



LATVIJAS UNIVERSITĀTE
**BIOLOĢIJAS
INSTITŪTS**



Latvijas
Biozinātņu un
tehnoloģiju
universitāte



Latvijas
Lauksaimniecības
universitāte

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA
EIROPA INVESTĒ LAUKU APVIDOS
Eiropas Lauksaimniecības fonds
lauku attīstībai

Atbalsta Zemkopības ministrija un Lauku atbalsta dienests

Projekta

“AUGU IZCELSMES BARĪBAS PIEDEVAS IZSTRĀDE PUTNU IMUNITĀTES STIPRINĀŠANAI UN OLU UZTURVĒRTĪBAS PAAUGSTINĀŠANAI AR OMEGA-3 TAUKSKĀBĒM”

Noslēguma pārskats

Projekts Nr. 22-00-A01612-000015

Informācijas sagatavotāji: Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta Rūpnieciskās mikrobioloģijas un pārtikas biotehnoloģiju laboratorija

Projekta vadītājs: *Dr. biol.* Pāvels Semjonovs, LU Bioloģijas institūts, vadošais pētnieks

Sadarbības partneri:

Latvijas Universitāte

Latvijas Biozinātņu un Tehnoloģiju Universitāte

AS “BIOLAT”

Latvijas Apvienotā putnkopības nozares asociācija (LAPNA)

Saimnieciskās darbības veicējs Ingus Druva

Saimnieciskās darbības veicēja Laura Logina-Lucava

Z/s “Skujas”

Z/s “Kalvāni”

Projekta īstenošanas periods: 01.08.2022. – 30.06.2025.

Projekta kopējais finansējums: 463 455,65 EUR

RĪGA 2025

SATURS

TEKSTĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	5
PAMATJĒDZIENI	7
KOPSAVILKUMS	8
1. VISPĀRĪGĀ PROJEKTA INFORMĀCIJA	12
1.1. Partneri	12
1.2. Projekta virsmērķis	12
1.3. Ievads	12
1.4. Tēmas aktualitāte.....	14
1.5. Mērķis	15
1.6. Plānotie rezultāti	16
1.7. Projektā iesaistīto partneru uzdevumi un atbildības jomas	17
2. MĀJPUTNU AUDZĒŠANA.....	20
2.1. Aktuālās problēmas mājasputnu uzturēšanā	20
2.2. Mikroaļģes kā piedeva dējējvistu pārtikai	23
3. MIKROAĻĢU BIOTEHNOLOĢIJAS	27
3.1. Projektā izmantoto mikroaļģu raksturojums	27
3.2. Mikroaļģu producēti mērķsavienojumi un to ietekme uz putnkopības produktivitāti	42
3.3. Mikroaļģu kultivēšanas tehnoloģijas.....	54
4. MIKROBIOĀLI IEGŪTU LIPĪDU UN POLINEPIESĀTINĀTO TAUKSKĀBJU EKSTRAKCIJAS UN ATTĪRĪŠANAS METODES	58
4.1. Lipīdu frakcijas iegūšanas metodes	59
4.2. Polinepiesātināto taukskābju (PNTS) ekstrakcija un iekonzentrēšana.....	74
5. ANALĪTISKĀS METODES	83

6. POTOKOLS: MIKROAĻĢU BIOĻOGISKI AKTĪVO PRODUCENTU, PRIMĀRI – PNTS IESPĒJAMO PRODUCENTU KANDIDĀTU KLĀSTA APZINĀŠANA.....	92
7. PĀRSKATS: KULTIVĀCIJAS TEHNOĻĪJU IETEKMES NOVĒRTĒJUMS UZ DAŽĀDU CELMU MIKROAĻĢĒM	106
7.1. Siera sūkalu izmantošana mikroaļģu kultivācijā.....	106
7.2. Siera un biezpiena sūkalu izmantošana mikroaļģu kultivācijā	118
8. PROTOKOLS: TAUKSKĀBJU KVANTIFICĒŠANA DAŽĀDU MIKROAĻĢU BIOMASĀ	125
9. PROTOKOLS: URĪNVIELAS METODES IZMANTOŠANA PNTS FRAKCIJAS IEGŪŠANAI.....	134
10. PROTOKOLS: LIPĪDU FRAKCIJAS IEGŪŠANA NO MIKROAĻĢĒM.....	141
Mikroaļģu koncentrācijas ietekme uz lipīdu iznākumu ar Soksleta ekstrakciju	142
Mikroviļņu asistētā ekstrakcija	154
Mikroaļģu lipīdu oksidācijas pakāpes noteikšana	163
11. MIKROAĻĢU LIPĪDU UN POLINEPIESĀTINĀTO TAUKSKĀBJU EKSTRAKTA RAŽOŠANAS REGLAMENTS.....	183
TEHNISKIE NOTEIKUMI - Mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ekstrakts TN LV 40003128200 – 04-25-E	193
12. MIKROAĻĢU IZĒDINĀŠANAS IETEKME UZ BROILERCĀĻU UN DĒJĒJVISTU VESELĪBU, PRODUKTIVITĀTI UN PRODUKCIJAS KVALITĀTI.	200
12.1. Pētījumā iekļautās augu izcelsmes barības piedevas.....	202
12.2. Mikroaļģu <i>Spirulina platensis</i>, <i>Chlorella vulgaris</i> un <i>Dunaliella salina</i> izbarošanas ietekme uz cāļu un jaunputnu augšanu, attīstību un produktivitāti laboratorijas un ražošanas apstākļos.....	211
12.3. Mikroaļģu <i>Chlorella vulgaris</i>, <i>Spirulina platensis</i> un <i>Dunaliella salina</i> biomasas izbarošanas ietekme uz pieaugušu dējējvistu organismu un produktivitāti laboratorijas un ražošanas apstākļos.	242

13. MĀJPUTNU BAROŠANA AR MIKROAĻĢĒM KĀ AUGU IZCELSMES BARĪBAS PIEDĒVU SAIMNIECĪBĀS – VIZUĀLAIS MATERIĀLS	297
SECINĀJUMI.....	299
PUBLICITĀTES PASĀKUMI.....	300
PIELIKUMI	302
LITEARTŪRAS SARAKSTS.....	326

TEKSTĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

3N-BBM-V – angl. *Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen and Vitamins*

AS – Akciju sabiedrība

ASV – Amerikas Savienotās valstis

ATP – Adenozīntrifosfāts

BSP – Bioloģiskais skābekļa patēriņš

CCAP - angl. *Culture collection of algae and protozoa*, Aļģu un protistu kultūru kolekcija

CD – Konjugētie diēni

CSP – Centrālā statistikas pārvalde

CT – Konjugētie triēni

DHA – Dokozaheksaēnskābe

EPA – Eikozapentaēnskābe

FAO – angl. *Food and agriculture organisation*, Pārtikas un lauksaimniecības organizācija

FCR – Folina – Ciocal reaģents

FFA – angl. *Free fatty acids*, Brīvās taukskābes

ĢM – Ģenētiski modificēts

ĢMO – Ģenētiski modificēts organisms

HIV – Cilvēka imūndeficīta vīruss

HPLC – Augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfija

HSP – Hansena šķīdības parametri

IDF – angl. *International dairy federation*, Internacionālā piena produktu federācija

ĶSP – Ķīmiskais skābekļa patēriņš

LAPNA – Latvijas Apvienotā putnkopības nozares asociācija

LU – Latvijas Universitāte

MNTS – Mononepiesātinātās taukskābes

MS – angl. *Microsoft*

NADP+ - Nikotīnamīdadenīdinukleotīdfosfāts

OD – angl. *Optical density*, Optiskais blīvums

PET – Polietilēntereftalāts

PNTS – Polinepiesātinātās taukskābes

PPTS – Polipiesātinātās taukskābes

rpm – angl. *Rounds per minute*, Apgriezieni minūtē

SC/CO₂ – Superkritiskā ogļskābā gāze

SD – Standartkļūda

SDA – Steridonskābe

SIA – Sabiedrība ar ierobežotu atbildību

TAG – Trigliceroli

TBA – Tiobarbitūrskābe

USD – ASV dolāri

UV – Ultravioletā gaisma

Z/s – Zemnieku saimniecība

PAMATJĒDZIENI

Autotrofs – Barošanās veids, kas saistīts ar enerģijas iegūšanu no neorganiskām vielām, piemēram, ar ogļskābo gāzi.

Biomasa – Mikroorganismu šūnu masas kopums, parasti vienas sugas.

Bioreaktors – Iekārta ar kuras palīdzību tiek kultivēti noteikti mikroorganismi ar mērķi iegūt biomasu.

Biostimulants – Savienojums ar bioloģiski aktīvām īpašībām.

Ekstrakcija – Tehnoloģisks process, kura laikā no izejvielām tiek iegūts ekstrakts.

Ekstrakts – Koncentrētā veidā iegūts ķīmisko savienojumu maisījums vai ķīmiskais savienojums.

Heterotrofs – Barošanās veids, kas saistīts ar enerģijas iegūšanu strikti no organiskām vielām, piemēram, organiskā oglekļa.

Kultivācija – Mikrobioloģijas un biotehnoloģiju process, kurā tiek audzēti mikroorganismi ar mērķi iegūt to palielinātu biomasas daudzumu.

Lipīdi – Bioloģiski aktīvi savienojumi, kas parasti ir saražoti ar dzīvu organismu palīdzību. Tos vēl sauc par taukiem jeb eļļām.

Mikroaļģes – Mikroskopisks, viensūnu organisms, kas galvenokārt aug un vairojas ūdens vidē. Šī organismu grupa ietver milzīgu sugu daudzveidību, kas mērāma simtos tūkstošu sugu. Mikroaļģes tiek izmantotas dažādās industrijās, galvenokārt, biotehnoloģijā, kā dažādu vērtīgu savienojumu ražotājas.

Miksotrofs – Barošanās veids, kas saistīts ar enerģijas iegūšanu gan autotrofi, gan heterotrofi.

Nepiesātinātās taukskābes – Taukskābju apakšklase ar īpašām bioloģiskām funkcijām, kas molekulu struktūrā satur lielu skaitu dubulto oglekļa saišu. Tās parasti tiek asociētas ar nozīmīgām pozitīvām īpašībām dzīvnieku un cilvēku sirds un asinsvadu sistēmas veselībā.

Omega taukskābes – Nepiesātināto taukskābju apakšklase ar īpaši nozīmīgām, pozitīvām bioloģiskām funkcijām dzīvnieku un cilvēku veselībā.

Piesātinātās taukskābes – Taukskābju apakšklase ar īpašām bioloģiskām funkcijām, kas molekulu struktūrā satur lielu skaitu vienkāršo oglekļa saišu, parasti ar dzīvnieku un cilvēku veselību negatīvā kontekstā.

Sūkalas - Šķidrums, kas rodas biezpiena ieguvē un kas satur ūdenī šķīstošas vielas (piemēram, cukuru, minerālvielas, vitamīnus).

Taukskābes – Lipīdu apakšklase ar īpašām bioloģiski aktīvām funkcijām.

KOPSAVILKUMS

Arvien pieaug pieprasījums pēc uzturvielām augstvērtīgas un videi draudzīgi ražotas pārtikas. Vistas tiek uzskatītas par biežāk audzētāko mājputnu pasaulē, un to produkti, gaļa un olas, kļūst aizvien pieprasītāki. Tomēr vistikopība saskarās ar vairākām nozīmīgām problēmām – putnu slimībām, zemu produktivitāti, nekvalitatīvu, nepietiekamu uzturu un neētiskiem audzēšanas apstākļiem. Šīs problēmas var samazināt produktivitāti un produktu pievilcību patērētājiem, tādējādi negatīvi ietekmējot ražotāju ekonomiskos rādītājus.

Šajā kontekstā mikroaļģes, kas ir fotosintizējoši mikroorganismi, tiek uzskatītas par potenciālu risinājumu ar mājputnu audzēšanu saistītajās problēmās. Mikroaļģu biomasa satur ļoti vērtīgus savienojumus kā antioksidantus, pretvīrusu, pretiekaisuma savienojumus, ogļhidrātus, proteīnus, vitamīnus, minerālvielas, lipīdus un, pats galvenais, omega taukskābes, kas ir ļoti svarīgas kā mājputnu, tā cilvēku veselībā. Mikroaļģu pievienošana vistu barībai varētu uzlabot vistu labturību un nozares kopējos ekonomiskos rādītājus, palielinot produktivitāti un padarot produktu pievilcīgāku patērētājam.

Omega taukskābes, kas palielinātās koncentrācijās sastopamas mikroaļģēs, uzlabo vistu veselību, bet vienlaikus var akumulēties gala produktos – gaļā un olās, kas labvēlīgi ietekmē cilvēku, konkrēti, samazinot sirds un asinsvadu slimību risku. Projekta virsmērķis bija aprobēt miksotrofu mikroaļģu kultivācijas metodi palielinātai poli-nepiesātināto taukskābju ieguvei un to ekstrakcijai no mikroaļģu biomasas dējējputnu barības kvalitātes uzlabošanai. Ar konkrētiem mērķiem – novērtēt taukskābju kompozīciju dažādās mikroaļģēs un izpētīt iespējas bagātināt mājputnu olas ar omega-3 taukskābēm, pievienojot mikroaļģu koncentrātu dējējvistu barības maisījumiem. Kā arī izvērtēt mikroaļģu koncentrāta ar paaugstinātu omega-3 taukskābju saturu ietekmi uz dējējvistu produktivitāti un veselību.

Kā nozīmīgākas mikroaļģu sugas, kas satur augstu polinepiesātināto taukskābju koncentrāciju un citus mājputniem vērtīgus savienojumus, tika identificētas *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Tetrademus obliquus*, *Dunaliella salina* un *Graesiella emersonii*. Kultivācijas eksperimentos apstiprinājās, ka *G. emersonii* jāizvēlas kā piemērotāko mikroaļģu sugu turpmākai kultivācijai, pamatojoties uz tās spēju veidot augstu biomasas daudzumu un sintezēt nozīmīgus metabolītus (piemēram, pigmentus un lipīdus) dažādos kultivācijas režīmos, īpaši miksotrofi, kā arī tās spēju izmantot dažādus cukurus, tostarp tos, kas atrodami siera sūkalās. Lielākais biomasas sausais svars – 1,97 g/L – tika iegūts 20% sūkalu koncentrācijas barotnē, kas ir par gandrīz 90%

vairāk nekā kontroles grupā, norādot uz augstu efektivitāti šajos apstākļos. Dati rāda ievērojamu izaugsmes pārsvaru jau 4. dienā: sausais svars sūkalu grupā bija 1,03 g/L, kas ir par gandrīz 78% vairāk nekā kontroles grupā. Kultivācijas beigās (24. dienā) siera sūkalu grupā iegūts sausais svars bija 1,55 g/L, kas ir par 60% augstāks nekā fotoautotrofās kontroles grupā (0,97 g/L). Mikroaļģu kultivācijai jāizmanto optimāla siera sūkalu koncentrācija, kas atkarīga no konkrētās sugas: *G. emersonii* gadījumā – 20%, bet *T. obliquus* gadījumā – 50%.

Šīs koncentrācijas nodrošina visaugstāko biomasas ražīgumu un ir būtisks pamats tālākai procesa optimizācijai industriālā mērogā. Mikroaļģu kultivācijā ieteicams izmantot 20% siera sūkalu barotni, īpaši *G. emersonii* sugai, jo šāds substrāts nodrošina ne tikai augstu biomasas ražu gan optimālā (25 °C), gan stresa (15 °C) temperatūrā, bet arī ievērojami veicina lipīdu uzkrāšanos zemākās temperatūrās.

Projekta laikā tika izstrādāta metode PNTS noteikšanai mikroaļģu biomasā, kas apvieno vairākas iepriekš aprakstītas metodes (Folha, TBA un konugēto diēnu). Tika izmēģināta urīnvielas metode PNTS frakcijas atdalīšanai no mikroaļģu biomasas. Tomēr salīdzinoši bīstamā ekstrakcijas procesa un zemo iznākumu dēļ, tika izmēģinātas alternatīvas metodes lipīdu frakcijas iegūšanai no mikroaļģēm ar mazāk kaitīgiem šķīdinātājiem, kas nodrošinātu iespēju to drošākai izmantošanai rūpnieciskās ražošanas apstākļos.

Tika izstrādāta ieteikumu shēma lipīdu ekstrakcijai no mikroaļģu biomasas, kas satur daudz PNTS. Šīs ražošanas metodes ir salīdzinoši viegli pārnest ražošanas praksē un lielākos ražošanas apjomos, tās ietver Soksleta un mikroviļņu asistēto ekstrakciju. Kopumā lipīdu ekstrakcija ar mikroviļņu palīdzību izrādījās pārsteidzoši efektīva. Salīdzinot šo alternatīvo ekstrakcijas metodi ar tradicionālo Soksleta ekstrakciju, neattīrītu lipīdu iznākums no biomasas lielākā skaitā gadījumu bija pat lielāks. Lipīdu frakcijām, iegūtām ar Soksleta ekstrakciju, bija augstāka tīrības pakāpe kā nefiltrētiem mikroviļņu paraugiem, tomēr ar ļoti vienkāršu filtrēšanas procesu tīrības pakāpi izdevās būtiski palielināt.

Rezultāti liecina par to, ka no mikroaļģu biomasas masas ir iespējams ekstrahēt līdz pat 20% lipīdu. Izmantojot atbilstošas attīrīšanas metodes, laboratorijā izdevās iegūt lipīdu frakciju, kas saturēja mazāk kā 5% piemaisījumus. Izmantotās metodes neietekmēja lipīdos esošo PNTS saturu – tas saglabājās augsts (līdz 12% no lipīdu masas). Papildus tika noteikts, ka mikroaļģu lipīdi dabiski satur augstas koncentrācijas ar dažādiem antioksidantiem, kas nodrošina eļļas stabilitāti. Tika noskaidrots, ka optimālie mikroaļģu eļļu uzglabāšanas apstākļi ir slēgts trauks, tumsā ar 4°C.

Pētījumā laboratorijas apstākļos tika pārbaudīts, kā ēdamo mikroaļģu *Tetrademus obliquus*, *Spirulina platensis* un *Chlorella vulgaris* biomasas ietekmē broileru cāļu augšanu un gaļas kvalitāti. *Chlorella vulgaris* palielināja E vitamīna saturu baltajā krūšu gaļā un uzlaboja olbaltumvielu daudzumu augšstilbu sarkanajā gaļā, vienlaikus bagātinot lipīdu profilu ar augstāku mononepiesātināto un polinepiesātināto taukskābju līmeni. Tomēr augstais omega-6 un zems omega-3 saturs izraisīja vismazāk labvēlīgo omega-6 un omega-3 attiecību, kas nav vēlama no cilvēka veselības viedokļa. *Spirulina platensis* veicināja labvēlīgāku taukskābju profilu ar zemāko omega-6/omega-3 attiecību un mērenu tauku saturu, vienlaikus paaugstinot olbaltumvielu līmeni, īpaši baltajā krūšu gaļā. Tas parāda tās potenciālu kā funkcionālu barības piedevu mājputnu gaļas uzturvērtības uzlabošanai. *Tetrademus obliquus* izbarošanas rezultātā ieguvām gaļu ar mazāku tauku saturu, paaugstinātu B12 vitamīna un kālija līmeni un līdzsvarotāku omega-6 un omega-3 attiecību, īpaši līdz 43 dienai, kas liecina par kumulatīviem ieguvumiem ilgstošas barošanas rezultātā.

Gan *Spirulina platensis* (1%, 1,5%, 3% devās), gan *Chlorella vulgaris* (1% devā) biomasas pievienošana dējējvistu barībai neizraisīja makroskopiskas patoloģiskas izmaiņas putnu organismā pētījuma laikā. Tas ir būtisks pozitīvs rādītājs, ņemot vērā, ka liela mikroaļģu deva citos pētījumos var izraisīt negatīvas sekas. Kritušo putnu nāves iemesli pētījuma saimniecībā nebija saistīti ar mikroaļģu izēdināšanu. Putnu ķermeņa masa būtiski neatšķīrās starp grupām, kas netieši apstiprina *Spirulina platensis* nekaitīgumu putnu pašsajūtai un veselībai.

Spirulina platensis (īpaši 3% deva) veicina barības evakuāciju no dziedzerkuņģa, savukārt *Chlorella vulgaris* (1% deva) to paildzina. Trīs mēnešus ilga mikroaļģu biomasas izēdināšana var būtiski palielināt tievo un resno zarnu garumu, kas norāda uz lielāku barības šķelšanas un uzsūkšanās laukumu, tādējādi uzlabojot barības pārstrādi un uzņemšanu. *Dunaliella 0,5% (DU5)* un *Spirulina 0,5% (SP5)* grupas uzrādīja augstāko vidējo olu skaitu un dējības intensitāti visā pētījuma periodā. *Chlorella vulgaris* biomasas pievienošana pie pamatbarības devā 1% var paaugstināt dējējvistu dēšanas intensitāti, atsevišķos gadījumos vidēji par 6%. Olu vidējā masa visās grupās nebija statistiski nozīmīgi atšķirīga, kas liecina, ka uzlabotā dējība un lielāks olu skaits nenotika uz olas kvalitātes (masas) rēķina.

Kopumā mikroaļģu biomasas pievienošana būtiski neietekmēja olu galvenos uzturvērtības rādītājus (ūdens, proteīna, pelnu, holīna, nātrija, kopējo tauku un enerģētisko vērtību). Omega-3, Omega-6 un Omega-9 taukskābju daudzums olās starp grupām un testēšanas nedēļām mainījās

minimāli un nebija statistiski nozīmīgi. Tomēr visās grupās tika konstatēta augsta omega-6/omega-3 attiecība (no 7,75:1 līdz 16:1), kas būtiski pārsniedz optimālo (~5:1) cilvēka uzturā. Holesterīna daudzums olās kontroles grupās pētījuma gaitā samazinājās, savukārt vairākās eksperimentālajās grupās (piemēram, CV1, CV3, CV5, SP5, CV51) holesterīna līmenis palielinājās. Tikai DU5 grupā holesterīna līmenis samazinājās.

Projekta laikā visas aktivitātes tika veiksmīgi izpildītas. Šī projekta posma pētījuma rezultāti apstiprina mikroaļģu izmantošanu kā ilgtspējīgas, funkcionālas barības sastāvdaļas un norāda, ka to pielietojums mājputnu uzturā ir jāpielāgo konkrētiem uztura mērķiem, piemēram, olbaltumvielu bagātināšanai, lipīdu modulācijai vai omega-3 palielināšanai.

1. VISPĀRĪGĀ PROJEKTA INFORMĀCIJA

1.1. Partneri

- **Latvijas Universitāte**, Raiņa bulvāris 19, Rīga, LV-1586, Pētniecības iestāde, Pāvels Semjonovs, e-pasts pavels.semjonovs@lu.lv ;
- **Latvijas Biozinātņu un Tehnoloģiju Universitāte**, Lielā iela 2, Jelgava, LV-3001, Pētniecības iestāde, Dr, med. Vet. Aija Ilgaža;
- **Akciju sabiedrība “BIOLAT”**, Rīgas iela 111, Salaspils, Salaspils nov., LV-2169;
- **Biedrība “LATVIJAS APVIENOTĀ PUTNKOPĪBAS NOZARES ASOCIĀCIJA”**, Republikas laukums 2, Rīga, LV-1010;
- Saimnieciskās darbības veicējs **Ingus Druva**, “Kalnadruvas”, Taurupes pagasts, Ogres novads, LV-5064, projekta vadītāja Sindija Druva, e-pasts sintija@kalnadruvas.lv;
- Saimnieciskās darbības veicēja **Laura Logina-Lucava**, "Pakalni", Lode, Lēdurgas pag., Siguldas nov., LV-4012, e-pasts lala1001@tvnet.lv;
- Vaidavas pagasta zemnieku saimniecība **“Skujas”**, “Skujas”, Vaidavas pag., Valmieras nov., LV-4227, saimniecības vadītājs Guntars Eglītis, e-pasts zsskujas@gmail.com;
- Taurupes pagasta Savinas zemnieku saimniecība **“KALVĀNI”**, "Pumpenes", Taurupes pag., Ogres nov., LV-5064, Brigita Savina, e-pasts brigita.savina@inbox.lv;

1.2. Projekta virsmērķis

Projekta gaitā plānots aprobēt mikсотрофу aļģu kultivācijas metodi palielinātai poli-nepiesātināto taukskābju (PNTS) ieguvei un to ekstrakcijai no mikrobiālās biomasas dējējputnu barības kvalitātes uzlabošanai.

1.3. Ievads

Mūsdienās ar vien pieaug pieprasījums pēc kvalitatīvas, uzturvielām bagātas un ilgtspējīgi ražotas pārtikas. Ar putnkopību saistītās problēmas ietver bažas par putnu labklājību, vides problēmas un dažādas bīstamas putnu slimības. Šai lauksaimniecības nozarei ir būtiska loma pārtikas ciklā, jo tā nodrošina lielu daļu no sabiedrībā patērētajām dzīvnieku izcelsmes olbaltumvielām. Viens no aktuālākajiem virzieniem šo jautājumu risināšanā ir inovatīvu un dabai draudzīgu alternatīvu izmantošana tradicionālajiem barības komponentiem.

Neatbilstoša barība dējējvistām var samazināt to produktivitāti, pasliktināt imunitāti, paaugstināt mirstību un ietekmēt galaprodukta uzturvērtību. Vienlaikus aug sabiedrības pieprasījums pēc augstvērtīgiem pārtikas produktiem, kas bagātīgi ar vērtīgām vielām, piemēram, omega-3.

Polinepiesātinātās taukskābes, īpaši Omega-3, ir zinātniski atzītas par cilvēka veselībai būtiskām. Tās samazina sirds un asinsvadu slimību risku, iekaisumu, neiroloģisko un citu hronisku saslimšanu risku. Līdz šim dominējošais omega-3 avots ir bijušas zivis, zivju eļļa, taču šo resursu pieejamība ir ierobežota, turklāt pastāv bažas par smago metālu piesārņojumu un ilgspējīgu zvejniecību.

Arī putnu veselībai un imunitātei ir svarīga šo polinepiesātināto taukskābju atbilstoša uzņemšana caur uzturu. Alternatīvs risinājums ilgspējīgu polinepiesātināto taukskābju iegūšanai un izmantošanai putnkopībā ir mikroaļģes. Tie ir viensūnu organismi, kas bagātīgi ar lipīdiem, proteīniem, vitamīniem, mineralvielām un bioaktīviem savienojumiem, tai skaitā omega-3.

Pētījumi rāda, ka mikroaļģu pievienošana mājputnu barībā uzlabo dējējvistu un broileru veselību, produktivitāti un gala produkta kvalitāti. Dažādu mikroaļģu sugu pievienošana mājputnu barībā ļauj palielināt PNTS taukskābju daudzumu olās, vienlaikus samazinot nepieciešamību pēc dzīvnieku izcelsmes barības piedevām, antibiotikām un mākslīgiem augšanas stimulatoriem. Mikroaļģes var kalpot kā efektīvs antioksidantu un vitamīnu avots, kas veicina vistu imūnsistēmas darbību.

Šī projekta ietvaros plānots izstrādāt un aprobēt mikroaļģu miksotrofās kultivācijas tehnoloģiju, kas nodrošinātu paaugstinātu polinepiesātināto taukskābju iznākumu un izstrādāt šo bioaktīvo savienojumu ekstrakcijas metodes. Tālāk šo vielu vai neapstrādātas mikroaļģu biomasas pievienošana mājputnu barībai ļautu sasniegt vairākus svarīgus mērķus – uzlabotu mājputnu veselību, samazinātu antibiotiku vai citu medikamentu nepieciešamību, palielinātu produktivitāti un uzlabotu galaprodukta kvalitāti, padarot to pievilcīgāku patērētājiem. Projekta rezultāti sniegs gan ekonomisku, gan sabiedrisku ieguvumu, veicinot veselīgāku pārtiku un videi draudzīgāku un atbildīgāku lauksaimniecību.

1.4. Tēmas aktualitāte

Vistas tiek uzskatītas par visizplatītāko putnu pasaulē un to skaits katru gadu pieaug. To gaļa tiek patērēta vairāku desmitu miljardu kilogramu apmērā katru gadu un tās ir visvairāk patērētais olbaltumvielu avots. Diemžēl arī tiek uzskatītas par visļauņprātīgāk izmantotajiem lauksaimniecības dzīvniekiem ar sliktāko apsaimniekošanas praksi (WAF 2023). Latvijā pēdējo desmit gadu laikā gan mājputnu kopumā, gan dējējvistu (atsevišķi) skaits ir pakāpeniski pieaudzis, 2023. gadā attiecīgi sasniedzot 5,9 un 3,4 miljonus. Tas ir par aptuveni vienu miljonu vairāk nekā pirms desmit gadiem (CSP 2024). Putni bieži vien ir pakļauti dažādām infekcijām. Bieži to izraisa nekvalitatīva, nesabalansēta un putnu vecumam neatbilstoša barība. Paralēli arvien pieaugoša prasība cilvēkiem ir pēc kvalitatīvas un uzturvielām bagātas pārtikas, kas audzēta dabiskos un dabai saudzīgos apstākļos. Un šo prasību lielā pieprasījuma dēļ ne visi mājputnu audzētāji spēj (vai nevēlas) izpildīt.

Mikroaļģes kā barības piedeva mājputniem tiek uzskatīta par videi draudzīgu alternatīvu, salīdzinot ar ķīmiskajiem preparātiem. To audzēšanai nav nepieciešams liels daudzums ūdens un zemes, kā arī to saturs ir bagātīgs ar minerāliem (dzelzs, cinks, selēns un citi, kas ir ārkārtīgi svarīgi dzīvnieku veselībai), kas ir viegli biopieejami. To saturs ir ļoti daudzveidīgs, iekļaujot arī proteīnus, lipīdus, neaizvietojamās aminoskābes, kā arī lielu daļu vitamīnu. Mikroaļģu audzēšanai var izmantot dažādus notekūdeņus (Costa et al. 2024) vai pārtikas blakusproduktus kā, piemēram, sūkalas, kas var mazināt ietekmi uz vidi un izmaksas par mikroaļģu audzēšanu.

Svarīgs ir fakts, ka mikroaļģu lipīdi satur arī polinepiesātinātās taukskābes, tostarp omega-3 taukskābes, uzsverot tieši eikozapentaēnskābi (EPA) un dokozaheksaēnskābi (DHA), ko lietojot uzturā, cilvēkam tiek nodrošināta normāla sirds darbība. Lai gan lielākoties omega-3 taukskābes tiek patērētas no zivju produktiem un uztura bagātinātājiem, to resursi ir izsmeļami, kā arī arvien pieaugoša problēma ir smago metālu klātbūtne zivju produktos.

Mikroaļģu izmantošana kā barības piedeva mājputniem sniedz iespēju to produktus bagātināt ar omega-3 taukskābēm, kas ir tik svarīgas cilvēka veselībai. Un ne tikai – pētījums (Costa et al. 2024) liecina, ka dējējvistām 9 % sojas pupu miltu aizstāšana ar mikroaļģes *Anthrosphira platensis* biomasu uzlaboja olu olbaltumvielu indeksu, augšanu, olas dzeltenuma indeksu, krāsu čaumalas biezumu un stiprumu. Citā pētījumā (Jiru et al. 2021) norāda, ka tikai 1 % no barības pievienojot mikroaļģu *Trachydicus minutus* vai *Japonochytrium marinum*, polinepiesātināto taukskābju daudzums olās pieaug par 26-66 %.

1.5. Mērķis

Projekta gaitā plānots aprobēt mikсотрофу аļģu kultivācijas metodi palielinātai poli-nepiesātināto taukskābju (PNTS) ieguvei un to ekstrakcijai no mikroaļģu biomasas dējējputnu barības kvalitātes uzlabošanai. Pētījuma konkrētie mērķi ir:

- 1) novērtēt taukskābju kompozīciju dažādās mikroaļģēs un izpētīt iespējas bagātināt mājputnu olas ar omega-3 taukskābēm, pievienojot mikroaļģu koncentrātu dējējvistu barības maisījumiem;
- 2) izvērtēt mikroaļģu koncentrāta ar paaugstinātu omega-3 taukskābju saturu ietekmi uz dējējvistu produktivitāti un veselību.

Projekta ietvaros paredzēta poli-nepiesātināto omega-3 grupas taukskābju satura noteikšana un salīdzināšana dažādu aļģu biomasā, un specifisku šo vielu ekstrakcijas metožu aprobēšana, lai tās būtu iespējams iekļaut mājputnu barības sastāvā. Plānota arī mājputnu barības tiešā bagātināšana ar mikroaļģu biomasu (iepriekš neizdalot omega-3), lai tā kalpotu par proteīnu, vitamīnu un antioksidantu avotu, tādējādi ierobežojot dzīvnieku izcelsmes un mākslīgu papildvielu iekļaušanu mājputnu uzturā.

Pētījumā plānots izmantot tādas mikroaļģu ģintis/sugas, kas literatūrā jau ir definētas kā potenciāli augstvērtīgi PNTS avoti, piemēram, *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis sp.* *Spirulina platensis* u.c.

Pētījuma ietvaros ir plānots izstrādāt mājputnu barības piedevu (mikroaļģu koncentrātu) un pārbaudīt tās efektivitāti. Paredzams, ka šādu piedevu pievienošana ļaus paaugstināt dējējvistu produktivitāti (t.i. iegūt vairāk olu), kā arī uzlabot putnu imunitāti un vispārējo veselību, samazināt cāļu un jaunputnu mirstību. Zinātniskās atziņas liecina, ka mikroaļģu biomasas piedevas var uzlabot dējējvistu gremošanas sistēmas funkcionēšanu un veicināt gremošanas sistēmas mikrobiotas līdzsvara atjaunošanos. Omega-3 izmantošana vīstū barībā potenciāli var palielināt arī šo taukskābju saturu gala produktā – olās, kas attiecīgi var uzlabot arī cilvēka imunitāti un mazināt sirds-asinsvadu saslimšanas riskus arī gala patērētājam.

1.6. Plānotie rezultāti

Galvenā mērķgrupa ir putnkopības saimniecības, kurām pēc veiksmīgas projekta īstenošanas varēs piedāvāt jaunu mikroaļģu koncentrātu māļputnu imunitātes stimulēšanai, dējības un iegūto olu kvalitātes (uzturvērtības) paaugstināšanai. Projekta pētījumu rezultātus varētu izmantot arī daudz plašāk, ņemot vērā, ka mikroaļģes un no tām iegūtos produktus iespējams lietot kā komponentus arī citu lauksaimniecības dzīvnieku barībā. Atbilstoši tam potenciālo labuma guvēju loks aptver plašu lauksaimniecības primāro ražotāju loku nozarē, kā arī barības un/vai funkcionālo barības piedevu ražotājus.

Dējību un olu kvalitāti samazina putnu novājināta imunitāte, nepilnvērtīgs uzturs. Mikroaļģu sastāvā esošām vielām ir potenciāls stiprināt dējējvistu veselību, kā arī bagātināt olas ar vērtīgām omega-3 taukskābēm. Tas ļautu gan samazināt putnkopības saimniecību izmaksas par vistu veselības profilaksi vai ārstēšanu, gan palielināt uzņēmumu ieņēmumus, tirgū piedāvājot augstvērtīgāku produktu par augstāku cenu.

Projektā iegūtās tehnoloģiskās zinātnes un koncentrāta efektivitātes pārbaude radīs pamatu, lai potenciāli piesaistītu ražotājus tālākai tehnoloģijas pilnveidei un komercializācijai. Turklāt, projektā iesaistās partneris “BIOLAT”, kura pamatdarbība jau tagad ir saistīta ar bioloģiski aktīvo vielu izdalīšanu un to iestrādi augstvērtīgos produktos. Ņemot to vērā, zināšanu pārnese un komercializācijas iespējas vērtējamas kā ļoti augstas. Jauni risinājumi omega-3 taukskābju ieguvē ir ar augstu tirgus potenciālu. Pasaules Omega-3 tirgus sasniedza 2,49 miljardu USD 2019.gadā, un ir prognozēta vismaz 7 % izaugsme 2020.–2027.gadā. Mikroaļģu izmantošana dod ilgtspējīgu risinājumu augošam Omega-3 pieprasījumam kā efektīvs un, kas ir īpaši būtiski, augu izcelsmes avots.

Ieguvums būtu arī sabiedrībai kopumā, jo būtu pieejami kvalitatīvi pārtikas produkti ar vērtīgu uzturvielu sastāvu. Cilvēka organisms nespēj sintezēt omega-3 taukskābes, tāpēc tās jāuzņem ar uzturu. To trūkums cilvēka uzturā ir atzīts sirds-asinsvadu, onkoloģisko, neirodeģeneratīvo un vielmaiņas saslimšanu riska faktors (Shahidi et al., 2018, Annual Review of Food Science and Technology).

Būtiska mērķgrupa ir arī citi lauksaimniecības produktu ražošanas un pārstrādes sektori, kam rodas problēmas ar ražošanas blakusproduktu utilizāciju. Projekta gaitā plānots pārbaudīt iespēju utilizēt blakusproduktus, veidojot no tiem substrātu mikroaļģu kultivēšanai, tādējādi būtiski samazinot ražošanas izmaksas un arī vides riskus.

1.7. Projektā iesaistīto partneru uzdevumi un atbildības jomas

Latvijas Universitāte:

- Mikroaļģu bioloģiski aktīvo producentu, primāri polinepiesātināto taukskābju (PNTS) iespējamo producentu kandidātu klāsta apzināšana – padziļināta zinātniskās literatūra izpēte un mikroaļģu parametru izpēte (no struktūrvienības kolekcijas un starptautiskiem katalogiem) ar mērķi identificēt perspektīvākos kandidātus PNTS ražošanai;
- Mikroaļģu kultivācijas tehnoloģijas ietekmes novērtējums uz biomasas aktīvo vielu iznākumiem – izvēlēto mikroaļģu kultūru kultivācija, kontrolējot un vērtējot ražības biotehnoloģiskos rādītājus. Izmēģināt dažāda veida tehnoloģijas (heterotrofa, fototrofa, miksotrofa);
- Miksotrofās kultivācijas metodes izstrāde un aprobēšana dažādu celmu mikroaļģēm – mikroaļģu kultivācijas nodrošināšanai tiks novērtētas dažādas izcelsmes lauksaimniecības un tās produkcijas pārstrādes blakusproduktu potenciāls;
- Taukskābju kvantificēšana mikroaļģu biomasā – analītisko metožu izmēģināšana, lai noteiktu PNTS kvantitatīvo daudzumu mikroaļģēs;
- PNTS ekstrakcijas un uzglabāšanas tehniskā procesa metodoloģijas izstrāde – iepriekš definēti PNTS ekstrakcijas paņēmieni tiks aprobēti ražošanai tuvinātos apstākļos. Tiks noteikta iegūto mērķa vielu oksidācijas pakāpe, no kā izrietīs uzglabāšanai piemērotākās formas un apstākļi;
- Informācijas apkopošana atskaites veidā no sadarbības partneru sniegtās informācijas un veiktajiem eksperimentiem laboratorijā;
- Publicitāte – 3 zinātniskās publikācijas, vismaz 1 tematiskais pasākums un dalība vismaz 3 konferencēs, kas nodrošina gan pieredzes apmaiņu, gan publicitāti.

Latvijas Biozinātņu un Tehnoloģiju Universitāte:

- Mājputnu barības piedevu formulācijas eksperimentu un metodoloģijas izstrāde - noteikt raksturlielumus eksperimentālajām mājputnu paraugkopām, definēti kontrolējamie rādītāji eksperimentu gaitas parametri, precizēts pamatbarības sastāvs kontroles/eksperimentālajās grupās. Iegūtās receptūras pārbaude laboratorijā.

- Barības piedevas priekšmēģinājumi laboratorijā - tiks testētas vairākas barības receptes (devas) un, salīdzinot ar kontrolgrupu, vērtēta to ietekme uz cāļu/jaunputnu imūnsistēmu, veselību, augšanu un attīstību, kā arī dējējvistu veselību, dējību un olu uzturvērtību.
- Barības piedevas pārbaude dējējvistu saimniecībās - tiks testēta barības recepte (devas) un, salīdzinot ar kontrolgrupu, vērtēta to ietekme uz cāļu/jaunputnu imūnsistēmu, veselību, augšanu un attīstību, kā arī dējējvistu veselību, dējību un olu uzturvērtību.
- Projekta publicitāte - par projekta tematiku, progresu un rezultātiem ziņots konferencēs/kongresos, sagatavotas zinātniskās publikācijas, organizēti tematiskie pasākumi.

Akciju sabiedrība “BIOLAT”:

- Polinepiesātināto taukskābju (omega-3) ekstrakcijas un uzglabāšanas tehniskā procesa metodoloģijas izstrāde - iepriekš definēti polinepiesātināto taukskābju ekstrakcijas paņēmieni tiks aprobēti ražošanai tuvinātos apstākļos. Tiks noteikta iegūto mērķa vielu oksidācijas pakāpe un uzglabāšanai piemērotās formas un apstākļi.

Biedrība “LATVIJAS APVIENOTĀ PUTNKOPIBAS NOZARES ASOCIĀCIJA”:

- Projekta publicitāte - par projekta tematiku, progresu un rezultātiem ziņots nozares speciālistiem, sagatavotas populārzinātniskās publikācijas.

Saimniecībās:

- Saimnieciskās darbības veicējs **Ingus Druva**, “Kalnadruvas”, Taurupes pagasts, Ogres novads, LV-5064;
- Saimnieciskās darbības veicēja **Laura Logina-Lucava**, Z/S "Pakalni", Lode, Lēdurgas pag., Siguldas nov., LV-4012;
- Vaidavas pagasta zemnieku saimniecība “**Skujas**”, “Skujas”, Vaidavas pag., Valmieras nov., LV-4227;
- Taurenas pagasta Savina zemnieku saimniecība “**KALVĀNI**”, "Pumpenes", Taurupes pag., Ogres nov., LV-5064

- Barības piedevas pārbaude dējējvistu saimniecībās - Tiks testētas barības recepte (devas) un, salīdzinot ar kontrolgrupu, vērtēta to ietekme uz cāļu/jaunputnu imūnsistēmu, veselību, augšanu un attīstību, kā arī dējējvistu veselību, dējību un olu uzturvērtību.

2. MĀJPUTNU AUDZĒŠANA

2.1. Aktuālās problēmas māļputnu uzturēšanā

Vistas tiek uzskatītas par visizplatītāko putnu pasaulē un to skaits katru gadu pieaug. Tās gaļa tiek patērēta vairāku desmitu miljardu kilogramu apmērā katru gadu un tās ir visvairāk patērētais olbaltumvielu avots. Diemžēl arī tiek uzskatītas par visļauņprātīgāk izmantotajiem lauksaimniecības dzīvniekiem ar sliktāko apsaimniekošanas praksi (WAF 2023). Latvijā pēdējo desmit gadu laikā gan māļputnu kopumā, gan dēļējvistu (atsevišķi) skaits ir pakāpeniski pieaudzis, 2023. gadā attiecīgi sasniedzot 5,9 un 3,4 miljonus. Tas ir par aptuveni vienu miljonu vairāk nekā pirms desmit gadiem (skat. 2.1. tabulu) (CSP 2024). Putni bieži vien ir pakļauti dažādām infekcijām (skat. 2.1. attēlu). Bieži to izraisa nekvalitatīva, nesabalansēta un putnu vecumam neatbilstoša barība. Piemēram, dēļējvistām dēšanas periodā nepieciešama pārtika, kuras sastāvā ir aptuveni 20 % olbaltumvielas (IK “Ziedkalni2007” 2024).

2.1. Tabula.

Lauksaimniecības dzīvnieku skaits gada beigās (tūkstošos) Latvijā (CSP 2024).

Gads	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Māļputni, tūkst. gab.	4 985,8	4 413,9	4 532,0	4 711,7	4 943,8	5 403,1	5 690,4	5 837,9	5 857,7	5 744,3	5 922,3
Dēļējvistas , tūkst. gab.	2 430,5	2 443,8	2 335,3	2 310,3	2 515,1	2 996,9	3 208,4	3 345,1	3 395,2	3 343,5	3 385,0

Pasaulē lielākos izaicinājumus māļputnu audzēšanā rada to vājā imunitāte, veselība un ražošanas kopumā. Lielu daļu sastāda tieši pārtikas izraisītas infekcijas, kā arī slimības, kas tiek pārnēstas no putniem uz cilvēkiem un otrādi. Turklāt arvien aktuāla problēma ir dzīvnieku uztura bagātināšana ar antibiotikām, lai veicinātu to ātrāku augšanu, kas, savukārt, var kaitīgi iedarboties uz cilvēku veselību un negatīvi ietekmēt dabisko imunitāti, lietojot tās uzturā. Antibiotikas iedarbojas un māļputnu zarnu floru, uzlabojot barības vielu sagremošanas un uzsūkšanās procesu, līdz ar to tiek uzlabota zarnu trakta ekosistēma, kas attiecīgi veicina labvēlīgo mikroorganismu savairošanos. Tomēr antibiotiku lietošana māļputniem var izraisīt arī pret zālēm tolerantu baktēriju savairošanos organismā, kas pāldzina un apgrūtina putnu atveseļošanās iespējas un palielina

slimību izplatību. Eiropā kopš 2006. gada antibiotiku lietošana uz dzīvniekiem ir stingri regulēta un ierobežota, taču tas atkal ir pasliktinājis mājputnu labturību, kā arī vairojis mājputniem dažāda veida saslimšanu un citas ražošanas problēmas. Citviet pasaulē, piemēram, Āzijā un Āfrikā, vietām Amerikā antibiotikas vēl aizvien tiek plaši lietotas putnu audzēšanas procesā (Hafez, Attia 2020).

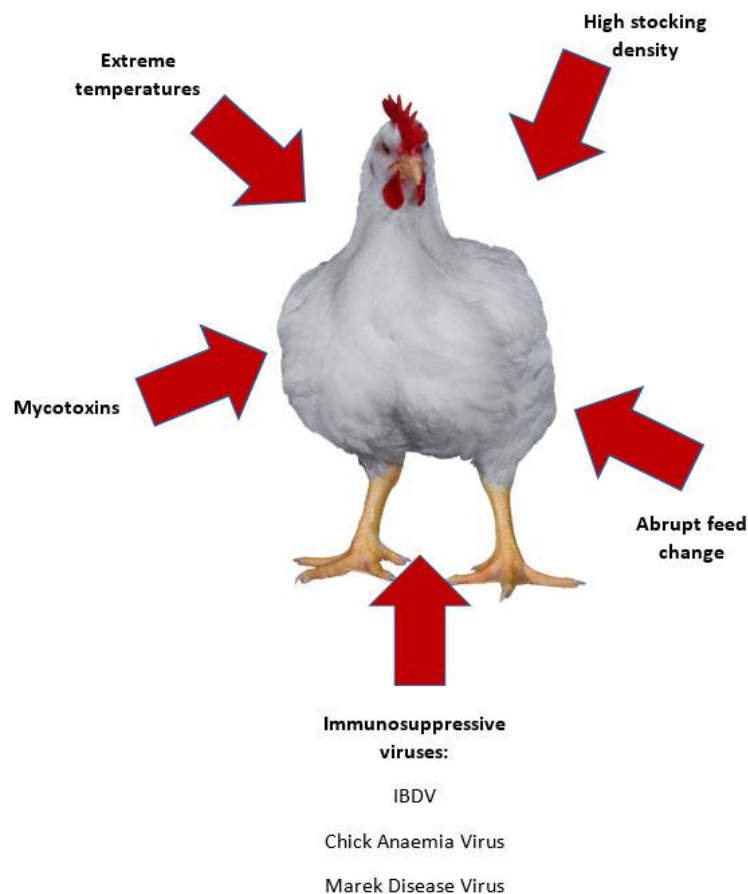
Dējējvistām ļoti svarīgs ir pirmo piecu mēnešu augšanas periods, jo šajā laikā attīstās reproduktīvie orgāni, kas ir atbildīgi par olu ražošanas spēju nākotnē. Ja šajā laikā netiek nodrošināti optimāli apstākļi, var ievērojami samazināties spēja dēt olas. Tikai pēc 21 nedēļas dējējvistas sasniedz vecumu, kurā tās ražo olas komerciāli nepieciešamajā apjomā. Arī olu ražošanas cikla laikā, kas ilgst aptuveni 52 – 56 nedēļas, nepieciešams nodrošināt optimālus un efektīvus apstākļus dēšanai, jo vairāku faktoru ietekmē process var būt nepilnīgs vai neproduktīvs. Izteikti to ietekmē barošanas prakse un vistu apsaimniekošana, taču ietekmi rada arī vistu šķirne, mirstības līmenis, dējējvistu vecums, svars, dienas gaismas ilgums, dzīvošanas apstākļi, klimats u.c. Nepietiekams uzturs ir arī viens no galvenajiem iemesls augstam mirstības līmenim, jo tas veicina putnu noslieci uz slimībām, vāju imūnreakciju pret vakcīnām un plēsoņām. Protams, arvien liela problēma ir dējējvistu turēšanas apstākļi, kas ievērojami ierobežo to kustības iespējamību, kā arī palielina iespēju putniem iegūt fiziskas traumas (FAO S.a.). Šī iemesla dēļ 2012. gadā Eiropā tika aizliegts vistas turēt neaprīkotos būros, taču šis likums tikai nedaudz uzlaboja vistu labturību (Bonnet et al. 2022).

Labāki apstākļi tiek nodrošināti brīvās turēšanas un bioloģiskās ražošanas sistēmās, kas nodrošina dējējvistām ievērojami vairāk vietu un iespēju augšanas procesā. Eiropā olas ir viens no pirtākajiem bioloģiskās pārtikas produktiem. Līdz ar pieprasījumu konkrētās lauksaimniecības prakses turpina augt un attīstīties, taču arī šajā gadījumā ir konstatētas vairākas problēmas. Tiek turpināta gaiļu izkaušana ļoti agrā vecumā (jo tie neražo olas) un vistas tiek pakļautas knābāšanai, kā arī ir palielinās risks saskarties ar endoparazītiem, plēsoņām un inficēties ar putnu gribo, jo lielu daļu laika vistas pavada brīvā dabā. Pastiprināt imunitāti pret infekcijām un slimībām ir iespējams, nodrošinot barības vielām bagātu pārtiku (Sharpes Stock Feeds 2021).

Uzturs ir galvenais ietekmējošais faktors dējējvistu olu ražošanas procesā. Proteīni (olbaltumvielas) tiek uzskatīti par svarīgāko uztura sastāvdaļu dējējvistām. To spalvu sastāvā ir 75% proteīnu, arī pašas olas tiek uzskatītas par nozīmīgu olbaltumvielu avotu cilvēku uzturā, kā arī tās ir nepieciešams, lai augtu un attīstītos. Savukārt, ogļhidrāti ir viens no galvenajiem enerģijas avotiem cāļiem augšanas procesā. Olu ražošanas spējai nepieciešami arī dažādi vitamīni un

minerāli, tostarp D vitamīns, fosfors un kalcijs. Imūnsistēmas stiprināšanai nepieciešams arī A un E vitamīns. Paralēli vienmēr ir nepieciešams liels daudzums ūdens – ja tas nav pietiekams, dējējvistas nespēj patērēt nepieciešamo daudzumu pārtikas, lai nodrošinātu sevi ar nepieciešamo barības vielu daudzumu (Sharpe's Stock Feeds 2021).

Kopumā mājputnu audzēšana ir sarežģīts process, kur norisinās vairāku faktoru ietekme uz olu un gaļas ražošanu, kas ietekmē gala produktu kvalitāti un daudzumu. Ļoti svarīgs aspekts ir sabalansēta un uzturvielām bagāta pārtika, kas ietekmē gan putnu veselību, gan to labturību, kas ir vienlīdz svarīgi aspekti.



2.1. attēls. Ārējie faktori, kas saistīti ar vistu imūnsistēmas darbības traucēšanu, palielinot slimību risku (Heinzel et al. 2020).

2.2. Mikroaļģes kā piedeva dējējvistu pārtikai

Dējējvistu barības piedāvājums internetā ir salīdzinoši neliels (skat. 2.2. tabulu). Norādītā informācija par barību atšķiras - visi ražotāji norāda kopproteīna daudzumu procentos, kas variē no 15 % līdz 19 %, kas norāda uz to būtisko lomu dējējvistu pārtikā. Lielāko daļu masas aizpilda kukurūza, kvieši un soja. Tikai daži ražotāji/izplatītāji norāda barībai pievienotos vitamīnus un minerālus. Arvien pieaug pieprasījums pēc dabīgajām barības piedevām, kas mājputniem nenodara kaitējumu un nodrošina veselīgu, pilnvērtīgu uzturu gan vistām, gan tālākiem mājputnu un to produktu patērētājiem. To starpā ir baktērijas, dažādi kukaiņi, raugi, sēnes, kā arī aļģes (Alghamdi et al. 2024) Tā kā olas tiek uzskatītas par salīdzinoši lētu un visiem pieejamu produktu, kā arī to saturu ir viegli papildināt ar dažādiem vitamīniem, minerāliem un omega-3 nepiesātinātajām taukskābēm, papildinot dējējvistu barību ar dažādām piedevām, arvien vairāk pieaug interese par mikroaļģu izmantošanu kā piedevu, kas jau dabīgi spēj saturēt visus iepriekš minētos uztura bagātinātājus. Īpaša interese ir par omega-3 taukskābēm, kuru lietošana uzturā ir uzrādījusi pozitīvas sekas, tostarp sirds un asinsvadu slimību, artrīta un diabēta profilaksei (Spasevski et al. 2019).

2.2. Tabula.

Interneta veikalos pieejamā dējējvistu barība un tās sastāvs.

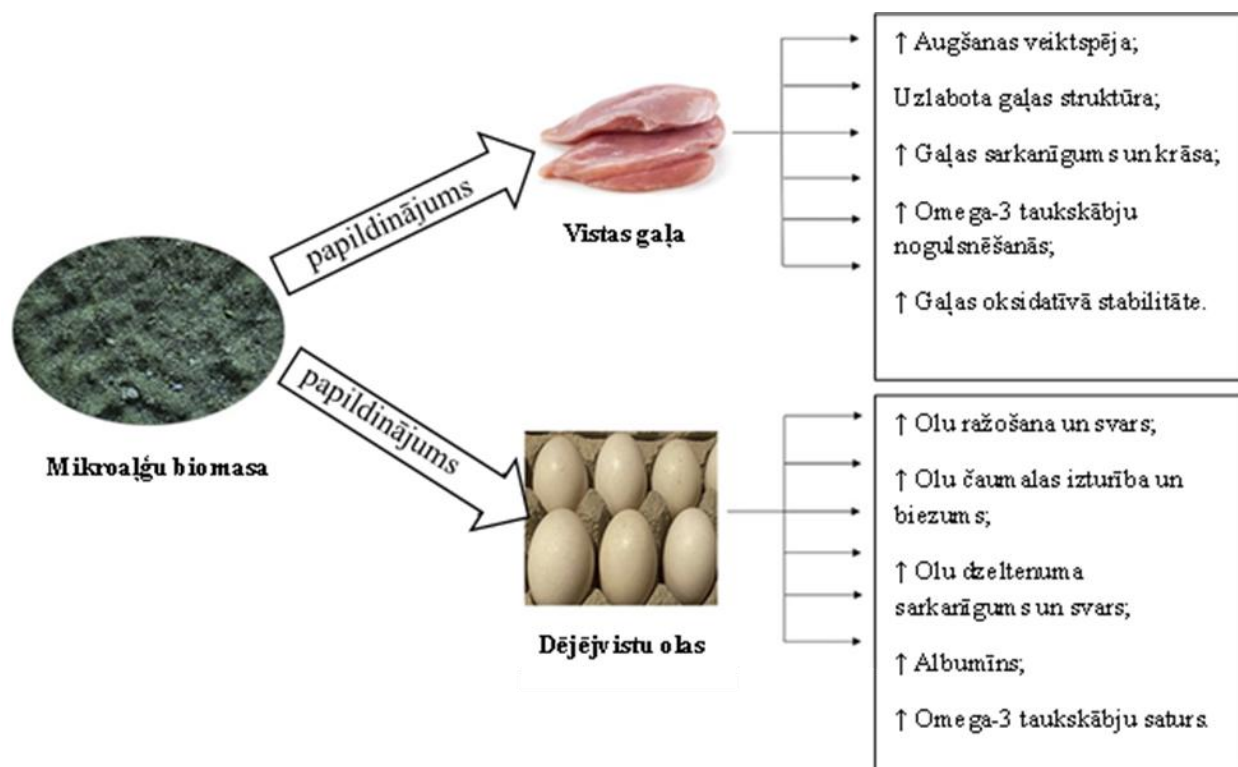
Barība	Sastāvs	Avots
	Kopproteīns – 18,9%	(SIA “SAIMNIECĪB A VISTIŅAS” S.a.)
	Kukurūza, kvieši, mieži, sojas spraukumi (ražoti no ĢMO sojas pupām), saulespuķu spraukumi, sojas eļļa (ĢMO), monokalcija fosfāts, kaļķu milti, vārāmā sāls, barības piedevas. Kopproteīns – 16,70%	(SIA “LASMA LA” S.a.)

	Kvieši, sojas spraukumi (ĢMO), kalcija (SIA "Pakavs" karbonāts, auzas, mieži, kukurūza, 2024) saulgriežu spraukumi, augu eļļa, piedevas. Nav norādīts kopproteīna daudzums.	
"Pilnvērtīga dējējvistām, Neto 1000 kg, drupināta granula"	barība	Kvieši 50,03%, soja 17,84% (ĢMO), mieži (Barība 24 S.a.) 10,48%, kukurūza 10%, kaļķakmens 8,8%, rapšu eļļa 1,0%, MCP 0,81%, olu vistas premikss 0,75%, sāls 0,29%. <u>Analītiskās sastāvdaļas:</u> 15,78% kopproteīna, neapstrādāti tauki 2,46%, kopšķiedra 2,96%, koppelni 12,93%, ME 2660 Kcal, kalcijs 3,8%, lizīns 0,804%, metionīna 0.37%
	Kvieši, sojas pupu milti, kukurūza, kviešu (ZOO parks.lv klijas, kviešu atsijas. S.a.) <u>Analītiskās sastāvdaļas:</u> Kopproteīns 18,00%, Metionīns 0,38%, Metionīns + Cisteīns 0,75%, Koptauki 4,00%, Koppelni 14,00%, Kalcijs 4,00%, Fosfors 0,60%, Nātrijs 0,20%, Vitamīns A 12,000 SV, Vitamīns D3 2,500 SV, Vitamīns E 30 mg	

Mikroaļģes galvenokārt sastāv no vistu barībā svarīgām sastāvdaļām – proteīniem, ogļhidrātiem, lipīdiem, antioksidantiem, pigmentiem dažādiem vitamīniem un citiem savienojumiem. Starp mikroaļģu sugām to daudzums var variēt. Piemēram, *Chlorella vulgaris* no sausās masas lipīdi sastāda aptuveni 40 %, proteīni 15 %, bet ogļhidrāti 20 %. *Spirulina platensis*, kas ir vēl viena plaši pielietota mikroaļģu suga, sausā masa sastāda aptuveni 45 % lipīdu, 13 % proteīnu un 30 % ogļhidrātu. Proteīniem bagāta mikroaļģe ir *Dunaliella salina* – tās sausā masa

sastāv no aptuveni 57 % proteīnu. Liels lipīdu procentuālais daudzums ir mikroaļģei *Dunaliella tertiolecta*, sastādot aptuveni 61 % (Velazquez-Lucio et al. 2018; Alghamdi et al. 2024).

Mikroaļģes kā piedeva vistu pārtikai sniedz vairākus uzlabojumus gan tās gaļai, gan dējējvistu olu saturam un kvalitātei (skat. 2.2. attēlu). Tomēr ne vienmēr rezultāti ir viennozīmīgi labi – tie var atšķirties atkarībā no mikroaļģu biomasas pievienotā daudzuma. Piemēram, mazākās devās putnu svars un to gaļas daudzums palielinājās par aptuveni 11 %, bet pie lielākām mikroaļģu devām notika pretējs rezultāts, kā arī produkts palika nesimpātisks tā patērētājiem. Taču arī šie rādītāji var mainīties atkarībā no mikroaļģu sugas un citiem mainīgajiem faktoriem (Kalia, Lei 2022), līdz ar to vienmēr ir nepieciešama detalizēta izpēte pirms veikt secinājumus par potenciālajiem ieguvumiem un/vai zaudējumiem. Līdzīga tendence ir arī no mikroaļģu ietekmes uz dējējvistu olām – tās pievienošana pārtikai spēj palielināt olu ražošanu līdz pat 91%, kā arī palielināt olu svaru un sniegt citus ieguvumus, taču nepiemērotas devas (pārāk lielas) var novest pie pretēja efekta (Kalia, Lei 2022).



2.2. attēls. Uzlabojumi dējējvistu olām un vistu gaļai no mikroaļģu biomasas kā barības piedevas (autora attēls, izmantojot (Kalia, Lei 2022)).

Citi pētījumi norāda, ka mikroaļģu izmantošana kā barības piedeva mājputniem var tiem samazināt holesterīna līmeni, uzlabot imūnreakciju, kā arī palielināt olu un putnu gaļas kvalitāti. Papildus mikroaļģēm kā barības piedevai piemīt antibakteriāla un pretvīrusu īpašības, kas palielina izturību pret slimībām (tātad samazina miršanas koeficientu) un uzlabo zarnu traktu darbību, kā arī (konkrēti) cāļu nieru un aknu darbību, līdz ar to var samazināties nepieciešamība pēc antibiotiku lietošanas (Alghamdi et al. 2024).

Citā pētījumā (Saeid et al. 2016) norāda, ka mikroaļģes *Spirulina maxima* biosorbcijas rezultātā, papildinot tās ar dzelzs Fe(II) un vara Cu(II) joniem un vēlāk pievienojot tās dējējvistu barībai kā piedevu, palielinājās Fe, Zn un Mn rādītāji olu saturā attiecīgi par 860%, 113% un 195%, salīdzinot ar kontrolgrupu, kuru barībai mikroaļģe netika pievienota. Par 7,5% uzlabojās arī olu čaumalu stiprība un samazinājās saplaisājušo olu skaits par aptuveni 1 %. Pozitīvi (lielāki) rezultāti ir novēroti (Lemahieu et al. 2013) arī omega-3 garo ķēžu polinepiesātināto taukskābju vērtībās pēc dējējvistu barības papildināšanas ar četrām dažādām mikroaļģēm – *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* un *Chlorella fusca*. Mikroaļģu iedarbība atšķiras, taču visos gadījumos omega-3 taukskābju daudzums palielinājās, kā arī olas dzeltenumi ieguva sarkanīgāku nokrāsu no mikroaļģēs esošajiem pigmentiem - karotenoīdiem.

Kopumā mikroaļģēm ir liels potenciāls kā dabīgajam vistu barības papildinājumam. To pielietošana spēj uzlabot dējējvistu olām un broileriem gan fizikālas, gan ķīmiskās, gan uzturvērtības īpašības, kas potenciāli varētu samazināt sintētiskās barības piedevas un uzlabot mājputnu veselību. Taču būtiski ir izzināt mikroaļģu sastāvu un vielu sinerģiju, lai vairāk izprastu, kāpēc lielākās devās rezultāti var būt negatīvi un kas to spēj ietekmēt (Kalia, Lei 2022).

3. MIKROAĻĢU BIOTEHNOLOĢIJAS

3.1. Projektā izmantoto mikroaļģu raksturojums

Mikroaļģes ir mikroskopiski organismi, kas sastopami gan saldūdens, gan sāļa ūdens vidē ar lielu nozīmi ekosistēmās. Tās var būt gan prokarioti, gan eikarioti, kas strauji aug plašā biotopu diapazonā fotoautotrofos apstākļos. Skaidrā dienā jūras līmenī vidējā saules starojuma intensitāte ir līdz 1 kW uz kvadrātmētru, kas ir 7500 reižu vairāk nekā kopējais primārās enerģijas patēriņš visā pasaulē. Fotosintēze ir vienīgais bioloģiskais process, kas virza saules enerģiju biosfērā. Mikroaļģes spēj dzīvot visās saules apspīdētās vidēs un ir pazīstamas ar augsto fotosintēzes efektivitāti un ātrumu. Kā fotosintezējoši organismi, mikroaļģes pārvērš saules gaismu, oglekļa dioksīdu un ūdeni biomasā, skābeklī un citos vērtīgos savienojumos, līdzīgi kā augstākie augi. Tās ir neticami daudzveidīgas, ar desmitiem tūkstošu sugu, katrai no tām ir atšķirīgas, unikālas īpašības (Barsanti, Gualtieri 2018).

Mikroaļģu pamata funkciju nodrošināšanai un izdzīvošanai ir nepieciešami primārie metabolīti, kur tie tiek izmantoti enerģijas audu veidošanai. Šie metabolīti ietver ogļhidrātus, lielāko daļu aminoskābju un olbaltumvielu (lipīdi, nukleīnskābes), vitamīnus un kofaktorus, hlorofilu un plastidiālos karotinoīdus (Barsanti, Gualtieri 2018).

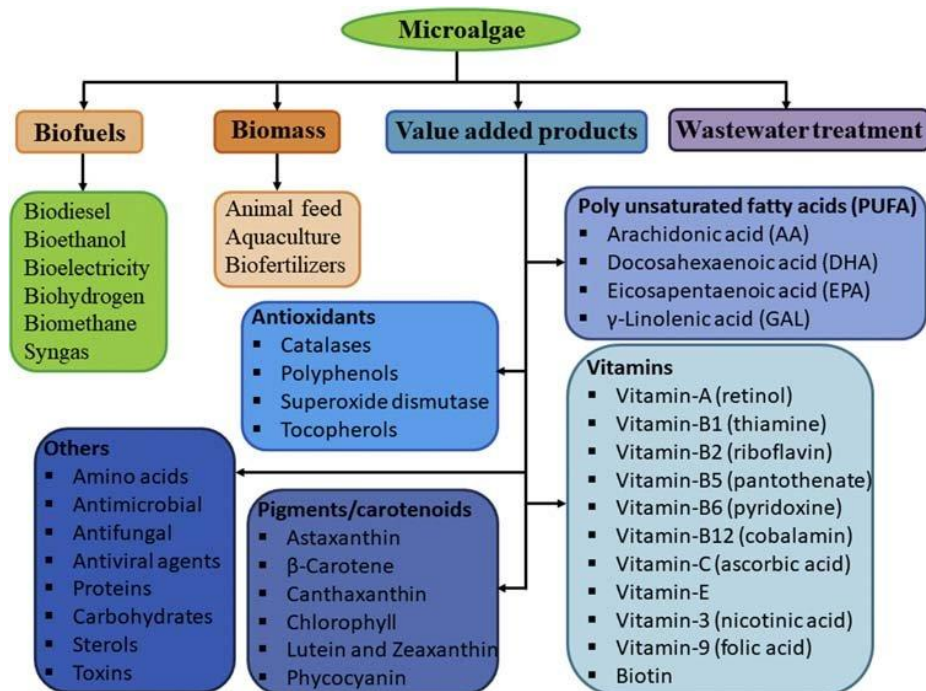
Mikroaļģes iedala vairākās grupās, pamatojoties uz to krāsu, šūnu sienīņu sastāvu un citām bioķīmiskajām īpašībām (skat. 3.1.1. attēlu). Galvenās grupas ir *Chlorophyta* (zaļās aļģes), kas satur hlorofilu a un b, piešķirot tām zaļo krāsu. Tās ir plaši pētītas kā biodegvielas un veselības piedevas. *Bacillariophyta* (Diatomas) ir raksturīgas silīcija dioksīda šūnu sienas ar sarežģītām struktūrām. Tās ir nozīmīgas fitoplanktonu kopienās un veicina globālo skābekļa ražošanu un oglekļa ciklu. *Rhodophyta* (sarkanās aļģes) pārsvarā ir daudzšūnu mikroorganismi, kas ietver sugas bagātas ar fikoeritrīnu. Zilaļģes ir baktērijas, tomēr to fotosintēzes spēju dēļ tās bieži tiek grupētas ar mikroaļģēm un bija vieni no pirmajiem organismiem, kas veica skābekļa fotosintēzi uz Zemes. *Phaeophyta* (brūnaļģes) pārsvarā ir daudzšūnu. Tās ietver dažas mikroaļģu sugas, kas satur fukoksantīnu, piešķirot tām brūnganu krāsu (Kirsten, Roger 2015; Emparan et al. 2019).

Pēdējās desmitgadēs mikroaļģes ir ieguvušas ievērojamu uzmanību to potenciālā pielietojuma dēļ dažādās nozarēs (skat. 3.1.2. attēlu). Galvenās tām piemītošās pozitīvās īpašības ir spēja ātri augt un ražot vērtīgas bioķīmiskas molekulas. Galvenie pielietojumi ietver biodegvielu, kur noteiktas mikroaļģes var ražot lielu daudzumu lipīdu, ko var pārvērst

biodīzeļdegvielā, nodrošinot ilgtspējīgu alternatīvu fosilajam kurināmajam. Uztura līdzekļos un farmācijā mikroaļģes tiek novērtētas ar bagātīgo olbaltumvielu, vitamīnu, antioksidantu un neaizstājamo taukskābju, piemēram, Omega-3 saturu, padarot tās vērtīgas veselības uztura bagātinātājos un kā potenciālus jaunu zāļu avotus. Akvakultūrās mikroaļģes audzē kā barības avotu. Tās izmanto arī notekūdeņu attīrīšanā, kur dažas mikroaļģes var absorbēt barības vielas un smagos metālus, palīdzot bioremediācijā. Ņemot vērā to straujo augšanu un oglekļa piesaistes spējas, mikroaļģes tiek pētītas kā līdzeklis atmosfēras CO₂ uztveršanai un samazināšanai (Spolaore et al. 2006).

Algae group	Microalgae species
Prokaryotic blue-green (<i>Cyanobacteria</i>)	<i>Arthrospira, Gloeocapsa, Microcystis, Oscillatoria</i> , etc.
Eukaryotic green (<i>Chlorophyceae</i>)	<i>Botryococcus, Chlamydomonas, Chlorella, Scenedesmus</i> , etc.
Eukaryotic brown (<i>Phaeophyceae</i>)	<i>Dinobryon, Mallomonas, Ochromonas, Synura, Uroglena</i> etc.
Eukaryotic red (<i>Rhodophyceae</i>)	<i>Porphyridium</i>
Eukaryotic diatoms (<i>Bacillariophyceae</i>)	<i>Asterionella, Cyclotella, Fragilaria, Surirella</i> , etc.

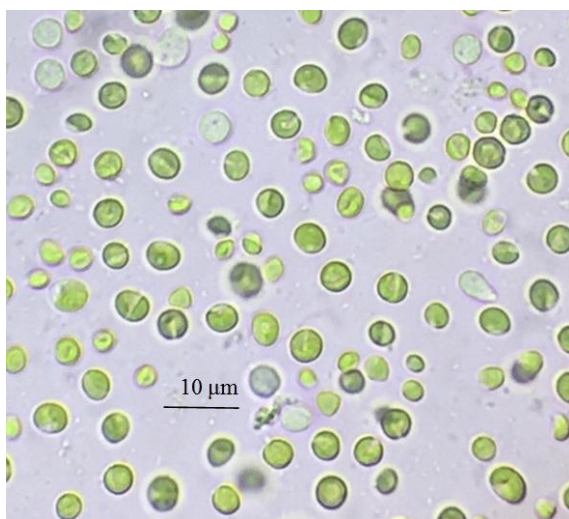
3.1.1. attēls. Mikroaļģu un to radniecīgo sugu klasifikācija (Emparan et al. 2019).



3.1.2. attēls. Mikroaļģu vērtīgie produkti un to potenciālais pielietojums (Karim et al. 2019).

Chlorella vulgaris ir zaļā viensūnu mikroaļģe, kas pieder *Chlorophyta* ģintij. *Chlorella* ģints parasti tiek audzēta saldūdens vidē. Šūnas ir mazas, sfēriskas ar diametru no 2 līdz 10 mikrometriem (skat. 3.1.3. attēlu). Tās attīstības laikā šūnu sienīgu biezums svārstās no 17 līdz 21 nanometram. Šīs mikroaļģes ir pazīstamas ar spēju uzkrāt lipīdus, padarot tās piemērotas biodīzeļdegvielas ražošanai, un ar biezu šūnu sienu, ko ir grūti sašķelt. Šūnapvalks sabiezē šūnas nobriešanas laikā, veidojot mikrofibrilāru struktūru, kas sastāv no glikozamīna. *C. vulgaris* vairojas aseksuāli, ar vienu mātes šūnu, kas optimālos apstākļos spēj ražot līdz četrām meitas šūnām. Pēc brieduma mātes šūna pārplīst, un meitas šūnas patērē paliekas, tas ir iemesls šo mikroaļģu straujai augšanai (Okoro et al. 2019).

C. vulgaris ir ar augstu olbaltumvielu, tauku, ogļhidrātu, vitamīnu, minerālvielu (Fe, K, Na, Ca, P un Mg), pigmentu (luteīns, β -karotīns, astaksantīns, hlorofils-a, kantaksantīns un hlorofils-b), polisaharīdu un augšanas faktoru molekulu saturu. Svarīgākie vitamīni *C. vulgaris* ir folijskābe, C vitamīns, B vitamīnu komplekss, biotīns, D vitamīns, alfa-tokoferols un menadions (skat. 3.1.4. attēlu). Šis bagātīgais uzturvērtības profils padara to par vērtīgu barības piedevu akvakultūrā, uzlabojot dažādu zivju un vēžveidīgo sugu augšanu, pigmentāciju un antioksidācijas spējas. Ir pierādīts, ka *C. vulgaris* uzlabo karotinoīdu līmeni varavīksnes forelē, pastiprina pigmentāciju dekoratīvajās mājās zivīs, veicina olīvu augšanu un antioksidācijas spējas. Tā labvēlīgi ietekmē ūdens dzīvnieku augšanu un biomasas veidošanos (Hany et al. 2022)



3.1.3. attēls. *Chlorella vulgaris* šūnas mikroskopa attēlā (Rameshprabu et al. 2016).

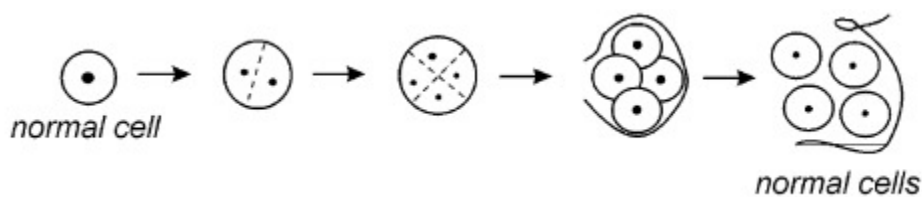
Vitamins	<i>Chlorella</i>
Vitamin A	30.77mg
Vitamin C	10.4mg
Thiamin (vitamin B1)	1.7mg
Riboflavin (vitamin B2)	4.3mg
Niacin (vitamin B3)	23.8mg
Pantothenic acid (vitamin B5)	1.1mg
Pyridoxine (vitamin B6)	1.4mg
Folate (vitamin B9)	94µg
Cobalamin (vitamin B12)	0.1ug
Vitamin E (alpha-tocopherol)	1.5mg
Vitamin K (phylloquinone)	-

3.1.4. attēls. *C. vulgaris* vitamīnu saturs 100 g sausas biomasas (Andre, Jose 2019).

Chlorella vulgaris vairojas aseksuāli pašsporulācijas ceļā, kas parasti ilgst aptuveni 24 stundas. Šī šūnu dalīšanās notiek sešos posmos: šūnas izmērs palielinās, kam seko iekšējās šūnu sienas veidošanās jaunajām meitas šūnām. Tālāk hloroplasts sadalās divās daļās un pēc tam noris otrreizējā dalīšanās, izveidojot četrus hloroplastus. Pēc tam veidojas un nobriest meitas šūnu sienas. Visbeidzot, četras jaunās šūnas tiek atbrīvotas, vecajai šūnai pārplīstot (skat. 3.1.5. attēlu). Svarīgi atzīmēt, ka šis process notiek efektīvi labvēlīgos augšanas apstākļos, taču, ja šūna ir pakļauta stresam, dalīšanās process var aizņemt ilgāku laiku un tā efektivitāte var būt zemāka (Jesus et al. 2019; Bajguz, Dinan 2004).

Šo mikroaļģi kā lielāko daļu mikroaļģu ir iespējams audzēt dažādos kultivācijas ceļos. Tā var augt autotrofī, kur kā enerģijas avotu izmanto saules gaismu vai kādu līdzīgu avotu. Šajā procesā tā izmanto neorganisko oglekli (CO₂), lai sintizētu tādus ķīmiskus savienojumus, kas nepieciešami izdzīvošanai. Autotrofā augšana ir efektīva mikroaļģu uzturēšanai, tomēr tā ir atkarīga no nepārtrauktas gaismas pieejamības, kas var apgrūtināt augšanu tumšos periodos, neizmantojot papildus mākslīgus apgaismojuma avotus (Jesus et al. 2019).

Heterotrofa augšana nav atkarīga no gaismas kā enerģijas avota, tā vietā tiek izmantoti organiskie oglekļa avoti (cukuri, glicerīna savienojumi, acetāti, glutamāti u.c.). Šāda kultivēšanas metode parasti sasniedz augstākus biomasas rādītājus, salīdzinājumā ar autotrofo augšanu, padarot *C. vulgaris* augšanu efektīvāku. Izmantojot viegli un lēti pieejamus organiskos substrātus, tā var strauji augt pat tumsas apstākļos, kas var būt īpaši izdevīgi kontrolētā audzēšanas vietā. *C. vulgaris* spēj augt arī miksotrofi, apvienojot autotrofo un heterotrofo augšanu. Miksotrofā vidē tiek izmantota gan gaisma, gan organiskie oglekļa avoti. Miksotrofās augšanas efektivitātes un augstās biomasas ražības dēļ tā bieži ir ieteicamā metode *C. vulgaris* kultivēšanai. Šādi audzējot, biomasas koncentrācija ik dienu pieaug robežās no 2 līdz 5 g/l (Jesus et al. 2019).



3.1.5. attēls. *C. vulgaris* normāla šūnu dalīšanās. No vienas mātes šūnas izveidojas četras jaunas meitas šūnas. No nobriedušas šūnas hloroplasts sadalās četros jaunos hloroplastos, vienlaikus veidojas jaunas šūnu sienas mātes šūnā, visbeidzot mātes šūna pārplīst, atbrīvojot četras jaunas šūnas, kas katra var turpināt dalīties vēl par četrām jaunām šūnām (Bajguz, Dinan 2004).

Pētījumi rāda, ka dažādos audzēšanas apstākļos audzētai *Chlorella vulgaris* ķīmiskais sastāvs var būtiski mainīties. Sausnas saturs ir salīdzinoši stabils (aptuveni 93 – 96 %), taču pārējo barības vielu īpatsvars ievērojami svārstās: kopproteīns veido apmēram 23 – 68 % sausnas, taukvielas (eterā šķīstošais ekstrakts) 2 – 14 %, bet šķiedrvielu frakcijas un pelnu daudzums arī atšķiras. Dažos pētījumos papildus tiek noteikts cietes, kopšķiedru, pieejamo un nestrukturālo ogļhidrātu saturs, lai labāk novērtētu mikroaļģes izmantošanu dzīvnieku barībā. Tātad audzēšanas apstākļi būtiski ietekmē proteīna, tauku un šķiedrvielu līmeni, un tas jāņem vērā, izmantojot šo sugu kā barības vai pārtikas sastāvdaļu (Gadzama et al. 2025).

C. vulgaris biomasas pievienošana liellopu barībai sniedz pretrunīgus rezultātus – Holšteinas teļiem barības patēriņš dažkārt samazinās, bet daudzlaktācijas frīzu govīm var pieaugt; barības izmantošanas efektivitāte un piena izslaukums bieži nemainās, lai gan dažos pētījumos reģistrēts lielāks proteīna, sausnas, tauku un joda īpatsvars pienā, savukārt citos šādu izmaiņu nav (skat. 3.1.6. attēlu). Gremošanas sistēmas nodalījumos *C. vulgaris* var palielināt ciliāto pirmdziņņu

populāciju un noteiktu ģinšu, piemēram, *Isotricha* un *Ostracodinium*, īpatsvaru, bet jaundzimušiem teļiem mikrofloras izmaiņas netika konstatētas, tādēļ optimālās devas, piedevas forma un šķirņu īpatnības joprojām jānoskaidro turpmākajos pētījumos (Gadzama et al. 2025).

Summary of Main Findings	References
Holstein cows in mid-lactation fed 30 g each of either conventional or lutein-fortified <i>Chlorella</i> for 3 weeks showed no significant differences in feed consumption, milk production, or milk fat percentage when compared to a control group	[54]
Cows fed <i>Chlorella</i> showed increased concentration of milk protein and non-fat solids than those in the control group	[54]
Milk from cows fed lutein-enriched <i>Chlorella</i> showed higher lutein levels than milk from cows fed standard <i>Chlorella</i> or control	[54]
Feeding Holstein heifer calves <i>Chlorella</i> spp. (60 g/d) led to a decrease in their daily feed intake compared to calves that did not receive <i>Chlorella</i>	[61]
Holstein cows receiving 1 to 1.5 L of CLV suspension daily showed higher concentrations of protein, fat, and iodine in their milk than the control groups	[63]
Neonate calves fed 400 mL daily of CLV IFR-111 for 30 d showed no significant difference in microflora compared to the control group	[66]
Cows receiving 90 and 170 g of lyophilized CLV in their TMR had a higher ciliate protozoa population after 21 d, surpassing that of the control diet	[64]
Dietary inclusion of CLV at 30, 90, and 170 g per diet enhanced the ruminal protozoa population, boosting genera like <i>Isotricha</i> , <i>Dasytricha</i> , <i>Charonina</i> , <i>Buetschlia</i> , <i>Ostracodinium</i> , and <i>Ophryoscolex</i>	[64]
Multiparous Friesian cows that received 2 mL or 4 mL of CLV per kg BW showed increased feed intake up to day 120 of lactation, compared to cows that did not receive CLV	[62]
For cows fed 2 mL and 4 mL of CLV, feed efficiency per kg for 4% FCM decreased	[62]
Cows fed 2 mL and 4 mL of CLV showed a decrease in DMI by 10.66% and 18.85%, TDN by 8% and 13.33%, CP by 10.17% and 18.55%, and DCP by 7.58% and 13.32%, respectively, compared to the control group	[62]

TMR = total mixed ration; BW = body weight; DMI = dry matter intake; CP = crude protein; TDN = total digestible nutrients; DCP = digestible crude protein; FCM = fat-corrected milk; g = grams; spp. = species; mL = milliliter; d = day/s.

3.1.6. attēls. Pētījumu rezultāti, kur liellopiem tika pievienota *C. vulgaris* biomasa pie barības (Gadzama et al. 2025).

Broileru barības bagātināšana ar *C. vulgaris* vairāku pētījumu griezumā parādīja uzlabotu gaļas kvalitāti. Tās pievienošana saglabā tievās zarnas (angl. *jejunuma*) struktūru un paaugstina barības vielu uzsūkšanos, kā arī, palielinoties devai, palielina krūts muskuļa masu. Vienlaikus tajā uzkrājas vairāk labvēlīgo taukskābju (DHA, EPA, ω -3), karotinoīdu un antioksidantu, kas uzlabo gaļas krāsu, pagarina derīguma laiku un pazemina Omega-6/Omega-3 attiecību (skat. 3.1.7. attēlu). Apmēram 20% ar *C. vulgaris* piedevu broileru barībā paaugstina ūdens noturību, samazina vārīšanas zudumus, padara gaļu mīkstāku un sulīgāku un palielina oksidatīvo stabilitāti, samazinot kaitīgos oksidācijas produktus, baktēriju skaitu un palielinot SOD aktivitāti. Patērētāju sensorie testi rāda, ka 10% ar *C. vulgaris* biomasas piedevu pie barības nepasliktina garšu un kopējo kvalitāti, turklāt samazina HDL-holesterīna līmeni vistas gaļā, tādējādi šo mikroaļģi var droši izmantot kā funkcionālu piedevu broileru diētās (Gadzama et al. 2025).

Summary of Main Findings
Broilers fed 1 g of CLV/kg diet for 32 d showed an increase in final body weight and weight gain as compared to control groups
Broilers fed 2.5% dried <i>Chlorella vulgaris</i> for 8 weeks had higher body weight in comparison to the control
Broilers fed with 0.8% CLV showed better final weight and feed conversion after 35 d than the control group
Birds fed <i>Chlorella</i> , in powder, <i>Chlorella</i> growth factor, or liquid form, gained more weight by 5 weeks of age than the control group, without affecting feed intake or efficiency
Chicks fed 0.05–0.5% <i>Chlorella</i> for 35 d had greater weight gains than the control group
Broilers fed CLV over 5 weeks had significantly higher body weight gain as compared to the control group
Broilers fed 1.0% <i>E. coli</i> fermented liquor with <i>Chlorella</i> showed a 2.6% higher weight gain and a 2.8% improved FCR than the control group
Broilers fed CLV over 5 weeks had similar feed intake and FCR
Broilers fed 10% CLV for 14 d showed similar growth and feed conversion rates, with or without added CAZymes
Broilers given 0, 10, or 20 g/kg of CLV had lower feed intake, yet their weight gain and FCR were similar
Birds on 15% and 20% CLV diets had reduced body weight, weight gain, and feed intake, unlike those on CLV10%, which were comparable to the control group
Birds fed with 15% and 20% CLV diets showed similar feed conversion ratios to the control group
Broilers receiving 1 g of CLV/kg of diet had similar feed intake and FCR as compared to the control groups
Adding 10% CLV and CAZymes to broiler diets did not significantly affect weight gain or feed efficiency
Chicks fed with 0.15% or 0.5% <i>Chlorella</i> or <i>Chlorella</i> growth factor showed increased serum IgG and IgM levels compared to the control group
Chicks fed 0.5% dried <i>Chlorella</i> powder had lower serum total lipid concentrations compared to the control
Broilers fed 0.8% CLV for 35 d showed reduced haptoglobin and interleukin-13 levels compared to the control
Supplementing broiler diets with 10 g/kg of <i>Chlorella</i> by-product enhances health, immunity, antioxidant capacity, and gut morphology

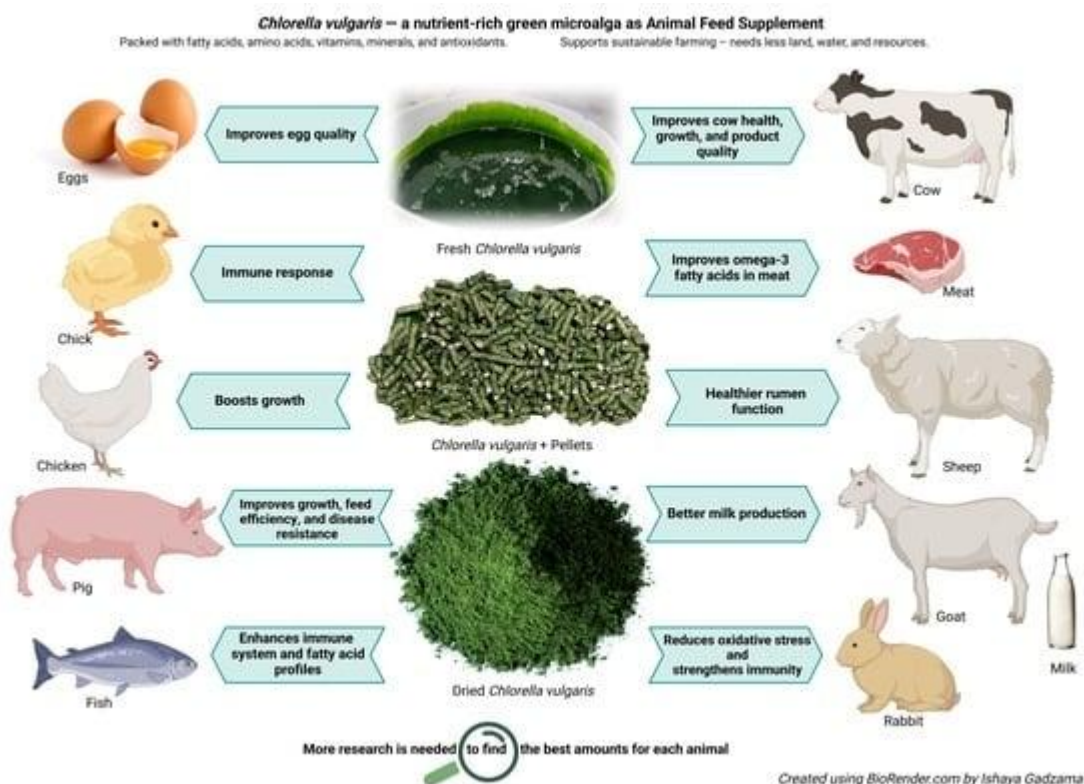
CLV = *Chlorella vulgaris*; FCR = Feed conversion ratio; d = day/s; CAZymes = carbohydrate-active enzymes.

3.1.7. attēls. Pētījumi par *C. vulgaris* biomasas pievienošanu broileru barībai un to rezultāti (Gadzama et al. 2025).

Pētījumi par *C. vulgaris* pievienošanu dējējvistu barībai rāda, ka 75 g/kg deva var paaugstināt barības patēriņu un olu dēšanas intensitāti, savukārt mazākas devas (≈ 5 g/kg) būtiski neietekmē dēšanu, bet spēj palielināt olu masu un dējību (skat. 3.1.8. un 3.1.9. attēlu). *C. vulgaris* uzlabo zarnu mikrobiotu, tādējādi veicinot barības vielu izmantošanu un imunitāti, mazina aknu tauku uzkrāšanos un, īpaši fermentētā veidā, uzlabo dējību, dzeltenuma krāsu un olu svaigumu. Piedeva pastiprina olās labvēlīgo taukskābju un β -karotīna saturu, uzlabojot gan uzturvērtību, gan krāsu (svaigās un vārītās olās), nemainot kopējo holesterīna līmeni. Tiek novērotas izmaiņas dzeltenuma taukskābju profilā – palielinās palmitīna un linolskābes, samazinās dokosatetraēnskābe – taču olu čaumalas kvalitāte parasti nemainās. Tajā pašā laikā trūkst datu par ilgtermiņa ietekmi uz vaislas stadiju, embriju attīstību un cāļu dzīvotspēju, kas prasa turpmākus pētījumus (Gadzama et al. 2025).

Summary of Main Findings	R
Hen-day egg production and feed intake improved with higher levels of <i>Chlorella</i> by-product at 75 g/kg of basal diet	
Lohmann Brown hens fed 2.0% CLV for 8 weeks had similar feed intake, final body weight and cholesterol levels as compared to control	
Hy-Line Brown laying hens fed a 5 g CLV/kg diet had a similar laying performance as the control group	
CLV-supplemented hens had greater egg weight (62.4 g) as compared to (59.8 g) in the control	
Feeding spray-dried or bullet-milled spray-dried CLV at 5.0 g/kg increased the diversity of lactobacilli in the crop of Lohmann Brown laying hens as compared to the control group	
Dietary CLV in the diet of hens resulted in a more diverse bacterial community in the ceca of Lohmann Brown hens	
CLV levels of 0, 1000, or 2000 mg/kg positively affected the contents of hepatic triacylglycerol and the profiles of cecal microflora in Hy-line Brown hens	
Hens fed CLV at 5 g of diet did not differ in laying performance, jejunal histology, cecal short-chain fatty acids, and antioxidant/immune markers in ileal mucosa	
Indicators of egg freshness (Haugh unit) and eggshell quality (i.e., strength and thickness) were not altered by 5 g dietary CLV in the diets of Hy-Line Brown laying hens	
A total of 80 weeks Hy-line Brown layers fed fermented CLV levels of 0, 1000, or 2000 mg/kg diet for 42 d showed a linear increase in egg production, egg yolk color, and Haugh unit	
CLV supplementation improved the color parameters (L*, a*, and b*) of fresh and 10 min boiled eggs compared to the control group	
Dietary CLV significantly influenced egg yolk color in laying hens compared to the control group	
Dietary CLV increased fatty acid content, β -carotene concentration, antioxidant capacity, yolk color intensity, and boiling eggs enhanced the b* colour	
A total of 74 weeks Bovans Braun laying hens fed <i>Chlorella</i> at 2% and 10% of the diet for 37 days had similar total cholesterol content in 100 g of yolk as compared to the control	
<i>Chlorella</i> supplementation increased palmitic and linoleic acid concentration but decreased docosatetraenic acid in egg yolk	
CLV = <i>Chlorella vulgaris</i> ; L* = lightness; a* = red/green; b* = yellowness/blue.	

3.1.8. attēls. Pētījumi par *C. vulgaris* ietekmi uz dējējvistām un to rezultāti (Gadzama et al. 2025).



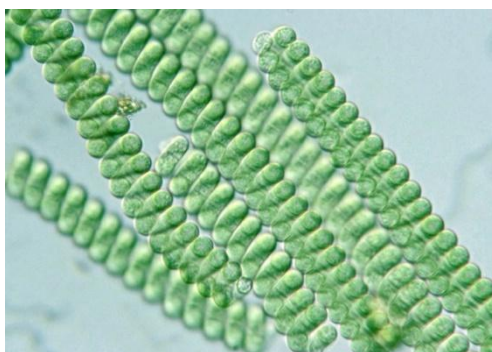
3.1.9. attēls. *C. vulgaris* dažādie pielietojumi lauksaimniecībā (Gadzama et al. 2025).

Spirulina platensis (*Arthrospira*) pieder pie fotosintētiskajām baktērijām no zilaļģu grupas. Tā parasti aug tropiskos reģionos ar siltiem, sārmainiem un sāļiem ūdeņiem, kas bagāti ar karbonātiem un bikarbonātiem. Tām ir gāzveida vakuolas pavedienu forma, diametrā sasniedzot no 3 līdz 12 μm. Gaismas mikroskopijā (skat. 3.1.10. attēlu) redzama zili zaļā krāsā (Ali, Saleh 2012).

Tā vairojas aseksuāli binārās dalīšanās ceļā, kur veģetatīvās šūnas dalās, veidojot jaunas šūnas un trihomu pavedienus. Augšana un dalīšanās notiek nepārtraukti labvēlīgos vides apstākļos, bez seksuālās vairošanās fāzes. Vides apstākļi var ietekmēt pavedienu formu, tomēr augšanai normālos apstākļos saglabā pavedienvēda formu (Ali, Saleh 2012).

S. platensis ir izcils minerālvielu, vitamīnu (skat. 3.1.11. attēlu) un proteīnu avots. 60-70% sausnas svara satur olbaltumvielas. Tās satur īpaši daudz provitamīna A jeb β-karotīna, vitamīna B12 un dzelzs, kas labvēlīgi ietekmē anēmijas pacientu ārstēšanu un uzlabo veselības stāvokli grūtniecības laikā. Lipīdi veido 4-7 % sausnas svara, bet ogļhidrāti – no 10 līdz 15 %. Tām ir dabiskas izcelsmes pigmenti, piemēram, karotīni, hlorofils un fikocianīni, kas ir komerciāli nozīmīgi produkti. Daži *Spirulina* celmi β-karotīnu spēj uzkrāt pat līdz 230 μg uz gramu sausnas (Ali, Saleh 2012; Liestianty et al. 2019).

Tā kā *Spirulina* ir uzturvielām bagāta cianobaktērija (skat. 3.1.12. attēlu), tā ir guvusi atzinību nozīmīgiem veselības ieguvumiem. Pārtikas un lauksaimniecības organizācijā (FAO) šo organismu ir atzinusi par ideālu 21. gadsimta pārtikas piedevu. Tai ir īpaši augstas antioksidatīvas spējas augstā fikocianoblīna satura dēļ, kas saistās ar pirmējo fikocianīna proteīna formu un darbojas kā spēcīgas NADPH oksidāzes (enzīms, kas rada kaitīgu oksidatīvu stresu, saistīts ar dažādām veselības problēmām) inhibitors. Tā satur brīvas formas bilirubīnu, kas novērš un ārstē sirds un asinsvadu slimības, diabētu un fibrotiskus iekaisumus. Jaunākie pētījumi uz grauzējiem liecina, ka *S. platensis* varētu būt daudzsološs papildinājums smadzeņu un nervu veselībai.



3.1.10. attēls. *Spirulina platensis* mikroskopa attēls (Fayzunnessa et al. 2011).

Ar šo mikroorganismu un tā ražotajiem savienojumiem var saistīt vēl neskaitāmus pielietojumus veselībā kā vēža samazināšanas risku, imūnsistēmas stiprināšanu, pretvīrusu un antimikrobiālo iedarbību un pat HIV vīrusa nomākšanu cilvēka šūnās (Ali, Saleh 2012).

Papildus tās uzturvērtībai un terapeitiskajām īpašībām *S. platensis* arī ir svarīga loma vides ilgtspējā. Tā pārvērš oglekļa dioksīdu organiskās vielās, papildus ražojot skābekli un, tā kā tā labi aug sārmainā un sāļā ūdenī, to var kultivēt neauglīgās vietās, nepaļaujoties uz saldūdens resursiem. Tas padara to par uzturvielām bagātu pārtikas avotu un videi draudzīgas lauksaimniecības prakses veicinātāju (Jung et al. 2019).

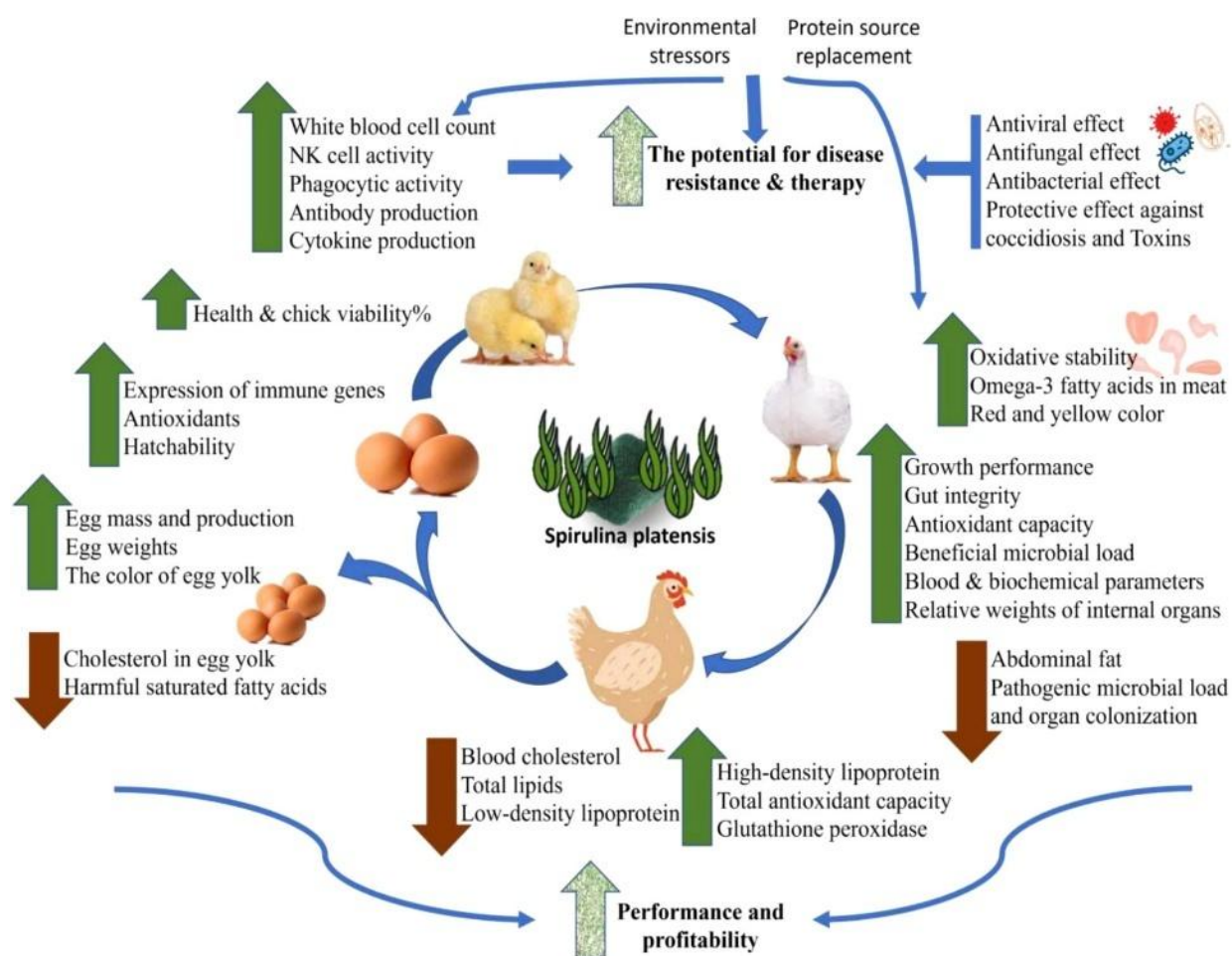
Vitamins composition		Minerals composition	
Biotin	0.55 µg	Potassium (K)	16 mg
Folic Acid	0.71 µg	Calcium (Ca)	15 mg
Pantothenic Acid	2 µg	Phosphorus (P)	10 mg
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	3.6 µg	Manganese (Mn)	3 mg
Pyridoxine (Vitamin B6)	8 µg	Zinc (Zn)	70 µg
Thiamine (Vitamin B1)	48 µg	Magnesium (Mg)	3.7 mg
riboflavin (Vitamin B2)	55 µg	Sodium (Na)	2.5 mg
Niacin (Vitamin B3)	0.15 mg	Iron (Fe)	1.7 mg
Tocopherol (Vitamin E)	0.41 mg	Pigments	
Inositol Acid	0.7 mg	Phycocyanin	180 mg
Beta-carotene (pro-vitamin A)	5.8 mg	Chlorophyll	11 mg
Bioflavonoids	10 mg	Total Carotenoids	6 mg

3.1.11. attēls. *Spirulina platensis* ķīmiskais sastāvs uz 1 g biomasas (Liestianty et al. 2019).

Vitamins	<i>Spirulina</i>
Vitamin A	0.34mg
Vitamin C	10.1mg
Thiamin (vitamin B1)	2.4mg
Riboflavin (vitamin B2)	3.7mg
Niacin (vitamin B3)	12.8mg
Pantothenic acid (vitamin B5)	-
Pyridoxine (vitamin B6)	0.4mg
Folate (vitamin B9)	94µg
Cobalamin (vitamin B12)	0ug
Vitamin E (alpha-tocopherol)	5.0mg
Vitamin K (phylloquinone)	25.5µg

3.1.12. attēls. *S. platensis* vitamīnu saturs 100 g sausas biomasas (Andre, Jose 2019).

Dažādos pētījumos pierādīts, ka *S. platensis* barības piedeva veicina mājputnu augšanu un produktivitāti jau no embrionālā posma (skat. 3.1.13. attēlu). In ovo injekcijas paātrina imunitātes un antioksidantu gēnu ekspresiju paipalu cāļos, bet 0,5–2 g/L spirulīnas dzeramajā ūdenī četrās nedēļās būtiski kāpina cāļu dzīvotspēju, ķermeņa masu un barības konversijas rādītājus, vienlaikus samazinot vēdera taukus. Devas 1–2 g/kg diētā uzlabo Japānas paipalu augšanu, ja izmanto augu olbaltumvielu avotu, neietekmējot gaļas kvalitāti. *Leghorna* un broileru putni, kas saņēma 10 – 10 000 ppm spirulīnas, svēra vairāk par kontroles grupu, un 0,7–0,9 g/kg barībā uzlaboja asins parametrus un samazināja mikrobioloģisko ietekmi. *Cobb* broileriem 10 g/kg deva palielināja svara pieaugumu, un veicināja labvēlīgo zarnu *Lactobacillus* pieaugumu, vienlaikus mazinot negatīvo *E. coli*. Paipalu augšanas fāzē 5 g/kg spirulīnas ievērojami palielināja svaru un krūšu muskuļa īpatsvaru, bet dējējvistām 3 g/kg uzlaboja olu dzeltenuma krāsu un samazināja holesterīnu. Līdz 0,9% diētā spirulīna neietekmēja barības patēriņu vai olu čaumalas kvalitāti, taču 0,6% palielināja olu masu, dējību un dzeltenuma krāsas intensitāti. Zelta *Montazah* dējējvistām 2–3 g/kg deva pazemināja kopējos lipīdus, paaugstinot antioksidantu aktivitāti, dējību un perēšanas sekmes. Paipalu diētās 5–15 % spirulīnas uzlaboja olu taukskābju profilu un antioksidantu līmeni, lai gan neietekmēja dējību (El-Shall et al. 2023).



3.1.13. attēls. Spirulīnas vispārējie pielietojumi un ietekme uz mājputnu produktivitāti un veselību (El-Shall et al. 2023).

S. platensis ir bagāta ar C-fīkocianīnu un citiem antioksidantiem – karotinoīdiem, tokoferoliem, linolēnskābi, fenoliem –, kas spēj neitralizēt brīvos radikāļus un samazināt lipīdu peroksidāciju, DNS bojājumus un holesterīna līmeni putnu asins plazmā. Barības vai dzeramā ūdens piedeva (0,5–2 g/L) Japāņu paipalu cāļiem palielināja kopējo antioksidatīvo kapacitāti, in vivo injekcijas paaugstināja izšķilšanās rādītājus. Broileru un paipalu gaļā 1,5 – 4% *S. platensis* diētā uzlaboja olu krāsu un oksidatīvo stabilitāti, palielinot linol- un dokozaheksaēnskābes, oleīnskābes un karotinoīdu saturu, kā arī samazināja peroksīdu koncentrāciju. Turklāt gaļas garša nezaudēja kvalitāti un samazinājās “metāliskās” piegaršas. Lielas devas ($\approx$ 50 % sojas proteīna aizvietošana vai 15 % barībā) pastiprināja olu dzeltenumu un gaļas sarkanumu, uzlaboja maigumu un sulīgumu, lai gan bija vērojams α -tokoferolu un omega-3 PUFA īpatsvara samazinājums.. Kopumā *S. platensis* papildinājums uzlabo putnu antioksidatīvo statusu un gaļas kvalitāti, taču

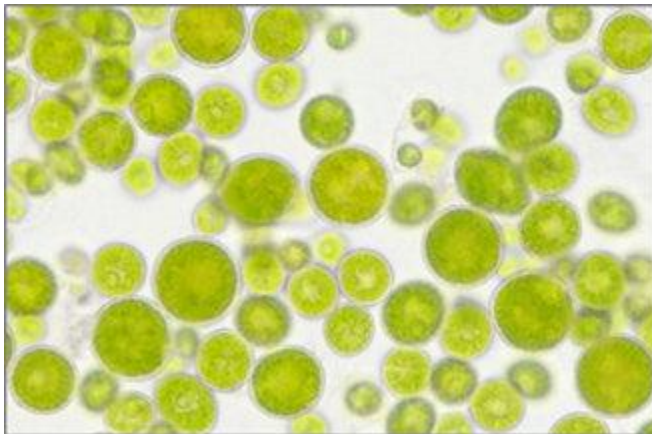
precīza deva un lietošanas veids jāpielāgo, lai izvairītos no nevēlamas viskozitātes vai taukskābju sastāva izmaiņām (El-Shall et al. 2023).

Spirulina platensis satur kalcijveida polisaharīdu spirulānu, kas kavē vīrusu vairošanos, bloķējot to iekļūšanu saimniekšūnās, un stimulē imūnsistēmu, palielinot leikocītu skaitu un antivielu ražošanu. Tas palīdz aizsargāt vistas no dažādām vīrusu slimībām, piemēram, A hepatīta un Nūkastlas slimības, uzlabojot vakcīnu efektivitāti un samazinot vīrusu izdalīšanos. Spirulina arī darbojas kā spēcīgs antibakteriāls un pretsēnīšu līdzeklis, efektīvi iedarbojoties pret dažādām baktērijām un mikroskopiskajām sēnēm, pateicoties bioaktīvām vielām, kas bojā baktēriju šūnu sienas un kavē to izplatīšanos. Papildus tam tā uztur zarnu veselību un stiprina imūnsistēmu, aizsargājot putnus no toksīnu negatīvās ietekmes, piemēram, aflatoksīniem, un palīdz samazināt iekaisuma procesus organismā. Šo īpašību dēļ *S. Platensis* tiek rekomendēta kā uztura piedeva putnu barībā, lai uzlabotu veselību, produktivitāti un aizsardzību pret slimībām (El-Shall et al. 2023).

Graesiella emersonii ir vienšūnu zaļāļģe (skat. 3.1.14. attēlu), kas pieder pie *Chlorophyta* ģints. Tā ir pazīstama ar spēju pielāgoties dažādiem vides apstākļiem, padarot to par interesantu pētījuma organismu ekoloģiskos un biotehnoloģiskos pielietojumos. Tā aug saldūdens vidē un spēj izturēt plašu temperatūras un gaismas intensitātes diapazonu. Tā spēj ražot karotinoīdus un taukskābes. Šiem savienojumiem ir ievērojams resursu potenciāls biodīzeļdegvielas un uztura nozarē (Ki et al. 2024; Mashael et al. 2022).

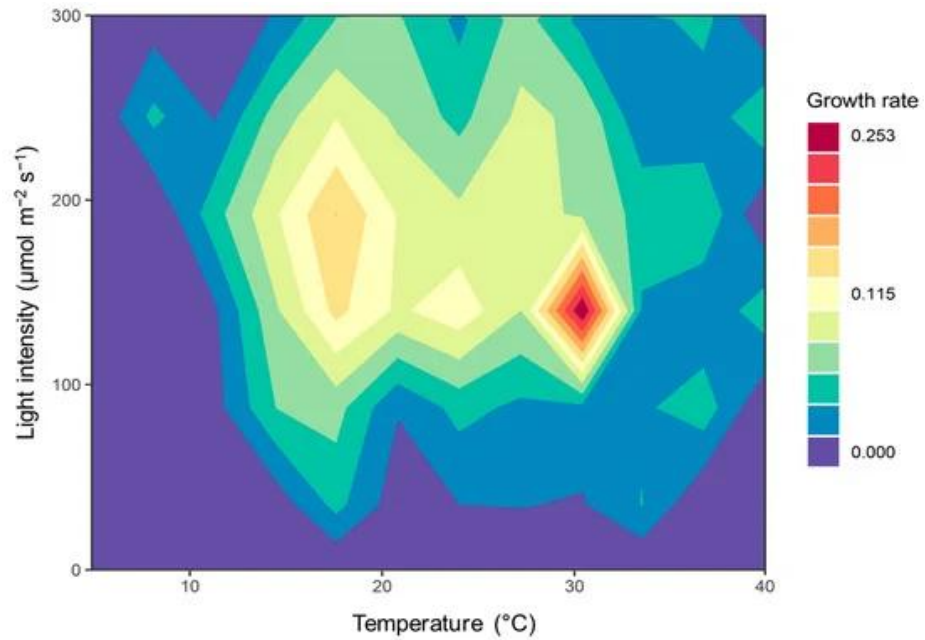
Šo mikroaļģi sākotnēji klasificēja Kalina un Puncucharová. *G. emersonii* ir vienīgā šajā ģintī atzītā suga. Lai gan tā sastopama saldūdens biotopos, to var atrast arī iesālā ūdenī, kas liecina par īpašajām vides pielāgošanās spējām. Tai ir liela nozīme ūdens ekosistēmās, īpaši ūdens attīrīšanas procesos, veicinot veselīgu un līdzsvarotu ūdenstilpņu uzturēšanu. Papildus ekoloģiskajām funkcijām, tā ir piesaistījusi uzmanību dažādos rūpnieciskos pielietojumos. Šī suga ir vērtīgs pigmentu, lipīdu un bioaktīvo savienojumu ražotājs. Viena no nozarēm, kas īpaši pēta *G. emersonii* potenciālu dažādu savienojumu ražošanai, ir farmācija. Eiropā tā ir atzīta par vērtīgu uztura bagātinātāju, uzsverot drošas uzturvērtības priekšrocības (Kang et al. 2022; Mashael et al. 2022).

Tiek pētīta arī *G. emersonii* spēja ražot dīzeļdegvielu, jo īpaši procesu integrējot ar notekūdeņu attīrīšanu. Šāda dubulta funkcionalitāte ne tikai uzlabo dīzeļdegvielas ražošanas ilgstpēju, bet arī piedāvā rentablu metodi atkritumu apsaimniekošanai (Kang et al. 2022).



3.1.14. attēls. *G. emersonii* 400 reižu palielinājumā mikroskopa attēlā (Mashael et al. 2022).

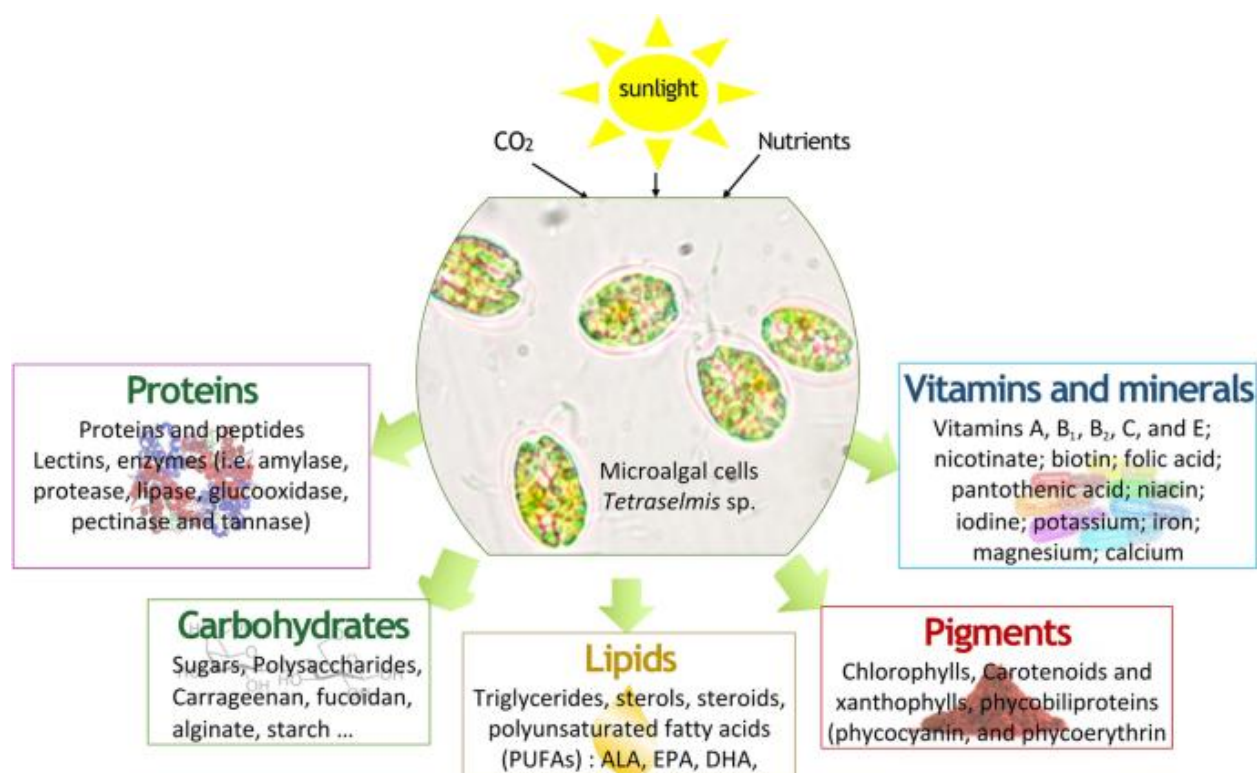
Kādā pētījumā (Kang et al. 2022) tika pārbaudīti labākie apstākļi *G. emersonii* audzēšanai laboratorijas apstākļos. Tika aplūkots, kā šīs mikroaļģes aug dažādos sāļuma līmeņos, temperatūras un gaismas intensitātē. Rezultāti parādīja, ka pēc 10 dienām aļģu augšana palielinājās, palielinoties sāls līmenim barotnē. Sāls koncentrācijā 0,5 M NaCl mikroaļģe sāka strauji augt pēc trīs dienām un sasniedza rezultātu līdz aptuveni 3,1 miljonom šūnu uz mililitru. Tomēr bez sāls (0 M NaCl) aļģes auga daudz labāk, pēc 10 dienām sasniedzot 17 miljonu šūnu mililitrā. Pie augstāka sāls līmeņa (1,0 – 2,0 M NaCl) augšana netika novērota. *G. emersonii* labi auga temperatūrā no 5 līdz 40 ° C, vislabāk augot 28 – 32 ° C temperatūrā un gaismas intensitāti 130–160 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, izmantojot baltu LED gaismu (skat. 3.1.15. attēlu). Tika secināts, ka *G. emersonii* spēj adaptēties plašiem vides apstākļiem, tādējādi konstatējot, ka tā potenciāli varētu būt piemērota suga dažādiem industriāliem pielietojumiem (Kang et al. 2022).



3.1.15. attēls. *Graesiella emersonii* GEGS21 augšanas ātruma matrica (kā parādīts leģendā) dažādos temperatūras un gaismas režīmos (Kang et al. 2022).

3.2. Mikroaļģu producēti mērķsavienojumi un to ietekme uz putnkopības produktivitāti

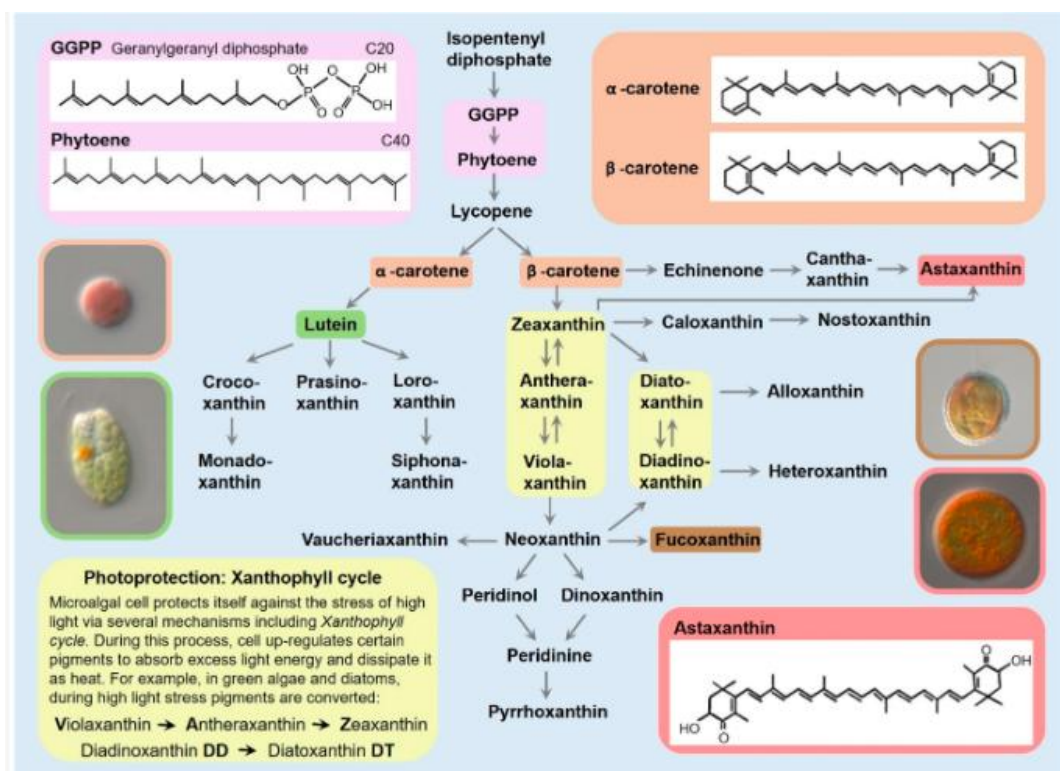
Mikroaļģes spēj ražot dažādus vērtīgus savienojumus, ko ir iespējams pielietot kā augstvērtīgas pārtikas piedevas dzīvnieku barībā (skat. 3.2.1. attēlu). Tās galvenokārt tiek kultivētas jeb audzētas, lai ekstrahētu dažādus pigmentus (hlorofilu, karotenoīdus), lipīdus, polinepiesātinātās taukskābes, vitamīnus un antioksidantus kā fenolus un flavonoīdus (Abdel-Wareth et al. 2024.) Kontekstā ar putnkopību un barības piedevu veidošanu vistām, svarīgākie mikroaļģu ražotie savienojumi ir karotenoīdi, lipīdi, polinepiesātinātās taukskābes, proteīni un vitamīni.



3.2.1. attēls. Mikroaļģu ražoti vērtīgi savienojumi (Saadaoui et al. 2021).

Karotenoīdi ir krāsaini pigmenti, kas šķīst taukos un darbojas kā antioksidanti – tie palīdz pasargāt šūnas no bojājumiem. Mikroaļģes satur daudz vairāk karotenoīdu nekā sauszemes augi, īpaši tad, ja tās pakļautas lielum karstumam vai gaismas daudzumam. Tāpēc karotenoīdu bagātās mikroaļģes tiek izmantotas farmācijā un veselības aprūpē. Daži no vērtīgākajiem karotenoīdiem ir astaksantīns, luteīns, β-karotīns un citi (skat. 3.2.2. attēlu). Papildus tam mikroaļģes ražo arī fitosterīnus – taukainas vielas, kas palīdz samazināt holesterīna līmeni organismā. Ir arī atklātas

mikroaļģu taukskābes, kas ietekmē asins recēšanu, padarot tās interesantas medicīniskai izmantošanai (Xin et al. 2024).



3.2.2. attēls. Karotinoģenēze (dažādie metabolisma ceļi un molekulārās struktūras). *Porphyridium sp.* (oranža), kas satur β-karotīnu, *Tetraselmis sp.* (zaļā), kas satur luteīnu, *Pleurochrysis* (brūna), kas satur fukoksantīnu un *Haemotococcus sp.* (rozā), kas satur astaksantīnu (Novoveská et al. 2019).

Karotenoīdi nodrošina uzturvērtību, terapeitiskas un antioksidanta īpašības. Apmēram 200 dažādu karotenoīdu avotu ir sastopami mikroaļģēs, no kuriem komerciāli visvairāk tiek ražoti β-karotīns un astaksantīns. Citas karotenoīdu formas, piemēram, luteīns, zeaksantīns un likopēns, ir mazāk pazīstamas, bet arī vērtīgas uzturvielas. Putnu barošanas pētījumos mikroaļģēs bagātināti barības avoti ar β-karotīnu veicināja tumši dzeltenu olu dzeltenuma krāsu. Lai gan mikroaļģu karotenoīdi ir dārgāki par sintētiskajiem, dabiskie avoti piedāvā plašāku izomēru klāstu (Saadaoui et al. 2021).

Dunaliella salina ir bieži izmantota β-karotīna ražošanai, jo spēj uzkrāt līdz pat 14% savas svara kā β-karotīnu īpaši skarbos apstākļos, piemēram, pārsālītā vidē, zema slāpekļa līmeņa un

augstas saules starojuma ietekmē. Līdzīgi, *Haematococcus pluvialis* dažādās sugas spēj saražot 4–5% astaksantīna dažādās formās, reaģējot uz stresu (Saadaoui et al. 2021).

Mikroaļģes spēj ražot dažādus **lipīdus**, kas ir ļoti vērtīgi cilvēka un citu dzīvo organismu, t.sk. veselībai. Tie ietver polinepiesātinātās taukskābes, triacilglicerīdus un karotenoīdus. Mikroaļģes ir vienīgie fotosintētiskie organismi, kas dabiski ražo omega-3 taukskābes, piemēram, EPA un DHA. Šīs taukskābes ir ļoti svarīgas uzturam, jo palīdz uzturēt sirds veselību, smadzeņu darbību un samazina iekaisumu un aptaukošanās risku. Salīdzinot ar zivju eļļu, mikroaļģu taukskābes ir tīrākas – tajās ir mazāk kaitīgu vielu, un tās retāk izraisa alerģijas. Mikroaļģu sastāvā var būt līdz pat 60% tauku, un galvenais uzkrātais tauku veids ir TAG (triglicerīdi). Tie kalpo kā enerģijas avots. TAG molekula sastāv no trim taukskābēm, kas piestiprinātas pie glicerīna. Šo taukskābju veids un izvietojums nosaka, kādā jomā šos taukus var izmantot un cik tie ir vērtīgi (Xin et al. 2024).

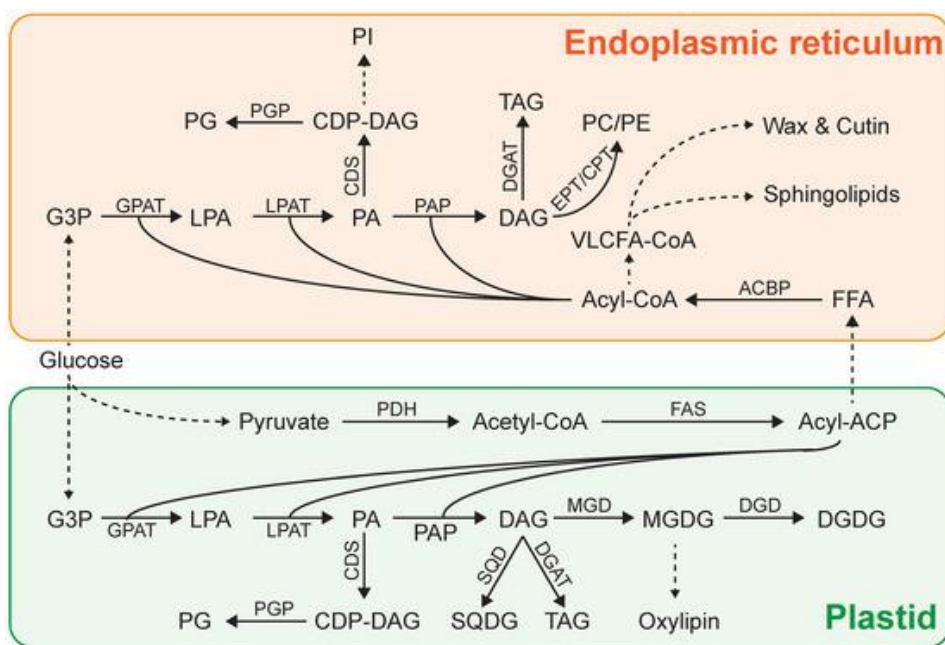
Daudzas mikroaļģu sugas tiek uzskatītas par lielisku uztura **taukskābju avotu** (skat. 3.2.3. attēlu). Atkarībā no sugas un audzēšanas apstākļiem mikroaļģes var saražot līdz pat 50% lipīdu sausas svarā, dažkārt pat vairāk. Dažām mikroaļģēm taukskābju sastāvā ir bagātīgas polinepiesātinātās taukskābes, piemēram, eikozapentaēnskābi, alfa-linolēnskābi, arahidonskābi, dokozaheksaēnskābi un linolēnskābi. Šīs Omega taukskābes ir būtiskas, jo cilvēka un dzīvnieka organisms tās pats nespēj sintezēt, tāpēc tās jāuzņem ar uzturu. Turklāt dokozaheksaēnskābe un eikozapentaēnskābe ir zināmas ar savām antioksidanta un pretiekaisuma īpašībām, kā arī spēj uzlabot garīgo veselību un samazināt sirds slimību, piemēram, aritmijas, insulta, reimatoīdā artrīta un paaugstināta asinsspiediena risku. Dažas mikroaļģu sugas, piemēram, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis* un *Arthrospira*, ir atzītas par labiem šo būtisko taukskābju avotiem (Saadaoui et al. 2021).

Genus	Lipid Yield (% DW ^{***})	Bioactive Lipid	Market Price (** \$/g)	Application
<i>Chlorococcum</i> sp.	20–24	Phosphatidylcholine	50–8000	Anti-inflammatory, anti-thrombotic activities
<i>Nannochloropsis</i> spp.	37–60	Eicosapentaenoic acid	40–23,000	Reduce heart attack and cardiovascular death
<i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Schizochytrium</i> spp.	14–33	Docosahexaenoic acid	2–4000	Improved vision, brain, and memory development
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	25–51	1,3-dioleoyl-2-palmitate	4–16,000	Proper infant growth and development
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	23–68	Medium-chain triglyceride	3–16,000	Anti-atherosclerosis, anti-obesity
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	10–32	Fucoxanthin	1000–43,000	Ophthalmic, cerebrovascular and hepatic health
<i>Euglena gracilis</i>	9–17	Lycopene	2–5300	Antioxidant, cerebrovascular health
<i>Coelastrella terrestis</i>	11–23	Canthaxanthin	1–20,000	Antioxidant, visual health
<i>Heterosigma akashiwo</i>	N/A *	Zeaxanthin	1–110,000	Anti-Inflammatory, anticancer
<i>Chlamydomonadales</i> sp.	15–23	Neoxanthin	5000–120,000	Antioxidant, cardiovascular health
<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella zofingiensis</i>	30–50	Astaxanthin	3–4500	Anti-oxidation, anti-inflammation
Rhodophyte, Chlorophyte, Bacillariophyte, etc.	12–33	Oxylipins	1–50,000	Anti-inflammatory, tissue regeneration
<i>Chlorella protothecoides</i>	10–30	Lutein	1–27,000	Immune stimulant, anti-inflammatory, antioxidant
<i>Dunaliella salina</i>	12–44	β -carotene	1–12,000	Antioxidant, anti-allergic, anti-inflammatory

3.2.3. attēls. Dažādu mikroaļģu sugu lipīdu iznākums % uz sauso masu, tā cena un pielietojums dažādās industrijās (Xin et al. 2024).

Taukskābes ir garu ķēžu karboksil- skābes, kas būtiski ietekmē eļļas sastāvu un kvalitāti. Taukskābes var iedalīt piesātinātajās un nepiesātinātajās taukskābēs. Jo vairāk šo garo ķēžu skābēs ir dubultsaites, jo nepiesātinātākas tās ir un otrādi – jo vairāk vienkāršas saites, jo tās piesātinātākas. Atkarībā no tā, kur molekulā atrodas pirmā dubultā saite garajā zarā, PNTS var tālāk klasificēt omega taukskābēs, piemēram, Omega-3, Omega-6, Omega-9, tās bieži tiek apzīmētas arī kā n-3, n-6 un n-9 (Weixian et al. 2023).

Mikroaļģēs lipīdi veidojas trīs ceļos – divos hloroplastos un vienā šūnas kodolā (skat. 3.2.4. attēlu). Hloroplastos tiek sintezētas taukskābes un to atvasinājumi, kā arī karotenoīdi un steroli, savukārt kodola ceļā veidojas nepieciešamie starpprodukti. Taukskābju sintēze sākas ar acetil-CoA, kas pārtop par garākām oglekļa ķēdēm (parasti C16 vai C18), kas var tikt izmantotas membrānu lipīdu vai uzkrājošo tauku (piemēram, TAG) veidošanai. Mikroaļģes spēj ražot arī gārķēžu nepiesātinātās taukskābes (piemēram, EPA un DHA) gan ar, gan bez skābekļa klātbūtnes, izmantojot specifiskus enzīmus. Šie lipīdi ir būtiski enerģijas uzkrāšanai, membrānu struktūrai (Weixian et al. 2023).



3.2.4. attēls. Dažādi ar lipīdiem un taukskābēm saistītie metabolisma ceļi mikroaļģēs (Weixian et al. 2023).

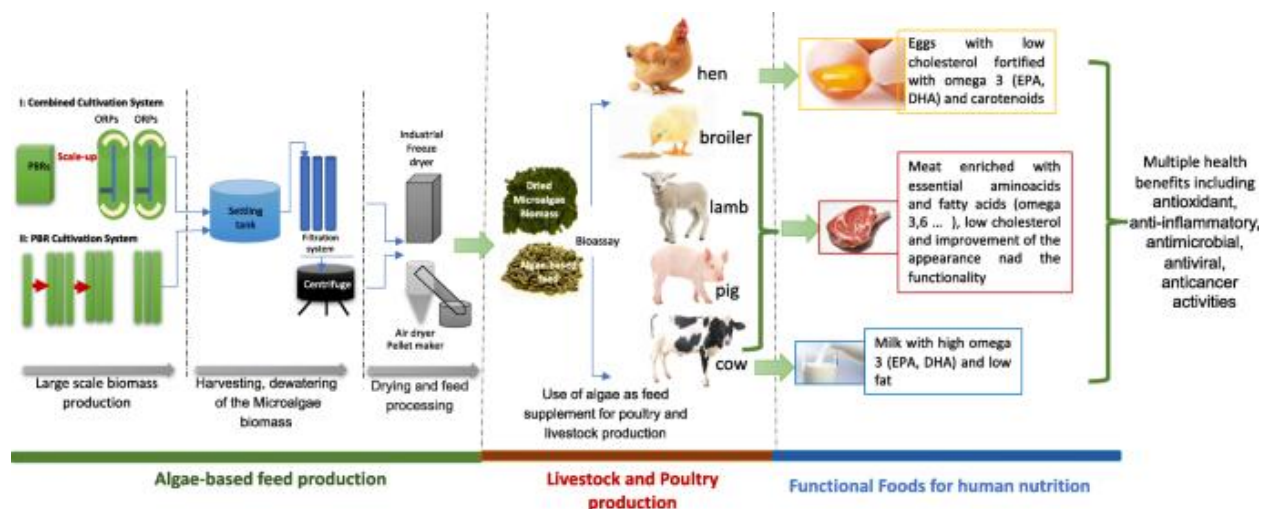
Globālo pārtikas drošības izaicinājumu dēļ tiek meklēti jauni, ilgtspējīgi **proteīnu avoti**. Mikroaļģes izceļas kā daudzsološa alternatīva, jo atsevišķas sugas spēj uzkrāt pat līdz 70% proteīna sausrnā (piemēram, zilaļģe *Arthrospira*). To neaizstājamās aminoskābes proporcijās līdzinās augstvērtīgiem augu proteīniem, piemēram, sojai, un atbilst Pārtikas un lauksaimniecības organizācijas un Pasaules Veselības organizācijas ieteikumiem cilvēku uzturā. Barība, kas bagāta ar metionīnu un lizīnu no mikroaļģēm, veicina vistas krūtiņas un ciskas muskuļu attīstību un uzlabo gaļas kvalitāti. Turklāt mikroaļģes sintezē bioaktīvus peptīdus ar antioksidatīvām, pret-hipertensīvām, pretreimatisma un imunitāti stimulējošām īpašībām. Praktiskajā lopbarībā visbiežāk izmanto proteīniem bagātās *Chlorella*, *Arthrospira*, *Dunaliella*, *Tetraselmis*, *Phaeodactylum*, *Skeletonema* un *Scenedesmus* mikroaļģu ģintis, kas piedāvā atjaunojamu un vērtīgu proteīna avotu gan dzīvnieku barībai, gan cilvēku pārtikai (Saadaoui et al. 2021).

Ogļhidrāti veido nozīmīgu mikroaļģu daļu un tiem ir gan uzturvērtības, gan farmaceitiska nozīme. Piemēram, *Chlorellas* sugas satur šķīstošo šķiedrvielu beta-1,3-glikānu, kam piemīt antioksidanta īpašības un kas palīdz pazemināt holesterīna līmeni asinīs. Komerciāli daudzsološa ogļhidrātu ražošanai ir arī viensūnu sarkanā aļģe *Porphyridium cruentum*, kas sintezē sulfātētu galaktāna eksopolisaharīdu un var aizstāt karaginānu gaļas un piena pārstrādē. Mikroaļģu polisaharīdu hidrolīzē iegūstami dažādi monosaharīdi – ksiloze, mannoze, glikoze, galaktoze un

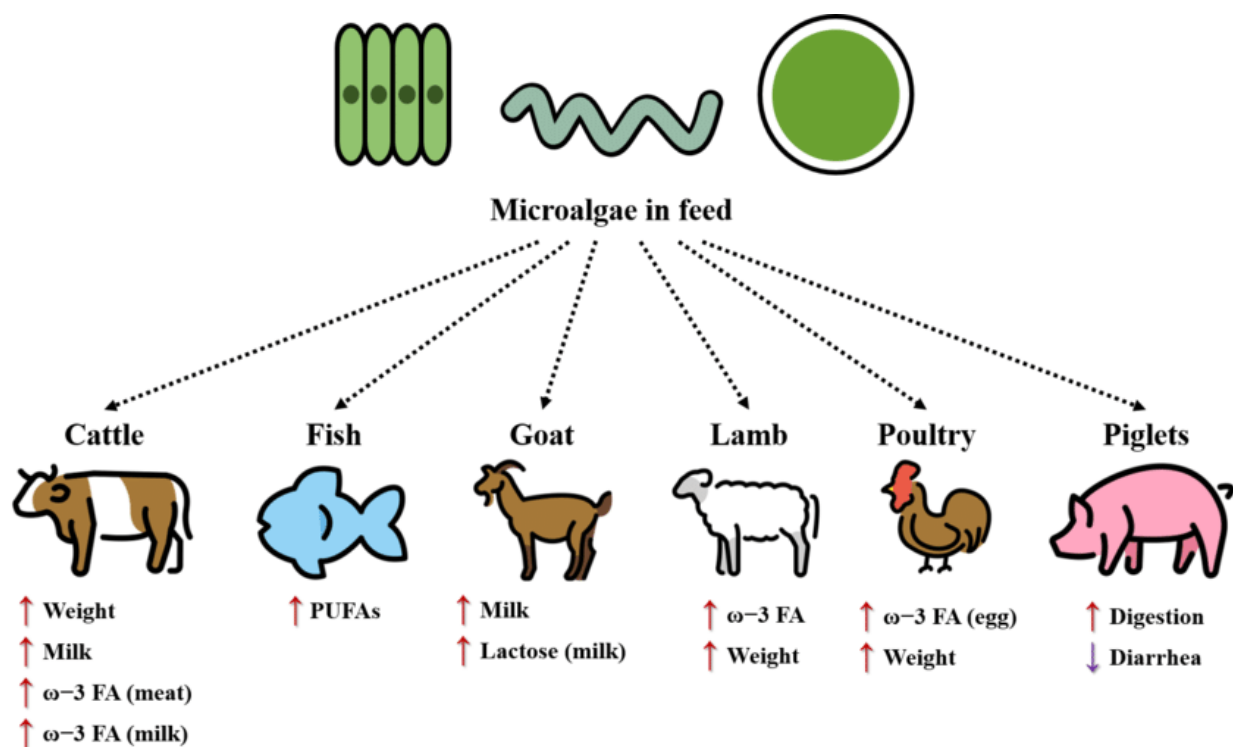
rhamnoze. No tiem glikoze zaļajās mikroaļģēs veido 47–85 % kopējo ogļhidrātu, savukārt mannoze diatomēs, piemēram, *Phaeodactylum tricornutum*, sasniedz gandrīz pusi (ap 46%) no visa ogļhidrātu satura (Saadaoui et al. 2021).

Mikroaļģu biomasa ir bagātīgs dabisko **vitamīnu** un **minerālvielu** avots, kas var papildināt dzīvnieku barību: tajā sastopams A vitamīns un citi retinoīdi, visi B grupas vitamīni (tiamīns, riboflavīns, niacīns, pantotēnskābe, piridoksāls fosfāts, biotīns, folskābe un kobalamīns), kā arī C vitamīns, E vitamīns un dažādi mikroelementi. Piemēram, nātrijs, kālijs, kalcijs, magnijs, dzelzs un cinks. Šie savienojumi veidojas un uzkrājas dabiskā, organismam viegli izmantojamā formā, savukārt to daudzums ir atkarīgs no sugas, apgaismojuma intensitātes, barības vielu sastāva audzēšanas vidē un augšanas fāzes. Piemēram, *Tetraselmis* sugas uzrāda augstu tiamīna, piridoksīna, niacīnskābes un pantotēnskābes saturu, *Dunaliella* sugas bagātīgi sintezē beta-karotīnu, riboflavīnu un kobalamīnu, bet atsevišķi *Chlorella* celmi satur ievērojamu daudzumu tokoferola un biotīna (Saadaoui et al. 2021).

Mikroaļģes piedāvā videi draudzīgu un uzturvērtībā bagātu alternatīvu dzīvnieku un akvakultūras barības ražošanai (skat. 3.2.5. attēlu). Tās var audzēt lielos apjomos fotobioreaktoros vai atklātās dīķu sistēmās, pēc tam novākt un pārstrādāt funkcionālās pārtikas piedevās putniem, cūkām, aitām, ūdelēm un citiem dzīvniekiem. Mainot audzēšanas apstākļus, biomasa mērķtiecīgi bagātinās ar vērtīgiem savienojumiem, piemēram, Omega-3 taukskābēm, karotenoīdiem un neaizstājamām aminoskābēm (skat. 3.2.6. attēlu). Šādi uzlabotas mikroaļģes barībā spēj paaugstināt gaļas, olu un piena uzturvērtību, nodrošinot cilvēkiem papildu pretvēža, antioksidanta un pretvīrusu ieguvumus (Saadaoui et al. 2021).



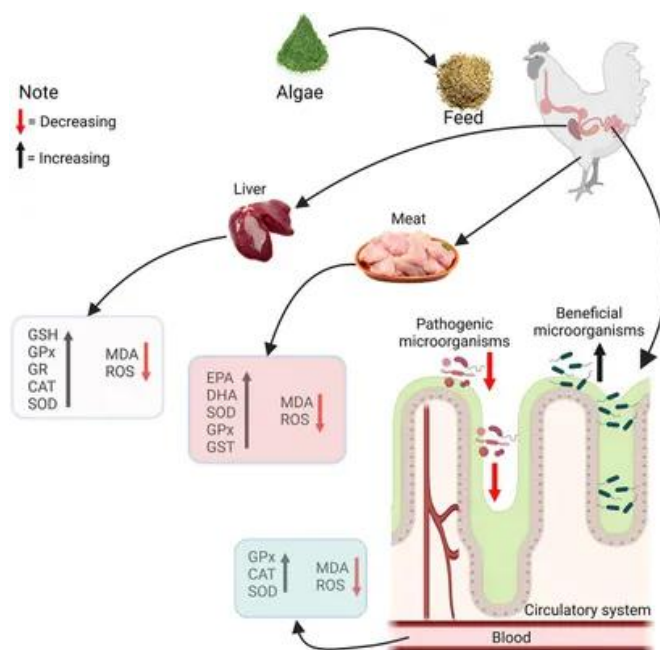
3.2.5. attēls. Tehnoloģiskais process, kā iegūst uzturvērtībā bagātu mikroaļģu biomasu pielietošanai dzīvnieku pārtikā un to ietekme uz gala produktiem (Saadaoui et al. 2021).



3.2.6. attēls. Mikroaļģu izmantošanas dzīvnieku pārtikā pozitīvie rezultāti (Amori et al. 2020).

Iepriekš tika apskatīti dažādie mikroaļģu vērtīgie mērķsavienojumi, kas saistīti ar pozitīvām īpašībām putnkopībā, turpmāk šajā sadaļā tiks apskatīta konkrētāka šo mērķsavienojumu ietekme uz darbības mehānismi saistībā ar putnkopību.

Mikroaļģes barībā var būt nozīmīgs **antioksidantu avots**, jo tajās ir karotinoīdi, tokoferoli, fikocianīns, floridozīds un citi bioaktīvi savienojumi, kas neitralizē brīvos radikāļus un samazina oksidatīvo stresu putnu organismā (skat. 3.2.7. attēlu). Eksperimentos ar broileriem aļģu piedeva izraisīja endogēno aizsardzības enzīmu – superoksīda dismutāzes, glutaciona peroksidāzes, glutaciona reduktāzes un katalāzes – pieaugumu aknās, asinīs un muskuļos, vienlaikus pazeminot lipīdu peroksidācijas marķieri malondialdehīdu un reaktīvo skābekļa formu daudzumu. Gaļā palielinājās ilgtspējīgo polinepiesātināto taukskābju eikozapentaēnskābes un dokozaheksaēnskābes īpatsvars, uzlabojās kopējā antioksidanta kapacitāte un samazinājās oksidatīvie bojājumi, kas labvēlīgi ietekmēja krāsu, garšu un uzglabāšanas stabilitāti. Tajā pašā laikā *Spirulina* un citas mikroaļģes palīdzēja uzturēt zarnu mikrobiotas līdzsvaru, pazeminot patogēno baktēriju un palielinot labvēlīgo mikroorganismu daudzumu, kā arī mazināja karstuma stresa negatīvo ietekmi uz broileru imunitāti un vielmaiņu. Kopumā mikroaļģu pievienošana līdz desmit procentiem barības uzlabo putnu antioksidatīvo statusu, veicina veselību un uzlabo gaļas kvalitāti, padarot tās par vērtīgu un ilgtspējīgu sastāvdaļu mājputnu ēdināšanā (Abdel-Wareth et al. 2024).



3.2.7. attēls. Mikroaļģu antioksidatīvā ietekme uz vistām (Abdel-Wareth et al. 2024).

Pētījumi rāda, ka **aļģu piedevas darbojas kā prebiotikas**, veicinot labvēlīgo zarnu mikroorganismu – piemēram, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* un *Ruminococcus* – augšanu,

tādējādi uzlabojot gremošanu, barības vielu izmantošanu un zarnu aizsargbarjeru mājputniem. Aļģēs esošie polisaharīdi, pigmenti (phiucoeritrīns, fikocianīns), fenoliskas vielas un citi bioaktīvi savienojumi nodrošina antibakteriālu un pretvīrusu iedarbību – tie kavē patogēno *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Vibrio spp.* u. c. augšanu, vienlaikus pastiprinot putnu imūnreakciju un samazinot iekaisumu procesus. *Spirulina platensis* īpaši bagātina barību ar antioksidantiem un imūnstimulatoriem, kas pēc *Eimeria* vai citu patogēnu saslimšanām palīdz uzturēt zarnu integritāti un pazemina oksidatīvo stresu. Eksperimentos 2% *Chondrus crispus* vai *Sarcodiotheca gaudichaudii* diētā būtiski palielināja probiotisko baktēriju īpatsvaru dējējvistu zarnās. Aļģu iekļaušana barībā uzlabo putnu mikrobioma līdzsvaru, stiprina imunitāti un samazina nepieciešamību pēc antibiotikām, tādēļ tās ir perspektīvs un ilgtspējīgs līdzeklis slimību profilaksē un mājputnu veselības veicināšanā (Abdel-Wareth et al. 2024).

Dažādu brūno, sarkano un zaļo aļģu iekļaušana putnu barībā pierādīti **uzlabo zarnu veselību**, jo to nešķīstošie polisaharīdi saglabājas apakšējā gremošanas traktā un kalpo kā substrāts labvēlīgajām baktērijām: palielinās *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* un *Streptococcus* sugas, samazinās *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* un *Salmonella* populācijas, kā arī pazeminās caurejas un iekaisuma rādītāji. Aļģu bioaktīvie savienojumi (polisaharīdi, fukoidāni, bromētie furanoni u.c.) tieši kavē patogēnu augšanu, traucē biofilmu veidošanos un sinerģiski pastiprina antibiotiku efektu, piemēram, kopā ar antibiotiku tetraciklīnu. Vienlaikus novērotas pozitīvas izmaiņas zarnu histomorfoloģijā – lielāks bārkstīņu augstums, platums un virsmas laukums, kā arī uzlabota imunitāte (paaugstināts IgA un IgG antivielu koncentrācija asinīs, limfocītu proliferācija un makrofāgu fagocitoze). Šīs prebiotiskās un antimikrobiālās īpašības uzlabo barības sagremošanu, barības vielu izmantošanu un mājputnu produktivitāti, ļaujot samazināt atkarību no antibiotikām un veicinot ilgtspējīgu mājputnu audzēšanu (Abdel-Wareth et al. 2024).

Pētījumi rāda, ka mikroaļģu pievienošana barībai vistām un pīlēm ietekmē augšanu un produkcijas kvalitāti atkarībā no sugas un devas (skat. 3.2.8. attēlu). Zilzaļā aļģe *Arthrospira* (*Spirulina*) nelielās devās ($\approx 1\%$) var paātrināt svara pieaugumu un uzlabot barības konversiju, kā arī, aizstājot $\sim 9\%$ sojas miltu, uzlabot olu čaulas un dzeltenuma kvalitāti. Savukārt lielas devas ($\geq 15\%$) palielina gaļas karotinoīdus, bet samazina ω -3 taukskābes un α -tokoferolu. *Chlorella* parasti tiek izmantota $< 1,5\%$ līmenī un konsekventi palielina vidējo dienas pieaugumu un uzlabo FCR. Pīlēm tā var stimulēt barības uzsūkšanu, bet broileriem 10% deva bagātina gaļu ar

karotinoīdiem un nedaudz palielina α -linolēnskābi. *Arthrospira* 3–6% devās palielina kalcija un fosfora uzkrājumu kaulos. *Porphyridium* 5–10 % samazina barības patēriņu bez svara zuduma, bet *Schizochytrium* (~7 %) uzlabo svara pieaugumu un ievērojami palielina gaļas EPA un DHA saturu. Kopumā zemas līdz vidējas mikroaļģu devas parasti uzlabo augšanas rādītājus un bagātina olu vai gaļu ar vērtīgām uzturvielām, bet pārmērīgi lieli daudzumi var mazināt barības izmantošanu vai mainīt taukskābju profilu nelabvēlīgā virzienā; tādēļ optimālā deva jāpielāgo konkrētajam mikroaļģu veidam un putnu sugai (Costa et al. 2022).

Microalga	Dietary Inclusion and Animals	Impact
<i>Arthrospira</i> sp.	4–8% in 21-day-old male chicks for 16 days	No significant effect on ADG
	1% in 1-day-old broiler chicks	Increased ADG and decreased FCR
	9% in laying hens	Improved egg quality
	15% in 1-day-old broilers	Increased total carotenoids in meat, but reduced <i>n</i> -3 PUFA and α -tocopherol contents
	3 and 6% in broilers	Increased Ca and P in tibia ash
<i>Chlorella</i> sp.	1.25% in laying hens	Decreased FCR without affecting feed intake
	10% in 1-day-old broilers for 21 days	Increased total carotenoids and a small significant increase in 18:3 <i>n</i> -3
	15% in 1-day-old broilers for 21 days	Increased total carotenoids but decreased <i>n</i> -3 PUFA and α -tocopherol contents
<i>Porphyridium</i> sp.	0.1–0.2% in 1-day-old ducks	Increased feed intake
	5–10% in 12–13, 30-week-old chickens	Reduced ADFI without affecting body weight
<i>Schizochytrium</i> JB5	0.1–0.2% in 2-day-old broilers for 35 days	No significant effect on ADG, ADFI, or FCR
<i>Schizochytrium</i> sp.	7.4% in 21-day-old broilers	Increased ADG and ADFI

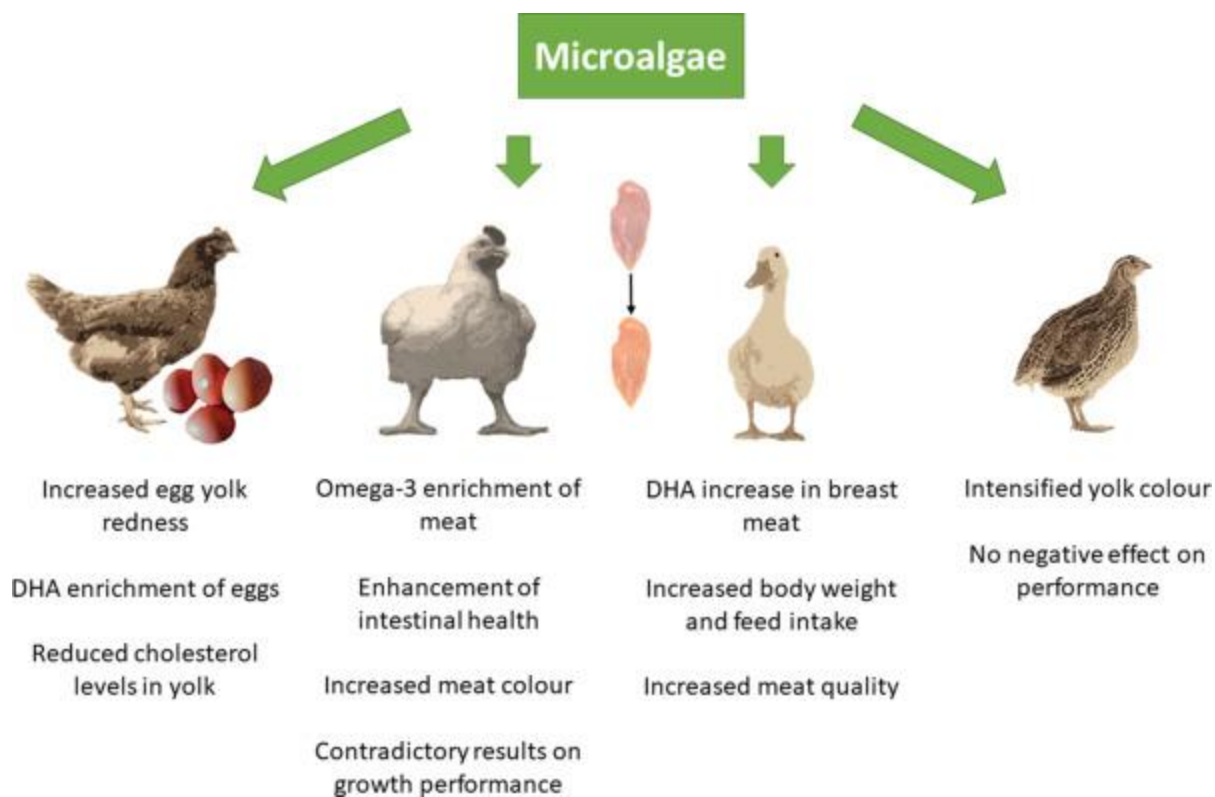
ADFI, average daily feed intake; ADG, average daily gain; FCR, feed conversion ratio, PUFA, polyunsaturated fatty acid.

3.2.8. attēls. Dažādu mikroaļģu sugu pielietošanas prakses un to ietekme uz broiler un dējējvistu produktivitātes parametriem (Costa et al. 2022).

Mikroaļģu pievienošanai kā barības piedevai vistu barībā daudzu pētījumu laikā ir apstiprinājusies **pozitīvā ietekme uz broileru gaļas kvalitāti**. Kā redzams pēc Costa et al. (2022) apkopojuma (skat. 3.2.9. un 3.2.10. attēlu) ietekme uz gaļas kvalitāti atšķiras atkarībā no pielietotās mikroaļģu sugas, barības piedevas koncentrācijas un putnu vecuma. Tāpēc secināms, ka liela nozīme ir šo parametru izpētei un pielāgošanai, lai pēc iespējas palielinātu produktivitāti un lauksaimnieka peļņu.

<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	0.5, 2.5 and 5%	Broilers, 1 day old	6 weeks	Performance not affected. Increased DHA content in broil meat.
<i>Chlorella vulgaris</i>	10%	Broilers, 21 days old	2 weeks	Performance not affected. Improvement of broiler meat quality and lipid nutritional value.
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.1, 0.5, 2 and 4%	Quails, 13 weeks old	13 weeks	The total proteins, albumin, globulin and glucose content increased.
<i>Chlorella vulgaris</i>	3 and 6%	Broilers, 1 day old	6 weeks	Diminution of food consumption and body weight; Increase in polyunsaturated fatty acids
<i>Chlorella vulgaris</i>	1%	Broilers, 1 day old	4 weeks	WG and increased plasma IgA concentration of chickens.
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.1 and 0.2%	Pekin ducks, 1 day old	6 weeks	Increased WG and FI
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.07, 0.14 and 0.21%	Broilers, 1 day old	6 weeks	Improved performance and quality of duck meat. FCR decreased. Increased cellular immune response.
<i>Chlorella vulgaris</i>	1 and 2%	Broilers, 14 days old	14 weeks	Increased meat protein content and PUFA/SFA ratio.
<i>Chlorella vulgaris</i> and <i>Spirulina platensis</i>	0.1% of <i>Chlorella vulgaris</i> 0.1% <i>Spirulina platensis</i>	Broilers, 4 days old	5 weeks	Increased the level of fatty acids and essential amino acids. Malondialdehyde was reduced by microalgae.
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	10%	Broilers, 1 day old	6 weeks	Performance not affected. Decreased malondialdehyde contents.
<i>Schizochytrium</i> sp.	3.7 and 7.4%	Broilers, 1 day old	2 weeks	7.4% incorporation of microalgae increased weight. Did not affect the content of cholesterol.
<i>Spirulina platensis</i>	3 and 6%	Broilers, 9 days old	6 weeks	Serum levels of total lipid, triglyceride, cholesterol and low-density lipoprotein decreased.
<i>Spirulina platensis</i>	0.5 and 1%	Broilers, 1 day old	6 weeks	DHA and EPA increase in thigh meat. Performance not affected.
<i>Spirulina platensis</i>	15%	Broilers, 1 day old	12 weeks	Increased the concentrations of polyunsaturated <i>n</i> -3 fatty acids
<i>Spirulina platensis</i>	6, 11, 16 and 21%	Broilers, 1 day old	3 weeks	Performance not affected up to 16%. Higher digestible methionine values.
<i>Spirulina platensis</i>	0.03, 0.05, 0.07 and 0.09%	Broilers, 7 days old	38 days	Incorporation of 0.07 and 0.09% improved the performance. 1% decreased of abdominal fat.
<i>Spirulina platensis</i>	0.1%	Broilers, 9 days old	6 weeks	Increased weights. Lower FCR.
<i>Spirulina platensis</i>	17 and 21%	Broilers 1 day old	5 weeks	Performance not affected. Decreased dietary protein quality.
<i>Spirulina platensis</i>	0.6, 1.2 e 1.8%	Broilers, 120 days old	7 weeks	Improved performance, haematological and biochemical variables.
<i>Spirulina platensis</i>	15%	Broilers, 21 days old	2 weeks	Reduced performance. Increased length of duodenum and jejunum.
<i>Spirulina platensis</i>	0.25, 0.5, 0.75 and 1%	Broilers, 1 day old	5 weeks	Improved performance and increased enzymatic activity.
<i>Spirulina platensis</i>	5, 10, 15 and 20%	Broilers, 1 day old	3 weeks	10 and 20% depressed growth
<i>Spirulina platensis</i>	1.5, 3, 6 and 12%	Broilers, 1 day old	41 days	Performance not affected.
<i>Spirulina platensis</i>	0.5, 1, and 1.5%	Broilers, 1 day old	36 days	1.00% increased weight. Increase in the height of villi up to 1.00% of <i>Spirulina</i> .
<i>Spirulina platensis</i>	4 and 8%	Broilers, 21 days old	16 days	Performance not affected. Colour of meat more intense
<i>Spirulina platensis</i>	14 and 17%	Broilers 1 day old	12 weeks	Performance not affected. Colour of meat more intense.
<i>Staurosira</i> sp.	7.5 and 10%	Broilers, 2 days old	6 weeks	Performance not affected. Responses of plasma and liver biomarkers and gross examination showed no toxicity of DFA.

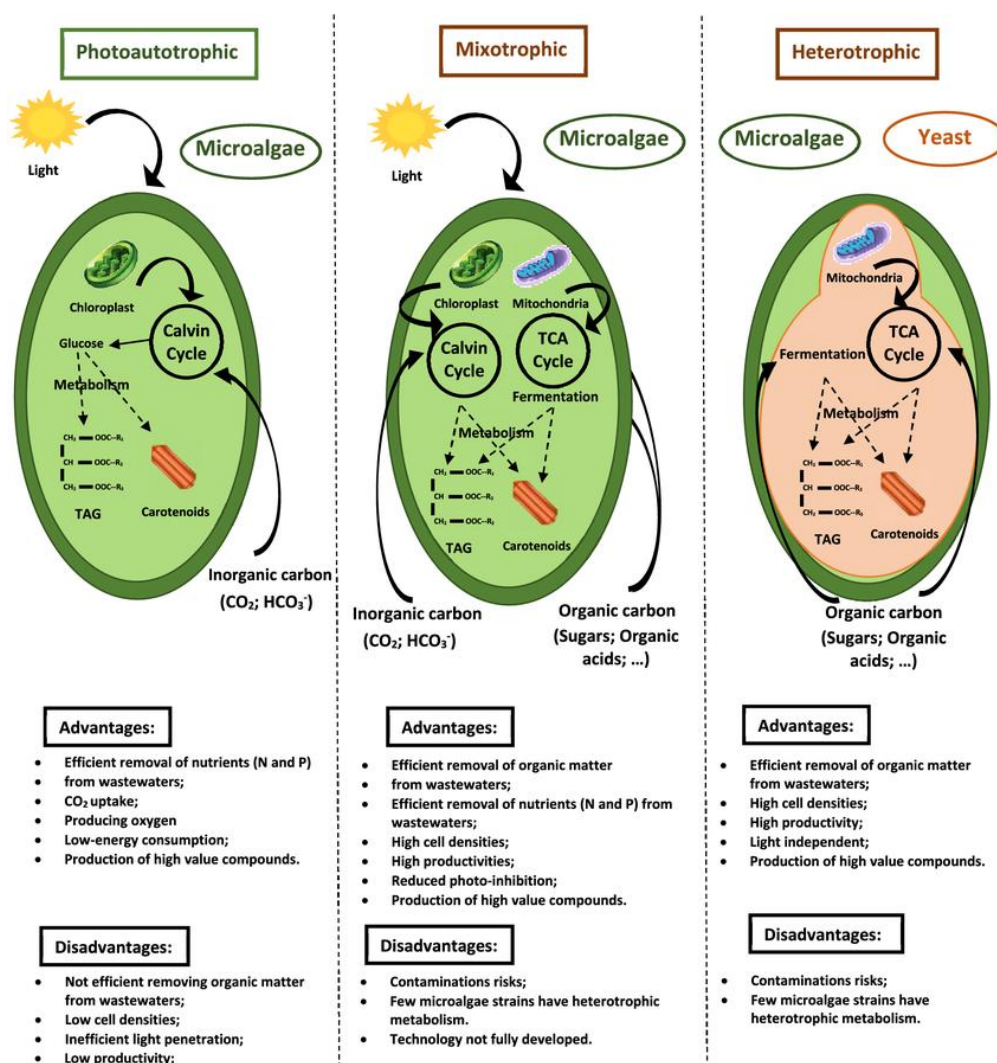
3.2.9. attēls. Dažādā mikroaļģu barības piedevu ietekme uz broileru gaļas kvalitāti (Costa et al. 2022).



3.2.10. attēls. Mikroaļģu barības piedevu ietekme uz dažādu sugu mājputnu produktivitāti (Valente et al. 2021).

3.3. Mikroaļģu kultivēšanas tehnoloģijas

Labi zināms, ka mikroaļģu audzēšanā nav nepieciešama augsne, kā arī lielas platības ar lauksaimniecības zemi. Tradicionāli tās audzē ūdenī (dīķos vai reaktoros), kas bagāts ar barības vielām, nodrošinot tām piekļuvi saules enerģijai, taču kopumā mikroaļģu kultivācijā tiek izšķirti trīs kultivācijas veidi: **fotoautotrofs**, **heterotrofs** un **miksotrofs** (skat. 3.3.1. attēlu). Šo kultivācijas veidu galvenā atšķirība ir mikroaļģu enerģijas avotu dažādība. Fotoautotrofās kultivācijas gaitā mikroaļģu kultivācijai izmanto gaismu, kas var būt dabīgs gaismas avots kā saules gaisma vai mākslīgs gaismas avots, un ogļskābo gāzi, ko mikroaļģes daļēji var izmantot kā oglekļa avotu. Heterotrofās kultivācijas gaitā mikroaļģes tiek kultivētas tikai oglekļa avota klātbūtnē bez gaismas avota. Tas nozīmē, ka visa nepieciešamā enerģija mikroaļģu attīstībai tiek



3.3.1. attēls. Mikroaļģu kultivācijas veidu attēlojums (Dias et al. 2023).

ņemta no tai pieejamā oglekļa avota augšanas barotnē. Miksotrofas kultivācijas gaitā mikroaļģes tiek kultivētas apstākļos, kur tai ir pieejams gan gaismas avots fotosintēzei, no kuras tiek iegūta enerģija, gan arī oglekļa avots barotnē, ko mikroaļģe spēj patērēt, lai papildus gūtu enerģiju attīstībai. Kā oglekļa avoti miksotrofā un heterotrofā kultivācijas tipā var tikt izmantoti: glikoze, laktoze, saharoze, fruktoze, melase, nātrijs acetāts, siera sūkalas un citi (Abreu et al. 2022). Kopums, izvēloties kultivācijas tehnoloģiju, nepieciešams ņemt vērā kultivācijas efektivitāti, produktivitāti, kā arī izmaksas.

Fotoautotrofas kultivācijas gadījumā lielākā daļa enerģijas tiek iegūta no gaismas enerģijas. Tā tiek uzskatīta par vienu no ekonomiskākajiem kultivēšanas veidiem, taču to pavada arī zema produktivitāte, nepietiekams apgaismojums, biomasas zudums nakts laikā u.c. (Nagarajan et al. 2018). Gaismas enerģiju mikroaļģes saņem kā fotonu plūsmu un var tikt izteikta kā fotonu plūsmas blīvums, kas sasniedz mikroaļģes virsmu. Šo fotonu plūsmu absorbē mikroaļģu šūnā sastopami pigmenti (hlorofils a un b, karotenoīdi), kas tālāk darbina fotosintēzes elektronu transportu, kā rezultātā samazinās NADP⁺ un veidojas tālāk ATP, ko mikroaļģe var tālāk izmantot citos šūnas uzturēšanas procesos. Kopumā šajos procesos tiek patērēts aptuveni 50–75% no kopējā saražotā ATP šūnā. Mikroaļģu šūnas absorbē tikai mazu daļu no fotonu plūsmas fotoautotrofas kultivācijas laikā. Pārējais atstarojas un izkliedējas apkārtējā vidē. Fotoautotrofas kultivācijas laikā mikroaļģu šūnu daudzums palielinās tik ilgi, kamēr vidē ir pietiekams daudzums pieejamo gaismas fotonu. Tiklīdz ir sasniegts līmenis, kad visi gaismas fotoni tiek absorbēti, kultūras augšana turpinās lineāri vai arī samazinās (de Gucht & van der Plas 1995; Richmond 2013; Yang et al. 2000).

Heterotrofas kultivācijas laikā teorētiskie mikroaļģu biomasas ieguvumi liecina, ka no 1 mola saražotās ATP enerģijas mikroaļģes šūnā, ir iespējams iegūt 19,3 g/mol biomasas, bet autotrofos apstākļos - 3,11 g/mol biomasas (Yang et al. 2000). Fotoautotrofā un heterotrofā metabolisma gaitā mikroaļģe saražo līdzvērtīgus apjomus ar ATP no mitohondriju oksidatīvās fosforilācijas, tomēr fotoautotrofajā metabolismā tiek iegūta papildus enerģija no fotofosforilēšanas reakcijām, kas norisinās hloroplastos. Šajā kultivācijas veidā tiek pārvarēta problēma par gaismas (tātad arī enerģijas augšanai) nepietiekamību. Informācija norāda, ka, audzējot mikroaļģes heterotrofī, notiek lielāka lipīdu uzkrāšanās, ko norāda arī pašreizējā PNTS ražošana no aļģēm, kas lielākoties tiek veikta heterotrofī, izmantojot jūras aļģes (Nagarajan et al. 2018). Lielākā daļa no visas pieejamās enerģijas, mikroaļģei augot fotoautotrofos apstākļos, tiek

novirzīta Kalvina cikla (CO_2 izmantošana par enerģijas avotu kādai darbībai) darbināšanai. Turpretī heterotrofas kultivācijas laikā mikroaļģēm Kalvina cikls nav funkcionāls, bet tiek stimulēts pentozes fosfātu ceļš un glikozilāta cikls, kas ļauj ietaupīt ATP un oglekli, tādējādi novirzot vairāk enerģijas un oglekļa šūnu augšanai, biomasas uzkrāšanai un metabolītu uzglabāšanai (Boyle, Morgan 2009; Perez-Garcia et al. 2011; Zuñiga et al. 2016).

Miksotrofas kultivācijas gaitā mikroaļģu šūnas ir spējīgas uzņemt enerģiju no dažādiem avotiem, kā organiskie oglekļa avoti, ogļskābā gāze un gaisma. Lai vieglāk izprastu atšķirību - heterotrofas kultivācijas gadījumā enerģiju un oglekli var uzņemt tikai no organiskiem oglekļa substrātiem. Miksotrofas augšanas laikā ir iespējams iegūt augstāku biomasas ražību, jo vienlaikus notiek fotosintēze un heterotrofas augšanas procesi, metabolizējot organisko oglekli kā nepieciešamo oglekli mikroaļģes attīstībai un kā enerģiju mikroaļģes attīstībai. Abi procesi var notikt ar vienādu intensitāti vai arī balanss var novirzīties uz kādu no tiem, to intensificējot, bet ne izslēdzot otru (Smith et al. 2015). Tiek paredzēti arī mazāki biomasas zudumi, jo diennakts tumšajā periodā mikroaļģes spēj iegūt enerģiju no organiskā oglekļa, piemēram, glikozes. Tomēr jāņem vērā, ka ne visām mikroaļģu sugām tas var izpausties vienādi – dažos gadījumos kultivācijas produktivitāte ir augstākā, taču lielākoties vērtības ir starp fotoautotrofo un heterotrofo kultivāciju (Shandilya, Kaushik 2019). Miksotrofajam kultivācijas veidam ir liels potenciāls, jo pastāv iespēja izmantot dažādus pārtikas rūpniecības blakusproduktus vai atkritumproduktus, piemēram, sūkalas, kas ļauj ievērojami samazināt mikroaļģu audzēšanas izmaksas, līdz ar to arī padarīt to ražošanu pieejamāku. Tajā pašā laikā tiek izmantota arī gaisma, kas nodrošina enerģijas izmantošanas nepārtrauktību jebkurā diennakts laikā.

Miksotrofajā kultivācijā biežāk izmantotās mikroaļģes: heterotrofajā un miksotrofajā kultivācijā nav iespējams izmantot pilnīgi visas mikroaļģu sugas, kuras ir iespējams kultivēt fotoautotrofos apstākļos. Dažas no sugām nav spējīgas patērēt organisko oglekli savā metabolismā vai arī tās to dara mazos apjomos. Miksotrofajā kultivācijā atšķirībā no heterotrofās var izmantot daudz plašāku spektru ar mikroaļģu kultūrām, jo miksotrofas kultivācijas gaitā tās sabalansēti balsta savu metabolismu vienlaicīgi uz fotoautotrofajiem un heterotrofajiem procesiem (Castillo et al. 2021). Miksotrofas kultivācijas laikā mikroaļģes nav atkarīgas tikai no gaismas avota enerģijas veidošanai, bet arī ir spējīgas asimilēt organiskā oglekļa avotus, kas ierobežo tādu faktoru limitējošu ietekmi kā gaismas nepietiekamība vai fotoinhibēšana. Šo faktoru izslēgšana var palielināt augšanas produktivitāti un dažādu metabolītu ar augstu pievienoto vērtību iegūšanu

(Pang et al. 2019). Mikroaļģes var tikt kultivētas uz tādiem substrātiem kā sūkalām, melases, notekūdeņiem no pienotavām, ūdens attīrīšanas vietām, zivju atkritumiem, mikroorganismu pārstrādātiem atkritumiem (Abril Bonett et al. 2020; Chong et al. 2022; Khanra et al. 2021; Mat Aron et al. 2021; Vidya et al. 2023). Miksotrofī biežāk kultivējamo mikroaļģu sugas un to metabolīti ar augstu pievienoto vērtību, kā arī to kultivācijas substrāts ir apkopoti 3.3.1. tabulā.

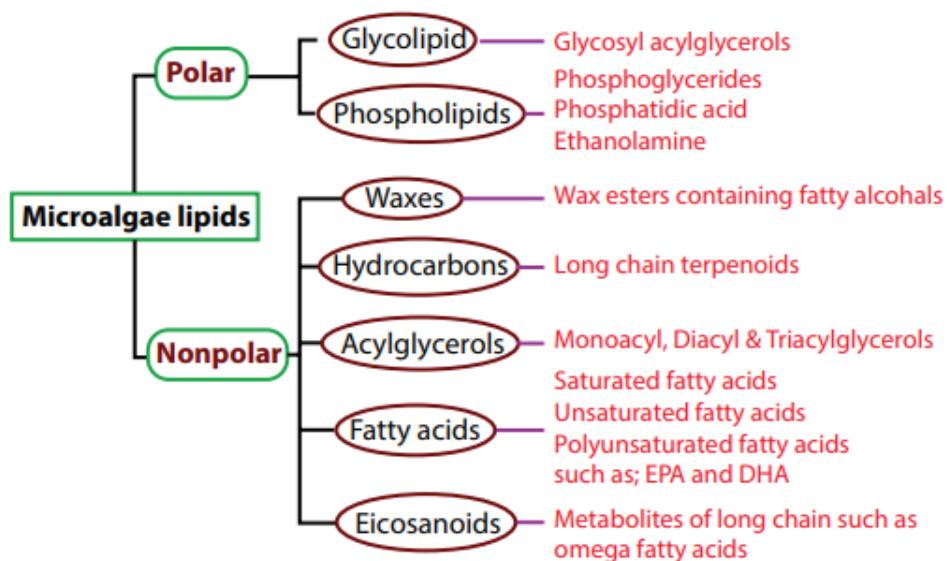
3.3.1. tabula.

Miksotrofī biežāk kultivējamu mikroaļģu un to metabolītu apkopojums.

Mikroaļģes kultūra	Iegūstamais metabolīts	Substrāts	Atsauce
Chlorella vulgaris	Lipīdi	Sojas sūkalas	(Mitra et al. 2012)
Chlorella sp.	Luteīns	Pārtikas atkritumi	(Wang et al. 2020)
Chlorella zofingiensis	Astaksantīns	Glikoze	(Sun et al. 2019)
Neochloris oleoabundans	Lipīdi	Glikozes un nātrija acetāta kombinācija	(Silva et al. 2016)
Haematococcus pluvialis	Astaksantīns	Kālija acetāts	(Wen et al. 2020)
Haematococcus pluvialis	Lipīdi	Riboze	(Pang, Fu et al. 2019)
Dunaliella salina	β -karotēns	Glicerīns	(Capa-Robles et al. 2021)
Porphyridium purpureum	Polinepiesātinātās taukskābes	Glicerīns	(Jiao et al., 2018)
Phaeodactylum tricornutum	Fukoksantīns	Glicerīns	(R. Yang & Wei, 2020)

4. MIKROBIOĀLI IEGŪTU LIPĪDU UN POLINEPIESĀTINĀTO TAUKSKĀBJU EKSTRAKCIJAS UN ATTĪRĪŠANAS METODES

Lipīdi ir svarīgas bioloģiskas molekulas augu un dzīvnieku šūnās. Lipīdu sastāvs ietver taukskābes, glicerolipīdus, glicerofosfolipīdus, sfingolipīdus, sterīnu lipīdus, prenola lipīdus, saharolipīdus un poliketīdus (skat. 4.1. attēlu). Tie nešķīst ūdenī, bet šķīst organiskos šķīdinātājos, piemēram, hloroformā, etanolā, heksānā un dietilēterī. Lipīdi darbojas kā enerģijas rezerves un šūnu membrānu strukturālās sastāvdaļas. Tos iedala neitrālos lipīdos (piemēram, triacilglicerīnos, sterīnos) un polārajos lipīdos (fosfolipīdos, glikolipīdos). Taukskābes un to atvasinājumi, piemēram, triglicerīdi, ir svarīgi enerģijas uzglabāšanai dzīvajos organismos. Triglicerīdi veidojas



4.1. attēls. Mikroaļģu lipīdu klasifikācija (Sharma et al. 2020).

no glicerīna un trim taukskābēm, kas var būt piesātinātas (PPTS), mononepiesātinātas (MNTS) vai polinepiesātinātas (PNTS) (Sharma et al. 2020; Chakraborty et al. 2010).

Mikroaļģes noteiktos apstākļos var uzkrāt lipīdus vairāk nekā 60 % no to sausās masas. Lipīdu sastāvs var atšķirties atkarībā no sugas un audzēšanas metodēm (autotrofas, heterotrofas, miksotrofas). Tādi faktori kā temperatūra, pH, uzturvielu barotne, gaismas intensitāte un gaismas/tumsas cikli ietekmē piesātināto un nepiesātināto taukskābju attiecību mikroaļģu lipīdu sastāvu. Parasti mikroaļģu lipīdos ir 12–22 oglekļa ķēdes ar piesātināto un polinepiesātināto taukskābju maisījumu, ko industriāli, galvenokārt, izmanto biodīzeļdegvielai. Dažas mikroaļģu sugas ir arī lieliski PNTS avoti, kas ir svarīgi cilvēku veselībai, palīdzot ārstēt depresiju,

neiroloģiskās slimības, iekaisumus, autoimūnas slimības un sirds un asinsvadu slimības (Sharma et al. 2020; Chakraborty et al. 2010).

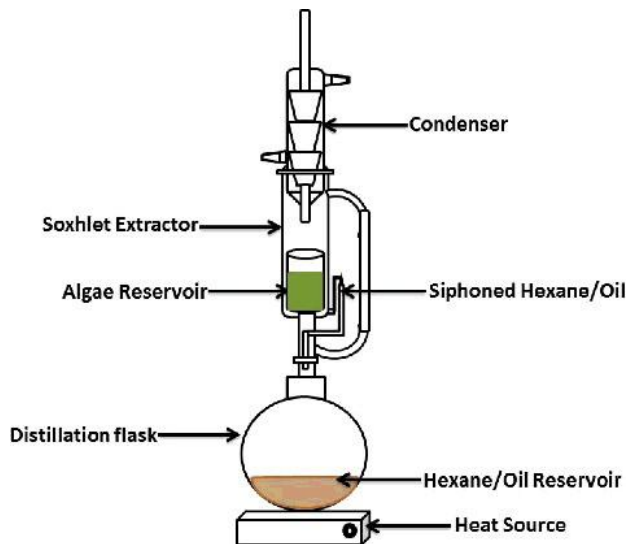
Mikroaļģu PNTS izdalīšanas un iekoncentrēšanas metodes ir dažādas, tās var iesaistīt sarežģītus posmus augstas kvalitātes frakcijas iegūšanai. Tas parasti ietver nešķīstošo vielu noņemšanu, produkta izolēšanu, attīrīšanu un iekoncentrēšanu. Fotobioreaktos mikroaļģes parasti ievāc centrifugējot. Pēc tam tās apstrādā lipīdu ekstrahēšanai. Kā lipīdu tā arī PNTS frakciju iegūšanai bieži izmanto šķīdinātāja ekstrakcijas paņēmienus. PNTS iegūšanai neapstrādātu ekstraktu vai lipīdu frakciju attīra, izmantojot selektīvās metodes, piemēram, hromatogrāfiju, ķīmisko izgulsnēšanu u.c. Lipīdu frakcijas satura dažādības dēļ ļoti tīras PNTS frakcijas iegūšana prasa vairākas darbības. Uzlabotās PNTS atdalīšanas metodes ietver urīnvielas, fracionētās kristalizācijas, sāļu šķīdības metodes, gāzu vai plānslāņa hromatogrāfiju, šķidrums-šķidrums fracionēšanu. Lai gan šīs metodes fracionē taukskābes, pamatojoties uz dubultsaišu esamību vai ķēdes garumu, tikai dažas var nodrošināt ļoti tīru atsevišķu taukskābju iegūšanu. PNTS iegūšanai bieži izmanto urīnvielas kristalizācijas metodi, lai gan hromatogrāfiskas metodes nodrošina augstāku tīrību (Medina et al. 1998).

4.1. Lipīdu frakcijas iegūšanas metodes

Soksleta ekstrakcijas metode, kas tika ieviesta 1879. gadā, sākotnēji tika izmantota, lai izmērītu kopējo lipīdu saturu pienā, un vēlāk tika izmantota pārtikas, farmācijas un citās nozarēs. Šis paņēmiens ietver atkārtotu parauga pakļaušanu ekstrahējošajam šķīdinātājam. Neskatoties uz zemajām izmaksām un vienkāršību, tradicionālā Soksleta ekstrakcija ir laikietilpīga un prasa lielu daudzumu šķīdinātāju. Lai risinātu šīs problēmas, ir izstrādāti mūsdienīgi pielāgojumi, piemēram, augstspiediena, automātiska un ar mikroviļņu palīdzību nodrošināta Soksleta ekstrakcija (Zhou et al. 2022).

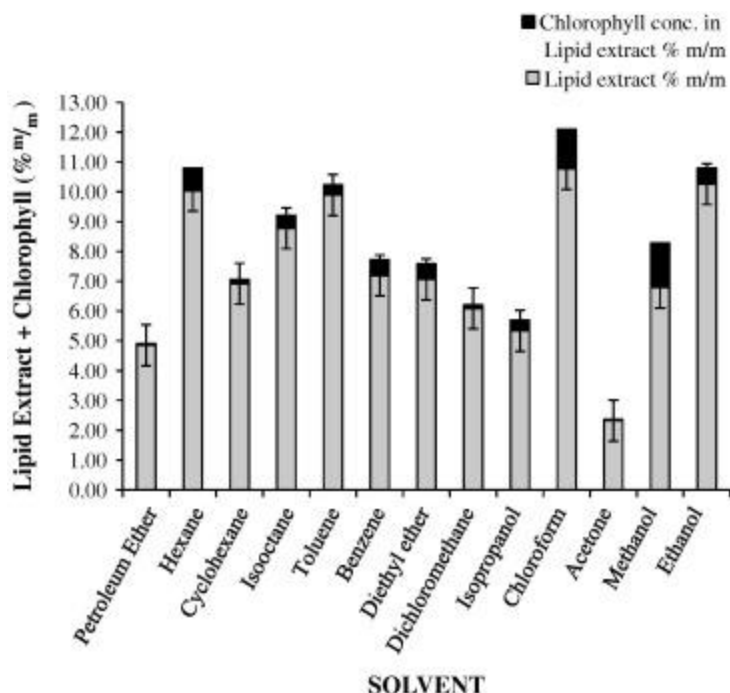
Viens no mikrobiāli iegūtu lipīdu piemēriem, izmantojot Soksleta ekstrakciju, ir pētījums, kuru veica Tulashie and Salifu (2020). Saulē žāvētās aļģes tika samaltas smalkā pulverī un ievietotas papīra traukā. Pēc tam šis kontainers tika novietots ekstrakcijas kamerā un pakļauts ekstrakcijai ar heksānu. Tika sagatavoti divi Soksleta ekstrakcijas iestatījumi: pirmajā iestatījumā izmantoja 150 ml heksāna ar 15 g sausu aļģu, bet otrajā izmantoja 300 ml heksāna ar 30 g neapstrādātu sausu aļģu biomasu. Ekstrakcija tika veikta 65°C, 3 stundas. Neapstrādāta eļļa tika iegūta, iztvaicējot heksānu no heksāna/eļļas maisījuma, izmantojot rotācijas iztvaicētāju (skat.

4.1.1. attēlu). No 15 g centrifugētu kultivētu aļģu tika iegūti 0,038 g eļļas, iegūstot 13,6 % masa/masa iznākumu. No 30 g neapstrādāta aļģu parauga tika iegūti 3,826 g eļļas, iegūstot 12,8 % iznākumu (Tulashie and Salifu 2020).



4.1.1. attēls. Soksleta ekstrakcijas shēma aļģu eļļas ekstrakcijas procesam (Tulashie and Salifu 2020).

Kādā citā pētījumā (Ramluckan et al. 2014) tika noskaidrota dažādu šķīdinātāju ietekme uz lipīdu frakcijas kvantitatīviem parametriem atkarībā no dažādiem organiskiem šķīdinātājiem un to maisījumiem. Ir liels organisko šķīdinātāju piedāvājums, tomēr spēcīgākie un biežāk izmantotie šķīdinātāji parasti ir cilvēkam un videi bīstamas vielas, piemēram, hloroforms, metanols, heksāns. Kā šķīdinātāji šīs vielas ir ar augstu efektivitāti un pašas par sevi nerada kaitējumu, ja no gala produkta tiek 100 % aizvadītas. Soksleta ekstrakcijas beigu posms ir šķīdinātāja destilācija, kur teorētiski gala produktam vajadzētu būt brīvam no izmantotā šķīdinātāja. Tomēr šādas atziņas garantēšana var būt dārga, jo nepieciešamas specifiskas šo šķīdinātāju detekcijas metodes ar ļoti zemām koncentrācijām. Lai gan bīstamu šķīdinātāju izmantošana eļļu frakcijas iegūšanā tiek plaši izmantota industriālā ražošanā (piemēram, augu eļļas ekstrahē ar heksānu un no tā pēc tam atbrīvojas rafinēšanas posmā), laboratoriskiem apstākļiem piemērotākas lipīdu iegūšanas tehnikas ir ar mazāk kaitīgiem šķīdinātājiem, piemēram, etanolu (Ramluckan et al. 2014).



4.1.2. attēls. Lipīdu un hlorofila daudzumi, kas ekstrahēti ar Soksleta metodi, izmantojot trīspadsmiit šķīdinātājus (Ramluckan et al. 2014).

Ramluckan et al. (2014) pētījuma rezultāti (skat. 4.1.2. attēlu) parāda, ka etanola izmantošana lipīdu ekstrakcijai ar Soksleta iekārtu ir tik pat efektīva kā tradicionālo šķīdinātāju (heksāna, hloroforma, metanola) ekstrakcija, sasniedzot aptuveni 10 % lipīdu no mikroaļģu sausās biomasas. Pētījums parādīja, ka lipīdu frakcijā nokļūst arī dažādi pigmenti un iespējami citi dabiski, labvēlīgi mikroaļģu savienojumi kā, piemēram, fenoli. Rezultāti uzrādīja, ka līdz 10 % lipīdu frakcijas masas veido hlorofils (Ramluckan et al. 2014).

Folha metode lipīdu frakcijas iegūšanai tika ieviesta 1957. gadā, izmantojot hloroforma un metanola maisījumu (2:1 v/v), lai ekstrahētu lipīdus no dzīvnieku taukiem. Šajā metodē lipīdu ekstrahēšanai vispirms izmanto hloroforma un metanola maisījumu, pēc tam pievieno ūdeni (vāju KCl šķīdumu), lai panāktu fāzes atdalīšanu, un ekstrahētos lipīdus varētu iegūt ar šķīdinātāja iztvaicēšanu. Metodei ekstrakcijas procesā nav nepieciešama augsta temperatūra vai augsts spiediens, un tā ir viena no uzticamākajām lipīdu ekstrakcijas metodēm (Zhou et al. 2022).

Pievienojot pietiekami daudz ūdens, veidojas divfāzu sistēma, liekot olbaltumvielām, ogļhidrātiem un fosfolipīdiem savienoties ar ūdeni un metanolu augšējā slānī, savukārt, lielākā daļa lipīdu pārvietojas hidrofoajā hloroforma, apakšējā slānī (skat. 4.1.3. attēlu). Šie slāņi savstarpēji nemaisās. Šīs gravimetriskās metodes parasti izmanto lipīdu noteikšanai dažādās laboratorijās, iztvaicējot šķīdinātājus un atstājot lipīdus. Tomēr hloroforma izmantošana rada ievērojamus drošības riskus tā kancerogēno īpašību dēļ, padarot metodi nepiemērotu liela mēroga pielietojumam (Breil et. al. 2017).

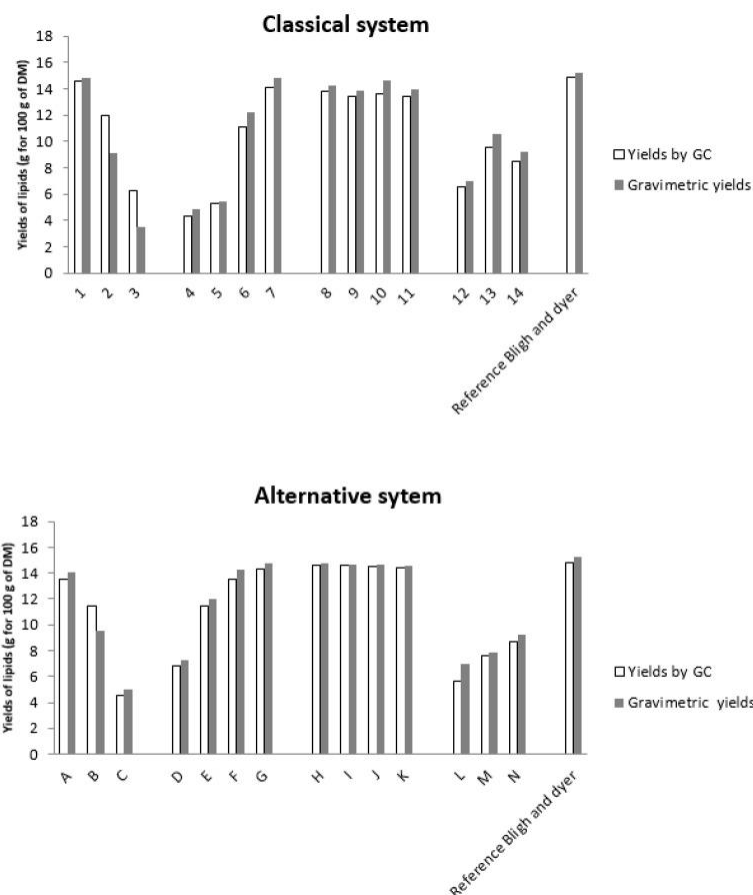


4.1.3. attēls. Folha (arī Bligh-Dyer) metodes šķīdinātāju slāņi un tajos izšķīdušie savienojumi (Breil et. al. 2017).

Bligh-Dyer ekstrakcijas metode ir divfāzu šķīdinātāja ekstrakcijas metode, kas līdzīga Folha metodei, izmantojot hloroformu, metanolu un ūdeni. Tā efektīvi atdala lipīdus hloroforma fāzē, vienlaikus izgulsnējot olbaltumvielas. Hloroforms ir plaši izmantots mikroaļģu lipīdu ekstrahēšanai un ir uzrādījis lielāku lipīdu ekstrakcijas iznākumu salīdzinājumā ar heksānu. Pētījumos tas ir salīdzināts arī ar Soksletu un jaunākām metodēm, piemēram, vienlaicīgu destilācijas un ekstrakcijas procesu. *Bligh-Dyer* bieži sniedz līdzīgus vai augstākus rezultātus. Neskatoties uz efektivitāti, *Bligh-Dyer* metodē izmanto toksiskus šķīdinātājus, radot videi kaitīgus atkritumus. Lai samazinātu piesārņojumu, tiek pētītas zaļākas alternatīvas, piemēram, ciklopentilmetilēteris un 2-metiltetrahidrofurāns ilgtspējīgākam lipīdu ekstrakcijas procesam (Zhou et. al. 2022).

Mūsdienās bīstamu un toksisku šķīdinātāju, piemēram, hloroforma un metanola izmantošana laboratorijās un rūpniecībā tiek uzskatīta par ļoti nopietnu problēmu darbinieku veselībai, drošībai un vides problēmām. Ekstrakcijas gadījumā hlorēti šķīdinātāji un metanols ir divi tipiski šādu problemātisku šķīdinātāju piemēri. Pēc būtības *Bligh-Dyer* neatšķiras no Folha metodes principiem. Vienīgās atšķirības ir citādas šķīdinātāju koncentrācijas. Tāpēc šīs metodes attiecībā

uz rezultātiem var aplūkot kopā. Kādā pētījumā (Breil et. al. 2017) tika pētīta lipīdu ekstrakcijas efektivitāte no mikroorganismu raugu šūnām (skat. 4.1.4. attēlu) un tika piedāvāta alternatīvo šķīdinātāju sistēma “zaļākai” lipīdu frakcijas iegūšanai.

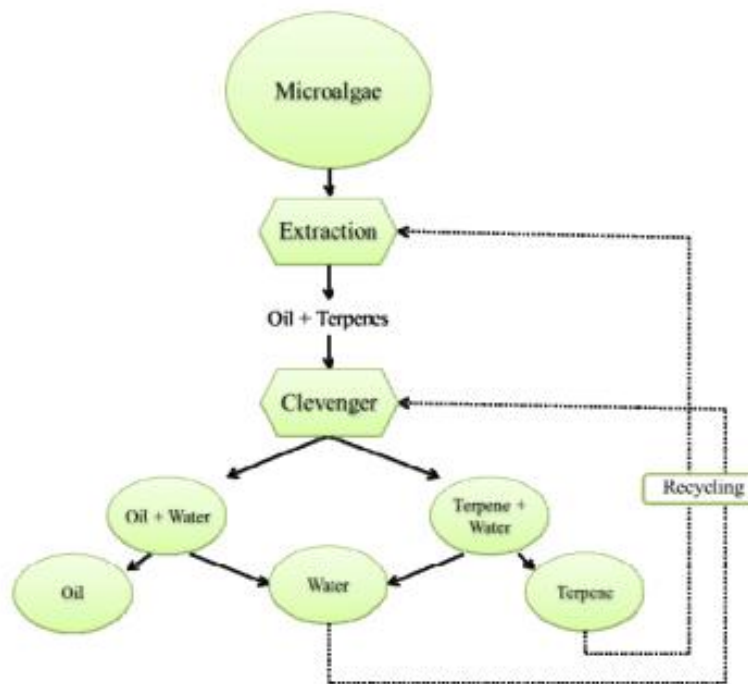


4.1.4. attēls. Ekstrakcijas iznākumi (g uz 100 g sausnas (DM)): dažādu ekstrakcijas rezultāti, kas iegūti ar hloraforma–metanola–ūdens sistēmu un ar etilacetāta–etanola–ūdens sistēmu, kas iegūti ar gravimetrisko metodi un gāzu hromatogrāfiju, salīdzinot ar *Bligh and Dyer* atsauces metode (1959) (Breil et al. 2017).

Klasiskās sistēmas gadījumā tika izmantots metanols, hloraforms un ūdens, bet alternatīvās – dažādi mazāk kaitīgi šķīdinātāji kā etilacetāta, ūdens un etanola maisījumu dažādos eksperimentālos iestatījumos. Rezultāti uzrādīja, ka gan klasiskā, gan alternatīvā sistēma dod vienlīdz augstus rezultātus. Var secināt, ka gan *Bligh-Dyer* oriģinālā, gan citu šķīdinātāju metodes ir izmantojamas lipīdu frakcijas iegūšanai.

Lipīdu ekstrakcija no mikroaļģu biomasas, izmantojot **terpēnus kā šķīdinātājus**, ir salīdzinoši jauna pieeja, kas ietilpst zaļo un ilgtspējīgu ekstrakcijas metožu kategorijā. Terpēni ir dabā sastopami savienojumi, kas atrodami dažādos augos, tostarp dažās mikroaļģēs, un tie ir ieguvuši uzmanību kā alternatīvi šķīdinātāji, ņemot vērā to zemo toksicitāti, atjaunojamus avotus un potenciālu uzlabot ekstrakcijas efektivitāti. Daži terpēni, piemēram, limonēns, α -pinīns un β -pinīns, ir pētīti attiecībā uz to spēju izšķīdināt lipīdus no mikroaļģēm - pēc principa *līdzīgs šķīst līdzīgā*. Šie terpēni parasti tiek uzskatīti par drošiem patēriņam, un tiem piemīt labas šķīdinātāju īpašības. Mikroaļģu biomasu žāvē, lai pirms ekstrakcijas noņemtu lieko ūdens saturu. Pēc tam žāvēto biomasu sajauc ar izvēlēto terpēnu vai terpēnu maisījumu. Maisījumu pakļauj ekstrakcijas apstākļiem, kas var ietvert temperatūru, spiedienu un maisīšanas apstākļu optimizāciju, lai panāktu lielāko efektivitāti. Ekstrahētos lipīdus, var attīrīt un koncentrēt, lai noņemtu piemaisījumus un iegūtu augstas tīrības pakāpes PNTS ekstraktu, kas piemērots lietošanai pārtikā. Šīs darbības var ietvert filtrēšanu, hromatogrāfiju vai molekulāro destilāciju (Dejoye et al. 2012).

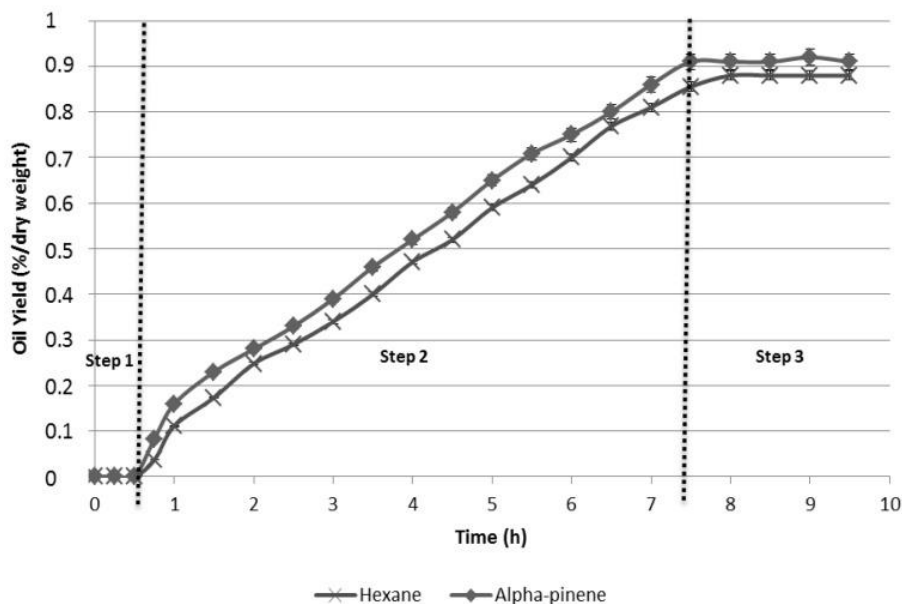
Trīs terpēnu (d-limonēna, α -pinēna un p-cimēna) lipīdu šķīdinošās īpašības, salīdzinājumā ar n-heksānu kā šķīdinātāju, pētīja Dejoye et al. (2012) (skat. 4.1.5. attēlu). Izvēlētais lipīdu avots bija plaši pielietotā mikroaļģe *Chlorella vulgaris*. Šiem terpēniem ir līdzīga molekulmasa un struktūra, kas padara tos par piemērotiem n-heksāna aizstājējiem. Šķīdinātāju šķīdības parametri, ko apraksta *Hansen* šķīdības parametri (HSP), iedala šķīdinātājus kategorijās, pamatojoties uz nepolāriem, polāriem un ūdeņraža saites raksturlielumiem. HSP darbojas pēc principa *līdzīgs izšķīdina līdzīgu*, norādot, ka šķīdinātāji ar līdzīgām HSP vērtībām efektīvi izšķīdinās līdzīgas vielas. Trīs HSP parametri ir δd (dispersijas saišu enerģija), δp (dipolārā starpmolekulārā spēka enerģija) un δh (ūdeņraža saišu enerģija). Terpēniem un n-heksānam ir līdzīgas HSP vērtības, kas liecina, ka to īpašības arī ir līdzīgas, šķīdinot eļļas. Tomēr terpēniem ir nedaudz augstākas dielektriskās konstantes, kas norāda uz lielāku polaritāti un disociācijas jaudu nekā n-heksānam. Attiecībā uz drošību - terpēniem ir augstāki uzliesmošanas punkti un tie nav ātri izgarojoši, līdz ar to ir mazāk bīstami nekā n-heksāns. Galvenais terpēnu izmantošanas trūkums ir to augstā viskozitāte un blīvums, kas izraisa lielāku enerģijas patēriņu, šķīdinātāja reģenerācijas laikā tos iztvaicējot. Tas ir saistīts ar to augstāku viršanas temperatūru (155 °C un 176 °C) un augstāku iztvaikošanas entalpiju (37–39 kJ/mol), salīdzinot ar n-heksānu (viršanas temperatūra 69 °C, iztvaikošanas entalpija 29,74 kJ/mol) (Dejoye et al. 2012).



4.1.5. attēls. Terpēnu kā lipīdu šķīdinātāju izmantošanas shēma (Dejoye et al. 2012).

Šī pētījuma rezultāti (skat. 4.1.6. attēlu) uzrādīja, ka alternatīvajam terpēnu šķīdinātājam nav būtiski zemāks lipīdu ekstrakcijas rezultāts kā heksānam, norādot uz to augsto potenciālu lipīdu ekstrakcijai no mikroaļģēm. Arī d-limonēnam un p-cimēnam izdevās sasniegt vienlīdz augstus lipīdu šķīdinātāju rezultātus. Tomēr salīdzinājumā ar *Bligh-Dyer* metodi (skat. 4.1.7. attēlu) tika noskaidrots, ka gan heksānam, gan terpēniem bija divas līdz piecas reizes mazāks lipīdu rezultāts kā tradicionālajai metanola/ūdens/hloroforma fāzei, kas liecina par mazāku efektivitāti ar iepriekš aprakstītajām divslāņu fāzes atdalīšanas metodēm.

Eksperimenti ar dažādiem šķīdinātājiem tika veikti Soksleta iekārtā, pēc tam šķīdinātāji tika atgūti ar destilēšanu, atstājot masu, ko konkrētais šķīdinātājs bija izvilcis no *C. vulgaris* sausām šūnām. Eļļa tika iegūta no mikroaļģēm, izmantojot Soksleta ekstrakciju. Sausās mikroaļģes (10 g)



4.1.6. attēls. Ekstrakcijas kinētikas salīdzinājums klasiskajam lipīdu šķīdinātājam heksānam un alternatīvajam – alfa-pinēnam (Dejoye et al. 2012).

Fatty Acids	Extracted amounts of fatty acids (%)				
	Bligh and Dyer	<i>n</i> -hexane	<i>d</i> -limonene	α -pinene	ρ -cymene
C14	1.29 $\pm$ 0.04	1.83 $\pm$ 0.11	0.98 $\pm$ 0.31	1.38 $\pm$ 0.06	1.43 $\pm$ 0.08
C16:0	26.63 $\pm$ 0.23	25.99 $\pm$ 0.52	27.62 $\pm$ 0.97	27.53 $\pm$ 0.32	28.91 $\pm$ 1.10
C16:1	4.93 $\pm$ 0.32	2.03 $\pm$ 0.09	4.95 $\pm$ 0.66	3.02 $\pm$ 0.21	4.47 $\pm$ 0.06
C16:2	1.37 $\pm$ 0.10	0.70 $\pm$ 0.03	2.83 $\pm$ 0.30	1.49 $\pm$ 0.17	0.92 $\pm$ 0.13
C16:3	3.27 $\pm$ 0.18	1.65 $\pm$ 0.48	2.35 $\pm$ 1.67	1.26 $\pm$ 0.18	1.39 $\pm$ 0.13
C16:4	9.89 $\pm$ 0.14	4.95 $\pm$ 1.78	6.64 $\pm$ 1.44	5.08 $\pm$ 0.16	3.36 $\pm$ 0.13
C18:0	1.67 $\pm$ 0.31	4.44 $\pm$ 0.08	6.37 $\pm$ 1.00	4.58 $\pm$ 0.11	3.92 $\pm$ 0.21
C18:1	17.79 $\pm$ 0.20	35.91 $\pm$ 0.07	23.97 $\pm$ 0.50	33.04 $\pm$ 0.10	36.70 $\pm$ 0.59
C18:2	6.99 $\pm$ 0.36	7.32 $\pm$ 0.24	5.87 $\pm$ 0.61	7.37 $\pm$ 0.31	5.49 $\pm$ 0.35
C18:3	23.48 $\pm$ 0.09	12.67 $\pm$ 0.10	14.55 $\pm$ 0.20	13.54 $\pm$ 0.07	12.33 $\pm$ 0.24
C18:4	2.50 $\pm$ 0.10	2.13 $\pm$ 0.09	3.64 $\pm$ 0.29	1.36 $\pm$ 0.08	0.66 $\pm$ 0.10
C20:0	0.20 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.09	0.35 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.06
Σ SFAs					
Σ MUFAs	29.7922.7247.49	32.6537.9429.41	35.228.935.9	33.8336.0630.11	34.6841.1724.15
Σ PUFAs					
Oil Yield [%]	3.36 $\pm$ 0.02	0.88 $\pm$ 0.01	1.29 $\pm$ 0.01	0.91 $\pm$ 0.05	1.52 $\pm$ 0.03

4.1.7. attēls. No *C. vulgaris* ekstrahēto lipīdu taukskābju sastāvs (Dejoye et al. 2012).

nosvēra 30 mm $\times$ 80 mm celulozes uzpirkstenī un ievietoja Soksleta aparātā. Ekstrakciju veica 8 stundas, izmantojot 300 ml četrus dažādu šķīdinātājus: d-limonēnu, α -pinēnu, para-cimēnu un n-heksānu. Heksāna gadījumā šķīdinātājs tika noņemts un tika noteikts aļģu eļļas svars. Terpēna

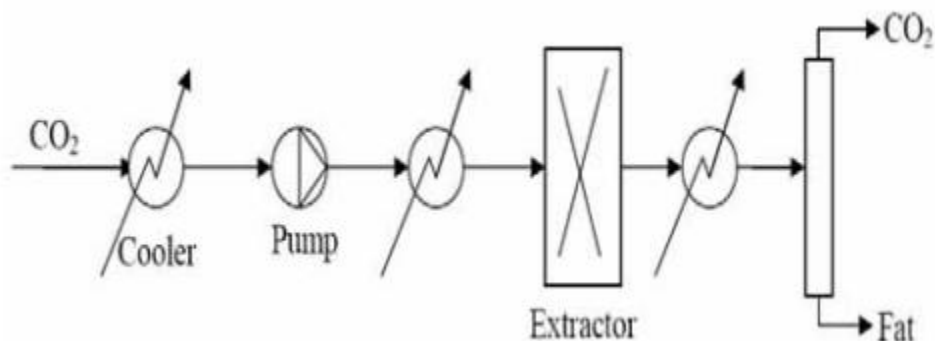
šķīdinātāja noņemšana tika veikta ar *Clevenger* destilāciju. Lai to izdarītu, Soksleta aparāts tika nomainīts uz *Clevenger* stikla traukiem un destilācijas kolbām, bet pirms tam maisījumam, kas sastāv no ekstrahētās eļļas un terpēna šķīdinātāja, tika pievienots destilēts ūdens. Binārā ūdens-terpēna maisījuma azeotropās destilācijas laikā no destilācijas kolbas tika izvadīts terpēna šķīdinātājs. Gan izmantotais terpēna šķīdinātājs, gan ekstrahētā eļļa tika iegūti atsevišķi, atdalot fāzes. Terpēna šķīdinātājs tika reģenerēts no ūdens slāņa, atdalot fāzes stikla trauku dalāmajā piltuvē, un ekstrahētā eļļa tika iegūta no ūdens slāņa, atdalot fāzes destilācijas kolbā.

Superkritiskā šķidrums ekstrakcija ir ļoti efektīva metode lipīdu ekstrakcijai, izmantojot šķidrumus kritiskā stāvoklī, kad to temperatūra un spiediens pārsniedz kritisko punktu. Šie superkritiskie šķidrumi apvieno gāzei līdzīgas transportēšanas īpašības ar šķidrumiem līdzīgu šķīdību, padarot tos ideāli piemērotus savienojumu efektīvai ekstrakcijai. Superkritiskais CO₂ (SC-CO₂) ir biežāk izmantotais superkritiskais šķidrums, pateicoties tā zemajām izmaksām, netoksicitātei un viegliem kritiskajiem apstākļiem, kas novērš siltumjutīgu savienojumu noārdīšanos. SC-CO₂ ir arī izdevīgs, jo tas viegli atdalās no ekstraktiem, tādējādi novēršot vajadzību pēc papildu šķīdinātāja noņemšanas darbībām. Mikroaļģu biomasa tiek pakļauta SC-CO₂ iedarbībai augstā spiedienā un temperatūrā. SC-CO₂ iekļūst biomasā, izšķīdinot lipīdus, kas pēc tam tiek izvadīti no ekstrakcijas kameras. Samazinot spiedienu, CO₂ atgriežas gāzveida stāvoklī, atstājot ekstrahētos lipīdus. SC-CO₂ ir īpaši efektīva neitrālu lipīdu ekstrakcijai. Lai uzlabotu polāro lipīdu ekstrakciju, var izmantot līdzšķīdinātājus, piemēram, etanolu, uzlabojot šķīdību un ekstrakcijas efektivitāti. Šī metode ir parādījusi augstus mikroaļģu ekstrakcijas ātrumus ar optimāliem apstākļiem, kas nodrošina ievērojami augstāku lipīdu saturu un labākus uztura profilus salīdzinājumā ar tradicionālajām metodēm. Neskatoties uz to efektivitāti, aprīkojuma augstās izmaksas ierobežo to plaša mēroga pielietojumu (Zhou et al. 2022; Santana et al. 2012; Yaakob et al. 2021).

Optimālie darbības apstākļi parasti ir diapazonā no 220 līdz 250 bar spiedienam un 50 °C temperatūrai. Pētījumi ar tādām mikroaļģu sugām kā *Nannochloropsis salina*, *Scenedesmus obliquus* un *Scenedesmus obtusiusculus* ir pierādījuši, ka šie apstākļi ir efektīvi lipīdu ekstrakcijai biodīzeļdegvielas ražošanai (Yaakob et al. 2021).

Kādā pētījumā (Santana et al. 2012), SC-CO₂ tika skatīta metodes efektivitāte lipīdu ekstrakcijai no mikroaļģes *Botryococcus braunii* (skat. 4.1.8. attēlu). Šķīdinātājs (CO₂) no cilindra tiek piegādāts pa cauruli uz kondensatoru. Šķidrās CO₂ sasniedz augstspiediena sūkni ar ieplūdes

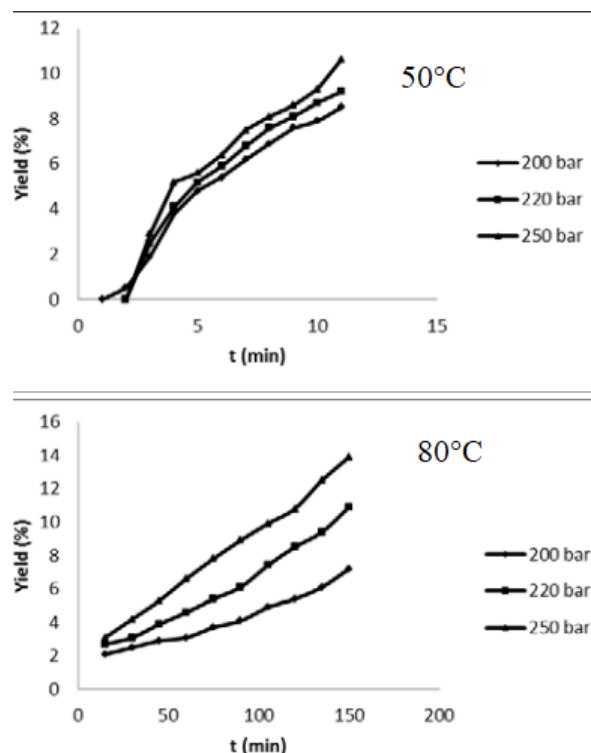
nominālo jaudu līdz 200 bar. Saspiests šķidrums tiek ievadīts sildītājā pirms ievadīšanas ekstrakcijas traukā. Ierīce satur 450 ml ekstrakcijas konteineru, kas noslēgts ar nerūsējošo tērauda porainiem diskus. Nosūcēju silda sildīšanas apvalks, kas ieskauj trauka ārējo virsmu. Ekstrakcijas spiedienu kontrolēja ar pretspiediena regulatora vārstu, kur notika CO₂ plūsma. Izvilkās vielas tika nogulsnētas un savāktas stikla slazdā, kas bija iegremdēts ledus vannā. Lai nodrošinātu kopējo savienojumu atgūšanu, gāzes plūsma, kas iziet no pirmā slazda, iet caur otru stikla slazdu (skat. 9. attēlu) (Santana et al. 2012).



4.1.8. attēls. Mikroaļģu superkritiskā šķidrums ekstrakcijas metodes shēma (Santana et al. 2012)

Rezultāti (skat. 4.1.9. attēlu) liecināja, ka pie zemākas temperatūras (50 °C) visos eksperimenta gadījumos jau pēc 10 min tika sasniegta ievērojama lipīdu koncentrācija attiecībā pret mikroaļģu biomasu (ap 10 %). Savukārt pie lielākas temperatūras (80 °C) paaugstinājās taukskābju saturs lipīdos, tomēr ekstrakcija prasīja krietni ilgāku laiku (līdz 3h) (Santana et al. 2012).

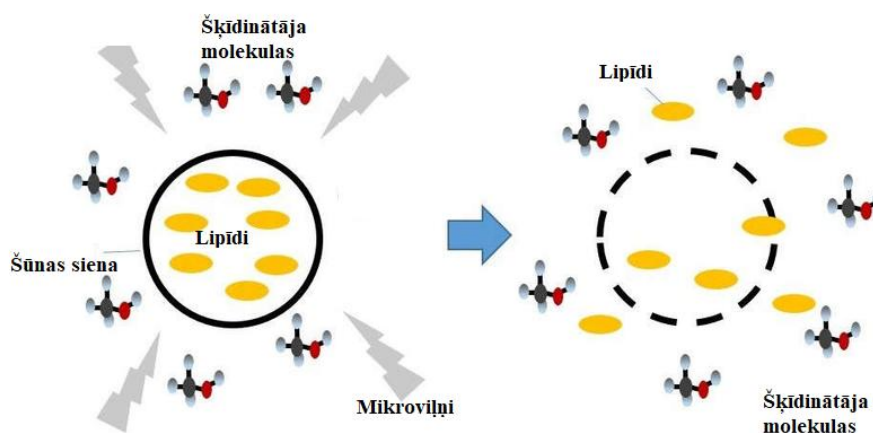
SC-CO₂ metode ir izrādījusies tehniski un ekonomiski iespējama, un tai ir vairākas priekšrocības, salīdzinot ar tradicionālajām ekstrakcijas metodēm. Kopējais investīciju kapitāls ir izmaksas, kas saistītas ar rūpnīcas būvniecību, un tās ir sadalīts tiešajās un netiešajās izmaksās. Tiešajās izmaksās ietilpst visi izdevumi, kas saistīti ar iekārtas uzstādīšanu, piemēram: aprīkojums, uzstādīšana, instrumenti un kontrole, elektriskās sistēmas, cauruļvadi, ēka un zeme. Netiešās izmaksas ietver izmaksas, kas saistītas ar iekārtas uzstādīšanu, piemēram, inženieriju un uzraudzību, juridiskās maksas, būvniecība, darbinieku algas, palīdzība darbības uzsākšanas laikā un neparedzētie izdevumi. SC-CO₂ ir ļoti efektīva mikrobiāli lipīdu iegūšanai, tomēr nepieciešamas lielas investīcijas tā darbībai (Mubarak 2024).



4.1.9. attēls. Divas ekstrakcijas ar *Botryococcus braunii*. Lipīdi iznākums no sausas biomasas atkarībā no pieliktā spiediena un temperatūras (Santana et al. 2012)

Mikroviļņu un ultraskaņas asistētās ekstrakcijas metodes iekļauj dažādus tradicionālus šķīdinātājus ar papildu fizikālo viļņu ietekmi uz šūnu sagraušanu un lielāku lipīdu izdalīšanos. Lipīdi ir ieslēgti iekšpus mikroaļģu šūnām. Šo šūnu apvalki ir salīdzinoši izturīgi un grūti degradējami. Iepriekš aprakstītajās metodēs, kur izmanto spēcīgus, šūnu degradējošus šķīdinātājus kā hloroformu, šūnapvalki pilnībā vai daļēji tiek sagrauti, atbrīvojot lipīdus, kur tie tālāk šķīst izvēlētajā šķīdinātājā. Jāņem vērā, ka izvēloties mazāk kaitīgus vai videi draudzīgus šķīdinātājus, to spēja sagraut šūnapvalkus ir mazāka, potenciāli samazinot lipīdu ekstrahēšanas spējas tāpēc, ka daļa lipīdu ir palikuši ieslēgti mikroaļģu šūnās. Šādu problēmu var risināt ar dažādām šūnu pirmsapstrādes metodēm, tomēr lielākā daļā gadījumu, kad izvēlas spēcīgus organiskos šķīdinātājus, netiek veikta šūnu masas pirmsapstrāde. Viena no šūnu sagraušanas metodēm, kas noris vienlaikus ar lipīdu šķīšanu šķīdinātājā, ir mikroviļņu vai ultraskaņas fizikālā iedarbība uz šūnām.

Mikroviļņi izraisa polāru šķīdinātāju ātru sakaršanu un vārīšanos. Mikroaļģu šūnu sastāvā šāda polāra viela ir ūdens, kas mikroviļņu iedarbībā sāk vārīties, tādējādi izteikti palielinot spiedienu šūnas iekšpusē, kā rezultātā tā pārplīst, atbrīvojot visus ieslēgtos savienojumus, tai skaitā lipīdus (skat. 4.1.10. attēlu). Arī šūnu pakļaušana ultraskaņai ar ultrasonicēšanu noved pie līdzīga rezultāta. Procesu ir iespējams apvienot ar lipīdu šķīšanu organiskajā šķīdinātājā. Piemēram, iesver 1 g izzāvētas mikroaļģu biomasas, pievieno 1 ml ūdens, 1.5 ml hloroforma/etanola maisījumu (2:1 v/v), pakļauj šūnu šķīdumu pēc iespējas lielākas jaudas mikroviļņiem 1 min, savāc organisko hloroforma slāni, atdala šķīdinātāju no lipīdiem. Procesu var atkārtot vairākas reizes ar jau izmantoto biomasu pēc iespējas lielāka daudzuma lipīdu ekstrakcijai. Līdzīgi kā iepriekšējās metodēs, šķīdinātāju ir iespējams atgūt un izmantot atkārtoti.



4.1.10. attēls. Mikroviļņu ietekmē tiek sagrautas šūnu sienas un intracelulārais sastāvs izšķīst šķīdinātājā (Fazril et al. 2022)

Kādā pētījumā (de Moura et al. 2018) tika skatīta mikroviļņu un ultraskaņas metodika attiecībā uz lipīdu frakcijas iegūšanu. Sausa biomasa tika samalta smalkā pulverī. 1,5 g biomasas tika sajaukti ar destilētu ūdeni (50 % m/w attiecībā pret biomasu) tad ar 4,5 ml hloroforma/metanola (2:1) un maisījums tika 20 min ievietots ultraskaņas vannā istabas temperatūrā. Šķīdinātāja fāze tika atgūta, centrifugējot 5 minūtes ar 2000 apgr./min. Tas pats process tika izmantots trīs reizes. Viss šķīdinātājs tika iztvaicēts un žāvēts vakuumā līdz nemainīgam svaram, atstājot lipīdu frakciju.

Lai izpētītu mikroviļņu ietekmi, 0,5 g žāvētas biomasas sajauc ar ūdeni (50 % w/w attiecībā pret biomasu), 35 ml stikla flakoniem pievienoja 1,5 ml hloroforma/metanola maisījuma

(2:1 v/v) katrai ekstrakcijai. Stikla flakons ar šķīdinātajiem un biomasu tika apstarots ar maksimālās jaudas mikroviļņiem noteiktā laikā. Tas pats process (šķīdinātāja pievienošana un apstarošana) tika atkārtots trīs reizes, un šķīdinātājs tika iztvaicēts pazeminātā spiedienā līdz nemainīgam svaram, atstājot lipīdu frakciju (de Moura et al. 2018).

Rezultāti (skat. 4.1.11. attēlu) liecināja, ka visos uzstādījumu gadījumos tika sasniegts aptuveni 30 % lipīdu iznākums no biomasas. Jāņem vērā, ka lipīdu iznākums ir tiešā proporcionalitātē ar lipīdu saturu konkrētās mikroaļģes šūnās. Šajā pētījumā netika salīdzināta iegūtā lipīdu masa attiecībā pret teorētisko, kas ir būtisks rādītājs metodes efektivitātes novērtēšanai. Pētījumā arī netika noteikts, kādu daļu no iegūtās lipīdu frakcijas veidoja lipīdi un kādu – biomasas un citu mikroaļģu dabīgie piemaisījumi. Kopumā šī ir viena no vieglākajām lipīdu ekstrakcijas metodēm, kas neprasa daudz laika un resursu izmantošanu. Tomēr nepieciešams izvērtēt, vai ir nepieciešama papildus frakcijas attīrīšana ar tradicionālajām metodēm. Kā arī izvērtēt metodoloģiskus pielāgojumus, lai pēc iespējas izvairītos no biomasas piemaisījumiem lipīdos (de Moura et al. 2018).

Weight [g]	Extraction method	Yield [%]	Average ^a
0.5	Microwave (1 min, 80 °C)	30.31	31.72 ± 3.3 ^a
0.5		29.39	
0.5		35.47	
1.5	Microwave (1 min, 80 °C)	36.26	33.6 ± 2.6 ^a
1.5		33.47	
1.5		31.07	
1.5	Ultrasonic (20 min, 25 °C)	27.61	28.51 ± 0.8 ^b
1.5		29.12	
1.5		28.81	

4.1.11. attēls. Mikroviļņu un ultraskaņas lipīdu ekstrakcija no mikroaļģes *N. Oculata* atkarībā no biomasas un fizikāliem apstākļiem (de Moura et al. 2018).

Bez apskatītajām lipīdu frakcijas iegūšanas metodēm pastāv arī dažādas citas (skat. 4.1.1. tabulu). Izvēloties piemērotāko metodi, nepieciešams izvērtēt vairākus ietekmējošos faktorus – metodes sarežģītību un pieprasījumu pēc iekārtām, laika patēriņu, metodes drošumu attiecībā pret cilvēku un vidi un iegūtā produkta kvalitāti.

4.1.1.tabula.

Dažādas lipīdu ekstrakcijas metodes no mikroaļģu biomasas, to priekšrocības un trūkumi (Yaakob et al. 2021).

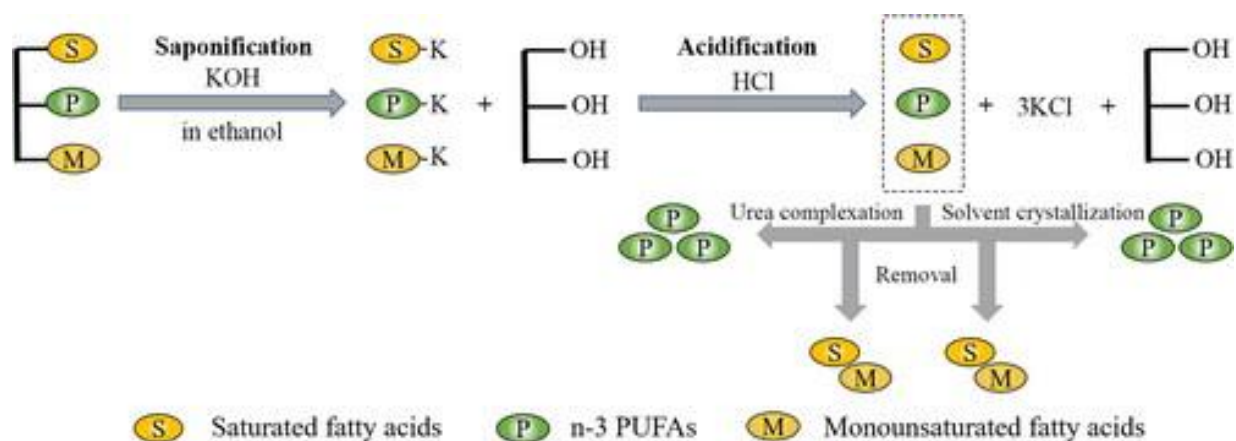
Metode	Darbības mehānisms	Priekšrocības	Trūkumi
Spiedējprese	Ar augstu spiedienu šūnas tiek pārplēstas, izspiežot eļļu	Viegla, efektīva metode	Laikietilpīgi, liels spiediens samazina lipīdu izgūšanu
Ultrakšaņas/ mikroviļņu asistētā	Fizikāli viļņi pārplēš šūnas, atbrīvojot lipīdus šķīdinātājā	Lēti, ātri	Produktam var būt lieli biomasas piemaisījumi, nepieciešams optimizēt
SC-CO ₂	Izmanto augstu spiedienu un CO ₂ īpašības lipīdu ekstrakcijai	Ļoti ātri, efektīvi	Nepieciešamas lielas finansiālas investīcijas
<i>Folha/ Blight-Dyer</i>	Šķīdinātāji sagrauj šūnu sienas un tajos izšķīst lipīdi	Salīdzinoši ātri, precīzi	Kaitīgi, bīstami šķīdinātāji
Soksleta ekstrakcija	Šķīdinātājs cirkulē cauri biomasai un tajā izšķīst lipīdi	Iespējams izmantot mazāk kaitīgus šķīdinātājus, to maisījumus, procesu iespējams optimizēt. Pastāv vairāki mūsdienu pielāgojumi, kas dod ātrāku rezultātu	Laikietilpīgi, nepieciešama izpēte, ja vēlas izmantot nekaitīgus šķīdinātājus

Spiediena ietekmes šķīdinātāju ekstrakcija	Šķīdinātāji slāpekļis lipīdus	un izšķīdina	Augsta efektivitāti	Dārgi.	Veselības, ugunsdrošības, vides riski
--	-------------------------------------	-----------------	---------------------	--------	---

4.2. Polinepiesātināto taukskābju (PNTS) ekstrakcija un iekonzentrēšana

Efektīva lipīdu ekstrakcija no mikroaļģēm ir izšķirošs faktors, lai iegūtu augstāko lipīdu saturu un tai skaitā polinepiesātinātās taukskābes. Parasti lipīdu ekstrakcijai izmanto organiskos šķīdinātājus, kas nesajaucas ar ūdeni - heksāns ir populārākais liela mēroga ekstrakcijā. Lai atdalītu nepiesātinātās taukskābes no lipīdiem, bieži tiek izmantota frakcionētā destilācija jeb rafinēšana, savukārt, piesātinātos lipīdus izgulsnē, pazeminot temperatūru ar dažādiem ķīmiskiem savienojumiem. Daudzu mikroaļģu sugu biežās šūnu sienas kavē intracelulārā materiāla izdalīšanu, padarot ekstrakciju sarežģītu bez liela daudzuma šķīdinātāja. Galvenā prasība PNTS ir atdalīt tās bez piesārņotājiem (dažādiem kaitīgiem šķīdinātājiem, piesātinātām taukskābēm, citiem mikroaļģēs esošiem savienojumiem), iegūt to augstus ekstrakcijas iznākumus no mikroaļģēs teorētiski esošajām, izmantot videi draudzīgas un cilvēkam nekaitīgas metodes (Kumar et al. 2019).

Urīnvielas kristalizācija ir viena no vieglākajām metodēm PNTS iegūšanai un attīrīšanai. Urīnvielas kristalizācija ir daudzsološs paņēmiens PNTS ekstrahēšanai no mikroaļģēm. Šī metode ietver vairākus posmus - pārziepjošanu, brīvo taukskābju ekstrakciju ar heksānu, heksāna atgūšanu un urīnvielas kristalizāciju (skat. 4.2.1. attēlu). Procesa soļi veicina augstvērtīgu PNTS izolāciju (skat. 4.2.2. attēlu). Process sākas ar pārziepjošanu, kurā mikroaļģu lipīdus apstrādā ar sārma šķīdumu, parasti nātrija vai kālija hidroksīdu, lai triglicerīdus (visas PNTS ir triglicerīdu formā) hidrolizētu glicerīnā un brīvajās taukskābes (angl. *“free fatty acids”* FFA). Šis solis sadala sarežģītās lipīdu molekulas vienkāršākos komponentos, padarot FFA pieejamākus ekstrakcijai (Medina et al. 1995; Toumi et al. 2022).



4.2.1. attēls. Urīnvielas metodes molekulārā shēma (Xie et al. 2022).

Pēc tam FFA ekstrahē, izmantojot heksānu (nopolāru šķīdinātāju), kas selektīvi šķīdina lipofīlas vielas. Mikroaļģu biomasu sajauc ar heksānu un to maisa, lai nodrošinātu kontaktu starp šķīdinātāju un FFA. Pēc ekstrakcijas maisījumam ļauj nosēsties, atdalot heksāna slāni, kas satur izšķīdušās FFA, no ūdens slāņa. Pēc FFA ekstrakcijas tiek veikta heksāna destilācija, lai atgūtu šķīdinātāju atkārtotai izmantošanai. To parasti veic, iztvaicējot vai destilējot. Heksāns tiek iztvaicēts, atstājot ekstrahētās FFA. Atgūto heksānu var kondensēt un izmantot turpmākajos ekstrakcijas ciklos, padarot procesu ekonomiskāku un videi draudzīgāku. Pēdējais solis ir urīnvielas kristalizācija, ko izmanto, lai selektīvi atdalītu PNTS no piesātinātajām taukskābēm un mono- taukskābēm. Šajā posmā urīnvielu izšķīdina etanolā un sajauc ar ekstrahētajām FFA. Maisījumam atdziestot, urīnviela veido kompleksus ar savienojumiem, kuriem nav dubultsaišu (piesātinātajām un mono- taukskābēm), kas izkristalizējas no šķīduma. PNTS, kas neveido kompleksus ar urīnvielu, paliek šķīdā fāzē. Pēc tam urīnvielas kristālus izfiltrē vai centrifugē augstos apgriezienos un iegūst šķīdumu, kas satur attīrītās PNTS (Medina et al. 1995; Toumi et al. 2022; Xie et al. 2022).

Kad urīnviela kristalizējas no šķīduma, kas satur taukskābes ar dažādu nepiesātinājuma līmeni, piesātinātās un mono- taukskābes, kurām ir garas un taisnas ķēdes, vispirms tiek iekļautas kristālos, bet polinepiesātinātās taukskābes paliek šķīduma vidē un nekristalizējas. Līdz ar to urīnvielas metode, galvenokārt, atdala taukskābes, pamatojoties uz to nepiesātinājuma pakāpi. Divkārsšo saišu klātbūtne rada sterisku līdzsvaru izjaukšanu taukskābju ķēdē, izjaucot optimālos starpmolekulāros attālumus un samazinot to pievilksnās spēku. Tā rezultātā taukskābju un esteru tendence veidot kompleksus ar urīnvielu samazinās, palielinoties nepiesātinājumam un īsākiem ķēdes garumiem (Medina et al. 1998; Xie et al. 2022).

Kristalizācijai ar urīnvielu ir vairākas priekšrocības. Tā ir salīdzinoši vienkārša un ekonomiski izdevīga metode, ar kuru var sasniegt augstu PNTS tīrības līmeni. Turklāt tai nav nepieciešama augsta temperatūra vai spiediens, saglabājot siltumjutīgo PNTS struktūru. Tomēr metodei ir arī daži trūkumi. Tā var būt laikietilpīga, un urīnvielas kristālu atgūšana var būt sarežģīta, kas var izraisīt PNTS zudumus. Turklāt heksāna izmantošana rada bažas par vidi un darba drošību, tādēļ ir nepieciešamas pareizas apstrādes un metodes veikšanas procedūras, ievērojot darba drošību. Kopumā urīnvielas kristalizācija ir vērtīgs paņēmieni PNTS ekstrakcijai no mikroaļģēm, nodrošinot līdzsvaru starp efektivitāti, izmaksām un tīrību. Ar rūpīgu optimizāciju un drošības protokolu ievērošanu tā var būt efektīva metode augstas kvalitātes PNTS ražošanai

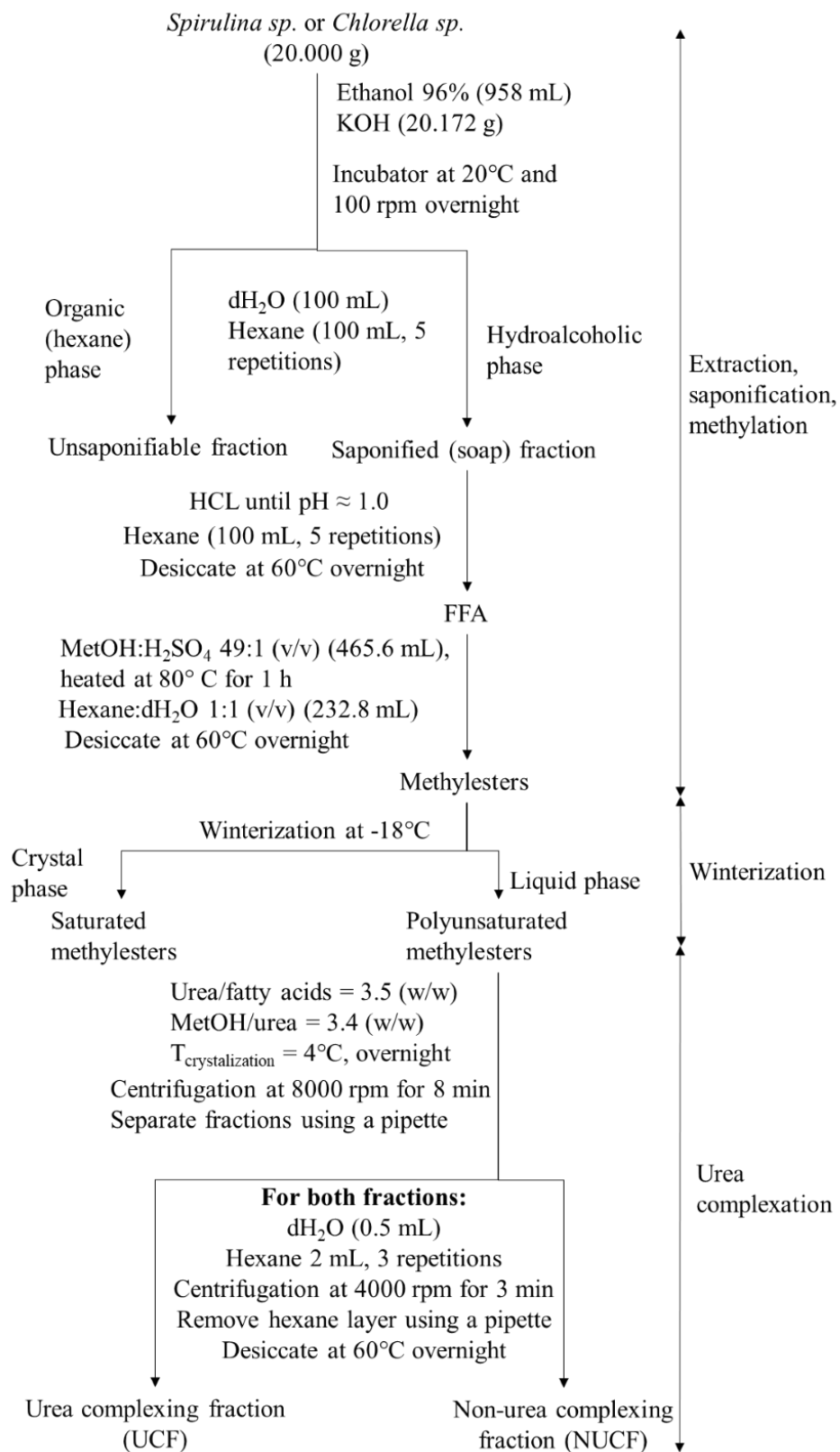
dažādiem lietojumiem. Vērts minēt, ka procesu ir iespējams automatizēt lielākā mērogā, veicot to slēgtā vidē bez kaitīgā šķīdinātāja iztvaikošanas un saglabājot iespēju tā atkārtotai izmantošanai (Medina et al. 1995; Toumi et al. 2022; Xie et al. 2022).

Kādā pētījumā (Toumi et al. 2022) n-3 polinepiesātinātās taukskābes (n-3 PNTS) no jūras mikroaļģēm *Isochrysis galbana* tika koncentrētas un attīrītas, izmantojot divpakāpju procesu: urīnvielas kristālu veidošanos, kam sekoja preperatīvā augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfija (HPLC).

Pētījumā ir piedāvāta metode aļģu eļļu iegūšanai no *Chlorella sorokiniana* ar atšķirīgām īpašībām, kuras varētu būt paredzētas dažādām nozarēm. Rezultāti liecina, ka iegūtā attīrītā PNTS frakcija saturēja 81 % PNTS ar DHA un EPA atgūšanas koncentrāciju no teorētiski iespējamās attiecīgi 59,09 % un 87,14 %. Šī frakcija varētu būt piemērota garās ķēdes omega-3 PNTS uztura bagātinātāju ražošanai. Otrā frakcija, kas saturēja citas lipīdu struktūras, tai skaitā piesātinātās taukskābes, sastāvēja no 19,09 % mononepiesātinātajām un 54,46 % piesātināto taukskābju, padarot to piemērotu gan cepamo eļļu, gan biodegvielu iegūšanai (Toumi et al. 2022).

Pēc PNTS frakcijas atkārtotas esterifikācijas ar glicerīnu, iegūtā eļļas koncentrāta fizikāli ķīmiskās īpašības bija Pasaules Veselības un Pārtikas organizācijas eļļu standartu un GOST 1129-2013 (regula par eļļu kvalitāti) ieteiktajās normās. Šis produkts varētu būt interesants ne tikai ar savu uzturvērtību, bet arī ar patērētāju pievilcību (Toumi et al. 2022).

Šajā rakstā piedāvātā biorafinēšanas koncepcija varētu ne tikai ļaut vienlaikus ražot pārtikas lipīdus un biodegvielu, bet arī apvienot ar citu vērtīgu savienojumu ekstrakcijas metodēm. Tas potenciāli varētu palielināt gūto peļņu, vienlaikus ievērojot aprites ekonomikas koncepcijas (Toumi et al. 2022).



4.2.2. attēls. Shēma DHA un EPA koncentrācijai un aļģu eļļas attīrīšanai (Toumi et al. 2022).

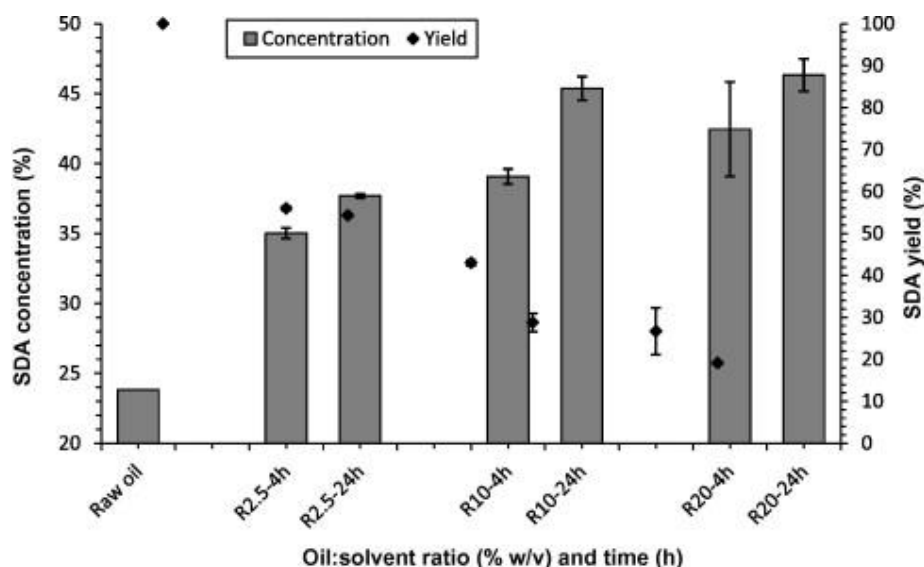
PNTS papildus iekonzertēšanai bieži izmanto **zemas temperatūras kristalizācijas jeb ziemošanas metodi**. Process balstās uz to, ka dažāda veida taukskābes sacietē dažādās temperatūrās. Ziemošanas laikā lipīdu ekstrakts tiek atdzesēts līdz temperatūrai, kurā piesātinātās un mono-nepiesātinātās taukskābes sāk sacietēt, bet PNTS paliek šķidrā fāzē. Šī selektīvā saldēšana ļauj atdalīt dažādu taukskābju veidus. Filtrējot sacietējušās frakcijas, tiek palielināta PNTS koncentrācija atlikušajā šķidrums daļā. Viena no galvenajām ziemošanas priekšrocībām ir tās vienkāršība. Tam nav nepieciešams sarežģīts aprīkojums vai ķīmiskas vielas, padarot to pieejamu maza mēroga sistēmām. Tomēr ziemošanai ir ierobežojumi – tā var nesasniegt augstu tīrības līmeni, jo dažas mazāk piesātinātās taukskābes var palikt koncentrētā šķidrā frakcijā. Turklāt process ir jutīgs pret temperatūru, un tam nepieciešama precīza kontrole, lai nodrošinātu optimālu atdalīšanu. Metodi ir nepieciešams pielāgot atsevišķi katrai mikroalģu sugai, iespējami var pētīt papildus šķīdinātāju klātbūtni saldēšanas procesā un temperatūras ietekmi uz gala produkta tīrību (Medina et al. 1998).

Taukskābju kušanas temperatūra ir atkarīga no to nepiesātinājuma pakāpes. Piemēram, EPA un DHA kūst pie -54 un -44,5 °C, salīdzinot ar citām taukskābēm, kurām kušanas temperatūra ir krietni augstāka. Kad piesātināto un nepiesātināto taukskābju maisījuma temperatūra pazeminās, piesātinātās taukskābes ar augstāku kušanas temperatūru sāk kristalizēties vispirms un šķidrā fāzē tiek bagātināta ar nepiesātinātajām taukskābēm.

Vienā piemērā (Vázquez et al. 2012), kur iekonzentrēt SDA (steridonskābe, kas ir omega-3 taukskābe) sojas eļļā, izmantoja acetona tilpumā 1:9 (acetons:eļļa) ar zemas temperatūras kristalizāciju. Tika sasniegts 45.2% SDA koncentrācijas rezultāts (skat. 4.2.3. attēlu), kas norāda, ka arī atsevišķas PNTS taukskābes ir iespējams iekonzentrēt, ja izvēlas atbilstošos šķīdinātājus un temperatūru (Vázquez et al. 2012).

Tauku šķīdība organiskajos šķīdinātājos samazinās, pazeminoties temperatūrai. Šī parādība ir īpaši pamanāma garu ķēžu taukskābēm ar augstu molekulmasu un augstu nepiesātinājuma pakāpi. Procesu var veikt bez šķīdinātāja vai izvēlēta šķīdinātāja/šķīdinātāja maisījumā. Parastie šķīdinātāji ir metanols un acetons. To un temperatūras izvēlei ir liela nozīme, lai sasniegtu labu PNTS koncentrācijas iznākumu. Attiecības parasti svārstās no 1:1 līdz 10:1 (šķīdinātājs pret eļļu), ar izmaiņām atkarībā no šķīdinātāja efektivitātes un mērķa PNTS šķīdības. PNTS ekstrakcija bieži ietver zemas temperatūras procesus, parasti diapazonā no -20 °C līdz 4 °C. Šīs temperatūras ir izvēlētas, lai izmantotu piesātināto taukskābju (kuras izkristalizējas) un PNTS (kas paliek šķidrā

veidā) atšķirīgo šķīdību kristalizācijas laikā (Vázquez et al. 2012; Sharma et al. 2020; Kermanshahi et al. 2020; Namal et al. 2013; Shahidi et al. 1998).

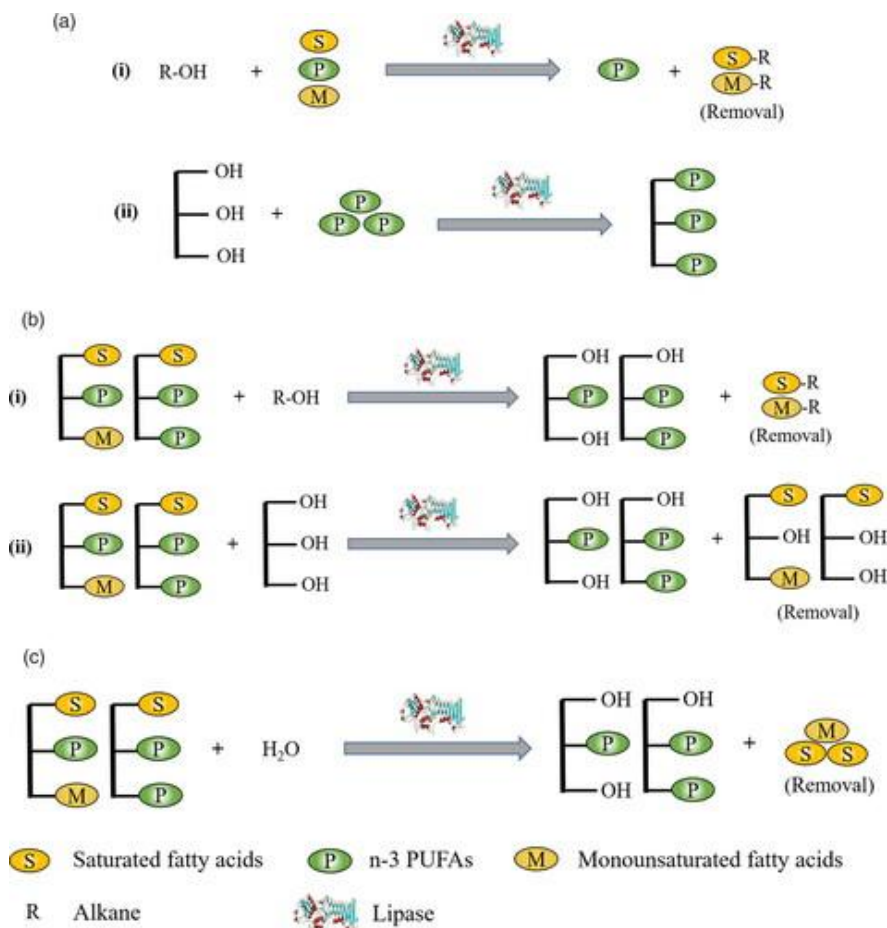


4.2.3. attēls. SDA koncentrācija un iznākums, kas iegūts šķīdrajā frakcijā ar acetonu, dažādos ziemošanas laikos ar optimizētu metodoloģiju. Eļļas:šķīdinātāja attiecības: (R2,5) 2,5%; (R10) 10%; (R20) 20%. Ziemošanas laiki: 4 un 24 h (Vázquez et al. 2012).

PNTS ir iespējams papildus attīrīt, izmantojot **enzimātisko hidrolīzi** vai **esterifikācijas reakcijas** ar dažādām lipāzēm (skat. 4.2.4. attēlu). Enzīmu izmantošana PNTS iegūšanai pēdējās desmitgadēs ir izraisījusi īpaši lielu interesi, jo tai nav nepieciešams liels daudzums kaitīgu šķīdinātāju, enzīmus ir iespējams ražot videi nekaitīgi, izmantojot dažādus mikroorganismus, procesu ir iespējams mērogot un, atkarībā no vajadzīgā gala produkta, var piemēlēt labāko enzīmu tā iegūšanai. Tomēr jāņem vērā, ka lielākajā daļā hidrolīzes metožu sākotnēji ir nepieciešams ekstrahēt lipīdus vai nonākt līdz brīvajām taukskābēm pirms tiek veikta PNTS atdalīšana, līdz ar to tiek iesaistītas iepriekš aprakstītās metodes, kur izmanto kaitīgus šķīdinātājus. Tas ļauj secināt, ka metode konkrēti PNTS atdalīšanas posmā ir videi un cilvēkam nekaitīga, tomēr materiāla pirmsapstrāde tāda nav, kas jāņem vērā skatoties uz metodi pēc būtības (Sharma et al. 2020; Xie et al. 2022).

Enzīmu tehnoloģija ir plaši pielietota speciālās pārtikas un medicīnas jomās, un tiek pētīti arvien vairāk fermentu rūpnieciskiem nolūkiem. Lipāžu izmantošana selektīvai PNTS bagātināšanai eļļā ir svarīga pieeja omega-3 koncentrātu ražošanai. Parasti omega-3 ražošanā var izmantot lipāzes ar specifiskām funkcijām, piemēram, esterificēšanu, pāresterificēšanu un

hidrolīzi. Atkarībā no funkcijas, ko veic izvēlētajā lipāze, papildus pievieno atbilstošu savienojumu, kas piedalās ķīmiskajā reakcijā. Piemēram, 4.2.4. attēla A gadījumā tiek pievienots spirts un lipāze taukskābju maisījumam. Tā ir esterifikācijas reakcija, kur, pievienojot glicerīnu, veidojas PNTS esteri. Apzinoties vēlamo produktu un īpaši selektīvi izvēloties enzīmus, ir iespējams iegūt vēlamo produktu (Xie et al. 2022).



4.2.4. attēls. Omega-3 iekonzentrēšana eļļā ar fermentatīvām metodēm: a) esterifikācijas reakcija ar lipāzi ar spirtu (i) vai glicerīnu (ii); b) pāresterifikācijas reakcija, ko katalizē lipāzes, izmantojot selektīvu alkoholīzi (i) vai glicerolīzi (ii); c) hidrolīzes reakcija ar lipāzi (Xie et al. 2022).

Iepriekš tika aprakstīta **superkritiskā CO₂ ekstrakcijas** lipīdu iegūšanai, tomēr procesu ir iespējams pielāgot arī polinepiesātināto taukskābju ekstrahēšanai. Tā ir zaļa metode PNTS koncentrātu ekstrakcijai un attīrīšanai no zivju eļļas, jūras zālēm un mikroaļģēm. Oglekļa dioksīds pāriet superkritiskā stāvoklī, kad gan tā temperatūra, gan spiediens pārsniedz kritiskās vērtības. Šajā stāvoklī CO₂ darbojas gan kā gāze, gan kā šķidrums, kam piemīt uzlabotas šķīdinātāja

īpašības. SC-CO₂ piedāvā selektīvu ekstrakciju, regulējot spiedienu, temperatūru un līdzšķīdinātāja sastāvu. Tas ļauj mērķtiecīgi iegūt konkrētus savienojumus, piemēram, PNT, vienlaikus atstājot nevēlamus komponentus. Lipīdu un PNTS šķīdība SC-CO₂ palielinās līdz ar spiedienu un temperatūru (Paula et al. 2007; Medina et al. 1998).

Paula et al. (2007) izstrādāja automatizētu pretstrāvas kolonnu, lai atdalītu PNTS frakciju, izmantojot SC-CO₂. Pētījums tika veikts, izmantojot komerciālu zivju eļļas taukskābju etilesteru maisījumu un dažādu citu eļļu maisījumus. Pētījuma gaitā mērķis bija izstrādāt fizikālus parametrus konkrētu savienojumu iegūšanai. No šī eksperimenta var secināt, ka kopumā SC-CO₂ potenciāli varētu izmantot arī PNTS atdalīšanai, balstoties uz dažādu šo savienojumu šķīdību pie konkrētiem fizikāliem apstākļiem. Tomēr svarīgākais arguments metodes trūkumiem ir ļoti sarežģītas iekārtas un procesi (skat. 4.2.5. attēlu), kā arī lieli finansiālie ieguldījumi (Paula et al. 2007).

Pētījuma galvenie secinājumi, ka zivju eļļā var palielināt omega-3 koncentrāciju, to varētu būt iespējams veikt arī ar eļļām ar zemu PNTS koncentrāciju un ka šķīdinātājs var frakcionēt eļļas, balstoties uz triglicerīdu saturu eļļā.

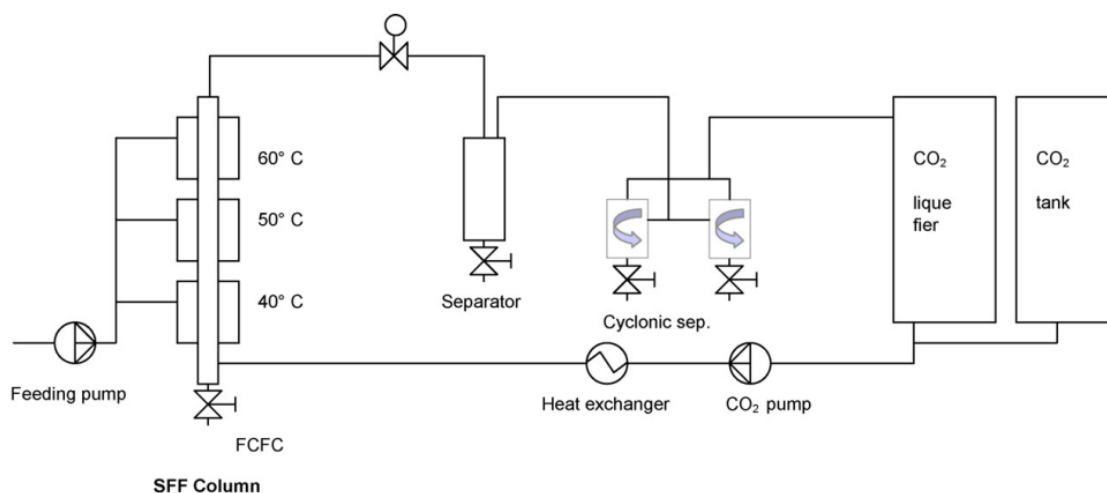


Fig. 1. Muller SC-CO₂ pilot plant scheme of equipment.

4.2.5. attēls. Superkritiskās ekstrakcijas reaktora shematisks attēlojums (Paula et al. 2007).

Līdzīgi kā lipīdu gadījumā, arī PNTS frakcijas iegūšanas vai iekonzentrēšanas centieniem ir jāizvērtē dažādas metodes, balstoties uz vairākiem faktoriem kā sarežģītību, izmaksas, nepieciešamās iekārtas, zināšanas, produkta kvalitātes parametriem un drošības risku izvērtējumiem.

4. SADAĻAS SECINĀJUMI UN KOPSAVILKUMS:

1. Pastāv dažādas lipīdu ekstrakcijas metodes. Vēsturiski tradicionālā Folha metode izmanto spēcīgus šķīdinātājus, kas degradē šūnu sienas un izšķīdina lipīdus. Liela daļa lipīdu ekstrakcijas metožu neprasa specifisku aprīkojumu, tāpēc ir iespējams izvēlēties piemērotāko balstoties uz personīgiem apstākļiem. Alternatīvas metodes iekļauj fizikālu viļņu pielietošanu, kas ir ātri un lēti, bet negarantē tīru lipīdu iznākumu. Kritiskā CO₂ izmantošanas metode ir ātra, precīza, efektīva metode ar ļoti tīrām lipīdu frakcijām, bet prasa lielus finansiālus ieguldījumus un izpēti.
2. Lai iegūtu eļļas frakciju ar augstu PNTS saturu, vispirms nepieciešams iegūt lipīdu frakciju.
3. Daudzsološākās PNTS koncentrācijas paaugstināšanas metodes ir urīnvielas un zemas temperatūras kristalizācijas metode, kuru pamatā ir selektīva molekulu atdalīšana, balstoties uz to dažādajām fizikāli ķīmiskajām īpašībām.
4. Apvienojot un pielāgojot urīnvielas/ziemošanas metodi, ir iespējams izveidot automatizētas, slēgtas iekārtas, kas samazinātu drošības risku kaitīgo šķīdinātāju dēļ, tomēr tam ir nepieciešama plaša izpēte un eksperimentēšana.
5. Ļoti tīras PNTS frakcijas iegūšana ir sarežģīta un laikietilpīga. Dažādos pētījumos reti tiek sasniegta vairāk par 80 % PNTS tīrības pakāpe mikrobiāli iegūtās eļļās.
6. SC-CO₂ ekstrakcija triglicerīdu atdalīšanai no eļļas varētu būt daudzsološa augstas kvalitātes PNTS frakcijas iegūšanas metode, tomēr nav skaidri selektīvie apstākļi un tas prasītu lielus finansiālus ieguldījumus un izpēti.
7. No literatūras apkopojuma var secināt, ka no mikroaļģēm ir iespējams iegūt lipīdu frakciju ar dažādām vieglām metodēm, tomēr PNTS iekonzentrēšana ir sarežģīta un, visticamāk, netiks sasniegta 100 % tīra frakcija. Tomēr vairums mikroaļģu ir bagātas ar PNTS lipīdu sastāvā.

5. ANALĪTISKĀS METODES

Projekta ietvaros, lai analizētu datus un iegūtās vērtības, tika izmantotas vairākas analītiskās metodes. To gaita tiks aprakstīta turpmāk, iekļaujot, **biomasas sausā svara, proteīnu, ogļhidrātu, fenolu, lipīdu, cukuru** laboratoriskās noteikšanas metodes. Šie ir galvenie parametri, pēc kuriem tika novērtēts mikroaļģu biomasas saturs un tā izmaiņas, optimizējot augšanas apstākļus mikroaļģēm polinepiesātināto taukskābju ražošanai.

Biomassas sausā svara noteikšanas metodoloģija:

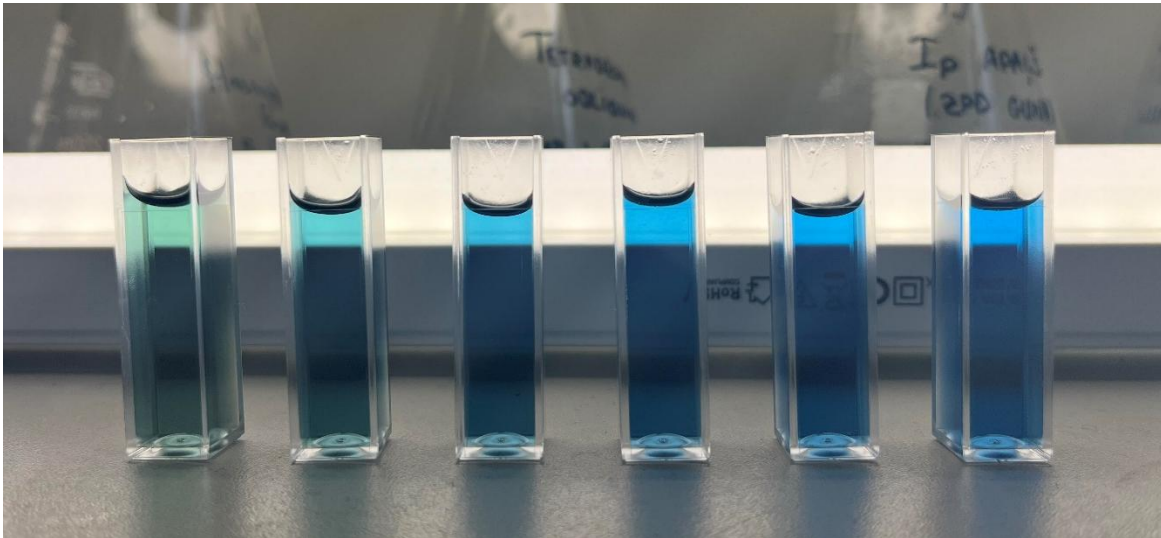
1. Eksperimentu beigās kolbas saturu sakrata, tad noņem 10 ml parauga. To pārnes 15 ml centrifugēšanas stobriņā;
2. Stobriņi ar kultūru tiek centrifugēti 5 minūtes 5000 rpm (apgriezieni minūtē);
3. Supernatants tiek uzmanīgi dekantēts un aizvietots ar 10 ml dH₂O; stobriņi tiek sakratīti;
4. Stobriņus atkārtoti centrifugē 5 minūtes 5000 rpm;
5. Paralēli tiek nosvērtas sverglāzes un rezultāts pierakstīts;
6. Atmazgātā biomasa tiek salieta stikla sverglāzes un žāvētas termostātā 80°C temperatūrā, 24 stundas;
7. Pēc žāvēšanas sverglāzes ar biomasu tiek izņemtas no termostata un nosvērtas;
8. No iegūtā rezultāta atņem tukšās sverglāzes svaru un iegūst mikroaļģu daudzumu g uz 10 ml, lai aprēķinātu g/L, iegūto rezultātu sareizina ar $1000\text{ mL}/10\text{ mL}=100$ (1000 ir ml vienā L, savukārt 10 ml ir svars, kurš tika paņemts).

Kopējo proteīnu noteikšanas metodoloģija:

Kopējo proteīnu daudzuma noteikšanai mikroaļģu ekstraktos izmanto Bredforda metodi (Kruger 1994).

1. Sākotnēji tiek sagatavots Bredforda reaģents – mērkolbā (1 L) ar analītisko svaru palīdzību tiek iesvērta *Coomassie Blue* G250 krāsviela, kas tiek izšķīdināta 50 ml 95% etanolā. Tālāk pievieno 100 ml 85% ortofosforskābes. Pārējais tilpums līdz 1 L atzīmei tiek uzpildīts ar destilētu ūdeni (dH₂O).
2. Iegūtais reaģents tiek samaisīts, viegli apļojot mērkolbu, un tālāk izfiltrēts ar Bunzena kolbas (1 L) (kopā ar Binhera piltuvi un filtrpapīru) palīdzību. Filtrācija nepieciešama, lai atdalītu krāsvielas neizšķīdušās daļiņas. Pēc izfiltrēšanas reaģents ir sagatavots analīzēm.

3. Kalibrācijas līknei izmanto 1 mg/ml liellopu γ -globulīna standartšķīdumu, kuru pipetē stikla mēģenēs (kopā 6 mēģenēs) – 10, 20, 40, 60, 80 un 100 μ L. Tālāk tilpums tiek pacelts ar destilētu ūdeni tā, lai katrā mēģenē būtu 100 μ L šķīduma.
4. Kalibrācijas līknei pievieno 5 ml sagatavotā Bredforda reaģenta. Mēģeņu saturu samaisa, izmantojot vorteksu. Kalibrācijas līknes saturs ir gatavs (skat. 5.1. attēlu).



5.1. attēls. Kalibrācijas līkne proteīnu noteikšanai pēc Bredforda metodes.

5. Atsevišķās stikla mēģenēs tiek pievienoti 100 μ L ar mikroaļģu biomasas paraugiem (pirms tam tie tiek sagatavoti 1mg/ml koncentrācijā ar destilētu ūdeni un homogenizēti, izmantojot ultraskaņas sonikatoru). Katram paraugam tiek pievienoti 5 ml ar Bredforda reaģentu. Mēģeņu saturu samaisa, izmantojot vorteksu.
6. Pēc 15 min kalibrācijas līknes un mikroaļģu paraugi tiek atkārtoti samaisīti ar vorteksa palīdzību un 1,5 ml pārnesti uz kivetēm pirms tiek veikti mērījumi.
7. Paraugu absorbciju mēra ar spektrofotometru pie 595 nm. Negatīvā fona novēršanai tiek izmantots tīrs Bredforda reaģents.
8. Lai konstruētu kalibrācijas līkni *MS Excel* programmatūrā un izrēķinātu regresijas vienādojumu, izmanto gaismas absorbcijas vērtības no γ -globulīna kalibrācijas paraugiem.

Kopējo ogļhidrātu noteikšanas metodoloģija:

Ogļhidrātu analīzei izmanto Antrona (angl. *Anthrone*) reakciju (Fagen et al., 1954). Ogļhidrātu daudzums tika noteikts tikai sausajai mikroaļģu biomasai, netika noteikts mikroaļģu ekstraktiem.

1. Pagatavo paraugu 1 mg/ml (biomasa/destilēts ūdens) koncentrācijā. Pēc sagatavošanas paraugu homogenizē, izmantojot sonikatoru (homogenizēšana ar ultraskaņu).
2. Paraugam (0,2 ml, stikla mēģenē) pievieno 0,4 ml atdzesēta 75 % H₂SO₄ šķīduma.
3. Maisījumam pievieno 0,8 ml Antrona reaģenta (svaigi pagatavots 2 g/L Antrona reaģents 75 % H₂SO₄ šķīdumā). Pipetēšanai ar sērskābes šķīdumiem iesākam izmantot reversās pipetēšanas metodi: izspiež pipeti līdz otrajai atdurei, ievieļ pilnībā sērskābes šķīdumu. Šķīdumu izspiež no pipetes uzgaļa vien līdz pirmajai pipetes atdurei).
4. Maisījumu vāra 100 °C temperatūrā 15 min.
5. Ļauj paraugam atdzesēties un izmēra absorbciju spektrofotometrā pie 630 nm
6. Ogļhidrātu koncentrāciju nosaka ar D-glikozes standartlīknes lineārās regresijas vienādojumu.
7. Glikozes atšķaidījumus veido paraugi ar 1, 0,5, 0,25, 0,175 g/L glikozes koncentrāciju šķīdumā. Papildus izmanto negatīvo fonu kontroli (reaģents bez cukuriem), kam parauga vietā pievieno ūdeni.
8. Izmanto gaismas absorbcijas vērtības no glikozes kalibrācijas paraugiem, lai konstruētu regresijas līkni MS Excel programmā un izrēķinātu regresijas vienādojumu.
9. Ogļhidrātu daudzums paraugā tiek rēķināts pēc vienādojuma: $m = (A - X_0)/k$, kur m ir masa μg ; A ir parauga gaismas absorbcija; X_0 ir x vērtība, regresijas līknei krustojot Y asi; k ir regresijas līknes k koeficients.
10. Ogļhidrātu koncentrācijas biomasā (%) aprēķinam proteīna masu izdala ar parauga masu un reizina ar 100 %.

Kopējo lipīdu noteikšanas metodoloģija:

Kopējo lipīdu satura noteikšanai mikroaļģu biomasā (%) tika izmantota Folha metode (Folch et al. 1957). Lipīdu daudzums tika noteikts tikai sausajai mikroaļģu biomasai (nevis ekstraktiem). Folha metodes pamatā ir lipīdu sadalīšana divfāzu hlороforma un metanola

maisījumā. Metanols pārrauj ūdeņraža saites starp lipīdiem un olbaltumvielām pēc organiska šķīdinātāja (hloroforma) pievienošanas.

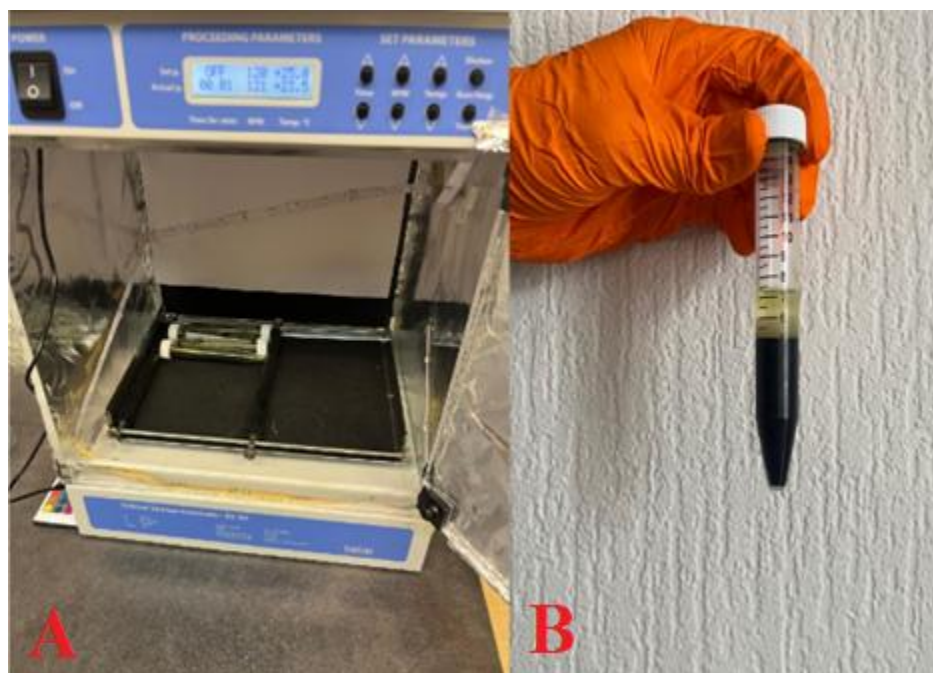
1. Nosver tukšu 15 ml plastmasas stobriņu ar aizskrūvējamu vāciņu, pieraksta tā masu;
2. Stobriņā iesver 100 mg analizējamā parauga;
3. Pievieno 20 daļas ar hloroformu/metanolu (2:1, v/v – 2 ml: 1,33 ml hloroforms, 0,66 ml metanols) stobriņā ar analizējamo paraugu. Masas attiecība šķīdinātājam pret paraugu ir aptuveni 20:1. Stobriņu ar paraugu un šķīdinātāju maisa 10 min orbitālajā kratītājā (120 apgrz./min) (skat. 5.2. attēlu). Ja paraugs ir ciets, labāk maisīšanu veikt ar stikla nūjiņu, vienlaikus sadalot paraugu viendabīgā maisījumā (skat. 5.2. attēlu);



5.2 attēls. Neapstrādātu ekstrahēto lipīdu masa šķīdināta hloroformā un metanolā (protokola otrais un trešais solis).

4. Pievieno 0,5 ml ar KCl 0,8% sāls šķīdumu ūdenī, sasniedzot gala koncentrāciju hloroformam: metanolam: ūdenim 8:4:3;

5. Atkārtro trešo un ceturto punktu divas līdz četras reizes, līdz analizējamais paraugs kļūst balts (skat. 5.3. attēlu);



5.3. attēls. A – neattīrītu lipīdu horizontāla kratīšana orbitālajā kratītājā (protokola trešais solis; B – biomasas iekrāsošanās baltā krāsā (pelēcīgi baltais slānis virs organiskā tumšā slāņa) pēc vairākkārtīga hlороформа, метанола un ūdens pievairošanas.

6. Stobriņu centrifugē 2000 apgriezienos/min 10 minūtes;
7. Pēc centrifugēšanas izveidojas divi slāņi – augšējais ūdens un apakšējais organiskais slānis.
8. Ar pipetes palīdzību uzmanīgi iesūc apakšējo organisko slāni, vienlaikus nepaņemot parauga daļiņas. Organisko slāni iepilda citā trauciņā, kam iepriekš precīzi noteikta masa.
9. Organiskajā slāni ir izšķīduši lipīdi, šķīdinātāju iztvaicē 70°C žāvskapī uz nakti;

10. Nosakot trauciņa masas ar lipīdiem un tukša trauciņa masas starpību, iegūst parauga lipīdu masu (skat. 5.4. attēlu). Izdala lipīdu masu ar parauga masu, izsaka vērtību procentos. Šāds rezultāts raksturo, cik liela masas daļa no parauga ir lipīdi.



5.4. attēls. Tīri lipīdi pēc šķīdinātāja iztvaicēšanas stikla trauciņos.

Hlorofila noteikšana:

1. 5 mg parauga pievieno 8 ml šķīdinātāja, metanols 99%.

**Ir iespējams izmantot dažādus šķīdinātājus, piemēram, metanolu, etanolu, dietilēteri, acetonu, uc., taču katram šķīdinātājam ir atšķirīga formula*

2. Iegūto suspensiju ievieto kratītājā istabas temperatūrā 25 min aptuveni 130 apgrz./min. Maisīšanas laikā dažādie pigmenti izšķīst izvēlētajā šķīdinātājā.

3. Iegūto suspensiju centrifugē 10 min 8000 apgrz./min.

4. Savāc šķidro fāzi. To mēra spektrofotometriski dažādos viļņa garumus, atkarībā no šķīdinātāja.

5. Pēc formulām aprēķina savienojumu koncentrāciju uz parauga masas vienību.

Fenolu savienojumu noteikšanas metodoloģija:

Kopējo fenolu savienojumu noteikšanai mikroaļģu lipīdos tika izmantota metode, kura izskaidrota S.S. Anwer et al. (2022) publikācijā.

2. Sākotnēji tika sagatavota kalibrācijas līkne – stikla vārglāzē tika sagatavots gallskābes šķīdums destilētā ūdenī, kura koncentrācija ir 1 mg/ml (ar analītiskajiem svāriem tika nosvērti 10 mg gallskābes, kam ar pipetes palīdzību tika pievienoti 10 ml destilēta ūdens; šķīdums tiek maisīts uz laboratorijas magnētiskās plīts (nekarsējot)).
3. No sagatavotā gallskābes šķīduma tiek veidots sērijveida atšķaidījums ependorfos (1.5 ml) – pirmajā tika iepildīts 200 µl gallskābes šķīdums, no otrā līdz astotajam ependorfam tika iepildīti 100 µl destilēta ūdens. Tālāk no pirmā tika paņemti 100 µl šķīduma, pārnesti uz otro un kārtīgi samaisīti, veidojot uz pusi mazāku gallskābes koncentrāciju kā pirmajā. Šī darbība tika veikta secīgi līdz sestajam ependorfam, nodrošinot, ka katrā nākamajā gallskābes šķīdums tiek atšķaidīts par 50 %. Tādējādi koncentrācijas standartlīknē bija no 1 mg/ml pirmajā stobriņā līdz 0,003906 mgGAE/ml astotajā.
4. Tālāk tika pievienots *Folin-Ciocalteu* reaģents (FCR) 0,5 ml, kuru pipetē katrā ependorfā. Pēc pievienošanas paraugus maisa 5 min istabas temperatūrā.
5. Kā pēdējais tiek pievienots 7.5 % Na_2CO_3 0.4 ml. Pirms mērījumu veikšanas kalibrācijas līkne tiek noturēta 2 h istabas temperatūrā.
6. 15 ml stobriņos ar analītisko svaru palīdzību tiek iesvērts mikroaļģu lipīdu paraugs (aptuveni 0,02 g) un tam tiek pielieti klāt 8 ml ar etanolu, lai lipīdi izšķīst un iegūst viendabīgu masu visā šķīdumā.
7. Pēc to izmaisīšanas un homogenizēšanas 2 ml ependorfos tika pipetēti 100 µl sagatavoto paraugu, kam tika pievienots *Folin-Ciocalteu* reaģents (FCR) 0,5 ml. Pēc pievienošanas paraugus maisa 5 min istabas temperatūrā.
8. Pievieno 7.5 % Na_2CO_3 0.4 ml. Pirms mērījumu veikšanas tos notur 2 h istabas temperatūrā.

9. Gan kalibrācijas līknes, gan mikroaļģu ekstraktu paraugi tika atkārtoti vorteksēti, centrifugēti 5 min 8000 agriezienos un pārnesti uz 1 ml kivetēm (skat. 5.5. attēlu). Absorbcijas mērījumi tika veikti uz fotospektometra pie 760 nm.



5.5. attēls. Kopējo fenolu savienojumu noteikšanas kalibrācijas līkne ar gallskābi.

10. Lai konstruētu kalibrācijas līkni *MS Excel* programmatūrā un izrēķinātu regresijas vienādojumu, izmanto gaismas absorbcijas vērtības no gallskābes kalibrācijas paraugiem.

Cukuru noteikšana barotnē metodoloģija:

Glikozes koncentrācijas noteikšanai tika izmantots – *D-glucose assay procedure K-GLUC 08/18 GOPOD-format* (ENRK) (*Megazyme*, Īrija) enzimatiskās noteikšanas reaģentu komplektus.

1. Absorbcijas rādījumi tiek veikti pie 510 nm viļņu garuma;
2. Metabolīta noteikšanai tiek sagatavotas kivetes. Uz kivetēm veic references, standarta un paraugu atzīmes;
3. Visās kivetēs iepilda 3ml GOPOD reaģenta;
4. Paraugu kivetēs pievieno 0,1 ml parauga, tālāk pievieno 0,1 ml D-glikozes standarta šķīdumu. References kivetē pievieno 0,1 ml destilētu ūdeni;
5. Tās samaisa un inkubē 40-50 °C 20 min;
6. Pēc inkubācijas nolasa absorbcijas rādījumu;
7. Iegūtos rezultātus aprēķina pēc zemāk norādītās formulas:

$$D\text{-glikoze } (\mu\text{g}/0,1\text{mL}) = \Delta A_{\text{paraugs}} / \Delta A_{D\text{-glikozes standarts}} (100\mu\text{g}) \times 100 \quad 24$$

Laktozes un galaktozes koncentrācijas noteikšanai tika izmantots – *Lactose & D-galactose (Rapid) assay procedure K-LACGAR 03/20* (ENRK) (*Megazyme*, Īrija).

1. Absorbcijas lasījumi tiek veikti pie 340 nm viļņu garuma;
2. Tiek sagatavotas kivetes eksperimentam (atsevišķi laktozei un galaktozei). Tiek atzīmētas references un paraugu kivetes;
3. Laktozes visās kivetēs iepilda 0,20 ml *solution 4* (β - *Galactosidase*). Paraugu kivetēs pievieno arī pašu paraugu - 0,20 ml (atbilstošā atšķaidījumā);
4. Galaktozes paraugu kivetēs pievieno tikai paraugu 0,20 ml;
5. Samaisa un ievieto termostatā inkubēties uz 10 min 25 °C;
6. Laktozes references kivetei pievieno 2,20 ml destilēta ūdens, bet paraugu kivetei pievieno 2,00 ml destilēta ūdens. Galaktozes references kivetei pievieno 2,40 ml destilēta ūdens, bet paraugu kivetēs pievieno 2,20 ml destilēta ūdens;
7. Visiem pievieno *solution 2 (buffer)* 0,20 ml un *solution 3* (NAD⁺) 0,10 ml;
8. Samaisa un pēc ~3 min nolasa pirmos absorbcijas rādītājus (A1);
9. Tālāk tiek sākota reakcija, visām kivetēm pievienojot *suspension 5* (β -GalDH/GalM) 0,02 ml;
10. Samaisa un pēc ~5 min nolasa otros absorbcijas rezultātus (A2). Ja reakcija vēl nav beigusies, turpina nolasīt absorbcijas rezultātus ar 1 min intervālu;
11. Iegūtos rezultātus ievieto *Megazyme excel* kalkulāciju tabulā un iegūst paraugos esošo cukuru koncentrāciju g/l:

$c = \frac{V \cdot MW \cdot \epsilon \cdot d \cdot v \cdot \Delta A}{1000} \text{ [g/l]}$ V = gala tilpums (ml); MW = vielas molekulmasa (g/mol); ϵ = ekstinkcijas koeficients NADH ar 340 nm = 6300 (l $\times$ mol⁻¹ $\times$ cm⁻¹); d = gaismas ceļš (kivetes platums) (cm); v = parauga tilpums (ml).

6. POTOKOLS: MIKROAĻĢU BIOĻOGISKI AKTĪVO PRODUCENTU, PRIMĀRI – PNTS IESPĒJAMO PRODUCENTU KANDIDĀTU KLĀSTA APZINĀŠANA

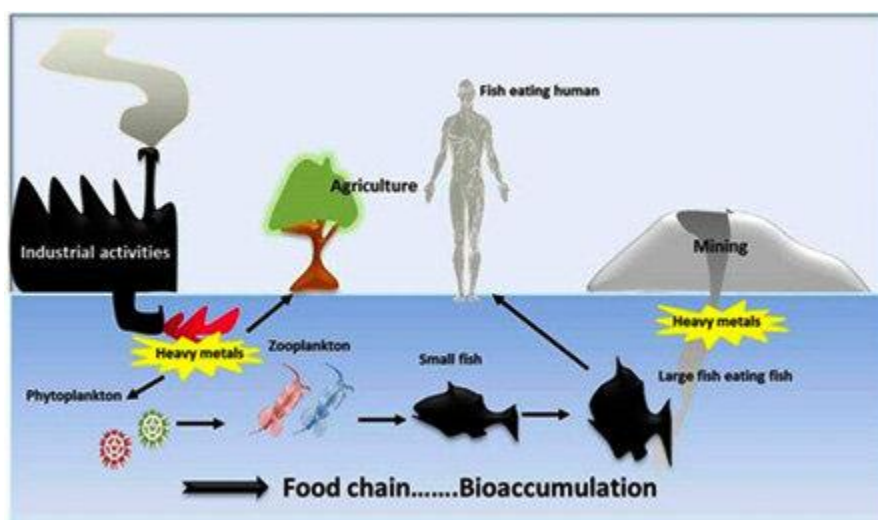
Aļģes ir daudzveidīga fotosintētisko organismu grupa, kas evolucionēja uz Zemes ilgi pirms augstākajiem augiem. Visā Zemes vēsturē cilvēki kā pārtikas avotu ir izmantojuši dažādas aļģu sugas, tostarp *Nostoc*, *Aphanizomenon* un *Spirulina*. Lai gan makroaļģes cilvēki var patērēt tiešā veidā, to ražotie savienojumi barības ķēdē bieži nonāk netieši, galvenokārt, no zivju un citu ūdensdzīvnieku lietošanas uzturā. Aļģēm ir būtiska loma ūdens vidē, jo tās veicina ūdens ekosistēmu produktivitāti, piegādājot barības vielas plašam organismu lokam. Dažas aļģu sugas ir īpaši piemērotas dzīvnieku barībai, un ir izstrādātas pamata apstrādes metodes, lai izmantotu šo potenciālu (Ramesh et al. 2019).

Pētījumi par aļģēm arvien vairāk koncentrējas uz lipīdu un taukskābju izpēti, kas ir galvenās interešu jomas, ņemot vērā to ievērojamo bioloģisko un rūpniecisko pielietojumu. Aļģu šūnas parasti satur lipīdus, kas veido no 1 % līdz 40 % no to sausā svara, un dažas sugas spēj uzkrāt līdz pat 85%. Šie lipīdi galvenokārt tiek uzglabāti glicerīdu, brīvo taukskābju, glikolipīdu un fosfolipīdu veidā. Dažas aļģes, piemēram, diatoma *Nitzschia laevis* un *Tisochrysis lutea*, var vienlaikus ražot gan polinepiesātinātās taukskābes (PNTS), gan pigmentu fukoksantīnu. Mikroaļģes tiek atzītas par daudzsoļiem PNTS avotiem, tostarp linolēnskābes, arahidonskābes, eikozapentaēnskābes (EPA), dokozaheksaēnskābes un dokozaheksaēnskābes (DHA) ražotājiem. To vidū no aļģēm iegūtais DHA jau ir veiksmīgi komercializēts. Lai gan dziļūdens zivju eļļās atrodamās PNTS pašlaik tiek iegūti no zivīm, šīs taukskābes rodas no zivju patērētajām aļģēm, uzsverot aļģu nozīmi ūdens vides barības ķēdēs (Gabriel et al. 2021; Satin et al. 2021; Ramesh et al. 2019).

Pašlaik omega-3 PNTS galvenokārt tiek iegūti no zivsaimniecības produktiem, kas rada iespējamu veselības risku vides piesārņotāju, piemēram, metildzīvsudraba, polihlorbifenilu un makroaļģu toksīnu dēļ (skat. 6.1. attēlu). Tie rada bažas par zivju un zivju eļļas patēriņa drošību, un zvejas resursu izsīkšana vēl vairāk apgrūtina ilgtspējīgu omega-3 PNTS ieguvu. Turklāt omega-3 PNTS uzņemšanas efektivitāti cilvēka gremošanas sistēmā var negatīvi ietekmēt ūdens produktu gatavošanā izmantotās apstrādes metodes. Ar PNTS bagātākās zivis ir dažādu sugu laši, foreles, tuncis un zobzivis. Liela daļa ar PNTS bagātām zivīm tiek patērētas uzturā, kad tās ir vairākus

gadus vecas, kas rada ievērojamu risku smago metālu klātbūtnei. PNTS ieguve tieši no mikroaļģēm ir jauns, drošs un efektīvs paņēmiens to veselīgai lietošanai (Gabriel et al. 2021; Satin et al. 2021; Choudhary et al. 2023).

Mikroaļģes un citi mikroorganismi ir daudzsoļoša alternatīva omega-3 PNTS ražošanai, piedāvājot elastīgu, efektīvu un drošāku šo savienojumu dabiskās sintēzes ceļu. Lai gan mikroaļģu audzēšanai vēl nav būtisku izmaksu priekšrocību salīdzinājumā ar tradicionālo zveju un akvakultūru, pastāvīgā zvejas resursu izsīkšana un mikroaļģu apstrādes tehnoloģiju attīstība, visticamāk, samazinās izmaksas un uzlabos produktu kvalitāti, salīdzinot ar augstākajiem augiem vai tradicionāli izmantotajiem jūras dzīvniekiem, padarot no aļģēm iegūtos omega-3 PNTS savienojumus arvien konkurētspējīgākus pasaules tirgū (skat. 6.1. tabulu) (Weixian et al. 2023).



6.1. attēls. Smago metālu aprite barības ķēdēs (Choudhary et al. 2023).

Omega-3 PNTS komerciālā ražošana no mikroaļģēm jau ir guvusi panākumus, jo īpaši ar DHA un EPA, kas ir plašā mērogā industrializēti ražošanas produkti. Pašlaik PNTS ražošanā tiek izmantotas tādas mikroaļģu sugas kā *Schizochytrium*, *Cryptocodinium cohnii* un dažādas kramaļģes. Mikroaļģes var kultivēt fotoautotrofi atklātos dīķos vai heterotrofi fermentācijas tvertnēs, lai gan komerciālā ražošana bieži balstās uz autotrofām kultivēšanas metodēm, kur to pielieto tādām sugām kā *Spirulina* un *Chlorella* (Weixian et al. 2023).

Fotoautotrofā kultivēšana piedāvā zemākas izejvielu izmaksas, bet arī zemāku produkta iznākumu uz vienības izmaksām. No otras puses, miksotrofi un heterotrofi apstākļi var ievērojami palielināt biomasas ražu, dažreiz pat desmit reizes, salīdzinot ar autotrofām metodēm. Īpaši augsta blīvuma kultivēšanai ir potenciāls samazināt ražošanas izmaksas, kas ir zemākas par audzēšanas

izmaksām atklātos dīķos, īpaši, ja kultivācijas apjomi ir lielāki par 1000 tonnu gadā. Tomēr ir svarīgi atzīmēt, ka eļļas saturs un sastāvs heterotrofi kultivētās aļģēs var nebūt tik komerciāli vērtīgs kā tiem, kas iegūti ar fotoautotrofām metodēm (Weixian et al. 2023; Santi et al. 2022).

Dažām aļģu sugām, piemēram, *Galdieria sulphuraria*, ir novērots augstāks PNTS saturs, kultivējot heterotrofos, nevis fototrofos apstākļos, kur tika novērots augstāks piesātināto un mononepiesātināto taukskābju saturs. PNTS ražošanu fotoheterotrofos apstākļos var ietekmēt arī oglekļa avots: piemēram, kontrolētos (iekštelu) apstākļos glikozes izmantošana ir efektīvāka nekā citi organiskie substrāti (fruktoze, saharoze un maltoze), lai stimulētu PNTS ražošanu tādās sugās kā *Tetraselmis gracilis* un *Platymonas convolutae*. Diemžēl glikoze ir arī viens no dārgākajiem oglekļa avotiem, un tas var padarīt ļoti vērtīgu lipīdu ražošanu neekonomisku (Santi et al. 2022).

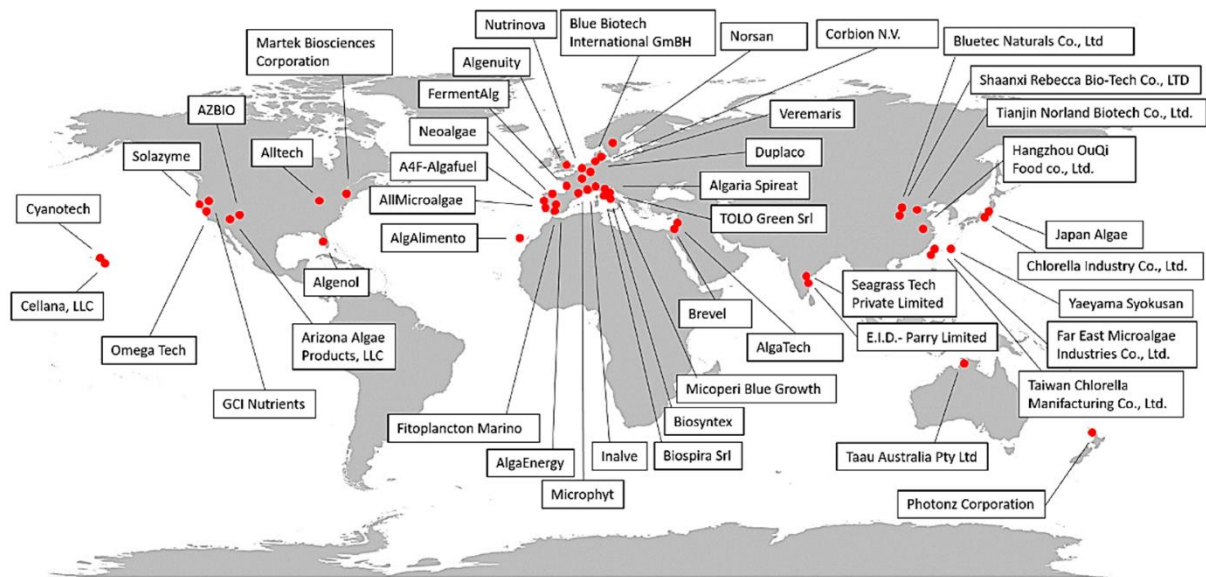
6.1. tabula.

Mikroaļģu, augstāko augu un jūras dzīvnieku PNTS produktu salīdzinājums (Weixian et al. 2023).

Kritērijs	Mikroaļģes	Augstākie augi	Jūras dzīvnieki
Avots	Ģenētisko transformāciju veikšana augsta iznākuma organismu radīšanai	Ļoti reti sastopamas sugas ar augstiem iznākumiem	Jūras dzīvnieku resursi izsīkst
Ražošana	Var ražot visu gadu, nav atkarīgs no izejvielu izcelsmes	Atkarīga no klimatiskiem apstākļiem, var būt sezonāla	no PNTS saturs mainās atkarībā no sugas, zvejas laika, ģeogrāfiskās atrašanās vietas
	Kultivēšanu un kvalitātes kontroli ir salīdzinoši viegli kontrolēt	Produkta iznākumus ietekmē vides faktori un apsaimniekošanas	Neizbēgama smago metālu uzkrāšanās produktos piesārņoto ūdenstilpņu dēļ
Ievākšana un ekstrakcija	Salīdzinoši grūta, dažām aļģu sugām nepieciešama pirmsapstrāde šūnu sagraušanai	Salīdzinoši viegla	Salīdzinoši viegla
Attīrīšana	Salīdzinoši augsta PNTS koncentrācija, viegla	Salīdzinoši augsta PNTS koncentrācija, ar	Satur lielu koncentrāciju PPTS un MPTS,

	iekoncentrēšana, attīrīšana	viegla iekoncentrēšana, attīrīšana	salīdzinoši iekoncentrēšana, attīrīšana	grūta
Kvalitāte	Nav holestarīna, zivju smakas, pesticīdu, smago metālu, produkta īpašības ir stabilas	Nav holestarīna, zivju smakas, smago metālu, produkta īpašības ir stabilas, dažas sugas var saturēt pesticīdu piemaisījumus	Salīdzinoši holestarīna saturs, lieli smago metālu piemāšījumi, zivju smaka	augsts
Izmaksas	Augstas	Vidējas	Zemas	

Ražotāji bieži dod priekšroku audzēšanas metodēm, kas dod lielāku biomasu uz vienu ievades vienību, padarot īpaši augsta blīvuma kultivēšanu par svarīgāko metodi mikroaļģu komercializācijā. Teorētiski mikroaļģu audzēšana varētu notikt bez fotosintēzes, ja tiek pievadīti organiski savienojumi, parasti, ražošanas blakusproduktu cukuri. Turklāt, izpētot ceļus augstvērtīgu produktu, piemēram, PNTS sintēzei mikroaļģu šūnās, varētu ievērojami uzlabot uz mikroaļģēm balstītas ražošanas ekonomisko dzīvotspēju. Daudzas valstis investē mikroaļģu ražotās PNTS. Īpaši izplatīts tas ir Eiropā un Ziemeļamerikā, šo reģionu valstis veido lielāko tirgus daļu no mikroaļģu iegūtiem PNTS produktiem (skat. 6.2. attēlu). PNTS produktu ražošanas nolūkiem galvenās izmantotās ģintis ir *Arthrospira (Spirulina)*, *Dunaliella* un *Chlorella* (Weixian et al. 2023; Santi et al. 2022).



6.2. attēls. Karte, kurā attēloti galvenie uzņēmumi, kas ražo ar PNTS bagātas mikroaļģes un citas no mikroaļģēm iegūtas preces (Santi et al. 2022).

Ir skaidrs, ka, izstrādājot audzēšanas tehnoloģijas, izvēloties vai uzlabojot mikroaļģu celmus, optimizējot ražošanas izmaksas, piemeklējot lētus, nepietiekami apzinātus substrātus, ir iespējams iegūt PNTS produktus ar augstu tīrību, samazinātu PPTS saturu, bez smagajiem metāliem un pesticīdiem, videi draudzīgā, ilgtspējīgā veidā. No zinātnisko pētījumu skaita pieauguma pēdējās desmitgadēs ir skaidrs, ka mikroaļģu ražotās PNTS ir nākotne šī produkta ražošanā. Veicot pētījumus, ir nepieciešams izvēlēties atbilstošākos mikroaļģu celmus, balstot tos uz iepriekš izstrādātiem kritērijiem, lai prognozētu un iegūtu pēc iespējas vairāk produktu ar augstu pievienoto vērtību. Iepriekš tika salīdzināta PNTS iegūšana starp mikroaļģēm, augstākajiem augiem un jūras dzīvniekiem (skat. 6.1. tabulu), tomēr, lai izvēlētos, kuras mikroaļģes potenciāli spēs konkurēt ar tradicionāli izmantotajiem organismiem, ir nepieciešams izveidot salīdzinājumu starp dažādām mikroaļģēm, balstoties uz vairākiem kritērijiem, par galveno pieņemot spēju ražot PNTS.

Svarīgākais faktors kandidātu klāsta apzināšanai un izpētei ir spēja ražot PNTS savienojumus. Šajā posmā arī pierādījumi par zemu šo savienojumu ražošanu var būt pieņemami, jo, optimizējot un pielāgojot apstākļus tieši PNTS sintēzei, ir iespējams panākt to palielinātu sintēzi arī kandidātos ar zemāku to saturu normālos kultivēšanas apstākļos. Sākotnēji ar mērķi apzināt mikroaļģu bioloģiski aktīvo producentu, primāri- PNTS iespējamo producentu kandidātu klāstu,

tika izpētīta zinātniskā literatūra, kur dažādos pētījumos tika konstatēts, ka konkrētās mikroaļģes ir spējušas ražots PNTS.

Mikroaļģes, kas ražo polinepiesātinātās taukskābes un citus mērķsavienojumus dažādos pētījumos:

Sākotnēji tika izpētīts plašs mikroaļģu sugu klāsts, balstoties uz zinātniskām publikācijām, lai atlasītu iespējami lielāku PNTS un citu mērķsavienojumu, kā aminoskābju un lipīdu, kadidātu klāstu (skat. 6.2. tabulu). Tika aprakstītas tādas mikroaļģu sugas, kas iepriekš ir pētītas attiecībā uz PNTS savienojumu ražošanu. Tika uzskaitīti svarīgākie šīs grupas savienojumi, ko mikroaļģes ir spējušas ražot, kā arī tajās esošo lipīdu saturs. Lipīdu saturs ir svarīgs, jo daļa pētījumu koncentrējas uz lipīdu frakcijas palielināšanu mikroaļģu biomasā tālāk nepētot šīs frakcijas sastāvu, kas, iespējams, var saturēt interesējošos PNTS savienojumus. Tika veikts arī svarīgāko tēžu apkopojums saistībā ar konkrēto sugu, lai padziļinātāk izprastu tās īpašības un iepriekšējos zinātniskos sasniegumus attiecībā pret sugas PNTS ražošanas īpašībām un mūsdienu pielietojumu komerciāliem nolūkiem, ja tāds ir.

6.2. tabula.

Dažādu sugu mikroaļģu ražoti mērķsavienojumi, primāri PNTS savienojumi, lipīdi un to sugu īpatnības saistībā ar produktu ražošanas potenciāla izpēti.

Suga	Mērķsavienojumi	Komentāri	Lipīdu saturs	Atsauce
<i>Chlorella vulgaris</i>	Palmitīnskābe, linolskābe, oleīnskābe, linolēnskābe	Viena no biežāk izmantotajām un izpētītākajām sugām mikroaļģu biotehnoloģijās, plaši izmantota kā dzīvnieku pārtikas piedeva	52.5 ± 2.3% sausas biomasas	Araujo et al. 2013
<i>Selenastrum minutum</i>	Palmitīnskābe, stearīnskābe, oleīnskābe, linolskābe, linolēnskābe, lignocerīnskābe	Augstākā lipīdu koncentrācija tika sasniegta barības vielu bada apstākļos un paaugstinātā sāļumā	1.26 – 40.06% sausas biomasas	Axelsson, Gentili 2014; Pushpaku mari et al. 2018

<i>Nannochloropsis oculata</i>	Miristīnskābe, palmitīnskābe, palmitoleīnskābe, stearīnskābe, oleīnskābe, linolskābe, γ - linolēnskābe, arahidonskābe, eikozapentaēnskābe	Pētījumos par to izmantošanu kā barības piedevu zivīm tika noskaidrots, ka tā spēj būtiski palielināt PNTS daudzumu zivju produktos, kas liek domāt, ka tā varētu būt daudzsološa šo savienojumu ražotāja.	0.21 – 7,50 % sausas biomasas	Adam et al. 2012; Zahran et al. 2023
<i>Spirulina platensis</i>	γ -linolēnskābe, eikozapentaēnskābe, dokozaheksaēnskābe, linolēnskābe, α -linolēnskābe	Tropisks organisms, kas pasaules līmenī atzīts par “superfood”. Satur ļoti daudz cilvēkam labvēlīgus savienojumus- aminoskābes, PNTS, vitamīnus, mikro un makroelementus. Liela proporcija no lipīdiem sastāda PNTS.	4 – 9% sausas biomasas . 47.78% pnts no kopējām taukskābēm	Hossain et al. 2016; Diraman et al. 2009
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	EPA, DHA	Droša, uzturā lietojama jūras mikroaļģe. Miksotrofiskā audzēšana ar glikozi ir potenciāli noderīga, lai uzlabotu lipīdu, EPA un karotinoīdu veidošanos <i>N. gaditana</i> kultūrās, kurām nav ierobežota barības vielu daudzuma.	10 – 12% sausās masas satur PNTS	Menegol et al. 2019

<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EPA, DHA, dažādas piesātinātās taukskābes (PPTS)	Lipīdu biosintēzi var stimulēt barības vielu samazināšanās un palielināta CO ₂ piegāde. EPA sintēzi var izraisīt CO ₂ un urīnvielas padeve un augsts apgaismojums. Var ražot arī OMEGA-3 bagātu eļļu un augstvērtīgus proteīnus.	20 – 30% sausas biomasas	Cui et al. 2019
<i>Tetrademus obliquus</i>	C18:2, C18:3 (linolēnskābes), omega-3, omega-6	Augsta CO ₂ piesaistes pakāpe, aug autotrofi, miksotrofi, heterotrofi, kultivēšanas apstākļi būtiski ietekmē taukskābju saturu, PNTS saturs palielinās slāpekļa trūkumā	49.69% no lipīdiem	Piasecka et al. 2020; Rıza Akgül 2024
<i>Schizochytrium limacinum</i>	PNTS, PPTS, DHA, DPA	Palielināts PPTS daudzums attiecībā pret PNTS. PNTS satur 40 – 50% no kopējām tauksābēm. DHA un DPA attiecība mainījās dažādās temperatūrās un sāļumā	Līdz 40% sausas biomasas	Zhu et al. 2007
<i>Isochrysis galbana</i>	Palmitoleīnskābe, linolskābe, linolēnskābe, stearidonskābe, miristīnskābe, DHA	Atkarībā no žāvētās masas aļģu biomasa var darboties kā lipīdiem bagāta izejviela ar paaugstinātu lipīdu saturu (60,3 %).	10 – 60% sausas biomasas	Sukenik, Wahnon, 1991; Hubert et al. 2017; Mohy 2019.
<i>Tetraselmis suecica</i>	EPA, DHA, palmitoleīnskābe, miristīnskābe, palmitīnskābe	Plaši izmanto akvakultūrās gliemju un vēžveidīgo kāpuru barošanai un kā probiotisku līdzekli zivīm.	N.A.	Bong, Loh 2013;

		Viena no svarīgākajām mikroaļģēm, un tās biomasu var izmantot, lai iegūtu karotinoīdus, lipīdus, glicerīnu, ogļhidrātus un olbaltumvielas biodegvielas, farmācijas un pārtikas ražošanai.		
<i>Dunaliella salina</i>	Kaprīlskābe, laurīnskābe, miristīnskābe, palmitīnskābe, palmitoleīnskābe, linolēnskābe, arahīnskābe, behenīnskābe, EPA, DHA, lignocerīnskābe, virkne PNTS, MPTS, MNTS	Lai izdzīvotu ļoti augsta sāls līmeņa biotopos, šiem organismiem ir augsta β -karotīna koncentrācija, kas aizsargā pret intensīvu gaismu, un augsta glicerīna koncentrācija, kas nodrošina aizsardzību pret osmotisko spiedienu. Tas paver iespēju šo vielu komerciāli bioloģiskai ražošanai.	Līdz 40% sausas biomasas	Gleison et al. 2022; Hanaa et al. 2004.
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	DHA	Izteikti ražīgs DHA producers. Organisms ir neparasts ar to, ka tas neražo citas PNTS, izņemot DHA savā šūnu lipīdā nozīmīgā daudzumā, kas padara DHA attīrīšanas procesu ļoti pievilcīgu, jo īpaši farmācijas un uztura vajadzībām.	Aptuveni 20% sausas biomasas	Mendes et al. 2009
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Lielākā daļa skābju līdz C24	Modeļorganisms ģenētikā, jo tam ir nosekvenēts pilns genoms. Potenciāls pielietojums biodīzeļa un lipīdu ražošanā.	Līdz 60% sausas biomasas	Zhukova 2004; Meksiarun et al. 2015
<i>Porphyridium cruentum</i>	30% kopējo lipīdu ir C ₁₆ –C _{18:1}	Kosmētikas produktos izmanto kā daudzpusīgu un ļoti efektīvu	19.9% sausas masas	Sunga et al. 2009

		antioksidantu un ādu kondicionējošu līdzekli.		
<i>Aurantiochytrium sp.</i>	Miristīnskābe, pentadekānskābe, palmitīnskābe, palmitoleīnskābe, heptadekānskābe, oleīnskābe, arahidonskābe, EPA, DHA	Ūdens attīrīšana, mikrobiāli iegūti lipīdi, PNTS, pigmenti.	46,97 % (DHA) pie 10 g/l glikozes koncentrācijas no lipīdu masas	Chauhan et al. 2023
<i>Euglena gracilis</i>	EPA, DHA, α-linolēnskābe, arahidonskābe	Spēj augt autotrofi un heterotrofi, ražo daudzus interesantus sekundāros metabolītus. Izmanto dabisku produktu biosintēzē, bioremedācijā un uztura bagātinātāju ražošanā.	Ap pnts 50% no lipīdiem	Bedard et al. 2024
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Linolēnskābe, linolīnskābe	Uzskatīts par vienu no labākajiem astaksantīna ražotājiem (5% sausās masas).	41.5–44.6%	Mahadi et al. 2022
<i>Navicula sp.</i>	Heksadecēnskābe, Heksadekatriēnskābe, eikozatetraēnskābe, eikozapentaēnskābe	Augsta bioloģiskā aktivitāte. Izmanto farmācijā sekundāro metabolītu iegūšanai, akvakultūrās kā barību un pārtikas piedevu uztura bagātinātājos.	14.2 μg/mL	Pezzolesi et al. 2017
<i>Botryococcus braunii</i>	Oleīnskābe, palmitīnskābe, α-linolēnskābe,	Ar ogļūdeņražiem bagāta mikroaļģe, potenciāla aviodegvielas ražotāja.	17.65% pnts no lipīdiem	Sadeghin et al. 2018

	erukskābe	un			
	stearīnskābe				
<i>Skeletonema costatum</i>	Morocitskābe, α -linolēnskābe, linolēnskābe	Bagāta ar A vitamīnu.	Ap 10% pnts no lipīdiem	Kumar et al. 2015	
<i>Chaetoceros muelleri</i>	EPA	Lielākā PNTS koncentrācija no kopējām taukskābēm pēc 1 dienas kultivācijas	28,7% pnts no kopējām taukskābēm	Liang et al. 2006; Remize et al. 2020	
<i>Monodus subterraneus</i>	EPA	Lielāks EPA saturs samazinātas gaismas stersa ietekmē.	31.5% pnts no kopējām taukskābēm	Lu et al. 2001	
<i>Graesiella emersonii</i>	Oleīnskābe, α -linolēnskābe, linolēnskābe, steraīnskābe, g-linolēnskābe, eikozēnskābe	Interessants pētījumu objekts biodīzeļa ražošanā, satur daudz pigmentus, antioksidantus, labi aug ļoti plašā temperatūras diapazonā, spēj augt paaugstinātā sāļumā, ļoti m bagātīgs PNTS saturs.	55% pnts no kopējām taukskābēm	Kang et al. 2022; Zili et al. 2017	

Mikroaļģu kandidātu izvēle polinepiesātināto taukskābju ražošanai prasa rūpīgu bioloģisko, vides un rūpniecisko faktoru novērtēšanu. Ideālajai mikroaļģu sugai jābūt ar dabīgi augstu lipīdu saturu, īpaši bagātai ar vēlamajām PNTS, piemēram, EPA, DHA vai gamma-linolēnskābi. Svarīgi ir izvēlēties sugas, kas ir plašāk pētītas attiecībā uz optimālajiem augšanas apstākļiem palielināta PNTS satura iegūšanai. Mikroaļģu bioķīmiskajam profilam jāatbilst rūpnieciskajām prasībām, lai nodrošinātu augstu mērķa savienojumu iegūšanu.

Papildus lipīdu sastāvam svarīga ir arī mikroaļģu augšanas īpašības un pielāgošanās spēja audzēšanas apstākļiem. Ideālajiem kandidātiem jābūt ar ātru augšanas ātrumu, augstu biomasas

produktivitāti un izturību pret dažādiem vides faktoriem, piemēram, sāļumu, temperatūru un gaismas intensitāti. Turklāt svarīga ir spēja augt lielapjoma fotobioreaktoros vai atklātās dīķu sistēmās, lai nodrošinātu komerciāli konkurētspējīgu galaproduktu cenu. Priekšrocības sniedz arī sugas, kas efektīvi izmanto oglekļa avotus, tostarp CO₂ vai organiskās vielas, tādējādi optimizējot ražošanas efektivitāti un kas spēj augt gan autotrofī, gan heterotrofī, gan miksotrofī, tādējādi dažādojot ražošanas iespējas.

No iepriekš literatūrā apskatītajiem potenciālajiem mikroaļģu PNTS kandidātiem tika izvēlēti astoņi atbilstošākie kandidāti, balsoties uz izlases kritērijiem. Tabulā attēlots izvēlēto astoņu sugu vērtējums un kritēriji pēc kuriem tika vērtēti visi iepriekš aprakstītie kandidāti. Kā galvenais tika izvēlēts kritērijs - augsts lipīdu saturs attiecībā pret sausu biomasu, augsts PNTS saturs attiecībā pret lipīdiem vai sausu biomasu, vai arī augst lipīdu saturs attiecībā pret sausu biomasu (skat. 6.3. tabulu).

6.3 tabula.

PNTS ražotāju labāko kandidātu novērtējums, balstoties uz kritērijiem.

Kritērijs	Suga	Vērtējums
Augsts lipīdu saturs attiecībā pret sausu biomasu, augsts PNTS saturs attiecībā pret lipīdiem vai sausu biomasu, vai arī augstu lipīdu saturs attiecībā pret sausu biomasu	<i>C. vulgaris</i>	Atbilst pilnībā
	<i>S. platensis</i>	Atbilst pilnībā
	<i>D. salina</i>	Atbilst pilnībā
	<i>T. obliquus</i>	Atbilst pilnībā
	<i>N. gaditana</i>	Atbilst pilnībā
	<i>G. emersonii</i>	Atbilst pilnībā
	<i>T. pseudonana</i>	Atbilst pilnībā
Suga ir labi pētīta attiecībā uz optimālajiem augšanas apstākļiem un iespējām palielināt PNTS saturu	<i>I. galbana</i>	Atbilst pilnībā
	<i>C. vulgaris</i>	Atbilst pilnībā
	<i>S. platensis</i>	Atbilst pilnībā
	<i>D. salina</i>	Lielākoties atbilst
	<i>T. obliquus</i>	Lielākoties atbilst
	<i>N. gaditana</i>	Lielākoties atbilst
	<i>G. emersonii</i>	Atbilst pilnībā

	<i>T. pseudonana</i>	Lielākoties atbilst
	<i>I. galbana</i>	Lielākoties atbilst
Suga ir pieejama izplatītākajās kultūru kolekcijās	<i>C. vulgaris</i>	Atbilst pilnībā
	<i>S. platensis</i>	Atbilst pilnībā
	<i>D. salina</i>	Atbilst pilnībā
	<i>T. obliquus</i>	Atbilst pilnībā
	<i>N. gaditana</i>	Lielākoties atbilst
	<i>G. emersonii</i>	Lielākoties atbilst, ir pieejams vides pašizolāts
	<i>T. pseudonana</i>	Atbilst pilnībā
	<i>I. galbana</i>	Atbilst pilnībā
Sugas biomasas pulveri ir iespējams iegādāties tālākai izmantošanai	<i>C. vulgaris</i>	Atbilst pilnībā
	<i>S. platensis</i>	Atbilst pilnībā
	<i>D. salina</i>	Lielākoties atbilst
	<i>T. obliquus</i>	Lielākoties neatbilst
	<i>N. gaditana</i>	Atbilst pilnībā
	<i>G. emersonii</i>	Lielākoties neatbilst
	<i>T. pseudonana</i>	Lielākoties neatbilst
	<i>I. galbana</i>	Atbilst pilnībā
Papildus PNTS suga spēj ražot citus svarīgus savienojumus, kas paredzēti uzturam	<i>C. vulgaris</i>	Atbilst pilnībā
	<i>S. platensis</i>	Atbilst pilnībā
	<i>D. salina</i>	Atbilst pilnībā
	<i>T. obliquus</i>	Atbilst pilnībā
	<i>N. gaditana</i>	Atbilst pilnībā
	<i>G. emersonii</i>	Atbilst pilnībā
	<i>T. pseudonana</i>	Atbilst pilnībā
	<i>I. galbana</i>	Atbilst pilnībā
Suga spēj augt dažādos vides apstākļos vai vides apstākļu maiņa var uzlabot	<i>C. vulgaris</i>	Atbilst pilnībā
	<i>S. platensis</i>	Atbilst pilnībā
	<i>D. salina</i>	Atbilst pilnībā

PNTS satura palielināšanos biomasā	<i>T. obliquus</i>	Atbilst pilnībā
	<i>N. gaditana</i>	Daļēji atbilst
	<i>G. emersonii</i>	Lielākoties atbilst
	<i>T. pseudonana</i>	Lielākoties atbilst
	<i>I. galbana</i>	Lielākoties atbilst
Sugas audzēšanu ir iespējams palielināt līdz lielapjoma ražošanai, tādējādi samazinot galaprodukta cenu	<i>C. vulgaris</i>	Atbilst pilnībā
	<i>S. platensis</i>	Atbilst pilnībā
	<i>D. salina</i>	Atbilst pilnībā
	<i>T. obliquus</i>	Nav zināms
	<i>N. gaditana</i>	Atbilst pilnībā
	<i>G. emersonii</i>	Nav zināms
	<i>T. pseudonana</i>	Nav zināms
	<i>I. galbana</i>	Atbilst pilnībā

No iepriekš novērtētajiem kritērijiem attiecībā pret svarīgākajām astoņām lipīdu un pnts produktu ražotāju sugām tika secināts, ka četri potenciāli nozīmīgākie kandidāti ir *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina* un *Tetrademus obliquus*.

Balstoties uz literatūras izpēti, šīs sugas demonstrēja augstāko spēju ražot lipīdus un tai skaitā polinepiesātinātās taukskābes. Vienlaikus tās ir labi pētītas uz optimālajiem augšanas apstākļiem, to kultūras ir plaši pieejamas dažādu kultūru katalogu kolekcijās un to biomasu tiek ražota industriālā līmenī, nodrošinot, ka to var izmantot arī dažādās jomās, kur ir nepieciešams mikroaļģu labvēlīgais sastāva efekts, bet kur biomasas ražošana varētu būt sarežģīta vai neiespējama. Papildus visas izvēlētās sugas spēj ražot lielu daudzveidību ar citiem uzturam svarīgiem savienojumiem, kā vitamīniem, antioksidantiem, pigmentiem, u.c.

Izstrādāto kritēriju tabulu un sugas izpēti var izmantot kā protokolu vēl citu, šajā sadaļā neiekļauto mikroaļģu sugu novērtēšanai PNTS vai kādu citu augstvērtīgu savienojumu ražošanai vai izmantošanai dažādos nolūkos.

7. PĀRSKATS: KULTIVĀCIJAS TEHNOLOĢIJU IETEKMES NOVĒRTĒJUMS UZ DAŽĀDU CELMU MIKROAĻĢĒM

7.1. Siera sūkalu izmantošana mikroaļģu kultivācijā

Lai novērtētu mikroaļģu spēju augt dažādu kultivācijas tehnoloģiju ietekmē, tika veikti vairāki eksperimenti. Mikroaļģu kultivācijā tiek izšķirti trīs veidi: fotoautotrofs, heterotrofs un miksotrofs. To galvenā atšķirība ir mikroaļģu enerģijas avotu dažādība. Fotoautotrofās kultivācijas gaitā mikroaļģu augšanas procesā izmanto gaismu, kas var būt dabīgs gaismas avots (saules gaisma) vai mākslīgs gaismas avots, un oglekšābo gāzi, ko mikroaļģes daļēji var izmantot kā oglekļa avotu. Heterotrofās kultivācijas gaitā mikroaļģes tiek kultivētas tikai oglekļa avota klātbūtnē bez gaismas avota. Tas nozīmē, ka visa nepieciešamā enerģija mikroaļģu attīstībai tiek ņemta no tai pieejamā oglekļa avota augšanas barotnē. Miksotrofās kultivācijas gaitā mikroaļģes tiek kultivētas apstākļos, kur tai ir pieejams gan gaismas avots fotosintēzei, no kuras tiek iegūta enerģija, gan arī oglekļa avots barotnē, ko mikroaļģe spēj patērēt, lai papildus gūtu enerģiju attīstībai. Kā oglekļa avoti miksotrofā un heterotrofā kultivācijas tipā var tikt izmantoti: glikoze, laktoze, saharoze, fruktoze, melase, nātrija acetāts, siera sūkalas un citi (Abreu et al. 2022).

Mūsdienu tehnoloģiskie risinājumi tiecas uz pāreju no lineārās ekonomikas uz aprites ekonomiku. Produktam nonākot līdz tā dzīves cikla beigām, to nevis utilizē atkritumos, bet pārstrādā, lai varētu izmantot jaunu produktu ražošanā. Tādā veidā tiek ievēroti aprites ekonomikas principi, kas paredz samazinātu neatjaunojamo resursu ieguvī, samazinātu atkritumu daudzumu un papildzinātu resursu kopējo apriti (Ravindran, Jaiswal, 2016; Schilling, Weiss, 2021). Balstoties uz šiem principiem, mikroaļģu kultivācijai tika izmantoti pārtikas un lauksaimniecības blakusprodukts - sūkalas.

Sūkalas ir viens no galvenajiem blakusproduktiem, ražojot dažādus siera veidus un biezpienu. Sūkalas var sasniegt 85-95 % no izmantotā piena, saglabāt vairāk nekā pusi (55 %) no piena uzturvērtības un 20 % no kopējiem proteīniem (Mirabella et al. 2014; Ryan, Walsh 2016). Tiek uzskatīts, ka sūkalas ir viens no problemātiskākajiem blakusproduktiem starp lauksaimniecības un rūpniecības blakusproduktiem, jo tām ir plaša ietekme uz vidi, samērā maz relatīvi efektīvu valorizācijas iespēju un lieli apjomi (Zotta et al., 2020). Sūkalu ievērojami negatīvo ietekmi uz vidi nosaka to sastāvs un apjoms. Sūkalās ir augsts bioķīmiskais skābekļa patēriņš (BSP) un ķīmiskais skābekļa patēriņš (KSP). To vērtības sasniedz 60 g/l un 102 g/l. Salīdzinot ar pilsētas notekūdeņu rādītājiem 0,2 g/l un 0,41 g/l, kas ir par attiecīgi 99,66 % un

99,60 %, mazāk nekā sūkalām. Sūkalās ir liels daudzums laktozes, sasniedzot 60-70 %, kas nozīmē, ka sūkalām ir augsta noturība pret aerobo mikroorganismu vai ķīmisko oksidētāju izraisītu sadalīšanos (Niknezhad et al. 2015; Rama et al. 2019; Sommella et al. 2016).

Eksperimentā izmantotās mikroaļģes:

- *Graesiella emersonii* KM01;
- *Tetreadesmus obliquus* OM02;
- *Chromochloris zofingiensis* CCAP 211/14.

Barotnes:

Mikroaļģu kultivēšanai tika izmantotas 3N-BBM-V (*Bold Basal Medium* ar trīskāršo slāpekļa koncentrāciju un pievienotiem B grupas vitamīniem, modificēta) un **barotnes ar siera sūkalām** (skat. 7.1.1. attēlu).

Lai veiktu heterotrofās un miksotrofās augšanas eksperimentus, 3N-BBM-V barotne tika papildināta ar siera sūkalās biežāk sastopamajiem cukuriem – D-glikozi (*Enola*, Čehija), laktozi (*Enola*, Čehija) un D-galaktozi (*Enola*, Čehija). Izmantoto cukuru koncentrācija barotnē - 5g/l (Zhang et al. 2021). Tas nepieciešams, lai noskaidrotu, kura no kultivācijas metodēm ir produktīvāka, kā arī lai noskaidrotu, vai izvēlētās mikroaļģes spēj patērēt siera sūkalās esošos cukurus.



7.1.1.attēls. Mikroaļģu kultivācija barotnē ar siera sūkalām sākumā (pa kreisi) un eksperimenta gaitā (pa labi).

3N-BBM-V barotnes pagatavošana:

Barotnes sagatavošanas procedūra ir paredzēta tilpumam uz vienu litru. Tiek ņemti 10 ml ar NaNO_3 0,75 g/l šķīdumu ūdenī, 1 ml ar: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 g/l šķīdumu ūdenī, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0075 g/l šķīdumu ūdenī, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,0075 g/l šķīdumu ūdenī, KH_2PO_4 0,0175 g/L šķīdumu ūdenī, NaCl 0,0025 g/L šķīdumu ūdenī. Un 6 ml no mikroelementu šķīduma ūdenī ar šādu sastāvu: Na_2EDTA 0,0045 g/l, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,000582 g/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,000246 g/l, ZnCl_2 0,00003 g/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,000012 g/l, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,000024 g/l. Sagatavoto šķīdumu papildina ar destilētu ūdeni 1 L mērkolbā, līdz viena litra tilpumam. B grupas vitamīnu kompleksu pievieno barotnei pēc autoklāvēšanas (121°C, 0,5 atm., 30 minūtes), jo paaugstinātā temperatūrā vitamīni denaturējas. Vitamīni tiek pievienoti sterilos apstākļos laminārās plūsmas boksā ar sterilas šļirces un 0,22 µm poru filtru palīdzību.

Barotnes 3N-BBM-V ar cukuriem pagatavošana:

Lai iegūtu vēlamo barotnes gala koncentrāciju kopā ar dažādiem cukuriem, tiek pagatavota divas reizes koncentrētāka 3N-BBM-V barotne un divas reizes koncentrētāks cukuru šķīdums destilētā ūdenī.

Lai pagatavotu divas reizes koncentrētāku 3N-BBM-V barotni, visas sastāvdaļas ir jāņem divas reizes lielākā tilpumā. Laktozes, glikozes un galaktozes šķīdumu pagatavo divas reizes koncentrētāku atsevišķā kolbā. Izvēlēta cukura koncentrācija pagatavošanas brīdī ir nepieciešama divas reizes lielāka, nekā tas ir nepieciešams gala barotnē. Pēc barotņu sastāvdaļu autoklāvēšanas (121°C 0,5 atm., 30 minūtes) (Harrigan et al. 1998), sterilos apstākļos pievieno B grupas vitamīnus ar sterilas šļirces un 0,22 µm poru filtra palīdzību 3N-BBM-V barotnei. Beigās vienādās daļās sajauc kopā cukura šķīdumu un 3N-BBM-V barotni ar pievienotiem B grupas vitamīniem, tādējādi iegūstot vēlamo barotnes 3N-BBM-V un cukura koncentrāciju.

Barotnes ar sūkalām pagatavošana:

Sūkalu barotnes sagatavošanai tika izmantotas siera sūkalas no *A/S Rankas piens*. Siera sūkalas tika uzglabātas sasaldētas -15 °C PET pudelēs (1L). Pirms sūkalu izmantošanas, tās atkausējot istabas temperatūrā, pH tika noregulēts līdz 7,0. Lai noregulētu pH līmeni sūkalās, izmantoja 1M NaOH pH paaugstināšanai un 1M HCl - pH pazemināšanai. Attiecīgās barotnes koncentrācijas iegūšanai, sūkalas tika izmantotas neatšķaidītas vai atšķaidītas ar destilētu ūdeni.

Pēc barotnes pagatavošanas tā tika autoklāvēta (121°C 0,5 atm., 30 minūtes). Pēc autoklāvēšanas pH līmenis barotnē palika nemainīgs un nebija nepieciešama atkārtota pH regulācija.

Siera sūkalu sastāvs ir skatāms 7.1.1. tabulā. Siera sūkalu analīzes tika veiktas SIA J. S. HAMILTON laboratorijā.

7.1.1. tabula.

Siera sūkalu sastāvs.

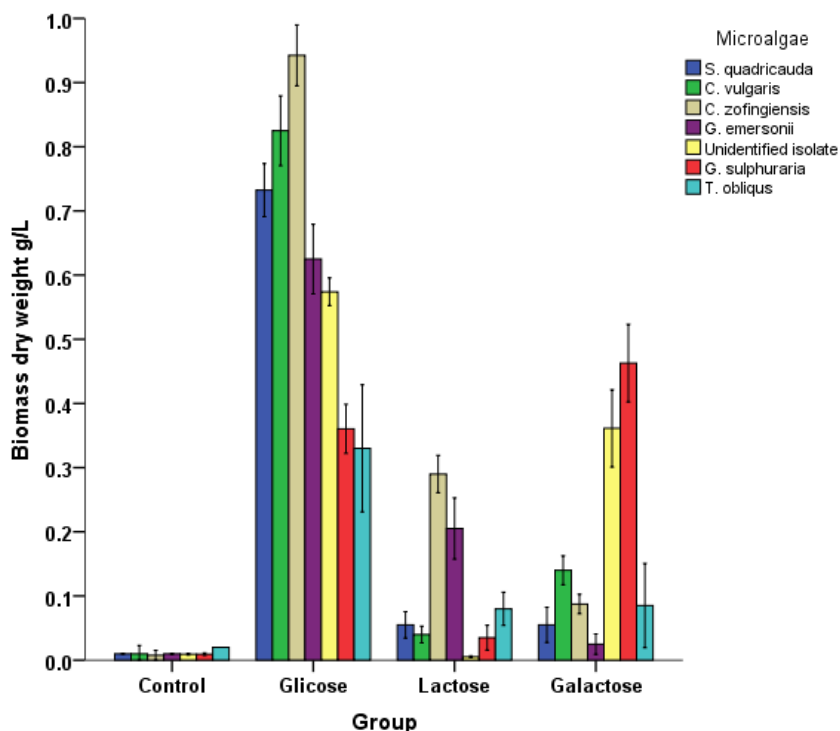
Sastāvs	Mērvienība	Koncentrācija
Laktoze	g/L	47 – 49
Glikoze	g/L	0,8 – 1,1
Galaktoze	g/L	0,3 – 0,4
Proteīni	g/L	8
Tauki	g/100g	0,8
K	mg/100g	164
Na	mg/100g	48,1
Ca	mg/100g	38,7
Mg	mg/100g	7,83

Mirkoalģu kultivācija:

Mirkoalģu kultivācija darba gaitā tika veikta trīs dažādos režīmos – fotoautotrofī, heterotrofī un miksotrofī. Visos kultivācijas režīmos tika izmantotas 100 ml Erlenmeijera kolbas ar kopējo barotnes tilpumu 50 ml (45 ml barotne un 5 ml sējmateriāls (10%)). Visas kultivācijas notika 25 °C temperatūrā, ar dienas:nakts režīmu 16:8 h fotoautotrofās un miksotrofās kultivācijas gadījumā. Apgaismojuma intensitāte barotnes līmenī bija 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (Rahimi & Jazini, 2021). Fotoautotrofā un miksotrofā statiskā kultivācija tika veiktas piespiedu konvekcijas termostatā (*Varicon aqua*, Lielbritānija) ar iepriekš minētajiem parametriem. Kultūras miksotrofās augšanas dinamikas eksperimentā tika izmantots rotācijas kratītājs (*Biosan*, Latvija), kur rotācijas ātrums tika uzstādīts uz 120 apgriezieniem, pārējiem parametriem paliekot tādiem kā minēts iepriekš. Heterotrofās augšanas nodrošināšanai tika izmantots dabiskās konvekcijas termostats (*Binder*, Vācija), kurā tika nodrošināta tumsa visu kultivācijas periodu.

Lai noskaidrotu izmaiņas gan barotnē, gan izmantotās kultivācijas tehnoloģijas produktivitātē, tika veiktas vairākas analītiskās metodes (skat. nodaļu “Analītiskās metodes”). Barotnēm tika noteikti cukuri gan eksperimenta sākumā, gan tā gaitā, lai noskaidrotu, cik lielā mēra mikroaļģes tos patērē. Mikroaļģu biomasai tika noteikti vairāki parametri – kopējie proteīni un oglehidrāti, pigmenti, kā arī tika novērtēts biomasas pieaugums laikā.

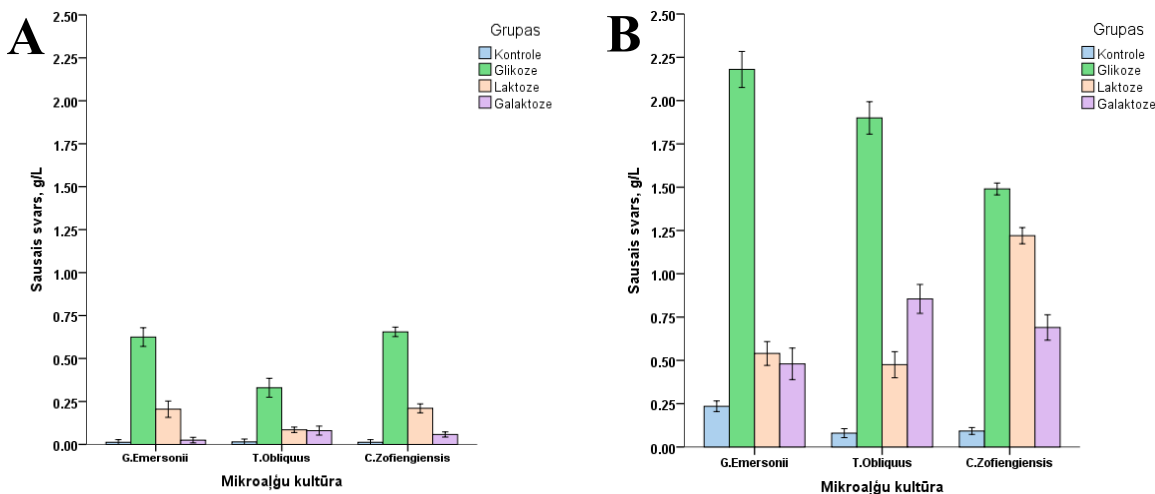
Rezultāti: eksperimenta pirmajā daļā tika pārbaudīts, kura no kultivācijas metodēm ir produktīvākā biomasas ražošanā. Sākotnēji tika pārbaudītas vairāku mikroaļģu (7) spēja augt heterotrofās kultivācijas režīmā ar dažādu cukuru pievienošanu barotnei (skat. 7.1.2. attēlu). Dažādu apsvērumu dēļ tika izvēlētas trīs mikroaļģes, ar kurām eksperiments tiks turpināts, kultivējot gan heterotrofi, gan miksotrofi.



7.1.2. attēls. Mikroaļģu *S. quadricauda*, *C. vulgaris*, *C. zoofinglensis*, *G. emersonii*, *G. sulphuraria*, *T. obliquus* un vēl nenodefinēta izolāta heterotrofās augšanas salīdzinājums glikozē, laktozē un galaktozē. $N = 3$, $\pm SD$.

Tika noskaidrots, ka ievērojami labāki rezultāti ir miksotrofās kultivācijas gadījumā visām aļģēm, salīdzinot ar heterotrofu kultivāciju, rezultātiem atšķiroties par vairāk nekā divas reizes (skat. 7.1.3. attēlu). Redzams arī, ka lielākā biomasa, salīdzinot ar kontroles grupu, kur ir

nemodificēta 3N-BBM-V barotne, ir barotnē ar pievienotu glikozi, pārsniedzot vērtības pat par 10 reizēm. Augstāki rādītāji par kontrolgrupu ir arī paraugos ar laktozi un galaktozi. Tas ļauj secināt, ka izvēlētās mikroaļģes augšanas procesā spēj patērēt siera sūkalās biežāk sastopamos cukurus un tie spēj paaugstināt mikroaļģu biomasas ražošanas produktivitāti. Šis ir svarīgs secinājums, lai turpinātu eksperimentu un izmantotu modificētās barotnes ar siera sūkalām.

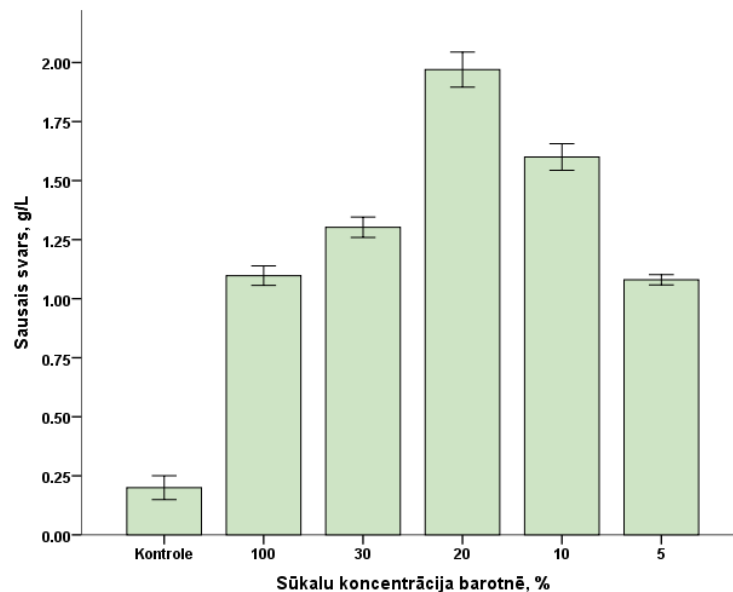


7.1.3. attēls. Mikroaļģu *G. emersonii*, *T. obliquus* un *C. zofingiensis* biomasas sausais svars, g/L heterotrofā (A) un miksotrofā (B) kultivācijā 3N-BBM-V barotnē ar laktozes, glikozes vai galaktozes piedevu, 5 g/L. Kontrola 3N-BBM-V barotnē bez laktozes, glikozes vai galaktozes piedevām. Statiska kultivācija, 25°C temperatūrā, dienas:nakts režīmā 16:8, pēc 14 dienu kultivācijas. $N=3 \pm SD$.

Nākošajā eksperimenta daļā tika veikta *G.emersonii* miksotrofa kultivācija siera sūkalās koncentrācijā - 100 % (neatšķaidītas), 30 %, 20 %, 10 % un 5 %, atšķaidījumus iegūstot ar destilētu ūdeni. Kā fotoautotrofa kontrole tika izmantota 3N-BBM-V barotne bez pievienotām siera sūkalām. Šādas siera sūkalu koncentrācijas tika izvēlētas balstoties uz iepriekšējos eksperimentos iegūtajiem rezultātiem. Pēc 14 dienu kultivācijas tika ievākta biomasa un iegūti sausā svara dati (skat. 7.1.4. attēlu).

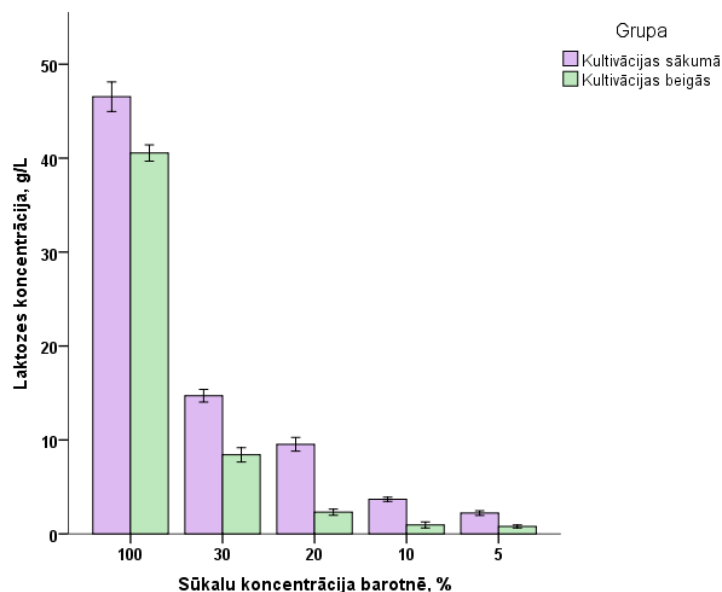
Mikroaļģes biomasas sausais svars kontroles grupā bija $0,20 \pm 0,06$ g/L. **Augstākais sausais svars tika iegūts 20 % sūkalu barotnē – $1,97 \pm 0,08$ g/L, kas ir par 89,85% vairāk nekā kontroles grupā.** Produktivitāte (Q_x) sasniedza $0,14$ g/L/d un iznākums no patērētā substrāta ($Y_{P/S}$) 27 %. Otrs augstākais biomasas sausais svars tika iegūts 10 % sūkalu barotnē – $1,60 \pm 0,06$

g/L, kas ir par 87,50 % vairāk nekā kontroles grupā. Grupā ar pievienotām sūkalām 30 % koncentrācijā sausais svars sasniedza $1,30 \pm 0,05$ g/L. Līdzīgs sausais svars tika iegūts grupās ar pievienotām siera sūkalām 100 % un 5 % koncentrācijā – $1,09 \pm 0,06$ g/L un $1,08 \pm 0,02$ g/L. Veicot datu statistisko analīzi, tika noskaidrots, ka statistiski būtiska atšķirība ($p < 0,05$) ir novērojama starp visām grupām, izņemot starp grupām ar pievienotām sūkalām 5 % un 100 % koncentrācijā, kur tika novērota statistiski nebūtiskā atšķirība ($p > 0,05$).



7.1.4. attēls. *G. emersonii* biomasas sausais svars siera sūkalu barotnē 100% (neatšķaidītas), 30%, 20%, 10% un 5% koncentrācijās. Kontrolē – fotoautotrofā kultivācija 3N-BBM-V barotnē bez pievienotām siera sūkalām. Statiska kultivācija, 25°C temperatūrā, dienas nakts režīmā 16:8, pēc 14 dienu kultivācijas.

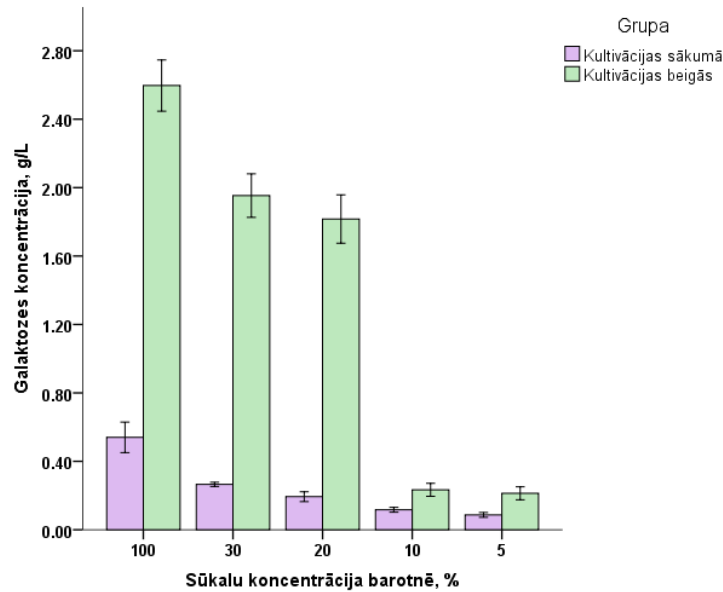
Laktozes izmaiņas *G. emersonii* miksotrofas kultivācijas gaitā siera sūkalu barotnē ir redzamas 7.1.5. attēlā. Statistiski būtiska ($p < 0,05$) atšķirība ir novērojama visās barotnēs starp laktozes sākuma un beigu koncentrācijām. Augstākais laktozes patēriņš tika novērots barotnē ar



7.1.5. attēls. Laktozes koncentrācijas izmaiņas siera sūkalu barotnē, *G.emersonii* kultivējot miksotrofi. Statiska kultivācija, 25°C temperatūrā, dienas nakts režīmā 16:8, pēc 14 dienu kultivācijas.

pievienotām siera sūkalām 20% koncentrācijā. Sākotnējā laktozes koncentrācija barotnē bija $9,53 \pm 0,29$ g/L un beigu koncentrācija bija $2,31 \pm 0,13$ g/L, kas ir samazinājums par 75,76%, kas norāda uz ievērojamu spēju izvēlētajai mikroaļģei patērēt laktozi.

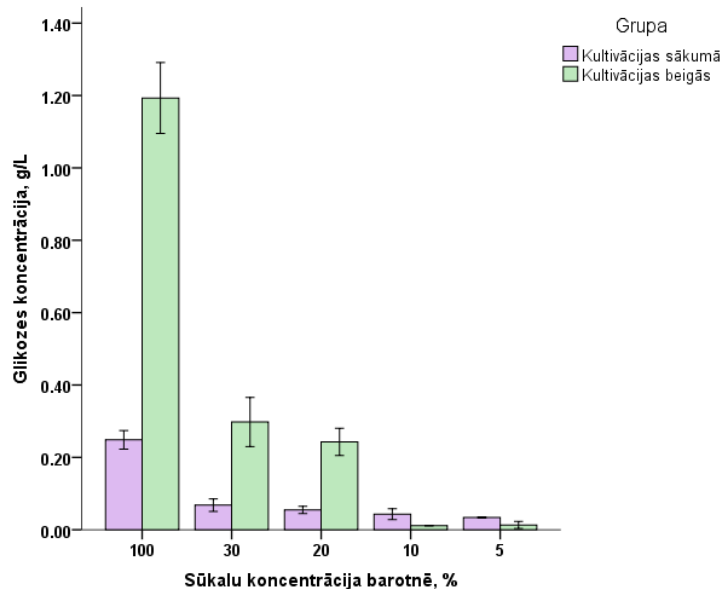
Galaktozes izmaiņas *G. emersonii* miksotrofas kultivācijas gaitā siera sūkalu barotnē ir redzamas 7.1.6. attēlā. Visās barotnēs tika novērota statistiski būtiska ($p < 0,05$) atšķirība starp sākuma un beigu galaktozes koncentrāciju barotnē. Augstākais galaktozes uzkrājums tika novērots barotnēs ar pievienotām siera sūkalām koncentrācijā 100 %, 30 %, 20 %. Zemākais uzkrājums tika novērots barotnēs ar pievienotām siera sūkalām koncentrācijā 10 % un 5 %.



7.1.6. attēls. Galaktozes koncentrācijas izmaiņas siera sūkalu barotnē, *G.emersonii* kultivējot miksotrofī. Statiska kultivācija, 25°C temperatūrā, dienas nakts režīmā 16:8, pēc 14 dienu kultivācijas.

Glikozes izmaiņas *G. emersonii* miksotrofas kultivācijas gaitā siera sūkalu barotnē ir redzamas 7.1.7. attēlā. Statistiski būtiska ($p < 0,05$) atšķirība tika novērota visās barotnēs starp glikozes sākuma koncentrāciju un beigu koncentrāciju. Glikozes pieaugums tika novērots barotnēs ar pievienotām siera sūkalām koncentrācijās 100 %, 30 % un 20 %.

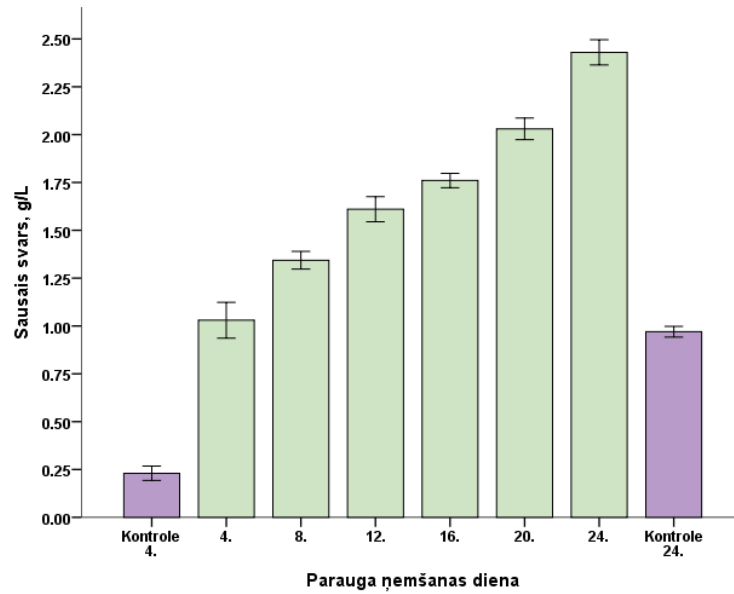
Barotnēs ar pievienotām siera sūkalām koncentrācijās 10 % un 5 % tika novērots glikozes koncentrācijas samazinājums. Lielākais glikozes pieaugums tika novērots barotnē ar pievienotām siera sūkalām 100 % koncentrācijā. Pieaugums tika novērots par 79,17 %.



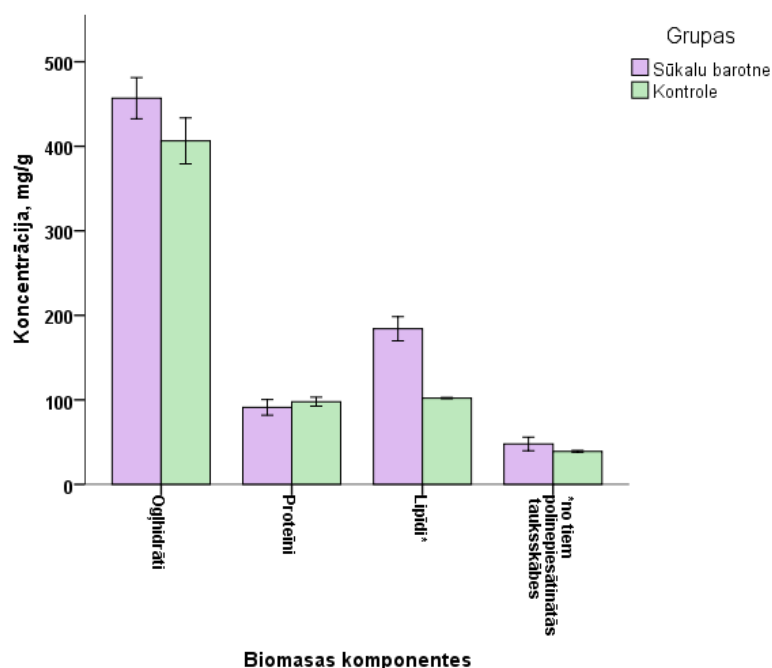
7.1.7. attēls. Glikozes koncentrācijas izmaiņas siera sūkalu barotnē, *G.emersonii* kultivējot miksotrofī. Statiska kultivācija, 25 °C temperatūrā, dienas nakts režīmā 16:8, pēc 14 dienu kultivācijas.

Balstoties uz iepriekšējā eksperimenta datiem, **kā optimāla tika izvēlēta siera sūkalu koncentrācija 20 %**. Eksperimentā tika veikta *G.emersonii* kultivācija orbitālajā kratītājā pie 120 rpm 24 dienas. Kontroles grupa tika kultivēta fotoautotrofī 3N-BBM-V barotnē, nepievienojot sūkalas. Paraugi tika ņemti ik pēc četrām dienām, sākot no kultivācijas sākuma. Pirmajā paraugā, kas tika ņemts ceturtajā dienā pēc kultivācijas uzsākšanas, tika ievākta biomasa no kontroles grupas un siera sūkalu grupas barotnēm. To sausais svars bija $0,23 \pm 0,03$ g/l un $1,03 \pm 0,08$ g/l, attiecīgi par 77,67 % vairāk sūkalu grupā nekā kontroles grupā jau pēc četrām kultivācijas dienām. Divdesmit ceturtajā kultivācijas dienā tika iegūts sausais svars arī kontroles grupai – $0,97 \pm 0,02$ g/L (7.1.8. attēlā).

Salīdzinot siera sūkalu grupu un kontroles grupu divdesmit ceturtajā dienā, siera sūkalu grupā ir par 60,08 % vairāk sausās biomasas nekā kontroles grupā. Produktivitāte (Q_x) kultivācijas beigās, 24. dienā, sasniedza 0,10 g/L/d un iznākums no patērētā substrāta ($Y_{P/S}$) 53 %. Veicot datu statistisko analīzi, ir novērojama statistiski būtiska atšķirība ($p < 0,01$) starp kontroles grupu un siera sūkalu grupu, kā arī ir novērojama statistiski būtiska atšķirība starp visiem siera sūkalu grupas paraugiem sākot no ceturtais līdz divdesmit ceturtajai dienai.



7.1.8. attēls. *G.emersonii* biomasas veidošanās dinamika, kultivējot miksotrofi siera sūkalu barotnē ar koncentrāciju 20%. Kontrolē – 3N-BBM-V barotnē bez siera sūkalām, kultivējot fotoautotrofi. Kultivācija veikta orbitālajā kratītājā pie 120 rpm, 25°C temperatūrā, dienas nakts režīmā 16:8.



7.1.9. attēls. *G.emersonii* biomasas sastāva izmaiņas siera sūkalu barotnē ar koncentrāciju 20%, salīdzinot ar fotoautotrofo kontroli 3N-BBM-V barotnē pēc 24 dienu kultivācijas. Kultivācija veikta orbitālajā kratītājā pie 120 rpm, 25°C temperatūrā, dienas nakts režīmā 16:8.

Tika novērots, ka sūkalu barotnē kultivētai mikroaļģei ir lielāks ogļhidrātu saturs biomasā, nekā fotoautotrofi iegūtajā biomasā attiecīgi $456,96 \pm 9,81$ mg/g un $406,31 \pm 10,94$ mg/g. Proteīnu saturs starp siera sūkalu barotni un fotoautotrofo kontroli neatšķīrās - $91,10 \pm 3,03$ mg/g un $97,78 \pm 2,15$ mg/g. Augstāks lipīdu saturs tika novērots siera sūkalu barotnē, salīdzinot ar fotoautotrofo kontroli - $184,16 \pm 5,75$ mg/g un $102,10 \pm 1,27$ mg/g.

Būtiskā atšķirība sastāvā attiecībā uz polinepiesātinātajām taukskābēm netika novērota biomasā, kas iegūta siera sūkalu barotnē un fotoautotrofā kontrolē, attiecīgi sasniedzot $47,81 \pm 3,08$ mg/g un $39,02 \pm 1,44$ mg/g (skat. 7.1.9 attēlu). Augstākas vērtības siera sūkalu barotnē tika novērota arī pigmentiem, īpaši kopējiem karotinoīdiem, kopējam hlorofilam un hlorofilam b. Nebūtiska atšķirība bija tikai hlorofilam a, salīdzinot ar kontrolgrupu. Šādi rezultāti liecina, ka siera sūkalu barotnē ir vielas, kas veicina karotinoīdu un hlorofila b sintēzi.

Potenciāli, lai iegūtu lielāku biomasas daudzumu un palielinātu sintēzi kādam no mikroaļģu šūnā sastopamiem metabolītiem, būtu jāveic siera sūkalu modifikācijas. Kā variants būtu siera sūkalu termiska apstrāde, kurai sekotu cieto daļiņu (proteīnu) atdalīšana ar mērķi samazināt proteīnu daudzumu siera sūkalās. Iespējams būtu jāveic enzimatiska vai cita veida hidrolīze, lai

samazinātu disaharīdu un monosaharīdu attiecību barotnē un mikroaļģei būtu vairāk viegli izmantojamu cukuru. Turpmākos pētījumos būtu svarīgi noskaidrot, vai siera sūkalu barotnē ir kāds limitējošs faktors, kas ierobežo mikroaļģes attīstību. Iespējama ir arī vairāku ražošanas vai lauksaimniecības blakusproduktu apvienošana vienā barotnē, kas introducētu citus cukurus vai augšanas faktorus kombinētajā siera sūkalu barotnē, kas tālāk varētu uzlabot mikroaļģu augšanu un potenciāli arī kāda no mikroaļģu šūnā sastopamo metabolītu pastiprinātu sintēzi. Būtu jāņem vērā, ka siera sūkalu modifikācija un biomasas sintēzes paaugstināšana varētu ietekmēt arī kopējās ražošanas izmaksas.

Taču kopumā mikroaļģu kultivācijas tehnoloģiskajos risinājumos piena ražošanas blakusproduktu iesaistīšanai ir liels potenciāls, pietuvojoties aprites ekonomikas pamatprincipiem, kā arī palielinot mikroaļģu biomasas pieauguma produktivitāti.

7.2. Siera un biezpiena sūkalu izmantošana mikroaļģu kultivācijā

Tika izmantotas A/S “Rankas piens” siera un biezpiena sūkalas, kuras pirms lietošanas tika uzglabātas -15°C PET pudelēs. Pirms lietošanas sūkalas tika atkausētas istabas temperatūrā un pēc atkausēšanas sūkalu pH tika noregulēts līdz 7. pH paaugstināšanai tika izmantots 1M NaOH, savukārt, 1M HCl šķīdums tika izmantots pH pazemināšanai. Sūkalas tika izmantots kā pamats barotņu sagatavošanai priekš mikroaļģu audzēšanas. Atbilstoši barotnes koncentrācijai sūkalas tika izmantotas atšķaidītas vai neatšķaidītas ar destilētu ūdeni. Pirms lietošanas sagatavotās barotnes liek sterilizēties autoklāvā (121°C, 0,5 atm, 30 minūtes).

Siera un biezpiena sūkalu sastāva analīzes tika veiktas SIA J.S. HAMILTON laboratorijā (skat. 7.2.1 un 7.2.2. tabulu).

7.2.1. tabula.

Siera sūkalu sastāvs.

Sastāvs	Mērvienība	Koncentrācija
Laktoze	g/L	47 – 49
Glikoze	g/L	0,8 – 1,1
Galaktoze	g/L	0,3 – 0,4
Proteīni	g/L	8
Tauki	g/100g	0,8
K	mg/100g	164
Na	mg/100g	48,1
Ca	mg/100g	38,7
Mg	mg/100g	7,83

7.2.2. tabula.

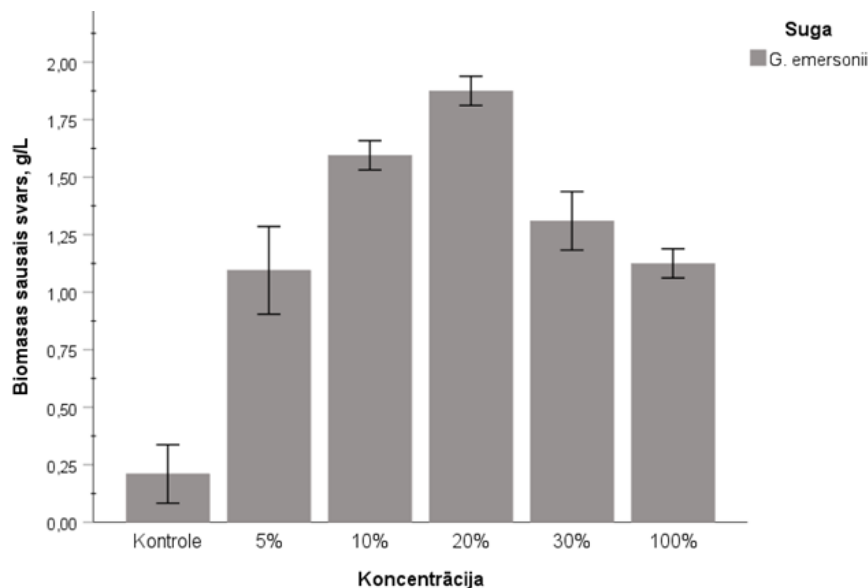
Biezpiena sūkalu sastāvs.

Sastāvs	Mērvienība	Koncentrācija
Laktoze	g/L	38 ± 0,8
Glikoze	g/L	1 ± 0,02
Galaktoze	g/L	1 ± 0,02
Proteīni	g/L	5 ± 0,2
Tauki	g/L	1,2 ± 0,06
K	mg/100g	112 ± 24
Na	mg/100g	31,5 ± 7,2
Ca	mg/100g	86,3 ± 20,7
Mg	mg/100g	8,27 ± 1,49

Mikroaļģes (*Tetrademus obliquus* OM02, *Graesiella emersonii* KM01) tika kultivētas sterilās 250 mL koniskajās kolbās, 100 mL barotnē (90 mL sūkalas un 10 mL sējmateriāls). Kultivācija notika termostatā ar apgaismojuma intensitāti līdz 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$, kas tika nodrošināts ar LED gaismām. Kultivācija ilga 10 dienas orbitālajā kratītājā pie 110 apgriezieniem minūtē. Mikroaļģu augšanas parametri sūkalās tika pārbaudīti pie dažādām temperatūrām. Pie

pazeminātām (15°C) tika izmantots divfāžu kultivācijas režīms, kur divas dienas mikroaļģes tika kultivētas 25°C, lai nodrošinātu vienādu sākotnējo saaugumu. Pēc divu dienu kultivācijas temperatūra tika samazināta uz nepieciešamo temperatūru.

Pētījumu gaitā tika izmantotas četras dažādas mikroaļģu sugas, taču labākos rezultātus (augstākās biomasas vērtības) uzrādīja divas no tām – *T. obliquus* un *G. emersonii*. Eksperimenta noslēgumā mikroaļģēm tika noteikts sausais svars un lipīdi, audzējot dažādas izcelsmes (siera un biezpiena) sūkalās, kā arī to koncentrācijās.



7.2.1. attēls. *G. emersonii* sausā svara (g/L) izmaiņas sūkalu barotnēs ar koncentrācijām 100% (neatšķaidītas), 80%, 50%, 30% un 10%. Kontrole – autotrofi kultivēta 3N-BBM-V barotnē bez pievienotām sūkalām. Kultivācijas tika veikta statistiski, 25°C temperatūrā, dienas nakts režīmā 16:8, 10 dienas.

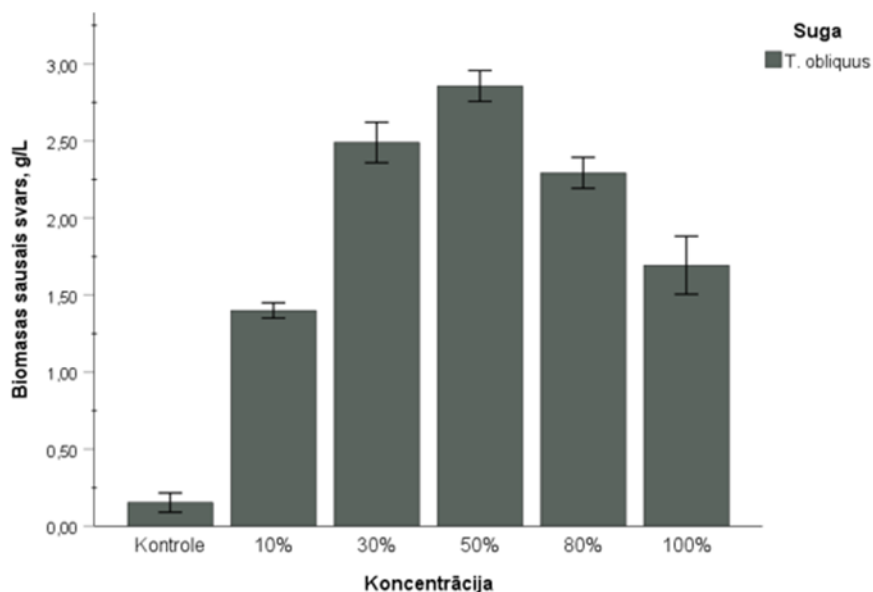
Optimālā sūkalu koncentrācijas noteikšana:

Eksperimentā ar siera sūkalām *G. emersonii* tika kultivēta dažādās siera sūkalu koncentrācijās – 100% (neatšķaidītas), 30%, 20%, 10% un 5%, atšķaidot ar destilētu ūdeni (skat. 7.2.1. attēlu). Kontrole (autotrofā kultivācija) tika kultivēta 3N-BBM-V barotnē bez pievienotām sūkalām. Sūkalu koncentrācija tika izvēlēta, pamatojoties uz laboratorijā veiktajiem eksperimentiem. Pēc desmit kultivācijas dienām tika ievākta biomasa, iegūts sausais svars (g/L). Kontroles grupā mikroaļģes sausais svars sasniedza $0,21 \pm 0,01$ g/L.

Lielākais biomasas svars tika iegūts 20% sūkalu barotnē – $1,86 \pm 0,03$ g/L, kas ir par 88,71% vairāk nekā kontroles grupā – tas norāda uz lielu potenciālu alternatīvās barotnes

izmantošanā. Otrs lielākais biomasas sausais svars tika iegūts 10% sūkalu barotnē – $1,64 \pm 0,03$ g/L, kas ir 87,20% vairāk nekā kontroles grupā. Līdzīgi sausie svāri tika iegūti 100% un 5% koncentrācijās: $1,08 \pm 0,07$ g/L un $1,08 \pm 0,03$ g/L. Starp grupām bija statistiski nozīmīga ($p < 0,05$) atšķirība, izņemot grupās ar sūkalu 5%, 30% un 100% koncentrāciju ($p > 0,05$).

T. obliquus sausais svārs kontroles grupā bija $0,21 \pm 0,01$ g/L, kas ir līdzīgs *G. emersonii* iegūtajam svāram kontroles grupā. Lielākais sausais svārs tika sasniegts 50% sūkalu barotnē – $2,87 \pm 0,08$ g/L, kas ir par 92,68% vairāk nekā kontroles grupā. Otrā lielākā biomasa tika sasniegta 30% sūkalu koncentrācijā $2,47 \pm 0,08$ g/L, tomēr netika novērota būtiska atšķirība ($p > 0,05$) ar biomasu, kas ir iegūta 80% sūkalu koncentrācijā. Labi iezīmējas produktīvākā sūkalu koncentrācija – 50 %.

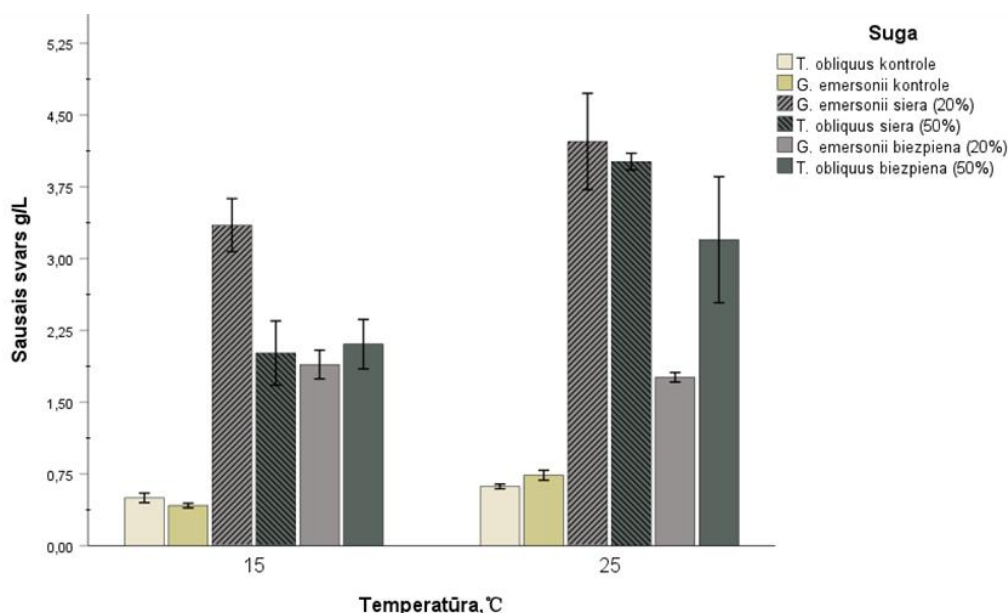


7.2.2. attēls. *T. obliquus* sausā svāra (g/L) izmaiņas sūkalu barotnēs ar koncentrācijām 100% (neatšķaidītas), 80%, 50%, 30% un 10%. Kontrole – autotrofi kultivēta 3N-BBM-V barotnē bez pievienotām sūkalām. Kultivācijas tika veikta statiski, 25°C temperatūrā, dienas nakts režīmā 16:8, 10 dienas.

Biomassas un tās sastāva novērtējums mikсотроfi kultivētām mikroaļģēm uz sūkalu substrātiem dažādās temperatūrās:

Eksperimentā ar siera un biezpiena sūkalām divām mikroaļģu sugām (*T. obliquus* un *G. emersonii*) optimālā un pazeminātā temperatūrā (15 un 25°C) pēc 14 dienu kultivēšanas tika pārbaudīts biomasas sausais svārs (g/L) (skat. 7.2.2. attēlu). Kontroles grupa - 3N-BBM-V barotnē

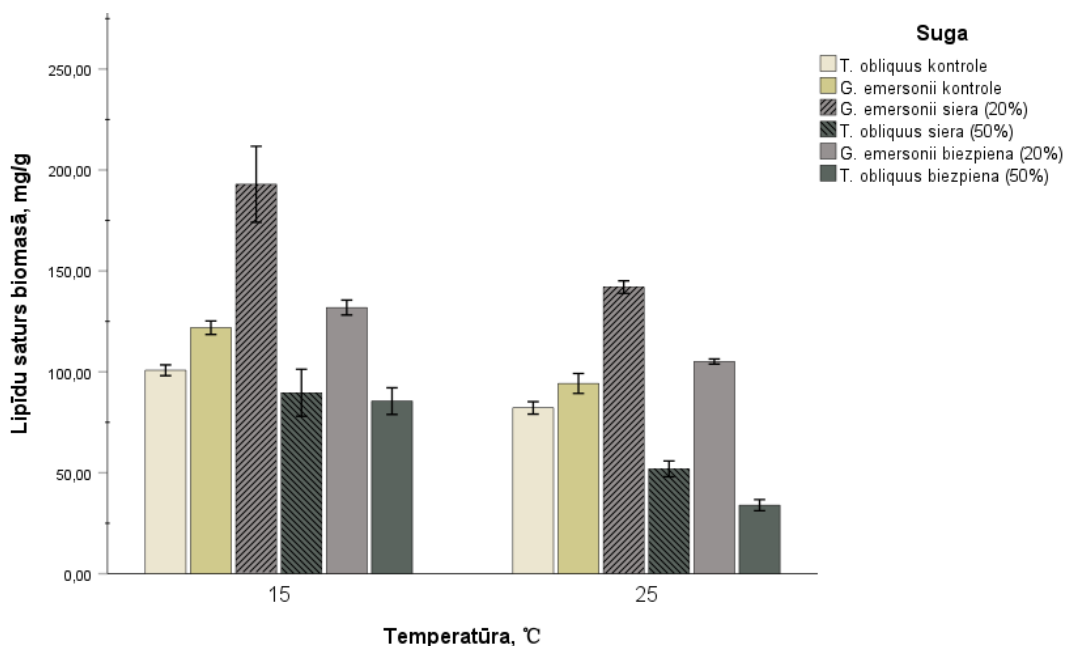
kultivētas mikroaļģes bez pievienotām sūkalām. Lielāko biomasas sausnas svaru 15 °C temperatūrā sasniedza *G. emersonii* kultūra uz siera sūkalu barotnes - $3,35 \pm 0,11$ g/L, kas ir 87,47% vairāk nekā kontroles grupā. Tā kā lipīdi lielākoties tiek saražoti zemākās temperatūrās (stresa apstākļos), šis secinājums ir ļoti būtisks. *T. obliquus* 15 °C temperatūrā sasniedza $2,11 \pm 0,10$ g/L sausā svara uz siera sūkalu barotnes, kas ir par 76,31 % vairāk nekā kontroles grupā, tomēr pēc statistiskās analīzes *T. obliquus* celmam nebija būtisku atšķirību ($p > 0,05$) uz siera un biezpiena sūkalām kultivētām kultūrām. *T. obliquus* un *G. emersonii* 25 °C temperatūrā sasniedza augstāko biomasas iznākumu uz siera sūkalu barotnes - $4,01 \pm 0,03$ g/L un $4,22 \pm 0,20$ g/L. Tā kā šī ir optimālā augšanas temperatūra abām mikroaļģu sugām, augstākie rezultāti bija paredzami, taču citādākas tendences var iezīmēties lipīdu sastāvā.



7.2.3. attēls. Mikroaļģu *G. emersonii* (20%) un *T. obliquus* (50%) biomasas sausais svars (g/L) uz siera un biezpiena sūkalām ar kontroles grupu pēc bez pievienotām sūkalām pēc 14 dienu miksotrofās kultivācijas. Kultivācijas tika veikta orbitālajā kratītājā pie 120 rpm, 15°C un 25°C temperatūrā, dienas nakts režīmā 16:8.

Pēc *T. obliquus* un *G. emersonii* iegūtajiem lipīdu rezultātiem uz biezpiena un siera sūkalām, bija novērojama lipīdu uzkrāšanās 15 °C temperatūrā (skat. 7.2.3. un 7.2.4. attēlu). Mikroaļģe *G. emersonii* uz siera sūkalām uzrādīja vislielāko lipīdu uzkrāšanos 15 °C temperatūrā - $192,93 \pm 7,57$ mg/g, kas ir par 36,84 % vairāk nekā kontroles grupā un par 31,66 % vairāk nekā uz biezpiena sūkalu substrāta. *T. obliquus* uz siera sūkalām un biezpiena sūkalām 15 °C

temperatūrā uzrādīja zemāku lipīdu daudzumu nekā kontroles grupās. Kontroles grupā lipīdu svars bija $100,78 \pm 1,07$ mg/g, siera sūkalās - $89,65 \pm 7,57$ mg/g, bet biezpiena sūkalās - $85,51 \pm 2,66$ mg/g. Augstākais lipīdu iznākums 25 °C temperatūrā bija *G. emersonii* celmam uz siera sūkalām - $141,99 \pm 1,25$ mg/g, kas ir par 35,04 % vairāk nekā kontroles grupā, tomēr tas ir par 26,41% mazāks nekā 15 °C temperatūrā sasniegtais svars. Viszemāko lipīdu sauso svaru 25 °C temperatūrā sasniedza *T. obliquus* uz biezpiena sūkalām - $33,96 \pm 1,11$ mg/g, kas ir par 58,67 % mazāk nekā kontroles grupā un par 34,60 % mazāk nekā uz siera sūkalu kultivētās barotnes. Kopumā redzams, ka lipīdu daudzums lielāks ir pazeminātā temperatūrā visos gadījumos, bet vislabākos rādītājus sasniedza *G. emersonii*, kultivējot 20% siera sūkalās.



7.2.4. attēls. Mikroaļģu *G. emersonii* (20%) un *T. obliquus* (50%) lipīdu saturs biomasā (mg/g) uz siera un biezpiena sūkalām ar kontroles grupu pēc bez pievienotām sūkalām pēc 14 dienu miksotrofās kultivācijas. Kultivācijas tika veikta orbitālajā kratītājā pie 120 rpm, 15°C un 25°C temperatūrā, dienas nakts režīmā 16:8.

Izvērtējot veikto eksperimentu rezultātus, redzams, ka piena ražošanas blakusproduktu izmantošanai mikroaļģu audzēšanā ir liels potenciāls, kas var ievērojami samazināt kultivācijas izmaksas, ņemot vērā, ka barotne sastāda aptuveni 30% no kultivācijas izmaksām. Īpaši labus rezultātus uzrādīja siera sūkalu izmantošana. Šī tehnoloģija ne tikai spēj aizstāt tradicionālo

barotni, saglabājot līdzvērtīgus biomasas rezultātus, bet spēj vairākkārtīgi arī šo rādītāju paaugstināt, kas ievērojami palielina mikroaļģu kultivācijas produktivitāti.

8. PROTOKOLS: TAUKSKĀBJU KVANTIFICĒŠANA DAŽĀDU MIKROAĻGU BIOMASĀ

Projekta ietvaros tika veikta polinepiesātināto taukskābju (PNTS) noteikšana mikroaļģu biomasā metodoloģijas atlase. Tika secīgi izmēģinātas trīs polinepiesātināto taukskābju noteikšanas metodes: **konjugēto diēnu metode, tiobarbitūrskābes (TBA) metode un IDF metode**. Apvienojot TBA metodi ar konjugēto diēnu metodi, TBA metode tika adaptēta (PNTS) noteikšanai no mikroaļģu ekstrahētiem lipīdiem.

Konjugēto diēnu metodoloģija:

Šī metode balstās uz triglicerīdu saponifikāciju un brīvo taukskābju enzīmātisko peroksidāciju. Peroksidācijas laikā rodas konjugētie diēni, kuru koncentrāciju var uzzināt, ja nomēra parauga OD₂₃₄. *Blank* mērījumu izdara ar parauga alikvotu, kam pievienots vārīts (neaktīvs) enzīms. Parauga OD₂₃₄ nomēra ar aktīvu (nevārītu) enzīmu. *Blank* mērījums ir jādara pirms katra parauga mērījuma, citiem vārdiem, no katra parauga ir jāsagatavo gan *blank* paraugs ar neaktīvu enzīmu, gan paraugs ar aktīvu enzīmu (MaxGee 1959).

Izmantotās mikroaļģes: *Tetrademus obliquus*

Izmantotās iekārtas:

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Spektrofotometrs	UV5Bio	Mettler toledo, Šveice
Vortekss	V-1	Biosan, Latvija
Analītiskie svāri	PLS 1200-3A	Kern&Sohn, Vācija
Magnētiskais maisītājs ar sildītāju	MSH – 300	Biosan, Latvija

Eksperimenta gaita:

Sākotnēji tiek sagatavoti reaģenti:

1. **Kālija borāta buferis 1.0 M, pH 9.0** - izšķīdina 61,9 g borskābes un 25 g kālija hidroksīda 800 ml destilētā ūdenī, maisot un karsējot uz magnētiskā maisītāja ar sildītāju. Pēc vielu pilnīgas izšķīšanas jāļauj reaģentam atdzist istabas temperatūrā. Šķīdumam tiek precizēts pH ar 1N sālskābi, lai tas precīzi sasniegtu pH 9.0. Pēc pH noregulēšanas, šķīdums tiek papildināts ar destilētu ūdeni līdz 1 L atzīmei.
2. **Kālija borāta buferis 0.2M, pH 9.0** – sagatavoto kālija borāta buferi 1.0M 200 ml pārnes uz 1 L mērtrauku. Tālāk pievieno destilētu ūdeni līdz 1 L atzīmei.
3. Lai sagatavotu **lipoksidāzes (enzīma) šķīdumu atšķaidījumiem**, ar analītisko svaru palīdzību mērkolbā (100 ml) tiek nosvērti 10 mg lipoksidāzes, kam pipetē 10 ml ledus aukstu 0.2 M kālija borāta buferi.
4. Tālāk tiek pagatavots nepieciešamais **atšķaidījums** – 15 ml plastmasa stobriņā tiek pipetēti 2 ml sagatavotā lipoksidāzes šķīduma, kam pievieno 8 ml ledus aukstu 0.2 M kālija borāta buferi.
5. Tiek sagatavots **karsēts atšķaidījums** - ar pipetes palīdzību 5 ml iepriekš sagatavotā atšķaidījuma pārvieto citā plastmasas stobriņā, kas tiek karsēts 5 min vāroša ūdens peldē.

Brīvās taukskābes. PNTS daudzumu brīvajās taukskābēs nosaka pēc to izšķīšanas 0.2 M kālija borāta buferī.

1. Mērkolba (1 L) tiek pipetēti 200 ml no 1.0M kālija borāta bufera. Līdz 1 L atzīmei tiek pievienots destilēts ūdens, lai iegūtu 0.2M kālija borāta buferi. Šķīdums tiek pievienots nepieciešamajam brīvo taukskābju paraugam.

Taukskābju esteri.

1. Sākotnēji jāveic esteru saponifikācija (pārziepjošanu) - paraugu, kas satur 0.5 mg polinepiesātinātās taukskābes, mērkolbā (100 ml) atjauc ar 1 ml 0.5N etanola kālija hidroksīdu (*alcoholic potassium hydroxide*), šķīdumu jānotur tumšā telpā vismaz 4 h.
2. Pēc saponifikācijas nepieciešams ar pipeti pievienot 20 ml 1.0M kālija borāta buferi un 1 ml sālskābi. Atlikušo daudzumu līdz 100 ml atzīmei piepilda ar destilētu ūdeni.

Tālāk tiek sagatavoti paraugi, kam tiks noteikts PNTS daudzums:

1. Mērkolbās (100 ml) uz analītiskajiem svāriem tiek iesvērta mikroaļģe *Tetrademus obliquus* – 3,0, 5,0, 6,5, 6,3, 5,9, un 6,4 mg. Lai pārbaudītu rezultātu patiesumu, paralēli tika sagatavoti paraugi ar zināmu PNTS cervonskābes (DHA) koncentrāciju. Katrā mērkolbā tiek pipetēti 100 ml 0.2M kālija borāta buferis. Šķīdums tiek samaisīts.
2. No katra parauga 3 ml tiek pārnesti uz stikla mēģenēm – pirmajā, kas tika lietota kā *blank* jeb nulles vērtība fotospektrometrā (katram neatkarīgam paraugam sava *blank* vērtība), tika pipetēti 3 ml sagatavotā parauga un 0,10 ml karsētā lipoksidāzes šķīduma. Otrajā stikla mēģenē (PNTS noteikšanas paraugs) tiek pipetēti 3 ml katra sagatavotā parauga un klāt tiek pipetēti 0,10 ml nekarsētais (aktīvais) lipoksidāzes šķīdums. Paraugi tiek vorteksēti un atstāti 30 min istabas temperatūrā. Pēc tam paraugi tika atkārtoti vorteksēti un pārnesti uz kvarca kivetēm.
3. Spektrofotometriski pie 234 nm tiek noteiktas paraugu absorbcijas vērtības.
4. PNTS daudzums tiek aprēķināts pēc formulas: $\% \text{ PNTS} = A * 3964 / W$, kur A = absorbciju atšķirība starp *blank* un parauga vērtību; W = parauga svars mikrogramos uz 3 ml parauga šķīduma.

Secinājumi:

Blank parauga mērīšanas laikā tika atšķelts OD₂₃₄, kas izveidojās pirms enzīma pievienošanas (piemēram, ekstrakcijas, uzglabāšanas vai saponifikācijas gaitā). Šī apsvēruma dēļ netika ņemts vērā tas PNTS daudzums, kas oksidējās pirms enzīma pievienošanas. Tādēļ, analīzes rezultāts ir mazāks par reālo PNTS saturu sastāvā.

Metodes dati nav konsekventi, kas liek secināt, ka dati varētu būt neprecīzi. Metode nav piemērota mūsu nepieciešamībām.

Blank parauga veidošana katram paraugam atsevišķi būtiski palielina laika faktoru.

TBA metodoloģija:

Tiobarbiturskābes (TBA) metode tiek balstīta uz TBA spēju veidot sarkanīgu kompleksu kopā ar malonilaldehīdu – PNTS peroksidācijas blakusproduktu. TBA veido kompleksu ar visu malonilaldehīdu, *blank* mērījums tiek veikts, izmantojot destilēto ūdeni, tādā veidā tiek detektēti visi peroksidācijas produkti, neatkarīgi no tā, kad tie radās: pirms vai pēc enzīma pievienošanas (Yagi 1998) (konjugētas diēnu metodes mīnuss, jo netiek detektēti visi peroksidācijas produkti).

Izmantotās mikroaļģes: *Tetrademus obliquus*

Izmantotās iekārtas:

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Spektrofotometrs	UV5Bio	Mettler toledo, Šveice
Vortekss	V-1	Biosan, Latvija
Analītiskie svāri	PLS 1200-3A	Kern&Sohn, Vācija
Magnētiskais maisītājs ar sildītāju	MSH – 300	Biosan, Latvija
Universālā centrifūga	FC5816	Ohaus, Vācija

Sākotnēji tiek sagatavoti reaģenti:

1. **N/12 H₂SO₄**;
2. **10 % fosforvolframskābe** (*phosphotungstic acid*);
3. **TBA reaģents** – 50% tilpuma etiķskābes anhidrīta + 50% tilpuma 0,67 % TBA šķīduma ūdenī (piemērs – 15 ml etiķskābes anhidrīta, 15 ml d.H₂O un 0,1 g TBA);
4. **n-Butanols**;
5. **Tetrametoksipropāns**.

Eksperimenta gaita:

1. 15 ml stobriņos ar analītisko svaru palīdzību tiek iesvērti 6 mg izvēlētajā *Tetrademus obliquus* mikroaļģe. Lai pārļiecinātos par metodes precizitāti, kā ceturtais no paraugiem bija tīrs DHA. Klāt biomasai tiek pipetēti 4 ml N/12 H₂SO₄. Saturs tiek viegli samaisīts.
2. Šķīdumam klāt tiek pipetēti 0,5 ml 10 % fosforvolframskābes un saturs tiek vorteksēts. Pēc samaisīšanas paraugam jānostāv 5 min istabas temperatūrā.
3. Paraugi tiek centrifugēti 1600 rpm uz 10 min. Pēc centrifugēšanas supernatants tiek izliets, bet sedimenti tiek aplieti ar 2 ml N/12 H₂SO₄ un 0,3 ml 10 % fosforvolframskābes. Šķīdums tiek atkārtoti centrifugēts pie 1600 rpm uz 10 min.
4. Supernatants tiek atkārtoti izliets un paraugam tiek pieliet 4 ml destilēts ūdens un 1 ml iepriekš sagatavotā TBA reaģenta.
5. Paraugus karsē ūdens peldē 60 min.

6. Pēc karsēšanas paraugi tiek atdzesēti aukstā ūdens peldē. Pēc atdzišanas tiek pievienoti 5 ml *n*-butanols. Saturs tiek kārtīgi sakratīts un centrifugēts 1600 rpm 15 min.
7. Pēc centrifugēšanas *n*-butanola slānis tiek savākts un pārliets kivetē. Uz fotospektrometra pie 515 nm un 533,6 nm tiek noteiktas paraugu absorbcijas vērtības (*blank* – destilēts ūdens).
8. **Viena punkta standarta šķīdumam**, ko izmantos, lai noteiktu lipīdu peroksidācijas līmeni (nmol/ml) paraugos, tiek sagatavots šķīdums 15 ml stobriņos ar 0,5 nmol tetrametoksipropānu 4 ml ūdens un 1 ml TBA reaģenta. Tiek atkārtots 5.-7. eksperimenta gaitas punkts.
9. Pēc formulas tiek aprēķināts lipīdu peroksidācijas līmenis paraugos: $0,5 \cdot f / F \cdot 1,0 / 0,002 = f / F \cdot 25$ (nmol/ml), kur F = viena punkta standarta šķīduma absorbcijas vērtība, bet f = paraugu absorbcijas vērtība.

Secinājumi:

Lai gan metodes rezultāti bija sekmīgi un konsekventi, laika faktora dēļ un ekonomiski neizdevīgo (dārgi nepieciešamie reaģenti) iemeslu dēļ, tika izmēģinātas piemērotākas metodes.

IDF metode.

IDF (*International Dairy Federation*) metode balstās uz peroksidācijas produktu iekrāsošanu ar amonija tiocionātu. Literatūrā šo metodi pielieto, lai uzzinātu eļļu oksidācijas pakāpi. Par metodes piemērotību eļļu analīzēm liecina arī organisko šķīdinātāju izmantošana (Uluata et al. 2015).

Izmantotās mikroaļģes: *Tetrademus obliquus*

Izmantotās iekārtas:

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Spektrofotometrs	UV5Bio	<i>Mettler toledo</i> , Šveice
Vortekss	V-1	<i>Biosan</i> , Latvija
Analītiskie svāri	PLS 1200-3A	<i>Kern&Sohn</i> , Vācija
Magnētiskais maisītājs ar sildītāju	MSH – 300	<i>Biosan</i> , Latvija

Eksperimenta gaita:

1. Tiek sagatavota emulsija – sagatavošanai tika izmantots 1% no sojas pupiņu eļļas 10 mM nātrija acetāta/imidazola buferšķīdumā (šķīduma pH 4.0). Šis šķīdums ir bez oksidējamām taukskābēm. Masa tiek homogenizēta.
2. Šķīdumam tiek pievienots *Tween-20*, kas strādās kā emulgators ar attiecību 1:10 (emulgators/sojas pupiņu eļļa).
3. Masai tiek pievienots tīrs DHA dažādās koncentrācijās – pirmajā mēģinājumā no 3,2 mg/100 ml līdz 0,1 mg/100 ml (atšķaidot katru nākamo par 50 %) un otrajā mēģinājumā no 14,8 mg/100 ml līdz 0,4625 mg/100 ml (atšķaidot katru nākamo par 50 %)
4. 15 ml stobriņā tiek pipetēta 0,3 ml sagatavotā emulsija (ar visiem atšķaidījumiem). Tā tiek sajaukta ar 1,5 ml izooktāna/2-propanola šķīdumu (3:1 v/v). Šķīdums tiek vorteksēts trīs reizes 10 s. Sagatavotais šķīdums tiek cetrifugēts 3400 rpm 10 min.
5. Pēc cetrifugēšanas šķīdums sadalās slāņos – no augšējā slāņa ar pipetes palīdzību tiek paņemti 200 µL un sajaukti ar 2,8 ml metanola/butanola šķīdumu (2:1 v/v). Tālāk tiek pievienoti 15 µL 3.94 M amonija tiocianāta un 15 µL Fe²⁺ šķīduma (supetnatants no 0.132 M BaCl₂, 0,3 M NaCl, un 0.144 M FeSO₄). Kad viss sajaukts, šķīdumi tiek atkārtoti vorteksēti un atstāti 20 min istabas temperatūrā pirms mērījumu veikšanas.
6. Sagatavotos šķīdumus atkārtoti vorteksē un pārlej uz kivetēm. Absorbcijas vērtības tiek mērītas pie 510 nm fotospektrometrā.

Secinājumi:

Mūsu mēģinājums šo metodi adoptēt mikroaļģu lipīdu analīzēm nebija sekmīgs. Nesanāca iegūt sakarīgu un konsekventu kalibrācijas līkni ($R(1)=0,2624$; $R(2)=0.9629$) un paraugu rezultātus. Absorbiju mērījumu vērtības bija pārāk zemas. Šī metode ir piemērota eļļu analīzēm (arī literatūrā to izmanto tieši eļļu analīzēm), nevis taukskābju ūdens šķīdumu analīzēm, kas ir mūsu gadījumā.

Apvienotā TBA + konjugēto diēnu + Folha metode.

Tiobarbiturskābes (TBA) metode tiek balstīta uz TBA spēju veidot sarkanīgu kompleksu kopā ar malonilaldehīdu – PNTS peroksidācijas blakusproduktu (Yagi 1998). No konjugēto diēnu metodes tika aizgūts peroksidēt PNTS enzimatiski (MacGee 1959). Aprakstāmo metodi var iedalīt 4 daļās: **ekstrakciju pēc Folha (Folch et al., 1957), saponifikāciju, enzimatisko peroksidāciju un iekrāsošanu ar TBA.**

Izmantotās mikroaļģes: *Tetrademus obliquus*, *Graesiella emersonii*, *Scenedesmus quadricauda*

Izmantotās iekārtas:

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Spektrofotometrs	UV5Bio	Mettler toledo, Šveice
Vortekss	V-1	Biosan, Latvija
Analītiskie svāri	PLS 1200-3A	Kern&Sohn, Vācija
Magnētiskais maisītājs ar sildītāju	MSH – 300	Biosan, Latvija
Universālā centrifūga	FC5816	Ohaus, Vācija
Kratītājs-inkubators	ES-20	Biosan, Latvija

Eksperimenta gaita:

Sākotnēji tiek sagatavoti reaģenti:

1. **0.5M KOH etanola šķīdums** – 2,8 g KOH, 5 ml dH₂O, 95 ml EtOH;
2. **0,5M NaCl** – 4,17 ml HCl, 96 ml d.H₂O;
3. **1,0M kālija borāta buferis** – 61,9 g H₃BO₃, 25 g KOH, 800 ml d.H₂O – visu samaisīt uz magnētiskā maisītāja līdz izšķīst borskābe. Pieregulēt pH līdz 9.0 ar sālskābi un pievienot 200 ml d.H₂O;
4. **0.2M kālija borāta buferis** – 200 ml 1.0M kālija borāta buferis, 800 ml d.H₂O;
5. **Lipoksidāzes šķīdums** – 10 mg lipoksidāzes enzīma, 10 ml d.H₂O. Svarīgi šķīdumu uzglabāt saldētavā. Arī pēc atkausēšanas nepieciešams turēt vēsumā, piemēram, auksta ūdens peldē, lai enzīms turpina palikt aktīvs;

6. **TBA reaģents** – 50% tilpuma etiķskābes anhidrīta + 50% tilpuma 0,67 % TBA šķīduma ūdenī (piemērs – 15 ml etiķskābes anhidrīta, 15 ml d.H₂O un 0,1 g TBA).

Ekstrakcija pēc Folha:

1. Polinepiesātinātās taukskābes kopā ar pārējiem lipīdiem tiek ekstrahētas ar Folha metodes palīdzību. Izmanto 25 - 30 mg sausās mikroaļģu biomasas un ievēro Folha protokolu;
2. Nosver sausās 100 mL kolbas (kam var uzlikt stikla korķi), un tajās ielej Folha metodes gaitā iegūto lipīdu ekstraktu. Kolbas liek termostātā šķīdinātāja iztvaikošanai;
3. Tās nosver un nosaka lipīdu svaru (zinot mikroaļģu biomasas iesvaru var aprēķināt lipīdu % saturu tajā).

Saponifikācija jeb pārziepjošana:

4. Veic iegūto lipīdu saponifikāciju. Šim nolūkam kolbās ar lipīdu ekstraktu tika pipetēts 10 ml 0,5 M KOH etanola šķīdums un novietots kratītājā uz 140 rpm bez gaismas piekļuves 4 stundas;
5. Pēc saponifikācijas kolbās tika pievienots 10 ml 0,5 M HCl, 20 ml 1,0 M kālija borāta bufera un 60 ml destilēts H₂O. Kolbas liek uz magnēta maisītāja uz 5 min, lai pilnīgi izšķīdinātu uz kolbas pamata pielīpušo lipīdu ekstraktu;

Enzimātiskā peroksidācija:

6. No katras 100 ml kolbas ar saponificēto taukskābju šķīdumu tika pipetēti 4 ml un ievietoti 15 ml plastmasas stobriņos;
7. Katrā stobriņā tika pievienoti 40 ml lipoksidāzes šķīdums;
8. Stobriņi horizontāli tika ievietoti maisītājā (140 rpm) uz 60 minūtēm;

Iekrāsošana ar TBA:

9. Katra stobriņa saturam pievienoja 1 ml TBA reaģenta;
10. Stobriņi ar aiztaisītiem korķiem tika ielikti uz 1 stundu verdoša ūdens vannā;

Absorbcijas vērtību noteikšana:

11. Pēc karsēšanas stobriņi tika izņemti no verdošā ūdens vannas un atdzesēti tekošā ūdenī;
12. Pēc atdzesēšanas stobriņu saturs tika vorteksēts;
13. No katra stobriņa tika paņemts 1 ml satura, kas tika pipetēts kivetē;

14. Kivešu saturam tiek mērīta absorbcija gaismas spektrofotometrā pie 531 nm viļņu garuma (*blank* ir destilēts ūdens);
15. Lai aprēķinātu PUFA koncentrāciju (mg/100 ml) izmanto kalibrācijas līknes vienādojumu;
16. Lai aprēķinātu PUFA saturu (%), PUFA koncentrāciju (mg/100 ml) izdala ar ekstrahēto lipīdu koncentrāciju paraugā (mg/100 ml) un reizina ar 100 %.

Secinājumi:

TBA veido kompleksu ar visu malonilaldehīdu, *blank* mērījums tiek veikts, izmantojot destilēto ūdeni, tādā veidā tiek detektēti visi peroksidācijas produkti, neatkarīgi no tā, kad tie radās - pirms vai pēc enzīma pievienošanas. Tas izskaidro, kāpēc iegūtie rezultāti (PUFA %) ir lielāki, nekā konjugēto diēnu metodē.

Iegūtie rezultāti bija konsekventi, bez lielām standartklūdām, kas apstiprina tās rezultātu ticamību. Arī kalibrācijas līknes augstās R vērtības ($R(1)=0,9996$; $R(2)=0,9963$) norādīja uz metodes iegūto rezultātu ticamību.

Iepriekš minēto iemeslu dēļ metode tika izvēlēta par standartmetodi tālākām PNTS kvantitatīvo rādītāju analīzēm.

9. PROTOKOLS: URĪNVIELAS METODES IZMANTOŠANA PNTS FRAKCIJAS IEGŪŠANAI

Polinepiesātināto taukskābju (PNTS) frakcijas iegūšanai no mikroaļģēm tika izmantota urīnvielas jeb karbamīda ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) metode. Metodes izvēle balstās uz tās vienkāršību un iespējamību veikt bez specifiskas aparatūras. PNTS frakcijas atdalīšanas mēģinājumiem tika izmantotas divas mikroaļģu sugas:

- *Dunaliella salina* (5 g sausas aļģu masas);
- *Tetrademus obliquus* (10 g sausas aļģu masas – dubulta deva pie attiecīgā šķīdinātāju daudzuma).

Izmantotās iekārtas:

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Analītiskie svāri	PLS 1200-3A	Kern&Sohn, Vācija
Dabiskas konvekcijas termostats (žāvkapis)	ED-S 115	Binder, Vācija
Elektriskā plīts		LabHEAT, Vācija
Magnētiskais maisītājs ar sildītāju	MSH – 300	Biosan, Latvija
pH/ORP-metrs	HI 2211	Hanna, Taizeme
Spektrofotometrs	UV5Bio	Mettler toledo, Šveice
Universālā centrifūga	FC5816	Ohaus, Vācija
Vortekss	V-1	Biosan, Latvija

Saponifikācija:

Abi mikroaļģu paraugi tika iesvērti koniskajās kolbās (1000 ml). Atsevišķi uz laboratorijas plīts ar magnētisko maisītāju līdz 60 °C tika uzsildīti šķīdums - 760 ml 96 % etanols ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) un 16 g kālija hidroksīds (KOH). Pēc uzsildīšanas šķīdums tiek pievienots paraugiem - katram 380 ml 96 % etanols un 8 g kālija hidroksīds. Maisījumus turpina sildīt ap 60 °C uz laboratorijas plīts ar magnētisko maisītāju 1,5 h.

1. Paraugiem pievieno 100 ml destilēta ūdens;
2. Tālāk tiek pievienoti 200 ml heksāna;
3. Koniskās kolbas (1000 ml) viss saturs tiek pārliets dalāmajā piltuvē, lai atdalītu hidroalkoholisko slāni no heksāna slāņa, kur izšķīdušas taukskābes (skat. 9.1. attēlu);



9.1. attēls. Heksāna pievienošana maisījumam un tā pārlišana dalāmajā piltuvē, lai atdalītu hidroalkoholisko slāni no heksāna slāņa.

4. Otrā un trešā darbība katram paraugam tiek atkārtota piecas reizes, lai pēc iespējas efektīvāk tiktu atdalītas heksānā izšķīdušās taukskābes;
5. Hidroalkoholiskā fāze (apakšējā, tumšā, kas nesatur heksānu) tiek paskābināta ar sālsskābi (HCl), līdz istabas temperatūrā tā sasniedz pH 1, izmantojot pH-metru;
6. Paskābinātajai hidroalkoholiskajai fāzei tiek atkārtota otrā un trešā darbība piecas reizes, lai pēc iespējas efektīvāk atdalītu visas paraugā esošās taukskābes;
7. Katram paraugam visu atdalīto heksāna slāni destilē vakuuma destilatorā (skat. 9.2. attēlu) un pašas beigas (aptuveni 30 ml) pārlej stikla svarglāzē ar vāciņu (pirms tam tukša svarglāze ar visu vāciņu tiek nosvērta!) un ievieto žāvskapī uz nakti 80 °C.



9.2. attēls. Heksāna atdalīšana no taukskābēm, izmantojot vakuuma destilatoru.

Pēc žāvēšanas tika iegūtas taukskābes (skat. 9.3. attēlu):

- No *Tetradesmus obliquus* 10 g – **0,8041 g**;
- No *Dunaliella salina* 5 g – **0,2368 g**.



9.3. attēls. *Tetradesmus obliquus* (pa kreisi) un *Dunaliella salina* (pa labi) atdalītās taukskābes.

Tetradesmus obliquus pēc taukskābju atdalīšanas uzreiz tika veikta **urīnvielas kompleksu veidošana**, kas ir galvenais process PNTS atdalīšanai.

Urīnvielas kompleksu veidošana *Tetrademus obliquus*:

Urīnvielas kompleksu veidošanā pamats ir urīnvielas tendence kristalizēties ap taukskābju oglekļa virknēm, kas satur vienkāršas oglekļa saites (Mendes et al. 2006).

1. Paraugam tiek pievienota urīnviela (4:1 attiecība pret paraugu) 3,22 g;
2. Paraugam tiek pievienots metanols (CH_3OH) 8,62 g (11,8 ml) (lai urīnviela/metanols būtu 373 g/l);
3. Maisījumu silda uz laboratoriskās plīts ar metāla maisītāju 60-65 °C (skat. 9.4. attēlu). Maisījuma šķidrā fāze diezgan ātri iztvaiko, kas liecina par pārāk augstu temperatūru, jo mazā tilpuma dēļ šķidrums ātri uzkarst un pārsniedz nepieciešamo temperatūru;



9.4. attēls. Parauga karsēšana un maisīšana urīnvielas un metanola šķīdumā.

4. Iegūtais saturs tiek uz nakti ielikts termostatā +4 °C, lai turpinātu veidoties urīnvielas kompleksi (kristāli).
5. Nākošajā dienā saturs tiek pārliks uz polistirola stobriņu (15 ml), tiek sablīvēts ar stikla nūjiņu un centrifugēts 15 min ar 8000 rpm.

6. Pēc centrifugēšanas ar 1 ml pipetes palīdzību tiek savākta parauga šķidrā daļa (skat. 9.5. attēlu). Piektais un sestais punkts tika atkārtots piecas reizes, lai pēc iespējas vairāk tiktu savākta parauga šķidrā daļa;

Kopā tika ievākti 0,5 ml parauga šķidrā daļa. Tā kā daudzums ir ļoti mazs, netiek veikta tālāka parauga attīrīšana. Ar analītiskās metodes palīdzību tiek noteikts, ka no iegūtā parauga aptuveni 20 % sastāda polinepiesātinātās taukskābes, kas ir aptuveni 0,1 ml no 10 g sausas *Tetrademus obiquus* aļģu masas.

Rezultāti ir ļoti zemi, ņemot vērā, ka tika izmantots divas reizes lielāks paraugs priekš attiecīgā šķīdinātāju daudzuma. Turklāt, lai iegūtu aptuveni 0,1 ml PNTS, bija nepieciešami 2 L heksāna.



9.5. attēls. Paraugs pēc centrifugēšanas 15 min ar 8000 rpm - šķidrā daļa tiek savākta ar 1 ml pipetes palīdzību.

Dunaliella salina pēc taukskābju atdalīšanas tika veikta **trasmetilēšana** un **kristalizācija** pirms urīnvielu kompleksu veidošanas.

Transmetilēšana:

Iegūtās taukskābju frakcijas no parauga tiek transmetilētas par taukskābju metilesteriem.

1. Paraugam pievieno 4,410 ml metanola;
2. Tālāk tiek pievienots 0,088 ml sērskābes (H_2SO_4) (lai attiecība būtu 49:1 metanols/sērskābe);
3. Šķīdumu karsē aptuveni 5 min 80°C ;
4. Pēc atdzesēšanas līdz istabas temperatūrai, tiek pievienots 12,2 ml destilēts ūdens un 12,2 ml heksāna;
5. Ar pipetes palīdzību tiek atdalīts heksāna slānis (heksāns tiek pievienots un atdalīts divas reizes) un tas tiek likts žāvēties žāvskapī 80°C ;

Kristalizācija:

Lai papildus attīrītu paraugu, tiek izmantota kristalizācijas (angl. *winterization*) metode.

6. Iegūtajai masai tiek pievienoti 2 ml heksāna un paraugs tiek atstāts uz nakti -18°C , kuras laikā būtu jāizveidojas kristāliem, taču šajā gadījumā tie neizveidojās, līdz ar to nākošajā dienā heksāns tika iztvaicēts žāvskapī 80°C .

Urīnvielas kompleksu veidošana *Dunaliella salina*:

Šajā reizē metanola un urīnvielas proporcija ir 3,4 (masa pret masu), bet parauga attiecība pret urīnvielas daudzumu šajā gadījumā netiek ievērota, lai neatkārtotos ātra metanola iztvaikošana pie konkrētās temperatūras, jo parauga svars ir ļoti mazs.

1. Sākotnēji tiek ņemti 10,284 g metanols, kas tiek sajaukts ar 3,02 g urīnvielas;
2. Šķīdums tiek karsēts un maisīts uz laboratorijas plīts ar magnētisko maisītāju $60-65^\circ\text{C}$ līdz tas ir dzidrs;

3. Tālāk tiek pievienots paraugs un viss maisījums tiek karsēts aptuveni pus h (līdz taukskābes izšķīst metanolā) ūdens peldē 60-65°C (šajā reizē izteikti redzama kristālu veidošanās jau uzreiz kā paraugs tiek noņemts no karsēšanas avota (skat. 9.6. attēlu);



9.6. attēls. Paraugs kristalizācijas procesā.

4. Paraugs tiek uz 2 naktīm ielikts termostatā +4°C, lai turpinātu kristalizēties;
5. Pēc kristalizācijas paraugs tiek pārlikts uz polistirola stobriņu (15 ml) un centrifugēts 10 min pie 8000 rpm, lai atdalītu kristālisko un šķidro frakciju;
6. Ar pipetes palīdzību tiek atdalīta kristāliskā no šķidrās frakcijas;
7. Šķidrajai frakcijai tiek pievienoti 4 ml destilēts ūdens, kas uzkarsēts līdz 60°C, un 8 ml heksāns. Šķīdums tiek vorteksēts un ar pipetes palīdzību tiek atdalīts heksāna slānis. Heksāna pievienošana un atdalīšana tiek atkārtota trīs reizes;
8. Heksāna slānis svarglāzē ar vāciņu (kas iepriekš tiek nosvērts) tiek likts žāvskapī 80 °C;
9. Pēc žāvēšanas saturs tiek nosvērts - tiek iegūti 0,028 g, kas visticamāk nav tīras PNTS, jo saturā redzami arī balti un melni kristāli.

Arī šajā gadījumā iegūtais gala rezultāts ir ļoti mazs, jo no 5 g aļģu masas tika iegūti 0,56 % PNTS, kuras nepieciešams vēl papildus attīrīt.

10. PROTOKOLS: LIPĪDU FRAKCIJAS IEGŪŠANA NO MIKROAĻĢĒM

Tā kā, izmantojot urīnvielas metodi, nepieciešams izmantot kaitīgus šķīdinātājus un tās gala rezultāti nenodrošina tīru polinepiesātināto taukskābju maisījumu, tika izmēģinātas alternatīvas metodes lipīdu frakcijas iegūšanai no mikroaļģēm ar mazāk kaitīgiem šķīdinātājiem, kas nodrošinātu iespēju to drošākai izmantošanai rūpnieciskas ražošanas apstākļos.

Metodes pamatā ir standarta Soksleta ekstrakcija, kura apskatīta Ramluckan et al. (2014) publikācijā. Tās gaitā tika pārbaudīti dažādi šķīdinātāji un to ietekme uz lipīdu frakcijas izvilkšanas daudzumu, kur viens no šķīdinātājiem bija etanols, kura pielietojums ir plašs arī pārtikas rūpniecībā.

Tika pētīta mikroaļģu biomasas koncentrācijas maiņas ietekme uz lipīdu un pigmentu gala masu, izmantojot **Soksleta ekstrahēšanas metodi**. Tika pētīta arī alternatīva, ātrāka metode – **mikroviļņu asistētā ekstrakcija**, kur, līdzīgi kā iepriekš, tika pētīta vairāku parametru maiņas ietekme uz lipīdu ekstrakcijas un pigmentu gala rezultātu.

Lai novērtētu gala produkta kvalitāti izvilktajai lipīdu masai, tika veikti vairāki kvalitātes novērtēšanas mērījumi – lipīdu kvantitatīvā noteikšana izmantojot Folha metodi (lai noteiktu, cik liela masas daļa no iegūtā produkta ir lipīdi, cik liela – piemaisījumi), hlorofila kvantitatīvā noteikšana uz 1 g ekstrahēto lipīdu (hlorofils kopā ar lipīdiem šķīst etanolā, kas dod zaļu līdz melnu krāsu gala produktam), polinepiesātināto taukskābju (PNTS) kvantitatīvā noteikšana (PNTS ir lipīdu apakšvienība, kas etanolā šķīst kopā ar lipīdiem, ir nepieciešams raksturot iegūto lipīdu kvalitāti ar PNTS masas attiecību pret kopējo lipīdu masu, lai varētu spriest par dažādu piesātināto taukskābju koncentrāciju tajā) un lipīdu oksidēšanās pakāpi (tā raksturo produkta kvalitāti, ja lipīdi ir oksidējušies, tajos var veidoties brīvie radikāļi, citi toksīni un zust eļļās esošie vitamīni, kas negatīvi ietekmē dzīvos organismus), lai noteiktu labākos mikroaļģu lipīdu uzglabāšanas apstākļus.

Eksperimentu mērķis ir noskaidrot vieglas, videi draudzīgas un ekonomiski izdevīgas metodes un dažādu apstākļu ietekmi uz lipīdu (tai skaitā polinepiesātināto taukskābju) frakcijas iegūšanu no *Spirulina platensis* un *Chlorella vulgaris* mikroaļģēm. Kā arī ar dažādiem kvantitatīviem parametriem (lipīdu, PNTS, hlorofila saturs, oksidācijas pakāpe) raksturot iegūtā produkta kvalitāti un novērtēt tā drošu pielietojumu kā barības piedevu dzīvjiem organismiem.

Mikroaļģu koncentrācijas ietekme uz lipīdu iznākumu ar Soksleta ekstrakciju

Izmantotās mikroaļģes: *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*

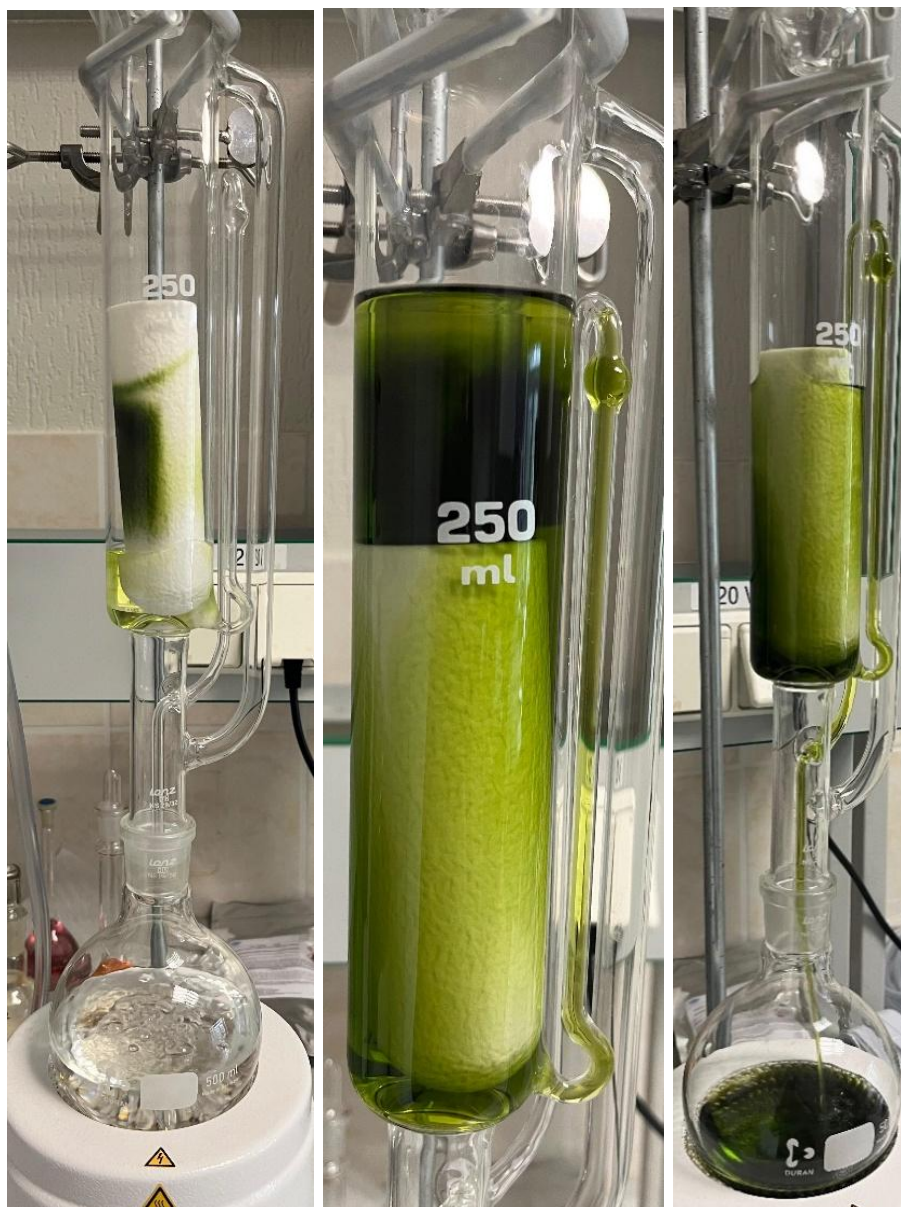
Izmantotās iekārtas:

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Analītiskie svāri	PLS 1200-3A	Kern&Sohn, Vācija
Piespiedu konvekcijas termostats	CTC	Varicon aqua, Lielbritānija
Elektriskā plīts		LabHEAT, Vācija

Ekspērimēta gaita:

1. Uz analītiskajiem svāriem tiek nosvērts celulozes uzpirkstenis un pierakstīts tā svārs. Tajā tiek iesvērta mikroaļģes (*Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*) biomasā un piefiksēts tās precīzais iesvārs, lai pēc ekstrakcijas varētu noteikt svāra zudumu no biomasas (izvilkto lipīdu un pigmentu daudzumu gramos);
2. Apaļkolbā, kas atrodas soksleta aparāta apakšējā daļā tiek iepildīti precīzi 300 ml 96 % etanola. To novieto uz elektriskās laboratorijas plīts;
3. Uzpirkstenis ar pincetes palīdzību tiek uzmanīgi ielikts soksleta aparāta parauga novietošanas daļā un tas tiek novietots uz iepriekš minētās apaļkolbas;
4. Virs parauga daļas tiek novietota trešā (pēdējā) dzesēšanas daļa, kuru pievieno ūdens krānam, lai nodrošinātu nemītīgu dzesēšanu lipīdu ekstrakcijai laikā;
5. Pirms elektriskās plīts ieslēgšanas, soksleta aparātu nostiprina un pagriež vaļā aukstā ūdens krānu, lai sākas dzesēšana. Ieslēdz elektrisko plīti, uzstādot to uz maksimālo karstumu (karsēšanas režīmi - 1-10), pēc pirmās etanola piles, kas nonāk parauga nodalījumā, plīts karstumu noregulē par vienu iedaļu zemāku (uz 9). Sākās lipīdu frakcijas iegūšana (skat. 10.1. attēlu) – pirmajā eksperimenta daļā ļauj soksleta aparātā etanolam iziet trīs pilnus ciklus, kas ilgst aptuveni 3 stundas.
6. Pēc lipīdu ekstrakcijas šķīdumam (ar lipīdiem un pigmentiem) veic destilāciju vakuuma destilatorā (skat. 10.2. un 10.3. attēlu), lai atbrīvotos no etanola (ierīces izkārtējums redzams urīnvielas metodes protokolā).

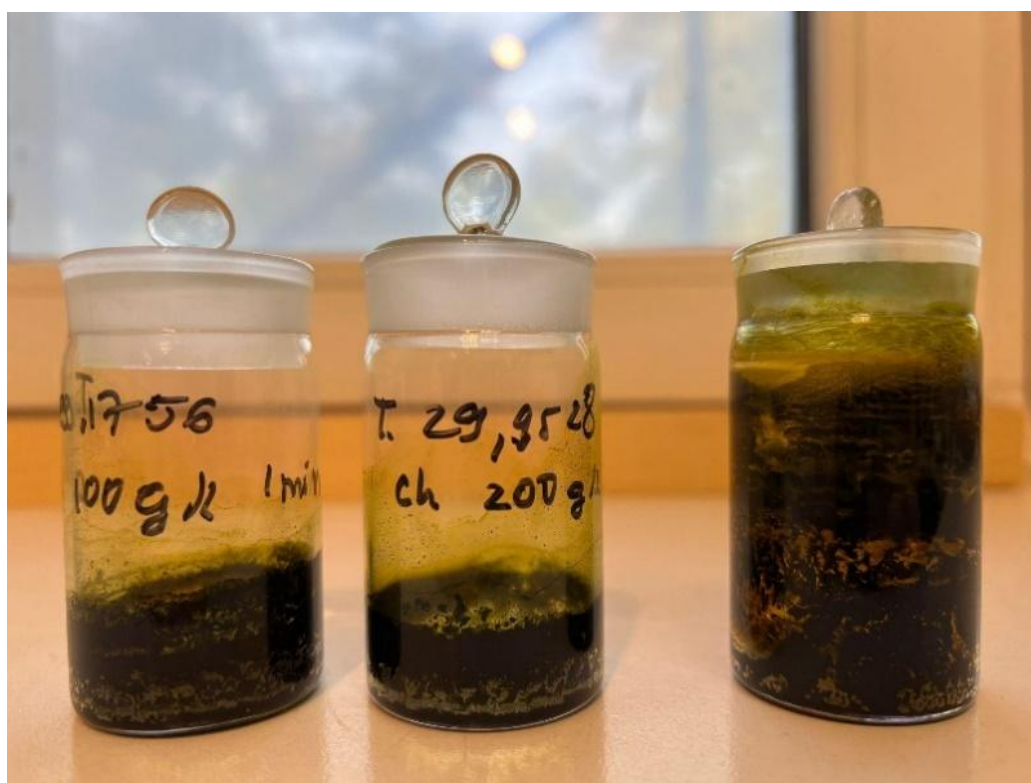
7. Lai lipīdu masa nepieliptu pie apaļkolbas dibena, pēdējie mililitri (30-50) tiek pārlieti iepriekš nosvērtā stikla trauciņā ar vāku un saturs tiek ievietots žāvskapī uz nakti aptuveni 25 °C, lai lēnam iztvaikotu atlikušais etanols, bet lipīdus nepakļautu oksidācijai.
8. Pēc parauga izžūšanas, tas tiek nosvērts uz analītiskajiem svariem un tiek aprēķināta starpība ar tukšo sikla trauciņu (ar vāku) svars, lai iegūtu lipīdu un pigmentu masas svaru no parauga.



10.1. attēls. Lipīdu ekstrahēšana Soksleta aparātā dažādos posmos.

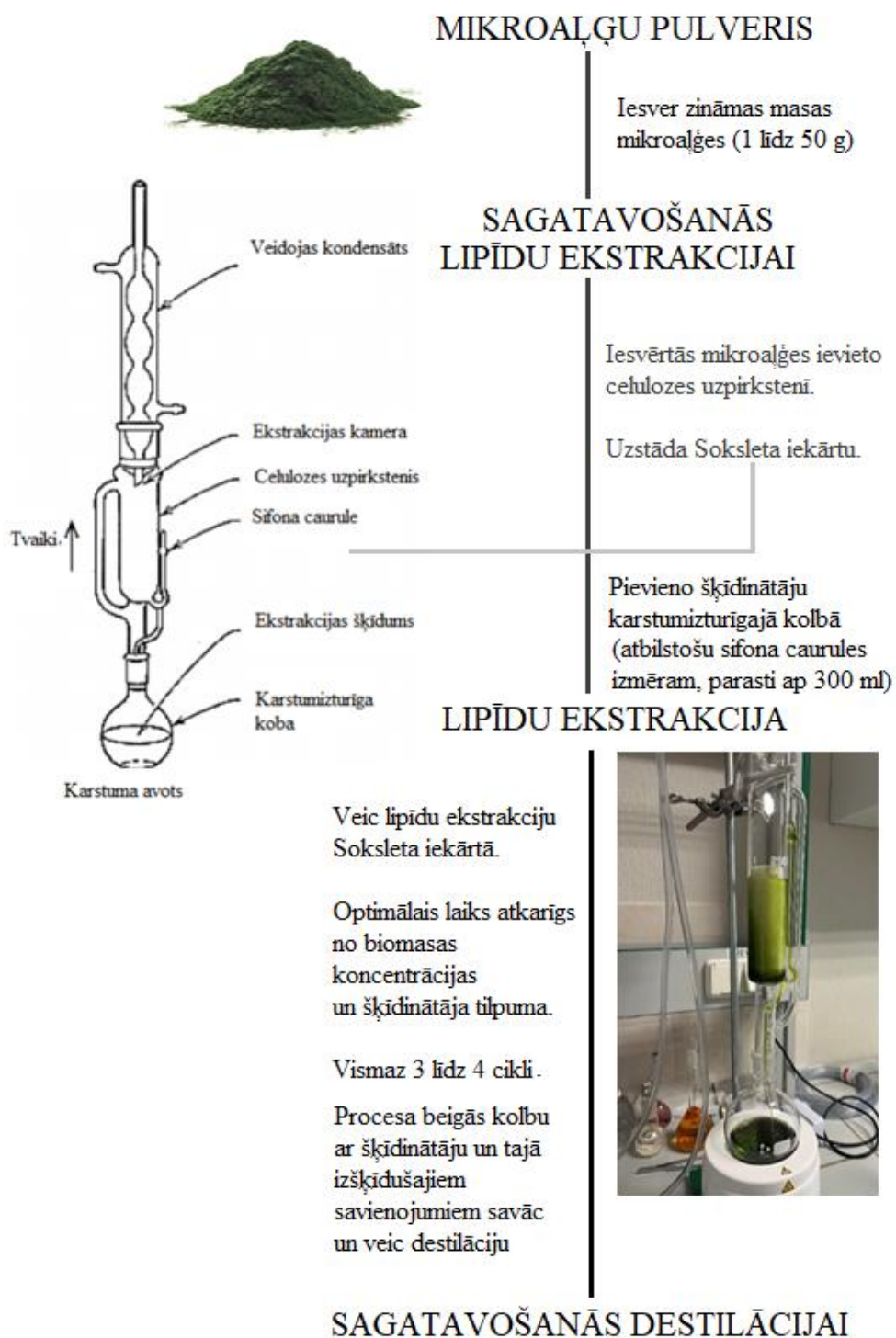


10.2. attēls. Šķīdinātāja (etanola) vakuumdestilācija procesā.



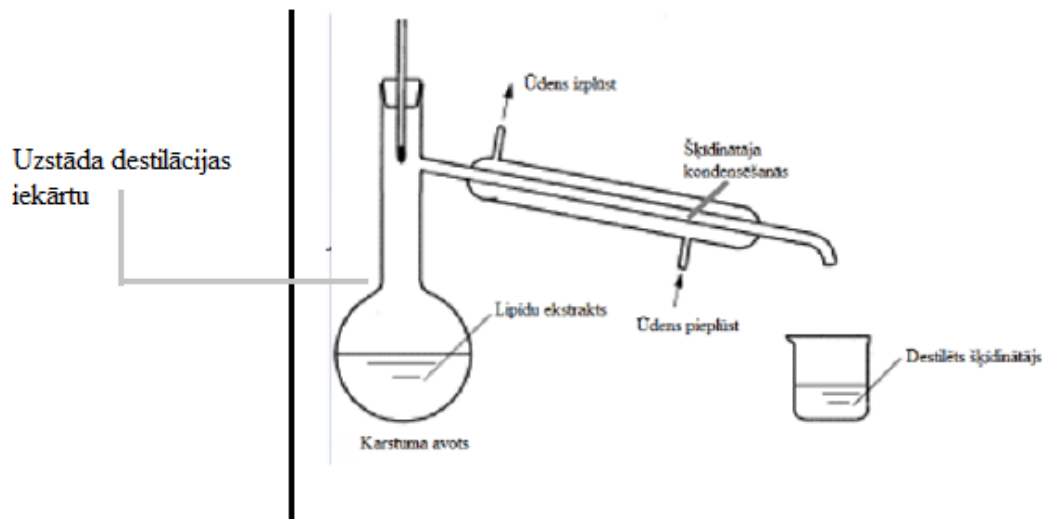
10.3. attēls. Neattīrītu lipīdu frakcija (“*crude oil*” angl.).

Darba gaitas shematisku attēlojumu var skatīt divos sekojošajos attēlos (skat. 10.4. un 10.5. attēlu).



10.4. attēls. Lipīdu ekstrakcija ar Soksleta iekārtu un šķīdinātāja destilācija ar lipīdiem bagātas frakcijas iegūšanai no mikroalģēm. Shematisks attēlojums (I).

SAGATAVOŠANĀS DESTILĀCIJAI



DESTILĀCIJAS PROCESS



Destilējot savāc lielāko daļu šķīdinātāja, aptuveni 90 %.

Atlikušo koncentrēto lipīdu ekstraktu pārnēs mazākā karstumizturīgā traukā.

30 līdz 40°C iztvaicē atlikušo šķīdinātāju.

LIPĪDU FRAKCIJA

Pēc šķīdinātāja pilnīgas iztvaicēšanas, tiek iegūta mikroaļģu lipīdu frakcija. Tās tīrības pakāpe var svārstīties starp 80 līdz 90%. Lipīdu saturā tiek iegūtas arī polinepiesātinātās taukskābes. Papildus lipīdiem neattīrītas frakcijas sastāvā var būt dažādi dabiski mikroaļģu antioksidanti kā pigmenti un fenoli.

10.5. attēls. Lipīdu ekstrakcija ar Soksleta iekārtu un šķīdinātāja destilācija ar lipīdiem bagātas frakcijas iegūšanai no mikroaļģēm. Shematisks attēlojums (II).

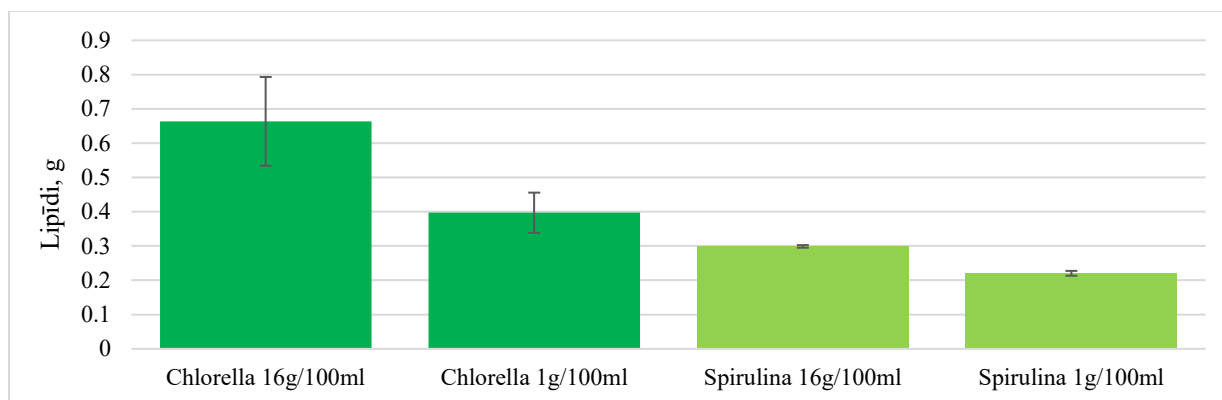
Soksleta eksperimentu rezultāti

Soksleta ekstrakcijas eksperimentos tika pētīta divu mikroaļģu (*C. vulgaris* un *S. platensis*) biomasas koncentrācijas attiecība pret etanolu (šķīdinātāju) kā ietekmējošo faktoru lipīdu frakcijas iegūšanai. Visos eksperimentos ekstrakcija ilga trīs pilnus ciklus (aptuveni trīs stundas), ar divām biomasas koncentrācijām (1g/100 ml un 16 g/100 ml), tika veikti divi neatkarīgi atkārtojumi, etanola tilpums visos gadījumos - 300 ml.

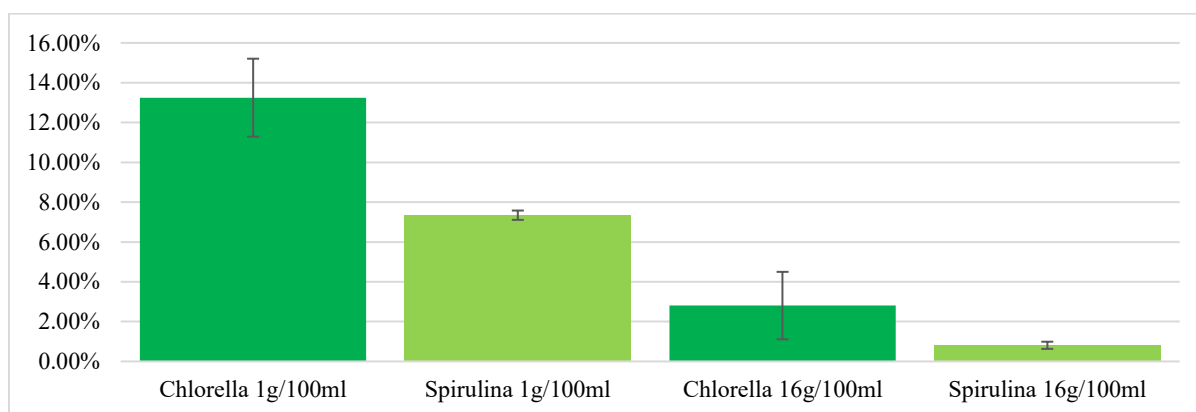
No eksperimentiem tika iegūti dažādi procesa un iznākuma raksturojošie parametri – faktiskais lipīdu iznākums (norāda, kādu masu ar lipīdu frakciju konkrētajos uzstādījumos izdevies iegūt, neņemot vērā tās tīrību), lipīdi no 1 g biomasas (raksturo to, cik lielu lipīdu masu pie konkrētajiem uzstādījumiem ir iespējams iegūt, neņemot vērā tās tīrību), tīrības pakāpi (lipīdu frakcijā esošo lipīdu saturs, izteikts procentos) un PNTS saturu lipīdos (raksturo to, cik lielu masu no tīras lipīdu frakcijas, attīrītas ar Folha metodi, sastāda PNTS, nenorādot to saturu faktiskajā lipīdu frakcijā).

Skatoties uz faktisko lipīdu frakcijas iznākumu (skat. 10.6. attēlu), var teikt, ka iegūtie rezultāti loģiski saskan ar sakarību – jo vairāk mikroaļģu biomasas, jo lielāka lipīdu frakcijas masa. Kopumā augstāki rezultāti tika sasniegti ar *C. vulgaris*, kur pie 16 g/l neattīrītu lipīdu frakcija sasniedza $0,66 \pm 0,12$ g un pie 1 g/l – $0,40 \pm 0,06$ g. Savukārt, *S. platensis* attiecīgi $0,30 \pm 0,003$ g un $0,22 \pm 0,007$ g. Rezultāti parāda, ka krietni lielāka efektivitāte, iegūstot lipīdus no biomasas, pie 300 ml šķīdinātāja tilpuma, ir pie mazākām biomasas koncentrācijām (skat. 10.7. attēlu). Lai gan faktiski abos gadījumos pie palielinātas biomasas koncentrācijas tika iegūts vairāk lipīdu, vidējā vērtību atšķirība starp šiem uzstādījumiem ir 20-40 % robežās, tomēr pie palielinātas biomasas koncentrācijas tās ir 16 reizes vairāk nekā pie samazinātas, kas liek domāt par procesa efektivitātes samazināšanos.

Galvenais iemesls, kāpēc pie lielākas biomasas proporcionāli netika sasniegta līdzvērtīga lipīdu masa, ir nepietiekams ekstrakcijas ciklu skaits. Tāpēc tika izmēģināts arī īpaši ilgāks ekstrakcijas process. Piemēram, iesverot 16 g/l *C. vulgaris* uz 300 ml šķīdinātāja un Soksleta ekstrakciju atstājot ieslēgtu 72 h, iegūtā lipīdu frakcija sasniedza 2,74 g, kas veidoja 5,72 % no biomasas iesvara. Tika novērots, ka ilgi ekstrahēta biomasa kļuva balti pelēcīga jeb atkrāsojās (skat. 10.8. attēlu). Tas liecina par augstu ekstrakcijas efektivitāti, jo lielāka daļa pigmentu ir pārgājuši šķīdinātājā. Tā kā gan pigmenti, gan lipīdi šķīst etanolā, tas ļauj secināt, ka arī lielākā daļa lipīdu varētu būt pārgājuši šķīdinātājā.



10.6. attēls. Faktiskais lipīdu frakcijas iznākums (g) ar Soksleta ekstrakciju atkarībā no biomasas koncentrācijas un mikroaļģu sugas, $t = 3$ cikli.

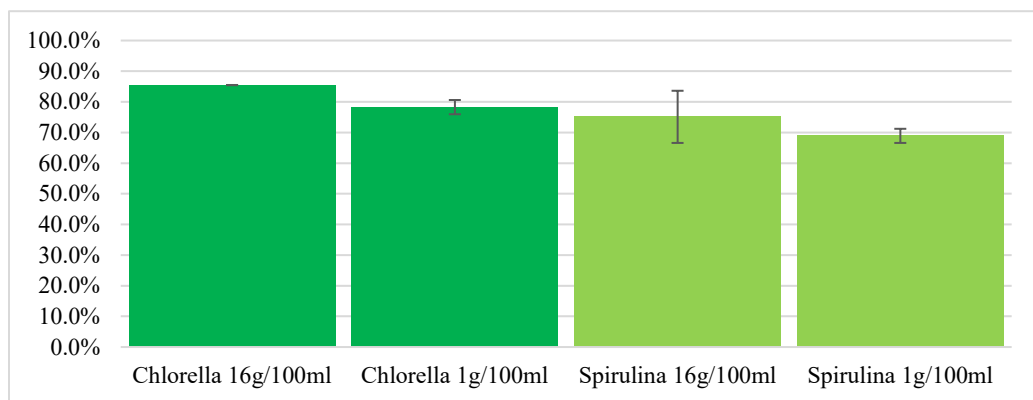


10.7. attēls. Lipīdu frakcijas iznākums no 1 g biomasas ar Soksleta ekstrakciju atkarībā no biomasas C , g/l un mikroaļģu sugas.



10.8. attēls. *C. vulgaris* atkrāsojisies biomasa pēc 72 h Soksleta ekstrakcijas.

Tika skatīta arī lipīdu tīrība iegūtajā frakcijā (skat. 10.9. attēlu). Šajā posmā netika veiktas papildus attīrīšanas procedūras, jo pēc būtības, ekstrahējot ar Soksleta metodi, šķīdinātājā nevajadzētu nonākt biomasai. Pēc lipīdu attīrīšanas to tīrība visās frakcijās svārstījās no 70 līdz 85 %. *C. vulgaris* vidējās vērtības kopumā bija nedaudz augstākas nekā *S. platenis*.



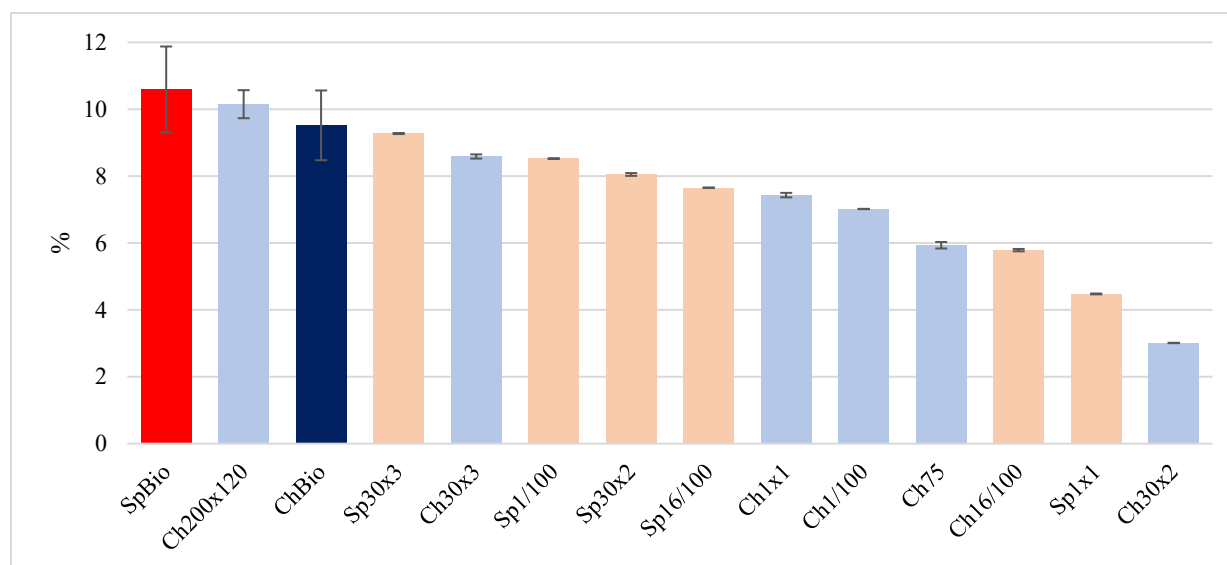
10.9. attēls. Lipīdu tīrība dažādās ar Soksleta ekstrakciju iegūtās frakcijās.

Visiem iegūtajiem paraugiem tika veiktas PNTS analīzes. PNTS saturs tika noskaidrots no Folha metodes attīrītās lipīdu frakcijas. Pēc būtības izmantotajās mikroaļģu sugās netika paredzēts, ka PNTS koncentrāciju lipīdos ietekmēs lipīdu frakcijas ekstrakcijas metodes. Tas nozīmē, ka, nosakot teorētisko PNTS saturu mikroaļģu biomasā, tai vajadzētu būt vienādei visos ekstrahētajos lipīdos, neatkarīgi no eksperimenta uzstādījumiem, jo PNTS netiek ekstrahēts atsevišķi no lipīdiem – PNTS ir lipīdu apakšklase.

PNTS mērījumi tika veikti, lai apstiprinātu iepriekš izvirzīto pieņēmumu. Rezultāti (skat. 10.10. attēlu) daļēji apstiprināja šo pieņēmumu. *S. platensis* teorētiski noteiktā PNTS koncentrācija biomasā bija $10,6 \pm 1,3$ g/g, *C. vulgaris* – $9,5 \pm 1,0$ g/g. Kopumā gan Soksleta gan mikroviļņu lipīdu ekstrakcijas rezultāti parādīja, ka lielākajā daļā gadījumu PNTS koncentrācija ekstrahētajās lipīdu frakcijās saglabājas robežās no 6 līdz 10 %.

Atsevišķos gadījumos PNTS koncentrācija lipīdu frakcijā bija ievērojami zemāka kā citos gadījumos. Piemēram, *C. vulgaris* 30 s karsējot divas reizes mikroviļņu krāsnī, PNTS saturs bija ap 3 %, kas ir aptuveni trīs reizes mazāk par teorētiski iespējamo. Konkrēti šo gadījumu var

skaidrot ar to, ka pirms tika veikta šķīdinātāja žāvēšana, netika veikta filtrēšana, kas radīja biomasas piemaisījumus.



10.10. attēls. Vidējais PNTS saturs dažādu eksperimentu uzstādījumu lipīdu frakcijās (attīrītas pēc Folha metodes). *SpBio*; *ChBio* – *S. platensis* un *C. vulgaris* biomasas, *Ch200x120* – *C. vulgaris* 200 ml, mikroviļņu ekstrakcija 120 s, *Sp30x3* – *S. platensis* 30 s trīs reizes, mikroviļņu ekstrakcija, *Ch30x3* – *C. vulgaris* 30 s trīs reizes mikroviļņu ekstrakcija, *Sp1/100* – *S. platensis* 1g/100 ml Soksleta ekstrakcija, *Sp30x2* – *S. platensis* 30 s divas reizes, *Sp16/100* – *S. platensis* 16g/100ml Soksleta ekstrakcija, *Ch1x1* – *C. vulgaris* 1 min 1 reizi mikroviļņu ekstrakcija, *Ch1/100* – *C. vulgaris* 1g/100 ml Soksleta ekstrakcija, *Ch75* – *C. vulgaris* 75 ml 60 s mikroviļņu ekstrakcija, *Ch16/100* – *C. vulgaris* 16g/ 100 ml Soksleta ekstrakcija, *Sp1x1* – *S. platensis* 1 min 1 reizi mikroviļņu ekstrakcija, *Ch30x2* – *C. vulgaris* 30 s divas reizes mikroviļņu ekstrakcija. Visiem mikroviļņu eksperimentiem izmantotā $c=100\text{g/l}$. $N=4 \pm SD$.”

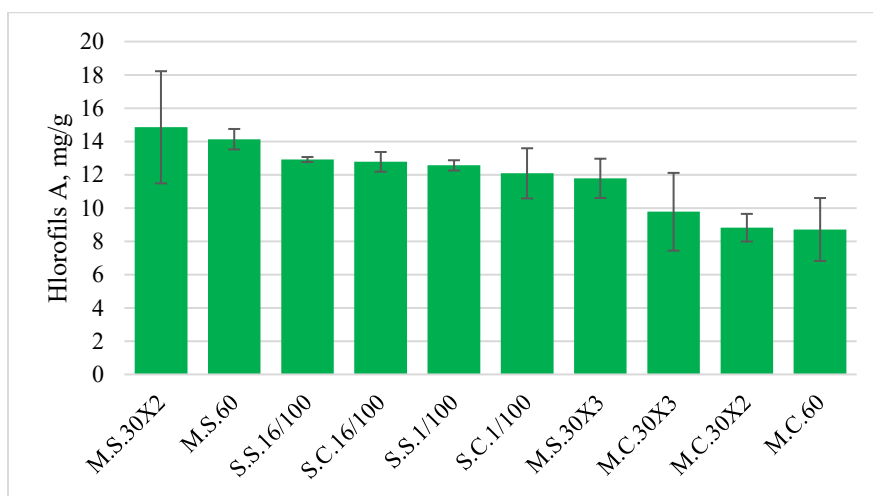
Kopumā var secināt, neatkarīgi no lipīdu frakcijas iegūšanas metodoloģijas, PNTS saturs attīrītā lipīdu frakcijā saglabāsies tuvs vai vidēji par 20-40 % zemāks nekā teorētiskais. Būtiska nozīme ir paraugu filtrēšanai, kas nodrošina tīrāku lipīdu frakciju. Tas saskan ar loģisku domu – jo tīrāka lipīdu frakcija, jo precīzāki PNTS rezultāti.

Nelielu PNTS iztrūkumu no teorētiski iespējamā, galvenokārt, var saistīt ar biomasas piemaisījumiem. Arī, attīrot lipīdus ar Folha metodi, ir iespējams pieļaut nelielu biomasas piesārņojumu lipīdos, tomēr ekstrakcijas procesam nav izšķiroša nozīme PNTS iznākumā lipīdu frakcijā. Drīzāk tas ir saistīts ar PNTS saturu mikroaļģu biomasā.

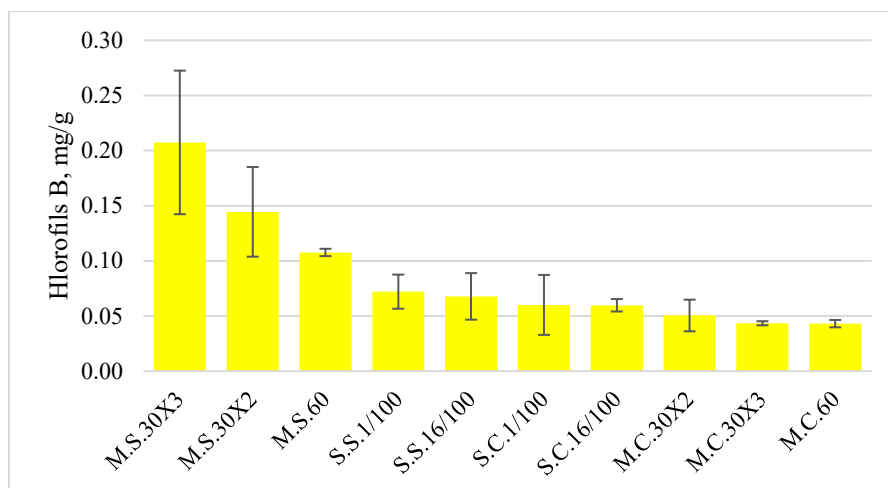
Papildus neattīrītai lipīdu biomasai tika skatīta **fenolu un pigmentu koncentrācija**. Tā kā mikroaļģes dabīgi ražo dažādus vērtīgus savienojumus, kas var uzlabot produkta kvalitāti un samazināt uzglabāšanas izmaksas, tika izvirzīta hipotēze, ka neattīrīta no mikroaļģēm iegūta lipīdu frakcija saturēs dažādus antioksidantus un dabīgus antibakteriālus savienojumus, tādējādi nebūtu vajadzīga lipīdu papildus attīrīšana.

Tika noskaidrots, ka iegūtie lipīdi ir bagāti ar dažādiem pigmentiem. Piemēram, hlorofila A saturs visos gadījumos svārstījās no 7 līdz 18 mg/g, hlorofila B – no 0,04 līdz 0,28 mg/g un karetonoīdu – no 0,07 līdz 0,22 mg/g (skat. 10.11., 10.12., 10.13. un 10.14. attēlu). Jāatzīmē, ka mikroviļņu paraugos ar *S. platensis* netika detektēti karetonoīdi, kas liecina, ka šī metode varētu būt nepiemērota lipīdu iegūšanai ar augstu karetonoīdu saturu.

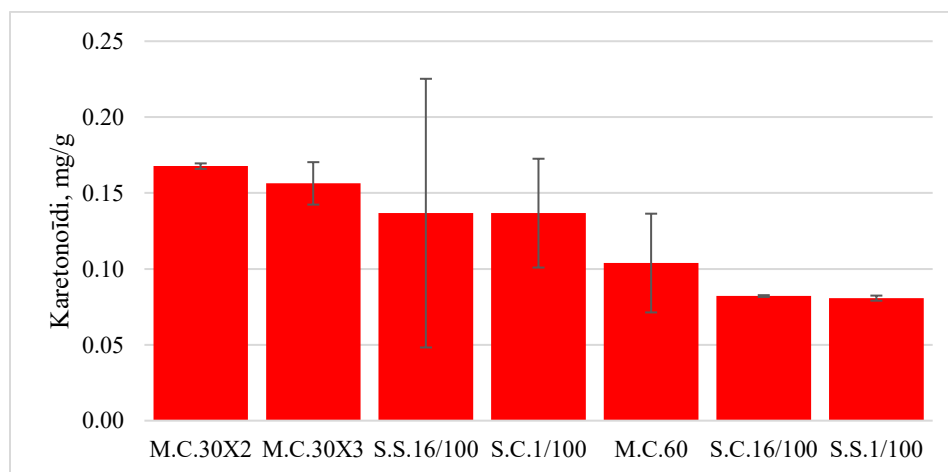
Fenolu rezultāti visos gadījumos bija no 1 līdz 11 mg/g (skat. attēlu). No iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka gan ar Soksleta, gan mikroviļņu asistēto ekstrakciju, ir iespējams iegūt lipīdus, kas ir bagāti ar dažādiem dabiskiem antioksidantiem un antimikrobiāliem savienojumiem – fenoliem, pigmentiem. Tas nozīmē, ka neattīrītas lipīdu frakcijas vērtība ir ne tikai mikroaļģu taukskābes, bet arī citi vērtīgi savienojumi.



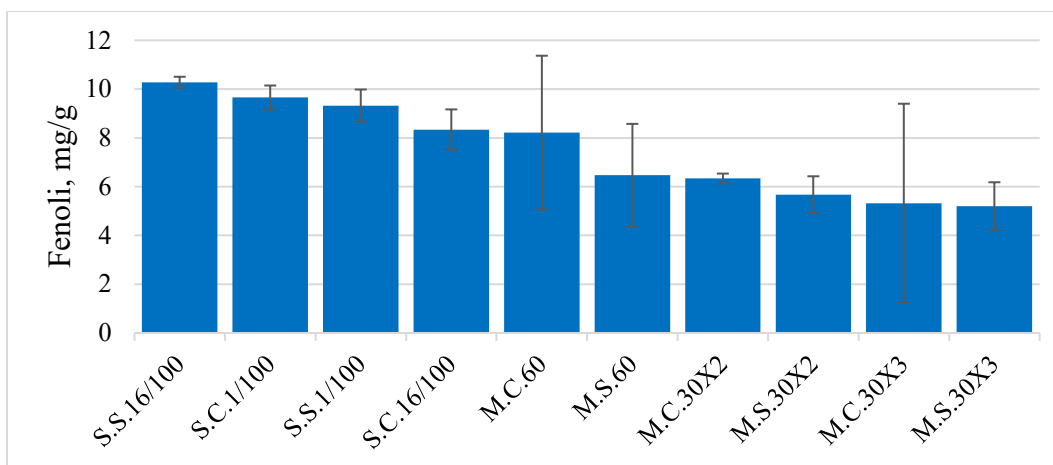
10.11. attēls. Hlorofila A saturs (mg/g) dažādās neattīrītu lipīdu frakcijās. *M.S.30X2* – *S. platensis* mikroviļņi 30 s divas reizes, *M.S.60* – *S. platensis* mikroviļņi 60 s, *S.S.16/100* – *S. platensis* Sokslets 16 g/100 ml, *S.C.16/100* – *C. vulgaris* Sokslets 16 g/100 ml, *S.S.1/100* – *S. platensis* Sokslets 1 g/100 ml, *S.C.1/100* – *C. vulgaris* Sokslets 1 g/100 ml, *M.S.30X3* – *S. platensis* mikroviļņi 30 s trīs reizes, *M.C.30X3* – *C. vulgaris* mikroviļņi 30 s trīs reizes, *M.C.30X2* – mikroviļņi *C. vulgaris* 30 s divas reizes, *M.C. 60* – mikroviļņi *C. vulgaris* 60 s. Vidējā vērtība $\pm$ SD, n=2.



10.12. attēls. Hlorofila B saturs (mg/g) dažādās neattīrītu lipīdu frakcijās. *M.S.30X2* – *S. platensis* mikroviļņi 30 s divas reizes, *M.S.60* – *S. platensis* mikroviļņi 60 s, *S.S.16/100* – *S. platensis* Sokslets 16 g/100 ml, *S.C.16/100* – *C. vulgaris* Sokslets 16 g/100 ml, *S.S.1/100* – *S. platensis* Sokslets 1 g/100 ml, *S.C.1/100* – *C. vulgaris* Sokslets 1 g/100 ml, *M.S.30X3* – *S. platensis* mikroviļņi 30 s trīs reizes, *M.C.30X3* – *C. vulgaris* mikroviļņi 30 s trīs reizes, *M.C.30X2* – mikroviļņi *C. vulgaris* 30 s divas reizes, *M.C.60* – mikroviļņi *C. vulgaris* 60 s. Vidējā vērtība $\pm$ SD, n=2.



10.13. attēls. Karetonoīdu saturs (mg/g) dažādās neattīrītu lipīdu frakcijās *S.S.16/100* – *S. platensis* Sokslets 16 g/100 ml, *S.C.16/100* – *C. vulgaris* Sokslets 16 g/100 ml, *S.S.1/100* – *S. platensis* Sokslets 1 g/100 ml, *S.C.1/100* – *C. vulgaris* Sokslets 1 g/100 ml, *M.C.30X3* – *C. vulgaris* mikroviļņi 30 s trīs reizes, *M.C.30X2* – mikroviļņi *C. vulgaris* 30 s divas reizes, *M.C.60* – mikroviļņi *C. vulgaris* 60 s. Vidējā vērtība $\pm$ SD, n=2.

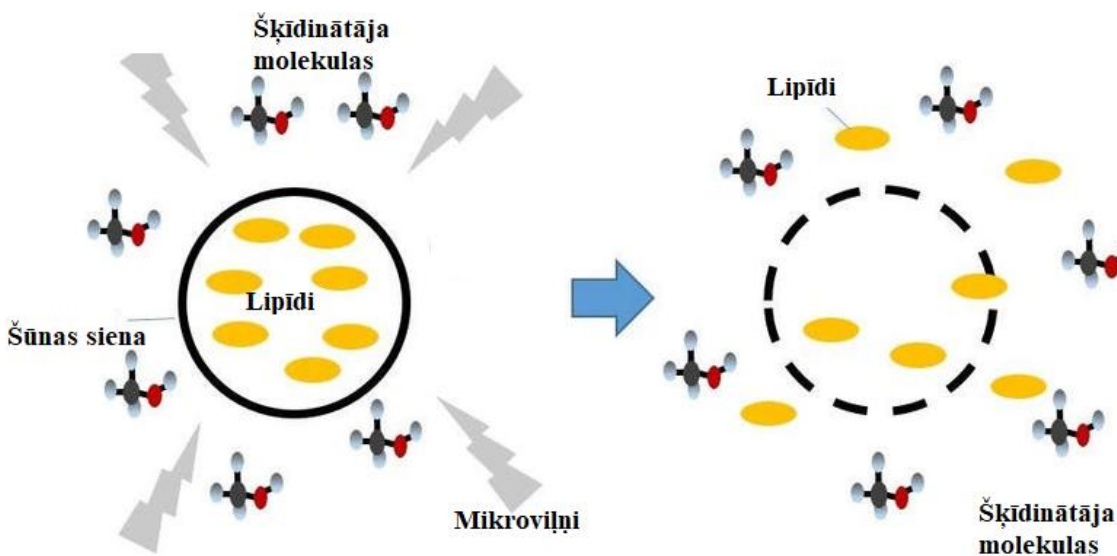


10.14. attēls. Kopējo fenolu saturs (mg/g) dažādās neattīrītu lipīdu frakcijās. *M.S.30X2* – *S. platensis* mikroviļņi 30 s divas reizes, *M.S.60* – *S. platensis* mikroviļņi 60 s, *S.S.16/100* – *S. platensis* Sokslets 16 g/100 ml, *S.C.16/100* – *C. vulgaris* Sokslets 16 g/100 ml, *S.S.1/100* – *S. platensis* Sokslets 1 g/100 ml, *S.C.1/100* – *C. vulgaris* Sokslets 1 g/100 ml, *M.S.30X3* – *S. platensis* mikroviļņi 30 s trīs reizes, *M.C.30X3* – *C. vulgaris* mikroviļņi 30 s trīs reizes, *M.C.30X2* – mikroviļņi *C. vulgaris* 30 s divas reizes, *M.C. 60* – mikroviļņi *C. vulgaris* 60 s. Vidējā vērtība ± SD, n=2.

Mikroviļņu asistētā ekstrakcija

Kā alternatīvais ekstrakcijas veids Soksleta ekstrakcijai, tika izmēģināta mikroviļņu asistētā ekstrakcija. Metodes pamatā ir pēc iespējas augstākas frekvences mikroviļņu pievade (skat. 10.15. attēlu) uz īsu laiku (parasti vienu līdz trīs minūtēm), lai šūnām ar augstu iekšējo osmotisko spiedienu izraisītu šūnas sienas pārpļīšanu un veicinātu intracelulāro savienojumu, tai skaitā lipīdu, polinepiesātināto taukskābju un hlorofila, nokļūšanu šķīdinātājā. Metodes priekšrocības ir ļoti īss laika patēriņš, draudzīgu, nekaitīgu šķīdinātāju izmantošana un dažādu mainīgu apstākļu pielāgošana optimāla rezultāta sasniegšanai.

Veicot lipīdu ekstrakciju ar mikroviļņu asistēto metodi, tika pētīti vairāki ietekmējošie parametri – mikroaļģes (*Spirulina platenis*, *Chlorella vulgaris*), to koncentrācija šķīdinātājā (etanolā), mikroviļņu pievades laiks un šķīduma tilpums. Līdzīgi kā iepriekš, iegūtajam produktam, tika veiktas kvalitātes raksturojošas analīzes – lipīdu, PNTS un hlorofila saturs. Tika izmantotas iepriekš aprakstītās un pārbaudītās analītiskās metodes.



10.15. attēls. Mikroviļņu ietekmē tiek sagrautas šūnu sienas un iekššūnas sastāvs izšķīst šķīdinātājā (Fazril et al. 2022).

Mikroaļģu biomasas koncentrācijas un mikroviļņu apstarošanas laika ietekme uz lipīdu iznākumu ar mikroviļņu asistēto ekstrakciju (1. eksperiments)

Izmantotās mikroaļģes: *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*

Izmantotas iekārtas:

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Analītiskie svāri	PLS 1200-3A	Kern&Sohn, Vācija
Mikroviļņu krāsns		
Dabiskas konvekcijas termostats (žāvkapis)	ED-S 115	Binder, Vācija
Universālā centrifūga	FC5816	Ohaus, Vācija

Eksperimenta gaita:

1. 250 ml karstumizturīgā stikla vārglāzē atsevišķi iesver 1,25, 2,5 un 5,0 g attiecīgās sugas sausu mikroaļģu biomasu.
2. Pievieno 25 ml 96 % etanola, sasniedzot mikroaļģu biomasas koncentrāciju 50, 100 un 200 g/l (m/v). Tilpuma attiecība starp šķīdumu un vārglāzes maksimālo tilpumu, tika izvēlēta attiecīgi vismaz 1:5, lai izvairītos no šķīduma nonākšanas ārpus stikla trauka mikroviļņu apstarošanas laikā. Izvēlētie šķīdinātāja tilpumi bija 25, 50 un 100 ml.
3. Izvēlētie mikroviļņu apstarošanas laiki bija 30 s un 60 s, 30 s divas reizes un 30 s četras reizes, izvēloties iekārtas maksimālo jaudu. Atsevišķi pa vienam mikroviļņu krāsnī tika ievietoti stikla trauki ar iepriekš sagatavotu dažādas koncentrācijas biomasas šķīdumu etanolā. Eksperimentos, kur šķīdums tika pakļauts mikroviļņu ietekmei vairākas reizes, tika ievērota vismaz 10 min pauze, lai atdzesētu šķīdumu. Jāņem vērā, ka daļa etanola izgaro, tāpēc ir nepieciešams izvēlēties tādu etanola tilpumu, kas pēc izvēlēta apstarošanas laika saglabāsies šķidrā agregātstāvoklī. Sausas biomasas iegūšana ir nevēlama, jo etanola kā šķīdinātāja klātbūtne ir izšķiroša lipīdu un citu mikrobiāli vērtīgu savienojumu ekstrakcijai no biomasas.
4. Pēc karsēšanas šķīdums tika atdzesēts vismaz 10 min, tad pārliets 15 ml plastmasas stobriņos un centrifugēts 8000 apriņķos/min 5 min.

5. Ar analītiskajiem svāriem tika nosvērti nelieli stikla traučiņi ar vāciņu, pierakstīta to precīza masa. Katram paraugam savs stikla traučiņš.
6. Pēc centrifugēšanas uzmanīgi tika nolieta šķidrā frakcija iepriekš nosvērtā stikla traučiņā. Iespēju robežās, ir svarīgi nepārliet cietvielu daļiņas (biomasu), kas var samazināt ekstrahēto lipīdu tīrību. Ja šķīdums sāk maisīties ar mikroaļģu biomasu, to ir nepieciešams atkārtoti centrifugēt.
7. Stikla traučiņi ar iepildītu etanola un ekstrahēto savienojumu šķīdumu tika ievietoti žāvskapī 80 °C līdz viss etanols iztvaiko (skat. 10.16. attēlu). Svarīgi – pie nelieliem šķīdinātāja tilpumiem to var iztvaicēt, ja tilpums pārsniedz 50 ml, to ir nepieciešams vispirms destilēt vai filtrēt, kā aprakstīts iepriekšējos lipīdu frakcijas iegūšanas eksperimentos.



10.16. attēls. Šķīdinātāja tvaicēšana žāvskapī.

8. Pēc šķīdinātāja iztvaicēšanas, trauciņš ar palikušo masu tika nosvērts uz analītiskajiem svariem. Masas starpība starp tukšu trauciņu un lipīdu masu ir iegūtā lipīdu masa.
9. Iegūtajiem paraugiem tika veikta kvantitatīva lipīdu, polinepiesātināto taukskābju, pigmentu un kopējo fenolu noteikšana, lai novērtētu produkta kvalitāti un potenciālās pielietojšanas iespējas. Metodoloģijas shēma redzama 10.17. attēlā.

MIKROALĢU PULVERIS



Karstumizturīgā vārglāzē iesver nepieciešamo mikroalģu masu.

Pievieno šķīdinātāju (etanolu)

Jāievēro, lai šķīdinātāja un mikroalģu kopējais tilpums nepārsniedz trešdaļu no trauka kopējā tilpuma!

Mikroviļņu asistētā lipīdu ekstrakcija



Sagatavo mikroviļņu krāsni, uzstādu augstākās jaudas iestatījumus.

Ievieto trauku ar mikroalģu šķīdumu, karsē to izvēlētajā laikā (30 s, 30 s divreiz un 1 min).

Nepārsniedz 1 min karsēšanu, lai nodrošinātu, ka viss šķīdinātājs neiztvaiko!

Starp atkārtotu karsēšanu ievēro vismaz 10 min dzesēšanu istabas temperatūrā.

Šķīduma frakcijas iegūšana



Pārlej visu ekstrakta tilpumu plastmasas stobriņos.

Ja nepieciešams pievieno papildus šķīdinātāja, lai visu biomasu pārnestu jaunā traukā.

Stobriņu ar ekstraktu centrifugē 8000 apgrz./min 5 min., uzmanīgi nolēj šķīdno frakciju.

Šķīdinātāja iztvaicēšana



Šķīdno frakciju iztvaicē 30 līdz 40° C līdz viss šķīdinātājs iztvaiko.

Pie lielākiem šķīdinātāja tilpumiem var izmantot destilācijas iekārtu ātrākai ta iztvaicēšanai.

Lipīdu frakcija

Atlikusī masa ir lipīdiem bagāta frakcija. Atkarībā no tā, cik uzmanīgi pēc centrifugēšanas noliets supernatants, lipīdu saturs svārstās no 50 līdz 70%, no kuriem ap 20-30% ir polinepiesātinātās taukskābes. Pārējo masas sadalījumu veido dažādi dabiski mikroalģu savienojumi un antioksidanti kā pigmenti, fenoli, uc.

10.17. attēls. Mikroviļņu asistētās ekstrakcijas metodoloģijas shēma.

Biomاسas un šķīdinātāja apjoma ietekme uz lipīdu ekstrakciju (2. eksperiments)

Tā kā no iepriekšējiem rezultātiem netika noteikta viennozīmīga saistība starp lipīdu frakcijas iznākumu un mikroviļņu pievadīšanas laiku, tālākie eksperimenti tika balstīti uz faktu, ka pie ilgāka karsēšanas laika, būs lielāka iespēja, ka vairāk šūnu tiks pārplēstas un attiecīgi vairāk lipīdu izšķīdīs etanolā. Ņemto vērā, ka apjoma eksperimentos tika izmantots ievērojami lielāks tilpums, atsevišķos gadījumos (abām mikroaļģēm pie 200 ml tilpuma) tika izvēlēts vēl ilgāks karsēšanas laiks (120 s), kamēr citos gadījumos – 60 s. Visos gadījumos tika saglabāta nemainīga biomasas koncentrācija pret etanolu – 100 g/l.

Lai salīdzinātu lipīdu frakcijas iznākumu no biomasas ar teorētiski iespējamo (t.i., cik lielu daļu masas no mikroaļģēm sastāda lipīdi), vispirms tika veikta lipīdu noteikšana abu mikroaļģu biomasā pēc Folha metodes.

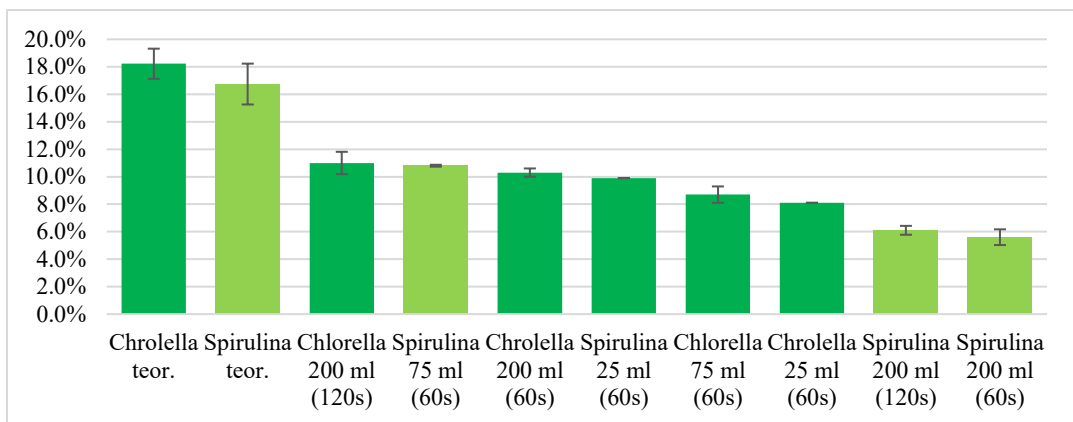
Lipīdu iznākuma rezultāti (neattīrīti lipīdi), norādīja, ka process kopumā nesasniedz 100 % efektivitāti (skat. 10.18., un 10.19., attēlu). Lipīdu iznākums no biomasas visos gadījumos svārstījās 6-11 %, kā tas tika novērots arī iepriekšējos eksperimentos. Svarīgi atzīmēt, ka šie paraugi pirms neattīrītu lipīdu frakcijas masas noteikšanas, netika filtrēti, tāpēc pastāvēja aizdomas, ka to tīrība varētu būt mazāka kā Soksleta ekstrakcijā, jo metodoloģiskajā posmā, kur ekstrakts jācentrifugē un jānolej, varētu papildus nonākt mikroaļģu biomasa.

Lipīdu iznākuma no biomasas rezultāti parāda, ka nav viennozīmīgas ietekmes starp parauga apjomu un lipīdu iznākumu. Tiek novērots, ka eksperimentā iegūtā lipīdu frakcijas masa, svārstās no 30 līdz 60 % no teorētiski iespējamā apjoma. Liela daļa lipīdu pie šāda ekstrakcijas laika nespēj nonākt šķīdinātājā un biomasu nepieciešams atkārtoti pakļaut mikroviļņu ietekmei vai samazināt ekstrakcijas tilpumu.

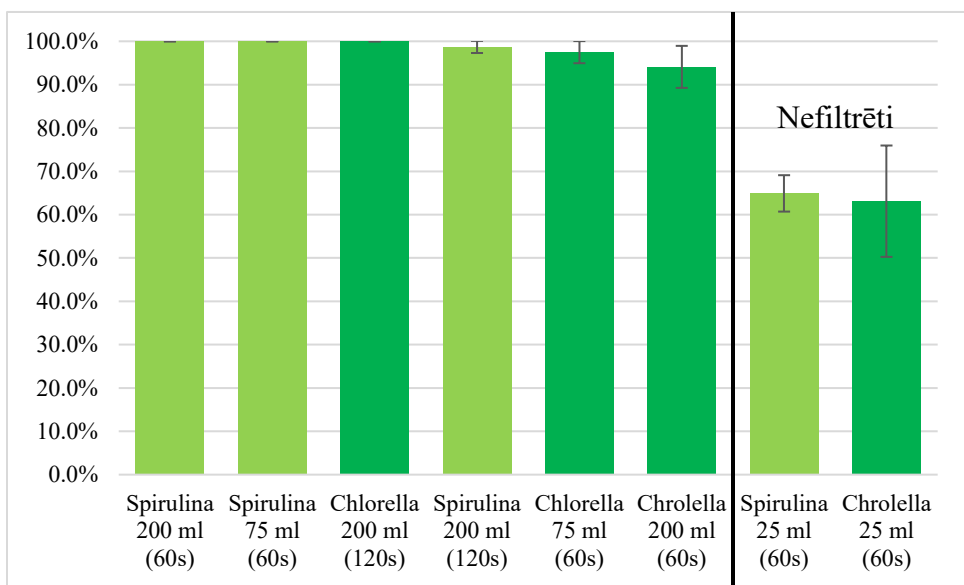
Tā kā bija aizdomas, ka ar mikroviļņu ekstrakciju iegūtajās lipīdu frakcijās varētu būt samazināta lipīdu tīrība augstā biomasas piemaisījuma dēļ, daļai paraugu tika veikta filtrēšana pirms lipīdu noteikšanas pēc Folha metodes (skat. 10.20. attēlu). 25 ml paraugiem abām mikroaļģēm tīrības pakāpe tika noteikta kā iepriekš – lipīdus nosaka no iegūtās frakcijas pēc Folha metodes. Pārējie paraugi pirms etanola iztvaicešanas tika filtrēti. Rezultāti viennozīmīgi parāda, ka filtrēšanai ir būtiska ietekme uz lipīdu frakcijas tīrību un ka iepriekš izteiktās aizdomas par biomasas piemaisījumu ir patiesas.

Visos gadījumos, kad tika izmantota filtrēšana, tika sasniegta praktiski 100 % frakcijas tīrība, kamēr nefiltrētos – 50-70 %. Tas nozīmē, ka, filtrējot šķīdinātāju pirms žāvēšanas ir

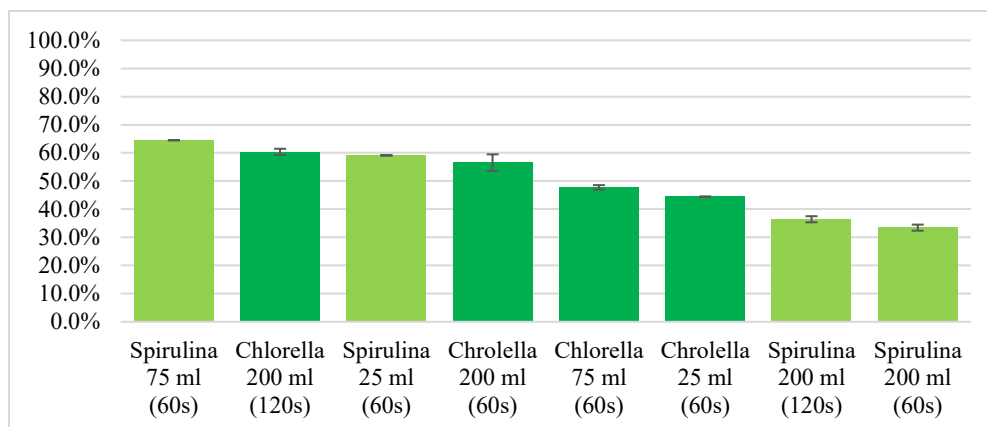
iespējams būtiski palielināt lipīdu frakcijas tīrību, tomēr tas par 30-50 % samazinās neattīrītu lipīdu frakcijas masu. Svarīgi ir arī ņemt vērā, ka Folha metode izmanto ļoti spēcīgus šķīdinātājus, kas vienlaikus ar lipīdiem spēj izšķīdināt arī dažādus pigmentus – hlorofilu, karotinoīdus. Tas nozīmē, ka faktiski nevar teikt, ka ir iegūta 100 % lipīdu frakcija. Šis iznākums norāda uz tīrību, ja tiek izmantota Folha metode kā parametra noteicējs.



10.18. attēls. Lipīdu frakcija atkarībā no apjoma (25, 75, 200 ml), laika (30s, 60s) un mikroaļģu sugas. Mikroaļģu biomasas koncentrācija visos paraugos – 100 g/l.



10.19. attēls. Lipīdu tīrība (pēc Folha metodes) ar mikroviļņu ekstrakciju iegūtajā frakcijā atkarībā no apjoma, laika un mikroaļģu sugas.



10.20. attēls. Lipīdu iznākums (%) attiecībā pret teorētisko (kādu daļu no teorētiskā lipīdu daudzuma ir izdevies iegūt) atkarībā no dažādiem eksperimenta uzstādījumiem.

Kopumā lipīdu ekstrakcija ar mikroviļņu palīdzību izrādījās pārsteidzoši efektīva. Salīdzinot šo alternatīvo ekstrakcijas metodi ar tradicionālo Soksleta ekstrakciju, neattīrītu lipīdu iznākums no biomasas lielākā skaitā gadījumu bija pat lielāks. Lipīdu frakcijām iegūtām ar Soksleta ekstrakciju bija austāka tīrības pakāpe kā nefiltrētiem mikroviļņu paraugiem, tomēr ar ļoti vienkāršu filtrēšanas procesu tīrības pakāpi izdevās būtiski palielināt.

Galvenais secinājums ir tāds, ka lipīdu frakcijas iegūšanai krietni efektīvāka ir mikroviļņu asistētā ekstrakcija. Tā prasa vidēji 50 reizes mazāk laika, nav nepieciešamas specifiskas iekārtas vai zināšanas, un, ieviešot filtrēšanas posmu metodē, ir iespējams iegūt praktiski tīru lipīdu frakciju. Arī skatoties faktiskos iznākos, pat ar lielāku masas zudumu pie filtrēšanas, jaunu mikroviļņu lipīdu ekstraktu ir iespējams iegūt tik ātri, ka nav nozīmes augstākas Soksleta frakcijas tīrībai.

Papildus tika pētīta iegūtās frakcijas tīrība mikroskopā – tika skatīts, vai ir novērojams šūnu piemaisījums. Īsumā, neliels daudzums iegūtās lipīdu eļļas tika izsmērēts uz priekšmetstikliņa un novietots skatīšanai 40 reižu palielinājumā (skat. 10.21. attēlu). Netika atrastas pazīmes tam, ka iegūtajā produktā būtu šūnu piemaisījumi, kas liecina par filtrēšanas efektivitāti. Kopumā iegūtajai frakcijai tika novērota eļveidīga daba – tā viegli smērējās pa priekšmetstikliņu un veidoja eļļām līdzīgus sabiezinājumus.



10.21. attēls. Iegūtā lipīdu frakcija 40 reižu palielinājumā mikroskopa attēlā šūnu piemaisījumu skatīšanai.

Mikroaļģu lipīdu oksidācijas pakāpes noteikšana

Oksidācijas pakāpe ir ļoti svarīgs rādītājs, kas nosaka eļļas kvalitāti un vērtību, jo oksidācijas procesu laikā notiek virkne reakciju, kas rada brīvos radikāļus, degradē eļļā esošos vitamīnus, samazina neaizvietojamā taukskābju saturu un tās uzturvērtību kopumā. Mainās arī eļļas garša un smarža un fizikālās īpašības. Oksidācijas pakāpes noteikšanai par indeksu tiek izmantota peroksīdu vērtība, kas ir primārie eļļas oksidācijas produkti. Respektīvi, jo zemāka peroksīdu vērtība, jo kvalitatīvāka eļļa. Galvenie oksidācijas procesa ierosinātāji ir siltums, gaiss un gaisma (AIC 2024). Oksidācijas pakāpes noteikšanai tika izvēlētas divas dažādas metodes (Wrolstad et al. 2005) – peroksīdu vērtības noteikšana, izmantojot jodometrisko titrēšanu, un konjugēto diēnu un triēnu noteikšana (arī oksidācijas produkti), izmantojot UV spektrofotometru.

Jodometriskās titrēšanas metodoloģija

Jodometriskās titrēšanas metodes pamatā ir tilpuma analīze, kas balstās uz joda titrēšanu, kas atdalās no kālija jodīda peroksīdu ietekmē. Titrēšanai izmanto tiosulfāta šķīdumu un cietes šķīdumu kā indikatoru (Wrolstad 2005).

Izmantoto mikroaļģu lipīdi – *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*

Izmantotās iekārtas:

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Velkmes skapis		
Magnētiskais maisītājs ar sildītāju	MSH – 300	Biosan, Latvija
Analītiskie svāri	PLS 1200-3A	Kern&Sohn, Vācija

Eksperimenta gaita:

Sākotnēji tiek sagatavoti reaģenti:

0,1 nātrija tiosulfāta šķīdums: uz magnētiskā maisītāja ar sildītāju vārglāzē (1 L) tiek uzvārīts 0,5 L destilēts ūdens. Tas tiek vārīts aptuveni 5 min. Destilētais ūdens tiek atdzesēts auksta ūdens peldē. Uz analītiskajiem svāriem mērkolbā (0,5 L) tiek nosvērti 12,42 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ un 0,05 g ar Na_2CO_3 . Mērkolbā pielej 0,5 L iepriekš uzvārīto destilēto ūdeni (pārliacinās, vai tas nav

iztvaikojis. Ja ir – nepieciešams papildināt, lai tilpums būtu tieši 0,5 L). Maisa uz magnētiskā maisītāja līdz visi kristāli ir pilnībā izšķīduši.

Kālija jodīda (KJ) piesātināts šķīdums: Mērkolbā uz analītiskajiem svariem nosver 50 g KJ un ar pipeti tiek pielieti 50 ml ūdens. Maisa uz magnētiskā maisītāja līdz visi kristāli ir pilnībā izšķīduši.

Cietes šķīdums: mērkolbā uz analītiskajiem svariem iesver 1 g cietes un 0,5 g salicilskābi, pielej klāt 100 ml destilēta ūdens. Viegli apļo mērkolbu līdz šķīdums ir viendabīgs.

Etiķskābes/Hloroforma šķīdums: Mērkolbā tiek pipetēti 18 ml etiķskābe un 12 ml hloroforms (tā lai šķīdinātāju attiecība būtu 3:2).

Metodes gaita:

1. Mērkolbā (250 ml) tiek iesvērti aptuveni 5 g parauga (ja zināms, kas paraugs ir stipri oksidējies, tad var likt arī mazāku svaru), pieraksta precīzu svaru;
2. Uz statīva velkmē fiksē 10 ml stikla bireti, piepilda to ar 0,1 N Nātrija tiosulfāta šķīdumu (Nedrīkst nekur palikt gaisa burbulīši, lai mērījumi būtu precīzi. Sākotnējo šķīduma daudzumu piefiksē);
3. Statīva apakšā novieto magnētisko maisītāju un tam virsū iepriekš sagatavoto mērkolbu ar paraugu. Paraugu maisa visas titrēšanas laiku ar magnētiskā maisītāja palīdzību;
4. Paraugam pielej 30 ml etiķskābes/hloroforma šķīdumu, ļauj paraugam apmaisīties līdz eļļa izšķīdusi;
5. Ar mikropipeti pievienot 0,5 ml piesātināto kālija jodīda šķīdumu;
6. Pēc kālija jodīda pievienošanas, ļauj minūti šķīdumam samaisīties un pēc tam pievienot 30 ml destilēta ūdens;
7. Sāk titrēšanu. 0,1 N Na tiosulfātu pievieno līdz brīdim, kad šķīdums ir palicis pavisam maigi dzeltens;
8. Ar mikropipeti pievieno 0,5 ml cietes šķīdumu, paraugam vajadzētu iekrāsoties tumši violetos toņos;
9. Turpina pipetēt klāt 0,1 N Na tiosulfātu līdz violetais tonis ir pavisam pazudis. Piefiksē iztērēto 0,1 N Na tiosulfāta daudzumu.

Lai aprēķinātu *blank* vērtību, tiek atkārtots 2.-9. metodes solim. Iegūto vērtību piefiksē (Jāņem vērā, ka *blank* gadījumā nebūtu pieļaujams, ka tiek iztērēts vairāk par 0,1 ml. Ja tā notiek, jāsagatavo svaigi šķīdumi un metode jāsāk no jauna, tāpēc *blank* vērtību iespējams jānosaka pirms sāk titrēt paraugu).

Oksidācijas pakāpi jeb peroksīdu vērtību nosaka pēc formulas:

$PV = [(S-B) \cdot N \cdot 1000] / W$, kur PV = peroksīdu daudzums, S = iztērētais Na tiosulfāta daudzums (ml), B = Na tiosulfāta iztērētais daudzums priekš *blank* (ml), N = Na triosulfāta normalitāte (kas mūsu gadījumā ir 0,1 N) un W = parauga iesvars (g). Vērtības mērvienība ir meqO₂/kg vai mmol O₂/2 kg.

Konjugēto diēnu un triēnu noteikšana ar UV spektrofotometru

Metode ar UV spektrofotometru ir salīdzinoši vienkārša un ātra, taču tā nosaka tikai konkrētas vielas – polinepiesātināto taukskābju konjugētos diēnus (CD) un triēnus (CT), kas ir blakusprodukti oksidācijas procesā – jo lielāka to vērtība, jo augstāka oksidācijas pakāpe. Šī iemesla dēļ metode der tikai tādā gadījumā, ja paraugs satur PNTS (Wrolstad et al. 2005). Tā kā mūsu gadījumā galvenais uzvars tiek likts tieši uz PNTS, tā ir ļoti piemērota.

Izmantoto mikroaļģu lipīdi – *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*

Izmantotās iekārtas:

Iekārta	Modelis	Ražotājs
Analītiskie svāri	PLS 1200-3A	Kern&Sohn, Vācija
Magnētiskais maisītājs ar sildītāju	MSH – 300	Biosan, Latvija
Universālā centrifūga	FC5816	Ohaus, Vācija
Spektrofotometrs	UV5Bio	Mettler toledo, Šveice
Vortekss	V-1	Biosan, Latvija

Eksperimenta gaita:

1. Ar analītisko svaru palīdzību 50 ml stobriņā tiek iesvērts paraugs aptuveni 0.02 g.
2. Paraugu izšķīdina 2,2,4-trimetilpentānā (izooktānā) piepildot to līdz 25 ml atzīmei. Šķīdums kārtīgi jāizmaisa, lai masa būtu viendabīga – maisīšanai tika izmantots vortekss;
3. Jāieslēdz spektrofotometrs un jāuzstāda to uz 233 nm (pēc ieslēgšanas jāuzgaida 30 min, lai ierīce uzsilst un mērījumi ir precīzi).
4. Kā *blank* vērtība tiek izmantots izooktāns bez parauga piemaisījuma. SVARĪGI! – jāizmanto kivetes, kas paredzētas UV spektra gaismas viļņiem, citādi mērījumi būs neprecīzi.
5. Mēra absorbciju visiem paraugiem. Ja vērtības pārsniedz 1, nepieciešams paraugu atšķaidīt.
6. Tos pašus paraugus mēra arī pie 268 nm.
7. Lai aprēķinātu konjugētos diēnu un triēnu daudzumu, tiek izmantotas sekojoši vienādojumi:

$$C(CD) = A_{233}/(\varepsilon \times l) \quad CD \text{ vērtība} = [C(CD) \times (2,5 \times 10^4)]W,$$

kur C(CD) ir CD koncentrācija mmol/ml (molārā koncentrācija), A_{233} ir absorbcija pie konkrētā viļņu garuma, ε ir molarā absorbcija linolskābes hidroperoksīdam ($2,525 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) l ir izmantotās kivete garums (caur kuru iet gaisma) (1 cm), $2,5 \times 10^4$ ir izooktāna izmantotais tilpums (25 ml), kas ietver arī vienības konversiju (1000 pmol/mmol), lai CD vērtību varētu izteikt pmol; W ir parauga svars gramos.

Tas pats attiecas arī uz CT aprēķināšanu, tikai to gadījumā nav noteikta molārā absorbcijas vērtība, ko jāaprēķina pēc formulas:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{A_{\gamma}}{(C_L \times l)},$$

kur E ir molārā absorbcija, A_{γ} ir absorbcijas vērtība pie 268 nm (vai pie 233, ja vēlas molārā absorbcijas vērtību aprēķināt priekš CD), C_L norāda uz lipīdu koncentrāciju parauga šķīdumā (g/100ml), l ir kivetes garums, caur kuru iet gaisma (1 cm).

8. Pēc aprēķiniem tiek uzzinātas konjugēto diēnu un triēnu vērtības – jo lielākas vērtības, jo augstāka oksidēšanās pakāpe.

Lai noteiktu optimālos eļļu uzglabāšanas apstākļus, tika veikti oksidēšanās eksperimenti. Īsumā, tika iegūta izspiesta ķirbju sēklu eļļa un dažādos uzglabāšanas apstākļos tika novērtēta dažādu svarīgu antioksidantu ietekme uz eļļas oksidēšanās procesa palēnināšanu. Kopumā tika izmantotas divas ķirbju sēklu eļļas oksidēšanās pakāpes noteikšanas metodes. Viena (konjugēto diēnu un konjugēto triēnu metode) ir aprakstīta iepriekš, kas balstās uz konkrētu savienojumu, kas saistīti ar eļļu oksidēšanos, noteikšanu šķīdinātājā, to mērot spektrofotometriski. Otra tika izvēlēta kā uz maņām balstīta noteikšana, kur eksperimentā iesaistītie cilvēki novērtēja eļļas smaržu atkarībā no dažādiem uzglabāšanas apstākļiem un antioksidantu klātbūtnes.

Autoksidācija ir ķēdes reakcija, kas notiek polinepiesātinātajās taukskābēs (PNTS), izraisot lipīdu oksidāciju. Šis process sākas, kad reaktīvā skābekļa suga (ROS), piemēram, hidroksilgrupa, atdala ūdeņraža atomu no PNTS molekulas. Tas ierosina strukturālu pārkārtošanos, kurā dubultā saite mainās, veidojot **konjugētus diēnus**, kas īslaicīgi stabilizē molekulu. Tomēr molekulārā skābekļa klātbūtnē PNTS peroksilradikālis ātri turpina oksidāciju, reaģējot ar citu PNTS, pārvēršot to hidroperoksīdā ar konjugētu diēna struktūru.

Konjugēto diēnu mērījumus parasti izmanto kā **lipīdu oksidācijas agrīnās stadijas indikatoru**. Tā kā diēni absorbē UV gaismu pie 233 nm, to koncentrāciju var novērtēt, mērot absorbcijas pieaugumu šajā viļņa garumā. Šī metode ir salīdzinoši vienkārša un sniedz plašu novērtējumu par konjugēto diēnu veidošanos lipīdos, kas parasti labi korelē ar citiem oksidācijas rādītājiem, piemēram, peroksīda vērtībām (Abeyrathne et al. 2021).

Tomēr, neskatoties uz tās vienkāršību, šai pieejai ir vairāki ierobežojumi. Diēnu konjugācijas maksimums pie 233 nm **ir skaidri atšķirams tikai pilnībā peroksidētos lipīdos**, padarot to mazāk ticamu daļējas oksidācijas noteikšanai. Daļēji oksidētos lipīdos signālu var aizsegst neperoksidētu lipīdu, traucējošu savienojumu un ekstrahētu piesārņotāju klātbūtne, izraisot iespējamās neprecizitātes. Turklāt šī metode **nenošķir primāros un sekundāros oksidācijas produktus, kā arī neņem vērā hidroperoksīdu sadalīšanos aldehīdos, ketonos un citos gaistošos savienojumos vēlākās oksidācijas stadijās**. Līdz ar to, paļaujoties tikai uz konjugētā diēna mērījumiem, var nenovērtēt lipīdu oksidācijas apjomu un sniegt nepilnīgu priekšstatu par oksidatīvo noārdīšanos. Konjugēto diēnu noteikšana sniedz priekšstatu par lipīdu primāro oksidēšanos procesa sākumā (Abeyrathne et al. 2021).

Lipīdu oksidāciju var efektīvi novērtēt, izmantojot **sensoro (uz maņām balstīto) novērtējumu**, jo oksidēšanās rezultātā veidojas gaistoši savienojumi, kas rada konkrētas, iepriekš

detalizēti raksturotas smakas. Tā kā lipīdi laika gaitā noārdās, tie rada dažādus aldehīdus, ketonus un citas oksidētas molekulas, kas rada raksturīgas smakas. Analizējot oksidētas eļļas/ūdens emulsijas smakas profilu, vērtētāji var noteikt un aprakstīt specifiskas aromāta izmaiņas, kas norāda uz oksidācijas procesa norisi. Lai standartizētu smakas novērtēšanu, ir izveidoti sensorie apraksti, kas saistīti ar oksidāciju, un katrs no tiem ir saistīts ar atsauces savienojumu vai materiālu (skat. 10.22. attēlu). Piemēram, pļautas zāles smaka, kas saistīta ar heksanālu, liecina par agrīnām oksidēšanās stadijām, jo šis aldehīds ir viens no primārajiem gaistošajiem marķieriem, kas veidojas no linolskābes sadalīšanās. Līdzīgi fritētais aromāts, ko rada 2,4-(E,E)-dekadienāls, bieži ir saistīts ar sakarsētiem vai termiski noārdītiem taukiem, kas liecina par progresējošu oksidāciju (skat. 10.23. attēlu). Svaiga eļļa, ko izmanto kā kontroles līdzekli, palīdz novērtētājiem atšķirt tikko apstrādātas eļļas no tām, kurām ir notikusi oksidatīvā bojāšanās (Villière et al. 2007).

Oksidācijai progresējot, parādās intensīvākas un nepatīkamākas smakas. Sēņu smarža, kas saistīta ar 1-okten-3-olu, papildus oksidācijai var norādīt uz mikrobiālo piesārņojumu vai lipīdu hidrolīzi. “Sasmakušā”, kodīgā, nepatīkamā smarža, kas saistīta ar 2-(E)-oktenālu, spēcīgi norāda uz lipīdu degradāciju, radot nepatīkamu, novecojušu aromātu, kas raksturīgs oksidētiem taukiem. Visbeidzot, koksnes smaka, lai gan tas ir retāk sastopama, var rasties sarežģītas oksidācijas produktu un piesārņotāju rezultātā (Villière et al. 2007).

Tab. 2. Sensory attributes generated by the panel to describe the odour of emulsions throughout aging and their associated references.

Sensory descriptor	Reference
Cut-grass	Aqueous solution of hexanal (4.1 µg/L)
Deep-fried	Aqueous solution of 2,4-(E,E)-decadienal (8.7 µg/L)
Fresh oil	Fresh commercial sunflower oil
Mushroom	Aqueous solution of 1-octen-3-ol (3.34 µg/L)
Oilseeds	Sunflower seeds, nuts or hazelnuts
Painty	Oil paint, Louvre, Lefranc & Bourgeois
Rancid	– no reference, but consensual acceptance –
Wood bug	Aqueous solution of 2-(E)-octenal (1.7 µg/L)

10.22. attēls. Dažādi sensorie eļļu novērtējumi, kas saistīti ar oksidēšanās produktu klātbūtni (Villière et al. 2007).

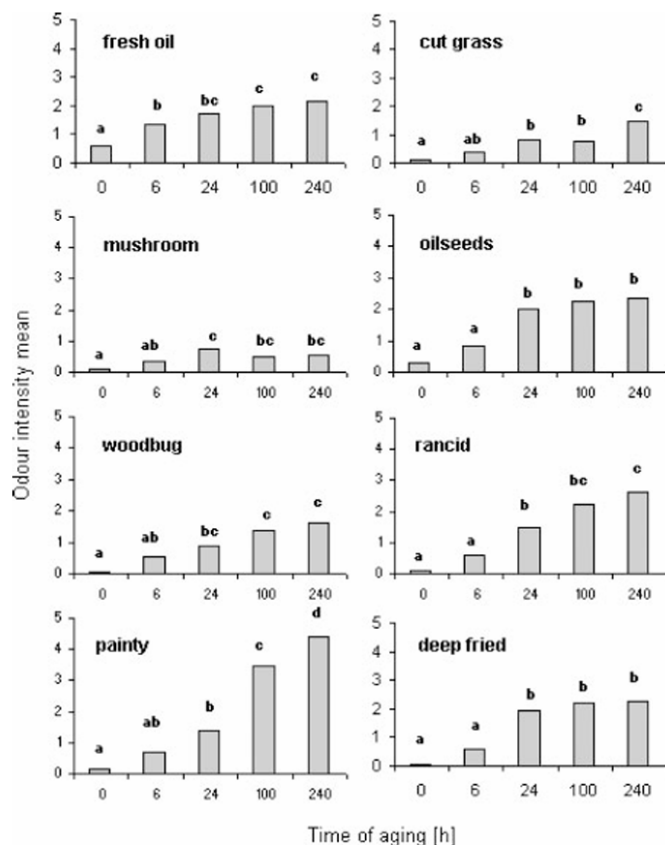


Fig. 2. Intensities of odour attributes during the aging of emulsions at 50 °C in the dark: 0, 6, 24, 100, and 240 h (scores attributed on a 10-cm unstructured scale). For each descriptor, different letters stand for significantly different means ($p < 0.05$) (19 assessors, two replications).

10.23. attēls. Dažādu ar oksidēšanos saistīto smaržu sensorais novērtējums – piemērs (Villière et al. 2007).

Darba gaita:

1. Lai nodrošinātu, ka eļļā nav klātesoši antioksidanti, tika izspiesta svaiga ķirbju sēklu eļļa. 500 g sausu ķirbju sēklu tika ievietoti traukā, kas sēklas aizvada uz spiedi. No 500 g ķirbju sēklu tika iegūti aptuveni 200 ml ķirbju sēklu eļļas. Eļļa tika ievākta 50 ml stobriņos. Stobriņi tika ievietoti centrifūgā 8000 apgrz./min 5 min, lai izgulsnētu cietvielu piemaisījumus. Svaigas eļļas izspiešana ir būtiska daļa eksperimentā, lai tajā nebūtu ražošanas procesā pievienotie antioksidanti. Ķirbju sēklu eļļa tika izmantota, jo nebija iespēja iegūt tik lielu apjomu ar mikroaļģu lipīdiem, lai rezultāti būtu ticami, kā arī tajā ir augsts PNTS saturs.

2. Eksperimenta laikā tika izvēlēti industrijā biežāk izmantotie antioksidanti – kvercetīns, E vitamīns, C vitamīns un papildus rozmarīna ekstrakts. Kā mainīgie vides apstākļi tika izmantoti ātrie testi oksidēšanai labvēlīgos apstākļos – žāvskapī 70°C temperatūrā, atvērtā veidā saules gaismā, un kā kontrole – ledusskapī 4°C (skat. 10.1. tabulu).

10.1. Tabula.

Oksidēšanās eksperimentu paraugu veidi un to uzglabāšanas apstākļi.

Eļļas avots	Antioksidants	Antioksidanta C, mg/g	Uzglabāšanas apstākļi	Paraugu nr.
	Kvercetīns	1	0; 4; 24h 70°C	1;2
	Askorbīnskābe (C vitamīns)		0; 4; 24h 70°C	3;4
	Rozmarīna ekstrakts		0; 4; 24h 70°C	5;6
	Tokoferols (E vitamīns)		0; 4; 24h 70°C	7;8
	Citronskābe		0; 4; 24h 70°C	9;10
	- (kontrolē)	0	0; 4; 24h 70°C	11;12
	-	0	Ledusskapī, 4°C, tumsā, aizskrūvētā trauciņā kā atsauces materiāls	13;14
	-	0	0; 4; 24h uz palodzes gaismā ar	15;16

3. 25 ml plastmasas trauciņos ar aizskrūvējamu vāciņu ar pipetes un analītisko svaru palīdzību, tika iesvērti 10 g svaigi spiestās ķirbju sēklu eļļas.
4. Trauciņā ar eļļu tika pievienots attiecīgā antioksidanta daudzums, pirms tam to nosverot uz analītiskajiem svariem (skat. 10.1. tabulu).
5. Paraugi, kurus ievietoja žāvskapī paaugstinātā temperatūrā un tie, kas atradās saules gaismā, tika atskrūvēti, lai nodrošinātu gaisa piekļuvi un atstāti šādos vides apstākļos 0, 4 un 24 h (skat. 10.24. un 10.25. attēlu).

6. Pozitīvās kontroles (paraugi 11 un 12) tika ievietoti paaugstinātā temperatūrā bez antioksidanta klātbūtnes, savukārt negatīvās kontroles (paraugi 13 un 14) tika aizskrūvēti un ievietoti ledusskapī tumsā 4°C bez antioksidanta klātbūtnes.



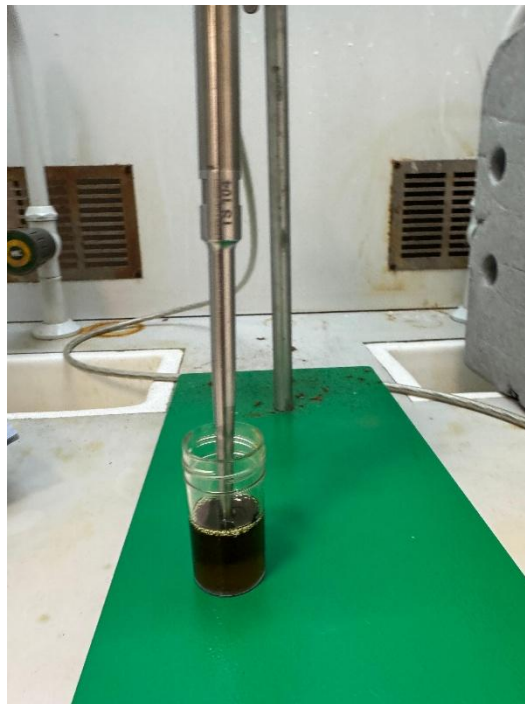
10.24. attēls. Ķirbju sēklu eļļas paraugi ar pievienotu antioksidantu karsēšanai žāvkspai 70°C 0, 4 un 24h.



10.25. attēls. Paraugu karsēšana atvērtā traukā 70°C.

7. Pēc antioksidanta pievienošanas, visi paraugi tika sonicēti 30 s, lai homogenizētu maisījumu un nodrošinātu plašāku antioksidanta iedarbību (skat. 10.26. attēlu).

8. Lai noteiktu oksidēšanās produktu veidošanos, tika izmantota konjugēto diēnu un triēnu spektrofotometriskās noteikšanas metode. Īsumā, 50 ml plastmasas stobriņos ar pipetes palīdzību tika iepildīti 25 ml izooktāna. Tad tika pievienots aptuveni 1 piliens eļļas parauga, tā masa tika noteikta, izmantojot analītiskos svarus. Šķīdums tika viegli sakratīts un pēc 5 min tika mērīta tā absorbcija pie 233 un 268 nm. Rezultāti tika pierakstīti.



10.26. attēls. Eļļas parauga ar antioksidantu homogenizēšana sonicējot.

9. Lai noteiktu oksidēšanās produktu veidošanos izmantojot sensoru jeb uz maņām balstīto noteikšanas metodi, tika izveidotas aptaujas anketas, lai vērtētāji viegli varētu noteikt paraugā jūtamās smaržas, kas saistītas ar oksidēšanās produktu klātesamību (skat. 10.2. tabulu).

10.2. Tabula.

Smakas novērtētājam aizpildāmā tabula.

Smaržas kritēriju novērtēšanas raksturojums	
1	Aprakstītā smarža nav jūtama, vai ir īpaši jākoncentrējas, lai to sajustu.
2	Smarža ir klātesoša, bet maiga – tā nav uzmācīga un var pazust citu aromātu fonā.
3	Smarža ir skaidri jūtama, tomēr tā nav uzmācīga.
4	Smarža ir izteikta un dominējoša, tā īpaši pievērš uzmanību salīdzinājumā ar citiem aromātiem paraugā.
5	Smarža ir ļoti intensīva – kairinoša, kodīga, rada diskomfortu.

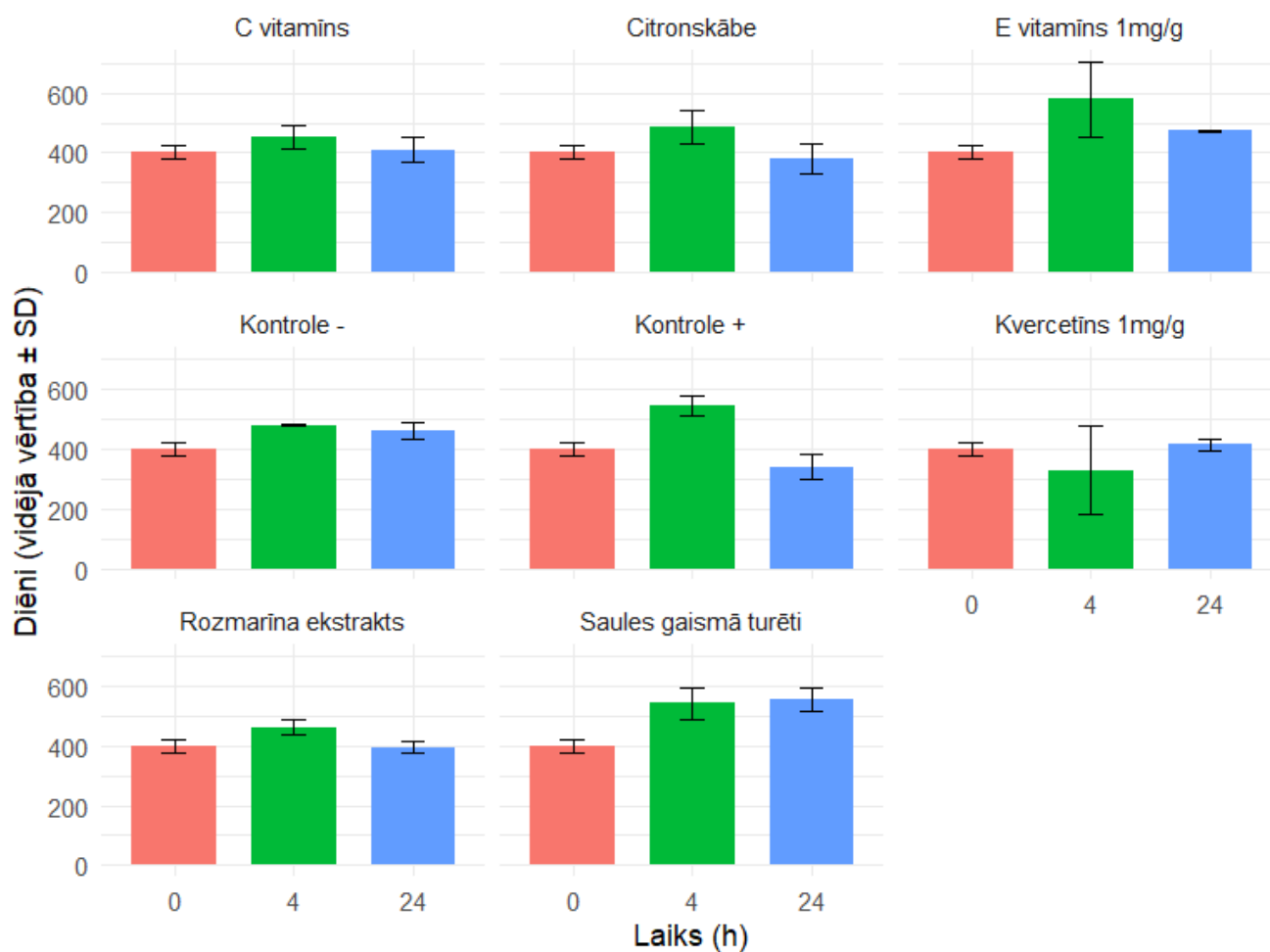
Parauga numurs	Smaku apraksts	Vērtējums (0 – 5)
1	Pļauta zāle	
	Fritēta	
	Sēnes	
	Krāsas smaka	
	Asa, nepatīkama, kodīga	
2	Pļauta zāle	
	Fritēta	
	Sēnes	
	Krāsas smaka	
	Asa, nepatīkama, kodīga	
3...16	Pļauta zāle	
	Fritēta	
	Sēnes	
	Krāsas smaka	
	Asa, nepatīkama, kodīga	

10. Lai nodrošinātu pēc iespējas patiesāku smaržu novērtēšanu, paraugi tika randomizēti sanumurēti un pēc 0, 4 un 24h tika nodoti vērtētājiem smaržu novērtēšanai.

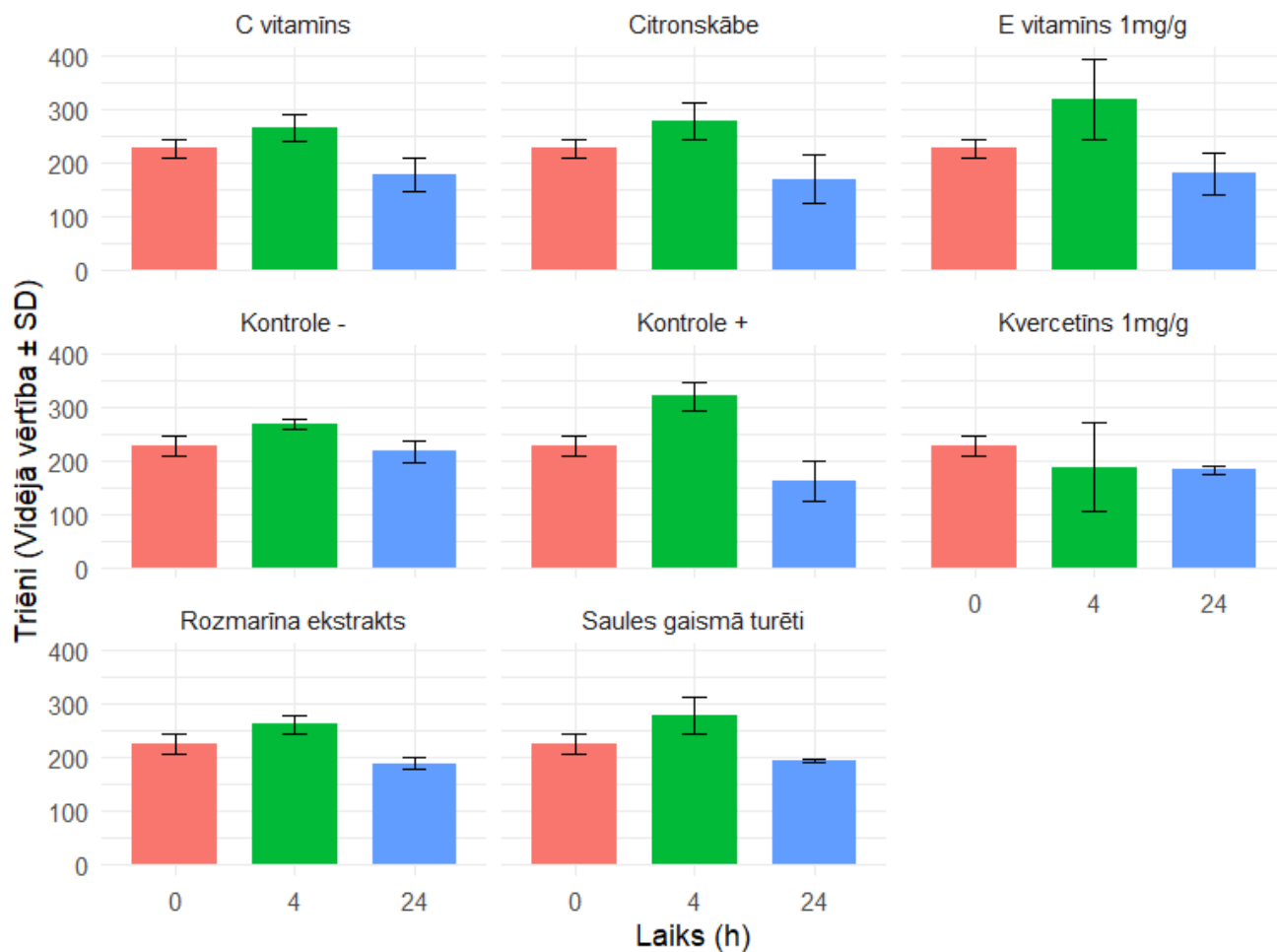
11. Vērtētāji nejaušā secībā novērtēja dažādu smaržu un to intensitāti paraugos. Tika vērtēta pļautas zāles, fritētas, sēņu, krāsas un asas, nepatīkamas, kodīgas smaku klātbūtne paraugos, balstoties uz intensitāti, izteiktu skalā no 1 līdz 5 (skat. 10.2. tabulu).
12. Iegūtie rezultāti tika apstrādāti un vizuāli attēloti ar programmas R palīdzību.

Rezultāti

1. Konjugētie diēni un triēni.



10.27. attēls. Konjugētie diēni atkarībā no uzglabāšanas laika dažādos apstākļos un paraugu veidos.



10.28. attēls. Konjugētie triēni atkarībā no uzglabāšanas laika dažādos apstākļos un paraugu veidos.

Eksperimentā pētījām eļļas ar antioksidantiem dažādos uzglabāšanas apstākļos, mērot absorbciju izooktānā pie 233 nm un 268 nm, lai noteiktu konjugētos diēnus un triēnus – galvenos lipīdu oksidācijas rādītājus. Iegūtie rezultāti bija diezgan svārstīgi, un šīs svārstības var izskaidrot ar vairākiem savstarpēji saistītiem faktoriem, kas saistīti gan ar eksperimenta uzbūvi, gan ar oksidācijas procesa dabu (skat. 10.27. un 10.28. attēlu).

Pirmkārt, lipīdu oksidācija ir sarežģīts process, uz kuru ietekmi atstāj daudzi faktori, piemēram, gaiss, temperatūra, skābekļa pieejamība un metālu jonu klātbūtne. Pat nelielas atšķirības šajos apstākļos uzglabāšanas laikā var būtiski ietekmēt oksidācijas ātrumu un intensitāti. Piemēram, temperatūras svārstības var paātrināt peroksidācijas reakcijas, bet atšķirīga skābekļa piekļuve ietekmē konjugēto sistēmu veidošanos un stabilitāti.

Antioksidantu darbība var būt ļoti atšķirīga atkarībā no to ķīmiskā sastāva, koncentrācijas un mijiedarbības ar konkrēto eļļas matricu. Daži antioksidanti var noārdīties laika gaitā vai gaismas/karstuma ietekmē, tādējādi zaudējot savu aizsargfunkciju un ļaujot notikt oksidācijas paātrinājumam. Turklāt antioksidantu efektivitāte var atšķirties dažādās eļļās, jo atšķirīgais taukskābju sastāvs ietekmē to jutīgumu pret oksidāciju un konjugēto diēnu/triēnu veidošanos.

Kopumā var secināt, ka svārstības, kuras novērojām, visticamāk ir radušās vairāku faktoru dēļ – vides apstākļu mainīguma, atšķirīgās antioksidantu efektivitātes, kā arī sarežģītās oksidācijas kinētikas eļļās. Lielāka kontrole pār eksperimentālajiem apstākļiem un atkārtoti mērījumi var palīdzēt samazināt šo mainīgumu un iegūt konsekvētākus rezultātus.

Salīdzinot pozitīvās kontroles rezultātus (eļļa, kas bez antioksidanta atvērtā traukā tika uzglabāta 70°C) un negatīvās kontroles (eļļa, kas bez antioksidanta slēgtā traukā tika uzglabāta 4°C tumsā) rezultātus (skat. 10.27. un 10.28. attēlu) gan konjugēto diēnu gadījumā, gan konjugēto triēnu netika novērotas ciešas likumsakarības. Abos gadījumos rādītāji svārstījās, sasniedzot maksimumu pēc 4 vai 24 h. Tas liecina par oksidēšanās procesa dinamisko dabu – pirmējie oksidēšanās produkti var ķīmisko reakciju rezultātā pārveidoties par sekundāriem oksidēšanās produktiem. Turklāt, nereti ar oksidēšanās produktiem saistītās reakcijas ir atgriezeniskas, kas vēl vairāk apgrūtina ķīmiski noteikt eļļas oksidēšanās pakāpes stāvokli.

Arī starp dažādiem pievienotiem antioksidantiem netika novērotas īpašas izmaiņas, kas ietekmētu oksidēšanās procesu. Interesanti, ka gan konjugēto diēnu, gan konjugēto triēnu gadījumā biežāk lielākā oksidēšanās pakāpes vērtība tika noteikta pēc 4 h uzglabāšanas, kas vēl vairāk apstiprina ar oksidēšanos saistīto savienojumu nestabilo dabu.

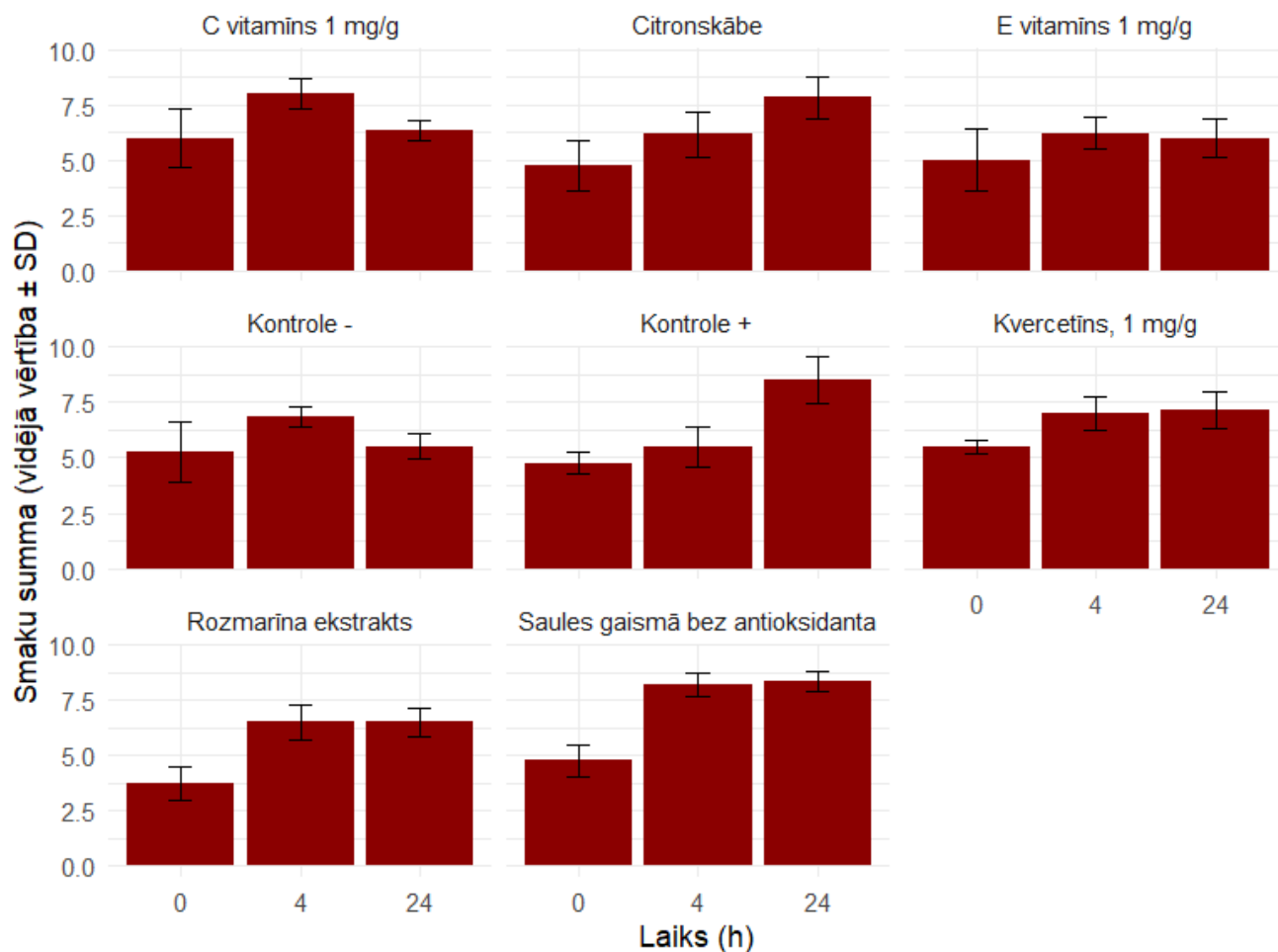
Lielās variabilitātes starp laika vienībām dēļ nevienā gadījumā netika sasniegti statistiski nozīmīgi rezultāti vienas parauga grupas ietvaros – tas nozīmē, ka visticamāk šajā gadījumā nav bijusi būtiska ietekme uz eļļu oksidēšanās pakāpi.

Var secināt, lai noteiktu eļļas oksidēšanās pakāpi, ir nepieciešama kompleksa pieeja, kas ietver dažādu ķīmisko savienojumu noteikšanu eļļā. Pieejām ir jābūt gan analītiskām, gan uz maņām balstītām, lai varētu spriest par eļļas oksidēšanās procesiem.

10.3. Tabula. Konjugēto diēnu un triēnu vērtības dažādos parauga veidos un uzglabāšanas apstākļos. *Vidējās vērtības, n=2.*

Konjugētie diēni un triēni dažādos paraugos				
Veids	Laiks	Diēni	Triēni	p_value
C vitamīns	0	400.747	226.812	0.833
C vitamīns	4	453.208	266.011	0.833
C vitamīns	24	409.050	178.096	0.833
Citronskābe	0	400.747	226.812	0.668
Citronskābe	4	487.793	276.830	0.668
Citronskābe	24	380.340	170.115	0.668
E vitamīns 1mg/g	0	400.747	226.812	0.129
E vitamīns 1mg/g	4	578.771	320.175	0.129
E vitamīns 1mg/g	24	473.298	180.104	0.129
Kontrole +	0	400.747	226.812	0.245
Kontrole +	4	544.710	320.137	0.245
Kontrole +	24	339.601	161.323	0.245
Kontrole -	0	400.747	226.812	0.149
Kontrole -	4	481.313	269.128	0.149
Kontrole -	24	462.302	217.079	0.149
Kvercetīns 1mg/g	0	400.747	226.812	0.572
Kvercetīns 1mg/g	4	329.167	186.859	0.572
Kvercetīns 1mg/g	24	415.276	182.654	0.572
Rozmarīna ekstrakts	0	400.747	226.812	0.831
Rozmarīna ekstrakts	4	462.932	263.261	0.831
Rozmarīna ekstrakts	24	395.847	189.842	0.831
Saules gaismā turēti	0	400.747	226.812	0.067
Saules gaismā turēti	4	542.303	279.122	0.067
Saules gaismā turēti	24	555.672	195.890	0.067

2. Sensorās novērtēšanas rezultāti.



10.29. attēls. Vērtētāju noteiktā smaku summa dažādos parauga veidos un uzglabāšanas apstākļos. Vidējā vērtība $\pm$ SD, $n=5$.

Sensorās novērtēšanas rezultāti sniedza nozīmīgākus datus par eļļu oksidēšanos dažādos apstākļos kā analītiskās konjugēto diēnu un triēnu noteikšanas metodes. Tas varētu būt saistīts ar to, ka sensorā novērtēšana balstījās uz piecu dažādu smaku kategoriju novērtēšanu skalā no 1 līdz 5. Šāda pieeja ir daudzpusīgāka par divu konkrētu savienojumu spektrofotometrisko noteikšanu, jo tā ļauj novērtēt plašāku potenciālo oksidēšanās produktu klāstu.

Papildus plašākai oksidēšanās produktu novērtēšanai, uz smaržu balstītais vērtējums aptver dažādās lipīdu oksidēšanās stadijas. Ir iespējams novērtēt kopēju oksidēšanos, neskatoties uz oksidēšanās posmu un tā sarežģītajām reakcijām, jo liela daļa oksidēšanās produktu uzkrājas tādos vai citos savienojumos, kuru smaržu ir iespējams noteikt.

10.4. Tabula. Vērtētāju noteiktā smaku summa atkarībā no parauga veida un uzglabāšanas apstākļiem. *Smaku summa ir vidējā vērtība $\pm$ SD, $n=5$.*

Smaku summa atkarībā no parauga veida un uzglabāšanas apstākļiem			
Veids	Laiks (h)	Smaku summa $\pm$ SD	p-value
C vitamīns 1 mg/g	0	6 $\pm$ 2.58	0.328
C vitamīns 1 mg/g	4	8 $\pm$ 2.19	0.328
C vitamīns 1 mg/g	24	6.33 $\pm$ 1.37	0.328
Citronskābe	0	4.75 $\pm$ 2.22	0.159
Citronskābe	4	6.17 $\pm$ 3.25	0.159
Citronskābe	24	7.83 $\pm$ 2.93	0.159
E vitamīns 1 mg/g	0	5 $\pm$ 2.83	0.613
E vitamīns 1 mg/g	4	6.2 $\pm$ 2.28	0.613
E vitamīns 1 mg/g	24	6 $\pm$ 2.83	0.613
Kontrole +	0	4.75 $\pm$ 0.96	0.109
Kontrole +	4	5.5 $\pm$ 2.88	0.109
Kontrole +	24	8.5 $\pm$ 3.33	0.109
Kontrole -	0	5.25 $\pm$ 2.75	0.270
Kontrole -	4	6.83 $\pm$ 1.47	0.270
Kontrole -	24	5.5 $\pm$ 1.76	0.270
Kvercetīns, 1 mg/g	0	5.5 $\pm$ 0.58	0.533
Kvercetīns, 1 mg/g	4	7 $\pm$ 2.37	0.533
Kvercetīns, 1 mg/g	24	7.17 $\pm$ 2.56	0.533
Rozmarīna ekstrakts	0	3.75 $\pm$ 1.5	0.074
Rozmarīna ekstrakts	4	6.5 $\pm$ 2.59	0.074
Rozmarīna ekstrakts	24	6.5 $\pm$ 1.97	0.074
Saules gaismā bez antioksidanta	0	4.75 $\pm$ 1.5	0.035
Saules gaismā bez antioksidanta	4	8.17 $\pm$ 1.72	0.035
Saules gaismā bez antioksidanta	24	8.33 $\pm$ 1.51	0.035

Analizējot iegūtos rezultātus var teikt, ka gan parauga veidam, gan uzglabāšanas apstākļiem, gan laika faktoram, atsevišķos gadījumos ir novērojama statistiski būtiska ietekme uz smaku summas vērtējumu. Salīdzinot negatīvās un pozitīvās kontroles grupas (skat. 10.4. tabulu), secināms, ka pie 0 h smaku vērtējums tīrai eļļai ir līdzīgs, attiecīgi $5,25 \pm 2,75$ un $4,75 \pm 0,96$. Tomēr, sasniedzot 24 h, negatīvās kontroles grupai, kur bija ķirbju sēklu eļļa bez antioksidanta, bet kas tika uzglabāta ledusskapī 4°C , tumsā un slēgtā traukā, eļļas smaku vērtējums ir zemāks par 3 vienībām.

No tā secināms, ka šādi uzglabāšanas apstākļi eļļām bez antioksidantu pievienošanas var būtiski samazināt eļļu oksidēšanās procesu. Turklāt, negatīvās kontroles gadījumā, 24 h laikā smaku summas novērtējuma pieaugums bija par 0,25 vienībām, lai gan 4 h šim pašam paraugam vērtētāji bija devuši 1,58 vienību pieaugumu. Savukārt, pozitīvas kontroles paraugiem, kas bija ievietoti 70°C bez antioksidanta un atvērtā traukā, 24 h laikā tika novērtēts 3,75 vienību liels pieaugums, kas saskan ar iepriekš izteiktajiem secinājumiem. Tomēr, ņemot vērā ierobežoto vērtētāju skaitu, gan pozitīvās, gan negatīvās kontroles gadījumā netika sasniegti statistiski būtiski rezultāti ($p > 0,05$). Tas, visticamāk, ir lielo standartkļūdu dēļ, tomēr, skatoties uz rezultātiem, ir skaidri redzamas tendences par to, kādi uzglabāšanas apstākļi varētu būt piemērotākie.

Apskatot dažādo antioksidantu ietekme uz smaku summas vērtējumu (skat. 10.29. attēlu un skat. 10.4. tabulu), izceļas kvercetīna un rozmarīna ekstrakta rezultāti, kur tie ir tuvāki statistiski nozīmīgām atšķirībām. Visos gadījumos, kur paraugiem tika pievienots antioksidants, pēc 24 h karsēšanas ir zemāki smaku novērtējuma rādītāji, tomēr tie ir pieaugoši. Tas liek secināt, ka antioksidanta pievienošanai un to veidam ir mazāka nozīme, kā vides apstākļiem eļļas uzglabāšanai. E vitamīna, kvercetīna un rozmarīna ekstrakta paraugos, smaku kopsummas vērtējums pieauga pēc 4 h, un saglabājās līdzīgi nemainīgs pēc 24 h. Citronskābes paraugos smaku summas vērtējums laikā turpināja vienmērīgi pieaugt. Tomēr visos paraugos ar antioksidantu, kas bija uzglabāti 70°C atvērtā veidā, bija augstāki smaku summas vērtējumi kā paraugiem negatīvajā kontrolē, kas bija bez antioksidanta 4°C tumsā un slēgtā traukā.

Interesanti, ka paraugiem, kas tika uzglabāti saules gaismā atvērtā traukā bez antioksidanta klātbūtnes, tika iegūti statistiski būtiski rezultāti ($p < 0,05$). Tas varēja notikt tāpēc, ka jau pēc 4 h šādiem paraugiem smaku summas vērtējums bija teju dubultojies. Šādi uzglabāšanas apstākļi izrādījās tik pat nelabvēlīgi, kā karsēšana 70°C tumsā ar atvērtu trauku. Tas ir īpaši svarīgi, jo vairums patērētāju uzglabā eļļas istabas temperatūrā, gaišā vietā, nereti arī daļēji atvērtā traukā.

Šādas uzglabāšanas prakses ir eļļas oksidēšanai tik pat labvēlīgas kā uzglabāšana 70°C tumsā ar atvērtu trauku.

Balstoties uz sensoro novērtēšanu, var teikt, ka svarīgākais faktors, lai eļļa neoksidētos un tādējādi nekļūtu patērētāja veselībai kaitīga, ir atbilstoši uzglabāšanas apstākļi. Eļļas ir jāuzglabā slēgtā traukā, tumsā, ledusskapī temperatūrā ap 4°C. Antioksidantu pievienošana var samazināt eļļu oksidēšanās ātrumu, tomēr šis paņēmieni ir mazāk efektīvs kā atbilstošu vides apstākļu nodrošināšana.

Papildus jāmin, ka smaržu vērtētājiem uz anketu lapām bija iespēja pierakstīt komentārus, ja smakas profils neatbilst vai ir plašāks par kritērijos minētu. Interesanti bija tas, ka trīs no pieciem vērtētājiem atsevišķos gadījumos sajuta ābolu smaržu intensitātē no viens līdz divi. Ābolu smarža atsevišķiem paraugiem parādījās pēc 4 h, savukārt pēc 24 h 20% vērtētāju piešķīra ābolu smaržu aptuveni pusei piedāvāto paraugu, turklāt ar lielāku smaržas intensitāti.

Pētot literatūras avotus, ābolu smarža nereti tiek pieminēta saistībā ar eļļu oksidēšanās procesiem, tomēr nav skaidras atbildes par to, kādiem ķīmiskajiem savienojumiem šī smarža atbilst (Díaz-Montaña et al. 2023).

Jāmin, ka izvēlēta pieeja varētu tikt saukta par īstermiņa testiem. 70°C temperatūra uzglabāšanas apstākļiem tika izvēlēta, lai spriestu par to, vai ekstrēmos apstākļos parauga veidam ir ietekme uz eļļas oksidēšanās pakāpi. Šādus ātros testus varētu būt ērti pielietot, lai noskaidrotu dažādu antioksidantu spējas samazināt eļļu oksidēšanos. Tomēr pēc iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka eļļu oksidēšanās ir straujš, dinamisks, daudzpakāpju process.

Piemēram, paraugiem, kas tika atvērtā veidā turēti uz palodzes, oksidēšanās norisēja vienlīdz strauji kā pozitīvajai kontroles grupai – paraugiem, kas atvērtā veidā tika uzglabāti 70°C. Lai gan antioksidanti šo procesu mazliet palēnināja, tomēr vides apstākļi izrādījās izšķiroši pat tik īsā laika posmā kā viena diennakts.

Tas nozīmē, ka eļļu atbilstoša uzglabāšana ir nepieciešama no eļļas ieguves brīža līdz pat patērētāja gala vajadzībām. Tas ietver nepārtrauktu atbilstošu uzglabāšanas apstākļu nodrošināšanu noliktavās, transportā, tirdzniecības vietās un arī pie patērētāja.

Oksidēšanās eksperimentu galvenie secinājumi:

1. Konjugēto diēnu un triēnu noteikšana spektrofotometriski izooktānā var kalpot kā metode, ko ir iespējams izmantot īslaicīgai lipīdu oksidēšanās procesu noteikšanai.
2. Lipīdu oksidēšanās ir daudzpusīgs process, kas iesaista virkni ķīmisko reakciju, tāpēc to oksidēšanās pakāpes noteikšanai ir nepieciešama kompleksa pieeja.
3. Sensorā uz smaržu balstītā metode var būt efektīvāka par konkrētu savienojumu noteikšanas analītiskajām metodēm, jo tā piedāvā netieši noteikt dažādu ar oksidēšanos procesiem saistītu savienojumu noteikšanu, neatkarīgi no to mainīgās dabas. Sensorā oksidēšanās pakāpe ietver plašu smaržu profilu, līdz ar to ir iespējams noteikt dažādu potenciālu oksidēšanās produktu klātbūtni eļļā.
4. Uzglabāšanas apstākļi ir svarīgākais parametrs, lai nodrošinātu lēnāku eļļu oksidēšanos. Atbilstoši uzglabāšanas apstākļi ietver 4°C, tumsu un slēgta tipa trauku ar ierobežotu gaisa piekļuvi.
5. Antioksidantiem ir labvēlīga ietekme oksidēšanās procesa palēnināšanā, tomēr starp tiem nav būtisku atšķirību.
6. Eļļas uzglabāšana atvērtā veidā istabas temperatūrā saules gaismā ir tik pat nelabvēlīga kā tās uzglabāšana atvērtā veidā 70°C.

11. MIKROAĻĢU LIPĪDU UN POLINEPIESĀTINĀTO TAUKSKĀBJU EKSTRAKTA RAŽOŠANAS REGLAMENTS

RAŽOŠANAS GALAPRODUKTA RAKSTUROJUMS

Ražošanas reglamentu sagatavojuši AS "Biolat"

Produkta nosaukums

Mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ekstrakts.

Produkta izmantošana

Augu izcelsmes barības piedeva putnu imunitātes stiprināšanai un olu uzturvērtības paaugstināšanai ar omega-3 taukskābēm.

Informācija par dokumentāciju, kas dod tiesības produkta rūpnieciskai ražošanai un nosaka prasības kvalitātei

Pamatdokumentācija ražošanai ir:

Tehniskie noteikumi TN LV40003128200 – 04-25-E

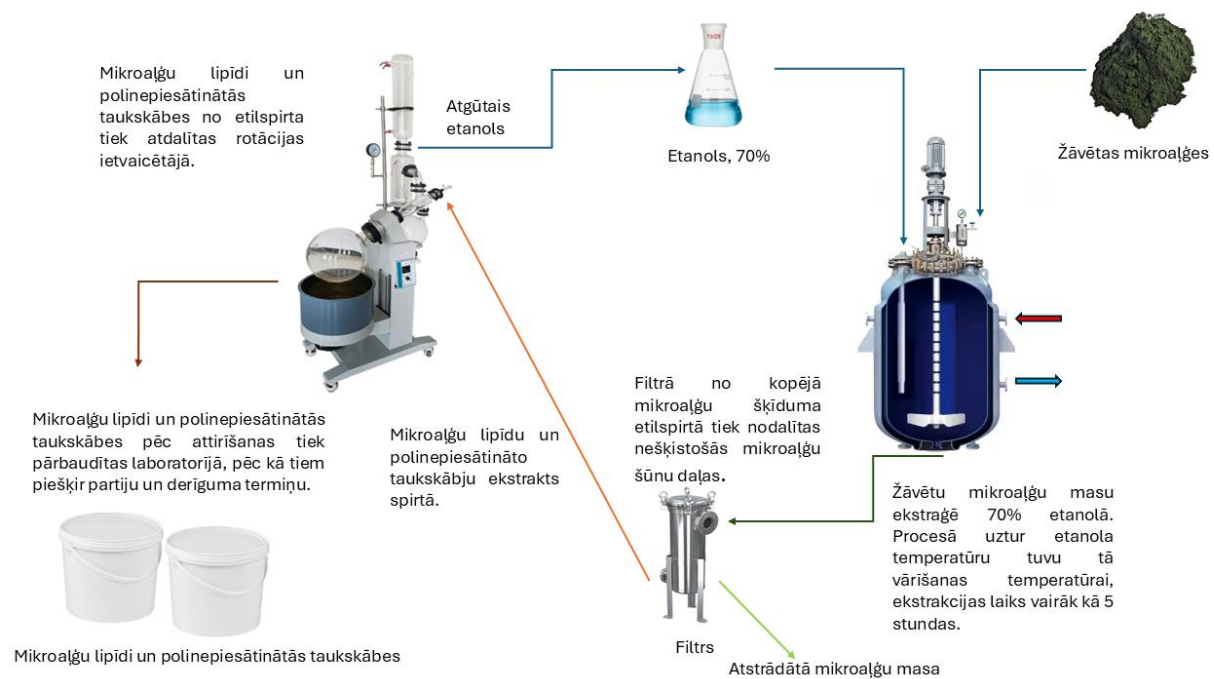
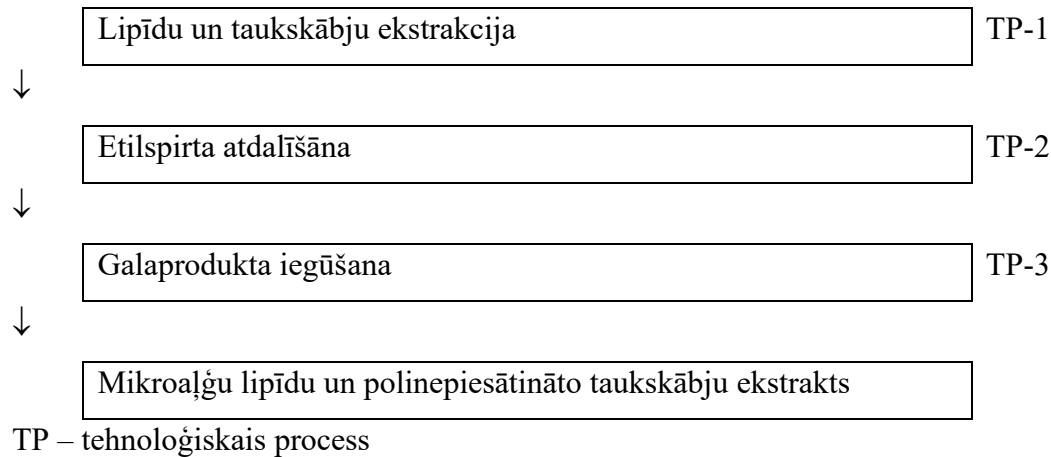
Īss produkta raksturojums

Lipīdi ir svarīgas bioloģiskas molekulas augu un dzīvnieku šūnās. Lipīdu sastāvs ietver taukskābes, glicerolipīdus, glicerofosfolipīdus, sfingolipīdus, sterīnu lipīdus, prenola lipīdus, saharolipīdus un poliketīdus. Tie nešķīst ūdenī, bet šķīst organiskos šķīdinātājos, piemēram, hloroformā, etanolā, heksānā un dietilēterī. Lipīdi darbojas kā enerģijas rezerves un šūnu membrānu strukturālās sastāvdaļas. Tos iedala neitrālos lipīdos (piemēram, triacilglicerīnos, sterīnos) un polārajos lipīdos (fosfolipīdos, glikolipīdos). Taukskābes un to atvasinājumi, piemēram, triglicerīdi, ir svarīgi enerģijas uzglabāšanai dzīvajos organismos. Triglicerīdi veidojas no glicerīna un trim taukskābēm, kas var būt piesātinātas (PPTS), mononepiesātinātas (MNTS) vai polinepiesātinātas (PNTS)

RAŽOŠANAS ĶĪMISKĀ SHĒMA

Mikroaļģu lipīdu un taukskābju ekstrakta ražošanas procesā notiek tikai vielu šķīdināšana un citi fizikāli-mehāniski procesi, bet ķīmiskas pārvērtības ar vielām nenotiek. Tādēļ šī reglamenta nodaļa netiek izvērsta.

RAŽOŠANAS TEHNOĻOGISKĀ SHĒMA



11.1. attēls. Ražošanas tehnoloģiskās shēmas grafisks attēlojums.

STARPPRODUKTI, IZEJVIELAS UN MATERIĀLI

Produkta ražošanas procesā starpproduktu nav, tādēļ prasības tiem reglamentā netiek izvērstas.

Prasības ražošanā izmantojamajiem materiāliem un izejvielām uzskaitītas 11.1. tabulā.

11.1. tabula.

Prasības ražošanā lietojamiem materiāliem un izejvielām.

Nr. p.k.	Izejvielu un materiālu nosaukums	Šķira vai artikuls	Pamatvielas saturs, (%)
1.	Mikroaļģes	-	>85
2.	Etilspirts	nedenaturēts	80±10

RAŽOŠANAS APARATŪRAS SHĒMA UN IEKĀRTU SPECIFIKĀCIJA

Ražošanas shēma attēlota 11.1. attēlā

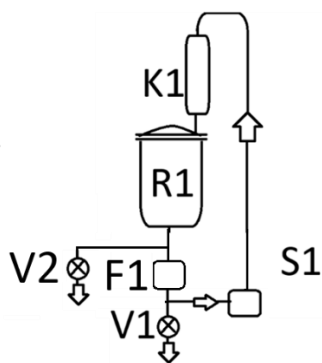
Aparātu, kontroles mēraparātu un regulējošo iekārtu specifikācija ir izklāstīta 11.2. tabulā.

TEHNOLOĢISKĀ PROCESA IZKLĀSTS

Mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ražošanas procesā nenotiek ķīmiskas pārvērtības, bet šķīstošās vielas pāriet šķīdumā.

Ziņas par pielietotajām izejvielām, to veidu un daudzumu kopumā par katru stadiju apkopotas 11.3. un 11.4. tabulā.

Tālāk seko darbu izklāsts pa tehnoloģiskajām operācijām. Aparatūras un iekārtu numerācija aprakstā atbilst 11.1. attēlā "Mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ražošanas shēma" lietotajai.



R1 – ekstrakcijas reaktors

K1- kondensātors

F1- filtrs

V1,V2 – ventiļi

S1 – sildītājs

11.2. attēls. Iekārtas specifikācija un numerācija.

11.2.tabula.

Aparātu un iekārtu specifikācija.

Nr.pēc shēmas	Aparātu, un iekārtu nosaukums	Aparātu vai iekārtu skaits	Aparātu un iekārtu darbojošās virsmas materiāls	Aparātu, kontroles mēraparātu un regulējošo iekārtu raksturojums
1	2	3	4	5
R1	Reaktors	1	Borsilikātu stikls	Termiski stabils
V1, V2	Ventilis	2	Borsilikātu stikls, teflons	Termiski stabils
S2	Sildītājs	1	-	Nesatur toksiskus matereālus darba virsmās
K1	Kondensātors	1	-	Nesatur toksiskus matereālus darba virsmās
F1	Filtrs	1	-	Piemērots pārtikas produktiem

Tehnoloģiskā procesa apraksts

TP1 Lipīdu un taukskābju ekstrakcija.

Sausas mikroaļģes un etilspirtu iepilda reaktorā R1 (skat. 11.3. attēlu). Pie noslēgtiem ventīļiem V1 un V2 uzsāk dzesēšanu kondensatorā K1 un sildīšanu sildītājā S1. Novērojot mikroaļģu atkrāsošanos, izslēdz sildītāju S1 un ļauj šķīdumam atdzist tiktāl, līdz šķīdinātāja tvaiki beidz kondensēties kondensatorā K1, pēc kā iegūto ekstraktu no sildītāja kameras izlaiž caur ventīli V1, bet atstrādāto mikroaļģu masu izkrauj atverot ventīli V2.



11.3. attēls. Reaktora piepildīšana ar izejvielām (K. Spalvis foto).

TP2 Etilspirta atdalīšana.

Etilspirts tiek atgūts, to atdestilējot no mikroaļģu lipīdu masas (skat. 11.4. attēlu).



11.4. attēls. Etilspirta atdalīšana (atgūšana) no mikroaļģu lipīdiem (K. Spalvis foto).

TP3 Galaprodukta iegūšana.

Iegūto masu fasē pārtikas produktiem atbilstošā un marķētā tarā, paņemot vidējo paraugu. Paraugs tiek analizēts atbilstoši TN LV 40003128200 – 04-25-E, ja mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ekstrakts atbilst tehniskajiem noteikumiem, tam tiek piešķirts partijas numurs, derīguma termiņš, kā arī tiek norādīti parametri atbilstoši TN LV 40003128200 – 04-25-E.

Izlietoto un iegūto vielu bilance

11.3. tabula.

Stadija TP 1. Lipīdu un taukskābju ekstrakcija.

Izlietots:

Nr.p.k.	Izejvielu nosaukums	Iekrautā masa, kg
1.	Mikroaļģu masa	2
2.	Etilspirts	8
	Kopā:	10

Iegūts:

Nr.p.k.	Izejvielu nosaukums	Iekrautā masa, kg
1.	Atstrādāta mikroaļģu masa pēc ekstrakcijas	2.5
2.	Etilspirta un lipīdu un polinepiesātināto taukskābju maisījums	6.5
	Kopā:	9

11.4. tabula.

Stadija TP 2. Etilspirta atdalīšana.

Izlietots:

Nr.p.k.	Izejvielu nosaukums	Iekrautā masa, kg
1.	Etilspirta un lipīdu un polinepiesātināto taukskābju maisījums	6.5
	Kopā:	6.5

Iegūts:

Nr.p.k.	Izejvielu nosaukums	Iekrautā masa, kg
1.	Etilspirts	5.9
2.	Mikroaļģu lipīdi un polinepiesātinātās taukskābes	0.4
	Kopā:	6.3

RAŽOŠANAS ATKRITUMI. TEHNOLOĢISKIE UN VENTILĀCIJAS IZMEŠI ATMOSFĒRĀ, TO IZMANTOŠANA UN NEITRALIZĒŠANA

Tā kā mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju iegūšanas tehnoloģiskā procesa atkritumi un izmeši neprasa organizēt atsevišķu tehnoloģisko procesu to izmantošanai un neitralizēšanai, tad šī reglamenta nodaļa netiek izvērsta, bet to izlietošana tiek izklāstīta reizē ar pamatprocesa attiecīgajām stadijām.

RAŽOŠANAS KONTROLE

Šajā nodaļā dots to ražošanas svarīgāko kontroles punktu uzskaitījums, kas nodrošina nepieciešamā tehnoloģiskā režīma ievērošanu (11.5. tabula).

Dokumenti, kuros reģistrē kontroles rezultātus, ir sekojoši:

- operāciju lapa, ko aizpilda operators (aparātstrādnieks),
- ceha laboratorijas darba žurnāls.

Ceha meistars katru dienu pārbauda tehnoloģiskā procesa kontroles pareizību un speciālā žurnālā fiksē novirzes no noteiktā reglamenta un veiktos pasākumus reglamenta pārkāpumu seku novēršanai.

11.5. tabula.

Svarīgāko to ražošanas procesa kontroles punktu saraksts, kas nodrošina tehnoloģiskā procesa ievērošanu.

Stadijas nosaukums un Nr	Kontroles objekta nosaukums	Kontrolējama parametra nosaukums	Reglamentētais normatīvs (mērvien.)	Kas veic kontroli	Metode un kontroles biežums	Kas un kādā dokumentā reģistrē kontroles rezultātus
2	2	4	5	6	7	8
TP-1 "Lipīdu un taukskābju ekstrakcija R1 - reaktors"	Mikroaļģu masa	masa	2 kg	Tehnoloģis	Svari, katram ciklam	operators operāciju lapā
TP-1 "Lipīdu un taukskābju ekstrakcija R1 - reaktors"	etilspirts	masa	8 kg	Tehnoloģis	Svari, katram ciklam	operators operāciju lapā

TP-1 "Lipīdu un taukskābju ekstrakcija R1 - reaktors"	maisīšana	maisīšanas laiks	5 stundas	Tehnoloģs	Pulkstenis vai hronometrs, katram ciklam	operators operāciju lapā.
TP-2 Etilspirta atdalīšana	ekstrakts	Nemainīga masa	0.02kg	laborants	svari	laborants tehnoloģiskajā žurnālā
TP-3 "Galaprodukta iegūšana",	Mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ekstrakts	PNTS saturs	Virs 10 %	Laborants	Atbilstoši TN	operators tehnoloģiskajā žurnālā

DROŠĪBAS TEHNIKA, UGUNSDROŠĪBA UN RAŽOŠANAS SANITĀRIJA

Šajā nodaļā tiek sniegti tehnoloģiskie dati, kas vajadzīgi drošības tehnikas un ražošanas sanitārijas nepieciešamo pasākumu izstrādāšanai, saskaņā ar spēkā esošās dokumentācijas noteikumiem un prasībām.

Saskaņā ar "Telpu un ēku sprādzienbīstamības un ugunsbīstamības kategorijas pamatpazīmēm" pēc LBN 201-96 "Ugunsdrošības normas" mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ekstrakta ražošanas telpas atbilst A kategorijai. Strādājot ar etanolu, ražošanas telpā ir jābūt ieslēgtai pieplūdes un izplūdes ventilācijai, un tajās jānodrošina ugunsdrošības normas saskaņā ar **Ministru kabineta noteikumiem Nr.82 (2004.gada 17. februārī Ugunsdrošības noteikumi)**.

Elektroiekārtu (mašīnas, aparāti, ierīces), elektroinstalācijas un kabeļu līniju izvēli un uzstādīšanu veic ievērojot MK 22.10.1996 noteikumus Nr. 413 "Elektroenerģijas piegādes un lietošanas noteikumi".

Statiskās elektrības lādiņu uzkrāšanās ražošanas procesā nav sagaidāma, tādēļ speciāli pasākumi šajā sakarībā nav jāveic.

Ražošanas procesā nav speciālu paaugstinātas bīstamības vietu, tādēļ ražošanas bīstamākās vietas kopā ar drošības pasākumiem atsevišķi netiek uzskaitītas, bet atspoguļosies ražošanas tehnoloģiskajā instrukcijā.

Speciālās sadzīves telpas un to iekārtojums jāveido atbilstoši higiēnas prasībām pārtikas ap-
ritē (MK not. Nr.269 no 2004.gada 8.aprīļa).

RAŽOŠANAS INSTRUKCIJU SARAKSTS

Ražošanas instrukcijas jāizstrādā uzņēmumam (organizācijai) atbilstoši ražošanas reglamentam un tās jāapstiprina uzņēmuma galvenajam inženierim. Ražošanas instrukcijas jāpārskata un jāapstiprina no jauna reizē ar reglamenta izmaiņām, bet ne retāk kā reizi gadā.

To strādnieku un inženiertehnisko darbinieku, kuri apkalpo Mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ekstrakta ražošanas procesu, lietošanai jāizstrādā šādas instrukcijas:

- " Mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ekstrakta ražošanas tehnoloģiskā instrukcija";
- "Darba drošības tehnikas, ugunsdrošības un ražošanas sanitārijas instrukcija"

TEHNISKIE NOTEIKUMI - Mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ekstrakts TN LV 40003128200 – 04-25-E

Sagatavoja AS "Biolat"

Ieviešanas laiks: 15.04.2025

Šie tehniskie noteikumi nosaka no mikroaļģēm iegūtu lipīdu un taukskābju kvalitātes rādītājus, to noteikšanas metodes, pieņemšanas, marķēšanas, transportēšanas un uzglabāšanas noteikumus, kā arī ražotāja garantijas.

Lipīdu un taukskābju ekstrakts satur augu lipīdus, polinepiesātinātās taukskābes un citus savienojumus.

Lipīdu un taukskābju ekstraktu lieto kā dabīgu, no augiem iegūtu piedevu pārtikas produktiem, piedevu dzīvnieku pārtikai un kosmētikas izstrādājumiem.

TEHNISKĀS PRASĪBAS

1. Mikroaļģu lipīdu un taukskābju ekstraktu izgatavo saskaņā ar izstrādāto tehnoloģisko reglamentu. Lipīdu un taukskābju ekstraktu kvalitātei jāatbilst šo tehnisko noteikumu prasībām.
2. Mikroaļģu lipīdu un taukskābju ekstraktu iegūst no mikroaļģēm ekstrakcijas ceļā.
3. Mikroaļģu lipīdu un taukskābju ekstraktu izgatavo pastas veidā.
4. Pēc organoleptiskiem un fizikāli ķīmiskiem rādītājiem lipīdu un taukskābju ekstraktam jāatbilst 11.6. tabulā uzrādītajām prasībām.

11.6.tabula.

Organoleptiskie un fizikāli ķīmiskie rādītāji lipīdu un taukskābju ekstraktam, pēc kuriem tam jāatbilst.

Rādītājs	Pieļaujamās vērtības
Krāsa	no olīvzaļas līdz melnai
Smarža	Nav smaržas līdz vāji izteikta aļģu smarža
PNTS saturs	Vairāk nekā 10%
Piemaisījumu saturs	Mazāk nekā 50%
Mikrobioloģiskie rādītāji: *	
- mezofili aerobo un fakultatīvi anaerobo (MAFAM) mikroorganismu skaits	ne vairāk kā 30/1 g nav pieļaujamās
- zarnu nūjiņas grupas baktērijas 100 ml dzēriena	nav pieļaujami
- patogēnie mikroorganismi (t.sk., salmonella)	

*- nosaka akreditētā laboratorijā reizi gadā

Kvalitātes prasības ražošanā lietojamām izejvielām norādīta 11.7. tabulā:

11.7. tabula. Kvalitāte prasības.

N.p.k.	Izejvielu un materiālu nosaukums	Pamatvielas saturs, %
1.	Mikroaļģes	>85
2.	Etilspirts	80±10

PIEŅEMŠANAS NOTEIKUMI

1. Mikroaļģu lipīdu un taukskābju ekstraktu pieņem partijās.
2. Par partija tiek uzskatīts jebkurš produkcijas daudzums, kas izgatavots no vienas izejvielu partijas, ir viendabīgs pēc saviem kvalitātes rādītājiem un tiek nosūtīts ar vienu kvalitātes pavadzīmi.
3. Vidējā parauga ņemšana.

Vidējā parauga ņemšanu veic saskaņā ar t.s. nejaušības principu. Ar karoti (10 - 20 ml tilpuma) samaisa trauka saturu un stikla vārglāzē pārnes vienas karotes saturu (10 – 20 g). Atkārtoti samaisa un atkal pārnes 1 karotes saturu stikla vārglāzē pie iepriekš paņemtā parauga. Vidējā parauga ņemšanu turpina, līdz tā masa ir apmēram 100 g (kontrolē ar svariem). Ja lipīdu un taukskābju ekstraktu vienas partijas daudzums ir safasēts vairākos traukos, tad apvienoto paraugu ņem no katra trauka un pārnes vienā traukā. Vidējo paraugu no partijas ievieto hermētiski noslēgtā stikla traukā un uzlīmē etiķeti, uz kuras jānorāda:

- ražotājs,
 - produkta nosaukums,
 - parauga ņemšanas datums,
 - tās personas uzvārds, kura ņēma paraugu,
 - esošo tehnisko noteikumu nosaukums.
4. Ja analīzes rezultāti neatbilst tehnisko noteikumu prasībām, analīzes atkārtoti. Atkārtotajā analīzē iegūtie rezultāti ir galīgie.
 5. Katrai produkcijas partijai jāpievieno kvalitāti apstiprinošs dokuments, kurā norādīts:
 - ražotāja nosaukums, preču zīme, adrese,
 - produkta nosaukums,
 - partijas masa,

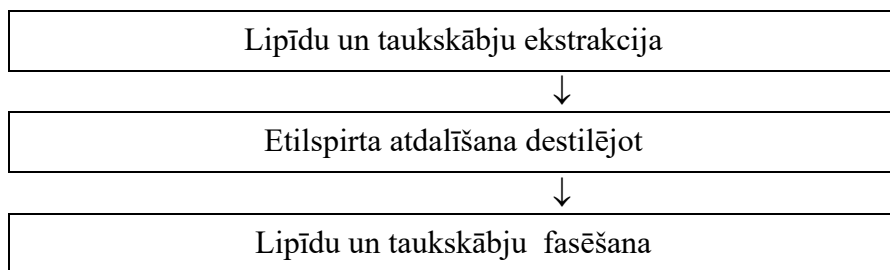
- izgatavošanas datums,
- partijas numurs, nosūtīšanas datums,
- analīžu rezultāti un apstiprinājums, ka produkcija atbilst esošo tehnisko noteikumu prasībām,
- tehnisko noteikumu reģistrācijas numurs.

ĪSS TEHNOLOĢISKĀ PROCESA APRAKSTS

Tehnoloģiskā procesa sīks apraksts dots “Mikroaļģu lipīdu un polinepiesātināto taukskābju ekstrakta ražošanas reglamentā”.

Lipīdu un taukskābju ekstraktu iegūst ekstrahējot mikroaļģu masu etilspirtā, izmantojot vai neizmantojot mikroviļņu sildīšanu ar tālāku šķīdinātāja atdalīšanu no iegūtā produkta.

Ražošanas procesu kopumā attēlo pievienotā tehnoloģiskā shēma:



KVALITĀTES PĀRBAUDES METODES

1. Paraugu noņemšanas metode - saskaņā ar šo noteikumu tehniskajām prasībām.
2. Krāsas un smaržas noteikšana – organoleptiski.
3. Pamatvielas noteikšanai lieto Folha metodi:
 1. Nosver tukšu 15 ml plastmasas stobriņu ar aizskrūvējamu vāciņu, pieraksta tā masu.
 2. Stobriņā iesver 100 mg analizējamā parauga.
 3. Pievieno 20 daļas ar hloroformu/metanolu (2:1, v/v – 2 ml: 1,33 ml hloroforms, 0,66 ml metanols) stobriņā ar analizējamo paraugu. Masas attiecība šķīdinātājam pret paraugu ir aptuveni 20:1. Stobriņu ar paraugu un šķīdinātāju maisa 10 min orbitālajā kratītājā (120 apgrz./min). Ja paraugs ir ciets, labāk maisīšanu veikt ar stikla nūjiņu, vienlaikus sadalot paraugu viendabīgā maisījumā.
 4. Pievieno 0,5 ml ar KCl 0,8% sāls šķīdumu ūdenī, sasniedzot gala koncentrāciju hloroformam: metanolam: ūdenim 8:4:3.

5. Atkārtoto trešo un ceturto punktu divas līdz četras reizes, līdz analizējamais paraugs kļūst balts.
6. Stobriņu centrifugē 2000 apgriezienos/min 10 minūtes. Pēc centrifugēšanas izveidojas divi slāņi – augšējais ūdens un apakšējais organiskais slānis. Ar pipetes palīdzību uzmanīgi iesūc apakšējo organisko slāni, vienlaikus nepaņemot parauga daļiņas. Organisko slāni iepilda citā trauciņā, kam iepriekš precīzi noteikta masa.
7. Organiskajā slānī ir izšķīduši lipīdi, šķīdinātāju iztvaicē 70°C žāvskapī līdz nemainīgai masai.
8. Nosakot trauciņa masas ar lipīdiem un tukša trauciņa masas starpību, iegūst parauga lipīdu masu. Izdala lipīdu masu ar parauga masu, izsaka vērtību procentos. Šāds rezultāts raksturo, cik liela masas daļa no parauga ir lipīdi.
4. PNTS saturu nosaka ar lipīdu saponifikāciju, enzimatisko peroksidāciju un iekrāsošanu ar TBA.
 1. Saponifikāciju veic iegūto lipīdu saponifikāciju. Šim nolūkam kolbās ar lipīdu ekstraktu tika pipetēts 10 ml 0,5 M KOH etanola šķīdums un novietots kratītājā uz 140 rpm bez gaismas piekļuves 4 stundas. Pēc saponifikācijas procesa kolbās tika pievienots 10 ml 0,5 M HCl, 20 mL 1,0 M kālija borāta bufera un 60 mL destilēts H₂O. Kolbas liek uz magnēta maisītāja uz 5 min, lai pilnīgi izšķīdinātu uz kolbas pamata pielipušo lipīdu ekstraktu.
 2. Enzimātisko peroksidāciju veic no 100 ml kolbas ar saponificēto taukskābju šķīduma pipetējot 4 ml un ievietojot 15 ml plastmasas stobriņos. Katrā stobriņā pievieno 40 mL lipoksidāzes šķīdumu. Stobriņus horizontāli ievieto maisītājā (140 rpm) uz 60 minūtēm.
 3. Iekrāsošana ar TBA un PNTS aprēķins tiek veikts augstāk aprakstītā veidā iegūtam stobriņa saturam pievienoja 1 ml TBA reaģenta. Stobriņi vienu stundu tiek karsēti verdošā ūdenī, pēc kā tiek dzesēti tekošā ūdenī. Pēc atdzēšanas stobriņu saturs tika vorteksēts. No stobriņa tiek paņemts 1 ml satura un pārvietots kivetē, kivetes saturam tiek mērīta absorbcija spektrofotometrā pie 531 nm viļņu garuma. Lai aprēķinātu PNTS koncentrāciju (mg/100 mL) izmanto kalibrācijas līknes vienādojumu, kas iegūts lietojot zināmus PNTS paraugus. Lai aprēķinātu PNTS saturu (%), PNTS koncentrāciju (mg/100 mL) izdala ar ekstrahēto lipīdu koncentrāciju paraugā (mg/100 mL) un reizina ar 100 %.

DROŠĪBAS TEHNIKAS PRASĪBAS/NOTEIKUMI

Šajā nodaļā tiek sniegti tehnoloģiskie dati, kas ir vajadzīgi drošības tehnikas un ražošanas sanitārijas nepieciešamo pasākumu izstrādāšanai, saskaņā ar spēkā esošās dokumentācijas noteikumiem un prasībām.

Mikroaļģu lipīdu un taukskābju ekstrakta ražošanas procesā netiek pielietotas sprādzienbīstamas un degošas vielas, tādēļ speciāli papildpasākumi ugunsdrošības nodrošināšanai nav jāveic.

Saskaņā ar Latvijas būvnormatīvu LBN 201-96 "Ugunsdrošības normas" lipīdu un taukskābju ekstrakta ražošanas telpas atbilst E kategorijai (Nedegošas vielas un materiāli aukstā stāvoklī; degoši un grūti degoši šķidrumi un cietas vielas un materiāli daudzumos, kas nepārsniedz pieļaujamus. Pieļaujamo ugunsslodzi telpā aprēķina pēc metodikas, kas sniegta šī būvnormatīva 7. pielikumā,) un tajās jānodrošina ugunsdrošības normas saskaņā ar Ministru kabineta noteikumiem Nr.82 (2004.gada 17.februārī Ugunsdrošības noteikumi).

Elektroiekārtu (mašīnas, aparāti, ierīces), elektroinstalācijas un kabeļu līniju izvēli un uzstādīšanu veic ievērojot MK 22.10.1996 noteikumus Nr. 413 "Elektroenerģijas piegādes un lietošanas noteikumi".

PIEGĀDES NOTEIKUMI

1. Mikroaļģu lipīdu un taukskābju ekstraktu pieņem partijās. Par partiju tiek uzskatīts jebkurš daudzums preparāta, kas izgatavots no vienas izejvielu partijas, ir viendabīgs pēc saviem kvalitātes rādītājiem un tiek nosūtīts ar vienu kvalitātes pavadzīmi.
2. Vidējo paraugu no partijas noņem pēc partijas izgatavošanas speciāli paredzētā vidēja parauga ņemšanas vietā.
3. Vidējo paraugu paņem tehnologs hermētiski noslēdzamā traukā un uzlīmē etiķeti, uz kuras jānorāda:
 - partijas numurs,
 - parauga derīguma datums,
4. Ja analīžu rezultāti neatbilst prasībām kaut vienā no rādītājiem, analīzes šiem rādītājiem atkārtoti. Atkārtotajā analīzē iegūtie rezultāti ir galīgie.
5. Katrai produkcijas partijai jāpievieno kvalitāti apstiprinošs dokuments, kurā norādīts:

- ražotāja nosaukums, preču zīme, adrese,
- produkta nosaukums,
- izgatavošanas datums,
- analīžu rezultāti vai apstiprinājums tam, ka produkcija atbilst esošo tehnisko noteikumu prasībām,
- tehnisko noteikumu numurs.

IZGATAVOTĀJA GARANTIJAS

1. Ražotājs garantē produkta atbilstību šiem tehniskajiem noteikumiem.
2. Garantētais glabāšanas laiks, ievērojot glabāšanas noteikumus - 12 mēneši no izgatavošanas dienas.

12. MIKROAĻĢU IZĒDINĀŠANAS IETEKME UZ BROILERCĀĻU UN DĒJĒJVISTU VESELĪBU, PRODUKTIVITĀTI UN PRODUKCIJAS KVALITĀTI.

Zinātniskās literatūras izpēte liecina, ka ēdamās mikroaļģes sintezē antibakteriālas, antifungālas, antitoksiskas, antioksidatīvas vielas, kas spēj cīnīties ar baktērijām un citiem mikroorganismiem, tādējādi novēršot mājputnu saslimšanu. Kā arī mikroaļģu biomasā esošās taukskābes, minerālvielas, lipīdi un vitamīni (Dwei et al., 2018, Udayan et al., 2023. El-Shall et al., 2023) bagātina un uzlabo uzņemtais barības sastāvu, kas pozitīvi ietekmē putnu vispārējo veselības stāvokli, kā arī paaugstina putnkopības produktu kvalitāti (Abd El-Hack et al., 2023, El-Shall et al., 2023). Mājputnu barības tiešā bagātināšana ar šādu mikroaļģu biomasu kalpos kā proteīna, vitamīni un antioksidantu avots un ļaus ierobežojot dzīvnieku izcelsmes vai ģenētiski modificētu (ĢM) proteīnu avotu un mākslīgu papildvielu iekļaušanu mājputnu uzturā. Šie un citi aspekti (salīdzinoši lētā ieguve, mazprasīgums pret iegūšanas apstākļiem, neitrāla ietekme uz apkārtējo vidi u.c.) arvien vairāk pievērš zinātnieku uzmanību mikroaļģu izpētei, meklējot jaunas mikroaļģu eļļas, miltu, ekstraktu, biomasas vai tīrkultūras iegūšanas metodes, uzlabojot produktu sastāvu, precizējot ieteicamās devas un pētot ietekmes (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/1017/oj>). Lai arī aļģes kā barības sastāvdaļa ar ES regulu ir atļauta barības sastāvdaļa putnu barības līdzekļos (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/1017/oj>), tomēr barībai pievienojamais ieteicamais mikroaļģu apjoms, lasot zinātnisko literatūru, svārstās robežās no 1 līdz 5 % (Coudert et al., 2020, El-Shall et al., 2023), atsevišķos pētījumos līdz pat 20% (Lokapirnasari et al., 2016; Tarkington et al., 2020; El-Shall et al., 2023).

Pastāv liela iespēja, ka, ražojot jaunus mikroaļģu produktus un mainot ar dehidratāciju saistīto procesu tehnoloģiju, var mainīties iegūtajā produktā esošais ūdens daudzums un sastāvā esošo vērtīgo vielu koncentrācija. Palielinātas dehidratācijas rezultātā jauniegūtais produkts var radīt pārdozēšanas risku. Piemēram, ir konstatēts, ka pārāk liela mikroaļģu eļļas deva var samazināt dējību un dzīvsvara pieaugumu, pasliktināt gremošanas orgānu, tai skaitā aknu funkcionālo stāvokli, samazināt triglicerīdu sintēzi (Pestana et al., 2020; Elkin et al., 2023). Tāpēc, radot jaunu produktu, ir svarīgi noteikt tieši šī produkta optimālo devu uzstādīto uzdevumu sasniegšanai.

Šajā pētījumā ne mazāk svarīgs uzdevums ir zinātniski pierādīt iespēju ar barības līdzekļa (mūsu projektā ar mikroaļģu biomasas koncentrāta) palīdzību palielināt no mājas vistām iegūtas produkcijas uzturvērtību. Ir izpētīts, ka, kontrolēti palielinot vistu barībā noteiktu barības līdzekļu īpatsvaru, var ietekmēt iegūtās produkcijas ķīmisko sastāvu. Jau 1934. gadā Cruickshank pirmais aprakstīja, ka izēdinot dējējvistām taukus saturošas barības piedevas, var būtiski paaugstināt lipīdu daudzumu olu dzeltenumā. Putnu gaļa un olas ir salīdzinoši viegli bagātināmas arī ar omega trīs (Ω -3) polinepiesātinātajām taukskābēm (PNTS). To var panākt mājas vistas barojot ar Ω -3 saturošiem avotiem, piemēram, linsēklām vai to eļļu (El-Zenary et al. (2022; El-Zenary et al., 2023), ar sojas pupiņu eļļu (Elkin et al., 2018), zivju eļļu vai zivju miltiem (Ragaza et al., 2020; El-Shall et al., 2023). Lai arī no zivju pārstrādes blakusproduktiem iegūtās barības piedevas satur plašu klāstu ar vistkopībā nepieciešamajām barības sastāvdaļām un ir atzītas kā potenciāli vienas no efektīvākajām, tomēr tās var atstāt negatīvu iespaidu uz iegūtās produkcijas krāsu un smaržu (Ragaza et al., 2020). Turklāt putnkopības lielražošanā nav lietderīgi lietot barības līdzekļus, ko var izmantot cilvēku pārtikā. Mikroaļģes, lai arī tiek ieteiktas kā cilvēkam noderīga pārtikas piedeva, tomēr netiek lietotas kā pārtikas līdzeklis.

Mainot ēdamo mikroaļģu biomasas ieguves un apstrādes metodes ar mērķi bagātināt to ar kādu no sastāvdaļām (piem., PNTS, Ω -3, vitamīni u.c.), ir jāprecizē optimālā iegūtā produkta deva, kas sasniegtu labākos putnu veselības un produktivitātes uzlabošanas rādītājus, vienlaikus paaugstinot PNTS daudzumu iegūtajos produktos (gaļā un olās), kas arī ir šīs LBTU realizētās projekta daļas **mērķis**.

Paredzamos rezultātus nosacīti iedalījām trijās daļās:

Pirmkārt, paredzējām, ka piedevas pievienošana putnu barībai uzlabos gremošanas kanāla funkcionālās spējas, veicinot gremošanas procesā iesaistīto fermentus producējošo orgānu (dziedzerkuņģa, tievās zarnas, aknu un aizkuņģa dziedzera) sekretoro funkciju un palielinot tievo zarnu uzsūkšanas laukumu. Līdz ar to uzlabosies barības konversija un paātrināsies cāļu un jaunputnu augšana un attīstība.

Otrkārt, uzlabojot barības pārstrādi un veselības stāvokli, paaugstināsies mājas vistu produktivitāte.

Treškārt, palielinot PNTS un citu vērtīgu uzturvielu (vitamīnu, minerālvielu u.c.) daudzumu izēdināmajā barībā, paredzējām, ka uzlabosies iegūtās produkcijas kvalitāte: gaļā un olās paaugstināsies Ω -3 un/vai citas PNTS daudzums. Saimnieciskais ieguvums summēsies, ļaujot

uzlabot putnu imunitāti un vispārējo veselību - samazināt cāļu, jaunputnu un pieaugušu putnu mirstību, kā arī paildzināt aktīvās dēšanas perioda ilgumu, iegūstot lielāku produkcijas apjomu, turklāt ar pievienoto vērtību – palielinātu Ω -3 un vai citu PNTS, vitamīnu, vērtīgu miko- un makroelementu saturu tajos.

Datu statistiskā analīze tika veikta, lai noteiktu, vai pastāv statistiski nozīmīgas atšķirības starp divām, trim un/vai vairākām neatkarīgām grupām, izmantojot vispārināto lineārā jauktā modeļa GLMM analīzi, dispersijas analīzes rīku ANOVA. Ja dati bija normāli sadalīti, viendabīgi un nesaturēja izņēmumus, izmantojām *Tukey post-hoc* testu trīs vai vairāku grupu rezultātu salīdzināšanai. T-tests tika izmantoti, lai noteiktu, vai starp divām grupām ir statistiski nozīmīga atšķirība. Lai pielāgotu p vērtību katram konkrētajam izmeklējumam, testos lietojamie indeksi katru reizi tika precizēti un piemēroti katra pētījuma posma specifikai (izvēle bija atkarīga no grupu skaita, datu sadalījuma, pētījuma dizaina bilances un datu dispersijas u.c. faktoriem). Nelielam skaitam grupu (līdz pieciem pāriem) ar tādu pašu dispersiju un normālu datu sadalījumu tiek izmantots *Tukey* tests. Datu analīzei tika izmantota programmatūra JASP versija 0.9.2 un Microsoft Excel 2021. Visas statistiskās analīzes tika veiktas nozīmīguma līmenī $\alpha=0,05$; $p<0,05$; $P=95\%$. Dati tika parādīti kā vidējais $\pm$ standartnovirze, atsevišķos izmeklējumos datu analīzi papildinājām ar grupā konstatēto mazāko (min.) un lielāko (maks.) konstatēto rezultātu. Diagrammu un tabulu izveidei tika izmantota Microsoft Excel 2021 (Microsoft Corporation, ASV), kā arī Microsoft PowerPoint programmu.

12.1. Pētījumā iekļautās augu izcelsmes barības piedevas.

Pētījuma galvenais izpētes virziens bija iegūt bagātinātu īpašu augu – dažādu sugu mikroaļģu un spirulīnu biomasu un pārbaudīt tās izmantošanas efektivitāti putnkopībā. Noskaidrojām, ka mikroaļģes ir fotosintezējošu viensūnas eikariotu organismu grupa, kas galvenokārt apdzīvo ūdens vidi. Pie tām bieži pieskaita arī spirulīnu (*Arthrospira* vai *Lemnospira*), kas pieder cianobaktērijām, pazīstamām arī kā zilaļģes. Aļģes, tai skaitā arī mikroaļģes un spirulīna (turpmāk visus apzīmēsim vienādi – kā mikroaļģes), kā barības sastāvdaļa ir iekļautas ES dzīvnieku barības produktu regulā (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/1017/oj>, C DAĻA “Barības sastāvdaļu saraksts.”, 12.7. tabula “*Citi augi, aļģes un no tām iegūti produkti*”).

Kā jau minējām, mikroaļģes ir vērtīga barības piedeva, jo satur kvalitatīvu proteīnu, lipīdus, ogļhidrātus, vitamīnus, minerālvielas un pigmentus (Santas et al., 2024). Mikroaļģu

barības vielu sastāvs ir atkarīgs no dažādiem faktoriem, piemēram, sugas un tās augšanas apstākļiem. Mikroaļģes plaši izmanto tādu akvakultūras dzīvnieku kā zivju, garneļu un gliemeņu barošanā. Tās tiek lietotas arī tādiem lauksaimniecības dzīvniekiem kā govīm, aitām, kazām, cūkām, trušiem un mājputniem. Tās, lietojot kā barības piedevas, dzīvniekiem var uzlabot veselību, kā arī uzlabojas dzīvnieku produktivitāte un no tiem iegūto produktu kvalitāte (Villaró-Cos et al., 2024; Dolganyuk et al., 2020; Ma and Hu, 2024; Spínola et al., 2024).

Balstoties uz zinātnisko literatūru un saskaņojot ar projekta sadarbības partneriem, pētījumā ar mājas vistām izvēlējamies četras mikroaļģu sugas. Divas no tām – *Spirulina* un *Chlorella* bija salīdzinoši daudz pētītas un aprakstītas, bet iegūtie rezultāti, tai skaitā devas un iegūtie efekti, ir pretrunīgi. Lai papildinātu informāciju par mikroaļģu izmantošanu putnkopībā, pētījumā iekļāvām arī divas mazāk pētītas un zināmas mikroaļģu sugas - *Dunaliella* un *Tetrademus*. Īsa informācija par katru izvēlēto mikroaļģu sugu.

Spirulina (Arthrospira vai Limnospira) ir fotosintezējoša, pavedienvēda daudzšūnu mikroaļģe, kas pieder pie cianobaktērijām (zināmām arī kā zilaļģēm). Uzturā visbiežāk izmatotās divas spirulīnu sugas - *Limnospira platensis* un *Limnospira maxima* (sugu nosaukumu sinonīmi *Spirulina platensis*, *Arthrospira platensis* un *Spirulina maxima*, *Arthrospira maxima*). Spirulīna ir bagāta ar olbaltumvielām (50-70% sausnas; turklāt tā satur arī visas neaizvietojamās aminoskābes), lipīdiem (5-10% sausnas, galvenokārt polinepiesātinātās taukskābes, īpaši gamma-linolēnskābi (GLA), kas ir viena no omega-6 taukskābēm), ogļhidrātiem (15-20% sausnas), vitamīniem (A, E un B grupas vitamīnus), minerālvielām (tās satur daudz dzelzs, bet arī kalciju, magniju, cinku un kāliju) un pigmentiem (satur zilo pigmentu fikocianīnu, kuram piemīt arī antioksidantu īpašības). To lieto, kā barības piedevu lauksaimniecības dzīvniekiem, mājputniem, akvakultūrās un mīldzīvniekiem (Safi et al., 2014; Nowicka-Guiry et al., 2018; Krawczyk et al., 2019; Spínola et al., 2024).

Chlorella vulgaris (C. vulgaris) ir vienšūnas mikroaļģe, kas aug saldūdenī. Tajā esošo olbaltumvielu sastāvs var variēt robežās no 22,7% līdz 67,7% no sausnas, tāpat ļoti var atšķirties arī lipīdu daudzums (no 2,4% līdz 14,2%). Mikroaļģē atrodamas dažādas taukskābes, ieskaitot omega-3 un omega-6 taukskābes. No vitamīniem hlorella satur A, C, E un B grupas vitamīnus, savukārt attiecībā un minerālvielām *C. vulgaris* ir labs kālija, fosfora, kalcija, magnija un cinka avots (Safi et al., 2014; Gadzama et al., 2025; Wang et al., 2024).

***Dunaliella salina* (*D. salina*)** ir vienšūnas aļģe, kurai ir raksturīgas divas vicas un stingra šūnapvalka trūkums, kas ļauj tai labāk pielāgoties ekstremālajiem vides apstākļiem, kurās šīs ģints mikroaļģes bieži ir sastopamas (daudzas no tām aug ļoti sāļos ūdeņos, piemēram, sālsezeros). *D. salina* spēj akumulēt līdz pat 14% β -karotīna, kas ir daudz vairāk nekā sauszemes augos, tāpēc to komerciāli audzē šī pigmenta ieguvei. Lielais β -karotīna daudzums aļģei var piešķirt sarkanu krāsu. *Dunaliella* ģints mikroaļģes var saturēt arī daudz lipīdus (līdz 25% sausas), *D. salina* satur tādas taukskābes kā palmitīnskābi, alfa-linolēnskābi (viena no omega-3 taukskābēm) un oleīnskābi. Pētījumi liecina, ka to var izmantot gan akvakultūras dzīvnieku, gan lauksaimniecības dzīvnieku, ieskaitot mājputnu, ēdināšanā (Oren et al., 2005; Barbosa et al., 2023; Thore et al., 2023).

***Tetrademus obliquus* (*T. obliquus*)** ir zaļā saldūdens mikroaļģe, kas ir piemērota liela apjoma ražošanai. *T. obliquus* satur ogļhidrātus (10-69%), lipīdus (10-56%), olbaltumvielas (19-56%), kā arī pigmentus (īpaši a un b hlorofilu un luteīnu, bet ievērojamā daudzumā arī β -karotīnu un astaksantīnu). Tas tiek izmantots akvakultūrā. Lai gan nav daudz pētījumu par *T. obliquus* lietošanu mājputniem, ir konstatēts, ka tās pievienošana dējējvistu barībai var uzlabot olas dzeltenuma krāsu. Ir veikts arī pētījums par iespējām *T. obliquus* izmantot arī suņu barošanā (Oliveira et al., 2021; Kim et al., 2023; Cabrita et al., 2022).

Mikroaļģu biomasu pētījumam ar dzīvniekiem nodrošināja projekta vadošais sadraudzības partneris LU Bioloģijas institūts. Pēc viņu sniegtās informācijas, *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris* biomasu mājputnu eksperimentiem tika iegādāta no Buxtrade.de. Savukārt *Tetrademus obliquus* ir izolāts no Rūpnieciskās mikrobioloģijas un pārtikas biotehnoloģijas laboratorijas (LIMFB), kas iegūts no ūdenstilpēm Rīgā, Latvijā. Partneri mikroaļģes kultūras uzturēšanu pirms izmantošanas fotobioreaktorā (PBR) un visā eksperimentā veica, izmantojot standarta HP barotni, kas iegādāta no *Varicon Aqua* (Apvienotā Karaliste). Inokulācijas tika sagatavotas no krājumu kultūras. Katrs inokulācijas posms tika audzēts septiņas dienas. Zaļās mikroaļģes *T. obliquus* audzēšana tika veikta 140 L Phyco-Lift vertikālā cauruļveida gaisa pacelšanas fotobioreaktorā (*Varicon Aqua*, Apvienotā Karaliste) daļēji nepārtrauktā darbībā, kā gaismas avotu izmantojot LED paneļus, kas izstaro sarkanu un baltu gaismu. Audzēšanas process tika uzsākts ar 10 l inokulāciju, nepārtrauktu erācijas procesu, bagātinot gaisu CO₂ un pH uzturot robežās no 7,5 līdz 9,5, bet temperatūra robežās no 25 līdz 30° C. Katru nedēļu 50% no reaktora tilpuma tika novākti biomasas savākšanai, kam sekoja papildināšana ar svaigu vidi.

Biomasa pēc novākšanas tika koncentrēta, kombinējot paaugstinātu pH un centrifugāciju, pēc tam mazgāta destilētā ūdenī un žāvēta 45°C temperatūrā, lai novērstu bioaktīvo savienojumu noārdīšanos.

Mikroaļģu biomasas paraugi (*Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina* un *Tetrademus obliquus*) tika iesniegti laboratorijā “J.S. Hamilton Baltic SIA”, kuras galvenais birojs un centrālā laboratorija “J.S. Hamilton Poland Sp.z o.o.” atrodas Gdiņa (Polija). Izmeklējums ietvēra taukskābju profilu, aminoskābju sastāvu, vitamīnu, minerālvielu, tuvāko uzturvielu saturu un antioksidantu savienojumu, piemēram, polifenolu un karotinoīdu, kvantitatīvu noteikšanu. Iegūtie rezultāti apkopoti 12.1., 12.2., 12.3. un 12.4. tabulās.

12.1. tabula

Taukskābju daudzums pētījumā iekļauto mikroaļģu biomasā.

Kods un pilnais nosaukums	Mērv.	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Tetrademus obliquus</i>
C12:0 laurīnskābe	g/100 g	0,1			
C14:0 miristīnskābe	g/100 g			0,1	0,1
C16:0 palmitīnskābe	g/100 g	2,2	2,7	2	1,5
C16:1n7 palmitoleīnskābe	g/100 g	0,1	0,2	0,1	
C16:2n4 heksadekadiēnskābe	g/100 g	1,2			
C18:0 stearīnskābe	g/100 g	0,1	0,1	0,1	0,2
C18:1n9 oleīnskābe	g/100 g	0,3	0,1	0,4	1,7
C18:1n7 vakēnskābe	g/100 g	0,1			0,1
C18:2n6 linolskābe (LA)	g/100 g	4,5	1,1	0,5	0,9
C18:3n6 γ-linolēnskābe (GLA)	g/100 g		0,9		
C18:3n3 α-linolēnskābe (ALA)	g/100 g	0,4		1,4	1,6
C18:4n3 stearidonskābe (SDA)	g/100 g				0,3
C22:1n9 eruīnskābe	g/100 g	0,1			
C24:0 lignocerīnskābe	g/100 g	0,1			
C22:5n3 dokozapentaēnskābe (DPA)	g/100 g			0,1	
Kopējās piesātinātās taukskābes (SAFA)	g/100 g	2,5	2,8	2,3	1,9
Kopējās mononepiesātinātās taukskābes (MUFA)	g/100 g	0,7	0,4	0,6	1,9
Kopējās polinepiesātinātās taukskābes (PUFA)	g/100 g	6,1	2	1,9	3,1
Kopējās omega-3 taukskābes	g/100 g	0,4	<0,1	1,5	2
Kopējās omega-6 taukskābes	g/100 g	4,5	2	0,5	1
Kopējās omega-9 taukskābes	g/100 g	0,4	0,1	0,4	1,7
Omega-6/Omega-3		11,25:1	<20:1	0,33:1	0,5:1

Analīzes parādīja, ka dažādu mikroaļģu biomasās esošo taukskābju profili (sastāvs) ir atšķirīgi gan taukskābju veida, gan daudzuma ziņā. Piemēram, tikai *Spirulina platensis* saturēja laurīnskābi (0,1 g), heksadekadiēnskābi (1,2 g), erukskābi (0,1 g) un lignocerīnskābi (0,1 g). Maz pētītās *Tetrademus obliquus* sastāvs “pārsteidza”, jo vairākas taukskābes šīs mikroaļģes biomasas sastāvā bija vairāk, nekā pārējo izmeklēto mikroaļģu biomasas 100g: stearīnskābe (0,2 g), oleīnskābe (1,7 g), α -linolēnskābe (1,6 g), stearidonskābe (0,3 g), kā arī kopējo mononepiesātināto taukskābju daudzums (MUFA, 1,9 g) (skat. 12.1. tab.).

Mūs īpaši interesēja polinepiesātināto taukskābju omega-3, omega-6, omega-9 daudzums katrā izvēlēto mikroaļģu biomasā. Omega-3 visvairāk tika konstatēta maz pētītās *Dunaliella salina* mikroaļģes biomasas paraugā (2g/100g), bet *Spirulina platensis* biomasā omega-3 bija zem laboratorijas noteikšanas robežām. Arī citu autoru pētījumos atzīmēts, ka omega-3 spirulīnas sausajā masā ir salīdzinoši maz (bieži zem laboratorijas metožu noteikšanas robežas), bet omega-6 taukskābes var būt līdz par 42 % no taukskābju masas, jeb 3,2/100g (Spinola et al., 2024). Mūsu izmeklētajā *Spirulina platensis* biomasā bija omega-6 bija salīdzinoši vairāk, t.i. 4,5 g/100g. Lai gan mikroaļģes *Dunaliella salina* biomasas sastāvā bija salīdzinoši mazāk omega-3, -6 un -9 grupu taukskābju (attiecīgi 1,5, 0,5, 0,4 g/100g), tomēr omega 6 un 3 taukskābju attiecība ir 0,33:1, kas ir vismazākā un tāpat veselīgākā, bet arī *Tetrademus obliquus* šī attiecība ir ļoti maza (0,5:1), bet *Chlorella vulgaris* tā ir 11,25:1, kas klasificējas kā nevēlama un lielos apjomos pat veselībai nelabvēlīga (skat. 12.1. tab.).

12.2. tabula

Aminoskābju daudzums pētījumā iekļauto mikroaļģu biomasā.

Aminoskābes nosaukums	Mērv.	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Tetrademus obliquus</i>
Asparagīnskābe	mg/100 g	3550	4340	350	2260
Glutamīnskābe	mg/100 g	6100	7840	860	3850
Serīns	mg/100 g	1800	2940	370	1740
Histidīns	mg/100 g	960	1000	160	662
Glicīns	mg/100 g	2520	3020	470	2400
Arginīns	mg/100 g	3580	3940	410	2140
Treonīns	mg/100 g	1890	2950	380	1970
Alanīns	mg/100 g	3670	4600	600	3470
Prolīns	mg/100 g	2110	2310	430	2020
Tirozīns	mg/100 g	1340	2490	300	1350
Valīns	mg/100 g	2450	3490	490	2200
Metionīns	mg/100 g	1010	1550	210	947
Cisteīns	mg/100 g	360	340	58	318
Izoleicīns	mg/100 g	1580	3130	350	1440
Leicīns	mg/100 g	3950	5270	720	3460
Fenilalanīns	mg/100 g	2170	2770	440	2120
Lizīns	mg/100 g	3530	2940	360	2050

Apskatot laboratoriski noteikto neaizvietojamu aminoskābju daudzumu 100 gramos biomasas (skat. 12.2. tab.), konstatējām, ka gandrīz visas noteiktās aminoskābes (tabulā iekrāsotas sarkanā krāsā) vislielākajos apjomos bija *Spirulina platensis* biomasas sastāvā (pat 10 reizes vairāk, nekā *Dunaliella salina*). Tātad *Spirulina platensis* ir salīdzinoši vērtīgāka barības piedeva, lai uzņemtu neaizvietojamās aminoskābes.

12.3. tabula

Vitamīnu daudzums pētījumā iekļauto mikroaļģu biomasā.

Vitamīns	Mērv.	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Tetrademus obliquus</i>
E (α-tokoferols)	mg/100 g	17,3	2,8	557	8,3
B1 (tiamīns)	mg/100 g	0,08	1,15		
B2 (riboflavīns)	mg/100 g	3,86	2,19		
B3 (niacīns)	mg/100 g	22,9	16,2		
B5 (pantotēnskābe)	μg/100 g	1,23	96,1		
B6 (piridoksīns)	mg/100 g	1,52	0,61		0,38
B7 (biotīns)	μg/100 g	21,5	1,62		
B9 (folskābe)	μg/100 g	1030	108		
B12 (cianokobalamīns)	μg/100 g	1,54	168	23	105

Salīdzinot dažādu vitamīnu daudzumu pētījumā iekļauto mikroaļģu biomasā, konstatējām, ka *Chlorella vulgaris* un *Spirulina platensis* satur visus noteiktos vitamīnus. Mūsu uzmanību pievērta salīdzinoši lielais B5 vitamīna daudzums (96,1 μg/100 g) *Spirulina platensis* un vitamīna B9 daudzums (1030 μg/100 g) *Chlorella vulgaris* biomasā. Mikroaļģu *Dunaliella salina* un *Tetrademus obliquus* biomasā lielākā daļa vitamīnu daļa netika noteikti, iespējams tādēļ, ka tie bija nelielā daudzumā, tos vairs nespēj noteikt ar šajās laboratorijās izmantotajām metodēm. Tomēr jāatzīmē, ka *Dunaliella salina* saturēja lielu daudzumu E vitamīna, kas saniedza 557 mg/100 g, kas liecina, ka šī mikroaļģe var būt kā vērtīgs šī vitamīna avots. (Oren et al., 2005; Barbosa et al., 2023; Thore et al., 2023).

12.4. tabula

Minerālvielu citu uzturvērtību raksturojošo rādītāju daudzuma vērtības pētījumā iekļauto mikroaļģu biomasā.

Rādītājs	Mērv.	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Tetrademus obliquus</i>
Na	mg/100 g	434	322		
NaCl	mg/100 g	1085	805		
Fe	mg/100 g	14,026	75,4	6,75	28,3
Zn	mg/100 g	0,99	1,34	4,31	26,2
Mg	mg/100 g	258	254	53,6	357
Proteīns (N*6,25)	g/100 g	56,9	69,6	26,9	54,8
Šķiedrvielas	g/100 g	10,4	7,8		
Enerģētiskā vērtība	kcal/100 g	406	372		
Ogļhidrāti	g/100 g	15,8	6,7	40	28,5
Tauki	g/100 g	10,5	5,7	6	9,4
Pelni	g/100 g	4,38	5,78	19,6	
Kopējie ogļhidrāti	g/100 g	0,22	0		
Polifenoli	mg/100 g	528,03	188,93	396,92	
Karetenoīdi	mg/100 g	13,63	15,41	1200	11,45

Analizējot minerālvielu daudzumu biomasu sastāvā, konstatējām, ka *Tetrademus obliquus* saturēja lielāko cinka (26,2 mg/100g) un magnija (357 mg/100g) daudzumu, bet dzelzi visvairāk (75,4 mg/100g) saturēja spirulīnas biomasā. Lielu daudzumu (1085 mg/100g) NaCl saturēja hlorellas biomasā.

Zināms, ka karotinoīdi ir taukos šķīstoši pigmenti, kas pamatā atbildīgi par spilgtiem dzelteniem, oranžiem vai sarkaniem toņiem augļos un dārzeņos. Tāpēc nebijām pārsteigti, ka visvairāk kopējo karotinoīdu konstatējām *Dunaliella salina* biomasā, kas bija dzeltenoranžā krāsā. Kopā ar augsto α -tokoferola līmeni (skat. 12.3. tab.) tas šai mikroaļģei nodrošina augstas antioksidanta īpašības (Oren et al., 2005; Barbosa et al., 2023; Thore et al., 2023).

Pētījumā iekļauto dzīvnieku izvēle.

Piesakot projekta pētījumu Pārtikas veterinārā dienesta atļaujas saņemšanai, laboratorijas pētījuma posmā kopā plānojām iekļaut mājas vistas (*Gallus gallus domesticus*), no kurām bija viena broileru šķirne un viena deķējvistu šķirne. Putnu skaits laboratorijas pētījumā tika noteikts, izvēloties mazāko skaitu, kurš tika izmantots citos līdzīgos pētījumos (Abdelfatah et al., 2024; Billah et al., 2022; Nahed, Farida, 2024), kas ļaus savstarpēji salīdzināt iegūtos rezultātus. Putnu skaits ražošanas apstākļos veiktajā pētījumā daļā tika noteikts pēc līdzīgiem principiem, vienlaicīgi pielāgojot projekta uzdevumiem un saimniecību iespējām.

Rezultātā pirms eksperimentālā pētījuma aktīvās daļas no Latvijas PVD tika saņemta izmēģinājuma projekta "*Mikroaļģu barošanas ietekme uz deķējvistu un broileru cāļu veselību, produktivitāti un ražošanas kvalitāti*", atļaujas Nr. 152/2024.

12.2. Mikroaļģu *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* un *Dunaliella salina* izbarošanas ietekme uz cāļu un jaunputnu augšanu, attīstību un produktivitāti laboratorijas un ražošanas apstākļos.

Viens no pētījuma uzdevumiem bija noteikt, vai relatīvi mazas devas mikroaļģu piedeva – *Spirulina paltensis*, *Chlorella vulgaris* un jaunas mikroaļģu sugas — *Tetrademus obliquus* lietošana mājputnu audzēšanā kontrolētos laboratorijas apstākļos ietekmē mājas vistu broileru šķirnes (1-42 dienu vecu) veselību, ķermeņa masas pieaugumu, barības konversijas koeficientu (FCR) un gaļas kvalitātes parametrus. Šis pētījums notika Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes (VMF) Klīnisko pētījumu centrā. Pēc līdzīgas shēmas tika veikts pētījums ražošanas apstākļos saimniecībās “Kalvāni” un “Kalnadruvas”, noskaidrojot *Spirulina paltensis* biomasas izbarošanas ietekmi uz broileru (no 1 līdz 62 dienu vecumam) un *Chlorella vulgaris* biomasas izbarošanas ietekmi uz dējējvistu cāļu (no 1 līdz 93 dienu vecumam) augšanu un veselību. Asins analīzes (hematoloģiskās un bioķīmiskās) tika veiktas LBTU Veterinārās klīnikas laboratorijā. Patologanatomisko izmeklēšanu veicām Veterinārmedicīnas fakultātes Salīdzinošās patoloģijas centrā. Gaļas uzturvērtība tika noteikta laboratorijā “J.S. Hamilton Baltic SIA” un “Eurofins Labtarna Lietuva UAB”.

12.2.1. Laboratorijas apstākļos veiktais pētījums.

Laboratorijas apstākļos veiktais pētījums tika veikts LBTU VMF Klīnisko pētījumu centrā Jelgavā, Latvijā no 2024. gada aprīļa vidus līdz maija beigām. Lai noskaidrotu mikroaļģu biomasas ietekmi uz mājas vistu organismu no izšķilšanās brīža līdz jaunputna vecumam, tika izvēlēta broilercāļu šķirne Ross 308. Vēlējāmie noskaidrot, vai relatīvi mazas devas mikroaļģu piedeva – *Spirulina paltensis* (deva 0,5%), *Chlorella vulgaris* (deva 0,5%) un jaunas mikroaļģu sugas — *Tetrademus obliquus* (deva 0,5%) lietošana mājputnu audzēšanā kontrolētos apstākļos ietekmē putnu: veselību, ķermeņa masas pieaugumu, barības konversijas koeficientu (FCR), gaļas kvalitātes parametrus.

Īss pētījuma plāns.

Četras grupas pēc nejaušības principa (*randomi*) tika izveidotas uzreiz pēc 140 cāļu saņemšanas no inkubatora un pārvešanas uz Klīnisko pētījumu centrā sagatavotajām telpām, nešķirojot tos pēc dzimuma vai citām iezīmēm. Katras grupas 35 cāļi tika ievietoti vienā norobežotā telpā (biokamerā), kur tika nodrošināti vienādi, broilercāļu vecumam un šķirnei atbilstoši barības līdzekļi un arī mikroklimats, kas tika mainīts atbilstoši putnu vecumam, vadoties no vispārpieejamas, īpaši izveidotas Ross 308 šķirnes cāļu audzēšanas instrukcijas: https://aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross-Broiler-Pocket-Guide-2020-EN.pdf un *Avigen Ross* broileru rokasgrāmata (2024).

No vienas dienas vecuma viena (kontroles) grupa saņems tikai vecumam atbilstošo barības veidu un devu, bet trīs pārējām grupām pie barības tiks pievienotas trīs dažādu mikroaļģu biomasas ar aprēķinu 5g/kg (t.i. 0,5% no pamatbarības daudzuma), izveidojot četras grupas:

1. Kontroles grupa, ko apzīmējām BK (n=35),
2. *Spirulina paltensis* (deva 0,5 %) grupa, apzīmējām BS (n=35),
3. *Chlorella vulgaris* (deva 0,5 %) grupa, BC (n=35),
4. *Tetrademus obliquus* (deva 0,5 %) grupa, BT (n=35).



A.



B.



C.

12.1. attēls. Laboratorijas pētījumā iekļautie Ross 308 cāļi A. - 8. dienu, B. - 23. un C. - 44. dienu vecumā VMF Klīnisko pētījumu centrā (foto. A.Freiberga).

Mājputnu pamatbarībai izvēlējamies Dobeles ražoto barību broilercāļiem, kas visām grupām tika piedāvāta vienādā apjomā (aprēķinot uz vienu putnu). Šai barībai ir trīs veidi, kas secīgi nomaina viena otru. Barības nosaukumi atvasināti no angļu valodas vārdiem:

- *Starter* - no 0. līdz 18. dienai; 14,5 MJ/kg,
- *Grover* - no 18. līdz 35. dienai; 14,46 MJ/kg,
- *Finisher* - no 35. dienas līdz pētījuma beigām 43. dienā; 14,39 MJ/kg.

Galvenie olbaltumvielu avoti barībā bija kviešu graudi, sojas pupu milti (ĢMO), kukurūza un rapšu rauši. Barības ķīmiskais sastāvs ir atrodams ražotāja mājas lapā (<https://dzirnavnieks.lv/category/dzivnieku-bariba/bariba-putniem/>).

Kā jau minējām, visas grupas tika izmitinātas četrās identiskās biokamerās (kopējā telpas platība 20,76 m², sadalīta četrās vienādās daļās – 5,19 m²), kas aprīkotas ar visaptverošu mikroklimata kontroles sistēmu, kas aprīkotas ar visaptverošu mikroklimata kontroles sistēmu. Šī sistēma regulēja temperatūru, mitrumu un gaisa padevi, kā arī kontrolēja ienākošā un izejošā gaisa un gaismas ciklu sastāvu. Katra biokamera tika aprīkota ar videonovērošanas iekārtām, lai nodrošinātu nepārtrauktu uzraudzību. Dzīvnieku dzirdināšanai un barošanai biokameras bija aprīkotas ar pārvietojamām dzirdnēm un barošanas torņiem, kuru augstums tika pielāgots cāļu vecumam. Lai ievērotu biodrošības prasības un nodrošinātu dzīvnieku komfortu, grīdas tika noklātas ar dziļajiem pakaišiem – īpaši attīrītām, vakuumā iesaiņotām lapu koka skaidām.

Cāļi tika audzēti no pirmās līdz 43. dzīves dienai, piemērojot mainīgu gaismas un temperatūras režīmu. Tas tika noteikts, pamatojoties uz iepriekšējiem pētījumiem un Ross 308 vispārēju veselības inspekciju atbilstoši labai veterinārmedicīnas praksei).

- Pētījuma 1., 8., 14., 22., 29., 35. un 43. dienā visi putni tika nosvērti, katras grupas ietvaros novērtēts dzīvsvara pieaugums, kā arī aprēķināta un novērtēta barības konversija.
- Pētījuma laikā cāļiem 14., 35., 43. dienu vecumā, tika iegūti asins paraugi, lai papildu novērtētu ne tikai organisma vispārējo veselības stāvokli, bet arī vielmaiņu raksturojošos rādītājus.
- Pētījumam noslēdzoties, veicām putnu eitanāziju - 35. dienā pēc nejaušības principa izvēlējamies un eitanizējām piecus cāļus no katras grupas, bet 43. dienā 7 cāļus no katras grupas. Tā kā plānojām veikt gaļas uzturvērtības noteikšanu, bija svarīgi iegūt ražošanas apstākļiem un cilvēku pārtikai atbilstošus “atasiņotus” gaļas paraugus. Tāpēc broileri tika apdullināti ar triecienpistoli un, pārgriežot kopējo miega artēriju, izraisīts asiņu zudums, kā rezultātā iestājās letāls iznākums.
- Eitanāzijas laikā tika iegūti asins paraugi bioķīmiskajai un hematoloģiskajai izmeklēšanai 35. un 43. dienas veciem putniem.
- Veicām pilnu patologanatomisko sekciju, kuras laikā tika iegūti iekšējo orgānu masometriskie rādītāji, kā arī gremošanas un imūnsistēmas orgānu paraugi attīstības un iespējamo patoloģisko izmaiņu izvērtēšanai.
- Noslēgumā ieguvām gaļas (krūšu filejas un augšstilbu) paraugus taukskābju, vitamīnu un minerālvielu noteikšanai – 35. dienas veciem cāļiem piecus, bet 43. dienas veciem septiņus paraugus šķirnes audzēšanas vadlīnijām, galvenokārt pēc “*Avigen Ross* broileru rokasgrāmata” (2024).

Pirmajā eksperimenta nedēļā apkārtējā temperatūra kamerās visām grupām tika uzturēta no +27 līdz +30°C. Putniem pieaugot, temperatūra pakāpeniski tika samazināta, līdz pētījuma beigās tā sasniedza no +20 līdz +22°C. Pirmajā dienā gaismas/tumsas cikls sastāvēja no 23 stundām gaismas un vienas stundas tumsas (attiecīgi 23/1). Pēc tam tumsas periods pakāpeniski tika palielināts līdz sešām stundām, ar 18 stundu gaismas un sešu stundu tumsas (18/6) režīmu no astotās līdz 26. dienai. Pēdējās nedēļas laikā tumšais periods tika pakāpeniski saīsināts, lai izveidotu gaismas / tumsas ciklu 20 stundu gaismas un 4 stundas tumsas (20/4). Pāreja no gaismas uz tumsu notika caur sarkanās gaismas spektru.

Rezultāti.

Dzīvsvara pieaugums gaļas šķirnes mājas vistām ir viens no uzskatāmākajiem veselības un arī produktivitātes rādītājiem.

12.5. tabula

**Mikroaļģu izbarošanas ietekme uz Ross 308 cāļu vidējo ķermeņa masu (g)
no 1. līdz 43. dzīves dienai.**

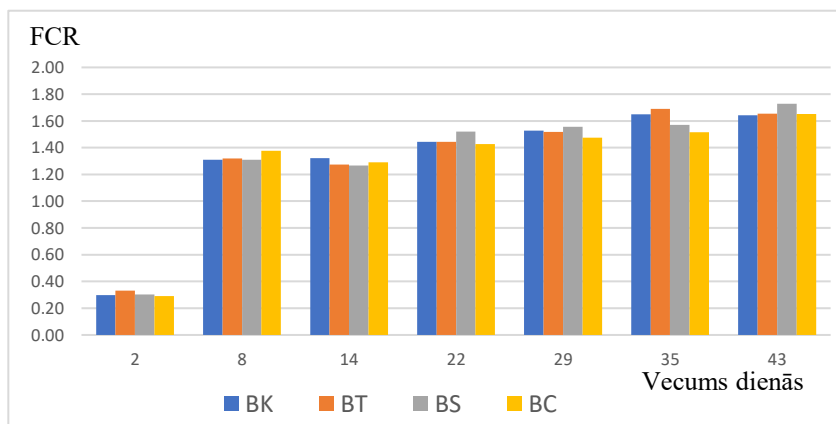
Vecums	Grupa	Dzīvsvars (g)*			
		vid.	st.nov.	min.	maks.
1. diena	Kontroles (BK)	61,49	1,43	59,90	63,40
	<i>Tetrademus obliquus</i> (BT)	60,55	2,03	57,30	63,00
	<i>Spirulina platensis</i> (BS)	61,72	1,27	59,80	63,00
	<i>Chlorella vulgaris</i> (BC)	60,67	1,07	59,00	61,60
8. dienas	Kontroles (BK)	181,09	6,03	169,80	189,80
	<i>Tetrademus obliquus</i> (BT)	176,57	7,86	166,80	191,20
	<i>Spirulina platensis</i> (BS)	180,17	4,99	172,40	187,80
	<i>Chlorella vulgaris</i> (BC)	170,56	6,46	160,20	180,60
14. dienas	Kontroles (BK)	454,07	26,86	421,60	513,30
	<i>Tetrademus obliquus</i> (BT)	431,29	30,64	375,30	483,00
	<i>Spirulina platensis</i> (BS)	437,22	25,06	396,60	467,30
	<i>Chlorella vulgaris</i> (BC)	429,13	34,50	377,60	508,60
22. dienas	Kontroles (BK)	895,68	28,29	829,00	933,50
	<i>Tetrademus obliquus</i> (BT)	882,16	74,97	761,50	1068,00
	<i>Spirulina platensis</i> (BS)	881,46	79,89	726,50	1009,00
	<i>Chlorella vulgaris</i> (BC)	884,32	82,17	731,50	1084,00
29. dienas	Kontroles (BK)	1556,92	184,91	1298,00	2028,00
	<i>Tetrademus obliquus</i> (BT)	1514,84	167,01	1179,00	1889,00
	<i>Spirulina platensis</i> (BS)	1473,36	143,81	1241,00	1760,00
	<i>Chlorella vulgaris</i> (BC)	1521,88	173,53	1245,00	1881,00
35. dienas	Kontroles (BK)	2225,25	289,01	1770,00	2890,00
	<i>Tetrademus obliquus</i> (BT)	2034,36	319,11	1203,00	2624,00
	<i>Spirulina platensis</i> (BS)	2185,20	197,94	1936,00	2563,00
	<i>Chlorella vulgaris</i> (BC)	2145,56	242,37	1690,00	2607,00
43. dienas	Kontroles (BK)	3061,00	468,75	2122,00	3903,00
	<i>Tetrademus obliquus</i> (BT)	3032,89	462,71	1676,00	4029,00
	<i>Spirulina platensis</i> (BS)	3046,00	276,40	2509,00	3566,00
	<i>Chlorella vulgaris</i> (BC)	2964,85	306,37	2403,00	3506,00

* Dzīvsvara rādītāji grupu robežās dažādos vecumos atspoguļoti, izmantojot vidējo aritmētisko (vid.), standartnovirzi (st.nov.), kā arī konstatēto mazāko (min.) un lielāko (maks.) individuālo dzīvsvaru grupā.

Konstatējām, ka visām grupām bija pastāvīgs ķermeņa masas pieaugums no 1. līdz pat 43. dienai, kas norāda uz augšupejošu augšanas trajektoriju neatkarīgi no barības bagātināšanas ar piedevām. Tomēr jāatzīmē, ka līdz 43. dienu vecumam, kas ir arī 43. pētījuma diena, BT grupas cāļi bija sasnieguši augstāko individuālo svaru (4,029 kg), un kontroles grupas putni sasniedza otro augstāko svaru (3,903 kg). BT grupai bija vislielākais individuālais svars (4,029 kg) līdz 43. dienai, bet BC grupai bija otrs augstākais (3,903 kg). Dzīvsvara rādītāja izkliede, kas atspoguļojas kā standartnovirzes vērtība, pētījuma laikā palielinājās visās grupās, īpaši pēc 22. pētījuma dienas, kas norāda uz individuālā pieauguma dažādību, putniem kļūstot vecākiem. Lai gan statistiski nozīmīgas atšķirības starp grupām netika konstatētas ($p=0,777$), BK un BS grupu cāļi uzrādīja augstāku vidējo dzīvsvara rādītājus nekā BC un BT grupās.

Barības konversijas izvērtēšana.

Sākot ar 22. dienu, BC grupas cāļi patērēja mazāku barības daudzumu, līdz ar to, aprēķinot barības konversiju (saīsināti FCR) šai grupai bija viszemākais barības patēriņš uz dzīvsvara pieaugumu. Tas nozīmē, ka *Chlorella vulgaris* izēdināšana nodrošināja efektīvāku barības pārstrādi, sasniedzot to pašu ķermeņa masu kā citu grupu cāļi.



12. 2. attēls. Mikroaļģu *Tetrademus obliquus* (BT), *Spirulina paltensis* (BS) un *Chlorella vulgaris* (BC) izbarošanas ietekme uz barības konversiju (FCR), salīdzinot ar kontroles grupu (BK).

Asins izmeklēšanas rezultāti.

Lai pētījuma laikā novērtētu veselības stāvokli, mājas vistu cāļiem 14., 35., 43. vecuma dienā ieguvām asins paraugus un tos izmeklējām LBTU Veterinārās klīnikas laboratorijā. Visu noteikto rādītāju vērtības atradās vispārpieņemtās fizioloģisko normu robežās. Tomēr atsevišķi rādītāji (piem., leikocītu skaits), izmantojot vispārināto lineārā jauktā modeļa GLMM analīzi,

uzrādīja būtiskas atšķirības starp kontroles un eksperimentālajām grupām. Tāpēc atskaitē pievērsīsim uzmanību tieši šim rādītājam.

Konstatējām, ka spirulīnas grupā leukocītu skaits bija būtiski ($p=0,012$) augstāks nekā kontroles grupā. Veicot papildu aprēķinus, izrādījās, ka tas ir lielāks par 27%. Būtiska atšķirība starp kontroles un tetradesmus grupu ($p = 0,015$), jo tetradesmus grupā bija par 25% augstāks limfocītu skaits. Arī limfocītu skaits būtiski atšķīrās starp Tetradesmus un Chlorella grupām ($p = 0,028$), Chlorella grupai uzrādot par 19 % zemāku limfocītu skaitu. Tāpat tika novērotas statistiski nozīmīgas ($p = 0,015$) atšķirības starp spirulīnas un tetradesmus grupām, kur leukocītu skaits bija par 10% zemāks nekā spirulīnas grupā (skat. 12.6. tab.).

12.6. tabula

Mikroaļģu *Tetrademus obliquus* (BT), *Spirulina platensis* (BS) un *Chlorella vulgaris* (BC) izbarošanas ietekme uz leukocītu skaitu.

Vecums	Grupa	Leukocītu skaits*			
		vid.	st.nov.	min.	maks.
14. diena	Kontroles (BK)	4,5 ^{a**}	2,56	4,03	5,05
	<i>Tetrademus obliquus</i> (BT)	5,3 ^d	3,13	4,68	5,92
	<i>Spirulina platensis</i> (BS)	6,6 ^{a, d}	3,31	4,15	5,12
	<i>Chlorella vulgaris</i> (BC)	3,3	2,17	2,74	3,86
35. dienas	Kontroles (BK)	9,3 ^b	3,79	8,18	10,34
	<i>Tetrademus obliquus</i> (BT)	8,4 ^d	2,31	7,63	9,25
	<i>Spirulina platensis</i> (BS)	9,6 ^{b, d}	3,61	8,53	10,59
	<i>Chlorella vulgaris</i> (BC)	11,1	3,29	10,13	11,99
43. dienas	Kontroles (BK)	9,5 ^c	3,65	8,59	10,33
	<i>Tetrademus obliquus</i> (BT)	8,7 ^d	3,17	7,94	9,46
	<i>Spirulina platensis</i> (BS)	11,8 ^{c, d}	4,08	10,78	12,73
	<i>Chlorella vulgaris</i> (BC)	11,2	3,83	10,27	12,10

* Dažādos vecumos leukocītu skaita rādītāji grupu robežās atspoguļoti, izmantojot vidējo aritmētisko (vid.), standartnovirzi (st.nov.), kā arī konstatēto mazāko (min.) un lielāko (maks.) individuālo leukocītu skaitu grupā.

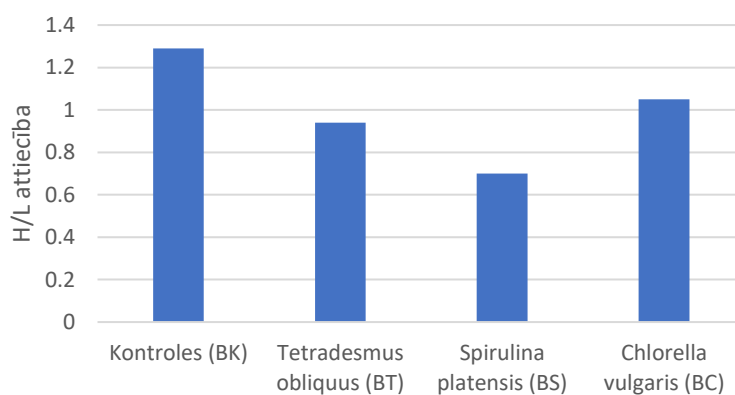
** Vienādi burti pie rezultātiem nozīmē, ka šie rādītāji savstarpēji būtiski atšķiras (vismaz ar $p < 0,05$; 95%)

Spirulina platensis ir pazīstama ar savām spēcīgajām imūnstimulējošajām īpašībām, kas, iespējams, izskaidro paaugstināto leukocītu skaitu, bet *Tetrademus obliquus* ir mazāk izteikta imūnstimulējoša iedarbība. *S. platensis* satur fikocianīnu – pigmenta-olbaltumvielu kompleksu ar pretiekaisuma un antioksidanta iedarbību, kas var stimulēt leukocītu veidošanos. Tā satur arī polisaharīdus – pierādīts, ka tie aktivizē makrofāģus un veicina citokīnu izdalīšanos, kā arī neaizvietojamās aminoskābes un vitamīnus – atbalsta imūnšūnu attīstību. *T.obliquus* satur karotinoīdus un antioksidantus – kas var atbalstīt imūnsistēmas līdzsvaru, nevis stimulāciju. Šai mikroaļģei, iespējams, ir zemāks imunitāti aktivizējošu savienojums, piemēram, polisaharīdu vai fikocianīna līmenis. (Ahmed AA, 2024; Coudert E, 2020).

Vispārzināms, ka leukocītu rādītāji ir būtiski, novērtējot dzīvnieka organisma stresa līmeni, jo tie korelē ar imūnsistēmas darbību. Dažu dzīvnieku, tai skaitā putnu asinīs ir tā saucamie "Heterofīlie" leukocīti. Tas ir īpašs leukocītu veids, kas funkcionāli atbilst neitrofīlajiem leukocītiem cilvēkiem un zīdītājiem. Tiem ir segmentēts kodols un citoplazma ar rupjām, sarkanīgi krāsotām granulas (atšķirībā no cilvēku neitrofīliem, kuriem ir smalkākas, neitrāli krāsotas granulas).

Heterofīlie leukocīti ir fagocīti – šūnas, kas "apēd" patogēnus, piemēram, baktērijas, un spēlē būtisku lomu iedzimtajā imūnsistēmā. Cilvēkiem heterofīlo leukocītu nav, un līdzīgu funkciju veic neitrofīlie granulocīti. GLM analīze atklāja būtisku atšķirību starp kontroles un spirulīnas grupu ($p = 0,003$), Spirulīnas grupā bija par 20% zemāks heterofīlu skaits, un starp kontroles un tetradesmus grupu ($p = 0,004$), grupā bija par 19% zemāks heterofīlu skaits (95% TI: 4% – 31%).

Īpaši nozīmīga ir heterofīlo leukocītu un limfocītu attiecība (H/L attiecība), kas kalpo kā indikators stresa līmenim organismā. Interpretējot šo attiecību, ja vērtība ir mazāka par 0,5 liecina par normāliem apstākļiem bez stresa (bez stresa pazīmēm), no 0,5-1,0 liecina, ka ir viegls līdz vidējs stresa stāvoklis, no 0,8-1,0 parāda, ka dzīvniekiem ir fizioloģisks stress vai imūnsistēmas kairinājums, ja vērtība ir virs 1,5-2,0 vai augstāka ir spēcīgs imunoloģisks vai hormonāls stress (Gross and Siegel, 1983). Tātad, H/L attiecība līdz 0,5 norāda uz normālu fizioloģisko stāvokli bez stresa, savukārt vērtības virs 0,5 liecina par stresa klātbūtni.



12.3. attēls. Mikroaļģu *Tetradesmus obliquus* (BT), *Spirulina platensis* (BS) un *Chlorella vulgaris* (BC) izbarošanas ietekme heterofīlo leukocītu un limfocītu attiecība (H/L).

Šajā pētījumā *S.platensis* grupā tika konstatējām, ka vidējā H/L attiecība 0,7, kas liecina par vieglu stresu vai tā sākuma pazīmēm. Salīdzinot ar pārējām grupām, spirulīnas grupas dzīvniekiem šī attiecība bija zemāka, norādot, ka tie, iespējams, labāk panes stresa apstākļus vai arī bija vismazāk pakļauti stresam. Arī citi autori ir konstatējuši, ka broileri ražošanas apstākļos var būt pakļauti dažādiem stresa faktoriem, kas pasliktina organisma vispārējo veselības stāvokli un produktivitāti. Piemēram, pārāk augsta apkārtējās vides temperatūra rada traucējumus fermentatīvā antioksidantu sistēmas darbībā, paaugstina stresa hormonu līmeni un izmaina lipīdu profilu galā – to var mazināt, papildinot barību ar *Spirulina platensis* (Mirzaie et al., 2017; Lestingi et al., 2024).

Gaļas uzturvērtības analīze.

Lai noskaidrotu, kā dažādu mikroaļģu biomasu pievienošana ietekmē broileru gaļas uzturvērtību, ieguvām gaļas paraugus divas reizes - pirmo reizi tad, kad cāļi bija sasnieguši 35. dienu vecumu, bet otro reizi 43. dienu vecumu. Turklāt laboratoriskai izmeklēšanai tika iegūti gan augšstilba muskuļu grupas jeb t.s. “sarkanās” gaļas, gan krūšu muskuļu jeb t.s. “baltās” gaļas paraugi. Jāatzīmē, ka, lai noteiktu visus paredzētos uzturvērtības rādītājus (taukskābju, aminoskābju, vitamīnu, minerālvielu daudzumu, kā arī tauku, olbaltumvielu, ogļhidrātu, holesterīna, holīna un vēl citu rādītāju vērtības, vienam izmeklējumam bija nepieciešams vismaz 1,2 kilogrami attīrītas sarkanās vai baltās gaļas. Tāda daudzuma “tīras” gaļas daudzuma iegūšana no viena putna nebija iespējama, tāpēc katras grupas ietvaros veidojām kopparaugus.

Katras grupas kopparaugu izmeklēšanas rezultāti parādīja, ka netika novērotas statistiski nozīmīgas gaļas kvalitātes parametru atšķirības starp visu četru pētījuma grupu rādītājiem ($p > 0,05$), tomēr, analizējot katras mājas vistu grupas (BT, BC, BS) rezultātus, varam saskatīt vairākas likumsakarības starp gaļas un attiecīgās mikroaļģes biomasas rādītājiem.

Kopparaugos, kurus ieguvām no cāļiem, kuri bija 35. dienas veci, grupu robežās konstatējām atšķirības. Grupas paraugos, kuras cāļi pie barības saņēma spirulīnu (BS), konstatējām cilvēka pārtikai ietacamākos taukskābju grupu MUFA un PUFA daudzumu, (attiecīgi 0,9 un 0,5 g/100 g gaļas), vienlaicīgi ar zemāko (līdz ar to veselīgāko) omega-6 un omega-3 attiecību, kas bija 4,3:1. Tas atbilst tam, ko konstatējām, izmeklējot spirulīnas biomasas uzturvērtības rādītājus (skat 1.tab.), jo PUFA līmenis bija tikai 2,0 g/100 g barības.

Tikmēr *C.vulgaris* (BC) grupā bija visaugstākais kopējais tauku daudzums (2,8 g/100 g) un likumsakarīgi, arī augstākā enerģētiskā vērtība (115 kcal/100 g). Šīs grupas paraugos konstatējām arī visaugstākos mononepiesātināto (1,3 g/100 g) un polinepiesātināto (0,7 g/100 g) taukskābju rādītājus, kā arī augstāko omega-6 (0,6 g/100 g) un omega-9 (1,1 g/100 g) taukskābju līmeni. Tas atbilda *Chlorella vulgaris* aļģu biomasas profilam, kurā bija visaugstākais PUFA saturs (6,1 g/100 g) un omega-6 (4,5 g/100 g) daudzums (skat. 12.1. tabulu).

Tetrademus obliquus (TB) grupas filejas paraugos bija zemāks tauku saturs (2,4 g / 100 g) ar MUFA un PUFA līmeni (attiecīgi 1,1 un 0,6 g / 100 g). *Tetrademus* aļģu biomasā saturēja vienu no zemākajiem PUFA (3,1 g / 100 g) un zemāko SAFA saturu (1,9 / 100 g).

**Mikroaļģu biomasas izbarošanas ietekme uz taukskābju profilu, sastāvu,
enerģētisko vērtību un mikroelementu saturu broileru filejā
35. un 43. dienu vecumā.**

Rādītāji		Pētījuma grupa			
		BK	BT	BS	BC
35. dienas vecu broileru fileja					
Taukskābes (g/100g):	Kopējās piesātinātās taukskābes (SAFA)	0,5	0,7	0,6	0,8
	Kopējās mononepiesātinātās taukskābes (MUFA)	0,9	1,1	0,9	1,3
	Kopējās polinepiesātinātās taukskābes (PUFA)	0,5	0,6	0,5	0,7
	Kopā Omega-3	0,1	0,1	0,1	0,1
	Kopā Omega-6	0,4	0,5	0,4	0,6
	Kopā Omega-9	0,8	0,9	0,8	1,1
Īdens (g/100g)		75,7	75,8	75,4	75,1
Kopējie pelni (g/100g)		1,29	1,24	1,29	1,17
Enerģētiskā vērtība (kcal/100g)		106	111	106	115
Olbaltumvielas (g/100g)		21,9	22,3	22	22,4
Tauki (g/100g)		2,0	2,4	2,0	2,8
42. dienu vecu broileru fileja					
Taukskābes (g/100g):	Kopējās piesātinātās taukskābes (SAFA)	0,8	0,5	0,5	1,2
	Kopējās mononepiesātinātās taukskābes (MUFA)	1,2	0,7	0,8	2,1
	Kopējās polinepiesātinātās taukskābes (PUFA)	0,6	0,4	0,4	1
	Kopā Omega-3	0,1	0,1	0,1	0,1
	Kopā Omega-6	0,5	0,4	0,4	0,9
	Kopā Omega-9	1,1	0,6	0,7	1,9
Īdens (g/100g)		74,3	74,3	75,8	76,1
Kopējie pelni (g/100g)		1,14	1,14	1,28	1,15
Enerģētiskā vērtība (kcal/100g)		116	116	106	104
Olbaltumvielas (g/100g)		23	23	22,6	21,8
Tauki (g/100g)		2,7	2,7	1,7	1,9
Minerālvielas un vitamīni:	Fe (mg/kg)	4,1	3,8	4,2	3,5
	Se (mg/kg)	0,33	0,28	0,27	0,26
	K (mg/kg)	3120	3250	3060	2990
	Mg (mg/kg)	220	212	191	206
	E vit. (mg/kg)	0,391	0,375	0,472	0,855
	B12 vit. (µg/100g)	0,325	0,412	0,357	0,350

Līdzīgas tendences saglabājās 43. dienu vecu cāļu baltās gaļas paraugos. BC grupā bija visaugstākais MUFA (2,1 g/100 g), PUFA (1,0 g/100 g), omega-9 (1,9 g/100 g) un kopējo tauku (4,5 g/100 g) līmenis, kā arī visaugstākais kaloriju saturs (121 kcal/100 g). Tas atspoguļoja *Chlorella vulgaris* biomasā konstatētās augstās PUFA un omega-6 vērtības. Turpretī Tetradesmus (BT) un Spirulīnas (BS) grupām baltās gaļas paraugos bija ar salīdzinoši zemāks tauku saturs (attiecīgi 1,7 un 1,9 g/100 g) un enerģētiskā vērtība (attiecīgi 106 un 104 kcal/100 g), kas atbilst zemākam tauku, PUFA un MUFA līmenim šo grupu barībai pievienotajā mikroaļģu piedevai.

Likumsakarīgi, ka Tetrademus grupas gaļas paraugos bija visaugstākais B12 vitamīna līmenis (0,412 µg/100g) un kālija līmenis (3250 mg/kg), kas bija arī viens no augstākajiem šīs aļģes biomasā. Kontroles grupai bija visaugstākais olbaltumvielu saturs (23 g/100 g), kam sekoja BT grupa (22,6 g/100 g). Minerālvielu un vitamīnu satura ziņā 43. dienā visās grupās bija līdzīgs dzelzs, selēna un magnija līmenis. Tomēr *Chlorella vulgaris* grupas filejā bija visaugstākā E vitamīna koncentrācija (0,855 mg/kg), kas bija gandrīz divas reizes lielāka nekā kontroles grupā, kas saskan ar augsto šī vitamīna līmeni šīs mikroaļģes biomasā (skat. 12.3.tab.).

Pētījumā noteicām arī augšstilba jeb “sarkanās” gaļas uzturvērtības rādītājus (skat. 8.tab.). Lai gan statistiski nozīmīgas atšķirības augšstilba gaļas uzturvērtības parametros starp pētījuma grupām netika novērotas ($p > 0,05$), tomēr, analizējot katras grupas (BT, BC, BS un kontroles) rezultātus, varam saskatīt līdzīgas likumsakarības starp gaļas un attiecīgās mikroaļģes biomasas rādītājiem, kādas tās bija filejas paraugos.

**Mikroaļģu biomasas izbarošanas ietekme uz taukskābju profilu, sastāvs,
enerģētisko vērtību un mikroelementu saturu broileru augšstilbu gaļā
35. un 43. dienu vecumā.**

Rādītāji		Pētījuma grupa			
		BK	BT	BS	BC
35. dienas vecu broileru augšstilbu gaļa					
Taukskābes (g/100g):	Kopējās piesātinātās taukskābes (SAFA)	1,8	1,8	1,6	2,1
	Kopējās mononepiesātinātās taukskābes (MUFA)	3,7	3,2	3,0	3,7
	Kopējās polinepiesātinātās taukskābes (PUFA)	1,8	1,7	1,5	1,8
	Kopā Omega-3	0,2	0,2	0,2	0,2
	Kopā Omega-6	1,5	1,4	1,3	1,6
	Kopā Omega-9	3,4	2,9	2,7	3,4
Īdens (g/100g)		73,5	73,4	74,1	73,1
Kopējie pelni (g/100g)		1,11	1,21	1,22	1,04
Enerģētiskā vērtība (kcal/100g)		141	136	133	145
Olbaltumvielas (g/100g)		18,6	18,7	19,4	18,9
Tauki (g/100g)		7,4	6,8	6,2	7,7
43. dienu vecu broileru augšstilbu gaļa					
Taukskābes (g/100g):	Kopējās piesātinātās taukskābes (SAFA)	1,5	1,5	2,0	1,0
	Kopējās mononepiesātinātās taukskābes (MUFA)	2,6	2,7	3,5	1,6
	Kopējās polinepiesātinātās taukskābes (PUFA)	1,5	1,3	1,7	0,9
	Kopā Omega-3	0,2	0,2	0,2	0,1
	Kopā Omega-6	1,2	1,1	1,5	0,8
	Kopā Omega-9	2,3	2,4	3,1	1,5
Īdens (g/100g)		74,9	74,9	74,7	74,3
Kopējie pelni (g/100g)		1,09	1,09	1,03	0,97
Enerģētiskā vērtība (kcal/100g)		129	129	128	142
Olbaltumvielas (g/100g)		19,3	19,3	19,4	19,1
Tauki (g/100g)		5,8	5,8	5,6	7,3
Minerālvielas un vitamīni:	Fe (mg/kg)	6,1	6,9	6,3	6,5
	Se (mg/kg)	0,31	0,3	0,3	0,28
	K (mg/kg)	2860	2850	2820	2980
	Mg (mg/kg)	191	190	184	195
	E vit. (mg/kg)	0,220	0,221	0,141	0,152
	B12 vit. (µg/100g)	0,368	0,414	0,383	0,390

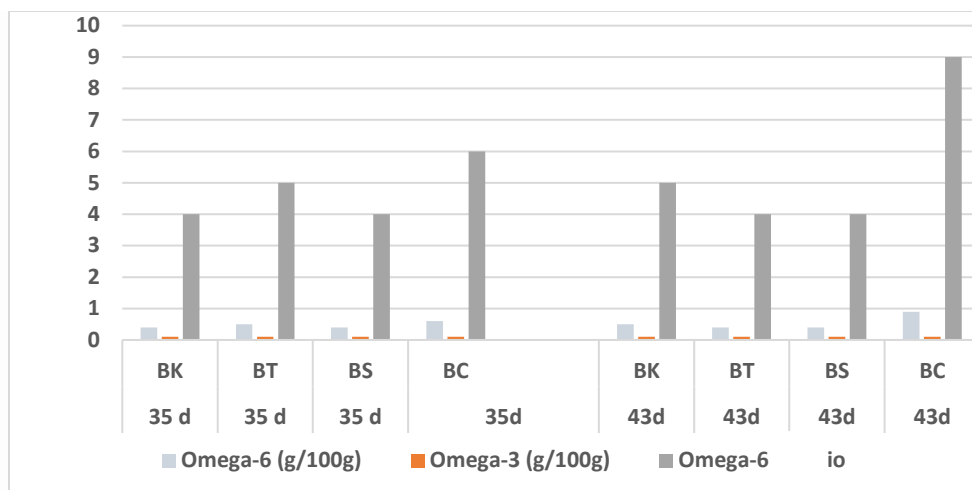
Rezultātu apkopojumā (12.8. tabulā) redzam, ka 35. dienā *Chlorella vulgaris* (BC) grupas sarkanajā gaļā bija visaugstākais tauku saturs (7,7 g / 100 g), kā arī kopējo mononepiesātināto taukskābju (MUFA; 3,7 g / 100 g), PUFA (1,8 g / 100 g) un omega-6 (1,6 g / 100 g) daudzums, kas atbilst hlorella augstajam PUFA un omega-6 saturam aļģu biomasas sastāvā. Spirulīnas grupas gaļas paraugos bija salīdzinoši zemāks tauku saturs (6,2 g / 100 g), kā arī MUFA (3,0 g / 100 g) un PUFA (1,5 g / 100 g) daudzums. *Tetrademus obliquus* (BT) grupas sarkanajā gaļā bija vēl nedaudz zemāks tauku saturs (6,8 g / 100 g), kā arī MUFA (3,2 g / 100 g) un PUFA (1,7 g / 100

g) daudzums. Visās grupās omega-3 vērtības gaļā saglabājās 0,2 g/100 g līmenī, kas atbilst omega-3 klātbūtni šo aļģu biomasā. Jāuzsver, ka *S.platensis* grupas sarkanajā gaļā bija visaugstākais olbaltumvielu saturs (19,4 g/100 g), kas ir arī visaugstākais aļģu biomasā.

Putniem sasniedzot 43. dienu, taukskābju daudzums to sarkanajā gaļā bija mainījies. Spirulīnas (BS) grupā augšstilba gaļā bija visaugstākā MUFA (3,5 g/100 g), PUFA (1,7 g/100 g), omega-6 (1,5 g/100 g) un omega-9 (3,1 g/100 g) koncentrācija. Tomēr Hlorella (BC) grupai bija viszemākais kopējais tauku saturs (3,6 g/100 g) un ievērojami augstāks olbaltumvielu saturs (21,1 g/100 g). MUFA un PUFA līmenis bija attiecīgi 1,6 g/100 g un 0,9 g/100 g, kas atspoguļoja Chlorella augstāko PUFAS un olbaltumvielu saturu biomasā.

Ūdens un pelnu saturs saglabājās salīdzinoši nemainīgs visās grupās. Mikroelementu ziņā visās grupās augšstilba gaļā bija līdzīgs dzelzs līmenis (6,1–6,9 mg/kg) un selēna (0,28–0,31 mg/kg). Kālija un magnija līmenis bija salīdzinoši vienmērīgs, un Chlorella grupā bija nedaudz lielāks kālija saturs (2980 mg/kg). Attiecībā uz vitamīnu koncentrāciju, jāsaaka, ka Tetradesmus (BT) grupā bija augstākais B12 vitamīna (0,414 µg/100 g) un E vitamīna daudzums (0,221 mg / kg) un vidēji augsts tauku daudzums (5,6 g/100 g), kas atkal atbilst ar aļģu piedevas attiecīgam uzturvielu daudzumam (skat. 12.3. tab.).

Omega-6 un omega-3 taukskābju attiecība vistu filejā ir svarīga – gan no cilvēku uztura, gan vistas audzēšanas perspektīvas. Eiropā cilvēku uzturā omega-6 taukskābju daudzums ir neproporcionāls – tas ir pārāk liels, salīdzinot ar omega-3 (attiecība no 10 līdz pat 20:1). Lielākā daļa no literatūras avotiem liecina, ka cilvēku uzturā ieteicams omega-6/omega-3 attiecība ir no 1:1 līdz 5:1, vidēja 5 - 6:1, bet attiecība, kas pārsniedz 9:1 nav vēlama (Simopoulos, 2001). Ideāla uztura attiecība ir 1- 4:1, kas saistīta ar mazāku iekaisumu un sirds slimību risku. Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti par mikroaļģu *Tetradesmus obliquus* (BT), *Spirulina paltensis* (BS) un *Chlorella vulgaris* (BC) izbarošanas ietekme omega-6 un omega-3 taukskābju daudzuma attiecību 35. un 43. dienas vecu broileru krūšu muskuļos (t.s. filejā jeb “baltajā” gaļā) ir apkopoti un parādīti 12.4. attēlā.



12.4. attēls. Mikroaļģu *Tetrademus obliquus* (BT), *Spirulina paltensis* (BS) un *Chlorella vulgaris* (BC) izbarošanas ietekme uz omega-6 un omega-3 taukskābju daudzuma savstarpējo attiecību (omega-6:omega-3) broileru krūšu muskuļos.

Redzam, ka gaļas paraugos, kas tika iegūti gan 35 gan 43 dienu veciem broileriem, zemu omega-6 un omega-3 taukskābju daudzuma attiecību novērojām tikai BS grupas cāļu filejas paraugos. Tātad, neskatoties uz to, ka *Spirulina paltensis* nepaaugstināja omega-3 daudzumu salīdzinot ar kontroles grupu (skat. tab. 12.8.), tomēr tās pievienošana barībai, nodrošināja cilvēka veselībai labvēlīgu omega-3 un 6 attiecību (4:1), nobarojot broilerus Ross 308 gan 35 gan 43 dienas. Grupai, kas pie barības saņēma *Tetrademus obliquus* mikroaļģi attiecību 4:1 konstatējām tikai 42. dienas vecu broileru filejā. Savukārt *Chlorella vulgaris* omega attiecība bija augsta gan 35. gan 43. dienas vecu broileru filejā (attiecīgi 6:1 un 9:1).

12.2.2. Ražošanas apstākļos veiktais pētījums Nr. 1.

Lai noskaidrotu *Spirulina paltensis* trīs dažādu devu ietekmi uz mājas vistu cāļu augšanu un attīstību, tika veikts zemnieku saimniecībā “Kalvāni”. Veicot pētījumu ar trīs dažādām *S.paltensis* devas pievienošanu barībai, vēlējāmies noskaidrot, kā mājputnu audzēšanas rezultātus ražošanas apstākļos ietekmē putnu:

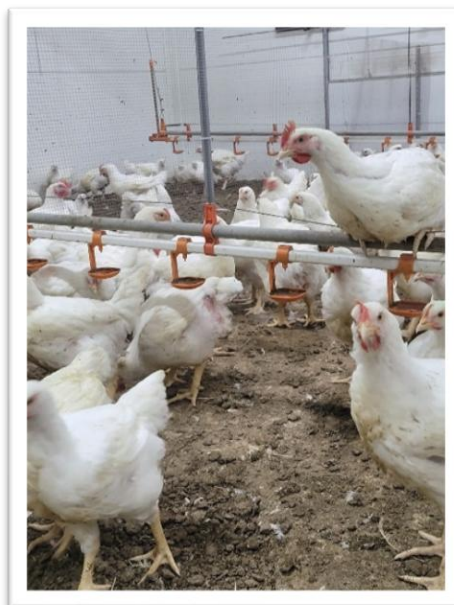
- veselību,
- ķermeņa masas pieaugumu,
- barības konversijas koeficientu (FCR),
- gaļas kvalitātes parametrus.

Īss pētījuma plāns.

Šajā pētījumā tika iekļauti 400 *Hubbart* šķirnes broilercāļi no 1. dienas vecuma līdz tie sasniedza kaušanai piemērotu dzīvsvaru. Pēc saimnieku pieredzes, tas tika prognozēts 60-65 dienas. Saimniecībā visiem cāļiem tika nodrošināti vienādi turēšanas un barošanas apstākļi, sadalot lielo putnu novietni četrās vienādās daļās. Barošana, dzirdināšana notika, izmantojot automatizētas līnijas. Kā barība tika izmantota komerciāli ražota broilercāļiem piemērots barības maisījums, ko atļauts lietot bioloģiskajā saimniecībā. Tā kā pamatbarība visiem putniem bija vienāda (gan sastāva, gan daudzuma ziņā), tā neietekmēja iegūtos rezultātus, tāpēc atskaitē šobrīd tās analīzi neietversim. Atkarībā no tā, cik lielu devu *Spirulina paltensis* saņēma katras pētījuma grupas cāļi, visus 400 putnus randomi iedalījām četrās grupās, katrā grupā pa 100 putniem:

- C - Kontroles grupa, n=100;
- S1 - *Spirulina paltensis* 1%, n=100;
- S1,5 - *Spirulina paltensis* 1,5%, n=100;
- S3 - *Spirulina paltensis* 3%, n=100.

Pētījuma ietvaros sekojām cāļu veselības stāvoklim (dzīvsvara pieaugums, asins analīžu rādītāji) un produktivitātei (masa pētījumu noslēdzot, iegūtās gaļas uzturvērtība, gaļas sastāva analīze).



12.5. attēls. *Ražošanas pētījumā iekļautie Hubbart cāļi 62 dienu vecumā bioloģiskajā saimniecībā “Kalvāni” (foto. A.Ilgaža).*

Rezultāti.

Rezultātu analīzē iekļausim rādītājus, kuriem bija būtiska statistiskā un/vai bioloģiskā nozīme projekta uzdevumu izpildē un rezultātu analīzē.

Dzīvsvara pieaugums.

Ražošanas apstākļos gaļas šķirnes mājas vistām dzīvsvara pieaugums ir viens no vieglāk nosakāmajiem un uzskatāmākajiem produktivitātes un veselības rādītājiem. Iegūtos rezultātus apkopojām 12.9. tabulā.

12.9. tabula

Mikroaļģes *Spirulina paltensis* 1% (S1, 1%), 1,5 (S1,5%) un 3% (S3, 3%) devu izbarošanas ietekme uz dzīvsvara pieaugumu (g) *Hubbart* šķirnes broilercāļiem no 1 līdz 62 dienu vecumam.

Vecums	Grupa (grupas saīsinājums)	Dzīvsvars (g)*			
		Vid.	St.nov.	Min.	Maks.
15. diena	Kontroles (K)	313,18 ^{a**}	29,78	253,80	367,60
	<i>Spirulina platensis</i> 1% (S1)	282,98 ^a	15,34	253,80	305,60
	<i>Spirulina platensis</i> 1,5% (S1,5)	282,98 ^a	15,34	253,80	305,60
	<i>Spirulina platensis</i> 3%(S3)	300,92	26,71	257,80	370,60
60-62. diena	Kontroles (K)	2912,4 ^b	350,18	2408,00	3969,00
	<i>Spirulina platensis</i> 1% (S1)	2889,08	268,18	2511,00	3400,00
	<i>Spirulina platensis</i> 1,5% (S1,5)	2841,96	331,34	2131,00	3400,00
	<i>Spirulina platensis</i> 3% (S3)	3005,92 ^b	337,19	2411,00	3600,00

* Dažādos vecumos vidējā dzīvsvara rādītāji grupu robežās atspoguļoti, izmantojot vidējo aritmētisko (vid.), standartnovirzi (st.nov.), kā arī konstatēto mazāko (min.) un lielāko (maks.) individuālo dzīvsvaru grupā.

** Vienādi burti pie rezultātiem nozīmē, ka šie rādītāji savstarpēji būtiski atšķiras (vismaz ar $p < 0,05$; 95%)

Analizējot *Spirulina paltensis* dažādu devu (1%, 1,5% un 3% no pamatbarības) devu pievienošanas barībai ietekmi uz dzīvsvara pieaugumu (g) broilercāļiem no 1 līdz 62 dienu vecumam, konstatējām, ka visām grupām bija stabils vidējais ķermeņa masas pieaugums no 1. līdz pat 62. dienai, kas norāda labu veselības stāvokli. Salīdzinot *S.platensis* saņēmušo cāļu masu ar kontroles grupu, konstatējām būtiskas atšķirības. Kontroles grupas cāļiem bija būtiski lielāka masa, salīdzinot ar S1 ($p=0,0005$) un S1,5 ($p=0,0057$) grupas cāļu vidējo dzīvsvaru. Grupai, kura saņēma *S.platensis* 3% devu, vidējie dzīvsvara rādītāji bija līdzīgi kontroles grupas rādītājiem. Jāatzīmē, ka lielākais individuālais sniegums šajā vecumā bija *S.platensis* 3% grupas cālim (370,60 g). Lai arī būtiski neatšķīrās, tomēr tika atzīmēta nedaudz mazāk barības konversija (patēriņš) tieši *S.platensis* grupām, kas varētu būt saistīts ar barības garšas izmaiņām, pievienojot šo mikroaļģi. Putniem, iespējams, bija jāpierod pie jaunās barības piedevas. Acīmredzot tas ir noticis, jo sverot broilercāļus 60 un 62 pētījuma dienā, konstatējām, ka *S.platensis* 3% grupas vidējais dzīvsvars ir lielāks nekā kontroles grupai. Kopumā varam teikt, ka *S.platensis* pievienošana barībai dzīvsvara pieaugumu būtiski nepalielināja.

Asins paraugu izmeklēšanas rezultāti.

Hematoloģiskos parametrus analizējot ar GLMM statistisko analīzi, mēs neatklājām būtiskas atšķirības trombocītu vai leukocītu skaitā starp grupām pēc cāļu vecuma kontroles ($p > 0,05$). Tomēr analizējot un salīdzinot leukocitārās formulas atsevišķus rādītājus, konstatējām, ka:

- Heterofīlo leukocītu skaitā starp grupām netika konstatētas būtiskas atšķirības ($p > 0,05$).
- Eozinofīlie leukocīti: pēc GLM analīzes veikšanas atklāja būtisku atšķirību starp kontroles un S1 grupu ($p = 0,010$) un starp kontroles un S3 grupu ($p = 0,014$).
- S1 grupā uzrādot par 48% zemāku eozinofīlo leukocītu skaitu (95% TI: 14%–71%) un S3 grupā uzrādot par 82% zemāku eozinofīlo leukocītu skaitu (95% TI: 37%–99%).
- Monocīti: Starp kontroles grupu un S1 grupu bija būtiska atšķirība ($p = 0,037$), kur S1 grupā uzrādīja par 27 % zemāku monocītu skaitu (95 % TI: 2–46 %).
- Limfocīti: Limfocītu skaita ziņā starp pētījumu grupām atšķirības nav ($p > 0,05$).

Padziļināti analizējot heterofīlos, eozinofīlos leukocītus, monocītus un limfocītus – tika novērotas būtiskas atšķirības atsevišķos rādītājos. Heterofīlo leukocītu skaitā starp grupām būtiskas atšķirības netika konstatētas. Savukārt eozinofīlo leukocītu skaitā tika novērotas statistiski nozīmīgas izmaiņas. Salīdzinājumā ar kontrolgrupu:

- S1 grupā eozinofīlo leukocītu skaits bija par 48% zemāks,
- S3 grupā – par 82% zemāks,
- S1 grupā monocītu skaits bija par 27% zemāks.

Gan eozinofīlie leukocīti, gan monocīti ir cieši saistīti ar organisma imūnreakciju un iekaisuma procesiem. Monocīti ir īpaši nozīmīgi fagocitozes procesā – tie migrē uz audiem, kur diferencējas par makrofāgiem un pilda būtisku antigēnu atpazīšanas un imūnās atbildes regulēšanas funkciju. Šie novērojumi saskan ar iepriekšējiem pētījumiem, kuros konstatēts, ka *Spirulina platensis* piemīt pretiekaisuma un imūnmodulējošas īpašības, kas izpaužas kā iekaisuma veicinošo imūnšūnu aktivitātes samazināšanās. Tāpat literatūrā minēti dati, ka spirulīnas pievienošana barībai stabilizē leukocītu skaitu, novēršot to krasas svārstības. Mūsu rezultāti arī atbilst (Adli&Salih, 2018; Mullenix et al., 2021) rezultātiem, kur novēroja, ka *S. platensis* piemīt pretiekaisuma un imūnmodulējoša iedarbība, ko apliecina samazinātas

iekaisuma veicinošo imūnšūnu daudzums. Leikocītu skaita stabilitāti apstiprina arī citas publikācijas rezultāti, kur līdzīgos pētījumos ziņots, ka kur *S.platensis* kā piedeva (3–6%) tika pievienota putnu barībai (Gunwan et al., 2025). Putnu eozinofīlajiem leikocītiem galvenā loma ir parazitāro infekciju apkarošanā un iekaisuma vai alerģisku reakciju medelēšanā. To skaita samazināšanās, kā to novērojām S1 un S3 grupu cāļiem, ja nav infekcijas — var liecināt par stabilāku un mazāk saspringtu imūno stāvokli, īpaši eksperimentālos vai komerciālos audzēšanas apstākļos (Adli&Salih, 2018; Mullenix et al., 2021; Gunwan et al., 2025).

Gaļas uzturvērtības analīze.

Lai noskaidrotu, kā dažādu mikroaļģu biomasu pievienošana ietekmē broileru gaļas uzturvērtību, ieguvām gaļas paraugus pētījumam noslēdzoties, tas ir 60. un 62. pētījuma dienā, kas sakrita ar cāļu vecumu. Paraugus ieguvām divās dienās tehnisku apstākļu dēļ. Tā kā rezultātiem nebija būtiskas atšķirības, tos apvienojām un izskatījām par 62. dienas paraugu analīzi.

12.10. tabula

Mikroalģes *Spirulina paltensis* 1% (S1, 1%), 1,5 (S1,5%) un 3% (S3, 3%) devu izbarošanas ietekme uz broilercāļu krūšu muskuļu gaļas uzturvērtības rādītājiem.

Rādītājs		Pētījuma grupa			
		K	S1	S1.5	S3
Taukskābes g/100g	Kopējais (SAFA)	0,7	0,6	0,7	0,5
	Kopējais (MUFA)	0,9	0,6	0,7	0,6
	Kopējais (PUFA)	0,7	0,3	0,4	0,5
	Kopējais Omega-3	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Kopējais Omega-6	0,6	0,3	0,4	0,5
	Kopējais Omega-9	0,8	0,5	0,6	0,6
Ūdens		75,1	75,1	73,9	75
Kopējais pelnu daudzums		1,1	1,1	1,12	1,09
Enerģētiskā vērtība (kcal/100g)		114	114	111	110
Proteīns (g/100g)		23,1	23,1	24,2	23,5
Tauki (g/100g)		2,4	2,4	1,6	1,8
Holesterīns (g/100g)		32	32	24	21
Minerālvielas un vitamīni	Fe mg/kg	2,6	2,9	3,2	3
	Se mg/kg	0,2	0,18	0,16	0,17
	K mg/kg	3540	3390	3400	3470
	Mg mg/kg	244	226	232	235
	E vit. mg/kg	0,602	0,434	0,512	0,413
	B12 vit µg/100g	0,310	0,324	0,325	0,333

Gaļas kvalitātes rādītāju novērtējums neliecināja par būtiskām atšķirībām starp grupām, tomēr detalizētāk analizējot datus (skat 12.10. tab.), var novērot noteiktas tendences starp eksperimentālajām un kontroles grupām.

Analizējot taukskābju sastāvu, varam atzīmēt, ka visās eksperimentālajās grupās (S1, S1,5 un S3) omega-3 taukskābju saturs broilercāļu gaļā bija zem laboratorijas minimālā noteikšanas sliekšņa. Jau konstatējām, ka laboratorijas sniegtajos *Spirulina platensis* biomasas sastāvā analīzes rezultātos omega-3 taukskābes netika noteiktas, jo atradās zem attiecīgās metodes noteikšanas sliekšņa, kas, visticamāk, arī ir iemesls, kāpēc laboratorija šīs taukskābes nespēja noteikt arī gaļā. Jāatzīmē, ka omega-6 taukskābju līmenis biomasu saņēmušo cāļu gaļā arī bija zemāks, salīdzinot

ar kontroles grupas attiecīgo rādītāju. Tas netieši liecina, ka mikroaļģu biomasas sastāvs samazina krūšu muskulatūras gaļā esošo nepiesātināto taukskābju, tai skaitā omega-3 un omega-6 daudzumu.

Salīdzinot krūšu muskuļu paraugos konstatēto tauku un enerģētisko vērtību (kcal/100 g), varam atzīmēt, ka visās eksperimentālajās grupās, kuras pie barības saņēma *S. platensis*, tauku saturs un kaloriju daudzums bija zemāks nekā kontroles grupā, ko var tikt uzskatīt par pozitīvu aspektu no uzturvērtības viedokļa.

Arī holesterīna līmenis broileru gaļā eksperimentālajās grupās bija zemāks salīdzinājumā ar kontrolgrupu, ko uzskata par pozitīvu uzturvērtības rādītāju. Arī literatūrā norādīts, ka *S. platensis* piemīt holesterīna līmeni samazinoša iedarbība, pateicoties tās aktīvajām vielām – fikocianīnam un dažādiem antioksidantiem, kas spēj ierobežot holesterīna uzkrāšanos muskuļaudos. Tas saskan ar šajā pētījumā novēroto rezultātu, ka spirulīnas lietošana var uzlabot gaļas lipīdu profilu.

***Spirulina paltensis* dažādu devu izbarošanas ietekme uz omega-6 un omega-3 taukskābju daudzumu un to savstarpējo attiecību broileru krūšu muskuļos.**

GRUPA	Omega-6 (g/100g)	Omega-3 (g/100g)	Omega-6:3 attiecība
Kontrole	0,6	0,1	6
S 1	0,3	<0,1	> 3,0 (0,3 / 0,099)
S 1,5	0,4	<0,1	> 4,0 (0,4 / 0,099)
S 3	0,5	<0,1	> 5,1 (0,5 / 0,099)

Veicot detalizētāku uzturvērtības datu analīzi (skat. 12.11. tabulu), pārbaudījām omega-6 un omega-3 taukskābju daudzumu un to savstarpējo attiecību broileru krūšu muskuļos, grupās, kuras saņēma *Spirulina paltensis*, novērojām zemu omega-6 un omega-3 taukskābju daudzuma attiecību, kas ir veselīga pārtikas produkta rādītājs, bet kontroles grupas cāļiem tas sasniedz attiecību 6:1, kas ir nedaudz sliktāks rādītājs. Atgādinām, ka cilvēku uzturā ieteicams omega-6/omega-3 attiecība ir no 1:1 līdz 5:1, vidēja 5-6:1, bet attiecība, kas pārsniedz 9:1 nav vēlama (Simopoulos, 2001). Tātad, neskatoties uz to, ka devas *S.paltensis* 1%, 1,5% vai 3% nepaaugstināja omega-3 daudzumu gaļā, vienlaicīgi samazināja omega-6 daudzumu, kas nodrošina labvēlīgāku omega taukskābju (6:3) attiecību (skat. 12.11. tab.).

Pētījumos parādīts, ka pārāk liels omega-6 daudzums bloķē omega-3 transformāciju un samazina pretiekaisuma metabolītu ražošanu un izturību pret oksidatīvu stresu. Samazinot omega-6/omega-3 no 30:1 līdz 2,5:1, palielinājās EPA (eikozapentaēnskābe) un DHA (dokozaheksaēnskābe) (divas svarīgas omega-3 polinepiesātinātās taukskābes, kas spēlē nozīmīgu lomu gan cilvēka, gan dzīvnieku veselībā) koncentrācija filejā, uzlabojās gaļas īpašības un uzturvērtība cilvēku pārtikā - uzlabojas gaļas krāsa, mīkstums, garša un citas īpašības (Qu et al., 2010; Alagawany et al., 2019). Izpētīts, ka omega-3 papildinājums uzlaboja ne tikai omega-6 un omega-3 taukskābju attiecību vistu gaļā, bet arī palielināja broileru organisma izturību un imunitāti, samazinot pro-iekaisuma TNF α , TLR4 ekspresiju (Ghanbari et al., 2024https://www.reddit.com/r/StopEatingSeedOils/comments/1e3x1h9?utm_source=chatgpt.com).

Kopumā varam secināt, ka *Spirulīna platensis* pievienošana barībai veicināja liesākas gaļas iegūšanu, jo šo grupu krūšu muskuļu gaļas paraugos tauku saturs bija zemāks, salīdzinot ar kontroles grupas gaļas paraugiem. Bija samazināts arī holesterīna līmenis gaļā, īpaši grupā, kura saņēma 1 % *S.platensis* devu (24 mg/100 g), salīdzinot ar kontroles grupu (32 mg/100 g), kas liecina par spirulīnas holesterīnu mazinošu efektu. Tā kā Spirulīnas grupās bija samazināts tauku saturs, tad likumsakarīgi, ka arī enerģētiskā vērtība šajās grupās bija salīdzinoši mazāka (līdz 107 kcal/100 g). Šie trīs rādītāji var būt nozīmīgi veselīgākas gaļas produkta ražošanai. Savukārt augstais proteīna saturs krūšu muskulī (S3 grupai līdz pat 24,2 g/100 g) atbilst augstajam olbaltumvielu saturam Spirulīnas biomasā (69,6 g/100 g). Jāatzīst, ka omega-3 taukskābju saturs visās spirulīnas grupās saglabājās zem kvantitatīvās noteikšanas sliekšņa (<0,1 g/100 g), tāpēc omega-6/omega-3 attiecība bija augsta (>3:1 līdz >5:1). Palielināts dzelzs saturs Spirulīnas grupu gaļas paraugos (līdz 2,2 mg/kg) iespējams tika panākts, jo *Spirulīnas platensis* biomasā tika konstatēts augsts dzelzs saturs (75,4 mg/100 g), kas var uzlabot šī produkta mikroelementu vērtību.

Šī pētījuma posma rezultāti parādīja, ka *Spirulīna platensis* uzlaboja broileru gaļas uzturvērtību, samazinot tauku un holesterīna saturu un palielinot proteīna un dzelzs daudzumu. Tomēr, lai nodrošinātu vēlamu omega-3 taukskābju līdzsvaru, nepieciešams izmantot papildu EPA/DHA avotus.

12.2.3. Ražošanas apstākļos veiktais pētījums Nr. 2.

Lai noskaidrotu mikroaļģu biomasas ietekmi uz mājas vistu organismu no izšķilšanās brīža līdz jaunputna vecumam ražošanas apstākļos, pētījums notika divās saimniecībās. Zemnieku saimniecībā “Kalvāni” pētījuma norisei tika izvēlēta broilercāļu šķirne Ross 308, kur tika pārbaudītas trīs mikroaļģes *Spirulina platensis* biomasas devas (1%, 1,5%, 3%, katrā grupā n=100). Lai paplašinātu iegūto datu daudzumu un noskaidrotu citas mikroaļģes izbarošanas ietekmi uz dējējvistu augšanu un attīstību, zemnieku saimniecībā “Kalnadravas” pētījumā ar dējējvistu šķirnes *Dominantes* D 187 un D 107 cāļiem (n=110) izmantojām citu sugu - *Chlorella vulgaris*, pievienojot barībai 1% šīs mikroaļģes biomasas.

Īss pētījuma plāns.

Lai nodrošinātu dējējvistu Dominantes D 187 un D 107 cāļiem nepieciešamos turēšanas apstākļus, tie tika turēti slēgtā telpā, sadalot to uz pusēm. Abas daļas tika vienādi iekārtotas, ievietojot nepieciešamo ūdens un barības trauku skaitu, kā arī komerciāl ražotus elektriskās cāļu sildīšanas iekārtas. Barošana un dzirdināšana tika veikta manuāli. Kā pamatbarība tika izmantota dējējvistu cāļiem domātā Dobeles komercbarība, deva un barības veidus izvēts atbilstoši cāļu vecumam.

Pētījumā tika iekļauti cāļi no 1. līdz 90. dienu vecumam. No inkubatora izņemtus 1 dienu vecos cāļus uzreiz ievietoja sagatavotajās telpās, randomi sadalot divās grupās:

- Kontroles grupa, putnu skaits $n=55$, tika barota tikai ar pamatbarību.
- Chrolela 1% grupa, $n=55$, pie pamatbarības tika pievienots 1% *S. Platensis* biomasas.

Lai noskaidrotu *Chlorella vulgaris* devas 1% sekojām cāļu veselības stāvoklim, pētījuma noslēgumā ieguvām un asins paraugus (punktējot spārnu vēnu) un, sverot katru putnu atsevišķi, arī dzīvsvara rādītājus.

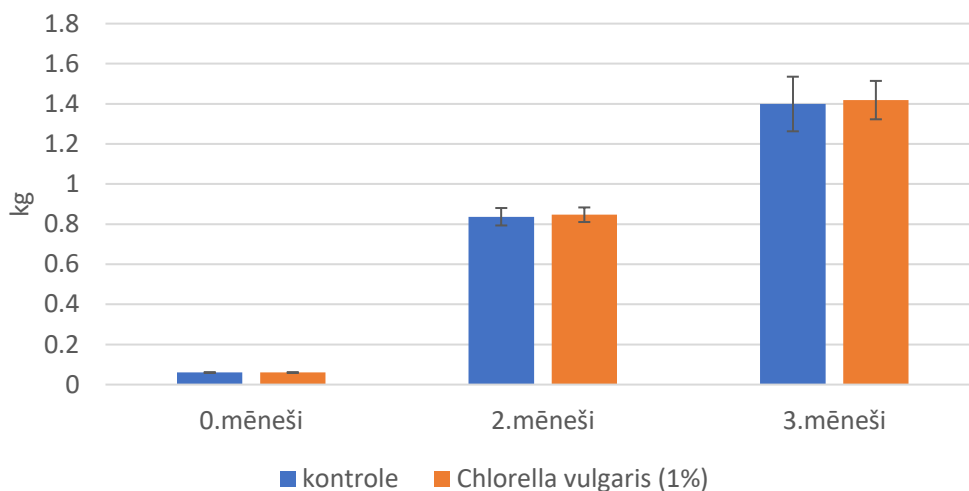
Rezultāti.

Rezultātu analīzē iekļausim rādītājus, kuriem bija būtiska statistiskā un/vai bioloģiskā nozīme projekta uzdevumu izpildē un rezultātu analīzē. Tā kā asins analīzes parādīja, ka abu grupu cāļu hematoloģiskie un bioķīmiskie rādītāji atrodas fizioloģiskās normas robežās un to atšķirības starp grupām nav būtiski nozīmīgas, tad šo rādītāju analīzi atskaitē neiekļausim.

Dzīvsvara pieaugums.

Cāļu svēršanu KD saimnieki veica trīs reizes: pirmo reizi veidojot pētījuma grupas (t.i. 1 dienas vecumā), otro reizi 2, mēnešu vecumā, bet trešo reizi tad, kad cāļi bija sasnieguši pilnu triju mēnešu vecumu (jeb 13. nedēļu vecumā).

Iegūtie dati tika statistiski apstrādāti, izmantojot MC Exel un aprēķinot vidējo aritmētisko, standartnovirzi (kā izkliedes rādītāju) un t-testu divu vidējo paraugkopu vidējo rādītāju salīdzināšanai. Iegūtie rezultāti atspoguļoti 12.6. attēlā.



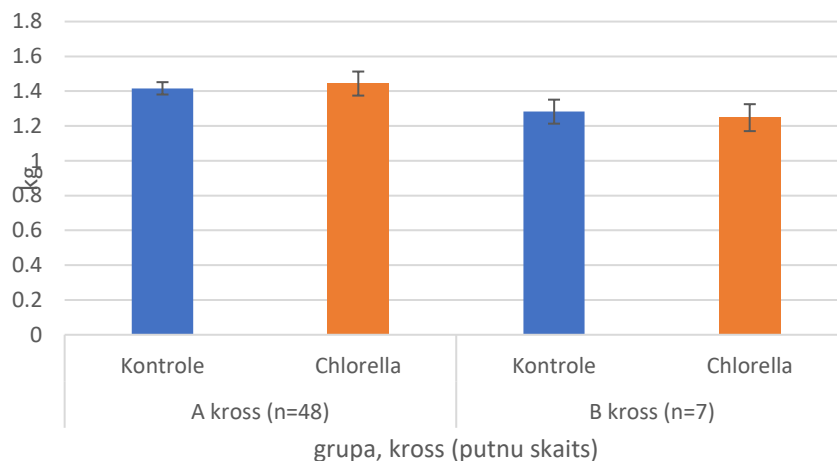
12.6. attēls. Chlorella vulgaris izbarošanas ietekme uz Dominant dējējvistu cāļu dzīvsvara pieaugums no 1 dienas līdz 3 mēnešu vecumam.

Konstatējām, ka abu grupu cāļu vidējais dzīvsvara pieaugums atbilst šķirnes *Dominante* D 187 (A) un D 107 (B) vidējiem rādītājiem. 1. dzīves dienā vidējais cāļu svars starp grupām būtiski neatšķīrās un standartnovirze norādīja, ka tas svārstās salīdzinoši nelielās robežās (kontrolē $60 \pm 2,0$ g un Chlorella 1% grupa $60 \pm 1,5$ g). Tas parāda, ka grupas ir viendabīgas un nodrošina korektu pētījuma tālāku norisi.

Pēc diviem mēnešiem notika atkārtota cāļu svēršana. Rezultāti liecina, ka šajā vecuma posmā abu grupu cāļi vairākkārtīgi palielinājuši savu dzīvsvaru (aptuveni par 92,8 % kontrolē un par 92,9% *C.vulgaris* grupai) Redzam, ka ir pieaudzis izkliedes rādītājs (kontrolē $837 \pm 43,5$ g un Chlorella 1% grupa $857 \pm 36,4$ g), tāpēc, lai arī *C.vulgaris* grupas pieaugums ir lielāks, tomēr atšķirība starp grupu vidējiem svara rādītājiem nav būtiska.

Pēc mēneša, sasniedzot 3 mēnešu vecumu, cāļu dzīvsvars bija palielinājies, sasniedzot $1,40 \pm 0,136$ kg kontrolē un Chlorella 1% grupa $1,42 \pm 0,095$ g (pieaugums kontrolē grupai par 40,19% un *C.vulgaris* grupai par 40,3%). Pieauguma atšķirība starp grupām atkal izrādījās statistiski nebūtiska ($p = 0,188$). Uzmanība atkal tika pievērsta datu izkliedes rādītājam, jo vidējie rādītāji *C.vulgaris* grupai atkal bija lielāki nekā kontrolē grupas vidējie svara rādītāji. Pārrunājot šos rezultātus ar zemnieku saimniecības vadītāju, noskaidrojās, ka pētījumā iekļautajā *Dominant*

šķirnes vistām ir divi krosi, kas savā starpā atšķiras ne tikai ar krāsas, bet arī ar izmēra atšķirību. Dējējvistu cāļi, ar saimnieku palīdzību, tika nosvērti atkārtoti, atsevišķi sverot A un B krosu putnus. Iegūtie rezultāti ir parādīt 12.7. attēlā.



12.7. attēls. *Chlorella vulgaris* izbarošanas ietekme uz Dominant A un B krosu dējējvistu cāļu dzīvsvara pieaugums no 1 dienas līdz 3 mēn. vecumam.

12.7. attēlā parādītie rezultāti liecina, ka A krosa putni ir lielāki par B krosa mājas vistām, turklāt šī atšķirība izrādījās būtiska, salīdzinot savstarpēji gan kontroles grupas vistu svaru ($p=0,0068$), gan abu krosu *C.vulgaris* 1% grupas ($p=1,96907E-06$). Salīdzinot B krosa kontroles un *C.vulgaris* 1% grupas vidējos rādītājus, noskaidrojām, ka *Chlorella vulgaris* pievienošana barībai būtiski palielina vidējo dzīvsvara pieaugumu, ja to izēdina līdz 3 mēnešu vecumam.

Kopumā varam secināt, ka Chlorella 1% pievienošana dējējvistu cāļu barībai no 1.dzīves dienas līdz pat 3 mēnešu vecumam var nodrošināt zināmu dzīvsvara pieaugumu. Mūsu pētījumā rezultātu ietekmēja gan šķirne, gan kross. Rezultāti nav viennozīmīgi un pētījumi šajā virzienā vēl jāturpina.

12.2.4. Mikroaļģu izēdināšanas broilercāļu šķirņu mājas vistu cāļiem kopsavilkums.

Pētījumā laboratorijas apstākļos tika pārbaudīts, kā ēdamo mikroaļģu *Tetrademus obliquus*, *Spirulina platensis* un *Chlorella vulgaris* biomasa ietekmē broileru cāļu augšanu un gaļas kvalitāti. Lai gan centāmiem nodrošināt pēc iespējas labākus turēšanas un barošanas apstākļus, tomēr asins analīzes liecināja ka putni atrodas fizioloģiskā stresa apstākļos. Tikai *S. platensis* grupā konstatējām zemāku (vidēju) stresa līmeni, jo vidējā H/L attiecība 0,7 liecināja par vieglu stresu vai tā sākuma pazīmēm. Jāatzīmē, ka augstu stresa līmeni (H/L attiecība (virs 1,5) netika konstatēta, kaut gan kontroles grupas dzīvniekiem šis rādītājs tam pietuvojās, sasniedzot 1,25. Tātad, salīdzinot ar pārējām grupām, *S. platensis* grupas dzīvniekiem šī attiecība bija zemāka, norādot, ka tie, iespējams, labāk panes stresa apstākļus vai arī bija vismazāk pakļauti stresam.

Statistiski nozīmīgas ķermeņa masas vai gaļas kvalitātes atšķirības, veicot pētījumu laboratorijas apstākļos, netika konstatētas, bet konstatējām vairākas bioloģiski nozīmīgas tendences, kas parāda veikto pētījumu nozīmību un sniedz ieskatu par šo mikroaļģu biomasu funkcionālajām īpašībām. Lai gan ķermeņa masa dažādās grupās būtiski neatšķīrās, skaitliski augstākais galīgais svars laboratorijas apstākļos audzētajiem broilercāļiem tika novērots grupā, kur cāļiem Ross 308 pie barības pievienoja 0,5% *T. obliquus* - viens no tiem 43 dienu laika sasniedza 4029 g dzīvmasu (skat. 12.5. tab.), kam cieši sekoja kontroles un spirulīnas grupa cāļu individuālie rādījumi.

Savukārt ražošanas apstākļos veiktajā pētījumā par mikroaļģes *Spirulina paltensis* 1%, 1,5% un 3% devu izbarošana nodrošināja stabilu dzīvsvara pieaugumu *Hubbart* šķirnes broilercāļiem no 1 līdz 62 dienu vecumam. Būtiska ietekme izrādījās lielākajai šīs barības piedevas devai (3%), kas vidēji grupā nodrošināja 3005 +/- 337,2 g dzīvsvaru. Lielākais sasniegtais individuālais rādītājs *Hubbart* šķirnes cālim 62 dienu vecumā bija 3600 g. Tas atbilst citu zinātnieku aprakstītajiem rezultātiem, ka barības papildināšana ar mikroaļģēm var veicināt augšanas rādītājus, negatīvi neietekmējot vispārējo produktivitāti un veselības stāvokli (El-Bahr et al., 2020; Šefcová et al., 2021).

Grupa, kuras barībai pievienojām 0,5% *S. platensis* uzrādīja cilvēku veselībai labvēlīgu omega-6 un omega-3 attiecību un paaugstināja PUFA līmeni gan t.s. filejas baltajā, gan augšstilbu sarkanajā gaļā. Savukārt, neskatoties uz to, ka *S. paltensis* 1%, 1,5% vai 3% devas nepaaugstināja omega-3 daudzumu gaļā, tās vienlaicīgi samazināja omega-6 daudzumu, kas nodrošināja

labvēlīgāku omega taukskābju (6:3) attiecību. Pamatojoties uz Simopoulos (2001) un Pasaules Veselības organizācijas (2003) atklājumiem, zemāka uztura omega-6 un omega-3 attiecībai ir saistīta ar uzlabotiem veselības saglabāšanas rezultātiem.

Mikroaļģes *C.vulgaris* biomasas pievienošana broileru barībai rezultējās ar lielāku mononepiesātināto un polinepiesātināto taukskābju koncentrāciju, kā arī lielāku kopējo tauku un olbaltumvielu saturu broileru baltajā un sarkanajā gaļā. Šos rezultātus apstiprina arī citu autoru publikācijas, kas parāda, ka diēta, kas satur *Hlorella* mikroaļģes, uzlabo gaļas kvalitāti un uzturvērtību (Cabrol et al., 2022). Ir pētījums par daļēju sojas pupu miltu aizstāšanu ar *C. vulgaris* palielināja MUFA un PUFA saturu krūšu muskuļos, vienlaikus saglabājot normālu augšanas veiktspēju. Līdzīgus rezultātus aprakstīja Corrêa ar līdzautoriem (2024) par to, ka broileri, kas baroti ar mikroaļģes *Hlorella* biomasu uzrādīja augstāku proteīnu un kopējo lipīdu līmeni gan krūts, gan augšstilbu gaļā.

Mikroaļģes *Tetrademus obliquus* biomasas izbarošana cāļiem kopā ar pamatbarību devā 0,5% uz 1 kg barības gaļā nodrošināja ieteicamo omega-6/omega-3 taukskābju attiecību, sasniedzot attiecību 4:1 vai pat zemāku. Šādu pozitīvu sniegumu konstatējuši arī citi autori, kas to skaidro ar mikroaļģes spēju sintezēt omega-3 taukskābes miksotrofiskos audzēšanas apstākļos (Piasecka et al., 2020). Savā pētījumā novērojām, ka *T. obliquus* grupas vecāku (43 dienu v.) gaļas paraugos omega-6/omega-3 taukskābju attiecība uzlabojās, salīdzinot ar 35 dienu vecu cāļu gaļas paraugu rezultātiem. Šādu tendenci - uzlaboties taukskābju omega-6 un omega-3 attiecībām, dzīvniekiem kļūstot vecākiem, liecina par kumulatīvu efektu, kas norāda, ka ilgāks barošanas laiks veicina omega-3 nogulsnešanos audos un samazina omega-6 un omega-3 attiecību (Shahid et al., 2019).

Mūsu pētījumā omega-6 / omega-3 attiecība ar *tetrademus* un *spirulinu* (arī dažādu devu) barotajās grupās 43. dienā samazinājās, tuvojoties attiecībai 4:1 vai zemāk, cāļiem kļūstot vecākiem. Šāda attiecība atbilst optimālajai, ko iesaka citi autori (Simopoulos et al., 2002) un Pasaules Veselības organizācija (2003) iekaisuma samazināšanai un hronisku slimību riska samazināšanai. Ilgstoša barības papildināšana ar šo mikroaļģu biomasu ir ieteicama, lai panāktu ne tikai optimālu efektu taukskābju bagātināšanai mājputnu gaļā, bet arī iegūtu ieteicamo taukskābju omega-6/omega-3 attiecību. Tas liecina, ka vecums, kādā tiek iegūta broileru gaļa, ietekmē galaprodukta (gaļas) uzturvērtību.

Atšķirības, kuras novērojām starp krūšu un augšstilbu gaļas uzturvērtības rādītājiem, varam skaidrot atšķirīgo šo muskuļu grupu noslogojumu un līdz ar to vielmaiņas intensitāti. Augšstilba gaļai ir jāiztur lielāka fiziskā slodze, līdz ar to tai vajag lielākas enerģijas rezerves, tāpēc likumsakarīgi, ka šajos muskuļos ir lielāks tauku saturs, kas nodrošina lielāku taukskābju uzkrāšanos (Crespo & Esteve-García, 2001). Tas apstiprina no aļģēm iegūto taukskābju pieejamību un izmantošanu muskuļu vielmaiņas un augšanas nodrošināšanai.

Papildus lipīdu sastāva modulēšanai un papildināšanai, mikroaļģu pievienošana barībai ietekmēja broileru gaļā esošo vitamīnu (īpaši B grupas vitamīna) profilu. Mikroaļģes *C. vulgaris* pievienošana barībai izraisīja augstāku B₁₂ vitamīna koncentrāciju gan krūts, gan augšstilba muskuļos 43 dienas veciem cāļiem, neskatoties uz salīdzinoši nelielo kobalamīna saturu aļģu biomasā. Tas atbilst pētījumiem, kas liecina, ka *Hlorella* satur bioloģiski pieejamas B₁₂ vitamīna formas, piemēram, metilkobalamīnu un adenosilkobalamīnu (Kittaka-Katsura et al., 2002), kas efektīvi uzsūcas un nogulsnējas dzīvnieku audos. Mikroaļģes *Spirulina platensis* biomasu uzrādīja augstu B₁₂ vitamīna koncentrāciju biomasā. Tomēr iepriekšējie pētījumi ir parādījuši, ka lielākā daļa tā korinoīdo savienojumu ir pseidovitamīna B₁₂ analogi ar zemu iekšējo faktoru saistīšanās afinitāti un bez nepieciešamās bioaktivitātes cilvēku organismā (Watanabe et al., 1999; Watanabe et al., 2014). Tāpēc šādus rezultātus (par augstu B₁₂ vitamīna daudzumu ēdienā) zinātnieki nevērtē viennozīmīgi. Lai gan putnu barība tika papildināta ar *S. Platensis*, kas palielināja kopējo B₁₂ vitamīna līmeni gaļā, tās uzturvērtība cilvēkiem joprojām ir neskaidra. Literatūrā pašlaik nav nozīmīgu datu par B₁₂ vitamīna saturu *Tetrademus obliquus*. Tomēr šajā pētījumā putni, kuru barība tika papildināti ar *tetrademus* biomasu, arī uzrādīja paaugstinātu B₁₂ līmeni gaļas audos. Nav skaidrs, vai tas atspoguļo patiesu uzturvērtības paaugstināšanu un tas prasa turpmāku izpēti.

Attiecībā uz E vitamīnu (α -tokoferolu) jāsaka, ka papildināšana ar spirulīnu noveda pie visaugstākās koncentrācijas augšstilba gaļā, kas atbilst labi dokumentētajai tokoferolu un karotinoīdu pārpilnībai (Khan et al., 2005). Turpretī *Chlorella vulgaris* izraisīja visaugstāko α -tokoferola saturu krūts gaļā līdz 43. dienai, kas norāda uz efektīvu audu nogulsnēšanos un apstiprina tā klasifikāciju kā bagātīgu dabisku taukos šķīstošo vitamīnu, tostarp α -tokoferola, avotu (Del Mondo et al., 2020). Lai gan mūsu pētījumā izmantotā *Tetrademus obliquus* biomasā saturēja ievērojamu daudzumu E vitamīna (8,3 mg / 100 g), tas neizraisīja α -tokoferola līmeņa paaugstināšanos broileru gaļā. 43. dienā E vitamīna saturs krūts gaļā *Tetrademus* grupā (0,375 mg/kg) bija nedaudz zemāks nekā kontroles grupā (0,391 mg/kg) un daudz zemāks nekā *Chlorella*

grupā (0,855 mg/kg). Šie rezultāti liecina, ka, neraugoties uz tam raksturīgo α -tokoferīna saturu, *T.obliquus* sastāvā esošā E vitamīna biopieejamība vai metaboliskā izmantošana var būt ierobežota. Tas atbilst iepriekšējiem atklājumiem (Chronopoulou et al., 2019), kuri pierādīja, ka taukos šķīstošo vitamīnu ekstrakcija un biopieejamība no *T.obliquus* var būt atkarīga no konkrētām apstrādes metodēm.

Varam secināt, ka uztura bagātināšana ar *Tetrademus obliquus* (BT), *Spirulina paltensis* (BS) un *Chlorella vulgaris* (BC) uz ietekmēja broileru gaļas uzturvielu sastāvu atbilstoši katras mikroaļģes sugas biomasas specifiskajam sastāvam, būtiski neietekmējot dzīvsvara pieaugumu.

Chlorella vulgaris palielināja E vitamīna saturu baltajā krūšu gaļā un uzlaboja olbaltumvielu daudzumu augšstilbu sarkanajā gaļā, vienlaikus bagātinot lipīdu profilu ar augstāku mononepiesātināto un polinepiesātināto taukskābju līmeni. Tomēr augstais omega-6 un zemais omega-3 saturs izraisīja vismazāk labvēlīgo omega-6 un omega-3 attiecību, kas nav vēlama no cilvēka veselības viedokļa.

Spirulina platensis veicināja labvēlīgāku taukskābju profilu ar zemāko omega-6/omega-3 attiecību un mērenu tauku saturu, vienlaikus paaugstinot olbaltumvielu līmeni, īpaši baltajā krūšu gaļā. Tas parāda tās potenciālu kā funkcionālu barības piedevu mājputnu gaļas uzturvērtības uzlabošanai.

Tetrademus obliquus izbarošanas rezultātā ieguvām gaļu ar mazāku tauku saturu, paaugstinātu B12 vitamīna un kālija līmeni un līdzsvarotāku omega-6 un omega-3 attiecību, īpaši līdz 43 dienai, kas liecina par kumulatīviem ieguvumiem ilgstošas barošanas rezultātā.

Šī projekta posma pētījuma rezultāti apstiprina mikroaļģu izmantošanu kā ilgtspējīgas, funkcionālas barības sastāvdaļas un norāda, ka to pielietojums mājputnu uzturā ir jāpielāgo konkrētiem uztura mērķiem, piemēram, olbaltumvielu bagātināšanai, lipīdu modulācijai vai omega-3 palielināšanai.

12.3. Mikroaļģu *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* un *Dunaliella salina* biomasas izbarošanas ietekme uz pieaugušu dējējvistu organismu un produktivitāti laboratorijas un ražošanas apstākļos.

Pēdējos gados zinātnieki arvien aktīvāk pievēršas pētījumiem par dažādu mikroaļģu pievienošanu mājputnu barībai. Izpētīts, ka to pievienošana barībai var uzlabot ne tikai dējējvistu veselību, bet arī to produktivitāti un olu kvalitāti. Mikroaļģu barošana var stimulēt olnīcu funkcijas un palielināt olu svaru (Abdel-Wareth et al., 2024). Vienlaicīgi ir atrodami pētījumi, kas liecina, ka mikroaļģu pievienošana būtiski nepalielina olu ražošanu un olu svaru (Kusuma et al., 2025). Ir pierādīts, ka mikroaļģu piedevas var ievērojami uzlabot olu čaumalas biezumu un čaumalas izturību, pateicoties to augstajam kalcija un fosfora saturam un labai minerālvielu pieejamībai (Kusuma et al., 2025; Costa et al., 2024). Mikroaļģēs atrodami pigmenti var ievērojami uzlabot dzeltenuma krāsu, kas ir viens no olu kvalitātes rādītājiem (Kusuma et al., 2025; Abdel-Wareth et al., 2024). To barošana var ietekmēt arī olu uzturvērtību (piemēram, palielinot omega-3 taukskābes un dzelzi, vienlaikus samazinot holesterīna un triglicerīdu līmeni) (Abdel-Wareth et al., 2024).

Tomēr rezultāti dažādos pētījumos atšķiras, kas var būt saistīti ar atšķirībām mikroaļģu sugās, devās, papildināšanas periodos, putnu vecumā, šķirnē un citos faktoros (Kusuma et al., 2025). Piemēram, dažādos pētījumos dējējvistu barībai ir izmantotas dažādas *C. vulgaris* devas (no 0,1% līdz 10%) (Abdel-Wareth et al., 2024; Madacussengua et al., 2024). Piemēram, Madacussengua et al. (2024) atklāja, ka 2,5, 5 un 10% *C. vulgaris* pievienošana nemainīja dējējvistu produktivitāti, savukārt olu svars palielinājās putniem, kas baroti ar 2,5% *C. vulgaris*. Tomēr Kim et al. (2023) atklāja, ka barošana ar 5 g/kg *C. vulgaris* nemainīja ne olu skaitu, ne svaru. Panaite et al. (2023) atklāja, ka 2% *C. vulgaris* barošana dējējvistām būtiski nemainīja holesterīna līmeni olu dzeltenumā, bet mainīja taukskābju profilu daudzumu (piemēram, hlorellas barošana ievērojami palielināja omega-3 taukskābju daudzumu olās). Līdzīgi, Grigorova et al. (2006) atklāja, ka 2% un 10% *Chlorella* mikroaļģu barošana dējējvistām būtiski nemainīja holesterīna līmeni olu dzeltenumā, bet mainīja taukskābju saturu. Līdzīgas pretrunas atrodamas arī pētījumos par citu mikroaļģu izbarošanas ietekmi uz vistu organismu un produktivitāti. Trūkst pētījumu, vai mikroaļģu pievienošana barībai ietekmē dējējvistu dēšanas sākumu un paildzina dēšanas sezonas ilgumu.

Nemot vērā nekonsekventos rezultātus un ekonomiskos aspektus, ir svarīgi precizēt optimālās mikroaļģu devas, ko var pievienot barībai, lai iegūtu vēlamos rezultātus. Šīs pētījuma

daļas **mērķis** bija izpētīt dažādu mikroaļģu biomasas dažādu devu biomasas ietekmi uz dažāda vecuma vistu organismu, kā arī olu ražošanas intensitāti, svaru un uzturvērtību.

12.3.1. Laboratorijas apstākļos veiktais pētījums par mikroaļģu biomasas izbarošanas ietekmi uz dējējvistu organismu un produktivitāti.

Lai sagatavotos ar dējējvistā saistītajiem pētījumiem ražošanas apstākļos – pārbaudītu izstrādāto metodiku, noskaidrotu, kādu iespaidu uz vistu organismu un produktivitāti atstāj literatūrā minētās mazākās mikroaļģu biomasas devas, tika veikts pilotpētījums LBTU VMF Klīnisko pētījumu centrā. Šī pētījuma daļas uzdevumi bija izpētīt dažādu mikroaļģu biomasas *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, un *Dunaliella salina* vienādas devas – t.i 0,5%, kā arī trīs dažādu devu (0,1%, 0,3% un 0,5%) *Chlorella vulgaris* biomasas ietekmi uz divu dažāda vecuma vistu organismu, olu ražošanu, olu svaru un olu uzturvērtību.

Īsi pār pētījumā izmantotajiem materiāliem un metodiku.

Pētījumā tika izmantotas vistas *Lohmann Brown*, kas LBTU Veterinārmedicīnas fakultātē Klīnisko pētījumu centrā tika ievestas 2024.gada 1.maijā kā 27-28 nedēļas vecas (nosacīt jaunās) un 47-48 nedēļas vecas (nosacīti vecās) mājas dējējvistas (*Gallus gallus domesticus*). Vistas tika nosvērtas un pēc nejaušības principa sadalītas četrās jauno vistu grupās un četrās veco vistu grupās. Lai varētu kvalitatīvāk sekot putnu veselības stāvoklim un svara izmaiņām, katra grupa tika sadalīta vēl trijās apakšgrupās (katrā apakšgrupā pa 7 putniem), ar dzīvniekiem nekaitīgu krāsu iekrāsojot asti, muguru vai spārnu.

Turēšanas apstākļi. Mikroklimata rādītāji.

Turēšanas apstākļi tiek kontrolēti un fiksēti vismaz 3 reizes dienā. Gaisa temperatūra svārstās no 18-27 °C, vidēji 22,9±1,9 °C visu astoņu grupu telpās.

Gaisa mitrums visas dienas un nakts garumā vidēji 53±6,6 %, pēc telpu uzkopšanas un ūdens trauku nomaiņas uz 1-1,5 stundām paaugstinājās maksimāli līdz 70%.

Gaismas režīms – atbilstoši diennakts ritmam Latvijā maijā-jūlijā, tika nodrošināts nakts režīmu vismaz 8 stundas diennaktī. Tā kā telpai tikai vienā sienā bija logi, pa kuriem ieplūda dienas gaisma, tad apgaismojuma izlīdzināšanas nolūkā papildu apgaismojums tika ieslēgts 7:00 no rīta un izsegts 20:00 vakarā.

Ēdināšana.

Pirmās 10 dienas turpināja ēst vistu pārdevēja līdzīgu iedoto barību un nemainot tās devu - 100g/vistu. Novērojām, ka tiek izēsta visa piedāvātā deva. Turpmāk 3 dienas notiek pakāpeniska (miksējot attiecīgi: 2/3+1/3; 1/5+1/5; 1/3+2/3) barības pāreja uz Baltic Agro (kopproteīna daudzums 18,9%) "Pilnvērtīgu barību dējējvistām", saglabājot devu 150g/vistu katrā grupā. Vērojot vistas turpmākās dienas, konstatējām, ka šī barība vistām negaršo (tika apēsti ne vairāk kā 60% no piedāvātā daudzuma, bet vistu uzvedība liecināja, ka tās ir izsalkušas, tāpēc tika veikta atkārtota barības maiņa uz Dobeles ražoto "Pilnvērtīga barība dējējvistām", (miksējot attiecīgi: 2/3+1/3; 1/5+1/5; 1/3+2/3). Šo barību piedāvājām 150 g/vistu.

Īsi par barības sastāvu: kukurūza, kvieši, saulgriežu spraukumi, kalcija karbonāts, sojas spraukumi (GMO), melase, rapšu eļļa, monokalcija fosfāts, nātrija sulfāts, nātrija hlorīds.

Analītiskie komponenti: Kopproteīns - 15,1%, Kopšķiedra - 5,31%, Fosfors - 0,5%, Koppelni - 13,72%, Koptauki - 3,98%, Lizīns - 0,75%, Nātrijs - 0,16%, Kalcijs - 3,9%, Metionīns - 0,39%.

Barības piedevas: Vitamīns A (3a672a) - 10000 i.v, Vitamīns D3 (3a671) - 3200 i.v, Vitamīns E (3a700) - 75 mg, Dzelzs (3b103 dzelzs (II) sulfāts monohidrāts) - 60 mg Cinks (3b603 cinka oksīds) - 100 mg, Mangāns (3b502 mangāna (II) oksīds) - 100 mg, Varš (3b405 vara (II) sulfāts pentahidrāts) - 15 mg, Jods (3b202 kalcija jodāts anhidrīts) - 1,8 mg, Selēns (3b801 nātrija selenīts) - 0,3 mg, Butilēts hidroksitoluols (E321) - 9,71 mg, Butilhidroksianizols (1b320) - 3,24 mg, Propilgalāts (E310) - 0,65 mg.

Adaptācijas perioda laikā, kas barības maiņas dēļ ilga trīs nedēļas, uzskaitījām dienā izdēto olu daudzumu, sekojām putnu veselības stāvoklim, mainījām putnu atrašanās grupas un/vai izolējam tos, ja bija tāda nepieciešamība (veselības stāvokļa dēļ, uzvedības korekcijai (dominēšana vai savstarpējās cīņas) u.c. Pēc triju nedēļu adaptācijas perioda tika noslēgta pētījumu grupu formēšana, izveidojot 8 dējējvistu grupas, katrā grupā iekļaujot 21 putnu. 24.maijā pie barības sākam pievienot mikroaļģes - no šīs dienas sākas eksperiments. Jauno vistu grupā putni bija sasnieguši 30 bet veco vistu grupā 50 nedēļu vecumu.

Dienā divas reizes tika mainīts ūdens un tika iebērts paredzētais barības daudzums (visās grupās vienāds barības daudzums, aprēķinot uz vienu putnu), pievienojot vai nepievienojot atbilstošo aļģu biomasas daudzumu. Nedēļā vienu reizi tika noteikts neapēstās barības svars barības silēs, uzskaitot to katras grupas ietvaros.

Sākot pētījuma eksperimentālo daļu, jaunākajām (30 nedēļas vecajām) vistām (turpmāk tekstā tās nosacīti sauksim “jaunās”) pie barības pievienojām trīs dažādas mikroaļģu sugas, iekļaujot arī jaunu, līdz šim dējējvistām neizpētīto *Dunaliella salina*. Pēc pievienotās mikroaļģes sugas nosaukuma veidojām arī pētījuma grupu saīsinātos nosaukumus:

1. Tikai pamatbarība – kontroles grupa (CON1)
2. Pamatbarība + 0,5% *Chlorella vulgaris* (CV5₁)
3. Pamatbarība + 0,5% *Spirulina platensis* (SP5)
4. Pamatbarība + 0,5% *Dunaliella salina* (DU5)

Tā kā viens no pētījuma mērķiem bija atrast mazāko optimālo mikroaļģu devu kas uzlabotu ne tikai iegūtās produkcijas (olu) uzturvērtību, bet arī paildzinātu vistu dēšanas ilgumu, tad vecāko vistu grupai, kas uz eksperimenta sākumu bija 50 nedēļas vecas (nosacīti sauksim “vecās”) pie barības pievienojām trīs dažādas *Chlorella vulgaris* devas, tā veidojot grupu nosaukumus:

1. Tikai pamatbarība – kontroles grupa (CON2)
2. Pamatbarība + 0,1% *Chlorella vulgaris* (CV1)
3. Pamatbarība + 0,3% *Chlorella vulgaris* (CV3)
4. Pamatbarība + 0,5% *Chlorella vulgaris* (CV5)

Veiktie izmeklējumi.

Nepārtraukti sekojām putnu uzvedības izmaiņām, veselības stāvoklim. Katru dienu tika fiksēts izdēto olu skaits, svars. Olu svara vērtēšanai izmantojām vispārpieņemto standartu: S<52 g, M – 53-62 g, L – 63-72 g, XL – 72 g.

Lai sekotu veselībai, ik pēc 4 nedēļām tika noteikts katra putna svars. Pētījuma noslēgumā eitanāzijas laikā tika iegūti paraugi asins bioķīmiskajām un hematoloģiskajām analīzēm, kā arī

fekāliju izmeklējumiem. Pēc putnu eitanāzijas tika noteikts to svars un veikta pilna pataloganatomiskā sekcija, iegūstot orgānu paraugus vēlākai histoloģiskai izmeklēšanai.

Rezultāti.

Analīzi sāksim ar mikroaļģu *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* un *Spirulina vulgaris* ietekme uz vīstu organismu un veselības stāvokli laboratorijas apstākļos. Rezultātu analīzē iekļausim izmeklējumus, kuriem bija būtiska statistiskā un/vai bioloģiskā nozīme projekta uzdevumu izpildē un rezultātu analīzē.

Asins paraugu izmeklēšanas rezultāti.

Analizējot hematoloģiskos parametrus, konstatējām būtiskas atšķirības leukocītu un trombocītu skaitā starp grupām ($p < 0,05$). Tomēr analizējot un salīdzinot leukocitārās formulas atsevišķus rādītājus būtiskas atšķirības netika konstatētas.

Iegūtie rezultāti par to, kā dažādu mikroaļģu biomasas pievienošana barībai ietekmēja jauno dējējvīstu hematoloģiskos rādītājus, ir apkopoti 12.12. tabulā.

Chlorella vulgaris (CV51), *Spirulina platensis* (SP5), un *Dunaliella salina* (DU5)
 ietekme uz jauno dējējvistu hematoloģiskajiem rādītājiem, pievienojot
 biomasu pie dējējvistu barības (deva 0,5%).

Rādītāji (mērvienība)	Jauno vistu grupas							
	Con1		CV51		DU5		SP5	
	vid	stan.n.	vid	stan.n.	vid	stan.n.	vid	stan.n.
Leikocīti (10 ⁹ /l)	27,4 ^{a*}	7,23	21,9 ^a	4,76	22,0 ^a	5,25	23,7	7,54
Heterofilie (%)	42,2	8,11	44,2	6,38	51,2	9,96	130,6	188,33
Eozinofilie (%)	1,2	1,30	1,2	1,10	2,2	1,30	0,8	0,45
Bazofilie (%)	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Monocīti (%)	7,2	1,79	7,2	2,17	5,8	2,49	6,6	3,85
Limfocīti (%)	49,2	8,93	47,4	7,50	40,8	7,76	46,2	9,52
Trombocīti (10 ⁹ /l)	88,1 ^b	21,47	60,6 ^b	7,54	75,6	17,74	72,9	11,05
PCV (%)	28,2	0,75	27,6	2,06	28,2	0,75	26,4	0,80
H/L attiecība	0,86		0,93		1,25		2,83	

*Vienādi burti pie rezultātiem nozīmē, ka šie rādītāji savstarpēji būtiski atšķiras (vismaz ar $p < 0,05$; 95%)

Konstatējām, ka leikocītu skaitā starp grupām ir būtiskas atšķirības ($p > 0,05$). Būtiski augstāks leikocītu skaits bija kontroles grupas (Con1) putnu asins paraugos ($27,4 \pm 7,22 \cdot 10^9/l$), salīdzinot ar CV51 un DU5, kā arī augstāks nekā SP5 grupas asins paraugos. Trombocītu skaitam tika konstatētas būtiskas atšķirības ($p > 0,05$) starp CV5 grupas kontroles grupas (Con1) putnu asins paraugiem, bet arī DU5 un SP5 grupās to skaits bija zemāks nekā Con1 putniem. Jāatzīmē, ka hematokrīts (PCV, jeb asins šūnu daudzums, %) visās grupās bija ļoti līdzīgs (skat. 13.12. tab.), kas izslēdz piem., dehidratācijas ietekmi un leikocītu un trombocītu skaita atšķirībām.

Noslēgumā aprēķinājām heterofīlo leikocītu un limfocītu attiecību (H/L attiecība), Heterofīli-limfocīti (H/L) attiecība ir putnu hematoloģijā plaši lietots imūnoloģisks un stresa biomarkieris, īpaši dējējvistām (Gross and Siegel, 1983). Pierādīts, ka vistas, kurām selekcionēta zemāka H/L attiecība, parāda labāku adaptāciju pret stresa faktoriem (Campo et al., 2008). Atgādināsim, ka gadījumos, kad šīs attiecības vērtība ir mazāka par 0,5, tas liecina par normāliem apstākļiem bez stresa, vērtība no 0,5-1,0 liecina par vieglu līdz vidēji stipru stresa stāvokli, bet

vērtības no 0,8-1,0 parāda, ka dzīvniekiem ir fizioloģisks stress vai imūnsistēmas kairinājums, bet virs 1,5-2,0 vai augstāka - spēcīgs imunoloģisks vai hormonāls stress (Gross and Siegel, 1983).

Jauno vistu asinīs konstatētā H/L attiecība liecina, ka kontroles un mikroaļģes *C.vulgaris* (0,5%) grupai (CV51) ir zemākais stresa līmenis, kas atbilst vieglam stresam. Savukārt DU5 un SP5 grupu asins analīzes liecina par spēcīgu stresu. Jāatzīmē, ka, lai gan visām vistām bija vienādi turēšanas apstākļi, tomēr grupas DU5 un SP5 atradās vistuvāk ārdurvīm un logam un varēja tikt pakļautas ārējiem stresa faktoriem vairāk nekā CV51 un Con1.

Izmeklējot vecāko dējējvistu grupu, leukocītu skaita izmaiņas parādīja atšķirīgu reakciju uz mikroaļģes *Chlorella vulgaris* biomasas dažādu devu pievienošanu dējējvistu barībai, iegūtos rezultātus apkopojām 13.13.tabulā.

Konstatējām, ka, pievienojot vistu barībai trīs dažādas *C. vulgaris* devas, leukocītu šajās grupas bija lielāks, nekā kontroles grupas asins paraugos. Būtiski ($p > 0,05$) augstāku leukocītu daudzumu konstatējām CV3 grupu asins paraugos, salīdzinot ar Con1 grupas putniem (attiecīgi $28,9 \pm 9,17$ un $21,9 \pm 3,29 \cdot 10^9/l$). Trombocītu skaitam tika konstatētas būtiskas atšķirības ($p > 0,05$) starp CV5 grupas kontroles grupas (Con1) putnu asins paraugiem, bet arī DU5 un SP5 grupās to skaits bija zemāks nekā kontroles grupas (Con1) putniem. No leukocītu veidiem, monocītu skaits CV3 grupas asinīs bija būtiski ($p > 0,05$) lielāks nekā CV1 un CV5 putnu asins paraugos.

Chlorella vulgaris ietekme uz vecāko dējējvistu hematoloģiskajiem rādītājiem,
pievienojot pie dējējvistu barības dažādas biomasas devas
(0% (Con2); 0,1% (CV1); 0,3% (CV3); 0,5% (CV5)).

Rādītāji (mērvienība)	Veco vistu grupas							
	Con2		CV1		CV3		CV5	
	vid	stan.n.	vid	stan.n.	vid	stan.n.	vid	stan.n.
Leikocīti ($10^9/l$)	21,9 ^a	3,29	24,2	8,99	28,9 ^a	9,17	22,1	2,59
Heterofilie (%)	45,0	4,30	56,4	22,50	45,6	7,27	48,6	5,77
Eozinofilie (%)	1,8	1,30	1,8	3,49	2,6	2,07	1,2	1,64
Bazofilie (%)	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Monocīti (%)	9,4	3,65	4,0 ^b	2,12	11,2 ^b	6,02	5,8 ^b	2,17
Limfocīti (%)	43,8	2,28	37,8	21,30	40,6	12,97	44,4	4,04
Trombocīti ($10^9/l$)	71,4	17,51	66,9	29,33	79,8	26,20	75,3	17,34
PCV (%)	26,8	1,10	22,2	7,92	27,4	2,07	27,6	1,14
H/L attiecība	1,03		1,49		1,12		1,09	

*Vienādi burti pie rezultātiem nozīmē, ka šie rādītāji savstarpēji būtiski atšķiras (vismaz ar $p < 0,05$; 95%)

Jāatzīmē, ka hematokrīts (PCV, jeb asins šūnu daudzums, %) starp grupām būtiski neatšķīrās (skat. 12.13. tab.), kas izslēdz piem., dehidratācijas ietekmi un leikocītu, monocītu un trombocītu daudzuma atšķirībām.

Attiecībā uz heterofilu un limfocītu attiecību (skat. 12.13. tab.), jāatzīmē, ka, vadoties no šīs attiecības analīzes, visām veco dējējvistu grupām ir zemākais stresa līmenis, kas atbilst vieglam stresam. Atgādināsim, ka šīm vistām kā barības piedeva tika pievienota *C.vulgaris* piedeva, kas arī jaunāko vistu grupā izrādīja augstāko stresa izturību.

Leikocītu skaits dējējvistu asinīs ir būtisks imūnsistēmas veselības rādītājs, un to izmaiņas signalizē par dažādiem fizioloģiskiem stāvokļiem — imunoloģisko reakciju, stresa pakāpi vai infekciju. Pētījumi ar *Lohmann Brown* šķirnēm rāda, ka inkubācijas laikā limfocītu, bet īpaši T-limfocītu, skaits vistām intensīvas dēšanas laikā būtiski samazinās, kaut gan nepieciešamība pēc šīs iedzimtās aizsardzības sistēmas palielinās (Schmucker et al., 2021). Autori to skaidro ar pāreju no specifiskas adaptīvās imūnreakcijas uz plašāk orientētu humorālo un iedzimto imūnreakciju, kas var ietekmēt dējējvistas imūnkompetenci, veselību un produktivitāti. Mūsu pētījuma ietvaros vistām, kuras saņēma *C.vulgaris* leikocītu skaits dēšanas laikā nesamazinājās, bet gan pieauga.

Monocītiem dējējvistu organismā ir liela nozīme – tās ir dinamiski aktīvas šūnas ar plašu funkciju spektru: fagocitozi, citokīnu ražošanu, antigēnu prezentāciju, imūnās atmiņas veidošanu, kā arī būtisku lomu selekcijā un veselības uzturēšanā. Izpētīts, ka dējējvistām monocītu skaits var tikt paaugstināts ar imūnsistēmas stimulāciju, kā rezultātā tiek uzlabotas organisma imūnās reakcijas, tai skaitā pretestība pret patogēniem. Monocītu skaita izmaiņas var būt arī kā reakcija uz vakcināciju vai izmainītu barības sastāvu (Ma et al., 2010; Verwoolde, et al., 2020). Šis rādītājs tiek uztverts kā marķieris slimību izturībai un vispārējai veselībai (Ma et al., 2010).

Trombocīti nav tikai asins šūnas, kas nodrošina hemostāzi (asinsreci), tie darbojas arī kā aktīvas imūnšūnas. Tie ir spējīgi atpazīt patogēnus ar īpaša TLR receptora palīdzību un izdalīt pro- un pretiekaisuma citokīnus (piemēram, IL-1 β , IL-6, TGF- β). Tiem ir novērota baktēriju – piemēram, *Salmonella* un *E. coli* piesaistes spējas, ko skaidro ar iespējamo šo baktēriju fagocitozi. Trombocītu skaita izmaiņas var atspoguļot imūno atbildi, stresa stāvokli vai pat slēptu veselības traucējumu. (St Paul et al., 2012).

Ietekme uz dējējvistu produktivitāti laboratorijas apstākļos.

Lai izpētītu izbaroto mikroaļģu ietekmi uz jauno vistu produktivitāti, vispirms tika aprēķināts vidējais producēto olu skaits grupā dienā, dējība uz vienu vistu dienā un vienas olas vidējā masa kontroles grupā (CON1), *Chlorella vulgaris* 0,5% grupā (CV5₁), *Dunaliella salina* 0,5% (DU5) un *Spirulina vulgaris* 0,5% (SP5) grupās. Iegūtie rezultāti ir apkopoti 12.14. tabulā.

12.14. tabula

Mikroaļģu *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* un *Spirulina vulgaris* izbarošanas ietekme uz jauno vistu produktivitāti.

Grupa	Producēto olu skaits grupā dienā ($\bar{x} \pm SD$)	Dējība dienā uz 1 vistu ($\bar{x} \pm SD$)	1 olas vidējā masa, g ($\bar{x} \pm SD$)
CON1	17,89 $\pm$ 3,26	0,85 $\pm$ 0,16	65,88 $\pm$ 4,16
CV5 ₁	17,36 $\pm$ 3,32 ^a	0,84 $\pm$ 0,16 ^{bc}	66,40 $\pm$ 3,91
DU5	18,46 $\pm$ 3,20 ^a	0,87 $\pm$ 0,15 ^c	65,57 $\pm$ 2,70
SP5	19,25 $\pm$ 2,26	0,92 $\pm$ 0,11 ^b	66,05 $\pm$ 2,99

Vidējais producēto olu skaits grupā dienā statistiski nozīmīgi atšķīrās (p=0,011). Visaugstākais olu skaits tika konstatēts *Spirulina* 0,5% (SP5) grupā (19,25 $\pm$ 2,26), savukārt

viszemākais – *Chlorella vulgaris* 0,5% (CV51) grupā ($17,36 \pm 2,32$). Lai arī rezultāts atšķiras, šī atšķirība nav statistiski būtiska. Bet DU5 grupā (*Dunaliella* 0,5%) novērots statistiski nozīmīgi lielāks olu skaits salīdzinājumā ar CV51 ($p=0,007$), kas norāda uz pozitīvu *Dunaliella* ietekmi uz olu produkciju.

Tāpat tika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības arī dējībā uz vienu vistu dienā ($p=0,011$). SP5 grupā fiksēta visaugstākā dējība ($0,92 \pm 0,11$), bet CV51 – zemākā ($0,84 \pm 0,16$). DU5 grupas dējības rādītājs ($0,87 \pm 0,15$) bija statistiski nozīmīgi augstāks nekā CV51 grupai ($p=0,007$), kas vēlreiz apstiprina *Dunaliella* 0,5% pozitīvo ietekmi uz olu ražību.

Savukārt vienas olas vidējais svars būtiski neatšķīrās starp grupām ($p=0,678$), svārstoties robežās no $65,57 \pm 2,70$ g DU5 grupā līdz $66,40 \pm 2,91$ g CV51 grupā. Lai arī šie rezultāti norāda, ka mikroaļģu izbarošana būtiski neietekmēja olas masu, tomēr vistām sākot dēt, lielas olas (XLvirs 72 g) nav vēlams. Visu grupu izdēto olu vidējais svars atbilda “L” olu kategorija, tomēr jāatzīmē, ka atsevišķas CV51 un SP5 grupu vistu izdētās olas to pārsniedza, par ko liecina vidējā olu svara ($\bar{x}$) izkliedes rādītājs ($\pm SD$). Šādu lielu olu izdēšana jaunajām vistām var būt apgrūtināša un var veicināt olvadu izkritumus un traumas. Optimāls jauno vistu olu izmērs un svars atbilst “izmēra” olai, kas bija raksturīgs *Dunaliella* un kontroles grupām.

Varam secināt, ka *Dunaliella* un *Spirulina* 0,5% pievienošana pie barības pozitīvi ietekmēja jauno vistu dējību un producēto olu skaitu, savukārt *Chlorella vulgaris* pievienošana neuzrādīja būtisku pozitīvu efektu. Olu masa visās grupās statistiski neatšķīrās un atbilda vairumā gadījumu L, retāk XL izmēram. Tomēr kontroles un *Dunaliella* grupas vistām tas vairumā gadījumu atbilda L izmēram, kas ir piemērots un optimāls olu lielums jaunajām vistām.

Lai noskaidrotu mazāko mikroaļģu biomasas devu, kas sniegtu vēlamus rezultātus (uzlabotu vistu veselības stāvokli, produktivitāti, olu uzturvērtību, kā arī paildzinātu dējību), vecākajām vistām, kuras uz eksperimenta sākšanās brīdi bija sasniegušas 50 nedēļu vecumu, pie barības tika pievienotas trīs dažādas mikroaļģes *Chlorella vulgaris* dažādu devas: 0,1%, 0,3% un 0,5% no izēdinātās barības.

**Mikroaļģes *Chlorella vulgaris* biomasas dažādu devu
(0,1%, 0,3%, 0,5%) izbarošanas ietekme uz veco vistu produktivitāti**

Grupa	Producēto olu skaits grupā dienā ($\bar{x} \pm SD$)	Dējība dienā uz 1 vistu ($\bar{x} \pm SD$)	1 olas vidējā masa, g ($\bar{x} \pm SD$)
CON2	16,63 ± 2,42	0,79 ± 0,12	65,21 ± 5,59
CV1	16,07 ± 1,37	0,79 ± 0,09	64,44 ± 4,73
CV3	17,02 ± 2,45	0,84 ± 0,11	63,75 ± 6,65
CV5	18,27 ± 1,98	0,91 ± 0,11	67,36 ± 10,72

Visaugstākais producētais olu skaits grupā dienā tika konstatēts *Dunaliella* 5% (DU5) grupā (19,25±2,26), savukārt viszemākais – *Chlorella vulgaris* (CV5₁) grupā (17,36±2,32) un šī atšķirība bija arī statistiski būtiska.

Tāpat tika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības arī dējībā uz vienu vistu dienā. DU5 grupā fiksēta visaugstākā dējība (0,92±0,11), bet CV5₁ – zemākā (0,84±0,16), (p=0,013), kas vēlreiz apstiprina *Dunaliella* 0,5% pozitīvo ietekmi uz olu ražību.

Savukārt vienas olas vidējā masa būtiski neatšķīrās starp grupām (p=0,678), svārstoties robežās no 65,57±2,70 g SP5 grupā līdz 66,40±2,91g CV5₁ grupā, kas norāda, ka mikroaļģu izbarošana neietekmēja olas masu, neskatoties uz to ietekmi uz dējības intensitāti

Varam secināt, ka kopumā rezultāti liecina, ka *C. vulgaris* pievienošana barībā, īpaši CV5 koncentrācijā, var veicināt veco vistu dējību un kopējo olu ražošanu, būtiski neietekmējot olu masu.

Lai papildinātu iegūto datu ko pu par mikroaļģu ietekmi uz vistu produktivitāti kopumā, veicām savstarpējo krustenisko salīdzināšanu arī starp jauno un veco vistu grupām (skat 13. un 14. tabulu). Iegūtie rezultāti parādīja, ka producēto olu skaits dienā starp atsevišķām grupām būtiski atšķīrās (p<0,001). Ieguvām rezultātus, kas parādīja, kuras grupas uzrādīja augstāku producēto olu skaitu un ar kādu ticamības pakāpi šī atšķirība bija būtiska

Visaugstākais producēto olu skaits dienā tika konstatēts DU5 grupā (19,25±2,26), un tas būtiski pārsniedza vairākas citas grupām.:

- DU5 > CON2 (p<0,001)
- DU5 > CV1 (p<0,001)

- DU5 > CV3 ($p < 0,001$)
- DU5 > CV5₁ ($p = 0,003$)

Līdzīgas tendences producēto olu skaita dienā novērotas arī SP5 ($0,92 \pm 0,11$) un CV5 ($0,91 \pm 0,11$) grupās, kuru rādītāji bija būtiski lielāki par:

- SP5 > CON2 ($p = 0,005$)
- SP5 > CV1 ($p < 0,001$)
- CV5 > CON2 ($p = 0,021$)
- CV5 > CV1 ($p < 0,001$)
- CON1 > CV1 ($p = 0,006$)

Šie rezultāti par producēto olu skaita norāda, ka *Spirulina* (SP5) un *Dunaliella* (DU5) piedevas, kā arī lielāka *Chlorella vulgaris* deva (CV5), pozitīvi ietekmē olu ražošanu salīdzinājumā ar kontroles grupām un zemākām *Chlorella vulgaris* devām.

Arī dējība uz vienu vistu būtiski atšķīrās starp grupām ($p < 0,001$). DU5 grupā šis rādītājs bija visaugstākais ($0,92 \pm 0,11$), un tas būtiski pārsniedza:

- DU5 > CON2 ($p < 0,001$)
- DU5 > CV1 ($p < 0,001$)
- DU5 > CV5₁ ($p = 0,013$)
- DU5 > CV3 ($p = 0,028$)

Dējība bija būtiski augstāka, salīdzinot arī sekojošās pētījumā iekļautās grupas:

- CV5 > CON2 ($p < 0,001$),
- CV5 > CV1 ($p < 0,001$)
- SP5 > CON2 ($p = 0,021$),
- SP5 > CV1 ($p = 0,022$)

Šie dati atspoguļo līdzīgu tendenci kā to novērojām olu skaita rādītājos – dējība ievērojami uzlabojās ar noteiktu mikroaļģu piedevām barotās grupās, īpaši DU5 un CV5 grupās.

Vienas olas vidējā masa starp grupām būtiski neatšķīrās ($p = 0,103$). Visi vidējie rādītāji bija salīdzinoši līdzīgi, svārstoties no $62,75 \pm 6,65$ g (CV3) līdz $67,36 \pm 10,72$ g (CV5), norādot, ka mikroaļģu pievienošana būtiski neietekmēja olas masu.

Iegūtie dati liecina, ka *Dunaliella* (DU5), *Spirulina* (SP5) un *Chlorella vulgaris* (CV5) pievienošana barībai pozitīvi ietekmēja olu produkciju un dējību visa pētījuma perioda laikā tad, kad tās pie barības saņēma aļģu biomasu (t.i jaunajām vistām no 30. līdz 38. nedēļu vecumam, vecajām no 50 līdz 58 nedēļu vecumam). Rezultātus salīdzinājām gan ar kontrolgrupām, gan zemākām *Chlorella* devām. Vienlaikus šīs izmaiņas neietekmēja olas vidējo masu. Šādi rezultāti norāda uz potenciālu šo mikroaļģu pielietojumu putnkopībā ražības veicināšanai.

Tomēr mūs interesēja, kā mainījās dējības rādītāji astoņu nedēļu laikā, kad dējējvistas saņēma barības piedevas. Tāpēc aprēķinājām vidējo dējības intensitāti katrā pētījuma nedēļā. Lai izvērtētu, kā mikroaļģu biomasas izbarošana pētījuma astoņu nedēļu laikā ietekmē dažāda vecuma (jaunās vistas no 30. līdz 38. un vecās vistas no 50. līdz 58. nedēļu vecumā), visas astoņas vistu grupas salīdzinājām grupas savā starpā.

12.16. tabula

Dažādu mikroaļģu sugu biomasu izēdināšanas ietekme uz dējības intensitāti dažāda vecuma dējējvistām astoņās pētījuma nedēļās.

Grupa	Vidējā dējības intensitāte (%)								Vidējā dējības intensitāte (%)
	1.ned.	2.ned.	3.ned.	4.ned.	5.ned.	6.ned.	7.ned.	8.ned.	
CON1	56,46	71,43	79,59	91,16	95,92	97,28	97,28	92,52	85,20
CV5 ₁	51,02	69,39	85,71	91,16	91,16	91,16	94,32	95,71	83,70
SP5	64,63	73,47	80,27	93,88	93,88	97,28	102,04	92,10	87,19
DU5	78,23	81,63	90,48	99,32	99,32	97,28	95,92	94,35	92,07
CON ₂	78,91	65,99	72,11	80,27	80,95	81,63	87,76	85,71	79,17
CV1	71,43	70,07	74,83	78,23	79,59	84,89	90,23	84,21	79,18
CV3	76,87	78,23	82,31	82,99	88,44	88,44	85,71	91,07	84,26
CV5	82,31	81,63	87,07	95,17	92,86	100,75	93,57	93,20	90,82

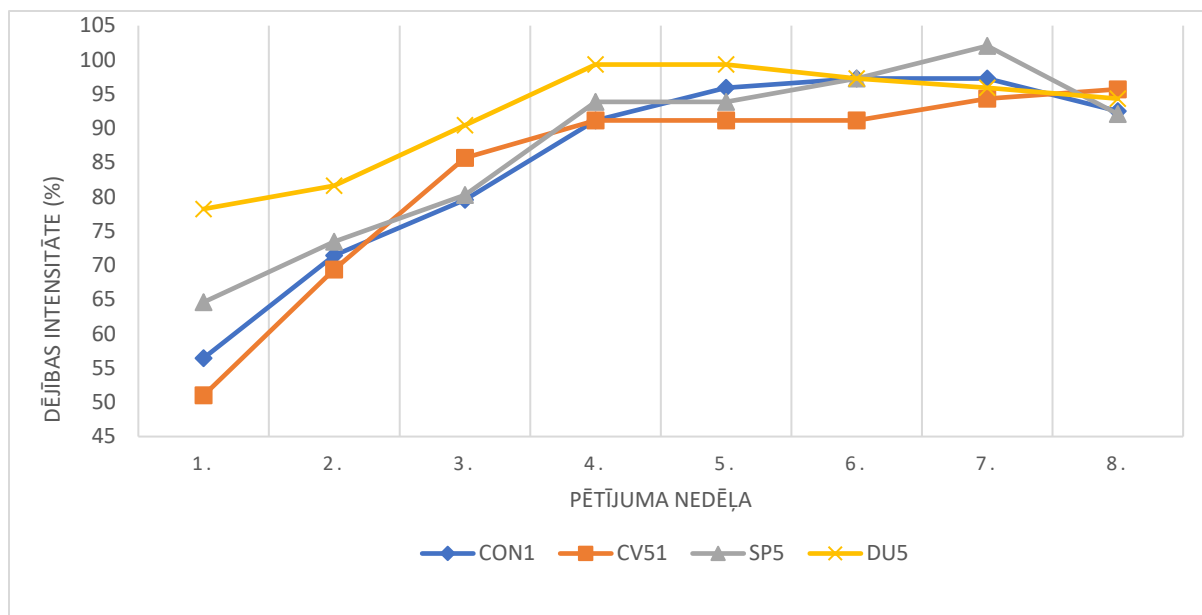
Vidējā dējības intensitāte (%) starp grupām bija atšķirīga (skat. 12.16. tab.). Sakārtojot to no lielākās uz mazāko, ieguvām sekojošu rindu:

1. DU5 – 92,07%

2. CV5 – 90,77%
3. SP5 – 87,19%
4. CON1 – 85,20%
5. CV5₁ – 83,70%
6. CV3 – 84,26%
7. CV1 – 79,18%
8. CON2 – 79,17%

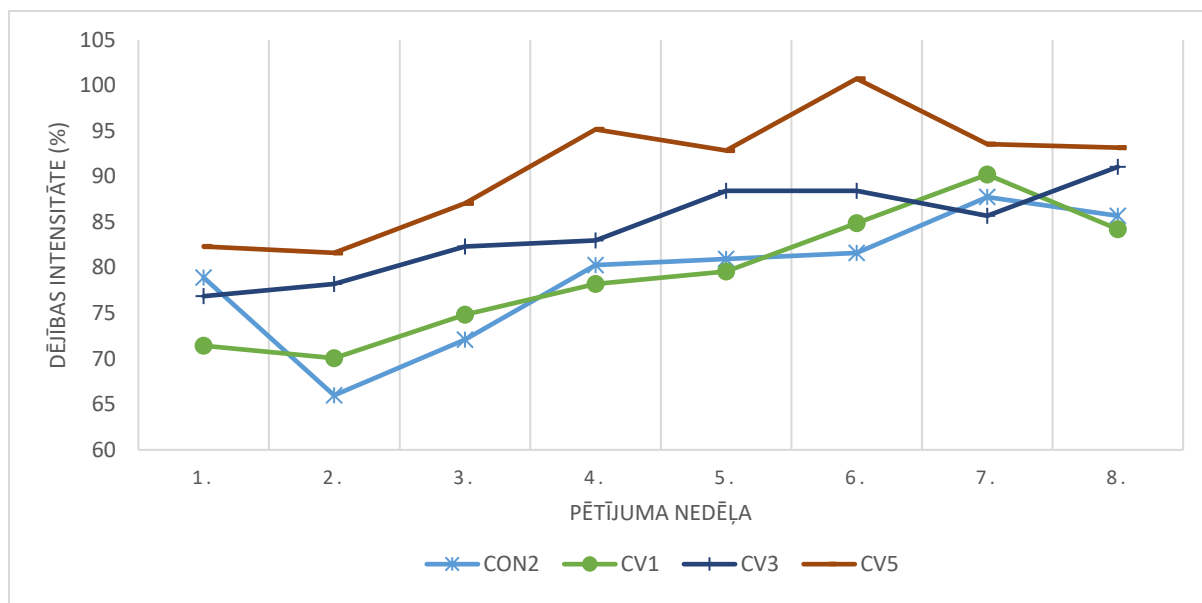
Redzam, ka augstākā vidējā dējības intensitāte bija jaunajām vistām, no kurām lielākā tā bija DU5 grupai, bet mazākā CV5₁ grupai, kas bija nedaudz zemākā nekā kontroles grupai (Con1). Starp veco vistu grupām grupai lielākā dējības intensitāte tika konstatētā CV5 grupai, kas pie barības saņēma lielāko *C.vulgaris* devu (0,5%) turklāt dējība bija augstāka nekā tādu pašu devu saņēmušo jauno vistu grupai. Zemākā dējības intensitāte veco vistu grupā bija kontroles grupai (Con2).

Mums interesēja ne tikai astoņu pētījuma nedēļu vidējā dējība intensitāte, bet arī tas, kā tā šajās astoņās nedēļās mainījās vidējā dējības intensitāti jauno vistu (no 30. līdz 38 ned.v.) grupās pētījuma nedēļu laikā (šī rādītāja izmaiņu dinamika). Lai tam vieglāk izsekotu, izveidojām divus grafiskus attēlus – jauno vistu grupu dējības intensitāte ir attēlotā 12.8. attēlā, bet veco vistu 12.9. attēlā.



12.8. attēls. Mikroaļģu ietekme uz grupas vidējo dējības intensitāti (%) jauno vistu (no 30. līdz 38 ned.v.) grupās (katras pētījuma nedēļas vidējie rādītāji).

Dati liecina, ka visu jauno vistu grupu dējība jauno vistu grupā uzrādīja stabili pozitīvu dinamiku (skat. 13.8. attēlu). Lai arī visās grupās rādītāji bija augoši, tomēr atsevišķās nedēļās starp grupām tika konstatētas statistiski nozīmīgas atšķirības (ANOVA $p < 0,001-0,012$), īpaši pētījuma pirmajā mēnesī, tas ir no 1. līdz 5. nedēļai ieskaitot. Tāpēc analīzi turpināsim katras nedēļas ietvaros.



12.9. attēls. Mikroaļģu ietekme uz grupas vidējo dējības intensitāti (%) veco vistu (no 50. līdz 58 ned.v.) grupās (katras pētījuma nedēļas vidējie rādītāji).

Rezultāti parāda, ka veco vistu grupā dējībai stabila augšupejoša tendence bija grupām, kuras pie barības saņēma *C. vulgaris*. Turklāt grupai, kura saņēma lielāko biomasas devu, dējības intensitāte bija augstāka nekā tā, kuras saņēma mazāku devu. Kontroles grupai otrajā nedēļā pēc pētījuma uzsākšanas novēroja dējības intensitātes kritumu, kas pakāpeniski paaugstinājās, divu nedēļu laikā sasniedzot pārējo grupu dējību.

Turpināsim analīzi, savstarpēji salīdzinot visu grupu (gan jauno, gan veco vistu) dējības intensitāti katras nedēļas ietvaros.

1. nedēļa. Konstatējām būtiskas atšķirības starp grupām ($p < 0,001$):

- Augstāko dējības intensitāti konstatējām DU5 grupai, turklāt šī atšķirība bija būtiski augstāka, salīdzinot ar pārējo grupu rezultātiem.
- CON1 (56,46%) bija ievērojami zemāka par DU5 (78,23%, $p = 0,012$), CON2 (78,91%, $p = 0,009$), CV3 (76,87%, $p = 0,023$) un CV5 (82,31%, $p = 0,001$).
- CV5₁ (51,02%) uzrādīja viszemāko dējības intensitāti un būtiski atpalika no DU5, CON2, CV1, CV3 un CV5 (visi $p < 0,001$ – $0,023$).

2. nedēļa. Būtiskas atšķirības ar $p = 0,012$:

- Augstāko dējības intensitāti konstatējām DU5 grupai (81,63%), kas būtiski pārsniedza kontroles grupas rādītājus (65,99%, $p = 0,042$).
- Arī CV5 grupas rādītāji (81,63%) bija augstāki par CON2 ($p = 0,042$).

3. nedēļa. Būtiskas atšķirības ar $p=0,002$:

- Augstāko dējības intensitāti konstatējām DU5 (90,48%) grupai, kas būtiski pārsniedza CV1 (74,83%, $p=0,020$) un CON2 (72,11%, $p=0,003$) grupu rādītājus.
- CV5 (87,07%) arī būtiski atšķīrās no CON2 ($p=0,031$).

4. nedēļa. Izteiktas starpgrupu atšķirības ($p<0,001$).

- Augstāko dējības intensitāti joprojām konstatējām DU5 (99,32%) grupas vistām, kuru sniegtie rezultāti būtiski atšķīrās no CON2 (80,27%, $p<0,001$), CV1 ($p<0,001$) un CV3 ($p=0,002$).
- Lai arī grupu CON1 (91,16%) un CV51 (91,16%) bija zemāka nekā DU5, lādējība bija būtiski lielāka CV1 (78,23%, $p=0,024$).
- SP5 (93,88%) būtiski pārsniedza CON2 ($p=0,015$) un CV1 ($p=0,003$).
- CV1 arī būtiski atšķīrās no CV5 ($p<0,001$) un CV3 ($p=0,041$).

5. nedēļa. Statistiski nozīmīgas atšķirības ($p<0,001$).

- DU5 (99,32%) būtiski atšķīrās no CON2 (80,95%, $p=0,004$) un CV1 (79,59%, $p=0,002$).
- CON1 (95,92%) pārsniedza CON2 ($p=0,034$) un CV1 ($p=0,015$).
- SP5 (92,88%) būtiski pārsniedza CV1 ($p=0,049$).

6. nedēļa. Mērenas starpgrupu atšķirības ($p=0,006$).

- CON2 (81,63%) bija būtiski zemāka par CV5 (100,75%, $p=0,017$), norādot uz *Chlorella* vulgaris pozitīvu efektu augstākā devā.

7. nedēļa. Būtiskas atšķirības ($p<0,001$).

- SP5 (102,04%) būtiski pārsniedza CON2 (87,76%, $p=0,005$), CV1 (90,23%, $p=0,035$) un CV3 (85,71%, $p<0,001$).
- CON1 (97,28%) atšķīrās no CV3 ($p=0,042$).

8. nedēļa. Atšķirības starp grupām nebija statistiski nozīmīgas ($p=0,122$), norādot uz izlīdzināšanos dējības intensitātē starp grupām šajā posmā.

Varam secināt, ka DU5 un SP5 grupas konsekventi uzrādīja augstāku dējības intensitāti salīdzinājumā ar kontroles un CV1, CV3 un CV5₁ grupām. Vairāk būtiskas atšķirības tika novērotas agrīnajos posmos (1.–5. nedēļa), bet vēlāk (8. nedēļā) rezultāti izlīdzinājās.

**Dažādu mikroaļģu sugu biomasu izēdināšanas ietekme
uz producēto olu skaitu dažāda vecuma dējējvistām astoņās pētījuma nedēļās.**

Grupa	Vidējais olu skaits							
	1.ned.	2.ned.	3.ned.	4.ned.	5.ned.	6.ned.	7.ned.	8.ned.
CON1	11,86 ± 0,90	15,00 ± 2,08	16,71 ± 0,76	19,14 ± 2,55	20,14 ± 1,07	20,43 ±0,79	20,43 ± 1,13	19,43 ± 1,62
CV5₁	10,71 ± 1,98	13,86 ± 1,57	18,00 ± 0,82	19,14 ± 1,57	19,14 ±1,22	19,14 ±0,90	19,00 ± 0,82	19,14 ± 1,07
SP5	13,57 ± 1,98	15,43 ± 2,76	16,86 ± 2,04	19,71 ± 1,80	19,71 ±0,76	20,43 ±1,72	21,43 ± 1,13	20,57 ± 2,07
DU5	16,43 ± 1,51	17,14 ± 2,19	19,00 ± 2,24	20,86 ± 1,35	20,86 ±1,58	20,43 ±1,72	20,14 ± 1,22	19,14 ± 1,68
CON2	16,57± 4,04	13,86 ± 1,57	15,14 ± 2,27	16,86 ± 0,69	17,00 ± 1,53	17,14 ± 2,12	18,43 ±0,98	18,00 ± 1,92
CV1	15,00 ± 1,63	14,71 ± 1,80	15,71 ± 1,38	16,43 ± 0,79	16,71 ± 0,49	16,86 ± 0,38	17,14 ± 0,90	16,00 ± 1,16
CV3	16,14 ± 1,86	16,43 ± 1,81	17,29 ± 1,80	17,43 ± 1,13	18,57 ±2,64	18,57 ± 3,87	17,14 ± 2,48	14,57 ± 1,27
CV5	17,29 ± 1,98	17,14 ± 1,57	18,29 ± 1,98	19,29 ± 1,11	16,71 ±2,69	19,14 ± 1,95	18,71 ± 1,50	19,57 ± 1,13

Analīzi sāksim ar producēto olu skaits pa nedēļām – dinamiskā analīzi.

Pētījuma laikā tika novērtēts vidējais producēto olu skaits dažādās grupās pa nedēļām, analizējot izmaiņas astoņu nedēļu laikā. Tika novērotas būtiskas atšķirības starp grupām vairākās nedēļās (ANOVA, $p < 0,001-0,012$), kas norāda uz atšķirīgu mikroaļģu piedevu ietekmi uz vistu dējību dažādos laika posmos (skat. 12.17.tab.).

1. nedēļa. Būtiskas atšķirības starp grupām ($p < 0,001$). CON1 grupa ($11,86 \pm 0,90$) uzrādīja būtiski augstāku olu skaitu salīdzinājumā ar CV3 ($p = 0,023$), CV5 ($p = 0,002$), DU5 ($p = 0,012$) un īpaši CV5₁ ($p < 0,001$). CON2 arī ievērojami pārsniedza CV5₁ ($p < 0,001$). CV5₁ bija būtiski zemāka nekā CV1 ($p = 0,023$), CV5 ($p < 0,001$) un DU5 ($p < 0,001$), norādot uz lēnāku sākotnējo pielāgošanos šajā grupā.

2. nedēļa. Statistiski nozīmīgas atšķirības ($p = 0,012$). DU5 un CV5 grupām bija būtiski augstāks olu skaits nekā CON2 (attiecīgi $p = 0,042$ katrā salīdzinājumā).

3. nedēļa. Būtiskas atšķirības ($p = 0,002$). CV5 ($18,29 \pm 1,98$) un DU5 ($19,00 \pm 2,24$) būtiski pārsniedza CON2 ($p = 0,031$ un $p = 0,004$). DU5 bija arī ievērojami augstāka nekā CV1 ($p = 0,020$).

4. nedēļa. Būtiskas atšķirības starp grupām ($p < 0,001$). CON2 uzrādīja būtiski zemāku olu skaitu nekā DU5 ($p < 0,001$) un SP5 ($p = 0,016$). CV1 bija ievērojami zemāka salīdzinājumā ar CON1, CV5, DU5, CV5₁ un SP5 (visi $p < 0,05$). CV3 grupa arī būtiski atpalika no DU5 ($p = 0,002$).

5. nedēļa. Starpgrupu atšķirības bija izteiktas ($p < 0,001$). DU5 būtiski pārsniedza CV1 ($p < 0,001$), CON2 ($p = 0,002$) un CV5 ($p < 0,001$). SP5 būtiski pārsniedza CV1 ($p = 0,031$) un bija līdzvērtīga CV5. CON1 uzrādīja augstākus rādītājus nekā CON2 ($p = 0,020$) un CV1 ($p = 0,008$).

6. nedēļa. Būtiskas atšķirības starp grupām ($p = 0,003$). CV1 joprojām būtiski atpalika no CON1, DU5 un SP5 ($p = 0,027$ katrā gadījumā), saglabājot vienu no zemākajiem rādītājiem.

7. nedēļa. Būtiskas starpgrupu atšķirības ($p < 0,001$). CV1 būtiski atšķīrās no vairākām grupām – CON1 ($p < 0,001$), DU5 ($p = 0,003$), SP5 ($p < 0,001$). CV3 uzrādīja kritumu un atšķīrās no DU5 ($p = 0,003$) un SP5 ($p < 0,001$). CV5 bija būtiski zemāka nekā SP5 ($p = 0,001$), bet CV5₁ arī atšķīrās no SP5 ($p = 0,033$).

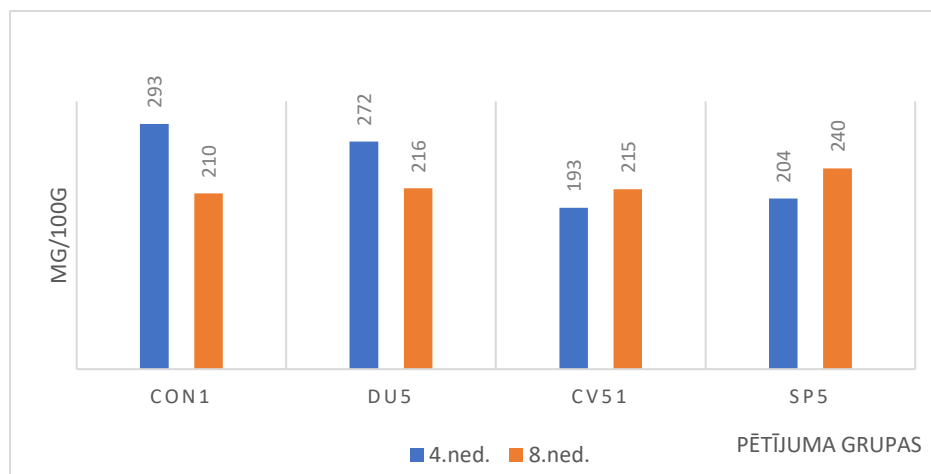
8. nedēļa. Būtiskas atšķirības ($p < 0,001$). CV1 uzrādīja ievērojami zemāku olu skaitu nekā CON1, CV5, CV5₁, DU5 un SP5 (visi $p < 0,01$). CV3 grupa uzrādīja izteiktu kritumu, būtiski atšķīroties no CV5, CV5₁, DU5 un SP5 (visi $p < 0,001$). CV1 un CV5 atšķīrās ($p = 0,002$), liecinot par devu atkarīgu efektu.

Kopsavilkumā varam teikt, ka datu analīze par olu skaitu pa nedēļām liecina, ka DU5 un SP5 grupas konsekventi uzrādīja vienus no augstākajiem olu skaita rādītājiem vairākās nedēļās. CV5₁ grupa pirmajās nedēļās uzrādīja viszemāko ražību, bet stabilizējās vēlāk. CV1 grupa bieži uzrādīja būtiski zemākus rezultātus nekā citas grupas, īpaši vēlākajās nedēļās. CV5 grupā novēroja labākus rezultātus nekā grupās, kuras saņēma zemākas *Chlorella vulgaris* devas, norādot uz iespējamu devas atkarību. Šie dati papildina vispārējo novērojumu, ka noteiktas mikroaļģu piedevas spēj ilgtermiņā veicināt dējību, bet efekts var būt atkarīgs no izmantotās sugas un devas.

Šī projekta ietvaros tika pētīta mikroaļģu biomasas pievienošanas ietekme dējējvistu barībai uz iegūto olu uzturvērtības rādītājiem.

Četrus nedēļu ilga mikroaļģu biomasas pievienošana dējējvistu barībai neietekmēja olu uzturvērtības rādītājus ne jauno, ne veco vistu grupās, salīdzinot ar kontroles grupu.

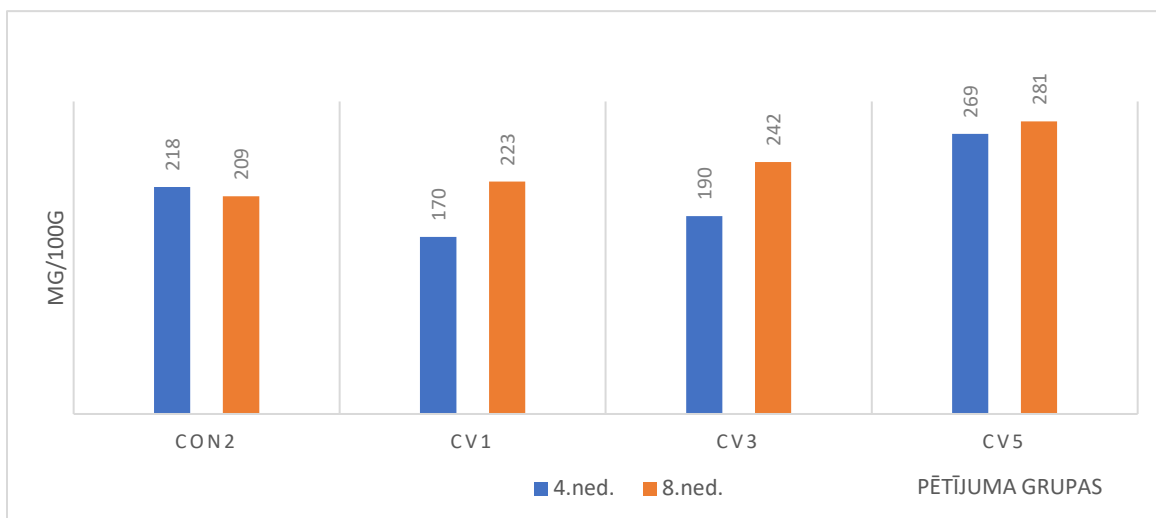
Ņemot vērā sākotnējo konstatējumu, turpmākajā analīzē koncentrējamies uz atsevišķiem, cilvēka uzturā nozīmīgiem parametriem: holesterīnu un omega-3, -6 un -9 taukskābēm. Šo parametru daudzums tika salīdzināts jauno un veco vistu grupās, pētījuma 4. un 8. nedēļā.



12.10. attēls. Mikroaļģu *Dunaliella salina* (DU5), *Spirulina paltensis* (SP5) un *Chlorella vulgaris* (CV51) biomasas izēdināšanas ietekme uz holesterīna daudzumu (mg/100g) jauno vistu (no 30. līdz 38 ned.v.) grupās 4 un 8. pētījuma nedēļā.

Pētījuma rezultāti atklāj, ka holesterīna saturs olās mainījās atkarībā no gan grupas, gan pētījuma ilguma. Kontroles grupā (CON1) tika novērots būtisks holesterīna samazinājums — no 293 mg līdz 210 mg/100 g olu masas, kas ir par 28,35%. Arī DU5 grupā holesterīna samazinājums bija, bet mērenāks — par 20,59%. Savukārt eksperimentālajās grupās CV51 un SP5 tika konstatēts holesterīna pieaugums, attiecīgi par 11,40% un 17,65%. Šīs atšķirības skaidri parāda, ka barības sastāvs un tās izmaiņas putnu uzturā var būtiski ietekmēt holesterīna saturu galaproduktā.

Apkopojot iegūtos datus, secināms, ka jauno dējējvistu kontrolgrupas olās holesterīna saturs pētījuma gaitā samazinājās, kamēr dažās eksperimentālajās grupās tas saglabājās stabils vai pat pieauga. Īpaši izteikts pieaugums novērots grupā, kuras barībai tika pievienots 0,5% *C. vulgaris* (CV5).



12.11. attēls. Mikroaļģes *C. vulgaris* dažādu devu (deva 0,1% (grupa CV1); 0,3% (CV3); 0,5% (CV5)) ietekme uz holesterīna daudzumu (mg/100g) veco dējējvistu (no 50. līdz 58 ned.v.) grupās 4 un 8. pētījuma nedēļā.

Pētījumā noteiktais holesterīna saturs veco vistu olās (4. un 8. nedēļā) atklāja atšķirīgas tendences starp kontroles un eksperimentālajām grupām (sk. 12.11. att.). Kontroles grupā (CON2) tika novērots neliels holesterīna samazinājums no 218 mg līdz 209 mg/100 g olu masas, kas ir 4,13%. Turpretim visās eksperimentālajās grupās (CV1, CV3, CV5) holesterīna daudzums palielinājās. Visnozīmīgākais pieaugums tika konstatēts CV1 grupā — par 31,18%, savukārt CV3 grupā holesterīna daudzums pieauga par 27,37%. Jāatzīmē, ka CV5 grupā šīs izmaiņas bija mērenākas, tomēr joprojām pozitīvas (+4,46%).

Eksperimentālo barības papildinājumu ietekme uz holesterīna akumulāciju olās liecina, ka izmantotie eksperimentālie barības papildinājumi veicināja holesterīna akumulāciju olās, īpaši CV1 un CV3 grupās, kuras saņēma 0,1% un 0,3% *C. vulgaris* biomasas devu. Tā kā olu holesterīna saturs ir viens no būtiskākajiem kvalitātes rādītājiem no cilvēka uztura viedokļa, šādas izmaiņas ir nozīmīgas, jo tās var ietekmēt olu potenciālo veselīgumu gala patērētājam.

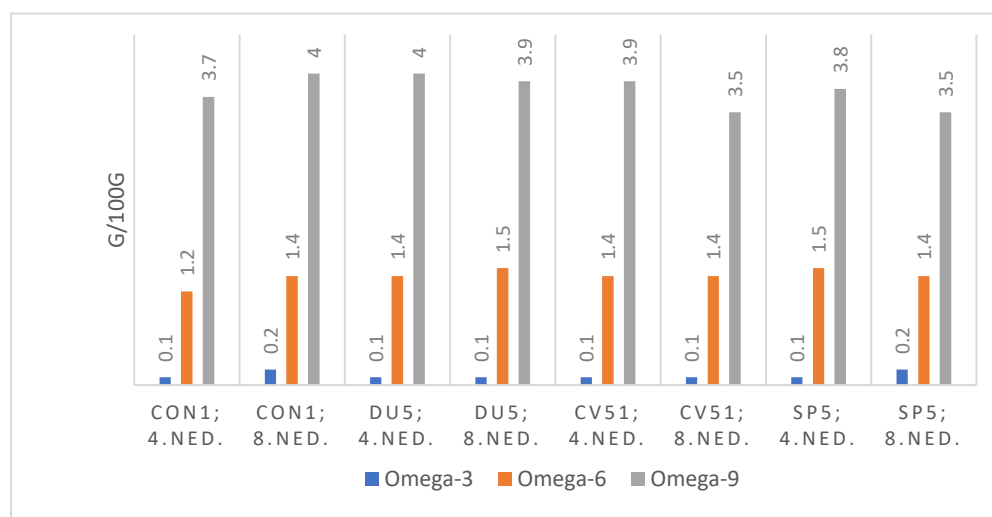
Tātad mikroaļģes *C. vulgaris* biomasas izēdināšana paaugstināja holesterīna saturu dējējvistu olās, neskatoties uz devu (0,1% (CV1); 0,3% (CV3); 0,5% (CV5)) un vistu vecumu (30-38. nedēļas un 50.-58. nedēļas).

Literatūrā vidējais holesterīna daudzums vienā olā tiek vērtēts no 141 mg līdz pat 234 mg, jeb 200–220 mg/100 g olu masas. Tas svārstās atkarībā no putnu šķirnes, barības un dējējvistu turēšanas apstākļiem.

Vēsturiski uztura vadlīnijas rekomendēja ierobežot holesterīna uzņemšanu līdz 300 mg dienā. Tomēr jaunākie pētījumi liecina, ka uztura holesterīns tikai nelielai daļai cilvēku būtiski ietekmē plazmas lipīdu sastāvu un veselību kopumā (Zachary S. Clayton et al., 2017; Rouhani et al., 2018). Tomēr pacientiem ar hiperlipidēmiju, 2. tipa cukura diabētu vai sirds un asinsvadu slimību risku holesterīna uzņemšana joprojām būtu jāregulē (Rouhani et al., 2018).

Tādējādi holesterīna saturs olās saglabā nozīmi produktu kvalitātes un mērķa patērētāju grupu izvērtējumā. SP5 grupas būtiskais holesterīna pieaugums var ierobežot šādu olu izmantošanu veselību veicinošos produktos.

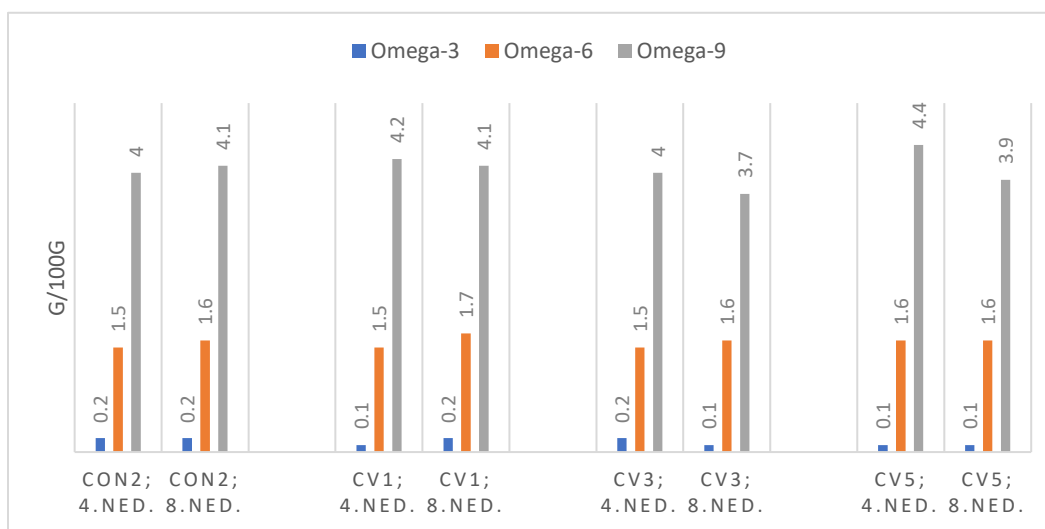
Analīzi turpināsim ar omega-3, omega-6 un omega-9 taukskābju daudzuma analīzi pēc 4. un pēc 8. nedēļas ilga mikroaļģu izbarošanas perioda.



12.12.attēls. Mikroaļģu *Dunaliella salina* (DU5), *Spirulina paltensis* (SP5) un *Chlorella vulgaris* (CV51) biomasas izēdināšanas ietekme uz omega-3, -6 un -9 taukskābju daudzums 30. līdz 38 nedēļas vecu vistu olās 4 un 8. pētījuma nedēļā.

Konstatējām, ka vidējais omega-3, omega-6 un omega-9 taukskābju saturs olās katrā grupā 4. un 8. pētījuma nedēļā būtiski neatšķīrās, un arī izmaiņas starp 4. un 8. nedēļu bija minimālas. Tomēr pievērsām uzmanību katras taukskābes daudzuma izmaiņām:

- Omega-3 taukskābes: saturs svārstījās no 0,1 līdz 0,2 g/100g olu. Kopumā izmaiņas bija nelielas un nenožīmīgas.
- Omega-6 taukskābes: saturs variējās no 1,5 līdz 1,7 g/100g olu. Arī šīs izmaiņas būtiski neatšķīrās.
- Omega-9 taukskābes: Šīs taukskābes daudzums bija kvantitatīvi vislielākais un svārstījās robežās no 3,5 līdz 4,4 g/100g olu. Jāpiebilst, ka kontroles grupā vērtība pieauga no 3,7 uz 4,0 g. Savukārt pārējās grupās nedaudz samazinājās.



12.13.attēls. Mikroaļģes *C. vulgaris* dažādu devu (deva 0,1% (CV1 grupa); 0,3% (CV3); 0,5% (CV5)) ietekme uz omega-3, -6 un -9 taukskābju daudzums (mg/100g) 50. līdz 58 nedēļas vecu vistu olās 4 un 8. pētījuma nedēļā.

Mēs analizējām omega-3, omega-6 un omega-9 taukskābju saturu olās (mg/100g olu) pēc mikroaļģes *C. vulgaris* dažādu devu (0,1%, 0,3% un 0,5%) izbarošanas 4. un 8. pētījuma nedēļā. Kā redzams 13. attēlā, koncentrāciju izmaiņas starp 4. un 8. nedēļu bija nelielas, tāpēc pievērsāmies atsevišķu taukskābju daudzuma svārstību analīzei:

- Omega-3 taukskābju saturs svārstījās no 0,1 līdz 0,2 mg/100g olu. Vienā grupā tika novērots pieaugums no 0,1 uz 0,2 mg, bet citā – samazinājums no 0,2 uz 0,1 mg. Kopumā izmaiņas bija nelielas un nenožīmīgas.

- Omega-6 taukskābju saturs variēja no 1,5 līdz 1,7 mg/100g. Vienā grupā bija neliels pieaugums (no 1,5 uz 1,7 mg), citās līmenis palika stabils vai minimāli mainīgs. Tendences neliecina par būtiskām izmaiņām.
- Omega-9 taukskābes bija kvantitatīvi visizteiktāk pārstāvētās taukskābes (3,7–4,4 mg/100g). Divās grupās tika novērots neliels samazinājums (piemēram, no 4,4 uz 3,9 mg; no 4,0 uz 3,7 mg), bet vienā grupā vērojams neliels pieaugums (no 4,0 uz 4,1 mg)

Noslēgumā varam secināt, ka, lai gan dažās grupās novērotas nelielas izmaiņas taukskābju saturā, svārstības starp 4. un 8. nedēļu nebija nozīmīgas. Rezultāti norāda uz stabilu taukskābju saturu olās neatkarīgi no pie pamatbarības pievienotās mikroaļģu sugas, devas vai pētījuma nedēļas.

Laboratorijā iegūtie rezultāti par olu uzturvērtības parametriem un enerģētisko vērtību pēc astoņu nedēļu ilgas mikroaļģu biomasas izbarošanas ir apkopoti 12.18. un 12.19. tabulā.

12.18. tabula

Šajā pētījumā tika analizēta astoņas nedēļas ilgas mikroaļģu biomasas pievienošanas ietekme uz eksperimentālo grupu (CV51, DU5, SP5) olu uzturvērtības parametriem un enerģētisko vērtību, salīdzinot ar kontroles grupu (CON1).

Parameters	Pētījumu grupas			
	CON ₁	CV51	DU5	SP5
Ūdens, g	76,55 ± 0,92	77,05 ± 0,21	76,30 ± 0,14	76,85 ± 0,64
Proteīns, g	12,35 ± 0,07	12,35 ± 0,07	12,70 ± 0,28	12,50 ± 0,28
Tauki, g	8,75 ± 0,67	8,55 ± 0,07	8,95 ± 0,07	8,60 ± 0,28
- piesātinātie (SAFA), g	2,65 ± 0,07	2,55 ± 0,07	2,8 ± 0,00	2,6 ± 0,14
- mononepiesātinātie (MUFA), g	4,45 ± 0,21	4,25 ± 0,21	4,50 ± 0,00	4,25 ± 0,21
- polinepiesātinātie, (PUFA), g	1,45 ± 0,21	1,55 ± 0,07	1,55 ± 0,07	1,60 ± 0,00
- omega-3, g	0,15 ± 0,71	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,15 ± 0,71
- omega-6, g	1,30 ± 0,14	1,40 ± 0,00	1,45 ± 0,07	1,45 ± 0,07
- omega-9, g	3,85 ± 0,21	3,70 ± 0,28	3,95 ± 0,07	3,65 ± 0,21
- linolskābe, g	1,20 ± 0,14	1,25 ± 0,07	1,35 ± 0,07	1,30 ± 0,00
- oleīnskābe, g	3,85 ± 0,21	3,7 ± 0,14	3,95 ± 0,07	3,65 ± 0,21
- palmitīnskābe, g	2,05 ± 0,07	2,00 ± 0,00	2,1 ± 0,00	2,0 ± 0,14
- eikozapentaēnskābe (EPA), g	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
- dokozaheksaēnskābe (DHA), g	0,1	0,1	0,1	0,1
Transtaukskābes, g	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Holesterīns, mg	251,50 ± 58,69	204,0 ± 15,56	244,0 ± 39,60	222,0 ± 25,46
Pelni, g	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,00	0,77 ± 0,11	0,82 ± 0,02
Ogļhidrāti, g	1,55 ± 0,21	1,25 ± 0,07	1,30 ± 0,28	1,25 ± 0,07
- cukuri, g	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Enerģētiskā vērtība, kJ	560,0 ± 28,28	547,5 ± 4,95	569,0 ± 2,83	552,0 ± 16,97
Holīns, g	0,14 ± 0,19	0,30 ± 0,03	0,29 ± 0,00	0,30 ± 0,00
Nātrijs (Na), g	0,26 ± 0,17	0,35 ± 0,00	0,35 ± 0,00	0,37 ± 0,02
Nātrija hlorīds, g	0,25 ± 0,14	0,14 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,15 ± 0,01

Vērtības ir norādītas kā vidējais rādītājs ± standartnovirze. Visas vērtības neuzrādīja statistiski nozīmīgas atšķirības (ANOVA, Tukey post hoc tests, $P > 0,05$).

Uzturvielu analīze atklāja, ka starp kontroles grupas (CON1) un eksperimentālajām grupām (CV51, DU5, SP5), kurām tika pievienota trīs dažādu mikroaļģu biomasa, olu paraugos netika konstatētas statistiski nozīmīgas atšķirības uzturvērtības parametros (ANOVA, Tukey post hoc tests, $P > 0,05$).

Vidējais ūdens, olbaltumvielu, pelnu, ogļhidrātu, holesterīna, holīna un nātrija saturs olās starp visu jauno vistu grupu paraugiem būtiski neatšķīrās. Arī kopējais tauku saturs un to sastāvs (piesātinātās, mononepiesātinātās un polinepiesātinātās taukskābes, kā arī omega-3, omega-6 un omega-9 frakcijas) būtiski neatšķīrās, lai gan nelielas svārstības tomēr tika novērotas. Piemēram, CV51 grupā bija nedaudz zemāks piesātināto taukskābju un oleīnskābes saturs. Arī enerģētiskā

vērtība visu grupu olu paraugos saglabājās līdzīga, svārstoties no 547,5 līdz 569,0 kJ uz 100 g produkta.

12.19. tabula

**Kontroles grupas (CON₂) un eksperimentālo grupu (CV1, CV3, CV5)
olu uzturvērtības parametri un enerģētiskā vērtība uz 100 g.**

Parameters	Pētījuma grupas			
	CON ₂	CV1	CV3	CV5
Ūdens, g	76,0 ± 0,28	76,25 ± 0,21	76,50 ± 0,14	75,65 ± 1,06
Proteīns, g	12,20 ± 0,28	12,60 ± 0,00	12,00 ± 0,57	12,40 ± 0,57
Tauki, g	9,30 ± 0,00	9,25 ± 0,07	8,85 ± 0,35	9,35 ± 0,50
- piesātinātie (SAFA), g	2,75 ± 0,07	2,75 ± 0,07	2,65 ± 0,07	2,80 ± 0,14
- mononepiesātinātie (MUFA), g	4,60 ± 0,14	4,70 ± 0,14	4,35 ± 0,21	4,65 ± 0,35
- polinepiesātinātie, (PUFA), g	1,65 ± 0,07	1,75 ± 0,21	1,70 ± 0,00	1,70 ± 0,00
- omega-3, g	0,20 ± 0,00	0,15 ± 0,07	0,15 ± 0,07	0,10 ± 0,00
- omega-6, g	1,55 ± 0,07	1,60 ± 0,14	1,55 ± 0,07	1,60 ± 0,00
- omega-9, g	4,05 ± 0,07	4,15 ± 0,07	2,85 ± 0,21	4,15 ± 0,35
- linolskābe, g	1,45 ± 0,07	1,40 ± 0,14	1,45 ± 0,07	1,45 ± 0,07
- oleīnskābe, g	4,05 ± 0,07	4,15 ± 0,07	2,85 ± 0,21	4,10 ± 0,28
- palmitīnskābe, g	2,10 ± 0,14	2,10 ± 0,00	2,05 ± 0,07	2,20 ± 0,14
- eikozapentaēnskābe (EPA), g	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
- dokozaheksaēnskābe (DHA), g	0,1	0,1	0,1	0,1
Transtaukskābes, g	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Holesterīns, mg	212,5 ± 6,36	196,5 ± 37,48	216,0 ± 36,77	275,0 ± 8,49
Pelni, g	0,87 ± 0,01	0,85 ± 0,05	0,82 ± 0,02	0,89 ± 0,01
Ogļhidrāti, g	1,60 ± 0,00	1,05 ± 0,21	1,85 ± 0,78	1,70 ± 0,00
- cukuri, g	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Enerģētiskā vērtība, kJ	578,5 ± 4,95	574,5 ± 0,71	562,0 ± 9,90	585,5 ± 27,58
Holīns, g	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,03	0,31 ± 0,01
Nātrijs (Na), g	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,02
Nātrija hlorīds, g	0,40 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,38 ± 0,03	0,34 ± 0,06

Vērtības ir norādītas kā vidējais rādītājs ± standartnovirze. Visas vērtības neuzrādīja statistiski nozīmīgas atšķirības (ANOVA, Tukey post hoc tests, $P > 0,05$).

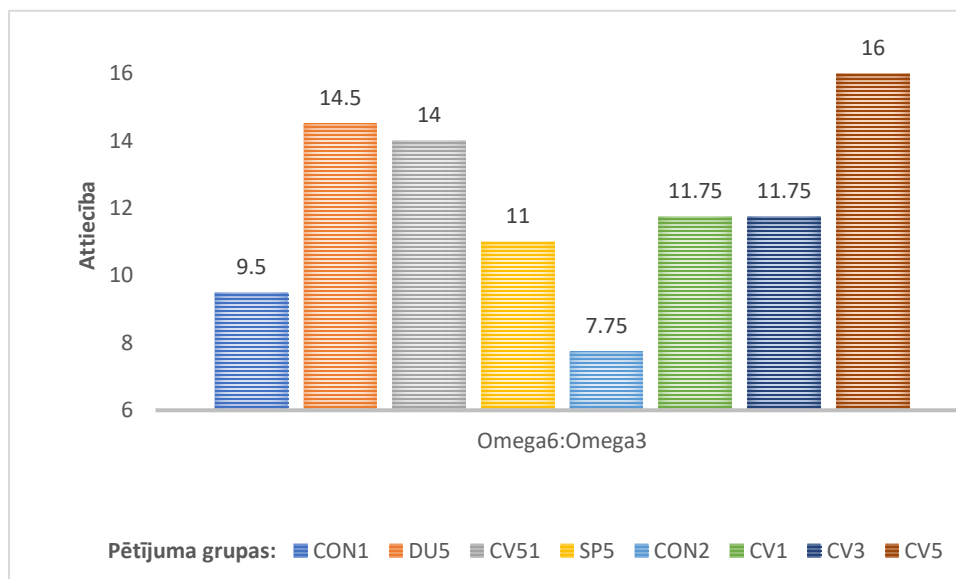
Ūdens, proteīna, pelnu, holīna un nātrija satura rādītāji visās grupās bija līdzīgi, liecinot, ka *Chlorella vulgaris* pievienošana barībai šos komponentus būtiski neietekmēja. Tauku daudzums nedaudz samazinājās CV3 grupā (0,3% *Chlorella vulgaris*), taču atšķirība nebija statistiski nozīmīga.

Taukskābju profils visās grupās bija līdzīgs, lai gan CV4 un CV5 grupās 8. nedēļā tika novērota omega-3 taukskābju koncentrācijas samazināšanās salīdzinājumā ar kontroli (sk. 12.1. attēlu). Arī holesterīna un enerģētiskās vērtības variācijas starp grupām nebija statistiski nozīmīgas. Holesterīna saturs variēja robežās no 204,0 mg (CV51) līdz 251,5 mg (CON1), taču šīs

atšķirības nebija statistiski nozīmīgas. Enerģētiskā vērtība visās grupās saglabājās līdzīga, svārstoties no 547,5 līdz 569,0 kJ uz 100 g produkta.

Kopumā šie rezultāti liecina, ka *Chlorella vulgaris* iekļaušana barībā līdz 0,5% apjomam būtiski nemainīja olu uzturvērtības parametrus un enerģētisko vērtību.

Rezultātu apskatu turpināsim ar omega-6 un omega-3 attiecības analīzi visu pētījumā iekļauto dējējvistu grupu olu paraugos. Iegūtie rezultāti atspoguļoti 12.14. attēlā.



12.14.attēls. Dažādu mikroaļģu sugu biomasas izēdināšanas ietekme uz omega-6 un omega-3 taukskābju attiecību mājas vistu olās.

Salīdzinot iegūtos datus ar literatūrā ieteikto omega-6 un omega-3 attiecību cilvēku uzturā (vēlamā attiecība ir no 1:1 līdz 5(6):1), visu pētījuma grupu dējējvistu olās šī attiecība ir augstāka, nekā to iesaka pārtikas speciālisti. Lai gan kontroles grupās šī attiecība bija salīdzinoši zemāka (grupā CON1 9,5:1 un CON2 7,75:1), tomēr arī šo grupu olās tā pārsniedza ieteikto.

Ir izpētīts, ka cilvēki pirmsākumos uzturā lietoja pārtiku, kurā omega-6 un omega-3 neaizvietojamā taukskābju attiecība bija aptuveni 1:1. Savukārt Rietumu valstu diētās šī attiecība ir 15:1–16:1, līdz pat 20:1 un vairāk. Rietumu diētās trūkst omega-3 taukskābju un ir pārmērīgs omega-6 taukskābju daudzums. Optimālā šo taukskābju attiecība tiek lēsta aptuveni 4-5:1 (Simopoulos, 2002; Calder, 2010).

Taukskābēm ir būtiska loma cilvēka veselībā. Pētījumi liecina, ka uzturs ar augstu omega-3 taukskābju saturu, kas atrodams tādos pārtikas produktos kā zivis, zivju eļļa, linsēklas un

valrieksti, var pozitīvi ietekmēt cilvēku veselību. Diemžēl šajā pārtikas līdzekļu sarakstā nav minēti mājas vistu produkti (gaļa un olas), ko cilvēki lieto aizvien vairāk. Ir vispāratzīts, ka mūsu pārtikā trūkst tieši omega-3 taukskābju.

Pēdējo gadu pētījumi ir pastiprinājuši atziņu, ka pārāk mazs omega-3 taukskābju daudzums Rietumvalstu cilvēku uzturā var būt saistīts ar depresijas un trauksmes simptomiem, mazināt kognitīvās funkcijas un paaugstināt Alzheimerā un demences risku. Turklāt omega-3 funkcionē kā pretiekaisuma mediators, tāpēc tā trūkums veicina iekaisumu, aterosklerozi, koronāro sirds slimību un insulta risku. Šīs taukskābes palīdz asaru plēves stabilizācijā, mazina metaboliskos traucējumus, centrālo aptaukošanos un paaugstinātu insulīna rezistenci (Simopoulos, 2002; Calder, 2010; Bhargava et al., 2016; Clayton et al., 2016; Hong et al., 2024). Omega-3 un omega-6 līdzsvars uzturā ir vitāli svarīgs veselībai.

Ne mazāk svarīga ir neaizvietoājamo taukskābju attiecība. Omega-6 un omega-3 attiecība asinīs, kas pārsniedz ieteicamās normas, ir saistīta ar paaugstinātu mirstības risku no dažādiem cēloņiem, piemēram, vēža un sirds-asinsvadu slimībām (Clayton et al., 2016; Hong et al., 2024). Šie un citi atklājumi uzsver nepieciešamību līdzsvarot omega-6 un omega-3 uzņemšanu uzturā, lai veicinātu labāku veselību un samazinātu hronisku slimību risku.

Iegūtie dati par mikroaļģu *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* un *Dunaliella salina* biomasas izbarošanas ietekmi uz pieaugušu dējējvistu organismu un produktivitāti laboratorijas apstākļos, kā arī rezultātu analīze ļauj mums secināt, ka:

- *Dunaliella* 0,5% (DU5) un *Spirulina* 0,5% (SP5) grupas pārliecinoši uzrādīja augstāko vidējo olu skaitu un dējības intensitāti visā pētījuma periodā.
- *Chlorella vulgaris* pozitīva ietekme uz ražību tika novērota tikai pie lielākās devas (0,5%).
- Visās grupās vidējā olas masa nebija statistiski nozīmīgi atšķirīga ($p > 0,05$), svārstoties robežās no ~63,7 g līdz ~67,4 g. Tas nozīmē, ka uzlabotā dējība un lielāks olu skaits nenotika uz olas kvalitātes (masas) rēķina, kas ir pozitīvs aspekts no ražošanas viedokļa.
- *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* vai *Spirulina platensis* pievienošana barībai līdz 0,5% būtiski neietekmēja olu galvenos uzturvērtības rādītājus – ūdens, proteīna, pelnu, holīna, nātrija, tauku un enerģētisko vērtību. Visās grupās šie parametri bija līdzīgi kontroles grupām.
- Omega-3, Omega-6 un Omega-9 taukskābju daudzums olās starp grupām un testēšanas nedēļām mainījās minimāli un nebija statistiski nozīmīgi.

- Tomēr visās grupās tika konstatēta augsta omega-6/omega-3 attiecība (no 7,75:1 līdz 16:1), kas būtiski pārsniedz optimālo (~5:1).
- Holesterīna daudzums olās kontroles grupās pētījuma gaitā samazinājās. Savukārt vairākās eksperimentālajās grupās (piemēram, CV1, CV3, CV5, SP5, CV51) holesterīna līmenis palielinājās. Tikai DU5 grupā, līdzīgi kā kontroles grupās, holesterīna līmenis samazinājās.

12.3.2. Ražošanas apstākļos veiktais pētījums par mikroaļģu biomasas izbarošanas ietekmi uz dējējvistu organismu un produktivitāti.

Pēc pētījuma pirmā posma, kas notika laboratorijas apstākļos un ietvēra iegūto rezultātu sākotnējo izvērtēšanu, mēs turpinājām pētījumu reālos ražošanas apstākļos. Projekta otrajā posmā tika iesaistītas trīs saimniecības: zemnieku saimniecība "Pakalni" **Lauras Loginas-Lucavas** vadībā, bioloģiskā saimniecība "Skujas" un zemnieku saimniecība "Kalnadruvas" **Ingus Druva** vadībā.

Īsi ražošanas apstākļos veiktā pētījuma izvēlētajiem materiāliem un metodiku.

“Pakalni” (turpmāk lietosim saīsinājumu Pa). Iegādājās 18. nedēļas vecas dējējvistas, šķirne Lohman Braun. Tika izveidotas četras grupas, kuras visas saņēma vienādu devu pamatbarības, bet trīs no grupām papildu saņēma atšķirīgas mikroaļģes biomasas devas. Kopā pētījumā tika iekļauti 200 putni, katrā grupā iekļaujot 50 mājas vistas. Līdz ar to tika izveidotas: kontrole, n=50; Spir.p.1%, n=50; Spir.p.1,5%, n=50; Spir.p. 3%, n=50. Uzsākot pētījumu, vistas vēl nebija sākušas dēt, tāpēc pētījums ilga trīs mēnešus no putnu dēšanas sākuma.

“Skujas” (saīsinājums Sk). Saimniecībā tika inkubētas pašu iegūtas mājas vistu olas. Apskatot saimniecību, redzējām, ka tiek turēti dējējvistu šķirņu krustojumi, tāpēc hibrīdi, kas ir salīdzinoši maza izmēra. Pētījumā iekļautie cāļi izšķīlās 2024.gada 19. aprīlī. Pētījuma pirmais posms ilga trīs mēnešus un tika uzsākts, kad vistas bija 24. nedēļas vecas. Izveidojām divas pētījuma grupas – kontrolgrupa (Sk kontrole), pētījuma sākumā n=50) un Sk Ch.v.1% grupa, kas pie barības saņēma 1% *Chlorella vulgaris* biomasu. Pirmās olas vistas izdēja 30 nedēļu vecumā. Šī pētījuma posms noslēdzās, kad putni bija 39. nedēļas veci. Pētījums turpinājās ar trīs mēnešu ilgu otro posmu, nemainot izveidoto grupu sastāvu, no vistu 40. nedēļu vecuma līdz 52. nedēļu vecumam, kura laikā dējējvistas turpināja saņemt pamatdiētu, bet Sk Ch.v. 1% grupa turpināja papildu saņemt 1% *Chlorella vulgaris*.

“Kalnadruvas” (turpmāk saīsināts KD). Šajā pētījuma posmā tika iekļautas 200 dominantes D104 (*Sussex*) un D109 dējējvistas, šī posma pētījuma sākumā tās bija 27. nedēļas vecas (izšķīlušās 2024.gada 14.maijā). Pētījuma ilgums 3 mēneši, līdz 37. nedēļu vecumam. Tika izveidotas divas grupas, kontroles (n=100), kas saņēma pamatdiētu, un KD Ch.v.1% grupa (n=100), kas pie barības saņēma 1% *Chlorella vulgaris* biomasu.

Pirms pētījuma apmeklējām visas saimniecības un, atkarībā no konstatētās situācijas un projektā uzstādītajiem uzdevumiem, kā arī saskaņojām pētījuma norises shēmu.

Katrā no saimniecībām bija savas specifiskas īpatnības – sākot no putnu mājas vistu šķirnēm, līdz turēšanas un barošanas apstākļiem.

Katra saimniecība projektā iesaistījās atšķirīgā laikā, ar atšķirīgu putnu skaitu un plānoto dalības ilgumu. Tomēr katrā saimniecībā tika veikti vienādi izmeklējumi, kas pirms pētījuma uzsākšanas tika saskaņoti ar projektā minēto saimniecības vadītāju. Tātad katrā saimniecībā (ar nelielām novirzēm) tika veikta sekojoši izmeklējumi:

- Putnu vispārējais veselības stāvoklis: katru dienu.
- Putnu svars: katra posma (arī tad, ja tādi ir vairāki) sākums un noslēgums.
- Olu skaits un svars: katru dienu katrā grupā atsevišķi (savāc olas katras grupas ietvaros, nosver (visas kopā), saskaita).
- Asins analīzes, sākums (ja nepieciešams) un noslēgums.
- Parazitoloģiskā izmeklēšana (fēces un ektoparazīti), noslēgums.
- Pilna patologanatomisā sekcija: vismaz 10% no putnu skaita, noslēgums.
- Kritušie putni: jāpievieno pavadraksts ar īsu aprakstu (kad, kādos apstākļos, vai slimoja, u.c.), jāieliek celofāna maisiņā un saldētavā (vismaz -18°C). Atdod sekcijas veikšanai.
- Pētījuma noslēgumā jānogatavo 30 olas no grupas laboratorijas analīzēm.

Ietekme uz dējējvistu organismu

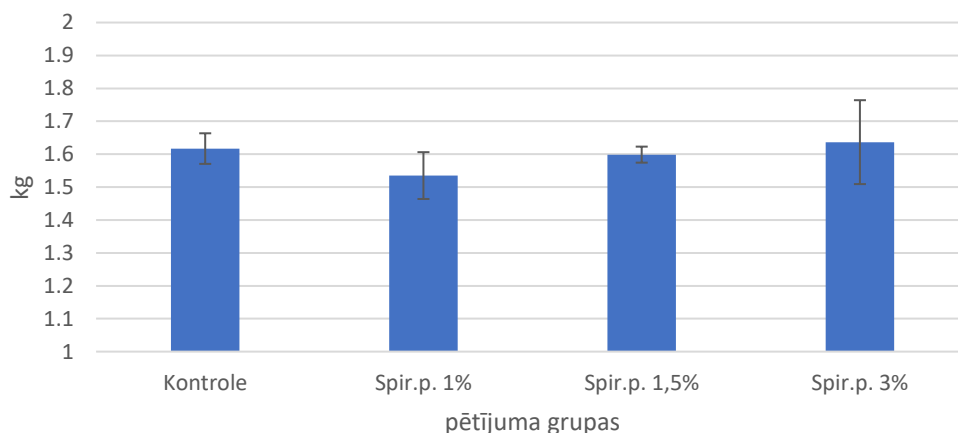
Lai noskaidrotu mikroaļģu izēdināšanas ietekmi uz mājas vistu organismu ražošanas apstākļos, pēc pētījuma noslēguma vistu audzēšanas saimniecībās veicām putnu eitanāziju un patologanatomisko sekciju.

Apkopotie rezultāti liecina, ka pētījumā iekļauto mikroaļģu sugu un devu izēdināšana neizraisīja patoloģiskas izmaiņas mājas vistu organismā. Tas ir pozitīvs rezultāts, jo ir pētījumi, kuros konstatēts, ka liela mikroaļģu deva var izraisīt dējības samazināšanos, pasliktināt gremošanas orgānu, tai skaitā aknu funkcionālo stāvokli, samazināt triglicerīdu sintēzi, kā rezultātā var novērot dzīvsvara samazināšanos pieaugušiem putniem un dzīvsvara pieauguma traucējumus cāļiem (Pestana et al., 2020; Elkin et al. 2023).

Analizējot saimniecībās bojā gājušo putnu nāves iemeslus, konstatējām, ka tie nav saistīti mikroaļģu izēdināšanu. Kopumā pētījuma laikā saimniecībās, kuras piedalījās pētījumā, bojā gāja

11 dējējvistas (saimniecībās tas ir mazāk kā 5% no putnu skaita grupā), kuriem konstatētās viena vai vairākas patoloģijas ir distrofija (5 gadījumi), lipidoze (4 gad.), olvada izvēršanās (3 gad.), enterīts (1 gad.), pseidomelanoze (1 gad.), hidroperikards (1 gad.), ceļa locītavas trauma un tam sekojoša eitanāzija (1 gadījums), nefrīts (1.gad.).

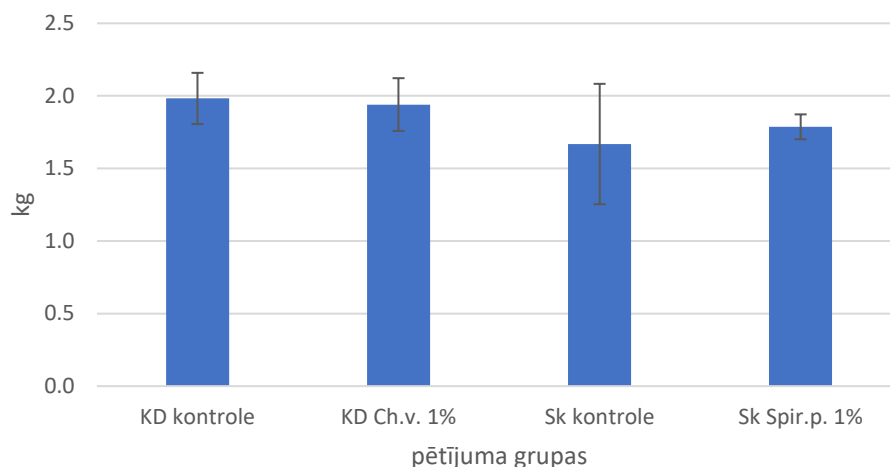
Par to, ka *Spirulina platensis* pievienošana barībai nerada pašsajūtas un veselības traucējumus, netieši liecina arī tas, ka putnu masa starp grupām būtiski neatšķīrās. Mazākā ķermeņa masa ($1,34 \pm 0,07$ kg) tika novērota putniem, kuri saņēma mazāko barības piedevas devu (1%). Savukārt putnu, kuri saņēma 3% devu, ķermeņa masa ($1,62 \pm 0,05$ kg) bija ļoti līdzīga kontroles grupas putnu ķermeņa masai ($1,64 \pm 0,13$ kg).



12.15. attēls. *Spirulina platensis* biomasas 1%, 1,5% un 3% devu izēdināšanas ietekme uz mājas vistu ķermeņa masu.

Lai novērtētu *Chlorella vulgaris* ietekmi uz dējējvistu organismu, šo barības sastāvdaļu testējām divās saimniecībās, izmantojot dažādu šķirņu dējējvistas ar atšķirīgiem turēšanas un barošanas apstākļiem. Abās saimniecībās biomasu pievienojām vienādā devā, proti, 1% no kopējā piedāvātā barības daudzuma.

Līdz ar to tika izveidotas un analizētas divas kontroles grupas (KD kontrole un Sk kontrole) un divas pētījuma grupas (KD Ch.v. 1% un Sk Ch.v. 1%). Tā kā katrā saimniecībā izmantotie pamatbarošanas līdzekļi un arī turēšanas apstākļi atšķīrās, analizējot iegūtos rezultātus, pirmām kārtām salīdzinājām attiecīgās saimniecības kontroles un Ch.v.1% grupu datus, vienlaicīgi meklējot citas sakarības.



12.16. attēls. *Chlorella vulgaris* 1% devas izēdināšanas ietekme uz vistu ķermeņa masu saimniecībās KD un Sk.

Tā kā abās saimniecībās audzē atšķirīgas dējējvistu šķirnes, kas atspoguļojas rezultātos (saimniecībā Sk ir salīdzinoši mazāka izmēra hibrīdi, kas izšķīlās 2024. gada 19. aprīlī, tātad šī posma pētījuma sākumā tās bija 5,5 mēnešus vecas; savukārt saimniecībā KD tiek audzētas Dominant D104 (Sussex) un D109, kas šī posma pētījuma sākumā bija 5 mēnešus vecas), masas (dzīvsvara) izmaiņas savstarpēji nesalīdzināsim. Savstarpēji salīdzinot attiecīgās saimniecības kontroles un pētījuma grupu putnu vidējo svaru, būtiskas atšķirības netika konstatētas (sk. 12.16. att.).

Lai izpētītu, vai mikroaļģu izēdināšana var ietekmēt iekšējo orgānu attīstību un līdz ar to arī funkcionalitāti, veicām atsevišķu orgānu svēršanu un mērīšanu. Analīzi sāksim ar *Spirulina platensis* 1%, 1,5% un 3% devu izēdināšanas ietekmes izpēti uz vistu sirds, liesas, aknu un olnīcu masu un izmēru. Iegūtie rezultāti ir apkopoti 12.20. tabulā.

12.20. tabula

Spirulina platensis 1%, 1,5%, 3% devu izēdināšanas ietekme
uz vistu sirds, liesas, aknu un olnīcu masu un izmēru.

Grupas nosaukums	Stat. rādītājs	Sirds				Liesa		Aknas		
		masa (g)	garums (cm)	platums (cm)	biezums (cm)	masa (g)	masa (g)	garums (cm)	platums (cm)	biezums (cm)
P kontrole	Vid. aritm.	6,9	3,4	2,1	1,5	1,8	42,1	8,0	6,5	2,6
	Standartn.	0,82	0,33	0,25	0,36	0,43	4,00	0,62	0,53	0,23
Spir.p. 1%	Vid. aritm.	5,9	3,5	2,0	1,3	1,8	32,0	7,6	6,6	2,7
	Standartn.	0,44	0,29	0,29	0,27	0,52	12,01	0,64	0,97	0,42
Spir.p. 1,5%	Vid. aritm.	6,6	11,7	2,3	1,4	2,0	9,9	8,2	6,0	2,9
	Standartn.	1,27	1,16	0,25	0,21	0,58	4,45	0,59	0,53	0,60
Spir.p. 3%.	Vid. aritm.	6,0	3,5	2,2	1,4	2,2	3,9	7,7	6,7	2,8
	Standartn.	0,48	0,26	0,42	0,29	0,46	5,27	0,51	1,52	0,44

Putniem, kuriem pie barības bija pievienoti 3% *Spirulina platensis* biomasas, konstatējām smagāko liesu ($2,2 \pm 0,58$ g) un aknas ($43,9 \pm 5,27$ g). Arī olnīcas vidējā masa šīs grupas putniem bija lielākā ($46,5 \pm 7,55$ g) nekā citu grupu vidējie rādītāji. Kontroles grupas putniem konstatējām lielāku sirds vidējo svaru un arī izmērus, tomēr šī atšķirība nebija statistiski nozīmīga (sk. 12.20. tab.).

Rezultāti par *Chlorella vulgaris* ietekmi uz dējējvistu sirds, liesas un aknu attīstību (masu un izmēriem) apkopotī sekojošā 12.21. tabulā.

***Chlorella vulgaris* izēdināšanas (deva 1%) ietekme uz vistu sirds,
liesas un aknu masu un izmēru.**

Grupas nosaukums	Stat. rādītājs	Sirds				Liesa		Aknas		
		masa (g)	garums (cm)	platums (cm)	biezums (cm)	masa (g)	masa (g)	garums (cm)	platums (cm)	biezums (cm)
KD kontrole	Vid.	9,1	3,7	2,6	1,3	2,4	46,2	8,6	8,2 ^a	2,1
	Stan- darn.	1,10	1,43	0,55	0,41	0,51	5,43	0,99	0,67	0,46
KD 1%	Ch.v.	8,7	4,4	2,5	1,5	2,3	42,9	8,0	7,5 ^a	2,4
	Stan- darn.	0,96	0,56	0,54	0,46	0,78	5,79	1,09	0,88	0,66
Sk kontrole	Vid.	6,4	3,1	2,0	1,2	2,0	36,2	7,5	6,2 ^b	2,1
	Stan- darn.	1,53	0,30	0,32	0,41	0,62	9,86	1,08	0,25	0,66
Sk 1%	Ch.v.	7,7	4,0	2,5	1,7	2,0	42,0	6,7	7,5 ^b	2,3
	Stan- darn.	0,63	0,35	0,45	0,45	0,46	3,15	2,95	1,34	0,70

*Rādītāji, kuri apzīmēti ar vienādu burtu, savstarpēju atšķiras vismaz ar 95% būtiskuma pakāpi

Salīdzinot iegūtos rezultātus saimniecību robežās, konstatējām pretrunas. Piemēram, sirds masa un platums KD saimniecībā bija lielāka kontroles grupas dējējvistām. Tomēr Sk saimniecībā putniem, kuri pie barības saņēma 1% *Chlorella* biomasu, bija lielāka gan sirds masa, gan arī sirds garums, platums un biežums. Lai arī vidējie rādītāji atšķiras ievērojami (piem., Sk saimniecībā sirds masa $9,1 \pm 1,1$ g kontroles grupai un $8,8 \pm 0,96$ g Ch.c.1% grupai), tomēr salīdzinoši lielā datu izkliede neļauj apgalvot, ka ar ANOVA T-testa palīdzību konstatētā atšķirība ir statistiski būtiska. Lai arī visi sirds izmērus raksturojošie rādītāji Ch.v. 1% grupas dējējvistām bija lielāki nekā kontroles grupas putniem ar mazāku datu izkliedi, tomēr arī šo rezultātu atšķirība neizrādījās statistiski ticama. Jāatzīmē, ka sirds ir viens no orgāniem, kurus izmanto cilvēku pārtikā (t.s. “ēdamais” orgāns), tāpēc lielāku šī orgāna masu un izmērus varam uzskatīt kā pozitīvu tendenci šī orgāna ieguvē.

Tālāko izpēti turpināsim, analizējot mikroaļģu ietekmi uz gremošanas orgānu sistēmas anatomisko struktūru.

Rezultāti par *Chlorella vulgaris* ietekmi uz dējējvistu sirds, liesas un aknu attīstību (masu un izmēriem) apkopoti sekojošā 12.21. tabulā. Rezultāti par to, kā *Spirulina platensis* izvēlēto devu

(1%, 1,5% un 3%) pievienošana barībai ietekmēja dziedzerkuņa un muskuļkuņa svaru un izmērus ir apkopoti 13.22. tabulā.

12.22. tabula

***Spirulina platensis* 1%, 1,5%, 3% devu ietekme
uz vistu dziedzerkuņa un muskuļkuņa masu un izmēru.**

Grupas nosaukums	Stat. rādītājs	Dziedzerkuņģis				Muskuļkuņģis			
		masa (g)	garums (cm)	platums (cm)	biezums (cm)	masa (g)	garums (cm)	platums (cm)	biezums (cm)
Kontrole	Vid.	9,0 ^a	3,8	2,4 ^a	1,6	37,4	5,7	4,8	2,3
	St.nov.	0,77	0,20	0,15	0,30	3,35	0,48	0,51	0,58
Spir.p. 1%	Vid.	7,7 ^{a, b}	3,8	2,1 ^a	1,2	34,1	5,8	4,7 ^{ab}	2,2
	St.nov.	1,04	0,28	0,22	0,22	6,37	0,77	0,23	0,77
Spir.p. 1,5%	Vid.	7,6	3,8	2,1	1,3	38,2	5,9	5,26 ^a	2,4
	St.nov.	1,03	0,51	0,22	0,28	3,11	0,10	0,22	0,32
Spir.p. 3%	Vid.	8,1 ^b	3,8	2,2	1,3	34,9	5,5	5,2 ^b	2,3
	St.nov.	1,16	0,24	0,19	0,31	4,18	0,38	0,29	0,74

*Rādītāji, kuri apzīmēti ar vienādu burtu, savstarpēju atšķiras vismaz ar 95% būtiskuma pakāpi

Salīdzinot savstarpēji visu grupu apkopotos rezultātus, izrādījās, ka lielāks dziedzerkuņģis masas, platuma un biezuma ziņā bija kontroles grupas vistām. Tā kā dziedzerkuņģī barība samaisās ar kuņģa sulu un tiek evakuēta tālāk uz muskuļkuņģi, tā lielāks izmērs varētu liecināt, ka šiem putniem barības masas dziedzerkuņģī uzkrājas un uzturas ilgāk nekā putniem, kuri saņēma Spirulīnu, tā iestiepjot tā sienīgas. Savukārt muskuļkuņģa būtiski lielāku masu un platumu (attiecīgi $38,2 \pm 3,11$ g un $5,26 \pm 0,22$ cm) konstatējām tiem putniem, kuri pie barības saņēma 1,5% *Spirulina platensis* biomasas. Muskuļkuņģa galveno masu sastāda muskuļu šūnas, kas, kā jau jebkurš muskulis, kļūst lielāks, veicot darbu - saraujoties un atslābstot. Ja barības masas uz muskuļkuņģi tiek evakuētas intensīvāk, tam ir “jāstrādā” intensīvāk, kas varētu veicināt tā izmēru pieaugšanu.

Rezultāti par to, kā *Chlorella vulgaris* izvēlētās devas (1%) pievienošana barībai ietekmēja dziedzerkuņa un muskuļkuņa svaru un izmērus saimniecībās KD un Sk ir apkopoti 12.23. tabulā.

***Chorella vulgaris* 1% izbarošanas ietekme
uz vistu dziedzerkuņģa un muskuļkuņģa masu un izmēru.**

Grupās nosau- kums	Stat. rādītājs	Dziedzerkuņģis				Muskuļkuņģis			
		masa (g)	garums (cm)	platums (cm)	biezums (cm)	masa (g)	garums (cm)	platums (cm)	biezums (cm)
KD kontrolē	Vid.	10,8	5,0	2,5 ^a	1,1	44,3	6,2	5,7	2,0
	St.nov.	1,38	0,11	0,34	0,25	7,88	0,92	0,34	0,99
KD Ch.v. 1%	Vid.	11,8	5,2	3,0 ^a	1,2	48,8	6,1	5,4	2,4
	St.nov.	2,27	0,66	0,52	0,29	9,61	0,64	0,65	1,30
Sk Kontrolē	Vid.	7,6	3,9	2,1	1,1	35,0	5,5	5,0	2,4
	St.nov.	0,55	0,25	0,09	0,19	5,10	0,47	0,66	0,68
Sk Ch.v. 1%	Vid.	8,0	4,4	2,4	1,8	41,5	5,7	5,4	3,1
	St.nov.	0,98	0,74	0,09	0,67	13,02	0,84	0,39	0,93

**Rādītāji, kuri apzīmēti ar vienādu burtu, savstarpēju atšķiras vismaz ar 95% būtiskuma pakāpi*

Iegūtie rezultāti parāda, ka grupās, kurām pie barības tika pievienots 1% *Chlorella vulgaris*, dziedzerkuņģa masa un izmēri bija lielāki nekā kontroles grupas dējējvistām. Turklāt dziedzerkuņģa platuma atšķirība KD saimniecībā bija būtiska ($p < 0,05$). Tā kā dziedzerkuņģī barība samaisās ar kuņģa sulu un tiek evakuēta tālāk uz muskuļkuņģi, tā lielāks izmērs varētu liecināt, ka šiem putniem barības masas dziedzerkuņģī uzkrājas un uzturas ilgāk nekā kontroles grupas putniem, tā iestiepjot tā sienas.

Varam secināt, ka Spirulīnas pievienošana barībai veicina barības evakuāciju no dziedzerkuņģa, bet Chlorellas to paildzina.

Pētījuma turpinājumā salīdzināsim mikroaļģu biomasas izēdināšanas ietekmi uz tievās un resnās zarnas dažādu posmu garumu (skat. 12.24. tab.).

Spirulina platensis 1%, 1,5%, 3% devu ietekme
uz tievās un resnās zarnas garumu mājās vistām.

Grupas nosaukums	Stat. rādītājs	Tievās zarnas posmu garums (cm)			Resnās zarnas posmu garums (cm)	
		12-pirkstu zarna	tukšā zarna	gūžas zarna	aklā zarna	loka zarna
Kontrole	Vid.	22,5	139,4	22,5	21,5	12,1
	St.nov.	7,66	10,70	4,99	2,32	2,07
Spir.p. 1%	Vid.	25,8	143,5	20,9	20,9	13,0
	St.nov.	7,10	9,70	1,88	1,91	2,10
Spir.p. 1,5%	Vid.	23,0	149,6	20,8	21,3	11,1
	St.nov.	9,82	10,44	1,89	0,90	2,08
Spir.p. 3%	Vid.	26,8	143,7	23,0	22,4	13,1
	St.nov.	8,52	10,11	1,10	1,24	2,56

Apkopojot tievo un resno zarnu dažādu posmu garuma rādītājus, konstatējām, ka tie ir izklaidēti salīdzinoši lielā amplitūdā, par ko pēc aprēķinu veikšanas liecina salīdzinoši lielās standartnovirzes. Dējējvistām, kuras pie barības saņēma lielāko *Spirulina* biomasas devu (3%), bija salīdzinoši garāki atsevišķi zarnu posmi – no tievajām zarnām 12-pirkstu ($26,8 \pm 8,52$ cm) un gūžas ($23 \pm 1,1$ cm) zarnas, kā arī no resnajām zarnām aklā ($22,4 \pm 1,24$ cm) un loka ($13,1 \pm 2,56$ cm) zarnas. Tomēr, nosakot to savstarpējo atšķirību būtiskumu ar ANOVA T-testa palīdzību, statistiski būtiskas atšķirības netika konstatētas. Lai gan šīs atšķirības nebija statistiski nozīmīgas, tomēr šī tendence skaidri iezīmējas un ir atzīmējama kā pozitīva, jo augstāki vidējie rādītāji spirulīnas biomasu saņēmušajām grupām norāda uz to, ka šiem putniem bija lielāks barības šķelšanas un uzsūkšanās laukums, kas uzlabo tās pārstrādi un uzsūkšanu.

***Spirulina platensis* izēdināšanas ietekme
uz tievās un resnās zarnas garumu mājas vistām.**

Grupas nosaukums	Statistiskie rādītāji	Tievās zarnas posmu garums (cm)			Resnās zarnas posmu garums (cm)	
		12- pirkstu zarna	tukšā zarna	gūžas zarna	aklā zarna	loka zarna
KD Kontrole	Vid.	32,8 ^a	125,2	20,4	22,0	12,4
	St.nov.	2,28	11,86	2,04	2,74	2,01
KD Ch.v. 1%	Vid.	29,7 ^a	119,4	21,7	21,9	12,6
	St.nov.	1,71	11,03	0,92	1,40	3,21
Sk kontrole	Vid.	27,4	103,0 ^b	17,3 ^c	17,7 ^d	9,4
	St.nov.	3,97	10,33	2,31	2,28	1,85
Sk Ch.v. 1%	Vid.	34,0	114,6 ^b	21,8 ^c	21,4 ^d	12,0
	St.nov.	4,06	10,31	3,27	3,19	3,16

*Rādītāji, kuri apzīmēti ar vienādu burtu, savstarpēju atšķiras vismaz ar 95% būtiskuma pakāpi

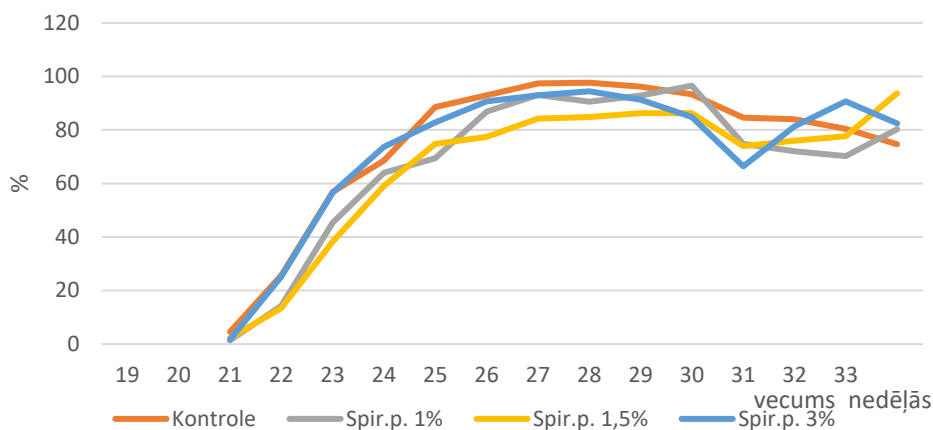
Saimniecībās, kuru mājas vistām pie pamatbarības tika pievienots 1% *Spirulina platensis*, novērojam gan atšķirīgas, gan vienādas zarnu garuma atšķirības tendences. Divpadsmit pirkstu zarnas garums bija būtiski ($p < 0,05$) garāks ($32,8 \pm 2,28$ cm) nekā pētījuma grupai ($29,7 \pm 1,71$ cm) saimniecībā KD, bet saimniecībā Sk šī zarna bija garāka putniem, kuriem pie barības tika pievienota mikroaļģu biomasa. Saimniecībā Sk būtiski garāku tievo zarnu garumu konstatējām tukšās zarnas ($114,6 \pm 10,3$ cm, $p < 0,05$), gūžas zarnas ($21,8 \pm 3,27$ cm, $p < 0,05$) posmos, kā arī aklajai zarnai ($21,4 \pm 3,19$ cm, $p < 0,05$) no resnās zarnas posmiem. Saimniecības Sk putniem garākas bija 12-pirkstu un loka zarnas, tomēr šīs atšķirības neizrādījās statistiski būtiskas. Arī *Chlorellas* biomasu saņēmušajām grupām konstatētie augstāki vidējie zarnu garumu rādītāji norāda uz to, ka šiem putniem ir lielāks barības šķelšanas un uzsūkšanās laukums, kas uzlabo tās pārstrādi un uzņemšanu.

Kopumā varam secināt, ka *Spirulina platensis* (1%, 1,5% un 3%) un *Chlorella vulgaris* (1%) biomasas pievienošana dējējvistu barībai neizsauc makroskopiskas patoloģiskas izmaiņas putnu organismā. *Spirulina platensis* pievienošana barībai (3%) veicina barības evakuāciju no dziedzerkuņģa, bet *Chlorella vulgaris* (1% no barības masas) to paildzina. Piecus mēnešus ilga

mikroaļģu biomasas izēdināšana var būtiski palielināt tievo un resno zarnu garumu, tā uzlabojot barības pārstrādi un uzsūšanos.

12.4.2. Mikroaļģu *Spirulina platensis* un *Chlorella vulgaris* izbarošanas ietekme uz dējējvistu produktivitāti ražošanas apstākļos.

Vienā no saimniecībām (Pa) vistas, ievēdot saimniecībā, bija 18 nedēļas vecas. Šajā vecumā tās vēl nedēja. Visas grupas sāka dēt pēc 2 nedēļu adaptācijas perioda, t.i., 21. dzīves nedēļā.

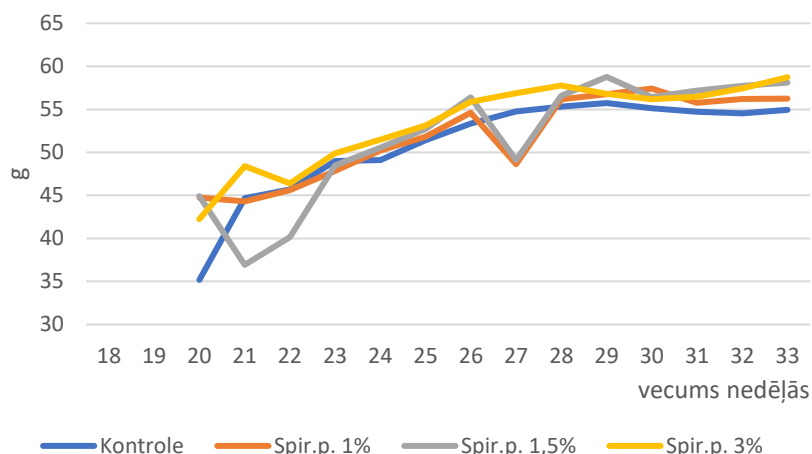


12.17. attēls. *Spirulina platensis* 1%, 1,5%, 3% devu ietekme uz dējības intensitāti jaunajām vistām (19.- 33.ned.v.).

Putniem 18 nedēļu vecumā pēc ievietošanas jaunās telpās, barības nomaņas un citiem ar atrašanās vietu saistītajiem stresiem, dēšana sākās pēc trīs nedēļām, tad, kad tie bija sasnieguši 21 nedēļu vecumu. Jāatzīmē, ka par strauju un augošu dējības intensitātes dinamiku nākamās 4-5 nedēļas parāda visu grupu rādītāji, sasniedzot 80%, kas netieši liecina, ka dējējvistām tika radīti labi turēšanas un barošanas apstākļi (skat 12.17. att.).

Konstatējām, ka ātrāka intensīvu olu produkcija sākās kontroles un *Spirulina platensis* grupā, kura biomasu pie barības saņēma lielākajā devā (3%). Šo abu grupu putnu grupām dējības intensitāte bija augstāka nekā Spir.p1% un Spir.p1,5% grupās vēl arī nākamās četras nedēļas. Sākot no piektās nedēļas (tad, kad putni bija sasnieguši 25 nedēļu vecumu), augstākie dēšanas intensitātes rādītāji bija Spir.p.3% grupai (atsevišķās nedēļās pietuvojās 100%), un tādi tie saglabājās (ar dažiem izņēmumiem) līdz pat pētījuma beigām. Arī 31 nedēļu vecumā, kad pēc stresa situācijas visās grupās pasliktinājās dējības rādītāji, Spir.p.3% grupai tie saglabājās augstākā līmenī nekā citu grupu dējējvistām.

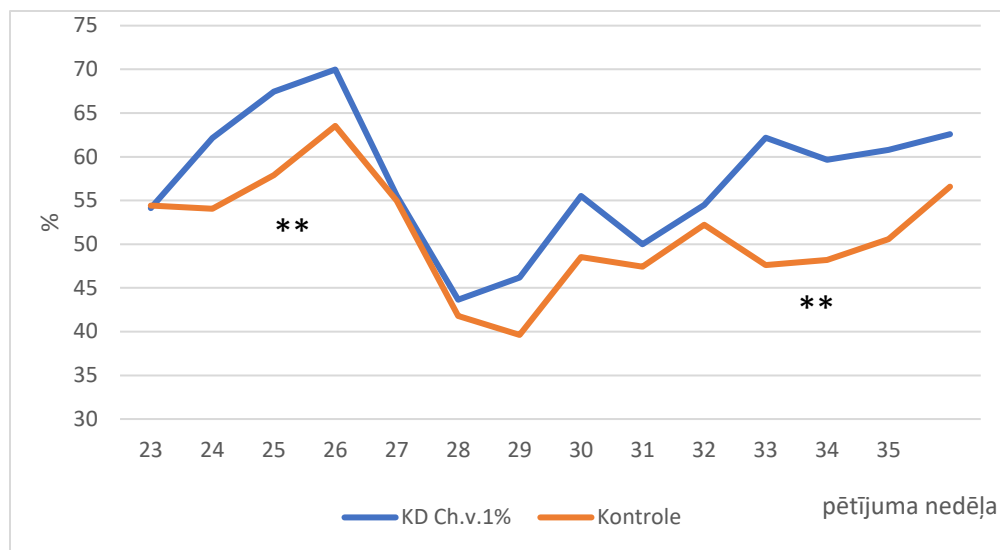
Analizējot olu vidējo masu, iegūtos rezultātus esam apkopojuši 12.18. attēlā.



12.18. attēls. *Spirulina platensis* dažādu devu (1%, 1,5%, 3%) ietekme uz mājas vistu olu masu.

Redzam, ka sākot dēt (pēc divām adaptācijas nedēļām), olu vidējais svars grupās, kuras saņēma *Spirulina platensis* biomasu, jau pirmajā nedēļā sasniedza 43-45 gramus, bet kontroles grupas jaunvistiņām tas bija tikai 35 g (skat. 12.18. att.). Analizējot tālāko vidējo olu svara pieauguma dinamiku katras grupas robežās, tad jāatzīmē, ka lai arī dinamika bija augoša, tomēr atsevišķās nedēļās (piem., 21.-22. ned.v. Spir.p.1,5% grupā olu vidējais svars samazinājās par 5-8 g, bet 11 nedēļā līdzīgu samazināšanos redzam Spir.p.1% un Spir.p.1,5% grupās). Jāatzīmē, ka labākie olu svara vidējie rādītāji nepārsniedza 60 g. Augstāko olu svaru visa pētījuma laikā konstatējām Spir.p.3% grupas dējējvistu dētajām olām, bet sliktākie rādītāji kopumā bija kontroles grupai, tomēr šī atšķirība nebija statistiski būtiska ($p > 0,05$).

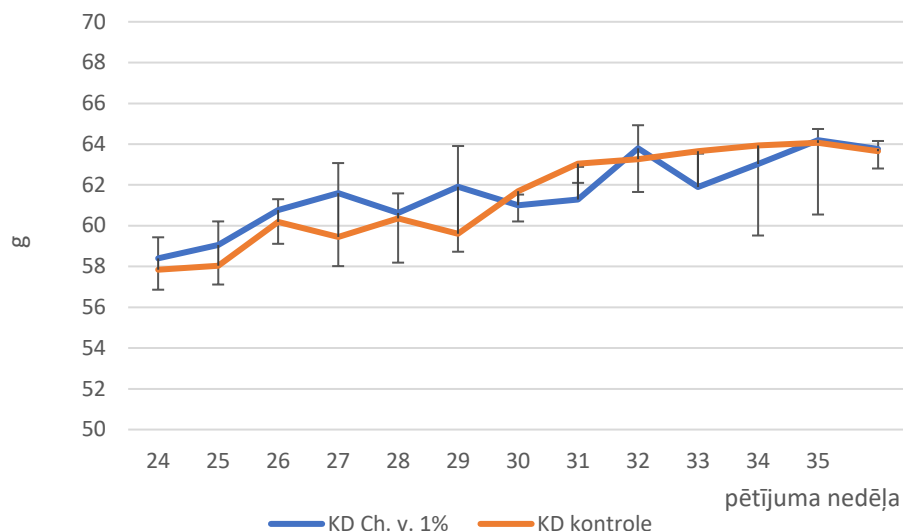
Otras pētījumā iesaistītās saimniecības (KD) dējības intensitātes izmaiņas pētījuma laikā esam apkopojuši 12.19. attēlā.



12.19. attēls. *Chlorella vulgaris* 1% devas ietekme uz dējības intensitāti 24- 36 nedēļas vecām mājas vistām (** - atšķirība ir būtiska, $p < 0,05$).

Otras pētījumā iesaistītās saimniecības (KD) dējības intensitātes izmaiņas pētījuma laikā esam apkopojuši 12.19. attēlā.

Grupas tika izveidotas, kad vistas bija 23. nedēļas vecas. Uzsākot pētījumu, tās jau dēja olas - kā redzam 12.19. attēlā, dējības intensitāte bija ap 55%. Šajā vecumā dēšanas intensitāte vēl tikai pieaug, ko arī attēlā redzam augšupejošajā līknē. Tomēr dējējvistām, kuras saņēma *S. vulgaris* (1%), dējības intensitātes līkne pieaug būtiski straujāk nekā kontroles grupai, 25 nedēļu vecumā sasniedzot 70% (skat. 12.19. att.). Mums nezināmu iemeslu dēļ 26. nedēļā dējības rādītāji strauji pasliktinājās līdz 40–45%, pēc kā nākamajās nedēļās tie pakāpeniski pieauga. Jāatzīmē, ka dējējvistu grupai, kura saņēma *Chlorella vulgaris* biomasu, dējības intensitāte visu pētījuma laiku bija augstākā līmenī nekā kontroles grupai – atsevišķos posmos līdz pat 10,02% (visa pētījuma laikā vidēji par 6,2%). Laika posmos no 24.-25. un no 33.-35. vecuma nedēļai dējības intensitātes atšķirība starp grupām bija būtiska.



12.20. attēls. *Chlorella vulgaris* 1% devas ietekme 24.- 36. nedēļas vecu mājas vistu olu masu.

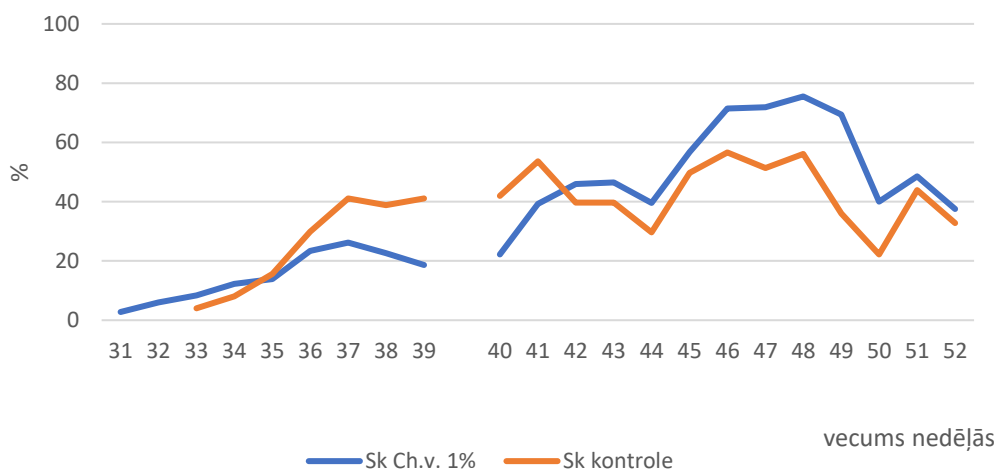
Otras pētījumā iesaistītās saimniecības (KD) dējības intensitātes izmaiņas pētījuma laikā esam apkopojuši 12.19. attēlā.

Grupas tika izveidotas, kad vistas bija 23 nedēļas vecas. Uzsākot pētījumu, tās jau dēja olas — kā redzam 12.19. attēlā, dējības intensitāte bija ap 55%. Šajā vecumā dēšanas intensitāte vēl tikai pieaug, ko arī attēlā redzam augšupejošajā līknē. Tomēr dējējvistām, kuras saņēma *S. vulgaris* (1%), dējības intensitātes līkne pieaug būtiski straujāk nekā kontroles grupai, 25 nedēļu vecumā sasniedzot 70% (skat. 12.19. att.). Mums nezināmu iemeslu dēļ 26. nedēļā dējības rādītāji strauji pasliktinājās līdz 40–45%, pēc kā nākamajās nedēļās tie pakāpeniski pieauga. Jāatzīmē, ka dējējvistu grupai, kura saņēma *Chlorella vulgaris* biomasu, dējības intensitāte visu pētījuma laiku bija augstākā līmenī nekā kontroles grupai – atsevišķos posmos līdz pat 10,02% (visa pētījuma laikā vidēji par 6,2%). Laika posmos no 24.-25. un no 33.-35. vecuma nedēļai dējības intensitātes atšķirība starp grupām bija būtiska.

12.20. attēls liecina, ka vistām kļūstot vecākām, olu masa pieaug vidēji no 58 g līdz 64 g. Kas attiecas uz *Chlorella vulgaris* 1% devas izēdināšanas ietekmi uz olu masu, tad salīdzinot iegūtos abu grupu katras nedēļas vidējos rādītājus, būtisku atšķirību nekonstatējām. Tomēr jāatzīmē, ka gandrīz visu pētījuma laiku dējējvistu grupai, kura pie pamatbarības saņēma *C. vulgaris*, olu vidējā masas rādītāji bija augstāki nekā kontroles grupai.

Trešajā saimniecībā plānojām atkārtot otrās saimniecības pētījumu, un dējējvistām pie barības pievienojām to pašu mikroaļģi tādā pašā daudzumā, kā otrajā saimniecībā. Šāds atkārtojums ļautu salīdzināt iegūtos rezultātus.

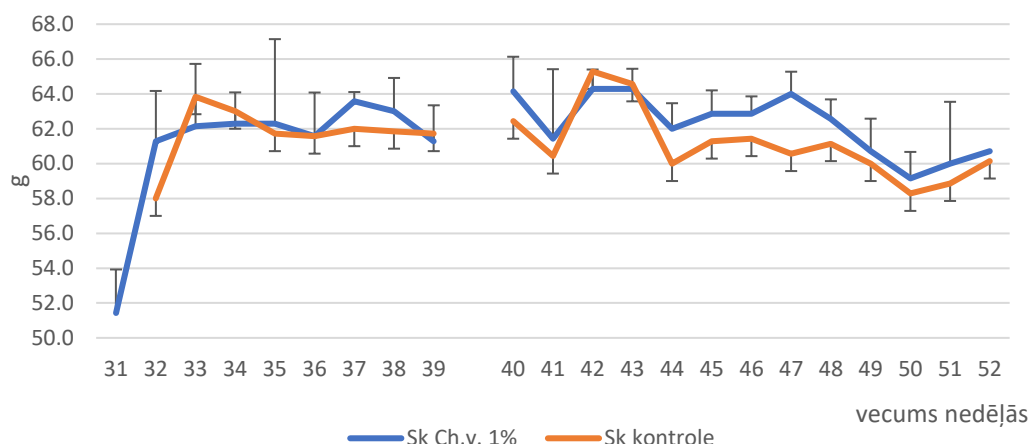
Šis pētījums tomēr atšķīrās no iepriekšējiem, jo eksperiments norisinājās divos posmos. Turklāt saimniecība neizmantoja konkrētas šķirnes vistas, bet gan hibrīdus, ko izaudzēja no saimniecībā izperētajiem cāļiem. Līdz ar to putni nebija pakļauti ar atrašanās vietas maiņu saistītā stresa situācijā. Tad, kad jaunvistiņām tuvojās dēšanas vecums, tām pie barības sāka pievienot 1% *C. vulgaris* – to pašu mikroaļģi tādā pašā daudzumā, kā otrajā saimniecībā. Pirmais posms, iesaistot tajā jaunvistas, ilga trīs mēnešus. Pēc tam sākās otrais posms, kas arī ilga trīs mēnešus, iesaistot dējējvistas. Katra posma rezultātus analizēsim atsevišķi. Dati par vistu dēšanas intensitāti abos pētījuma posmos ir apkopoti 12.21. attēlā.



12.21. attēls. *Chlorella vulgaris* 1% (Sk Ch.v.1% grupa) devas ietekme uz dējības intensitāti jaunām (31.-39. ned.v.) un pieaugušām (40. – 52 ned.v.) vistām.

Rezultāti liecina, ka kontroles grupā pirmā ola tika izdēta divas nedēļas vēlāk, nekā grupā, kura saņēma *C.vulgaris* jau pirmās pētījuma nedēļas noslēgumā. Augstāku dējības intensitāti Sk Ch.v.1% grupas vistām saglabājās pirmās četras pētījuma nedēļas (skat. 12.21. att.). Sākot no ceturktās pētījuma nedēļas dējības intensitāte kontroles grupai pieauga salīdzinoši straujāk - pirmā posma noslēgumā (astoņu nedēļu laikā) tā pieauga līdz 40%, bet Sk Ch.v.1,4% grupai tikai līdz 20%.

Sākoties otrajam posmam, dējības intensitāte Sk Ch.v.1% grupas vistām pieauga, līdz 42 nedēļu vecumā tā pārsniedz kontroles grupas rādītājus, un saglabājās augstāka līdz pat pētījuma beigām. Vidēji rēķinot dējības intensitāte šajā posmā Sk Ch.v.1% grupas vistām bija par 1% augstāka.



12.22. attēls. *Chlorella vulgaris* 1% devas ietekme uz olu masu jaunām un pieaugušām vistām.

Analizējot iegūtos rezultātus par olu masas dinamiku pētījuma abos posmos, redzam, ka tā atšķiras. Pirmajā posmā olu svars sākot no 34. nedēļas vecuma svārstījās no 61 līdz 66 gramiem, atsevišķos gadījumos Sk.Ch.v.1% grupā tika fiksētas arī 67 g smagas olas. Otrajā pētījuma posmā, lai arī atšķirība nebija statistiski būtiska, tomēr Sk.Ch.v.1% grupas vidējie olu masas rādītāji bija augstāki nekā kontroles grupai. Tātad varam secināt, ka *Chlorella vulgaris* biomasas pievienošana pie pamatbarības devā 1% var paaugstināt dējējvistu dēšanas intensitāti, atsevišķos gadījumos vidēji par 6% (skat. 12.25.tab.). Arī citi pētījumi apraksta pozitīvu *Chlorella vulgaris* ietekmi uz dējējvistu produktivitāti, kas ir pretrunīgi. Aprakstīts, ka fermentēta *Chlorella vulgaris* (CBT®) 42 dienas ilga pētījuma laikā lineāri palielināja olu ražošanas intensitāti (Zheng, 2012). Savukārt citā pētījumā ar mikroaļģes *Chlorella* biomasu papildināja dējējvistu barību (līdz 5 g/kg), rezultātā panāca olu svara pieaugumu, uzlaboja dzeltenuma krāsu un barības mikrofloru, bet bieži vien nebija būtiskas izmaiņas olu ražošanā vai barības patēriņā.

Tālāko izpēti turpināsim ar mikroaļģu ietekmes analīzi uz olu uzturvērtības rādītājiem, Viens no projekta uzdevumiem bija mikroaļģu palīdzību iegūtajā produkcijā paaugstināt polinepiesātināto taukskābju daudzumu, īpaši omega-3 taukskābju, daudzumu mājas vistu olās, lai paaugstinātu to uzturvērtību. Analīzi sāksim ar *Spirulina platensis* devu (1%, 1,5%, 3%) ietekmi

uz kopējo piesātināto taukskābju (SAFA), kopējo mononepiesātināto taukskābju (MUFA) un kopējās polinepiesātināto taukskābju (PUFA) daudzumu vistu olās. Rezultāti parādīti 12.26. tabulā.

12.26. tabula

**Taukskābju daudzums un omega-6/ omega-3 attiecība kontroles un PaSpir.p.1%;
PaSpir.p.1,5% un PaSpir.p.3% grupu dējējvistu olās.**

Rādītājs	Pa - kontrolē	Pa- <i>Spirulina platensis</i>		
		1%	1,5%	3%
palmitoleīnskābe	0,2	0,3	0,3	0,3
stearīnskābe	0,6	0,6	0,6	0,5
linolskābe (LA)	1,1	1,1	1	1,1
palmitīnskābe	2	2,3	2,2	2
oleīnskābe	3,5	4,1	3,9	3,6
Kopējās piesātinātās taukskābes (SAFA)	2,7	2,9	2,8	2,6
Kopējās mononepiesātinātās taukskābes (MUFA)	4	4,7	4,5	4,3
Kopējās polinepiesātinātās taukskābes (PUFA)	1,7	1,3	1,3	1,3
Omega-3 taukskābes	0,2	0,1	0,1	0,1
Omega-6 taukskābes	1,5	1,2	1,2	1,2
Omega-9 taukskābes	3,5	4,2	3,9	3,7
Omega-6/omega-3	7,5	12	12	12

Statistiskā analīze liecina, ka starp kontrolgrupas (CON1) un eksperimentālās grupas (PaSpir.p.1%; PaSpir.p.1,5% un PaSpir.p.3%), kurām tika pievienota trīs dažādas mikroaļģes *Spirulina platensis* biomasas devas, olu paraugos starp SAFA, MUFA, PUFA rādītājiem netika konstatētas statistiski nozīmīgas atšķirības uzturvērtības parametros (ANOVA, Tukey post hoc tests, $P > 0,05$). Atsevišķu taukskābju saturs - palmitoleīnskābe, stearīnskābe, linolskābe, oleīnskābes, palmitīnskābe, kā arī omega-3, omega-6 un omega-9 taukskābju frakciju daudzums arī būtiski neatšķīrās, lai gan nelielas svārstības tomēr novērojām. Piemēram, PaSpir.p.1% grupā bija augstāks palmitīnskābes un oleīnskābes saturs, kā arī MUFA daudzums. Jāatzīmē, ka PUFA rezultāti visām eksperimentālajām grupām bija zemāki nekā kontroles grupai. Savukārt MUFA rādītāji zemāka vērtība bija kontroles grupai, bet vērtīgās kopējās mononepiesātinātās taukskābes (MUFA) bija vairāk Spir.p.1%; Spir.p.1,5% un Spir.p.3% grupu vistu olās.

Kā jau iepriekš minējām, literatūrā aprakstīts, ka cilvēku uzturā ieteicams omega-6/omega-3 attiecība ir no 1:1 līdz 5:1, vidēja 5-6:1, bet attiecība, kas pārsniedz 9:1 nav vēlama (Simopoulos, 2001). Attiecība starp omega-6/omega-3 taukskābju daudzumā šo pētījuma grupu vistu olās zemākā attiecība bija kontroles grupai, bet PaSpir.p.1%; PaSpir.p.1,5% un PaSpir.p.3% grupu olās šī attiecība bija 12, kas cilvēku pārtikas produktos nav vēlama.

12. 27. tabula

**Taukskābju daudzums un omega-6/ omega-3 attiecība kontroles un
Chlorofila vulgaris (1%) dējējvistu olās trijos atkārtojumos.**

Rādītājs	1-Sk kon	1-Sk Ch.v 1%	KD kon	KD Ch.v. 1%	2-Sk kon	2-Sk Ch.v 1%
Palmitoleīnskābe, g	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Stearīnskābe, g	0,8	0,7	1	0,9	0,9	0,8
linolskābe (LA), g	1,3	0,9	1,2	1,3	0,7	0,8
Palmitīnskābe, g	2,2	2	2,7	2,5	2,1	2,2
Oleīnskābe, g	4	3,3	5	4,7	4,3	4
Kopējās piesātinātās taukskābes (SAFA), g	3,1	2,7	3,1	3,1	3,7	3,5
Kopējās mononepiesātinātās taukskābes (MUFA), g	4,4	3,7	4,8	4,6	5,6	5,3
Kopējās polinepiesātinātās taukskābes (PUFA), g	1,6	1,2	1	1	1,5	1,6
Omega-3 taukskābes, g	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
Omega-6 taukskābes, g	1,4	1,1	0,9	0,9	1,3	1,4
Omega-9 taukskābes, g	4	3,3	4,3	4	5	4,8
Omega-6/omega-3	7:1	5,5:1	9:1	9:1	6,5:1	7:1

Izpētot taukskābju daudzumu divās saimniecībās notikušajos trijos atkārtojumos, kur dējējvistām pie barības tika pievienota *Chlorofila vulgaris* (1%) biomasa. Konstatējām, ka statistiski būtiskas atšķirības starp iegūtajiem katras grupas rādītājiem netika konstatētas. Tomēr jāatzīmē, ka saimniecības Sk otrajā posmā notikušā pētījuma rezultātā omega-3, -6 un -9 bija augstākā līmenī nekā pārējām grupām. Šīs grupas dējējvistas *Chlorofila vulgaris* biomasu saņēma visilgāk, t.i. 6.mēnešus. Attiecība starp omega-6/omega-3 taukskābēm zemākais līmenis tika

konstatēts jaunajām dējējvistiņām, kas pie barības saņēma biomasu 3 mēnešus, bet vēl pēc 3. mēnešiem šo dējējvistu olās attiecība palielinājās, kas nav vēlamais iznākums (skat. 12.27.tab.).

Arī citi pētījumi apraksta, ka *Chlorella* pievienošana vistu barībai nemaina olās esošo holesterīna līmeni, pat ja tiek izmantota salīdzinoši liela deva (2 % un 10 %). Pētnieki konstatēja, ka holesterīna rādītāji bija līdzīgi kā kontrolgrupā (Gadzama et al., 2025). Mūsu pētījumam līdzīgā ar Lohmann Brown šķirnes vistām, tik pat ilgi 8 nedēļas barojot tās ar 2 % *Chlorella vulgaris* mikroaļģu sauso biomasu, tas neizmainīja olu holesterīna līmeni, taču uzlaboja olu dzeltenuma krāsu, ārējo kvalitāti un antioksidantu saturu (Panaite et al., 2013).

12.28. tabula

Spirulina platensis izbarošanas ieteme uz uzturvērtības rādītājiem.

Rādītāji	Mērv.	Pa kontrole	Pa Spir.p. 1%	Pa Spir.p. 1,5%	Pa Spir.p. 3%
Ogļhidrāti	g/100 g	1,7	1,4	1,7	1,4
Tauki	g/100 g	8,8	9,1	8,7	8,6
Olbaltumvielas	g/100 g	12,1	12,1	12,2	12,6
Ūdens	g/100 g	76,6	76,6	76,5	76,6
Pelni	g/100 g	0,84	0,84	0,88	0,83
Enerģētiskā vērtība	kcal/100 g	134	136	134	133
Enerģētiskā vērtība	kJ/100 g	560	566	558	556
Holesterīns	g/100 g	185	185	152	141

Analizējot *Spirulina platensis* izbarošanas ietekmi uz pārējiem uzturvielu raksturojošiem rādītājiem, redzam (skat. 12.28, tab.), ka olbaltumvielu līmenis visu grupu dējējvistu olās bija ļoti līdzīgs. Savukārt tauku līmeņa visaugstākais daudzums ir Pa Spir.p. 1% grupas vistu olās. Augstāko enerģētisko vērtību konstatējām arī šīs pašas grupas vistu olās (566 kJ/100g). Holesterīns ir viens no rādītājiem, kam tiek pievērsta uzmanība, vērtējot produktu uzturvērtību. Zemākais holesterīna līmenis ir to vistu olās, kuras saņem lielākās *S.platensis* devas.

12. 29. tabula

Chlorella vulgaris ietekme uz olu uzturvērtības rādītājiem.

Rādītājs	Mērv.	1-Sk kontrole	1-Sk Ch.v. 1%	KD kontrole	KD Ch.v. 1%	2-Sk kontrole	2-Sk Ch.v. 1%
Ogļhidrāti	g/100 g	1,5	1,7	1,5	1,5	1,0	1,3
Tauki	g/100 g	9,3	8,2	8,96	8,82	10,99	10,65
Olbaltumvielas	g/100 g	12,4	12,6	12,4	12,4	13,1	13,0
Ūdens	g/100 g	75,9	76,7	76,4	76,6	74	74,1
Pelni	g/100 g	0,82	0,81	0,78	0,88	0,92	0,99
Enerģētiskā vērtība	kcal/100 g	139	131	137	134	155	154
Enerģētiskā vērtība	kJ/100 g	580	547	569	559	647	639
Holesterīns	g/100 g	182	164	326	273	284	242

Petījumos, kuros eksperimentālajām grupām pie barības tika pievienota *C.vulgaris* biomasa, salīdzināsim kontroles grupas attiecīgos rādītājus. Ogļhidrātu līmenis visās eksperimenta *C.vulgaris* grupās bija vienāds vai augstāks nekā attiecīgajā kontroles grupā. Tā kā tauku daudzums augstākajā līmenī tika konstatēts abās Sk 2. posma dējējvistu olās, tāpēc uzskatam, ka to nosaka turēšanas un barošanas apstākļi. Holesterīna līmenis visās eksperimenta grupās bija zemāks nekā kontroles, bet pašu zemāko holesterīna rādītāju konstatējām 1-Sk Ch.v. 1% grupas dējējvistu olās (skat. 12.29. tab.).

12.30. tabula

***Spirulina platensis* izbarošanas ieteme
uz minerālvielām un vitamīniem dējējvistu olās.**

Rādītājs	Mērv.	1-Sk kontrole	1-Sk Ch.v. 1%	Pa kontrole	Pa Spir.p. 1%	Pa Spir.p. 1,5%	Pa Spir.p. 3%
NaCl	g/100 g	0,17	0,15	0,18	0,16	0,15	0,16
Na	g/100 g	0,4	0,38	0,45	0,4	0,38	0,4
Fe	mg/kg	20,2	18,7	25,1	16,1	20,9	13,4
Se	mg/kg	0,41	0,6	0,4	0,27	0,37	0,27
K	mg/kg	1150	1150	1020	1180	1290	1300
Mg	mg/kg	103	98	100	104	111	103
Trans-beta-karotīns	mg/100 g	0,006	0,0261	0,004	0,006	0,017	0,027
Vitamīns D3	µg/100g	1,182	1,358	1,57	1,207	ND	1,153
Vitamīns B12	µg/100g	3,122	2,353	1,082	0,788	ND	0,747
Holīns	mg/100 g	313	297	347	330	323	333

Salīdzinot minerālvielu rādītājus vistu olās, konstatējām, ka *Chlrella platensis* pievienošana nedeļa būtiskas izmaiņas minerālvielu un vitamīnu daudzumā. Konstatējām, ka atsevišķi rādītāji eksperimenta grupās bija augstāki. Piemēram K un Trans-beta-karotīna līmenis nemainījās vai bija augstāks visās eksperimenta grupās, 1-Sk Ch.v. 1% grupas olās bija augstākais Se līmenis.

Vistu olas ir vērtīgs minerālvielu avots, un šīs minerālvielas spēlē būtisku lomu dažādos cilvēka organisma procesos. Minerālvielas olā ir viegli uzsūcams, jo tās ir saistītas ar fosvitīnu,

ovomukoīdu un citiem dzeltenuma proteīniem, kas uzlabo uzsūkšanos zarnās. Olas arī nesatur filātus vai oksalātus, kas citos pārtikas produktos bieži samazina minerālvielu uzsūkšanos (Nys et al., 2011). Vistu olas ir bagātas ar bioloģiski aktīviem vitamīniem, īpaši taukos šķīstošo vitamīnu ziņā. Šie vitamīni piedalās daudzos būtiskos fizioloģiskos procesos — no redzes, imunitātes un nervu sistēmas darbības, līdz šūnu atjaunošanai un antioksidantu aizsardzībai. Vitamīni olās ir ļoti labi uzsūcami, pateicoties fosfolipīdiem un taukiem dzeltenumā, kas uzlabo uzsūkšanos zarnās (Ruxton et al., 2010; Nys et al., 2011).

Noslēguma secinājumi:

1. Vispārējā ietekme uz veselību un orgāniem:

- Gan *Spirulina platensis* (1%, 1,5%, 3% devās), gan *Chlorella vulgaris* (1% devā) biomasas pievienošana dējējvistu barībai neizraisīja makroskopiskas patoloģiskas izmaiņas putnu organismā pētījuma laikā. Tas ir būtisks pozitīvs rādītājs, ņemot vērā, ka liela mikroaļģu deva citos pētījumos var izraisīt negatīvas sekas.
- Kritušo putnu nāves iemesli pētījuma saimniecībā nebija saistīti ar mikroaļģu izēdināšanu.
- Putnu ķermeņa masa būtiski neatšķīrās starp grupām, kas netieši apstiprina *Spirulina platensis* nekaitīgumu putnu pašsajūtai un veselībai.

2. Ietekme uz gremošanas sistēmu:

- *Spirulina platensis* (īpaši 3% deva) veicina barības evakuāciju no dziedzerkuņģa, savukārt *Chlorella vulgaris* (1% deva) to paildzina.
- Trīs mēnešus ilga mikroaļģu biomasas izēdināšana var būtiski palielināt tievo un resno zarnu garumu, kas norāda uz lielāku barības šķelšanas un uzsūkšanās laukumu, tādējādi uzlabojot barības pārstrādi un uzņemšanu.

3. Ietekme uz olu produktivitāti un masu:

- *Dunaliella* 0,5% (DU5) un *Spirulina* 0,5% (SP5) grupas uzrādīja augstāko vidējo olu skaitu un dējības intensitāti visā pētījuma periodā.
- *Chlorella vulgaris* biomasas pievienošana pie pamatbarības devā 1% var paaugstināt dējējvistu dēšanas intensitāti, atsevišķos gadījumos vidēji par 6%. Olu vidējā masa visās grupās nebija statistiski nozīmīgi atšķirīga, kas liecina, ka uzlabotā dējība un lielāks olu skaits nenotika uz olas kvalitātes (masas) rēķina.

4. Ietekme uz olu uzturvērtību:

- Kopumā mikroaļģu biomasas pievienošana būtiski neietekmēja olu galvenos uzturvērtības rādītājus (ūdens, proteīna, pelnu, holīna, nātrija, kopējo tauku un enerģētisko vērtību).
- Omega-3, Omega-6 un Omega-9 taukskābju daudzums olās starp grupām un testēšanas nedēļām mainījās minimāli un nebija statistiski nozīmīgi.
- Tomēr visās grupās tika konstatēta augsta omega-6/omega-3 attiecība (no 7,75:1 līdz 16:1), kas būtiski pārsniedz optimālo (~5:1) cilvēka uzturā.
- Holesterīna daudzums olās kontroles grupās pētījuma gaitā samazinājās, savukārt vairākās eksperimentālajās grupās (piemēram, CV1, CV3, CV5, SP5, CV51) holesterīna līmenis palielinājās. Tikai DU5 grupā holesterīna līmenis samazinājās.

Ieteikumi praksei:

1. Produktivitātes uzlabošanai:

- Lauksaimniekiem, kuri vēlas palielināt dējējvistu olu skaitu un dējības intensitāti, ieteicams apsvērt *Dunaliella* (0,5%) vai *Spirulina* (0,5%) biomasas pievienošanu barībai.
- *Chlorella vulgaris* 1% deva var būt noderīga dējības intensitātes paaugstināšanai, īpaši jaunām vistām.

2. Gremošanas sistēmas veselībai:

- Mikroaļģu biomasas iekļaušana barībā var pozitīvi ietekmēt gremošanas orgānu attīstību, palielinot zarnu garumu un tādējādi uzlabojot barības vielu uzsūkšanos. Tas var veicināt putnu vispārējo veselību un efektivitāti.

3. Olu uzturvērtības aspekts:

- Lai gan pētījumā mikroaļģes būtiski neuzlaboja olu omega-3 taukskābju saturu vai holesterīna līmeni vēlamajā virzienā, ir svarīgi turpināt pētījumus par citām mikroaļģu sugām vai to kombinācijām, kas varētu efektīvāk uzlabot olu uzturvērtības profilu, īpaši samazinot omega-6/omega-3 attiecību un holesterīna saturu.
- Pašreizējie rezultāti liecina, ka šīs mikroaļģes galvenokārt ietekmē putnu produktivitāti, nevis olu uzturvērtību cilvēka uztura kontekstā.

4. Drošība un veselība:

- Pētījums apstiprina, ka izmantotās mikroaļģu devas ir drošas dējējvistām un neizraisa patoloģiskas izmaiņas putnu organismā, kas ir svarīgi apsvērumi to ieviešanai praksē.

Šie secinājumi un ieteikumi sniedz vērtīgu ieskatu mikroaļģu biomasas izmantošanā dējējvistu barībā, palīdzot lauksaimniekiem pieņemt informētus lēmumus par barības piedevu izmantošanu.

13. MĀJPUTNU BAROŠANA AR MIKROAĻĢĒM KĀ AUGU IZCELSMES BARĪBAS PIEDEVU SAIMNIECĪBĀS – VIZUĀLAIS MATERIĀLS

**Eksperimenta plāns mājputnu barības nodrošināšanai ar mikroaļģēm kā barības piedevu Z/s
“Skujas” Guntara Eglīša vadībā:**

Eksperimentu uzsāk 2. oktobrī 2024. gadā.

Mājputni (dējējvistas un gaiļi) tika sadalītas divās grupās:

- **N1** – tiek baroti ar Dobeles dzirnavnieka kombinēto barību bioloģiskajām saimniecībām + 1% mikroaļģu piedeva (56 gb.);
- **N2 (kontrolgrupa)** – tiek baroti ar Dobeles dzirnavnieka kombinēto barību bioloģiskajām saimniecībām (51 gb.).

Vidējais mājputnu svars:

- N1 – 1,65 kg (gaiļu/vistu attiecība 1/3);
- N2 – 1,87 kg (gaiļu/vistu attiecība 2/3).

Mājputnu turēšanas apstākļi:



13.1. attēls. Mājputnu turēšanas apstākļi N1 grupai (pa kreisi) un N2 grupai (pa labi) (Attēla autors: Guntars Eglītis).

Mājputni tika turēti uz dziļajiem pakaišiem, skujkoka ēveļskaidām un kviešu salmiem (skat. 13.1.attēlu). Tiem tika nodrošināta pieeja pastaigu laukumam (ņemot vērā laikapstākļus un grupas – vienā dienā ārā tiek tikai viena mājputnu eksperimentālā grupa). N1 grupai katru dienu barība tika papildināta ar vidēji 0,68 g mikroaļģes, kas pēc 34 dienām sastāda kopumā 2,3 kg uz 56 mājputniem. Abas putnu grupas katru dienu tika nodrošinātas ar 20 L svaigu dzeramo ūdeni (sākotnēji tas tika mainīts divas reizes dienā, bet, laikapstākļiem paliekot aukstākiem, ūdens vairs netika dienas ietvaros mainīts).

Eksperimenta novērojumi:



13.2. attēls. N1 grupas barības pārpalikumi pēc 1 h (pa kreisi) un N2 grupas ēdiena pārpalikumi pēc 1 h (pa labi) (Autors: Guntars Eglītis).

Sākotnēji var novērot, ka N1 mājputnu grupai pēc vienas stundas barība silēs redzama vēl daudz – tā tiek apēsta lēnāk (līdz nākošās dienas rītam siles ir tukšas), kas var liecināt par ātrāku sāta sajūtu vistām vai par pārejas posmu, kamēr mājputni pierod pie jaunas pārtikas piedevas. Bildē (skat. 13.2. attēlu) redzams, ka daļa barības nokrīt zemē – lai novērstu pārtikas zudumus, mājputni pāris reizes nedēļā tiek izlaisti priekštelpā, lai izbīrušo pārtiku salasītu.

SECINĀJUMI

1. Mikroaļģes ir daudzsološs risinājums vīstkopības nozares izaicinājumiem, piedāvājot augstvērtīgu uzturvielu avotu, kas var uzlabot mājputnu veselību, produktivitāti un galaproduktu kvalitāti, vienlaikus samazinot vides noslodzi.
2. No pētītajām mikroaļģu sugām *G. emersonii* izrādījās vispiemērotākā industriālai kultivācijai mikсотроfos apstākļos, īpaši ar 20% sūkalu pievienojumu, nodrošinot augstu biomasas un vērtīgo metabolītu ražu.
3. Tika izstrādātas drošas un efektīvas lipīdu frakciju ieguves metodes no mikroaļģu biomasas: Soksleta un mikroviļņu asistētā ekstrakcija, kas piemērotas lielākas ražošanas vajadzībām un saglabā augstu polinepiesātināto taukskābju saturu.
4. Mikroaļģu biomasas, īpaši *Spirulina platensis* un *Tetrademus obliquus*, iekļaušana mājputnu barībā uzlaboja gaļas uzturvērtību (zemāks tauku saturs, labvēlīgāka taukskābju attiecība, augstāks vitamīnu un olbaltumvielu saturs), nekaitējot putnu veselībai.
5. Atsevišķu mikroaļģu (piemēram, *Chlorella vulgaris* un *Dunaliella salina*) pievienošana dējējvistu barībai palielināja dēšanas intensitāti, neietekmējot olu masu vai to uzturvērtību, lai gan netika panākta būtiska omega-3 koncentrācijas palielināšanās olās.
6. Mikroaļģu izmantošana barībā jāpielāgo konkrētiem uztura mērķiem – olbaltumvielu, antioksidantu vai lipīdu profila bagātināšanai –, jo katrai mikroaļģu sugai un devai ir atšķirīga ietekme uz putnu produktivitāti un galaproduktu sastāvu.
7. Pētījuma rezultāti veido pamatu mikroaļģu pielietošanai mājputnu barībā industriālā mērogā, īpaši uzsverot *G. emersonii* kultivācijas potenciālu un nepieciešamību turpināt procesu optimizāciju, lai sasniegtu vēl augstāku uzturvērtību un ekonomisko izdevīgumu.

PUBLICITĀTES PASĀKUMI

Zinātniskās publikācijas *SCOPUS* rakstos (skat. 1. pielikumu)

- Publikācijas iesniegums. Apse, O. J., Neiberts, K., Sukaruka, S., Tumpelis, T., & Semjonovs, P.* (n.d.). Effects of mixotrophic and heterotrophic cultivation of microalgae on whey and lactose containing substrates on biomass productivity and content of lipids. Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, Faculty of Medicine and Life Science, University of Latvia.

Dalības starptautiskajās konferencēs (skat. 2. pielikumu)

- Neiberts, K., Semjonovs, P. (2024). Mixotrophic cultivation of microalgae in whey medium for poultry diet supplementation with microalgal biomass. Ziņojums prezentēts 82. Latvijas Universitātes Starptautiskajā zinātniskajā konferencē, Bioloģijas institūts, Rūpnieciskās mikrobioloģijas un pārtikas biotehnoloģijas laboratorija, Latvijas Universitāte.
- Apse, O. J., Neiberts, K., Ilgaza, A., Freiberga, A., Gorbacevska, D., Jonova, S., Semjonovs, P. (2024). Microalgae as a source of lipids and OMEGA-3, fatty acids for enhancement of poultry diet. Ziņojums prezentēts konferencē AlgaEurope 2024, Atēnas, Grieķija. University of Latvia, Faculty of Medicine and Life Science, Institute of Biology, Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology; Latvia University of Life Sciences and Technologies, Faculty of Veterinary Medicine.
- Neiberts, K., Apse, O. J., Semjonovs, P. (2025, februāris). Utilizing cheese whey for mixotrophic cultivation of microalgae *Graesiella emersonii*: Improving lipid and omega-3 polyunsaturated fatty acid content in poultry diets. Ziņojums prezentēts Latvijas Universitātes 83. starptautiskās zinātniskās konferences sekcijā “Inovatīvā un lietišķā pētniecība bioloģijā”, Rīga, Latvija.
- Ilgaza, A., Freiberga, A., Jonova, S., Gorbacevska, S., Ilgazs, A., Plivca, A., Sukaruka, S., Tumpelis, T., Apse, O. J., Neiberts, K., Semjonovs, P. (2025). Effects of the microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* in the diet of laying hens on the stress tolerance, the productivity and the nutritional value of the eggs. Ziņojums prezentēts 3rd EAAP Regional Meeting 2025 – Animal Production in the Changing World, Jelgava & Rīga, Latvija.

- Freiberga, A., Ilgaza, A., Jonova, S., Eglīte, S., Gorbacevska, D., Nuksa, K., Apse, O. J., Neiberts, K., Semjonovs, P. (2025, April 9–11). The effect of different types of edible microalgae on health, production performance and meat quality parameters in broiler chickens [Theatre presentation, 3rd EAAP Regional Meeting 2025]. European Federation of Animal Science (EAAP), Krakow, Poland. p. 74, theatre 5.

Zinātniskie darbi (skat. 3. pielikumu)

- Kristapa Neiberta (2024) maģistra darbs “Siera sūkalu ietekme uz mikroaļģu miksotrofās kultivācijas gaitu un to biomasas sastāvu”, Latvijas Universitāte Medicīnas un dzīvības zinātņu fakultāte;
- Oto Jēkaba Apses (2024) kursa darbs “Pazeminātas kultivācijas kultivācijas temperatūras ietekme uz polinepiesātināto taukskābju, lipīdu un citu komponentu saturu mikroaļģu biomasā”, Latvijas Universitāte Medicīnas un dzīvības zinātņu fakultāte.
- Oto Jēkaba Apses (2025) bakalaura darbs “Miksotrofās kultivācijas ietekme uz mikroaļģu biomasas sastāvu siera un biezpiena sūkalās”, Latvijas Universitāte Medicīnas un Dzīvības Zinātņu Fakultāte, Molekulāro Dzīvības Zinātņu, Mikrobioloģijas un Biotehnoloģijas nodaļa.
- Guna Skuja (2023) Zinātniski pētnieciskais darbs “Sūkalu izmantošana kā mikroaļģu augšanas barotne”, Rīgas Valsts 1. ģimnāzija.

Komunikācija ar sabiedrību (skat. 4. pielikumu)

- Dalība 2024. gada Zinātnieku naktī, kur Kristaps Neiberts, Oto Jēkabs Apse un Tomass Tumpelis viesus iepazīstināja ar mikroaļģu kultivāciju, dažādiem plūsmas fotobioreaktoriem, mikroaļģu ekstrakcijas metodēm un citām ar botehnoloģiju saistītām darbībām un iekārtām.

Informācija tīmeklī (skat. 4. pielikumu)

- Latvijas Putnkopības Asociācija 2024. gada 4. oktobrī savā mājaslapā publicēja informāciju par Sadarbības projektu. Ar pieredzi dalījās arī “Pakalni” saimniece Laura Logina-Lucava. Ar pieredzi dalījās arī bioloģiskās ZS Skujas saimnieks Guntars Eglītis no Vaidavas pagasta. Pieejams: <https://www.majputni.lv/2024/10/04/augu-izcelsmes-omega-3-baribas-piedevas-putniem/>

PIELIKUMI

1. PIELIKUMS

Zinātniskā publikācija *SCOPUS* žurnālā

Effects of mixotrophic and heterotrophic cultivation of microalgae on whey and lactose containing substrates on biomass productivity and content of lipids

Oto Jekabs Apse, Kristaps Neiberts, Santa Sukaruka, Tomass Tumpelis, Pavels Semjonovs*

***Corresponding author: pavels.semjonovs@lu.lv**

Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology of the Faculty of Medicine and Life Science, University of Latvia, Ojara Vācijas Street 4, LV - 1004, Latvia

Abstract

The dairy industry produces large volumes of whey, a nutrient rich by-product that is a threat to the environment because of a high lactose concentration. In this research, a potential of four microalgae strains – *Tetrademus obliquus* OM02, *Graesiella emersonii* KM01, *Chlorella vulgaris* CCAP 211/111 and *Scenedesmus quadricauda* CCAP 276/16 has been investigated to evaluate their growth under heterotrophic and mixotrophic conditions of lactose and its monosaccharides, with an emphasis on biomass and lipid production in the local isolates - *G. emersonii* KM01 and *T. obliquus* OM02 on acid (AW) and sweet whey (SW) at various medium concentrations and temperatures (15 °C and 25 °C). Mixotrophic cultivation in SW enhanced biomass productivity, with *G. emersonii* KM01 achieving 0.30 g/L/d and *T. obliquus* OM02 0.29 g/L/d at the optimal temperature (25 °C). The highest lipid accumulation was observed in mixotrophic conditions for *G. emersonii* KM01 in SW at a suboptimal temperature (15 °C), reaching 158.31% more than in the autotrophic control. β – galactosidase activity correlated with lactose assimilation for *G. emersonii* KM01, suggesting that it is suitable for cultivation on whey substrates. The results confirm the ability of microalgae to grow on SW, and on AW, as sustainable substrate for biomass and lipid production.

2. PIELIKUMS

Dalība konferencēs



Mixotrophic cultivation of microalgae in whey medium for poultry diet supplementation with microalgal biomass

Authors: Kristaps Neiberts, Pāvels Semjonovs

Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, University of Latvia

Contacts: kristaps.neiberts@lu.lv

ABSTRACT

Just as global human population is increasing every day, the demand for variety of different goods also increases. To be able to deliver enough goods for human society, we need to expand research not only on land, but also in freshwater and saltwater bodies. There is an aquatic group of microorganisms that is drawing favourable attention of scientists – microalgae.

Poultry farming has a great impact on delivering human diet with eggs and meat. To have high quality eggs and meat, high-quality diet should be provided for poultry, which is rich in lipids, polyunsaturated fatty acids, proteins, vitamins, complex carbohydrates, and other functional compounds.

Microalgae are microorganisms that can be used to fulfil those requirements. It has been shown that, to increase microalgae biomass yield, it is possible to cultivate microalgae mixotrophically in whey medium. Besides, by cultivation in whey medium there can be seen decrease in ecological impact of improper disposals, as whey considerably composes most important part of dairy processing by-products. But not all microalgae are able to consume lactose, which is the main sugar in whey. So there needs to be found microalgal strains which are able to consume lactose as additional carbon source during mixotrophic cultivation.

In this research have been obtained environmental isolates and microalgal strains have been screened for lactose assimilation properties. Isolated strains have been identified as *Graesiella emersonii* and *Tetrademus obliquus* as well as unidentified isolate X1, and compared with *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11 as commercially already widely used microalgae and other cultures - *Scenedesmus quadricauda* CCAP 276/16, *Chromochloris zofingiensis* CCAP 211/14, *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919. Heterotrophic growth pattern of *G. emersonii* and *T. obliquus* showed highest biomass yield compared to other evaluated microalgal cultures when grown in presence of lactose, however *C. zofingiensis* showed greater biomass yield as compared to *G. sulphuraria*, which could be related to higher *lacZ* gene activity. By performing further mixotrophic growth experiments in whey, both environmental isolates and *C. zofingiensis* showed higher biomass productivity then in photoautotrophic control. Results confirm that during mixotrophic growth in whey it is possible to obtain a higher biomass yield then during photoautotrophic cultivation.

In further experiments optimisation of whey media should be performed to obtain greater impact of mixotrophic cultivation on selected microalgal strains biomass productivity and yield. As well as it should be evaluated further whether changes in media composition can also provoke the changes in microalgal biomass composition.

Key words: microalgae, *Graesiella emersonii*, *Tetrademus obliquus*, whey, mixotrophic cultivation

This study was performed within the project “Development of plant origin feed supplement for strengthening poultry immunity and increasing nutritional value of eggs with omega-3 fatty acids (grant Nr.: 22-00-A01612-000015) co-financed by European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) and supported by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia.

MIXOTROPHIC CULTIVATION OF MICROALGAE IN WHEY MEDIUM FOR POULTRY DIET SUPPLEMENTATION WITH MICROALGAL BIOMASS

Authors: Kristaps Neiberts, Pavels Semjonovs

Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, University of Latvia



Introduction

Just as global human population is increasing every day, the demand for variety of different goods also increases. To be able to deliver enough goods for human society, we need to expand research not only on land, but also in freshwater and saltwater bodies. There is an aquatic group of microorganisms that is drawing favourable attention of scientists – microalgae.

Poultry farming has a great impact on delivering human diet with eggs and meat. To have high quality eggs and meat, high-quality diet should be provided for poultry, which is rich in lipids, polyunsaturated fatty acids, proteins, vitamins, complex carbohydrates, and other functional compounds.

Microalgae is the microorganism that can be used to fulfil those requirements. It has been shown that, to increase microalgae biomass yield, it is possible to cultivate microalgae mixotrophically in whey medium. Besides, by cultivation in whey medium it is able to decrease ecological impact of improper disposals, as whey considerably composes most important part of dairy processing by-products. But not all microalgae are able to consume lactose, which is the main sugar in whey. So there needs to be found microalgal strains which are able to consume lactose as carbon source during mixotrophic cultivation.



Figure 1. Heterotrophic growth of microalgae.

Results

In this research have been obtained environmental isolates and microalgal strains screened for lactose assimilation properties. Obtained isolates have been identified as *Graesiella emersonii* and *Tetrademus obliquus* as well as unidentified isolate X1. Compared to *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11 as commercially already widely used microalgae and other cultures - *Scenedesmus quadricauda* CCAP 276/16, *Chromochloris zoffingensis* CCAP 211/14, *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919. Heterotrophic growth pattern of *G. emersonii* and *T. obliquus* showed great biomass yield when grown in presence of lactose. Respectively 0.21 ± 0.007 g/L and 0.08 ± 0.004 g/L. But *C. zoffingensis* showed greater biomass yield 0.29 ± 0.05 g/L, which could be related to higher *lacZ* gene activity.

By comparing results of *G. emersonii*, *T. obliquus* and *C. zoffingensis* to other strains, all of them showed significantly ($p < 0.05$) higher biomass yield compared to other as well as between each other.

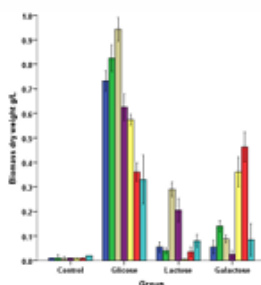


Figure 2. Heterotrophic growth of *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, *Chromochloris zoffingensis*, *Graesiella emersonii*, unidentified isolate X1, *Galdieria sulphuraria* and *Tetrademus obliquus* in glucose, lactose and galactose media compared to control without any sugars.

By performing further mixotrophic growth experiments in whey, both environmental isolates and *C. zoffingensis* showed higher biomass productivity than in photoautotrophic control.

Results show, that each of the microalgae strains have had their optimal whey concentration in which is possible to achieve the highest biomass yield. For *G. emersonii* optimal whey concentration was 20% and at this concentration 1.94 ± 0.04 g/L biomass has been harvested. As for *T. obliquus* the optimal whey concentration was found to be 50%, it was able to reach biomass yield of 2.84 ± 0.06 g/L. For the *C. zoffingensis* the optimal whey concentration was found to be 6.5%, in which it is able to reach 0.73 ± 0.08 g/L. All of the obtained results are significant ($p < 0.05$).

By comparing results of the three microalgae strains, most promising one for achieving high biomass yield, thus also for decreasing environmental impact of improper whey utilisation was shown to be *T. obliquus*. *G. emersonii* and *C. zoffingensis* can be considered as relatively slow growing microalgae which not exceed results of *T. obliquus*.

Results confirm that during mixotrophic growth in whey it is possible to obtain a higher biomass yield than during photoautotrophic cultivation, which can be attributed to whey composition. There are different sugars, mainly lactose, but also glucose, galactose and traces of other sugars that microalgae can potentially use as an additional carbon source. Besides there are minerals and other growth promoting factors in whey that could contribute for higher biomass yield.

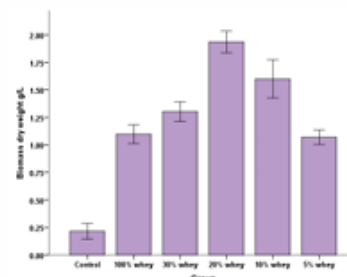


Figure 3. *G. emersonii* growth in different whey concentration diluted with distilled water.

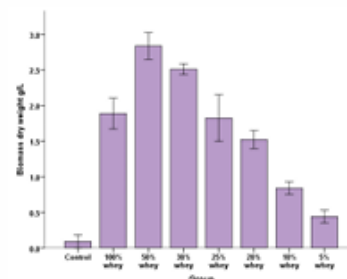


Figure 4. *T. obliquus* growth in different whey concentration diluted with distilled water.

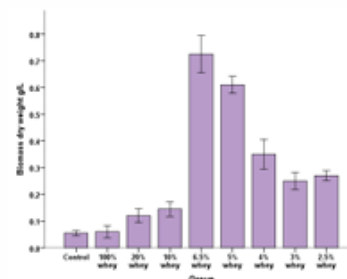


Figure 5. *C. zoffingensis* growth in different whey concentrations diluted with distilled water.

Conclusion

In further experiments optimisation of whey media should be performed to obtain greater impact of mixotrophic cultivation on selected microalgal strains biomass productivity and yield. As well as it should be evaluated further that changes in media composition can also provoke the changes in microalgal biomass composition.

This study was performed within the project "Development of plant origin feed supplement for strengthening poultry immunity and increasing nutritional value of eggs with omega-3 fatty acids (grant Nr.: 22-00-A01612-000015) co-financed by European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) and supported by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia.

ALGÆEUROPE 2024

10-13 • DECEMBER • ATHENS

Microalgae as a source of lipids and omega-3 fatty acids for enhancement of poultry diet

Authors: Apse O. J., Neiberts K., Ilgaza A., Freiberga A., Gorbacevska D., Jonova S., Semjonovs, P.

University of Latvia, Faculty of Medicine and Life Science, Institute of Biology, Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Riga, Latvia.

Latvia University of Life Science and Technologies, Faculty of Veterinary Medicine, Jelgava, Latvia.

ABSTRACT

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) have a positive impact on human and poultry physiological processes. Their intake has a beneficial effect on the nervous system, they act as an antioxidant and prevent cardiovascular diseases by improving metabolic processes and productivity indicators (Perdana et al., 2021). Until now eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are classified as most potent Omega-3 fatty acids, have been mainly obtained from marine (fish) sources. In the last years there have been raising concerns about decrease of marine resources, and the presence of heavy metals in fish (Adarme-Vega et al., 2012).

Hence, microalgae can synthesize PUFA, and their productivity are dependent on the cultivation conditions. Microalgae can grow quickly and could be an environmentally friendly alternative source of Omega-3 fatty acids as well as other bioactive substances (Jiru et al., 2021). It has been reported that microalgae are capable of synthesizing significant amounts of EPA and DHA when growing under autotrophic, mixotrophic or heterotrophic conditions (Adarme-Vega et al., 2012). Biomass or extracted PUFA can be successfully incorporated into food or poultry diet. It has been reported, that microalgal fatty acids, especially high content of Omega-3 fatty acids could

strengthen bird immunity and increase the nutritional value of eggs or meat when microalgae are added to broiler chicken diet (Mens et al., 2022b., Mahendra et al., 2023).

Used microalgae's where environmental isolates of *Graesiella emersonii* KM01 and *Tetrademus obliquus* OM02 and *Scenedesmus quadricauda* CCAP 276/16, which have shown a significant increase in biomass, lipids and PUFA concentration when grown under mixotrophic conditions in presence of 50 g/L lactose. All assayed strains showed the ability to grow under mixotrophic conditions, however *G. emersonii* showed higher biomass (g/L) with glucose as co-substrate by 89,45% then in the autotrophic control and higher β – galactosidase activity between strains on lactose. And therefore, has been directed for further research on enhancement of biomass productivity. In research with domestic chickens (*Gallus gallus*), it was found that different species of microalgae have different effects on the quantitative and qualitative indicators of poultry eggs and meat.

Founded within the EAFRD grant Nr. 22-00-A01612-000015.

Keywords: Microalgae, poultry, *Scenedesmus quadricauda*, *Tetrademus obliquus*, *Graesiella emersonii*, mixotrophic cultivation, polyunsaturated fatty acids.



MICROALGAE AS A SOURCE OF LIPIDS AND OMEGA-3 FATTY ACIDS FOR ENHANCEMENT OF POULTRY DIET

¹Apse O. J., ¹Neiberts K., ¹Ilga A., ²Freiberga A., ²Gorbacevska D., ²Jonova S., ³Senjonevs P.

¹University of Latvia, Faculty of Medicine and Life Science, Institute of Biology, Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Riga, Latvia

²Latvia University of Life Science and Technologies, Faculty of Veterinary Medicine, Jelgava, Latvia



Introduction

Omega-3 fatty acids are essential components for higher eukaryotes because of their significance in health maintenance. Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are the main fatty acids belonging to this group of bioactive compounds. Consumption of Omega-3 fatty acids can improve central nervous system development and ensure proper brain function. Until now EPA and DHA have been mainly obtained from fish sources. However, in the last years fish resources have been declining dramatically. Furthermore, the presence of heavy metals (mercury, lead, copper) can have an adverse effect on consumers.

Since microalgae can grow fast and synthesize polyunsaturated fatty acids (PUFA), they can become an important potential Omega-3 fatty acid producer in the future. However, there are still many challenges that should be considered, for example optimal growth temperature, growth conditions and microalgal species. Biomass and extracted PUFA can be successfully incorporated into food or poultry diet. It has been reported that microalgal fatty acids could strengthen bird immunity and increase the nutritional value of eggs or meat when added to broiler chicken diet.

The main objective of this study was to find a suitable strains and growth conditions to improve biomass, lipids and PUFA content in microalgal biomass.

Methods

Microalgal cultivation: Autotrophic cultivation was carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL 3N-BBM-V medium (90 mL medium + 10 mL inoculum) at 5-25°C. For mixotrophic cultivation 100 mL media was used (20% or 50% cheese whey, pH7) and grown at 15°C and 25°C. All strains were cultivated in two phase mode. Cultivation followed a 16 h: 8 h day: night cycle with light intensity of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in orbital shaker.

Microalgal cultures: *Scenedesmus quadricauda* CCAP 276/16, *Tetraselmis obliquus* OMD2, *Gracilariopsis lemaneiformis* KM01, *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11.

Detection of lipids: Folch method was used for lipid extraction [Folch et al., 1957].

Detection of glucose: For glucose concentration estimation, the D-glucose assay procedure K-GLUC 08/18 GOPOD-format (ENRR) enzymatic determination reagent kit was used.

Detection of Lactose and galactose: For determining the concentration of lactose and galactose, the Lactose and D-galactose (Rapid) assay procedure K-LACGAR 03/20 (ENRR) kit was used.

Detection of PUFA content in the biomass: Method is based on fatty acid peroxidation and the initiation of this reaction with thiobarbituric acid (Yagi, 2003). Fatty acid peroxidation is carried out with the help of the enzyme lipooxygenase (MacGee, 1959) following the extraction of lipids using Folch method.



Figure 1. Chicken in outdoor conditions.

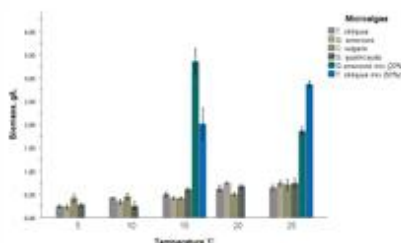


Figure 2. Comparison of microalgae *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris* and *Tetraselmis obliquus* autotrophic and mixotrophic cultivation at 20% (*G. lemaneiformis*) and 50% (*T. obliquus*) cheese whey media at different temperatures after 10-day cultivation (5, 10, 15, 20, 25 °C).

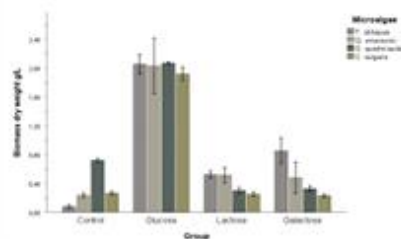


Figure 3. Mixotrophic growth of *Tetraselmis obliquus*, *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* in glucose, lactose and galactose supplemented media (20-6000 g/L), compared with control without added sugars after 10-day cultivation at suboptimal temperature (15 °C).

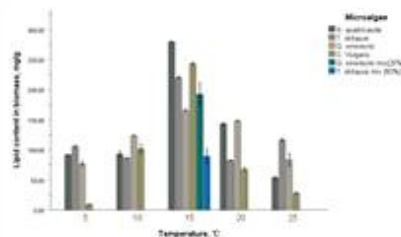


Figure 4. Comparison of lipid content (mg/g) in the biomass of *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* after 10-day autotrophic cultivation at different temperatures (5, 10, 15, 20, 25 °C) in the 3N-BBM-V media and mixotrophic cultivation of *Tetraselmis obliquus* (50%) and *Gracilariopsis lemaneiformis* (20%) at 15°C in cheese whey.

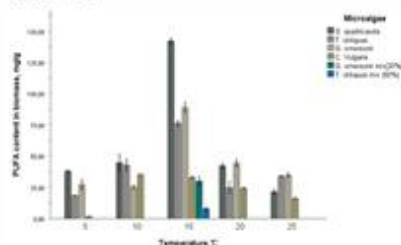


Figure 5. Comparison of PUFA content (mg/g) in the biomass of *Gracilariopsis lemaneiformis*, *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* after 10-day autotrophic cultivation at different temperatures (5, 10, 15, 20, 25 °C) in the 3N-BBM-V media and mixotrophic cultivation of *Tetraselmis obliquus* (50%) and *Gracilariopsis lemaneiformis* (20%) at 15°C in cheese whey.

Results

Autotrophic cultivation of *G. lemaneiformis*, *T. obliquus*, *S. quadricauda* and *C. vulgaris* was compared with mixotrophic cultivation of *G. lemaneiformis* and *T. obliquus* at suboptimal temperature 25°C and stress induced temperature 15°C. *G. lemaneiformis* was cultivated at 20% whey concentration and *T. obliquus* at 50% whey concentration. Results showed a significant increase in biomass (DW) when cultivated mixotrophically, where *G. lemaneiformis* reached 3.41 ± 0.07 g/L at 15°C and *T. obliquus* reached staggering 2.87 ± 0.03 g/L at 25°C. However, when grown autotrophically these results reached only 0.42 ± 0.01 g/L for *G. lemaneiformis* at 15°C and 0.6 ± 0.08 g/L for *T. obliquus* at 25°C. Microalgae *T. obliquus* and *G. lemaneiformis* were selected because of their ability to grow on lactose.

Further experiments mixotrophically in different sugars showed that *S. quadricauda*, *T. obliquus*, *C. vulgaris* and *G. lemaneiformis* had the ability to grow on glucose and reach significant amount of biomass. However, *G. lemaneiformis* isolate showed higher biomass yield on glucose (2.03 ± 0.24 g/L) than other isolates. Not all strains showed the ability to grow on lactose, whereas *T. obliquus* (0.52 ± 0.03) and *G. lemaneiformis* (0.51 ± 0.06) could reach higher biomass g/L and use lactose as substrate. Between lactose strains *G. lemaneiformis* had the highest β -galactosidase activity.

Additionally, significant increase in lipid and PUFA content was observed at 15°C when cultivated autotrophically at different temperatures (5, 10, 15, 20, 25 °C). At 15°C *S. quadricauda*, *C. vulgaris* and *T. obliquus* reached the highest lipid content ($p < 0.05$), however only *S. quadricauda* and *T. obliquus* had the ability to produce large amounts of PUFA in biomass, where *S. quadricauda* reached 142.31 ± 0.78 mg/g and *T. obliquus* estimated to 76.48 ± 0.97 mg/g. Two microalgal strains (*T. obliquus* and *G. lemaneiformis*) were grown mixotrophically on cheese whey at different concentrations (20%, 50%) to compare content of lipid and PUFA in biomass (mg/g) at 15°C. Interestingly *G. lemaneiformis* reached 192.93 ± 7.57 mg/g which is 27.15 ± 6.99 mg/g higher than in autotrophic cultivation. However, PUFA content in biomass was 59.8 ± 1.01 mg/g higher in autotrophic cultivation.

Results confirm that cultivation autotrophically and mixotrophically at lower temperature can positively affect lipid content in biomass, however not all microalgal strains showed the ability to produce PUFA at the same temperature. Which can be attributed to suboptimal temperature and whey concentration as a growth factor, that can affect metabolite synthesis mechanisms.

Conclusion

Mixotrophically grown microalgae strains (*G. lemaneiformis* and *T. obliquus*) on cheese whey reached higher biomass yield than in autotrophic cultivation at suboptimal temperature (25°C) and stress induced low temperature (15°C). From both strains highest lipid yield reached *G. lemaneiformis* at 15°C in cheese whey concentration of 20%, however PUFA content was highest in autotrophic cultivation for both strains. To reach higher PUFA concentration in mixotrophic conditions, cheese whey media composition should be optimized. Hence, for further microalgal growth and incorporation in domestic chickens *G. gallus* diet, biomass of *G. lemaneiformis* mixotrophically, and *S. quadricauda* grown in autotrophic conditions at 15°C should be considered, because of the ability of these microalgae to reach high biomass, lipid yield and PUFA concentration in the biomass.

This study was performed within the project "Development of plant origin feed supplement for strengthening poultry immunity and increasing nutritional value of eggs with omega-3 fatty acids" (grant Nr. 22-00-A01612-000015) co-financed by European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) and supported by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia.



O9: UTILIZING CHEESE WHEY FOR MIXOTROPHIC CULTIVATION OF MICROALGAE *GRAESIELLA* *EMERSONII*: IMPROVING LIPID AND OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACID CONTENT IN POULTRY DIETS

Kristaps Neiberts*, Oto Jēkabs Apse, Pāvels Semjonovs

Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, Institute of Biology, FMLS, University of Latvia, Rīga,
Latvija

* Corresponding author. Email: kristaps.neiberts@lu.lv

Photoautotrophic cultivation is the most common method for large-scale microalgal growth. However, this process has some limitations, including long cultivation and low cell productivity due to self-shading at the end of growth (J. Wang et al., 2014). Hence, mixotrophic cultivation method overcomes these drawbacks by combining photosynthesis and organic carbon uptake offering shorter cultivation periods with higher growth rates. This approach minimises self-shading effects and photo limitation by utilising both light and organic compounds as energy source. For instance, dairy wastewater has been utilised as both an energy and a carbon source under mixotrophic conditions to support the growth of various microalgae species, such as *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides*, *Haematococcus pluvialis*, *Scenedesmus obliquus*, *Dunaliella salina* and *Arthrospira platensis* (De Andrade et al., 2022).

Lactose is the main component of cheese whey (CW), contributing to a high chemical oxygen demand (COD) 80–40 g L⁻¹ and biological oxygen demand (BOD) 30–50 g L⁻¹. If not properly managed, CW's high organic content can cause environmental pollution. However, its carbon, nitrogen, and phosphorus content make it a potential substrate for microalgal growth. Effective utilisation requires microalgae capable of metabolising lactose as an organic carbon source (De Andrade et al., 2022). As microalgae are rich in pigments, lipids, polyunsaturated fatty acids, polysaccharides, vitamins, and other compounds, it is essential to determine the cost-effective cultivation method (Ibrahim et al., 2023).

Mixotrophic cultivation combines autotrophic and heterotrophic cultivation methods and has a great option to cut cultivation costs. It has been documented that, in contrast to the cultivation under autotrophic conditions, the cultivation of microalgae under mixotrophic conditions generally improved growth rates, biomass, and other high-value products (Youssef et al., 2024). For instance, in our study, microalgae *Graesiella emersonii* KM01 grown mixotrophically on cheese whey reached 184.16 ± 5.75 mg/g of lipids compared with autotrophic growth, whereas it was estimated only to 102.10 ± 1.27 mg/g.

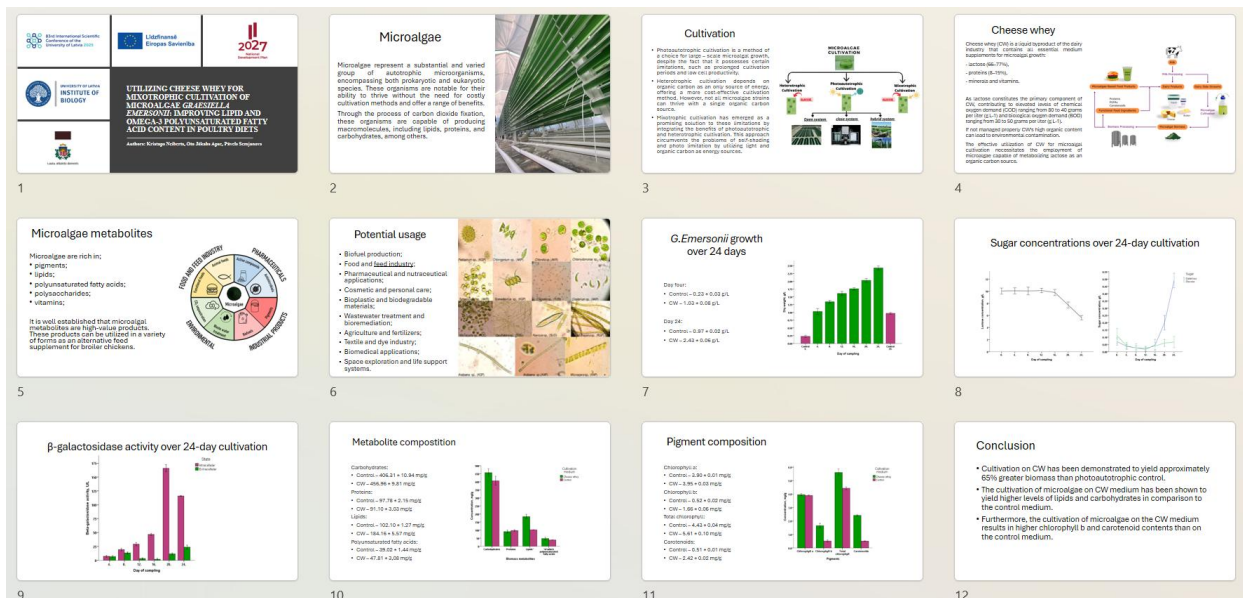
Microalgal biomass and metabolites are high-value products that serve as alternative feed supplements for broiler chickens due to their rich lipid and Omega-3 fatty acid content. Feeding microalgal biomass can improve body weight and enrich eggs with Omega-3 fatty acids (Abdel-Wareth et al., 2024).

Keywords: microalgae, *Graesiella emersonii*, lipids, biomass, poultry diet

Acknowledgements: this study was co-financed by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD) and supported by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia, grant No. 22-00-A01612-000015.

References

1. Abdel-Wareth AaA, Williams AN, Salahuddin M, Gadekar S, Lohakare J. Algae as an alternative source of protein in poultry diets for sustainable production and disease resistance: present status and future considerations. *Front Vet Sci.* 2024;11:1382163.
2. Youssef AM, Gomaa M, Mohamed AKSH, El-Shanawany AA. Enhancement of biomass productivity and biochemical composition of alkaliphilic microalgae by mixotrophic cultivation using cheese whey for biofuel production. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2024;31:42875–88.
3. De Andrade AF, Da Costa e Silva PE, De MeloRG, do Nascimento Ferreira MP, Porto ALF, Bezerra RP. Microalgal production under mixotrophic conditions using cheese whey as substrate. *Biol Sci.* 2022;44:8.
4. Wang J, Yang H, Wang F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;172:3307–29.
5. Ibrahim TNBT, Feisal NAS, Kamaludin NH, et al. Biological active metabolites from microalgae for healthcare and pharmaceutical industries: A comprehensive review. *Bioprocess Technol.* 2023;372:128661.





Effects of the microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* in the diet of laying hens on the stress tolerance, the productivity and the nutritional value of the eggs

Authors: A. Ilgaza¹, A. Freiberga¹, A. Plivca¹, S. Jonoval¹, D. Gorbacevskal¹, A. Ilgazs¹, T. Sukaruka², T. Tumpelis², O. J. Apse², K. Neiberts², P. Semjonovs²

¹ Latvia University of Life Science and Technologies, Faculty of Veterinary Medicine, K. Helmana st. 8, LV3004 Jelgava, Latvia,

² University of Latvia, Institute of Biology, Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology of Biology, O. Vaciesa st. 4, LV-1004 Riga, Latvia.

ABSTRACT

The microalgae have been shown to improve the composition of feed intake, which has an impact on bird health and increases the nutritional value of eggs. In the scientific literature, the amount of *Chlorella vulgaris* to be added to the diet varies from 0.001% to 10%. The aim of study was to determine whether supplementing the diet of laying hens with 0.1%, 0.3% or 0.5% of the microalgae *Chlorella vulgaris* affects their health, stress resistance, egg production and nutritional parameters. In a trial 47 weeks old Lohman Brown laying hens were divided into 4 equal (n=21) groups: control CON and CV1; CV3; CV5, fed with 0.1%, 0.3% or 0.5% *Chlorella vulgaris* biomass and the basal diet. After 4 and 8 weeks we evaluated health, stress resistance, FCR, egg production indicators and nutritional value (SAFA, MUFA, PUFA, omega-3; -6; -9, fatty acids, cholesterol, choline etc.). Results show, that laying hens in groups CV3 and CV5 were more resistant to stress than in CON, CV1. The number of eggs per hen was higher in groups CV3 and CV5 than in CON. In the CV3 and CV5 groups, the amount of choline, palmitic acid, oleic acid, SAFA, MUFA and energy in the eggs increased as early as week 4 after the addition of microalgal biomass to the diet, but after 8 weeks the CV5 group showed an increase in protein and cholesterol

levels, but these differences were not significant. In general, it can be concluded that supplementation with *Chlorella vulgaris* microalgae at 0.3% and especially at 0.5% improved the performance of laying hens, but the nutritional value of the eggs was not convincingly affected.

Acknowledgements: Project "Development of a plant feed additive for strengthening poultry immunity and increasing the nutritional value of eggs with omega-3 fatty acids" (grant No.: 22-00-A01612-000015), EAFRD, the Ministry of Agriculture and the Rural Support Service of Latvia.

Effects of the microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* in the diet of laying hens on the stress tolerance, the productivity and the nutritional value of the eggs

A. Ilgaza, A. Freiberga, S. Jonova, S. Gorbacevska, A. Ilgaza, A. Plivca, S. Sukaruka, T. Tumpelis, O. J. Apse, K. Neiberts, P. Semionovs



LBTU, Faculty of Veterinary Medicine, K. Helmana street 8, LV-3004 Jelgava, Latvia,
LU, Institute of Biology, O. Vaciņa street 4, LV-1004 Riga, Latvia
Aija.ilgaza@lbtu.lv anete.freiberga@lbtu.lv



UNIVERSITY OF LATVIA
INSTITUTE OF
BIOLOGY

The fatty acids, minerals, lipids and vitamins contained in the microalgal biomass have been shown to improve the composition of feed intake, which has an impact on bird health and increases the nutritional value of eggs. In the scientific literature, the amount of *Chlorella vulgaris* to be added to the diet varies from 0.001% to 10%.

The aim of our study was to determine whether supplementing the diet of laying hens with 0.1%, 0.3% or 0.5% of the microalgae *Chlorella vulgaris* affects their health, stress resistance, egg production and nutritional parameters.

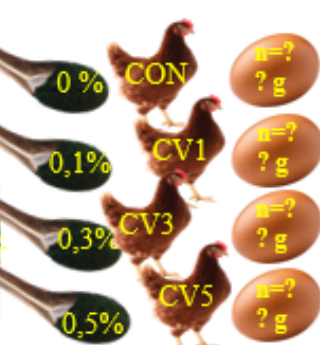
Materials and methods



Chlorella vulgaris bioreactors



Chlorella vulgaris biomass



After 4 and 8 weeks

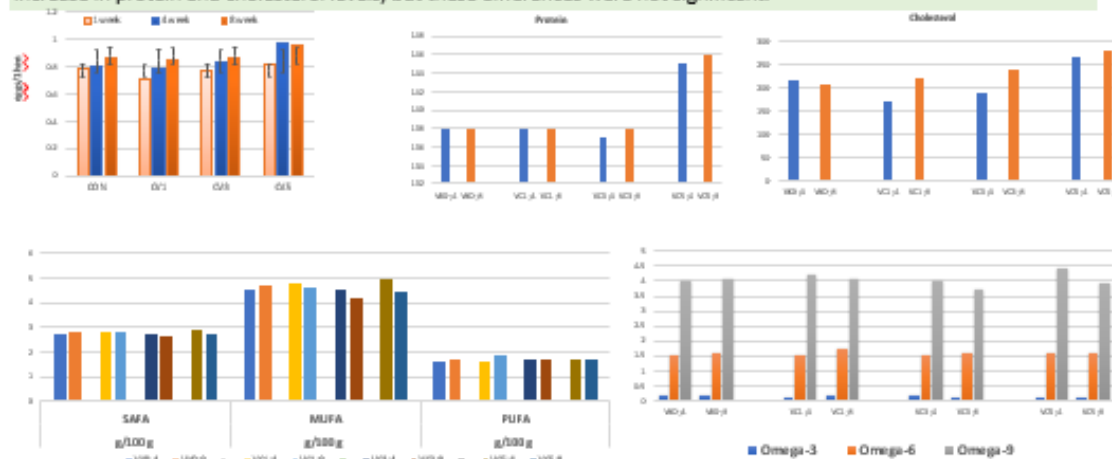
Hens:
health, FCR,
stress resistance

Eggs:
production indic.,
nutritional value:
SAFA, MUFA, PUFA,
omega-3; -6; -9,
fatty acids,
cholesterol,
choline, etc.

In the **first phase** of the project, a mixotrophic and autotrophic algae cultivation method was tested for increased polyunsaturated fatty acids (PUFA) production and their extraction from microbial biomass to improve the quality of bird feed.

In the **second phase** of the project 47 weeks old Lohman Brown laying hens were divided into 4 equal (CON, CV1, CV2,3, CV5; n=21) groups fed with 0.1%, 0.3% or 0.5% *Chlorella vulgaris* biomass added to the basal diet.

Results show, that laying hens in groups CV3 and CV5 were more resistant to stress than in CON and CV1. The number of eggs per hen was higher in groups CV3 and CV5 than in CON, but the average egg weight tended to decrease. In the CV3 and CV5 groups, the amount of choline, palmitic acid, oleic acid, SAFA, MUFA and energy in the eggs increased as early as week 4 after the addition of microalgal biomass to the diet, but after 8 weeks the CV5 group showed an increase in protein and cholesterol levels, but these differences were not significant.



Can be concluded that supplementation with *Chlorella vulgaris* microalgae at 0.3% and especially at 0.5% improved the performance of laying hens, but the nutritional value of the eggs was not convincingly affected.

Acknowledgements: Project "Development of a plant feed additive for strengthening poultry immunity and increasing the nutritional value of eggs with omega-3 fatty acids" (grant No.: 22-00-A01612-000015), EAFRD, the Ministry of Agriculture and the Rural Support Service of Latvia.

NATIONAL
DEVELOPMENT
PLAN 2020



EUROPEAN UNION
European Social
Fund

INVESTING IN YOUR FUTURE



The effect of different types of edible microalgae on health, production performance and meat quality parameters in broiler chickens

Authors: A. Freiberga¹, A. Ilgaza¹, S. Jonova¹, S. Eglite¹, D. Gorbacevskaja¹, K. Nuksa¹, O. J. Apse², K. Neiberts², P. Semjonovs²

¹ Latvia University of Life Sciences and Technologies, Faculty of Veterinary Medicine, K. Helmana street 8, LV-3004 Jelgava, Latvia,

² University of Latvia, Institute of Biology, Laboratory of Industrial Microbiology and Food Biotechnology, O. Vaciesa street 4, LV-1004 Riga, Latvia.

ABSTRACT

Spirulina (*Arthrospira platensis*) and *Chlorella vulgaris* have been shown to improve the health of broiler chickens and the quantity and quality of the resulting production. There is a lack of information on the optimal intake of these and other microalgae in broiler chickens. Therefore, the aim of our study was to determine whether the supplementation of relatively low doses (0.5%) of Spirulina, *Chlorella* and a novel microalgae species in poultry production – *Tetrademus obliquus* – under controlled conditions affects the health, body weight gain, feed conversion ratio (FCR) and meat quality parameters of broiler chickens. Materials and methods. Four study groups (control (BK), Spirulina (BS), *Chlorella vulgaris* (BC) and *Tetrademus obliquus* (BT)) were established, each containing day-old Ros 308 broiler chickens (n=35, total n=140). The broilers were reared for 43 days under controlled conditions according to the Ros 308 rearing recommendations. All birds were fed the same diet with 0.5% of the respective microalgal supplement added to the BS, BC and BT groups. Results. The results obtained (live weight gain, feed conversion ratio, breast and thigh meat quality parameters (MUFA; PUFA; omega-3; -6; -9, linoleic acid; α -linolenic acid and other fatty acids; water; energy (kcal); protein; fat; cholesterol)

were compared between the groups. Overall, it can be concluded that chickens from the BC and BS groups had relatively better results in terms of FCR, breast and thigh meat quality indicators (omega fatty acids 3; 6; 9; vitamin E). Acknowledgements: This study was conducted as part of the project “Development of a feed supplement of plant origin for strengthening poultry immunity and increasing the nutritional value of eggs with omega-3 fatty acids” (Grant No: 22-00-A01612-000015), co-financed by the EAFRD and supported by the Ministry of Agriculture and Rural Support Service of the Republic of Latvia.

3. PIELIKUMS

Zinātniskie darbi

Siera sūkalu ietekme uz mikroaļģu miksotrofās kultivācijas gaitu un to biomasas sastāvu

Autors: Kristaps Neiberts (Maģistra darbs)

KOPSAVILKUMS

Mikroaļģes ir mikroorganisms, kura metabolītiem ir augsta pievienotā vērtība. Šī iemesla dēļ mikroaļģu izpēte un to augšanas apstākļu optimizācija, lai uzlabotu biomasas iznākumu vai iegūtu kādu mērķvielu, ir iemesls zinātnieku interesei. Pētījuma ietvaros tika veikta mikroaļģu kultūru *Graesiella emersonii*, *Tetrademus obliquus* un *Chromochloris zofingiensis* izpēte spējai augt miksotrofos apstākļos. Kaut arī visas izvēlētās mikroaļģu kultūras spēja asimilēt laktozi miksotrofās kultivācijas apstākļos, tālākiem eksperimentiem tika virzīta *G. emersonii* mikroaļģe tās augstās β – galaktozidāzes aktivitātes dēļ. Eksperimentos tika noskaidrota optimālā laktozes koncentrācija barotnē, kas sastāda 10 g/L līdz 15 g/L. Iegūtos rezultātus tālāk implementēja, lai noteiktu optimālo siera sūkalu koncentrāciju. Tika konstatēts, ka barotnē ar 20% siera sūkalām nodrošina augstāku mikroaļģu biomasas sintēzi, salīdzinot ar fotoautotrofajiem kultivācijas apstākļiem. *G. emersonii* kultivējot 20% siera sūkalu barotnē pēc 24 dienām tika veikta cukuru un biomasas sastāva analīze. Kultivācijas beigās ieguva biomasas sauso svaru $2,43 \pm 0,06$ g/L, kas ir par 60,08% vairāk nekā fotoautotrofai kontrolei. Tika noskaidrots, ka veicot kultivāciju siera sūkalu barotnē, salīdzinot ar fotoautotrofajiem kultivācijas apstākļiem palielinās lipīdu par 44,56%, karatenoīdu par 78,93%, kā arī kopējā hlorofila par 21,04% saturs *G. emersonii* biomasā.

Atslēgvārdi: *Graesiella emersonii*, *Tetrademus obliquus*, *Chromochloris zofingiensis*, siera sūkalas, lipīdi, miksotrofa kultivācija

Pazeminātas kultivācijas temperatūras ietekme uz polinepiesātināto taukskābju, lipīdu un citu komponentu saturu mikroaļģu biomasā

Autors: Oto Jēkabs Apse (Kursa darbs)

KOPSAVILKUMS

Mikroaļģu sintezētās polinepiesātinātās taukskābes (PNTS) ir piesaistījušas zinātnieku uzmanību kā perspektīvs, labai draudzīgs uztura bagātinātājs, kurš spētu aizvietot līdz šim izmantotās zivju eļļas. Taču, lai varētu pilnībā komercializēt mikroaļģu sintezētās PNTS, būtu nepieciešams izprast, kādi ir optimālie mikroaļģu augšanas apstākļi un temperatūra, pie, kuras visefektīvāk notiktu PNTS un citu biomasas komponentu sintēze. Kursa darba ietvaros, pētījuma mērķis ir noskaidrot, kā mikroaļģu kultūru, – *Scenedesmus quadricauda*, *Tetrademus obliquus* un *Graesiella emersonii* – fotoautotrofā audzēšana dažādās temperatūrās (5, 10, 15, 20, 25°C), ietekmē polinepiesātināto taukskābju (PNTS), lipīdu un citu biomasas komponentu saturu. Pētījuma gaitā tika secināts, ka kultivācijas temperatūra ietekmē izvēlēto mikroaļģu kultūru biomasas sastāvu, un, ka fotoautotrofi audzējot *S. quadricauda* CCAP 276/16 kultūru 15°C temperatūrā, var iegūt $0,6 \pm 0,01$ g/L biomasas (sausais svars, 10 dienās) ar visaugstāko PNTS saturu, kas sastāda $75,44 \pm 0,1$ mg/g no sausās biomasas un veido $54,45 \pm 0,4\%$ no lipīdiem.

Atslēgas vārdi: *Scenedesmus quadricauda*, *Tetrademus obliquus*, *Graesiella emersonii*, mikroaļģes, autotrofā kultivācija, polinepiesātinātās taukskābes, temperatūras ietekme.

Miksotrofās kultivācijas ietekme uz mikroaļģu biomasas sastāvu siera un biezpiena sūkalās

Autors: Oto Jēkabs Apse (Bakalaura darbs)

KOPSAVLIKUMS

Piena pārstrādes saražotais sūkalu apjoms apdraud apkārtējo vidi augstās laktozes koncentrācijas dēļ. Bakalaura darba ietvaros tika noskaidrotas mikroaļģu – *Scenedesmus quadricauda* CCAP 276/16, *Tetradismus obliquus* OM02, *Graesiella emersonii* KM01 un *Chlorella vulgaris* CCAP211/111 spēja izmantot miksotrofi un heterotrofi laktozi un tās monomērus, kā arī laboratorijas izolātu *Tetradismus obliquus* OM02 un *Graesiella emersonii* KM01 kultivācijas novērtējums uz siera un biezpiena sūkalām optimālā un pazeminātā temperatūrā (°C) dažādos kultivācijas režīmos. *G. emersonii* KM01 kultūrai miksotrofi kultivējot uz siera sūkalām, ievērojami palielinās biomasas iznākums – par 84,53% (25°C) un pazeminātā temperatūrā (15°C) ievērojami palielinās lipīdu saturs – par 36,84% salīdzinājumā ar autotrofo kontroli.

Atslēgas vārdi: Mikroaļģes, *Scenedesmus quadricauda*, *Tetradismus obliquus*, *Graesiella emersonii*, *Chlorella vulgaris*, miksotrofa un heterotrofa kultivācija, siera un biezpiena sūkalas.

Sūkalu izmantošana kā mikroaļģu augšanas barotne

Autors: Guna Skuja (Zinātniski pētnieciskais darbs)

Rīgas Valsts 1. ģimnāzija, Latvijas Universitātes Bioloģijas institūts, Rūpnieciskās
Mikrobioloģijas un Pārtikas Biotehnoloģiju laboratorija

IEVADS

Aktuāla problēma mūsdienās, kas skar mūs visus, ir dabas piesārņojums. To veido ne tikai ikdienā nešķīrotie un nepārstrādātie atkritumi, bet arī dažādu blakusproduktu un atkritumu rašanās pārtikas rūpniecībā.

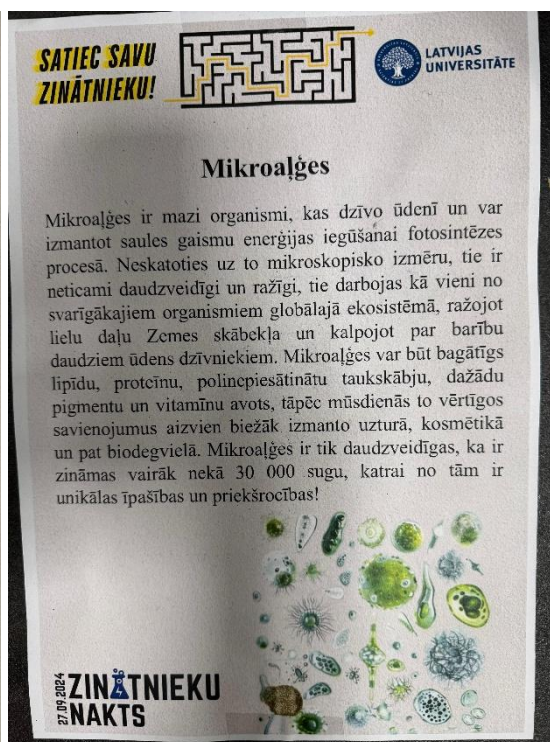
Ražojot piena produktus, neizbēgams blakusprodukts ir sūkalas. Tā kā piena produktu ražošanas apjoms pasaulē ir milzīgs, 2023. gadā sasniedzot 944 miljonu tonnu, un turpina augt par aptuveni 1% gadā, tad šī blakusprodukta rašanās ir neizbēgama (1). Sūkalas sastāda aptuveni 80% no iegūtā galaprodukta. Ja sūkalas netiek utilizētas pareizi, piemēram, tiek izgāztas kādā grāvī vai pļavā, tas rada vides problēmas, jo sūkalu noārdīšanās un oksidēšanās process ir ilgs, galvenokārt sūkalu sastāvā esošās laktozes dēļ, jo ne visi mikroorganismi spēj to patērēt (2). Lai arī sūkalas tiek izmantotas, piemēram, proteīna pulveru un rikotas sieru ražošanā, kā arī dzīvnieku barībai, aptuveni 50% sūkalu netiek izmantotas (3). Lai mazinātu iespējamo dabas piesārņojumu, kā arī lietderīgi izmantotu pieejamos resursus (sūkalas), šī darba ietvaros tiks pētīta mikroaļģu spēja augt sūkalās, patērējot tajā esošos cukurus – glikozi, laktozi, galaktozi.

Mikroaļģēm ir laba ietekme uz apkārtējo vidi – tās aktīvi fotosintezē, patērējot gaisā esošo CO₂, samazinot tā daudzumu atmosfērā. Mikroaļģes ir potenciāli iespējams izmantot pārtikas rūpniecībā, lauksaimniecībā un medicīnā. Tās satur vielas ar augstu pievienoto vērtību - polinepiesātīnātas taukskābes, omega-3, omega-6 taukskābes (4). Komerciāli tās tiek kultivētas proteīnu, lipīdu, karotinoīdu iegūšanai. Kultivējot mikroaļģes sūkalās, sūkalas tiktu lietderīgi izmantotas, mazinot ekoloģisko slogu, kā arī tiktu iegūta mikroaļģu biomasa, kuru tālāk varētu izmantot dažādu vielu ar augstu pievienoto vērtību ražošanai, kā arī kultivācijas laikā tiktu samazināts CO₂ daudzums gaisā (5).

Darba mērķis: Veikt mikroaļģes izolēšanu no Torņakalna stacijas pieguļošās teritorijas un noskaidrot, vai mikroaļģes izolāts spēj patērēt galvenos sūkalās esošos cukurus – glikozi, laktozi, galaktozi un augt sūkalu barotnē.

4. PIELIKUMS

Zinātnieku nakts 2024 pasākums





Interesenti laipni gaidīti Ojāra Vācieša ielā 4 un LU Bioloģijas institūta Papes Ornitoloģisko pētījumu centrā

Ojāra vācieša ielā 4, Rīgā

Mikroaļģu pasaule. Bioloģijas Institūts

Pasākuma laikā būs iespēja apskatīt laboratorijas telpas, kas ir aprīkotas ar visām nepieciešamajām iekārtām, lai varētu īstenot pētījumus mikroaļģu biotehnoloģijā un nodrošināt to biomasas ievākšanu. Kā arī būs iespējams redzēt 140 L ietilpīgu plūsmas fotobioreaktoru un trīs mazākus 10 L ietilpības fotobioreaktorus darbībā. Papildus būs iespējams apskatīt mikroaļģu biomasas bioloģiski aktīvo vielu ekstrakciju ar soksleta iekārtas palīdzību un pašas mikroaļģes gaismas mikroskopā. Kā arī pie vairākām iekārtām tiks izvietotas informatīvās par to pielietojumu. Pastāstīsim arī par mikroaļģu biomasas un to bioloģiski aktīvo vielu praktiskas izmantošanas iespējām un īstenojamiem praktiskās ievirzes pētnieciskajiem projektiem.

Projekts LIFE FOR SPECIES

Ipazīstina ar topošo Latvijas Sarkano Grāmatu un aizsargājamām sugām.

Bioloģijas institūta Papes Ornitoloģisko pētījumu centrs

Pape, Rucavas novads

"Murd, čalo, čivina un taurē putnu ceļš" (Vizma Belševica). LU Bioloģijas institūta Papes Ornitoloģisko pētījumu centrs.

Apgredzenosim noķertos putnus, vērosim putnus starmeša gaismā, ar ultraskaņas detektoru mēģināsim uztvert migrējošo sikspārņu saucienus.

Aicinām pieteikties iepriekš: oskars.keiss@lu.lv.

Dalīties



← BACK

5. PIELIKUMS

Mikroaļģu biomasas hromotogrāfijas analīzes putnu barības piedevās izmantotajām mikroaļģu sugām.

	Parametrs	Mērvienība	Chlorella vulgaris	Spirulina platensis	Dunaliella salina	Tetrademus obliquus
Taukskābes	C12:0 lauric acid	g/100 g	0.1			
	C14:0 myristic acid	g/100 g			0.1	0.1
	C16:0 palmitic acid	g/100 g	2.2	2.7	2	1.5
	C16:1n7 palmitoleic acid	g/100 g	0.1	0.2	0.1	
	C16:1 (sum of)	g/100 g	0.1	0.2	0.1	
	C16:2n4 hexadecadienoic acid	g/100 g	1.2			
	C16:3n4 hexadecatrienoic acid	g/100 g				0.1
	C18:0 stearic acid	g/100 g	0.1	0.1	0.1	0.2
	C18:1n9 oleic acid	g/100 g	0.3	0.1	0.4	1.7
	C18:1n7 vaccenic acid	g/100 g	0.1			0.1
	C18:1 (sum of)	g/100 g	0.5	0.2	0.5	1.8
	C18:2 trans (sum of)	g/100 g			0.4	0.7
	C18:2 (sum of)	g/100 g	4.5	1.1	0.9	1.6
	C18:2n6 linoleic acid (LA)	g/100 g	4.5	1.1	0.5	0.9
	C18:3n6 γ-linolenic acid (GLA)	g/100 g		0.9		
	C18:3n3 α-linolenic acid (ALA)	g/100 g	0.4		1.4	1.6
	C18:3 (sum of)	g/100 g	0.4	0.9	1.4	1.7
	C18:4n3 stearidonic acid (SDA)	g/100 g				0.3
	C22:1n9 erucic acid	g/100 g	0.1			
	C22:1 (sum of)	g/100 g	0.1			
	C24:0 lignoceric acid	g/100 g	0.1			
	C22:5n3 docosapentaenoic acid (DPA)	g/100 g			0.1	
	Other fatty acids	g/100 g	1.1	0.5	0.8	1.8
	Total saturated fatty acids (SAFA)	g/100 g	2.5	2.8	2.3	1.9
	Total monounsaturated fatty acids (MUFA)	g/100 g	0.7	0.4	0.6	1.9
	Total polyunsaturated fatty acids (PUFA)	g/100 g	6.1	2	1.9	3.1
	Sum of trans fatty acids isomers	g/100 g			0.4	0.7
	Total Omega-3 fatty acids	g/100 g	0.4		1.5	2
	Total Omega-6 fatty acids	g/100 g	4.5	2	0.5	1
	Total Omega-9 fatty acids	g/100 g	0.4	0.1	0.4	1.7
Aminoskābes	Aspartic acid	mg/100 g	3550	4340	350	2260
	Glutamic acid	mg/100 g	6100	7840	860	3850
	Serine	mg/100 g	1800	2940	370	1740
	Histidine	mg/100 g	960	1000	160	662
	Glycine	mg/100 g	2520	3020	470	2400
	Arginine	mg/100 g	3580	3940	410	2140
	Threonine	mg/100 g	1890	2950	380	1970
	Alanine	mg/100 g	3670	4600	600	3470
	Proline	mg/100 g	2110	2310	430	2020
	Tyrosine	mg/100 g	1340	2490	300	1350
	Valine	mg/100 g	2450	3490	490	2200
	Methionine	mg/100 g	1010	1550	210	947
	Cysteine	mg/100 g	360	340	58	318
	Isoleucine	mg/100 g	1580	3130	350	1440
	Leucine	mg/100 g	3950	5270	720	3460
	Phenylalanine	mg/100 g	2170	2770	440	2120
	Lysine	mg/100 g	3530	2940	360	2050
Vitamīni	Vitamin E (α-tocopherol)	mg/100 g	17.3	2.8	557	8.3
	Vitamin B1 (thiamine)	mg/100 g	0.08	1.15		
	Vitamin B2 (ryboflavin)	mg/100 g	3.86	2.19		
	Vitamin B3 (niacin)	mg/100 g	22.9	16.2		
	Vitamin B5 (pantothenic acid)	μg/100 g	1.23	96.1		
	Vitamin B6 (pyridoxine)	mg/100 g	1.52	0.61		0.38
	Vitamin B7 (biotin)	μg/100 g	21.5	1.62		
	Vitamin B9 (folic acid)	μg/100 g	1030	108		
	Vitamin B12 (cyanocobalamin)	μg/100 g	1.54	168	23	105
	Sodium (Na)	mg/100 g	434	322		
	Salt as sodium chloride (NaCl)	mg/100 g	1085	805		
	Iron (Fe)	mg/100 g	14.026	75.4	6.75	28.3
	Zinc (Zn)	mg/100 g	0.99	1.34	4.31	26.2
	Magnesium (Mg)	mg/100 g	258	254	53.6	357

Moisture	g/100 g	2	4.4	5	
Protein (N*6.25)	g/100 g	56.9	69.6	26.9	54.8
Dietary fiber	g/100 g	10.4	7.8		
Energy value	kcal/100 g	406	372		
Carbohydrates	g/100 g	15.8	6.7	40	28.5
Fat	g/100 g	10.5	5.7	6	9.4
Ash	g/100 g	4.38	5.78	19.6	
Total sugars	g/100 g	0.22	0		
Total polyphenols as gallic acid	mg/100 g	528.03	188.93	396.92	
Total Carotenoids	mg/100 g	13.63	15.41	1200	11.45
D ₂ Vitamin	μg/100 g	208 ± 54,08	IP vides izolāts:	168 ± 43,68	

LITEARTŪRAS SARAKSTS

- Abdel-Wareth, A. A. A., Williams, A. N., Salahuddin, M., Gadekar, S., Lohakare, J. 2024. Algae as an alternative source of protein in poultry diets for sustainable production and disease resistance: present status and future considerations. *Frontiers in Veterinary Science*. 11-24, 2297-1769.
- Abeyrathne, E.D.N.S., Nam, K., Ahn, D.U. 2021. Analytical Methods for Lipid Oxidation and Antioxidant Capacity in Food Systems. *Antioxidants (Basel)*. 9;10(10):1587. doi: 10.3390/antiox10101587. PMID: 34679722; PMCID: PMC8533275.
- Abreu, A. P., Morais, R. C., Teixeira, J. A., Nunes, J. 2022. A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 159, 112247. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112247>.
- Abril B. J. E., de Sousa G. P., Cardoso, P. G., de Freitas C. F., Duarte, W. F. 2020. Isolation of freshwater microalgae and outdoor cultivation using cheese whey as substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 29 (101799). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101799>
- Adam, F., Abert-Vian, M., Peltier, G., Chemat, F. 2012. "Solvent-free" ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process *Bioresour. Technol.*, 114, 457-465.
- Alghamdi, M.A., Elbaz, M.I., Ismail, I.E., Reda, F.M., Alagawany, M., El-Tarabily, K.A., Abdelgeliel, A.S. 2024. Dietary supplementation with a mixture of *Dunaliella salina* and *Spirulina* enhances broiler performance by improving growth, immunity, digestive enzymes and gut microbiota. *Poultry Science*. 103(2), 103337.
- Ali, S., K, Saleh, A., M. 2012. *Spirulina – an Overview. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3).
- Amorim, M., Soares, J., Coimbra, J., Leite, M., Ibino, L., Martins, M. 2020. Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 61. 1976-2002. 10.1080/10408398.2020.1768046.
- Anderson International Corp (AIC). 2024. Oil Oxidation: How To Measure It And Why It Matters. <https://www.andersonintl.com/oil-oxidation-how-to-measure-it-and-why-it-matters/>. Skatīts 12.11.2024.

- Andrade, D., José, C. 2018. Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. *MOJ Food Processing & Technology*, 6. 144.
- Araujo, G.S., Matos, L.J., Fernandes, J.O., Cartaxo, S.J., Gonçalves, L.R., Fernandes, F.A., Farias, W.R. 2013. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. *Ultrason. Sonochem*, 20, 95-98.
- Axelsson, M., Gentili, F. 2014. A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PloS One*, 9, e89643.
- Bajguz, A., Dinan, L. 2004. Effects of ecdysteroids on Chlorella vulgaris. *Physiologia Plantarum - PHYSIOL PLANT*, 121. 349-357.
- Barība24. S.a. Pilnvērtīga barība dējējvistām, Neto 1000 kg, drupināta granula. <http://bariba24.lv/bariba24/vista/kompleksa-bariba-dejejvistam-1000kg>. Skatīts 26.06.2024.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2018. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? *Algal Research*, 31, 107-115.
- Bedard, S. E., Roxborough, E., O'Neill, V., Mangal 2024. The biomolecules of Euglena gracilis: Harnessing biology for natural solutions to future problems, *Protist*, Volume 175, Issue 4, 2024, 126044, ISSN 1434-4610, <https://doi.org/10.1016/j.protis.2024.126044>.
- Bong, S., Loh, S. 2013. A study of fatty acid composition and tocopherol content of lipid extracted from marine microalgae, Nannochloropsis oculata and Tetraselmis suecica, using solvent extraction and supercritical fluid extraction. *International Food Research Journal*, 20(2): 721-729.
- Boyle, N. R., Morgan, J. A. 2009. Flux balance analysis of primary metabolism in Chlamydomonas reinhardtii. *BMC Systems Biology*. 3(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-3-4>
- Breil, C., Abert V. M., Zemb T., Kunz W., Chemat F. 2017. "Bligh and Dyer" and Folch Methods for Solid-Liquid-Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents. *Int J Mol Sci*. 27;18(4):708.
- Capa-Robles, W., García-Mendoza, E., Paniagua-Michel, J. de J. 2021. Enhanced β -carotene and biomass production by induced mixotrophy in dunaliella salina across a combined strategy

- of glycerol, salinity, and light. *Metabolites*. 11(12).
<https://doi.org/10.3390/metabo11120866>
- Castillo, T., Ramos, D., García-Beltrán, T., Brito-Bazan, M., Galindo, E. 2021. Mixotrophic cultivation of microalgae: An alternative to produce high-value metabolites. *Biochemical Engineering Journal*. 176, 108183. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108183>
- Centrālā Statistikas pārvalde. 2024. Lauksaimniecības dzīvnieku skaits gada beigās (tūkstošos) 1915 – 2023.
https://data.stat.gov.lv/pxweb/lv/OSP_PUB/START_NOZ_LA_LAL/LAL090/table/tableViewLayout1/. Skatīts 06.06.2024.
- Chakraborty, K., Vijayagopal, P., Chakraborty, R.D., Vijayan, K.K. 2010. Preparation of eicosapentaenoic acid concentrates from sardine oil by *Bacillus circulans* lipase. *Food Chemistry*. 120(2), 433–442.
- Chauhan, A.S., Patel, A.K., Chen, C-W., Chang, J-S., Michaud, P., Dong, C.D., Singhania, R.R. 2023. Enhanced production of high-value polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from potential thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. *Bioresource Technology*, 370, 128536.
- Chong, C. C., Cheng, Y. W., Ishak, S., Lam, M. K., Lim, J. W., Tan, I. S., Show, P. L., Lee, K. T. 2022. Anaerobic digestate as a low-cost nutrient source for sustainable microalgae cultivation: A way forward through waste valorization approach. *Science of The Total Environment*. 803, 150070. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150070>
- Choudhary, P., Sharma, P., Kaur, S., Randhawa, J., Borse, L. 2023. A Comprehensive Review on the Deleterious Effects of Heavy Metal Bioaccumulation on the Gills and Other Tissues of Freshwater Fishes. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 20. 395-405.
- Costa, M.M, Spínola, M.P, Prates, J.A.M. 2024. Microalgae as an Alternative Mineral Source in Poultry Nutrition. *Veterinary Sciences*. 11(1):44. <https://doi.org/10.3390/vetsci11010044>
- Cui, Y., Skye R. Thomas-Hall, P., Schenk, M. 2019. *Phaeodactylum tricornutum* microalgae as a rich source of omega-3 oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. *Food Chemistry*, 297, 124937.
- de Gucht, L. P. E., van der Plas, L. H. W. 1995. Growth kinetics of glucose-limited *petunia hybrida* cells in chemostat cultures: Determination of experimental values for growth and maintenance parameters. *Biotechnology and Bioengineering*. 47-1(42–52).
<https://doi.org/10.1002/bit.260470106>

- de Moura, R. R., Etges, B. J., dos Santos, E. O., Martins, T. G., Roselet, F., Abreu, P. C., Primel, E. G., D'Oca, M. G. M. 2018. Microwave-Assisted Extraction of Lipids from Wet Microalgae Paste: A Quick and Efficient Method. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 120: 1700419.
- Dejoye T. C., Abert V. M., Ginies C., Elmaataoui M., Chemat F. 2012. Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. *Molecules*. 17(7):8196-205.
- Dias, C., Santos, J., Reis, A., Lopes S.T. 2023. The Use of Oleaginous Yeasts and Microalgae Grown in Brewery Wastewater for Lipid Production and Nutrient Removal: A Review. *Waste and Biomass Valorization*. 14. 1-24.
- Díaz-Montaña, E.J, Aparicio-Ruiz, R., Morales, M.T. 2023 Effect of Flavorization on Virgin Olive Oil Oxidation and Volatile Profile. *Antioxidants (Basel)*. 21;12(2):242. doi: 10.3390/antiox12020242. PMID: 36829801; PMCID: PMC9952243.
- Diraman, H., Koru, E., Dibeklioglu, H. 2009. Fatty Acid Profile of *Spirulina platensis* Used as a Food Supplement. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*. 61, 134-142. <https://doi.org/10.46989/001c.20548>
- El-Shall, N. A., Jiang, S., Farag, M. R., Azzam, M., Al-Abdullatif, A. A., Alhotan, R., Dhama, K., Hassan, F., Alagawany, M. 2023. Potential of *Spirulina platensis* as a feed supplement for poultry to enhance growth performance and immune modulation. *Frontiers in Immunology*. 14, 1072787. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1072787>
- Empanan, Q., Harun, R., Danquah, M. 2019. Role of phycoremediation for nutrient removal from wastewaters: A review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17. 889-915.
- FAO. S.a. Chapter 1 – Egg production. <https://www.fao.org/4/Y4628E/y4628e03.htm>. Skatīts 10.06.2024.
- Fayzunnessa, N., Morshed, M., A., Uddin, A., Parvin, A., Saifur R. 2011. In vivo study on the efficacy of hypoglycemic activity of *Spirulina plantesis* in long evan rats. *International Journal of Biomolecules and Biomedicine*, 1, 27 – 33.
- Fazril, I., Faiz, M.M., Halim, S.A., Saifuddin, N.M., Fitranto, K., Fattah, I.M.R., Mahlia, T.M.I. 2022. Progress on Conventional and Advanced Techniques of In Situ Transesterification of Microalgae Lipids for Biodiesel Production. *Energies*, 15. 1-33
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J biol Chem*. 226 (1), 497-509.

- Gabriel, B., Vasile, C., Dan. 2021. Microalgae as sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids: Biotechnological aspects. *Algal Research*, 58.
- Gadzama, I. U, Ray, S., Méité, R., Mugweru, I. M., Gondo, T., Rahman, M. A, Redoy, M. R. A., Rohani, M., Mholif, A. E, Salahuddin, M, et al. 2025. *Chlorella vulgaris* as a Livestock Supplement and Animal Feed: A Comprehensive Review. *Animals*. 15(6):879. <https://doi.org/10.3390/ani15060879>
- Gleison, S.C., Tiele, M.R., Yixing S., Rosana C.S. 2022. Potential use of microalga *Dunaliella salina* for bioproducts with industrial relevance. *Biomass and Bioenergy*, 167,106647.
- Hafez, H.M., Attia, Y.A. 2020. Challenges to the Poultry Industry: Current Perspectives and Strategic Future After the COVID-19 Outbreak. *Sec. Animal Nutrition and Metabolism*. 7.
- Hanaa H. Abd El-Baky, Farouk K. El Baz, Gamal S. El-Baroty, 2004. Production of Lipids Rich in Omega 3 Fatty Acids from the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*. *Biotechnology*, 3 (1): 102-108.
- Hany M.R., Abdel L., Saeed E-A., Sevdan Y., Naiel, M. A. E., Kari, Z. A., Hamid, N. K. A., Dawood, M. A. O., Nowosad, J., Kucharczyk, D. 2022. The effectiveness of *Arthrospira platensis* and microalgae in relieving stressful conditions affecting finfish and shellfish species: An overview. *Aquaculture Reports*, 24, 101135.
- Harrigan, W.F. 1998. Laboratory methods in food microbiology. San Diego Academic Press, 532 pp.
- Hossain, M., Ratnayake, R., Liyanage, W. 2016. Isolation Purification and Culturing of Cyanobacteria and Microalgae towards Biodiesel Production: Current Status:. *American Journal of Biomass and Bioenergy*. 1009.
- Hubert, F., Poisson, L., Loiseau, C., Gauvry, L., Pencreac'H, G., et al. 2017. Lipids and lipolytic enzymes of the microalga *Isochrysis galbana*. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 24 (4), 407.
- IK "Ziedkalni". 2024. Padoimi. <https://calisi.lv/padoimi/>. Skatīts 06.06.2024.
- Jesús, A., Torres, S.J., Beatriz, J.C., Juan, G.H. 2020. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 42.
- Jiao, K., Xiao, W., Xu, Y., Zeng, X., Ho, S. H., Laws, E. A., Lu, Y., Ling, X., Shi, T., Sun, Y., Tang, X., & Lin, L. 2018. Using a trait-based approach to optimize mixotrophic growth of

- the red microalga *Porphyridium purpureum* towards fatty acid production. *In Biotechnology for Biofuels*. 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1277-7>
- Jiru, M., Stranska-Zachariasova, M., Kohoutkova, J., Schulzova, V., Krmela, A., Revenco, D., Koplik, R., Kastanek, P., Fulin, T., Hajslova, J. 2021. Potential of microalgae as source of health-beneficial bioactive components in produced eggs. *J Food Sci Technol*. 58, 1–10.
- Jung, F., Krüger-Genge, A.B., Waldeck, P.C., Küpper, J.-H. 2019. *Spirulina platensis*, a super food? *Journal of Cellular Biotechnology*, 5(1), 43-54.
- Kalia, S., Lei, X.G. 2022. Dietary microalgae on poultry meat and eggs: explained versus unexplained effects. *Current Opinion in Biotechnology*. 75, 102689.
- Kang, N.S, Cho, K., An, S.M., Kim, E.S., Ki, H., Lee, C.H., Choi G., Hong, J.W. 2022. Taxonomic and Biochemical Characterization of Microalga *Graesiella emersonii* GEGS21 for Its Potential to Become Feedstock for Biofuels and Bioproducts. *Energies*. 15(22), 8725. <https://doi.org/10.3390/en15228725>
- Kang, N.S., Cho, K., An, S.M., Kim, E.S., Ki, H., Lee, C.H., Choi, G., Hong, J.W. 2022. Taxonomic and Biochemical Characterization of Microalga *Graesiella emersonii* GEGS21 for Its Potential to Become Feedstock for Biofuels and Bioproducts. *Energies*. 15, 8725.
- Karim, A., Bin K. Z., Islam, A., Faizal, C. K., Khan, M., Yousuf, A. 2019. Microalgal Cell Disruption and Lipid Extraction Techniques for Potential Biofuel Production. *Microalgae cultivation for biofuels* production. p.129-147.
- Kermanshahi pour, A., Mirmehrabi, M., Brar, S. K. 2020. A novel process for isolation and purification of polyunsaturated fatty acids from a thraustochytrid. *Algal Research*, 46.
- Khanra, A., Vasistha, S., Kumar, S., Rai, M. P. 2021. Cultivation of microalgae on unhydrolysed waste molasses syrup using mass cultivation strategy for improved biodiesel. *Biotech*. 11(6), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02823-7>
- Ki, H., Kim, E.S., An, S.M., Kang, N.S., Bae, S.S., Choi, G., Pan, C.H., Kim, K.Y., Patil, J.G., Cho, K. 2024. Enhanced carotenoid production, biodiesel quality, and harvesting efficiency in microalga *Graesiella emersonii* via heterotrophic cultivation strategy. *Algal Research*. 78, 103437.
- Kirsten H., Roger H. 2015. Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. *Academic Press*, 3(25-41).

- Krishan, R., Kandasamy, M., Faizal, B. 2013. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the Soxhlet extraction method. *Fuel*, 116. 103-108.
- Kumar, B. R., Deviram, G., Mathimani, T., Duc, P. A., Pugazhendhi, A. 2019. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 17 (583-588).
- Kumar, C.S., Prabu, V.A. 2015. Nutritional Value of *Skeletonema Costatum* (Cleve, 1873) From Parangipettai, Southeast Coast of India. *Int J Pharm Sci Res.* 6(8), 3463. [10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(8\).3463-66](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(8).3463-66)
- Liang, Y., Beardall, J., Heraud, P. 2006. Changes in growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition with culture age in batch cultures of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Botanica Marina - BOT MAR.* 49, 165-173. <https://doi.org/10.1515/BOT.2006.021>
- Liestianty, D., Rodiana, I.A., Arfah, R., Asma, A., Sundari, S., Muliadi, M. 2019. Nutritional analysis of spirulina sp to promote as superfood candidate. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 509.
- Lu, C., Rao, K., Hall, D., Vonshak, A. 2001. Production of eicosapentaenoic acid (EPA) in *Monodus subterraneus* grown in a helical tubular photobioreactor as affected by cell density and light intensity. *Journal of Applied Phycology*. 13, 517-522. <https://doi.org/10.1023/A:1012515500651>
- MacGee, J. 1959. Enzymatic determination of polyunsaturated fatty acids. *Analytical Chemistry*. 31(2), 298-302.
- Mahadi, R., Vahisan, L. P. S., Ilhamsyah, D. P. A., Kim, S., Kim, B., Lee, N., & Oh, Y.-K. (2022). Enhancement of Astaxanthin and Fatty Acid Production in *Haematococcus pluvialis* Using Strigolactone. *Applied Sciences*, 12(4), 1791. <https://doi.org/10.3390/app12041791>
- Mashaël, A., Esam, A., Wafa, A. 2021. Identification and Growth Characterization of Native Microalgae Isolated from Different Environments of Saudi Arabia. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 14. 1065.
- Mat, A. N. S., Khoo, K. S., Chew, K. W., Veeramuthu, A., Chang, J. S., Show, P. L. 2021. Microalgae cultivation in wastewater and potential processing strategies using solvent and

- membrane separation technologies. *Journal of Water Process Engineering*. 39. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101701>
- Medina, A. R., Giménez, A. G., Camacho, F. G., Pérez, J. A. S., Grima, E. M., Gómez, A. C. 1995. Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 72(5), 575–583.
- Medina, A.R., Grima, E.M., Giménez, A.G., González, M.J.I. 1998. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*. 16(3), 517–580.
- Meksiarun P, Spegazzini N, Matsui H, Nakajima K, Matsuda Y, Sato H. 2015. In Vivo Study of Lipid Accumulation in the Microalgae Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana* Using Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 69(1):45-51
- Mendes, A., da Silva, T.L., Reis, A. 2006. DHA Concentration and Purification from the Marine Heterotrophic Microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by Winterization and Urea Complexation. *Food Technology and Biotechnology*. 45, 38-44.
- Mendes, A., Reis, A., Vasconcelos, R. et al. 2009 *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. *J Appl Phycol*, 21, 199–214.
- Menegol, T., Romero-Villegas, G.I., López-Rodríguez, M. et al. 2019. Mixotrophic production of polyunsaturated fatty acids and carotenoids by the microalga *Nannochloropsis gaditana*. *J Appl Phycol*, 31, 2823–2832.
- Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S. 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste. *Journal of Cleaner Production*. 65, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>
- Mitra, D., van Leeuwen, J. H., Lamsal, B. 2012. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*. 1-1(40–48). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.03.002>
- Mohy E.D. 2019. Accumulation of Lipids and Triglycerides in *Isochrysis galbana* Under Nutrient Stress. *Appl Biochem Biotechnol*, 189, 359–373.
- Mubarak, M. 2024 Supercritical CO₂ Extraction of Lipid from Microalgae for Biodiesel Production - A Comprehensive Review. *SAJ Biotechnol*. 9: 101.

- Nagarajan, D., Lee, D.J., Chang, J.S. 2018. Heterotrophic Microalgal Cultivation for Microbial Biomass and Energy Conversion. *Green Energy and Technology*. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7677-0_4
- Niekerk, T. 2023. How Many Chickens Are In The World – For All Those Who Are Lovin’ It. <https://worldanimalfoundation.org/advocate/how-many-chickens-are-in-the-world/>. Skatits 06.06.2024.
- Niknezhad, S.V., Asadollahi, M.A., Zamani, A., Biria, D., Doostmohammadi, M. 2015. Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*. 24(2), 453–460. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0060-9>
- Novoveská, L, Ross, M. E, Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V, Sassi, J-F. 2019. Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. *Marine Drugs*. 17(11):640. <https://doi.org/10.3390/md17110640>
- Okoro, V., Azimov, U., Munoz, J., Hernandez, H., H., Phan, A., N. 2019. Microalgae cultivation and harvesting: Growth performance and use of flocculants - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115, 109364.
- Pang, N., Fu, X., Fernandez, J. S. M., Chen, S. 2019. Multilevel heuristic LED regime for stimulating lipid and bioproducts biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*. Vol. 288. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121525>
- Pang, N., Gu, X., Chen, S., Kirchhoff, H., Lei, H., Roje, S. 2019. Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 12(450–460). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.06.001>
- Paula, P. A. C., Arantes, C. P., Aparecida, L. G. G., Cabral, F. A. 2008. Fractionation of fish oil with supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*. 88:3(381-387).
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Bashan, Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 45-1(11–36). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Pezzolesi, L., Pichierri, S., Samorì, S., Totti, C., Pistocchi, R. 2017. PUFAs and PUAs production in three benthic diatoms from the northern Adriatic Sea. *Phytochemistry*. 142, 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.06.018>

- Piasecka, A., Nawrocka, A., Wiącek, D., Krzemińska, I. 2020. Agro-industrial by-product in photoheterotrophic and mixotrophic culture of *Tetrademus obliquus*: Production of $\omega 3$ and $\omega 6$ essential fatty acids with biotechnological importance. *Sci Re.* 10, 6411. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63184-4>
- Pushpakumari K., Nirupa, P.J., Gentili F.G. 2018. Stressing Algae for Biofuel Production: Biomass and Biochemical Composition of *Scenedesmus dimorphus* and *Selenastrum minutum* Grown in Municipal Untreated Wastewater. *Frontiers in Energy Research*, 6.
- Rahimi, M., Jazini, M. 2021. Mixotrophic cultivation of *Chromochloris zofingiensis* on glycerol, acetate, and vinasse. *Journal of Applied Phycology*. 33(6), 3579–3590. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02568-z>
- Rama, G.R., Kuhn, D., Beux, S., Maciel, M.J., Volken de Souza, C.F. 2019. Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal*. 98, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.012>
- Ramesh, K., Garlapati, D., Thangavel, M., Pham, A., Duc, A., Pugazhendhi 2019. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17 (583-588).
- Rameshprabu, R., Yuwalee, U., Natthawud, D. 2016. Cultivation of Green Microalga, *Chlorella vulgaris* for Biogas Purification. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 2.
- Ramluckan, K., Moodley, K. G., Bux, F. 2014. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel*. 116(), 103–108.
- Ravindran, R., Jaiswal, A.K. 2016. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. In *Trends in Biotechnology*. 34(1), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>
- Remize, M. Planchon, F., Loh, A.N., Le Grand, F., Bideau, A., Le Goic, N., Fleury, E., Miner, P., Corvaisier, R., Volety, A., Soudant, P. 2020. Study of Synthesis Pathways of the Essential Polyunsaturated Fatty Acid 20:5n-3 in the Diatom *Chaetoceros Muellieri* Using ^{13}C -Isotope Labeling. *Biomolecules*. 10(5), 797. <https://doi.org/10.3390/biom10050797>
- Richmond, A. 2013. Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture. Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*. (pp. 171–204). <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch11>

- Rıza A. 2024. Growth performance and biochemical composition of *Tetrademus obliquus* (Turpin) M.J. Wynne in media with different nitrogen concentrations. *Ciência Rural, Santa Maria*. 54(9), e20230269. [10.1590/0103-8478cr20230269](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20230269)
- Ryan, M.P., Walsh, G. 2016. The biotechnological potential of whey. *Environmental Science and Biotechnology*, 15(3), 479–498. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1>
- Saadaoui, I., Rasheed, R., Aguilar, A. *et al.* 2021. Microalgal-based feed: promising alternative feedstocks for livestock and poultry production. *J Animal Sci Biotechnol*. 12, 76. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00593-z>
- Sadeghin, B., Sarrafzadeh, M.H., Jin, J., Dupre, C., Watanabe, M., Legrand, J., Grizeau, D. 2018. Variation of fatty acids composition in the hydrocarbon producer *Botryococcus braunii* BOT 22. *Biomass and Bioenergy*. 119, 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.013>
- Saeid, A., Chojnacka, K., Opaliński, S., Korczyński, M. 2016. Biomass of *Spirulina maxima* enriched by biosorption process as a new feed supplement for laying hens. *Algal Research*. 19, 342-347.
- Santana, A., Jesus, S., Larrayoz, M. A., Filho, R. M. 2012. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Algal Lipids for the Biodiesel Production. *Procedia Engineering*. 42, 1755–1761.
- Santin A., Balzano S., Russo M.T., Palma Esposito F., Ferrante M.I., Blasio M., Cavalletti E., Sardo A. 2022. Microalgae-Based PUFAs for Food and Feed: Current Applications, Future Possibilities, and Constraints. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(7):844.
- Santin A., Russo M.T., Ferrante M.I., Balzano S., Orefice I., Sardo A. 2021. Highly Valuable Polyunsaturated Fatty Acids from Microalgae: Strategies to Improve Their Yields and Their Potential Exploitation in Aquaculture. *Molecules*, 20;26(24):7697.
- Schilling, C., Weiss, S. 2021. A Roadmap for Industry to Harness Biotechnology for a More Circular Economy. *New Biotechnology*. 60, 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.08.005>
- Senanayake, N. S. P. J. 2013. Methods of concentration and purification of omega-3 fatty acids. Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceuical Industries. 483–505.

- Shahidi, F., Wanasundara, U. N. 1998. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends in Food Science & Technology*. 9(6), 230–240.
- Shandilya, K. K. 2019. Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts *Using Microalgae for Treating Wastewater*. 119–136. doi:10.1016/B978-0-12-817937-6.00007-2
- Sharma, A., K., Chintala, V., Ghodke, P., Prasher, P., Patel, A. 2020. Extraction and Purification of PUFA from Microbial Biomass. *Nutraceutical Fatty Acids from Oleaginous Microalgae*, 249–279.
- Sharpes Stock Feeds Ltd. 2021. Nutrition requirements and feed for laying hens. <https://www.stockfeed.co.nz/resources/poultry-feed/laying-hens-nutritional-requirements/>. Skatīts 26.06.2024.
- SIA “LASMA LA”. S.a. Kombinētā spēkbarība dējējvistām drupatas 35 kg (Rīgas komb spēkbarība). <https://www.e-saimnieciba.lv/kontakti/>. Skatīts 26.06.2024.
- SIA “Pakavs”. 2024. Barība dējējvistām Dobeles dzirnavnieks, 20 kg. <https://pakavs.lv/preces/dzivniekiem/putniem/bariba-un-mineralpiedevas/bariba-dejevistam-dobeles-dzirnavnieks-20-kg/>. Skatīts 26.06.2024.
- SIA “SAIMNIECĪBA VISTIŅAS”. S.a. Pilnvērtīga barība dējējvistām, 20kg. <https://www.inkubatori.lv/kontakti/>. Skatīts 26.06.2024.
- Silva, H. R., Prete, C. E. C., Zambrano, F., de Mello, V. H., Tischer, C. A., Andrade, D. S. 2016. Combining glucose and sodium acetate improves the growth of neochloris oleoabundans under mixotrophic conditions. *AMB Express*. 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0180-5>
- Smith, R. T., Bangert, K., Wilkinson, S. J., Gilmour, D. J. 2015. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. *Biomass and Bioenergy*. 82(73–86). <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.04.023>
- Sommella, E., Pepe, G., Ventre, G., Pagano, F., Conte, G.M., Ostacolo, C., Manfra, M., Tenore, G.C., Russo, M., Novellino, E., Campiglia, P. 2016. Detailed peptide profiling of “Scotta”: from a dairy waste to a source of potential health-promoting compounds. *Dairy Science and Technology*. 96(5), 763–771. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0297-y>
- Spasevski, N.J., Peulič, T., Banjac, V., Rakita, S. 2019. Natural additives in functional egg production. *Food and Feed Research*. 46(2), 199-207.

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 2 (87-96).
- Sukenik, A., Wahnou, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Ebevier Science Publishers B.V., Amsterdam*, 97(1), 61–72.
- Sung, H.O., Jae, G.H, Young, K. Ji, H.H., Seung, S.K., Myoung, H.J., Hyang, S.J., Na, Y.K., Jeong, S.C., Won, B.Y., Shin, Y.L., Do, H.K., Hyeon, Y.L. 2009. Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *J Biosci Bioeng*, 108(5), 429–434.
- Toumi, A, Politaeva, N, Đurović, S, Mukhametova, L, Ilyashenko, S. 2022. Obtaining DHA–EPA Oil Concentrates from the Biomass of Microalga *Chlorella sorokiniana*. *Resources*. 11(2):20.
- Tulashie, S. K., Salifu, S. 2020. Potential production of biodiesel from green microalgae. *Biofuels*, 11(2), 201–208.
- Uluata, S., McClements, D.J., Decker, E.A. 2015. How the multiple antioxidant properties of ascorbic acid affect lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(6), 1819-1824.
- Valente, L. M. P., Cabrita, A. R. J., Maia, M. R. G., Valente, I. M., Engrola, S., Fonseca, A. J. M., Ribeiro, D. M., Lordelo, M., Martins, C. F., Cunha, L. F., Almeida, A. M., Freire, J. P. B. 2021. Microalgae as feed ingredients for livestock production and aquaculture. *Academic Press*. In C. M. Galanakis (Ed.), *Microalgae* (pp. 239–312). ISBN 9780128212189.
- Vázquez, L., Casimir, C., A. 2012. Enrichment of stearidonic acid in modified soybean oil by low temperature crystallisation, *Food Chemistry*. 130:1(147-155).
- Velazquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R.M., Colla, L.M., Sáenz-Galindo, A. Cisneros, D.E.C., Aguilar, C.N., Fernandes, B.D., Ruiz, H.A. 2018. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. *Biofuel Research Journal*. 17, 780-791.
- Vidya, D., Nayana, K., Sreelakshmi, M., Keerthi, K. V., Mohan, K. S., Sudhakar, M. P., Arunkumar, K. 2023. A sustainable cultivation of microalgae using dairy and fish wastes for enhanced biomass and bio-product production. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 13(8), 6859–6873. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01817-y>

- Villière, A., Rousseau, F., Brossard, C., Genot, C. 2007. Sensory evaluation of the odour of a sunflower oil emulsion throughout oxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Wang, X., Zhang, M. M., Sun, Z., Liu, S. F., Qin, Z. H., Mou, J. H., Zhou, Z. G., Lin, C. S. K. 2020. Sustainable lipid and lutein production from *Chlorella* mixotrophic fermentation by food waste hydrolysate. *Journal of Hazardous Materials*. 400. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123258>
- Weixian, C., Li, T., Du, S., Chen H., Wang Q. 2023. Microalgal polyunsaturated fatty acids: Hotspots and production techniques. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 11.
- Wen, X., Wang, Z., Ding, Y., Geng, Y., Li, Y. 2020. Enhancing the production of astaxanthin by mixotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in open raceway ponds. *Aquaculture International*. 28(2), 625–638. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00483-2>
- Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D., Sporns, P. 2004. Handbook of food analytical chemistry. John Wiley & Sons, 513-564.
- Xie, D., Chen, Y., Yu, J., Yang, Z., Wang, X., Wang, X. 2022. Progress in enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acid: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 63(32), 11310–11326.
- Xin, Y., Wu, S., Miao, C., Xu, T., Lu, Y. 2024. Towards Lipid from Microalgae: Products, Biosynthesis, and Genetic Engineering. *Life*. 14(4), 447. <https://doi.org/10.3390/life14040447>
- Yaakob, M. A. Mohamed, R. Al-Gheethi, E. I., A., Gokare, R., Ambati, R. 2021. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*. 10. 393.
- Yagi, K. 1998. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Free radical and antioxidant protocols*. 101-106.
- Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic lightautotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 6-2(87–102). [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00080-2)

- Yang, R., Wei, D. 2020. Improving Fucoxanthin Production in Mixotrophic Culture of Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* by LED Light Shift and Nitrogen Supplementation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00820>
- Zahran, E., Elbahnaswy, S., Ahmed, F. *et al.* 2023. Nutritional and immunological evaluation of *Nannochloropsis oculata* as a potential Nile tilapia-aquafeed supplement. *BMC Vet Res*, 19, 65.
- Zhang, Y., Ye, Y., Bai, F., Liu, J. 2021. The oleaginous astaxanthin-producing alga *Chromochloris zofingiensis*: potential from production to an emerging model for studying lipid metabolism and carotenogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01969-z>
- Zhou, J., Wang, M., Saraiva, A. J., Martins, A. P., Pinto, C. A., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Cao, H., Xiao, J., Barba, F. J. 2022. Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. *Food Chemistry*. 384, 132236.
- Zhu, L., Zhang, X., Ji, L., Song, X., Kuang, C. 2007. Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. *Process biochemistry*, 42(2), 210–214.
- Zhukova, N.V. 2004. Changes in the Lipid Composition of *Thalassiosira pseudonana* during Its Life Cycle. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51, 702–707.
- Zili, F., Bouzidi, N., Ammar, J., Zakhama, W., Ghoul, M., Sayadi, S., Ouada, H. 2017. Mixotrophic cultivation promotes growth, lipid productivity, and PUFA production of a thermophilic Chlorophyta strain related to the genus *Graesiella*. *Journal of Applied Phycology*. 29(1). [10.1007/s10811-016-0941-1](https://doi.org/10.1007/s10811-016-0941-1)
- ZOOparks.lv. S.a. Panto LMK 25kg Pilnvērtīga barība dējējvistām. <https://zooparks.lv/lv/putni/majputniem/bariba/panto-lmk-25kg-pilnvertiga-bariba-dejevjistam/>. Skatīts 26.06.2024.
- Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C., Gullo, M. 2020. Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104(7), 2749–2764. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10408-2>
- Zuñiga, C., Li, C.-T., Huelsman, T., Levering, J., Zielinski, D. C., McConnell, B. O., Long, C. P., Knoshaug, E. P., Guarnieri, M. T., Antoniewicz, M. R., Betenbaugh, M. J., Zengler, K.

2016. Genome-Scale Metabolic Model for the Green Alga *Chlorella vulgaris* UTEX 395 Accurately Predicts Phenotypes under Autotrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Growth Conditions. *Plant Physiology*. 172(1), 589–602.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.00593>

Heinzl, I., Caballero, M., Bhoyar, A. 2020. Necrotic enteritis: The complete overview. *EW Nutrition*. Skatīts: 12.06.2025. Pieejams: <https://ew-nutrition.com/necrotic-enteritis-complete-overview/>