ MEB+LC, šķidra : LC, 0.25; 0.50; 1.33; 2.50 $\frac{1}{2}$ MEB+KL, šķidra : KL, 0.05; 0.25; 0.50; 2.50
<i>Agarizēta $\frac{1}{2}$ MEB:</i>	Malt Extract Broth 10 g un bacteriological agar 20 g izšķīdina 0.5 L destilēta ūdens, uzpilda ar destilētu ūdeni līdz 1L atzīmei. Ražotāja noteiktais pH 4.7±0.2. Autoklāvē 20 minūtes, 1 atm (121°C). Atdzesētu barotni izlej petrī platēs (20 mL).
<i>Agarizēta $\frac{1}{2}$ MEB ar piedevu.</i> Divreiz skalotu, sausu lignocelulozes materiālu nosver, sadala pa stobriņiem (50mL) daudzumos, kas paredzēti vienai petrī	Barotnes nosaukums, veids : Piedevas nosaukums, daudzums (g/100mL) $\frac{1}{2}$ MEB+l _c , agarizēta : l _c , 2.50 $\frac{1}{2}$ MEB+LC, agarizēta: LC, 2.50

platei. Autoklāvē 40 minūtes, 1 atm (121°C). Stobriņā ar sterilo lignocelulozi, ielej atdzesētu ½ MEB barotni līdz 20 mL atzīmei. Sterili samaisa, izlej.	½ MEB+acer, agarizēta: kļavu lapas, 2.50 ½ MEB+fucus, agarizēta : brūnaļģes, 2.50
Agarizēta Malt Extract barotne (ME)	Malt extract 30 g un bacteriological agar 20 g izšķīdina 0.5L destilēta ūdens , uzpilda ar destilētu ūdeni līdz 1 L atzīmei. Autoklāvē 20 minūtes, 1 atm (121°C).
Sintētiskās barotnes	
Sintētiskā barotne (S)	KH ₂ PO ₄ 0.8 g, K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O 0.2g, MgSO ₄ *7H ₂ O 0.5g, NH ₄ NO ₃ 2.0g un bacteriological agar 20 g izšķīdinā 0.5L destilēta ūdens, uzpilda ar destilētu ūdeni līdz 1 L atzīmei. Autoklāvē 20 minūtes, 1 atm (121°C).
<u>Barotnes modifikācijas</u>	
S ar piedevu. Divreiz skalotu, sausu lignocelulozes materiālu nosver, sadala pa stobriņiem (50mL) daudzumos, kas paredzēti vienai petrī platei. Autoklāvē 40 minūtes, 1 atm (121°C). Stobriņā ar sterilo lignocelulozi, ielej atdzesētu S barotni līdz 20 mL atzīmei. Sterili samaisa, veikli izlej.	Barotnes nosaukums, veids : Piedevas nosaukums, daudzums (g/100mL) S+lc, agarizēta: lc, 0.25; 0.50; 2.50 S+LC, agarizēta: LC, 0.25; 0.50; 2.50 S+KL, agarizēta: KL, 0.25; 0.50; 2.50 S+acer, agarizēta: kļavu lapas, 2.50 S+fucus, agarizēta: brūnaļģes, 2.50

Barotņu piedevas

Darbā izmantotās barotņu piedevas:

- Dažādi apstrādāti kviešu salmi, kas saņemti no LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūta (M.Sc. Linda Rozenfelde): LC – hemicelulozi nesaturoši salmi; lc– hemicelulozi un celulozi nesaturoši salmi.
- *Acer platanoides* nokritušās lapas. Ievāktas Rīgā, Latvijā. Pirms lietošanas divas reizes skalotas krāna ūdenī, žāvētas 48h +43°C, samaltas līdz daļiņu izmēram ≤2mm.

- *Fucus vesiculosus* aļģes. Ievāktas Jūrmalā, Latvijā. Pirms lietošanas divas reizes skalotas krāna ūdenī, žāvētas 48h +43°C, samaltas līdz daļiņu izmēram ≤2mm.

SDS-PAGE

2. tabula

Vielas un reaģenti SDS – Poliakrilamīda Gēla Elektroforēzei

Table 2

Solutions used in SDS-PAGE

▪ A buferis	▪ 5 % koncentrējošais gēls (4 mL)
- 25.0 mM trisCl pH 8.0	- dH ₂ O
- 50.0 mM NaCl	- 30.0 % Akrilamīda maisījums
- 1.0 mM EDTA	- 1.0 M Tris (pH 6.8)
▪ Tris-Glicīna buferis	- 0.1% SDS
- 27.5 mM Tris	- 10.0 % APS
- 213.0 mM glicīns	- TEMED
- 0.1 % SDS	▪ 10 % sadalošais gēls (15 mL)
▪ 2x lizējošais maisījums	- dH ₂ O
- dH ₂ O	- 30.0 % Akrilamīda maisījums
- 1.0 M Tris-Cl pH 6.8	- 1.5 M Tris pH 8.8
- 10.0 % SDS	- 0.1% SDS
- Glicerols	- 10.0 % APS
- 2-merkaptoetanolis	- TEMED
- bromfenolzilā krāsa	
▪ dH₂O (Ultra pure)	▪ Sudrabkrāsa (Pierce® Silver Stain Kit)
▪ 10% etanols	▪ 10% etiķskābe
▪ 30% etanols	▪ 5% etiķskābe

NaCl no ražotāja Biolife, atlikušo reaģentu ražotājs – Carl ROTH, Vācija

- 96% Etanols (C₂H₆O)
- 6.0 M HCl
- N,N'-methylbisacrylamide, Carl ROTH

3. tabula

Trauki, piederumi un iekārtas

Table 3

Glassware, metalware, plasticware, and laboratory appliances

Trauki	Piederumi	Iekārtas
Cimdi, Nitril, MaiMed	Autoklāvējamas gumijas	Autoklāvs
Kivetes 1.5mL, Sarstedt, Vācija	Automātiskās pipetes (1-5mL; 20-200 µL; 100-1000 µL; 10- 100 µL; 1-10 µL)	BIO-RAD Mini-PROTEAN tetra cell
Kolbas, 150 mL	Cilindrs, d=0.8cm	BIO-RAD POWER-PAC 300
Mērcilindri, 250 mL, 1000 mL	Filtrpapīrs, FILTRAK, 89, medium wide pores, Vācija	Centrifūgas: 5417R Eppendorf, 5810R Eppendorf,
Petrī plates, d=8.0cm, Starstedt, Vācija	Mikrobioloģiskā adata	Magnētiskais maisītājs IKA- COMBIMAG REO, Janke&Kunkel, IKA-Works, Vācija
Plastmasas stobriņi, 15mL, 50mL, Sarstedt	Milimetru papīrs	
Stikla plates, d=9.0cm, Sarstedt	Pergamenta papīrs	Velkmes skapis
	Pipešu uzgaļi (1-5mL; 100- 1000 µL; 10-100 µL; 1-10 µL)	Kratītājs, Mk x incubator shaker, Lh Fermentation un kratītājs Heraeus
Piltuves	siets	Laminārās plūsmas bokss, Telstar, Bio- II-A/M
Vārglāzes	Skalpelis	Liofilizators, Alpha 1-4 LD plus, CHrist
	Spirta lampiņa	pH metrs, AD1410, Adrona
	Stikla nūjiņas	Spektrofotometrs
	Vates-marles aizbāžņi	Svari, BOECO, Vācija, d=0.001g
	Seroloģiskās pipetes (1-5mL), Sarstedt	UV bokss, UVT-S DNA/RNA UV- cleaner, Biosan
	Pipetēšanas palīgs	Ūdens vanna, Grant Instruments Ltd

2.2 Metodes

Eksperimentiem izdalīti vairāk nekā 378 micēlija diski. Micēlija fragmenti ņemti no agarizētām barotnēm ar augošu *L.edodes* 3565 micēliju vecumā no 10 līdz 13 dienām.

Micēlijs sterili izdalīts UV boksā, aptuveni 10 cm attālumā no degošas spirta lampiņas, ar sterilu metāla cilindru caurdurot barotni un ar sterilu skalpeli rūpīgi izņemot izveidojušos micēlija-barotnes diskus (turpmāk “micēlija disks”).

2.2.1 Micēlija kultivēšana uz agarizētām barotnēm

Veikti 5 eksperimenti +22°C. Katrs eksperimenta ilgums bija 14 dienas.

Izdalot micēlija diskus, nepieļauj skalpeļa mehānisku iedarbību uz micēliju, lai nodrošinātu vienmērīgu micēlija radiālo pieaugumu. Micēlija disku sterili novieto barotnes centrā. Micēlija hifas aug radiāli, tāpēc pavairojot to uz jaunām barotnēm, visas cilindra caurdures vietas veic vienādā attālumā no micēlija centra un barotnes malām.

2.2.1.1 Diametra noteikšana

Micēliju diametru mērīšanu veic izmantojot milimetru papīru, nenoņemot petrī plates vāciņu un skatienu vēršot perpendikulāri pret micēlija centru.

Veiktajiem mērījumiem aprēķina vidējo aritmētisko un standartnovirzi (SD).

2.2.1.2 Lakāzes kvalitatīva noteikšana

Lakāzes kvalitatīvu noteikšanu (ENG: *screening*) veic agarizētās barotnēs, uz kurām 14 dienas kultivēts micēlijs (modifikācija metodei Srinivasan et al. 1995). Barotnei noņem micēliju un zonā, kurā micēlijs bija sasniedzis maksimālo diametru, ar cilindra palīdzību veic caurduri. Agarizētās barotnes disku ievieto mikroplatē un tam uznes 10µL ABTS (11 mg/mL). Rezultātus nolasa pēc 5 min., 10 min., 15. min inkubācijas.

2.2.2 Micēlija kultivēšana šķidrajās barotnēs

Veikti 7 eksperimenti 23.1°C - 26.5°C, kuru ilgums 28 dienas, kultivēšanas režīmi: stacionāri un uz kratītāja pie 140 rpm.

Barotnēs (75 mL) sterili ievieto divus *L. edodes* micēlija diskus, kuri sterili ar cilindra un skalpeļa palīdzību izdalīti no micēliju saturošas barotnes.

Micēlija hifas aug radiāli, tāpēc pavairojot to uz jaunām barotnēm, visas cilindra caurdures vietas veic vienādā attālumā no micēlija centra un barotnes malām.

Eksperimenta dienās 0, 7, 14, 21 un 28 barotnēm nosaka pH un noņem paraugus turpmākai analīzei – lakāzes aktivitātes noteikšanai un gēla elektroforēzei. Paraugus, kuri paredzēti SDS-PAGE, sasaldē, liofilizē un uzglabā -21°C.

Pēc inkubācijas izbeigšanas, kolbu saturu sterili filtrē, atdalot micēliju no filtrāta.

2.2.2.1 Barotņu filtrēšana un liofilizēšana

Kolbas saturu divas reizes sterili filtrē stobriņā caur filtrpapīru, kurš ievietots sterilā piltuvē. Filtrātus uzglabā +4°C, noslēgtos sterilos stobriņos. Micēlija biomasu žāvē 48h +43°C.

Liofilizēšanai paredzētos paraugus (1 mL) uzglabā 15 mL stobriņos -21°C, novietotus slīpi, šaurā leņķī. Paraugus liofilizē 24h. Liofilizētos paraugus uzglabā -21°C, slēgtos stobriņos.

2.2.2.2 Lakāzes aktivitātes noteikšana

Lakāzes aktivitātes noteikšanu veic spektrofotometriski ($\lambda=420\text{nm}$) ar ABTS (11 mg/mL). Paraugus centrifugē 5 min. 10 000 rpm. Reakcijas tilpumā (1 mL) 200 μL paraugs, 720 μL Na acetāta buferis (pH=5.0), 80 μL ABTS. Mērījumus veic katru minūti, kopā desmit minūtes.

Viena aktivitātes vienība (U/mL) definēta kā lakāzes daudzums, kurš 1 minūtē oksidē 1 μmol ABTS. Aktivitātes aprēķinam izmanto sekojošo formulu, kura atvasināta¹ no Beer-Lambert likuma par absorbcijas un koncentrācijas lineāru atkarību ($A = \varepsilon * l * c$):

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta A \times V_{kiv.} \times 10^3}{\varepsilon \times t \times V_{par.}}$$

ΔA absorbcijas izmaiņa

$V_{kiv.}$ reakcijas maisījuma tilpums kivetē (mL)

10^3 $\mu\text{mol mL}$

ε ekstinkcijas koef. ABTS pie 420nm = 36 (uz mL)

t reakcijas laiks (min)

$V_{par.}$ parauga tilpums (mL)

l gaismas ceļa garums (jeb kivetes platums, 1 cm)

¹Formulas izvedums no Institute of biochemistry, Charles Univeristy, Prague, Czech Republic.

2.2.2.3 Lakāzes daudzuma noteikšana

Lakāzes daudzuma noteikšanai izveidota standartlīkne (Pielikums 5) ar *T. versicolor* lakāzi koncentrācijā 0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL, 1.00 mg/mL, 2.00 mg/mL. Aprēķins veikts pēc formulas $y = 1.4663x - 0.1297$, kur y ir absorbcija (A) pēc 5 minūšu inkubācijas un x ir nosakāmais lakāzes daudzums miligramos.

2.2.3 Proteīnu analīze SDS-PAGE

Metode pēc Laemmli 1970.

Liofilizētu paraugu 10x koncentrē A buferī. Pievieno 50 µL 2x lizējošā maisījuma. Karsē 100°C 10-15 min. Paraugu uzglabā -20°C.

Gēla uznešanu veic pēc BIORAD Mini-Protean Tetra Cell instrukcijas. Gēla kasetē pirmo uznes sadalošo gēlu, pēc tam koncentrējošo gēlu. Ievieto iedobes veidojošo ķemmīti. Gēlam ļauj polimerizēties vismaz 30 minūtes. Tvertni līdz norādītajai atzīmei aizpilda ar Trīs-Glicīna buferi.

Pirmajā parauga iedobē ienes 7 µL marķiera (5 kDa – 250 kDa, Fermentas Life Science), atlikušajās gēla iedobēs – 10 µL parauga. Proteīnu elektroforētisku sadalīšanu veic 10% poliakrilamīda gēlos, 5 min. pie 80V, 1h pie 150V gēla elektroforēzes iekārtā BIO-RAD Mini-PROTEAN tetra cell.

Gēla atmazgāšanu un krāsošanu veic saskaņā ar *Thermo Scientific Pierce Silver Stain Kit* instrukciju:

1. Gēlu mazgā 2 x 5 min dejonizētā ūdenī.
2. Gēlu fiksē 2 x 15 min 30% etanola:10% etiķskābes šķīdumā.
3. Gēlu mazgā 2 x 5 min 10% etanolā, pēc tam 2 x 5 min dejonizētā ūdenī.
4. Pagatavo *Sensitizer Working Solution* (50 µL *Sensitizer* un 25 mL ūdens)
5. Gēlu sensitizē (ENG: *sensitize*) 1 min, pēc tam mazgā 2 x 1 min ar ūdeni.
6. Pagatavo *Stain Working Solution* (0.5 mL *Enhancer* un 25 mL krāsviela)
7. Gēlu krāso 30 min.
8. Pagatavo *Developer Working Solution* (0.5 mL *Enhancer* un 25 mL *Developer*).
9. Gēlu mazgā 2 x 20 sekundes ar ultrafiltru ūdeni, pēc tam 2 – 3 min tur *Developer Working Solution* līdz redzamas proteīnu zonas.
10. Procedūru pārtrauc ar 10 min inkubāciju 5% etiķskābē.

2.2.4 Reāģentu pagatavošana

ABTS tiek izšķīdināts dejonizētā ūdenī koncentrācijā 11 mg/mL.

Na acetāta buferis pH 5.0 – 141 mL 0.1M Na acetāta (trihidrāts 13.6g/L, Sigma-Aldrich) pievieno 59 mL 0.1M etiķskābes.

Akrilamīda maisījums 30% - 30 g akrilamīda un 0.8 g bisakrilamīda izšķīdina 50 mL dejonizēta ūdens, uzpilda ar ūdeni līdz 60 mL atzīmei. Silda 10 min. 60°C. Uzglabā +4°C.

2.2.5 Datu apstrādes un analīzes metodes

Skaitlisko datu apstrādē izmantots *Microsoft Excel 2013* un *RStudio* versija 0.99.902, teksta apstrādē – *Microsoft Word 2013*.

Kā statistiskās analīzes programma tika izmantots *R studio*. Atšķirību statistiskā būtiskuma noteikšanai, paraugkopas tika salīdzinātas izmantojot parametriskās metodes, kas paredzētas neatkarīgu paraugkopu salīdzināšanai: vidējo aritmētisko salīdzināšanai veikts *ANOVA tests*, valodā *R* funkcija *aov.out()*, normālsadalījuma novērtēšanai veikts *Shapiro-Wilk tests*, valodā *R* funkcija *shapiro.test()*.

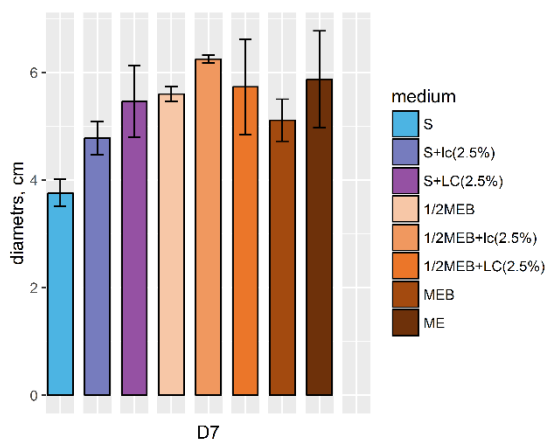
3 REZULTĀTI

3.1 Micēlija kultivēšana agarizētās barotnēs

Mērķis: Novērot lignīnu saturošu piedevu ietekmi uz *L. edodes* 3565 micēlija augšanu agarizētās barotnēs.

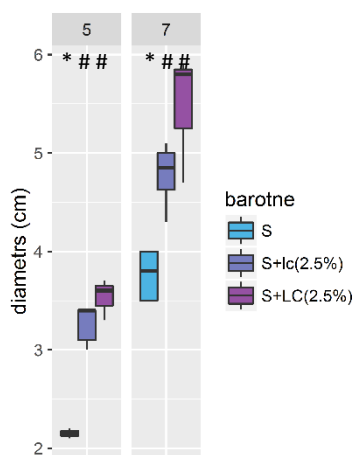
Uzdevums: Salīdzināt *L. edodes* micēlija diametrālo augšanu agarizētās barotnēs ar un bez lignīnu saturošas piedevas.

Lai noskaidrotu lignīnu saturošo piedevu ietekmi uz micēlija diametrālo augšanu un izvēlētos atbilstošu barotni tālākai tā kultivācijai šķidrā vidē, tika salīdzināta micēlija diametrālā augšana agarizētās sintētiskās un iesala ekstrakta barotnēs.



2. attēls. Micēliju diametrs 7. dienā uz sintētiskas (S) un iesala ekstrakta saturošas (ME, MEB) barotnes. “LC”, “lc” – kviešu salmu lignīna piedeva.

Figure 2. Mycelia diameter on solid synthetic (S) and malt extract (ME, MEB) media. “LC”, “lc” – wheat straw additive.



3. attēls. *L. edodes* 3565 micēlija diametrs (5., 7. diena) barotnēs ar kviešu lignīna piedevu (lc, LC). * p-value < 0.04; # p-value ≥ 0.05. Figure 1. *L. edodes* 3565 mycelial diameter (day 5, 7) on synthetic media (S) with wheat straw additives (lc, LC). * p-value < 0.04; # p-value ≥ 0.05.

Micēlija diametrālais pieaugums 7. dienā iesala ekstrakta (1/2 MEB) bezpiedevu barotnēs bija par 48.94±3.76% lielāks nekā bezpiedevu sintētiskajās (S) barotnēs (2. attēls).

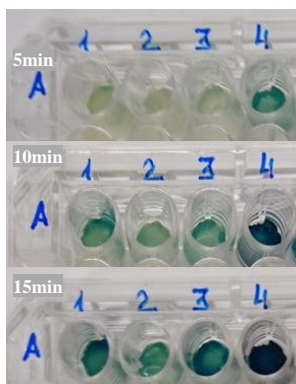
Hemicelulozi nesaturošas kviešu salmu salmu piedevas (LC, C%=2.5) pievienošana sintētiskajā barotnē 7. dienā bija veicinājusi micēlija diametrālo pieaugumu par 45.39±17.71% (3. attēls). Hemicelulozi un celulozi nesaturošas kviešu salmu salmu piedevas (lc, C%=2.5) pievienošana sintētiskajā barotnē veicināja micēlija pieaugumu par 27.22±8.14%. Iesala ekstrakta barotnēs pieaugums 7. dienā bija attiecīgi 2.38±15.80% un 11.61±1.26%. Sintētiskajās barotnēs ar lc

piedevu koncentrācijā 0.50% novērots vislielākais diametrs. Barotnēs ar LC lielākie diametri novēroti ar piedevu koncentrācijā 2.50%.

Atšķirības micēliju diametros starp sintētiskajām barotnēm ar un bez piedevām bija statistiski būtiskas ($p < 0.04$). Savstarpējās atšķirības micēliju diametros sintētiskajās barotnēs ar LC un LC piedevām nebija statistiski būtiskas ($p \geq 0.05$) (3. attēls).

Lai novērotu kļavu lapu un brūnaļģu piedevu ietekmi uz micēliju diametrālo augšanu, tās izžāvētā un samaltā veidā pievienotas sintētiskajās (S) un iesala ekstrakta (MEB) barotnēs koncentrācijā 2.50% (w/v). Kļavu lapu piedeva veicināja micēlija diametrālo augšanu gan iesala ekstrakta (10. diena $11.84 \pm 1.32\%$), gan minerālajās barotnēs (10. diena $21.21 \pm 4.55\%$). Aļģu piedeva veicināja micēlija diametra pieaugumu iesala ekstrakta barotnēs (10. diena $7.89 \pm 2.63\%$). Desmitajā dienā sintētiskajās barotnēs ar aļģu piedevu micēliju diametrs bija par $6.07 \pm 2.27\%$ mazāks nekā attiecīgajā bezpiedevu barotnē (Pielikums 1).

Lai novērtētu ligninolītisko enzīmu (lignināžu) sekrēciju dažādās barotnēs, tika veikts lakāzes aktivitātes kvalitatīvs salīdzinājums bezpiedevu iesala ekstrakta un sintētiskajās barotnēs. Pēc 5 minūšu inkubācijas mikroplatēs, sintētiskajās barotnēs novērots tumši zaļš krāsojums.



4. attēls. Lakāzes aktivitātes *screening* agarizētās barotnēs. Apzīmējumi: 1 – ME; 2 – MEB; 3 – ½ MEB; 4 – S.

Figure 4. Screening of laccase activity in solid media. Notes: 1 - 1 – ME; 2 – MEB; 3 – ½ MEB; 4 – S.

Līdzvērtīgi zaļš krāsojums iesala ekstrakta barotnēs tika iegūts pēc 10 minūšu ilgas inkubācijas. Arī pēc 15 minūšu inkubācijas lielākā lakāzes aktivitāte novērota sintētiskajā barotnē (4. attēls). Lakāzes aktivitāte lignīna piedevu saturošajās barotnēs bija ievērojami lielāka nekā bezpiedevu barotnēs (Okmane, bakalaura darbs. 2015)

Kvalitatīvi salīdzinot micēliju biomasu (blīvumu) ar lakāzes aktivitāti var secināt, ka sintētiskajās barotnēs novērota lielākā lakāzes aktivitāte un mazākā biomasa, savukārt iesala ekstrakta barotnēs novērota lielākā micēlija biomasa (5. attēls) un zemākā lakāzes aktivitāte, Savstarpēji salīdzinot iesala ekstrakta barotnes, lielākā lakāzes aktivitāte novērota 1/2 MEB barotnēs, savukārt micēlija biomasas blīvums ME, MEB un 1/2 MEB nebija būtiski atšķirīgs.



5. attēls. Micēliju (D7) blīvums uz sintētiskajām un iesala ekstraktu saturošām barotnēm: S , 1/2MEB, S+LC, 1/2MEB+LC (no kreisās uz labo).

Figure 5. Density of *L. edodes* 3565 mycelia on synthetic or malt extract media, day 7. Corresponding media (from left to right): S , 1/2MEB, S+LC, 1/2MEB+LC

3.2 Micēlija kultivēšana šķidrās barotnēs

Mērķis: Novērtēt lignīnu saturošu piedevu ietekmi uz *L. edodes* 3565 micēlija augšanu šķidrās barotnēs.

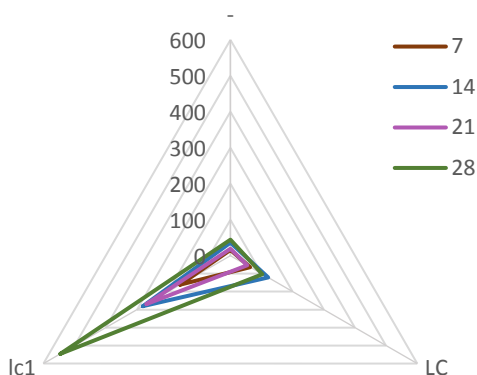
Uzdevumi:

- ❖ Salīdzināt lignīnu saturošu substrātu un to koncentrāciju ietekmi uz *L. edodes* micēlija biomasas pieaugumu un ligninolītisko enzīmu aktivitāti šķidrās barotnēs.
- ❖ Salīdzināt kultivēšanas režīma ietekmi uz *L. edodes* micēlija biomasas pieaugumu un ligninolītisko enzīmu aktivitāti šķidrās barotnēs.

Kultivēšanai šķidrā vidē izvēlētas iesala ekstrakta barotnes ($\frac{1}{2}$ MEB) ar dažādi apstrādātu kviešu salmu un *kraft lignin* piedevu.

3.2.1 Lakāzes aktivitāte

Lai novērtētu lignīnu saturošu substrātu ietekmi uz lakāzes produkciju, barotnēm pievienotas lignīnu saturošas piedevas koncentrācijās: 0.05%; 0.25%; 0.50%; 1.33%; 2.50%. Tās pakļautas diviem inkubācijas režīmiem: statisks (0rpm), dinamisks (140 rpm) uz rotācijas kratītāja.

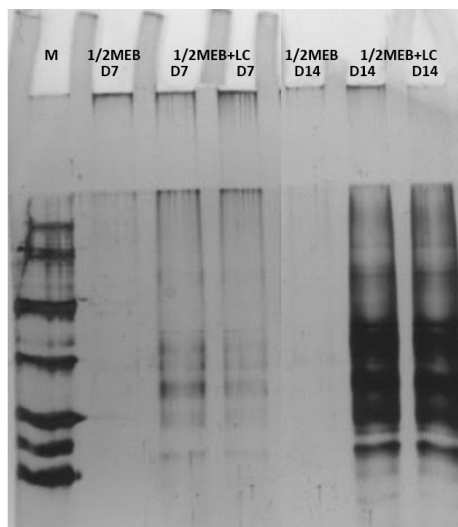


6. attēls. Lakāzes aktivitāte (U/mL) šķidrās barotnēs dažādās inkubācijas dienās: 7., 14., 21., 28. diena.

“LC” hemicelulozi nesaturoši kviešu salmi; “lc” hemicelulozi un celulozi nesaturoši kviešu salmi; “-” bezpiedevu barotne.

Figure 6. Laccase activity (U/mL) in submerged media on various days of incubation: 7, 14, 21, 28.

“LC” wheat-straw additive without hemicellulose; “lc” wheat straw additive without hemicellulose and cellulose; “-” medium with no additives.



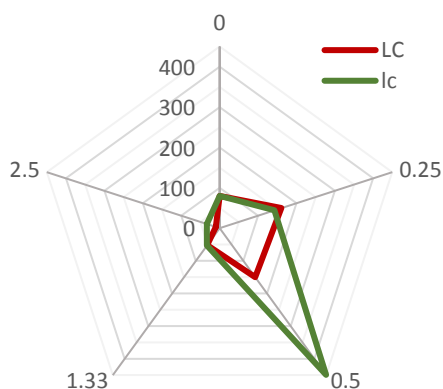
7. attēls. Ekstracelulāro proteīnu kvalitatīvs salīdzinājums dažādās inkubācijas dienās, SDS-PAGE (10%). M – marķieris; D7 – 7. Inkubācijas diena; “LC” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva.

Figure 7. Extracellular protein profile on various days of incubation, SDS-PAGE (10%). M – marker; D7 – day 7; “LC” wheat-straw additive without hemicellulose.

Inkubācijas laikā, neatkarīgi no piedevas un inkubācijas režīma (Pielikums 2), lakāzes aktivitāte un barotnēs sekretēto proteīnu daudzums pakāpeniski pieaug – zemākā lakāzes aktivitāte vērojama 7. dienā, augstākā – 28. dienā (6. attēls).

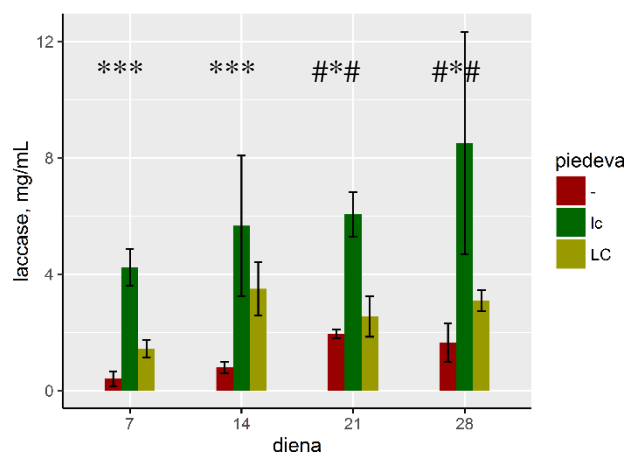
Barotnēs ar lignīnu saturošām piedevām novērots lielāks ekstracelulāro proteīnu daudzums nekā bezpiedevu barotnēs (7. attēls). Veicot SDS-PAGE, uznesti identiski parauga tilpumi (10 µL) tomēr 7. attēlā redzams, ka ½ MEB+LC gadījumā šis tilpums satur intensīvi krāsojošos proteīna daudzumu, bet bezpiedevu barotnēs – nē. Tas norāda, ka barotņu filtrātos bez piedevām ekstracelulāro proteīnu koncentrācija ir ievērojami zemāka nekā barotnēs ar piedevām.

Salīdzinot piedevu ietekmi aerētājās (140 rpm) barotnēs, lakāzes aktivitāte bija lielākā pie piedevu koncentrācijas 0.50% (8. attēls). Divdesmit astotajā dienā barotnēs LC 0.25% un LC 0.50% lakāzes aktivitātes ir līdzīgas (LC(0.25%) par 11.94±31.28% lielāks), bet lc 0.50% barotnēs ievērojami (par 212.07±134.24%) augstāka aktivitāte nekā lc 0.25%.



8. attēls. *L. edodes* 3565 lakāzes aktivitāte (U/mL) barotnēs ar kviešu salmu lignocelulozes piedevu dažādās koncentrācijās, 28. diena. “LC” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva; “lc” hemicelulozi un celulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva.

Figure 8. *L. edodes* 3565 laccase activity (U/mL) in submerged media with various wheat-straw lignin concentrations, day 28. “LC” wheat-straw additive without hemicellulose; “lc” wheat straw additive without hemicellulose and cellulose.



9. attēls. *L. edodes* 3565 lakāzes daudzums (mg/mL) barotnēs ar kviešu salmu lignocelulozes piedevu 0.50%. “LC” hemicelulozi nesaturoši kviešu salmi; “lc” hemicelulozi un celulozi nesaturoši kviešu salmi.

Figure 9. *L. edodes* 3565 laccase (mg/mL) in submerged media with wheat-straw lignin 0.50%. “LC” wheat-straw additive without hemicellulose; “lc” wheat straw additive without hemicellulose and cellulose.

Palielinot piedevas koncentrāciju līdz 0.50%, vērojams lakāzes aktivitātes pieaugums, bet pie augstākām (1.33%, 2.50%) koncentrācijām – samazināšanās (Pielikums 3): kultūrās ar 1.33% LC lakāzes aktivitātes samazinājums par 62.80%; 1.33% lc samazinājums par 85.96%; 2.50% LC samazinājums par 92.96% un 2.50% lc samazinājums par 92.46%, salīdzinot ar attiecīgo piedevu koncentrācijā 0.50%.

½ MEB barotnē bez piedevām $23.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (140 rpm) vidējā lakāzes aktivitāte 28. dienā bija 44.44 ± 23.12 U/mL, barotnēs ar LC(0.50%) piedevu – 102.64 ± 25.73 U/mL, ar lc (0.50%) piedevu – 545.74 ± 135.92 U/mL (4. tabula). Lakāzes daudzums barotnēs ar un bez piedevām bija proporcionāls lakāzes aktivitātei – 28. dienā lielākais lakāzes daudzums 8.50 ± 3.82 mg/mL novērots barotnēs ar lc(0.50%), mazākais – bezpiedevu barotnēs (1.65 ± 0.66 mg/mL) (9. attēls).

4. tabula

L. edodes 3565 lakāzes aktivitāte (U/mL) šķidrās barotnēs (½ MEB) ar kviešu lignīna piedevu

C%= 0.50, 140 rpm

Table 4

L. edodes 3565 laccase activity (U/mL), submerged media (½ MEB) with wheat lignin additive

C%=0.50, 140 rpm

C%	piedeva	diena	rpm	U/mL	
0	-	7	140	10.18	± 8.69
0	-	28	140	44.44	± 23.12
0.50	LC	7	140	64.77	± 6.52
0.50	LC	28	140	102.64	± 25.73
0.50	lc	7	140	164.20	± 9.17
0.50	lc	28	140	545.74	± 135.92

Piezīmes: “ – “ bezpiedevu barotne; “LC” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva; “lc” hemicelulozi un celulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva. Rezultāti izteikti kā vidējais aritmētiskais \pm SD.

Notes: “ – “ media with no additive; “LC” wheat straw additive not containing hemicellulose; “lc” wheat straw additive not containing hemicellulose and cellulose. Data expressed as medium \pm SD.

Savstarpēji salīdzinot piedevu ietekmi statistiski inkubētajās (0 rpm) barotnēs, LC piedevai koncentrācijā 0.25% un 0.50% nebija būtiska ietekme uz lakāzes aktivitāti – 28. dienā attiecīgi 100.00 U/mL un 129.17±86.03 U/mL. Barotnēs ar piedevu lc 0.25% iegūta lakāzes aktivitāte 88.89 U/mL. Barotnēs ar piedevu lc 0.50% iegūta lakāzes aktivitāte 72.22±11.79 U/mL. Bezpiedevu barotnēs 28. dienā iegūtā lakāzes aktivitāte bija līdzīga lakāzes aktivitātei barotnēs ar piedevām – 88.89 U/mL.

Kulturās ar piedevām pie 140 rpm kultivācijas režīma novērota lakāzes aktivitāte ir lielāka nekā stacionāri kultivētās barotnēs. Bezpiedevu barotnēs būtiska atšķirība starp kultivācijas režīmiem netika novērota (5. tabula).

5. tabula

L. edodes 3565 lakāzes aktivitāte (U/mL) šķidrās barotnēs (½ MEB) ar kviešu salmu lignīna 0.50% piedevu 28. inkubācijas dienā, 140 rpm un 0 rpm

Table 5

L. edodes 3565 laccase activity (U/mL), submerged media (½ MEB) with wheat-straw lignin 0.50% additive on incubation day 28, 140 rpm un 0 rpm

Piedeva	C%	diena	rpm	U/mL	
-	0	28	0	88.89	±NA
-	0	28	140	60.11	±54.14
LC	0.50	28	0	129.17	±86.03
LC	0.50	28	140	141.88	±50.40
lc	0.50	28	0	72.22	±11.79
lc	0.50	28	140	449.01	±193.15

Piezīmes: “ – “ bezpiedevu barotne; “LC” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva; “lc” hemicelulozi un celulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva. Rezultāti izteikti kā vidējais aritmētiskais±SD.

Notes: “ – “ media with no additive; “LC” wheat straw additive not containing hemicellulose; “lc” wheat straw additive not containing hemicellulose and cellulose. Data expressed as medium±SD

3.2.2 Micēlija biomasa

Lai novērtētu lignīnu saturošu substrātu ietekmi uz micēlija biomasas pieaugumu, barotnēm pievienotas lignīnu saturošas piedevas koncentrācijās no 0.05% līdz 2.50%. Barotnes inkubētas stacionāri (0 rpm) un uz kratītāja pie 140 rpm.

Vislielākais biomasas iznākums iegūts barotnēs ar piedevām koncentrācijā 0.50%. Inkubācija pie 140 rpm veicināja biomasas pieaugumu vairāk nekā statistiska kultivācija (6. tabula). Bezpiedevu barotnēs pie 140 rpm iegūtā micēlija biomasa bija 105.82 ± 20.63 mg/100 mL, barotnēs ar KL 0.50% - 229.33 ± 22.32 mg/100mL, LC 0.50% - 335.40 ± 4.59 mg/100 mL, lc 0.50% - 422.92 ± 31.52 mg/100 mL.

Inkubācijas laikā barotnēs bez piedevām un ar kviešu salmu piedevu pH pakāpeni samazinājās no 6.0-5.0 līdz 3.5-3.0 (Pielikums 4). Kraft lignin barotnēs pH izmaiņa bija atkarīga no kultivēšanas režīma un piedevas koncentrācijas – 140 rpm C% \leq 0.50 sākotnējais pH 7.0-6.0, beigu pH 4.0-3.0, C%=2.5 inkubācijas 28. dienā pH 6.1; 0 rpm C% \leq 0.50 sākotnējais pH 7.0-6.0, beigu pH 5.0-3.5, C%=2.5 inkubācijas 28. dienā pH 6.1. Barotņu pH samazināšanās korelēja ar biomasas pieaugumu – 28. inkubācijas dienā barotnēs ar pH>4 biomasas iznākums bija mazāks nekā barotnēs ar pH \leq 4.

6. tabula

L. edodes 3565 micēlija biomasa (mg/100mL) šķidrās barotnēs (½ MEB) ar lignīna piedevu

Table 6

L. edodes 3565 mycelium dry weight (mg/100mL) in submerged media (½ MEB) with lignin additive

piedeva	C%	rpm	Biomasa mg/100mL	
-	0	0	137.97	±51.25
-	0	140	105.82	±20.63
KL	0.05	0	194.73	±11.34
KL	0.05	140	127.40	±6.60
KL	0.25	0	147.40	±16.00
KL	0.25	140	225.40	±13.21
KL	0.5	0	191.23	±28.04
KL	0.5	140	229.33	±22.32
KL	2.5	0	8.73	±0.97
KL	2.5	140	8.06	±1.89
lc	0.25	0	307.63	±NA
lc	0.25	140	352.11	±NA
lc	0.5	0	281.34	±11.75
lc	0.5	140	422.92	±31.52
LC	0.25	0	292.15	±NA
LC	0.25	140	282.55	±NA
LC	0.5	0	313.80	±66.78
LC	0.5	140	335.40	±4.59

Piezīmes: “ – “ bezpiedevu barotne; “LC” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva; “lc” hemicelulozi un celulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva. Rezultāti izteikti kā vidējais aritmētiskais±SD.

Notes: “ – “ media with no additive; “LC” wheat straw additive not containing hemicellulose; “lc” wheat straw additive not containing hemicellulose and cellulose. Data expressed as medium±SD

4 DISKUSIJA

Lignocelulozes atlikumi ir plaši izplatīti sezonāli un rūpnieciski atlikumi, kuru pilnīgai utilizācijai nepieciešama to sastāvā esošā lignīna degradācija.

Tādus lauksaimniecības atlikumus kā kviešu, rapšu salmus var izmantot furforola un bioetanola iegūšanai. Furforolu var iegūt no salmu hemicelulozes (Carrier et al. 2012), pārpalikumos atstājot lignīnu un celulozi. Lignocelulozi bez hemicelulozes iespējams izmantot bioetanola iegūšanā, atlikumā paliekot pārsvarā tikai lignīnam. Tālāku lignīna utilizāciju iespējams veikt ķīmiski, tādā veidā palielinot radušos atlikumu utilizācijas slogu uz vidi, vai bioloģiski ar lignīnu biodegradējošo sēņu pie palīdzību. Dabā lignīna degradēšanu galvenokārt veic baltās trupes sēnes, tāpēc arī botehnoloģijas procesos ir aktuāla sēņu izmantošana lignīna atlikumu biodegradācijā.

L. edodes ir baltās trupes sēne, no kuras micēlija iespējams izdalīt polisaharīdus ar imunomodulējošām īpašībām un tā kultivēšanas laikā iegūt ligninolītiskus enzīmus biotehnoloģiskiem nolūkiem.

L. edodes izmantošana lignocelulozes atlikumu biodegradācijā dod iespēju iegūt izejmateriālu, no kura var izdalīt bioaktīvas vielas un iegūt lignīnu degradējošus enzīmus.

4.1 Micēlija kultivēšana agarizētās barotnēs

Iesala ekstrakta agarizētajās barotnēs bez lignīnu saturošām piedevām novērots straujāks micēliju diametra un blīvuma pieaugums nekā tādās pašās sintētiskajās barotnēs. Novērojamās izmaiņas skaidrojamas ar barības vielu daudzveidību iesala ekstrakta barotnēs salīdzinājumā ar sintētiskajām barotnēm – *Malt Extract Broth* barotnē iesala ekstrakts kalpo kā oglekļa un proteīnu avots, peptons – kā slāpekļa avots.

Salīdzinot iesala ekstrakta bezpiedevu barotnes, lielākais diametrs un blīvākais micēlijs novērojams *Malt Extract* (ME) barotnē. ME barotnē ir par 50% vairāk iesala ekstrakta nekā *Malt Extract Broth*, attiecīgi tajā vairāk oglekļa avota, vairāk vienkāršo cukuru, kuru katabolisma rezultātā iegūstama lielāka biomasa (Sen et al. 2012).

Micēlija diametrs un biomasa neveido pozitīvu korelāciju (Philippoussis et al. 2011), tādēļ pēc diametra vien nevar spriest par piedevu piemērotību tehnoloģisko uzdevumu risināšanai, nepieciešams novērtēt arī micēlija blīvumu. Barības vielām bagātāku zonu izmantošanai,

micēlijsēnes pagarina micēliju, nepalielinot tā blīvumu (Pielikums 6). Blīvums pieaug tikai tad, kad barības vielu koncentrācija barotnē pārsniedz vadošo hifu augšanai nepieciešamo līmeni. Vadošās hifas ir prioritāras barības vielu uzņemšanā, tikai tad, kad tām barības vielas ir pietiekamā daudzumā, pārējais micēlijs tiek nodrošināts ar barības vielām. Šī un citu iemeslu dēļ micēlijiem mēdz novērot rizoīdu morfoloģiju – barības vielu gradients nav pietiekošs, lai nodrošinātu sīkāku zarošanos (Jennings 1995). Šajā darbā uz barības vielām nabadzīgākajām, sintētiskajām, barotnēm augušie micēliji bija ar mazāku blīvumu nekā iesala ekstrakta barotnēs augušie.

Uz nepietiekamu oglekļa barības avotu pieejamību norāda arī sintētiskajās barotnēs novērotā augstā lakāzes aktivitāte, salīdzinot ar iesala ekstrakta barotnēm. Lakāzes izdalīšanās nabadzīgākā barotnē dod iespēju piekļūt lignīna degradācijas rezultātā iegūstamam oglekļa avotam. Analogi dabas procesiem, baltās trupes sēnes izdala ligninolītiskos enzīmus, lai piekļūtu koksnes celulozei, *L. edodes* lignīnu šķel selektīvi, kas nozīmē, ka lignīna degradācijai nenotiek paralēla celulozes šķelšana. Līdz ar to lignīna šķelšanas laikā biomasas daudzums nepalielinās. Viedokļi par to, vai biomasas pieaugums un lignīna degradācija ir pilnībā nesaistīti, atšķiras – Warg et al. (2003) uzskata, ka metabolisma pārslēgšanās sēnēs nav tik vienkārša, lai varētu pateikt, kad sākas lignīna noārdīšana un kad biomasas pieaugums. Savukārt Leisola et al. (2012) apskata rakstā izteikts apgalvojums, ka lignīna degradācijas laikā sēnes augšana apstājas.

Diametra pieaugums barotnēs ar piedevām bija lielāks nekā bezpiedevu barotnēs, izņemot sintētiskās barotnes ar aļģu piedevu, kurās micēlija diametrs bija līdzīgs diametram bezpiedevu barotnē.

Salīdzinot barotnes ar kviešu salmu piedevām, celulozi saturošās piedevas (LC) barotnēs novērots lielākais micēliju diametrs, kamēr micēlija blīvums barotnēs ar abu tipu kviešu salmu piedevu bija līdzīgs. Celulozi saturošā kviešu salmu piedeva veicināja diametrālo pieaugumu, jo micēlijs tika nodrošināts ar papildu ogļhidrātu avotu.

Sintētiskajās hemicelulozi un celulozi nesaturošās kviešu salmu piedevas (lc) barotnēs micēliju diametri statistiski būtiski neatšķīrās no diametriem LC barotnēs, tomēr vidēji lc barotnēs novērotie diametri bija mazāki. Bezpiedevu sintētiskajās barotnēs diametri ievērojami mazāki nekā lc barotnēs, kas ļauj domāt, ka micēlijs substrātu izmanto augšanai. Atsaucoties uz pašu un citu veiktajiem eksperimentiem, Leisola et al. (2012) apskata rakstā minēts, ka sēnes nespēj lignīnu izmantot par oglekļa avotu tādēļ, ka tas ir augsti polimerizēts. Viņuprāt, eksperimentos, kuros novērots biomasas pieaugums kultivējot uz lignīna substrāta, izmantotais lignīns saturējis citus

oglekļa avotu – cukurus. Šajā darbā iegūtie rezultāti uzrāda ievērojamu micēlija diametru pieaugumu barotnēs ar lc substrātu, kas, iespējams, liecina par cukura atlikumu klātesamību substrātā, bet var liecināt arī par lignīna utilizāciju. Piedeva lc ir vairākkārt hidrolizēta, lai no tās izdalītu hemicelulozi un celulozi, kas nozīmē, ka var būt šķeltas arī lignīnu veidojošās ķīmiskās saites, tā aizsākot lignīna degradāciju, samazinot tā polimerizācijas pakāpi un atvieglot tā izmantojamību. Lignīna šķelšana turpinās kultivēšanas laikā, jo micēlijs ārvīdē izdala lignolītiskus enzīmus. Rezultātā lignīna bieži zarotais polimērs ir ticis sašķelts līdz vienkāršākiem polimēriem, kurus varētu izmantot kā oglekļa avotu.

Kļavu lapas, kā ogļhidrātiem un minerālvielām bagātīga piedeva, ievērojami veicināja micēliju diametrālo pieaugumu gan iesala ekstrakta, gan sintētiskajās barotnēs. Diametru atšķirības sintētiskajās barotnēs bija lielākas nekā iesala ekstrakta barotnēs. Tas skaidrojams ar barības vielu lielāku pieejamību iesala ekstrakta–kļavu lapu barotnēs – kļavu lapu izmantošana ir lēnāka nekā sintētiskajās barotnēs, jo micēlijs tiek nodrošināts ar nepieciešamajām barības vielām iesala un peptona veidā. Sintētiskajās barotnēs ogļhidrātu trūkums izsauc lignināžu un celulolītisko enzīmu sekrēciju, lapas tiek šķeltas un izmantotas par oglekļa avotu, kas nodrošina strauju biomasas pieaugumu.

Micēliju diametri uz agarizētām barotnēm ar aļģu piedevu atšķīrās atkarībā no pamatbarotnes. Iesala ekstrakta barotnēs aļģu piedeva veicināja micēliju diametra pieaugumu, bet sintētiskajās barotnēs nebija novērojamas atšķirības no bezpiedevu barotnēm. Iesala ekstrakta barotnēs tā kalpoja kā barotni ar minerālvielām, proteīniem un ogļhidrātiem papildinoša piedeva, bet sintētiskajās – nebija pietiekams ogļhidrātu avots. Brūnaļģēs sastopams jods, kuram novērota fungicīda (ED80 pie $C=2.4\text{mg/mL}$) vai fungistatiska ietekme (Bojsen 2004). Darbā izmantotas *Fucus* ģints suga, kuru sausrinā, spriežot pēc literatūras datiem, joda koncentrācija ir aptuveni 500 mg/kg . Darbā izmantotais aļģu daudzums var veidot joda koncentrāciju barotnē $C\sim 0.125\text{mg/mL}$, kas ir gandrīz 20 reīžu zemāka par fungicīdo koncentrāciju, tomēr tai varētu būt fungistatiska iedarbība. Tādejādi no aļģēm iegūstamo ogļhidrātu daudzums nav pietiekams, lai atsvērtu biomasas pieaugumā fungistatisko ietekmi, kas labāk izpaužas barības vielām nabadzīgākā barotnē.

4.2 Micēlija kultivēšana šķidrās barotnēs

Micēlija kultivēšanai šķidrā vidē izvēlēta iesala ekstrakta barotne ½ MEB, jo uz tās agarizēta varianta bija novērota lielākā biomasas un augsta lakāzes aktivitāte. Iesala ekstrakts ir arī ogļhidrātu avots, kas nepieciešams biomasas veidošanai. Iesala ekstrakta sastāvā ir aromātiskās aminoskābes triptofāns un tirozīns, tām ir novērota lignināžu produkciju veicinoša iedarbība baltās trupes sēnēs (Arora and Gill 2011; Collins et al. 1997). ½ MEB satur arī peptonu, kurš kā slāpekļa avots sekundārā metabolisma laikā aktivē ligninolītisko sistēmu (Buswell et al. 1995). Tam novērota lignināžu izdalīšanos veicinošāka iedarbība nekā iesala ekstraktam (Levin et al. 2008). Divkārt palielinot ½ MEB barotnes komponentu koncentrāciju barotnē MEB, palielinās micēlijam viegli pieejamo barības vielu koncentrācija ārvīdē, tāpēc piedevu utilizācija uzsākas vēlāk, kas paildzina piedevu iedarbības novērojumus.

Kviešu salmu piedevas veicināja lielākas micēlija biomasas veidošanos salīdzinājumā ar barotnēm bez piedevām. Hemicelulozi nesaturošās kviešu salmu piedevas (LC) barotnēs novēroto micēlija biomasas pieaugumu var skaidrot ar LC sastāvā esošās celulozes izmantošanu kā ogļhidrātu avotu. Lignīna klātbūtnē tiek inducēta lakāzes sekrēcija, tiek šķelts lignīns un nodrošināta piekļuve celulozei. Lignīna šķelšanai seko celololītisko enzīmu producēšana, kuras rezultātā barotnē nonāk viegli izmantojami cukuri, kas savukārt rezultējas biomasas pieaugumā.

Kviešu salmu piedevu lc un LC barotnēs biomasas iznākums būtiski neatšķīrās, tomēr vidēji lc barotnēs biomasas daudzums bija lielāks.

Salīdzinoši lielais biomasas iznākums hemicelulozi un celulozi nesaturošās kviešu salmu piedevas barotnēs ļauj domāt, ka vairākkārtīgā piedevas hidrolizēšana, kas veikta pirmsapstrādē izdalot hemicelulozes un celulozes no kviešu salmu materiāla, un enzimatiskā šķelšana ar micēlija izdalītajiem ligninolītiskajiem enzīmiem kultivēšanas laikā padarījusi to par izmantojamu kā oglekļa avotu.

Kviešu salmu piedevas barotnēs iegūta lielākā lakāzes aktivitāte. Visvairāk lakāzes iegūts barotnēs ar hemicelulozi un celulozi nesaturošām kviešu salmu piedevām. To sastāvā ir lielākā lignīna koncentrācija, kas norāda uz fenola savienojumu inducējošo ietekmi uz lakāzes uzkrāšanos.

Darbā iegūtā lakāzes aktivitāte (U/mL) kultivēšanas laikā pakāpeniski palielinājās, maksimumu sasniedzot kultivācijas beigās – 28. dienā. Salīdzinot ar literatūras datiem, var secināt,

ka enzīma aktivitātes uzkrāšanās laikā var variēt, jo ir atkarīga no kultivēšanas temperatūras, pH, inkubācijas režīma un barotņu piedevām (Shraddha et al. 2011; Sahay et al. 2008).

Lakāzes produkciju inducē fenola savienojumi un ogļhidrātu nepietiekamība, tāpēc novērotais pakāpeniskais aktivitātes pieaugums varētu būt saistīts ar pakāpenisku ogļhidrātu koncentrācijas samazināšanos kultivēšanas laikā. Vienkāršo cukuru (glikozes, mannozes, maltozes, fruktozes, laktozes) klātesamība kultivēšanas vidē kavē lakāzes produkciju, tāpēc augstas lakāzes aktivitātes iegūšanai kā oglekļa substrātu iesaka barotnēs pievienot celulozi (Lee et al. 2004).

Darbā micēlija inkubācija veikta 21.5-26.5°C. Atkarībā no barotnes, maksimālai biomasas iegūšanai optimālā *L. edodes* micēliju kultivēšanas temperatūra ir diapazonā no +20°C līdz +25°C. Kultivējot pie +25°C paaugstinās prasības pret barotni (Aminuddin et al. 2007), barības vielām bagātā barotnē pie +25°C iespējams iegūt visvairāk micēlija.

Šajā darbā novērota statistiski būtiska negatīva korelācija starp lakāzes aktivitāti un inkubācijas temperatūru (Pielikums 7), tas palīdz izskaidrot lielās standartnovirzes apkopojošajos grafikos – tajos attēlotās vērtības iegūtas plašā temperatūras intervālā (21.5°C-26.5°C), kuram ir ietekme uz novēroto aktivitāti, bet datu nepietiekamības dēļ katra temperatūra netiek apskatīta atsevišķi. Savukārt bezpiedevu barotnēs lakāzes aktivitātes optimums tika iegūts pie +26.5°C. Bezpiedevu barotnēs novērota statistiski neapstiprināta tendence negatīvai korelācijai starp lakāzes aktivitāti un biomasas daudzumu, kas liecina par to, ka lakāzes uzkrāšanās nenotiek vienlaicīgi ar micēlija biomasas pieaugumu (Pielikums 8).

Literatūras dati norāda (Levin et al. 2008), ka barotnes sākotnējais pH intervālā 4.0-7.0 būtiski neietekmē micēlija biomasas iznākumu. Mūsu laboratorijā veiktie eksperimenti parādījuši, ka sākotnējā pH ietekme ir atkarīga no *L. edodes* celma. Darbā izmantotā celma *L. edodes* 3565 inkubācijas veikta barotnēs ar sākotnējo pH no 5.0 līdz 7.0 un tam nebija statistiski būtiskas ietekmes uz micēlija biomasu ($p \geq 0.05$).

Kultivēšanas režīmam nebija statistiski būtiska ($p \geq 0.05$) ietekme uz biomasas pieaugumu, tomēr būtiska ietekme ($p < 0.05$) uz lakāzes produkciju. Literatūrā minēts, ka daudzu micēlijsēņu kultivēšana lodveida agregātos, kurus iegūst inkubāciju veicot uz kratītāja, samazinājusi to sekretēto metabolītu daudzumu.

Shraddha et al. (2011) apskata rakstā par lakāzes produkciju dažādu faktoru ietekmē minēti piemēri, kuros barotņu maisīšana *Trametes* ģints sugām nemainījusi vai mazinājusi lakāzes

aktivitāti. Iespējams, ka enzīma producēšanas efektivitāti ietekmē micēlijsēņu veidoto agregātu diametrs. Schügerl et al. (1983) pētījumos ar *Penicillium chrysogenum* novērots, ka metaboliski aktīvāki bijuši diametrā salīdzinoši mazi micēlija agregāti. Arī mūsu eksperimentos novērots, ka reizēm blīvu lodveida micēlija agregātu kodols ir tukšs, iespējams, barības vielu trūkuma dēļ notikusi vecāko hifu autolīze. Lai arī maisīšana vienmērīgi disperģē skābekli un barības vielas barotnes tilpumā, tomēr barības vielu transports uz šūnu agregātu iekšieni ir apgrūtināts. Darbā veiktajos eksperimentos lignīna piedevas barotnēs micēlijs veidojis maza diametra lodveida agregātus. Šajās barotnēs novērotās lakāzes aktivitātes bija visaugstākās, kas ļauj domāt, ka sīki lignīna agregāti kalpo kā micēlija imobilizācijas un augšanas centri, kuros lignīns inducē enzīmu ekskrēciju. Tas, iespējams, ir papildu veids kādā kviešu salmu lignocelulozes piedevas veicināja lakāzes aktivitātes pieaugumu barotnē.

4.3 Turpmākie pētījumi

Jāņem vērā, ka iegūtie dati par optimālajām piedevu koncentrācijām, iespējams, ir attiecināmi tikai uz tieši šajā darbā izmantoto inokulāta daudzumu – 2 micēlija diski ar diametru 8 mm. Iespējams, ka pie lielāka inokulāta daudzuma optimālas būtu lielākas substrāta koncentrācijas, tāpēc būtu nepieciešami papildu pētījumi, variējot inokulāta lielumu.

Micēliju inkubējot lignīnu saturošā vidē, iegūtas salīdzinoši augstas lakāzes aktivitātēs, tāpēc to izdalīšana, attīrīšana un raksturošana būtu nākamais solis *L. edodes* 3565 izmantošanas tehnoloģijas izstrādē.

Būtu nepieciešami arī micēlija biomasas sastāva pētījumi, lai noskaidrotu dažādu piedevu ietekmi uz proteīnu un ogļhidrātu sastāva un koncentrāciju izmaiņām, papildu pētījumi par kultivēšanas apstākļu ietekmi uz šī celma ligninolītisko enzīmu, to skaitā mangāna peroksidāzes, un biomasas produkciju.

Turpmāk būtu jāpēta arī citus biotehnoloģijā izmantojamus enzīmus (celulāzes, β -glikozidāzes un β -galaktozidāzes), kurus var producēt *L. edodes*.

4.4 Kopsavilkums

Furforola un bioetanola iegūšanā pārpalikušo lignocelulozes atlikumu pievienošana kultivēšanas vidē palielināja *L. edodes* 3565 izdalīto lakāzes aktivitāti un iegūstamo micēlija biomasu. Tas ļauj secināt, ka *L. edodes* 3565 ir enzimatiski un termiski apstrādātu kviešu salmu atlieku pārstrādē izmantojama baltās trupes sēne. Kļavu lapas ir barotni bagātinoša piedeva *L. edodes* 3565 kultivēšanai.

Inkubācijas režīms šķidrā barotnē ir jāpielāgo micēlija kultivēšanas mērķim – biomasas iegūšanas gadījumā stacionāri turētas un uz kratītāja inkubētas kolbas dod līdzīgu rezultātu, bet metabolītu izdalīšanai piemērotāka ir audzēšana uz kratītāja (140 rpm).

Ņemot vērā lakāzes aktivitātes pakāpenisko pieaugumu kultivēšanas gaitā, lakāzes izdalīšanas optimums būtu 28. kultivēšana diena, inkubāciju veicot ½ MEB barotnēs ar hemicelulozi un celulozi nesaturošu kviešu salmu piedevu.

Samazināts micēlija blīvums agarizētās barotnēs var norādīt uz pārslēgšanos uz sekundāro metabolismu un lignināžu producēšanu.

SECINĀJUMI

1. Lignīnu saturošas piedevas pievienošana šķidrā kultivēšanas vidē palielināja *L. edodes* 3565 izdalītās lakāzes aktivitāti un micēlija biomasas pieaugumu.
2. Kviešu salmu piedevām koncentrācijā 0.50% novērota visveicinošākā ietekme uz biomasas un lakāzes aktivitātes pieaugumu iesala ekstrakta šķidro barotņu kultūrās (palielinājums attiecīgi vismaz 2.5 un 2.7 reizes).
3. Kultivēšanas režīmam pie 140 rpm uz rotācijas kratītāja novērota lakāzes aktivitātes pieaugumu veicinošāka iedarbība nekā statiskas kultivācijas režīmam. Biomasas pieaugumu inkubācijas režīms būtiski neietekmēja.
4. *L. edodes* 3565 28 dienu ilgā kultivēšanas laikā lakāzes aktivitāte pakāpeniski pieauga, novēroto maksimumu sasniedzot pēdējā kultivēšanas dienā.
5. Savstarpēji salīdzinot bezpiedevu un kviešu salmu piedevu barotnes, pēdējā kultivēšanas dienā vislielākais lakāzes aktivitātes pieaugums (7.5 reizes) novērots kultūrām šķidrās barotnēs ar hemicelulozi un celulozi nesaturošo kviešu salmu piedevu koncentrācijā 0.50% pie 140 rpm uz rotācijas kratītāja.
6. Inkubācija agarizētās barotnēs uzrādīja kviešu salmus un kļavu lapas kā barotni bagātinošu piedevu, kas 8. dienā sintētiskajās barotnēs palielināja micēlija diametru par attiecīgi $\geq 27\%$ un 26% pie koncentrācijas 2.50%.

PATEICĪBAS

Izsaku īpašu pateicību, Dr. biol., Asoc. prof. Nataļjai Matjuškovai† par šī darba vadīšanu, pacietību un atbalstu darba izstrādes laikā. Īpaša pateicība Dr. h. biol., Prof. Indriķim Muižniekam par vērtīgiem padomiem un šī darba vadības pārņemšanu.

Pateicība Mag. biol. Elīnai Ažēnai par praktiskiem padomiem un atbalstu. Pateicība Mag. biol. Dzintrai Zaļajai un Mag. biol. Gaļinai Makarenkovai par praktiskiem padomiem un palīdzību darba izstrādē.

Pateicība Dr. h. biol., prof. Aleksandram Rapoportam par ieguldīto laiku darba recenzēšanā.

LITERATŪRAS SARAKSTS

Aminuddin H., Khan A. M. and Madzlan K. 2013. Effects of pH on mycelial growth and amino acid composition of *Lentinula edodes* in submerged cultures. J. Trop. Agric. and Fd. Sc. 41(1): 63 – 70.

Aminuddin H., Mohd Khan A., Abidin H., Madzlan K., Suri R. and Kamal M.K. 2007. Optimization of submerged culture for the production of *Lentinula edodes* mycelia biomass and amino acid composition by different temperatures. J. Trop. Agric. and Fd. Sc. 35(1): 131 – 138.

Aminuddin H., Mohd Khan A., Abidin H., Madzlan K., Suri R. and Kamal M. K. 2007. Optimization of submerged culture for the production of *Lentinula edodes* mycelia biomass and amino acid composition by different temperatures. J. Trop. Agric. and Fd. Sc. 35(1): 131 – 138.

Arora D. K. 2003. Handbook of Fungal Biotechnology. Mycology Series. New York : Marcel Dekker Incorporated, 21: 363 – 481.

Arora D. S., Gill P. K. 2001. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. Bioresource Technology, 77: 89 – 9.

Asgher M., Bhatti H. N., Ashraf M., Legge R. L. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. Biodegradation, 19: 771 – 783.

Bengt Bojsen. 2004. Investigation on the fungitoxic effect of an iodine solution on three plant pathogens in vitro. Uppsala, 39 pp.

Bisen P.S., Baghel R.K., Sanodiya B.S., Thakur G.S., Prasad G.B.K.S. 2010. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. Current Medicinal Chemistry, 17(22): 2419 – 2430.

Black W. A. P. 1950. The seasonal variation in the cellulose content of the common Scottish Laminariaceae and Fucaceae. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 29(2): 379 – 387.

Blanchette R. A. 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. Can J Bot Rev Can Bot 73: 999–1010.

Brijwani, K., Rigdon, A., & Vadlani, P. V. (2010). Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. Enzyme Research, 2010, 149748.

Buswell J. A., Cai Y., and Chang S. T. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*,” FEMS Microbiology Letters, vol. 128, no. 1, pp. 81–88.

Buswell J. A., Cai Y., and Chang S. – T. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS Microbiology Letters, 128 (1):81–88.

Christopher L. P., Yao B., Ji Y. 2014. Lignin biodegradation with laccase – mediator systems. Frontiers in energy research, March 2014(2):1 – 13.

Cox, P. W., Paul, G. C., and Thomas, C. R. 1998. Image analysis of the morphology of filamentous micro – organisms. Microbiology, 144: 817–827.

D. H. Jennings. 1995. The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge University Press, 622pp

d’Acunzo, F., Galli, C., and Masci, B. 2002. Oxidation of phenols by laccase and laccase – mediator systems. Eur. J. Biochem. 269: 5330–5335.

Elisashvili V., Kachlishvili E., Asatiani M. 2015. Shiitake Medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* (Higher Basidiomycetes) Productivity and Lignocellulolytic Enzyme Profiles during Wheat Straw and Tree Leaf Bioconversion. International Journal of Medicinal Mushrooms 17(1):77 – 86.

Eriksson K – E, Blanchette R. A., and Ander P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. New York: Springer, pp1 – 333.

Fang Z. 2013. Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries. Green Energy and Technology, pp 3 – 34.

Fernández – Fernández M., Sanromán M. A., Moldes D. 2013. Recent developments and applications of immobilized laccase. Vol. 31, Issue 8, 1808–1825.

Gąsecka M., Drzewiecka K., Stachowiak J., Siwulski M., Goliński P., Sobieralski K., Gólak I. 2012. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by spent mushroom substrates of *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes*. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus, 11 (4): 39 – 46.

Gibbs P. A., Seviour R. J., and Schmid F. 2000. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. Critical Reviews in Biotechnology, 20(1):17–48.

Goltapeh E., Mohammadi D., Rezaee Y, Varma, A. 2013. Fungi as Bioremediators. Soil Biology, Springer, 32: 1613 – 3382.

Hatakka A. 1994. Lignin – modifying enzymes from selected white – rot fungi—production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* 13:125–135

Hatakka A. I. 1983. Pretreatment of wheat straw by white – rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 18:350–7.

Hatakka A. I., Pirhonen T. I. 1985. Cultivation of Wood – Rotting Fungi on Agricultural Lignocellulosic Materials for the Production of Crude Protein. *Agricultural Wastes*, 12: 81 – 97.

He J. Z., Ru Q. M., Dong D. D. and Sun P. L. 2012. Chemical Characteristics and Antioxidant Properties of Crude Water Soluble Polysaccharides from Four Common Edible Mushrooms. *Molecules*, 17: 4373 – 4387.

Higuchi T. 1990. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci Technol* 24:23–63

Humphrey A. 1998. Shake Flask to Fermentor: What Have We Learned? *Biotechnology Progress*, 14: 3 – 7.

Hustad P. D., Britt P. F., Buchannan A. C. 1996. Pyrolysis mechanisms of biomass: pyrolysis of a lignin model compound. Emory and Henry College. <http://zeeman.ehc.edu/students/pdhustad/bio4.htm>

Jacob, M., Viedenz, K., Polle, A., & Thomas, F. M. 2010. Leaf litter decomposition in temperate deciduous forest stands with a decreasing fraction of beech (*Fagus sylvatica*). *Oecologia*, 164(4), 1083–1094.

Kang J. C. 2013. The Risen of Mushroom Pharmaceutical Industry. The 7th International Medicinal Mushroom Conference. China, 826 – 834 pp.

Kirk T. K. and Farrell R. L. 1987. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 41: 465–505.

Kirk T. K., Tien M. 1984. Lignin – Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂ – Requiring Oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2280 – 2284.

Knežević A., Milovanović I., Stajić M., Lončar N., Brčeski I., Vukojević J., Cilerdžić J. 2013. Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology* 138: 117–123.

Kuijk S. J. A., Rio J. C., Rencoret J., Gutierrez A., Sonnenberg A. S. M., Baars, J. J. P., Hendriks W. H., Cone J.W. 2016. Selective ligninolysis of wheat straw and wood chips by the

white – rot fungus *Lentinula edodes* and its influence on in vitro rumen degradability. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7: 55.

Kuiters A. T., Sarink H. M. 1986. Leaching of phenolic compounds from leaf and needle litter of several deciduous and coniferous trees. *Soil Biology and Biochemistry* 5:475 – 480.

Kuitunen S., Kalliola A., Tarvo V. 2011. Lignin oxidation mechanisms under oxygen delignification conditions. *Holzforschung*, 65(4): 587 – 599.

Leatham G. F. and Kirk T. K. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white – rot basidiomycetes, *FEMS Microbiology Letters*, 16 (1):65–67.

Lee K. H., Wi S. G., Singh A. P., and Kim Y. S. 2004. Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown – rot fungus *Coniophora puteana*. *Journal of Wood Science*, 50(3): 281–284.

Leisola M., Pastinen O., and Axe D. D. 2012. Lignin—Designed Randomness. *Bio – Complexity* (3):1–11.

Levin L., Hermann C., Papinutti V. L. 2008. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white – rot fungus *Trametes trogii* in solid – state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 39: 207–214.

Lo T. C. T., Tsao H. H., Wang A. Y., and Chang A. 2007. Pressurized Water Extraction of Polysaccharides as Secondary Metabolites from *Lentinula edodes*. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 4196 – 4201.

Macfarlane, A. L., Prestidge, R., Farid, M. M., and Chen, J. J. 2009. Dissolved air flotation: a novel approach to recovery of organosolv lignin. *Chem. Eng. J.* 148: 15–19.

Mansouri N. – E.E., Salvado J. 2006. Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda – anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Industrial Crops and Products* 24: 8–16.

Mansur, M., Arias, M. E., Copa – Patiño, J. L., Flärdh, M., and González, A. E. 2003. The white – rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia* 95: 1013–1020.

Maria Florence E. J., Balasundaran M. 2000. Mushroom cultivation using forest litters and waste wood. Kerala Forest Research Institute, Research Report 195, 28pp.

- Martone P. T., Estevez J. M., Lu F., Ruel K., Denny M. W., Somerville C., Ralph J. 2009. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell – Wall Architecture. *Current Biology*, 19(2): 169 – 175.
- Matjuškova N., Raipulis J. 1999. Šitakē grāmata. Rīga, 13 – 16 lpp.
- Messerschmidt, A., and Huber, R. 1990. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin modelling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* 187: 341–352.
- Messner K. and Srebotnik E. 1994. Biopulping: An overview of developments in an environmentally safe paper – making technology. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 351 – 364.
- Metz B., Kossen, N. W. F., and van Suijdam, J. C. 1979. The rheology of mould suspensions. *Adv. Biochem. Eng.* 11: 103–156.
- Miles P.G., Chang, S – T. 1997. *Mushroom Biology. Concise Basics and Current Developments.* World Scientific. Singapore, pp 194.
- Modrzewska B., Kosiorek M., Wyszowski M. 2016. Content of some nutrients in Scots pine, silver birch and Norway maple in an urbanized environment. *Journal of Elementology*, 21(1): 149 – 157.
- Morozova O. V., Shumakovich G. P., Shleev S. V., Yaropolov Y. I. 2007. Laccase–Mediator Systems and Their Applications: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5): 523–535.
- Morreel, K.; Dima, O.; Kim, H.; Lu, F.; Niculaes, C.; Vanholme, R.; Dauwe, R.; Goeminne, G.; Inze, D.; Messens, E.; Ralph, J.; Boerjan, W. 2010. Mass Spectrometry – Based Sequencing of Lignin Oligomer. *Plant Physiology*, 153: 1464–1478.
- Nicolai, V. 1988. Phenolic and mineral content of leaves influences decomposition in European forest ecosystems. *Oecologia*, 75: 575
- Nunes, M. H., Davey, M. P., Coomes, D. A. 2016. Leaf trait variation and field spectroscopy of generalist tree species on contrasting soil types, *Biogeosciences Discuss.*, in review.
- Okmane L., Matjuškova N., Nāgele Z., Zaļā Dz., Poppele I. 2017. Effect of a maple leaf additive on growth of *Lentinula edodes*. *Environmental and Experimental Biology*, Abstract of the 75th Scientific Conference of the University of Latvia, 15: 87–88.
- Pegler D. N., 1975. The classification of the genus *Lentinus* Fr. (Basidiomycetae). *Kavaka*, 3., pp. 11 – 20.

Perlack R. D., Wright L. L. 2005. Biomass as a Feedstock for a Bioenergy and Bioproducts Industry: The Technical Feasibility of a Billion – Ton Annual Supply. U.S. Department of Energy, 78pp.

Petre M., Teodorescu A. 2012. Biotechnology of Agricultural Wastes Recycling Through Controlled Cultivation of Mushrooms. Advances in Applied Biotechnology. [http://www.intechopen.com/books/advances – in – applied – biotechnology/biotechnology – of – agricultural – wastes – recycling – through – controlled – cultivation – of – mushrooms](http://www.intechopen.com/books/advances-in-applied-biotechnology/biotechnology-of-agricultural-wastes-recycling-through-controlled-cultivation-of-mushrooms)

Philippoussis A., Diamantopoulou P., Papadopoulou K., Lakhtar H., Roussos S., Parissopoulos G., Papanikolaou S. 2011. Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. World J Microbiol Biotechnol 27:285–297.

Przybylowicz P., Donoghue J., 1990. Shiitake growers handbook. The art and science of mushroom cultivation. Kendall/Hunt Publishing Company. Iowa.

Raaska L. 1993. Cultivation and spawn production of the wood – decaying fungus, shiitake (*Lentinula edodes*). Optimization of spawn growth, production of degradative enzymes and interaction with wood inhabitants. Espoo, Technical Research Center of Finland, VTT Publications, 157: 10 – 50.

Rypáček V. 1977. Chemical composition of hemicelluloses as a factor participating in the substrate specificity of wood – destroying fungi. Wood Science and Technology, 11: 59 – 67.

Ruiz – Duenas F. J., Morales M., Garcia E., Miki Y. 2009. Martinez MJ and Martinez AT. Substrate oxidation Sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. J Exp Bot, 60:441 – 452.

Salvachúa D., Prieto A., López – Abelairas M., Lu – Chau T., Martínez A.T., Martínez M.J. 2011. Fungal pretreatment: an alternative in second – generation ethanol from wheat straw. Bioresour. Technol. 102: 7500–7506.

Sasidharan S., Aravindran S., Latha L. Y., Vijenthi R., Saravanan D. and Amutha S. 2010. In Vitro Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effects of *Lentinula edodes* against Paracetamol – Induced Hepatotoxicity. Molecules, 15: 4478 – 4489

Schügerl, K., Wittler, R., and Lorenz, T. 1983. The use of molds in pellet form. Trends Biotechnol. 1:120–123.

Sen K., Pakshirajan K., Santra S. B. 2012. Modelling the Biomass Growth and Enzyme Secretion by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* in Presence of a Toxic Pollutant. *Journal of Environmental Protection*, 3: 114 – 119.

Shraddha S., Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., and Kumar A. 2011. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*, vol. 2011, Article ID 217861, 11 pages, 2011. doi:10.4061/2011/217861

Siqueira, G., Várnai, A., Ferraz, A., and Milagres, A. M. 2012. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. *Appl. Energy* 102, 399–402.

Srinivasan, D'Souza T. M, Boominathan K., Reddy C. A.. 1995. A Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (12): 4274–4277.

Taguchi T., Furue H., Kimura T., Kondo T., Hattori T., Itoh I., Ogawa N. 1985. Results of phase III study of lentinan. *Cancer & chemotherapy*, 12(2):366 – 78.

Takaki K., Yoshida K., Saito T., Kusaka T., Yamaguchi R., Takahashi K. and Sakamoto Y. 2014. Effect of Electrical Stimulation on Fruit Body Formation in Cultivating Mushrooms. *Microorganisms*, 2: 58 – 72.

Thurston C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1):19–26.

Tucker, K. G. and Thomas, C. R. 1992. Mycelial morphology: the effect of spore inoculum level. *Biotechnol. Lett.*, 14: 1071–1074.

Turło J., Gutkowska B., Kałucka M., Bujak M. 2007. Accumulation of zinc by the *Lentinus edodes* (Berk.) mycelium cultivated in submerged culture. *Acta Pol Pharm.*, 64(1):45 – 51.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2013. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26. Nutrient Data Laboratory, Full Report (All Nutrients): 11268, Mushrooms, shiitake, dried. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3063?qlookup=11268&format=Full&max=25&man=&facet=&new=1>

United Nations. 2012. Forest Products Annual Market Review 2011 – 2012. New York: UNECE/FAO, United Nations.

Valentin L., Kluczek – Turpeinen B., Oivanen P., Hatakka A., Steffen K. and Tuomela M. 2009. Evaluation of basidiomycetous fungi for pretreatment of contaminated soil. *J Chem Technol Biotechnol*, 84: 851–858.

Wang L., Yan W., Chen J., Huang F. and Gao P. 2008. Function of the iron – binding chelator produced by *Coriolus versicolor* in lignin biodegradation. *Sci China C Life Sci*, 51: 214 – 221.

Ward G., Hadar Y., Dosoretz C. G. 2003. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications: The Biodegradation of Lignocellulose by White Rot Fungi*. CRC Press. 393 – 402.

Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S. N. 2003. White – rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv*, 22: 161 – 187.

Wilkaniec B., Breś W., Frużyńska – Józwiak D., Borowiak – Sobkowiak B., Wilkaniec A. 2012. The assessment of chemical properties of the soil, the chemical composition of leaves and the occurrence of diseases on *Acer platanoides* and *Tilia cordata* in selected sites of urban greenery in Poznań. *Phytopathologia*. 65: 13 – 22.

Winqvist E., Hatakka A., Valentin L., Tuomela M., Moilanen U., Leisola M., and Steffen K. T. 2009. Development of a fungal pre – treatment process for reduction of organic matter in contaminated soil. *J Chem Technol Biotechnol*, 84: 845–850.

Wong D.W. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 157: 174 – 209.

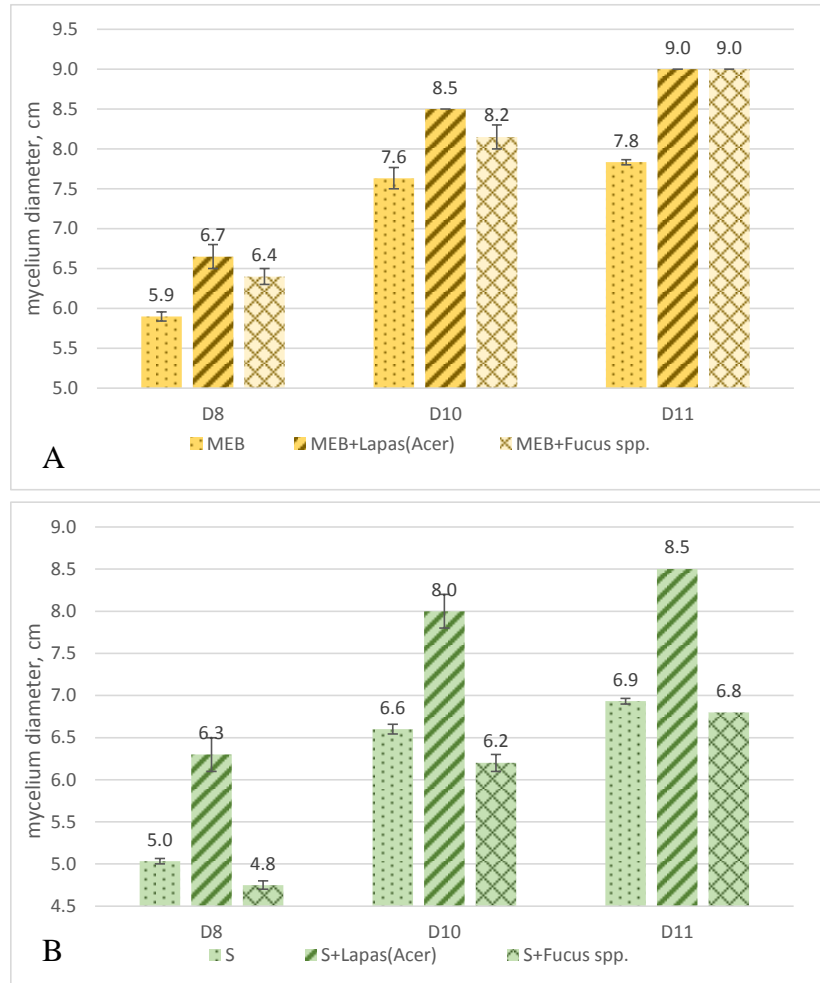
Zabel R. A. and Morrell J. J. 1992. *Wood microbiology. Decay and it's prevention*. Academic press, pp 1 – 473.

PIELIKUMI

Pielikums 1

L. edodes 3565 micēliju diametri iesala ekstrakta (A) un sintētiskajās (B) barotnēs ar kļavu lapu un aļģu (*Fucus* spp.) piedevu

L. edodes 3565 diametric growth on malt extract (A) and synthetic (B) with maple leaf and seaweed (*Fucus* spp.) additives



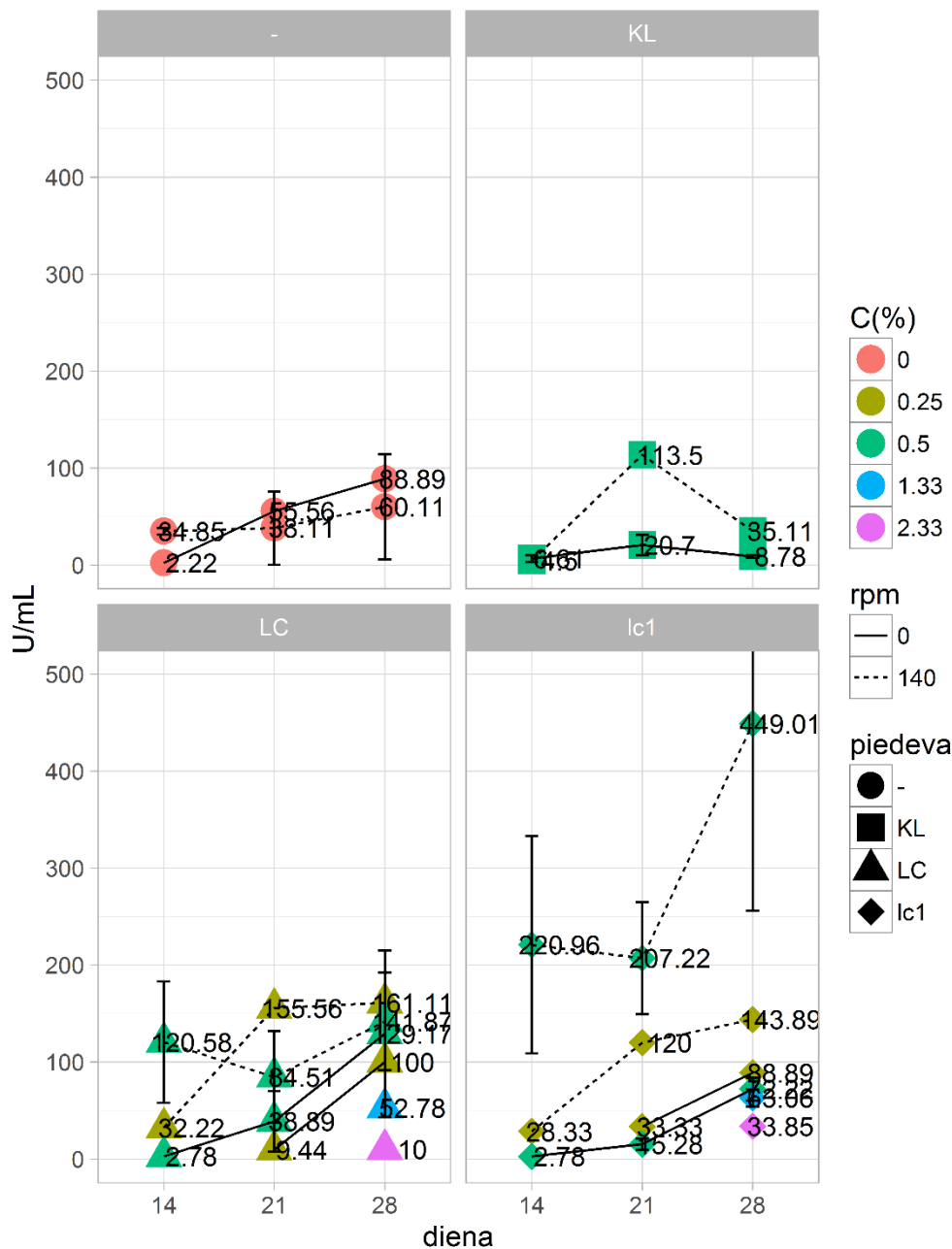
“D” – kultivēšanas diena.

“D” – cultivation day.

L. edodes 3565 lakāzes aktivitāte (U/mL) šķidrās ½ MEB barotnēs

L. edodes 3565 laccase activity (U/mL) in ½ MEB submerged medium

DSM3565 laccase activity, 1/2MEB, 21.5-26.5°C



“LC” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva; “lc1” hemicelulozi un celulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva; “KL” kraft lignīns.

“LC” wheat-straw additive without hemicellulose; “lc1” wheat straw additive without hemicellulose and cellulose; “KL” kraft lignin.

L. edodes 3565 lakāzes aktivitāte (U/mL) šķidrās barotnēs 28. inkubācijas dienā
L. edodes 3565 laccase activity (U/mL) in submerged medium on 28th incubation day

C(%)	piedeva	diena	rpm	U/mL	
0	-	28	0	88.89	±NA
0	-	28	140	60.11	±54.14
0.25	LC	28	0	100.00	±NA
0.25	LC	28	140	161.11	±NA
0.25	lc1	28	0	88.89	±NA
0.25	lc1	28	140	143.89	±NA
0.50	KL	28	0	8.78	±1.51
0.50	KL	28	140	35.11	±NA
0.50	LC	28	0	129.16	±86.03
0.50	LC	28	140	141.88	±50.40
0.50	lc1	28	0	72.22	±11.79
0.50	lc1	28	140	449.01	±193.15
1.33	LC	28	140	52.78	±NA
1.33	lc1	28	140	63.06	±9.04
2.33	LC	28	140	10.00	±NA
2.33	lc1	28	140	33.85	±NA

“LC” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva; “lc1” hemicelulozi un celulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva; “KL” kraft lignīns.

Lakāzes aktivitātes vērtības izteiktas kā vidējais aritmētiskais ± standartnovirze (SD).

“LC” wheat-straw additive without hemicellulose; “lc1” wheat straw additive without hemicellulose and cellulose; “KL” kraft lignin.

Data represented as arithmetic mean ± standard deviation (SD).

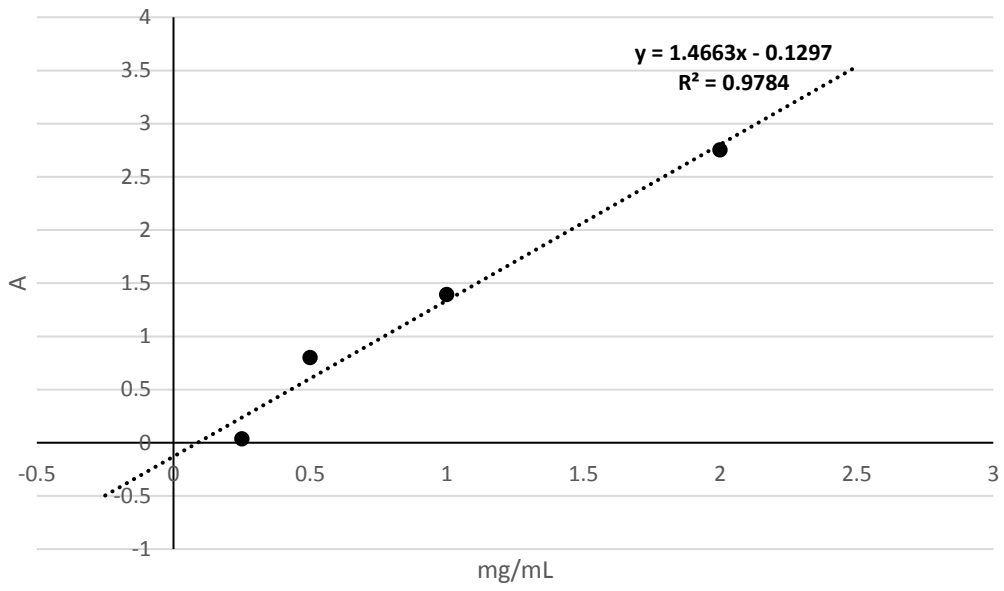
Šķidro barotņu pH *L. edodes* 3565 kultivēšanas laikā
Submerged medium pH during *L. edodes* 3565 cultivation

piedevas veids	C%	diena					rpm
		0	7	14	21	28	
-	0.00	6.1	4.0	4.0	4.0	3.5	0
-	0.00	6.1	5.5	5.0	4.0	3.2	0
KL	0.05	6.5	5.0	4.0	4.0	3.5	0
KL	0.25	7.0	6.5	6.3	4.5	4.0	0
KL	0.50	7.2	6.5	6.5	6.0	5.0	0
KL	2.50	7.8	7.5	6.1	6.1	6.1	0
LC	0.25	5.5	4.0	4.0	4.0	3.2	0
LC	0.50	5.5	4.0	4.0	4.0	3.0	0
LC	0.50	5.5	4.0	4.0	4.0	3.2	0
lc1-46	0.25	5.5	4.0	4.0	4.0	3.0	0
lc1-46	0.50	5.5	4.0	4.0	4.0	3.0	0
lc1-46	0.50	5.5	4.0	4.0	4.0	3.0	0
-	0.00	6.1	4.0	4.0	3.0	3.0	140
-	0.00	6.0	5.3	4.0	3.0	3.0	140
-	0.00	6.0	4.5	4.0	3.5	3.0	140
KL	0.05	6.5	4.5	3.2	3.2	3.0	140
KL	0.25	7.0	6.0	4.0	3.8	3.7	140
KL	0.50	7.2	6.8	5.5	4.3	3.7	140
KL	2.50	7.8	7.3	6.8	6.3	6.1	140
LC	0.25	5.5	4.0	4.0	3.0	3.0	140
LC	0.50	5.5	4.0	4.0	3.0	3.0	140
LC	0.50	5.5	4.0	4.0	3.0	3.0	140
LC	0.50	5.5	4.0	3.5	3.0	3.0	140
LC	1.33	5.5	NA	NA	NA	3.3	140
lc1-46	0.25	5.5	4.0	4.0	3.0	3.0	140
lc1-46	0.50	5.5	4.0	4.0	3.0	3.0	140
lc1-46	0.50	5.5	4.0	4.0	3.0	3.0	140
lc54	1.33	5.8	NA	NA	NA	3.5	140
lc7	0.50	5.0	3.5	3.0	3.0	3.0	140

Apzīmējumi: “LC” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedevas; “lc1-46”, “lc54”, “lc7” hemicelulozi un celulozi nesaturoša kviešu salmu piedevas; “KL” kraft lignīns. “NA” – nav datu.

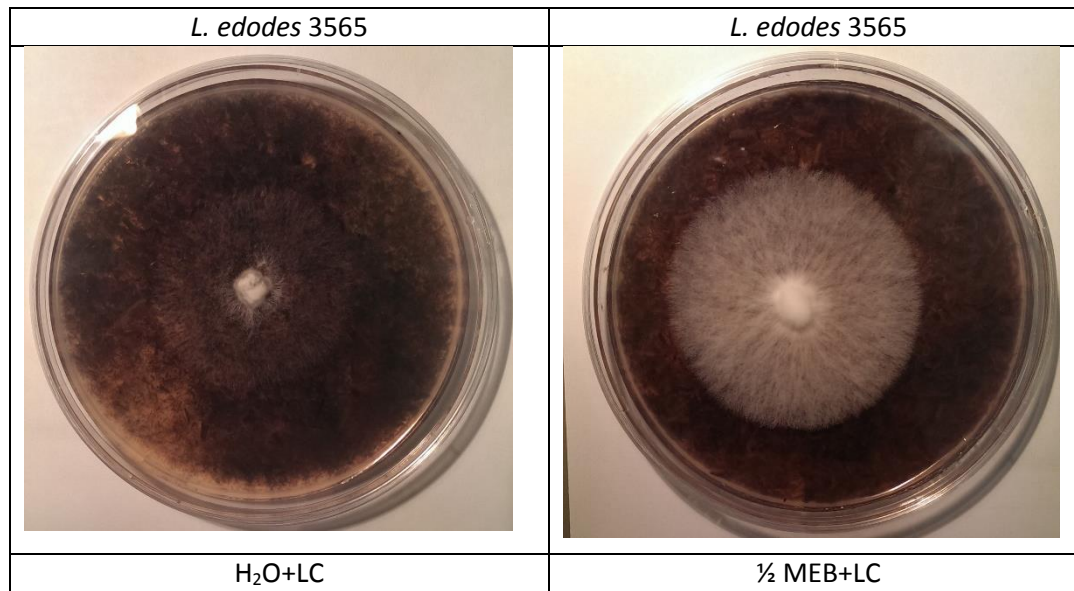
Notes: “LC” wheat-straw additive without hemicellulose; “lc1-46”, “lc54”, “lc7” wheat straw additive without hemicellulose and cellulose; “KL” kraft lignin. “NA” – not applicable

Pielikums 5
Standartlīkne lakāzes daudzuma (mg) noteikšanai
Standartcurve for laccase (mg) determination



Pielikums 6

L. edodes 3565 micēlijs agarizētās barotnēs, inkubācijas ilgums – 7 dienas
L. edodes 3565 mycelia on solid media, incubation period – 7 days



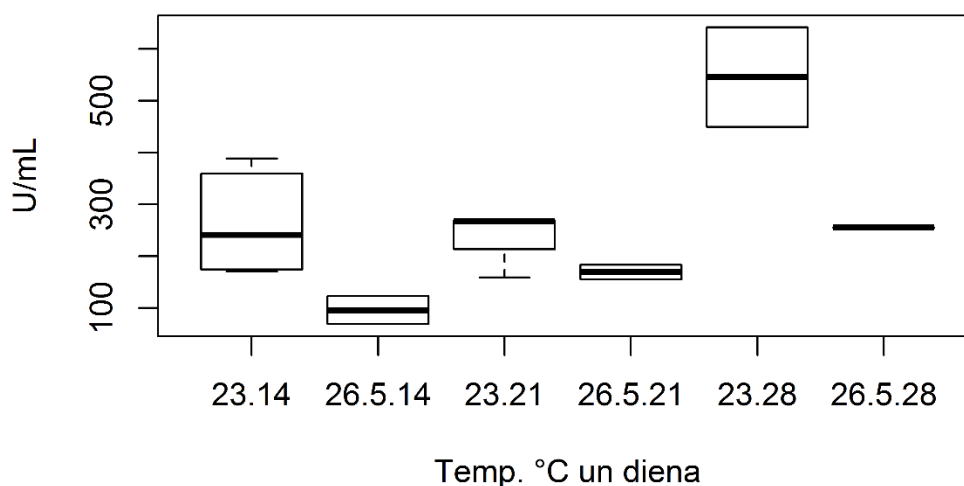
Apzīmējumi: “LC” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva.

Notes: “LC” wheat-straw additive without hemicellulose.

L. edodes 3565 lakāzes aktivitāte (U/mL) šķidrās barotnēs ar piedevu C%=0.50 un novērojamo atšķirību statistiskais būtiskums (ANOVA tests¹)

L. edodes 3565 laccase activity (U/mL) in submerged medium with additive C%=0.50 and statistical significance of data variation (ANOVA test^a)

lakazes aktivitāte, 1/2MEB, rpm=140, lc c%=0.50



ANOVA			
lc, rpm=140, c%=0.50		LC, rpm=140, c%=0.50	
> summary(aov.out)		> summary(aov.out)	
	Pr(>F)		Pr(>F)
diena	0.0187 *	diena	0.631101
temp.vid.C	0.0131 *	temp.vid.C	0.778238
diena:temp.vid.C	0.6588	diena:temp.vid.C	0.000443 ***
bezpiedeva, rpm=140, c%=0.00		Signif. codes:	
> summary(aov.out)		0	***
	Pr(>F)	0.001	**
diena	0.00167 **	0.01	*
temp.vid.C	0.11509	0.05	.
diena:temp.vid.C	0.54768	0.1	

“LC” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva; “lc” hemicelulozi un celulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva.

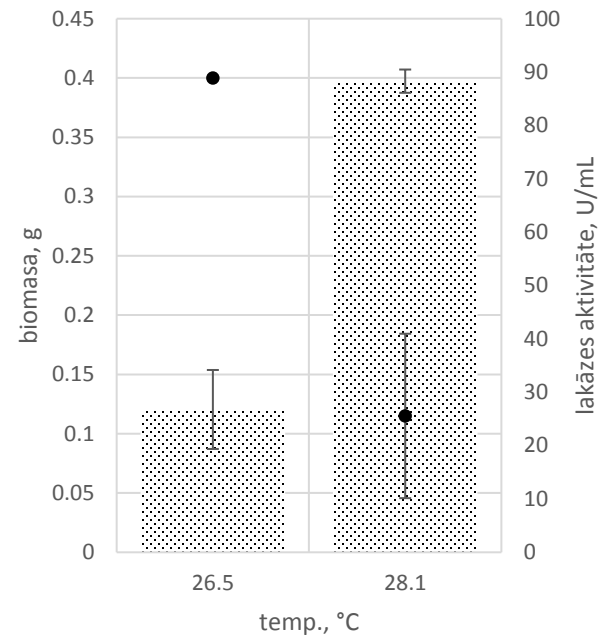
“LC” wheat-straw additive without hemicellulose; “lc” wheat straw additive without hemicellulose and cellulose.

¹ Paraugkopas normālsadalījumu skatīt Pielikums 9. ¹ Sample normal distribution in Appendix 9 (Pielikums 9).

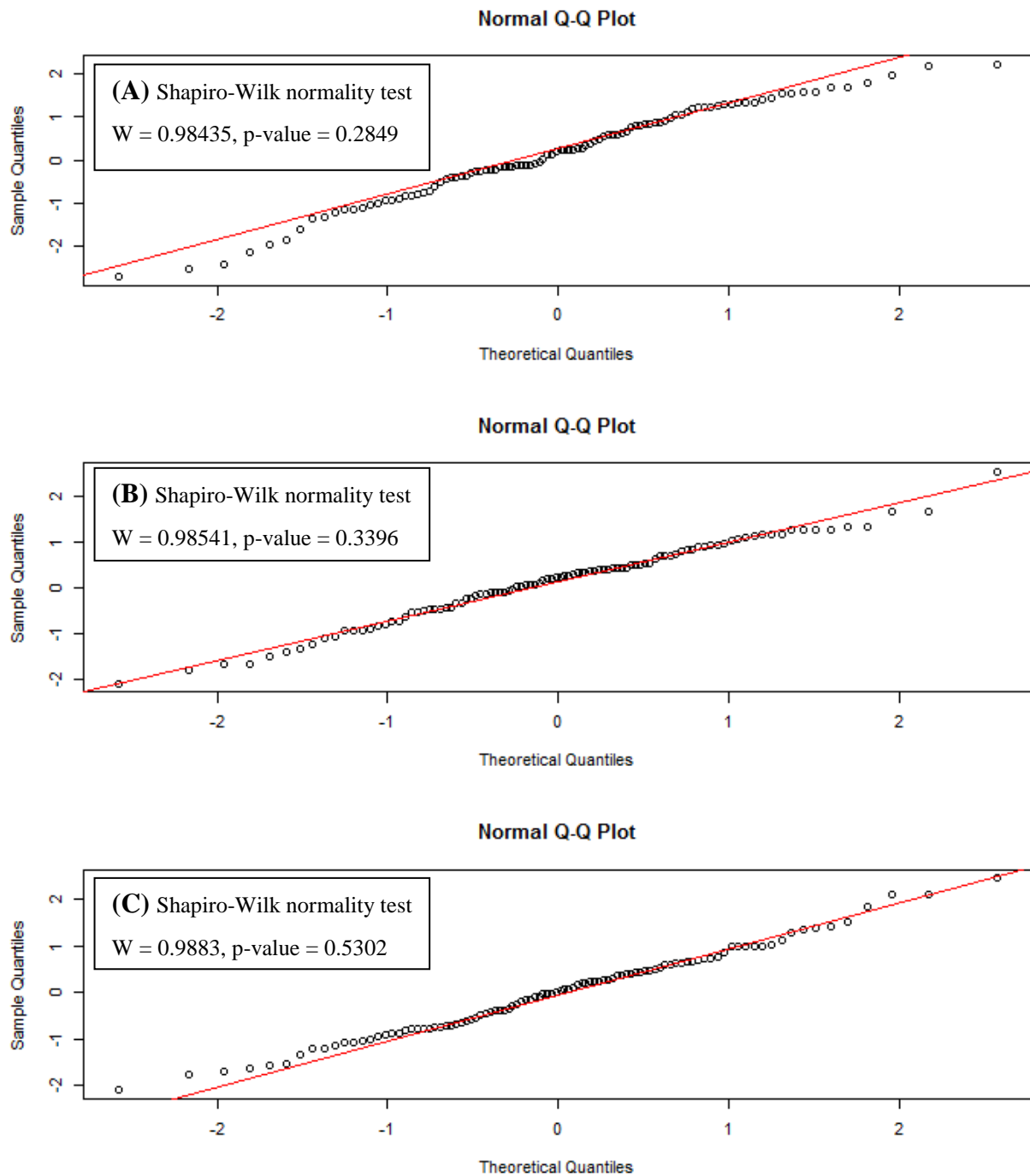
Pielikums 8

L. edodes 3565 micēlija biomasa (g) un lakāzes aktivitāte (●, U/mL) bezpiedevu ½ MEB šķidrās barotnēs (140rpm)

L. edodes 3565 mycelium dry weight (g) and laccase activity (●, U/mL) in ½ MEB submerged media (140rpm).



L. edodes 3565 lakāzes aktivitāte (U/mL) šķidrās barotnēs, paraugkopu normālsadalījums
L. edodes 3565 laccase activity (U/mL) in submerged medium, sample normal distribution



“A” bezpiedevu barotnes; “B” hemicelulozi un celulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva (C%=0.50); “C” hemicelulozi nesaturoša kviešu salmu piedeva (C%=0.50).

“A” medium without additives; “B” wheat straw additive without hemicellulose and cellulose (C%=0.50); “C” wheat-straw additive without hemicellulose(C%=0.50).