Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte
Latvia University of Life Sciences and Technologies
Meža un vides zinātņu fakultāte
Faculty of Forest and Environmental Sciences

Mg. chem. **Anna Andersone**

SMILTSĒRKŠĶU LIGNOCELULOZES BIOMASAS BEZATLIKUMA IZMANTOŠANAS IZPĒTE ILGTSPĒJĪGAI MULTIFUNKCIONĀLO PRODUKTU RAŽOŠANAI

RESEARCH ON THE ZERO-WASTE USES OF SEA BUCKTHORN LIGNOCELLULOSIC BIOMASS FOR SUSTAINABLE MANUFACTURING OF MULTIFUNCTIONAL PRODUCTS

Promocijas darba KOPSAVILKUMS
zinātnes doktora grāda (*Ph.D.*) iegūšanai

SUMMARY
of the Doctoral thesis for the Doctoral degree of Science (*Ph.D.*)

Autore / Author_____

Jelgava
2024

Promocijas darbs izstrādāts un aprobēts Latvijas Valsts Koksnes ķīmijas institūtā sadarbībā ar Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultāti un Zemkopības institūtu. Doktorantūras studiju laiks Rīgas Tehniskajā Unversitātē no 2010. – līdz 2023. gadam un Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātē no 2023. līdz 2024. gadam. Pētījumu finansiālais atbalsts ir ERAF projekts Nr. 1.1.1.1/19/A/146 "Smiltsērkšķu bez-augļu biomasas biorafinēšanas pārstrāde, izmantojot inovatīvas tehnoloģijas un visaptverošu analītisko izpēti, lai iegūtu Latvijas bioekonomikai perspektīvus produktus ar augstu pievienoto vērtību, ieskaitot serotonīnu" un LZP projekts Nr. lzp-2022/1-0599 "Inovatīvas pretiekaisuma un antipatogēnas sistēmas, kuru pamatā ir proantocianidīni, kas izolēti no augļu krūmu lauksaimniecības lignocelulozes atkritumiem".

The doctoral thesis was developed and approved at the Latvian State Institute of Wood Chemistry in cooperation with the Faculty of Biology of the University of Latvia and the Institute of Agriculture. Period of doctoral studies at the Riga Technical University from 2010 to 2023 and at the Latvia University of Life Sciences and Technologies from 2023 to 2024. Financial support for research is ERDF project no. 1.1.1.1/19/A/146 "Biorefinery processing of sea buckthorn non-fruit biomass using innovative techniques and comprehensive analytical investigation, for obtaining prospective high value-added products for the Latvian bioeconomy, including serotonin" and Latvian Concil of Science project Nr. lzp-2022/1-0599 "Innovative anti-inflammatory and antipathogenic systems based on proanthocyanidins isolated from fruit shrubs agricultural lignocellulosic waste".

Promocijas darba zinātniskie vadītāji / *Scientific supervisors*:
Dr.sc.ing. Sarmīte Janceva
Dr.sc.ing. Uldis Spulle

Promocijas darba rezultāti ir atspoguļoti 8 SCI zinātniskajās publikācijās un 4 recenzētos zinātnisko konferenču rakstos. Ir iesniegts 1 Latvijas Republikas patents. Darbs izpildīts LV Koksnes ķīmijas institūtā, Lignīna ķīmijas laboratorijā laika posmā no 2020. gada līdz 2024. gadam.

The results of the doctoral thesis are included in 8 SCI scientific publications and 4 peer-reviewed scientific conference articles. 1 patent of the Republic of Latvia has been submitted and will be published on December 20, 2024. The work was performed at the Latvian State Institute of Wood Chemistry, Lignin Chemistry Laboratory in the period from 2020 to 2024.

Oficiālie recenzenti/ *Official reviewers:*

1. *Dr.chem.* Bruno ANDERSONS, Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūta vadošais pētnieks / *Leading Researcher, Latvian State Institute of Wood Chemistry*;
2. *Dr.sc.ing.* Inese FIĻIPOVA, Rīgas Tehniskās Universitātes Individuālo aizsardzības līdzekļu laboratorijas vecākā zinātniskās darbības eksperte / *Senior Expert in Scientific Activity, Riga Technical University Personal Protective Equipment laboratory*;
3. *Ph.D.* Andrey PRANOVITCH, Abo Akadēmijas (Somija), vadošais pētnieks / *Leading Researcher, Abo Akademi University*.

Promocijas darba aizstāvēšana paredzēta Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Materiālzinātnes nozares promocijas padomes atklātā sēdē, Būvniecības un kokapstrādes institūta Prof. (Emeritus), Dr.habil.sc.ing. Henn TUHERM auditorijā, 2024. gada 30. augustā plkst. 10:00.

The defense of the doctoral thesis *is scheduled at the open session of the Materials Science doctoral council of the Latvia University of Biosciences and Technologies, in the Institute of Construction and Woodworking. Prof. (Emeritus), Dr.habil.sc.ing. Henn TUHERM auditorium, August 30, 2024 at 10:00 a.m.*

Ar promocijas darbu var iepazīties LBTU Fundamentālajā bibliotēkā Jelgavā, Lielā ielā 2 un interneta vietnē https://lbtufb.lbtu.lv/lv / *The doctoral thesis can be viewed at the LBTU Fundamental Library in Jelgava, Liela street 2, and at the website https://lbtufb.lbtu.lv/lv.*

© 2024 Anna Andersone
© 2024 Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte

SATURS / *CONTENTS*

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE 6
ZINĀTNISKA DARBA APROBĀCIJA 11
MATERIĀLI UN METODES 16
REZULTĀTI UN DISKUSIJA 22
1. Smiltsērkšķu biomasas raksturojums 22
2. Smiltsērkšķu biomasas kā bioloģiski aktīvo vielu avota potenciāls 23
3. Proantocianidīnu un serotonīna izdalīšana 27
4. Antioksidatīvā aktivitāte 28
5. Antimikrobiālā aktivitāte 31
6. Pretiekaisuma aktivitāte 34
7. Mērķsavienojumu iedarbība uz aizkuņģa dziedzera lipāzes aktivitāti gremošanas divpadsmitpirkstu zarnas fāzē 35
8. Mērķsavienojumu iedarbība uz amilāzes aktivitāti siekalās 36
9. Analizējamo paraugu hemolīze 36
10. Citotoksicitāte 37
11. Smiltsērkšķu biomasas novērtējums lopbarības ieguvei 38
12. Smiltsērkšķu biomasas novērtējums augsnes piedevas ieguvei 40
13. Smiltsērkšķu biorafinēšanas shema 41
SECINĀJUMI 42
REKOMENDĀCIJAS 43
PATEICĪBA 44
LITERATŪRAS SARAKSTS 84

RELEVANCE OF THE RESEARCH 45
APPROBATION OF RESEARCH RESULTS 51
MATERIALS AND METHODS 55
RESULTS AND DISCUSSION 62
1. Characterization of sea buckthorn biomass 62
2. The potential of sea buckthorn biomass as a source of biologically active substances 63
3. Isolation of proanthocyanidins and serotonin 67
4. Antioxidant activity 68
5. Antimicrobial activity 71
6. Anti-inflammatory activity 74

7. Effect of target compounds on pancreatic lipase activity in the duodenal phase of digestion.....75
8. Effect of target compounds on salivary amylase activity.....76
9. Hemolysis of analyzed samples.....76
10. Cytotoxicity.....77
11. Evaluation of sea buckthorn biomass for feed production 78
12. Evaluation of sea buckthorn biomass for soil additive production.....80
13. Sea buckthorn biorefinery scheme 81
CONCLUSIONS 82
RECOMMENDATION.....83
ACKNOWLEDGMENT 84
REFERENCES LIST……..…84

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Pašreizējā pasaules patēriņa apmierināšana nav ilgtspējīga, jo cilvēces resursu patēriņš pārsniedz to, ko daba spēj atjaunot. Pārvēršot bioatkritumus resursā, ne tikai tiks aizvietoti fosilie resursi, bet arī tiks atrisināta izejvielu trūkuma problēma.

Eiropas Savienībā (ES) augļu koku audzēšanai kopumā atvēlēti 11.3 mln hektāru (ha) [1]. Šo koku atzarošana kopā ar stādījumu nozāģēšanu vai izņemšanu rada milzīgu daudzumu koksnes atkritumu. Teorētiskais koksnes atkritumu aprēķins ES lēš, ka katru gadu augļu koku atzarošanas rezultātā tiek iegūti līdz 25 miljoni tonnu koksnes zaru veidā [2]. Šie koksnes atkritumi parasti tiek sadedzināti vai sasmalcināti ar to turpmāko iestrādi augsnē, kas nerada tiešus ekonomiskus ieguvumus. Tādējādi ir racionāli ieviest augļkoku koksnes pārstrādi vērtīgos produktos ar pievienoto vērtību. Atjaunīgo resursu racionālā pielietošana ir viena no Latvijas Bioekonomikas stratēģijas 2030 prioritātēm, paaugstinot vietējo atjaunīgo resursu produktivitāti [3].

Viens no Latvijā aktuālajiem un mazizpētītajiem atjaunīgiem resursiem ir smiltsērkšķu koksne. Smiltsērkšķis savu uzmanību izpelnījies, pateicoties augļu bagātīgam sastāvam un vērtīgām īpašībām. Smiltsērkšķi aug 52 valstīs, vislielākās plantācijas Eirāzijas teritorijā, Kaukāzā, Rietumāzijā, Vidusāzijā, Ķīnā un Mongolijā [4]. *Hippophaë rhamnoides L.* ir visizplatītākā smiltsērkšķu ģints suga. Pateicoties spēcīgai un attīstītai sakņu sistēmai, smiltsērkšķus izmanto meliorācijā un augsnes bagātināšanā, tā slāpekli piesaistošo īpašību dēļ (8 līdz 10 gadus vecs smiltsērkšķu stādījums spēj piesaistīt 180 kg slāpekļa uz ha gadā) [5].

Latvijā smiltsērkšķis ir otra visvairāk izplatītā augļu koku suga pēc ābeles, un tā stādījumu platība arvien pieaug. Salīdzinot ar 2010. gadu, smiltsērkšķu platību skaits Latvijā palielinājās no 200 līdz 1535 ha, līdzvērtīgi palielinoties arī smiltsērkšķu ogu ražai no 200 līdz 814 t gadā [6]. Latvijā audzētu smiltsērkšķu ogām ir ļoti augsti kvalitātes rādītāji, bet ogu pārstrādātāji ekonomisko apsvērumu dēļ bieži vien spiesti izvēlēties lētākas ogas, nevis kvalitatīvākas. Liela konkurence liek aizdomāties par videi draudzīgu un racionālu visu augu daļu pārstrādi.

Augļu koku atzarošanas galvenais mērķis ir atvieglot vainagu veidošanu lielākai koka ražībai un ērtākai ražas novākšanai. Smiltsērkšķu audzēšanas tehnoloģija paredz četrus gadus vecu plantācijās augošo koku pilnīgu nozāģēšanu un vienu līdz divus gadus vecu zaru apgriešanu gan pavasarī, veidojot vainagu un samazinot krūma sēnīšu infekciju risku, gan vasarā un rudenī – ogu novākšanas rezultātā, t.sk. veicot sanitāro atzarošanu. Vasarā un rudenī veidojas vislielākais zaru apjoms. Asi, ērkšķaini zari traucē ogu noņemšanu, un komercnolūkos audzēto ogu novākšanas procesa paātrināšanai zari tiek nogriezti kopā ar ogām. Pēc ogu atdalīšanas (iepriekš visu zaru ar ogām sasaldējot) atdalīto

zaru apjoms vidēji sastāda ap 20-30% no augļzaru masas un ikgadēji var radīt no 0.5 līdz 2.0 tonnām/ha sausas koksnes (1. att.)

1. att. **Smiltsērkšķu plantācija (A); pavasara zaru biomasa (B); rudens zaru biomasa (C)**

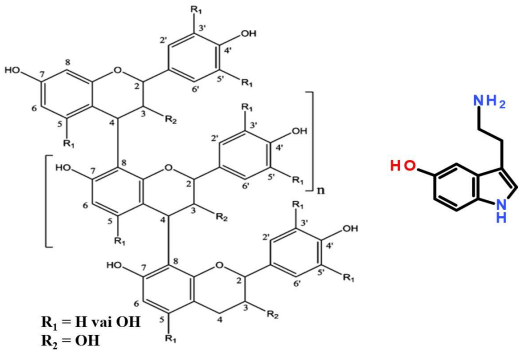
Šobrīd smiltsērkšķu audzētāji visu šo zaru apjomu sadedzina, nenovērtējot šīs lignocelulozes biomasas potenciālu, kaut gan šī koksnes daļa var būt vērtīga izejviela bioloģiski aktīvo vielu un jaunu produktu ieguvei, radot papildus ienākumus audzētājiem ārpus ražas novākšanas laikā. Pamatojoties uz Lauku atbalsta dienesta (LAD) datiem, 2023. gadā Latvijā bija 2 miljoni ha neapstrādātas lauksaimniecības platības [7]. Daļu no šīm platībām ir iespējams izmantot smiltsērkšķu audzēšanas plantāciju paplašināšanai, papildus piesaistot jaunu darbaspēku, veidojot pozitīvu sociālās vides sekmēšanu lauku reģionos.

Neskatoties uz smiltsērkšķa ātraudzību un koksnes pozitīvām īpašībām (cieta, izturīga, blīva, un vidēja svara), tas tiek uzskatīts par mazvērtīgu augļkoku sugu, kas nesasniedz pietiekami lielas dimensijas, lai tas būtu izmantojams celtniecībā, būvgaldniecībā vai mēbeļu ražošanā. No smiltsērkšķu stumbra koksnes izgatavo nažu un lietussargu rokturus, iemutņus, spieķus, virtuves piederumus un rotaļlietas. Smiltsērkšķu atzarojumu atlikumos lielāko daļu aizņem maza diametra zari, tādēļ to izmantošana kurināmo granulu ieguvei ir apgrūtināta, augsta pelnu satura dēļ. Saskaņā ar Scopus® bāzes datiem, pēdējo desmit gadu laikā publikāciju skaits par tēmu "augļu koksnes valorizācija" ir pieaudzis 7 reizes, piedāvājot augļkoku koksnes izmantošanu papīra ieguvei un koksnes kompozītmateriālu ražošanā.

Koksni vislabāk var definēt kā biopolimēra kompozītu, kas sastāv no celulozes, hemicelulozes, lignīna un ekstraktvielām. Koksnes ekstraktvielās ir daudz visdažādāko klašu organisko savienojumu [8]. Vieni no vērtīgākiem koksnes kā lignocelulozes biomasas ķimiskiem savienojumiem ir polifenoli, t.sk. proantocianidīni, kas uzkrājas augu augšanas un attīstības procesā, nodrošinot augiem svarīgas fizioloģiskās īpašības, pasargājot augu no biotiskajiem un abiotiskajiem stresiem un nodrošinot aizsardzību pret infekcijas slimību ierosinātājiem [20]. Polifenolu koncentrācija augā un to sastāvs ir atkarīgs gan no auga veģetācijas fāzes gan no šķirnes, gan no ģeogrāfiskās augšanas vietas un

fizioloģiskā brieduma. Polifenoliem piemīt antioksidatīvas, antimikrobiālas, fungicīdas, biostimulējošas, pretiekaisuma, kardioprotektīvas un antikancerogēnas īpašības [9]. Tas liecina, ka augļu koksnes ekstraktiem var būt vairāki pielietojumi medicīnā, pārtikas, farmācijas un uztura rūpniecībā, kosmētikas ražošanā un lauksaimniecībā. Iepriekšējie pētījumi parādīja, ka proantocianidīni ir dominējošie savienojumi oligomēro polifenolu sastāvā, kas iegūti no lapkoku un skujkoku lignocelulozes biomasām (koksne, miza) [21]. Proantocianidīnu saturs smiltsērkšķu koksnes biomasā, to sastāvs un bioaktivitāte nav pētīti. Dažos zinātniskos pētījumos atzīmēts, ka smiltsērkšķu zaru miza satur serotonīnu, tā saukto "laimes hormons", turklāt daudz lielākā daudzumā, nekā tas ir, piemēram, šokolādē vai banānos. Organismā serotonīns veidojas smadzenēs un gremošanas traktā no neaizvietojamās aminoskābes L-triptofāna, kas nonāk organismā ar pārtiku. Serotonīns veicina psiholoģisko un fizisko labsajūtu, imūnsistēmas darbību, regulē gremošanu, miegu, atmiņu un dzimumfunkciju. No saflora sēklām iegūtajam serotonīnam piemīt antioksidatīva, pretiekaisuma un pretvēža aktivitāte, kā arī novērojams potenciāls Parkinsona slimībai līdzīgo simptomu, depresijas un aptaukošanas mazināšanai [54], [55], [56], [53]. Serotonīna fizioloģiskās funkcijas augos vēl nav skaidras.

Balstoties uz serotonīna un proantocianidīnu (2. att.) potenciālu un svarīgumu organismam, promocijas darbā tie izvēlēti kā mērķsavienojumi, novērtējot Latvijā kultivēto smiltsērkšķu atkritumus, galvenokārt zarus, kā mērķsavienojumu avotu, tos izdalot, attīrot un raksturojot, lai novērtētu papildu izmantošanas iespējas. Lai nodrošinātu bezatlikuma koksnes pārstrādi, koksnes atlikums pēc mērķsavienojumu atdalīšanas var būt lietderīgi izmantots kā lopbarības piedeva vai kā augsnes piedevas substrāts, atgriežot dabas apritē no tās paņemto organisko daļu, kas nepieciešama augsnes-biotiskā kompleksa labvēlīgai darbībai.



2. att. **Proantocianidīna un serotonīna ķīmiskā struktūra**

Smiltsērkšķu proantocianidīnu vai to saturošo ekstraktu izmantošana rūpnieciskos nolūkos, piemēram, koksnes adhezīvu iegūšanai, vai to izmantošana ūdens attīrīšanai, vai viskozitātītes regulēšanai nav ekonomiski lietderīga nepieciešamo lielo apjomu dēļ, līdz ar to šī promocijas darba ietvaros tika meklēti jauni pielietojuma virzieni ar augstāko pievienoto vērtību, un primāri ir pētīta proantocianidīniem piemītošā bioloģiskā aktīvitāte, t.sk., pretmikrobu un pretiekaisuma īpašības.

Tādējādi, smiltsērkšķa proantocianidīni no zariem varēs aizvietot citas augu izcelsmes proantocianidīnus, piemēram, no dzērvenēm, vai preparātus no smiltsērkšķa augļiem, kuru iegūšana konkurē ar pārtikas ķēdi un līdz ar to ir daudz dargāka. Turklāt, tas ne tikai ļaus izstrādāt smiltsērkšķa ilgtspējīgo pārstrādes ciklu, bet arī ļaus iegūt proantocianidīnus no vietējās izcelsmes koksnes, kas būs vērtīgs pienesums Latvijas ekonomikai. Smiltsērkšķu pielietojums medicīnas un veterinārijas nozarēs ir ļoti aktuāls, ņemot vērā dažādu infekcijas slimību izplatību, to apgrūtinātu ārstēšanu, kam par iemeslu ir patogēni mikroorganismi, kas kļuvuši rezistenti pret antibiotikām [46].

Promocijas darba hipotēze

Analizējot literatūrā pieejamo informāciju, ir izvirzīta **promocijas darba hipotēze**: cirkulāras ekonomikas ietvaros smiltsērkšķim ir iespējams izstrādāt biorafinēšanas shēmu, pārstrādājot visas koka veģetatīvas daļas vērtīgos mērķproduktos (proantocianidīni un serotonīns), ar pretiekaisuma un antimikrobiālām īpašībām, un no pārstrādes atlikuma iegustot lopbarības un augsnes piedevu.

Promocijas darba hipotēze ir aiztāvama ar sekojošām tēzēm:

- smiltsērkšķu koksnes biomasa ir perspektīva izejviela oligomēro proantocianidīnu un serotonīnu ieguvei kā individuālu komponentu vai kompleksā veidā, radot sinerģiju bioaktivitātē. Izstrādātais tehnoloģiskais paņēmiens ir efektīvs mērķsavienojumu izdalīšanai no ekstrakta;
- pierādīta mērķsavienojumu un to saturošo ekstraktu augsta antioksidatīvā, antimikrobiālā un pretiekaisuma aktivitāte, kā arī ietekme cilvēku gremošanas fermentu aktivitātē, gan inhibējot, gan aktivējot to darbību. Iegūtie mērķsavienojumi un to saturošie ekstrakti nav toksiski darbības koncentrāciju diapazonā;
- smiltsērkšķu koksnes atlikums pēc ekstrakcijas ir piemērota izejviela lopbarības piedevas ieguvei, kas spēj kontrolēt sagremojamību un gāzes veidošanos, mainot izejvielu masas attiecību. Bagātinot smiltsērkšķu koksnes atlikumu ar mikro- un makroelementiem, iegūtā augsnes piedeva veicina dārzeņu un graudu augšanu un attīstību, papildus uzlabojot augsnes kvalitāti, paaugstinot organisko vielu saturu augsnes sastāvā.

Promocijas darba mērķis ir novērtēt Latvijā kultivēto augļkoku – smiltsērkšķu (*Hippophae rhamnoides* L.) – lignocelulozes biomasu kā potenciālu serotonīna un proantocianidīnu avotu, piedāvājot inovatīvu risinājumu lignocelulozes biomasas bezatlikuma kompleksai pārstrādei konkurētspējīgu, funkcionālu, videi, cilvēkiem un dzīvniekiem nekaitīgu produktu iegūšanai.

Darba mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši **uzdevumi**:

1. novērtēt smiltsērkšķu atzarojumu koksnes potenciālu kā izejvielu bioloģiski aktīvo vielu – serotonīna un oligomēro proantocianidīnu – ieguvei un noteikt piemērotāko ekstrakcijas un attīrīšanas veidu mērķsavienojumu ieguvei;
2. noteikt antimikrobiālo, antioksidatīvo, pretiekaisuma aktivitāti un citotoksicitāti ekstaktiem, oligomēro proantocianidīnu un serotonīnu saturošām frakcijām un izvērtēt to praktiskās izmantošanas iespējas;
3. noteikt mērķsavienojumu un ekstraktu iedarbību uz cilvēku gremošanas fermentu aktivitāti;
4. noteikt pēcekstrakcijas koksnes atlikuma potenciālu kā izejvielu granulētas lopbarības un augu augšanas veicinātāja ieguvei;
5. izstrādāt biorafinēšanas shēmu bezatlikuma smiltsērkšķu atzarojumu - lignocelulozes biomasas kompleksai izmantošanai.

Zinātniskā novitāte:

- pirmo reizi novērtēts Latvijā kultivēto smiltsērkšķu atkritumu potenciāls oligomēro proantocianidīnu un serotonīnu ieguvei;
- izmantojot cilvēkiem un videi drošas ķimikālijas, t.sk. ozonam drošu freonu HFC R134a, izstrādāts piemērots mērķsavienojumu izdalīšanas paņēmiens, kas ļāva novērtēt vielu lomu ekstraktu sastāvos un bioaktivitātē, t.sk. cilvēka gremošanas fermentu (alpha-amilāze, aizkuņģa dziedzera lipāze) aktivitātē;
- pirmo reizi noteikts piemērotākais sezonas laiks un smiltsērkšu zaru vecums proantocianidīnu, serotonīna un to saturošo ekstraktu ieguvei;
- pamatojoties uz asu nepieciešamību pēc dabiskiem antimikrobiālajiem līdzekļiem, mērķsavienojumi gan individuālā, gan maisījuma veidā testēti pret septiņiem patogeniem mikroorganismiem, papildus novērtējot to ietekmi bioplēves veidošanā, izmantojot triju veidu baktērijas;
- pirmo reizi ir noteikts no smiltsērkšķu koksnes biomasas izdalīto proantocianidīnu sastāvs un to loma pretiekaisuma aktivitātē;
- veikta smiltsērkšķu ekstraktu un mērķsavienojumu antioksidatīvas aktivitātes izpēte lipīdu saturošos produktos;
- novērtētas smiltsērkšķu koksnes atlikuma pēc ekstrakcijas izmantošanas iespējas lopbarības piedevas ieguvei, ķīmiski to raksturojot un nosakot gremošanas efektivitāti atgremotāju kuņģa modeļu sistēmā;
- bagātinot pēc ekstrakcijas smiltsērkšķu koksnes atlikumu ar silīciju saturošo komponentu, novērtēta iegūtas augsnes piedevas ietekme uz augu augšanu un

attīstību, atgriežot dabas apritē organisko daļu, kas nepieciešama augsnes-biotiskā kompleksa labvēlīgai darbībai.

Darba tautsaimnieciskā nozīmība:

- parādīta iespēja no smiltsērkšķu zariem iegūt proantocianidīnu un serotonīnu saturošus produktus, kas dos būtisku ieguldījumu bioekonomikas attīstīšanā, kas aktuāla Latvijas tautsaimniecībai un atbilst Eiropas Savienības stratēģiskajiem uzdevumiem;
- proantocianidīni un to saturošie ekstrakti ir potenciāli antioksidanti medicīniskiem un kosmētiskajiem krēmiem, radot alternatīvu sintētiskiem, ekoloģiski nedrošiem antioksidantiem;
- proantocianidīni, serotonīns un to saturošie ekstrakti ir potenciāli antimikrobiālie līdzekļi, radot alternatīvu vai papildinot antibiotikas cīņai pret rezistentiem mikrobiem;
- serotonīna gremošanas fermentu stimulējošā un proantocianidīnu kavējošā darbība parāda mērķsavienojumu perspektivitāti veselības aprūpē, dažādu ar gremošanu saistītu problēmu risināšanai;
- parādīta iespēja izmantot zaru atlikumu pēc ekstrakcijas lopbarības piedevas ieguvei, un kā substrātu augsnes piedevas ieguvei;
- izstrādātā smiltsērkšķu lignocelulozes biomasas racionālā bezatlikuma pārstrādes shēma produktos ar pievienoto vērtību būs noderīga un pielietojama arī citu augļkoku vai ogulāju atzarošanas atkritumu pilnvērtīgai izmantošanai.

ZINĀTNISKA DARBA APROBĀCIJA

Publikāciju saraksts / *List of publications*

Promocijas darba rezultāti ir atspoguļoti astoņās publikācijas, uz kurām atsauces tekstā veidotas, izmantojot romiešu ciparus:
The doctoral thesis is based on eight publications, referred to by Roman numerals in the text:

I. **Andersone A.***, Janceva S.*, Lauberte L., Nikolajeva V., Zaharova N., Jurkjane V., Rieksts G., Spulle U., Telysheva G. (2024) Sea Buckthorn, Aronia, and Black Currant Pruning Biomass as a Source of Multifunctional Anti-aging Cosmetic and Pharmaceutical Creams Ingredients (**pirmo divu autoru vienāds ieguldījums publikācijas rakstīšanā, sagatavota iesniegšanai*).

II. Janceva S., **Andersone A.**, Lauberte L., Zaharova N., Telysheva G., Krasilnikova J., Rieksts G. (2024) A Comparative Assessment of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Pruning Waste as a Potential Source of

Serotonin. BioResources 19(1), 886-897. https://doi.org/10.15376/biores.19.1.886-897.

III. **Andersone A.**, Janceva S., Lauberte L., Skadins I., Nikolajeva V., Logviss K., Zaharova N., Rieksts G., Telysheva G. (2023) A Comparative Analysis of the Proanthocyanidins from Fruit and Non-fruit Trees and Shrubs of Northern Europe: Chemical Characteristics and Biological Activity. Sustainable Chemistry and Pharmacy, Volume 36, 101266. https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101266.

IV. **Andersone A.**, Janceva S., Lauberte L., Krasilnikova J., Zaharova N., Nikolajeva V., Rieksts G., Telysheva G. (2023) Lignocellulosic Waste Compounds for Pancreatic Lipase Inhibition: Preliminary Extraction by Freon, Obtaining of Proanthocyanidins and Testing on Lipase Activity. Metabolites, 13(8), 922. https://doi.org/10.3390/metabo13080922.

V. **Andersone A.**, Janceva S., Lauberte L., Zaharova N., Chervenkov M., Jurkjane V., Jashina L., Rieksts G., Telysheva G. (2023) Granulated Animal Feed and Fuel Based on Sea Buckthorn Agro-Waste Biomass for Sustainable Berry Production. Sustainability, 15(14), 11152. https://doi.org/10.3390/su151411152.

VI. **Andersone A.**, Janceva S., Lauberte L., Ramata-Stunda A., Nikolajeva V., Zaharova N., Rieksts G., Telysheva G. (2023) Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial, and Anti-Fungal Activity of Oligomeric Proanthocyanidins and Extracts Obtained from Lignocellulosic Agricultural Waste. Molecules, 28(2), 863. https://doi.org/10.3390/molecules28020863.

VII. **Andersone A.**, Janceva S., Svarta A., Zaharova N., Rieksts G., Telysheva G. (2023) Lignin and Lignocellulose-based Organomineral Complex for Organic Agriculture. 23rd SGEM International Multidisciplinary Scientific GeoConference. https://doi.org/10.5593/sgem2023/3.1/s13.30.

VIII. Janceva S., **Andersone A.**, Lauberte L., Bikovens O., Nikolajeva V., Jashina L., Zaharova N., Telysheva G., Senkovs M., Rieksts G., Ramata-Stunda A., Krasilnikova J. Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Waste Biomass after Harvesting as a Source of Valuable Biologically Active Compounds with Nutraceutical and Antibacterial Potential. Plants 2022, 11, 642. https://doi.org/10.3390/plants11050642.

Pētījumu rezultātu prezentēšana konferencēs ***/ Approbation of research results at the conferences***

Pētījuma rezultāti ir prezentēti četrās zinātniskajās konferencēs: / *Study results have been presented at four scientific conferences:*

IX. **Andersone A**., Janceva S., Zaharova N., Rieksts G., Telysheva G. (2022) Granulated Animal Feed Additives on the Basis of Sea Buckthorn Biomass. Proceedings of the XIII International Scientific Agricultural Symposium “Agrosym 2022”, 1109 – 1115.

X. **Andersone A.**, Janceva S., Zaharova N., Rieksts G., Telysheva G. (2022) Bioactivity of Silylated Lignocellulosic Biomass of Sea Buckthorn. Proceedings of the XIII International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2022", 796 – 802.

XI. **Andersone A.**, Janceva S., Lauberte L., Zaharova N., Senkovs M., Ramata-Stunda A., Telysheva G., Rieksts G. (2022) Comparative Analysis of the Biological Activity of Proanthocyanidins from Fruit and Non-fruit Trees and Shrubs of Northern Europe. 9th IUPAC International Conference on Green Chemistry, 432 – 433.

XII. Janceva S., **Andersone A.**, Lauberte L., Zaharova N., Nikolajeva V. Fruit shrubs' twigs as a source of valuable oligomeric polyphenolic compounds with antibacterial and antifungal potential. Proceedings of the 15th International Scientific and Practical Conference "Environment. Technology. Resources". Rezekne, Latvia, June 27 – June 28, 2024 (apstiprināts publicēšanai).

Autoru ieguldījums publikācijās

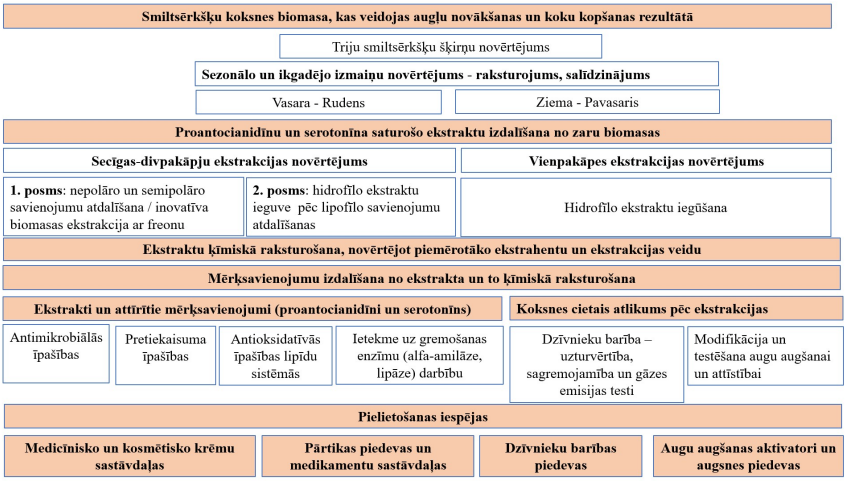
Nr. p.k.	Ideja /	Pētījuma plāns	Datu ievākšana	Datu analīze	Manuskripta sagatavošana	Doktora grāda pretendenta ieguldījums, %
I	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., V.N., N.Z., V.J., G.R.	**A.A.**, S.J., U.S.	**A.A.**, S.J., G.T., L.L., N.Z., G.R.	75
II	S.J., **A.A.,** G.T.	S.J., **A.A.,** G.T., L.L., J.K.	S.J., **A.A.,** L.L., N.Z., J.K.	S.J., **A.A.,** L.L.	S.J., **A.A.**	65
III	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., I.S., V.N., K.L., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., I.S., V.N., K.L., N.Z., G.R., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., V.N.	**A.A.**, S.J., L.L., V.N., N.Z., G.R., G.T.	60
IV	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., J.K., N.Z., V.N., G.R.	**A.A.**, S.J., L.L., J.K., N.Z., V.N.	**A.A.**, S.J., N.Z., J.K.	75
V	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., M.C., N.Z.	**A.A.**, S.J., L.L., N.Z., M.C., V.J., L.J., G.R.	**A.A.**, S.J., L.L., M.C., V.J.	**A.A.**, S.J., M.C.	75
VI	**A.A.**, S.J., G.T.	S.J., **A.A.**, L.L., G.T., A.R.-S., V.N.	S.J., **A.A.**, L.L., A.R.-S., V.N., N.Z., G.R., G.T.	**A.A.**, S.J.	**A.A.**, S.J., G.T., L.L., A.R.-S., V.N., N.Z., G.R.	70
VII	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., A.S.	**A.A.**, S.J., A.S., N.Z., G.R.	**A.A.**, S.J., A.S., N.Z.	**A.A.**, S.J., N.Z., G.T.	80
VIII	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., N.Z.	**A.A.**, S.J., N.Z., G.R.	**A.A.**, S.J., N.Z.	**A.A.**, S.J.	55
IX	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., N.Z.	**A.A.**, S.J., N.Z., G.R.	**A.A.**, S.J., N.Z.	**A.A.**, S.J., N.Z.	70
X	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., N.Z., M.S., A.R-S., G.R.	**A.A.**, S.J., L.L., A.R-S.	**A.A.**, S.J., G.R.	80
XI	S.J., **A.A.**, G.T.	S.J., **A.A.**, G.T.	S.J., **A.A.**, L.L., O.B., V.N., L.J., N.Z., G.T., M.S., G.R., A.R.-S., J.K	S.J., **A.A.**, G.T.	S.J., **A.A.**, G.T.	70
XII	S.J., **A.A.**	S.J., **A.A.**	S.J., **A.A.**, L.L., N.Z., V.N.	S.J., **A.A.**, N.Z.	S.J., **A.A.**, N.Z.	55

A.A. – Anna Andersone, S.J. – Sarmīte Janceva, G.T. – Gaļina Teliševa†, L.L. – Līga Lauberte, A.R.-S. – Anna Ramata-Stunda, V.N. – Vizma Nikolajeva, N.Z. – Natālija

Zaharova, J.K. – Jelena Krasiļņikova, M.C. – Mihails Červenkovs, A.S. – Agrita Švarta, I.S. – Ingus Skadiņš, K.L. - Konstantīns Logviss, M.S. – Māris Seņkovs, V.J. – Vilhelmīne Jurkjāne, O.B. – Oskars Bikovens, G.R. – Gints Rieksts.

Ir iesniegts Latvijas Republikas patents (patenta pieteikuma Nr. LVP2023000055, atbilstoši likumam tiks publicēts 20.12.2024.)

Promocijas darba struktūra ir pakārtota iepriekš minētajiem darba uzdevumiem. Darbs ir strukturēts trijās nodaļās. Pirmajā nodaļā ir novērtēts smiltsērkšķu koksnes-lignocelulozes biomasas kā oligomēro proantocianidīnu un serotonīnu ieguves avota potenciāls gan ekstrakta veidā, nosakot piemērotāko ekstrakcijas veidu un ekstrahentu, gan individuālā veidā, tos attīrot no piemaisījumiem, izstrādājot piemērotāko mērķsavienojumu attīrīšanas paņēmienu. Fokusējoties uz polifenoliem, iegūtiem ekstraktiem ir noteikts ķīmiskais sastāvs, un veikta mērķsavienojumu izdalīšana. Lai novērtētu iegūto ekstraktu un mērķsavienojumu praktiskās izmantošanas iespējas, otrajā nodaļā ir veikta to raksturošana, nosakot citotoksicitāti, antioksidatīvo, antimikrobiālo, pretiekaisuma aktivitāti, kā arī iedarbību uz gremošanas fermentu aktivitāti. Trešajā nodaļā saskaņā ar smiltsērkšķu biomasas bezatlikuma izmantošanas koncepciju izvērtēts pēc ekstrakcijas koksnes atlikuma un lapu potenciāls augsnes piedevas un lopbarības piedevas ieguvei. Nobeigumā, pamatojoties uz iegūtiem rezultātiem, izstrādāta un rekomendēta smiltsērkšķu biomasas pilnvērtīgas izmantošanas elastīga tehnoloģiskā shēma, atkarībā no patērētāju klāsta, pieprasījuma un smiltsērkšķu augšanas reģiona. 3. attēlā ir parādīti iespējamie mērķsavienojumu un to saturošo ekstraktu pielietošanas virzieni.



3. att. **Pētījumu shēma un iespējamie mērķsavienojumu pielietojuma virzieni**

MATERIĀLI UN METODES

Smiltsērkšķu biomasas paraugi saņemti no smiltsērkšķu audzētāja SIA "Bruwell" (1. tabula).

1. tabula

Analizējamo paraugu saraksts

Parauga apzīmējums	**Smiltsērkšķu šķirne**	**Paraugu veids**	**Ievākšanas sezona**	**Paraugu ievākšanas veids**
Koksnes paraugi				
MB/Z/2020/R	Maria Bruvele	Zari	Augusts – Septembris	Augļu novākšanas rezultātā
MB/Z/2021/R				
MB/Z/2022/R				
MB/Z/2023/R				
BL/Z/2020/R	B. Ļubiteļskaja			
BL/Z/2021/R				
BL/Z/2022/R				
TAT/Z/2020/R	Tatjana			
TAT/Z/2021/R				
TAT/Z/2022/R				
MB/1Z/2021/P	Maria Bruvele	1 gadīgie zari	Marts / Augusts	Augļkoka kopšanas rezultātā
MB/2Z/2021/P		2 gadīgie zari		
MB/3Z/2021/P		3 gadīgie zari		
MB/4Z/2021/P		4 gadīgie zari		
MB/1-2Z/2022	Maria Bruvele	1 un 2 gadīgo zaru maisījums		
BL/1-2Z/2022	B. Lubiteļskaja			
TAT/1-2Z/2022	Tatjana			
Miza no četrgadīgiem zariem				
MB/M/2021/R	Maria Bruvele	Miza	Augusts – Septembris	Atmizošanas rezultātā
BL/M/2021/R	B.Ļubiteļskaja			
Lapu paraugi				
MB/L/2020/R	Maria Bruvele	Lapas	Augusts – Septembris	Augļu novākšanas rezultātā
MB/L/2021/R				
MB/L/2022/R				
BL/L/2020/R	B. Ļubiteļskaja			
BL/L/2021/R				
BL/L/2022/R				
TAT/L/2020/R	Tatjana			
TAT/L/2021/R				
TAT/L/2022/R				

Rudens koksnes paraugi (zari, lapas) ievākti laika periodā no 2020. – 2023. gada augustā / septembrī augļu novākšanas rezultātā, atbilstoši ražas vākšanas tehnoloģijai nogriežot zarus kopā ar ogām un tos atdalot pēc sasaldēšanas.

Pavasara koksnes paraugi ievākti 2021. gada martā auga kopšanas (atzarošanas) rezultātā, iegūstot četrus pavasara koksnes paraugu veidus – viengadīgie, divgadīgie, trīsgadīgie un četrgadīgie zari.

2022. gada martā, auga kopšanas rezultātā, ievākti **trīs šķirņu viengadīgie un divgadīgie zari** maisījuma veidā.

Salīdzināšanai iegūta **miza** 2021. gada rudens četrgadīgo zaru atmizošanas rezultātā. Visas trīs smiltsērkšķu šķirnes audzētas Tukuma rajonā vienā plantācijā un vienādos klimatiskajos apstākļos.

Analizējamo paraugu, kā **lignocelulozes biomasas vispārīgs ķīmiskais raksturojums** veikts izmantojot analītiskās pirolīzes metodi (500 °C, 15 sek.) ar sekojošo gaistošo produktu gāzes hromatogrāfijas analīzi. Pirolīzei izmantota Frontier Lab (Fukushima, Japan) Micro Double-shot Pyrolyzer Py-3030D iekārtu un Shimadzu GC/MS/FID-QP ULTRA 2010 gāzes hromatogrāfu.

Lai novērtētu smiltsērkšķu biomasas kā **proantocianidīnu un serotonīna ieguves avotu**, izžāvēti un sasmalcināti smiltsērkšķu biomasas paraugi ekstrahēti divos veidos. Pielietojot secīgu biomasas ekstrakciju, smiltsērkšķu koksne un lapas atsevišķi apstrādātas ar freonu 3-4 stundas noslēgtā sistēmā zem spiediena 4.0– 4.3 Bar un 17–19 °C temperatūrā. Pēc freona frakcijas atdalīšanas sekoja 30 minūšu biomasas ekstrakcija ~60 °C temperatūrā ar destilēto ūdeni un etanola-ūdens maisījumiem.

Pielietojot vienpakāpes biomasas ekstrakciju, biomasa ekstrahēta ar ūdeni un etilspirta ūdens maisījumiem bez biomasas priekšapstrādes ar freonu. Visi izmantotie šķīdinātāji atbilst zaļās ķīmijas prasībām un ir izmantojami vērtīgu savienojumu ieguvei atbilstoši kosmētikas, farmācijas un pārtikas produktu kvalitātes kontroles un ieguves prasībām. Ekstraktu iznākums noteikts gravimetriski pēc to liofilizācijas -50 °C temperatūrā un izteikts procentos no sausiem koksnes, lapu un mizas paraugiem.

Iegūtie ekstrakti ar freonu analizēti, izmantojot Shimadzu GC/MS/FID-QP ULTRA 2010 aparātu (Shimadzu, Kioto, Japāna) un kapilāru kolonnu RTX-1701 (garums 60 m, iekšējais diametrs 0.25 mm, slāņa biezums 0.25 μm). Savienojumu identificēšana veikta izmantojot GC/MS bibliotēku MS NIST 11 un NIST 11s, savukārt atsevišķu savienojumu pīķa relatīvais laukums aprēķināts, izmantojot Shimadzu programmatūru, pamatojoties uz GC/FID datiem.

Hidrofīlie ekstrakti analizēti ar augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas (HPLC) palīdzību izmantojot dažādus detektorus, gaismas izkliedes detektors – kopējās kompozīcijas noteikšanai, UV detektors – polifenola savienojumu raksturošanai un augstas izšķirtspējas masspektometrs (kvadrupola lidojuma laika masspektrometrs (Q-TOF-MS), ar elektrosmidzināšanas jonizācijas (ESI) avotu) – individuālu savienojumu

identifikācijai, izmantojot Acquity UPLC BEH C18 (1.8 µm, 2.1 x 50 mm, Waters) kolonnu. Kā eluenti izmantoti: skudrskābe ūdenī (0.1 %, v/v) un acetonitrils.

Kvantitatīvā proantocianidīnu noteikšana hidrofīlo ekstraktu sastāvā veikta izmantojot Porter metodi, kā analītisko standartu izmantojot procianidīna dimēru (*procyanidins B2*). **Kvantitatīvā polifenolu noteikšana** hidrofīlo ekstraktu sastāvā veikta izmantojot Folina-Čikalto metodi, kā analītisko standartu izmantojot galluskābi. **Kvantitatīva serotonīna noteikšana** ekstraktu sastāvā veikta izmantojot augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas (HPLC) metodi tandēmā ar kvadrupola lidojuma laika masspektru (Q-TOF-MS), ar elektrosmidzināšanas jonizācijas (ESI) avotu. Serotonīns identificēts un kvantificēts, izmantojot analītisko standartu ar Mw=176.22 g moL^{-1}. Pozitīvā elektroizsmidzināšanas jonizācijas režīmā serotonīns protonēts, veidojot jonus formā $[M+H]^+$, ar m/z 177. Pamatojoties uz konstatēto serotonīna fragmentāciju, izstrādāts daudzkārtējas reakcijas monitoringa režīms konkrētajām m/z pārejām 177→160 (intensīvākais sadalīšanas jons), 177→132 un 177→115.

Mērķsavienojumu izdalīšana no hidrofīliem ekstraktiem veikta pakāpeniski, sākot ar proantocianidīnu izdalīšanu no ekstrakta, izmantojot sorbentu Sephadex LH-20, kā eluentu - 96% EtOH un 70% acetonu. Pēc proantocianidīnu atdalīšanas, serotonīnu saturošā frakcija attīrīta pēc patentēta paņēmiena (patenta pieteikums Nr. LVP2023000055 atbilstoši likumam publicēts 20.12.2024.).

Izdalīto proantocianidīnu raksturojums veikts izmantojot LC-DAD-ESI-MS/MS analīzi. Proantocianidīnu MS spektri reģistrēti ar Waters Acquity UPLC HClass ar PDA detektoru un Micromass QuattroMicro masas spektrometru, izmantojot Acquity UPLC BEH amīda kolonnu (1.7 µm, 3.0 × 100 mm).

Izdalīto proantocianidīnu raksturojums tika veikts ar LC-DAD-ESI-MS/MS analīzi. Proantocianidīnu MS spektri tika reģistrēti ar Waters Acquity UPLC HClass ar PDA detektoru un Micromass QuattroMicro masas spektrometru, izmantojot Acquity UPLC BEH amīda kolonnu (1.7 µm, 3.0 × 100 mm).

Analizējamo paraugu **antioksidatīvās aktivitātes noteikšanai** tika izmantotas divas metodes, kas balstās uz reducēšanas principu, par antioksidatīvās aktivitātes indikatoriem izmantojot stabili brīvos radikāļus: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikāli ($DFPH^{\bullet}$) un 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes ($ABTS^{+\bullet}$) katjona radikāli. Antioksidatīvā aktivitāte paraugiem noteikta, aprēķinot IK_{50} vērtību – antioksidantu masas koncentrāciju, kas ir nepieciešama, lai panāktu 50% brīvo radikāļu inhibēšanu.

Lai novērtētu paraugu spēju aizkavēt lipīdu oksidēšanos, analīzei izmantotas divas krēma bāzes ar dažādu lipīdu saturu (19 un 35%), kas nesatur konservantus, stabilizatorus un antioksidantus. Lipīdu saturošo produktu oksidēšanas stabilitātes noteikšanai izmantota ML OXIPRES (Mikrolab Aarhus) iekārta. Spiediena izmaiņas atkarībā no laika reģistrētas ar datorprogrammas

“Paralog-Version 3.10” palīdzību. Kā references antioksidanti pētījumos izmantoti galluskābe un askorbīnskābe.

Antimikrobiālās aktivitātes *in vitro* analīzes veiktas Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātē, un Rīgas Strādiņa Universistātē, balstoties uz Eiropas standarta protokoliem. Paraugu antimikrobiālā aktivitāte noteikta, izmantojot diska difūzijas un agara bedrīšu metodi (96 bedrīšu platēs ar divkāršu sērijas buljona mikroatšķaidīšanu), kas izstrādāta 1940. gadā ikdienas antimikrobiālās jutības pārbaudei, un ļāva noteikt minimālo inhibējošo (MIC) un minimālo baktericīdo/fungicīdo koncentrāciju (MBC/MFC). Izmantoti references mikrobu celmi no Latvijas Universitātes Latvijas mikrobu celmu kolekcijas (MSCL): *Pseudomonas aeruginosa* MSCL 334*, Staphylococcus aureus* MSCL 330*, Escherichia coli* MSCL 332*, Bacillus cereus* MSCL 330*, Streptococcus pyogenes* MSCL 620*, Cutibacterium acnes* MSCL 1521 un *Candida albicans* MSCL 378, kā arī četri kliniskie cilvēku isolāti: meticilīnreiztentais *Staphylococcus aureus* (MRSA), paplašināta spektra bēta laktamāzes producējošā *Escherichia coli* (ESBL) un *P. aeruginosa*. Visi klīniskie izolāti iegūti ar Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas apstiprinājumu (25.10.2022., Nr. 4/462/2022 un Nr. 4/465/2022).

Paraugu pretiekaisuma aktivitāte noteikta izmantojot cilvēka perifēro asiņu mononukleārās šūnas (PBMNC) izdalītas no veselo donoru asinīm ar Latvijas Universitātes Kardioloģijas un reģeneratīvās medicīnas institūta Pētniecības ētikas komitejas saskaņojumu. IL-8 vai IL-6 koncentrācija, ko perifēro asiņu mononukleārā šūna izdalīja kultivēšanas vidē, noteikta, izmantojot ar enzīmu saistīto imūnsorbcijas testu (ELISA). Cilvēka IL-8 DuoSet ELISA komplekti (RnD Systems, Mineapolisa, ASV) izmantoti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

***In vitro* analīzes**, lai noteiktu paraugu ietekmi **gremošanas enzīmu aktivitātē** veica Rīgas Stradiņu Universitātē, balstoties uz Eiropas standarta protokoliem. Paraugu ietekme **alfa-amilāzes aktivitātē** noteikta donoru siekalās bez hroniskām vai akūtām saslimšanām, raksturojot kā amilolastisko spēku (D 30/38 °C). Siekalas bez parauga klātbūtnes tika izmantotas salīdzināšanai.
Paraugu ietekme **lipāzes aktivitātē** noteikta, izmantojot divpadsmit pirkstu **zarnas** gremošanas fāzes standarta modeli, nosakot nepieciešamo NaOH daudzumu triglicerīdu hidrolīzei.

Hemolīzes tests veikt lai novērtētu analizējamo paraugu ietekmi uz cilvēka asins eritrocītiem. Hemolītiskā attiecība (HR, %) aprēķināta kā aprakstīts VI. publikācijā.

Analizējamo paraugu citotoksicitāte testēta, izmantojot BALB/C3T3 peles fibroblastu šūnu līniju NR (neirālais sarkanais) testu. Balb/c 3T3 (American Type Culture Collection, ATCC, ASV) šūnu līnija iegūta no peļu embriju fibroblastiem. Šūnas kultivētas 96-lauciņu šūnu kultivēšanas platēs ar blīvumu 5 × 103 šūnas vienā lauciņā. Citotoksicitāte izteikta kā NR absorbciju samazinājums atkarībā no analizējamo paraugu koncentrācijas, salīdzinot ar

neapstrādātām šūnām (kontroli). Absorbcija mērīta, izmantojot mikroplašu lasītāju Tecan Infinite® 200 Pro. Rezultāti aprēķināti, izmantojot GraphPad 9 programmatūru. Šūnu līnija un testa metode atbilst ESAO vadlīnijām.

Sekojot biorafinēšanas koncepcijai, novērtēta koksnes atlikuma pēc ekstrakcijas un lapu izmantošanas perspektivitāte. Pamatojoties uz reģiona pieprasījuma dažādību un loģistikas risinājumu, izstrādāta un piedāvāta smiltsērkšķu audzētājam elastīga tehnoloģiskā shēma, piedāvājot ražoto produktu klāstu.

Paraugu elementanalīze, nosakot kopējo oglekļa, slāpekļa un sēra saturu, veikta, izmantojot ELEMENTAR Vario MACRO iekārtu. Barības elementu (kalcijs, kālijs, nātrijs, fosfors) un smago metālu (kadmijs, svins, dzīvsudrabs) saturs biomasā noteikts saskaņā ar izstrādāto RSU procedūru, izmantojot induktīvi saistītās plazmas trīskāršā kvadrupola masspektrometra (Inductively coupled plasma triple quadrupole mass spectrometer) ICP-MS/MS, iCAP TQe iekārtu.

Askorbīnskābes (C vitamīna) saturs biomasā noteikts, izmantojot augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijas (HPLC) metodi, izmantojot HPLC-UV-Vis/-RI (augstas veiktspējas šķidruma hromatogrāfs ar UV-Vis un RI detektoru) un Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent, 5 µm, 150 cm x 0.46 cm i.d.) kolonnu. Kā eluenti izmantoti: A - trifluoretiķskābe (0.025% v/v) (A) un B - acetonitrils Rezultāti pārrēķināti uz biomasu, ņemot vērā ekstrakta iznākumu no biomasas.

E vitamīna kā α-tokoferola un A vitamīna kā retinola saturs biomasā noteikts, izmantojot HPLC-UV-Vis/-RI sistēmu un Hichrom 5 C18 (i.d. 25 cm x 4.6 mm) kolonnu. Kā kustīgā fāze izmantots metanols ar plūsmas ātrumu 2 mL min^{-1}. Paraugu šķīdumi sagatavoti, izšķīdinot ekstraktu metanolā. Rezultāti pārrēķināti uz biomasu, ņemot vērā ekstrakta iznākumu no biomasas.

Koptauku noteikšana paraugiem veikta, izmantojot paraugu 30 minūšu ekstrakciju ar heksānu. Koptauku iznākums no biomasas noteikts gravimetriski.

Kokšķiedras saturs (*ADF - Acid Detergent Fiber*) analizējamos paraugos noteikts gravimetriski, veicot skābo hidrolīzi ar sērskābi (1.25%, w/v) ogļhidrātu atdalīšanai, kam sekoja sarmainā hidrolīze ar NaOH (1.25%, w/v) olbaltumvielu, daļēji hemicelulozes un lignīna atdalīšanai.

Kopproteīna (KP) saturs analizējamos paraugos noteikts, izmantojot Kjeldāla metodi, un noteiktais slāpekļa (N) daudzums reizināts ar koeficientu 6.25 (N% × 6.25 = KP%/sausnu). Noteiktā kopproteīna sastāvā bija gan olbaltumvielas, gan citas slāpekli saturošas vielas.

***In vitro* gāzes emisijas noteikšanai** izmantota ANKOM RF gāzes veidošanas sistēma (Gas Production System). Analīze balstās uz saistību starp fermentāciju spureklī un izveidotajām gāzēm. Spurekļa šķidrums ievākts no atgremotājiem kautuvē. Gāzes emisija izteikta mL g^{-1} inkubēta parauga. Gāzes spiediena izmaiņas 24 un 48 stundu fermentācijas laikā uzkrājās (ΔP) un pārveidotas tilpuma vienībās, izmantojot ideālās gāzes likumu, kā aprakstīts V. publikācijā.

Sagremojamības novērtēšanai izmantots Ankom Daisy inkubators. Daisy inkubators ir 4 cilindru inkubators, kur vienam cilindram ir nepieciešams 1600 mL buferšķīduma un 400 mL spurekļa šķidruma kā inokulāts. Sagremojamība aprēķināta kā aprakstīts V. publikācijā.

Biomasas granulēšana veikta, izmantojot laboratorijas mēroga plakanas matricas granulatoru KAHL 14-175, kas ir maza mēroga analogs rūpnieciskiem granulatoriem (Amandus Kahl GmbH & Co. KG, Reinbek, Vācija). Granulu izveidei caurules kanāla diametrs bija 6 mm, un kanāla garuma attiecība pret diametru bija 4:1. Granulēšanas sākuma temperatūra 50 °C. Lai novērtētu iegūto granulu kvalitāti, savstarpēji salīdzināti galvenie granulu kvalitāti raksturojošie parametri (diametrs, garums, mitrums, mehāniskā izturība - nodilumizturība un tilpumblīvums) saskaņā ar Eiropas standartiem EN ISO 17831-1:2015 [58] un ISO 17828 [59]. Granulu uzbriešana ūdenī noteikta vizuāli.

Augsnes piedevas ieguvei hidrolīzes lignīns un koksnes atlikums pēc ekstrakcijas sajaukts masas attiecībā 1:1 (w/w), ar turpmāko Si saturoša komponenta – diatomīta suspensijas veidā pievienošanu. Si saturs substrātā sastādīja 5%/sausu masu.

Augsnes piedeva ķīmiski raksturota, nosakot mitrumu [60], sausnes saturu [60], pH [67], organisko vielu saturu [61], lignīna saturu (Klasona metode), kopējo slāpekļa (N) saturu [62], kopējo fosforu (P_2O_5) [63], kopējo kāliju (K_2O) [64], dzīvsudraba [65], kadmija [66], un arsēna [64] saturu.

Lauka izmēģinājumi ierīkoti Skrīveros, LBTU Zemkopības institūta bioloģiskajos laukos. Audzēta vasaras kviešu šķirne 'Vinjet' un kartupeļi 'Imanta'. Atrašanās vieta: 56º 69.4280` N un 25º 13.826` E. Lauka izmēģinājumi vasaras kviešiem bija iekārtoti četros atkārtojumos. Uzskaites lauciņa lielums bija 22.5 m^2 (2.5 m x 9 m). Izmēģinājumā trīs varianti:

1) Kontrole - bez augsnes piedevas lietošanas;
2) Augsnes piedeva 20 kg ha^{-1};
3) Augsnes piedeva 40 kg ha^{-1}.

Lai novērtētu augsnes piedevas ietekmi, kviešiem noteikta ražas starpība starp izmēģinājuma variantiem un noteikti ražas kvalitātes rādītāji: kopproteīns, lipekļa un cietes saturs, Zeleny indekss, tilpummasa, izmantojot analizatoru Infratec™ NOVA (Dānija). Ražas struktūrelementu (produktīvo stiebru skaits, vienas vārpas svars, graudu skaits vienā vārpā, 1000 graudu masa) veidošanās noteikta gravimetriski. 1000 graudu masa noteikta ar standartmetodi LVS EN ISO 520.

Kartupeļiem lauka izmēģinājumi iekārtoti četros atkārtojumos. Uzskaites lauciņa lielums 12.6 m^2 (2.8 m x 9 m). Lauciņā četras vagas ar attālumu 70 cm, viena auga barošanās laukums 0.21 m^2. Izmēģinājumā testēti trīs varianti:

1) kontrole - bez augsnes piedevas lietošanas;
2) Augsnes piedeva 20 kg ha^{-1};
3) Augsnes piedeva 40 kg ha^{-1}.

Izmēģinājumā kartupeļiem noteikta ražas starpība starp variantiem, ražas kvalitāte (cietes saturs %), preču produkcijas iznākums, bumbuļu sadalījums pa frakcijām, viena bumbuļa svars. Izmēģinājumi ierīkoti velēnu podzolētā virspusēji glejotā mālsmilts augsnē, ar sekojošiem agroķīmiskiem rādītājiem: pH 5.6, organiskās vielas saturs 2.7 %, augiem pieejamā fosfora daudzums 105 mg kg^{-1} (zems) un kālija daudzums 201 mg kg^{-1} (augsts).

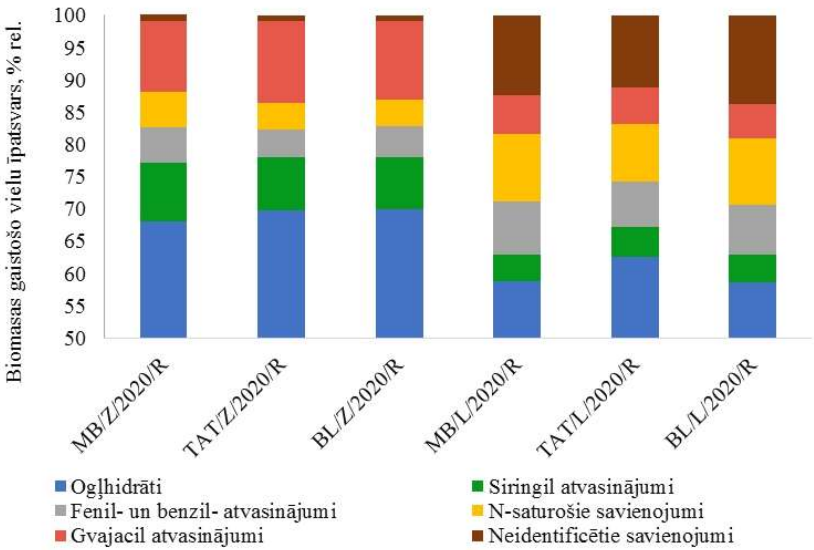
Statistikas analīze

Visi mērījumi veikti vismaz trīs eksemplāros, un rezultāti ir parādīti kā vidējā vērtība ± standarta novirze (SD). Statistiskās analīzes veiktas, izmantojot programmu Microsoft Excel 2016. Vidējie ticamības intervāli, izmantojot Stjudenta T sadalījumu, aprēķināti pie nozīmīguma līmeņa $\alpha = 0.05$. Lai kvantitatīvi noteiktu IL-8 un IL-6 izdalīšanos no cilvēka PBMNC, dati analizēti un grafiki ģenerēti, izmantojot GraphPad Prism 5.0 programmatūru (Sandjego, Kalifornija, ASV). Paraugkopu salīdzināšanai izmantots ANOVA tests. Atšķirības uzskatītas par statistiski nozīmīgām, ja $p < 0.01$ un $p < 0.05$ (attiecīgais līmenis atzīmēts attēlos (kā aprakstīts VI. publikācijā). Lauka izmēģinājumu eksperimentos, sēklu apstrādes substrātu ietekmes būtiskuma novērtēšanai uz diļļu ražu izmantoja vienfaktoru dispersijas analīzi. Starpības starp variantiem noteica ar Bonferroni testu pie 95% būtiskuma līmeņa ($p<0.05$). Datu matemātiskā apstrāde veikta brīvpieejas programmā "R", versijā 4.0.2.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

1. Smiltsērkšķu biomasas raksturojums

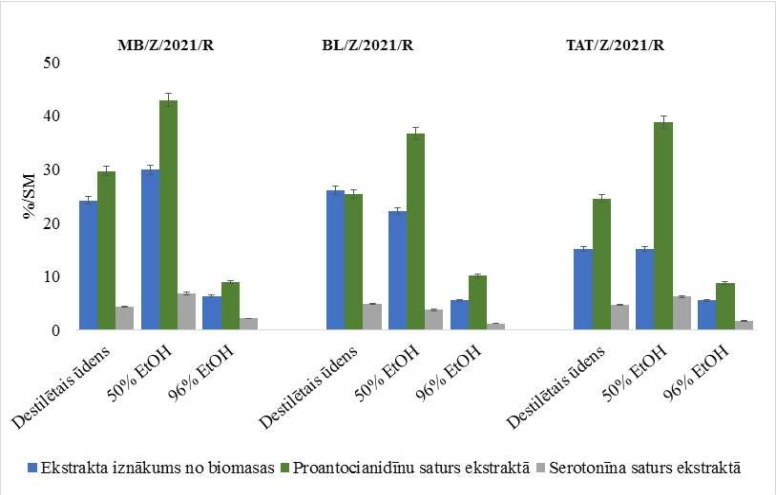
Mizas saturs smiltsērkšķu koksnes paraugā bija mainīgs un sastādīja ~ 8-20% no kopējās zaru masas. Miza ir viena no izcilajām izejvielām bioloģisko aktīvo vielu ieguvei, līdz ar to zari netika mizoti un tika izmantoti kā vesela koksnes daļa (turpmāk tekstā saukts - koksne vai zari). Koksnes ķīmiskais sastāvs ir atkarīgs ne tikai no koka sugas, šķirnes, bet arī no koka vecuma, augšanas apstākļiem un citiem faktoriem. Koksni veidojošie komponenti ir celuloze, hemicelulozes, lignīns un ekstraktvielas (sekundārie metabolīti). Pamatojoties uz šo pamatsastāvu, to dēvē par lignocelulozes biomasu. Vadoties no analītiskās pirolīzes datiem, vislielāko daļu aizņem celuloze un hemiceluloze = 70% rel/SM, kam seko lignīns, to saturu apstiprinot ar siringila, gvajacila atvasinājumiem 20-25% rel/SM. Zaru un lapu gaistošos produktos ir arī polifenoli un N-saturošie savienojumumi, kas norāda uz sekundāro metabolītu klātbūtni un koksnes augsto potenciālu izejvielas veidā bioloģiski aktīvo vielu – proantocianidīnu un serotonīnu – ieguvei. Smiltsērkšķu zaru un lapu gaistošie produkti un to relatīvais saturs parādīts 4. attēlā, un I. publikācijā.



4. att. **Smiltsērkšķu biomasas analītiskās pirolīzes (Py-GC-MS-FID) gaistošie produkti un to relatīvais saturs, %**

2. Smiltsērkšķu biomasas kā bioloģiski aktīvo vielu avota potenciāls

Lai noteiktu efektīvāko ekstrahentu mērķsavienojumu iegūšanai, laboratorijas apstākļos veikta vienpakāpes ekstrakcija pie rekomendētajiem ekstrakcijas parametriem, izmantojot par pamatu iepriekšējos eksperimentos gūtos rezultātus, kas ietvēra biomasas un ekstrahenta masas attiecību 1:8 (w:w), ekstrakcijas temperatūru 60 °C un laiku 30 minūtes. Veicot vienpakāpes ekstrakciju zariem, izdalīto ekstraktu iznākums bija robežās no 6 līdz 30%/SM. Visaugstākais mērķsavienojumu (proantocianidīnu un serotonīnu) saturs bija smiltsērkšķu zaru ekstraktiem, kas iegūti ar 50% EtOH šķīdumu (5. att.). Savstarpēji salīdzinot trīs šķirņu biomasas pēc mērķsavienojumu satura ekstraktos un biomasā, perspektīvākā šķirne bija *Maria Bruvele*.



5. att. **Trīs šķirņu smiltsērkšķu koksnes un hidrofīlo ekstraktu raksturojums**

Neskatoties uz augsto lapu ekstrakta iznākumu, proantocianidīni ekstrakta sastāvā netika konstatēti. Serotonīna saturs lapu ekstraktos bija zemāks par 0.1%/SM (II. publikācija). Tas liecina, ka efektīvākai mērķsavienojumu ieguvei, lai palielinātu mērķsavienojumu iznākumu no zariem, ir nepieciešams atdalīt lapas. Atdalītās lapas tika novērtētas konservantu un lopbarības piedevas ieguvei (V. publikācija).

Arvien biežāk cilvēki meklē pārtikas un kosmētikas produktus ar norādi "bez konservantiem". Bet konservantu galvenā loma ir novērst baktēriju, sēnīšu, raugu un citu patogēnu mikroorganismu vairošanos, novēršot inficēšanās varbūtību kosmētisko līdzekļu ražošanā un lietošanā. Pamatā lielākā daļa kosmētisko līdzekļu bāzes ir eļļas un ūdens emulsija, kas ir labi apstākļi, lai vairotos patogēnie mikroorganismi. Papildus lipīdu saturošie produkti pārstrādes un uzglabāšanas laikā ir pakļauti oksidācijai, kā rezultātā uzkrājas toksiskie savienojumi, kas ne tikai pasliktina produktu īpašības, bet arī var izraisīt ilgstošus ādas bojājumus un apdraudēt cilvēka veselību. Ņemot vērā iepriekšminēto, drošai lipīdu saturošo produktu aizsardzībai būtu noderīgi 2 fāžu augu izcelsmes konservanti – lipofīlie un hidrofīlie. Lipofīlo ekstraktu ieguvei iepriekšminētajā vienpakāpes ekstrakcijas ciklā iekļauta papildus stadija – biomasas apstrāde ar freonu R134a (IV. publikācija, patents). Šobrīd freons tiek uzskatīts par vienu no saudzējošākiem ekstrahentiem lipofīlo vielu ieguvei no augu biomasas. Biomasas apstrāde ar freonu (6. att.) veikta gan zariem, gan lapām. Salīdzinot ar hidrofīlajiem ekstraktiem, lipofīlo ekstraktu saturs zaros bija robežās no 1.1 līdz 1.6%/SM un lapās no 2.7 līdz 3.4%/SM. Turpinot zaru atlikumu ekstrakciju ar 50% EtOH kā piemērotāko ekstrahentu hidrofīlo mērķsavienojumu ieguvei, būtiskas izmaiņas hifrofīlo ekstraktu sastāvā netika novērotas. Balstoties uz šiem

novērojumiem, turpmākiem pētījumiem no iegūtiem ekstraktu paraugiem izmantoti hidrofīlie ekstrakti no zariem un lipofīlie ekstrakti no lapām.

6. att. **Lipofīlo ekstraktu ieguve no smiltsērkšķu lapām, ekstrakcija ar freonu**

Pamatojoties uz GC analīzes datiem, viena no galvenajām lipofīlo ekstraktu sastāvdaļām ir taukskābes (I. publikācija). Tieši lipīdu taukskābju sastāvs lielā mērā nosaka to uzturvērtību un bioloģisko efektivitāti. Identificējot >90% komponentu, atklāja linolēnskābes un palmitoleīnskābes pārsvaru ekstrakta taukskābju sastāvā. Saskaņā ar literatūras avotiem, šo skābju izmantošana krēmos ir svarīga sausai un sasprēgājušai ādai, kas mazina niezi, kairinājumu, palielina elastību un hidratāciju.

Lai novērtētu zaru augšanas vecuma ietekmi uz mērķsavienojumu saturu, pavasarī ievākti viengadīgie, divgadīgie, trīsgadīgie un četrgadīgie zari. Veicot vienpakāpes ekstrakciju, ekstrakcijas dati (2. tabula) liecina, ka visaugstākais proantocianidīnu saturs bija trīsgadīgajos un četrgadīgajos zaros, savukārt serotonīna saturs – viengadīgajos un divgadīgajos zaros. Tā kā ekstraktu iznākums un mērķsavienojumu saturs ekstraktos, kas iegūti ar 96% EtOH, bija viszemākie, turpmākajos pētījumos šis ekstrahents vairs netika izmantots.

2. tabula

Salīdzinošs ķīmiskais raksturojums ekstraktiem, iegūtiem no dažāda augšanas vecuma zaru homogēna maisījuma

Maria Bruvele šķirnes paraugi	Ekstrakta iznākums, %/SM	Proantocianidīnu saturs ekstraktā, %/SM	Serotonīna saturs ekstraktā, %/SM
	Ekstrakcija ar destilēto ūdenī		
MB/1Z/2021/P	11.96±0.01	21.88±0.03	11.21±0.02
MB/2Z/2021/P	12.57±0.02	20.95±0.02	14.62±0.03
MB/3Z/2021/P	15.87±0.02	23.02±0.03	11.08±0.02
MB/4Z/2021/P	8.53±0.02	26.92±0.03	7.91±0.01
	Ekstrakcija ar 50% EtOH		
MB/1Z/2021/P	22.23±0.02	40.56±0.01	10.53±0.03
MB/2Z/2021/P	19.61±0.01	51.94±0.02	14.85±0.03
MB/3Z/2021/P	17.25±0.01	57.03±0.02	9.88±0.02
MB/4Z/2021/P	8.56±0.02	57.31±0.02	9.97±0.01
	Ekstrakcija ar 96%EtOH		
MB/1Z/2021/P	15.65±0.01	6.08±0.02	2.8±0.02
MB/2Z/2021/P	11.83±0.02	6.12±0.02	2.7±0.01
MB/3Z/2021/P	10.89±0.01	9.71±0.01	2.2±0.01
MB/4Z/2021/P	6.26±0.01	11.14±0.02	2.4±0.01

Lai novērtētu optimālo smiltsērkšķu kopšanas laiku un sezonālās atšķirības biomasas sastāvā, pavasarī un rudenī no vienas un tās pašas plantācijas ievākti viengadīgie un divgadīgie zari. Analizējot vienpakāpes ekstrakcijā iegūto ekstraktu sastāvu, rezultāti liecina, ka rudenī ievāktie zari bija bagātāki gan ar serotonīna gan ar proantocinaidīnu saturu un līdz ar to kā izejviela ir piemērotākā mērķsavienojumu ieguvei (3. tabula un II. publikācija).

3. tabula

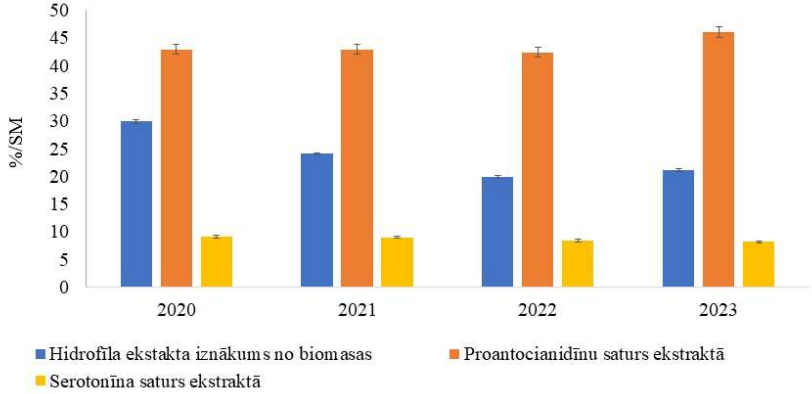
Sezonālās atšķirības ekstraktos iegūtiem no 1 un 2-gadīgo zaru maisījuma

Smiltsērkšķu šķirne	Ekstrakta iznākums, %/SM	Proantocianidīnu saturs ekstraktā, %/SM	Serotonīna saturs ekstraktā, %/SM
	Ekstrakcija ar destilēto ūdeni		
	Pavasaris / Rudens	Pavasaris / Rudens	Pavasaris / Rudens
MB/1-2Z/2022	12.1 / 15.7	21.1/ 41.3	13.0 /13.7
BL/1-2Z/2022	10.2 / 19.4	21.5/ 41.8	11.0 / 11.6
TAT/1-2Z/2022	10.1 / 19.4	24.7 / 56.1	9.5 / 10.3

3. tabulas turpinājums

Smiltsērkšķu šķirne	Ekstrakta iznākums, %/SM	Proantocianidīnu saturs ekstraktā, %/SM	Serotonīna saturs ekstraktā, %/SM
	Ekstrakciju ar 50% EtOH		
	Pavasaris / Rudens	Pavasaris / Rudens	Pavasaris / Rudens
MB/1-2Z/2022/P	20.2 / 26.4	50.0 / 52.9	12.8 / 14.0
BL/1-2Z/2022/P	18.1 / 24.0	48.2 / 64.2	11.0 / 12.6
TAT/1-2Z/2022/P	18.7 / 24.1	42.2 / 64.1	8.3 / 10.6

Laika posmā no 2020. līdz 2023. gadam ogu novākšanas rezultātā gūtiem zaru atlikumiem šķirnei *Maria Bruvele* veikts mērķsavienojumu skrīnings. Pēdējo trīs gadu laikā mērķsavienojumu saturs bija līdzīgs, kas norāda uz zaru kā izejvielas augsto potenciālu (7. att.).

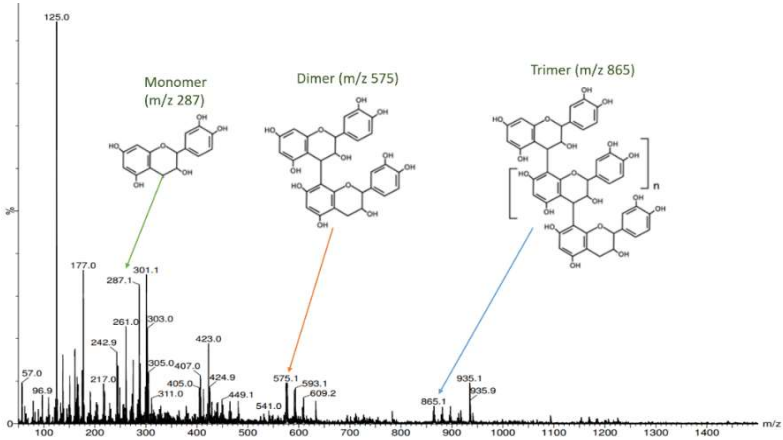


7. att. **Augļu novākšanas rezultātā, ievākto smiltsērkšķu zaru, kā mērķsavienojumu avota skrīnings laika periodā no 2020. gada līdz 2023. gadam**

3. Proantocianidīnu un serotonīna izdalīšana

Visaugstākais serotonīna un proantocianidīnu saturs bija noteikts smiltsērkšķu mizas sastāvā, kas ļauj no 100 g mizas ar 50% EtOH iegūt 26 g sausa ekstrakta ar 14% serotonīna un 53 % proantocianidīnu saturu (II. publikācija), bet smiltsērkšķu zaru mizošana nav ekonomiski saprātīgs risinājums, tāpēc vispiemērotākā izejviela no analizētiem paraugiem ir nemizotie viengadīgie un divgadīgie rudens zari. Serotonīna attīrīšana veikta secīgi, sākot ar proantocianidīnu izdalīšanu no ekstrakta, izmantojot Sephadex LH-20. Proantocianidīnu izdalīšana ļāva divreiz palielināt serotonīna saturu ekstraktos. Turpinot serotonina izdalīšanu pēc patentētā paņēmiena, daļēji atdalīti zemmolekulārie polifenoli un to glikozīdi, palielinot serotonīna saturu līdz 28.2 %/SM.

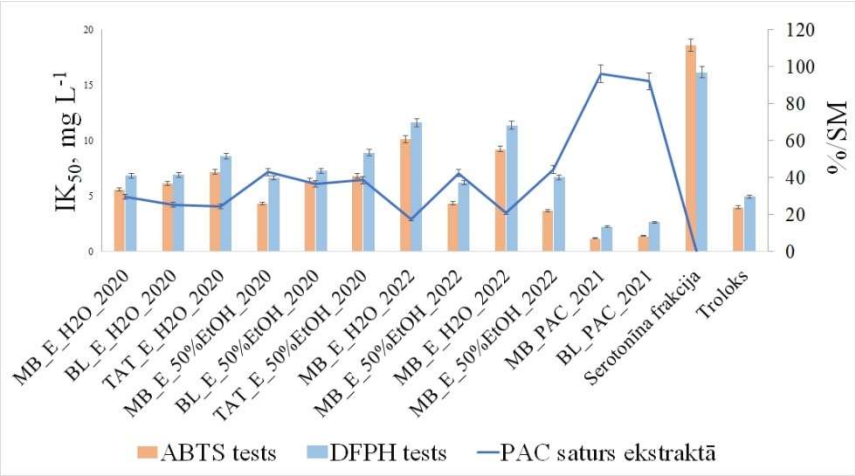
Izdalot proantocianidīnus no ekstrakta, tiem veikts ķīmiskais raksturojums, nosakot to sastāvu (MS spektroskopija), un tīrības pakāpi (Porter metode). Iegūto analīžu dati liecina, ka izdalītie proantocianidīni no *Maria Bruvele* šķirnes ekstraktiem, ar tīrības pakāpi 91-94% PAC/SM, sastāv no A-tipa (m/z 575) un B-tipa (m/z 577) katehīna/epikatehīna dimēriem, katehīna/epikatehīna-epigalokatehīna/galokatehīna dimēriem (m/z 593), B-tipa katehīna/epikatehīna trimēriem (m/z 865), un epikatehīna-katehīna-galokatehīna trimēriem (m/z 881) (8 att., III. publikācijā). Katehīna/epikatehīna tetramēri un pentamēri bija atrodami piemaisījuma līmenī.



8. att. **Izdalīto proantocianidīnu no *Maria Bruvele* 50% EtOH ekstrakta MS spektrs**

4. Antioksidatīvā aktivitāte

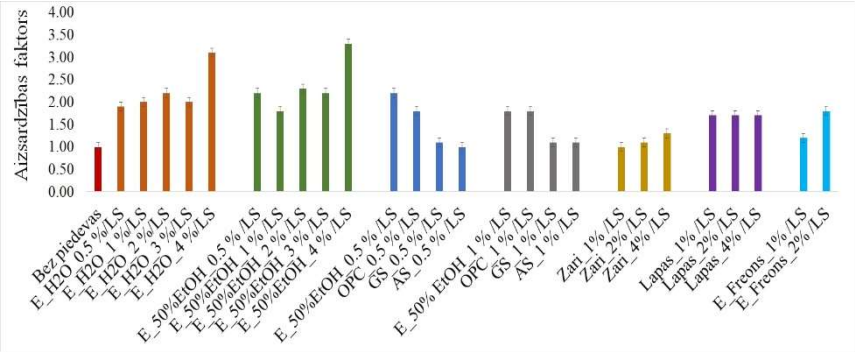
Savstarpēji salīdzinot zaru hidrofīlo ekstraktu antioksidatīvo aktivitāti (IV., VIII. publikācijas), tika novērota sakarība starp proantocianidīnu saturu ekstraktā un to antioksidatīvo aktivitāti – palielinoties proantocianidīnu saturam ekstraktā, palielinās radikāļu dezaktivēšanas aktivitāte $ABTS^{+\bullet}$ un $DFPH^{\bullet}$ testos (9. att.). No pētītajiem ekstraktiem, 50% EtOH ekstrakti parādīja visaugstāko antioksidatīvo aktivitāti, salīdzinot ar ūdens ekstraktiem (proantocianidīnu saturs ektraktā bija 42.45%/SM; IK_{50}=6.18 mg L^{-1} izmantojot $DFPH^{\bullet}$; IK_{50}= 4.4 mg L^{-1}, izmantojot $ABTS^{+\bullet}$. Proantocianidīniem no MB/Z/2021/R un BL/Z/2021/R antioksidatīvā aktivitāte bija robežās no 1.2 līdz 1.4 mg L^{-1} pēc $ABTS^{+\bullet}$ testa un no 2.2 līdz 2.6 mg L^{-1} pēc $DFPH^{\bullet}$ testa, kas ir ievērojami augstāka par ekstraktiem. Troloks izmantots kā references antioksidants, kas ir ūdenī šķīstošs E vitamīna analogs. Attiecībā uz freona ekstraktu, to antioksidatīvā aktivitāte bija vāja, >30 mg L^{-1} (IV. publikācija).



9. att. **Analizējamo paraugu antioksidatīvā aktivitāte. Zemāka IK_{50} vērtība atbilst lielākai antioksidatīvai aktivitātei**

Lai novērtētu analizējamo paraugu spēju aizkavēt oksidēšanos lipīdu saturošos produktos, analizējamie paraugi tika pievienoti kosmētisko krēmu substrātiem ar dažādu lipīdu saturu – 19% un 35% (I. publikācija). Pētāmie paraugi tika testēti koncentrācijā no 0.5 līdz 4% uz lipīdu saturu (LS) substrāta sastāvā. Šo analīžu veikšanai tika izmantota Oxipress metode. Analizēto paraugu aizsardzības faktors ir dots 10 un 11. attēlā. Salīdzinot analizējamos paraugus ar references materiāliem pie vienādas koncentrācijas substrātā (1%/LS), var secināt, ka 50% EtOH ekstrakts iedarbojas efektīvāk nekā references paraugi, proantocianidīni un ūdens ekstrakts. Neskatoties uz proantocianidīnu augsto antioksidatīvo aktivitāti, aizsardzības faktors substrāta oksidēšanas testā bija zemāks nekā 50 % EtOH ekstrakts. Visticamāk, tas ir saistīts ar proantocianidīnu ierobežoto šķīdību substrātā.

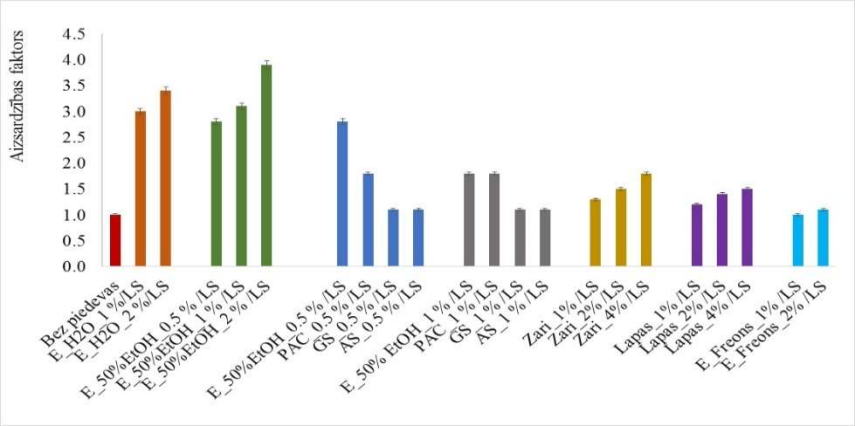
Savstarpēji salīdzinot sasmalcināto zaru un lapu ietekmi pie koncentrācijas 1%/LS, lapas ar plašu zemmolekulāro polifenolu klāstu bija līdzvērtīgas ūdens ekstrakta rezultātiem. Freona ekstrakts pie koncentrācijas 1%/LS bija līdzvērtīgs galluskābes iedarbībai, uzrādot zemu aizsardzības faktoru. Palielinot freona ekstrakta koncentrāciju līdz 2%/LS, lipīdu oksidācijas kavēšana bija līdzvērtīga lapu biomasas iedarbībai, kas norāda uz to, ka nav nepieciešama lapu biomasas ekstrakcija ar freonu, lai aizkavētu oksidēšanos lipīdu saturošos produktos.



10. att. **Analizējamo paraugu ietekme lipīdu oksidācijas kavēšanā, kā substrātu izmantojot krēmu ar 35% lipīdu saturu**

E_H_20 – ekstrakts, kas iegūts ar destilēto ūdeni no MB/Z/2021/R; 50%_EtOH – ekstrakts, kas iegūts ar 50% EtOH no MB/Z/2021/R; E_Freons – ekstrakts, kas izdalīts ar freonu no MB/L/2021/R; PAC - izdalītie no ekstrakta proantocianidīni; GS – galluskābe; AS – askorbinskābe; LS – lipīdu saturs

Ievadot analizējamos paraugus substrātā ar zemāku tauku saturu, ekstraktu darbība bija efektīvāka. Salīdzinot ūdens ekstrakta iedarbību pie koncentrācijas 1%/LS, substrātā ar 19% lipīdu saturu, aizsardzības faktors bija 1.5 reizi augstāks, līdzīga tendence ir novērota arī 50% EtOH ekstraktam. Pārējo analizējamo paraugu efektivitāte bija zemāka.



11. att. **Analizējamo paraugu ietekme lipīdu oksidācijas kavēšanā, kā substrātu izmantojot krēmu ar 19% lipīdu saturu**

E_H_20 – ekstrakts, kas iegūts ar destilēto ūdeni no MB/Z/2021/R; 50%_EtOH – ekstrakts, kas iegūts ar 50% EtOH no MB/Z/2021/R; E_Freons – ekstrakts, kas izdalīts ar freonu no MB/L/2021/R; PAC - izdalītie no ekstrakta proantocianidīni; GS – galluskābe; AS – askorbinskābe; LS – lipīdu saturs

5. Antimikrobiālā aktivitāte

Otra būtiska mūsdienu problēma ir baktēriju rezistence pret antibiotikām un sēņu rezistence pret fungicīdiem. Lai samazinātu un racionalizētu antibotiku un sintētisko fungicīdu lietošanu, kas ir viena no galvenajām ES prioritātēm, un ar tiem saistītas blakusparādības, darbā noteikta sakarība starp proantocianidīnu saturu ekstraktā un to antimikrobiālo un pretieksaisumu aktivitāti.

Ekstraktu un mērķsavienojumu antimikrobiālā aktivitāte testēta attiecībā pret tādām baktērijām – kā *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, B. cereus* un sēni *C. albicans*, nosakot minimālo inhibējošo (MIC) un minimālo baktericīdo/fungicīdu koncentrāciju (MBC/MFC) (II., VIII. publikācijas). *E. coli* baktērijas parasti dzīvo veselu cilvēku un dzīvnieku zarnās. Lielākā daļa *E. coli* veidu ir nekaitīgi, bet daži celmi, piemēram, *E. coli O157:H7*, var izraisīt smagus kuņģa krampjus un vemšanu. *P. aeruginosa* ir oportūnistisks patogēns, kas izraisa nopietnas infekcijas pacientiem ar novājinātu imunitāti, vēžu slimniekiem un pacientiem pēc smagiem apdegumiem un cistiskās fibrozes [68]. *S. aureus* ir komensāls organisms, kas dzīvo ādā un gļotādā. Viegla līdz dzīvībai bīstama sepse var rasties, ja šis mikroorganisms nonāk cilvēka organismā. Tiek lēsts, ka meticilīna rezistentā *S. aureus (MRSA)* forma katru gadu izraisa aptuveni 171 200 ar veselības aprūpi saistītas infekcijas Eiropā un ir saistīta ar 5 400 papildu nāves gadījumiem. *B. cereus* ir baktēriju veids, kas rada bīstamus toksīnus, pārnesot ar inficēto pārtiku. Tas galvenokārt skar pārtiku, kas pēc pagatavošanas ilgstoši uzglabāta istabas temperatūrā un tāpēc nav ātri un efektīvi atdzesēta. *C. albicans* ir oportūnistisks sēnīšu patogēns, kas ir cilvēku kuņģa-zarnu trakta floras sastāvdaļa, bet *C. albicans* spēj kolonizēt gandrīz visus cilvēka audus un orgānus, izraisot nopietnas invazīvas infekcijas [69].

Visiem pētāmiem ekstraktiem piemīt antimikrobiālā aktivitāte. Attiecībā pret *E. coli* starp ekstraktiem visefektīvākais bija 50% EtOH ekstrakts ar kopējo polifenolu saturu 48.1 g GSE·100 g^{-1} SM. Viszemāko efektivitāti uzrādīja ūdens ekstrakts ar zemu polifenolu saturu (33.2 g GSE·100 g^{-1} SM). Līdzīga tendence ir novērota pret baktērijām *P. aeruginosa* un *S. aureus*. Ekstraktu atimikrobiālā aktivitāte pret *B. cereus* un *C. albicans* bija vājāka, novērojot tikai ekstraktu inhibējošo aktivitāti, kavējot *B. cereus* un *C. albicans* augšanu (4. tab.).

4. tabula

Trīs šķirņu smiltsērkšķu ekstraktu antimikrobiālā aktivitāte

Smiltsērkšķu šķirne, 2020. gada paraugi	**Kopējais polifenolu saturs ekstraktā, g GSE·100 g^{-1} SM**	***E. coli***	***P. aeruginosa***	***S. aureus***	***B. cereus***	***C. albicans***
		MIC/MFC vai MBC, mg mL^{-1}				
Ekstrakti, kas iegūti ar destilēto ūdeni						
MB/Z/2020/R	43.62±0.03	0.39/0.39	0.39/3.13	0.39/0.78	0.78/>50	0.39/>50
BL/Z/2020/R	33.20±0.02	0.78/50	0.78/50	0.39/12.2	0.78/>50	0.39/>50
TAT/Z/2020/R	35.14±0.04	0.39/0.39	0.78/1.56	0.39/0.78	0.78/50	0.39/>50
Ekstrakti, kas iegūti ar 50% EtOH						
MB/Z/2020/R	48.12±0.02	0.20/0.20	0.39/0.78	0.20/0.39	0.39/50	0.20/>50
BL/Z/2020/R	43.78±0.02	0.39/0.39	0.78/1.56	0.39/0.78	0.78/>50	0.20/>50
TAT/Z/2020/R	41.36±0.03	0.39/0.39	3.13/3.13	0.20/0.78	0.78/50	0.39/>50

Līdzvērtīgi pētījumi veikti ar ekstraktiem un mērķsavienojumiem, kas iegūti no 2021. gada ievāktiem zariem. Salīdzinot ar ekstraktiem, proantocianidīni bija daudzkārt efektīvāki pret *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* un *S. pyogenes*. No visiem paraugiem dotajās koncentrācijās neviens neuzrādīja minimālo fungicīdo koncentrāciju attiecībā pret sēni *C. albicans*.

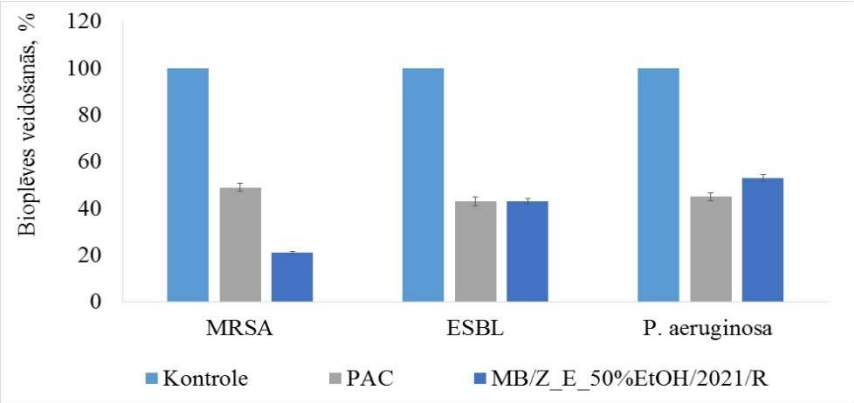
Serotonīnu saturošajai frakcijai noteikta antimikrobiālā aktivitāte attiecībā pret *S. pyogenes* un *C. acnes* (I. publikācija). Pamatojoties uz literatūras datiem, *S. pyogenes* izraisa dažādas akūtas infekcijas, piemēram, mīksto audu infekcijas un faringītu, kā arī smagas dzīvībai bīstamas infekcijas, piemēram, streptokoku toksiskā šoka sindromu un postošas postinfekciozas sekas, piemēram, reimatisko drudzi un glomerulonefrītu [70]. Otrs patogēns, *C. acnes*, ir relatīvi lēni augoša, parasti aerotoleranta, anaeroba grampozitīva baktērija, kas saistīta ar aknes ādas stāvokli. Šis patogēns var izraisīt arī hronisku blefarītu un endoftalmītu [71], [72]. Visi paraugi, ieskaitot serotonīnu un serotonīna standartu (references materiālu), bija efektīvi abu patogēnu nonāvēšanai. Freona ekstrakts no lapām salīdzinoši ar pārējiem ekstraktiem bija ar zemāku antimikrobiālo aktivitāti (5. tab).

5. tabula

Paraugu minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) un minimālā baktericīdā vai fungicīdā koncentrācija (MBC/MFC)

Paraugs; PAC saturs ekstraktā	***E. coli***	***P. aeruginosa***	***S. aureus***	***B. cereus***	***C. albicans***	***S. pyogenes***	***C. acnes***
	MIC/MFC vai MBC, mg mL^{-1}						
Ūdens ekstrakts no MB/Z/2021; 29.6%/SM	0.39/0.39	0.39/3.13	0.39/0.78	0.78/>50	0.39/ >50	0.20/0.20	0.78/0.78
50% EtOH ekstrakts no MB/Z/2021; 42.9%/SM	0.20/0.20	0.39/0.78	0.20/0.39	0.39/50	0.20/ >50	0.20/0.20	0.39/0.39
PACs no MB/Z/2021; 92.1%/SM	0.04/0.04	0.08/0.16	0.08/0.16	0.63/ 1.25	1.25/ >2.5	0.10/0.10	0.39/0.39
Serotonīnu saturošā frakcija (serotonīna saturs =28.2%/SM)	0.78/0.78	0.78/0.78	0.39/0.78	0.78/ 6.25	12.50/ >50	0.10/0.20	0.39/0.39
Freona ekstrakts no lapām	0.78/50	0.78/50	0.39/12.2	3.13/25			
Serotonīna standarts (tīrība ≥98.0%)						0.10/0.20	0.39/0.78

Bioplēves, ko veido dažādas baktēriju sugas, uzrāda paaugstinātu rezistenci pret antibiotikām un dezinfekcijas līdzekļiem, bieži izraisot hroniskus iekaisuma procesus. Tā kā praktiski nav līdzekļu baktēriju plēvju apkarošanai, promocijas darba ietvaros novērtēta dominējošo preparātu – proantocianidīnu un 50% EtOH ekstraktu – ietekme uz *MRSA* (Meticilīnreiztentais *S. aureus*), *ESBL* (paplašināta spektra bēta laktamāzes producējošā *E. coli*) un *P. aeruginosa* bioplēvju veidošanos (12. att. un III. publikācija).

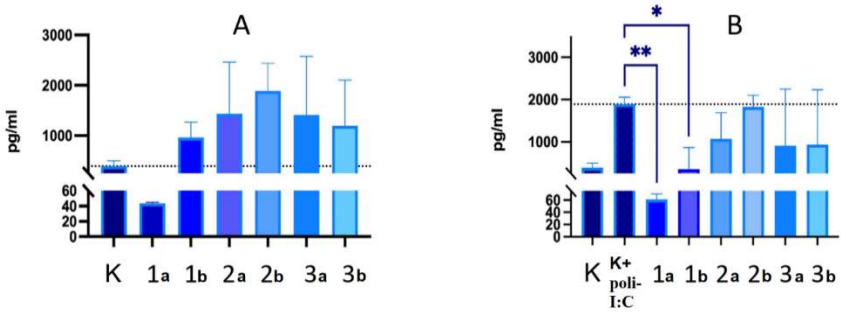


12. att. **Analizējamo preparātu ietekme uz bioplēves veidošanos: MRSA – *S. aureus*; ESBL - *E. coli*; PAC – proantocianidīni; MB/Z_E_50% EtOH/2021/R - ekstrakts, kas iegūts ar 50% EtOH no MB/Z/2021/R**

Salīdzinot ar kontroli (100% izveidota plēve), proantocianidīnu klātbūtnē plēvju veidošanās bija 2 reizes mazāka. Ekstrakta iedarbība bija līdzīga, izņemot uz MRSA bāzes veidoto bioplēvi, kuras veidošanās procentuālais lielums samazinājās 5 reizes. Pamatojoties uz gūtiem pētījuma rezultātiem, proantocianidīni un ekstrakti koncentrācijā 5 mg mL^{-1} spēj inhibēt bioplēves veidošanos un var būt izmantojami brūču dzīšanas terapijā.

6. Pretiekaisuma aktivitāte

Iekaisums ir organisma atbildes reākcija uz traumām un infekcijām, un tas ir nepieciešams, lai pārvarētu to sekas. Par iekaisumu organismā liecina dažāda veidā marķieru (bioķīmisku signālielementu - citokīnu) klātbūtne asinīs. Viens no galvenajiem citokīniem ir interleikīns IL-8, kas izlaists no vairākiem šūnu tipiem, reaģējot uz iekaisumu [73]. Citu citokīnu IL-6 izdala baltās asins šūnas, reaģējot uz traumām vai mikrobu iedarbību, tam arī ir galvenā loma neironu reakcijā uz nervu bojājumiem [74]. Ir parādījušies pierādījumi, ka IL-6 var izmantot kā iekaisuma marķieri smagai COVID-19 infekcijai [75]. Saskaņā ar iegūtajiem datiem, tikai proantocianidīni koncentrācijā 0.5 mg mL^{-1} samazināja IL-8 sekrēciju no nestimulētām cilvēka perifēro asiņu mononukleārām šūnām (PBMNC). Savukārt poliinozīnskābes: policitidilskābes (poli I:C) klātbūtnē, kas atdarina ar vīrusu infekcijām saistītu iekaisumu, visi *Maria Bruvele* paraugi (proantocianidīni, 50% EtOH ekstrakts un ūdens ekstrakts) samazināja IL-8 sekrēciju no šūnām, kas norāda spēju mazināt ar vīrusu infekcijām saistītu iekaisumu (13. att., VI. publikācija).



13. att. **Izmaiņas IL-8 sekrēcijā no nestimulētām (A) un poli-I:C stimulētām (B) cilvēka perifēro asiņu mononukleārajām šūnām pēc 24 h inkubācijas ar analizējamiem paraugiem: 1 – proantocianidīni; 2 – 50% EtOH ekstrakts no MB/Z/2021/R, 3 – ūdens ekstrakts no MB/Z/2021/R. K – kontrole, K+poli-I:C –** kontrole+policitidilskābe (poli I:C); **a – koncentrācija 0.5 mg mL^{-1}, b – 0.25 mg mL^{-1};** * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vienvirziena ANOVA, n = 3

Līdzīga situācija novērota arī pētījumos ar interleikīnu IL-6. Bez poli I:C stimulācijas pēc inkubācijas paraugu klātbūtnē, IL-6 sekrēcijas palielināšanās netika novērota, bet, vienlaikus pievienojot PBMNC pie parauga un poli I:C, novērots, ka proantocianidīni un 50% EtOH ekstrakts ievērojami samazina IL-6 sekrēciju. Proantocianidīnu klātbūtnē IL-6 sekrēcija samazināta līdz nestimulētam kontroles līmenim, turklāt netika novērotas atšķirības starp abām pārbaudītajām koncentrācijām. 50% EtOH ekstraktiem inhibējošā iedarbība bija atkarīga no koncentrācijas – 0.5 mg mL^{-1} samazināja IL-6 sekrēciju par 95.4%, savukārt, 0.25 mg mL^{-1} samazināja to par 63.8%. Ūdens ekstrakti nesamazināja poli-I:C izraisīto IL-6 sekrēciju (VI. publikācija). Kopumā mūsu atklājumi saskan ar citiem pētījumiem, kuros ir aprakstīta citu augu proantocianidīnu ietekme uz IL-6 un IL-8 sekrēciju iekaisuma modeļos.

7. Mērķsavienojumu iedarbība uz aizkuņģa dziedzera lipāzes aktivitāti gremošanas divpadsmitpirkstu zarnas fāzē

Normālos fizioloģiskos apstākļos (žults klātbūtnē) visi smiltsērkšķu hidrofīlie ekstrakti koncentrācijas diapazonā 0.2–40 mg g^{-1} PL uzrādīja būtisku aizkuņģa dziedzera lipāzes (ADL) aktivitātes inhibīciju. Jau pie 0.2 mg ūdens ekstrakta daudzuma, kas saturēja 43.4 ± 0.4 g GSE·100 g^{-1} polifenolu un 17.5 ± 0.1% proantocianidīnu, lipāzes aktivitāte samazinājās par 22%. Turpmāka pakāpeniska ekstrakta daudzuma palielināšana no 0.2 mg g^{-1} PL līdz 40 mg g^{-1} PL nodrošināja aptuveni tādu pašu ADL inhibīciju ticamības intervālā. Jo lielāks bija proantocianidīnu saturs ekstraktā, jo augstāks bija lipāzes inhibīcijas procents. Ekstrakts, kas saturēja 48.6 ± 0.2 g GSE·100 g^{-1} un 42.4 ± 0.3% proantocianidīnu, daudzumā no 0.2 mg g^{-1} PL līdz 40 mg g^{-1} PL, inhibēja lipāzes

aktivitāti par 33%. Proantocianidīnu loma ADL aktivitātes inhibēšanā pierādīta, savstarpēji salīdzinot izdalīto proantocianidīnu no ekstrakta un eluāta (atlikušo frakciju pēc proantocianidīnu izdalīšanas) iedarbību uz ADL aktivitāti. Proantocianidīni koncentrācijas diapazonā no 1 līdz 20 mg g^{-1} PL inhibēja ADL aktivitāti par 36%. Savukārt eluāts nebija tik efektīvs un koncentrācijā 20 mg g^{-1} PL veicināja ADL aktivitātes palielināšanu par 6–11%. Serotonīna saturošā frakcija palielināja ADL aktivitāti gremošanas divpadsmitpirkstu zarnas fāzē, un to var izmantot, lai normalizētu fizioloģisko gremošanu, īpaši triglicerīdu sadalīšanos brīvajās taukskābēs un monoglicerīdos, lai koriģētu lipīdu spektru, šūnu vielmaiņu un homeostāzi (patentēts pētījums).

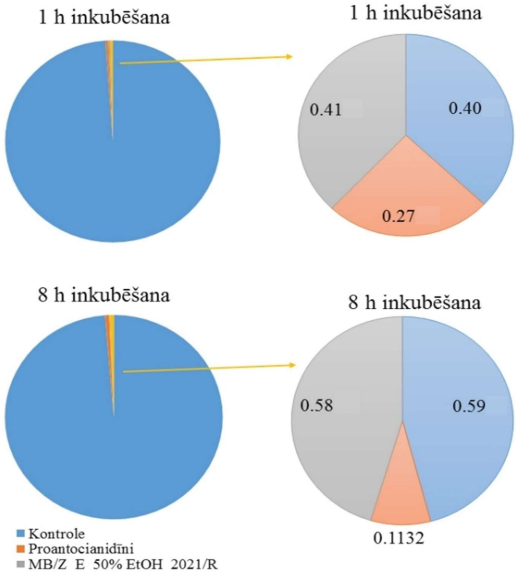
Patoloģiskos apstākļos (bez žults) 50% EtOH ekstraktam un izdalītiem proantocianidīniem novērota ADL inhibīcija pie 0.2 un 1 mg g^{-1} PL, taču jau pie 2 mg g^{-1} PL tika novērota aizkuņģa dziedzera lipāzes iedarbības aktivācija. Patoloģiskos apstākļos abi mērķsavienojumi koncentrācijā no 2 līdz 400 mg g^{-1} PL katalizēja ADL iedarbību gremošanas divpadsmitpirkstu zarnas fāzē (IV. publikācija).

8. Mērķsavienojumu iedarbība uz amilāzes aktivitāti siekalās

Normālos fizioloģiskos apstākļos visi smiltsērkšķu ekstrakti un serotonīnu saturošā frakcija koncentrācijā 0.1-2 mg mL^{-1} $_{siekalu}$ uzrādīja nozīmīgu iedarbību, paātrinot cietes sadalīšanos līdz glikozei, kas var būt noderīga, lai ārstētu cilvēkus ar nepietiekamu svaru malabsorbcijas sindroma gadījumā. Izdalīti proantocianidīni tajā pašā koncentrācijā uzrādīja inhibējošo aktivitāti, samazinot amilolitisko spēku no 640 uz 320 D 30/38 °C. Tas norāda, ka proantocianidīni spēj samazināt cietes ogļhidrātu sadalīšanos un uzsūkšanos organismā, kas var būt noderīga diabēta pacientiem un pacientiem ar lieko svaru (II. un VIII. publikācijas).

9. Analizējamo paraugu hemolīze

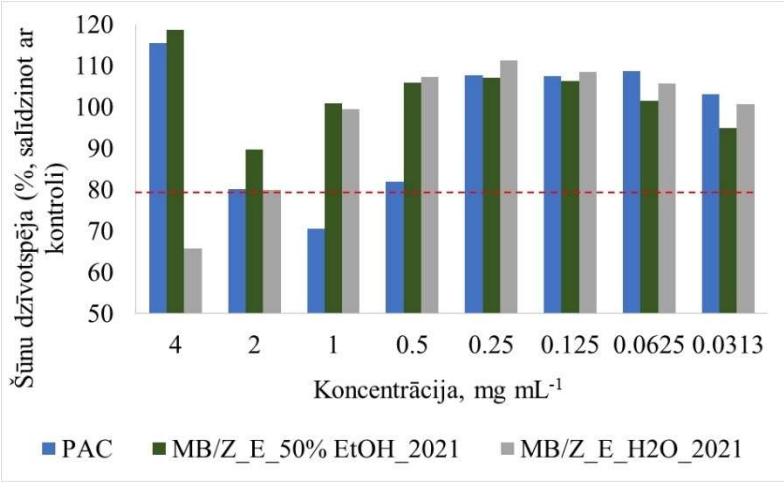
Hemolītiskā aktivitāte (ietekme uz cilvēka asins eritrocītiem) pārbaudīta ekstraktiem un proantocianidīniem koncentrācijā 0.5 mg mL^{-1}. Neviens no analizējamiem paraugiem neizraisīja eritrocitu sairšanu (hemolīzi) pēc 1 h vai 8 h inkubācijas. Tas norāda uz ekstraktu un proantocianidīnu drošību un augsto bioloģisko saderību (14. att., VI. publikācija).



14. att. **Analizējamo paraugu hemolīze. PAC – proantocianidīni. MB/Z_E_50% EtOH_2021/R – 50% EtOH ekstrakts iegūts no *Marija Bruvele* zariem ievāktiem 2021. gada rudenī**

10. Citotoksicitāte

Ekstraktu un mērķsavienojumu citotoksicitāte novērtēta un salīdzināta ar novēroto MIC/MBC un MIC/MFC koncentrāciju, kā arī antioksidanta IK_{50} vērtību un nepieciešamu devu amilāzes un lipāzes darbības inhibēšanai vai stimulēšanai (VI. un VIII. publikācija). Paraugi tiek uzskatīti par citotoksiskiem, ja šūnu dzīvotspēja bija samazināta par vairāk nekā 20%. Visi pētamie hidrofīlie ekstrakti no zaru biomasas to darības koncentrācijas diapazonā no 0.0313 līdz 2.0 mg mL^{-1} bija droši, neuzrādot citotoksicitāti. Proantocianidīnu droša koncentrācija bija robežās no 0.03 līdz 0.5 mg mL^{-1}, bet pie proantocianidīna koncentrācijas 1 mg mL^{-1} bija novērota neliela citotoksicitāte, samazinot šūnu dzīvotspēju par 29.56%. Ūdens ekstraktam koncentrācijā 4 mg mL^{-1}, šūnu dzīvotspēja samazinājās par 34.33% (15. attēls).



15. att. **Analizējamo paraugu citotoksicitāte**

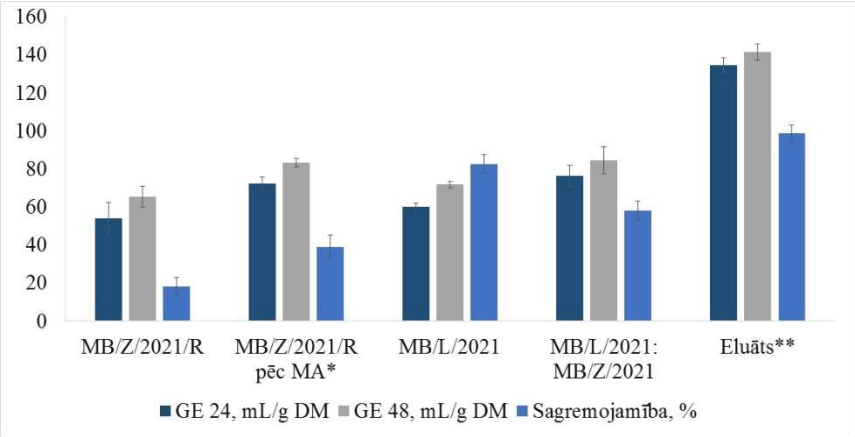
11. Smiltsērkšķu biomasas novērtējums lopbarības ieguvei

Lai novērtētu zaru atlikumu (MB/Z/2021/R, BL/Z/2021/R, TAT/Z/2021/) un lapu (MB/L/2021, BL/L/2021, TAT/L/2021) piemērotību lopbarības ieguvei, laboratorijas apstākļos veikts paraugu ķīmiskais raksturojums, noteikts koppelnu, jēlšķiedras, kopproteīna, fosfora, kālija, nātrija, kalcija un smago metālu (Pb, Cd un Hg) saturs. Lapās fosfora saturs bija robežās no 210±21 līdz 225±22 mg uz 100 g SM; kālija saturs no 1209±104 līdz 1376±113 mg uz 100 g SM; nātrija saturs no 1.72±0.40 līdz 2.25±0.52 mg uz 100 g SM; kalcija saturs no 856±205 līdz 989±237 mg uz 100 g SM. Zaros nātrija saturs bija augstāks, bet kalcija saturs zemāks: nātrija saturs no 7.83±1.80 līdz 22.5±5.2 mg uz 100 g SM; kalcija saturs no 281±67 līdz 332±80 mg uz 100 g SM. Smago metālu saturs biomasā nepārsniedz maksimāli pieļaujamo koncentrāciju un atbilst Eiropas Komisijas regulai Nr. 1275/2013. Papildus mikro- un makroelementiem smiltsērkšķu zari un lapas satur ūdenī un taukos šķīstošu vitamīnu kompleksu. C vitamīna saturs zaros bija no 8.0±3.0 līdz 178.0±50.0 mg uz 100 g SM, lapās no 12.0±3.0 līdz 15.6 mg uz 100 g SM. Salīdzinot ar zariem, visas trīs smiltsērkšķu šķirņu lapas bija bagātākas ar E vitamīnu (zaros: 14.7±2.1 mg uz 100 g SM; lapās no 30.9±4.3 līdz 42.6±2.2 mg uz 100 g SM). A vitamīns smiltsērkšķu koksnē netika konstatēts, savukārt, lapās A vitamīna saturs bija 0.86±0.07 līdz 1.29±0.02 mg uz 100 g SM (V. publikācija). Saskaņā ar literatūras datiem, smiltsērkšķu lapas papildus satur vērtīgas 13 aminoskābes, bet koksnes daļas un miza satur 17 aminoskābes [76], [77].

Izejvielu kvalitāte ietekmē barības sagremojamību, kas atsaucās siltumnīcefekta gāzu veidošanās lopu zarnu traktā. Barība ar augstāku

sagremojamību samazina metāna daudzuma emisiju. Ir zināms, ka liels tauku saturs biomasā (>8%/SM) var nelabvēlīgi ietekmēt spurekļa darbību, šķiedrvielu gremošanu un piena ražošanu. Tādējādi var teikt, ka tauku saturs analizējamos paraugos (0.7–3.6%/SM) bija optimāls uztura barībai. ADF parasti nav sagremojama, taču tā stimulē nozīmīgu baktēriju veidošanos. Visaugstākais ADF saturs biomasā bija zariem (26.2–27.1%/SM), lapās tās saturs bija nedaudz zemāks (18.1–19.1%/SM). Kopējais proteīna saturs zaros bija ~23%/SM un lapās robežās no 18.4 līdz 19.4%/SM.

Pētāmo paraugu sagremojamība noteikta, izmantojot *in vitro* analīzes, aprēķinot patieso sagremojamību un nosakot fermentācijas rezultātā izdalīto gāzi (V. publikācija). Jo augstāka ir biomasas sagremojamība, jo augstāka ir barības uzturvērtība. Šī analīze veikta *Maria Bruveles* šķirnes biomasas paraugiem MB/Z/2021/R un MB/L/2021 un atlikušai frakcijai pēc proantocianidīnu atdalīšanas (eluāts). Saskaņā ar *in vitro* anlīzes datiem eluāts uzrādīja visaugstāko sagremojamību. Savstarpēji salīdzinot biomasas, labāka sagremojamība bija lapām. Lai novērtētu mehanoķīmiskās apstrādes iedarbību uz gremošanas efektu, zaru atlikums bija papildus mehano-ķīmiski apstrādāts. Rezultāti parāda, ka mehano-ķīmiski apstrādātas biomasas sagremojamība bija 2.2 reizes augstāka, salīdzinot ar paraugu bez papildus mehanoķīmiskās apstrādes (16. att.).



16. att. ***In vitro* analīzes dati par biomasas sagremojamību pirms un pēc apstrādes:** * pēc MA – pēc mehanoķīmiskās apstrādes; ** eluāts - atlikusi frakcija pēc proantocianidīnu atdalīšanas; GE – gāzes emisija; DM – sausa masa

Smiltsērkšķu biomasas pārstrāde lopbarības granulās parādīta 17. attēlā.

17. att. **Ilgtspējīgas smiltsērkšķu atlikumu pārstrādes shēma lopbarības granulu iegūšanai**

Granulēšana ir viena no efektīvākajām metodēm produkta kvalitātes saglabāšanai gan uzglabāšanas laikā, gan to transportēšanas laikā. Iegūtas smiltsērkšķu paraugu granulas ir parādītas 18. attēlā. Sasmalcinātas lapas, salīdzinot ar zariem, ir vieglāk granulējamas, par to liecina zems enerģijas patēriņš un augsts ražīgums. Granulu nodilumizturība bija robežās no 96.9 līdz 97.7%, mitrums 5–6%, vidējais garums 12 mm, tilpumblīvums 714–716 g cm^{-2}. (V. publikācija).

18. att. **Lopbarības piedevas granulu veidā: A – lapu un zaru atlikuma maisījums (1:1 w/w); B – lapas; C – zaru atlikums**

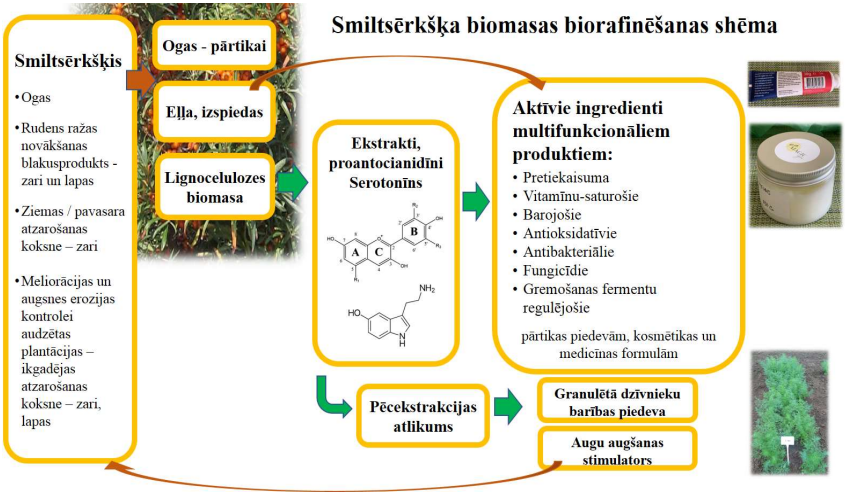
12. Smiltsērkšķu biomasas novērtējums augsnes piedevas ieguvei

Smiltsērkšķu zaru atlikums pēc ekstrakcijas pētīts kā lignocelulozes substrāts augsnes piedevas ieguvei, to bagātinot ar Si (VII. publikācija). Augsnes piedevas rādītāji bija sekojoši: lignīna saturs 38.5±0.5%/SM; humīnskābes saturs – 4.3 ±0.1%/SM; kopējais slāpekļa saturs – 1.35±0.02%/SM; kopējais fosfora saturs 0.06±0.01%/SM; pH – 8.7±0.1%/SM. Sadarbībā ar LBTU Zemkopības institūtu augsnes piedeva testēta lauka izmēģinājumos, audzējot vasaras kviešus (šķirne: ‘Vinjet’) un kartupeļus (šķirne: ‘Imanta’). Iestrādājot augsnes piedevu augsnē,

konstatēts būtisks kartupeļu ražas pieaugums. 2021. gada lauka izmēģinājumos lietojot augsnes piedevu devā 20 un 40 kg ha^{-1}, kartupeļu ražas pieaugums bija 11.2% un 13.8%, salīdzinot ar kontroles variantu. 2022. gadā karstais laiks atstāja būtisku ietekmi un kartupeļu ražas pieaugums iepriekš minētajās devās bija 8.4% un 21.4%, salīdzinot ar kontroles variantu. Audzējot vasaras kviešus, līdzvērtīgi kartupeļu izmēģinājumiem, karstais un sausais laiks kavēja vasaras kviešu attīstību, par ko liecina zemais augu augstums (vidēji 70–73 cm), kā arī ātri nokalta lapas. Lietojot augsnes piedevu devā 20 un 40 kg ha^{-1}, 2021. gadā graudu raža pieauga par 9.5 un 11.7 %, savukārt, 2022. gadā graudu raža kopumā bija zemāka, bet salīdzinošā analīze uzrādīja būtiskāku kviešu ražas pieaugumu par 16.5 un 26.5 %, lietojot augsnes piedevu daudzumā 20 un 40 kg ha^{-1}. Sausais un karstais laiks būtiski ietekmēja arī graudu kvalitāti. Izmēģinājumā iegūtajiem graudiem ir zema tilpummasa (< 700 g L^{-1}) un 1000 g masa (27.2–28.2 g).

13. Smiltsērkšķu biorafinēšanas shema

Pamatojoties uz promocijas darbā gūtiem rezultātiem tiek piedāvāta smiltsērkšķu biorafinēšanas shēma, kas ļauj racionāli izmantot visas augu daļas produktos ar pievienoto vērtību (19. att.).



19. att. **Smiltsērkšķa biorafinēšanas shēma**

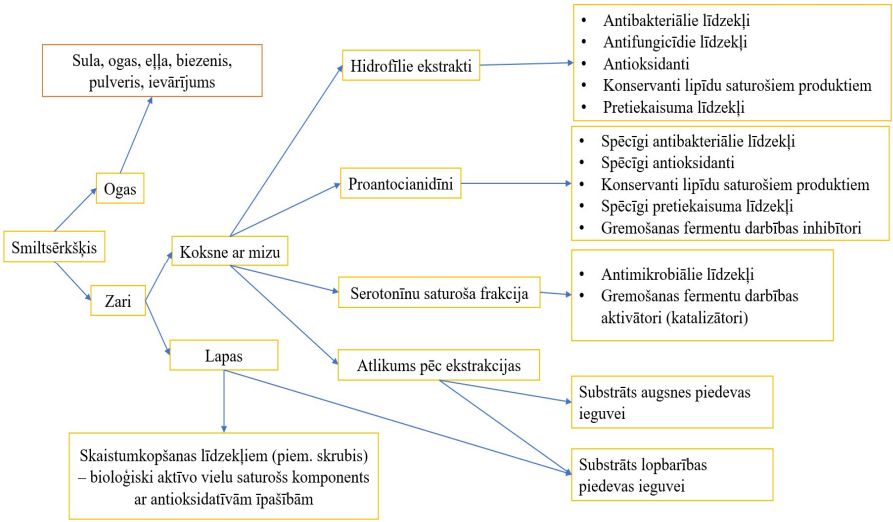
SECINĀJUMI

1. Latvijā kultivēto smiltsērkšķu zari ir vērtīga izejviela proantocianidīnu un serotonīna ieguvei. Rudens ir piemērotākais sezonālais periods mērķsavienojumu ieguvei, ņemot vērā augstu mērķsavienojumu saturu zaros (proantocianidīni ~12%/SM, serotonīns ~4%/SM). Atrasts piemērotākais ekstrakcijas un attīrīšanas paņēmiens, kas nodrošina augstāko hidrofīlo ekstraktu un mērķsavienojumu iznākumu no smiltsērkšķu biomasas. Šajos apstākļos no smiltsērkšķu zariem var iegūt oligomērus proantocianidīnus (ar ~92% proantocianidīnu uz SM ekstraktu) ar polimerizācijas pakāpi 2-5 Da un serotonīna saturošo frakciju ar 28.2%/SM serotonīna.
2. Hidrofīliem ekstraktiem un izdalītiem proantocianidīniem piemīt augsta antimikrobiālā aktivitāte attiecībā pret *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* un *Candida albicans*, radot iespēju iegūt pretmikrobu preparātus, aizvietojot vai papildinot antibiotikas cīņai pret rezistentiem mikrobiem. Serotonīns un proantocianidīni ir spēcīgi antibakteriālie līdzekļi pret ādas un mīksto audu infekciju izraisītājiem - *Streptococcus pyogenes* un *Cutibacterium acnes*, kas piesārņo ādas kopšanas produktus un attīstās sebumā. Proantocianidīni spēj aizturēt patogēno bioplēvju veidošanos par 80%, kas būtiski var samazināt hroniskus iekaisuma procesus.
3. Proantocianidīniem un to saturošiem ekstraktiem piemīt augsta pretiekaisuma aktivitāte, it īpaši samazinot ar vīrusu infekcijām saistītu iekaisumu. Proantocianidīni koncentrācijā 0.5 mg mL^{-1} samazināja IL-8 sekrēciju, un koncentrācijās 0.25–0.5 mg mL^{-1} samazināja IL-6 sekrēciju cilvēka perifēro asiņu mononukleārā šūnās. Poliinozīnskābes:policitidilskābes (poli I:C), kas atdarina vīrusa divpavedienu RNS, stimulētajās perifēro asiņu mononukleārā cilvēku šūnās gan proantocianidīni gan 50% EtOH ekstrakts būtiski samazināja IL-8 un IL-6 sekrēciju.
4. Pierādīta ekstraktu un proantocianidīnu augsta antioksidatīvā aktivitāte un to spēja aizsargāt lipīdu saturošas sistēmas no oksidācijas, kas paver iespēju tos izmantot kā dabīgus antioksidantus medicīniskajos un kosmētiskajos krēmos. Izdalītiem proantocianidīniem antioksidatīvā aktivitāte bija vidēji 3 reizēs augstāka salīdzinot ar E vitamīna analoga antioksidatīvo aktivitāti. 50% EtOH ekstrakts visefektivāk aizkāvē lipīdu saturošo produktu oksidēšanos. Substrātā ar zemāku lipīdu saturu (19%), ekstraktu darbība bija efektīvāka, nekā ar augstāku lipīdu saturu (35%).
5. Hidrofīlie ekstrakti no zaru biomasas darbības koncentrācijas diapazonā no 0.03 līdz 4.0 mg mL^{-1} un mērķsavienojumi diapazonā no 0.03 līdz 0.5 mg mL^{-1} neuzrādīja citotoksicitāti un neizrasīja cilvēku asins hemolīzi, kas norāda uz to augsto bioloģisko saderību un drošību lietošanai medicīnisko un kosmētisko krēmu sastāvos, kā arī veselības aprūpē.

6. Proantocianidīni ir spēcīgi lipāzes un alfa-amilāzes darbības inhibitori, kas paver iespējas tos izmantot pretaptaukošanas terapijā, savukārt, serotonīns ir cilvēku gremošanas fermentu aktivātors, kas paver iespēju to izmantot malabsorbcijas problēmu risināšanā.
7. Pēc mērķsavienojumu izdalīšanas lignocelulozes biomasas atlikumu ķīmiskais raksturojums un *in vitro* analīzes mazo atgremotāju gremošanas sistēmā parādīja iespēju tos izmantot lopbarības piedevas ieguvei. Bagātinot lignocelulozes biomasas atlikumu ar silīciju saturošo komponentu, tiek iegūta augsnes piedeva, kas veicina augu augšanu un attīstību, palielinot ražas īpatsvaru par 27%.
8. Izstrādāta bezatkritumu smiltsērkšķa biomasas biorafinēšanas shēma, kas ļaus smiltsērkšķu audzētājiem izmantot gan ogas, gan zarus - lignocelulozes biomasu, paplašinot sortimentu, izvēloties pielietošanas virzienus.

REKOMENDĀCIJAS

Izstrādāta elastīga smiltsērkšķa biomasas izmantošanas shēma ļaus smiltsērkšķu audzētājiem paplašināt sortimentu, izvēloties ražošanai sev piemērotākos produktus (20. att.).



20. att. **Izmantošanas virzienu shēma smiltsērkšķu audzētājiem**

PATEICĪBA

Izsaku visdziļāko pateicību Dr. habil. chem. Gaļinai Teliševai, lignīna laboratorijas vadītājai, par idejām, iedvesmu, zināšanām un apmācībām.

Sevišķi liels paldies zinātniskā darba vadītājiem Dr. sc. ing. Sarmītei Jancevai un Dr. sc.ing. Uldim Spullem par darba vadīšanu, neaizstājamu atbalstu promocijas darba izstrādes laikā, savlaicīgu palīdzību visos darba etapos un zinātnisko rakstu un prezentāciju sagatavošanā, vērtīgiem padomiem un efektīvu darba koordinēšanu.

Īpašs paldies starptautiskās smiltērkšķu asociācijas ISA valdes loceklim Andrejam Brūvelim par dalīšanos ar savām zināšanam par smiltsērkšķiem, par iedvesmu un palīdzību.

Esmu pateicīga institūta un laboratorijas kolēģiem, kas mani praktiski atbalstīja promocijas darba izstrādāšanas laikā.

Lielu pateicību izsaku Dr. biol. Vizmai Nikolajevai, PhD Līgai Pētersonei, Mg. biol. Annai Ramata-Stundai, PhD Mihailam Červenkovam, Mg. biol. Mārim Seņkovam un Dr. med. Krasiļņikovai par atbalstu un palīdzību iegūto analizējamo paraugu raksturošanā.

Sirsnīgs paldies manai ģimenei par neizsmeļamo pacietību, saprotošo attieksmi un lielo atbalstu.

RELEVANCE OF THE RESEARCH

Meeting the current global consumption is unsustainable because humanity's consumption of resources exceeds what nature can regenerate. Converting bio-waste into a resource will not only replace fossil resources but also solve the problem of lack of raw materials.

In the European Union (EU), a total of 11.3 million hectares (ha) have been allocated for the cultivation of fruit trees [1]. Pruning these trees together with felling or removal of plantations creates a huge amount of wood waste. A theoretical calculation of wood waste in the EU estimates that up to 25 million tonnes of wood are produced in the form of twigs every year as a result of fruit tree pruning [2]. This wood waste is usually burned or shredded with subsequent incorporation into the soil with no direct economic benefits. Thus, it is rational to introduce the processing of fruit tree wood into valuable value-added products. The rational use of renewable resources is one of the priorities of the Latvian Bioeconomy Strategy 2030, increasing the productivity of local renewable resources [3].

Sea buckthorn wood is one of the topical and understudied renewable resources in Latvia. Sea buckthorn has gained attention due to the rich composition of the fruits and valuable properties. Sea buckthorn grows in 52 countries, the largest plantations are located in Eurasia, the Caucasus, West Asia, Central Asia, China, and Mongolia [4]. *Hippophaë rhamnoides L.* . is the most common species of the sea buckthorn genus. Thanks to a strong and developed root system, sea buckthorn is used in land reclamation and soil enrichment due to its nitrogen-fixing properties (an 8- to 10-year-old sea buckthorn plantation can fix 180 kg of nitrogen/ha/year) [5].

In Latvia, sea buckthorn is the second most common fruit tree species after the apple tree, and the area of its plantations is constantly increasing. Compared to the year 2010, the number of sea buckthorn areas increased from 200 to 1535 ha in Latvia, and the sea buckthorn berry yield also increased from 200 tons per year to 814 tons per year [6]. Sea buckthorn berries grown in Latvia have very high-quality indicators, but berry processors are often forced to choose cheaper berries instead of better ones due to economic considerations. Great competition makes us think about the creation of environmentally friendly, rational technologies that will allow the processing of all plant parts.

The main purpose of pruning fruit trees is to facilitate crown formation for greater tree production and more convenient harvesting. Sea buckthorn cultivation technology requires the complete felling of four-year-old trees growing in plantations and pruning of one to two-year-old twigs both in spring, forming a crown and reducing the risk of fungal infections of the tree, and in summer and autumn - as a result of harvesting berries, incl. performing sanitary

pruning. The largest volume of twigs is formed in summer and autumn. Sharp, prickly twigs interfere with berry picking, and the twigs are cut with the berries to speed up the harvesting process of commercially grown berries. After removing the berries (freezing all the twigs with berries beforehand), the volume of the separated twigs is about 20-30% of the mass of the fruiting twigs on average and can produce from 0.5 to 2.0 tons/ha of dry wood annually (Fig. 1).

Fig.1. **Sea buckthorn plantation (A); biomass of spring twigs (B); autumn twigs biomass (C)**

Currently, sea buckthorn growers burn the entire volume of these twigs not appreciating the potential of this lignocellulosic biomass, although this part of the wood can be a valuable raw material for the extraction of biologically active substances and new products, creating additional income for growers outside of harvest time. Based on the data of the Rural Support Service (RSS), Latvia had 2 million ha of uncultivated agricultural area in 2023 [7]. It is possible to use part of these areas for the expansion of sea buckthorn plantations, additionally attracting new labour, creating a positive promotion of the social environment in rural regions.

Despite the quick growth of sea buckthorn and the positive properties of its wood (hard, durable, dense, and medium weight), it is considered a low-value tree species that does not reach large enough dimensions to be used in construction, carpentry, or furniture production. Handles of knives and umbrellas, mouthpieces, walking sticks, kitchen utensils, and toys are made from the wood of the sea buckthorn trunk. In the sea buckthorn pruning material, the majority is small-diameter twigs, so their use for the production of fuel pellets is difficult due to the high ash content. According to the Scopus® database, the number of publications on the topic of "fruit wood valorisation" has increased 7 times over the last ten years, proposing the use of fruit wood for paper production and wood composites.

Wood is best defined as a biopolymer composite consisting of cellulose, hemicellulose, lignin and extractives. Wood extractives contain many organic compounds of various classes [8]. One of the most valuable chemical compounds of wood as lignocellulosic biomass are polyphenols, incl. proanthocyanidins, which accumulate in the process of plant growth and development, providing plants with important physiological properties, protecting the plant from biotic and abiotic stresses and providing protection against infectious disease agents

[20]. The concentration of polyphenols in the plant and their composition depends both on the vegetation phase of the plant, on the variety, as well as on the geographical place of growth and physiological maturity. Polyphenols have antioxidant, antimicrobial, fungicidal, bio-stimulating, anti-inflammatory, cardioprotective and anticarcinogenic properties [9]. This suggests that fruit wood extracts may have several applications in medicine, food, pharmaceutical and nutritional industries, cosmetic production and agriculture. Previous studies have shown that proanthocyanidins are the dominant compounds in oligomeric polyphenols obtained from lignocellulosic biomass (wood, bark) of deciduous and coniferous trees [21]. The content of proanthocyanidins in sea buckthorn wood biomass, their composition and bioactivity have not been studied. Some scientific studies have noted that the bark of sea buckthorn twigs contains serotonin, the so-called hormone of happiness, and in much higher quantities than it is in, for example, chocolate or bananas. In a human body, serotonin is formed in the brain and digestive tract from the essential amino acid L-tryptophan, which enters the body with food. Serotonin promotes psychological and physical well-being, the functioning of the immune system, regulates digestion, sleep, memory and sexual function. Serotonin from safflower seeds has anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-cancer activity, as well as potential to reduce Parkinson's-like symptoms, depression and obesity [54], [55], [56], [53]. The physiological functions of serotonin in plants are not yet clear.

Based on the potential and importance of serotonin and proanthocyanidins (Fig. 2) for the human body, they were chosen as target compounds in the doctoral thesis, evaluating the waste of sea buckthorn cultivated in Latvia, mainly twigs, as a source of target compounds, separating, purifying and characterizing them in order to evaluate the possibilities of additional use. To ensure zero-waste wood processing, the wood residue after the separation of target compounds can be used efficiently as a feed additive or as a soil additive substrate, returning the organic part taken from the natural cycle back to it, which is necessary for the beneficial functioning of the soil-biotic system.

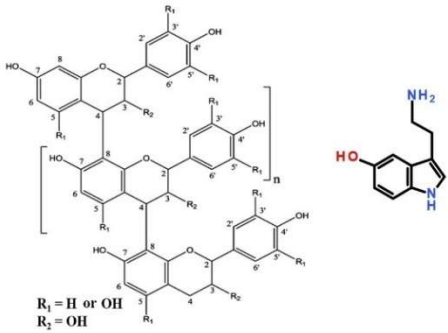


Fig. 2. **Chemical structure of proanthocyanidin and serotonin**

The use of sea buckthorn proanthocyanidins or extracts containing them for industrial purposes, for example, for obtaining wood adhesives, or their use for water purification, or for viscosity regulation is not economically viable due to the large volumes required, therefore, within the scope of this doctoral thesis, new application directions with the highest added value were sought and the biological activity of proanthocyanidins, including antimicrobial and anti-inflammatory properties, has been primarily studied.

Thus, sea buckthorn proanthocyanidins from twigs will be able to replace proanthocyanidins of other origins used in production, for example, from cranberries or preparations from sea buckthorn fruits, whose production competes with the food chain and is therefore much more expensive. In addition, it will not only enable the development of a sustainable processing cycle of sea buckthorn, but also enable the extraction of proanthocyanidins from wood of local origin, which will be a valuable contribution to the Latvian economy. The use of sea buckthorn in the medical and veterinary industries is very topical, taking into account the spread of various infectious diseases and their difficult treatment, which is caused by pathogenic microorganisms that have become resistant to antibiotics [46].

The hypothesis of the Doctoral Thesis

When analysing the information available in the literature, the following **hypothesis of the Doctoral Thesis** has been put forward: It is possible to develop a biorefining scheme for the sea buckthorn tree for the beneficial use of all its parts within the framework of a circular economy by processing the vegetative parts of the tree and obtaining valuable target products, i.d., proanthocyanidins and serotonin from sea buckthorn wood extracts with anti-inflammatory and antimicrobial properties and using the residue after wood extraction for feed or soil additive.

The hypothesis shall be defended with the following theses:

- Sea buckthorn wood biomass is a promising raw material for the extraction of oligomeric proanthocyanidins and serotonins as individual components or in complex form by creating synergy in bioactivity. The developed technological approach is effective for isolating target compounds from the extract;
- High antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity of target compounds and extracts containing them, as well as effects on the activity of human digestive enzymes, both by inhibiting and activating their activity are proven. The obtained target compounds and extracts containing them are non-toxic in the range of active concentrations;
- The wood residue of sea buckthorn after extraction is a suitable raw material for the production of animal feed additive, which can control digestibility and

gas formation by changing the mass ratio of raw materials. By enriching sea buckthorn wood residue with trace minerals and macro minerals, the resulting soil additive promotes the growth and development of vegetables and grains, additionally improving the quality of the soil by increasing the content of organic substances in the soil composition.

The aim of the doctoral thesis is to evaluate the lignocellulosic biomass of the cultivated fruit tree - sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) in Latvia as a potential source of serotonin and proanthocyanidins by proposing an innovative solution for the zero-waste complex processing of lignocellulosic biomass to obtain competitive, functional products that are harmless to the environment, humans, and animals.

To achieve the aim of the thesis, the **following tasks** have been set:

1. Assess the potential of the wood of sea buckthorn twigs as a raw material for the extraction of biologically active substances - serotonin and oligomeric proanthocyanidins – and determine the most suitable method of extraction and purification for obtaining of the target compounds;
2. Determine the antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of extracts, oligomeric proanthocyanidins, and serotonin-containing fractions and evaluate the possibilities of their practical use;
3. Detect the effects of target compounds and extracts on human digestive enzyme activity;
4. Identify the potential of post-extraction wood residue as a raw material for the production of pelleted feed and plant growth promoter;
5. Develop a biorefinery scheme for the zero-waste comprehensive use of sea buckthorn twigs - lignocellulosic biomass.

Scientific novelty:

- The potential of the waste of sea buckthorn cultivated in Latvia for the extraction of oligomeric proanthocyanidins and serotonin was evaluated for the first time;
- By using chemicals safe for people and the environment, including ozone-safe freon HFC R134a, a suitable technique for isolating target compounds was developed, which allowed to evaluate the role of substances in the composition and bioactivity of the extracts, inter alia, in the activity of human digestive enzymes (alpha-amylase, pancreatic lipase);
- For the first time, the most suitable season and age of sea buckthorn twigs for the extraction of proanthocyanidins, serotonin and extracts containing them were identified;
- Based on the acute need for natural antimicrobial agents, the target compounds were tested both individually and in a mixture against seven

pathogenic microorganisms by evaluating their effect on biofilm formation additionally by applying three types of bacteria;

- The composition of proanthocyanidins isolated from sea buckthorn wood biomass and their role in anti-inflammatory activity have been determined for the first time;
- A study of the antioxidant activity of sea buckthorn extracts and target compounds in lipid-containing products was done;
- The possibilities of using sea buckthorn wood residue after extraction for the production of feed additive, chemically characterizing it and determining the efficiency of digestion in the stomach model system of ruminants were assessed;
- By enriching the sea buckthorn wood residue with the silicon-containing component after extraction, the effect of the obtained soil additive on plant growth and development was evaluated by returning the organic part necessary for the beneficial functioning of the soil-biotic system to the natural cycle.

Economic importance of research:

- The possibility of obtaining products containing proanthocyanidin and serotonin from sea buckthorn twigs is demonstrated, which will make a significant contribution to the development of the bioeconomy that is relevant for the Latvian economy and corresponds to the strategic goals of the European Union;
- Proanthocyanidins and extracts containing them are potential antioxidants for medical and cosmetic creams, thus creating an alternative to synthetic, ecologically unsafe antioxidants;
- Proanthocyanidins, serotonin and extracts containing them are potential antimicrobial agents by offering an alternative or supplement to antibiotics to fight against resistant microbes;
- The stimulating activity of serotonin on digestive enzymes and the inhibiting action of proanthocyanidins show the perspective of targeted compounds in healthcare for solving various problems related to digestion;
- The possibility of using the twig residue after extraction for the production of feed additive and as a substrate for the production of soil additive is shown;
- Developing a rational zero-waste processing scheme for the wood of sea buckthorn twigs as lignocellulosic biomass in products with added value will be useful and applicable also for the full use of wood waste from other fruit trees or berry trees.

APPROBATION OF RESEARCH RESULTS

List of publications

This thesis is based on eight publications, reffered to by Roman numerals in the text:

I. **Andersone A.***, Janceva S.*, Lauberte L., Nikolajeva V., Zaharova N., Jurkjane V., Rieksts G., Spulle U., Telysheva G. (2024) Sea Buckthorn, Aronia, and Black Currant Pruning Biomass as a Source of Multifunctional Anti-aging Cosmetic and Pharmaceutical Creams Ingredients (**equal contribution of the first two authors to the writing of the publication, prepared for submission*).

II. Janceva S., **Andersone A.**, Lauberte L., Zaharova N., Telysheva G., Krasilnikova J., Rieksts G. (2024) A Comparative Assessment of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Pruning Waste as a Potential Source of Serotonin. BioResources 19(1), 886-897. https://doi.org/10.15376/biores.19.1.886-897.

III. **Andersone A.**, Janceva S., Lauberte L., Skadins I., Nikolajeva V., Logviss K., Zaharova N., Rieksts G., Telysheva G. (2023) A Comparative Analysis of the Proanthocyanidins from Fruit and Non-fruit Trees and Shrubs of Northern Europe: Chemical Characteristics and Biological Aactivity. Sustainable Chemistry and Pharmacy, Volume 36, 101266. https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101266.

IV. **Andersone A.**, Janceva S., Lauberte L., Krasilnikova J., Zaharova N., Nikolajeva V., Rieksts G., Telysheva G. (2023) Lignocellulosic Waste Compounds for Pancreatic Lipase Inhibition: Preliminary Extraction by Freon, Obtaining of Proanthocyanidins and Testing on Lipase Activity. Metabolites, 13(8), 922. https://doi.org/10.3390/metabo13080922.

V. **Andersone A.**, Janceva S., Lauberte L., Zaharova N., Chervenkov M., Jurkjane V., Jashina L., Rieksts G., Telysheva G. (2023) Granulated Animal Feed and Fuel Based on Sea Buckthorn Agro-Waste Biomass for Sustainable Berry Production. Sustainability, 15(14), 11152. https://doi.org/10.3390/su151411152.

VI. **Andersone A.**, Janceva S., Lauberte L., Ramata-Stunda A., Nikolajeva V., Zaharova N., Rieksts G., Telysheva G. (2023) Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial, and Anti-Fungal Activity of Oligomeric Proanthocyanidins and Extracts Obtained from Lignocellulosic Agricultural Waste. Molecules, 28(2), 863. https://doi.org/10.3390/molecules28020863.

VII. **Andersone A.**, Janceva S., Svarta A., Zaharova N., Rieksts G., Telysheva G. (2023) Lignin and Lignocellulose-based Organomineral Complex for Organic Agriculture. 23rd SGEM International Multidisciplinary Scientific GeoConference. https://doi.org/10.5593/sgem2023/3.1/s13.30.

VIII. Janceva S., **Andersone A.**, Lauberte L., Bikovens O., Nikolajeva V., Jashina L., Zaharova N., Telysheva G., Senkovs M., Rieksts G., Ramata-Stunda A., Krasilnikova J. Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Waste Biomass after Harvesting as a Source of Valuable Biologically Active Compounds with Nutraceutical and Antibacterial Potential. Plants 2022, 11, 642. https://doi.org/10.3390/plants11050642.

Approbation of research results at the conferences

Study results have been presented at four scientific conferences:

IX. **Andersone A**., Janceva S., Zaharova N., Rieksts G., Telysheva G. (2022) Granulated Animal Feed Additives on the Basis of Sea Buckthorn Biomass. Proceedings of the XIII International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2022", 1109 – 1115.

X. **Andersone A.**, Janceva S., Zaharova N., Rieksts G., Telysheva G. (2022) Bioactivity of Silylated Lignocellulosic Biomass of Sea Buckthorn. Proceedings of the XIII International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2022", 796 – 802.

XI. **Andersone A.**, Janceva S., Lauberte L., Zaharova N., Senkovs M., Ramata-Stunda A., Telysheva G., Rieksts G. (2022) Comparative Analysis of the Biological Activity of Proanthocyanidins from Fruit and Non-fruit Trees and Shrubs of Northern Europe. 9th IUPAC International Conference on Green Chemistry, 432 – 433.

XII. Janceva S., **Andersone A.**, Lauberte L., Zaharova N., Nikolajeva V. Fruit shrubs' twigs as a source of valuable oligomeric polyphenolic compounds with antibacterial and antifungal potential. Proceedings of the 15th International Scientific and Practical Conference "Environment. Technology. Resources". Rezekne, Latvia, June 27 – June 28, 2024 (accepted for publication).

The contribution of the authors

No.	Original idea	Study design	Data collection	Data analysis	Manuscript preparation	Contribution of the author, %
I	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., V.N., N.Z., V.J., G.R.	**A.A.**, S.J., U.S.	**A.A.**, S.J., G.T., L.L., N.Z., G.R.	75
II	S.J., **A.A.**, G.T.	S.J., **A.A.**, G.T., L.L., J.K.	S.J., **A.A.**, L.L., N.Z., J.K.	S.J., **A.A.**, L.L.	S.J., **A.A.**	65
III	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., I.S., V.N., K.L., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., I.S., V.N., K.L., N.Z., G.R., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., V.N.	**A.A.**, S.J., L.L., V.N., N.Z., G.R., G.T.	60
IV	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., J.K., N.Z., V.N., G.R.	**A.A.**, S.J., L.L., J.K., N.Z., V.N.	**A.A.**, S.J., N.Z., J.K.	75
V	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., M.C., N.Z.	**A.A.**, S.J., L.L., N.Z., M.C., V.J., L.J., G.R.	**A.A.**, S.J., L.L., M.C., V.J.	**A.A.**, S.J., M.C.	75
VI	**A.A.**, S.J., G.T.	S.J., **A.A.**, L.L., G.T., A.R.-S., V.N.	S.J., **A.A.**, L.L., A.R.-S., V.N., N.Z., G.R., G.T.	**A.A.**, S.J.	**A.A.**, S.J., G.T., L.L., A.R.-S., V.N., N.Z., G.R.	70
VII	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., A.S.	**A.A.**, S.J., A.S., N.Z., G.R.	**A.A.**, S.J., A.S., N.Z.	**A.A.**, S.J., N.Z., G.T.	80
VIII	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., N.Z.	**A.A.**, S.J., N.Z., G.R.	**A.A.**, S.J., N.Z.	**A.A.**, S.J.	55
IX	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., N.Z.	**A.A.**, S.J., N.Z., G.R.	**A.A.**, S.J., N.Z.	**A.A.**, S.J., N.Z.	70
X	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., G.T.	**A.A.**, S.J., L.L., N.Z., M.S., A.R-S., G.R.	**A.A.**, S.J., L.L., A.R-S.	**A.A.**, S.J., G.R.	80
XI	S.J., **A.A.**, G.T.	S.J., **A.A.**, G.T.	S.J., **A.A.**, L.L., O.B., V.N., L.J., N.Z., G.T., M.S., G.R., A.R.-S. and J.K	S.J., **A.A.**, G.T.	S.J., **A.A.**, G.T.	70
XII	S.J., **A.A.**	S.J., **A.A.**	S.J., **A.A.**, L.L., N.Z., V.N.	S.J., **A.A.**, N.Z.	S.J., **A.A.**, N.Z.	55

A.A. – Anna Andersone, S.J. – Sarmite Janceva, G.T. – Galina Telysheva†, L.L. – Liga Lauberte, A.R.-S. – Anna Ramata-Stunda, V.N. – Vizma Nikolajeva, N.Z. – Natalija Zaharova, J.K. – Jelena Krasilnikova, M.C. – Mihail Chervenkov, A.S. – Agrita Svarta, I.S. – Ingus Skadins, K.L. - Konstantins Logviss, M.S. – Maris Senkovs, V.J. – Vilhelmine Jurkjane, O.B. – Oskars Bikovens, G.R. – Gints Rieksts.

A patent of the Republic of Latvia has been submitted (patent application No LVP2023000055, according to the law, it will be published on 20 December 2024).

The **structure of the Doctoral Thesis** is subordinated to the above-mentioned tasks. The thesis is structured in three chapters. The first chapter evaluates the potential of sea buckthorn wood-lignocellulose biomass as a source of oligomeric proanthocyanidins and serotonin, both in the form of an extract by determining the most suitable extraction method and extractant, and in an individual way by purifying them from impurities, developing the most suitable purification technique for target compounds. Focusing on polyphenols, the chemical composition of the obtained extracts has been determined and the target compounds have been isolated. In order to evaluate the possibilities of practical use of the obtained extracts and target compounds, their characterization has been performed in the second chapter by determining their cytotoxicity, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory activity, as well as the effect on the activity of digestive enzymes. In the third chapter, the potential of wood residue and leaves after extraction for the production of soil additive and feed additive is evaluated according to the concept of zero-waste use of sea buckthorn biomass. Finally, based on the obtained results, a flexible technological scheme for the full use of sea buckthorn biomass has been developed and recommended, depending on the range of consumers, demand and sea buckthorn growth region. Fig. 3 shows the possible directions of application of target compounds and extracts containing them.

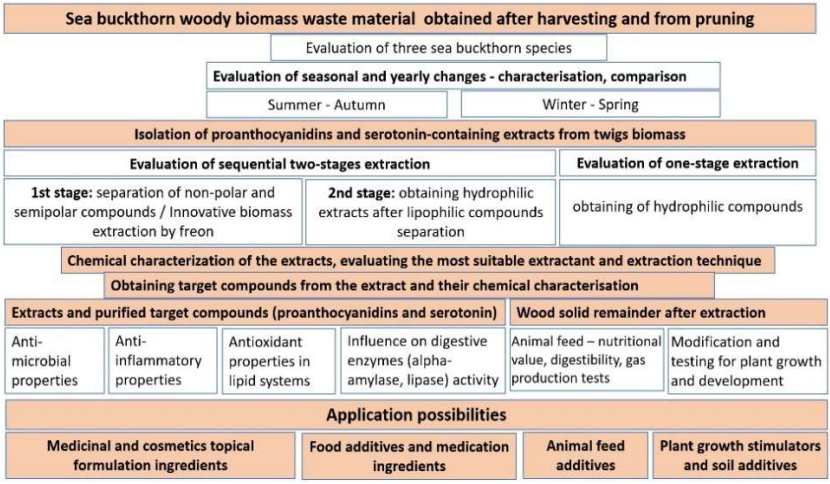


Fig. 3. **Research scheme and possible directions of application of target compounds**

MATERIALS AND METHODS

Sea buckthorn biomass samples were received from sea buckthorn grower "Bruwell" Ltd. (Table 1).

Table 1

List of samples analyzed

Designation of sample	Sea buckthorn variety	Type of sample	Season of sampling	Type of sampling
Wood samples				
MB/Z/2020/R	Maria Bruvele	Twigs	August – September	As a result of harvesting the fruit
MB/Z/2021/R				
MB/Z/2022/R				
MB/Z/2023/R				
BL/Z/2020/R	B. Lubitelskaya			
BL/Z/2021/R				
BL/Z/2022/R				
TAT/Z/2020/R	Tatiana			
TAT/Z/2021/R				
TAT/Z/2022/R				
MB/1Z/2021/P	Maria Bruvele	1-year-old twigs	March / August	As a result of fruit tree maintenance
MB/2Z/2021/P		2-year-old twigs		
MB/3Z/2021/P		3-year-old twigs		
MB/4Z/2021/P		4-year-old twigs		

Table 1 continued

Designation of sample	Sea buckthorn variety	Type of sample	Season of sampling	Type of sampling
Wood samples				
MB/1-2Z/2022	Maria Bruvele	A mixture of 1- and 2-year-old twigs	March / August	As a result of fruit tree maintenance
BL/1-2Z/2022	B. Lubitelskaya			
TAT/1-2Z/2022	Tatiana			
Bark from four-year-old twigs				
MB/M/2021/R	Maria Bruvele	Bark	August – September	As a result of debarking
BL/M/2021/R	B. Lubitelskaya			
Leaves samples				
MB/L/2020/R	Maria Bruvele	Leaves	August – September	As a result of harvesting the fruit
MB/L/2021/R				
MB/L/2022/R				
BL/L/2020/R	B. Lubitelskaya			
BL/L/2021/R				
BL/L/2022/R				
TAT/L/2020/R	Tatiana			
TAT/L/2021/R				
TAT/L/2022/R				

Autumn wood samples (twigs, leaves) were collected in the period from August 2020 to September 2023 as a result of fruit harvesting, cutting the twigs together with the berries according to the harvesting technology and separating them after freezing.

Spring wood samples were collected in March 2021 as a result of plant maintenance (pruning), obtaining four types of spring wood samples, that is, one-, two-, three- and four-year-old twigs.

In March 2022, as a result of plant maintenance, the **one-year-old and two-year-old twigs of three varieties** were collected in the form of a mixture
For comparison, the **bark** was obtained as a result of debarking four-year-old twigs in the autumn of 2021. All three varieties of sea buckthorn were grown in the Tukums Region in one plantation and in the same climatic conditions.

The **general chemical characterization** of the analysed samples as **lignocellulosic biomass** was performed using the analytical pyrolysis method (500 °C, 15 sec.) with the subsequent gas chromatography analysis of the volatile products. Frontier Lab (Fukushima, Japan) Micro Double-shot Pyrolyzer Py-3030D equipment and Shimadzu GC/MS/FID-QP ULTRA 2010 gas chromatograph were used for pyrolysis.

To assess sea buckthorn biomass as a **source of proanthocyanidins and serotonin**, dried and crushed sea buckthorn biomass samples were extracted in two ways. By applying sequential biomass extraction, sea buckthorn wood and leaves were separately treated with Freon for 3-4 hours in a closed system under

pressure of 4.0–4 .3 Bar and at a temperature of 17–19 °C. The separation of the freon fraction was followed by a 30-minute biomass extraction at ~60 °C with distilled water and ethanol-water mixtures.

By applying one-step biomass extraction, biomass was extracted with water and ethanol-water mixtures without pre-treatment of biomass with freon. All used solvents meet the requirements of green chemistry and can be used for the extraction of valuable compounds according to the quality control and extraction requirements of cosmetics, pharmaceuticals, and food products. The yield of the extracts was determined gravimetrically after their lyophilization at -50 °C and expressed as a percentage of dry wood, leaf, and bark samples.

The extracts obtained with freon were analysed by using a Shimadzu GC/MS/FID-QP ULTRA 2010 apparatus (Shimadzu, Kyoto, Japan) and a capillary column RTX-1701 (length 60 m, inner diameter 0.25 mm), layer thickness 0.25 µm). Compounds were identified using GC/MS library MS NIST 11 and NIST 11s, while the relative peak area of individual compounds was calculated using Shimadzu software based on GC/FID data.

Hydrophilic extracts were analysed by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) using different detectors, a light scattering detector for determining the total composition, a UV detector for characterizing polyphenolic compounds and a high-resolution mass spectrometer (quadrupole time of flight mass spectrometer (Q-TOF-MS), with an electrospray ionization (ESI) source) for identifying individual compounds, using Acquity UPLC BEH C18 (1.8 µm, 2.1 x 50 mm, Waters) column. Formic acid in water (0.1%, v/v) and acetonitrile were used as eluents.

Quantitative determination of proanthocyanidins in hydrophilic extracts was performed using the Porter method, using procyanidin dimer (procyanidin B2) as an analytical standard. **Quantitative determination of polyphenols** in the composition of hydrophilic extracts was carried out using the Folin-Ciocalteu method by applying gallic acid as an analytical standard. **Quantitative determination of serotonin** in the composition of the extracts was performed by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) method in tandem with the quadrupole time of flight mass spectrometer (Q-TOF-MS), with an electrospray ionization (ESI) source. Serotonin was identified and quantified by using an analytical standard with Mw=176.22 g moL^{-1}. In the positive electrospray ionization mode, serotonin was protonated by forming ions in the form $[M+H]^+$, with m/z 177. Based on the detected fragmentation of serotonin, a multiple reaction monitoring mode was developed for the specific m/z transitions 177→160 (the most intense fragmentation ion), 177→132, and 177→115.

Isolation of the target compounds from hydrophilic extracts was carried out gradually, starting with the isolation of proanthocyanidins from the extract, using the sorbent Sephadex LH-20, 96% EtOH and 70% acetone as eluent. After the separation of proanthocyanidins, the serotonin-containing fraction was purified

according to a patented method (patent application No LVP2023000055 will be published on 20 December 2024 according to the law).

Characterization of the isolated proanthocyanidins was performed by LC-DAD-ESI-MS/MS analysis. MS spectra of proanthocyanidins were recorded on a Waters Acquity UPLC HClass with a PDA detector and a Micromass QuattroMicro mass spectrometer using an Acquity UPLC BEH amide column (1.7 µm, 3.0 × 100 mm).

Two methods were used to determine the **antioxidant activity of the analysed samples**, which were based on the principle of reduction, using stable free radicals as indicators of antioxidant activity: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals ($DPPH^{\bullet}$) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid ($ABTS^{+\bullet}$) cation radicals. The antioxidant activity of the samples was determined by calculating the IC_{50} value - the mass concentration of antioxidants, which is necessary to achieve 50% inhibition of free radicals.

In order to evaluate the ability of the samples to delay lipid oxidation, two cream bases with different lipid content (19% and 35%) that did not contain preservatives, stabilizers and antioxidants were used for the analysis. ML OXIPRES (Mikrolab Aarhus) equipment was used to determine the oxidation stability of lipid-containing products. Time-depending changes in pressure were registered with the help of the computer program "Paralog-Version 3.10". Gallic acid and ascorbic acid were used as reference antioxidants in the research.

Antimicrobial activity analyses were performed *in vitro* at the Faculty of Biology of the University of Latvia, and Riga Stradiņš University, based on European standard protocols. The antimicrobial activity of the samples was determined using the disk diffusion and agar well method (in 96-well plates with two-fold serial broth microdilution), developed in 1940 for routine antimicrobial sensitivity testing, and allowed the determination of minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC). Reference microbial strains from the collection of Latvian Microbial Strains (MSCL) of the University of Latvia were used: *Pseudomonas aeruginosa* MSCL 334*, Staphylococcus aureus* MSCL 330*, Escherichia coli* MSCL 332*, Bacillus cereus* MSCL 330*, Streptococcus pyogenes* MSCL 620*, Cutibacterium acnes* MSCL 1521 and *Candida albicans* MSCL 378, as well as clinical/human origin bacterial isolates: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* (ESBL), and *Pseudomonas aeruginosa.* All clinical isolates were obtained with approval from the Ethics Committee of Riga Stradiņš University (25.10.2022, No. 4/462/2022 and No. 4/465/2022).

The anti-inflammatory activity of the samples was determined using human peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) isolated from blood of healthy donors with the approval of the Research Ethics Committee of the Institute of Cardiology and Regenerative Medicine of the University of Latvia. The concentration of IL-8 or IL-6 secreted by peripheral blood mononuclear cells

into the culture medium was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Human IL-8 DuoSet ELISA kits (RnD Systems, Minneapolis, USA) were used according to the manufacturer's recommendations.

***In vitro* analyses** to determine the effect of samples on **digestive enzyme activity** were performed at the Riga Stradins University, based on European standard protocols. The effect of the samples **on alpha-amylase activity** was determined in the saliva of donors without chronic or acute diseases, characterized as amyloclastic force (D 30/38 °C). Saliva without sample was used for comparison.

The effect of the samples **on lipase activity** was determined using a standard model of the **duodenal** digestion phase by determining the required amount of NaOH for triglyceride hydrolysis.

A **hemolysis test** was performed to assess the effect of the analyzed samples on human blood erythrocytes. The hemolytic ratio (HR, %) was calculated as described in publication VI.

The cytotoxicity of the analysed samples was tested using the NR (neural red) uptake assay on BALB/C3T3 murine fibroblast cell line. Balb/c 3T3 (American Type Culture Collection, ATCC, USA) cell line was derived from mouse embryonic fibroblasts. Cells were cultured in 96-well cell culture plates at a density of 5×10^3 cells per well. Cytotoxicity is expressed as a decrease in NR absorbance depending on the concentration of the analysed samples compared to untreated cells (control). Absorbance was measured using a Tecan Infinite® 200 Pro microplate reader. The results were calculated using GraphPad 9 software. The cell line and assay method conform to OECD guidelines.

Following the concept of a biorefinery, the perspective of using wood residue after extraction and leaves has been evaluated. Based on the diversity of regional demand and logistics solutions, a flexible technological scheme has been developed and proposed to sea buckthorn growers by offering a range of produced products.

Elemental analysis of the samples determining the total carbon, nitrogen and sulphur content was carried out by using the ELEMENTAR Vario MACRO equipment. The content of nutrients (calcium, potassium, sodium, phosphorus) and heavy metals (cadmium, lead, mercury) in biomass was determined according to the developed RSU procedure by applying an inductively coupled plasma triple quadrupole mass spectrometer ICP-MS/ MS, iCAP TQe.

The content of ascorbic acid (vitamin C) in biomass was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) method by using HPLC-UV-Vis/-RI (high-performance liquid chromatograph with UV-Vis and RI detector) and a Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent, 5 µm, 150 cm x 0.46 cm i.d.) column. The following eluents were used: A - trifluoroacetic acid (0.025% v/v) (A) and B - acetonitrile. The results were converted to biomass taking into account the extract yield from biomass.

The content of vitamin E as α-tocopherol and vitamin A as retinol in biomass was determined by applying an HPLC-UV-Vis/-RI system and a Hichrom 5 C18 (i.d. 25 cm x 4.6 mm) column. Methanol was used as the mobile phase with a flow rate of 2 mL min^{-1}. Sample solutions were prepared by dissolving the extract in methanol. The results were converted to biomass taking into account the extract yield from biomass.

Determination of total fat in the samples was carried out by using a 30-minute extraction of the samples with hexane. Total fat yield from biomass was determined gravimetrically.

The content of **acid detergent fibre** (ADF) in the analysed samples was determined gravimetrically by acid hydrolysis with sulfuric acid (1.25%, w/v) for the separation of carbohydrates, followed by alkaline hydrolysis with NaOH (1.25%, w/v) for the separation of proteins, partly hemicellulose and lignin.

Crude protein (CP) content in the analysed samples was determined using the Kjeldahl method, and the determined amount of nitrogen (N) was multiplied by a factor of 6.25 (N% × 6.25 = CP%/dry matter). The determined crude protein contained both protein and other nitrogen-containing substances.

ANKOM RF gas production system was used for ***in vitro* gas emission (GE) determination**. The analysis was based on the relationship between fermentation in the rumen and the gases produced. Ruminal fluid was collected from ruminants in a slaughterhouse. Gas emission expressed in mL g^{-1} of incubated sample. Gas pressure changes during 24 and 48 hours of fermentation were accumulated (ΔP) and converted to volume units using the ideal gas law as described in publication V.

Ankom Daisy incubator was used to evaluate **digestibility**. The Daisy Incubator is a 4-cylinder incubator where one cylinder requires 1600 mL of buffer solution and 400 mL of rumen fluid as inoculum. Digestibility was calculated as described in publication V.

Biomass pelleting was performed using a laboratory-scale flat die granulator KAHL 14-175, which is a small-scale analogue of industrial granulators (Amandus Kahl GmbH & Co. KG, Reinbek, Germany). For pelleting, the tube channel diameter was 6 mm and the channel length to diameter ratio was 4:1. Pelleting start temperature was 50°C. To assess the quality of the obtained pellets, the main parameters characterizing the quality of the pellets (diameter, length, moisture, mechanical strength - wear resistance and bulk density) were compared in accordance with the European standards EN ISO 17831-1:2015 [58] and ISO 17828 [59]. Swelling of pellets in water was determined visually.

For the **obtaining of soil additive**, hydrolysis lignin and wood residue after extraction were mixed in a mass ratio of 1:1 (w/w), with the subsequent addition of a Si-containing component, that is, diatomite in the form of a suspension. The content of Si in the substrate was 5%/dry matter.

The soil additive was chemically characterized by determining moisture [60], dry matter content [60], pH [67], organic matter content [61], lignin content

(Klason method), total nitrogen (N) content [62], total phosphorus (P_2O_5) [63], total potassium (K_2O) [64], mercury [65], cadmium [66], and arsenic [64] content.

Field trials were set up in Skriveri, in the organic fields of the LBTU Institute of Agriculture. Summer wheat variety 'Vinjet' and potatoes 'Imanta' were cultivated. Location: 56º 69.4280` N and 25º 13.826` E. Field trials for summer wheat were arranged in four replications. The size of the registration plot was 22.5 m^2 (2.5 m x 9 m). Three variants in the trial:

1) Control - without the soil additive used;
2) Soil additive 20 kg ha^{-1};
3) Soil additive 40 kg ha^{-1}.

To evaluate the effect of the soil additive, the yield difference among the trial variants was determined for wheat and the yield quality indicators were determined: crude protein, gluten and starch content, Zeleny index, volumetric weight using the Infratec™ NOVA analyser (Denmark). The formation of structural elements of the harvest (number of productive stems, weight of one ear, number of grains in one ear, thousand grain weight or seed index) was determined gravimetrically. The thousand grain weight was determined by the standard method LVS EN ISO 520.

For potatoes, the field trials were arranged in four repetitions. The size of the registration field was 12.6 m2 (2.8 m x 9 m). In the field, there were four furrows with a distance of 70 cm, the feeding area of one plant was 0.21 m^2. Three variants were tested in the trial:

1) Control - without the soil additive used;
2) Soil additive 20 kg ha^{-1};
3) Soil additive 40 kg ha^{-1}.

In the experiment, the yield difference among the variants, the quality of the harvest (starch content %), the product yield, the distribution of tubers by fractions, the weight of one tuber were determined in the test. The trials were set up in peat-podzolized, superficially silty loam soil, soil with the following agrochemical parameters: pH 5.6, organic matter content 2.7%, the amount of phosphorus available to plants 105 mg kg^{-1} (low) and the amount of potassium 201 mg kg^{-1} (high).

Statistical analysis

All measurements were performed at least in triplicate, and results are presented as mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using the Microsoft Excel 2016 program. Average confidence intervals using the Student's T distribution were calculated at the significance level $\alpha=0.05$. To quantify IL-8 and IL-6 release from human PBMNCs, data were analysed and graphs were generated using GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, CA, USA). ANOVA test was used to compare sample groups. Differences were considered statistically significant at $p<0.01$ and $p<0.05$ (respective level marked in figures (as described in Publication VI). In field trial experiments, the analysis of variance by R-studio was used for statistical analysis of the experimental data. Bonferroni test was used for the comparison of means at $p<0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Characterization of sea buckthorn biomass

Sea buckthorn twigs form wood mixed with bark. The bark content in the wood sample was variable and comprised ~8-20% of the total twig mass. The bark is one of the excellent raw materials for the extraction of biologically active compounds, therefore the twigs were not peeled and were used as a whole part of the wood (hereinafter referred to as wood or twigs). The chemical composition of wood depends both on the tree species and variety, but also on the age of the tree, growing conditions and other factors. The components that make up wood are cellulose, hemicelluloses, lignin and extractives (secondary metabolites). Based on this basic composition, it is referred to as lignocellulosic biomass. Based on analytical pyrolysis data, the twigs largest part consists of cellulose and hemicellulose = 70% rel/DM, followed by lignin, its content being confirmed by syringyl, guaiacyl derivatives, 20-25% rel/DM. Volatile products of twigs and leaves also contain polyphenols and N-containing compounds, which indicate the presence of secondary metabolites and the high potential of wood as a raw material for the obtaining of biologically active compounds, that is, proanthocyanidins and serotonin. The volatile products of sea buckthorn twigs and leaves and their relative contents are shown in Fig. 4 and in Publication I.

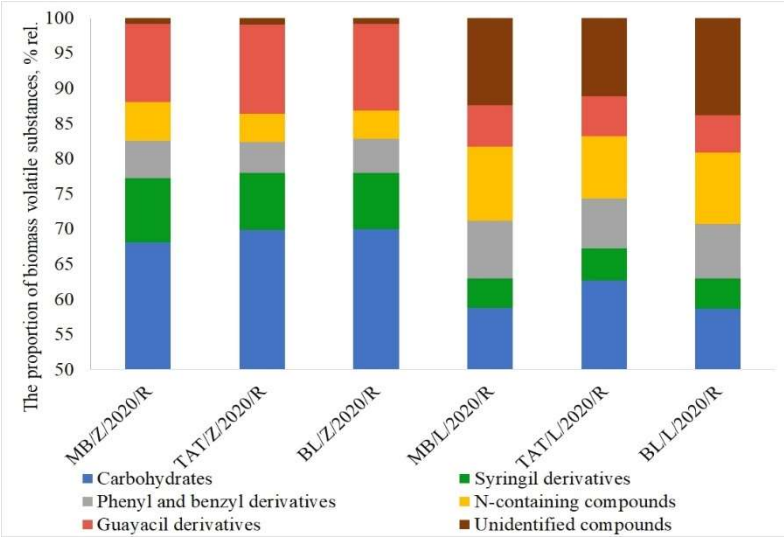


Fig. 4. **Volatile products of sea buckthorn biomass analytical pyrolysis (Py-GC-MS-FID) and their relative content, %**

2. The potential of sea buckthorn biomass as a source of biologically active substances

To determine the most effective extractant for obtaining the target compounds, a one-step extraction was performed under laboratory conditions at the recommended extraction parameters, using the results obtained in previous experiments as a basis, which included the mass ratio of biomass and extractant 1:8 (w:w), extraction temperature 60 °C and time 30 minutes. In one-step extraction of twigs, the yield of isolated extracts ranged from 6 to 30%/DM. The highest content of target compounds (proanthocyanidins and serotonin) was found in sea buckthorn twigs extracts obtained with 50% EtOH solution (Fig. 5). When comparing the biomasses of three varieties according to the content of target compounds in extracts and biomass, the most promising variety was *Maria Bruvele.*

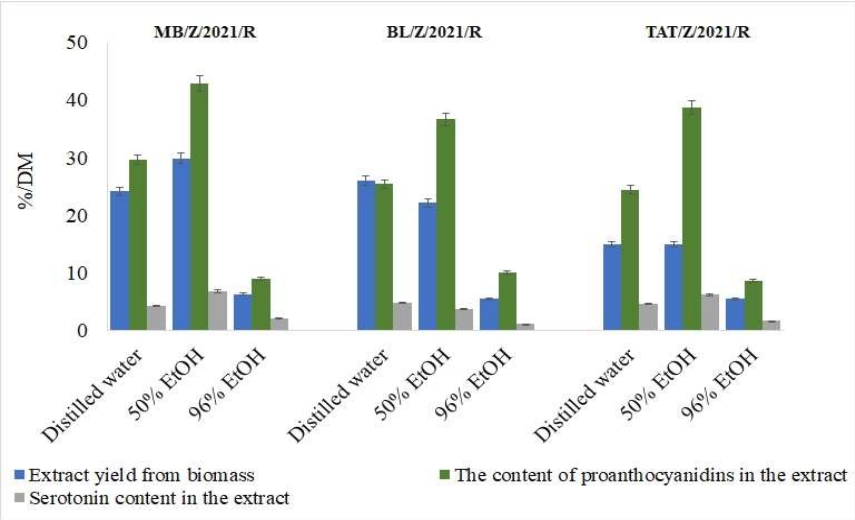


Fig. 5. **Characterization of wood and hydrophilic extracts of three varieties of sea buckthorn**

Despite the high yield of the leaf extract, no proanthocyanidins were detected in the extract. Serotonin content in leaf extracts was lower than 0.1%/DM (publication II). This shows that for more efficient extraction of the target compounds and to increase the yield it is necessary to separate the leaves from the twigs. The separated leaves were evaluated for the obtaining of preservatives and feed additives (publication V).

Increasingly, people are looking for food and cosmetic products with the label "preservative-free". But the main role of preservatives is to prevent the germination of bacteria, fungi, yeasts and other pathogenic microorganisms, preventing the possibility of infection in the production and use of cosmetics. Most cosmetics bases are an emulsion of oil and water, which are good conditions for the reproduction of pathogenic microorganisms. In addition, lipid-containing products are subject to oxidation during processing and storage, as a result of which toxic compounds accumulate, which both deteriorate the properties of the products and can also cause long-term skin damage and endanger human health. Considering the above, 2-phase herbal preservatives - lipophilic and hydrophilic - would be useful for the safe protection of lipid-containing products. For the extraction of lipophilic extracts, the aforementioned one-step extraction cycle was supplemented with the additional step – biomass treatment with freon R134a (publication IV, patent). Currently, freon is considered one of the gentlest extractants for extracting lipophilic substances from plant biomass. Biomass treatment with freon (Fig. 6) was performed for both twigs and leaves. Compared to hydrophilic extracts, the contents of lipophilic extracts ranged from 1.1 to 1.6%/DM in twigs and 2.7 to 3.4%/DM in

leaves. By continuing the extraction of twigs residues with 50% EtOH as the most suitable extractant for the extraction of hydrophilic target compounds, no significant changes in the composition of hydrophilic extracts were observed. Based on these observations, hydrophilic extracts from twigs and lipophilic extracts from leaves were used for further research from the obtained extract samples.

Fig. 6. **Obtaining of lipophilic extracts from sea buckthorn leaves, extraction by freon**

Based on GC analysis data, one of the main components of lipophilic extracts is fatty acids. It is the fatty acid composition of lipids that largely determines their nutritional value and biological effectiveness. Identifying >90% of the components revealed the predominance of linolenic acid and palmitoleic acid in the fatty acid composition of the extract. According to literature sources, the use of these acids in creams is important for dry and cracked skin, reducing itching, irritation, increasing elasticity and hydration.

In order to evaluate the influence of the age of twigs on the content of target compounds, one-year, two-year, three-year and four-year branches were collected in the spring. When performing one-step extraction, the extraction data (Table 2) showed that the highest content of proanthocyanidins was in the three- and four-year-old branches, while the serotonin content was highest in the one- and two-year-old branches. Since the yield of extracts and the content of target compounds in the extracts obtained with 96% EtOH were the lowest, this extractant was no longer used in further studies.

Table 2

Comparative chemical characterization of extracts obtained from a homogeneous mixture of branches of different growth ages

Samples of the Maria Bruvele variety	Extract yield, %/DM	The content of proanthocyanidins in the extract, %/DM	The content of serotonin in the extract, %/DM
	Extraction with distilled water		
MB/1Z/2021/P	11.96±0.01	21.88±0.03	11.21±0.02
MB/2Z/2021/P	12.57±0.02	20.95±0.02	14.62±0.03
MB/3Z/2021/P	15.87±0.02	23.02±0.03	11.08±0.02
MB/4Z/2021/P	8.53±0.02	26.92±0.03	7.91±0.01
	Extraction with 50% EtOH		
MB/1Z/2021/P	22.23±0.02	40.56±0.01	10.53±0.03
MB/2Z/2021/P	19.61±0.01	51.94±0.02	14.85±0.03
MB/3Z/2021/P	17.25±0.01	57.03±0.02	9.88±0.02
MB/4Z/2021/P	8.56±0.02	57.31±0.02	9.97±0.01
	Extraction with 96%EtOH		
MB/1Z/2021/P	15.65±0.01	6.08±0.02	2.8±0.02
MB/2Z/2021/P	11.83±0.02	6.12±0.02	2.7±0.01
MB/3Z/2021/P	10.89±0.01	9.71±0.01	2.2±0.01
MB/4Z/2021/P	6.26±0.01	11.14±0.02	2.4±0.01

In order to evaluate the optimal sea buckthorn pruning time and seasonal differences in biomass composition, one- and two-years old branches were collected from the same plantation in spring and autumn. Analyzing the composition of the extracts obtained in one-step extraction, the results show that the branches collected in autumn were richer in both serotonin and proanthocyanidin content and, therefore, are the most suitable raw material for the extraction of target compounds (Table 3).

Table 3

Seasonal differences in extracts obtained from a mixture of 1- and 2-year-old branches

Sea buckthorn variety	Extract yield, %/DM	The content of proanthocyanidins in the extract, %/DM	The content of serotonin in the extract, %/DM
	Extraction with distilled water		
	Spring / Autumn	Spring / Autumn	Spring / Autumn
MB/1-2Z/2022	12.1 / 15.7	21.1/ 41.3	13.0 /13.7
BL/1-2Z/2022	10.2 / 19.4	21.5/ 41.8	11.0 / 11.6
TAT/1-2Z/2022	10.1 / 19.4	24.7 / 56.1	9.5 / 10.3

Table 3 continued

Sea buckthorn variety	Extract yield, %/DM	The content of proanthocyanidins in the extract, %/DM	The content of serotonin in the extract, %/DM
	Extraction with 50% EtOH		
	Spring / Autumn	Spring / Autumn	Spring / Autumn
MB/1-2Z/2022	20.2 / 26.4	50.0 / 52.9	12.8 / 14.0
BL/1-2Z/2022	18.1 / 24.0	48.2 / 64.2	11.0 / 12.6
TAT/1-2Z/2022	18.7 / 24.1	42.2 / 64.1	8.3 / 10.6

In the period from 2020 to 2023, target compounds were screened in the branches obtained as a result of berry harvesting for the variety 'Maria Bruvele'. During the last three years, the content of target compounds was similar, indicating the high raw material potential of these branches (Fig. 7).

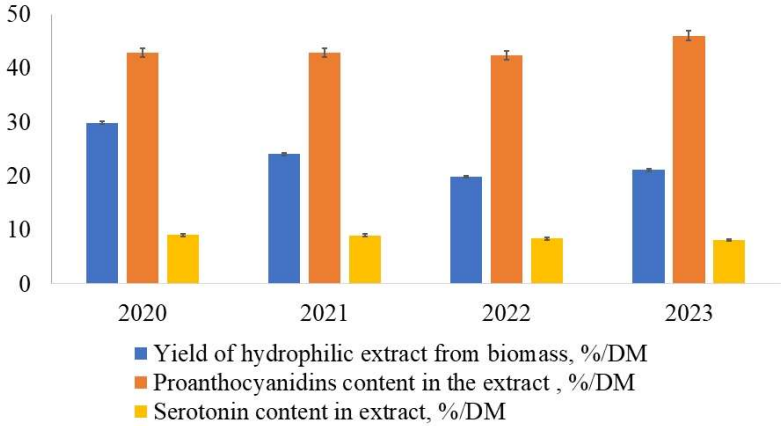


Fig. 7. **Screening of sea buckthorn branches obtained as a residue from berry harvesting, as a source of target compounds in the period from 2020 to 2023**

3. Isolation of proanthocyanidins and serotonin

The highest content of serotonin and proanthocyanidins was determined in the composition of sea buckthorn bark, which allows obtaining 26 g of dry extract with 14% serotonin and 53% proanthocyanidins content from 100 g of bark. But peeling sea buckthorn branches is not an economically reasonable solution, so the most suitable raw material from the analyzed samples is unpeeled 1- and 2-years-old branches. Serotonin purification is performed sequentially, starting with the isolation of proanthocyanidins from the extract using Sephadex LH-20. Extraction of proanthocyanidins allowed to double the serotonin content in the extracts. Continuing the purification of serotonin according to the patented

method, low molecular weight polyphenols and their glycosides are partially separated, increasing the serotonin content to 28.2%/DM.
After separation of the proanthocyanidins from the extract, they were chemically characterized by determining their composition and purity by Porter's method. The obtained data (Fig. 8) show that the proanthocyanidins isolated from extracts of 'Maria Bruvele' cultivar with 50% EtOH and water consist of catechin/epicatechin dimers (m/z 575) and trimers (m/z 865). Catechin/epicatechin tetramers and pentamers were found at impurity level.

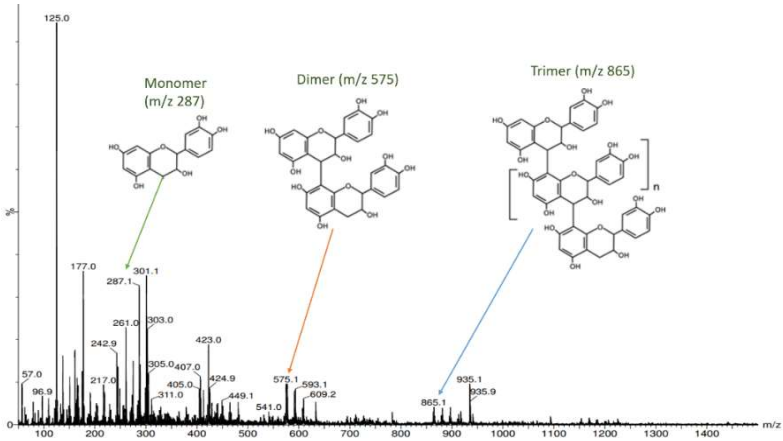


Fig. 8. **MS spectrum of proanthocyanidins isolated from the 50% EtOH extract of Maria Bruvele**

4. Antioxidant activity

By mutually comparing the antioxidant activity of hydrophilic extracts of branches, a relationship was observed between the content of proanthocyanidins in the extract and their antioxidant activity - as the content of proanthocyanidins in the extract increases, the activity of radical deactivation increases in the $ABTS^{+\bullet}$ and $DFPH^{\bullet}$ tests (Fig. 9). Among the studied extracts, 50% EtOH extracts showed the highest antioxidant activity compared to water extracts (the content of proanthocyanidins in the extract was 42.45%/DM; IC_{50}=6.18 mg L^{-1} using $DFPH^{\bullet}$; IC_{50}= 4.4 mg L^{-1} using $ABTS^{+\bullet}$). The antioxidant activity of proanthocyanidins from MB/Z/2021/R and BL/Z/2021/R ranged from 1.2 to 1.4 mg L^{-1} by $ABTS^{+\bullet}$ assay and from 2.2 to 2 .6 mg L^{-1} by the $DFPH^{\bullet}$ test, which is significantly higher than of the extracts. Trolox was used as a reference antioxidant, which is a water-soluble analog of vitamin E. As for freon extract, their antioxidant activity was weak, >30 mg L^{-1}.

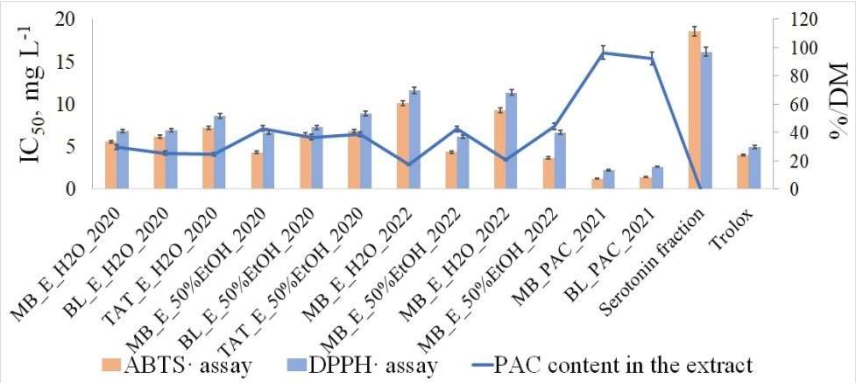


Fig. 9. **Antioxidant activity of analyzed samples. A lower IC_{50} value corresponds to a higher antioxidant activity**

In order to evaluate the ability of the analyzed samples to delay oxidation in lipid-containing products, the analyzed samples were added to the substrates of cosmetic creams with different lipid content – 19% and 35%. The studied samples were tested at concentrations from 0.5 to 4% of the lipid content (LC) in the substrate composition. The Oxipress method was used to perform these analyses. The protection factor of the analyzed samples is given in Figures 10 and 11. Comparing the analyzed samples with reference materials at the same concentration in the substrate (1%/LC), it can be concluded that the 50% EtOH extract acts more effectively than the reference samples, proanthocyanidins and water extract. Despite the high antioxidant activity of proanthocyanidins, the protection factor in the substrate oxidation test was lower than the one of the 50% EtOH extract. This is probably due to the limited solubility of proanthocyanidins in the substrate.

When comparing the effects of grinded branches and leaves at a concentration of 1%/LC, leaves with a wide range of low molecular weight polyphenols were equivalent to the results of the water extract. Freon extract at a concentration of 1%/LC was equivalent to the effect of gallic acid, showing a low protection factor. Increasing the freon extract concentration to 2%/LC, the inhibition of lipid oxidation was equivalent to that of leaf biomass, indicating that freon extraction of leaf biomass is not necessary to inhibit oxidation in lipid-containing products.

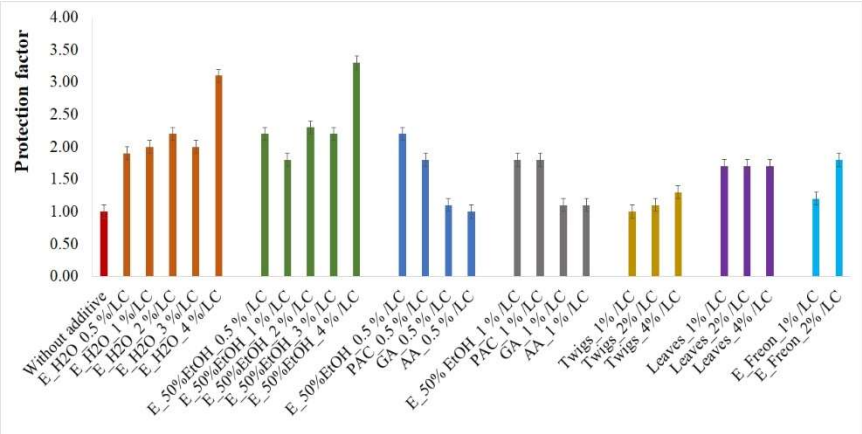


Fig. 10. **Effect of analyzed samples in inhibition of lipid oxidation, using the cream with 35% lipid content as a substrate**

E_H20 – extract obtained with distilled water from MB/Z/2021/R; 50%_EtOH – extract obtained with 50% EtOH from MB/Z/2021/R; E_Freon – extract obtained by freon extarction from MB/L/2021/R; PAC - proanthocyanidins isolated from the extract; GA – gallic acid; AA – ascorbic acid; LC – lipid content

When the analyzed samples were introduced into a substrate with a lower fat content, the activity of the extracts was more effective. Comparing the effect of the water extract at a concentration of 1%/LC, in a substrate with 19% lipid content the protection factor was 1.5 times higher, and a similar trend was also observed for the 50% EtOH extract. The efficiency of the other analyzed samples was lower than that of water and 50% EtOH extract.

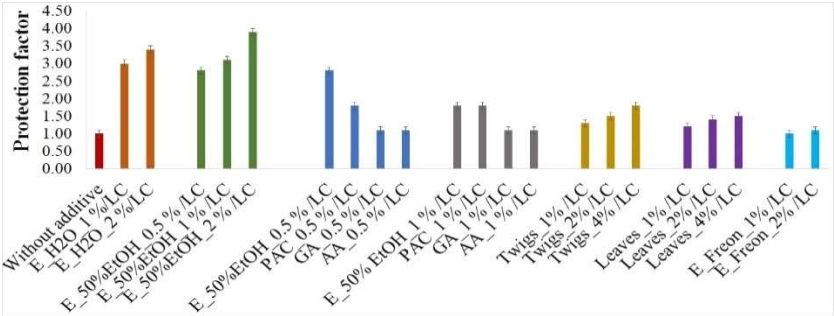


Fig. 11. **Effect of analyzed samples in inhibition of lipid oxidation, using cream with 19% lipid content as a substrate**

E_H20 – extract obtained with distilled water from MB/Z/2021/R; 50%_EtOH – extract obtained with 50% EtOH from MB/Z/2021/R; E_Freon – extract obtained by freon extarction from MB/L/2021/R; PAC - proanthocyanidins isolated from the extract; GA – gallic acid; AA – ascorbic acid; LC – lipid content

5. Antimicrobial activity

Another important problem nowadays is bacteria resistance against antibiotics and fungi resistance against synthetic antifungal antimicrobials. In order to reduce and rationalize the use of antibiotics and synthetic fungicides, which is one of the main priorities of the EU, and the side effects associated with them, the work determined the relationship between the content of proanthocyanidins in the extract and their antimicrobial and anti-inflammatory activity.

The antimicrobial activity of the extracts and target compounds was tested against bacteria *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* and the fungus *C. albicans* by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC). *E. coli* bacteria normally live in the intestines of healthy people and animals. Most types of *E. coli* are harmless, but some strains, such as *E. coli O157:H7*, can cause severe stomach cramps and vomiting. *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes serious infections in immunocompromised patients, cancer patients, and patients with severe burns and cystic fibrosis [68]. *Staphylococcus aureus* is a commensal organism that lives in the skin and mucous membranes. Mild to life-threatening sepsis can occur if this microorganism enters the human body. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is estimated to cause approximately 171,200 healthcare-associated infections in Europe each year and is associated with 5,400 additional deaths. *Bacillus cereus* is a type of bacteria that produces dangerous toxins when transmitted through contaminated food. It mainly affects the food that has been stored at room temperature for a long time after cooking and therefore not cooled quickly and efficiently. *C. albicans* is an opportunistic fungal pathogen that is part of the human gastrointestinal flora, but *C. albicans* is able to colonize almost all human tissues and organs, causing serious invasive infections [69].

All studied extracts have antimicrobial activity. Regarding *E. coli*, the 50% EtOH extract with a total polyphenol content of 48.1 g GAE·100 g^{-1} DM was the most effective among the extracts. The water extract with low polyphenol content (33.2 g GAE·100 g^{-1} DM) showed the lowest efficiency. A similar trend has been observed against the bacteria *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The antimicrobial activity of the extracts against *B. cereus* and *C. albicans* was weaker, observing only the inhibitory activity of the extracts against the growth of *B. cereus* and *C. albicans* (Table 4).

Table 4

Antimicrobial activity of extracts of three varieties of sea buckthorn

Sea buckthorn variety, year 2020 samples	Content of total polyphenols in the extract, g GAE·100 g^{-1} DM	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*B. cereus*	*C. albicans*
		MIC/MFC or MBC, mg mL^{-1}				
Extracts, obtained by distilled water						
MB/Z/2020/R	43.62±0.03	0.39/0.39	0.39/3.13	0.39/0.78	0.78/>50	0.39/>50
BL/Z/2020/R	33.20±0.02	0.78/50	0.78/50	0.39/12.2	0.78/>50	0.39/>50
TAT/Z/2020/R	35.14±0.04	0.39/0.39	0.78/1.56	0.39/0.78	0.78/50	0.39/>50
Extracts, obtained by 50% EtOH						
MB/Z/2020/R	48.12±0.02	0.20/0.20	0.39/0.78	0.20/0.39	0.39/50	0.20/>50
BL/Z/2020/R	43.78±0.02	0.39/0.39	0.78/1.56	0.39/0.78	0.78/>50	0.20/>50
TAT/Z/2020/R	41.36±0.03	0.39/0.39	3.13/3.13	0.20/0.78	0.78/50	0.39/>50

Equivalent studies have been conducted with extracts and target compounds obtained from branches harvested in 2021. Compared to extracts, proanthocyanidins were many times more effective against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. pyogenes*. Of all the samples at the given concentrations, none showed the minimum fungicidal concentration in relation to the fungus *C. albicans* (Table 6).

For the serotonin-containing fraction, antimicrobial activity against *S. pyogenes* and *C. acnes* was determined (Publication I). Based on the literature, *S. pyogenes* causes a variety of acute infections such as soft tissue infections and pharyngitis, as well as severe life-threatening infections such as streptococcal toxic shock syndrome and devastating post-infectious sequelae such as rheumatic fever and glomerulonephritis [70]. The second pathogen, *C. acnes*, is a relatively slow-growing, usually aerotolerant, anaerobic gram-positive bacterium associated with the skin condition acne. This pathogen can also cause chronic blepharitis and endophthalmitis [71], [72]. All samples, including serotonin and serotonin standard (reference sample), were effective in killing both pathogens. Freon extract from leaves had lower antimicrobial activity compared to other extracts (Table 5).

Table 5

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal or fungicidal concentration (MBC/MFC) of samples

Sample; PAC content in the extract	***E. coli***	***P. aeruginosa***	***S. aureus***	***B. cereus***	***C. albicans***	***S. pyogenes***	***C. acnes***
	MIC/MFC or MBC, mg mL^{-1}						
Water extract from MB/Z/2021; 29.6%/DM	0.39/0.39	0.39/3.13	0.39/0.78	0.78/>50	0.39/ >50	0.20/0.20	0.78/0.78
50% EtOH extract from MB/Z/2021; 42.9%/SM	0.20/0.20	0.39/0.78	0.20/0.39	0.39/50	0.20/ >50	0.20/0.20	0.39/0.39
PAC from MB/Z/2021; 92.1%/DM	0.04/0.04	0.08/0.16	0.08/0.16	0.63/1.25	1.25/ >2.5	0.10/0.10	0.39/0.39
Serotonin-containing fraction (serotonin content = 28.2%/DM)	0.78/0.78	0.78/0.78	0.39/0.78	0.78/6.25	12.50/ >50	0.10/0.20	0.39/0.39
Freon extraction from leaves	0.78/50	0.78/50	0.39/12.2	3.13/25			
Serotonin standard (purity ≥98.0%)						0.10/0.20	0.39/0.78

Biofilms formed by different species of bacteria show increased resistance to antibiotics and disinfectants, often causing chronic inflammatory processes. Since there are practically no means for combating bacterial films, within the framework of the doctoral thesis, the effect of the dominant samples – proanthocyanidins and 50% EtOH extracts - on MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), ESBL (extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli*) and *P. aeruginosa* biofilm formation was evaluated (Fig. 12, Publication III).

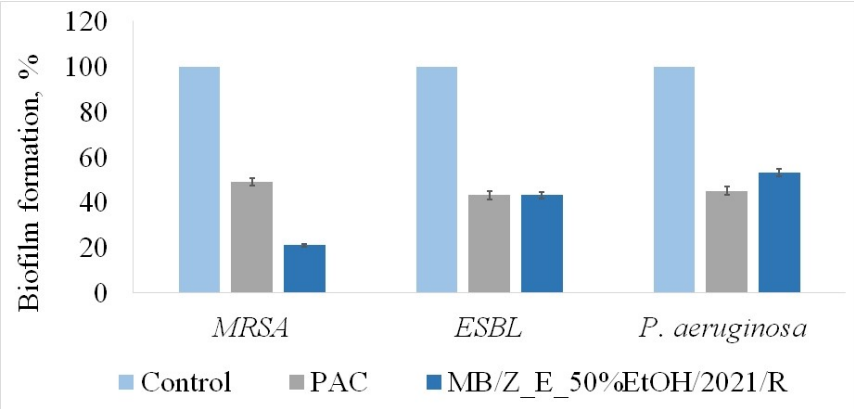


Fig. 12. **The effect of the analyzed preparations on biofilm formation:** MRSA – *S. aureus*; ESBL - *E. coli*; PAC – proanthocyanidins; MB/Z_E_50% EtOH/2021/R - extract obtained with 50% EtOH from MB/Z/2021/R

Compared to the control (100% formed film), in the presence of proanthocyanidins, film formation was 2 times lower. The effect of the extract was similar, except for the MRSA-based biofilm, which had a 5-fold reduction in the percentage of formation. Based on the research results, proanthocyanidins and extracts at a concentration of 5 mg mL^{-1} are able to inhibit biofilm formation and can be used in wound healing therapy.

6. Anti-inflammatory activity

Inflammation is the body's response to injury and infection, and is necessary to overcome these ailments. Inflammation in the body is indicated by the presence of various markers (biochemical signal elements - cytokines) in the blood. One of the key cytokines is interleukin IL-8, which is released from several cell types in response to inflammation [73]. Another cytokine – IL-6 is released by white blood cells in response to injury or microbial exposure, it also plays a key role in the neuronal response to nerve damage [74]. Evidence has emerged that IL-6 can be used as an inflammatory marker for severe COVID-19 infection [75]. According to the obtained data, only proanthocyanidins at a concentration of 0.5 mg mL^{-1} reduced IL-8 secretion from unstimulated human peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs). On the other hand, in the presence of polyinosinic acid: polycytidylic acid (poly I:C), which mimics the inflammation associated with viral infections, all samples of *Maria Bruvele* (proanthocyanidins, 50% EtOH extract and water extract) reduced the secretion of IL-8 from the cells, indicating the ability to reduce viral infections associated inflammation (Fig. 13, Publication VI).

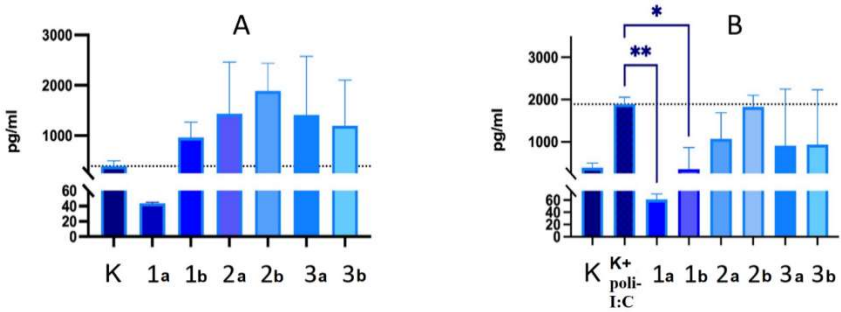


Fig.13. **Changes in IL-8 secretion from unstimulated (A) and poly-I:C-stimulated (B) human peripheral blood mononuclear cells after 24 h incubation with analyzed samples**: 1—PAC, 2—50% EtOH extract from MB/Z/2021/R, 3 – water extract from MB/Z/2021/R. K- control, K+poli-I:C – control+Poli-I:C, a – concentration 0.5 mg mL^{-1}, b – 0.25 mg mL^{-1}; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ one-way ANOVA, n = 3.

A similar situation was also observed in studies with interleukin IL-6. Without poly I:C stimulation after incubation in the presence of samples, no increase in IL-6 secretion was observed, but when PBMNCs were added to the sample and poly I:C simultaneously, proanthocyanidins and 50% EtOH extract were observed to significantly decrease IL-6 secretion.

In the presence of proanthocyanidins, IL-6 secretion was reduced to unstimulated control levels, and no differences were observed between the two tested concentrations. For 50% EtOH extracts, the inhibitory effect was concentration-dependent: 0.5 mg mL^{-1} reduced IL-6 secretion by 95.43%, while 0.25 mg mL^{-1} reduced it by 63.75%. Aqueous extracts did not reduce poly-I:C-induced IL-6 secretion (Publication VI). Overall, our findings are consistent with other studies describing the effects of other plant proanthocyanidins on IL-6 and IL-8 secretion in models of inflammation.

7. Effect of target compounds on pancreatic lipase activity in the duodenal phase of digestion

Under normal physiological conditions (in the presence of bile), all hydrophilic extracts of sea buckthorn in the concentration range of 0.2–40 mg g^{-1} PL showed a significant inhibition of pancreatic lipase (ADL) activity. Already at an amount of 0.2 mg of the aqueous extract, which contained 43.4±0.4 g GAE·100 g^{-1} polyphenols and 17.5±0.1% proanthocyanidins, lipase activity decreased by 22%.

A further gradual increase in the amount of extract from 0.2 mg g^{-1} PL to 40 mg g^{-1} PL provided approximately the same ADL inhibition within the confidence interval.

The higher the content of proanthocyanidins in the extract, the higher the

percentage of lipase inhibition. The extract containing 48.6 ± 0.2 g GAE·100 g^{-1} and 42.4 ± 0.3% proanthocyanidins, in the amount from 0.2 mg g^{-1} PL to 40 mg g^{-1} PL, inhibited lipase activity by 33%. The main role of proanthocyanidins in influencing ADL activity has been proven by comparing the effect of isolated proanthocyanidins from the extract and eluate (remaining fraction after proanthocyanidins separation) on ADL activity. Proanthocyanidins in the concentration range of 1 to 20 mg g^{-1} PL inhibited ADL activity by 36%. On the other hand, the eluate was not so effective and at a concentration of 20 mg g^{-1} PL promoted an increase in ADL activity by 6–11 %. The serotonin-containing fraction increased ADL activity in the duodenal phase of digestion and this can be used to normalize physiological digestion, especially the breakdown of triglycerides into free fatty acids and monoglycerides, to correct the lipid spectrum, cellular metabolism, and homeostasis (patented study).

In pathological conditions (without bile) 50% EtOH extract and secreted proanthocyanidins showed inhibition of ADL at 0.2 and 1 mg g^{-1} PL, but already at 2 mg g^{-1} PL activation of pancreatic lipase was observed. Under pathological conditions, both target compounds at concentrations between 2 and 400 mg g^{-1} PL catalyzed ADL activity in the duodenal phase of digestion (Publication IV).

8. Effect of target compounds on salivary amylase activity

Under normal physiological conditions, all sea buckthorn extracts and the serotonin-containing fraction at a concentration of 0.1-2 mg mL^{-1}_{saliva} showed a significant effect in accelerating the breakdown of starch to glucose, which may be useful in the treatment of malabsorption syndrome in underweight individuals. Isolated proanthocyanidins at the same concentration showed inhibitory activity, reducing the amylolytic power from 640 to 320 D at 30/38 °C. This indicates that proanthocyanidins are capable of reducing the breakdown and absorption of starchy carbohydrates in the body, which may be beneficial for diabetic and overweight patients (Publications II and VIII).

9. Hemolysis of the analyzed samples

Hemolytic activity (effect on human blood erythrocytes) was tested for extracts and proanthocyanidins at a concentration of 0.5 mg mL^{-1}. None of the analyzed samples caused erythrocyte rupting (hemolysis) after 1 h or 8 h incubation. This indicates the safety and high biocompatibility of extracts and proanthocyanidins (Fig. 14, Publication VI).

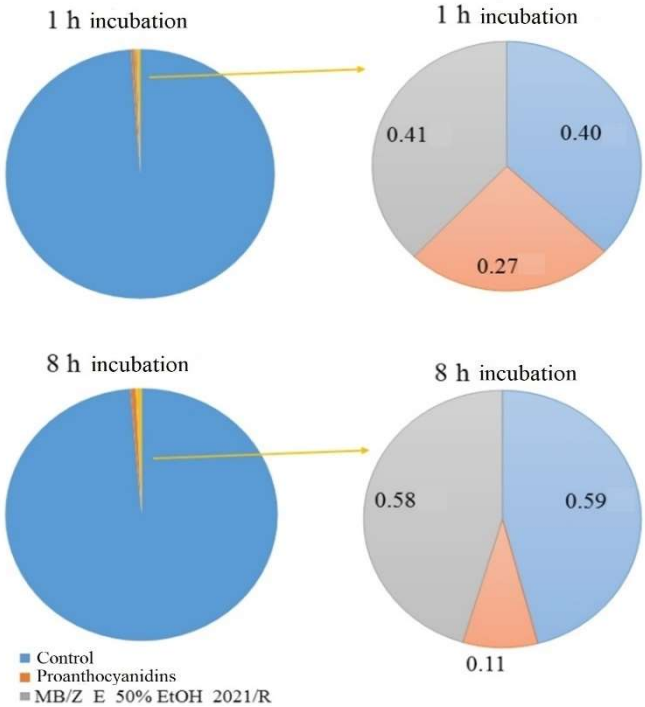


Fig. 14. **Hemolysis of the analyzed samples**. MB/Z_E_50% EtOH_2021 – extract obtained from branches of Marija Bruvele collected in autumn 2021 with 50% EtOH

10. Cytotoxicity

The cytotoxicity of the extracts and target compounds was evaluated and compared with the observed MIC/MBC and MIC/MFC concentration, as well as the IC_{50} value of the antioxidant activity and the required dose for inhibiting or stimulating the activity of amylase and lipase (Publications VI and VIII). Samples were considered cytotoxic if cell viability was reduced by more than 20%. All investigated hydrophilic extracts from twigs biomass were safe without showing cytotoxicity in their active concentration range from 0.0313 to 2.0 mg mL^{-1}. Safe concentrations of proanthocyanidins ranged from 0.03 to 0.5 mg mL^{-1}, but at a proanthocyanidin concentration of 1 mg mL^{-1}, slight cytotoxicity was observed, reducing cell viability by 29.56%. For the water extract at a concentration of 4 mg mL^{-1}, cell viability decreased by 34.33% (Fig. 15).

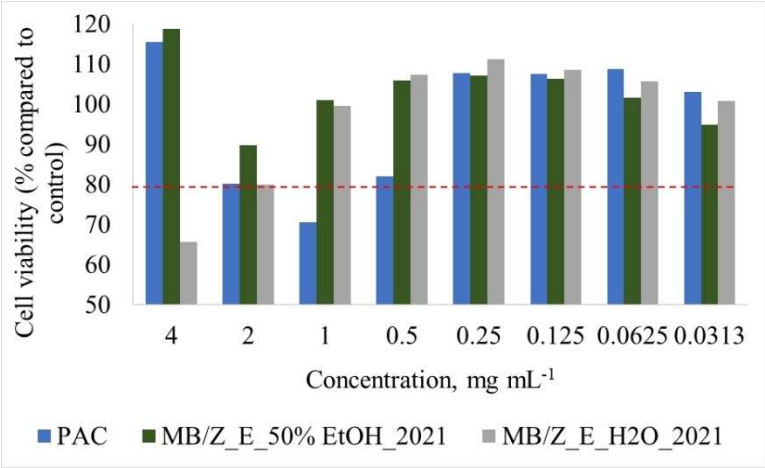


Fig. 15. **Cytotoxicity of the analyzed samples**

11. Evaluation of sea buckthorn biomass for feed production

To evaluate the twigs residues (MB/Z/2021/R, BL/Z/2021/R, TAT/Z/2021/R) and leaves (MB/L/2021, BL/L/2021, TAT/L/2021) suitability for fodder production, chemical characterization of the samples was carried out in laboratory conditions, the content of total ash, crude fiber, crude protein, phosphorus, potassium, sodium, calcium, and heavy metals (Pb, Cd and Hg) was determined. The phosphorus content in the leaves ranged from 210±21 to 225±22 mg per 100 g DM; potassium content from 1209±104 to 1376±113 mg per 100 g DM; sodium content from 1.72±0.40 to 2.25±0.52 mg per 100 g DM; calcium content from 856±205 to 989±237 mg per 100 g DM. Sodium content was higher in twigs, but calcium content was lower: sodium content from 7.83±1.80 to 22.5±5.2 mg per 100 g DM; calcium content from 281±67 to 332±80 mg per 100 g DM. The content of heavy metals in biomass does not exceed the maximum permissible concentration and complies with the European Commission Regulation no. 1275/2013. In addition to micro- and macroelements, sea buckthorn twigs and leaves contain a complex of water- and fat-soluble vitamins. Vitamin C content in twigs was from 8.0±3.0 to 178.0±50.0 mg per 100g DM, in leaves from 12.0±3.0 to 15.6 mg per 100g DM. Compared to the twigs, the leaves of all three sea buckthorn cultivars were richer in vitamin E (in twigs: 14.7±2.1 mg per 100g DM; in leaves from 30.9±4.3 to 42.6±2.2 mg per 100g DM). Vitamin A was not detected in sea buckthorn wood, while the vitamin A content in leaves was 0.86±0.07 to 1.29±0.02 mg per 100g DM (Publication V). According to the literature, sea buckthorn leaves additionally contain valuable 13 amino acids, while wood parts and bark contain 17 amino acids [76], [77].

The quality of raw materials affects the digestibility of feed, which refers to the production of greenhouse gases in the intestinal tract of livestock. Feed with higher digestibility reduces methane emissions. High fat content in biomass (>8%/DM) is known to adversely affect rumen function, fiber digestion and milk production. Thus, it can be said that the fat content in analyzed samples (0.7-3.6%/DM) was optimal for dietary feed. ADF is generally indigestible, but it stimulates the growth of important bacteria. The highest content of ADF in biomass was in twigs (26.2%–27.1%/DM), its content was slightly lower in leaves (18.1–19.1%/DM). Total protein content in twigs was ~23%/DM and in leaves between 18.4% and 19.4%/DM.

The digestibility of the studied samples was determined using *in vitro* analyses by calculating the true digestibility and determining the gas released as a result of fermentation (V. publication). The higher the digestibility of the biomass, the higher the nutritional value of the feed. This analysis was performed on the biomass samples of Maria Bruvele variety MB/Z/2021/R and MB/L/2021 and the remaining fraction after the separation of proanthocyanidins (eluate). According to *in vitro* analysis data, the extract showed the highest digestibility after the separation of proanthocyanidins. When comparing the biomasses, leaves had better digestibility. To evaluate the effect of mechanochemical treatment on the digestion effect, the twigs residue was additionally mechano-chemically treated. The results showed that the digestibility of mechano-chemically treated biomass was 2.2 times better compared to the sample without additional mechanochemical treatment (Fig. 16).

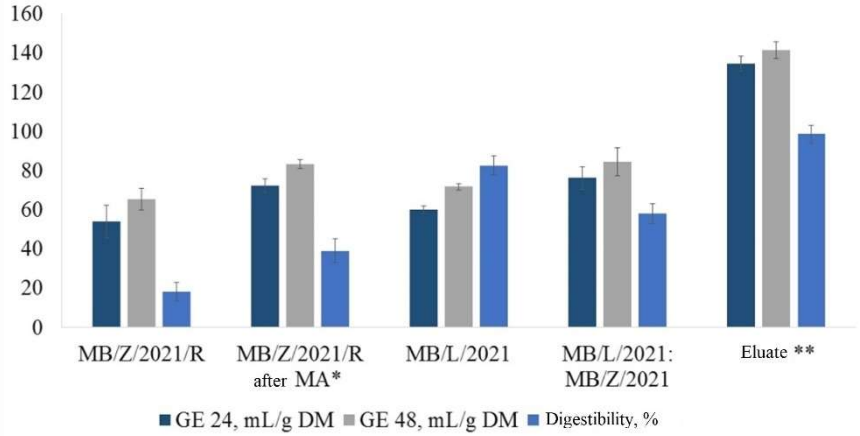


Fig. 16. ***In vitro* analysis data on biomass digestibility before and after treatment:** *after MA – after mechanochemical treatment; ** eluate - remaining fraction after separation of proanthocyanidins; GE – gas emission.

The processing of sea buckthorn biomass into fodder pellets is shown in Figure 17.

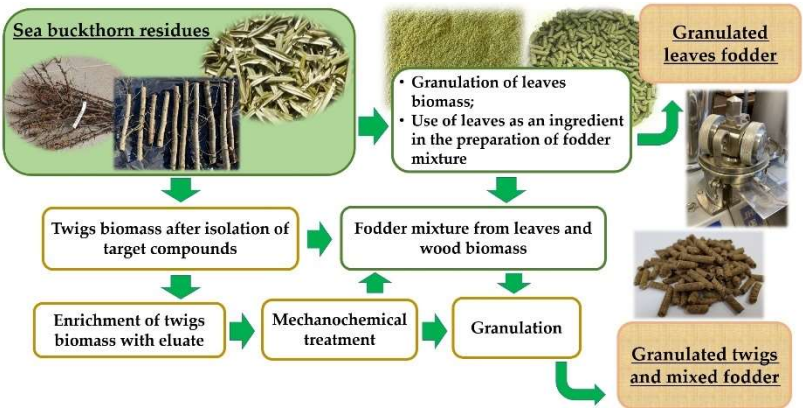


Fig.17. **Scheme of sustainable processing of sea buckthorn residues to produce animal feed pellets**

Granulation is one of the most effective methods for maintaining product quality both during storage and during their transportation. Obtained pellets of sea buckthorn samples are shown in Fig. 18. Grinded leaves are easier to pelletize compared to wood, as evidenced by low energy consumption and high productivity. The wear resistance of the granules was between 96.9 and 97.7%, moisture 5-6%, average length 12 mm, bulk density 714-716 g cm^{-2} (Publication V).

Fig.18. **Fodder additives in the form of granules**: A – mixture of leafs and twigs residue (1:1 w/w); B – leaves; C – twigs residue

12. . Evaluation of sea buckthorn biomass for soil additive production

The residue of sea buckthorn twigs after extraction has been studied as a lignocellulosic substrate for the production of soil additive by enriching it with Si (Publication VII). The indicators of the soil additive were as follows: lignin content 38.5±0.5 %/DM; humic acid content – 4.3±0.1%/DM; total nitrogen content – 1.35±0.02 %/DM; total phosphorus content 0.06±0.01%/DM; pH -

8.7±0.1%/DM. In cooperation with LBTU Institute of Agriculture, the soil additive was tested in field trials, growing spring wheat (variety: 'Vinjet') and potatoes (variety: 'Imanta'). By incorporating the soil additive into the soil, a significant increase in the yield of potatoes was found. In the field trials of 2021, using the soil additive at a dose of 20 and 40 kg ha^{-1}, the increase in potato yield was 11.2% and 13.8%, compared to the control option. In 2022, the hot weather had a significant impact and the increase in potato yield in the above doses was 8.4% and 21.4% compared to the control variant. When growing spring wheat, equivalent to the potato trials, hot and dry weather hindered the development of spring wheat, as evidenced by the low plant height (on average 70-73 cm) and quickly withered leaves. When using soil additives at a dose of 20 and 40 kg ha^{-1}, the grain yield increased by 9.5 and 11.7% in 2021, while in 2022 the grain yield was generally lower, but the comparative analysis showed a more significant increase in wheat yield by 16.5 and 26.5 % when using soil additives in the amount of 20 and 40 kg ha^{-1}. The dry and hot weather also significantly affected the grain quality. The grains obtained in the trial had a low bulk density (<700 g L^{-1}) and a mass of 1000 g (27.2-28.2 g).

13. Sea buckthorn biorefinery scheme

Based on the results obtained in the thesis, a sea buckthorn biorefinery scheme is proposed, which allows the rational use of all plant parts in products with added value (Fig. 19).

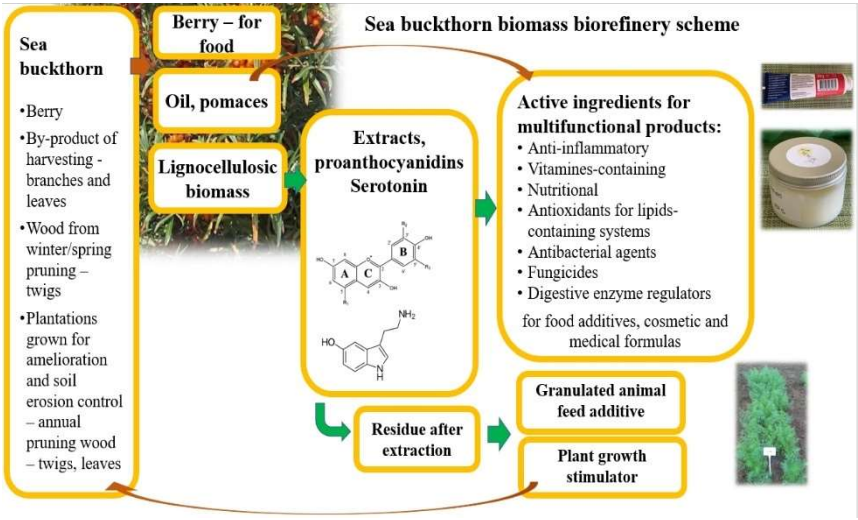


Fig.19. **Sea buckthorn biorefinery scheme**

CONCLUSIONS

1) Twigs of sea buckthorn tree cultivated in Latvia are a valuable raw material for the production of proanthocyanidins and serotonin. Autumn is the most suitable seasonal period for the extraction of target compounds, considering the high content of target compounds in twigs (proanthocyanidins ~12%/DM, serotonin ~4%/DM). The most suitable extraction and purification technique is found, which ensures the highest yield of hydrophilic extracts and target compounds from sea buckthorn biomass. Under these conditions, oligomeric proanthocyanidins (with ~92% proanthocyanidins per extract DM) with a degree of polymerization of 2-5 Da and a serotonin-containing fraction with 28.2%/DM serotonin can be obtained from sea buckthorn twigs.
2) Hydrophilic extracts and extracted proanthocyanidins have high antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus cereus,* and *Candida albicans*, creating the possibility of obtaining antimicrobial preparations by replacing or supplementing antibiotics to fight against resistant microbes. Serotonin and proanthocyanidins are powerful antibacterial agents for skin and soft tissue infections - *Streptococcus pyogenes* and *Cutibacterium acnes* – which contaminate skin care products and develop in sebum. Proanthocyanidins are able to stop the formation of pathogenic biofilms by 80%, which can reduce chronic inflammatory processes significantly.
3) Proanthocyanidins and extracts containing them have high anti-inflammatory activity, especially in reducing inflammation associated with viral infections. Proanthocyanidins at a concentration of 0.5 mg mL^{-1} reduced IL-8 secretion, and at concentrations of 0.25–0.5 mg mL^{-1} decreased IL-6 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. Both proanthocyanidins and the 50% EtOH extract significantly reduced IL-8 and IL-6 secretion in human peripheral blood mononuclear cells stimulated with polyinosinic acid:polycytidylic acid (poly I:C) which mimics viral double-stranded RNA.
4) The high antioxidant activity of extracts and proanthocyanidins and their ability to protect lipid-containing systems from oxidation have been proven, which enables to use them as natural antioxidants in medical and cosmetic creams. The antioxidant activity of isolated proanthocyanidins was 3 times higher on average compared to the antioxidant activity of the vitamin E analogue. The 50% EtOH extract delays the oxidation of lipid-containing products most effectively. In the substrate with lower lipid content (19%), the activity of the extracts was more effective than with higher lipid content (35%).
5) Hydrophilic extracts from twigs biomass in the working concentration range of 0.03 to 4.0 mg mL^{-1} and target compounds in the range of 0.03 to 0.5 mg mL^{-1} did not show cytotoxicity and did not cause hemolysis in human

blood, indicating their high biocompatibility and safety for use in medical and cosmetic cream formulations, as well as in healthcare.

6) Proanthocyanidins are strong inhibitors of lipase and alpha-amylase, which opens the possibility of their use in anti-obesity therapy, while serotonin is an activator of human digestive enzymes, which enables one to use it for solving malabsorption problems.
7) After the isolation of target compounds, chemical characterization of lignocellulosic biomass residues and *in vitro* analyses in the digestive system of small ruminants showed the possibility of using them for the production of animal feed additives. By enriching the lignocellulosic biomass residue with the silicon-containing component, a soil additive is obtained that promotes plant growth and development, increasing the yield by 27%.
8) A zero-waste biorefinery scheme of sea buckthorn biomass has been developed, which will allow sea buckthorn growers to use both berries and twigs – lignocellulosic biomass by expanding their assortment and choosing directions of application.

RECOMMENDATION

The developed flexible sea buckthorn biomass processing scheme will allow sea buckthorn growers to expand their assortment by choosing the most suitable products for their production (Fig. 20).

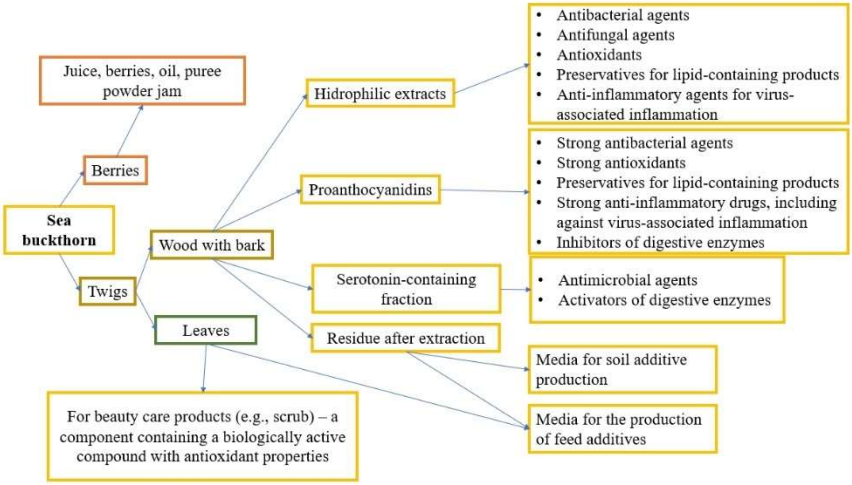


Fig.20. **Scheme of sea buckthorn applications directions for growers**

ACKNOWLEDGMENT

I express my deepest gratitude to Professor, Dr. habil. chem. Galina Telysheva, head of the lignin chemistry laboratory, for ideas, inspiration, knowledge, and training. I am grateful to my supervisors Dr. sc. ing. Sarmite Janceva and Dr. sc.ing. Uldis Spulle for managing the work, irreplaceable support during the development of the doctoral thesis, timely help in all stages of the work and the preparation of scientific articles and presentations, valuable advice, and effective work coordination.

I express my gratitude to the member of the board of the International Seabuckthorn Association, Andrejs Bruvelis, for sharing his knowledge about sea buckthorn, and for inspiration and help.

I am grateful to the institute and laboratory colleagues who supported me practically during the thesis development.

I am grateful to Dr. biol. Vizma Nikolaeva, PhD Liga Petersone, Mg. Biol. Anna Ramata-Stunda, PhD Mihail Chervenkov, Mg. biol. Maris Senkovs and Dr. med. Jelena Krasilnikova for support and help in the characterization of the analyzed samples.

Sincere thanks to my family for their inexhaustible patience, understanding, and great support.

LITERATŪRAS SARAKSTS / REFERENCES LIST

[1] National Institute of Research – Development for Machines and Installations Designed for Agriculture and Food Industry – INMA Bucharest, Romania *et al.*, "VALORIZATION IN THE AGRO-FOOD INDUSTRY OF WASTE FROM TREES FRUIT TREES," *FGR*, vol. 38, pp. 138–144, Dec. 2022, doi: 10.33045/fgr.v38.2022.20.

[2] M. J. Aliaño-González, J. Gabaston, V. Ortiz-Somovilla, and E. Cantos-Villar, "Wood Waste from Fruit Trees: Biomolecules and Their Applications in Agri-Food Industry," *Biomolecules*, vol. 12, no. 2, p. 238, Feb. 2022, doi: 10.3390/biom12020238.

[3] "Latvijas bioekonomikas strategija 2030." Dec. 19, 2017. Accessed: Feb. 29, 2024. [Online]. Available: https://likumi.lv/ta/id/342221-latvijas-bioekonomikas-strategija-2030

[4] "The Annual Report of International Seabuckthorn Development for the Year of 2021." International Seabuckthorn Association (ISA) Management Center for Seabuckthorn Development Ministry of Water

Resources, CHINA In December of 2022. [Online]. Available: www.isahome.net
[5] M. Husain, P. Jagdeesh, R. Aatifa, A. P. Aafaq, K. V. Dinesh, and M. Kolagani, "Seabuckthorn: A multipurpose shrubs species in Ladakh cold desert," *Journal of entomology and zoology studies*, vol. 6, pp. 1330–1337, 2018.
[6] "Augļu koku un ogulāju stādījumi (ieskaitot zemenes) 2000 - 2022." Accessed: Feb. 15, 2024. [Online]. Available: https://data.stat.gov.lv/pxweb/lv/OSP_PUB/START__NOZ__LA__LAG/LAG080/
[7] "LIZ apsekošanas rezultāti novadu griezumā 2023. gads." Accessed: Jan. 02, 2024. [Online]. Available: https://www.lad.gov.lv/lv/media/7650/download?attachment
[8] J. L. L. N'Guessan, B. F. Niamké, N. J. C. Yao, and N. Amusant, "Wood Extractives: Main Families, Functional Properties, Fields of Application and Interest of Wood Waste," *Forest Products Journal*, vol. 73, no. 3, pp. 194–208, May 2023, doi: 10.13073/FPJ-D-23-00015.
[9] J. Bié, B. Sepodes, P. C. B. Fernandes, and M. H. L. Ribeiro, "Polyphenols in Health and Disease: Gut Microbiota, Bioaccessibility, and Bioavailability," *Compounds*, vol. 3, no. 1, pp. 40–72, Jan. 2023, doi: 10.3390/compounds3010005.
[10] L. M. Bal, V. Meda, S. N. Naik, and S. Satya, "Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals," *Food Research International*, vol. 44, no. 7, pp. 1718–1727, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.foodres.2011.03.002.
[11] A. Chen, X. Feng, B. Dorjsuren, C. Chimedtseren, T.-A. Damda, and C. Zhang, "Traditional food, modern food and nutritional value of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.): a review," *Journal of Future Foods*, vol. 3, no. 3, pp. 191–205, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.jfutfo.2023.02.001.
[12] S. Attri, K. Sharma, P. Raigond, and G. Goel, "Colonic fermentation of polyphenolics from Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides) berries: Assessment of effects on microbial diversity by Principal Component Analysis," *Food Research International*, vol. 105, pp. 324–332, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2017.11.032.
[13] P. S. Larmo *et al.*, "Effect of a low dose of sea buckthorn berries on circulating concentrations of cholesterol, triacylglycerols, and flavonols in healthy adults," *Eur J Nutr*, vol. 48, no. 5, pp. 277–282, Aug. 2009, doi: 10.1007/s00394-009-0011-4.
[14] Z.-L. Gao, X.-H. Gu, F.-T. Cheng, and F.-H. Jiang, "Effect of sea buckthorn on liver fibrosis: a clinical study," *World J Gastroenterol*, vol. 9, no. 7, pp. 1615–1617, Jul. 2003, doi: 10.3748/wjg.v9.i7.1615.

[15] T. Yoshida, K. Tanaka, X.-M. Chen, and T. Okuda, “Tannins from Hippophae rhamnoides,” *Phytochemistry*, vol. 30, no. 2, pp. 663–666, Jan. 1991, doi: 10.1016/0031-9422(91)83748-A.
[16] Y. Tian *et al.*, “Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants,” *Food Chemistry*, vol. 220, pp. 266–281, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.145.
[17] S. Saggu, H. M. Divekar, V. Gupta, R. C. Sawhney, P. K. Banerjee, and R. Kumar, “Adaptogenic and safety evaluation of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides) leaf extract: A dose dependent study,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, no. 4, pp. 609–617, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.fct.2006.10.008.
[18] R. Tulsawani, “Ninety day repeated gavage administration of Hipphophae rhamnoides extract in rats,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 8–9, pp. 2483–2489, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.fct.2010.06.018.
[19] D. Nishad *et al.*, “Acute and sub acute toxicity and efficacy studies of Hippophae rhamnoides based herbal antioxidant supplement,” *Indian J Pharmacol*, vol. 44, no. 4, p. 504, 2012, doi: 10.4103/0253-7613.99329.
[20] K. Kumar, P. Debnath, S. Singh, and N. Kumar, “An Overview of Plant Phenolics and Their Involvement in Abiotic Stress Tolerance,” *Stresses*, vol. 3, no. 3, pp. 570–585, Aug. 2023, doi: 10.3390/stresses3030040.
[21] R. T. Neto, S. A. O. Santos, J. Oliveira, and A. J. D. Silvestre, “Biorefinery of high polymerization degree proanthocyanidins in the context of circular economy,” *Industrial Crops and Products*, vol. 151, p. 112450, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112450.
[22] H. Yang *et al.*, “Characterization of Unusual Proanthocyanidins in Leaves of Bayberry (Myrica rubra Sieb. et Zucc.),” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 5, pp. 1622–1629, Mar. 2011, doi: 10.1021/jf103918v.
[23] Q. Li *et al.*, “Antioxidant activity of proanthocyanidins-rich fractions from Choerospondias axillaris peels using a combination of chemical-based methods and cellular-based assay,” *Food Chemistry*, vol. 208, pp. 309–317, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.012.
[24] X. Chen *et al.*, “Analytical Profiling of Proanthocyanidins from Acacia mearnsii Bark and In Vitro Assessment of Antioxidant and Antidiabetic Potential,” *Molecules*, vol. 23, no. 11, p. 2891, Nov. 2018, doi: 10.3390/molecules23112891.
[25] R. De La Iglesia, F. I. Milagro, J. Campión, N. Boqué, and J. A. Martínez, “Healthy properties of proanthocyanidins,” *BioFactors*, vol. 36, no. 3, pp. 159–168, Mar. 2010, doi: 10.1002/biof.79.
[26] A. P. Neilson, S. F. O’Keefe, and B. W. Bolling, “High-Molecular-Weight Proanthocyanidins in Foods: Overcoming Analytical Challenges in Pursuit of Novel Dietary Bioactive Components,” *Annu. Rev. Food*

Sci. Technol., vol. 7, no. 1, pp. 43–64, Feb. 2016, doi: 10.1146/annurev-food-022814-015604.

[27] F. Nie *et al.*, "Oligomeric Proanthocyanidins: An Updated Review of Their Natural Sources, Synthesis, and Potentials," *Antioxidants*, vol. 12, no. 5, p. 1004, Apr. 2023, doi: 10.3390/antiox12051004.

[28] P. Sun *et al.*, "Trimer procyanidin oligomers contribute to the protective effects of cinnamon extracts on pancreatic β-cells in vitro," *Acta Pharmacol Sin*, vol. 37, no. 8, pp. 1083–1090, Aug. 2016, doi: 10.1038/aps.2016.29.

[29] W. Liu *et al.*, "Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates inflammation and adiposity by modulating gut microbiota in high-fat diet mice," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 61, no. 9, p. 1601082, Sep. 2017, doi: 10.1002/mnfr.201601082.

[30] L. Zhang *et al.*, "Grape proanthocyanidin-induced intestinal bloom of Akkermansia muciniphila is dependent on its baseline abundance and precedes activation of host genes related to metabolic health," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 56, pp. 142–151, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.02.009.

[31] F. Zhu, B. Du, and J. Li, "Recent advance on the antitumor and antioxidant activity of grape seed extracts," *IJWR*, p. 63, May 2015, doi: 10.2147/IJWR.S76162.

[32] K. Takagi and T. Mitsunaga, "Tyrosinase inhibitory activity of proanthocyanidins from woody plants," *J Wood Sci*, vol. 49, no. 5, pp. 461–465, Oct. 2003, doi: 10.1007/s10086-002-0496-4.

[33] M. Cádiz-Gurrea, I. Borrás-Linares, J. Lozano-Sánchez, J. Joven, S. Fernández-Arroyo, and A. Segura-Carretero, "Cocoa and Grape Seed Byproducts as a Source of Antioxidant and Anti-Inflammatory Proanthocyanidins," *IJMS*, vol. 18, no. 2, p. 376, Feb. 2017, doi: 10.3390/ijms18020376.

[34] J. T. Mao *et al.*, "A Pilot Study of a Grape Seed Procyanidin Extract for Lung Cancer Chemoprevention," *Cancer Prevention Research*, vol. 12, no. 8, pp. 557–566, Aug. 2019, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0053.

[35] P. Ravindranathan, D. Pasham, and A. Goel, "Oligomeric proanthocyanidins (OPCs) from grape seed extract suppress the activity of ABC transporters in overcoming chemoresistance in colorectal cancer cells," *Carcinogenesis*, vol. 40, no. 3, pp. 412–421, May 2019, doi: 10.1093/carcin/bgy184.

[36] R. Prasad and S. K. Katiyar, "Grape seed proanthocyanidins inhibit migration potential of pancreatic cancer cells by promoting mesenchymal-to-epithelial transition and targeting NF-κB," *Cancer Letters*, vol. 334, no. 1, pp. 118–126, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2012.08.003.

[37] S. Janceva, T. Dizhbite, G. Telisheva, U. Spulle, L. Klavinsh, and M. Dzenis, “Tannins of Deciduous Trees Bark As a Potential Source for Obtaining Ecologically Safe Wood Adhesives,” *ETR*, vol. 1, p. 265, Aug. 2015, doi: 10.17770/etr2011vol1.896.

[38] P. N. Diouf, T. Stevanovic, and A. Cloutier, “Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from Picea mariana bark and its proanthocyanidin-rich fractions,” *Food Chemistry*, vol. 113, no. 4, pp. 897–902, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.016.

[39] F. L. Booker, S. Anttonen, and A. S. Heagle, “Catechin, proanthocyanidin and lignin contents of loblolly pine (*Pinus taeda*) needles after chronic exposure to ozone,” *New Phytologist*, vol. 132, no. 3, pp. 483–492, Mar. 1996, doi: 10.1111/j.1469-8137.1996.tb01868.x.

[40] P. B. Venter, M. Sisa, M. J. Van Der Merwe, S. L. Bonnet, and J. H. Van Der Westhuizen, “Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 1: The chemical composition of quebracho (Schinopsis lorentzii and Schinopsis balansae) heartwood extract,” *Phytochemistry*, vol. 73, pp. 95–105, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.phytochem.2011.10.006.

[41] A. K. Das, Md. N. Islam, Md. O. Faruk, Md. Ashaduzzaman, and R. Dungani, “Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities,” *South African Journal of Botany*, vol. 135, pp. 58–70, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.sajb.2020.08.008.

[42] A. Kumar Das *et al.*, “Hardwood Tannin: Sources, Utilizations, and Prospects,” in *Tannins - Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge*, A. Aires, Ed., IntechOpen, 2020. doi: 10.5772/intechopen.86003.

[43] A. Pizzi, “Recent developments in eco-efficient bio-based adhesives for wood bonding: opportunities and issues,” *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 20, no. 8, pp. 829–846, Jan. 2006, doi: 10.1163/156856106777638635.

[44] V. Vorobyova, O. Sikorsky, M. Skiba, and G. Vasyliev, “Quebracho tannin as corrosion inhibitor in neutral media and novel rust conversion agent for enhanced corrosion protection,” *South African Journal of Chemical Engineering*, vol. 44, pp. 68–80, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.sajce.2023.01.003.

[45] M. Dargahi, A. L. J. Olsson, N. Tufenkji, and R. Gaudreault, “Green Technology: Tannin-Based Corrosion Inhibitor for Protection of Mild Steel,” *CORROSION*, vol. 71, no. 11, pp. 1321–1329, Nov. 2015, doi: 10.5006/1777.

[46] “https://www.spkc.gov.lv/lv/antibiotiku-rezistences-celoni.” [Online]. Available: https://www.spkc.gov.lv/lv/antibiotiku-rezistences-celoni

[47] C. J. L. Murray *et al.*, “Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis,” *The Lancet*, vol. 399, no. 10325, pp. 629–655, Feb. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
[48] M. Efenberger-Szmechtyk, A. Nowak, and A. Czyzowska, “Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 61, no. 1, pp. 149–178, Jan. 2021, doi: 10.1080/10408398.2020.1722060.
[49] M. A. Olszewska, A. Gędas, and M. Simões, “Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry,” *Food Research International*, vol. 134, p. 109214, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109214.
[50] D. Skroza, V. Šimat, S. Smole Možina, V. Katalinić, N. Boban, and I. Generalić Mekinić, “Interactions of resveratrol with other phenolics and activity against food-borne pathogens,” *Food Science & Nutrition*, vol. 7, no. 7, pp. 2312–2318, Jul. 2019, doi: 10.1002/fsn3.1073.
[51] L. Bouarab Chibane, P. Degraeve, H. Ferhout, J. Bouajila, and N. Oulahal, “Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives,” *J Sci Food Agric*, vol. 99, no. 4, pp. 1457–1474, Mar. 2019, doi: 10.1002/jsfa.9357.
[52] I. Gutiérrez-del-Río, J. Fernández, and F. Lombó, “Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 52, no. 3, pp. 309–315, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.04.024.
[53] E. A. Bell and D. H. Janzen, “Medical and Ecological Considerations of L-Dopa and 5-HTP in Seeds,” *Nature*, vol. 229, no. 5280, pp. 136–137, Jan. 1971, doi: 10.1038/229136a0.
[54] Y. Kumarasamy, M. Middleton, R. G. Reid, L. Nahar, and S. D. Sarker, “Biological activity of serotonin conjugates from the seeds of Centaurea nigra,” *Fitoterapia*, vol. 74, no. 6, pp. 609–612, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0367-326X(03)00144-8.
[55] Y. Hotta *et al.*, “Protective effects of antioxidative serotonin derivatives isolated from safflower against postischemic myocardial dysfunction,” *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 238, no. 1/2, pp. 151–162, 2002, doi: 10.1023/A:1019992124986.
[56] A. Nagatsu *et al.*, “Tyrosinase Inhibitory and Anti-Tumor Promoting Activities of Compounds Isolated from Safflower (Carthamus Tinctorius L.) and Cotton (Gossypium Hirsutum L.) Oil Cakes,” *Natural Product Letters*, vol. 14, no. 3, pp. 153–158, Mar. 2000, doi: 10.1080/10575630008041225.
[57] M. Ciulu *et al.*, “RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey,” *Talanta*, vol. 83, no. 3, pp. 924–929, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.talanta.2010.10.059.

[58] “EN ISO 17831-1. Solid Biofuels—Determination of Mechanical Durability of Pellets and Briquettes—Part 1: Pellets (ISO 17831-1:2015).” 2015.
[59] “EN ISO 17828:2015. Solid Biofuels—Determination of Bulk Density.” 2015.
[60] “LVS EN 13040:2008. Augsnes ielabošanas un augšanas substrāti. Paraugu sagatavošana ķīmiskiem un fizikāliem testiem, sausnas, mitruma satura un laboratorijā sablīvēta parauga tilpummasas noteikšana.” 2008.
[61] “LVS EN 13039:2012. Augsnes ielabošanas līdzekļi un augšanas substrāti. Organisko vielu un pelnu satura noteikšana.” 2012.
[62] “LVS EN 13654-1:2003/NAC:2004. Augsnes ielabošanas līdzekļi un augšanas substrāti. Slāpekļa noteikšana. 1. daļa: Modificēta Kjeldāla metode.” 2004 2003.
[63] “LVS 398:2002. Augsnes kvalitāte. Kopējā fosfora noteikšana.” 2002.
[64] “LVS ISO 110466:1995. Augsnes kvalitāte — Karaļūdenī šķīstošo elementu mineralizācija.” 1995.
[65] “LVS 346:2005. Augsnes kvalitāte — Dzīvsudraba noteikšana ar aukstā tvaika atomabsorbcijas spektrofotometriju.” 2005.
[66] “LVS ISO 11047:1998A. Augsnes kvalitāte – kādmija, hroma, kobalta, vara, svina, mangāna, niķeļa un cinka noteikšana augsnē, ekstraģējot ar karaļūdeni. Liesmas un elektrotermiskās atomu absorbcijas spektrofotometriskās metodes.” 1998.
[67] “LVS ISO 10390:2006. Augsnes kvalitāte. pH noteikšana.” 2006.
[68] W. Wu, Y. Jin, F. Bai, and S. Jin, “Pseudomonas aeruginosa,” in *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, 2015, pp. 753–767. doi: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X.
[69] A. D. Hernday, S. M. Noble, Q. M. Mitrovich, and A. D. Johnson, “Genetics and Molecular Biology in Candida albicans,” in *Methods in Enzymology*, vol. 470, Elsevier, 2010, pp. 737–758. doi: 10.1016/S0076-6879(10)70031-8.
[70] A. E. Bryant and D. L. Stevens, “Streptococcus pyogenes,” in *Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases*, Elsevier, 2015, pp. 2285-2299.e4. doi: 10.1016/B978-1-4557-4801-3.00199-5.
[71] S. Corvec, “Clinical and Biological Features of Cutibacterium (Formerly Propionibacterium) avidum, an Underrecognized Microorganism,” *Clin Microbiol Rev*, vol. 31, no. 3, pp. e00064-17, Jul. 2018, doi: 10.1128/CMR.00064-17.
[72] P. Dali, E. R. Giugliano, E. M. Vellozzi, and M. A. Smith, “Susceptibilities of </i>Propionibacterium acnes</i> Ophthalmic Isolates to Moxifloxacin,” *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 45, no. 10, pp. 2969–2970, Oct. 2001, doi: 10.1128/AAC.45.10.2969-2970.2001.

[73] A. Harada, N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida, and K. Matsushima, "Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 56, no. 5, pp. 559–564, Nov. 1994, doi: 10.1002/jlb.56.5.559.

[74] J.-M. Zhang and J. An, "Cytokines, Inflammation, and Pain," *International Anesthesiology Clinics*, vol. 45, no. 2, pp. 27–37, 2007, doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.

[75] "Raised troponin and interleukin-6 levels are associated with a poor prognosis in covid-19." Feb. 04, 2020. Accessed: Mar. 19, 2024. [Online]. Available: https://cardiacrhythmnews.com/raised-troponin-and-interleukin-6-levels-are-associated-with-a-poor-prognosis-in-covid-19/

[76] N. P. Bekker and A. I. Glushenkova, "Components of Certain Species of the Elaeagnaceae Family," *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 37, no. 2, pp. 97–116, 2001, doi: 10.1023/A:1012395332284.

[77] E. Šnē, R. Galoburda, and D. Segliņa, "Sea Buckthorn Vegetative Parts – A Good Source of Bioactive Compounds," *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, vol. 67, no. 2, pp. 101–108, Aug. 2013, doi: 10.2478/prolas-2013-0016.