



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО ИНЖЕНЕРНА ХИМИЯ

---

**Флора Венциславова Цветанова**

**Получаване на 2,3-бутандиол от нишесте чрез  
рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31 - А**

**Автореферат**

на дисертация за получаване на научна и образователна степен „Доктор“

Научна специалност: 02.10.09

Научен ръководител: проф. д-р Калоян Петров

София

2016г.

Дисертационният труд съдържа 103 страници, 9 таблици и 20 фигури. В библиографията са включени 155 заглавия. Експерименталната работа е извършена в Институт по Инженерна Химия и Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“.

Защитата на дисертационният труд ще се проведе на ..... от ..... часа в Институт по Инженерна Химия на БАН – София, ул. „Акад. Георги Бончев“, блок 103.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на Института по Инженерна Химия.

Автор: Флора Венциславова Цветанова

Заглавие: Получаване на 2,3-бутандиол от нишесте чрез рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31 - А



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО ИНЖЕНЕРНА ХИМИЯ

---

**Флора Венциславова Цветанова**

**Получаване на 2,3-бутандиол от нишесте чрез  
рекомбинантен щам *Klebsiella pneumonia* G31 - А**

**Автореферат**

на дисертация за получаване на научна и образователна степен „Доктор“

Научна специалност:

02.10.09.

Научен ръководител: проф. д-р Калоян Петров

Научно жури: Доц. д-р Величка Гочева

Доц. д-рн Маргарита Камбурова

Доц. д-р Александър Рътков

Проф. д-р Калоян Петров

Проф. д-р Драгомир Янков

София

2016г.

## СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на използваните съкращения	6
<b>1. Въведение</b>	<b>7</b>
<b>2. Цел и задачи</b>	<b>8</b>
<b>3. Материали и методи</b>	<b>9</b>
3.1. Бактериални щамове	9
3.2. Състав на хранителната среда и условия на култивиране	10
3.3. Изолиране на геномна ДНК	11
3.4. Изолиране на плазмидна ДНК	12
3.5. PCR	12
3.6. Клониране на генът amyI	12
3.7. Трансформация на бактериалният щам и отделяне на амилаза	12
3.8. Нуклеотидни секвенционни анализи на amyL	13
3.9. Условия за култивиране на генно-модифициран щам <i>Klebsiella pneumoniae</i> G31 – A	13
3.10. Аналитични методи	14
3.10.1. Определяне на разтворими метаболити	14
3.10.2. Определяне на нишесте	14
3.10.3. Определяне на ензимна активност и количество белтък	14
3.10.4. Определяне на биомаса	15
<b>4. Резултати</b>	<b>15</b>
4.1. Изучаване влиянието на различните компоненти на хранителната среда при ферментацията на глюкозата от <i>Klebsiella pneumoniae</i> G31	15

4.2.	Получаване на 2,3-БД от нишесте с рекомбинантен щам <i>Klebsiella pneumoniae</i> G31 – A	19
4.2.1.	Клониране и секвенционни анализи на amyL от <i>B. licheniformis</i>	19
4.2.2.	Хетероложна експресия на гена amyL в <i>Klebsiella pneumoniae</i> G31–A	21
4.2.3.	Метаболитен профил на ферментацията на нишесте с рекомбинантен щам <i>Klebsiella pneumoniae</i> G31–A	24
4.3.	Влияние на IPTG върху синтезирането на 2,3-БД	25
4.4.	Влияние на Ca <sup>2+</sup> върху получаването на 2,3-БД	26
4.5.	Влияние на добавянето на глицин върху извънклетъчната амилазна активност и получаването на 2,3-БД	29
4.6.	Конверсия на високо концентриран разтвор на нишесте	32
<b>5.</b>	<b>Обсъждане на резултатите</b>	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>Изводи</b>	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>Приноси</b>	<b>43</b>
	Списък на научните публикации по дисертацията и участие в научни конференции	44

## СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

<b>2,3-БД</b>	2,3-бутандиол
<b>NAD</b>	коензим никотинамид аденин динуклеотид (Nicotinamid Adenine Dinucleotide)
<b>SSF</b>	едновременно озахаряване и ферментация (simultaneous saccharification and fermentation)
<b>SHF</b>	отделно протичащи хидролиза и ферментация (separate hydrolysis and fermentation)
<b>IPTG</b>	изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside)
<b>rpm</b>	обороти за минута (revolutions per minute)
<b>ДНК</b>	дезоксирибонуклеинова киселина
<b>PCR</b>	полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction)
<b>HPLC</b>	високоэффективна течна хроматография (High Performance Liquid Chromatography)
<b>CDs</b>	циклодекстрини (cyclodextrines)
<b>cymH</b>	Циклодекстриназа
<b>SDS-PAGE</b>	електрофореза в полиакриламиден гел с натриев додецил сулфат (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Получаването на 2,3-бутандиол (2,3-БД) като продукт на микробна ферментация има дълга, повече от стогодишна история. Първите целенасочени опити за продуцирането му като метаболитен продукт на *Klebsiella pneumoniae* (тогава *Aerobacter aerogenes*) датират от 1906 година (Harden and Walpole 1906). През 1926 Donker използва щам на *Bacillus polymyxa*. Понастоящем са известни над 30 вида организми (основно бактерии), които могат да синтезират 2,3-БД. Едва няколко от тях, обаче, могат да го продуцират в количества, необходими за комерсиалното му използване. Схема за първото индустриално производство на 2,3-БД е предложена още през 1933 г. от Fulmer, но истински разцвет в научно и технологично отношение, ферментационното получаване на 2,3-БД преживява през годините на Втората световна война. Причина е нуждата от синтетична гума, основна суровина за чието производство се явява 1,3-бутадиена, дериват на 2,3-БД. По-късно, поради пад в цените на петрола и петролните продукти, производството на 1,3-бутадиен чрез конверсия на 2,3-БД става икономически неизгодно. Обратно, продължителното покачване в цените на петролните деривати през следващите две десетилетия, и най-вече скока през 70-те години, отново възвръщат интереса към 2,3-БД (първоначално в САЩ, по-късно и в Китай).

Вторият пик на значителен интерес към химикала продължава и до днес. Това се дължи на все по-широкото му приложение в редица индустрии – хранително-вкусова, фармацевтична, в козметиката, като дериват за получаване на диацетил, метилетилкетон и др. Ново приложение 2,3-БД намира като добавка в горивата. Поради високата калоричност на изгарянето му и високото октаново число, понастоящем се счита, че 2,3-БД има потенциал да бъде използван и като самостоятелно гориво.

Вследствие на непрекъснато развиващите се технологии за неговото получаване, себестойността му чувствително намалява. Според ценовият анализатор *ISIC pricing*, цената на тон технически 2,3-бутандиол към януари 2014 г. варира от

1850 долара (Китай) до 2100 евро (Германия), докато цената на 2,3-БД, пречистен за фармацевтична употреба е 48.32 долара за килограм.

През последните десетилетия, 2,3-БД е обект на множество научни изследвания, концентриращи се главно върху разработването на биотехнологии, използващи *ферментация* на все по-евтини субстрати. За целта усилено се работи както за оптимизиране на технологията на производството, така и за създаването на генетично модифицирани щамове-свръхпродуценти на 2,3-БД от различни субстрати. Целта е да се създадат хибридни организми, способни да разграждат колкото се може по-евтини материали – различни отпадни продукти, широко разпространени в природата полизахариди, както и различни захари, неподлежащи на конверсия от естествените организми. За целта, в естествените продуценти на 2,3-БД се клонират както гени, усилващи естествения метаболизъм на клетките, така и гени, чиято експресия води до създаването на нови метаболитни пътища и придава нови качества на организмите – например гени за целулазна, амилазна, ксиланазна и друга активност.

В този смисъл, целта на настоящия труд е създаването на генетично модифициран организъм, способен да разгражда нишесте и директно, в едностъпален процес на едновременно втечняване, озахаряване и ферментация, да го превръща в 2,3-бутандиол. Разработването на такава биотехнология би имало както научно, така и приложно значение, отваряйки възможността за индустриалното производство на 2,3-БД на базата на нишесте и нишестени материали.

## 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата работа е:

***Създаване на биотехнология за директно превръщане на сурово нишесте в 2,3-бутандиол чрез ферментация.***



За постигането на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Избор на щам – продуцент на 2,3-бутандиол.
2. Намиране на оптималните условия за получаване на 2,3-бутандиол от глюкоза.
3. Клониране и хетероложна експресия на ген за екстрацелуларна  $\alpha$  – амилаза в избрания щам.
4. Оптимизиране на условията за максимална експресия на гена:
  - концентрация на индуктора IPTG;
  - концентрация на глицин;
  - концентрация на  $Ca^{2+}$ .
5. Метаболизиране на високо концентрирани разтвори на нишесте за максимален добив на 2,3-бутандиол.

### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 3.1. Бактериални щамове

Използваният щам за трансформация - *Klebsiella pneumoniae* G31 е свръхпродуцент на 2,3-бутандиол от глицерол (Petrov and Petrova 2009, 2010), изолиран е от активна тиня и е депозиран в Българската Национална Банка за Промислени Микроорганизми и Клетъчни Култури под регистрационен № 8650.

Рекомбинантният щам - *Klebsiella pneumoniae* G31- A е получен чрез клониране в дивия на  $\alpha$  - амилазен ензим от щам на *Bacillus licheniformis* 44 MB82/G (получен от същата банка). Щамът *Klebsiella pneumoniae* G31 - A е депозиран в колекцията микроорганизми и клетъчни култури в институт Leibniz, Германия (DSM 27580).

Щамовете и плазмидните конструкти за получаването на рекомбинанта са посочени в табл. 1.

### 3.2. Състав на хранителните среди и условия на култивиране

Бактериалните щамове са съхранявани при температура  $-20^{\circ}\text{C}$  в присъствие на 20 % (w/w) глицерол.

Компонентите на използваните хранителните среди за култивиране на *Klebsiella pneumoniae* G31 са следните (g/L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (13.7),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2.0),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (3.3 – 4.91),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5.35 – 6.6),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2 – 0.25),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.02 – 0.05),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.001),  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.001 – 0.01),  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.01), EDTA (0.05), KCl (0.4 – 0.75),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (13.8),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0.28),  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (3.0), дрождев екстракт (2.0 – 5.0), бактопептон (2.0), солеви разтвор ( $\text{ZnCl}_2$  – 34.2,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 2.7,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 10,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.85,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0.31), лимонена киселина (0.42).

Всички експерименти са проведени на колби с обем 500 mL, (включително развитието на инокулума и работните среди). Извършени са със 100 mL хранителната среда при  $37^{\circ}\text{C}$  и скорост на разбъркване 200 rpm на клатачка (New Brunswick Scientific CO, Edison, New Jersey, USA, модел G25). За приготвянето на инокулума е използвана среда 7 (виж табл. 2) с въглероден източник глюкоза (30 g/L). Глюкозната концентрация при работните колби е 55 и 100 g/L. Началното рН при старта на процесите е 7.0, а в хода им не е осъществяван рН-контрол.

За конструирането на рекомбинантният щам, културите *E. coli* и *K. pneumoniae* G31 са култивирани на среда Luria - Bertani (Scharlau Chemie S. A., Barcelona, Испания) със съдържание (g/L): триптон - 10, дрождев екстракт - 5, NaCl - 10. За приготвянето на петритата е използван 1.5 %-ен агар (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Hampshire, Великобритания). Добавяни са антибиотиците ампицилин, канамицин, тетрациклин, еритромицин и хлорамфеникол (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Германия).

Щамът *B. licheniformis* 44MB82/G е култивиран в хранителна среда със съдържание (g/L): месен екстракт - 10, пептон - 10, NaCl - 5, разтворимо нишесте - 0.5 %.

Всички щамове са култивирани на  $37^{\circ}\text{C}$  на клатачка.

**Табл.1. Щамове, плазмиди и праймери**

Щам/плазмиди/праймери	Характеристики	Източник
<b>Щам</b>		
<i>K. pneumoniae</i> G31	продуцент на 2,3-БД, Amp <sup>r</sup>	Petrova et. al., 2009
<i>K. pneumoniae</i> G31-A	продуцент на 2,3-БД, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , pCRamyBL	Tsvetanova et. al., 2014
<i>E. coli</i> DH5α	F-endA1 gln V44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80ddlacZΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, hsdR17( <i>r<sub>k</sub>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ), λ-	Invitrogen™
<i>B. licheniformis</i> 44 MB82/G	разгражда необработено нишесте, <i>amyL</i>	Tonkova, 1991
<b>Плазмиди</b>		
pJET2.1/blunt	Amp <sup>r</sup> , T7 промотор, <i>rep</i> (MB1)	Thermo Scientific Inc.
pJETamyBL	Amp <sup>r</sup> , T7 промотор, <i>rep</i> (MB1), <i>amyL</i>	Tsvetanova et. al., 2014
pCR®2.1-TOPO®	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , f1 ori, pUC ori, <i>Plac</i> , <i>lacZα</i>	Invitrogen™
pCRamyBL	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , f1 ori, pUC ori, <i>Plac</i> , <i>amyL</i>	Tsvetanova et. al., 2014
<b>Праймери</b>		
<i>amyF</i> <sup>a</sup>	5'-gtgtaggattccatgaaacaacggctttac-3'	Tsvetanova et. al., 2014
<i>amyR</i>	5'-gattccgttctatctttgaacataaattgaaacc-3'	Tsvetanova et. al., 2014
pJET2.1-forward	5'-cgactcactataggagagcggc-3'	Thermo Scientific Inc.
pJET2.1-reverse	5'-aagaacatcgattttccatggcag-3'	Thermo Scientific Inc.

<sup>a</sup>Нуклеотидите, представени с наклонен шрифт представляват клонираната в *Klebsiella* последователност Shine-Delgarno

### 3.3. Изолране на геномна ДНК

Тоталното количество геномна ДНК е изолирано от 24-часова култура *B. licheniformis* 44 MB82/G с GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), като се спазват препоръките на производителя.

### **3.4. Изолитране на плазмидна ДНК**

Пречистването на плазмидната ДНК е извършено с GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### **3.5. PCR**

За PCR-амплифицирането на генът *amyL* са използвани праймерите *amyF* и *amyR* (Biomers.net GmbH, Ulm, Германия; табл.1.) и смес за PCR-GeneAmp® High Fidelity PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) с краен обем 50 µL, концентрация на праймерите 0.5 pmol/µL и геномна ДНК от *B. licheniformis* 44 MB82/G - 2 ng/µL. PCR реакцията е проведена в апарат QB-96 Satellite Gradient thermal cycler (LKB Vertriebs GmbH, Vienna, Австрия) при следния температурен профил: начална денатурация при 94 °C за 3.5 min, 35 цикъла, състоящи се от: една минута денатурация при 94 °C, 45 секунди хибридизация на праймерите при 55°C, елонгация – 2 минути на 72°C, последвани от финална фаза на елонгация при 72°C за 5 минути. Получените PCR - продукти са разделени и визуализирани електрофоретично на 1 % - ен агарозен гел при 60 V за 50 минути.

### **3.6. Клонитране на генът *amyL***

Намноженият посредством PCR ген *amyL* е пречистен с GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Швеция) и е клониран във вектор с тъпи краища pJET 2.1 (2974 bp) според инструкциите на CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, САЩ). Полученият конструкт е обозначен като pJETamyBL и е използван за секвениране на *amyL*. От този конструкт с рестрициране на Xho I/Xba I е получен рестрикционен фрагмент, съдържащ *amyL* (New England Biolabs, MA, САЩ). Фрагментът е клониран във вектор pCR®2.1-TOPO® под контрола на *lac* промотор. Конструктът е наречен pCRamyBL.

### **3.7. Трансформация на бактериалния щам и отделяне на амилаза**

Щамът *E. coli* DH5α е използван като гостоприемник, с помощта на който са мултиплицирани плазмидите pJETamyBL и pCRamyBL. Поръчани са компетентни клетки MAX Efficiency® DH5α™ от Invitrogen™ Life Technologies™ Co. Приготвени са

компетентни клетки на *K. pneumoniae* G31 с кит за бактериална трансформация TransformAid™ (Fermentas, Thermo Fischer Scientific Inc.).

Качествените анализи на способността на получените трансформанти да секретират  $\alpha$  - амилазния ензим са проведени на петрита със среда LB с добавено 0.5 % нишесте. След 24-часово култивиране при 37 °C получените бактериални колонии са обработени с разтвор на I<sub>2</sub>/KI. Около колониите, в чиито клетки фрагментът е успешно клониран и се експресира, се образува жълта зона поради липса на нишесте.

### **3.8. Нуклеотидни секвенционни анализи на *amyL***

Генът *amyL* е секвениран от MacroGen Inc. (Амстердам, Холандия) с праймери pJET2.1F и pJET2.1R, съответно работещи в права и в обратна посока. Секвенционните анализи са проведени с помощта на програмите Chromas и CAP3 (<http://genome.es.mtu.edu/cap>). Съпоставката на получената нуклеотидна последователност с данните от GenBank е извършена посредством програмите BLASTN и ClustaW. Предполагаемата белтъчна структура на амилазата е анализирана с програмата ExPASy (Swiss Institute of Bioinformatics). Нуклеотидната последователност на гена е депозирана в базата данни на NCBI GenBank под номер KF261567.

### **3.9. Условия за култивиране на генно – модифициран щам *K. pneumoniae* G31 - A**

Периодичните ферментационни процеси с *K. pneumoniae* G31 - A с клониран плазмид pCRamyBL са проведени на колби от 500 mL, съдържащи 100 mL хранителна среда M7d със съдържание (g/L): картофено нишесте (Fluka) – 40 ÷ 300, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 4.9, CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O - 3, KCl - 0.4, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0.2, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0.02, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0.01, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0.001, дрождев екстракт-5 (pH=7.0). Добавени са 75 µg/mL канамицин. Колбите са посяти с 24-часов инокулум със същата хранителна среда. За експериментите, проведени при начални концентрации на нишесте 40 g/L е използван 2 % - ен инокулум, а за всички други - 10 % - ен. Процесите са проведени на клатачка (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, САЩ) при 37 °C. Скоростта на

разбъркването е 200 грт при експериментите с начална концентрация на нишесте 40 g/L и 240 грт при тези с начална концентрация на нишесте 100, 200 и 300 g/L.

Проведени са и процеси с добавяне на  $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), глицин или  $\text{CaCl}_2$  (Sigma). След вземане на пробите, супернатантите са филтрувани през филтри с големина на порите 0.2  $\mu\text{m}$  (Minisart®, Sartorius Stedim Biotech, Германия) и анализирани за амилазна активност, неразградено нишесте и съдържание на разтворими метаболити.

### ***3.10. Аналитични методи***

#### ***3.10.1. Определяне на разтворими метаболити***

Количественото определяне на разтворимите метаболити е извършено с високоефективна течна хроматография (HPLC). Съдържанието на 2,3-БД, ацетоин, етанол, оцетна, сукцинова и млечна киселина е анализирано с хроматографска колона Bio-Rad Aminex HPX-87H, темперирана на 65 °C и е детектирано на базата на промяна на рефрактометричен индекс, използван за 2,3-БД, ацетоина и етанола (RI детектор), или чрез UV абсорбция при дължина на вълната 210 nm, като за целта е използван детектор с променлива дължина на вълната Knauer за измерване съдържанието на органичните киселини. Като мобилна фаза е използвана 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  с дебит 0.6 mL/min. Глюкозата, малтозата и олигозахарите са разделени с хроматографска колона Bio-Rad HPX-42A при 85 °C и детектирани с RI детектор (Perkin-Elmer 10). Мобилната фаза е дестилирана вода с дебит 0.6 mL/min.

#### ***3.10.2. Определяне на нишесте***

Съдържанието на нишесте е определено чрез измерване на светлинната абсорбция на комплекса нишесте-йод при дължина на вълната 580 nm (Nakashimura, 1981).

#### ***3.10.3. Определяне на ензимна активност и количество белтък***

Извънклетъчната амилазна активност на супернатантата е определена по метода на Pantshev et. al. (1981) при pH=6.0 (0.1 mol/L цитрат-фосфатен буфер) и температура 37 °C. За целта е измерена комплексообразуващата способност на

нишестето с йод. Една единица амилазна активност се дефинира като количеството на ензима, който хидролизира 1  $\mu\text{mol}$  нишесте за една минута. Една единица специфична амилазна активност е амилазната активност, измерена на милиграм тотален извънклетъчен белтък. Съдържанието на белтък е определено по метода на Bradford (1976).

#### **3.10.4. Определяне на биомаса**

При култивиране със субстрат глюкоза клетъчния растеж е определен чрез измерване на оптичната плътност на културата (при средите без нишесте) при дължина на вълната 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) със спектрофотометър UV-1600PC (VWR).

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

### **4.1. Изучаване влиянието на различни компоненти на хранителната среда при ферментация на глюкоза от *K. pneumoniae* G31**

Тъй като за целево клониране бе избран ген за екстрацелуларна  $\alpha$ -амилаза, очакваните продукти от неговото действие биха били главно малтоза и глюкоза. По тази причина изборът за трансформация щам *K. pneumoniae* G31 бе тестван като продуцент на 2,3-БД от глюкоза в хранителни среди с различен състав. Проведени са периодични процеси с начална концентрация на субстрата 55 g/L, като се работи със средите, посочени в табл.2 (с изключение на среда M7d). За процесите, целящи оптимизирането на хранителните среди с участието на дивия щам, са използвани такива среди, производни на публикуваните в научната литература като най-подходящи за щама - среда №3 (M3) (Ji et. al., 2008), среда №4 (M4) (Zhao et. al., 2009) и среда №7 (M7) (производна на хранителната среда, използвана от Ma et. al., 2008), или различни комбинации - среди №5, 6, 7a, 7b, 7c, 7d.

**Табл.2. Компоненти на хранителните среди**

Компонент	Среда								
	M3	M4	M5	M6	M7	M7a	M7b	M7c	M7d
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	13.7	-	13.7	-	-	-	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	2.0	-	2.0	-	-	-	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/ L)	3.3	-	3.3	3.3	4.91	4.91	4.91	4.91	4.91
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/ L)	6.6	5.35	6.6	5.35	-	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/ L)	0.25	-	0.25	-	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/ L)	0.05	-	0.05	-	0.02	0.02	0.02	-	-
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/l L)	0.001	-	0.001	-	-	-	-	0.001	0.001
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/ L)	0.001	-	0.001	-	0.01	0.01	0.01	-	0.01
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O (g/ L)	0.01	-	0.01	-	-	-	-	0.01	-
EDTA (g/ L)	0.05	-	0.05	-	-	-	-	-	-
KCl (g/ L)	-	0.75	-	0.75	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O(g/ L)	-	13.8	-	13.8	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/ L)	-	0.28	-	0.28	-	-	-	-	-
Цитрат (g/ L)	-	0.42	-	0.42	-	-	-	-	-
YE (g/ L)	-	2.0	2.0	2.0	5.0	2.0	2.0	5.0	5.0
Бактопептон (g/ L)	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-
Солеви разтвор* (µl/l)	-	300	-	300	-	-	-	-	-
Натриев ацетат (g/ L)	-	-	-	-	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

\*Солеви разтвор (g/L): ZnCl<sub>2</sub>-34.2, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O-2.7, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O-10, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O-0.85, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-0.31.



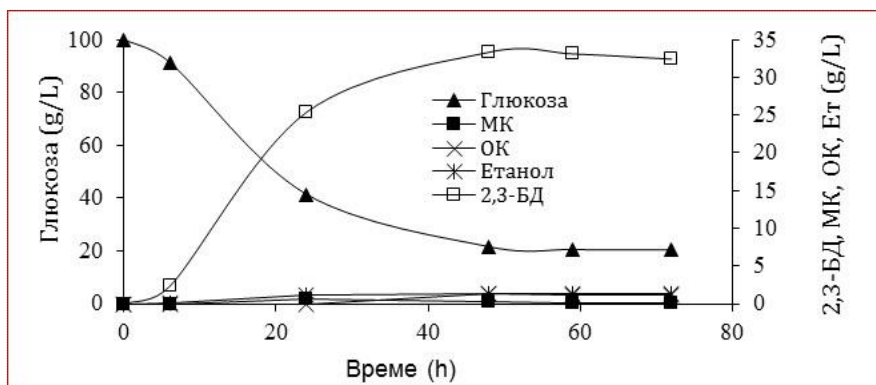
Резултатите показват, че най-подходяща за щама и продуцирането на 2,3-БД е среда М7 и нейните производни среди - М7а, М7б, М7с. Установява се, че глюкозата е напълно изконсумирана за 24 часа и се достигат най-високи концентрации на диола - съответно 20.89, 19.70, 19.30 и 20.72 g/L (табл.3). Разликата между среда М7а, М7б и М7с е в концентрацията на дрождевия екстракт и пептона. Среда М7с е със същия състав като този на среда М7, но с добавени ZnSO<sub>4</sub> (0.001 g/L) и CaCl<sub>2</sub> (0.01 g/L). От долупосочените резултати е видно, че колкото по-висока е концентрацията на дрождевия екстракт в хранителната среда, толкова по-голямо е превръщането на глюкозата в 2,3-БД. Количеството на добавения пептон обаче не оказва съществено влияние върху добива на диола. Добавянето на ZnSO<sub>4</sub> и CaCl<sub>2</sub> не влияе в голяма степен върху крайната концентрация на 2,3-БД (20.72 срещу 20.89 g/L), нито върху степента на конверсия на глюкозата в 2,3-БД.

**Табл.3.** Концентрации на глюкозата и разтворимите продукти след 24-часов ферментационен процес при следните условия: начална концентрация на глюкоза - 55 g/L, неконтролирана киселинност на средата, скорост на разбъркване - 200 rpm. Означение: 2,3-БД - 2,3-бутандиол, МК - млечна киселина, ОК - оцетна киселина.

<b>Концентрации на глюкозата и продуктите при различните хранителни среди (g/L)</b>								
	<b>М3</b>	<b>М4</b>	<b>М5</b>	<b>М6</b>	<b>М7</b>	<b>М7а</b>	<b>М7б</b>	<b>М7с</b>
Глюкоза	27.17	41.42	14.27	24.83	3.57	7.60	5.60	4.51
2,3-БД	11.02	6.50	15.41	12.87	20.89	19.70	19.30	20.72
МК	0.72	0.43	2.20	0.16	-	-	0.40	0.60
ОК	0.92	1.19	0.56	0.30	0.25	0.90	0.65	0.49
Етанол	1.58	0.60	2.57	0.98	3.44	2.60	2.70	3.82

Поради това, че най-високи концентрации на 2,3-БД са получени при среди М7 и М7с, с тях са проведени периодични ферментационни процеси с висока начална концентрация на глюкоза - 100 g/L. За да се изучи поотделно влиянието на ZnSO<sub>4</sub> и CaCl<sub>2</sub> върху процеса, е съставена нова хранителна среда - М7d, в която освен

основните компоненти на среда M7, е добавен и ZnSO<sub>4</sub> (0.001 g/L). Резултатите показват, че най-подходящата хранителна среда за получаването на 2,3-БД е именно M7d (фиг. 1). В този случай, най-високият добив на 2,3-БД е 33.34 g/L (табл. 4), най-високата продуктивност - 0.69 g/Lh и най-високата степен на превръщане на глюкозата - 0.851 mol/mol. Не се установява значителна разлика в количествата на другите продукти на ферментационния процес - етанол, млечна и оцетна киселина. Консумацията на глюкозата е най - висока при среда M7, но степента ѝ на конверсия до 2,3-БД е най - ниска (0.766 mol/mol).



**Фиг.1.** Кинетика на разграждане на глюкоза и формиране на метаболити при култивиране на *K. pneumoniae* G31 в среда M7d.

**Табл.4.** Концентрации на консумирана глюкоза и формирана биомаса и продукти след 24 часа култивиране в среди M7, M7c и M7d. Ферментационни условия: начална концентрация на глюкоза - 100 g/L, неконтролирана киселинност на средата, разбъркване - 200 rpm, 37°C.

Хранителна среда	Консум. глюкоза (g/l)	2,3-БД (g/l)	Степ. на превр. на 2,3-БД (mol/mol)	МК (g/l)	ОК (g/l)	Етанол (g/l)	Биомаса (OD <sub>600</sub> )
M7	82.19	31.56	0.766	-	2.99	4.96	2.600
M7c	72.90	29.15	0.798	-	3.32	5.51	2.359
M7d	78.39	33.34	0.851	0.85	3.55	4.03	2.461

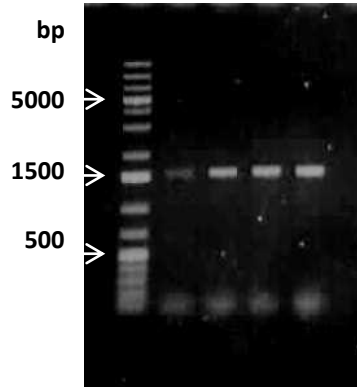
## **4.2. Получаване на 2,3-БД от нишесте с рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31 – А**

### **4.2.1. Клониране и секвенционни анализи на гена *amyL* от *B. licheniformis* 44 MB82/G**

Генът *amyL* от *B. licheniformis* 44 MB82/G е амплифициран като PCR-фрагмент, като е използвана двойка праймери *amyF* и *amyR*, клониран във вектор pJET2.1 с тъп край, получавайки се конструкта pJET $\alpha$ myBL (фиг.2).

Генът се състои от 1,539 двойки бази (фиг.3), започва с кодон ATG и кодиращ полипептид, състоящ се от 512 аминокиселини с молекулно тегло 58.5 kDa. Той съдържа сигнален пептид с дължина 29 аминокиселини. Протеинът притежава съхранената доменна структура, типична за амилазите. Каталитичната последователност от три аминокиселини „DED” (Asp, Glu, Asp) е на позиции съответно 260, 290 и 357. Аминокиселинните остатъци 42, 99, 134, 225, 227, 258, 260-264, 290, 292, 293, 319, 356 и 357 формират активния център на ензима. Остатъците Asn и Asp (N, D, D) са локализирани на позиции 133, 223 и 229, формирайки възможно Ca – Na - Ca място за свързване.





**Фиг. 3.** PCR амплификация на фрагмент, съдържащ гена *amyBL* на *Bacillus licheniformis*.

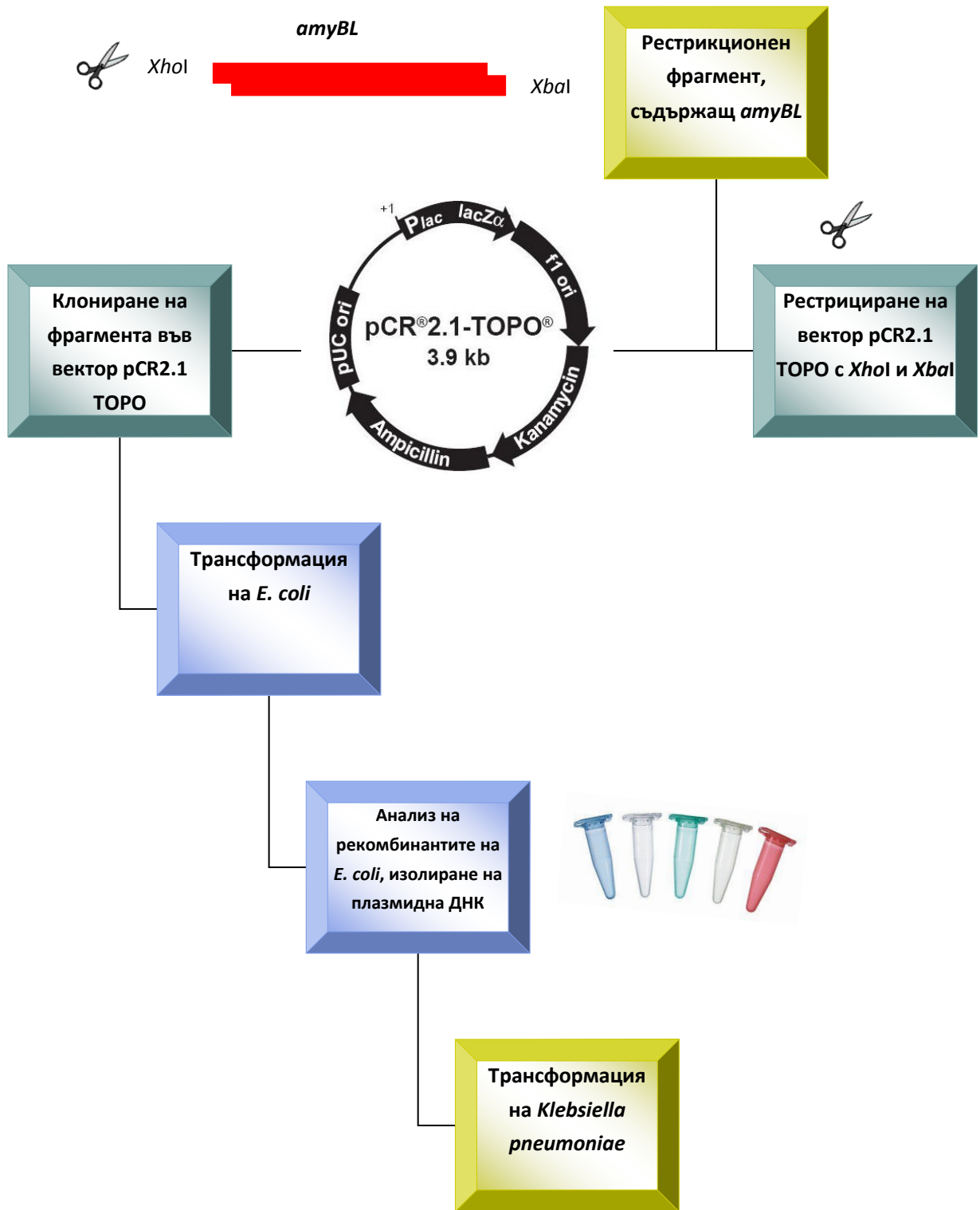
Данните от нуклеотидната последователност са депозираны в базата данни на NCBI Gen Bank под номер KF261567.1.

#### **4.2.2. Хетероложна експресия на гена *amyL* в *Klebsiella pneumoniae* G31 – А**

Важно условие, което предварително трябва да се вземе предвид при избора на вектор, осигуряващ експресията, е да се знае природната резистентност на дивия щам *K. pneumoniae* G31 към антибиотици. Установено е, че щамът е резистентен към всички проверени концентрации на ампицилин (50 – 200 µg/mL), тетрациклин (10 – 50 µg/mL) и еритромицин (15 – 45 µg/mL). Проявява чувствителност към високи концентрации на хлорамфеникол (50 µg/mL), но слабо се развива на 25 - 35 µg/mL. Щамът е силно чувствителен към канамицин и по тази причина този антибиотик е използван като селективен маркер.

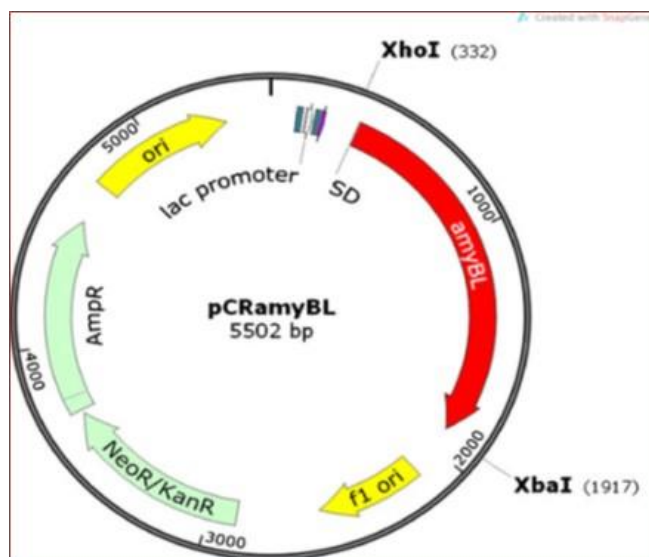
За клониране на гена *amyL* е избран вектора pCR2.1 – TOPO, съдържащ гени за резистентност към канамицин и ампицилин, както и сайтове за рестриктази XhoI и XbaI.

Конструктът pJETamyBL е рестрициран с рестриктази XhoI и XbaI, а получените фрагменти са разделени с гел – електрофореза. Фрагментът, съдържащ *amyL* е пречистен и клониран във вектора pCR2.1 – TOPO (фиг. 4).



Фиг.4. Схема на субклонирание на ген *amyL* от вектор pJET1.2 blunt във вектор pCR2.1 TOPO.

Полученият вектор е означен като pCRamyBL (фиг.5). Той е с големина 5502 двойки бази, съдържа гена *amyL* под контрола на *lac*-промотор, както и гени за резистентност към канамицин и ампицилин. С pCRamyBL е извършена трансформацията на *E.coli* DH5 $\alpha$ .



**Фиг.5.** Структура на вектора pCRamyBL. Конструктът съдържа ген *amyL* от *B. licheniformis* 44 MB82/G, клониран във вектор pCR<sup>®</sup>2.1 - TOPO<sup>®</sup> под контрола на *lac*-промотор.

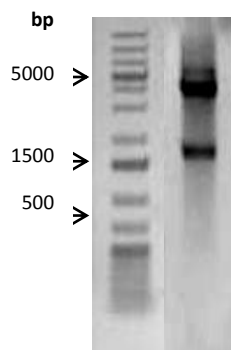
От получените трансформанти на *E.coli* е изолирана плазмидна ДНК, след което е извършена трансформация на *K. pneumoniae* G31.

Получените рекомбинантни клетки са посяти на твърда среда в петри, съдържаща 0.5 % нишесте и са наблюдавани зони (фиг. 6), в които нишестето е разградено, което потвърждава успешната експресия на гена *amyL* под контрола на *lac*-промотор.



**Фиг.6.** Жълти зони, образувани около колониите на клетките *K. pneumoniae*, в които клонирания фрагмент *amyL* се експресира

Щамът *K. pneumoniae* G31 е трансформиран с вектора pCRamyBL, изолиран от колония на *E. coli* DH5 $\alpha$  с положителна експресия на гена *amyL* (фиг. 7). Избран е рекомбинантният щам *K. pneumoniae* G31 – А, който демонстрира най-голяма зона, формирана от разградено нишесте върху агаровата среда.



**Фиг.7.** Рестрикционен анализ на плазмидна ДНК, изолирана от рекомбинантен клон на *E. coli* DH5 $\alpha$ , съдържащ pCRamyBL.

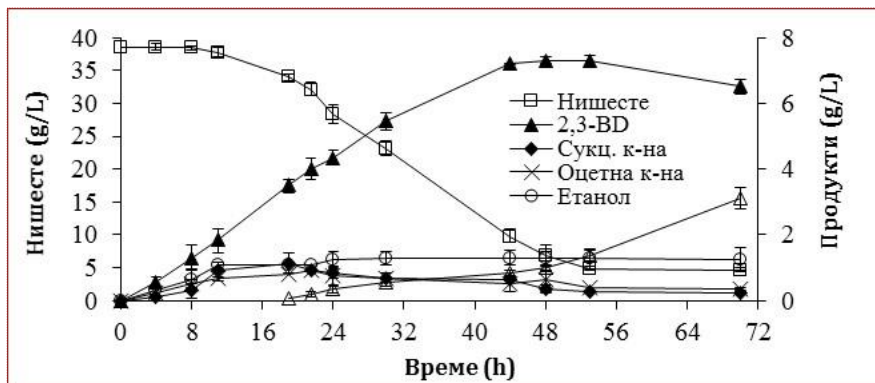
#### **4.2.3. Метаболитен профил на ферментацията на нишесте с рекомбинантния щам *K. pneumoniae* G31 – А**

Амилазната активност и формирането на продуктите при ферментацията на нишесте от родителския щам *K. pneumoniae* G31 и рекомбинантния щам *K.*



*pneumoniae* G31 – А са изучени при серия от периодични ферментационни процеси. Като хранителна среда е използвана предварително оптимизираната за получаване на 2,3-БД среда M7d. Тя съдържа йони на специфични микроелементи ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ), ацетатни йони, фосфати и азотни източници, необходими за повишаване на синтезирането на 2,3-БД от *K. pneumoniae*, осигурявайки минимално натрупване на странични продукти (Garg and Jain, 1995; Syu, 2001).

Дивият щам *K. pneumoniae* G31 се развива на среда с нишесте (поради наличие на дрождев екстракт, пептон и други елементи на средата), но не показва амилазна активност. 2,3-БД не се формира. За разлика от него, рекомбинантният щам, дори при липса на каквито и да е компоненти, повишаващи амилазната секреция, хидролизира  $\sim 35$  g/L нишесте за 48 часа и синтезира 7.3 g/L 2,3-БД. Скоростният профил на разграждането на нишесте с начална концентрация 40 g/L и получените от *K. pneumoniae* G31 – А метаболити са показани на фиг.8.



**Фиг.8.** Кинетика на разграждането на нишесте и формирането на продуктите при периодичен ферментационен процес с рекомбинантния щам *K. pneumoniae* G31 – А; начална концентрация на нишесте – 40 g/L, 200 грт, неконтролирано рН, 37 °С.

#### 4.3. Влияние на IPTG върху синтезирането на 2,3-БД

Поради това, че транскрипцията на гена *amyL* се осъществява под контрола на *lac*-промотор, е изследвано влиянието на добавянето на различни концентрации на индуктора IPTG (изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид), неметаболизиращ се аналог на лактозата. Добавени са три различни концентрации на IPTG (0.1, 1 и 1.5 mM) в началото на процеса. В табл. 5 са представени степента на разграждането на нишестето, амилазната активност, общото количество на извънклетъчния белтък и

концентрациите на синтезираните метаболити, съответно с добавен индуктор и при липса на такъв. Посочени са резултатите на 24-тия час от ферментационния процес.

От таблицата се вижда, че добавянето на IPTG оказва положителен ефект по отношение на хидролизата на нишестето чрез увеличаване на експресията на гена *amyL*. С повишаване концентрацията на IPTG, амилазната активност се повишава почти два пъти от 7.95 U/mL (без добавяне на индуктора) до 13.44 U/mL (1.5 mM IPTG). Количеството на продуцираните 2,3-БД и другите течни метаболити на 24-тия час от ферментационния процес показват, че концентрации на индуктора над 1 mM не оказват съществено влияние върху процеса. Поради това, всички следващи експерименти са проведени с добавяне на 1 mM IPTG към хранителната среда.

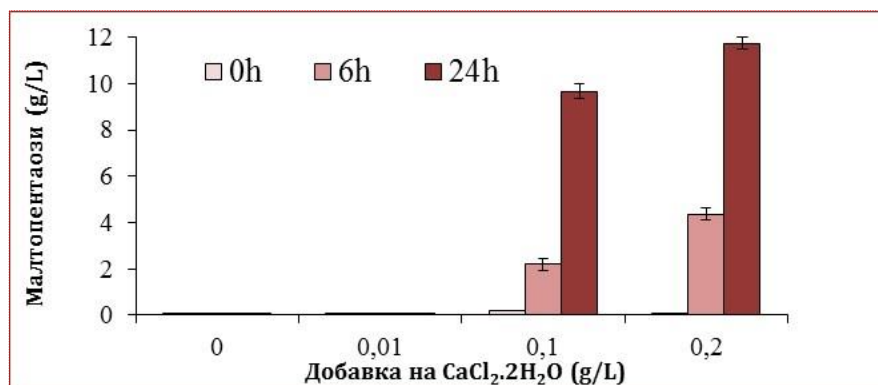
#### **4.4. Влияние на $Ca^{2+}$ върху получаването на 2,3-БД**

Известно е, че  $Ca^{2+}$  играят ролята на силен кофактор за дейността на  $\alpha$ -амилазите. Поради това, с цел допълнително увеличаване на амилазната активност и съответно добив на 2,3-БД, към средата, съдържаща 1 mM IPTG са добавени и  $Ca^{2+}$  под формата на  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  в концентрации 0.01, 0.1 и 0.2 g/L. В сравнение със стойностите, получени при ферментационните процеси без добавяне на калциеви йони, добавянето на 0.01 g/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  оказва незначително влияние върху амилазната активност (16.68 U/mL), води до слабо намаляване на крайната концентрация на 2,3-БД (4.54 g/L) и леко повишава продуцирането на ацетоин и етанол. Десетократното и двадесетократното увеличаване на  $Ca^{2+}$  в средата води до съществено повишение в амилазната активност, която достига 65 - 68 U/mL на 24-тия час от ферментационния процес. Неочаквано, колкото по-висока е амилазната активност, толкова по-ниски са концентрациите на всички продукти на ферментационния процес (табл.6). При концентрации на  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1 и 0.2 g/L след 24 часа ферментация се получават съответно 2.46 и 0.47 g/L 2,3-БД.

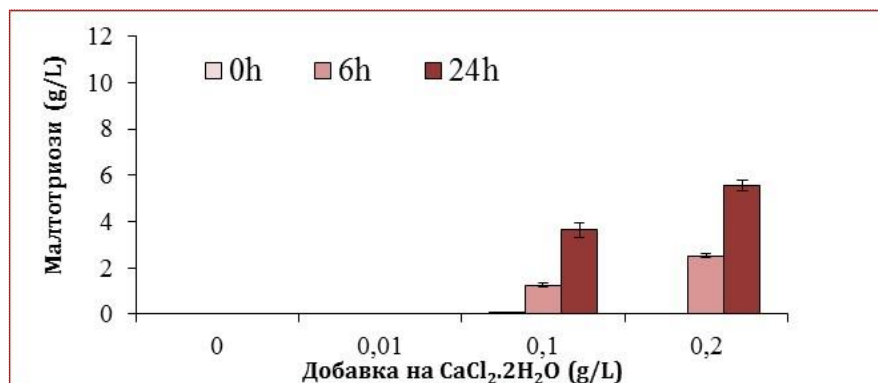


Количественото определяне на междинните съединения от хидролизата на нишесте показва, че по-високите концентрации на  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  водят до натрупване на олигозахариди със степен на полимеризация Dp2-Dp5. Най-голямо е акумулирането на малтопентаози (Dp 5) при процеса с 0.2 %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . В този случай за 24 часа ферментация се натрупват 11.2 g/L малтопентаоза (фиг. 9а), 5.5 g/L малтотриоза (фиг. 9б) и 1.8 g/L малтоза (фиг. 9с). Получените при тези експерименти стойности значително се различават от резултатите при процесите, проведени без добавка на калциеви йони, при които количеството на олигозахаридите със степен на полимеризация по-ниска от Dp 8 е пренебрежимо малко във всеки един момент.

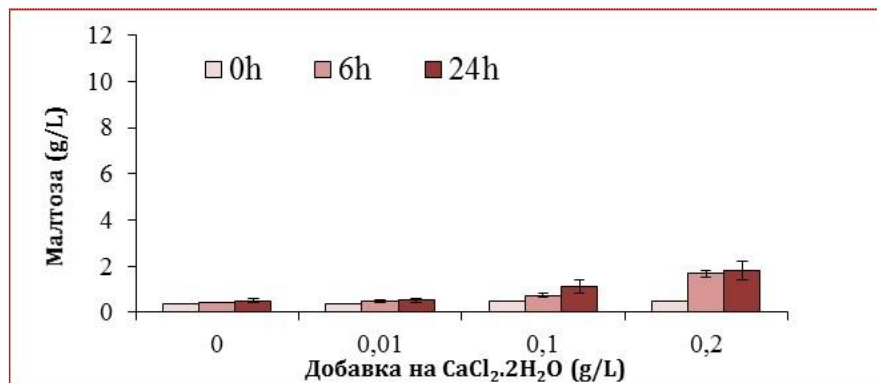
**а**



**б**



с



**Фиг.9.** Влияние на повишението на концентрацията на  $Ca^{2+}$  върху количеството на продуктите от разграждането на нишесте при периодичен ферментационен процес с рекомбинантния щам *K. рнеитопіае G31 – А*. Представена е кинетиката на натрупване на малтопентаозите (а), малтотриозите (b) и малтозата (с) в нулев, шести и 24 - ти час.

#### **4.5. Влияние на добавянето на глицин върху извънклетъчната амилазна активност и получаването на 2,3-БД**

С цел да се повиши пропускливостта на клетъчната мембрана и по този начин амилазния ензим да може безпрепятствено да излезе от бактериалната клетка, преди култивиране към хранителната среда са добавени различни концентрации глицин. За да се определи оптималната му концентрация върху процеса се експериментира с различни концентрации – 0.1 %, 0.3 %, 0.5 %, 0.6 %, 0.7 %. Влиянието на глицина върху извънклетъчната амилазна активност и получаването на 2,3-БД е отразено в табл.7.

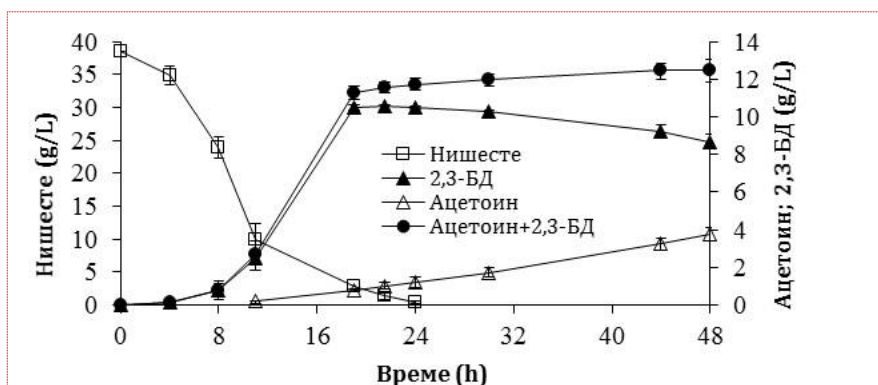
От таблицата става ясно, че най-висока концентрация на диола е достигната при добавяне на 0.5 % глицин – 10.54 g/L (което отговаря на 41.5 U/mL амилаза и 198 U/mg специфична активност), а най-ниска, при добавяне на 0.7 % глицин – 1.61 g/L 2,3-БД.

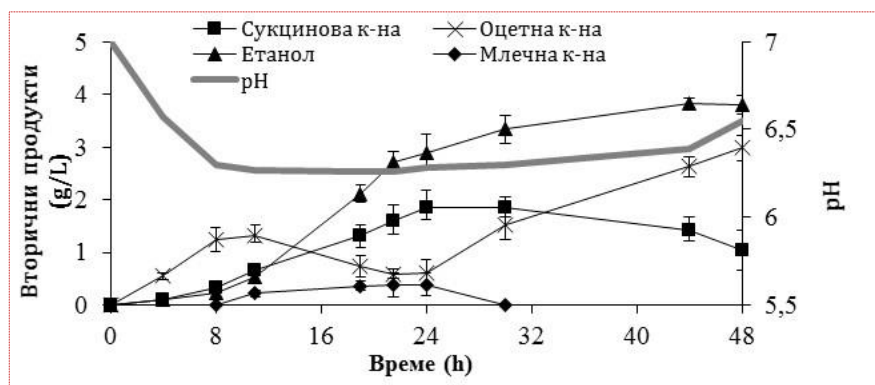
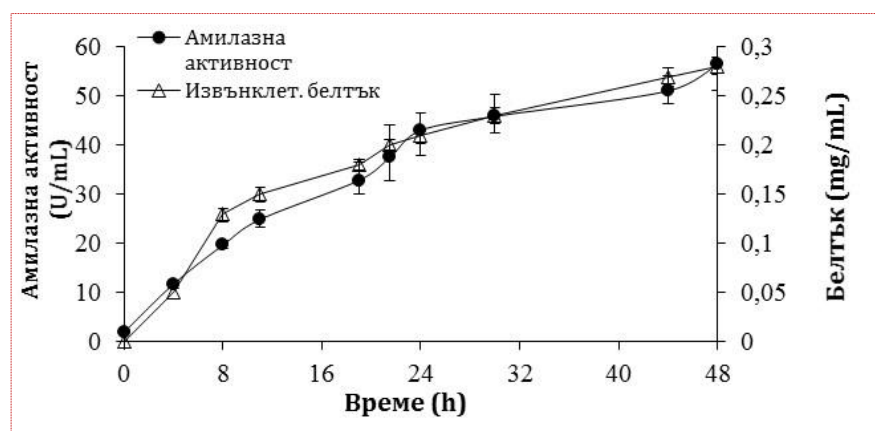


На фиг. 10а е илюстрирана кинетиката на хидролизата на нишесте и формирането на главния продукт по време на този процес. Всички 40 g/L нишесте са напълно разградени между 19-тия и 24-тия час на ферментационния процес, което съвпада и с пика в концентрацията на 2,3-БД. Ацетоинът е регистриран в забележими количества около 11-тия час от процеса. Общото количество на 2,3-БД и ацетоина леко се повишава около края на процеса, достигайки 12.5 g/L на 48-ия час, като концентрацията на ацетоина непрекъснато се увеличава за сметка на тази на 2,3-БД.

Образуването на киселините и етанола е представено на фиг. 10b. Тяхното количество се изменя в процеса на ферментацията на нишесте: концентрациите на млечната и сукциновата киселина нарастват до 24-тия час на процеса, след което спадат, като млечната киселина изцяло се разгражда. Оцетната киселина се натрупва през първите 10 часа на процеса, след което намалява, достигайки минимална стойност-0.6 g/L (едновременно с рязкото увеличение в концентрацията на 2,3-БД) и равномерно се увеличава до края на процеса. Концентрацията на етанола също равномерно се повишава. Амилазната активност нараства до края на процеса (фиг. 10c), както и общото извънклетъчно белтъчно съдържание, което вероятно се дължи на клетъчен лизис. рН на културата се понижава от 7.0 до 6.3 до 8-ия час от процеса и отново се повишава до 6.5 в края.

**а**



**b****c**

**Фиг.10.** Профил на периодичния ферментационен процес на хидролизата на нишесте с начална концентрация 40 g/L с рекомбинантния щам *K. pneumoniae* G31 – А в среда с добавка на 1 mM IPTG и 0.5 % (w/v) глицин. (а) разграждане на нишесте и натрупване на 2,3-БД и ацетон; (b) формиране на етанол и киселини и рН; (c) изменение на амилазната активност и общо съдържание на извънклетъчен белтък.

#### 4.6. Конверсия на високо концентриран разтвор на нишесте

След оптимизацията на процеса при ниски начални концентрации на нишесте с цел получаване на максимален и икономически изгоден добив на 2,3-БД, рекомбинантния щам *K. pneumoniae* G31 – А е култивиран в среди с нишесте с начална концентрация 100, 200 и 300 g/L. Поради по-високите начални

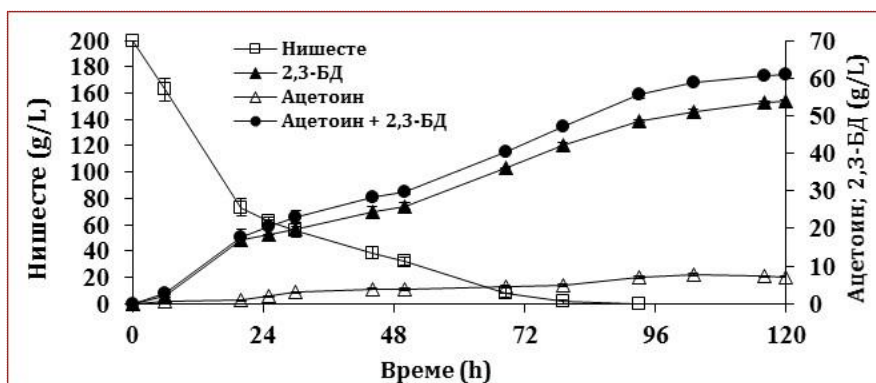


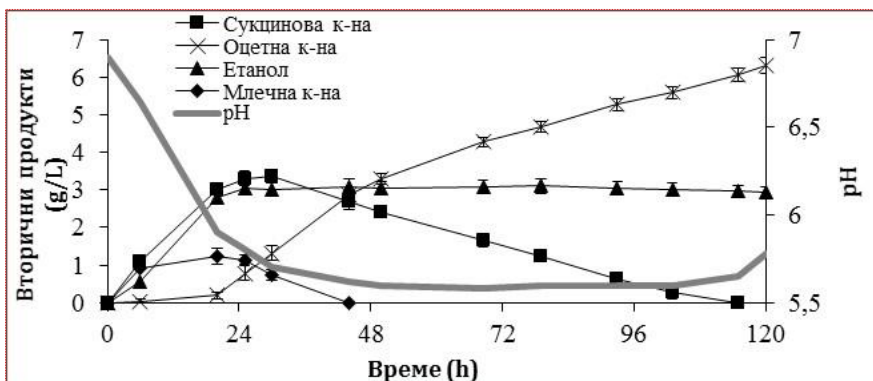
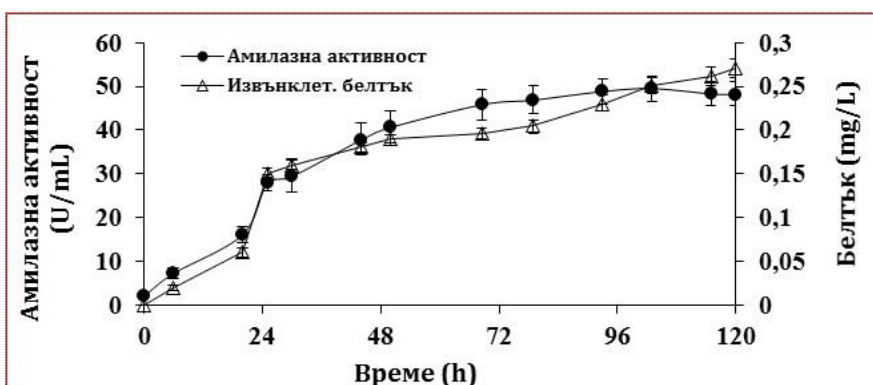
концентрации на нишесте, хидролизата му протича малко по-бавно в сравнение с описаните по - горе периодични процеси.

Най-високата крайна концентрация на 2,3-БД (53.8 g/L) е достигната при процеса с начална концентрация на нишесте 200 g/L (табл.8), което е изцяло метаболизирано след 90 часа ферментация.

Кинетиката на усвояване на субстрата и продуциране на диоли при процесите с начална концентрация на нишесте 200 g/L са показани на фиг. 11а. След 120 часа ферментация, максималната концентрация на 2,3-БД е 53.8 g/L, а тази на ацетоина – 7.13 g/L. В края на процеса са натрупани и други метаболити: оцетна киселина (6.31 g/L) и етанол (2.93 g/L). Техният дял остава нисък, което е индикация, че условията на култивиране благоприятстват формирането на диолите. Млечната и сукциновата киселина се формират в началото на процеса и след това се разграждат (фиг. 11b). Амилазната активност се повишава до 96-тия час на ферментационния процес и след това слабо се понижава (фиг. 11c). рН спада до ниски стойности в сравнение с ферментационните процеси с начална концентрация на нишесте 40 g/L и е със стойности около 5.7 в периода между 48-мия и 110-тия час.

а

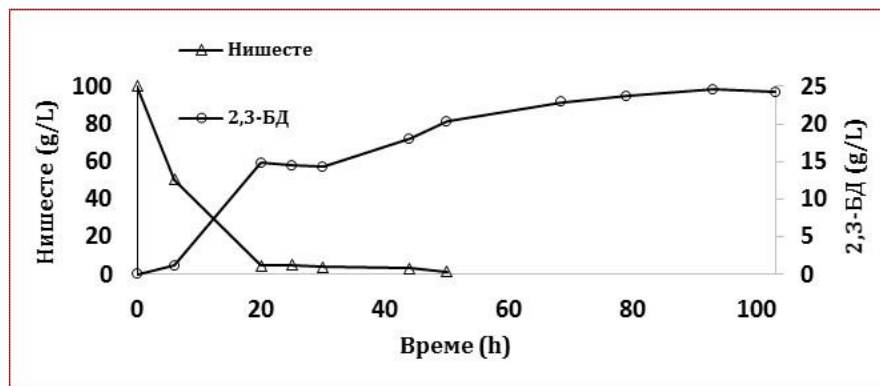


**b****c**

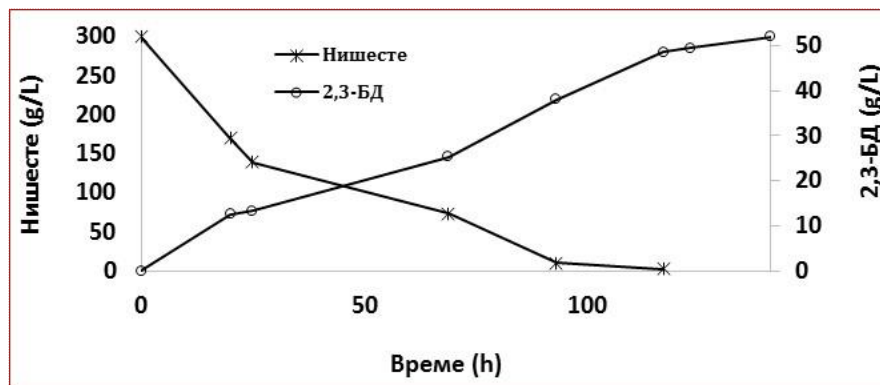
**Фиг. 11.** Кинетика на периодични ферментационни процеси с начална концентрация на нишесте 200 g/L с рекомбинантния щам *K. рнеитопіае* G31 – А в среда с 1 mM IPTG и 0.5 % глицин. (а) разграждане на нишесте и натрупване на 2,3-бутандиол и ацетонин; (b) формиране на страничните продукти и изменение на pH; (c) изменение на амилазната активност и общо съдържание на извъклетъчен белтък.



На фигури 12 и 13 са показани кинетиките на разграждане на нишесте с начална концентрация съответно 100 и 300 g/L и натрупване на 2,3-БД.



**Фиг.12.** Кинетика на периодичен ферментационен процес с начална концентрация на нишесте 100 g/L и натрупване на 2,3-бутандиол с рекомбинантния щам *K. рлеитопіае* G31 – А в среда с 1 mM IPTG и 0.5 % глицин.



**Фиг.13.** Кинетика на периодичен ферментационен процес с начална концентрация на нишесте 300 g/L и натрупване на 2,3-бутандиол с рекомбинантния щам *K. рлеитопіае* G31 – А в среда с 1 mM IPTG и 0.5 % глицин.

100 g/L нишесте са изцяло метаболизирани за 30 часа, а 300 g/L, за 120 часа. Крайната концентрация на общото диолно съдържание (2,3-БД + ацетоин), получена при процесите с 200 и 300 g/L начални концентрации на нишесте е почти еднаква (60.9 – 61 g/L общо съдържание на диоли).

## 5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Независимо от използвания субстрат, 2,3-бутандиолът винаги се продуцира в смес от киселини и етанол, чието количество намалява добива му. В този смисъл, от ключово значение е подбирането на условия, при които максимално да се намали продуцирането им. Киселинността на средата и аерацията са най-важните фактори, насочващи метаболизма към продуциране на един или друг продукт в смесено-киселата ферментация. Повечето анаеробни процеси са съпътствани с образуване на органични киселини. По този начин по време на ферментационния процес средата се окислява, а растежа на клетки и конверсията на субстрата постепенно намаляват, тъй като бактериалната култура се инактивира от собствените си продукти.

Съставът на хранителната среда представлява фактор от съществено значение за ферментационния процес. Няма строго определена хранителна среда за производството на 2,3-БД поради това, че различните микроорганизми-продуценти на диола имат различни изисквания.

Като се вземат предвид получените експериментални резултати от глюкозната ферментация, се оказва, че най-важният компонент на хранителната среда, който влияе върху получаването на 2,3-БД е дрождевият екстракт. От проведените процеси става ясно, че този компонент чувствително повишава консумацията на глюкозата и съответно крайната концентрация на получения 2,3-БД. От друга страна, компонентът е скъп и повишава цената на продукта. Опитите да се замени дрождевия екстракт с пептон водят до намаляване на количеството на получения 2,3-БД.

Известно е, че метални йони като  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , използвани като кофактори повлияват в значителна степен производството на диола в ензимозависимата реакция (Garg and Jain, 1995; Syu, 2001; Qin et. al., 2006). Получените експериментални резултати доказват, че добавката на  $Zn^{2+}$  под формата на  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  повишава крайната концентрация на синтезирания 2,3-БД с 6 % (от 31.56 до 33.334 g/L), както и продуктивността – с 11 % (от 0.766 mol/mol до 0.851

mol/mol). Тези стойности са близки до получената максимална теоретична степен на превръщане.

Известни са два метаболитни пътя за разграждане на нишесте при дивия щам *Klebsiella pneumoniae*. Първият включва извънклетъчното му разграждане с пулуланаза, свързана с повърхността на клетката и последващо разкъсване на  $\alpha$ -1,4-гликозидните връзки на линейните малтодекстрини. При вторият път нишестето се конвертира извънклетъчно до циклодекстрини (CDs), чрез което се преодолява външноклетъчната линеаризация от циклодекстриназата (*cymH*), а линейните малтодекстрини се включват в пътя за разграждане на малтозата. Като се има предвид локализацията в клетката на други нишесте-разграждащи ензими в *Klebsiella*, малтодекстрин-глюкозидазата се намира в цитоплазмата, малтохексахидролазата – в периплазменото пространство, а пулуланазата е свързана към външната клетъчна мембрана. Нито един от тези ензими не е извънклетъчен, дори никой от тях не може да натрупа значителни количества редуциращи захари или линейни малто-олигозахариди, които да могат да се редуцират до 2,3-БД (Gawande and Patkar, 2001).

Поради това, с цел да се постигне получаване на 2,3-БД чрез директна конверсия на нишесте, е избран подхода на хетероложната експресия. За най-подходящ е определен генът *amyL* от *B. licheniformis*. Анализите на неговата нуклеотидна последователност показват 100 % идентичност с гена *amyL* от *B. licheniformis* DSM 8785 и гена *amyS* от *B. licheniformis* NCIB 8061.

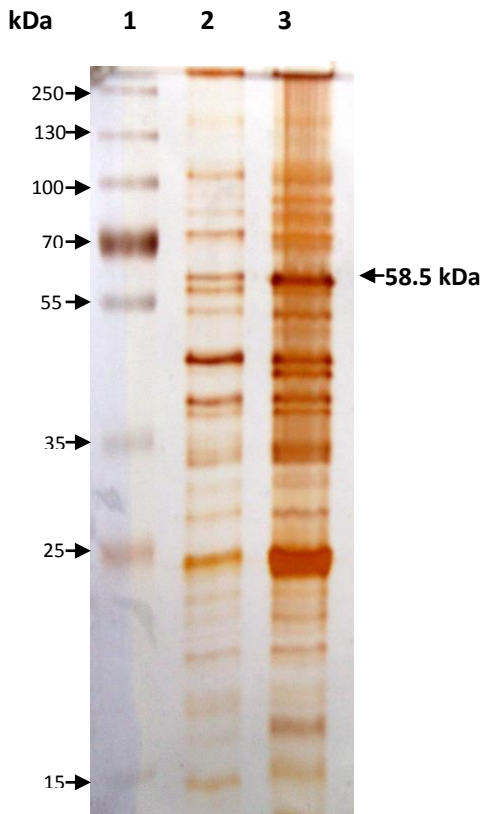
Хетероложната експресия на гени, изолирани от Грам-положителни бактерии създава доста усложнения при клонирането им в Грам-отрицателни гостоприемници. Сред тях са изборът на промотор и ефективния му контрол, подходящи последователности Shine-Delgarno, както и физичните бариери в клетката, подтискащи секрецията на белтък. Резултатите показват, че изборът на *amyL* от *B. licheniformis* в този смисъл е особено сполучлив. Поради това, че в *Klebsiella pneumoniae* G31 – А гена *amyL* е под контрола на *lac*-промотор от *E. coli*, се очаква неговата експресия да зависи от индуктора IPTG. Изненадващо, щамът *Klebsiella pneumoniae* G31 – А, не съдържащ клониран от *E. coli lac*-репресор също експресира в значителна степен гена *amyL*. Причината е, че рекомбинантният конструктор

pCRamyBL съдържа *lac*-промотор от *E. coli*, но не носи гена *lacI*, кодиращ съответстващия му *lac*-репресор. Това води само до частична репресия на *lac*-промотора от хромозомния репресор на *K. pneumoniae*. Сравнени, аминокиселинните последователности на *lac*-репресорите от *E. coli* и *K. pneumoniae*, имат сходство между 96 и 98 %, което обяснява слабата репресия на *lac*-промотора от страна на *lac*-репресора на *K. pneumoniae* с конформационни несъответствия.

Често срещан проблем, наблюдаващ се при извънклетъчната белтъчна експресия от Грам-отрицателни бактерии е бариерата на цитоплазмената мембрана. Получените високи стойности на извънклетъчна амилазна активност навеждат на предположението, че сигналния пептид пренася амилазен ензим до периплазмата. Анализирани, неговата аминокиселинна последователност разкрива наличието на участък с положително заредени аминокиселини, завършващ с азотен край (MKQKRLYAR), последван от изключително дълъг хидрофобен "h"-участък (LLTLLFALIFLLPHSAAAA), за който е известно, че подобрява контакта между сигналния пептид и цитоплазмената мембрана (Ismail et. al., 2011). Извънклетъчната секреция на амилазата в културалната среда показва, че сигналния пептид на ензима е функционален в *Klebsiella*. Електрофорезата в полиакриламиден гел (SDS - PAGE) на супернатантата, не съдържаща клетки показва, че ензима притежава същото молекулно тегло като предполагаемото – 58.5 kDa (фиг.14).

Следващото препятствие, което съпътства секрецията на рекомбинантния белтък е външната клетъчна мембрана. Хетероложните белтъци обикновено се натрупват в периплазменото пространство. Правени са опити да се улесни секрецията им. Глицинът е често срещан компонент на хранителната среда, съдействащ за секрецията на рекомбинантните ензими в културалната среда на *E. coli* (Li et. al., 2009). Същата зависимост е наблюдавана и при експериментите с *Klebsiella*. Повишената извънклетъчна секреция на рекомбинантните ензими под действието на глицина може да бъде обяснено с повишената проницаемост на клетъчната мембрана. Като цяло, колкото по-високо е количеството на глицина, толкова по-висока е извънклетъчната амилазна активност. При концентрации на глицин по-високи от 0.6 % обаче, общото количество извънклетъчен белтък рязко

се повишава поради клетъчния лизис, а специфичната амилазна активност се понижава.



**Фиг.14.** Извънклетъчната свръхекспресия на гена *атуL* от рекомбинантния щам *Klebsiella pneumoniae* G31 – А, демонстрирана от SDS – PAGE електрофореза на белтъчното съдържание в безклетъчните екстракти. Сравнението между контролната култура (без индуктор) и културата, развита в присъствие на 1 mM IPTG и 0,5 % глицин показва повишена секреция на рекомбинантната амилаза при втората култура. Анализите са направени с 12 %-ен гел и Mini - PROTEAN® Tetra Cell (BioRad Laboratories, CA, USA) и последваща обработка с оцветяващ гел, след 24 часа култивиране на *Klebsiella pneumoniae* G31 – А. Като контрола за определяне на белтъчното тегло се използва PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Освен повишената експресия, по-висока извънклетъчна амилазна активност може да бъде постигната чрез добавяне на кофактори на  $\alpha$ -амилазата в извънклетъчното пространство. Добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$  (които не присъстват в основната хранителна среда) се смята за необходимо условие за стабилизирането на  $\alpha$ -амилазите от род *Bacillus* (Nagihara et. al., 2001). В случая с *Klebsiella pneumoniae*



G31 – А при високи концентрации на  $\text{Ca}^{2+}$  (0.1 – 0.2 g/L  $\text{CaCl}_2$ ), активността на амилазата се увеличава, което от своя страна води до бързо натрупване на олигозахариди, състоящи се от два, три и пет глюкозни остатъка. Натрупването на Dp5 води до цялостно забавяне на хидролизата на олигозахаридите а също така и до намалено продуциране на 2,3-БД. Наблюденията, че малтопентаозите действат като инхибитор на амилазния ензим е в съгласие с публикуваното от Deutch (2002). Малтотриозата и малтозата затрудняват разграждането на нишестения полимер, като инхибират амилазата (Al Kazaz et. al. 1998).

По отношение на продуктивността на диолите, трябва да се отбележи, че резултатите, включени в настоящия дисертационен труд са първите публикувани, доказващи успешен процес на едновременно озахаряване и ферментация на нишесте до 2,3-БД. Рекомбинантният щам *Klebsiella pneumoniae* G31 – А е първия, способен да извърши едностъпална конверсия на нишесте до 2,3-БД и ацетоин във високи концентрации (табл. 8).

При хидролизата на нишесте с начална концентрация 200 g/L е достигнат 14 пъти по-висок добив (около 61 g/L общо диолно съдържание) от този, получен от нишесте чрез хомоложна експресия на други генетично манипулирани щамове на *Klebsiella*. За сравнение, рекомбинантният щам *Klebsiella pneumoniae* KG1 (pUC18K-amy) синтезира 3.8 g/L 2,3-БД и разгражда едва 20 g/L нишесте (Zheng et. al., 2008). Освен това, на високите крайни концентрации на диоли, получени с *Klebsiella pneumoniae* G31 - А съответства и висока продуктивност - 0.51-0.62 g/L/h. Тази продуктивност, въпреки че е постигната от много концентриран разтвор на нишесте, е значително по-висока, отколкото тази на рекомбинантният щам *Klebsiella pneumoniae* KG1 (pUC18K-amy) – 0.16 g/L/h (Zheng et. al., 2008). Степента на конверсия на нишесте в 2,3-БД също е много по-висока.

Общият добив на диоли е близък до този, получен при процеса на едновременно озахаряване и ферментация на грудки от земна ябълка - *Jerusalem artichoke* (Sun et. al., 2009) и целулоза, получена от царевични кочани (Cao et. al., 1997). Трябва обаче да се подчертае, че при тези експерименти озахаряването е проведено с киселини и промишлени ензими (инулиназа, целулази), предварителна обработка, която силно повишава разходите по процеса, докато в настоящия труд

както хидролизата на нишесте, така и продуцирания 2,3-БД са получени едновременно в един и същ процес с продуцирането на ензима.

## **6. ИЗВОДИ**

Въз основа на извършените експерименти и получените резултати могат да се направят следните заключения:

- 1. Конструиран е рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31 – А, в който е клониран ген за  $\alpha$ -амилаза от *Bacillus licheniformis* под контрола на индуцируем промотор *P*lac.***
- 2. Установено е, че максимални нива на експресия на гена *amyL* в *Klebsiella pneumoniae* G31 – А се постигат при добавка на 1 mM IPTG.***
- 3. Установено е, че добавяне на кофактора  $Ca^{2+}$  в средата повишава амилазната активност, но поради натрупването на олигозахариди води до намаляване на крайната концентрация на 2,3-БД.***
- 4. Установено е, че добавянето на глицин към средата улеснява транспорта на екстрацелуларната  $\alpha$ -амилаза през клетъчната стена, както и, че максимален добив на 2,3-БД се получава при добавяне на 0,5 % глицин.***
- 5. Рекомбинантният щам *Klebsiella pneumoniae* G31 – А е способен напълно да метаболизира високо концентрирани разтвори на нишесте – 20 % и 30 %.***
- 6. След метаболизиране на 200 g/L нишесте са получени 61 g/L диоли (53,8 g/L 2,3-БД и 7,1 g/L ацетоин), продуктивност – 0,51 g/Lh. Добив и продуктивност съответно 14 и 3 пъти по-високи от постигнатите до момента.***

## **7.ПРИНОСИ**

- 1. Създадена е първата успешна биотехнология за директно получаване на 2,3-БД от нишесте чрез рекомбинантен щам.***
- 2. За първи път е постигната хетероложна експресия на  $\alpha$ -амилаза с цел получаване на 2,3-БД.***

## СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

Tsvetanova, F., Petrov, K., Beschkov, V. 2013. Influence of the different media compounds on 2,3-butanediol production in glucose fermentation. *Journal of International Scientific Publications: Ecology and Safety*, 7: 257-261.

Tsvetanova, F., Petrova, P., Petrov, K. 2014. 2,3-butanediol production from starch by engineered *Klebsiella pneumoniae* G31 – A. *Appl Microbiol and Biotechnol* 98: 2441-2451.

-IF 3,337, цитирания: 4.

-Награда за най – добра работа на млад български микробиолог през 2013 г.

## УЧАСТИЕ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

Tsvetanova, F., Petrov, K., Beschkov, V. 2013. Influence of the different media compounds on 2,3-butanediol production in glucose fermentation.

### **ЗАБЕЛЕЖКИ:**

\* Номерата на таблиците и фигурите в автореферата не са идентични с тези в дисертацията.