

Svetlana Raita

SKRĪNINGA METODE UZLABOTAI VIENŠŪNU PROTEĪNA RAŽOŠANAI

Promocijas darba kopsavilkums



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultāte
Vides aizsardzības un siltuma sistēmu institūts

Svetlana Raita

Doktora studiju programmas "Vides inženierija" doktorante

SKRĪNINGA METODE UZLABOTAI VIENŠŪNU PROTEĪNA RAŽOŠANAI

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskie vadītāji
Ph. D. KRIŠS SPALVIŅŠ
docents *Dr. chem.*
KĀRLIS VALTERS
Zinātniskais konsultants
Dr. chem. TARAS MIKA

RTU Izdevniecība
Rīga 2025

Raita S. Skrīninga metode uzlabotai viēnšūnu proteīna ražošanai. Promocijas darba kopsavilkums. Rīga: RTU Izdevniecība, 2025. 38 lpp.

Publicēts saskaņā ar promocijas padomes "RTU P-19", 2024. gada 28. augusta lēmumu, protokols Nr. 208.

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Zinātnes padomes finansētā fundamentālo un lietišķo pētījumu projektā Nr. LZP-2022/1-0126 "Herbicīdi kā līdzeklis ēdamu, proteīniem bagātu mutantu selekcijai". Atbalstu sniedza arī Eiropas Sociālais fonds projektā Nr. 8.2.2.0/20/I/008 "Rīgas Tehniskās universitātes un Banku augstskolas doktorantu un akadēmiskā personāla stiprināšana stratēģiskās specializācijas jomās".



FLPP
FUNDAMENTAL AND
APPLIED RESEARCH
PROJECTS



Latvian Council of Science



European Union
European
Social Fund

Vāka attēla autore Svetlana Raita

<https://doi.org/10.7250/9789934371547>

ISBN 978-9934-37-154-7 (pdf)

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2025. gada 27. februārī plkst. 14 Rīgas Tehniskās universitātes Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātē, Āzenes ielā 12/1, 607. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors *Dr. sc. ing.* Ainis Lagzdīņš,
Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte, Latvija

Profesore *Dr. chem.* Elena Bartkiene,
Lietuvas Veselības zinātnes universitāte, Lietuva

Profesore *Ph. D.* Tiina Alamäe,
Tartu Universitāte, Igaunija

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Svetlana Raita (paraksts)

Datums:

Promocijas darbs ir uzrakstīts angļu valodā, tajā ir ievads, trīs nodaļas, secinājumi, 13 attēli, 22 tabulas, deviņi pielikumi, kopā 219 lappuses, ieskaitot pielikumus. Literatūras sarakstā ir 354 nosaukumi.

SATURS

Darbā izmantotie saīsinājumi.....	5
Ievads	6
Promocijas darba aktualitāte	6
Promocijas darba mērķis un uzdevumi	7
Izvirzītā hipotēze.....	7
Zinātniskā novitāte	7
Praktiskā vērtība.....	8
Promocijas darba struktūra	8
Promocijas darba zinātniskā aprobācija	9
1. Literatūras apskats	12
1.1. Vienšūnu proteīnu potenciāls akvakultūras barībā	12
1.2. Eksperimentālam pētījumam izvēlēta rauga suga	13
2. Metodoloģija	14
2.1. Daudzkritēriju lēmumu pieņemšanas analīze	14
2.2. Sagatavošanās pētījuma eksperimentālajai daļai	14
Barotņu un šķīdumu sagatavošana.....	14
Mikroorganisma celms un inokulātu sagatavošana	15
Mutaģenēze.....	15
Šūnu skaita un augšanas dinamikas noteikšana	16
Aminoskābju biosintēzes inhibitora koncentrācijas noteikšana	16
Mutantu skrīnings	16
Kultivēšana kolbās	17
2.3. Analītiskās metodes biomasas novērtēšanai.....	17
Kopproteīna satura noteikšana	17
Aminoskābju profila noteikšana	17
Vienšūnu proteīna kvalitātes novērtēšana.....	18
Astaksantīna satura noteikšana	18
Statistiskās analīzes.....	18
3. Rezultāti un diskusija.....	19
3.1. Aminoskābju biosintēzes inhibitoru daudzkritēriju lēmuma pieņemšanas analīzes rezultāti	19
3.2. <i>Phaffia rhodozyma</i> augšanas inhibīcijas eksperimenti	20
S-(2-aminoetil)-L-cisteīna ietekme uz <i>Phaffia rhodozyma</i> augšanu	20
Glufosināta amonija ietekme uz <i>Phaffia rhodozyma</i> augšanu.....	21
Metionīna sulfoksimīna ietekme uz <i>Phaffia rhodozyma</i> augšanu	23
3.3. Atlasīto mutantu analīze	25
Glicerīna-sāls barotnē izaudzētu mutantu analīze.....	25
Glicerīna-peptona barotnē izaudzētu mutantu analīze.....	27
Secinājumi	32
Izmantotā literatūra	33

DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

AAS – aminoskābju rādītājs
AEC – S-(2-aminoetil)-L-cisteīns
Ala – alanīns
Arg – arginīns
Asp ac – asparagīnskābe
ATX – astaksantīns
BCA – bicinchonīnskābes tests
Cys – cisteīns
EAA – neaizstājamas aminoskābes
EAAI – neaizstājamo aminoskābju indekss
Em. – emisija
EMS – etilmetānsulfonāts
Ex. – ierosme
FAO – Pārtikas un lauksaimniecības organizācija
g – smaguma spēks, relatīvā centrālās spēka mērvienība
GA – glufozināta amonijs
Gly – glicīns
Glu ac – glutamīnskābe
GPM – ar glicerīna-peptona barotne
GSM – glicerīna-sāls barotne
His – histidīns
Ile – izoleicīns
YM – rauga barotne
YNB – rauga slāpekļa bāze bez aminoskābēm
Leu – leicīns
Lys – lizīns
M – mols
MCDA – daudzkritēriju lēmumu analīze
Met – metionīns
MSO – L-metionīna sulfoksimīns
n/a – nav analizēts
NEAA – aizstājamas aminoskābes
OD – optiskais blīvums
Phe – fenilalanīns
Pro – prolīns
rpm – apgriezieni minūtē
SCP – viēnsūnu proteīns
Ser – serīns
Thr – treonīns
Tyr – tirozīns
TOPSIS – metode, kas ļauj alternatīvām noteikt relatīvās tuvības koeficientu ideālajam risinājumam
Val – valīns

Saīsinājumi, kas lietoti mutantu apzīmējumam (GA6/5-1; GA7/4-3; AEC2/1-2; AEC3/9-1 utt.).

Pirmie burti norāda mutantu skrīningā izmantoto aminoskābju biosintēzes inhibitoru, nākamais cipars atbilst inhibitora koncentrācijai, cipars pēc slīpsvītras norāda mutanta sērijas numuru, cipars pēc defises norāda subkultūras skaitu.

IEVADS

Promocijas darba aktualitāte

Akvakultūra ir kļuvusi par vienu no nozīmīgākajiem globālās pārtikas ražošanas sektoriem, tomēr šī izaugsme rada nopietnus izaicinājumus, īpaši attiecībā uz barības nodrošināšanu. Viens no būtiskākajiem jautājumiem ir zivju miltu plašā izmantošana kā primārais proteīnu un lipīdu avots akvakultūras barībā, kur šie milti galvenokārt tiek iegūti no savvaļas zivju nozvejas. Katru gadu vairāk nekā 30 miljoni tonnu zivju tiek novirzīti nepārtikas vajadzībām, no kuriem 80 % tiek izmantoti akvakultūras barības ražošanai, radot ievērojamas problēmas saistībā ar savvaļas zivju krājumiem [1], [2]. Sojas miltu izmantošana akvakultūras barībā daļēji aizstāja zivju miltus, tomēr šāds risinājums radīja akvakultūras nozares atkarību no lauksaimniecības. Līdz ar ko patlaban pastāv augsta nepieciešamība pēc ilgtspējīgiem alternatīviem proteīnu avotiem, kas nekonkurē par resursiem ar pārtikas nozari [3], [4].

Viens no tādiem alternatīviem proteīnu avotiem ir vienšūnu proteīni (angļu val. *single-cell protein*, *SCP*). *SCP* ir sausa mikroorganismu biomasa, galvenokārt mikroaļģu, baktēriju, pelējuma sēņu un raugu, kas bagāta ar proteīniem. *SCP* tehnoloģijai ir daudz priekšrocību, salīdzinot ar tradicionālo proteīnu ražošanu, jo tā ir videi draudzīgāka (patērē mazāk ūdens, tai ir nepieciešamas mazākas zemes platības, to neietekmē klimatiskie apstākļi, to var ražot no agrorūpniecības blakusproduktiem) [5]–[7]. Palielinot *SCP* izmantošanu akvakultūras barībā un lopbarībā, varētu samazināt lauksaimniecības zemes un komerciālās nozvejas noslogu, vienlaikus pildot vides stratēģiju prasības, piemēram, samazinot šo nozaru siltumnīcefekta gāzu emisijas [8], [9].

SCP ražošanas tehnoloģijas ir plaši pētītas gadu desmitiem [10], un ir produkti, ko veiksmīgi izmanto kā pārtikas piedevu cilvēku un dzīvnieku barībai [11]. Patlaban *SCP* tiek ražoti ar dažādiem komerciāliem nosaukumiem, piemēram, *Brovile*®, *AlgaVia*®, *Quorn*®, *Vitam-R*®, *Pruteen*®, *Marmite*®, *FermentIQ*™ u. c. [11], [12]. Lai gan daži no tiem jau ir tirgū, tie joprojām ir nišas produkti, kas nav plaši pieejami vai patērēti [13]. Esošie ierobežojumi, piemēram, nepietiekama pārstrādes un ražošanas jauda, nepietiekami attīstīta infrastruktūra, augstas izmaksas, izdevumi u. c., kavē tehnoloģijas paplašināšanu un komerciālās dzīvotspējas sasniegšanu [14]. Tāpēc ir svarīgi veikt pētījumus, kuru mērķis ir uzlabot *SCP* tehnoloģijas. Mikroorganismi ir šo tehnoloģiju pamatā, un to produktivitāte un kvalitāte ir galvenie faktori, kas ietekmē tehnoloģijas konkurētspēju. Uzlabojot un radot celmus ar labākām īpašībām, var palielināt *SCP* konkurētspēju tirgū. Patlaban gēnu inženierija ir vienīgais veids, kā uzlabot proteīnu biosintēzi mikroorganismos [15], [16]. Tomēr Eiropas valstīs ģenētiski modificētus mikroorganismus ir aizliegts izmantot pārtikā un barībā bez nekaitīguma apstiprinājuma. Šādu mikroorganismu nekaitīguma apstiprināšana ir apgrūtināts process dažādu sarežģītu noteikumu un likumdošanas šķēršļu dēļ [14], [17], [18].

Promocijas darbā pētīta jauna pieeja radīt mikroorganismus ar uzlabotu aminoskābju profilu. Tiek ierosināts, ka sākumā mikroorganisma šūnas tiek pakļautas nejaušai mutāģenēzei, kam seko mutantu skrīnings selektīvā barotnē. Šis koncepts ir labi zināms, veidojot tādus mikroorganismu mutantus, kuriem mērķa metabolīta biosintēzes ceļa inhibīcija uzlaboja taukskābju un karotinoīdu sintēzi [19]–[21]. Interesanti, ka nejaušo mutāģenēzi plaši izmantoto,

lai uzlabotu mikroorganismu vēlamās īpašības, tomēr šī metode netiek izmantota proteīnu sintēzes uzlabošanai. Promocijas darbā pētīti aminoskābju biosintēzes inhibitori kā selektīvā spiediena līdzeklis, lai atlasītu rauga mutantus ar uzlaboto aminoskābju profilu. Tika pieņemts, ka mutaģenēzei pakļautas rauga šūnas, kas spēj augt barotnē ar aminoskābju biosintēzes inhibitoru devu, kas inhibē 100 % savvaļas tipa šūnas, ar lielu varbūtību sintēzē lielāku aminoskābju daudzumu.

Lai gan kopējā proteīna koncentrācija celmu biomasā ir nozīmīgs faktors, neaizstājamo aminoskābju koncentrācija nosaka iegūtā proteīna kvalitāti. Neaizstājamās aminoskābes, piemēram, lizīns, metionīns, treonīns un triptofāns, ir svarīgas zivju barībā, jo tradicionālajos proteīna avotos, piemēram, sojā, tās ir pieejamas limitējošā daudzumā [22], [23]. Tādējādi, radot *SCP* mutantus, ir svarīgi palielināt neaizstājamo aminoskābju īpatsvaru mikroorganismu biomasā.

Promocijas darba mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir izstrādāt metodi mikroorganismu mutantu skrīningam ar uzlabotu neaizstājamo aminoskābju biosintēzi. Skrīninga metode ir balstīta aminoskābju biosintēzes inhibitoru izmantošanā, lai identificētu mutantus, izmantojot selektīvo spiedienu.

Mērķa sasniegšanai definēti vairāki galvenie uzdevumi.

1. Novērtēt viensūnu proteīna sintēzes uzlabošanas stratēģijas.
2. Izveidot aminoskābju biosintēzes inhibitoru datubāzi.
3. Veikt aminoskābju biosintēzes inhibitoru daudzkritēriju lēmuma pieņemšanas analīzi.
4. Veikt eksperimentālu pētījumu, lai radītu mutantus ar uzlabotu neaizstājamo aminoskābju biosintēzi.

Izvirzītā hipotēze

Aminoskābju biosintēzes inhibitoriem (aktīvām herbicīdu vielām) ir potenciāls būt skrīninga rīkam, lai atlasītu mutantus ar uzlabotu aminoskābju profilu.

Zinātniskā novitāte

Promocijas darbā pētīta jauna pieeja, kā atlasīt mikroorganismu mutantus ar paaugstinātu neaizstājamo aminoskābju biosintēzi. Darba gaitā tika izstrādāta aminoskābju biosintēzes inhibitoru datubāze, darba zinātnisko novitāti veido fakts, ka šīs ķīmiskās vielas kā proteīnu sintezējošo mutantu skrīninga rīks tika aplūkotas pirmo reizi. Līdz ar to vienuviet tika apkopoti pieejamie zinātniskie raksti par aminoskābju biosintēzes inhibitoru ietekmi uz mikroorganismiem.

Eksperimentālajam pētījumam ir augsta zinātniskā novitāte, jo tas apraksta mutantu radīšanas un skrīninga metodi, kā arī metodes specifiskās nianšes un nepilnības. Turklāt radītie mutantu validē jaunu rīku mutantu atlasē, kas liek pamatus šīs metodes tālākai attīstībai zinātniskajā sabiedrībā. Izstrādātā metode ir elastīga un piemērojama dažādu aminoskābju grupu biosintēzes uzlabošanai dažādos mikroorganismos.

Nozīmīgs promocijas darba rezultāts ir rauga *Phaffia rhodozyma* mutantu radīšana. Šis raugs ir izmantojams nelielos daudzumos kā astaksantīna piedeva akvakultūras barībā. Šī rauga

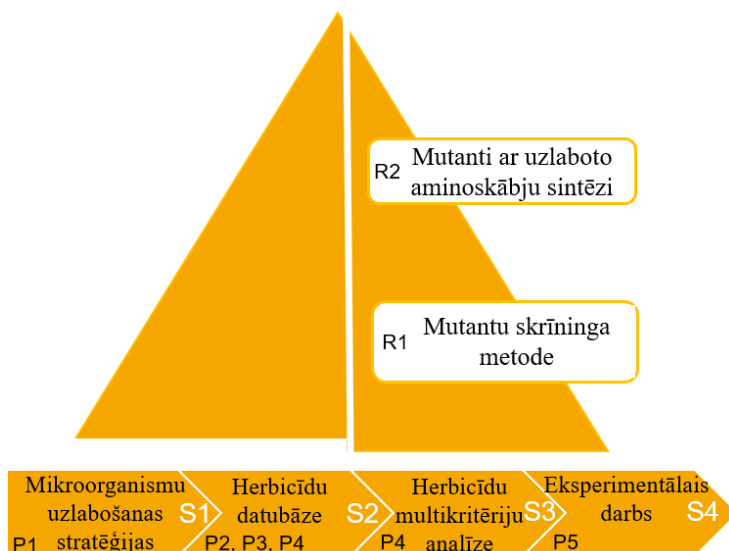
proteīnu analīze parādīja, ka tas kā *SCP* ražotājs līdz šim ir nepietiekami novērtēts. Radītie mutanti ar būtiski palielinātu lizīna, metionīna, fenilalanīna, izoleicīna un triptofāna sintēzi uzrādīja labāku proteīnu kvalitāti, salīdzinot ar tradicionālajiem *SCP* ražojošajiem raugiem. Šis atklājums paver jaunas iespējas izstrādāt tehnoloģiju, vienlaikus ražojot divus mikrobiālus produktus, *Phaffia rhodozyma* gadījumā – astaksantīnu un proteīnu.

Praktiskā vērtība

Saskaņā ar Pārtikas un lauksaimniecības organizācijas (*FAO*) paziņojumu [24] *SCP* tehnoloģiju attīstība ir svarīga, lai samazinātu slogu tradicionālajām barības proteīnu ražošanas nozarēm. Tāpēc uzlaboti komerciāli celmi, kas bagāti ar aminoskābēm, īpaši izceļot lizīnu un metionīnu, varētu kalpot kā ilgtspējīgi alternatīvo proteīnu avoti akvakultūru barībā. Izstrādātajai un eksperimentāli apstiprinātajai metodoloģijai ir tiešs praktisks lietojums biotehnoloģijās, kur produktīvi celmi var ievērojami palielināt *SCP* ražošanas efektivitāti un samazināt izmaksas. Pētnieki un zinātnieki *SCP* ražošanas jomā var izmantot promocijas darbā sniegtos datus un metodoloģiju, lai radītu uzlabotus celmus komercializācijai vai validētu jaunus celmus, kas iepriekš nav izvērtēti kā viensūnu proteīnu potenciālie ražotāji.

Promocijas darba struktūra

Promocijas darbs ietver četrus galvenos posmus (1. attēls). Pirmajā posmā (S1) tika apskatītas divas *SCP* ražošanas uzlabojošās stratēģijas – mikrobiālās fermentācijas apstākļu optimizācija (pirmā publikācija – P1) un nejaušā mutāģenēze, lai radītu uzlabotus *SCP* ražojošus mutantus (trešā publikācija – P3). Otrajā posmā (S2) tika izveidota herbicīdu datubāze, kurā apkopoti herbicīdu veidi, mērķa aminoskābes, iespējamās blakusparādības (otrā publikācija – P2), kā arī apkopoti pētījumi par mikroorganismu inhibīcijas pakāpi, izmantotajām devām un specifiskajiem lietošanas nosacījumiem (P3). Trešajā posmā (S3) tika veikta herbicīdu daudzkrītēriju analīze (*MCD*A), lai izvēlētos piemērotākos aminoskābju biosintēzes inhibitorus (ceturta publikācija – P4) turpmākai eksperimentālai izpētei. Pēdējā posmā (S4) tika veikti eksperimentālie darbi, lai radītu mutantus ar uzlabotu neaizstājamo aminoskābju biosintēzi, kas ietver mutāģenēzi, selektīvu mutantu skrīningu un atlasīto mutantu proteīnu analīzi (piektā publikācija – P5). Galvenie sagaidāmie rezultāti bija izstrādātā skrīninga metodoloģija (R1) un radītie mutanti (R2).



1. attēls. Promocijas darba struktūra. Burti S, P un R apzīmē soļus, publikācijas un rezultātus.

Promocijas darba zinātniskā aprobācija

Zinātniskās publikācijas, kas ir promocijas darba pamatā

1. Raita S., Kusnere Z., Spalvins K., Blumberga D. Optimization of yeast cultivation factors for improved SCP production. *Environmental and Climate Technologies*, 2022, vol. 26, no. 1, pp. 848–861. doi: 10.2478/rtuect-2022-0064.
2. Spalvins K., Raita S., Valters K., Blumberga D. Improving single cell protein yields and amino acid profile via mutagenesis: Review of applicable amino acid inhibitors for mutant selection. *Agronomy Research*, 2021, vol. 19, no. 3, pp. 1285–1307. doi: 10.15159/ar.21.083.
3. Raita S., Berzina I., Kusnere Z., Kalnins M., Kuzmika I., Spalvins K. Herbicide-based selection of mutants for improved single cell protein synthesis: application and procedures. *Agronomy Research*, 2024, vol. 22, no. 2, pp. 913–938. doi: 10.15159/ar.24.060.
4. Berzina I., Raita S., Kalnins M., Spalvins K., Kuzmika I. In search of the best technological solutions for creating edible protein-rich mutants: a multi-criteria analysis approach. *Agronomy Research*, 2024, vol. 22, no. S1, pp. 370–400. doi: 10.15159/AR.24.039
5. Raita S., Kuzmika I., Geiba Z., Mika T., Spalvins K. Screening of protein-improved *Phaffia rhodozyma* mutants through selective pressure by herbicides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (tiek recenzēta).

Citas zinātniskās publikācijas

6. Raita S., Spalvins K., Blumberga D. Prospect on agro-industrial residues usage for biobutanol production. *Agronomy Research*, 2021, vol. 19, no. 1, pp. 877–895. doi: 10.15159/ar.21.084.
7. Raita S., Spalvins K., Raits E., Silicka I., Blumberga D. Effect of polysorbates on the growth of *Rhodotorula glutinis* in oil rich medium. *Environmental and Climate Technologies*, 2021, vol. 25, no. 1, pp. 1075–1085. doi: 10.2478/rtuect-2021-0081.
8. Raita S., Feldmane L., Kusnere Z., Spalvins K., Kuzmika I., Berzina I., Mika T. Microbial carotenoids production: strains, conditions, and yield affecting factors. *Environmental and Climate Technologies*, 2023, vol. 27, no. 1, pp. 1027–1048. doi: 10.2478/rtuect-2023-0075.
9. Spalvins K., Kusnere Z., Raita S. Sustaining a Mars colony through integration of single-cell oil in biological life support systems. *Environmental and Climate Technologies*, 2023, vol. 27, no. 1, pp. 339–367. doi: 10.2478/rtuect-2023-0026.
10. Berzina I., Kalnins M., Geiba Z., Raita S., Mika T., Spalvins K. Creating SCP-producing *B. subtilis* mutants using EMS mutagen and amino acid inhibitors. *Sientifica*, 2024, Nov. 8968295. doi: 10.1155/sci5/8968295.

Dalība zinātniskajās konferencēs

1. Spalvins K., Raita S., Valters K., Blumberga D. Improving single cell protein yields and amino acid profile via mutagenesis: a review of applicable amino acid inhibitors for mutant selection. XII International Conference of Biosystems Engineering, 5.–7. maijs, 2021., Igaunija, Tartu.
2. Spalvins K., Raita S., Blumberga D. Optimization of yeast cultivation factors for improved SCP production. XV International Scientific Conference of Environmental and Climate Technologies, 11.–13. maijs, 2022., Latvija, Rīga.
3. Raita S., Berzina I., Kusnere Z., Kalnins M., Kuzmika I., Spalvins K. Herbicide-based selection of mutants for improved single cell protein synthesis: application and procedures. XV International Conference "Biosystems Engineering", 8.–10. maijs, 2024., Igaunija, Tartu.
4. Berzina I., Raita S., Kalnins M., Kuzmika I., Spalvins K. In search of the best technological solutions for creating edible protein-rich mutants: a MCDA approach. XV International Conference of Biosystems Engineering, 8.–10. maijs, 2024., Igaunija, Tartu.
5. Saronova J., Raita S., Spalvins K. Creation of single cell protein-producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. XVII International Scientific Conference of Environmental and Climate Technologies, 15.–17. maijs, 2024., Latvija, Rīga.

Vadītie un līdzvadītie bakalaura un maģistra darbi

1. Elizabete Lošmele. Eļļas ražojošo mikroorganismu UV mutantu radīšana. Bakalaura darbs. RTU, 2022. (Latviešu valodā).

2. Sintija Ozola. Vienšūnu proteīna ražojošo mikroorganismu UV mutantu radīšana. Bakalaura darbs. RTU, 2022. (Latviešu valodā).
3. Iveta Kuzmika. *Phaffia rhodozyma* blakusproduktu barotnes un kultivācijas apstākļu optimizācija. Bakalaura darbs. LU, 2023. (Latviešu valodā).
4. Baiba Paegle. *Phaffia rhodozyma* astaksantīna producējošo mutantu radīšana. Bakalaura darbs. RTU, 2023. (Latviešu valodā).
5. Linda Feldmane. Astaksantīnu producējošā mikroorganisma *Phaffia rhodozyma* mutāģenēze un īpašību analīze. Maģistra darbs. RTU, 2023. (Angļu valodā).
6. Jeļizaveta Šaronova. *Phaffia rhodozyma* vienšūnu proteīnu producējošo mutantu radīšana. Maģistra darbs. RTU, 2024. (Angļu valodā).
7. Liega Krasovska. Tehnoloģijas attīstības novērtējums: olbaltumvielu un karotinoīdu ražošana no rauga biomasas. Maģistra darbs. RTU, 2024. (Angļu valodā).

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Vienšūnu proteīnu potenciāls akvakultūras barībā

Akvakultūras barība parasti satur vairāku proteīna avotu kombināciju un vajadzības gadījumā tiek papildināta ar tīrām aminoskābēm, lai nodrošinātu nepieciešamo aminoskābju līdzsvaru [25]. Pārsvārā akvakultūras barības sastāvā izmanto zivju miltus, pākšaugus, eļļas augus, dzīvnieku blakusproduktus, vēžveidīgo un aļģu miltus [26], [27]. Katram no šiem avotiem ir atsevišķas neaizstājamās aminoskābes limitējošā daudzumā. Augu izcelsmes proteīnos parasti ir mazāk metionīna, triptofāna, lizīna un cisteīna. Dzīvnieku izcelsmes proteīnos, izņemot zivju miltus, trūkst treonīna, metionīna, cisteīna, izoleicīna un tirozīna [26], [27]. Aļģu proteīnā ir mazāk histidīna un metionīna [28]. Savukārt zivju miltus uzskata par līdzsvarotāku neaizstājamo aminoskābju avotu zivju uzturā. Zivju miltus pārsvārā ražo no mazām pelaģiskām barības zivīm, piemēram, makrelēm, siļķēm, sardīnēm, anšovjiem, un nelielu daļu no zivju blakusproduktiem un atkritumiem [24], [29]–[31].

Sākotnēji zivju miltus izmantoja kā efektīvu un lētu proteīniem bagātu barības sastāvdaļu akvakultūrās audzētajām sugām. Tomēr nozvejas produktivitātes samazināšanās un zivju miltu pieprasījuma pieaugums izraisīja ievērojamas cenu izmaiņas [31]. Zivju miltu cena pēdējo 20 gadu laikā ir palielinājusies no 599 EUR/t 2013. gadā līdz 1673 EUR/t 2023. gadā, un paredzams, ka tā turpinās pieaugt [24], [32]. Pašlaik vairāk nekā 80 % (86 % 2020. gadā) zivju miltu tiek izmantoti, lai ražotu barību akvakultūru sugu, galvenokārt garneļu, lašu un citu jūras zivju, piemēram, jūras asaru, audzēšanai [24]. Zivju milti ir galvenā sastāvdaļa zivju barības sastāvā. Varavīksnes foreļu barībā ir 30–68 %, savukārt Atlantijas lašu barībā ir 28,8–60,5 % zivju miltu kopējā barībā atkarībā no zivs augšanas stadijas [26], [33]. Akvakultūras nozares paplašināšanai ir jāizstrādā papildu ekonomiski un ekoloģiski dzīvotspējīgi risinājumi, lai apmierinātu pieaugošo pieprasījumu pēc barības. Tāpēc ilgtspējīgai akvakultūras audzēšanai ir jāsamazina atkarība no zivju miltiem, aizstājot tos ar alternatīviem proteīnu avotiem [24], [34], [35].

Vienšūnu proteīni (SCP) ir daudzsološa alternatīva zivju miltiem un augu izcelsmes proteīniem [36], [37]. SCP ir ar proteīniem bagāta žāvēta mikroorganismu biomasa no, piemēram, aļģēm, baktērijām, pelējuma sēnēm, raugiem un protistiem [38], [39]. Mūsdienās ražotāji zivju barības sastāvā veiksmīgi izmanto tādu mikroorganismu biomasu kā *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis gaditana*, *Schizochytrium sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Spirulina maxima*, *Methylococcus capsulatus*, *Methylophilus methylotrophus* un *Methylobacterium extorquens* [25], [40]. Nesenie eksperimentālie barošanas izmēģinājumi liecina, ka ar rauga SCP var aizstāt no 15 % līdz 60 % zivju miltu zivju barībā, kas atbilst līdz 345 g rauga uz kg barības [37], [41]–[43]. Piemēram, pētījuma [41] rezultāti liecina, ka *S. cerevisiae* var aizstāt līdz pat 40 % zivju miltu varavīksnes foreļu barībā, nepasliktinot zivs augšanas rādītājus, barības vielu uzsūkšanos vai veselību. *W. anomalus* izmantošana varavīksnes foreļu barībā 20 % apjomā uzlaboja fosfora uzsūkšanos zarnu traktā, vienlaikus samazinot fosfora patēriņu [41]. Interesanti, ka piemērotais *S. cerevisiae* biomasas daudzums barībā ir atkarīgs no zivju sugas. Tādējādi šis raugs var aizstāt

50 % zivju miltu barībā jūras asariem un taimiņiem, 20 % – sarkanām jūras karūsām un 15 % – Nilas tilapijām bez negatīvas ietekmes uz augšanu. Turklāt pētījumā tika uzlabota barības konversija zivs dzīvsvārā [37]. SCP var veiksmīgi izmantot arī zivju barošanai agrīnā dzīves ciklā. Šajā periodā zivīm barībā ir nepieciešams vairāk proteīna, jo notiek intensīvs ķermeņa svara pieaugums [44], [45]. Līdzīgi kā ar raugiem, baktēriju SCP izmantošana varavīksnes foreļu mazuļu barībā aizstāja 50 % zivju miltu un uzlaboja barības konversijas koeficientu, salīdzinot ar standarta barību [44].

1.2. Eksperimentālam pētījumam izvēlētā rauga suga

Pētījumam, kas aprakstīts promocijas darba eksperimentālajā daļā, tika izvēlēts sarkanais raugs *Phaffia rhodozyma*. *P. rhodozyma* jeb tās teleomorfs *Xanthophyllomyces dendrorhous* ir labi zināms karotinoīdus sintezējošs raugs, ko izmanto kā dabīgu astaksantīna piedevu lašveidīgo zivju barībai (piemēram, *Aquasta*[®] un *RedStar*[®]) [41], [46]. Šis raugs ir pētīts pēdējos 50 gadus, lai izstrādātu konkurētspējīgu dabīgā astaksantīna ražošanas tehnoloģiju [47]. Interesanti, ka *P. rhodozyma* biomasa tika skatīta kā astaksantīna avots, bet netiek ņemts vērā tā proteīnu un taukskābju saturs. Normatīvajos dokumentos, kas apstiprina *P. rhodozyma* biomasas izmantošanu akvakultūras barības sastāvā, ir norādītas pieļaujamās astaksantīna koncentrācijas un nekaitīguma kritēriji piedevai [48]. Saskaņā ar Eiropas regulu 2015/1415 astaksantīna saturs nedrīkst pārsniegt 100 mg/kg gatavās barības, vienlaikus astaksantīna koncentrācijai *P. rhodozyma* biomasā jābūt augstākai par 0,5 % [48]. Pamatojoties uz šiem nosacījumiem, rauga *P. rhodozyma* biomasu kā barības piedevu iespējams izmantot aptuveni 20 g uz 1 kg gatavās barības. Pētījumi, ka šī rauga biomasa lielākā daudzumā pie zemākām astaksantīna koncentrācijām kaitē lašveidīgo vai citu dzīvnieku veselību, netika atrasti. Zivs barošanas eksperimentālais pētījums ziņo, ka 100 g/kg *P. rhodozyma* biomasas varavīksnes foreļu uzturā nodrošināja līdzīgu zivs augšanas ātrumu, salīdzinot ar līdzvērtīgu daudzumu SCP rauga papildinātu uztura devu [49]. Kopumā *P. rhodozyma* proteīnu un aminoskābju sastāvs ir maz pētīts. 19. gadsimta 80. un 90. gadu pētījumos ziņots, ka *P. rhodozyma* biomasa satur aptuveni 25–47 % proteīna, sabalansētu aminoskābju profilu un augstu taukskābju daudzumu [50]–[52].

Pie nosacījuma, ka *P. rhodozyma* biomasā ir apmierinošs proteīna saturs (30–50 %) un mērens astaksantīna saturs (0,02–0,05 %), tā var kļūt par lielisku barības sastāvdaļu lašveidīgo sugām. Pieņemot, ka rauga biomasu var pievienot 200–350 g uz 1 kg barības bez negatīvas ietekmes uz zivs veselību, tā var daļēji aizstāt tradicionālos proteīnu avotus, vienlaikus nodrošinot nepieciešamo astaksantīna daudzumu barībā. Šāda pieeja, iegūstot SCP no *P. rhodozyma*, ļautu palielināt tehnoloģijas konkurētspēju un izstrādāt jaunu produktu barības tirgum. Promocijas darbā tika apskatīti un salīdzināti *P. rhodozyma* savvaļas celma un mutantu aminoskābju profili ar tradicionālajām SCP raugu sugām.

2. METODOLOĢIJA

2.1. Daudzkritēriju lēmumu pieņemšanas analīze

Šī pētījuma mērķis bija atrast un salīdzināt labākos aminoskābju biosintēzes inhibitorus uzlaboto mutantu selektīvajam skrīningam. Lai identificētu piemērotākos aminoskābju biosintēzes inhibitorus baktēriju un sēņu skrīningam, tika izmantota daudzkritēriju lēmumu pieņemšanas analīzes (*MCDA*) *TOPSIS* (angļu val. *a technique for order preference by similarity to ideal solution*) metode un *AHP* (angļu val. *analytic hierarchy process*). *TOPSIS* rīks tika izmantots, lai aprēķinātu aminoskābju biosintēzes inhibitoru alternatīvām relatīvās tuvības koeficientu ideālajam risinājumam, proti, nosakot labāko alternatīvu atkarībā no kritērijiem. Relatīvās tuvības koeficients vienmēr ir no 0 līdz 1, kur 1 ir ideālais vērtējums [53]. *AHP* rīks tika izmantots, lai piešķirtu kritērijiem svarus (2.1. tabula) pēc ekspertu viedokļa un matemātiskiem aprēķiniem, izvērtējot viena kritērija nozīmi attiecībā pret citu. *AHP* aprēķinos iegūtie kritēriju svāri tika integrēti *TOPSIS* aprēķinos, lai palielinātu iegūto rezultātu ticamību [54].

Pētījumā tika novērtētas šādas aminoskābju biosintēzes inhibitoru alternatīvas: glifosāts; metsulfuronmetils; sulfometuronmetils; hlorsulfurons; tribenuronmetils; imazapīrs; imazapīks; imazetapīrs; imazamokss; imazametabenzs; imazakvins; glufozinātamonijs; L-metionīna sulfoksimīns; DL-propargilglicīns; L- α -(2-aminoetoksivinil)glicīns; S-(2-aminoetil)-L-cisteīns; amitrols.

Aminoskābju biosintēzes inhibitori tika vērtēti pēc četriem kritērijiem – inhibitora cena, inhibīcijas efektivitāte, inhibēto neaizstājamo aminoskābju īpatsvars un drošība (2.1. tabula).

2.1. tabula

TOPSIS izmantotie kritēriji un *AHP* svāri

Nr.	Kritēriji	Mērvienība	Svārs
C1	Aminoskābju biosintēzes inhibitora cena*	€/100 mg	0,17
C2	Inhibīcijas efektivitāte	–	0,28
C3	Inhibēto neaizstājamo aminoskābju īpatsvars	%	0,47
C4	Kopējais veselības un vides apdraudējumu skaits	–	0,08
	Σ		1

* Aminoskābju biosintēzes inhibitoru cenas tika noteiktas pēc vietējo ķīmisko vielu piegādātāju aptaujas.

2.2. Sagatavošanās pētījuma eksperimentālajai daļai

Barotņu un šķīdumu sagatavošana

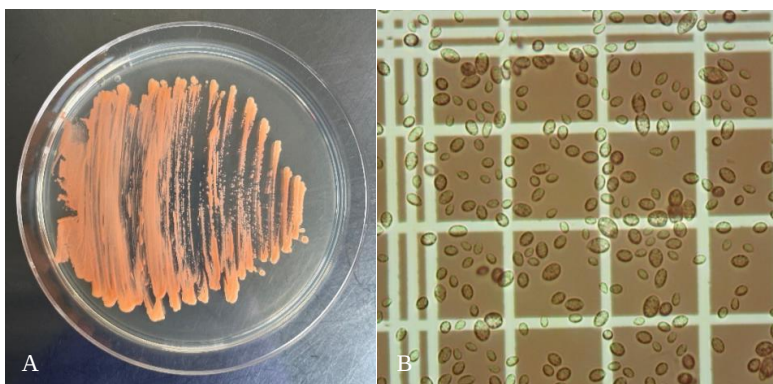
P. rhodozyma inokulāts tika kultivēts šķidrā rauga barotnē (*YM*), kas sastāv no 10 g/L glikozes, 5 g/L peptona, 3 g/L iesala ekstrakta un 3 g/L rauga ekstrakta. Eksperimentālā glicerīna-sāls barotne (*GSM*) sastāvēja no 40 g/L glicerīna, 4,83 g/L NH_4Cl , 1 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,88 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 g/L $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$, 1,7 g/L rauga slāpekļa bāzes (*YNB*) bez aminoskābēm, pH $6,0 \pm 0,1$). Glicerīna-peptona barotne (*GPM*) tika

izmantota eksperimentu tālākā posmā, un tā sastāv no 70 g/L glicerīna, 32 g/L sojas peptona, 10 g/L rauga ekstrakta, 1,7 g/L YNB, pH $5,0 \pm 0,1$.

Glufozinātamonijs (CAS 77182-82-2) tika iegādāts no *Combi-Blocks* (ASV). S-(2-aminoetil)-L-cisteīna hidrohlorīds (CAS 2936-69-8) un L-metionīna sulfoksimīns (CAS 15985-39-4) tika iegādāts no *Sigma-Aldrich* (ASV). Herbicīdu-ūdens šķīdumi tika sterilizēti caur 0,22 μm poru izmēru šļircēs filtru un līdz eksperimentiem uzglabāti 8 °C temperatūrā.

Mikroorganisma celms un inokulātu sagatavošana

Rauga kultūra *P. rhodozyma* DSM 5626 tika iegādāta no Vācijas Mikroorganismu un šūnu kultūru kolekcijas Leibnīcas institūta. Pirms eksperimentiem svaigu rauga kultūra tika uzglabāta 4 °C temperatūrā uz YM agara plates (2.1. A attēls). Pirms eksperimenta uzlikšanas inokulāts tika kultivēts 50 mL koniskajā kolbā 20 mL YM barotnes divas dienas 250 apgriezienos/min 22 °C.



2.1. attēls. *Phaffia rhodozyma* DSM 5626 uz YM agara plates (A), mikroskopējot paraugu 400 $\times$ palielinājumā (B).

Mutaģenēze

P. rhodozyma DSM 5626 šūnu mutaģenēzei tika izmantots etilmetānsulfonāts (EMS, *Sigma Aldrich*) 4 % koncentrācijā. EMS koncentrāciju, kas izraisa 50–95 % *P. rhodozyma* DSM 5626 šūnu bojāeju, iepriekš eksperimentāli noteica Feldmane [55]. EMS mutaģenēzes metode tika balstīta literatūras datos ar modifikācijām [21], [55], [56].

Īsumā, 48 stundu inokulātu šūnas tika ievāktas un divas reizes mazgātas ar 50 mM kālija fosfāta buferšķīdumu (pH 7,0). Pēc tam tās tika pārnestas 4 % EMS un 50 mM kālija fosfāta buferšķīdumā (EMS šķīdums). Šajā šķīdumā šūnas tika inkubētas 2 h 22 °C uz rotācijas kratītāja ar ātrumu 250 apgriezieni/min. Pēc tam, kad EMS tika neitralizēts ar 5 % nātrija tiosulfātu, tās tika ievāktas un divas reizes mazgātas ar kālija fosfāta buferšķīdumu, un noslēgumā suspendētas ar YM barotnē nakts kultivēšanai. Nākamajā dienā šūnas divas reizes tika mazgātas ar kālija fosfāta buferšķīdumu, lai izskalotu YM barotni. Pēc tam šūnas tika suspendētas ar GSM barotni, saskaitītas un inokulētas mikroplatē.

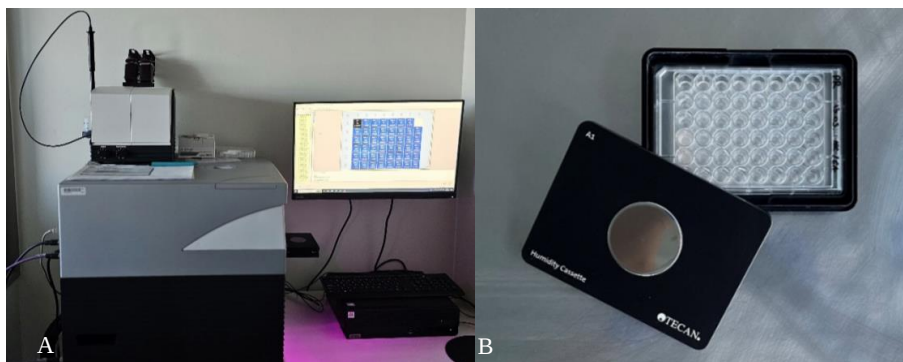
Šūnu skaita un augšanas dinamikas noteikšana

Rauga šūnu skaita un augšanas dinamikas noteikšanai tika izmantotas šādas metodes un aprīkojums:

- šūnu skaitīšana zem gaismas mikroskopa (*Micros Austria, MCX100LCD*) ar $400 \times$ palielinājumu, izmantojot hemocitometru (*Assistant, Neubauer improved*, 0,1 mm dziļuma kamera) (2.1. B attēls), šūnas/mL;
- kultūras optiskā blīvuma (*OD*) noteikšana pie 600 nm mikroplašu lasītājā (*TECAN Spark®*) un datu apstrāde ar *SparkControlMagellan™* programmatūru;
- sausās biomasas daudzuma noteikšana ar termogravimetrisko metodi, g/L;
- specifiskā augšanas ātruma noteikšana, μ .

Aminoskābju biosintēzes inhibitoru mērķa koncentrācijas noteikšana

Mikroorganismu inhibīcijas eksperimenti tika veikti caurspīdīgās 48 šūnu mikroplatēs. *GSM* barotnei tika pievienoti inhibitori atbilstošā koncentrācijā, kā arī inokulāts $1,0 \times 10^6$ šūnu/mL koncentrācijā. Katrai inhibitora koncentrācijai tika veikti trīs atkārtojumi. Augšanas inhibēšanai testēto herbicīdu koncentrācijas bija no 0,1–350 mM glufozinātamonijam (GA), 0,1–50 mM S-(2-aminoetil)-L-cisteīnam (AEC) un 0,01–50 mM metionīna sulfoksimīnam (MSO). Mikroplate tika inkubēta līdz sešām dienām mikroplašu lasītājā (2.2. A attēls) 22 °C temperatūrā pie 216 rpm mitruma kasetē (2.2. B attēls), lai samazinātu barotnes izžušanu. Papildus *OD* mērījumiem katra parauga tripleta šūnas pēc kultivēšanas tika mikroskopētas un saskaitītas. Turpmākai mutantu skrīninga veikšanai tika izvēlētas minimālās aminoskābju biosintēzes inhibitoru koncentrācijas, kas izraisa pilnīgu rauga augšanas inhibīciju.



2.2. attēls. (A) Mikroplašu lasītājs (*TECAN Spark®*), (B) mikroplate mitruma kasetē.

Mutantu skrīnings

Mutaģenēzei pakļautās *P. rhodozyma* šūnas $2,0 \times 10^6$ šūnu/mL koncentrācijā tika inokulētas 48 šūnu mikroplatēs, kas saturēja barotni ar dažādām aminoskābju biosintēzes inhibitoru koncentrācijām. Kontroles paraugi bija savvaļas tipa celms barotnē bez inhibitora, savvaļas tipa celms barotnē ar inhibitoru un mutaģenēzei pakļautās šūnas bez inhibitora. Eksperimentiem bija atšķirīgs kultivēšanas ilgums – no 91 h līdz 150 h – atkarībā no mutantu

augšanas ātruma mikroplatē. Katram paraugam tika veikta mikroskopēšana un šūnu skaitīšana. Mutanti, kuriem augšana bija labāka nekā kontroles šūnām savvaļas tipa celmam inhibitora barotnē, tika atlasīti subkulturāi jaunā mikroplatītē. 0,1 mL mutantu šūnu suspensijas tika pārnestas uz jaunu mikroplati, kas satur 0,4 mL *GSM* barotnes ar atbilstošo inhibitoru. Mutanti tika kultivēti identiskos apstākļos. Pēc katras subkultūras mutanti ar lielāko šūnu skaitu tika kultivēti 50 mL kolbās 15 mL *YM* barotnē bez inhibitora. Kultūras, kas sasniedza šūnu koncentrāciju $1,0 \times 10^6$ šūnu/mL un vairāk, tika izvēlētas par inokulātiem mutantu kultivēšanas testiem kolbās.

Kultivēšana kolbās

Pirmajā kolbu testā potenciālie mutanti un savvaļas tipa celms tika inokulēti ar sākotnējo šūnu koncentrāciju $1,0 \times 10^6$ šūnu/mL 20 mL *GSM* barotnē, inkubējot 11 dienas. Otrajā kolbas testā inokulāta šūnu koncentrācija tika dubultota, un *GSM* barotnes tilpums tika palielināts līdz 25 mL, lai iegūtu pietiekamu biomasas daudzumu analīzēm. Trešais un turpmākie testi tika veikti, izmantojot inokulātus ar šūnu koncentrāciju $1,0 \times 10^6$ šūnu/mL 25 mL *GPM* barotnē, inkubējot septiņas dienas. Pirms katra testa inokulāti tika divreiz skaloti sterilā ūdenī, un šūnu suspensija tika šķaidīta eksperimentālajā barotnē pirms skaitīšanas. Visi kolbu testi tika veikti 250 mL kolbās ar starpsienām trijos atkārtojumos 22 °C temperatūrā, izmantojot orbitālās rotācijas kratītājus (*Elmi, DOS-20L*) pie 250 rpm.

2.3. Analītiskās metodes biomasas novērtēšanai

Kopproteīna satura noteikšana

Kopproteīna koncentrācija sausā rauga biomasā tika noteikta ar biciklīnskābes (*BCA*) testu. Šūnu lizēšanas metode tika balstīta pētījumā [57] ar nebūtiskām modifikācijām. *BCA* tests tika veikts, izmantojot *BCA* proteīnu analīzes komplektu (*Millipore*, Nr. 71285-3). *OD* mērījumi tika veikti ar *UV-Vis* spektrofotometru (*ThermoFisher, BioMateTM 160*), izmantojot programmu "*Protein BCA*".

Aminoskābju profila noteikšana

Aminoskābju identifikāciju un kvantitatīvo noteikšana tika veikta, izmantojot šķīduma hromatogrāfiju (*HPLC*). *HPLC* analīze tika veikta *HPLC Shimadzu Nexera* sērijā, izmantojot *YMC-Triart C18* kolonnu (150 mm × 3,0 mm, 3 μm), tāda paša tipa aizsargkolonnas gradienta režīmā. Hromatogrāfijas apstākļi bija šādi [58]: A mobilās fāzes eluents acetoniitrils: metanols: H₂O = 45:40:15 (v/v/v) un B eluents 20 mM kālija fosfāta buferšķīdums pH 6,9; plūsmas ātrums – 0,7 mL/min; kolonnas temperatūra – 35 °C, parauga ievadišanas tilpums – 0,3 μL. Gradienta elūcijas programma bija 11 % B un 89 % A 03 min, 22 % B un 78 % A 12 min, 28 % B un 72 % A 14 min, 30 % B un 70 % A 23 min, 65 % B un 35 % A 27 min, 75 % B un 25 % A 34 min un 100 % B 35 min. Fluorescences *UV-Vis* detektēšana tika veikta divos kanālos: Ex. 350 nm un Em. 450 nm (029 min); prolinam Ex. 266 nm un Em. 350 nm (29–35 min) [58].

Pētījumā triptofāns netika noteikts, jo tam nepieciešami atšķirīgi hromatogrāfijas apstākļi (salīdzinot ar citām aminoskābēm) un proteīna hidrolīze sārmainā vidē, jo skābes hidrolīzes laikā (6 M HCl vidē) tas tiek iznīcināts [59], [60].

Vienšūnu proteīna kvalitātes novērtēšana

Rauga proteīna kvalitāte tika novērtēta, izmantojot divus svarīgus proteīna ķīmiskos parametrus – aminoskābju rādītāju (*AAS*) un neaizstājamo aminoskābju indeksu (*EAAI*). *AAS* novērtē atsevišķu neaizstājamo aminoskābju saturu testējamā proteīnā attiecībā pret references proteīnu vai mērķa dzīvnieka diētas prasībām [28], [61]. *AAS*, kas ir zemāks par 100 %, liecina par limitējošām aminoskābēm testētajā proteīnā [62]. *EAAI* novērtē proteīna kvalitāti, izmantojot neaizstājamo aminoskābju vidējo ģeometrisko vērtību attiecībā pret references proteīnu vai mērķa dzīvnieka diētas prasībām [28], [61]. Proteīna kvalitāte tiek vērtēta pēc šāda *EAAI* sadalījuma: 70 % – zema, no 70 % līdz 89 % – vidēja, virs 90 % – augsta [61], [63]. Par references proteīnu tiek pieņemts tāds proteīns, kas satur visas neaizstājamās aminoskābes nepieciešamos daudzumos, lai apmierinātu mērķa dzīvnieka vajadzības saskaņā ar *FAO* [62].

Astaksantīna satura noteikšana

Karotinoīdu ekstrakcijas metode tika balstīta *Luna-Flores et al.* pētījumā [21] ar nelielām izmaiņām. Astaksantīna saturs biomasā tika noteikts, izmērot parauga absorbciju pie viļņu garumiem 474 nm un 452 nm, izmantojot *UV-Vis* spektrofotometru (*ThermoFisher, BioMate™ 160*) "*Multi-wavelength*" programmu. Tukšajam mērījumam (*Blank*) tika izmantots heksāns un etilacetāta šķīdums proporcijā 1 : 1. Astaksantīna un β -karotīna daudzums paraugos tika aprēķināts pēc [64].

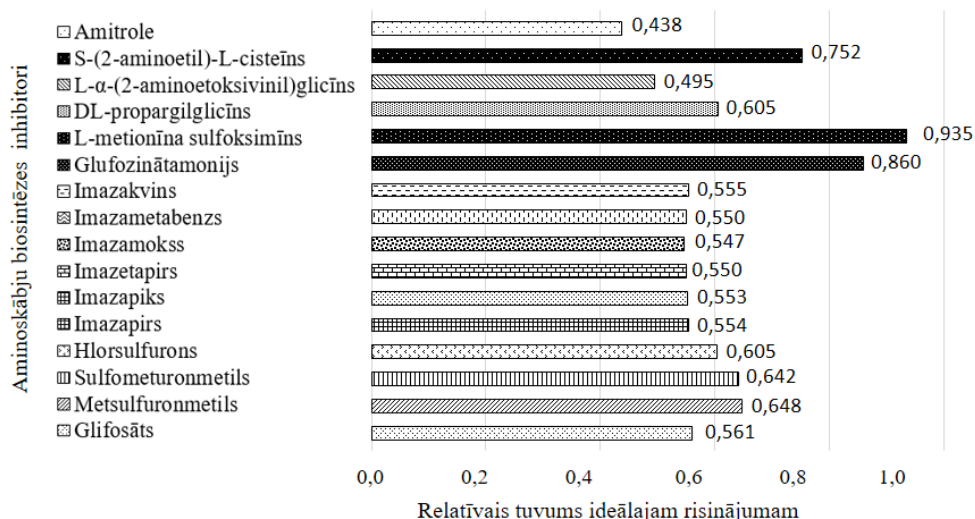
Statistiskās analīzes

Kultūru optiskā blīvuma, biomasas sausā svara, kopproteīna un astaksantīna satura dati ir parādīti kā trīs atkārtojumu vidējā vērtība. Rauga proteīna aminoskābju masas rezultāti ir divu atkārtojumu vidējie mērījumi. Kultūras optiskā blīvuma vērtību rezultāti mikroplatē tika analizēti, izmantojot vienvirziena dispersijas analīzi (*ANOVA*), kam sekoja Dunkana daudzskāršošanas tests. Biomasas, kopproteīna, astaksantīna un aminoskābju daudzumu tīrā proteīnā rezultāti tika analizēti, izmantojot vienvirziena *ANOVA*, kam sekoja *Tukey* nozīmīgas atšķirības (*HSD*) tests, izmantojot *SPSS* programmatūru (29.0 versija). Korelācijas analīze tika veikta ar *Spīrmena* korelācijas analīzi nenormalizētiem datiem un *Pīrsona* korelācijas analīzi normalizētiem datiem, izmantojot *Real Statistics Resource Pack for Excel (Rel 8.9.1 versija)*. Vidējās vērtības, kuru *p*-vērtība bija mazāka par 0,05, tika uzskatītas par statistiski nozīmīgām.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

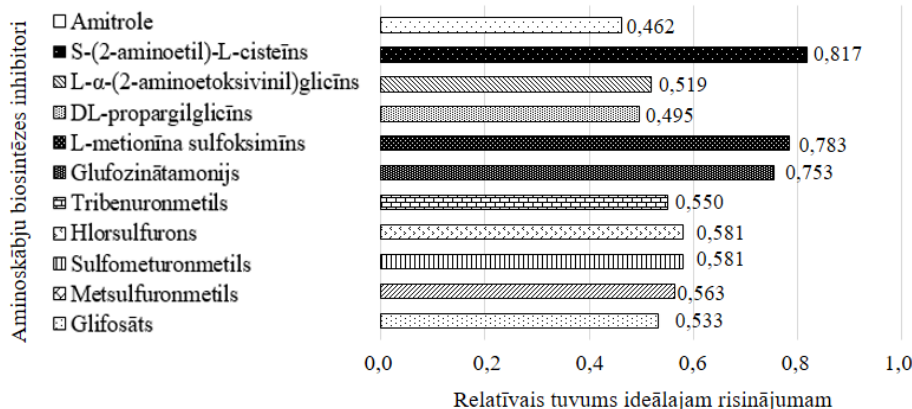
3.1. Aminoskābju biosintēzes inhibitoru daudzkritēriju lēmuma pieņemšanas analīzes rezultāti

Baktērijām un sēnēm izvēlēto aminoskābju biosintēzes inhibitoru *TOPSIS* rezultāti attēloti 3.1. un 3.2. attēlā. S-(2-aminoetil)-L-cisteīns, L-metionīna sulfoksimīns un glufozinātamonijs ieguva lielāko vērtējumu, salīdzinot ar pārējiem inhibitoriem baktēriju un sēņu inhibīcijai. Šāda prioritāte varētu būt skaidrojama ar lielāku svarīgo neaizstājamo aminoskābju īpatsvara inhibīciju, salīdzinot ar pārējiem herbicīdiem. S-(2-aminoetil)-L-cisteīns inhibē Met, Lys, Thr, Ile biosintēzi un L-metionīna sulfoksimīns un glufozinātamonijs inhibē Arg, Lys, Met, Thr, Ile un divu aizstājamu aminoskābju biosintēzi. Papildus tam šo inhibitoru cenas ir 10,86–33,86 EUR/100 mg, kas ir daudz zemākas nekā 117,94 EUR/100 mg par imazamoksu vai 2231,72 EUR/100 mg par L- α -(2-aminoetoksivinil)glicīnu.



3.1. attēls. Aminoskābju biosintēzes inhibitoru *TOPSIS* rezultāti attiecībā uz baktērijām.

Sulfonilurīnvielas (metsulfuronmetils, sulfometuronmetils, hlorsulfurons) un glifosāta *TOPSIS* rezultāti sēnēm sasniedza 0,533–0,581, kas ir ievērojami sliktāki nekā iepriekš minēto inhibitoru rezultāti (3.2. attēls). Attiecībā uz baktērijām sulfonilurīnvielu rezultāti ir nedaudz augstāki par imidazolinoniem, glifosātu un DL-propargilglicīnu, sasniedzot 0,605–0,648 vienības variācijas koeficientu. Sulfonilurīnvielu inhibitorus var izmantot kā nākamos inhibitorus baktēriju un sēņu skrīningā, lai atlasītu mutantu celmus ar palielinātu Ile, Leu un Val sintēzi. Tuvāk vissliktākajam risinājumam bija amitrole, kas sasniedza vidējās vērtības 0,438 baktērijām un 0,462 sēnēm.



3.2. att. Aminoskābju biosintēzes inhibitoru TOPSIS rezultāti attiecībā uz sēnēm.

Lai palielinātu inhibīcijas efektivitāti un inhibēto neaizstājamo aminoskābju skaitu, dažus inhibitorus var kombinēt selektīvajā barotnē. Piemēram, kombinācijas glifosāts + metsulfuronmetils un glifosāts + DL-propargilglicīns, teorētiski izraisītu selektīvo spiedienu uz Phe, Trp, Tyr + Ile, Leu, Val un Phe, Trp, Tyr + Met biosintēzi.

3.2. *P. rhodozyma* augšanas inhibīcijas eksperimenti

S-(2-aminoetil)-L-cisteīna ietekme uz *P. rhodozyma* augšanu

Lai noteiktu savvaļas tipa celma *P. rhodozyma* DSM 5626 inhibīcijas pakāpi, tika testētas septiņas S-(2-aminoetil)-L-cisteīna (AEC) koncentrācijas no 0,1 mM līdz 50 mM. Šim inhibitoram bija spēcīga inhibējoša iedarbība uz raugu. 0,1 mM AEC ievērojami inhibēja *P. rhodozyma* augšanu, 0,5 mM un augstākas koncentrācijas samazināja kultūras OD 2,5–3 reizes, salīdzinot ar kontroli bez inhibitora (3.1. tabula).

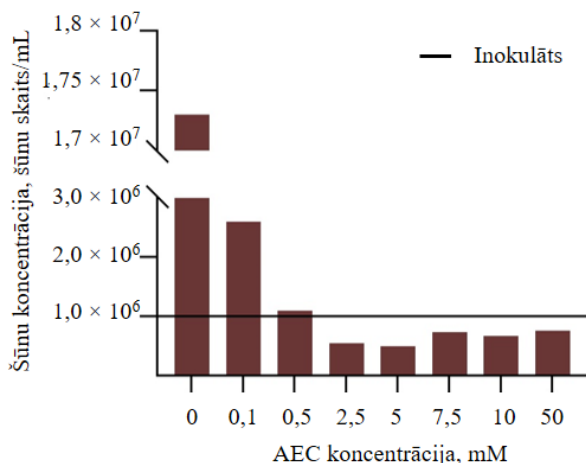
3.1. tabula

P. rhodozyma OD vērtības pie dažādām AEC inhibitora koncentrācijām

Paraugs	AEC koncentrācija, mM	Kultivēšanas laiks, h					
		0	24	48	73	96	116
Kontrole	0 ^a	0,069	0,231	0,467	0,612	0,723	0,818
AEC1	0,1 ^b	0,051	0,189	0,378	0,472	0,472	0,463
AEC2	0,5 ^c	0,048	0,133	0,202	0,287	0,350	0,321
AEC3	2,5 ^c	0,047	0,114	0,155	0,210	0,270	0,294
AEC4	5 ^c	0,048	0,115	0,154	0,203	0,262	0,289
AEC5	7,5 ^c	0,048	0,114	0,153	0,203	0,265	0,311
AEC6	10 ^c	0,049	0,117	0,157	0,206	0,268	0,304
AEC7	50 ^c	0,046	0,108	0,146	0,190	0,239	0,272

Piezīme. Atšķirīgi burti norāda statistisko nozīmību starp AEC koncentrācijām saskaņā ar Dunkana daudzkārtējo diapazonu testu 5 % līmenī ($p < 0,05$).

OD rezultātu analīze parādīja, ka kontroles parauga vidējā vērtība statistiski nozīmīgi atšķiras no paraugiem ar AEC inhibitoru, savukārt starp inhibitoru koncentrācijām bija tikai viens paraugs, kam bija statistiski nozīmīga atšķirība. Lai apstiprinātu pilnīgu rauga inhibīciju, katrs paraugs tika mikroskopēts, pārbaudot šūnu proliferāciju pēc pēdējā *OD* rādītuma 116 h. Pēc tam tika saskaitīts šūnu skaits vienam paraugam no katra tripleta (3.3. attēls).



3.3. attēls. Šūnu skaits paraugos ar dažādām AEC koncentrācijām pēc 116 h kultivēšanas. Horizontālā līnija attēlo sākotnējo šūnu koncentrāciju paraugos.

Rauga šūnu skaits pēc 116 h ilgas kultivēšanas 0,1 mM AEC klātbūtnē bija vairāk nekā divas reizes lielāks, 0,5 mM AEC paraugā tas bija vienāds ar sākotnējo inokulātu, un šūnu dalīšanās netika novērota. Sākotnējā šūnu skaita samazināšanās uz pusi ar autolizēto šūnu daļiņu klātbūtni tika novērota paraugos ar 2,5 mM un lielāku koncentrāciju. Korelācijas analīze parādīja statistiski nozīmīgu korelāciju starp pēdējo *OD* mērījumu un saskaitīto šūnu daudzumu ($p < 0,05$). *Sano* un *Shiio* [65] ziņoja par *Bacillus subtilis* un *Escherichia coli* 100 % inhibīciju, pievienojot barotnei 5 mM AEC, savukārt *Brevibacterium flavum* 50 % inhibīcijai bija nepieciešams 15 mM AEC. Promocijas darba pētījumā *P. rhodozyma* uzrādīja lielāku jutīgumu pret šo aminoskābju biosintēzes inhibitoru.

Turpmākajiem eksperimentiem tika izvēlētas AEC 0,5 mM un 2,5 mM koncentrācijas, lai atlasītu potenciālos proteīnu sintezējošos mutantus, kas spēj vairoties 100 % inhibīcijas devas klātbūtnē.

Glufosinātamonijs ietekme uz *P. rhodozyma* augšanu

Inhibitors glufosinātamonijs (GA) tika testēts divas reizes. Pirmajā testā tika izmantotas GA koncentrācijas no 0,1 mM līdz 100 mM, no kurām ievērojama inhibīcija radās divās augstākajās koncentrācijās (3.2. tabula). Zemākas koncentrācijas 0,1–1 mM neuzrādīja statistiski nozīmīgu inhibīciju. Savukārt 5–10 mM līdz 96 h kultivēšanai izraisīja augšanas inhibīciju, bet testa beigās *OD* bija augstāks nekā kontrolei. Paraugu mikroskopēšana un šūnu skaitīšana atklāja interesantu iezīmi, ka *P. rhodozyma* šūnu skaits bija lielāks paraugos, kas saturēja GA

koncentrācijas no 0,1 mM līdz 10 mM, salīdzinot ar kontroli (3.4. attēls). Daudzos pētījumos ir aprakstīta herbicīdu augšanu veicinošā ietekme uz dažiem mikroorganismiem. Ir ziņots, ka glifosāts, hlorsulfurons, imazakvīns un imazapīrs noteiktās koncentrācijās stimulē mikroorganismu augšanu, bet par glufozināta amoniju ir maz datu [66]–[70].

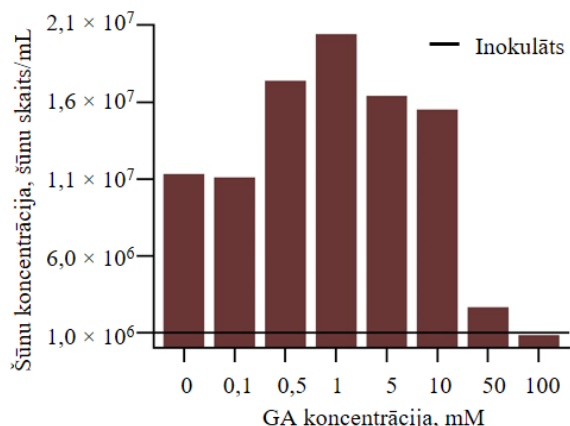
3.2. tabula

P. rhodozyma OD vērtības dažādās GA inhibitora koncentrācijās

Paraugs	GA koncentrācija, mM	Kultivēšanas laiks, h							
		0	24	48	73	96	120	144	165
Kontrole	0 ^a	0,006	0,075	0,349	0,623	0,738	0,819	0,876	0,916
GA1	0,1 ^a	0,012	0,075	0,35	0,614	0,715	0,781	0,828	0,875
GA2	0,5 ^{ab}	0,038	0,055	0,232	0,57	0,706	0,776	0,823	0,859
GA3	1 ^{ab}	0,045	0,047	0,181	0,525	0,716	0,802	0,847	0,890
GA4	5 ^{bc}	0,043	0,034	0,105	0,281	0,605	0,749	0,853	0,921
GA5	10 ^c	0,039	0,031	0,081	0,201	0,481	0,699	0,855	0,956
GA6	50 ^d	0,016	0,027	0,043	0,075	0,141	0,219	0,303	0,364
GA7	100 ^d	0,012	0,026	0,036	0,046	0,059	0,081	0,104	0,121

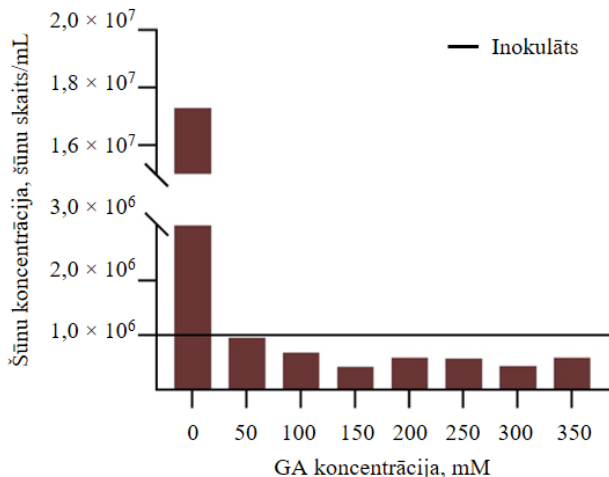
Atšķirīgi burti norāda statistisko nozīmību starp GA koncentrācijām saskaņā ar Dunkana daudzkārtējo diapazonu testu 5 % līmenī ($p < 0,05$).

Interesanti, ka *P. rhodozyma* ir izturīgāka pret GA nekā *S. cerevisiae* un *Aspergillus niger*, kam 0,05 mM un 0,15 mM GA klātbūtne izraisīja būtisku augšanas inhibīciju [71], [72]. Šajā pētījumā 100 mM GA bija pilnīga inhibējoša iedarbība, un šūnu skaits nedaudz samazinājās, salīdzinot ar inokulēto daudzumu. Korelācijas analīze starp OD un saskaitītajām šūnām testa pēdējā dienā uzrādīja korelācijas koeficientu 0,52. Šī korelācija nebija statistiski nozīmīga. Lai pārliecinātos, ka 100 mM ir 100 % inhibējošā koncentrācija, tika veikts jauns tests ar GA koncentrāciju no 50 mM līdz 350 mM.



3.4. attēls. Šūnu skaits paraugos, kas satur dažādas GA koncentrācijas, kultivējot 165 h. Horizontālā līnija attēlo sākotnējo šūnu koncentrāciju paraugos.

Otrais tests neatklāja statistiski nozīmīgu *OD* atšķirību starp septiņiem paraugiem ar GA koncentrāciju no 50 mM līdz 350 mM un pieauguma soli 50 mM. Šūnu skaitīšana vienam paraugam no katra tripla parādīja, ka 50 mM GA bija spēcīgāka inhibējošā iedarbība uz raugu nekā iepriekšējā testā, un šūnu proliferācija netika konstatēta (3.5. attēls).



3.5. attēls. Šūnu skaits paraugos, kas satur dažādas GA koncentrācijas, kultivējot 116 h. Horizontālā līnija attēlo sākotnējo šūnu koncentrāciju paraugos.

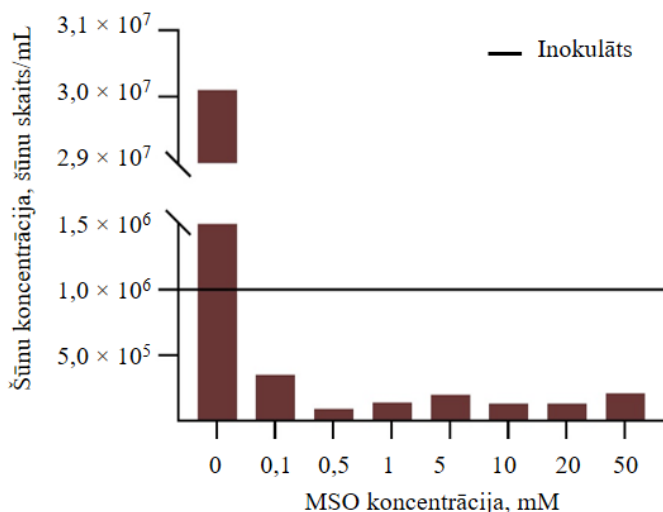
Šo rezultātu var izskaidrot ar testa laika ierobežojumu 116 h, salīdzinot ar pirmo testu, kas bija 165 h. Tomēr tas neietekmē secinājumu, ka 100 mM un augstākas koncentrācijas izraisa tuvu 100 % *P. rhodozyma* šūnu inhibīciju. To apstiprina šūnu skaita samazināšanās un autolīzes šūnu daļiņu klātbūtne paraugos. Korelācija starp pēdējo *OD* mērījumu un saskaitītajām šūnām nebija statistiski nozīmīga.

Turpmākajiem eksperimentiem tika izvēlētas 50 mM un 100 mM GA koncentrācijas, lai atlasītu potenciālos proteīnu sintezējošos mutantus, kas spēj vairoties aptuveni 100 % inhibīcijas devas klātbūtnē.

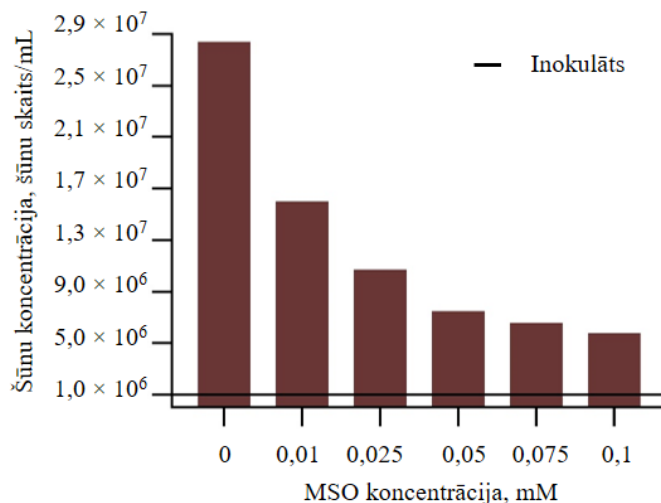
L-metionīna sulfoksimīna ietekme uz *P. rhodozyma* augšanu

Līdzīgi kā GA inhibitors, L-metionīna sulfoksimīns (MSO) tika testēts divas reizes. Pirmajā testā tika pārbaudītas septiņas MSO koncentrācijas no 0,1 mM līdz 50 mM, no kurām visās inhibitora koncentrācijās tika novērots spēcīgs rauga kultūras *OD* samazinājums, salīdzinot ar kontroli. *OD* rezultātu statistiskā analīze parādīja, ka kontroles parauga vidējā vērtība statistiski nozīmīgi atšķīrās no paraugiem ar MSO inhibitoru. Tajā pašā laikā starp inhibitora koncentrācijām nebija statistiskas atšķirības. Paraugu mikroskopija un šūnu skaitīšana parādīja pilnīgu rauga augšanas inhibīciju visām testētajām MSO koncentrācijām pēc 138 h kultivēšanas (3.6. attēls). Korelācijas koeficients starp pēdējo *OD* mērījumu un saskaitītajām šūnām bija 0,32, kas nebija statistiski nozīmīgs ($p > 0,05$). Tika nolemts atkārtot testu ar zemākām inhibitora devām, lai noteiktu minimālo koncentrāciju 100 % šūnu inhibēšanai.

Gan GA, gan MSO pieder pie glutamīna inhibitoru grupas [73]–[75]. GA tiek uzskatīts par efektīvāku herbicīdu, un mikroorganismu inhibēšanai nepieciešamas mazākas devas nekā MSO [72], [76]. Piemēram, 0,05 mM MSO inhibē 50 % *Mycobacterium tuberculosis* šūnu, bet GA ir tāda pati iedarbība pie 0,0015 mM. [72]. Šis rezultāts atbilst citam pētījumam, kurā 2 mM MSO nebija inhibējošas iedarbības uz *A. niger*, bet 0,15 mM GA nozīmīgi inhibēja [76]. Esošā pētījumā *P. rhodozyma* bija jutīgāka pret MSO klātbūtni nekā pret GA.



3.6. attēls. Šūnu skaits paraugos, kas satur dažādas MSO koncentrācijas, kultivējot 138 h. Horizontālā līnija attēlo sākotnējo šūnu koncentrāciju paraugos.



3.7. attēls. Šūnu skaits paraugos, kas satur dažādas MSO koncentrācijas, kultivējot 97 h. Horizontālā līnija attēlo sākotnējo šūnu koncentrāciju paraugos.

Otrajā MSO inhibīcijas eksperimentā tika pārbaudītas piecas koncentrācijas no 0,01 mM līdz 0,1 mM. Visos paraugos 97 h kultivēšanas laikā palielinājās OD, un paraugu saskaitītās šūnas parāda rauga augšanas atkarību no MSO inhibitora koncentrācijas (3.7. attēls). Šoreiz 0,1 mM koncentrācija neizraisīja pilnīgu šūnu inhibīciju, kā tas notika pirmajā testā. Korelācijas analīzē tika noteikts korelācijas koeficients (0,99) starp pēdējo OD mērījumu un saskaitīto šūnu skaitu. Korelācija bija nozīmīga ($p < 0,05$). Visu paraugu OD bija līdzīgs kontroles paraugam ($p > 0,05$). Tāpēc jāveic papildu tests 0,05–0,5 mM diapazonā, lai apstiprinātu minimālo koncentrāciju, kas nepieciešama pilnīgai rauga inhibīcijai (papildu tests nav iekļauts šajā darbā).

3.3. Atlasīto mutantu analīze

Glicerīna-sāls barotnē izaudzētu mutantu analīze

Pirmie divi eksperimenti tika veikti kratīšanas kolbās ar GSM barotni. Gan savvaļas tipa celms, gan atlasītie mutanti auga lēni, un to biomasas un kopproteīna koncentrācija bija salīdzinoši zema. Šādi rezultāti bija sagaidāmi savvaļas tipa celmam, jo iepriekšējie barotņu eksperimenti parādīja, ka *P. rhodozyma* DSM 5626 ir ierobežota spēja izmantot neorganiskā slāpekļa avotu – amonija hlorīdu. Tomēr citi slāpekļa avoti, piemēram, amonija sulfāts un kālija nitrāts, *P. rhodozyma* audzēšanai bija mazāk piemēroti nekā amonija hlorīds (dati nav sniegti). Savvaļas tipa celma biomasas iznākums, kopproteīna un astaksantīna koncentrācija bija 10,83 g/L, 19,07 % un 0,049 %, kas bija līdzīga trim GA6 mutantiem, kas tika atlasīti no pirmās mikroplates subkultūras (3.3. tabula). Šūnu mutāģenēze un subkultivēšana GSM barotnē, kas satur GA inhibitorus, neietekmēja astaksantīna biosintēzi.

3.3. tabula

P. rhodozyma savvaļas tipa celma salīdzinājums ar GA mutantiem no pirmās subkultūras

Celms*	Biomasas, g/L	Kopproteīns, g/L	Kopproteīns, %	AXT, %
Savvaļas celms	10,83 ± 0,97 ^a	2,07 ± 0,23 ^a	19,07 ± 0,53 ^a	0,049 ± 0,005 ^a
GA6/1-1	13,77 ± 0,59 ^b	2,45 ± 0,17 ^a	17,80 ± 0,60 ^a	0,051 ± 0,005 ^a
GA6/3-1	12,97 ± 0,15 ^{ab}	2,29 ± 0,15 ^a	17,69 ± 1,08 ^a	0,052 ± 0,003 ^a
GA6/5-1	11,90 ± 1,42 ^{ab}	2,28 ± 0,27 ^a	19,13 ± 0,60 ^a	0,053 ± 0,008 ^a

Piezīme. * *P. rhodozyma* savvaļas tipa celms un GA mutanti tika kultivēti kolbās GSM barotnē un analizēti 11. dienā. Vērtības vienā kolonnā ar dažādiem augšrakstiem būtiski atšķiras ($p < 0,05$).

Nākamajā eksperimentā tika izmantots palielināts inokulāta un barotnes daudzums, kā aprakstīts iepriekš metodoloģijas nodaļā. Tas uzlaboja savvaļas tipa celma augšanu. No otrās subkultūras atlasītajiem pieciem mutantiem nebija statistiski nozīmīgu atšķirību biomasas un kopproteīna daudzumā no savvaļas tipa celma (3.4. tabula). Tāpēc no abiem testiem tika nolemts atlasīt sešus mutantus ar augstāku biomasas vai kopproteīna saturu, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu, un analizēt to aminoskābju profilus.

3.4. tabula

P. rhodozyma savvaļas tipa celma salīdzinājums ar GA mutantiem no otrās subkultūras

Celms*	Biomasa, g/L	Kopproteīns, g/L	Kopproteīns, %	ATX, %
Savvaļas celms	14,20 ± 0,40 ^a	2,91 ± 0,17 ^a	20,49 ± 1,50 ^a	0,054 ± 0,004 ^a
GA6/1-2	13,83 ± 0,57 ^a	3,16 ± 0,19 ^a	22,89 ± 1,52 ^a	0,054 ± 0,002 ^a
GA6/2-2	13,90 ± 0,62 ^a	2,71 ± 0,13 ^a	19,47 ± 0,13 ^a	0,054 ± 0,003 ^a
GA6/3-2	13,97 ± 0,31 ^a	2,84 ± 0,15 ^a	20,33 ± 0,87 ^a	0,052 ± 0,010 ^a
GA6/4-2	14,23 ± 0,35 ^a	3,01 ± 0,22 ^a	21,11 ± 1,09 ^a	0,053 ± 0,002 ^a
GA7/4-2	14,23 ± 0,06 ^a	2,92 ± 0,05 ^a	20,49 ± 0,28 ^a	0,056 ± 0,003 ^a

Piezīme. * *P. rhodozyma* savvaļas tipa celms un GA mutanti tika kultivēti kolbās *GSM* barotnē un analizēti 11. dienā. Vērtības vienā kolonnā ar dažādiem augšrakstiem būtiski atšķiras ($p < 0,05$).

Savvaļas tipa celms kalpoja kā kontrole, lai novērtētu mutantu aminoskābju profila izmaiņas katrā testā. Analizējot aminoskābju profilus, tika konstatēts augsts Arg saturs visos testētajos celmos, kas raugam nav raksturīgs. Savvaļas tipa *P. rhodozyma* saturēja no 14,23 g līdz 16,54 g Arg uz 100 g kopproteīna, GA6 mutanti – no 14,08 g līdz 19,24 g Arg uz 100 g kopproteīna, kas bija 35 reizes vairāk, nekā literatūrā minēts *P. rhodozyma* un *SCP* raugu sugām [37], [49], [51]. Visos paraugos tika novērota augstāka Ile un Leu koncentrācija un zemāka Lys koncentrācija, kas atšķīrās no citos pētījumos iegūtajiem rezultātiem [49], [51]. Glutamīnskābes (Glu/E), glutamīna (Gln) un prolīna (Pro) saturs *P. rhodozyma* mutantu kopproteīnā promocijas darba pētījumā arī bija augstāks. Iespējams, ka šāds netipisks aminoskābju profils gan savvaļas tipa celmam, gan potenciālajiem mutantiem ir kultivēšanas sekas ar *GSM* barotni. Par barotnes ietekmi uz aminoskābju profilu ziņots *Ezekiel* pētījumā [77], kur Met saturs *C. utilis* biomasā atšķīrās atkarībā no substrāta pirmapstrādes veida. Tāpēc turpmākie testi tika veikti uz glicerīna un peptona bagātas barotnes. Tika pieņemts, ka labvēlīgos apstākļos audzētu raugu aminoskābju profils būs sabalansētāks.

3.5. tabula

P. rhodozyma GA mutantu aminoskābju profils no pirmās subkultūras

Celms*	Savvaļas celms	GA6/1-1	GA6/3-1	GA6/5-1
Tīrais proteīns, %	16,82 ± 0,20	17,94 ± 0,31	16,96 ± 0,23	16,92 ± 0,22
EAA, g/100 g tīra proteīna				
His	2,32 ± 0,04 ^a	2,21 ± 0,14 ^a	2,38 ± 0,02 ^a	2,40 ± 0,13 ^a
Thr	4,83 ± 0,13 ^c	4,37 ± 0,01 ^a	4,42 ± 0,01 ^{ab}	4,66 ± 0,05 ^{bc}
Arg	16,13 ± 0,29 ^{ab}	16,65 ± 0,54 ^{ab}	17,02 ± 0,12 ^b	15,69 ± 0,13 ^a
Val	5,24 ± 0,05 ^a	5,34 ± 0,07 ^{ab}	5,33 ± 0,05 ^{ab}	5,51 ± 0,00^b
Met	0,96	1,12	1,03	1,25
Izmēģiniet	n/a	n/a	n/a	n/a
Phe	3,83 ± 0,04 ^{ab}	3,73 ± 0,04 ^a	3,73 ± 0,02 ^a	3,89 ± 0,03 ^b
Ile	4,30 ± 0,27 ^a	4,23 ± 0,02 ^a	4,24 ± 0,07 ^a	4,26 ± 0,05 ^a
Leu	7,26 ± 0,05 ^a	7,00 ± 0,15 ^a	7,08 ± 0,14 ^a	7,31 ± 0,03 ^a
Lys	4,63 ± 0,01 ^a	4,80 ± 0,17 ^a	4,64 ± 0,00 ^a	4,70 ± 0,10 ^a
NEAA, g/100 g tīra proteīna				

3.5. tabulas turpinājums

Asp ac	9,39 ± 0,47 ^{ab}	8,82 ± 0,15 ^a	9,93 ± 0,14 ^b	9,64 ± 0,12 ^{ab}
Glu ac	15,25 ± 0,44 ^a	15,49 ± 1,03 ^a	15,21 ± 0,10 ^a	14,68 ± 0,19 ^a
Ser	5,04 ± 0,31 ^b	4,22 ± 0,14 ^a	4,21 ± 0,06 ^a	4,84 ± 0,19 ^{ab}
Gly	4,72 ± 0,06 ^a	4,82 ± 0,08 ^a	4,91 ± 0,09 ^a	4,75 ± 0,10 ^a
Ala	6,50 ± 0,15 ^b	5,98 ± 0,05 ^a	6,03 ± 0,06 ^a	6,27 ± 0,02 ^{ab}
Tyr	3,30 ± 0,01 ^a	3,19 ± 0,17 ^a	3,17 ± 0,04 ^a	3,27 ± 0,04 ^a
Cys	0,23 ± 0,49	2,19 ± 0,04	0,92 ± 0,05	0,77 ± 0,00
Pro	6,07 ± 0,15 ^a	5,84 ± 0,38 ^a	5,73 ± 0,33 ^a	6,12 ± 0,42 ^a

Piezīme. * *P. rhodozyma* savvaļas tipa celms un GA mutanti tika kultivēti kolbās GSM barotnē un analizēti 11. dienā. Vērtības vienā rindā ar dažādiem augšrakstiem būtiski atšķiras ($p < 0,05$).

Analizējot aminoskābju profilus, atklājās, ka tikai GA6/5-1 mutantu celmam ir būtiski lielāks Val saturs, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu (3.5. tabula). Trim GA mutantu celmiem aminoskābju profils no otrās subkultivētās mikroplates būtiski neatšķīrās no savvaļas tipa celma.

Mutantu analīze, kultivējot glicerīna-peptona barotnē

Trešais un ceturtais eksperiments tika veikts kratīšanas kolbās ar GPM barotni. GA un AEC mutantu celmi tika atlasīti attiecīgi no trešās un pirmās mikroplates subkultūras. Pēc trešās GA mutantu subkultivācijas uz mikroplates bija iespējams izaudzēt pietiekamu daudzumu inokulāta, lai kolbas eksperimentā iekļautu GA7 mutantus. Biomasas un proteīnu koncentrācijas ievērojami palielinājās, savukārt astaksantīna koncentrācijas samazinājās visiem testētajiem celmiem uz glicerīna-peptona bagātas barotnes (3.6. un 3.9. tabula). Astaksantīna koncentrācijas samazināšanās biomasā, kas audzēta labvēlīgos apstākļos barības vielām bagātā barotnē, bija sagaidāma. Karotinoīdu biosintēzes uzlabošanās notiek stresa apstākļos, ko izraisīja iepriekš izmantotā GSM barotne [47]. GA mutanti neuzrādīja statistiski nozīmīgas atšķirības biomasas, proteīnu, astaksantīna un kopējo karotinoīdu vērtībās, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu. No otras puses, starp dažiem mutantiem tika novērota būtiska atšķirība biomasas vērtībās un kopproteīna koncentrācijā.

3.6. tabula

P. rhodozyma savvaļas tipa celma salīdzinājums ar GA mutantiem no trešās subkultūras

Celms*	Biomasa, g/L	Kopproteīns, g/L	Kopproteīns, %	AXT, %
Savvaļas celms	39,43 ± 0,67 ^{ab}	12,22 ± 0,09 ^a	30,98 ± 0,41 ^{ab}	0,029 ± 0,002 ^a
GA6/1-3	40,20 ± 1,01 ^{ab}	12,22 ± 0,30 ^a	30,40 ± 1,54 ^{ab}	0,030 ± 0,003 ^a
GA6/2-3	38,10 ± 1,08 ^a	11,93 ± 1,34 ^a	31,33 ± 2,60 ^{ab}	0,030 ± 0,001 ^a
GA6/3-3	40,33 ± 0,68 ^{ab}	12,34 ± 0,43 ^a	30,62 ± 0,54 ^{ab}	0,034 ± 0,003 ^a
GA6/4-3	39,57 ± 1,07 ^{ab}	11,95 ± 1,13 ^a	30,22 ± 2,01 ^a	0,029 ± 0,002 ^a
GA7/4-3	40,90 ± 0,56 ^b	13,33 ± 0,62 ^a	32,58 ± 1,11 ^{ab}	0,028 ± 0,001 ^a
GA7/5-3	40,53 ± 0,40 ^b	14,15 ± 0,79 ^a	34,89 ± 1,90 ^b	0,028 ± 0,002 ^a

Piezīme. * *P. rhodozyma* savvaļas tipa celms un GA mutanti tika kultivēti kolbās uz GPM barotnes un analizēti septītajā dienā. Vērtības vienā kolonnā ar dažādiem augšrakstiem būtiski atšķiras ($p < 0,05$).

Uz *GPM* barotnes kultivēto rauga celmu aminoskābju profila analīze parādīja uzlabotu aminoskābju saturu. Arg koncentrācija savvaļas tipa un mutantu celmu proteīnu daudzums samazinājās vairāk nekā divas reizes, un tas saskanēja ar citu pētījumu [36]. Turpretī citu neaizstājamo aminoskābju koncentrācija proteīnā palielinājās. Trīs GA mutanti uzrādīja būtiski augstāku Lys (GA6/3-3) un Met (GA6/4-3 un GA7/5-3) koncentrāciju, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu (3.7. tabula). Trim celmiem – GA6/1-3, GA6/2-3 un GA7/4-2 – nebija būtisku atšķirību aminoskābju profilā, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu.

3.7. tabula

P. rhodozyma GA mutantu aminoskābju profils no trešās subkultūras

Celms*	Savvaļas celms	GA6/3-3	GA6/4-3	GA7/4-3	GA7/5-3
Tīrais proteīns, %	30,27 ± 0,12	29,44 ± 1,04	30,28 ± 0,41	29,24 ± 0,34	29,36 ± 0,26
EAA, g/100 g tīra proteīna					
His	2,46 ± 0,14 ^a	2,48 ± 0,09 ^a	2,52 ± 0,25 ^a	2,45 ± 0,03 ^a	2,41 ± 0,16 ^a
Thr	5,51 ± 0,26 ^a	4,93 ± 0,24 ^a	5,38 ± 0,09 ^a	5,13 ± 0,12 ^a	5,43 ± 0,12 ^a
Arg	6,77 ± 0,26 ^{abc}	7,41 ± 0,07 ^c	7,19 ± 0,05 ^{bc}	6,10 ± 0,02 ^a	6,38 ± 0,06 ^{ab}
Val	5,94 ± 0,02 ^{ab}	6,02 ± 0,04 ^{ab}	5,72 ± 0,09 ^a	6,08 ± 0,02 ^b	5,80 ± 0,02 ^{ab}
Met	1,24 ± 0,09 ^a	1,23 ± 0,02 ^a	1,70 ± 0,05^b	1,41 ± 0,12 ^{ab}	1,56 ± 0,09^b
Trp	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Phe	4,34 ± 0,10 ^a	4,24 ± 0,27 ^a	4,41 ± 0,03 ^a	4,49 ± 0,06 ^a	4,43 ± 0,06 ^a
Ile	5,14 ± 0,21 ^a	5,40 ± 0,21 ^a	4,96 ± 0,03 ^a	5,36 ± 0,08 ^a	4,99 ± 0,09 ^a
Leu	8,38 ± 0,10 ^a	8,19 ± 0,10 ^a	8,08 ± 0,19 ^a	8,38 ± 0,08 ^a	8,34 ± 0,07 ^a
Lys	4,90 ± 0,12 ^a	5,60 ± 0,13^b	5,20 ± 0,18 ^{ab}	4,90 ± 0,09 ^a	4,94 ± 0,02 ^a
NEAA, g/100 g tīra proteīna					
Asp ac	10,70 ± 0,39 ^a	10,82 ± 0,30 ^a	11,07 ± 0,15 ^a	10,74 ± 0,13 ^a	10,51 ± 0,09 ^a
Glu ac	14,93 ± 0,01 ^a	14,83 ± 0,58 ^a	14,58 ± 0,26 ^a	14,97 ± 0,17 ^a	14,91 ± 0,13 ^a
Ser	5,60 ± 0,38 ^a	4,81 ± 0,11 ^a	5,55 ± 0,07 ^a	4,72 ± 0,38 ^a	5,63 ± 0,08 ^a
Gly	5,79 ± 0,01 ^{ab}	6,01 ± 0,03 ^{ab}	5,59 ± 0,16 ^a	6,19 ± 0,13 ^b	5,67 ± 0,08 ^{ab}
Ala	7,45 ± 0,22 ^a	7,24 ± 0,04 ^a	7,26 ± 0,04 ^a	7,28 ± 0,06 ^a	7,34 ± 0,08 ^a
Tyr	3,79 ± 0,13 ^a	3,72 ± 0,00 ^a	3,70 ± 0,05 ^a	3,79 ± 0,04 ^a	3,69 ± 0,03 ^a
Cys	0,31 ± 1,80	0,16 ± 0,66	0,81 ± 0,02	1,27 ± 0,08	1,39 ± 0,04
Pro	6,81 ± 0,22 ^a	6,93 ± 0,36 ^a	6,33 ± 0,24 ^a	6,56 ± 0,01 ^a	6,51 ± 0,41 ^a

Piezīme. * *P. rhodozyma* savvaļas tipa celms un GA mutanti tika kultivēti kolbās *GPM* barotnē. Vērtības vienā rindā ar dažādiem augšrakstiem būtiski atšķiras ($p < 0,05$).

Negaidīti atklājās, ka *P. rhodozyma* DSM 5626 aminoskābju profils nav sliktāks par trim labākajiem *SCP* ražotājiem – *C. utilis*, *S. cerevisiae* un *K. marxianus*, izņemot Lys un daļēji Met [37]. Visiem testētajiem celmiem bija mazāks Lys daudzums – 5,41 g uz 100 g kopproteīna, salīdzinot ar 6,95 g, 6,19 g un 6,51 g Lys uz 100 g kopproteīna *C. utilis*, *S. cerevisiae* un *K. marxianus* [37]. Tomēr mutanti GA6/4-3 un GA7/5-3 uzrādīja statistiski nozīmīgu Met satura pieaugumu par 37 % un 26 % attiecīgi. Šis uzlabotais Met saturs mutantos bija lielāks nekā trim *SCP* rauga sugām, rēķinot uz 100 g kopproteīna [37]. Tomēr *SCP* komerciālajiem rauga celmiem ir augstāka kopproteīna koncentrācija biomasā (3.8. tabula), tādējādi *P. rhodozyma* ir zemāks aminoskābju saturs līdzvērtīgā biomasas daudzumā.

3.8. tabula

AAS un EAAI salīdzinājums *P. rhodozyma* GA mutantiem no trešās subkultūras

Celms	Savvaļas celms	GA6/3-3	GA6/4-3	GA7/4-3	GA7/5-3	CU	SC	KM
Kopproteīns, %	31	31	30	33	35	56	46	51
AAS, %								
His	100	99	113	93	89	82	71	76
Thr	125	110	125	110	105	111	104	98
Arg	118	127	131	98	97	83	75	73
Val	107	107	108	102	91	84	75	73
Met	38	41	55	45	47	45	51	41
Phe	104	99	108	98	91	101	90	80
Ile	107	110	106	102	89	90	83	73
Leu	108	104	106	99	92	91	80	72
Lys	61	69	69	58	53	89	83	79
EAAI, %	74	75	80	71	66	69	64	59

Piezīme. CU – *Candida utilis*, SC – *Saccharomyces cerevisiae* un KM – *Kluyveromyces marxianus* ir trīs komerciāli SCP rauga celmi (Borregaard ASA, Norvēģija) [37].

Saskaņā ar literatūras datiem GA inhibītors ietekmē septiņu aminoskābju biosintēzi [73]–[75], no kurām piecas ir neaizstājamās aminoskābes, kas nepieciešamas zivīm. Interesanti, ka *Vallejo* pētījumā vīna rauga apstrāde ar 0,05 mM GA ievērojami palielināja Met, Ile, Leu, Phe, Trp un Tyr sintēzi, salīdzinot ar neapstrādātām šūnām [71]. Tajā pašā laikā Phe, Trp un Tyr nav šī inhibitora mērķa AA, kas var liecināt par blakusparādībām mikroorganisma augšanā herbicīda klātbūtnē [78].

Ceturtajā kolbu eksperimentā astoņiem AEC3 mutantiem un vienam AEC2 mutantam biomasas, proteīnu un astaksantīna saturs nebija būtiski lielāks par savvaļas tipa celmu (3.9. tabula). Vairāki mutantu celmi uzrādīja būtiski zemākas biomasas, proteīnu un astaksantīna koncentrācijas vērtības. Diviem mutantiem būtiski samazinājās astaksantīna saturs biomasā. Tāpēc, tāpat kā iepriekšējos testos, aminoskābju profils tika analizēts mutantiem ar augstāku biomasas un proteīnu koncentrāciju.

3.9. tabula

P. rhodozyma savvaļas tipa celma salīdzinājums ar AEC mutantiem no pirmās un otrās subkultūras

Celms*	Biomasas, g/L	Kopproteīns, g/L	Kopproteīns, %	ATX, %
Savvaļas celms	38,95 ± 0,35 ^{bcd}	11,98 ± 0,04 ^{ab}	30,75 ± 0,15 ^{bc}	0,032 ± 0,012 ^{bc}
AEC2/1-2	38,73 ± 1,24 ^{bcd}	11,02 ± 0,59 ^a	28,45 ± 1,28 ^{ab}	0,039 ± 0,003 ^c
AEC3/1-1	39,70 ± 1,56 ^{bcd}	10,53 ± 0,76 ^{ab}	26,52 ± 1,06 ^a	0,034 ± 0,003 ^{bc}
AEC3/3-1	40,70 ± 0,70 ^d	11,65 ± 0,43 ^{ab}	28,62 ± 0,77 ^{ab}	0,032 ± 0,003 ^{bc}
AEC3/4-1	35,75 ± 0,25 ^a	10,55 ± 0,43 ^{ab}	29,51 ± 1,20 ^{abc}	0,019 ± 0,001 ^a

3.9. tabulas turpinājums

AEC3/5-1	39,13 ± 0,95 ^{bcd}	11,57 ± 0,79 ^{ab}	29,57 ± 1,31 ^{abc}	0,038 ± 0,001 ^{bc}
AEC3/6-1	37,93 ± 0,32 ^{abc}	11,89 ± 0,64 ^{ab}	31,35 ± 1,89 ^{bc}	0,027 ± 0,002 ^{ab}
AEC3/7-1	39,83 ± 1,10 ^{bcd}	11,77 ± 0,53 ^{ab}	29,55 ± 1,35 ^{abc}	0,034 ± 0,006 ^{bc}
AEC3/8-1	40,43 ± 1,12 ^{cd}	12,31 ± 0,55 ^b	30,45 ± 1,81 ^{abc}	0,037 ± 0,003 ^{bc}
AEC3/9-1	37,30 ± 0,26 ^{ab}	12,20 ± 0,59 ^{ab}	32,71 ± 1,78 ^c	0,018 ± 0,002 ^a

Piezīme. * *P. rhodozyma* savvaļas tipa celms un GA mutanti tika kultivēti kolbās GPM barotnē.

Vērtības vienā kolonnā ar dažādiem augšrakstiem būtiski atšķiras ($p < 0,05$).

Aminoskābju profils tika analizēts pieciem mutantu celmiem – AEC2/1-2, AEC3/3-1, AEC3/5-1, AEC3/8-1 un AEC3/9-1. Visiem testētajiem AEC mutantiem bija zemāks Arg saturs, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu. AEC2/1-2 mutanta proteīns saturēja būtiski lielāku Thr, Phe, Ala un Tyr koncentrāciju, savukārt AEC3/9-1 mutantam bija būtiski lielāks Phe, Ile un Lys saturs, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu (3.10. tabula). AEC3/9-1 celms saturēja par 35 % lielāku Met un par 24 % lielāku Lys daudzumu, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu.

3.10. tabula

P. rhodozyma AEC mutantu aminoskābju profils no pirmās subkulturās

Celms*	Savvaļas celms	AEC2/1-2	AEC3/5-1	AEC3/9-1
Tīrais proteīns, %	30,92 ± 0,18	26,77 ± 0,40	29,12 ± 0,57	31,35 ± 0,51
EAA, g/100 g tīra proteīna				
His	2,67 ± 0,04 ^a	2,27 ± 0,06 ^a	2,40 ± 0,07 ^a	2,39 ± 0,02 ^a
Thr	4,93 ± 0,13 ^{ab}	5,43 ± 0,02^c	5,23 ± 0,06 ^{bc}	4,79 ± 0,19 ^{ab}
Arg	8,30 ± 0,26 ^c	5,85 ± 0,10 ^a	7,16 ± 0,01 ^b	6,59 ± 0,29 ^b
Val	6,59 ± 0,00 ^b	6,66 ± 0,04 ^b	6,68 ± 0,01 ^b	6,50 ± 0,08 ^b
Met	1,23 ± 0,08 ^a	1,34 ± 0,02 ^b	1,26 ± 0,06 ^{ab}	1,66 ± 0,05^c
Trp	n/a	n/a	n/a	n/a
Phe	4,17 ± 0,05 ^a	4,43 ± 0,05^c	4,35 ± 0,00^{bc}	4,40 ± 0,04^c
Ile	4,88 ± 0,05 ^a	4,89 ± 0,05 ^a	4,91 ± 0,04 ^a	5,27 ± 0,10^b
Leu	7,98 ± 0,08 ^{ab}	8,19 ± 0,07 ^b	8,01 ± 0,03 ^{ab}	8,18 ± 0,10 ^b
Lys	5,91 ± 0,00 ^a	5,49 ± 0,12 ^a	5,60 ± 0,28 ^a	7,31 ± 0,17^b
NEAA, g/100 g tīra proteīna				
Asp ac	10,39 ± 0,05 ^{ab}	11,12 ± 0,17 ^b	11,17 ± 0,22 ^b	10,34 ± 0,17 ^{ab}
Glu ac	15,32 ± 0,01 ^a	15,45 ± 0,03 ^a	15,94 ± 0,61 ^{ab}	15,52 ± 0,29 ^a
Ser	4,87 ± 0,37 ^{ab}	5,80 ± 0,10 ^b	5,39 ± 0,04 ^{ab}	4,27 ± 0,50 ^a
Gly	5,48 ± 0,08 ^a	5,44 ± 0,09 ^a	5,42 ± 0,14 ^a	5,87 ± 0,10 ^a
Ala	6,68 ± 0,02 ^a	7,26 ± 0,05^b	6,83 ± 0,01 ^a	6,73 ± 0,08 ^a
Tyr	3,49 ± 0,03 ^a	3,80 ± 0,06^b	3,72 ± 0,07^b	3,67 ± 0,06 ^{ab}
Cys	1,26 ± 0,02	0,64 ± 0,00	0	0,29 ± 0,01
Pro	5,77 ± 0,05 ^a	5,91 ± 0,12 ^a	6,00 ± 0,51 ^a	6,28 ± 0,12 ^a

Piezīme. * *P. rhodozyma* savvaļas tipa celms un GA mutanti tika kultivēti kolbās GPM barotnē. Vērtības vienā rindā ar dažādiem augšrakstiem būtiski atšķiras ($p < 0,05$).

AEC3/5-1 celms saturēja būtiski lielāku Phe un Tyr daudzumu, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu. Diviem celmiem – AEC3/3-1 un AEC3/8-1 – nebija būtisku atšķirību aminoskābju profilā, salīdzinot ar savvaļas tipa celmu (dati nav norādīti).

His, Arg, Val, Phe, Ile un Leu *EAAI* un *AAS* bija augstāki visos *P. rhodozyma* celmos, salīdzinot ar trim komerciālajiem *SCP* celmiem (3.11. tabula). No visiem šajā pētījumā testētajiem mutantiem vislabākais bija celms AEC3/9-1 ar uzlabotu Lys un Met saturu. Lys *AAS* 95,59 % ir augstāks vērtējums nekā iepriekš ziņots tādiem raugiem kā *Y. lipolytica* [79], [80], *C. jadinii*, *B. adeninivorans* [42], *W. anomalus* [42], [81], *S. cerevisiae* [37], [41], [79], *C. utilis* [37], [82], *K. marxianus* [37], [80] un pat augstākās kvalitātes zivju miltiem [83], [29]. Interesanti, ka AEC ir četru neaizstājamo aminoskābju, Met, Lys, Thr un Ile, biosintēzes inhibitors [84]; tomēr šajā pētījumā tika konstatēts, ka palielinājās nemērķa aminoskābju biosintēzes inhibitoru biosintēze.

3.11. tabula

AAS un EAAI salīdzinājums P. rhodozyma AEC mutantiem no pirmās un otrās subkultūras

Celms	Savvaļas celms	AEC2/1-2	AEC3/5-1	AEC3/9-1	CU	SC	KM
Kopproteīns, %	31	28	30	33	56	46	51
<i>AAS, %</i>							
His	112	92	102	96	82	71	76
Thr	115	120	120	112	111	104	98
Arg	149	98	128	118	83	75	73
Val	123	117	124	115	84	75	73
Met	41	43	41	54	45	51	41
Phe	102	102	106	112	101	90	80
Ile	104	98	105	121	90	83	73
Leu	106	102	106	109	91	80	72
Lys	76	68	74	96	89	83	79
<i>EAAI, %</i>	79	73	78	82	69	64	59

Piezīme. CU – *Candida utilis*, SC – *Saccharomyces cerevisiae* un KM – *Kluyveromyces marxianus* ir trīs komerciāli *SCP* rauga celmi (*Borregaard ASA*, Norvēģija) [37].

Šis pētījums parāda aminoskābju biosintēzes inhibitoru potenciālu mutantu celmu ar uzlabotu proteīnu ražošanas spējām. Selektīvas barotnes izmantošana samazināja pētāmo mutantu skaitu, kas ļāva veikt kompaktus testus kolbās. Lai gan mutantu biomasas analīze neuzrādīja proteīna sintēzes pieaugumu, tika sasniegts neaizstājamo aminoskābju sintēzes pieaugums. Veicot mutagēnam pakļauto rauga šūnu skrīningu uz GA selektīvās barotnēs, tika atlasīti divi mutanti ar būtiski uzlabotu Met sintēzi un viens mutants ar būtiski uzlabotu Lys sintēzi. Rauga šūnu skrīnings uz AEC selektīvās barotnes palīdzēja atlasīti trīs mutantus ar ievērojami uzlabotu divu līdz četru aminoskābju sintēzi. Īpaši vērtīgs bija pirmo divu rauga ierobežojošo aminoskābju – Met un Lys – sintēzes pieaugums. Tas pierāda, ka aminoskābju biosintēzes inhibitori ir labs līdzeklis, lai atlasītu mutantus ar uzlabotu neaizstājamo aminoskābju sintēzi. Līdz ar to tika apstiprināta promocijas darbā izvirzītā hipotēze.

SECINĀJUMI

1. Daudzkritēriju lēmumu pieņemšanas analīzes rezultāti parādīja, ka trīs aminoskābju biosintēzes inhibitori – glufozinātamonijis, L-metionīna sulfoksimīns un S-(2-aminoetil)-L-cisteīns – ir labākās alternatīvas baktēriju un sēņu selektīvajam skrīningam. Tie teorētiski inhibē lielu neaizstājamo aminoskābju skaitu, tostarp Met un Lys, kas ir ierobežotā daudzumā augu un raugu izcelsmes proteīnos. Propargilglicīns, sulfonilurīnvielas un imidazolinona inhibitori uzrādīja pieņemamus rezultātus baktēriju inhibīcijai un sulfonilurīnvielas sēņu inhibīcijai. Labs risinājums varētu būt kombinēt dažus inhibitorus, piemēram, glifosātu ar metsulfuronmetilu vai citu sulfonilurīnvielu un glifosātu, ar propargilglicīnu. Šādas kombinācijas radīs selektīvu spiedienu uz plašāku dažādu svarīgāko neaizstājamo aminoskābju biosintēzi un pastiprinās viens otra inhibējošo iedarbību. Šī pieeja var būt noderīga, lai radītu mikroorganismu mutantus, kas nav jutīgi, piemēram, uz glufozinātamoniju vai S-(2-aminoetil)-L-cisteīnu.
2. Glufozinātamonija inhibitors ir piemērots skrīninga rīks rauga mutantu atļasei ar paaugstinātu Met un Lys biosintēzi. Divi mutanti ar būtiski uzlabotu Met biosintēzi tika atlasīti, izmantojot 50 mM un 100 mM glufozinātamonija. Šie uzlabotie mutanti uzrādīja vienādu vai lielāku Met saturu kopproteīnā, salīdzinot ar komerciālajiem *SCP* raugiem, tādiem kā *Y. lipolytica*, *C. utilis*, *S. cerevisiae* un *K. marxianus*.
3. S-(2-aminoetil)-L-cisteīna inhibitors veicināja divu mutantu atlasī ar būtiski uzlabotu Thr, Phe, Ala un Tyr biosintēzi, skrīningā, izmantojot 0,5 mM S-(2-aminoetil)-L-cisteīna, un Phe, Ile, Lys un Met, izmantojot 2,5 mM S-(2-aminoetil)-L-cisteīna. AEC3/9-1 mutants uzrādīja augstāku deviņu neaizstājamo aminoskābju saturu, tādējādi pārspējot komerciālu raugu proteīnu.
4. Glufozinātamonija un S-(2-aminoetil)-L-cisteīna izmantošana mutantu atlasē radīja mutantus ar būtiski uzlabotu Met un Lys sintēzi. Mutanti GA6/4-3 un GA7/5-3 uzrādīja par 37 % un 26 % augstāku Met līmeni, savukārt GA6/3-3 bija par 14 % augstāks Lys līmenis, salīdzinot ar savvaļas celmu. Mutants AEC3/9-1 uzrādīja par 35 % augstāku Met, par 24 % augstāku Lys, par 8 % augstāku Ile un par 6 % augstāku Phe, apliecinot šīs selektīvās atlasē pieejas efektivitāti neaizstājamā aminoskābju satura palielināšanā.
5. Aminoskābju biosintēzes inhibitori ir labs rīks mutantu atļasei ar uzlabotu neaizstājamo aminoskābju profilu un proteīna kvalitāti. Tādējādi promocijas darbā izvirzītā hipotēze tika apstiprināta.
6. *P. rhodozyma* DSM 5626 celma proteīna saturs un aminoskābju profils iepriekš nav plaši pētīts. Šis pētījums parādīja, ka šim celmam ir vidējas kvalitātes proteīns un neaizstājamo aminoskābju profils ir līdzīgs augstas kvalitātes zivju miltiem, izņemot ierobežotu Met un Lys saturu. *P. rhodozyma* DSM 5626 proteīna kvalitāte ir augstāka par dažiem citiem raugiem, tādiem kā *C. jadinii*, *W. anomalus* un *B. adeninivorans*.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- [1] R. R. Fantatto *et al.*, 'Exploring sustainable alternatives in aquaculture feeding: The role of insects', *Aquaculture Reports*, vol. 37, p. 102228, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.aqrep.2024.102228.
- [2] A. G. J. Tacon and M. Metian, 'Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture', *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, vol. 23, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2015, doi: 10.1080/23308249.2014.987209.
- [3] J. Spinelli, 'Chapter 12. Unconventional Feed Ingredients for Fish Feed'. Accessed: Dec. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.fao.org/3/x5738e/x5738e0d.htm>.
- [4] J. Yarnold, H. Karan, M. Oey, and B. Hankamer, 'Microalgal Aquafeeds As Part of a Circular Bioeconomy', *Trends in Plant Science*, vol. 24, no. 10, pp. 959–970, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.06.005>.
- [5] A.-F. M. El-Sayed, 'Nutrition and feeding', in *Tilapia Culture*, Elsevier, 2020, pp. 135–172. doi: 10.1016/B978-0-12-816509-6.00007-0.
- [6] M. García-Garibay, L. Gómez-Ruiz, A. E. Cruz-Guerrero, and E. Bárzana, 'Single Cell Protein: Yeasts and Bacteria', in *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, Elsevier Inc., 2014, pp. 431–438. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00310-4.
- [7] A. Singh and P. Mishra, 'Microbial production of single cell protein (SCP) and single cell oil (SCO)', *Elsevier*, vol. 33, no. C, pp. 301–316, 1995, doi: [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(06\)80051-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(06)80051-2).
- [8] European Commission, 'MEMO - Indirect Land Use Change (ILUC)', Brussels, MEMO/12/787, 2012.
- [9] European Commission, '2050 long-term strategy'. Accessed: Dec. 19, 2023. [Online]. Available: https://climate.ec.europa.eu/eu-action/climate-strategies-targets/2050-long-term-strategy_en.
- [10] P&S Intelligence, 'Protein Extracts from Single Cell Protein Sources Market | Forecast Report 2023'. Accessed: Dec. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.psmarketresearch.com/market-analysis/protein-extracts-from-single-cell-protein-sources-market>.
- [11] R. Kumar, T. Raj, G. Naess, M. Sørensen, and V. Dhawan, 'Opportunities and challenges in single-cell protein production using lignocellulosic material', *Biofuels Bioprod Bioref*, vol. 18, no. 1, pp. 310–321, Jan. 2024, doi: 10.1002/bbb.2563.
- [12] R. Wikandari, Manikharda, S. Baldermann, A. Ningrum, and M. J. Taherzadeh, 'Application of cell culture technology and genetic engineering for production of future foods and crop improvement to strengthen food security', *Bioengineered*, vol. 12, no. 2, pp. 11305–11330, Dec. 2021, doi: 10.1080/21655979.2021.2003665.
- [13] N. J. Salazar-López *et al.*, 'Single-Cell Protein Production as a Strategy to Reincorporate Food Waste and Agro By-Products Back into the Processing Chain', *Bioengineering*, vol. 9, no. 11, p. 623, Oct. 2022, doi: 10.3390/bioengineering9110623.
- [14] European Parliament. Directorate General for Parliamentary Research Services., *Alternative protein sources for food and feed*. LU: Publications Office, 2024. Accessed: Jun. 18, 2024. [Online]. Available: <https://data.europa.eu/doi/10.2861/999488>.
- [15] Q. Liu, T. Yu, K. Campbell, J. Nielsen, and Y. Chen, 'Modular Pathway Rewiring of Yeast for Amino Acid Production', in *Methods in Enzymology*, vol. 608, Elsevier, 2018, pp. 417–439. doi: 10.1016/bs.mie.2018.06.009.
- [16] Q. Ma *et al.*, 'Systems metabolic engineering strategies for the production of amino acids', *Synthetic and Systems Biotechnology*, vol. 2, no. 2, pp. 87–96, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.synbio.2017.07.003.

- [17] 'Directive 2009/41/EC of the European Parliament and of the Council on the contained use of genetically modified micro-organisms. Official Journal of the European Union L 125, 21 May 2009, pp. 75-97.' FAO. [Online]. Available: <https://faolex.fao.org/docs/pdf/eur138068.pdf>.
- [18] 'Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal L 106, 17.4.2001, p. 1–39'. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2001/18/oj>.
- [19] D. Atzmüller, F. Hawe, D. Sulzenbacher, and A. Cristobal-Sarramian, 'Wheat straw and lipids: UV-mutagenized *Yarrowia lipolytica* for the conversion of wheat straw hydrolysate into lipids', *Agronomy Research*, vol. 17, no. 6, pp. 2172–2179, 2019, doi: 10.15159/AR.19.197.
- [20] L. M. Ducrey Sanpietro and M.-R. Kula, 'Studies of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Effect of inhibitors and low temperature', *Yeast*, vol. 14, no. 11, pp. 1007–1016, Aug. 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199808)14:11<1007::AID-YEA307>3.0.CO;2-U.
- [21] C. H. Luna-Flores, A. Wang, J. von Hellens, and R. E. Speight, 'Towards commercial levels of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*', *Journal of Biotechnology*, vol. 350, pp. 42–54, May 2022, doi: 10.1016/j.jbiotec.2022.04.001.
- [22] W. Al-Marzooqi, M. A. Al-Farsi, I. T. Kadim, O. Mahgoub, and J. S. Goddard, 'The effect of feeding different levels of sardine fish silage on broiler performance, meat quality and sensory characteristics under closed and open-sided housing systems', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, vol. 23, no. 12, pp. 1614–1625, 2010, doi: 10.5713/AJAS.2010.10119.
- [23] R. W. Hardy, B. Patro, C. Pujol-Baxley, C. J. Marx, and L. Feinberg, 'Partial replacement of soybean meal with *Methylobacterium extorquens* single-cell protein in feeds for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)', *Aquaculture Research*, vol. 49, no. 6, pp. 2218–2224, Jun. 2018, doi: 10.1111/ARE.13678.
- [24] *Towards Blue Transformation*. in The State of World Fisheries and Aquaculture., no. 2022. Rome: FAO, 2022. doi: <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.
- [25] B. D. Glencross, D. Huyben, and J. W. Schrama, 'The Application of Single-Cell Ingredients in Aquaculture Feeds—A Review', *Fishes 2020, Vol. 5, Page 22*, vol. 5, no. 3, p. 22, Jul. 2020, doi: 10.3390/FISHES5030022.
- [26] 'FAO. Official website Food and Agricultural Organization of the United Nations. Aquaculture Feed and Fertilizer Resources Information System. Atlantic salmon - Nutritional requirements'. Accessed: Feb. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/atlantic-salmon/nutritional-requirements/en/>.
- [27] A. G. J. Tacon, 'The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp; a training manual. 1: The essential nutrients', OOD and Agriculture Organization of the United Nations, Jun. 1987. Accessed: Feb. 16, 2024. [Online]. Available: <https://www.fao.org/3/ab470e/AB470E02.htm#ch2.6.3>.
- [28] M. S. Astorga-España, B. Rodríguez-Galdón, E. M. Rodríguez-Rodríguez, and C. Díaz-Romero, 'Amino acid content in seaweeds from the Magellan Straits (Chile)', *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 53, pp. 77–84, 2016, doi: 10.1016/j.jfca.2016.09.004.
- [29] S. Janbakhsh, S. S. P. Hosseini, and M. M. Shamsaie, 'Nutritional value and heavy metal content of fishmeal from the Southwest Caspian Sea', *Caspian J. Environ. Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 307–317, 2018, doi: 10.22124/CJES.2018.3200.
- [30] R. Jannathulla, O. Sravanthi, S. Moomeen, G. Gopikrishna, and J. S. Dayal, 'Microbial products in terms of isolates, whole-cell biomass, and live organisms as aquafeed

- ingredients: production, nutritional values, and market potential – a review’, *Aquaculture International*, vol. 29, pp. 623–650, 2021, doi: 10.1007/s10499-021-00644-2.
- [31] R. S. Cottrell, J. L. Blanchard, B. S. Halpern, M. Metian, and H. E. Froehlich, ‘Global adoption of novel aquaculture feeds could substantially reduce forage fish demand by 2030’, *Nature Food*, vol. 1, no. 5, pp. 301–308, 2020, doi: 10.1038/s43016-020-0078-x.
- [32] www.indexmundi.com, ‘Commodity price. Fishmeal.’ [Online]. Available: <https://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=fish-meal&months=240¤cy=eur>.
- [33] ‘FAO. Official website Food and Agricultural Organization of the United Nations. Aquaculture Feed and Fertilizer Resources Information System. Rainbow trout - nutritional requirements’. Accessed: Feb. 28, 2024. [Online]. Available: <https://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/rainbow-trout/nutritional-requirements/en/>.
- [34] R. Jannathulla, V. Rajaram, R. Kalanjiam, K. Ambasankar, M. Muralidhar, and J. S. Dayal, ‘Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources’, *Aquaculture Research*, vol. 50, no. 12, pp. 3493–3506, Dec. 2019, doi: 10.1111/ARE.14324.
- [35] L. Gasco *et al.*, ‘Fishmeal Alternative Protein Sources for Aquaculture Feeds’, in *Feeds for Aquaculture Sector. Current situation and alternatives sources.*, in SpringerBriefs in Molecular Science. , Springer, Cham, 2018, pp. 1–28. Accessed: May 02, 2024. [Online]. Available: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-77941-6_1.
- [36] B. C. Bratosin, S. Darjan, and D. C. Vodnar, ‘Single cell protein: A potential substitute in human and animal nutrition’, *Sustainability (Switzerland)*, vol. 13, no. 16, pp. 1–24, 2021, doi: 10.3390/su13169284.
- [37] M. Øverland, A. Karlsson, L. T. Mydland, O. H. Romarheim, and A. Skrede, ‘Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)’, *Aquaculture*, vol. 402–403, pp. 1–7, 2013, doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.03.016.
- [38] S. W. Jones, A. Karpol, S. Friedman, B. T. Maru, and B. P. Tracy, ‘Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture’, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 61, no. Table 1, pp. 189–197, 2020, doi: 10.1016/j.copbio.2019.12.026.
- [39] R. C. Carranza-Méndez, M. L. Chávez-González, L. Sepúlveda-Torre, C. N. Aguilar, M. Govea-Salas, and R. Ramos-González, ‘Production of single cell protein from orange peel residues by *Candida utilis*’, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 40, no. January, pp. 1–9, 2022, doi: 10.1016/j.bcab.2022.102298.
- [40] A. Nyssölä, A. Suhonen, A. Ritala, and K. M. Oksman-Caldentey, ‘The role of single cell protein in cellular agriculture’, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 75, pp. 1–7, 2022, doi: 10.1016/j.copbio.2022.102686.
- [41] A. Vidakovic *et al.*, ‘Growth performance, nutrient digestibility and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed graded levels of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus*’, *Aquaculture Nutrition*, vol. 26, no. 2, pp. 275–286, Apr. 2020, doi: 10.1111/ANU.12988.
- [42] J. O. Agboola, D. Lapeña, M. Øverland, M. Ø. Arntzen, L. T. Mydland, and J. Ø. Hansen, ‘Yeast as a novel protein source - Effect of species and autolysis on protein and amino acid digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar*)’, *Aquaculture*, vol. 546, p. 737312, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737312.

- [43] D. Huyben *et al.*, 'Effects of dietary inclusion of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* on gut microbiota of rainbow trout', *Aquaculture*, vol. 473, no. 2016, pp. 528–537, 2017, doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.03.024.
- [44] A. Zamani, M. Khajavi, M. H. Nazarpak, and E. Gisbert, 'Evaluation of a Bacterial Single-Cell Protein in Compound Diets for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry as an Alternative Protein Source', *Animals* 2020, Vol. 10, Page 1676, vol. 10, no. 9, p. 1676, Sep. 2020, doi: 10.3390/ANI10091676.
- [45] K. Hua and D. P. Bureau, 'Estimating changes in essential amino acid requirements of rainbow trout and Atlantic salmon as a function of body weight or diet composition using a novel factorial requirement model', *Aquaculture*, vol. 513, no. August, 2019, doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734440.
- [46] B. Bjerkeng, M. Peisker, K. von Schwartzenberg, T. Ytrestøyl, and T. Åsgård, 'Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin', *Aquaculture*, vol. 269, no. 1–4, pp. 476–489, Sep. 2007, doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2007.04.070.
- [47] S. Raita *et al.*, 'Microbial Carotenoids Production: Strains, Conditions, and Yield Affecting Factors', *Environmental and Climate Technologies*, vol. 27, no. 1, pp. 1027–1048, 2023, doi: 10.2478/rtuct-2023-0075.
- [48] V. Bampidis *et al.*, 'Safety and efficacy of a feed additive consisting of astaxanthin-rich *Phaffia rhodozyma* for salmon and trout (Igene Biotechnology, Inc.)', *EFSA Journal*, vol. 20, no. 2, p. e07161, Feb. 2022, doi: 10.2903/J.EFSA.2022.7161.
- [49] G. W. Sanderson and S. O. Jolly, 'The value of *Phaffia* yeast as a feed ingredient for salmonid fish', *Aquaculture*, vol. 124, no. 1–4, pp. 193–200, 1994, doi: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90377-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90377-8).
- [50] E. A. Johnson, T. G. Villa, and M. J. Lewis, '*Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets', *Aquaculture*, vol. 20, no. 2, pp. 123–134, 1980, doi: 10.1016/0044-8486(80)90041-1.
- [51] E. A.-A. Acheampong, 'Study of the growth parameters of the yeast *Phaffia rhodozyma* and its production of astaxanthin in peat hydrolysates', Masters Thesis, Memorial University of Newfoundland, Canada, 1993. Accessed: Feb. 07, 2024. [Online]. Available: <http://research.library.mun.ca/10051/>.
- [52] A. M. Martin, E. Acheampong, and T. R. Patel, 'Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate', *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 58, no. 3, pp. 223–230, 1993, doi: 10.1002/jctb.280580304.
- [53] G.-H. Tzeng and J.-J. Huang, *Multiple Attribute Decision Making: Methods and Applications*. Chapman and Hall/CRC., 2011. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1201/b11032>.
- [54] B. Zlaugotne, L. Zihare, L. Balode, A. Kalnbalkite, A. Khabdullin, and D. Blumberga, 'Multi-Criteria Decision Analysis Methods Comparison', *Environmental and Climate Technologies*, vol. 24, no. 1, pp. 454–471, Jul. 2020, doi: 10.2478/rtuct-2020-0028.
- [55] L. Feldmane, 'Mutagenesis and property analysis of astaxanthin producing microorganism *Phaffia rhodozyma*. Master's thesis'. RTU, 2023.
- [56] F. Winston, 'EMS and UV mutagenesis in yeast', *Current Protocols in Molecular Biology*, no. SUPPL. 82, 2008, doi: 10.1002/0471142727.mb1303bs82.
- [57] P. Guerlava, V. Izac, and J. L. Tholozan, 'Comparison of different methods of cell lysis and protein measurements in *Clostridium perfringens*: Application to the cell volume determination', *Current Microbiology*, vol. 36, no. 3, pp. 131–135, 1998, doi: 10.1007/PL00006756.

- [58] GL Sciences, 'Analysis of Pre-column Derivatized Amino Acids. InertSearch for LC.' [Online]. Available: <https://www.glsiences.com/viewfile/?p=LB088>.
- [59] M. M. Yust, J. Pedroche, J. Girón-Calle, J. Vioque, F. Millán, and M. Alaiz, 'Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection', *Food Chemistry*, vol. 85, no. 2, pp. 317–320, Apr. 2004, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2003.07.026.
- [60] S. A. Cevikkalp, G. B. Loker, M. Yaman, and B. Amoutzopoulos, 'A simplified HPLC method for determination of tryptophan in some cereals and legumes', *Food chemistry*, vol. 193, pp. 26–29, Feb. 2016, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.02.108.
- [61] M. Machado, S. Machado, F. B. Pimentel, V. Freitas, R. C. Alves, and M. B. P. P. Oliveira, 'Amino Acid Profile and Protein Quality Assessment of Macroalgae Produced in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture System', *Foods 2020*, vol. 9, no. 10, p. 1382, Sep. 2020, doi: 10.3390/FOODS9101382.
- [62] A. V. Kurpad, 'Protein: Quality and Sources', *Encyclopedia of Human Nutrition*, vol. 4–4, pp. 123–130, 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-375083-9.00241-5.
- [63] M. G. B. Bunda, B. L. M. Tumbokon, and A. E. Serrano, 'Composition, chemical score (CS) and essential amino acid index (EAAI) of the crinkle grass *Rhizoclonium* sp. as ingredient for aquafeeds', *AACL Bioflux*, vol. 8, no. 3, pp. 411–420, 2015.
- [64] H. Ni, G. Q. He, H. Ruan, Q. H. Chen, and F. Chen, 'Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract', *Journal of Zhejiang University: Science*, vol. 6 B, no. 6, pp. 514–522, Jun. 2005, doi: 10.1631/JZUS.2005.B0514/METRICS.
- [65] K. Sano and I. Shiio, 'Microbial Production of L-Lysine. III. Production By Mutants Resistant to s-(2-Aminoethyl)-l-Cysteine', *The Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 16, no. 5, pp. 373–391, 1970, doi: https://doi.org/10.2323/jgam.16.5_373.
- [66] A. S. F. Araújo, R. T. R. Monteiro, and R. B. Abarkeli, 'Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils', *Chemosphere*, vol. 52, no. 5, pp. 799–804, 2003, doi: 10.1016/S0045-6535(03)00266-2.
- [67] B. Łozowicka *et al.*, 'Effect of microorganism on behaviour of two commonly used herbicides in wheat/soil system', *Applied Soil Ecology*, vol. 162, no. August 2020, 2021, doi: 10.1016/j.apsoil.2020.103879.
- [68] W. Xuedong, W. Huili, and F. Defang, 'Biodegradation of imazapyr by free cells of *Pseudomonas fluorescense* biotype II and *Bacillus cereus* isolated from soil', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 74, no. 2, pp. 350–355, 2005, doi: 10.1007/s00128-004-0591-x.
- [69] X. Wang, X. Liu, H. Wang, and Q. Dong, 'Utilization and degradation of imazaquin by a naturally occurring isolate of *Arthrobacter crystallopoietes*', *Chemosphere*, vol. 67, no. 11, pp. 2156–2162, 2007, doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.042.
- [70] I. Petrovickij-Angerer, 'Herbicide-sensitivity of some microorganisms on the basis of the chlorsulfuron', PhD Thesis, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Godollo, Hungary, 2009. [Online]. Available: https://archive2020.szie.hu/file/tti/archivum/Angerer_PhD_Thesis.pdf.
- [71] B. Vallejo, C. Picazo, H. Orozco, E. Matallana, and A. Aranda, 'Herbicide glufosinate inhibits yeast growth and extends longevity during wine fermentation', *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Sep. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-12794-6.
- [72] M. Ahuja and N. S. Punekar, 'Phosphinothricin resistance in *Aspergillus niger* and its utility as a selectable transformation marker', *Fungal Genetics and Biology*, vol. 45, no. 7, pp. 1103–1110, 2008, doi: 10.1016/j.fgb.2008.04.002.

- [73] C. Gong, X. You, S. Zhang, and D. Xue, 'Functional Analysis of a Glutamine Biosynthesis Protein from a Psychrotrophic Bacterium, *Cryobacterium soli* GCJ02', *Indian J Microbiol*, vol. 60, no. 2, pp. 153–159, Jun. 2020, doi: 10.1007/s12088-020-00858-7.
- [74] H. K. Joo, Y. W. Park, Y. Y. Jang, and J. Y. Lee, 'Structural Analysis of Glutamine Synthetase from *Helicobacter pylori*', *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 11657, Aug. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-30191-5.
- [75] S. Mowbray, M. Kathiravan, A. Pandey, and L. Odell, 'Inhibition of Glutamine Synthetase: A Potential Drug Target in *Mycobacterium tuberculosis*', *Molecules*, vol. 19, no. 9, pp. 13161–13176, Aug. 2014, doi: 10.3390/molecules190913161.
- [76] G. A. Munoz and E. Agosin, 'Glutamine involvement in nitrogen control of gibberellic acid production in *Gibberella fujikuroi*', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, no. 12, pp. 4317–4322, 1993, doi: 10.1128/aem.59.12.4317-4322.1993.
- [77] Olufunke O. Ezekiel, Ogugua C. Aworh, James C. du Preez, and Laurinda Steyn, 'Cultivation of *Candida utilis* on Cassava Peel Hydrolysates for Single-cell Protein Production', *Journal of Food Science and Engineering*, vol. 2, no. 8, 2012, doi: 10.17265/2159-5828/2012.08.004.
- [78] K. Spalvins, S. Raita, K. Valters, and D. Blumberga, 'Improving single cell protein yields and amino acid profile via mutagenesis: review of applicable amino acid inhibitors for mutant selection', *Agronomy Research*, vol. 19, no. Special Issue 3, pp. 1285–1307, 2021, doi: 10.15159/AR.21.083.
- [79] B. Michalik, W. Biel, R. Lubowicki, and E. Jacyno, 'Chemical composition and biological value of proteins of the yeast *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol', *Canadian Journal of Animal Science*, vol. 94, no. 1, pp. 99–104, 2014, doi: 10.4141/CJAS2013-052.
- [80] R. Yang, Z. Chen, P. Hu, S. Zhang, and G. Luo, 'Two-stage fermentation enhanced single-cell protein production by *Yarrowia lipolytica* from food waste', *Bioresource Technology*, vol. 361, no. July, p. 127677, 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2022.127677.
- [81] D. Lapeña *et al.*, 'Spruce sugars and poultry hydrolysate as growth medium in repeated fed-batch fermentation processes for production of yeast biomass', *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 43, no. 4, pp. 723–736, 2020, doi: 10.1007/s00449-019-02271-x.
- [82] K. S. Marius *et al.*, 'Production of single cell protein (SCP) and essentials amino acids from *Candida utilis* FMJ12 by solid state fermentation using mango waste supplemented with nitrogen sources', *African Journal of Biotechnology*, vol. 17, no. 23, pp. 716–723, 2018, doi: 10.5897/ajb2017.16361.
- [83] N. Felix, K. Manikandan, A. Uma, and S. J. Kaushik, 'Evaluation of single cell protein on the growth performance, digestibility and immune gene expression of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*', *Animal Feed Science and Technology*, vol. 296, no. July 2022, p. 115549, 2023, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2022.115549.
- [84] F. G. Pearce, A. O. Hudson, K. Loomes, and R. C. J. Dobson, 'Dihydrodipicolinate synthase: Structure, dynamics, function, and evolution', in *Sub-Cellular Biochemistry*, vol. 83, 2017, pp. 271–289.



Svetlana Raita dzimusi 1990. gadā Ludzā. Daugavpils Universitātē ieguvusi dabaszinātņu bakalaura grādu bioloģijā (2012), Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātē inženierzinātņu maģistra grādu pārtikas zinātnē (2018). No 2017. līdz 2020. gadam paaugstināja profesionālo kompetenci mikrobioloģijā Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūta "BIOR" Mikrobioloģijas un patoloģijas laboratorijā. Kopš 2020. gada ir Rīgas Tehniskās universitātes Vides aizsardzības un siltuma sistēmu institūta pētniece. Zinātniskās intereses saistītas ar biotehnoloģijām – mikrobiālās fermentācijas optimizāciju, mikroorganismu īpašību uzlabošanu rūpnieciskam lietojumam, agroindustriālo blakusproduktu biokonversiju, mikrobiālo produktu izstrādi barības un pārtikas vajadzībām.