



ERAF projekts Nr. 1.1.1.1/20/A/041

“Tehnoloģiju izstrāde notekūdeņu dūņu pārstrādei sekundārās izejvielās”,
ko realizē Rīgas Tehniskā Universitāte un sadarbības partneris SIA “Bio RE”

Galvenie zinātniskie rezultāti

Projekta 4. ceturksnī (16.12.2021. – 31.03.2022)

Darbība 1. Notekūdeņu attīrīšanas iekārtu dūņu (NAID) dezintegrācijas /priekšapstrādes un vai hidrolīzes tehnoloģisko aspektu izpēte un efektivitātes novērtējums, Rūpnieciskais pētījums

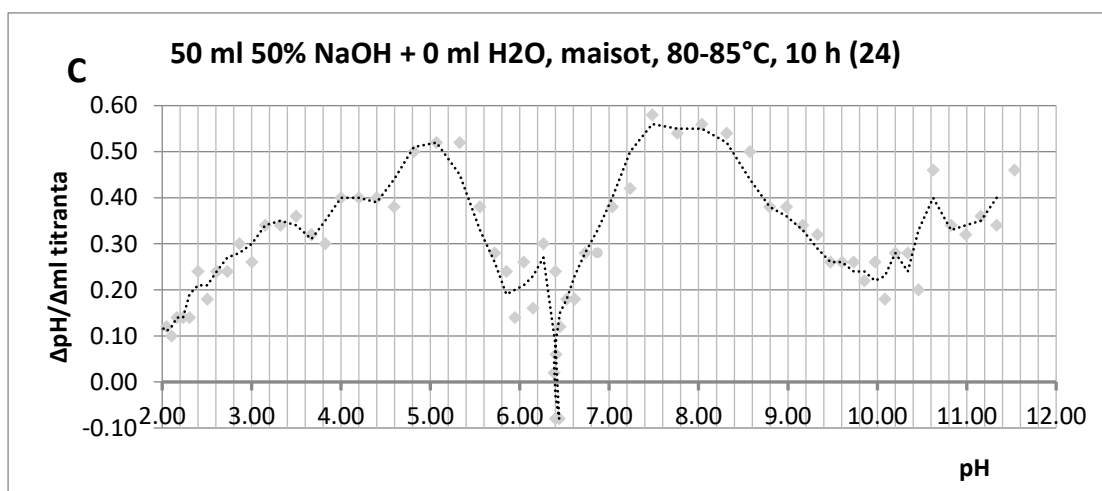
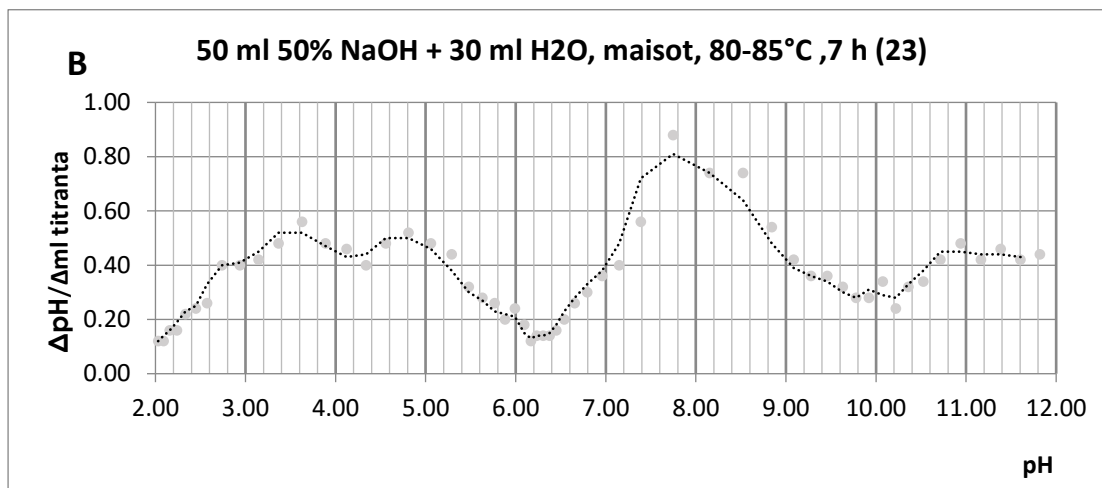
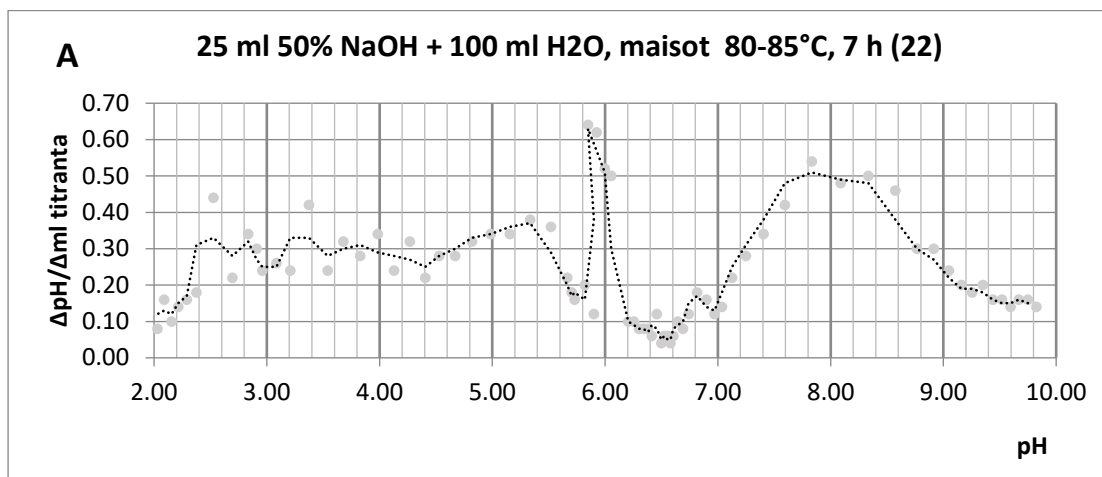
Šajā pētniecības periodā tika veikti NAID priekšapstrādes eksperimenti ar mikroviļņu starojumu, atkārtoti eksperimenti kavitācijas apstākļos. Pilnveidoti sārma un skābes hidrolīžu tehnoloģiskie risinājumi. Tika veikts visu izmantoto NAID apstrādes metožu rezultātu apkopojums. Tika pilnveidotas metodes kvantitatīvās proteīnu noteikšanas metodes.

Darbība 1.1. “Proteīnu sadalīšana: hidrodinamiskas, hidroakustiskās un fizikāli ķīmiskās metodes, šūnu dezintegrācijas un/vai hidrolīzes procesa kinētikas novērtēšanas algoritma izstrāde”, Rūpnieciskais pētījums

Šajā pētniecības periodā tika turpinātas aktivitātes ar dažādām hidrodinamiskajām un ķīmiskajām metodēm izmantojot: homogenizāciju, mikroviļņus un ultraskaņu. Pētījumi tika vērsti uz eksperimentālo procedūru un atkārtojamības uzlabošanu.

Dūņu ķīmiskās hidrolīzes pētījumi tika vērsti galvenokārt uz sārma hidrolīzes apstākļu optimizēšanu un reakcijas produktu analizēšanu ar sārma/skābes titrēšanas paņēmieniem, ar mērķi labāk izprast reakcijas produktu sastāvu.

Sārma hidrolīzē tika nodrošināti dažādi hidrolīzes apstākļi un analizēti šo hidrolīžu produkti.

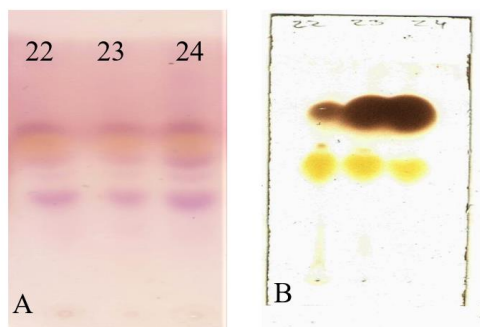


Attēls 1. Hidrolīzes šķīduma parametri pie dažādiem vielas sastāviem.

Pēc grafikos 1A, 1B un 1C attēlotajiem hidrolīzes šķīduma izoelektriskajiem punktiem, kas izteikti kā pH funkcija, no pH izmaiņas pret katru pievienoto titranta mililitru, var redzēt, ka iegūtajiem proteīnu vai peptīdu fragmentiem šie izoelektriskie punkti ir līdzīgi, kas izpaužas kā funkcijas maksimumu apgabali.

Jāatzīst, ka grafiks A ir visatšķirīgākais, taču ir jāņem vērā, ka posmā no pH 2 – 5 tam arī ir vairāki maksimumi, kas norāda uz to, ka produktiem ir līdzīgs raksturs.

Lai papildus novērtētu reakcijas produktu kvantitatīvo sastāvu, tiek veikta speciāli šim nolūkam izstrādāta plānslāņa hromatogrāfijas analīze ar šķīdinātāju sistēmu IPS:AcOH:H₂O 7:2:2.



Attēls 2. Plānslāņa hromatogrammas

Attēlos 2A un 2B attēlotas plānslāņa hromatogrammas.

Attēlā 2A redzama plānslāņa hromatogramma apstrādāta ar ninhidrīna šķīdumu acetona, bet attēlā 2B redzama šī pati hromatogramma apstrādāta ar skābes šķīdumu pēc žāvēšanas 105 °C.

Hromatogrammās redzams, ka dažādajos hidrolīzes apstākļos veidojas līdzīgi produkti, tomēr palielinot NaOH koncentrāciju, relatīvi palielinās arī hidrolīzes produktu koncentrācija, tātad paliek vairāk proteīna.

Ir jāņem vērā, ka šī metode balstās uz aminogrupu kvantitatīvo reakciju ar ninhidrīna acetona šķīdumu, tāpēc ir svarīgi atcerēties, ka, jo vairāk aminogrupu, jo intensīvāka krāsa, kas ne vienmēr nozīmē kopproteīna koncentrācijas palielināšanos. To apstiprina arī aktivitātē 1.2. iegūtie dati, salīdzinot dažādas proteīnu kvantitatīvās noteikšanas metodes.

Darbība 1.2. “NAID hidrolizēta proteīna kvantitatīvā novērtējuma metodes izstrāde un masas bilances, bioķīmiskā sastāva novērtējums hidrolizētajām NAI dūņām”, Rūpnieciskais pētījums

Iepriekšējos pētījuma posmos tika atlasītas metodes aktīvā proteīna kvantitatīvajai novērtēšanai un tika secināts, ka vispiemērotāka no atlasītajām metodēm ir Lovrija metode, kuras pamatā ir Biureta reakcijas sekundārā reakcija ar foleīnskābi. Tomēr proteīna koncentrācija tiek mērīta, izmantojot standarta proteīnu, kas šajā gadījumā ir izdalīts teļa seruma albumīns jeb tā masas daļa šķīdumā. Tas nozīmē, ka aminogrupu daudzums tiek salīdzināts ar standartā esošo aminogrupu daudzumu un tādā veidā izteikta testējamā proteīna koncentrācija - mg/L .

No iegūtajiem proteīnu koncentrācijas mērījumiem iespējams iegūt informāciju par aktīvā kopproteīna masu, taču, nezinot proteīnu fragmentu masu, nav iespējams iegūt informāciju par proteīnu fragmentu funkcionālo grupu koncentrāciju, kas ir nepieciešama tālāku ķīmisko reakciju stehiometrijas izveidei.

Šajā pētniecības periodā tika atlasīta kvantitatīvās proteīnu noteikšanas metode, pēc kuras iespējams noteikt funkcionālās karboksilgrupas (COO-) molāro koncentrāciju, izmantojot Formola (Sorensa, formaldehīda) titrēšanas metodi.

Formola titrēšana ir titrēšana, ko parasti veic lai ātri noteiktu olbaltumvielu saturu pienā. Turklāt formola titrēšanu var izmantot arī olbaltumvielu hidrolīzes produktu koncentrācijas mērīšanai. Formola titrēšanas metodes princips ir neitralizēt šķīdumu ar NaOH, kam pievienots formaldehīds, kurā aminogrupa ir saistīta un neietekmē NaOH skābes bāzes reakciju, veidojot dimetilolu. Parasti izmantotais indikators ir fenolftaleīns (PP), un krāsas maiņas reakcija titrēšanas beigās kļūst rozā.

Formola metode tika salīdzināta ar jau izmantoto Lovrija metodi un dati apskatāmi, analizējot paraugus dažādos hidrolīzes posmos – dati apkopoti tabulā 1.

Tabula 1. Proteīna koncentrācijas salīdzinājums ar Formola metodi un proteīna koncentrācija ar Lovrija metodi.

Hidrolīzes laiks, h	Funkcionālās grupas koncentrācija pēc Formola metodes, mol/L	Proteīnu koncentrācija pēc Lovrija metodes, mg/L
3	0,040	25016
6	0,035	15375
9	0,028	18220

Pēc rezultātiem iespējams secināt, ka līdz ar reakcijas laiku samazinās kopējā proteīna koncentrācija reakcijas masā un proteīnos esošo karboksilgrupu koncentrācija. Tas nozīmē, ka, palielinoties hidrolīzes ilgumam, notiek vājo skābju sadalīšanās un skābju grupu koncentrācija hidrolizātu proteīna fragmentos samazinās, taču nav izteiktas korelācijas starp karboksilgrupu un aktīvā kopproteīna koncentrāciju samazināšanos.

Šo koncentrāciju samazināšanās būtu skaidrojama ar proteīnā esošo sāna ķēdēs esošo karboksigrupu hidrolīzi skābajās abinoskābēs, piemēram, asparģīnskābē, asparģīnā un citās.

Darbība 2.1. “Proteīnu izdalīšana no aktīvo dūņu hidrolizāta ar membrānu tehnoloģijām un fizikāli ķīmiskajām metodēm”, Rūpnieciskais pētījums

Līdzšinēji augstākā aktīvā kopproteīna koncentrācija, kuriem ir izdevies iegūt kādā no hidrolīzes režīmiem, sasniedz tika aptuveni 35 000 mg/L lielu koncentrāciju, kas ir uzskatāma par nepietiekamu, lai nodrošinātu optimālu tālāku produktu sintēzi. Šāda veida hidrolizātu varētu izmantot kā substrātu biotehnoloģiskajos procesos augstākas pievienotās vērtības produktu ražošanā.

Šajā pētījumu periodā tika izmēģinātas un optimizētas dažāda veida proteīnu izgulsnēšanas un iekonzentrēšanas metodes, lai palielinātu to koncentrāciju tālāko produktu iegūšanai.

Brīdī, kad izdodas nodrošināt proteīnu kristalizēšanos un izsēšanos, tos ir iespējams atdalīt no reakcijas masas ar centrifugēšanas palīdzību jau pie 3500 rpm, 5 min. Tomēr līdz šim laboratoriski nav izdevies veikt šo nogulšņu atkārtotu izšķīdināšanu reakcijas masā tā, lai nodrošinātu pietiekamu koncentrāciju nākamajiem sintēzes posmiem.

Darbība 3. “Pilota iekārtas izstrāde NAID dezintegrācijas un/vai hidrolīzes un proteīnu izdalīšanai”, Rūpnieciskais pētījums

Pētniecības periodā tika pabeigta HDI testa iekārtas pārbūve. Tika veikti pirmie eksperimenti ar NAID. Eksperimenti uzrādīja pozitīvus rezultātus, taču ir nepieciešams aprīkot iekārtu ar elementiem, kas ļautu operatīvāk novērtēt hidrodinamiskās iedarbības procesu. Uz iegūto rezultātu bāzes top pilotiekārtas tehnoloģisko robežnosacījumu kopums.

Sagatavoja:

Ēriks Skripsts (vadošais pētnieks)