

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ИНЖЕНЕРНА ХИМИЯ**

Калоян Кирилов Петров

**Биотехнологично получаване на
нискомолекулни продукти**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на научната степен

“Доктор на науките”

Професионално направление: 4.2. Химически науки

Научно жури:

1. чл. –кор. Атанас Павлов
2. проф. дтн Серафим Влаев
3. проф. дбн Мария Ангелова
4. проф. дбн Искра Иванова
5. проф. дбн Яна Топалова
6. проф. д-р Драгомир Янков
7. доц. д-р Людмила Кабаиванова

София 2018

Дисертационният труд съдържа въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане в три основни глави, изводи, основни приноси, литература и списък на авторските публикации по темата на дисертационния труд.

Обемът на дисертационния труд е 373 страници, включващ 32 таблици и 126 фигури. Списъкът на цитираната литература включва 705 източника. Броят на авторските публикации в пълен текст по темата е 30. От тях 16 са в списания с импакт фактор за съответната година, а 12 са отпечатани през последните 5 години (2013 – 2017). В 11 от публикациите авторът на дисертационния труд е първи, а в 21 – кореспондиращ автор. Публикациите са цитирани общо 383 пъти.

Авторът на дисертационния труд работи като професор в Института по инженерна химия – БАН (ИИХ – БАН) и е ръководител на лаборатория „Химични и биохимични реактори”.

Дисертационният труд е обсъден от Колоквиума на ИИХ-БАН за откриване на процедура по защита на заседание, състояло се на 29.10.2018г. (Протокол № 12/29.10.2018г.) и с решение на НС на ИЕЕС-БАН от 22.11.2018г. (Протокол № 14/22.11.2018г.) е открита процедура по защита на дисертацията. На заседание на Колоквиума на ИИХ-БАН от 29.11.2018 г. (Протокол №.13/29.11.2018г.) е извършена предварителна защита и с последващо решение на НС на ИЕЕС-БАН от(Протокол №)е избрано Научно жури в състав:

1. чл. –кор. Атанас Павлов (УХТ – Пловдив)
2. проф. дтн Серафим Влаев (ИИХ – БАН) (вътрешен член)
3. проф. дбн Мария Ангелова (ИМикБ – БАН)
4. проф. дбн Искра Иванова (Биол. Факултет – СУ)
5. проф. дбн Яна Топалова (Биол. Факултет – СУ)
6. проф. д-р Драгомир Янков (ИИХ – БАН) (вътрешен член)
7. доц. д-р Людмила Кабаиванова (ИМикБ – БАН)

Резерви:

1. проф. д-р Ирен Цибранска (ИИХ – БАН) (вътрешен член)
2. проф. дхн Богдана Куманова (ХТМУ)

Защитата на дисертационния труд ще се състои на в залата на ИИХ-БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 103, София.

Съдържание:

Въведение	6
1. Изводи от литературния обзор	10
2. Цел и задачи	13
3. Резултати и обсъждане	16
3.1. Получаване на ценни продукти от глицерол	16
3.1.1. Получаване на 2,3-бутандиол от глицерол	16
3.1.2. Получаване на 1,3-пропандиол от глицерол	37
3.2. Получаване на ценни продукти от нишесте	41
3.2.1. Получаване на 2,3-бутандиол от нишесте	41
3.2.2. Получаване на млечна киселина от нишесте	61
3.2.3. Получаване на етанол от нишесте	68
3.3. Получаване на ценни продукти от инулин	76
3.3.1. Получаване на млечна киселина от инулин	76
3.3.2. Получаване на фруктоза от инулин	93
4. Изводи	109
5. Основни приноси	114
6. Публикации по представените резултати	116

Използвани съкращения и означения:

1,2-ПД	1,2-Пропандиол (1,2-Propanediol)
1,3-ПД	1,3-Пропандиол (1,3-Propanediol)
1,4-БД	1,4-Бутандиол (1,4-Butanediol)
2,3-БД	2,3-Бутандиол (2,3-Butanediol)
3-ХПА	3-Хидроксипропионалдехид (3-Hydroxypropionaldehyde)
3-ХПК	3-Хидроксипропионова киселина (3-Hydroxypropionic acid)
АДФ	Аденозин дифосфат (Adenosine diphosphate)
АТФ	Аденозин трифосфат (Adenosine triphosphate)
ГА-3-Ф	Глицералдехид 3-фосфат (Glyceraldehyde-3-phosphate)
ДФ	Двуфазна ферментация (Two stage fermentation)
ДХАП	Дихидроксиалдехид фосфат (Dihydroxyaldehyde phosphate)
ДХАФ	Дихидроксиацетон фосфат (Dihydroxyacetone phosphate)
МЕК	Метилетилкетон (Methyl ethyl ketone)
МКБ	Млечнокисели бактерии (Lactic acid bacteria)
НАД	Никотинамид-аденин-динуклеотид (Nicotinamide adenine dinucleotide)
П	Периодичен процес (Batch)
ПП	Периодичен процес с подхранване (Fed-batch)
РК	Процес с рециклиране на клетките (Cell-recycle)
ТПФ	Тиамин пирофосфат (Thiamine pyrophosphate)
16S rRNA	16S рибозомална РНК (16S ribosomal RNA)
АВЕ	Ацетон-бутанол-етанолова ферментация (Acetone-butanol-ethanol fermentation)
Adh	Алкохол дехидрогеназа (Alcohol dehydrogenase)
Ald	Алдехид дехидрогеназа (Aldehyde dehydrogenase)
Amp ^r	Ген за резистентност към ампицилин (Ampicillin resistance gene)
ALDC	α -Ацетолактат декарбоксилаза (α -Acetolactate decarboxylase)
ALS	α -Ацетолактат синтаза (α -Acetolactate synthase)
Bcd	Бутирил-КоА дехидрогеназа (Butyryl CoA dehydrogenase)
BDH	2,3-Бутандиол дехидрогеназа (2,3-Butanediol dehydrogenase)
Bk	Бутират киназа (Butyrate kinase)
CCR	Въглеродна катаболитна репресия (Carbon catabolite repression)
CFU	Формиращи колонии единици (Colony-forming units)
Crt	Кротоназа (Crotonase)
DAR	Диацетил редуктаза (Diacetyl reductase)
DCW	Суша биомаса (Dry cell weight)
DP	Степен на полимеризация (Degree of polymerization)
FosE	β -фруктозидаза (β -fructosidase)

GDH	Глицерол дехидрогеназа (Glycerol dehydrogenase)
GDHt	Глицерол дехидратаза (Glycerol dehydratase)
IPTG	изопропил β -D-1-тиогалактопиранозид (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)
Kan ^r	Ген за резистентност към канамицин (Kanamycin resistance gene)
k _{La}	Обемен коефициент на пренос на кислород (Volumetric oxygen transfer coefficient) [h ⁻¹]
Ldh	Лактат дехидрогеназа (Lactate dehydrogenase)
OD	Оптическа плътност (Optical density)
OTR	Скорост на пренос на кислород (Oxygen transfer rate) [mol O ₂ /m ³ h]
OUR	Скорост на поглъщане на кислород (Oxygen uptake rate) [mol O ₂ /m ³ h]
PBE	1,3-Пропандиол-бутанол-етанолова ферментация (1,3-Propanediol (PDO)-butanol-ethanol fermentation)
PCR	Полимеразна верижна реакция (Polymerase chain reaction)
PDC	Пируват дехидрогеназен комплекс (Pyruvate dehydrogenase complex)
Pdh	Пируват дехидрогеназа (Pyruvate dehydrogenase)
PEP	Фосфоенол пируват (Phosphoenolpyruvate)
PDOR	Пропандиол оксиредуктаза (Propanediol oxidoreductase)
PFOR	Пируват-фередоксин оксиредуктаза (Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase)
Pi	Неорганичен фосфат (Inorganic phosphate)
Ptb	Фосфат бутилтрансфераза (Phosphate butyltransferase)
PTS	Фосфотрансферазна система за транспорт (Phosphotransferase transport system)
PKK	Пируват киназа (Pyruvate kinase)
RT PCR	Полимеразна верижна реакция с обратна транскрипция (Reverse transcription polymerase chain reaction)
RQ	Коефициент на дишане (Respiratory quotient) [-]
rpm	Обороти в минута (Reverse per minute)
SHF	Процес на конверсия в две отделни стъпки – хидролиза и ферментация (Separate hydrolysis and fermentation)
SSF	Процес на едновременно озахаряване и ферментация (Simultaneous saccharification and fermentation)
TCA	Цикъл на трикарбоновите киселини (Tricarboxylic acid cycle)
Thl	Тиолаза (Thiolase)
Δ pH	Корекция на pH с определена амплитуда
Δ t	Времени интервал между pH корекциите

ВЪВЕДЕНИЕ

Настоящият труд обхваща изследвания, проведени и публикувани в периода 2006 – 2017 г. Всички те имат подчертано приложна насоченост и са съсредоточени върху създаването и оптимизирането на биотехнологични процеси за получаване на ценни нискомолекулни съединения с широко приложение. Целта на описаните изследвания е тези незаменими за икономиката продукти да бъдат синтезирани чрез микробната конверсия на евтини, широко достъпни и получаващи се на възобновяем принцип субстрати, което да гарантира икономическата ефективност и конкурентноспособността на тяхното получаване.

В голямата си част, съединенията с най-широко приложение в промишлеността са нискомолекулни $C_2 - C_6$ съединения, притежаващи двойна връзка или поне една функционална група. Това обуславя тяхното разнообразно използване като горива, структурни елементи, реагенти или прекурсори за получаването на други химикали. В повечето случаи, тези съединения могат да се получат и химично, и биологично, като се комерсиализират методите от тази област, в която технологиите се развиват по-бързо. Така например, бурното развитие на нефтохимията и биотехнологиите през последното столетие доведе до честа смяна в методите на промишлено производство на много от тези съединения (ацетон, бутанол, оцетна к-на и др.).

В момента обаче, почти всички $C_2 - C_6$ съединения, имащи жизненоважно значение за световната икономика, се произвеждат като нефтопродукти. Биологичните методи на получаване (в т.ч. и микробното получаване) се реализират в индустрията само в отделни случаи, там където химичните методи са скъпи или трудно приложими. Тази констатация показва силната зависимост на индустриално развитите общества от нефтената индустрия, криеща рискове от задълбочаващи се екологични проблеми или пълно изчерпване на изкопаемите въглеродороди.

За да бъдат успешна алтернатива, биотехнологичните методи за получаване на $C_2 - C_6$ съединения се нуждаят от допълнително развитие. Основните причини за ниската конкурентноспособност на биотехнологичните производства са следните: (i) висока цена на използвания субстрат, често достигаща до над 50 % от крайната себестойност на продукта; (ii) нисък добив и слаба продуктивност; (iii) трудно и скъпоструващо извличане на продукта от ферментационната среда. За разрешаването на тези проблеми, основно се прилагат следните стратегии: (i) използване на нови, по-евтини и по възможност възобновяеми източници на въглерод; (ii) генетично модифициране на продуцентите с цел разширяване на

субстратният им спектър или повишаване на добивните им характеристики; (iii) усъвършенстване на методологията на извличане и пречистване на продукта.

Конкретно в настоящата дисертация са приложени първите две стратегии, като обект на изследване е получаването на четири от най-атраktivните понастоящем C₂ – C₆ съединения – 2,3-бутандиол, 1,3-пропандиол, млечна киселина и етанол, с многостранно приложение като структурни химикали, реагенти и горива. Предложен е и биотехнологичен процес за получаването на една суровина – фруктоза, до момента явяваща се като субстрат, но никога досега като продукт в процесите на микробна конверсия.

В момента на провеждане на представените изследвания, микробното получаване на тези съединения на лабораторно ниво е следното:

2,3-Бутандиолът се получен в значителни концентрации (до 150 g/L) и продуктивност (4.21 g/Lh) от глюкоза, но въпреки това, поради сравнително високата цена на този субстрат, както и поради проблеми с извличането (дестилация при 180 °C), този процес не може да се комерсиализира. Получените концентрация и добив 2,3-бутандиол от други субстрати са незначителни.

1,3-Пропандиолът се получава микробно единствено от глицерол, но поради НАД⁺ / НАД.Н зависимия метаболитен път на получаване, теоретичният добив е нисък и процесът е икономически неефективен. Надежда за евентуална комерсиализация дава съобщение за генетично модифициран щам *Escherichia coli*, метаболизиращ глюкоза директно до 1,3-пропандиол (135 g/L), избягвайки оксидативния път на разграждане при глицерола (виж Лит. обзор).

В лабораторни условия, етанол и млечна киселина са получавани на практика от всички видове субстрат – лигноцелулоза, нишесте, инулин, суроватка и др. При директната конверсия на полизахариди обаче, получените концентрации са много ниски. Поради това се прибегва до предварителни етапи на хидролиза (ензимна или с киселини), след което се ферментират хидролизати. Друг широко използван начин е кокултивирането на щамове с целулазна, амилазна или инулиназна активност и свръхпродуцент на продукта от монозахари. При всички положения обаче, процесът на получаване е двустъпален, което силно намалява икономическата му ефективност. От друга страна, в описаните процеси на едновременно озахаряване и ферментация, получените концентрации на продукт в повечето случаи не са достатъчни за осъществяване на промишлен процес.

В промишлен мащаб обаче, положението е коренно различно. От разглежданите нискомолекулни съединения, до момента чрез ферментация се получават единствено етанол и млечна киселина. Микробното получаване на 2,3-бутандиол и 1,3-пропандиол (от глюкоза и глицерол, съответно) засега не е конкурентноспособно и индустриално те се получават като нефтопродукти. Фруктозата (както и висококонцентрираните фруктозни сиропи) също не се получава микробно, а чрез мултиензимно разграждане на нишесте или по химичен

път. Трябва да се отбележи също, че комерсиалните производства на етанол и млечна киселина на практика се осъществяват единствено от захари – захароза и глюкоза при получаването на етанол и глюкоза при получаването на млечна к-на (получаването на етанол от царевица включва ензимно разграждане на нишестето до глюкоза преди микробната ферментация). До момента не е реализиран промишлен процес за директното им микробно получаване от полизахариди.

Поради тези причини, акцентът в представения материал е върху разработването на стратегии за получаването на съединенията (2,3-бутандиол, 1,3-пропандиол, млечна киселина, етанол и фруктоза) от атрактивни и възобновяеми източници в едностъпални и високоефективни микробни процеси, позволяващи реализацията им в производствен мащаб.

С тази цел, в дисертацията е разгледано микробното получаване на тези съединения от три вида субстрат – глицерол, нишесте и инулин. Интересът към конверсията и на трите субстрата е значителен (и към сегашния момент, и по време на провеждане на изследванията). Те са сравнително евтини и едни от най-широко достъпните възобновяеми източници на въглерод. Нишестето и инулинът са съответно вторият и третият по разпространение полизахарид в природата (след лигноцелулозата), а глицеролът, в качеството си на органичен отпадък от редица производства, също може да бъде класифициран като възобновяем ресурс. За усвояването на тези субстрати е използван метаболизма на различни естествени и генетично модифицирани организми, предимно бактерии.

Както ще стане ясно от изложението, в някои от случаите беше постигнат значителен успех, например при разработените технологии за получаване на 2,3-бутандиол от глицерол и нишесте или на млечна киселина и фруктоза от инулин. Някои от тези разработки оказаха силно влияние върху световните изследвания през следващото десетилетие, а за значителното им приложно значение говори и фактът, че на тяхна база бяха регистрирани множество американски и световни патенти (WO-2014013330-A3, US-9392796-B2, US-9476073-B2, US-9783832-B2, US-9845342-B2), чието заявяване, за съжаление, не можах да си позволя. В други случаи, въпреки положените значителни усилия, получените резултати бяха далеч от желаните. Така например, създадените конструкции за придаване на амилолитични качества, не сработиха в крайният гостоприемник за продуциране на етанол, а много от изолираните амилолитични организми, се оказаха неподходящи за промишлено получаване на млечна киселина. Приносът на тези изследвания е лимитиран единствено до чисто научният им аспект.

Относно написването на дисертацията, трябва да се отбележи, че направената литературна справка (както и въведението до момента) са релевантни към момента на провеждане и публикуване на експериментите, а не към момента на написване на дисертацията. Това е така, за да не възникне объркване относно приноса на представения материал. Причината за това разминаване е настъпилата

съществена разлика в познанието по представените теми през този период. Така например, експериментите свързани с получаването на 2,3-бутандиол от глицерол са проведени в периода 2007 – 2009 г., когато 2,3-бутандиолът все още не беше получен като главен продукт на глицероловата ферментация и не представляваше интерес в процесите на глицероловата конверсия. Поради това, направената литературна справка по темата е ограничена само до този период. В момента обаче, получаването на 2,3-бутандиол от глицерол като главен продукт е рутинна практика, обект на стотици публикации, които не са споменати в обзора (и които са силно повлияни от резултатите в представения материал). Подобно е и положението с изследванията върху млечнокиселите бактерии, продуценти на амилази и инулинази, съобщенията за които бяха изключителна рядкост преди десетилетие.

Поради големия обем на представения материал, описанието на места е максимално концентрирано, като подробностите могат да бъдат намерени в публикациите, чиито списък е представен в края на дисертацията. Първоначално ми намерение беше навсякъде направените означения и съкращения да бъдат на кирилица, а дименсиите на латиница. За съжаление, на отделни места това се оказва невъзможно. При представянето на някои от фигурите, например, част от оригиналните файлове не бяха намерени и бяха заменени с фигури с означения изцяло на латиница (както са били публикувани). На други места, това се наложи поради липса на общоприети български аналози на използваните термини.

Юни 2018

Калоян Петров

1. Изводи от литературния обзор

До момента, почти всички нискомолекулни органични съединения се произвеждат промишлено от изкопаеми въглеводороди. Непрекъснато повишаващата се консумация на енергоносители, горива, суровини и химикали, получени като нефтопродукти, на базата на различни преработки на суровия петрол, води до неизбежни последствия като изчерпване на природните ресурси, замърсяване на околната среда, климатични промени и циклични енергийни кризи. Поради това, в света се очертава нарастващо търсене на алтернативни източници на енергия. Микроорганизмите, способни естествено да продуцират много от тези горива и химикали, метаболизират възобновяеми субстрати, са една от тези обещаващи алтернативи. Чрез микробна ферментация на захари, като биопродукти, могат да се получат широк диапазон от нискомолекулни съединения, включващи карбоксилни к-ни, дикарбоксилни к-ни, хидрокси к-ни, аминокиселини, алкохоли, диоли и диамини.

Получаването на биопродукти чрез ферментация обаче, среща редица трудности и ограничения. Без тяхното преодоляване, биопродуктите не биха могли да се комерсиализират и всички приложени методи, техники и изследвания относно тяхното получаване, биха останали на лабораторно ниво. До момента, индустриално чрез ферментация, от разгледаните съединения се получават единствено лимонена и млечна киселини, етанол и 1,3-пропандиол. При тези съединения, актуални са стратегиите, водещи до допълнително снижаване на себестойността на продукта. Например, намирането (или създаването) на организми, осъществяващи ферментацията от по-евтини и атрактивни субстрати, както и допълнителното оптимизиране на технологиичните процеси (особено на процесите на извличане и пречистване).

Подобни са стратегиите и при получаването на други съединения, като сукцинова к-на, 2,3-бутандиол, 1,4-бутандиол, изобутанол и оцетна к-на, където е постигнат значителен напредък, но все още няма мащабни производства. При тези съединения обаче, настоящият акцент е най-вече върху оптимизирането на ферментационния процес. За момента, получените концентрации, добив и продуктивност на тези съединения, макар и значителни, не са достатъчни за комерсиализация.

При трети вид нискомолекулни съединения, биотехнологичното получаване е все още неефективно и много далеч от стопанска реализация. Тук усилията са насочени към изясняването на сложни биохимични процеси, докато технологичните проблеми остават на по-заден план. Така например, главен проблем при ферментационното получаване на бутанол е изключително ниската толерантност на организмите към разтворители. Досега не са известни щамове,

естествени или модифицирани, които да издържат дори 4 - 5 % бутанол. Дори да се намери (създаде) продуцент на тези до 50 g/L бутанол, това пак няма да е достатъчно за осъществяване на икономически ефективен процес. В този смисъл, при тази група съединения е нужен значителен пробив на молекулно ниво, за да стане възможно едно бъдещо производство.

Конкретно за разглежданите в настоящия труд съединения, от литературния обзор могат да се направят следните изводи:

- Като най-перспективни субстрати за получаване на нискомолекулни съединения чрез микробна ферментация, се считат лигноцелулозата, отпадният глицерол, нишестените и инулин съдържащите материали.
- Широкото им приложение, както и възможността да бъдат получени ферментационно като крайни метаболити, определят млечната киселина, етанола, 2,3-бутандиола и 1,3-пропандиола, като едни от най-атраактивните нискомолекулни съединения.
- Чрез микробна ферментация, 2,3-бутандиол (2,3-БД) се получава в значителни количества единствено от глюкоза. Известно е, че 2,3-БД може да се получи при метаболизиране на глицерол от редица организми, но до момента не е получаван като основен продукт. Максималната постигната концентрация 2,3-БД от глицерол за момента е едва 12.4 g/L, получени заедно с 50.9 g/L 1,3-пропандиол (Viebl et al., 1998). Имайки предвид огромните количества отпаден глицерол, получаващи се при производството на биодизел, получаването на един нов, ценен продукт от глицерол, би помогнало значително за валоризацията (остойностяването) на процеса.
- До момента не е известен продуцент на 2,3-БД, било то естествен или модифициран, притежаващ значителни амилолитични способности. Поради това, получаването на 2,3-БД от нишестени материали остава проблемно. Чрез хомоложна експресия на ген за амилаза в *Klebsiella pneumoniae* (Zheng et al., 2008a), е получен модифициран щам, продуциращ 3.8 g/L 2,3-БД – концентрация, крайно недостатъчна за осъществяване на икономически изгоден процес.
- Проблем при получаването на млечна киселина от инулин съдържащи субстрати, е липсата на продуценти, притежаващи инулинази. До момента, най-високата концентрация на МК, получена от инулин е 141.5 g/L (Ge et al., 2010), но тя е получена след ферментиране на ензимно хидролизиран субстрат. До момента, поради липса на подходящ организъм, не е осъществен SSF процес за директно получаване на МК от инулин съдържащ субстрат.
- Получаването на МК от нишесте е лимитирано от сравнително малкото, известни до момента, амилолитични МКБ. Намирането на нови,

амилолитични свръхпродуценти на МК, би било важна стъпка към комерсиализирането на процеса.

- Бактерията *Zytoponas mobilis* е може би най-обещаващия продуцент на етанол, притежаващ редица предимства пред най-използваният вид *S. cerevisiae*. Основен недостатък на *Z. mobilis* е изключително тесния субстратен спектър на вида – той може да ферментира единствено глюкоза, фруктоза и захароза. Естествените щамове *Z. mobilis* не могат да усвояват полизахаридите, намиращи се в природните материали, което лимитира използването им в мащабни производства. Включването на допълнителни гени в естествените изолати, осигуряващи разширяване на субстратния им спектър, би било от ключово значение за внедряването им в промишлеността.

Направените изводи са валидни до момента на публикуване на описаните в труда резултати.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целите на настоящия труд са поставени на базата на направените изводи от литературния обзор и могат най-общо да се формулират по следния начин:

Цел: Създаване на нови биотехнологични процеси за микробно получаване на нискомолекулни съединения с широко приложение (горива и химикали) от възобновяеми природни субстрати.

Конкретното изпълнение на тази цел е свързано с разработването на процеси за микробно получаване на пет $C_2 - C_6$ съединения с широко приложение - 2,3-бутандиол, 1,3-пропандиол, млечна киселина, фруктоза и етанол. За получаването им са избрани три от най-атраактивните към момента възобновяеми източника на въглерод - глицерол, нишесте и инулин.

В зависимост от настоящето състояние на изследванията, поставянето на конкретни задачи за изпълнение, както и вида на методите и техниките, които трябва да бъдат приложени, са строго специфични за различните процеси.

Задачи:

Получаване на 2,3-бутандиол и 1,3-пропандиол от глицерол:

- Изолиране и характеризиране на щамове, способни да продуцират диоли от глицерол.
- Селекция на продуцентите и избор на щам, способен да усвоява високи концентрации глицерол.
- Установяване на оптималните условия за получаване на 2,3-бутандиол от глицерол (за конкретния продуцент).
- Получаване на 2,3-бутандиол като основен продукт на глицероловата ферментация.
- Установяване на оптималните условия за получаване на 1,3-пропандиол от глицерол за избрания продуцент.

Получаване на 2,3-бутандиол от нишесте:

- Избор на щам, свръхпродуцент на 2,3-бутандиол от глюкоза.
- Установяване на оптималните условия за получаване на 2,3-бутандиол от глюкоза.

- Избор на ген за за екстрацелуларна α -амилаза, който да бъде въведен в продуцента на 2,3-бутандиол, така че да му придаде нужните амилолитични качества.
- Създаване на генетично модифициран организъм, способен да конвертира нишесте директно до 2,3-бутандиол с високи концентрации.
- Оптимизиране на условията за постигане на максимална експресия на гена за амилаза в избрания продуцент.
- Оптимизиране на условията за получаване на максимална секреция на ензим в хранителната среда.
- Оптимизиране на условията за получаване на максимални концентрация, добив и продуктивност на 2,3-бутандиол от нишесте.

Получаване на млечна киселина от нишесте:

- Изолиране и характеризиране на амилолитични МКБ.
- Установяване на капацитета на амилолитичните МКБ да конвертират нишесте директно до млечна киселина в процес на едновременно озахаряване и ферментация.
- Установяване на оптималните процесни параметри и състав на хранителната среда за получаване на високи концентрация, добив и продуктивност на млечна киселина от нишесте.

Получаване на етанол от нишесте:

- Избор на щам, свръхпродуцент на етанол.
- Избор на ген за екстрацелуларна α -амилаза, който да бъде въведен в продуцента.
- Избор на вектор за пренос, както и промотор, под чийто контрол генът за амилаза да се експресира в клетките на гостоприемника.
- Създаване на генетично модифициран организъм, способен да конвертира нишесте директно до етанол.
- Установяване на оптималните параметри за максимален добив на етанол от нишесте.

Получаване на млечна киселина от инулин:

- Избор на инулин-съдържащ субстрат.
- Изолиране и характеризиране на продуценти на млечна киселина, притежаващи ензими с β -фруктозидазна активност (инулинази).

- Осъществяване на процес на директна конверсия на инулин в млечна киселина, чрез едновременно озахаряване и ферментация (SSF-процес).
- Установяване на условията за постигане на максимална инулиназна активност.
- Установяване на оптималните условия за получаване на млечна к-на от инулин.

Получаване на фруктоза от инулин:

- Определяне на ключовите параметри, способстващи едновременно за ускоряване на процеса на хидролиза и за възпрепятстване на процеса на ферментация в хода на процеса на микробна конверсия на инулин в млечна киселина.
- Установяване на оптималните условия за микробно получаване на фруктоза от инулин.

3 РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

3.1. Получаване на ценни продукти от глицерол

3.1.1. Получаване на 2,3-бутандиол от глицерол

До момента, за целево получаване на 2,3-БД са използвани различни субстрати, но не и глицерол. Известно е, че 2,3-БД се явява вторичен метаболитен продукт при ферментацията на глицерол от род *Klebsiella*, но в доста ниски концентрации. Главен продукт на тази смесено кисела ферментация е 1,3-пропандиолът (1,3-ПД), а главен вторичен продукт – млечната киселина. Единствената насочваща информация е, че добивът на 2,3-БД от глицерол се увеличава при неконтролирано рН на средата (Biebl et al., 1998).

Избор на щам-продуцент

С намерение да се изолират щамове усвояващи глицерол, първоначалната селекция е извършена на петрита с 10 g/L глицерол и 1.2 % агар, посяти с разредени проби от различни източници. Изолирани са 58 различни щамове, усвояващи глицерол в присъствието на различни азотни източници (пептон – от 0 до 10 g/L; дрождев екстракт – от 0 до 10 g/L). От тях са селектирани изолатите, продуциращи двата най-ценни метаболита - 1,3-пропандиол и 2,3-бутандиол.

По нататъшната селекция на продуцентите е извършена на течни среди с повишаваща се концентрация на глицерол – 25 и 50 g/L. Едва три от тях – G9, G31 и G46 (9-ти, 31-ви и 46-ти щам, усвояващи глицерол) са способни напълно да изконсумират 25 g/L глицерол. Морфологичните характеристики на трите изолата показват, че те са пръчковидни, неподвижни бактерии, формиращи големи, светли и блестящи колонии с гладък ръб. Физиологичните и биохимични тестове показват вероятната им принадлежност към вид *Klebsiella pneumoniae* - факултативни анаероби, грам-отрицателни, оксидазо-отрицателни, каталазо-положителни, не генериращи H₂S бактерии, способни да ферментират всички въглехидрати, характерни за вида.

Секвенирането на гените за 16S rRNA на трите изолата, потвърждава определянето им като *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. Сравнението на секвенциите с тези от световната база данни (NCBI) показва, че нуклеотидната последователност на гена на щам G31 има 99 % идентичност с тази на типовия щам *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883^T (секвенция Y17656), докато

нуклеотидната последователност на гена при щамовете G9 и G46 показва 99 % идентичност с други ATCC щамове - MGH 78578 (секвенция на пълен геном NC009648) и щам *K. pneumoniae* TUA01 (секвенция DQ185604), съответно.

С трите щаме са проведени периодични процеси без рН контрол, при температура 35 °С, разбъркване 200 rpm, в среда с начална концентрация на глицерол 50 g/L. На Табл. 1 са показани продуктите и изконсумираните количества глицерол след 4 дневна (96 h) ферментация на трите щаме.

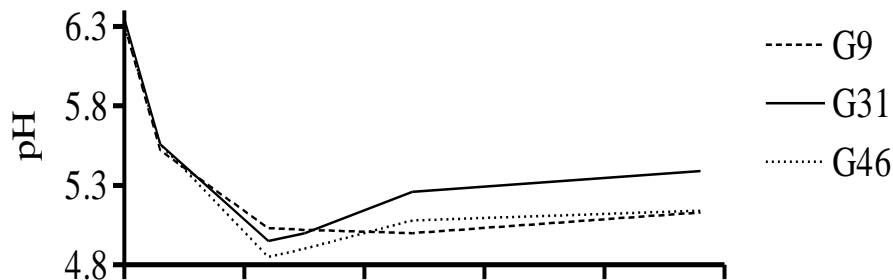
Таблица 1. Процентно количество усвоен глицерол с начална концентрация 50 g/L и ферментационни продукти при процеси без рН контрол, осъществени от *Klebsiella pneumoniae* G9, G31 и G46. 1,3-ПД – 1,3-пропандиол, 2,3-БД – 2,3-бутандиол, ОК – оцетна киселина, МК – млечна киселина.

Щам	Консумиран глицерол (%)	Ферментационни продукти (g/L)				
		1,3-ПД	2,3-БД	ОК	МК	Етанол
G9	40	6.78	2.42	1.15	1.48	1.72
G31	100	8.29	8.96	0.58	1.83	2.83
G46	54	8.19	7.22	1.47	1.68	1.54

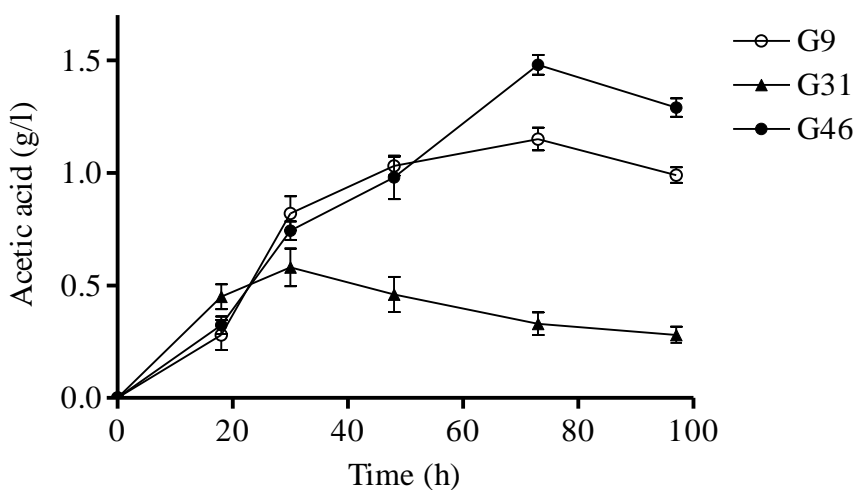
От направения експеримент се вижда, че единствено щам G31 е способен напълно да изконсумира 50 g/L глицерол за 96 часа. Сравнението с другите два щаме (G9 е усвоил 40 %, а G46 – 54 % от субстрата) показва, че G31 притежава много по-висока толерантност към високи концентрации на субстрат. Щамове G31 и G46 продуцират значително повече диоли от G9: G31 продуцира 8.29 g/L 1,3-ПД и 8.96 g/L 2,3-БД, G46 – 8.19 g/L 1,3-ПД и 7.22 g/L 2,3-БД. Също така, и трите щаме продуцират оцетна киселина (ОК) (0.58 – 1.47 g/L), млечна киселина (МК) – (1.48 – 1.83 g/L) и етанол (1.54 – 2.83 g/L).

И в трите случая, рН на средата намалява по време на ферментацията (за 24 часа от 6.4 до 4.8) поради натрупването на киселини (Фиг. 1). Интересно е да се отбележи, че щам G31 продуцира значително по-малко ОК (Фиг. 2) от G9 и G46, въпреки значително по-високата си консумация на субстрат. От фигурата се вижда, че при G31, ОК престава да се акумулира в средата още след първото денонощие, след което значително намалява до края на ферментацията. Съответно, рН на средата се понижава до 4.8 на 24-ти час, след което плавно се покачва до края на

ферментацията (5.3 – 5.5). Вероятно G31 ре-асимилира продуцираните количества ОК.



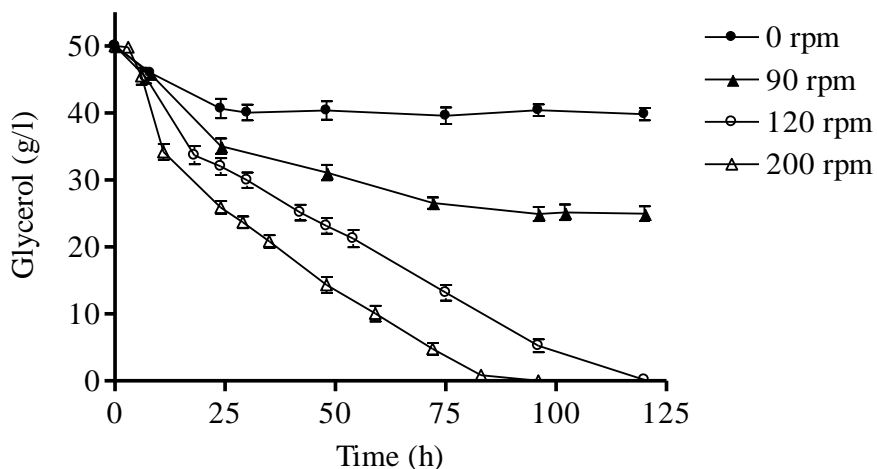
Фигура 1. Изменение на рН на средата при ферментация на 50 g/L глицерол от щамове *Klebsiella pneumoniae* G9, G31 и G46.



Фигура 2. Кинетика на формиране и ре-асимилиране на оцетна киселина при ферментация на 50 g/L глицерол от щамове *Klebsiella pneumoniae* G9, G31 и G46.

За установяване на влиянието на скоростта на разбъркване върху усвояването на глицерол от G9, G31 и G46, са проведени аналогични опити при скорост на разбъркване 90 и 120 rpm, както и в статично състояние, без разбъркване. Резултатите показват, че скоростта на усвояване се влияе силно от скоростта на разбъркване и при трите изолата. Най-отчетливи обаче, са разликите в консумацията на глицерол при G31, може би, поради по-високата степен на консумация на изолата. На Фиг. 3 са показани кинетиките на усвояване на глицерол

от G31 при различните обороти на клатачния апарат. Вижда се, че с увеличаване на оборотите, скоростта на метаболизиране на глицерола се увеличава.



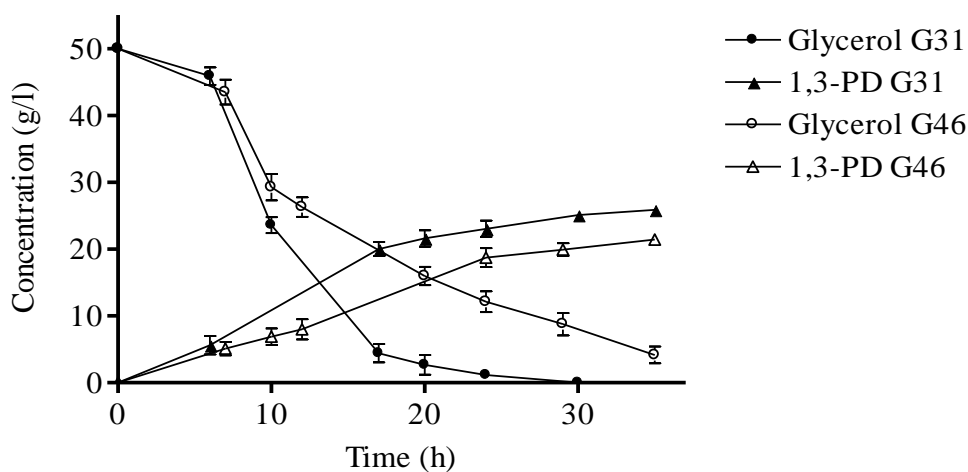
Фигура 3. Влияние на скоростта на разбъркване при ферментация на 50 g/L глицерол от щам *Klebsiella pneumoniae* G31.

От литературата е известно, че глицеролът се транспортира през клетъчната стена от мембранен транспортерен белтък (Huang et al., 2002), така че влиянието на разбъркването може да се обясни с увеличените конвекция и масообмен при по-високите скорости на разбъркване.

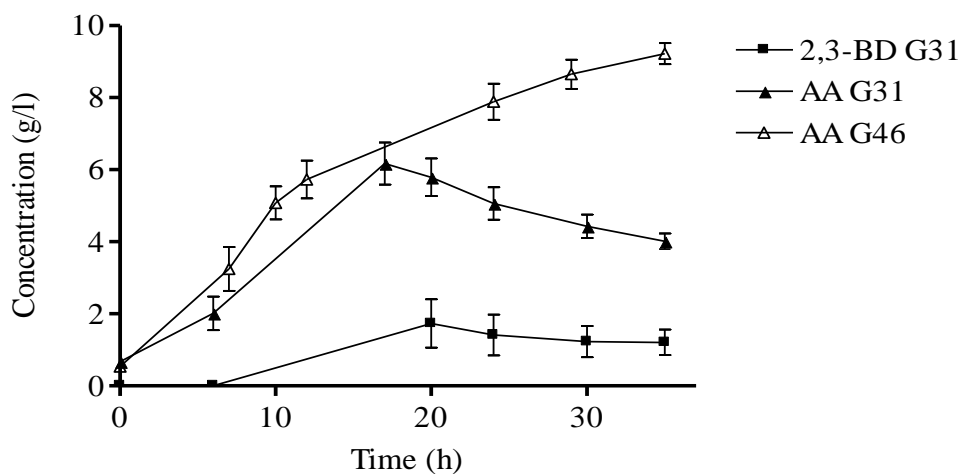
От направените дотук експерименти се вижда, че най-перспективен за получаване на 2,3-БД от глицерол е щам G31, докато за получаване на 1,3-ПД обещаващи са и G31 - поради по-високата си субстратна толерантност, и G46 - поради по-високата степен на конверсия на глицерол в 1,3-ПД (добив - g продуциран 1,3-ПД / g консумиран глицерол).

За уточняване на предимствата на двата щам като продуценти на 1,3-ПД, с тях са проведени периодични процеси във ферментатор, като е поддържано неутрално рН на средата (7.0) - условие, фаворизиращо продуцирането на 1,3-ПД при смесено киселата ферментация на глицерол. Очаквано, и при двата щам ферментирането на 50 g/L глицерол води до силно увеличение на продуцираните количества 1,3-ПД, (в сравнение с процесите без рН контрол) - само за 24 часа, G46 продуцира 21.42 g/L, а G31 - 25.86 g/L 1,3-ПД (Фиг. 4). От този резултат се вижда, че от решаващо значение се оказва по-високата степен на конверсия на глицерол от G31. Разликата в продуцираните количества 1,3-ПД от двата щам се увеличава при по-високи начални концентрации на субстрата.

На Фиг. 5 са представени кинетиките на акумулиране на 2,3-БД и ОК в тези процеси. Въпреки че и при двата щама, при рН 7.0 добивът на 2,3-БД рязко намалява, прави впечатление, че, щам G46 не продуцира никакви количества 2,3-БД (или недостатъчни за детекция - ≤ 0.1 g/L), докато G31 продуцира 1.73 g/L 2,3-БД (Фиг. 5).



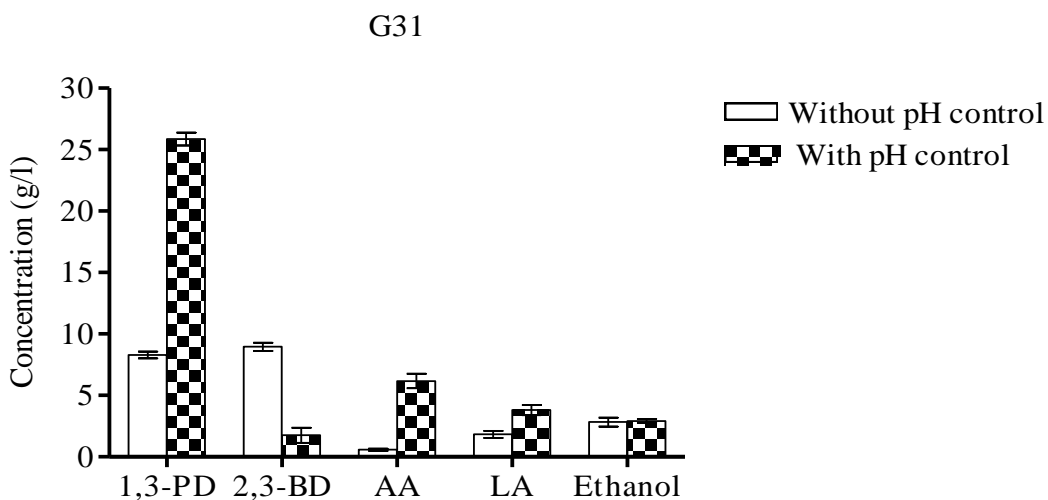
Фигура 4. Усвояване на глицерол и формиране на 1,3-ПД при контролирано рН 7.0 от щамове *Klebsiella pneumoniae* G31 и G46.



Фигура 5. Формиране на 2,3-БД и оцетна киселина (AA) при процеси с контролирано рН 7.0 от щамове *Klebsiella pneumoniae* G31 и G46.

Интересно е да се отбележи, че до 17-ти час на ферментацията, акумулираните количества ОК от двата щама са почти еднакви (≈ 6 g/L), но след това се появяват значителни разлики – при щам G46 акумулирането на ОК продължава и до 36-ти час достига 9.2 g/L, докато при G31 концентрацията ѝ намалява до 4 g/L. Имайки предвид, че ОК се явява силен инхибитор на процеса на конверсия на глицерол, способността на G31 вторично да асимилира ОК и да я преобразува в други продукти, вероятно е една от причините за способността му да усвоява високи концентрации глицерол.

От направеното изследване може да се каже, че за продуциране на 2,3-БД от глицерол, най-подходящ от новоизолираните щамове е *Klebsiella pneumoniae* G31. Щамът притежава висока толерантност към глицерол и продуцира 2,3-БД дори при рН 7.0, условие подходящо за получаване на 1,3-ПД (по редукирания метаболитен път) и органични киселини и етанол (по оксидативния метаболитен път) (Фиг. 6). Още по-впечатляващо е, че при конверсия на 50 g/L глицерол от щам G31, при процес без рН контрол, 2,3-БД се явява главен продукт на ферментацията (Фиг. 6), което не е получавано до момента. Въпреки, че полученият титър е нисък (8.96 g/L), това означава, че щам G31 е щам, подходящ за по-нататъшни изследвания.



Фигура 6. Метаболитни продукти при ферментация на 50 g/L глицерол от *Klebsiella pneumoniae* G31 в процеси без рН контрол (бели стълбчета) и контролирано рН на средата 7.0 (карирани стълбчета). 1,3-ПД – 1,3-пропандиол, 2,3-БД – 2,3-бутандиол, АА – оцетна киселина, LA – млечна киселина.

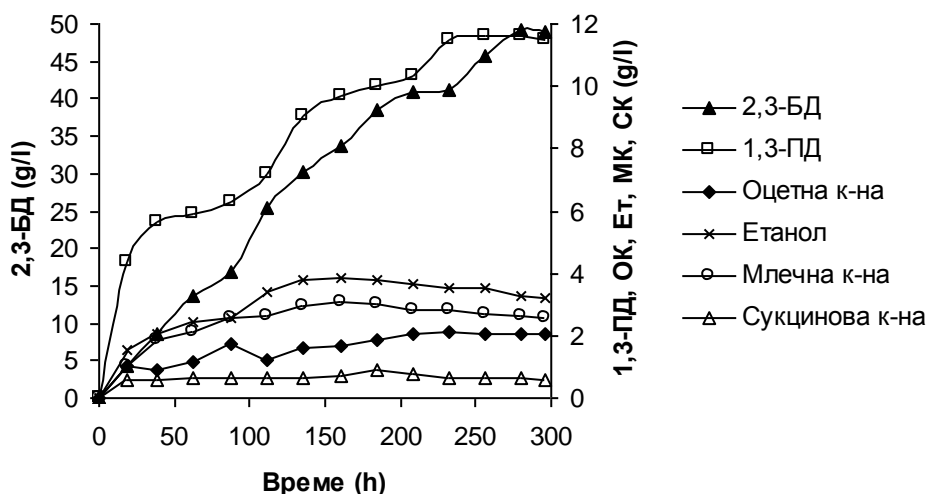
Освен специфичен продуцент на 2,3-БД, щам G31 осигурява и висок добив на 1,3-ПД от глицерол – 62.6 mol/100 mol глицерол, в един най-обикновен периодичен процес без никакви оптимизации. За сравнение, един от най-известните до

момента продуценти на 1,3-ПД - *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026, продуцира при същите условия 53 mol/100 mol глицерол (Barbirato et al., 1996b).

От направените изследвания може да се направи и извода, че рН на средата е от решаващо значение за насочването на метаболизма към получаване на различни продукти. Очевидно, по-ниските стойности на рН на средата са важно условие за продуцирането на 2,3-БД.

Оптимизация на хранителната среда

В периодични процеси с подхранване на чист глицерол и без рН контрол, беше изследвано влиянието на бивалентните метални йони върху продуцирането на 2,3-БД. Изключването на Co^{2+} (присъстващи в средата на Zhao et al. (2009)) от хранителната среда, оказва най-значителен позитивен ефект върху продуцирането на 2,3-БД. При еднакви останали условия (периодични процеси с подхранване без рН контрол и с начално рН 7.0 или 8.0), липсата на Co^{2+} в средата води до увеличение на добива на 2,3-БД с 30 – 32 %, главно за сметка на продуцирането на 1,3-ПД (Табл. 2). Крайната концентрация на другите продукти – органични киселини и етанол, остават непроменени. От всички проведени процеси, най-висока концентрация на 2,3-БД е получена в среда без Co^{2+} и начално рН на средата 8.0 – 49.2 g/L след 280 часа ферментация (Фиг. 7). Въпреки сравнително ниската продуктивност – 0.18 g/Lh, полученият титър 2,3-БД е четири пъти по-висок от максималния, получаван до момента от глицерол (12.4 g/L – Biebl et al., 1998).



Фигура 7. Кинетика на главните разтворими продукти при ферментация на глицерол от *Klebsiella pneumoniae* G31 в периодичен процес с подхранване без рН контрол и с начално рН 8.0.

Таблица 2. Сравнение на крайните концентрации на разтворими продукти при глицеролова ферментация на *Klebsiella pneumoniae* G31 в периодични процеси с подхранване при различни условия. Легенда: 1,3-ПД – 1,3-пропандиол, 2,3-БД – 2,3-бутандиол, ОК – оцетна киселина, МК – млечна киселина, Ет – етанол, СК – сукцинова киселина.

Условия	Начално рН	Крайно рН	Продълж. (ч)	Биомаса (g/L)	Глицерол ¹ (g/L)	2,3-БД (g/L)	Yield BD ²	C _{2,3-БД} ³ (%)	1,3-ПД (g/L)	C _{1,3-ПД} ⁴ (%)	ОК (g/L)	МК (g/L)	Ет (g/L)	СК (g/L)
Без рН контрол (с Co ²⁺)	7.0	4.3	211	1.74	90.6	30.7	34.63	46.17	10.0	13.37	0.8	2.1	2.2	0.56
	8.0	4.9	234	1.87	114.4	37.9	33.85	45.15	12.9	13.65	1.8	3.0	2.8	0.61
Без рН контрол (без Co ²⁺)	5.2	4.4	234	1.51	80.2	30.4	38.73	51.66	7.7	11.63	0.5	1.9	1.8	0.24
	7.0	4.5	260	1.80	99.3	40.4	41.57	55.44	8.4	10.24	0.9	2.5	2.1	0.58
	7.4	4.7	260	1.90	110.8	45.8	42.24	56.32	10.2	11.14	1.2	2.9	2.6	0.59
	8.0	5.1	280	1.88	138.3	49.2	36.35	48.47	11.6	10.14	2.1	3.1	3.2	0.61
рН контрол (без Co ²⁺)	5.0	5.0	72	1.16	35	4.5	13.14	17.53	8.6	29.75	1.2	4.8	5.7	0.67
	7.0	7.0	72	2.55	85	1.5	1.80	2.40	38.8	55.24	8.5	11.5	14.6	4.20

¹ Консумиран глицерол

² (mmol 2,3-БД/100 mmol глицерол)

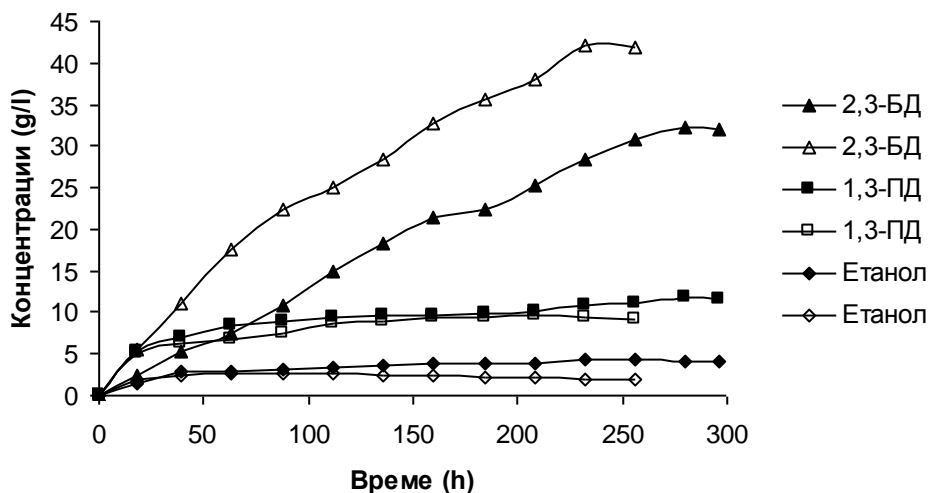
³ % въглерод, конвертиран в 2,3-БД

⁴ % въглерод, конвертиран в 1,3-ПД

Първоначално оптимизиране на аерацията

С оптимизираната хранителна среда (без наличие на Co^{2+}) бяха проведени периодични процеси с подхранване във ферментатор при анаеробни (без добавяне на стерилен въздух) и микро-аерофилни условия (добавяне на стерилен въздух с дебит 0.2 L/min (0.44 vvm)). Процесите са проведени при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ и скорост на разбъркване (магнитна бъркачка) 200 rpm и начално рН на средата 7.2 .

Резултатите са представени на Фиг. 8. Вижда се, че при микроаерофилни условия (0.44 vvm) продуцираното количество 2,3-БД е с 30% повече -42.1 g/L срещу 32.2 g/L при анаеробни условия. Обратно, анаеробните условия спомагат за формиране на етанол (до 4.4 g/L) и 1,3-ПД (11.8 g/L при анаеробни условия срещу 9.5 g/L при микроаерофилни).

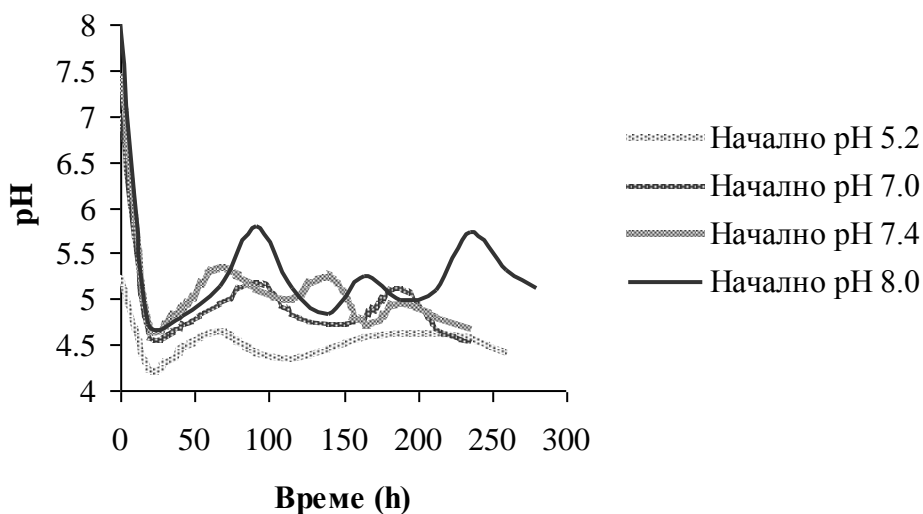


Фигура 8. Кинетики на получаване на 1,3-пропандиол (1,3-ПД), 2,3-бутандиол (2,3-БД) и етанол при периодични процеси с подхранване, проведени при анаеробни (запълнени символи) и микро-аерофилни условия (празни символи).

Влияние на рН на средата

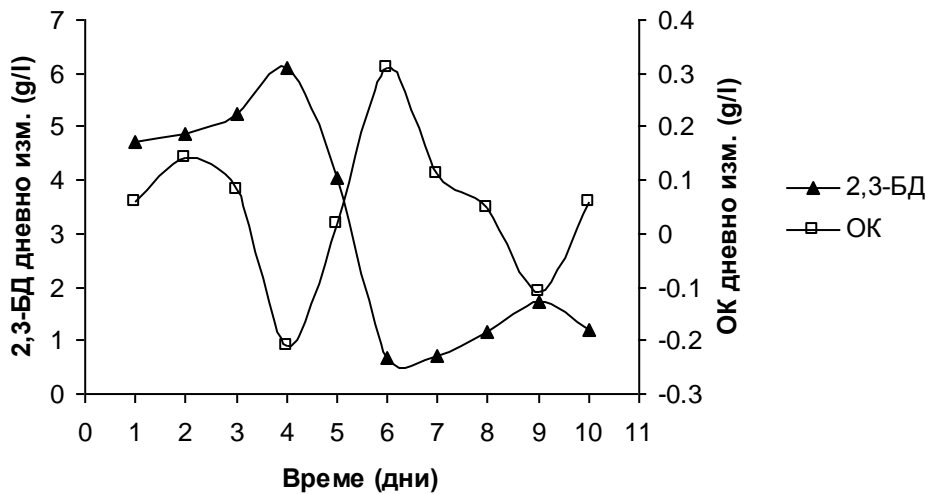
С оптимизирана хранителна среда (без Co^{2+}) и аерационен режим (0.44 vvm) са проведени периодични процеси с подхранване, стартиращи с различно рН на средата, което не се контролира по време на процеса. Изпробвани са различни начални стойности на рН, като след инокулиране те са 5.2 , 7.0 , 7.4 и 8.0 . Резултатите показват, че колкото по-високо е началното рН на процеса, толкова по-висока е

концентрацията на получения впоследствие 2,3-БД (Табл. 10). При детайлно проследяване на стойностите на рН на културалната течност (Фиг. 42) се забелязват отчетливи флукутации. От фигурата се вижда, че колкото по-висока е стойността на началното рН, толкова по-силни са тези флукутации. При начално рН 8.0, те се колебаят в диапазона 4.75 – 5.55 (Фиг. 9).

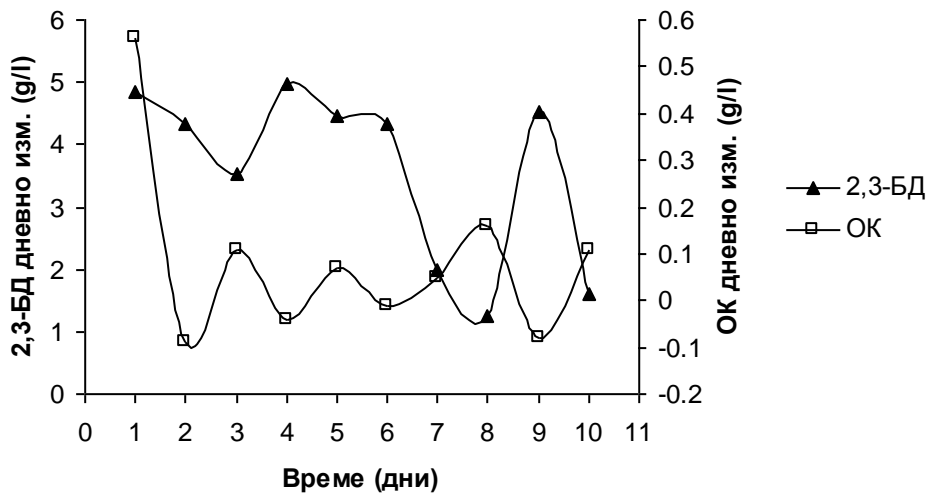


Фигура 9. Изменение на рН на културалната течност при периодични процеси с подхранване с начално рН 5.2, 7.0, 7.4 и 8.0.

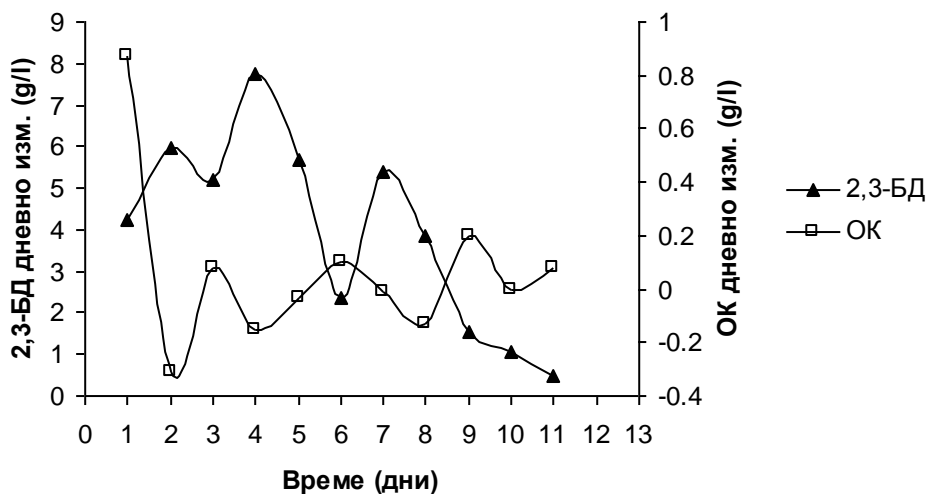
Детайлното проследяване на изменението в концентрациите на 2,3-БД и ОК по време на процеса дава едно възможно обяснение на флукутирането на киселинността на средата. При всички процеси се забелязва периодично пренасочване на метаболизма от продуциране на 2,3-БД към ОК и обратно (Фиг. 10 – при начално рН 5.2; Фиг. 11 – при начално рН 7.0; Фиг. 12 – при начално рН 7.4; Фиг. 13 – при начално рН 8.0). От фигурите се вижда, че периодите на ускорено натрупване на 2,3-БД съвпадат с намаляване на формирането и дори с реасимилиране на ОК. Флукутациите в натрупването на 1,3-ПД следват тези на ОК. Показаните на Фиг. 42 флукутации в киселинността на средата също (и логично) следват промените в натрупването на тези три метаболита (1,3-ПД, 2,3-БД и ОК), докато при останалите - етанол, млечна и сукцинова киселини, този феномен не се забелязва.



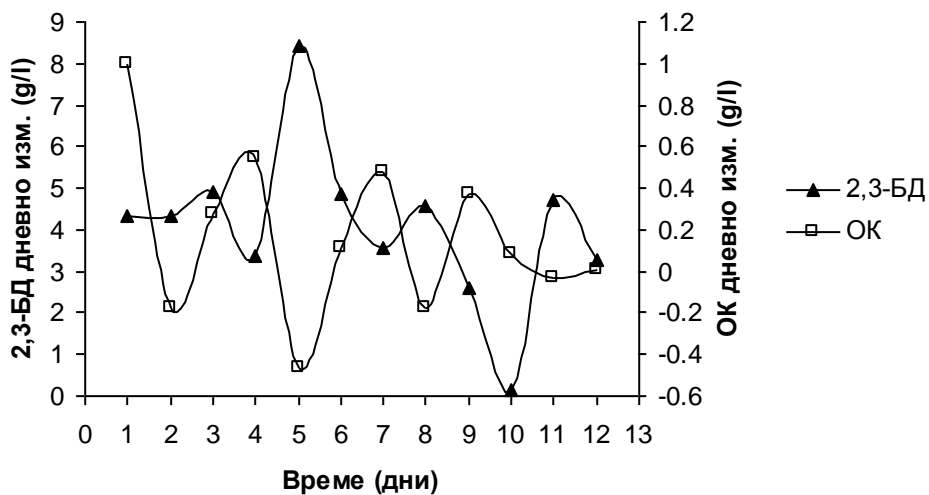
Фигура 10. Изменение в концентрациите на 2,3-бутандиол (2,3-БД) и оцетна киселина (ОК) при ферментирание на глицерол в периодичен процес с подхранване с начално рН 5.2 и без рН контрол.



Фигура 11. Изменение в концентрациите на 2,3-бутандиол (2,3-БД) и оцетна киселина (ОК) при ферментирание на глицерол в периодичен процес с подхранване с начално рН 7.0 и без рН контрол.



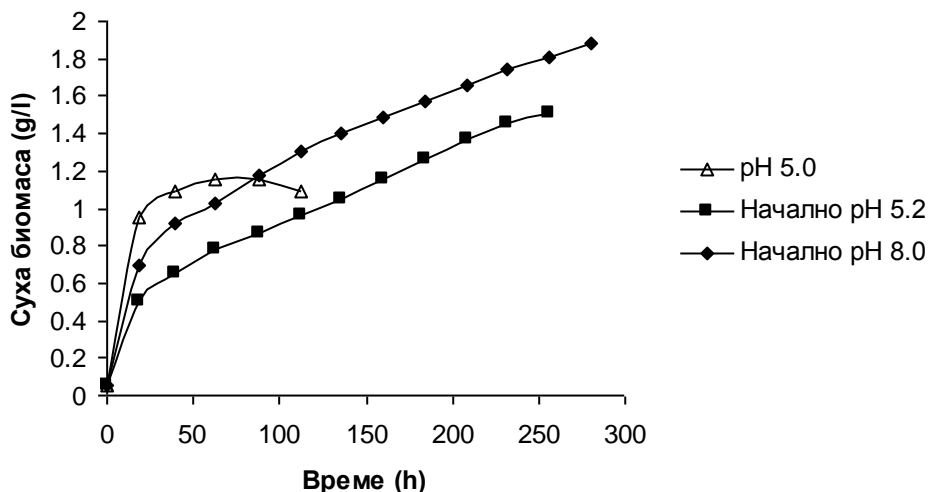
Фигура 12. Изменение в концентрациите на 2,3-бутандиол (2,3-БД) и оцетна киселина (ОК) при ферментирание на глицерол в периодичен процес с подхранване с начално рН 7.4 и без рН контрол.



Фигура 13. Изменение в концентрациите на 2,3-бутандиол (2,3-БД) и оцетна киселина (ОК) при ферментирание на глицерол в периодичен процес с подхранване с начално рН 8.0 и без рН контрол.

При сравнение на процесите без рН контрол но с различно начално рН се забелязва, че колкото по-високо е началната стойност на рН, толкова по-голяма е амплитудата на флукуациите и по-висока е крайната концентрация на трите продукта – 2,3-БД, 1,3-ПД и ОК (Табл. 2).

От друга страна, ако се вземат абсолютните стойности на рН, то най-ускорено натрупване на 2,3-БД се забелязва в интервала 4.7 – 5.4. В този смисъл, един процес при контролирано рН 5.0 по време на целия процес, би бил особено подходящ за получаване на 2,3-БД. Провеждането на такъв процес обаче показва, че той не е удачен – полученото количество 2,3-БД за 72 часа е едва 4.5 g/L, след което процесът спира напълно (Табл. 2). Главен продукт, също получен в ниска концентрация, е 1,3-ПД – 8.6 g/L. Сравнително значителни (спрямо процесите без рН контрол) са обаче продуцираните количества МК и етанол – 4.8 и 5.7 g/L, съответно. Причината за този резултат е слабия клетъчен растеж (Фиг. 14), непозволяващ конверсия на значителни количества глицерол – консумирани са едва 35 g/L, след което ферментацията спира напълно.



Фигура 14. Клетъчен растеж на *Klebsiella pneumoniae* G31 в периодични процес с подхранване без рН контрол (с начално рН 5.2 и 8.0) и рН контрол 5.0.

При процес с поддържано рН 7.0, ферментацията също продължава едва 72 часа. Тук количеството продуциран 2,3-БД е изключително ниско – 1.5 g/L. Очаквано, главен продукт на ферментацията е 1,3-ПД – 38.8 g/L, висока е и крайната концентрация на всички останали продукти (без 2,3-БД) от оксидативния метаболитен път – МК (11.5 g/L), етанол (14.6 g/L), ОК (8.5 g/L). Имайки предвид, че всички изброени метаболити са силни инхибитори на процеса, пълното спиране на ферментацията след само 72 часа е напълно очаквано.

От представените резултати следва, че за получаване на 2,3-БД от глицерол, ферментацията трябва да се провежда без поддържане на определена стойност на рН, като началната стойност на рН трябва да е възможно по-висока – 7.5 – 8.0. Механизмът на наблюдаваните феномени при всички процеси с неконтролирано рН е сложен и вероятно се дължи на фина саморегулация на клетката при оксидативния път на разграждане на глицерола. Киселинността на средата (рН) действа на клетъчния метаболизъм вероятно по два различни начина – чрез абсолютната си стойност, и чрез посоката на промяната си. Високите начални стойности на рН осигуряват силен пад на рН през първите 24 часа, дължащ се на натрупването на киселини. Намаляващото рН (повишаващата се киселинност на средата) обаче, вероятно действа като сигнал за клетката да преориентира метаболизма си от продуциране на киселини към продукти, които не само са по-нетоксични, но и чието продуциране би спряло процеса на ацидификация на средата. 2,3-БД е не само най-нетоксичният продукт на този вид ферментация, но и неговото продуциране е най-пряката алтернатива на получаването на ОК по оксидативния метаболитен път. Вероятното реасимилиране на ОК за получаване на 2,3-БД е един от начините клетката да оцелее - ферментацията без рН контрол може да продължи до 300 часа (Фиг. 7).

От друга страна, продуцираните в процеса киселини са особено инхибиращи при ниско рН поради това, че преобладаващо се намират в по-токсичната си недисоциирана форма. Поради това, ниската абсолютна стойност на рН също е сигнал за спиране на продуцирането им. При процеса с контролирано рН 5.0 например, тяхната концентрация е ниска. Въпреки това, в този процес клетките загиват до 72 часа, вероятно поради неспособност да приложат описаната по-горе саморегулация, базираща се на метаболитна промяна. Индикация за тази саморегулация вероятно е не толкова абсолютната стойност на рН, колкото посоката на промяна на рН.

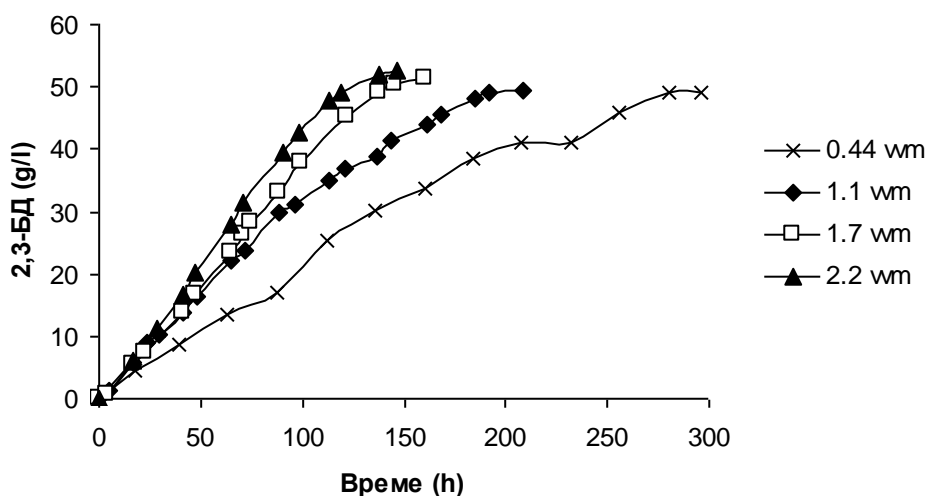
Аеробна ферментация на глицерол

Чрез направените до момента оптимизации – провеждане на процеса като периодичен с подхранване, използване на хранителна среда без Co^{2+} , поддържане на микро-аерофилни условия (0.44 vvm), както и провеждане на процеса без рН контрол – са получени 49.2 g/L 2,3-БД. Въпреки, че това е най-високата, постигната до момента, концентрация 2,3-БД от глицерол, тя е постигната след 280 часа ферментация с изключително ниска продуктивност (0.18 g/Lh). За да стане процесът на получаване на 2,3-БД от глицерол икономически ефективен, е нужно значително повишаване на добивът и продуктивността.

До момента, ферментацията на глицерол се е използвала преди всичко за получаване на един типично анаеробен продукт - 1,3-ПД. Проведените до момента

експерименти показват, че по - аеробните условия се оказват подходящи за получаване на 2,3-БД, главно поради намаляване на продуцирането на анаеробни метаболити като 1,3-ПД, етанол и МК. Според Celińska и Grajek (2009) при подобна смесено кисела ферментация, осъществяваща се от *Paenibacillus polymyxa*, единствено ОК се продуцира при по-аеробни условия от 2,3-БД.

Поради това, с цел повишаване на добива на 2,3-БД и допълнително изместване на катаболизма от продуциране на 1,3-ПД, етанол и МК, са проведени процеси с по-силно аериране на средата. Дебитът на подавания стерилен въздух към ферментатора бе увеличен от 0.2 на 0.5, 0.75 и 1.0 L/min, осигуряващи съответно 1.1, 1.7 и 2.2 vvm, като са запазени останалите параметри на процеса – разбъркване 200 rpm, температура 37 °C, начално рН на средата 8.0. Кинетиките на продуцирания 2,3-БД в тези три процеса са сравнени с формирането му при 0.44 vvm на Фиг. 15.



Фигура 15. Продуциране на 2,3-БД от *Klebsiella pneumoniae* G31 в периодични процес с подхранване без рН контрол при различни аерационни режими (0.44, 1.1, 1.7, 2.2 vvm).

Резултатите показват, че засилената аерация води до чувствително ускоряване на процеса, съпроводено с известно увеличение на продуцираното количество 2,3-БД. Така например, при провеждане на процеса в силно аеробни условия (2.2 vvm), ферментацията протича два пъти по-бързо (140 – 150 часа) в сравнение с тази при микроаерофилни условия (280 часа). Максималните достигнати концентрации 2,3-БД са съответно 49.5 g/L при 1.1 vvm, 51.2 g/L при 1.7 vvm и 52.5 g/L при 2.2 vvm. Разликите в увеличаването на продуктивността обаче са значителни – от 0.18 g/Lh при 0.44 vvm, до 0.36 g/Lh при 2.2 vvm (Табл. 3). Добивът на 2,3-БД също се увеличава значително – от 0.36 g/g (g продуциран 2,3-БД / g

консумиран глицерол) при 0.44 vvm, до 0.45 g/g при 2.2 vvm. Въпреки намаляването на общото количество консумиран глицерол с увеличаването на аерацията (от 138.3 до 118 g/L), консумацията на час се увеличава (от 0.49 g/Lh при 0.44 vvm, до 0.80 g/Lh при 1.7 и 2.2 vvm (Табл. 2 и 3).

Очаквано, продуцираните количества 1,3-ПД, МК, СК и етанол рязко намаляват, като при силно аерационните режими (1.7 и 2.2 vvm) формираните количества МК, СК и етанол се асимилират напълно до края на ферментацията. От фигурите се вижда, че с увеличаване на аерацията, скоростта на продуцирането им намалява, а на асимилирането им се увеличава.

От представените на Табл. 11 резултати се вижда, че по-подходящи за получаване на 2,3-БД са процесите в по-силно аерирани среди. Най-високи концентрация, добив и продуктивност на 2,3-БД (52.5 g/L, 0.45 g/g и 0.36 g/Lh, съответно) се получават при дебит на подавания въздух, осигуряващ 2.2 vvm. Концентрацията на формираните странични продукти също е най-ниска – 10.2 g/L 1,3-ПД и 1.4 g/L ОК, като останалите продукти от оксидативния път на разграждане (МК, СК и етанол) са напълно изчерпани в края на ферментацията и не се детектират. По тази причина, всички следващи оптимизации са приложени при този аерационен режим (2.2 vvm).

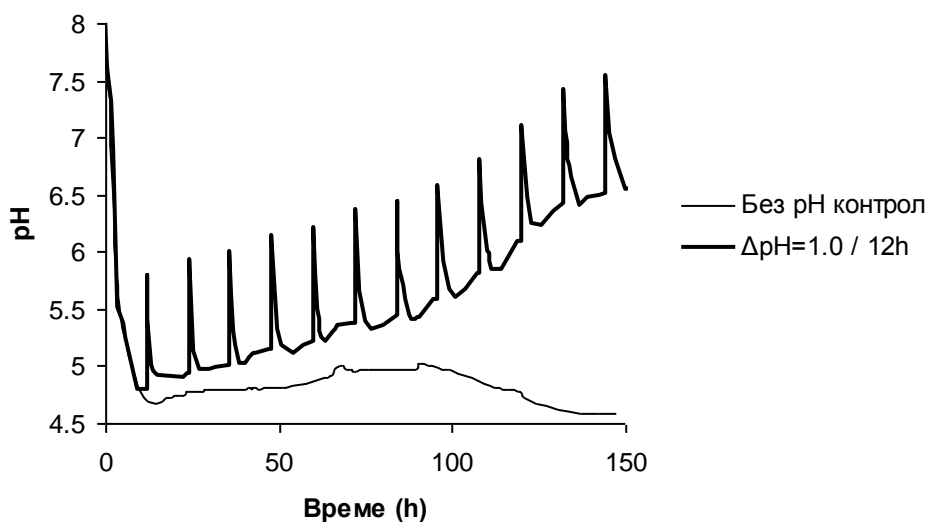
Процеси с изкуствени (принудени) рН флуктуации

От гореописаните изследвания се вижда, че при глицероловата ферментация без рН контрол, след първоначалния силен спад на рН на средата, киселинността не остава постоянна, а се изменя плавно, описвайки слаби флуктуации. Експерименталните данни показват също, че алтернацията в получаването на 2,3-БД и ОК, вероятната причина за тези флуктуации, представлява механизъм за саморегулация, позволяващ на клетката да оцелее в среда с повишаваща се киселинност. Въпреки, че механизмът на тази саморегулация не е изяснен, ясно се забелязва, че през периодите с повишаващата се киселинност (спад на рН) се наблюдава ускорено продуциране на 2,3-БД.

За да се провери влиянието на пада на рН върху продуцирането на 2,3-БД, е приложен нов метод за рН контрол, с цел да се осигури непрекъснат спад на рН по време на процеса. За провеждането на такъв експеримент, през определен период от време, чрез добавяне на основа, рН е коригирано (повишавано) така, че да осигури следващ силен естествен спад на рН. По този начин, рН на средата циклично се променя изкуствено (принудено), към по-високи стойности и естествено, чрез клетъчния метаболизъм, в обратна посока. За да бъде описан един такъв процес, е нужно да се въведат конкретни параметри на този вид рН контрол – интервали, през които да се правят рН корекциите, и амплитуда (Δ рН) на тези корекции. Друг вариант е, корекциите да се правят до определени стойности на рН

(например, коригиране на рН до 5.5 или до 6.0). Вторият метод се оказва неприложим за по-дълги процеси, поради това, че след всяка корекция, естествения рН спад е по-слаб и по-бавен.

Избирайки варианта с корекции на рН с определена амплитуда (ΔpH) през определен период от време (Δt), са проведени множество периодични процеси с подхранване, при вече оптимизираните до момента условия (среда, аериране). За да се установява влиянието на параметрите ΔpH и Δt върху продуцирането на 2,3-БД, бяха проведени процеси с различна амплитуда на корекцията ($\Delta\text{pH}=1.0$, $\Delta\text{pH}=2.0$ и $\Delta\text{pH}=3.0$) и различен времеви интервал между корекциите - 6, 12 и 24 часа. Примери за изменението на рН в процеси с изкуствени рН флукутации са показани на Фиг. 16 ($\Delta\text{pH}=1.0$, $\Delta t=12$) и Фиг. 17 ($\Delta\text{pH}=3.0$, $\Delta t=24$). И в двата случая е показано сравнение с рН стойностите при аналогичен процес без рН контрол.



Фигура 16. Изменение на рН при ферментиране на глицерол от *Klebsiella pneumoniae* G31 в периодичен процес с подхранване с изкуствени рН флукутации с $\Delta\text{pH}=1.0$, осъществени през интервал от 12 часа. Стойностите на рН са сравнени с тези при аналогичен процес без рН контрол (37 °C, 200 rpm, начално рН 8.0, 2.2 vvm).

Таблица 3. Сравнение на крайните концентрации на консумиран глицерол, суха биомаса и течни метаболитни продукти при ферментации на глицерол от *Klebsiella pneumoniae* G31 в различни аерационни режими. Всички процеси са проведени при температура 37 °С, разбъркване 200 rpm, без рН контрол и с начално рН на средата след инокулиране – 8.0. Стерилен въздух е добяван с дебит 0.5 L/min (1.1 vvm), 0.75 L/min (1.7 vvm) и 1.0 L/min (2.2 vvm).

Дебит (vvm)	Продължителност (h)	Консумиран глицерол (g/L)	Консумиран глицерол (g/Lh)	Биомаса (g/L)	2,3-БД (g/L)	C _{2,3-БД} ^a (%)	2,3-БД (g/Lh)	1,3-ПД (g/L)	C _{1,3-ПД} ^b (%)	ОК (g/L)
1.1	209	135	0.65	1.84	49.5	50.0	0.24	12.3	11.0	1.5
1.7	160	128	0.80	1.90	51.2	54.5	0.32	11.5	10.9	1.4
2.2	147	118	0.80	1.89	52.5	60.6	0.36	10.2	10.5	1.4

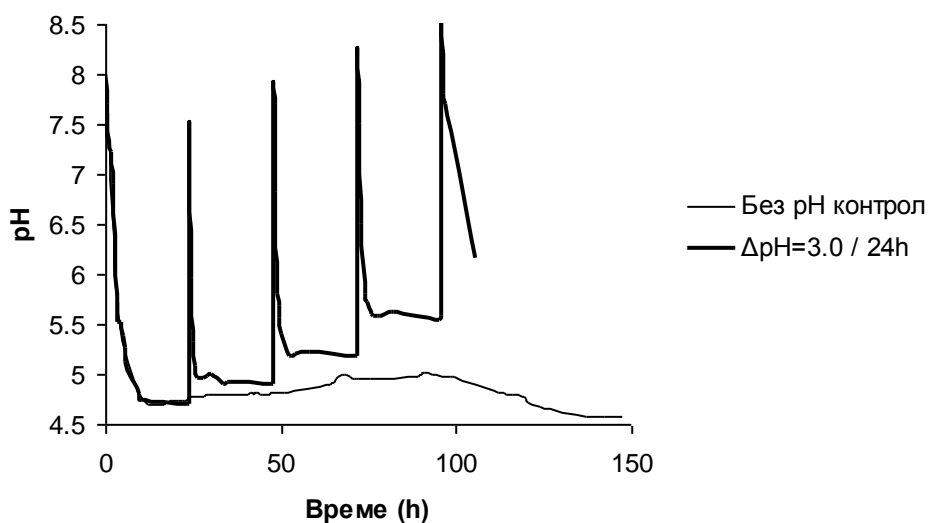
^a % въглерод, конвертиран в 2,3-БД

^b % въглерод, конвертиран в 1,3-ПД

ОК – оцетна киселина

От всички проведени процеси с изкуствени рН флукутации, най-висока концентрация на 2,3-БД е получена при процеса с корекции $\Delta\text{pH}=1.0$, осъществени през 12 часа – 70.02 g/L, докато най-висока продуктивност е получена при $\Delta\text{pH}=3.0 / 24$ ч. (Табл. 4).

Акумулирането на МК и СК в средата достига своя максимум на 19-ти час (4.44 g/L и 2.02 g/L, съответно), докато при етанола (1.13 g/L) това става още на 23-ти час. След 150 часа ферментация, единствените детектирани продукти са: 2,3-БД – 70.0 g/L, 1,3-ПД – 16.3 g/L и ОК – 3.1 g/L. Общото количество усвоен глицерол е 180 g/L (средно 1.2 g/Lh).



Фигура 17. Изменение на рН при ферментиране на глицерол от *Klebsiella pneumoniae* G31 в периодичен процес с подхранване с изкуствени рН флукутации с $\Delta\text{pH}=3.0$, осъществени през интервал от 24 часа. Стойностите на рН са сравнени с тези при аналогичен процес без рН контрол (37 °C, 200 грm, начално рН 8.0, 2.2 vvm).

На Табл. 4 са показани крайните резултати от всички процеси с изкуствени рН флукутации. Най-висока концентрация на 2,3-БД е получена при процес с $\Delta\text{pH}=1.0/\Delta t=12$ (70 g/L), следван от $\Delta\text{pH}=2.0/\Delta t=12$ (62.3 g/L) и $\Delta\text{pH}=2.0/\Delta t=24$ (55.7 g/L). При процеса с кратък интервал между доливанията ($\Delta t=6$ часа) обаче, максималната концентрация 2,3-БД е по-ниска от постигната при процеса без рН контрол – 49.5 g/L (Фиг. 18). В този процес се наблюдават и най-силно продуциране на 1,3-ПД (22 g/L) и ОК (7.9 g/L), както и повишено формиране на биомаса – 2.38 g/L. При всички процеси с времеви интервал между корекциите от 12 или 24 часа, полученото количество 2,3-БД надвишава полученото при процес без рН контрол (Табл. 4).

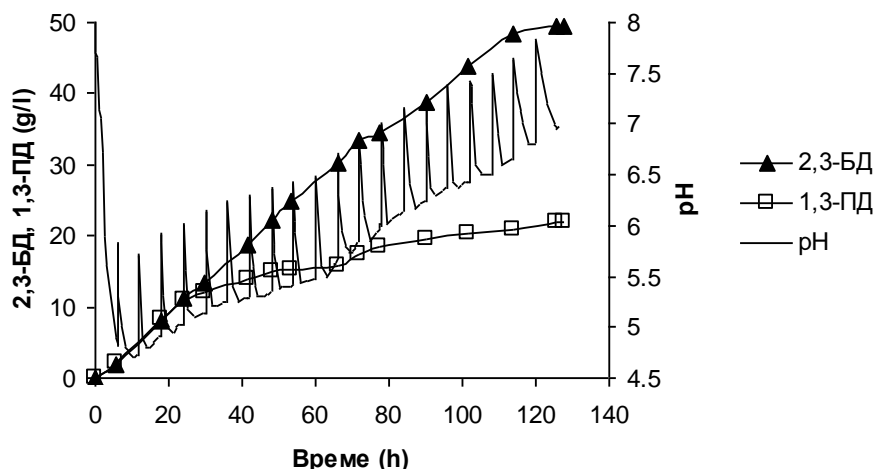
Таблица 4. Сравнение на крайните концентрации на консумиран глицерол, суха биомаса и течни метаболитни продукти при ферментации на глицерол от *Klebsiella pneumoniae* G31 в процеси с различни изкуствени рН флукутации. Всички процеси са проведени при температура 37 °С, разбъркване 200 rpm, с начално рН на средата след инокулиране – 8.0 и дебит на подавания стерилен въздух – 1.0 L/min (2.2 vvm).

ΔpH	Δt	Продължителност	Консумиран глицерол	Консумиран глицерол	Биомаса	2,3-БД	C _{2,3-БД} ^a	2,3-БД	1,3-ПД	C _{1,3-ПД} ^b	ОК
	(h)	(h)	(g/L)	(g/Lh)	(g/L)	(g/L)	(%)	(g/Lh)	(g/L)	(%)	(g/L)
ΔpH 1.0	6	125	169	1.35	2.38	49.5	39.9	0.40	22.0	15.7	7.9
ΔpH 1.0	12	150	180	1.20	1.81	70.0	53.0	0.47	16.3	10.9	3.1
ΔpH 2.0	12	120	173	1.44	1.69	62.3	49.0	0.52	17.8	12.4	3.0
ΔpH 2.0	24	127	158	1.24	1.82	55.7	48.0	0.44	16.9	12.9	2.6
ΔpH 3.0	24	96	154	1.60	1.59	54.5	48.2	0.57	17.2	13.5	1.4

^a % въглерод, конвертиран в 2,3-БД

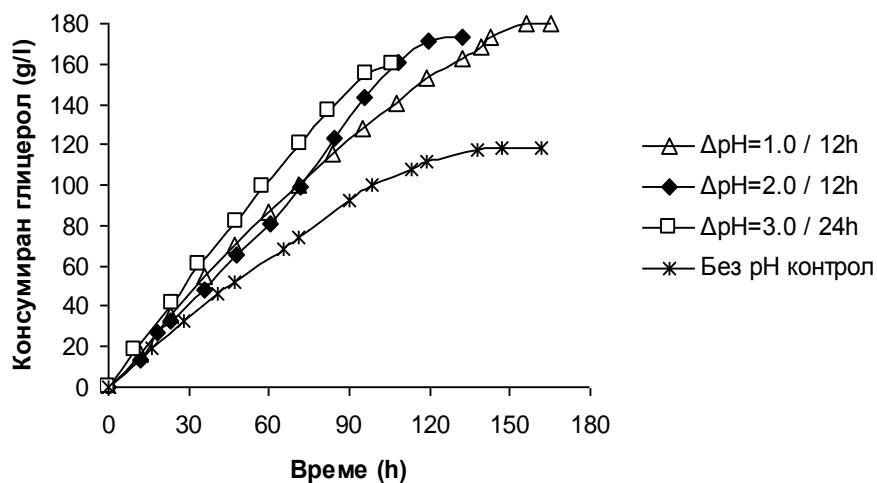
^b % въглерод, конвертиран в 1,3-ПД

ОК – оцетна киселина



Фигура 18. Формиране на 1,3-пропандиол и 2,3-бутандиол при процес с изкуствени рН флукутации с $\Delta\text{pH}=1.0$, осъществени през интервал от 6 часа (37°C , 200 грт, начално рН 8.0, 2.2 vvm).

Общото за всички процеси с изкуствени рН флукутации обаче, е значителното повишаване както на продуктивността на 2,3-БД (0.40 – 0.57 g/Lh), така и на конверсията на глицерол (1.2 – 1.6 g/Lh), спрямо процеса без рН контрол проведен при същите останали условия (Фиг. 19). В заключение може да се каже, че прилагането на изкуствени рН флукутации оказва значително влияние върху процеса на ферментация, като при добре подбрани параметри (ΔpH и Δt), крайната концентрация на 2,3-БД може да се увеличи с над 33 % (от 52.5 до 70.0 g/L), а общото количество консумиран глицерол – с повече от 50 % (от 118 до 180 g/L). Кратките интервали между отделните корекции на рН обаче, спомагат за формиране на 1,3-ПД, ОК и биомаса и не са подходящи за получаване на 2,3-БД.



Фигура 19. Кинетика на консумиране на глицерол при процеси с изкуствени рН флукутации и процес без рН контрол (37°C , 200 грт, начално рН 8.0, 2.2 vvm).

Заклучение

Изолиран е щам *Klebsiella pneumoniae* G31, притежаващ както висока толерантност към глицерол, така и щамова специфичност за продуциране на високи количества 2,3-БД в смесено кисела ферментация. Чрез оптимизиране на хранителната среда, вида ферментационен процес и аерационния режим, за първи път 2,3-БД е получен като главен продукт при ферментацията на глицерол. Въвеждането на нов метод на контролиране на рН – т.н. „метод на изкуствените рН флукутации” спомага за чувствително допълнително увеличаване на крайната концентрация на 2,3-БД (от 52.5 до 70.0 g/L) и продуктивността (от 0.36 до 0.57 g/Lh), докато добивът на 2,3-БД от глицерол остава непроменен (0.4 – 0.45 g/g).

Може да се направи извода, че в условия на по-силно аериране, метаболизмът на *K. pneumoniae* G31 се измества към продуциране на 2,3-БД, докато прилагането на новия метод за контролиране на рН води до ускорено усвояване на глицерол, без съществена метаболитна промяна спрямо процесите без рН контрол.

Представените резултати отварят възможността за промишлено получаване на 2,3-БД от един нов субстрат – глицерол.

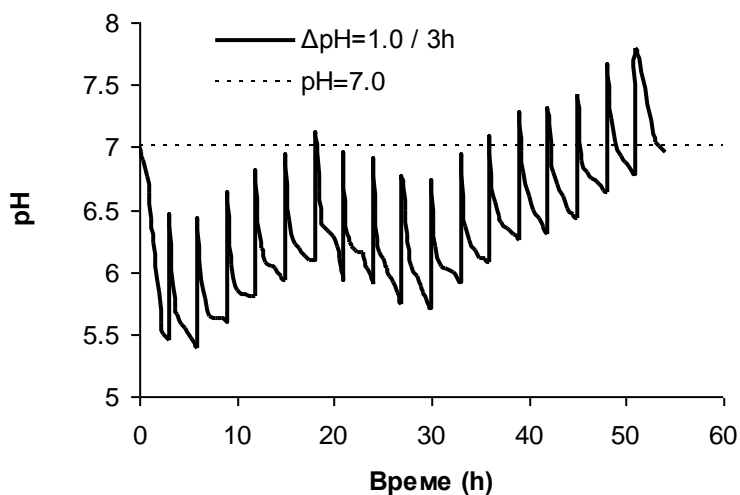
3.1.2. Получаване на 1,3-пропандиол от глицерол

За разлика от 2,3-БД, 1,3-ПД е целеви продукт при ферментацията на глицерол от десетилетия. Най-значимите фактори, оказващи влияние върху метаболизма на *K. pneumoniae* за продуциране на 1,3-ПД, вече са уточнени и оптимизирани – състав на хранителната среда (Zhao et al., 2009; Zheng et al., 2010; Cheng et al., 2004; Liu et al., 2007), микроаерофилни условия и рН на средата по време на процеса – 7.0. Тези, оптимизирани вече, параметри са взети като база в настоящето изследване, за да се оцени влиянието на метода на изкуствените рН флукутации върху продуцирането на 1,3-ПД.

От Табл. 12 се вижда, че за получаване на 1,3-ПД са подходящи флукутации през по-кратък интервал ($\Delta t \leq 6$ h). Поради това, за проведените периодични процеси с подхранване са използвани рН флукутации с амплитуда (ΔpH) – 1.0, 1.5 и 2.0, през интервали (Δt) от 2, 3 и 4 часа. На Фиг. 20 е показано изменението на рН при процес с $\Delta pH=1.0$ и $\Delta t=3$. За сравнение, с прекъснатата линия е посочено оптималното за продуциране на 1,3ПД, $pH=7.0$.

От фигурата се вижда, че при първите два цикъла, както и при циклите между 18-ти и 30-ти час, естественият спад на рН е по-силен от направената корекция ($\Delta pH=1.0$). Същите ефекти се забелязват и при процесите с $\Delta pH=1.5$, $\Delta t=3$ и с $\Delta pH=2.0$, $\Delta t=3$ – за първите два цикъла, и при всички наблюдавани процеси – за циклите между 18-ти и 30-ти час. При всички процеси, през останалите периоди се

забелязва обратен ефект – амплитудата на корекцията е по-висока от естествения спад.



Фигура 20. Изменение на рН по време на периодичен процес с подхранване с изкуствени рН флукутации с $\Delta\text{pH}=1.0$ и $\Delta t=3$ h. Оптимално рН за получаване на 1,3-ПД – 7.0.

Крайните резултати от проведените процеси са представени на Таблица 13. За сравнение са представени и резултатите от процес, проведен при рН 7.0 (без флукутации). Данните показват, че най-висока концентрация на 1,3-ПД е получена при процес с изкуствени рН флукутации с $\Delta\text{pH}=1.0$, провеждани през 3 часа – 52.9 g/L. При този процес е достигната продуктивност 1.15 g/Lh, като са усвоени 157.9 g/L глицерол (Фиг. 21). Като странични продукти се получават: 2,3-БД – 12.8 g/L, млечна к-на – 12.3 g/Lh, етанол – 9.7 g/L, сукцинова к-на – 4.0 g/L, оцетна к-на – 3.5 g/L. Тези резултати, сравнени с получените от контролния процес (рН=7.0), показват силно намаляване на продуцирането на киселини, особено на млечна (от 18.6 до 12.3 g/L) и оцетна (от 8.6 до 3.5 g/L). Не се забелязват значителни разлики в крайните концентрации на етанол (Табл. 5).

Най-висока продуктивност се наблюдава при процес с флукутации $\Delta\text{pH}=2.0$, $\Delta t=3$ – 1.35 g/Lh, но максималната концентрация на 1,3-ПД (48.6 g/L) намалява след 36-ти час. Максимален добив на 1,3-ПД е получен при флукутации $\Delta\text{pH}=1.0$, $\Delta t=4$ – 0.43 mol/mol. Въпреки това, крайната концентрация на 1,3-ПД в този процес е най-ниската от всички – едва 42.9 g/L (48.1 g/L при контролния процес), като са конвертирани едва 120.5 g/L глицерол. Очаквано, в този процес е получена и най-високата концентрация 2,3-БД (15.4 g/L) поради по-големия времеви интервал между доливанията ($\Delta t=4$ h). Липсата на аерация обаче, пречи на по-силно продуциране на 2,3-БД.

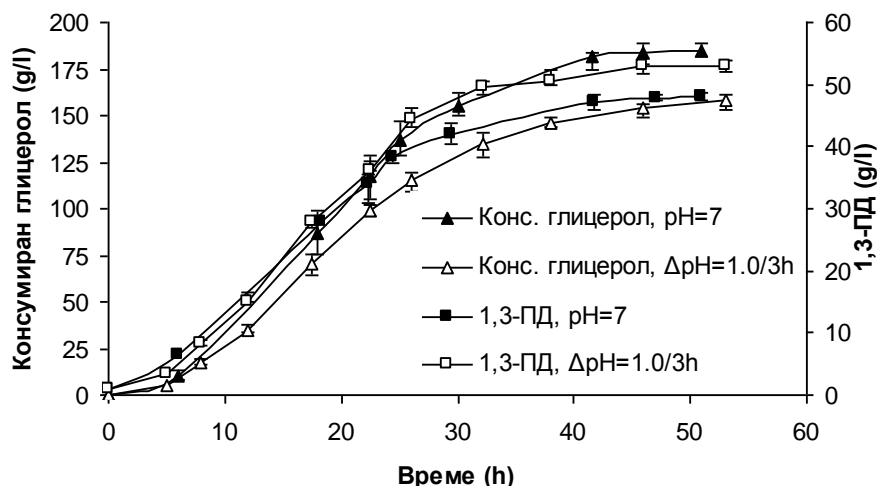
Таблица 5. Сравнение на глицеролови ферментации от *Klebsiella pneumoniae* G31, извършени в периодични процеси с подхранване с изкуствени рН флукутации и контролен процес при рН 7.0. Всички процеси са проведени при температура 37 °С, разбъркване 200 грт, с начално рН на средата след инокулиране – 7.0 и инокулиране 10 %.

рН	Δt	Продължителност ^a	Консумиран глицерол	1,3-ПД	1,3-ПД	Y _{P/S} ^b	2,3-БД	ОК	МК	СК	Етанол
	(h)	(h)	(g/L)	(g/L)	(g/Lh)	(mol/mol)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
ΔрН=1.0	2	51	168.5±3.6	49.7±0.4	0.97	0.36	8.8±0.3	4.2±0.2	16.5±1.0	4.4±0.2	10.8±0.3
ΔрН=1.0	3	46	157.9±4.0	52.9±1.0	1.15	0.41	12.8±0.5	3.5±0.2	12.3±1.1	4.0±0.3	9.7±0.4
ΔрН=1.5	3	38	162.8±4.0	49.2±0.5	1.29	0.37	11.2±0.3	3.0±0.3	11.2±0.7	3.8±0.1	9.4±0.3
ΔрН=2.0	3	36	162.6±2.6	48.6±0.4	1.35	0.36	10.8±0.3	3.3±0.2	12.8±0.5	4.1±0.1	8.6±0.2
ΔрН=1.0	4	56	120.5±4.9	42.9±1.0	0.77	0.43	15.4±0.6	2.6±0.2	10.1±1.2	3.5±0.2	6.3±0.3
ΔрН=2.0	4	40	139.5±3.5	45.5±0.6	1.14	0.39	12.3±0.5	2.6±0.1	11.3±0.6	3.8±0.2	7.6±0.3
Контрола рН=7.0		51	184.6±4.1	48.1±0.6	0.94	0.32	5.6±0.3	8.6±0.4	18.6±1.1	4.8±0.3	10.2±0.4

^a – Продължителност на процеса до натрупване на максимално количество 1,3-ПД;

^b – Моларен добив (mol 1,3-ПД / mol консумиран глицерол);

1,3-ПД – 1,3-пропандиол, 2,3-БД – 2,3-бутандиол, ОК – оцетна к-на, МК – млечна к-на, СК – сукцинова к-на.



Фигура 21. Сравнение на кинетиките на продуциране на 1,3-ПД (квадрати) и консумиране (усвояване) на глицерол (триъгълници) при процес на рН=7 (запълнени символи) и процес с изкуствени рН флукутации с $\Delta\text{pH}=1.0$ и $\Delta t=3$ h (празни символи).

Важно е да се отбележи, че всички флукутации са оптимизирани за получаване на 1,3-ПД. Въпреки това, при всички процеси, втори по концентрация продукт се в повечето случаи се явява 2,3-БД, а не МК. В контролния процес при рН 7.0 се вижда, количеството на продуцираните киселини и етанол е значително по-високо от това на 2,3-БД (Табл. 5 – последен ред). По-слабото продуциране на ОК при процесите с изкуствени флукутации е особено желан ефект, поради силната ѝ токсичност (Cheng et al., 2005).

Друга причина за силното намаляване на продуцираните количества ОК (50 – 70 %) е и липсата на аерация. В този смисъл, може да се направи важния извод, че изкуствените рН флукутации винаги, макар и в различна степен, пренасочват метаболизма на *K. pneumoniae* от продуциране на киселини и етанол към продуциране на диоли. Съотношението между продуцираните количества 1,3-ПД и 2,3-БД зависи от амплитудата на флукутациите и най-вече от времевия интервал между тях. За получаване на 1,3-ПД е необходимо този интервал да е по-малък ($\Delta t=2-4$ h), докато за 2,3-БД оптимален интервал е $\Delta t=12$ h. За получаване на 1,3-ПД, методът на изкуствените рН флукутации води до силно увеличаване на продуктивността (от 0.94 до 1.35 g/Lh) и добива на 1,3-ПД (от 0.32 до 0.43 mol/mol), но сравнително слабо увеличаване на крайната концентрация (от 48.1 до 52.9 g/L 1,3-ПД) на продукта. При по-детайлно анализиране на процесите се вижда, че максималните добив, продуктивност и концентрация 1,3-ПД се получават при различни флукутации. Това означава, че за да се използват ефективно предимствата на метода на изкуствените рН флукутации, е необходимо правилно да се подберат амплитудата (ΔpH) и времевия интервал (Δt) между корекциите.

3.2.

Получаване на ценни продукти от нишесте

3.2.1. Получаване на 2,3-бутандиол от нишесте

Избор на стратегия, продуцент и ген за клониране

За да се наложи нишестето като нов субстрат за индустриално получаване на 2,3-БД, е необходимо да са изпълнени няколко условия. Необходимо е, крайният продукт да е с висока концентрация (за да е рентабилно извличането му от ферментационната среда – виж литературен обзор), както и получаването му да се осъществи в едностъпален процес – в случая, да се обединят в един процесите на втечняване (желатинизиране), хидролиза и ферментация.

До момента това не е постигнато, поради липсата на естествени продуценти на 2,3-БД, които да притежават добри амилолитични способности. Така например, при представителите на род *Klebsiella* се наблюдават малтодекстрин глюконази, опериращи в цитоплазмата, малтохекса хидролази с действие в периплазмата, както и клетъчно свързани пулуланази. Тези ензими обаче, притежават слаба активност и не са екстрацелуларни, което силно лимитира хидролитичните способности на продуцента. В резултат на това, количеството на формираните редуциращи захари не е достатъчно за получаване на 2,3-БД (Gawande and Patkar, 2001). По тази причина, обикновено се прибегва до ензимна хидролиза на нишестените материали, с последващо ферментиране на получения хидролизат (Perego et al., 2003). Тази стратегия обаче, не е икономически ефективна. За директно получаване на 2,3-БД от нехидролизирано нишесте, Zheng и съавт. (2008a) свръхекспресират ген за α -амилаза (*malS*) в щам *Klebsiella pneumoniae* KG1. Създаденият генетично модифициран организъм KG1(pUC18K-amy) обаче, продуцира едва 3.8 g/L 2,3-БД, поради слабата ензимна активност на MalS. Извършената хомоложна експресия е единствения пример за директно получаване на 2,3-БД от нишесте в едностъпален процес, но полученият резултат не е достатъчен за осъществяване на икономически ефективен процес.

Въпреки това, създаването на генетично модифициран щам, притежаващ едновременно способността, както да втечнява и хидролизира грубо нишесте, така и да продуцира 2,3-БД във високи концентрации, остава една изключително перспективна възможност. За целта е нужно обаче, в продуцента на 2,3-БД да се въведе ген, кодиращ екстрацелуларен ензим със силна α -амилазна активност, способен бързо да втечнява и хидролизира грубия субстрат.

За донор на такъв ген беше избран българският изолат *Bacillus licheniformis* 44 MB82/G. Щамът продуцира екстрацелуларна α -амилаза (AmyBL), притежаваща способността да втечнява грубото нишесте, както и да запазва активност в широки температурни и рН граници (Tonkova, 1991; Hmidet et al., 2008). Всичко това прави ензима изключително подходящ за индустриално приложение.

За краен гостоприемник на *amyBL* беше избран свръхпродуцента на 2,3-БД от глицерол *Klebsiella pneumoniae* G31.

Първоначално оптимизиране на хранителната среда

От важно значение за целостния процес на превръщане на нишестето в 2,3-БД е да се установи капацитета на дивия продуцент *K. pneumoniae* G31 да усвоява и ферментира в 2,3-БД мономера на нишестето – глюкоза.

По тази причина, за оптимизиране на процеса на конверсия на глюкоза в 2,3-БД, щам G31 е култивиран в 8 хранителни среди (M3 – M7c) с различен състав (Табл. 6). Всички среди съдържат като единствен въглерод източник глюкоза, с начална концентрация 55 g/L. Резултатите показват, че след 24 часа ферментация, най-високи концентрации глюкоза, са консумирани от *K. pneumoniae* G31 в среди M7 и нейната производна M7c – 51.43 и 50.49 g/L, съответно. Най-високи концентрации 2,3-БД са получени пак при култивирането в тези среди – 20.89 g/L в среда M: и 20.72 g/L в среда M7c. Единствената разлика в състава на тези две среди е видът на използваните метални йони. От Табл. 14 се вижда, че среда M7 съдържа 0.02 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, докато среда M7c – вместо тях - 0.001 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Анализът на състава на други две среди – M7a и M7b показва, че $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ имат по-скоро негативно влияние върху продуцирането на 2,3-БД, докато $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – по-скоро положително. Поради това е конструирана среда M7d, съдържаща цинков сулфат (както среда M7c), но без другите три соли.

С култивиране в трите среди (M7, M7c и M7d), са проведени експерименти за конвертиране на 100 g/L глюкоза от щам G31. Резултатите показват, че наистина новоконструираната среда M7d е най-сполучлива за получаване на 2,3-БД.

Таблица 6. Компонентен състав на използваните хранителни среди.

Компонент	Среда								
	M3	M4	M5	M6	M7	M7a	M7b	M7c	M7d
K ₂ HPO ₄ (g/L)	13.7	-	13.7	-	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.0	-	2.0	-	-	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (g/L)	3.3	-	3.3	3.3	4.91	4.91	4.91	4.91	4.91
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	6.6	5.35	6.6	5.35	-	-	-	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.25	-	0.25	-	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.05	-	0.05	-	0.02	0.02	0.02	-	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.001	-	0.001	-	-	-	-	0.001	0.001
MnSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.001	-	0.001	-	0.01	0.01	0.01	-	-
CaCl ₂ ·H ₂ 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 ₂ PO ₄ ·2H ₂ O(g/L)	-	13.8	-	13.8	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄ (g/L)	-	0.28	-	0.28	-	-	-	-	-
Цитрат (g/L)	-	0.42	-	0.42	-	-	-	-	-
Дрождев екстракт (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

* Състав на солевия разтвор (g/L): ZnCl₂ - 34.2, FeCl₃·6H₂O - 2.7, MnCl₂·4H₂O - 10, CaCl₂·2H₂O - 0.85, H₃BO₃ - 0.31

При култивиране в среда M7d са получени 33.34 g/L 2,3-БД, в среда M7 – 31.56 g/L, а в среда M7c – 29.15 g/L. Най-високи количества глюкоза обаче, са консумирани при култивиране в среда M7 (82.19 g/L), откъдето се получава и пониския добив 2,3-БД (0.766 mol/mol). За сравнение, при ферментацията в среда M7d, добивът е 0.851 mol/mol. От представените резултати се вижда, че наличието на дрождев екстракт и амониев фосфат в хранителната среда силно стимулира формирането на 2,3-БД. В средите, съдържащи 5 g/L дрождев екстракт и 4.91 g/L амониев фосфат (M7, M7c и M7d), продуцираното количество 2,3-БД е значително по-високо. Друг извод е позитивното въздействие на Zn^{2+} , добавени в случая под формата на $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, върху продуцирането на 2,3-БД. Добавка от само 0.001 g/L цинков сулфат води до 6 % увеличение на крайната концентрация (от 31.56 до 33.34 g/L) и 11 % увеличение на добива (от 0.766 до 0.851 mol/mol) на 2,3-БД.

Клониране и секвенционен анализ на *amyL*

Генът *amyL* от *B. licheniformis* 44MB82/G беше амплифициран като PCR фрагмент с тъпи краища посредством праймерната двойка *amyF* (в права) и *amyR* (обратна посока). Фрагментът бе клониран във вектора pJET2.1/blunt. Новосъздадения вектор pJET α myBL беше въведен в *E. coli* DH5 α , след което беше намножен и секвениран. Секвенирането показва, че генът *amyL* съдържа 1 539 bp, започващи с ATG кодон и кодира полипептид от 512 аминокиселини, с изчислено молекулно тегло от 58.5.kDa, и съдържащ сигнален белтък от 29 аминокиселини.

Хетероложна експресия на *amyL* в *K. pneumoniae* G31

За уточняване на избора на вектор за клониране в *K. pneumoniae* G31, щамът бе изследван за естествена резистентност към различни антибиотици. Тестовите показаха, че G31 притежава естествена резистентност към ампицилин във всички изпробвани концентрации (50 – 200 μ g/mL), тетрациклин (10 – 50 μ g/mL) и еритромицин (15 – 45 μ g/mL). Щамът е чувствителен към високи концентрации на хлорамфеникол (50 μ g/mL), но се наблюдава слаб растеж при концентрации от 25 – 35 μ g/mL. G31 показва пълна чувствителност единствено към канамицин, поради което този антибиотик беше избран за селективен маркер. Съответно, за въвеждане в *K. pneumoniae* G31 бе избран векторът pCR^{2.1}-ТОРО[®], съдържащ ген за резистентност към канамицин.

По този начин, генът *amyL* бе субклонирани от pJET α myBL в pCR^{2.1}-ТОРО[®] (Фиг. 22). За гостоприемник на новосъздадения вектор pCR α myBL бе избран също щам *E. coli* DH5 α . Рекомбинантите бяха посяти на твърда хранителна среда, съдържаща 0.5 % нишесте. След оцветяване с йод, около позитивните клонове се

формира зона, показваща усвояване на нишестето. Това показва експресия на *amyL* под *lac* промотора на *E. coli* DH5 α .

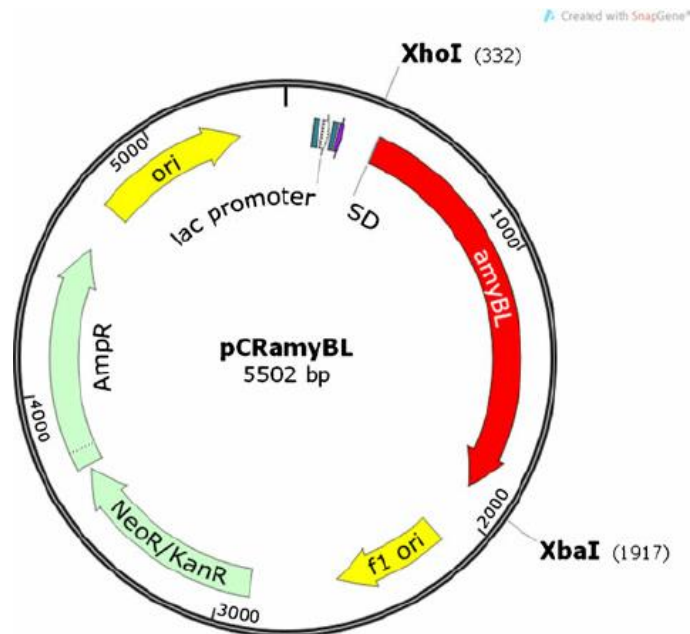
Впоследствие, компетентни клетки на *K. pneumoniae* G31 бяха трансформирани с вектор pCRamyBL, изолиран от позитивни клонове на *E. coli* DH5 α . Експресията на *amyL* в трансформантите *K. pneumoniae* G31-A бе проверена по гореописания начин, като след посявка на нишесте съдържащ агар, бяха селектирани трансформантите формиращи най-голяма зона.

Всички използвани щамове, плазмиди и праймери са показани на Табл. 17.

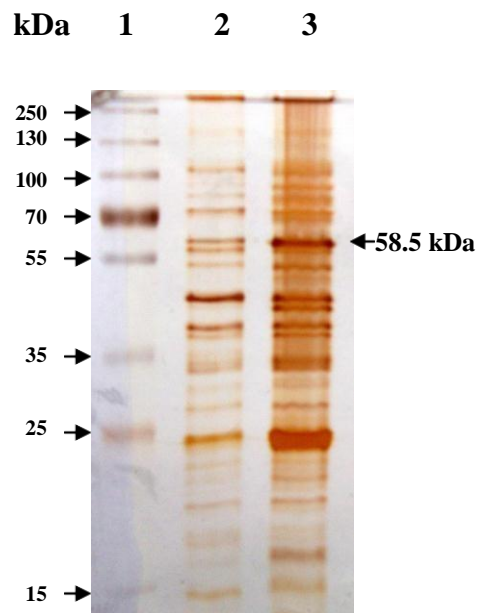
Таблица 17. Щамове, плазмиди и праймери, използвани за въвеждане на ген *amyL* в *Klebsiella pneumoniae* G31.

Щамове/плазмиди/праймери	Характеристики	Източник
Щамове		
<i>K. pneumoniae</i> G31	2,3-БД продуцент, AmpR	Глава 4.1.1.1.
<i>K. pneumoniae</i> G31-A	2,3-БД продуцент, AmpR, KanR, pCRamyL	Настоящо изследване
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 8odlacZ Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(rk ⁻ mk ⁺), λ -	Invitrogen™
<i>B. licheniformis</i> 44MB82/G	Деградиращ грубо нишесте, <i>amyL</i>	Tonkova et al., 1991
Плазмиди		
pJET2.1/blunt	AmpR, T7 промотор, гер (MB1)	Thermo Scientific Inc.
pJETamyBL	AmpR, T7 промотор, гер (MB1), <i>amyL</i>	Настоящо изследване
pCR [®] 2.1-ТОРО [®]	AmpR, KanR, fi ori, pUC ori, Plac, lacZ α	Invitrogen™
pCRamyBL	AmpR, KanR, fi ori, pUC ori, Plac, <i>amyL</i>	Настоящо изследване
Праймери		
amyF*	5'-gtgtaggattccatgaaacaacaaaaacggctttac-3'	Настоящо изследване
amyR	5'-gattccgttctatctttgaacataaattgaaacc-3'	Настоящо изследване
pJET2.1-forward	5'-cgactcactataggagagcggc-3'	Thermo Scientific Inc.
pJET2.1-reverse	5'-aagaacatcgatttccatggcag-3'	Thermo Scientific Inc.

* Подчертаните нуклеотиди представляват въведената Shine-Dalgarno последователност, типична за бактериите от род *Klebsiella*.



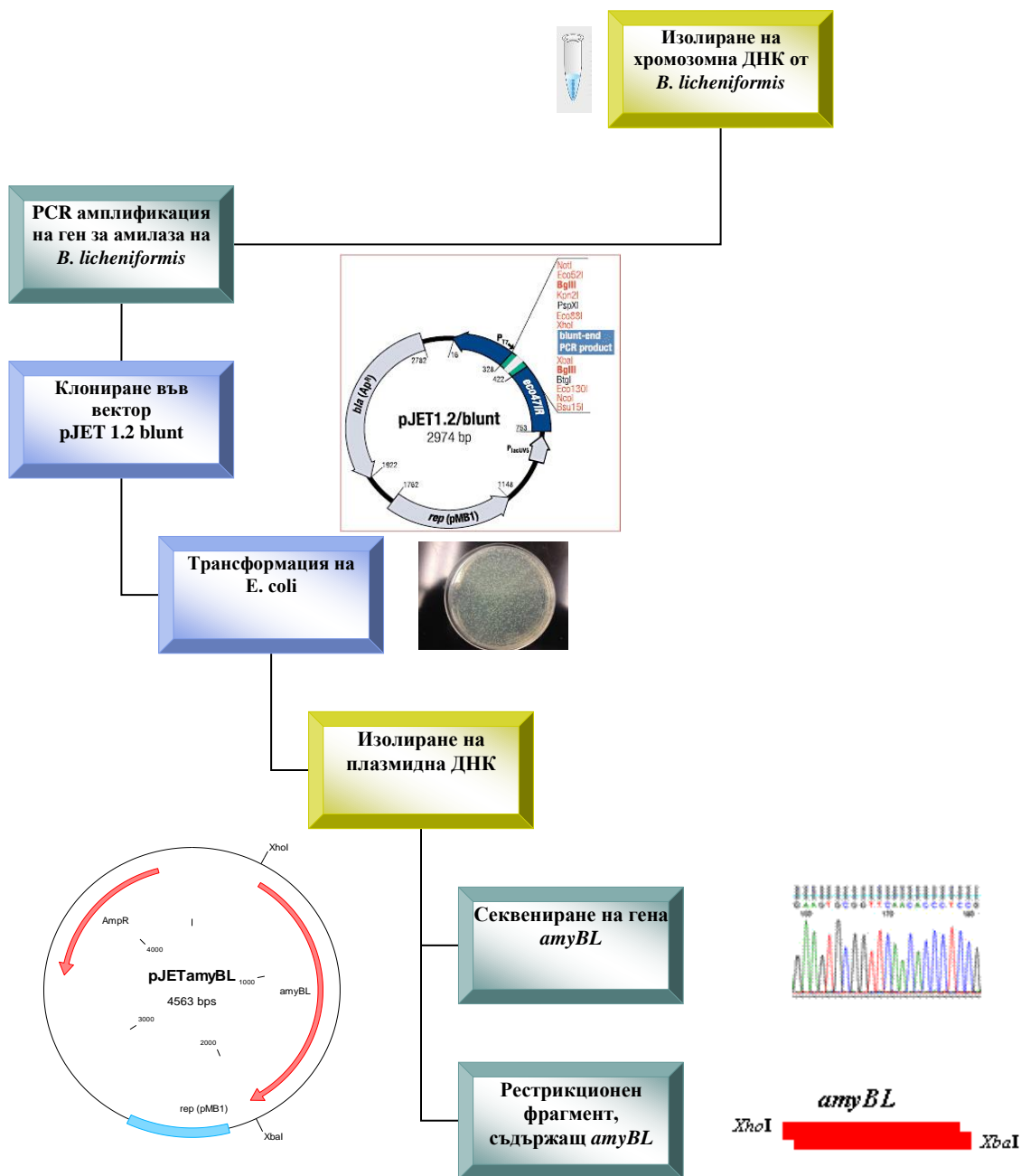
Фигура 22. Структура на вектор pCRamyBL. Конструктът съдържа гена *amyL* от *B. licheniformis* 44MB82/G, клониран във вектор pCR^{2.1}-ТОРО[®] под контрола на *lac* промотор.



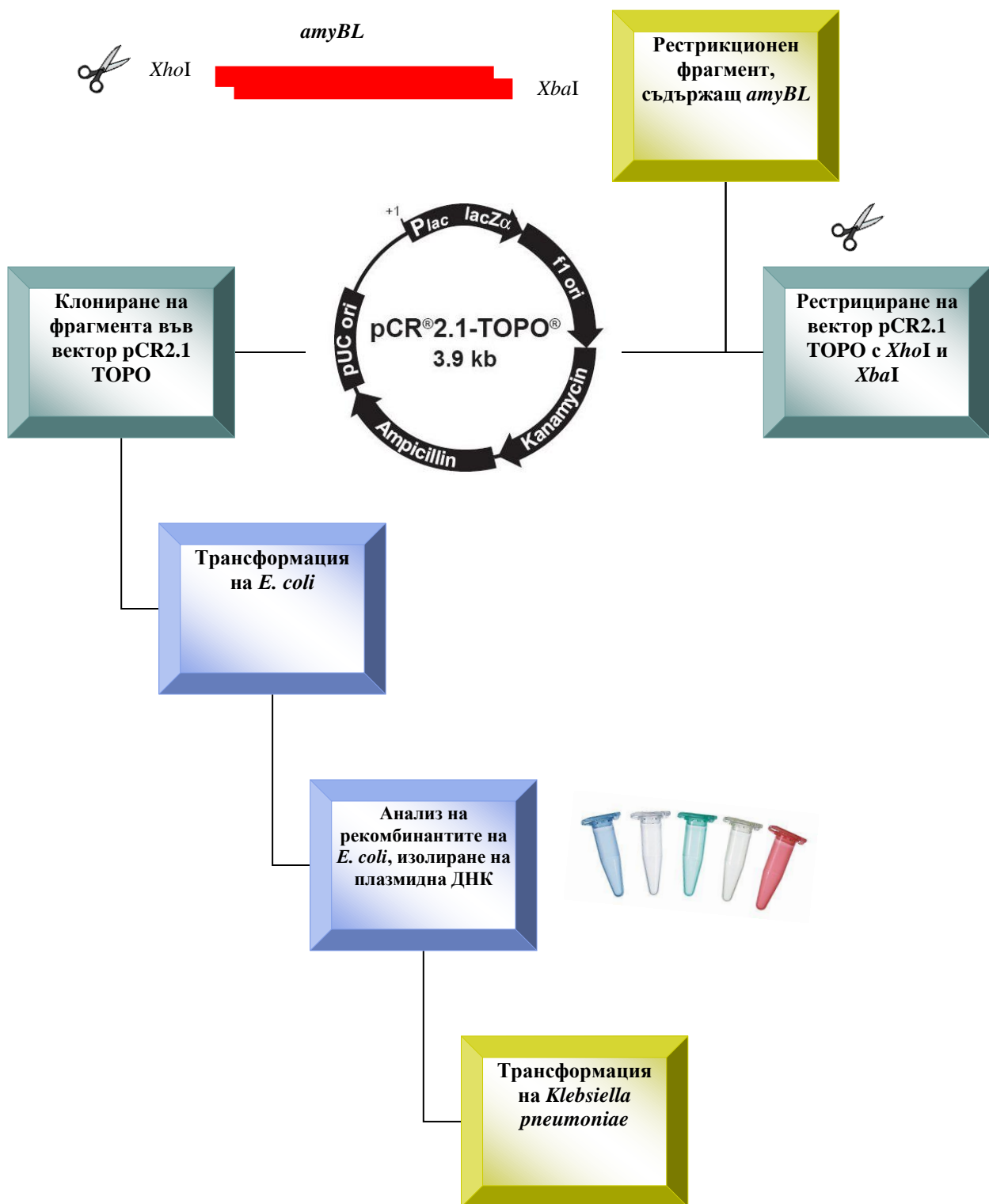
Фигура 23. Екстрацелуларна експресия на *amyL* от рекомбинантния щам *K. pneumoniae* G31-A, демонстриран чрез SDS-PAGE на тотален протеин от извънклетъчни фракции. Сравнени са профилите при неиндуцирана култура (2) с култура, развита в присъствие на 1 mM IPTG и 0.5% глицин, показваща повишена секреция (3). Анализите са направени след 24 часа культивиране, използвайки 12 % гел и Mini-PROTEAN[®] Tetra cell (BioRad Laboratories, CA, USA). Като белтъчен маркер е използван PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Екстрацелуларната експресията на гена *amyL* от *K. pneumoniae* G31-A е демонстрирана чрез SDS-PAGE на тотален протеин от извънклетъчна фракция (Фиг. 23).

На Фиг. 24 и 25 схематично е представено клонирането на *amyL* от *Bacillus licheniformis* във вектор pJET2.1/blunt и субклониране на ген *amyL* от pJETamyBL във вектор pCR[®] 2.1-ТОРО[®].



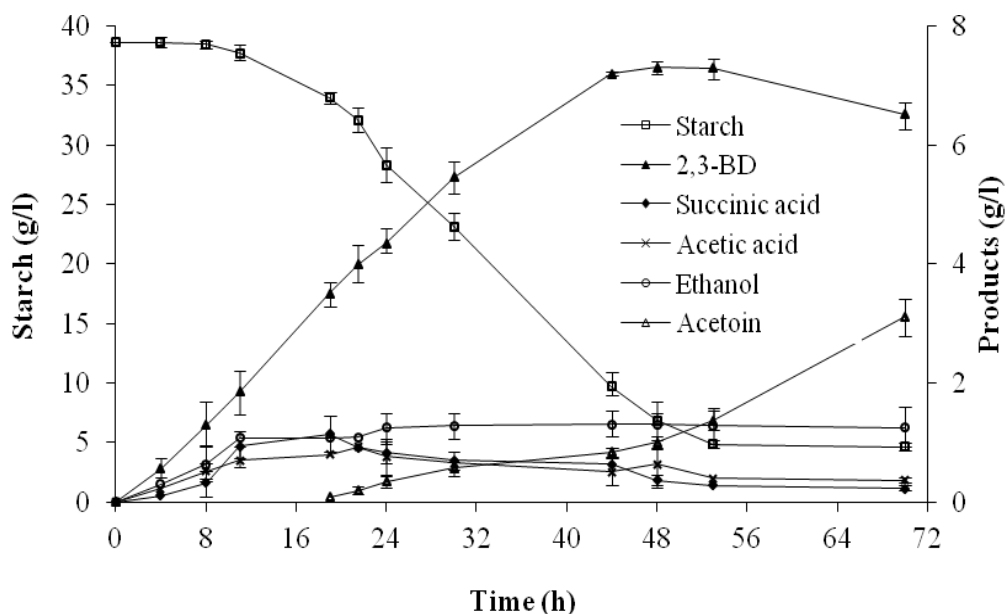
Фигура 24. Клонирането на *amyL* от *B. licheniformis* във вектор pJET2.1/blunt.



Фигура 25. Субклонирание на ген *amyL* от pJET_{amyBL} във вектор pCR[®]2.1-TOPO[®].

Ферментиране на нишесте от *K. pneumoniae* G31-A

Способността да ферментират нишесте, метаболитните профили и амилазната активност на родителския щам *K. pneumoniae* G31 и рекомбинантния *K. pneumoniae* G31-A бяха сравнени в периодични процеси. Двата щам са култивирани във вече оптимизираната за получаване на 2,3-БД от глюкоза среда M7d. В тази среда (виж Табл. 6), вместо глюкоза, като единствен въглерод източник е използвано картофено нишесте с начална концентрация 40 g/L. Резултатите показват, че дивият тип *K. pneumoniae* G31 е способен да се развива на среда с нишесте, но за 48 часа конвертира едва 4.9 g/L. Не се детектират нито екстрацелуларна амилазна активност, нито метаболитни продукти, включително 2,3-БД. Обратно, за същия период, рекомбинантният щам *K. pneumoniae* G31-A конвертира 35 g/L нишесте и продуцира 7.3 g/L 2,3-БД. Кинетики на усвояването на нишесте и формирането на метаболитни продукти от рекомбинанта са представени на Фиг. 26.



Фигура 26. Времени профили на разграждане на нишесте и формиране на метаболити при периодична ферментация на 40 g/L нишесте от рекомбинанта *K. pneumoniae* G31-A. Хранителна среда – M7d, култивиране на клатачка при 37 °C, 200 rpm, в колби от 500 mL със 100 mL среда.

Влияние на IPTG върху амилазната активност на G31-A

Поради това, че в рекомбинанта *K. pneumoniae* G31-A *amyL* се транскрибира под контрола на *lac* промотор, към средата са изпробвани добавки на различни

концентрации на индуктора IPTG (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид) – неметаболизиращ се аналог на лактозата. Целта е да се индуцира допълнително транскрипцията на амилазния ген. Тествани са добавки от 0.1, 1 и 1.5 mM IPTG, добавени непосредствено преди началото на ферментационния процес. Процесите на усвояване на нишесте, формиране на продукти и изменение на амилазната активност в тези три случая е сравнена с процеса без индуциран контрол след 24 часа ферментация (Табл. 8). От таблицата се вижда, че добавката на IPTG има позитивен ефект върху процеса на усвояване на нишесте, въпреки че разликите с процеса без индуциране не са особено значителни. С увеличаване на добавката на IPTG, амилазната активност (на 24ти час) се увеличава почти два пъти – от 7.95 U/mL (в процеса без индукция) до 13.44 U/mL (при процеса с максимална индукция – 1.5 mM IPTG). Въпреки това, максимално количество продуциран 2,3-БД се наблюдава при процеса с индукция от 1.0 mM IPTG (Табл. 8) – 5.01 g/L за 24 часа. Това означава, че индуциране с над 1.0 mM IPTG не води до допълнително акумулиране на целевия продукт и излишно би оскъпило процеса. Поради това, всички следващи оптимизации са проведени с добавка от 1.0 mM IPTG.

Влияние на Ca^{2+} върху амилазната активност на G31-A

Тъй като амилазите са металоензими, наличието на Ca^{2+} в средата се счита за необходимо за повишаване на активността и стабилизирането на α -амилазите от род *Bacillus* (Nagihara et al., 2001). Поради това, в средата (в основната среда M7d липсва Ca) са добавени различни концентрации Ca^{2+} под формата на 0.01, 0.1 и 0.2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. В среди с различните добавки са проведени периодични култивирания на *K. pneumoniae* G31-A, като амилазните активности, количествата усвоено нишесте и формираните продукти са сравнени с тези, при култивиране в среда без калции (Табл. 19 и ред 3 от Табл. 8).

Резултатите показват, че добавка от 0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ оказва слаб, макар и положителен ефект върху амилазната активност, увеличавайки я от 13.30 на 16.86 U/mL (ред 3 от Табл. 8 и ред 1 от Табл. 9). Също така, количеството усвоено нишесте за 24 часа се увеличава от 14.51 на 17.84 g/L. Формираното количество 2,3-БД обаче, намалява от 5.01 на 4.84 g/L.

Таблица 8. Влияние на индуктора IPTG (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) при ферментация на картофено нишесте от *Klebsiella pneumoniae* G31-A. Представените стойности за амилазна активност, общо количество екстрацелуларен белтък, концентрации на продукти и усвоено нишесте са измерени след 24 часа ферментация.

IPTG (mM)	Консумирано нишесте (g/L)	Амилазна активност (U/ml)	Протеин (mg/mL)	Специфична активност (U/mg прот.)	2,3-БД (g/L)	Ацетоин (g/L)	Сукцинова к-на (g/L)	Оцетна к-на (g/L)	Етанол (g/L)
0.0 (Control)	11.66±1.48	7.95±1.03	0.07±0.00	113.6	4.35±0.18	0.34±0.09	0.83±0.18	0.76±0.30	1.25±0.26
0.1	14.47±0.58	12.48±1.00	0.08±0.00	156.0	4.47±0.11	0.41±0.12	0.88±0.10	0.63±0.16	1.23±0.09
1.0	14.51±1.05	13.30±0.57	0.08±0.00	166.3	5.01±0.05	0.83±0.08	0.83±0.05	0.50±0.10	1.74±0.20
1.5	15.04±0.84	13.44±1.64	0.08±0.00	168.0	4.89±0.13	1.19±0.11	0.71±0.11	0.60±0.13	1.73±0.31

Таблица 9. Влияние на съдържанието на Ca²⁺ в средата при ферментация на картофено нишесте от *Klebsiella pneumoniae* G31-A. Представените стойности за амилазна активност, общо количество екстрацелуларен белтък, концентрации на продукти и усвоено нишесте са измерени след 24 часа ферментация. При всички процеси е осъществена индукция с 1.0 mM IPTG

CaCl ₂ ·2H ₂ O (g/L)	Консумирано нишесте (g/L)	Амилазна активност (U/mL)	Протеин (mg/mL)	Специфична активност (U/mg прот.)	2,3-БД (g/L)	Ацетоин (g/L)	Сукцинова к-на (g/L)	Оцетна к-на (g/L)	Етанол (g/L)
0.01	17.84±0.28	16.86±0.82	0.08±0.01	210.8	4.84±0.19	1.16±0.08	1.17±0.10	2.62±0.13	1.50±0.04
0.1	40	65.10±7.55	0.19±0.02	342.6	2.46±0.14	0.54±0.11	0.33±0.06	2.86±0.08	0.65±0.11
0.2	40	68.19±9.62	0.21±0.02	324.7	0.47±0.07	0.23±0.09	0	2.04±0.22	0.25±0.13

При процесите с добавка на 0.1 и 0.2 g/L CaCl₂.2H₂O (съответно 10 и 20 пъти повече калций), тези тенденции се увеличават значително. Амилазните активности в двата процеса достигат 65 – 68 U/mL, и в двата случая за 24 часа е разградено цялото налично количество нишесте (40 g/L), но продуцираните количества 2,3-БД са много по-ниски – 2.46 и 0.47, съответно.

Изследване на междинните продукти в процеса на хидролиза на нишестето (олигозахариди) показва, че този ефект се дължи на силно акумулиране на олигозахариди със степен на полимеризация 2 (DP₂ - малтоза) и особено с 3 (DP₃ - малтотриоза) и 5 (DP₅ - малтопентаоза), непозволяващи по-нататъшна конверсия до глюкоза и 2,3-БД. Колкото по-висока е концентрацията на добавения калций в средата, толкова по-силно е натрупването на тези захари, като най-значим е този ефект при малтопентаозата. Така например, при добавка на 0.2 g/L CaCl₂.2H₂O, след 24 часа ферментация в средата се акумулират 11.2 g/L малтопентаоза, 5.5 g/L малтотриоза и 1.8 g/L малтоза. От фигурите се вижда, че тези процеси на акумулиране започват още преди 6-тия час на ферментацията. Обратно, при процесите без или с незначителна (0.01 g/L) добавка на калций, акумулиране на олигозахариди с DP_≤8 не се забелязва в който и да е момент. Това е и причината в тези процеси крайната концентрация на 2,3-БД да е значително по-висока.

Влияние на добавка на глицин върху амилазната активност на G31-A

За увеличаване на пропускливостта на клетъчната мембрана, в различни концентрации, към средата е добавен глицин. Целта е да се подпомогне транспорта на екстрацелуларната амилаза през клетъчната мембрана, което би осигурило по-бърз контакт с молекулите на субстрата в извънклетъчното пространство. Тествани са 5 различни концентрации глицин (0.1, 0.3, 0.5, 0.6 и 0.7 %), които са добавени в среда M7d съдържаща 40 g/L картофено нишесте и оптимизираната вече концентрация на индуктор - 1.0 mM IPTG.

Влиянието на различните концентрации глицин върху процеса е установено след 24 часа култивиране на *K. pneumoniae* G31-A в така приготвените среди. Резултатите са показани на Таблица 20. Вижда се, че глицинът чувствително увеличава амилазната активност (от 15.63 U/mL при добавка от 0.1 % глицин до 81.16 U/mL при добавка от 0.7 % глицин) и скоростта на деградация на нишестето. С увеличаване на концентрация на глицин, общото количество извънклетъчен протеин се увеличава повече от пет пъти, но измененията в стойностите на специфичната ензимна активност, не са значителни (максимум при добавка от 0.5 % глицин от 197.8 U/mg протеин до минимум от 143.6 U/mg протеин при добавка от 0.6 % глицин). Това показва, че при концентрация на глицин над определени стойности, клетките започват частично да лизират и вътрешноклетъчните протеини излизат в извънклетъчната фракция. Поради това, при стойности на

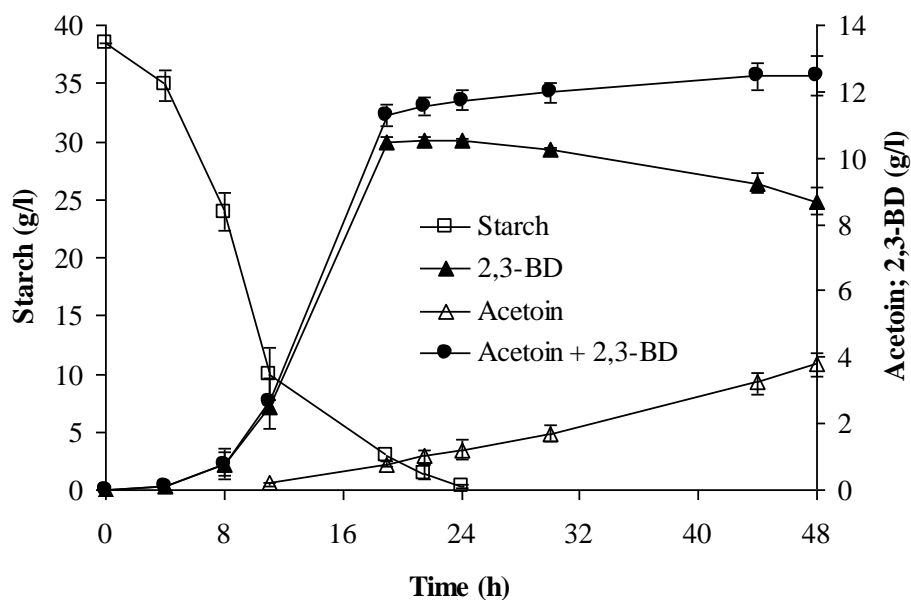
глицин над 0.5 % се наблюдава и рязко намаляване на концентрацията на метаболити (Табл. 10).

За получаване на 2,3-БД оптималната концентрация на глицин е 0.5 % - 10.54 g/L. В този случай е достигната амилазна активност 41.54 U/mL и специфична амилазна активност 197.8 U/mg протеин. Кинетики на усвояване на нишесте и формиране на 2,3-БД и ацетоин, в този процес, са представени на Фиг. 27. Кинетиките на формиране на останалите продукти са показани на Фиг. 28, а изменението на амилазната активност и количеството извънклетъчен протеин – на Фиг. 29. Прави впечатление, че 40 g/L нишесте са напълно усвоени за период от 19 – 24 часа. На 24ти час е достигната и максималната концентрация на 2,3-БД (10.54 g/L), след което се наблюдава лек спад, вероятно поради преминаване на 2,3-БД в ацетоин.

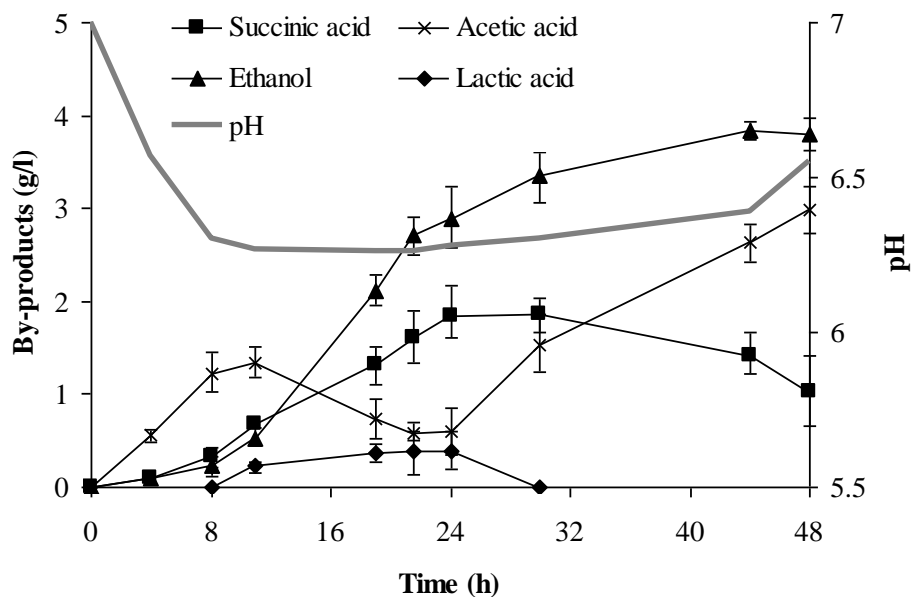
От своя страна, ацетоинът достига необходимата за детектиране концентрация на пети час, след което се увеличава плавно до края на ферментацията (48 часа). Общото количество 2,3-БД и ацетоин след 48 часа ферментиране достига 12.5 g/L (Фиг. 27). При формирането на останалите продукти се забелязва, че млечната и сукциновата к-ни достигат своето максимално акумулиране около 24ти час, след което се реасимилират, млечната к-на напълно. При формирането на оцетна к-на се наблюдава първоначално натрупване до юти час, след това намаляване на концентрацията до 0.6 g/L (този период съвпада със силно продуциране на 2,3-БД), след което отново се акумулира до края на ферментацията (Фиг. 28). Амилазната активност и количеството извънклетъчен протеин нарастват през целия период на ферментацията. рН на средата намалява от 7.0 до 6.3 за първите осем часа, след което се наблюдава леко повишение, усилващо се към края на ферментацията (Фиг. 29).

Таблица 20. Влияние на съдържанието на глицин в средата при ферментация на картофено нишесте от *Klebsiella pneumoniae* G31-A. Представените стойности за амилазна активност, общо количество екстрацелуларен белтък, концентрации на продукти и усвоено нишесте са измерени след 24 часа ферментация. При всички процеси е осъществена индукция с 1.0 mM IPTG

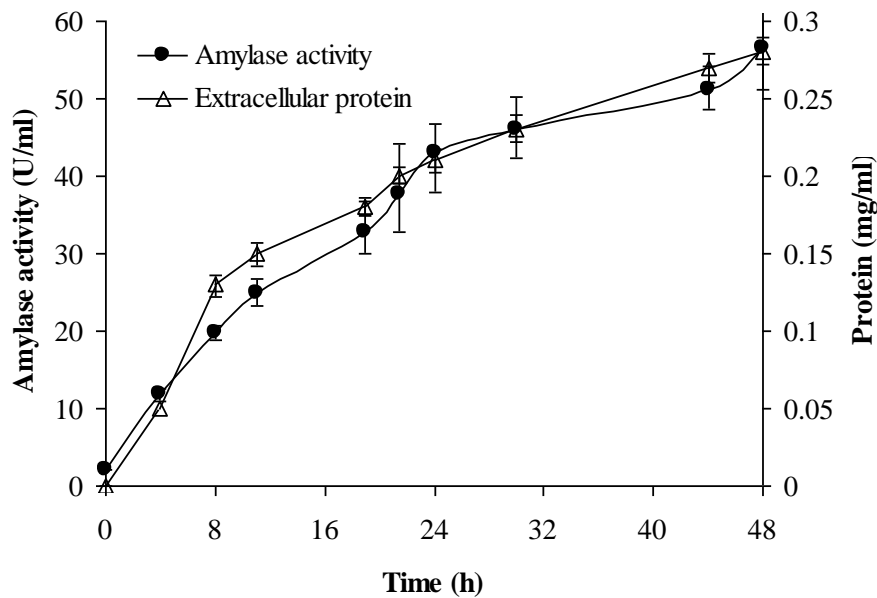
Глицин (%)	Консумирано нишесте (g/L)	Амилазна активност (U/ml)	Протеин (mg/mL)	Специфична активност (U/mg прот.)	2,3-БД (g/L)	Ацетоин (g/L)	Млечна к-на (g/L)	Сукцинова к-на (g/L)	Оцетна к-на (g/L)	Етанол (g/L)
0.1	34.66±1.15	15.63±1.39	0.09±0.00	173.7	5.80±0.19	0.58±0.14	0	1.54±0.18	1.01±0.02	2.07±0.23
0.3	37.66±0.48	24.82±4.23	0.14±0.00	177.3	9.08±0.14	1.17±0.05	0	2.15±0.27	1.05±0.04	2.14±0.17
0.5	40	41.54±5.48	0.21±0.02	197.8	10.52±0.17	1.21±0.14	0.39±0.21	1.84±0.28	0.60±0.26	2.89±0.34
0.6	40	54.55±4.85	0.38±0.02	143.6	10.16±0.28	0.92±0.12	0	1.75±0.35	0.90±0.31	2.58±0.44
0.7	40	81.16±7.64	0.52±0.02	156.1	1.61±0.43	0.39±0.26	0	0.18±0.16	0.23±0.10	0.15±0.07



Фигура 27. Времени профили на разграждане на нишесте и формиране на 2,3-БД и ацетоин при периодична ферментация на 40 g/L нишесте от *K. pneumoniae* G31-A. Хранителна среда – M7d + 1.0 mM IPTG + 0.5 % глицин. Култивиране на клатачка при 37 °C, 200 rpm, в колби от 500 mL със 100 mL среда.



Фигура 28. Времени профили на формиране на странични продукти при периодична ферментация на 40 g/L нишесте от *K. pneumoniae* G31-A. Хранителна среда – M7d + 1.0 mM IPTG + 0.5 % глицин. Култивиране на клатачка при 37 °C, 200 rpm, в колби от 500 mL със 100 mL среда.



Фигура 29. Изменение на амилазната активност и количеството извънклетъчен протеин при периодична ферментация на 40 g/L нишесте от *K. pneumoniae* G31-A. Хранителна среда – M7d + 1.0 mM IPTG + 0.5 % глицин. Култивиране на клатачка при 37 °C, 200 rpm, в колби от 500 mL със 100 mL среда.

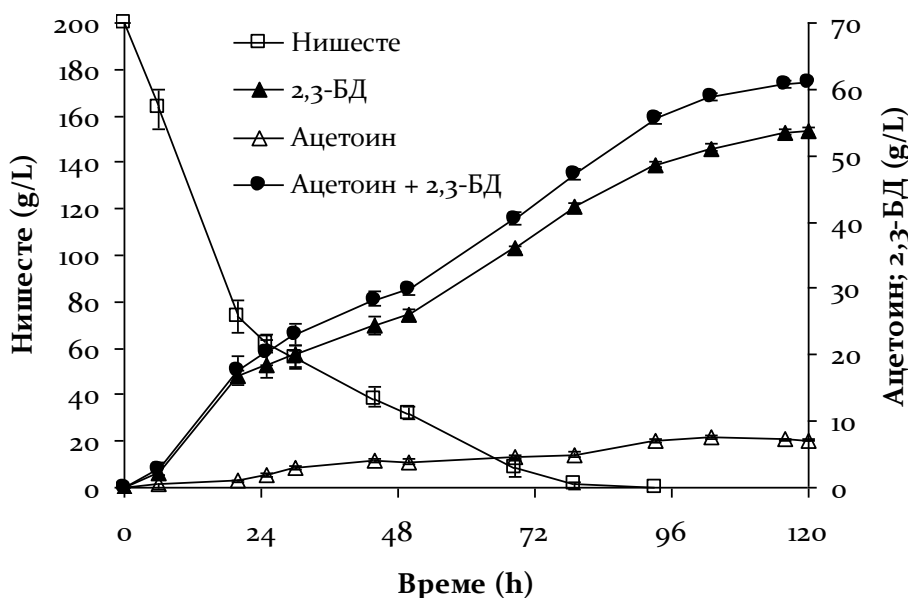
Усвояване на концентрирани нишестени разтвори от G31-A

След оптимизиране на процесните параметри и състава на хранителната среда (концентрации на индуктор, стабилизатор и глицин за разрежаване на клетъчната мембрана), е тествана способността на *K. pneumoniae* G31-A да усвоява високо концентрирани разтвори на нишесте – хранителни среди съдържащи като единствен въглероден източник 100, 200 и 300 g/L картофено нишесте. Усвояването на тези тези концентрации би доказало приложимостта на рекомбинанта за промишлено получаване на 2,3-БД от нишесте.

Култивиранятията са проведени на клатачка в колби от 500 mL със 100 mL среда. Температурата на култивиране е запазена (37 °C), но оборотите са повишени (в сравнение с експериментите с 40 g/L нишесте) на 240 rpm поради силно увеличената вискозност на средата. Резултатите от трите експеримента са показани на Табл. 11. В процеса с начална концентрация 100 g/L, нишестето е напълно разградено за около 30 часа, при начална концентрация 200 g/L – за 90 часа, при начална концентрация 300 g/L – за 120 часа. В случаите с 200 и 300 g/L субстрат, културалната среда напълно се втечнява след едно – две денонощия. Това показва изключителните амилазолинични качества на рекомбинанта *K. pneumoniae* G31-A. Максималните концентрации 2,3-БД са 25.9 g/L от 100 g/L нишесте (достигната след

48 часа) тези случаи, 53.8 g/L от 200 g/L нишесте (след 120 часа) и 52.0 g/L от 300 g/L нишесте (след 140 часа) (Табл. 11). В последните два случая максималните концентрации на диоли (2,3-БД + ацетоин) е еднакво – 60.9 – 61 g/L (Трябва да се спомене, че ацетоинът – 3-хидрокси-2-бутанон, всъщност не е диол, но общоприетият термин „общо диоли“ го включва). От икономическа гледна точка (добив и продуктивност), обаче, процесът с начална концентрация 200 g/L нишесте е най-перспективен. В процеса с начална концентрация 300 g/L, въпреки че по използваната методика след 140 часа ферментационно време не се детектира нишесте, вероятно голяма част от въглерода е под формата на олигозахариди, докато добивът на диоли е едва 0.2 (g/g) (общата концентрация на течни метаболити е едва 69 g/L).

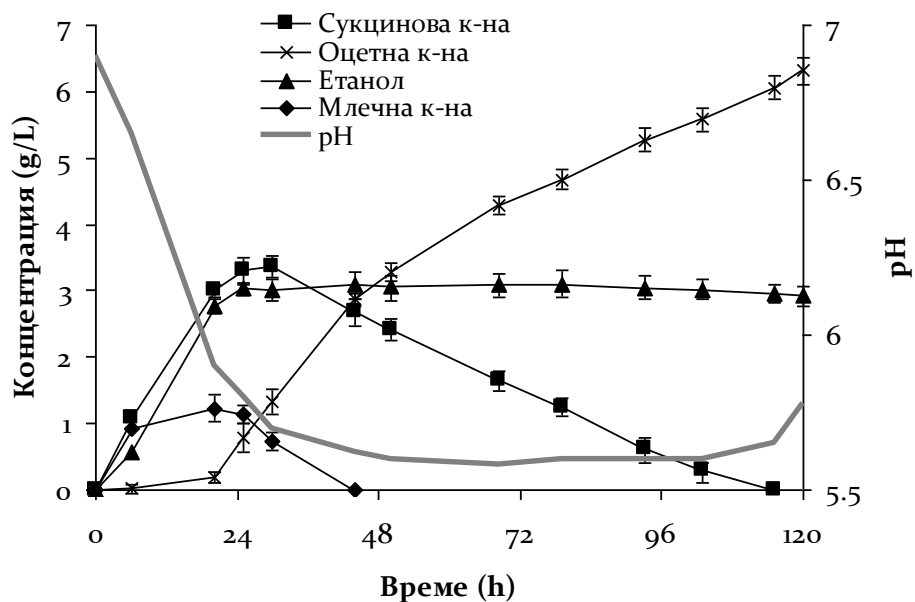
На Фиг. 30 са представени измененията в концентрациите на нишесте, 2,3-БД и ацетоин в процеса с нач. концентрация на нишесте 200 g/L. В този процес, след главния продукт 2,3-БД (53.8 g/L), ацетоинът е втори с концентрация 7.13 g/L. След 120 часа се детектират още само два течни метаболита – оцетна киселина – 6.31 g/L, и етанол – около 3 g/L. Други два метаболита – млечна и сукцинова киселини, дотогава са напълно реасимилирани (на 45-ти и 115-ти час, съответно) (Фиг. 31).



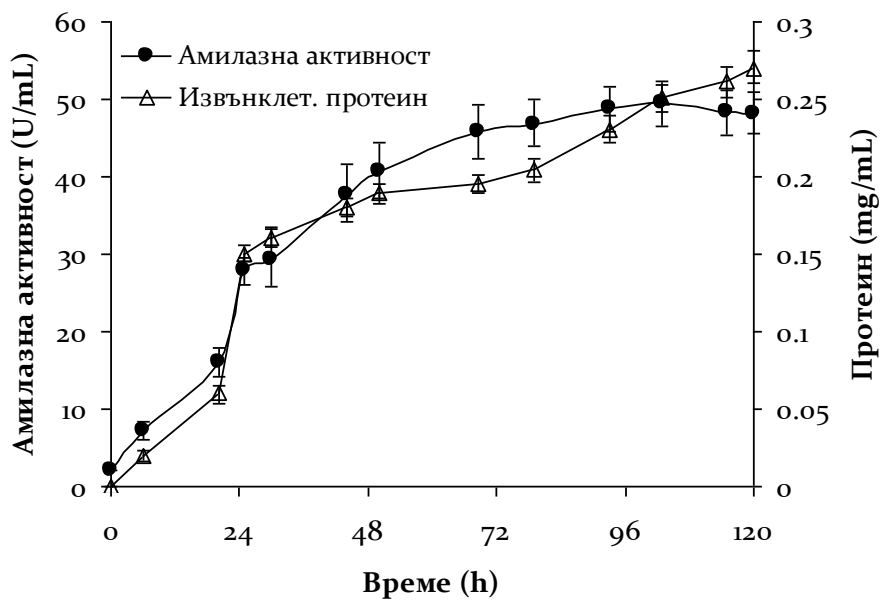
Фигура 30. Разграждане на нишесте и формиране на 2,3-БД и ацетоин при периодична ферментация на 200 g/L нишесте от *K. pneumoniae* G31-A. Хранителна среда – M7d + 1.0 mM IPTG + 0.5 % глицин. Култивирание на клатачка при 37 °C, 240 rpm, в колби от 500 mL със 100 mL среда.

Таблица 11. Усвояване на високо концентрирани нишестени разтвори от *Klebsiella pneumoniae* G31-A. Представени са крайните стойности за концентрацията на метаболитите. Култивиранията са извършени в хранителна среда – M7d + 1.0 mM IPTG + 0.5 % глицин, на клатачка при 37 °C, 240 rpm, в колби от 500 mL със 100 mL среда.

Нишесте (g/L)	Продължителност (h)	2,3-БД (g/L)	Ацетоин (g/L)	Диоли (g/L)	Продуктивност диоли (g/Lh)	Добив диоли (g/g)	Млечна к-на (g/L)	Сукцинова к-на (g/L)	Оцетна к-на (g/L)	Етанол (g/L)
100	48	25.9±0.3	3.92±0.19	29.8	0.621	0.298	0.55±0.18	2.65±0.12	1.50±0.26	2.03±0.16
200	120	53.8±0.5	7.13±0.22	60.9	0.508	0.305	-	-	6.31±0.21	2.93±0.14
300	140	52.0±0.5	9.03±0.17	61.0	0.436	0.203	-	-	4.79±0.27	3.15±0.17



Фигура 31. Формиране на странични продукти при периодична ферментация на 200 g/L нишесте от *K. pneumoniae* G31-A. Хранителна среда – M7d + 1.0 mM IPTG + 0.5 % глицин. Култивиране на клатачка при 37 °C, 240 грм, в колби от 500 mL със 100 mL среда.



Фигура 32. Изменение на амилазната активност и количеството извънклетъчен протеин при периодична ферментация на 200 g/L нишесте от *K. pneumoniae* G31-A. Хранителна среда – M7d + 1.0 mM IPTG + 0.5 % глицин. Култивиране на клатачка при 37 °C, 240 грм, в колби от 500 mL със 100 mL среда.

По време на ферментацията, рН пада до 5.6 – 5.7 на 48-мия час (т.е. до много по-ниски стойности отколкото при аналогичната ферментация на 40 g/L нишесте) и започва да се покачва след по-тия час (Фиг. 31).

Амилазната активност се повишава непрекъснато до 96-тия час, след което леко намалява (Фиг. 32). От друга страна, количеството извънклетъчен протеин, което общо взето следва повишението на амилазната активност по време на процеса, продължава да се увеличава и след 96-тия час, което говори (както и увеличаването на рН в този период) за повишена смъртност и клетъчен лизис, индикиращи края на ферментационния процес.

Заклучение

Описаното изследване представлява първото съобщение за успешен процес на едновременно озахаряване и ферментация (SSF) на нишесте до 2,3-бутандиол. Генетично модифицираният организъм *K. pneumoniae* G31-A е първия щам способен в една стъпка да конвертира нишесте в изключително високи концентрации 2,3-БД (над 14 пъти по-високи от постигнатото до момента, 53.8 vs 3.8). Освен постигната висока концентрация, 2,3-БД е получен със сравнително високи продуктивност (0.51 – 0.62 g/Lh) и добив (0.3 g/g), запазващи се при много високи концентрации на използвания субстрат (до 200 g/L). Концентрацията на съпътстващите ферментационни продукти е много по-ниска, което показва, че основните параметри на процеса, както и състава на средата за инокулиране са до голяма степен оптимизирани.

Причините за този успех на генетично модифицирания щам *K. pneumoniae* G31-A се дължат на хетероложната експресия на ген за амилаза от *B. licheniformis*, притежаваща изключително висока екстрацелуларна активност. В единственото досегашно изследване по темата (Zheng et al., 2008a), в аналогичен щам *K. pneumoniae* KG1 (pUC18K-amy) е извършена хомоложна експресия на ген за ензим без екстрацелуларна активност, постигнатите концентрация, добив и продуктивност (3.8 g/L, 0.19 g/g, 0.16 g/Lh) от нишесте са далеч от нужните за осъществяване на икономически ефективен процес.

3.2.2. Получаване на млечна киселина от нишесте

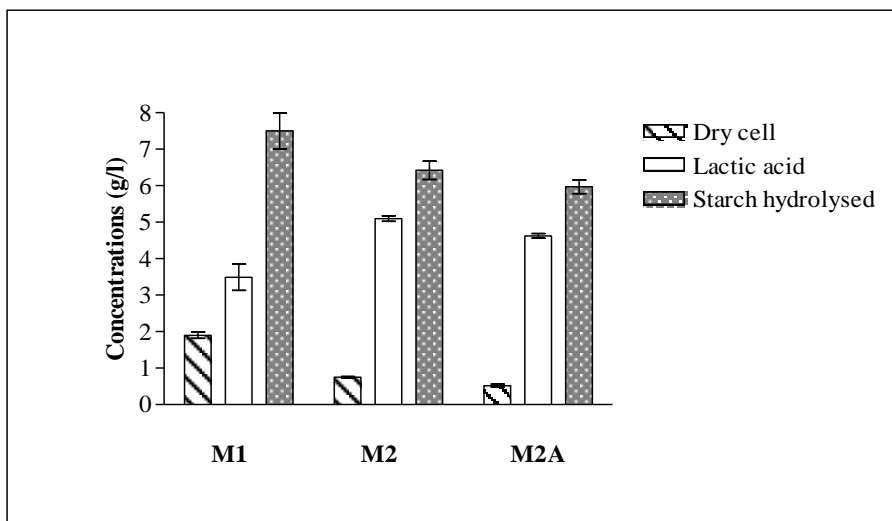
Получаване на МК от нишесте чрез *Lactococcus lactis* B84

Поради естествената си способност да конвертират нишестето директно в млечна киселина, амилолитичните МКБ са обект на изключителен интерес. До момента (2007 г.) обаче, са изолирани едва няколко щама МКБ, способни да секретират амилази (Reddy et al., 2008). В търсене на амилолитични представители на МКБ, е изследвано микробното съдържание на 11 различни типа брашна и теста. Открит е един единствен изолат, способен директно да продуцира МК от нишесте. Изолатът B84 е определен като *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Поради това, че до момента не е са открити лактококи, способни да конвертират нишесте директно до МК, а представителите на вида, способни да усвояват нишесте са изключително редки (Diaz-Ruiz et al., 2003), щам B84 е идентифициран по три различни начина – чрез ARDRA анализ, под-видово специфичен PCR и секвениране на 16S rRNA).

Оптимизиране на хранителната среда

За да се уточнят параметрите за максимален добив на МК, *Lactococcus lactis* B84 е посят в три, производни на MRS среди – M1, M2 и M2A, с единствен въглероден източник нишесте с начална концентрация 20 g/L. Най-висока концентрация на МК е достигната при култивиране на B84 в среда M2 (среда без месен и дрождев екстракт) – 5.10 g/L, а най-малко – в среда M1 (съдържаща двата вида екстракти) – 3.50 g/L. В среда M1 обаче, се забелязва най-силен клетъчен растеж (1.9 g/L DCW), както и най-силна хидролиза на нишестето (хидролизирани са 7.5 g/L) (Фиг. 33). В среди M2 и M2A се забелязва по-слаб растеж – 0.75 и 0.52 g/L DCW, съответно. Количествата хидролизирано нишесте също са по-ниски – 6.4 и 6.0 g/L. От тези резултати се вижда, че наличието на месен и дрождев екстракт (среда M1) способства процесите на натрупване на биомаса и хидролиза на нишесте, но не и секрецията на МК (Фиг. 33).

За секрецията на МК от нишесте при *L. lactis* B84 много важен фактор е наличието на пептон. Изключването му от състава на хранителната среда води до рязко намаляване на продуцирането на МК. Произходът на използвания пептон също е от голямо значение – при използването на месен пептон се получават 5.10 g/L МК (среда M2), но при замяната му с пептон от казеин, количеството получена МК намалява до 4.66 g/L МК (среда M2A), а при използване на соев пептон – едва 2.2 g/L МК. Наличието на соли също е важно за продуцирането на МК. Изключването им от състава на среда M2 води до намаляване на продуцирането на МК от 5.10 до 3.43 g/L.



Фигура 33. Влияние на азотните източници на хранителната среда върху продуцирането на МК, формирането на биомаса и хидролизата на нишесте от *Lactococcus lactis* B84 в периодични процеси без рН контрол.

Оптимизиране на температурата и скоростта на разбъркване

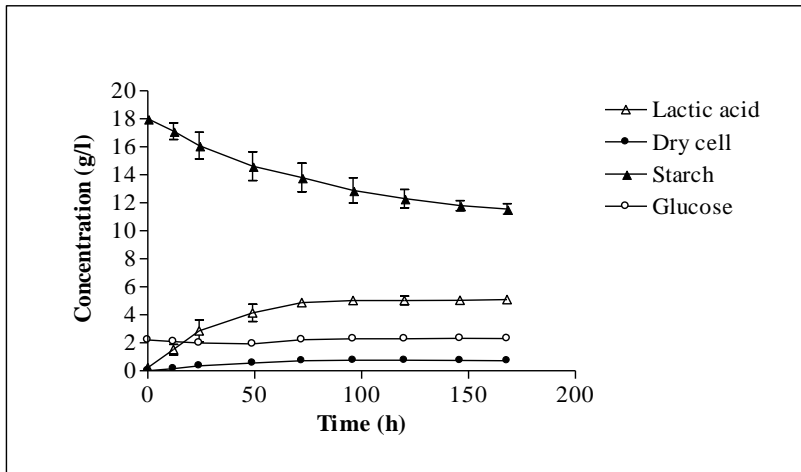
Влиянието на температурата и скоростта на разбъркване върху продуцирането на МК от *Lactococcus lactis* B84 е установено в периодични процеси на клатачка без рН контрол. Резултатите показват, че оптималната температура за получаване на МК е 33 °С. Също така, от фигурата се вижда, че при тази температура скоростта на разбъркване няма особено значение, като в диапазона от 0 до 300 грт почти не се забелязва промяна в количеството на продуцираната МК. Все пак, като абсолютна стойност, тя е най-висока при 200 грт. Кинетика на процеса, проведен при температура 33 °С и скорост на разбъркване 200 грт е показана на Фиг. 34. При този процес, детектираното количество нишесте намалява от 18 g/L (начална стойност след инокулиране) до 11.5 g/L в края на процеса (след 160 часа), т.е. хидролизирани са 36 %. рН на средата намалява от 6.5 до 4.2.

За да се оцени общият капацитет на *Lactococcus lactis* B84 като продуцент на МК, с щам е проведен и процес на ферментация на глюкоза. От 20 g/L глюкоза, щам B84 продуцира 8 g/L МК (от 20 g/L нишесте – 5.1 g/L МК), което показва, че при допълнителни оптимизации, добивът принципно може да достигне 40 %.

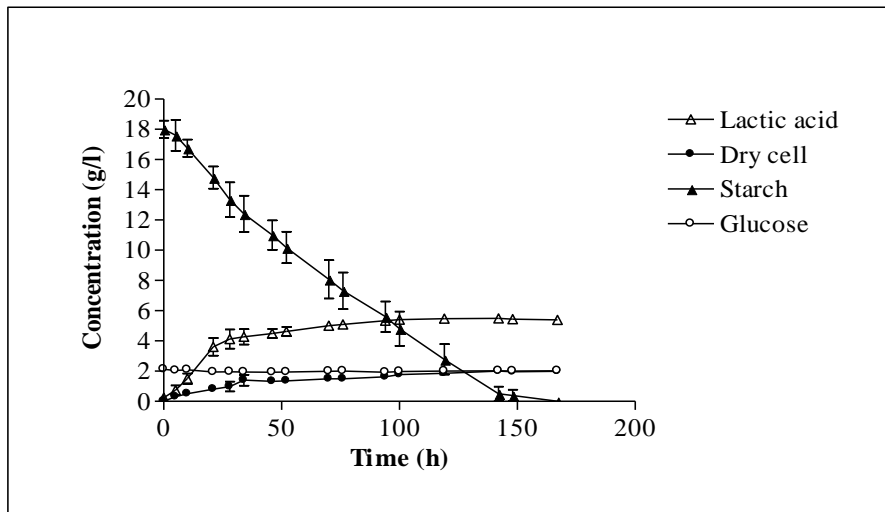
Усвояване на нишесте при контролирано рН на средата

При оптимизираните вече условия, с *Lactococcus lactis* B84 е проведен периодичен процес с контролирано рН на хранителната среда. Поддържането на

pH 6.0 по време на процеса води до силно ускоряване на процесите на хидролиза на нишесте (до пълното му усвояване за малко над 150 часа) и на формиране на биомаса (2.5 пъти по-висока концентрация на DCW). Максималната достигната концентрация на МК обаче, е едва с 8 % повече от тази при аналогичния процес без pH контрол (5.5 g/L срещу 5.1 g/L), което показва силно лимитираните способности на щам В84 като продуцент. Детайлна кинетика на процеса е представена на Фиг. 35.



Фигура 34. Кинетики на разграждане на нишесте, формиране на биомаса и продуциране на МК от *Lactococcus lactis* В84 в периодичен процес проведен при температура 33 °С, скорост на разбъркване 200 rpm и без pH контрол.



Фигура 35. Кинетики на разграждане на нишесте, формиране на биомаса и продуциране на МК от *Lactococcus lactis* В84 в периодичен процес проведен при температура 33 °С, скорост на разбъркване 200 rpm и pH 6.0.

Въпреки, че *Lactococcus lactis* В84 не притежава нужните качества, необходими да осъществяването на един производствен процес за получаване на

МК от нишесте, настоящото изследване е първото съобщение за лактокок, продуциращ МК от нишесте.

Получаване на МК от нишесте чрез *Lactobacillus paracasei* В41

Lactobacillus paracasei В41 е изолиран от боза, приготвена от пшеница. Депозирани са в DSMZ под номер DSM 23505. Щамът е хомоферментативен, като от нишесте продуцира 92.5 % L-(+)-МК. Секвенирането на гена за 16S rRNA показва 100 % идентичност със съответните гени за видовете *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus paracasei* от световната база данни. Поради това, за по-точната му определяне, допълнително е приложен анализ на полиморфните профили на ДНК, получени по метода RAPD, използвайки праймерите 0955 – 03 (Brousseau et al., 1993).

Щам В41 притежава силна екстрацелуларна амилазна активност. Изолираният ензим (*amy 1*) достига максимална активност от 58 – 62 U/mL при температура 45 °C и рН 5.0. Тези нива на активност са близки до активността на *L. plantarum* А6 (60 U/mL) (Giraud et al., 1994) и значително над обичайната за амилитичните лактобацили, варираща обикновено между 6 и 21 U/mL (Agati et al., 1998; Diaz-Ruiz et al., 2003; Songre-Ouattara et al., 2008; Sharma and Satyanarayana, 2013).

Усвояване на нишесте в процеси без рН контрол

За установяване на капацитета на *L. paracasei* В41 да усвоява нишесте са проведени периодични процеси с различна начална концентрация на използвания субстрат – от 30 до 100 g/L. Процесите са осъществени при 37 °C, скорост на разбъркване 90 rpm и инокулиране 10 % (v/v). Резултатите показват, че при процеси без рН контрол, *L. paracasei* В41 може да конвертира напълно до 50 g/L нишесте (Табл. 12), като начални концентрации от 30 – 40 g/L се усвояват напълно за две денонощия. При по-високи начални концентрации на нишесте (50 – 60 g/L) продуктивността и добивът на МК спадат значително. Максималните концентрации МК при всички процеси са в границите на 25 – 26 g/L и не зависят от началната концентрация на субстрата. Лимитиращ фактор е киселинността на средата, достигаща рН 3.7 при тези концентрации на МК.

На Фиг. 3б са показани кинетики на хидролизата на нишесте, продуциране на МК и изменение на рН на средата, в процеса с начална концентрация 40 g/L. През първите 24 часа се наблюдава бърза консумация на субстрат, като повече от 30 g/L нишесте се конвертират в МК. След това, поради силното намаляване на рН на средата, консумацията значително намалява, но въпреки това, след 65 часа нишестето е напълно усвоено. Максималната достигната концентрация на МК е 26.9 g/L (72-ри час), а формираната биомаса – 2.3×10^{10} CFU/mL.

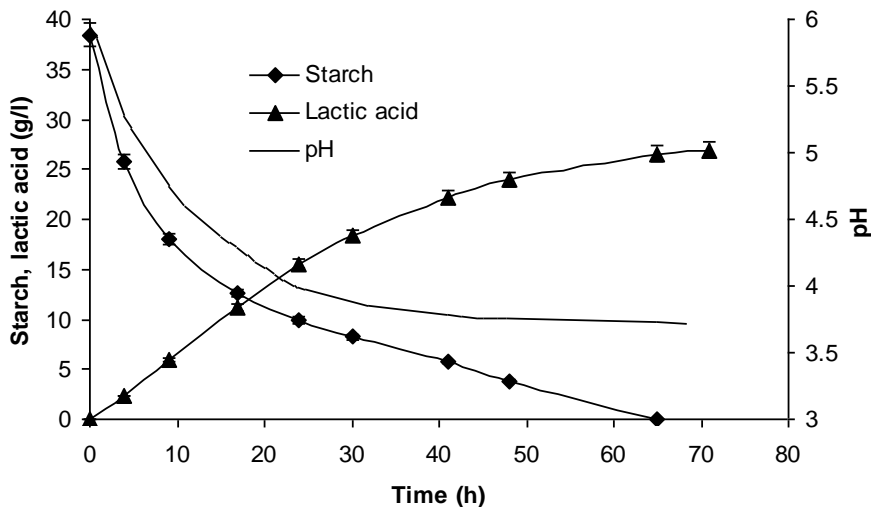
Таблица 12. Конверсия на различни концентрации нишесте и получаване на млечна к-на от *Lactobacillus paracasei* В41 в периодични процеси без рН контрол. Процесите са проведени при температура 37 °С, скорост на разбъркване 90 грт и начално рН на средата – 6.0.

Начална концентрация на нишесте (g/L)	Продължителност (h)	Остатъчно нишесте (g/L)	Млечна к-на ¹ (g/L)	Биомаса ² (CFU/mL)	Добив ³ (%)
30	66	-	22.9	4.5x10 ⁹	76.33
40	72	-	26.9	2.3x10 ¹⁰	67.25
50	72	-	26.6	2.8x10 ¹⁰	45.80
60	72	4.04	26.5	3.2x10 ¹⁰	40.56
100	96	47.20	24.8	2.9x10 ¹⁰	41.29

¹ Максимална достигната стойност

² CFU – формиращи колония клетки

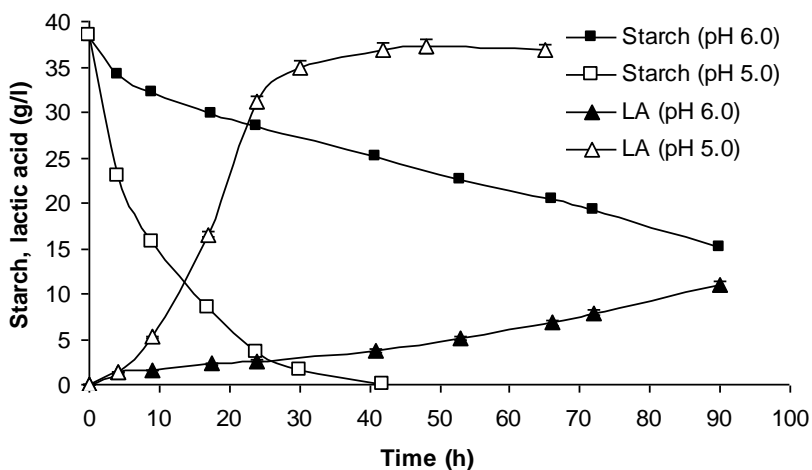
³ (g МК на g усвоено нишесте) x 100.



Фигура 36. Времеви профили на изменение на рН и концентрациите на нишесте и млечна к-на, при ферментация на 40 g/L нишесте от *Lactobacillus paracasei* В41.

Усвояване на нишесте в процеси с рН контрол

От представените дотук резултати се вижда, че високата киселинността на средата (рН 3.7 – 3.9) е основния лимитиращ фактор, непозволяващ получаването на по-високи концентрации МК. За да се преодолее това ограничение, са проведени периодични процеси с контролирано рН на средата 5.0 и 6.0. Процесите на конверсията на нишесте и продуциране на МК, в тези два случая, са показани на Фиг. 37.



Фигура 37. Времени профили на изменение на концентрациите на нишесте и млечна к-на, при ферментация на 40 g/L нишесте от *Lactobacillus paracasei* В41 в процеси с контролирано рН на средата.

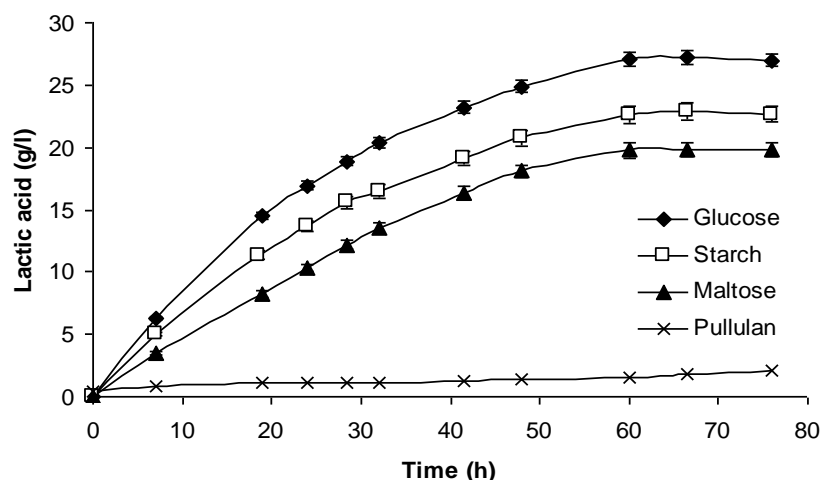
От фигурата се вижда, че при рН 6.0 процесите на хидролизиране на нишесте и продуциране на МК са значително по-бавни от тези при процеса без рН контрол. След 90 часа ферментация нишестето е хидролизирано наполовина, концентрацията на МК е едва 10.9 g/L, а формираната биомаса - 5.2×10^5 CFU/mL. Обратно, при процеса с рН контрол 5.0, нишестето (40 g/L) е хидролизирано напълно за едва 40 часа. След 48 часа ферментация е достигната максималната концентрация на МК - 37.3 g/L (добив 0.93 g/g, продуктивност 0.78 g/Lh), кореспондираща на витална биомаса от 3.9×10^{12} CFU/mL (два порядъка по-висока от процеса без рН контрол и 7 – от процеса при рН 6.0). За първите 24 часа продуктивността е 1.30 g/Lh.

Въпреки, че повечето лактобацили увеличават своя растеж и продуктивност при рН 6.0, това не се наблюдава при *L. paracasei* В41. Причината вероятно е ниският рН оптимум на амилазата му – 4.8 - 5.0. За сравнение, при температура от 37 °С, ензимът показва 5 до 8 пъти по-слаба активност при рН 6.0, отколкото при рН

5.0. Това рефлектира върху процеса на хидролиза на нишестето, който при рН 6.0 е много по-бавен дори от отчетения в процеса без рН контрол.

Усвояване на глюкоза, малтоза и пулулан

Доколкото нишесте-съдържащите храни обикновено имат комплексно въглехидратно съдържание, *L. paracasei* В41 е тестван за получаване на МК от глюкоза, малтоза и пулулан. В процеси без рН контрол, изброените въглехидрати с начална концентрация от 30 g/L, са използвани като единствен въглероден източник за ферментиране от *L. paracasei* В41. След 72 часа ферментация, от глюкоза са получени 27.2 g/L МК, от нишесте – 22.9 g/L, от малтоза – 19.8 g/L, от пулулан – 1.9 g/L (Фиг. 38).



Фигура 38. Получаване на МК при ферментацията на различни въглехидрати с начална концентрация 30 g/L от *Lactobacillus paracasei* В41 в процеси без рН контрол.

Крайните концентрации на биомаса са съответно 6.2×10^{11} CFU/mL (глюкоза), 4.5×10^9 CFU/mL (нишесте), 2.4×10^9 CFU/mL (малтоза) и 3.1×10^2 CFU/mL (пулулан). Тези резултати показват, че преференциален субстрат за *L. paracasei* В41 е глюкозата, следвана от нишестето, малтозата и пулулана. Забележително е, че при конверсията на глюкоза в МК, дори при процес с неконтролирано рН, добивът е 0.91 g/g.

Заклучение

За разлика от преди описаните амилалитични изолати (*Lactococcus lactis* В84, *Lactobacillus plantarum* Vom 816 и *Lactobacillus pentosus* N3), *Lactobacillus paracasei* В41 е един от най-ефективните, естествени продуценти на МК от нишесте.

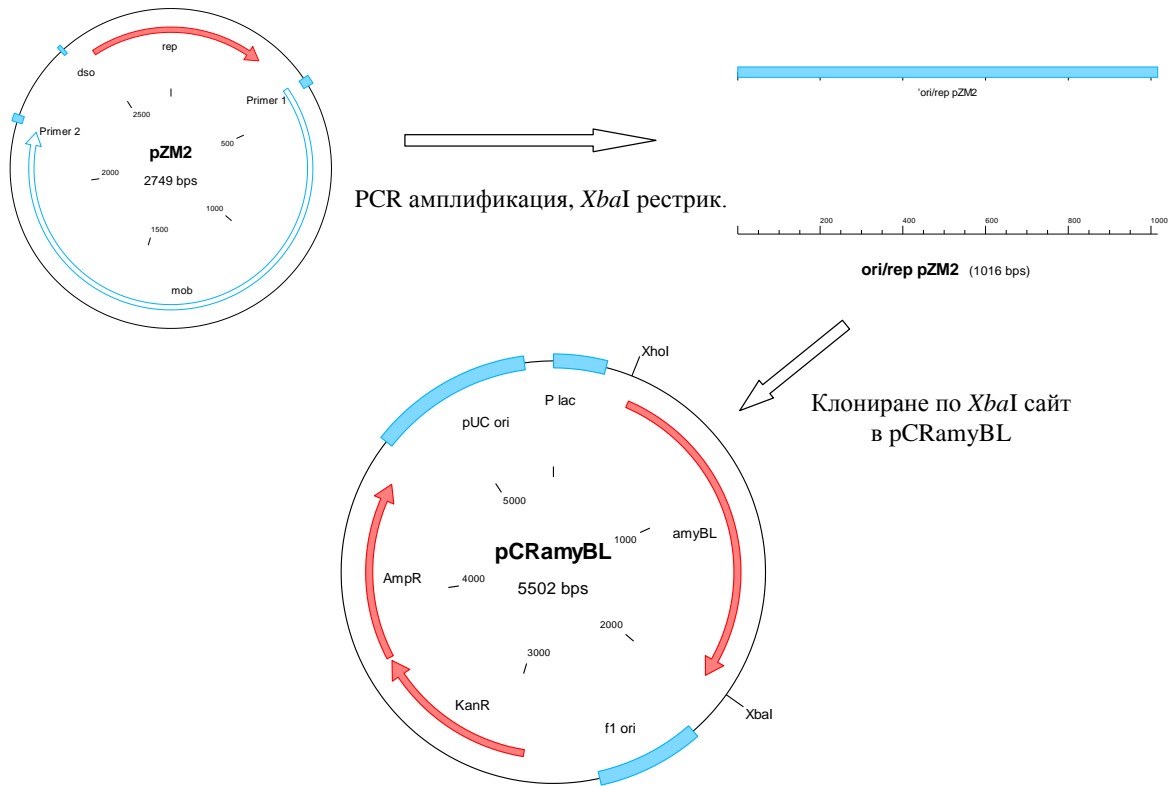
До момента бяха описани три щама с подобни възможности – *L. amylophilus* GV6 (Vishnu et al., 2002), *L. manihotivorans* LMG 18010 и *Streptococcus bovis* 148 (Narita et al., 2004). Сравнен с тях, щам В41 продуцира МК от нишесте с добив 0.933 g/g, докато при *S. bovis* 148 добивът е 0.88 g/g, а при *L. manihotivorans* LMG 18010 – едва 0.67 g/g. Щамът е способен да усвои напълно нишесте с начална концентрация 50 g/L, показвайки добър растеж и силни амилолитични качества дори при начална концентрация от 100 g/L. Това показва, че *L. paracasei* В41 би могъл успешно да се използва като промишлен щам за получаване на МК от нишестени материали.

3.2.3. Получаване на етанол от нишесте

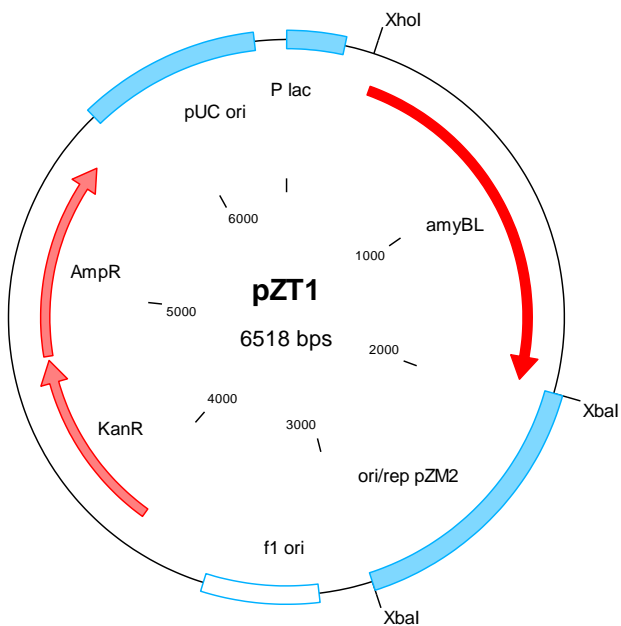
Zyomonas mobilis представлява пръчковидна, Грам-отрицателна бактерия, изолирана първоначално от алкохолни напитки. Притежава огромен потенциал като продуцент на етанол, със значителни предимства пред най-използвания вид за промишленото му получаване – *Saccharomyces cerevisiae*: *Z. mobilis* продуцира етанол в по-високи добив и концентрация, формира значително по-малко биомаса (което допълнително увеличава добива на продукта), издържа по-високи концентрации етанол (до 150 g/L) и метаболизира захарите с по-висока скорост. В допълнение, за разлика от дрождите, не изисква контролирано добавяне на кислород по време на ферментацията (Gunasekaran and Raj, 1999). Единственият сериозен недостатък на *Z. mobilis* спрямо дрождите е изключително тесния му субстратен спектър – усвоява единствено глюкоза, фруктоза и захароза (Parras et al., 2011). Поради това, в качеството си на продуцент на етанол, видът е обект на генетични манипулации преди всичко с цел разширяване на субстратния му спектър (Skotnicki et al., 1980; Carey et al., 1983; Goodman et al., 1986).

В настоящето изследване, като обект на трансформация за разширяване на субстратния спектър, е избран свръхпродуцента на етанол *Zyomonas mobilis* DSM424. За придаване на амилолитични качества на щам DSM424, е използван конструктът pCRamyBL (5502 bp), съдържащ под контрола на *Plac* промотор, гена *amyL*, кодиращ α -амилаза в *Bacillus licheniformis* щам 44 MB82/G. Конструктът е произведен на pCR[®]2.1-ТОРО[®] (*E. coli*), използван за трансформация на *K. pneumoniae* G31 за получаване на 2,3-БД от нишесте.

За да се осигури нормална репликация на конструкта pCRamyBL в *Z. mobilis* DSM424, в него е добавен фрагмент с дължина 1016 bp, съдържащ *dso ori* (двойно верижно начало на репликацията, характерно за плазмидите на *Z. mobilis*) и *rep* ген (ген кодиращ репликативен протеин). Този фрагмент е получен като PCR-продукт с матрица естествения плазмид на *Z. mobilis* DSM424 pZM2 (2749 bp) (Misawa and Nakamura, 1989).



Фигура 39. Схема на клониране на фрагмента (1016 bp), съдържащ *dso* и *rep*-ген от плазмидата pZM₂ (2749 bp) на *Z. mobilis*, в конструкта pCRamyBL по сайт за рестрикция *XbaI*.

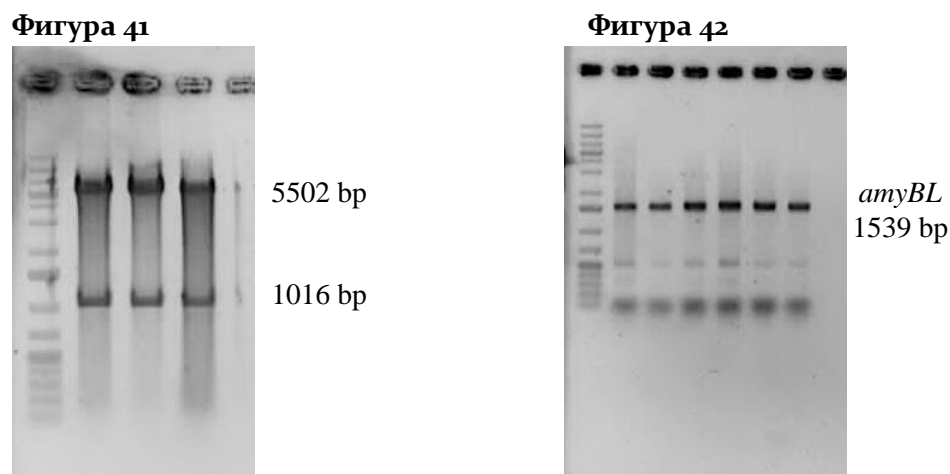


Фигура 40. Карта на полученият конструкт pZT₁ (6518 bp). Така полученият совалков конструкт е наречен pZT₁ (Фиг. 93) и съдържа 6518

бр. С конструкта са трансформирани компетентни клетки *E. coli* DH5 α , като рекомбинантните клонове са селектирани на базата на резистентността им към ампицилин (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). След изолиране на плазмидна ДНК от селектираните клонове, тя е рестрицирана с *Xba*I и след визуализация на електрофореза (Фиг. 41) – секвенирана.

След трансформация на *Z. mobilis* DSM424, позитивните клонове са подбрани на базата на резистентността им към канамицин (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Поради това, че дивият тип съдържа естествени плазмиди, рестрикция с *Xba*I за доказване на наличието на рZT1 не е приложима. Вместо това, е извършена PCR амплификация на *amy*BL, като за матрица е използвана тотална плазмидна ДНК на клона (Фиг. 42).

Резултатите показват стабилността на совалковия вектор рZT1 и в двата гостоприемника.

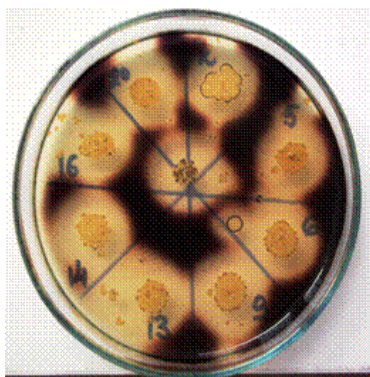


Фигура 41. Визуализация на рекомбинантни клонове на *E. coli* - рZT1, изолиран от *E. coli* DH5 α и рестрициран с *Xba*I.

Фигура 42 PCR амплификация на изолирана от клонове *Z. mobilis* плазмидна ДНК, съдържаща рZT1 (респективно *amy*BL).

Клоновете *E. coli* DH5 α , съдържащи рZT1 са посяти на агарова среда с нишесте за определяне на експресията на *amy*BL. Около колониите се формира зона от разградено нишесте, което показва силно продуциране на екстрацелуларна α -амилаза (Фиг. 43). За съжаление, позитивните рекомбинанти на *Z. mobilis* DSM424 (*Z. mobilis* рZT1), въпреки че растат на среда с нишесте, не формират зони около колониите. Това показва, че генът *amy*BL се експресира трудно и *Plac* промотора вероятно не е подходящ за генна експресия при този вид организъм. *Z. mobilis* рZT1 очевидно не би могъл да продуцира етанол от нишесте. Поради това е разработена нова стратегия за клониране, при която *Plac* промотора е заменен с естествените за *Z. mobilis* промотори. В *Z. mobilis* гените за екстрацелуларна леван-захараза (*Sac*B) и екстрацелуларна захараза (*Sac*C), осъществяващи хидролизата на захароза, са известни с действието си под контрола на силни промотори. За да се постигне експресия на *amy*BL под контрола на *Sac*C промотор, бяха конструирани праймери

на базата на известна секвенция на ген за захараза (*sacC*) от *Z. mobilis* (GenBank L33403) (Kannan et al., 1995).



Фигура 43. Рекombинантни клонове на *E. coli* DH5 α , култивирани на агар с нишесте. Около позитивните клонове (секретиращи α -амилаза) се формират зони от разградено нишесте.

На тази база са конструирани два совалкови вектора – pZT₂ и pZT₃. При pZT₂ промотора *SacC* е включен след *Plac* и преди гена *amyBL*. При pZT₃, *SacC* промотора е последван от последователност от 42 bp, част от гена *sacC*, отговаряща за синтезата на сигнален белтък (*SP*) (Фиг. 44).

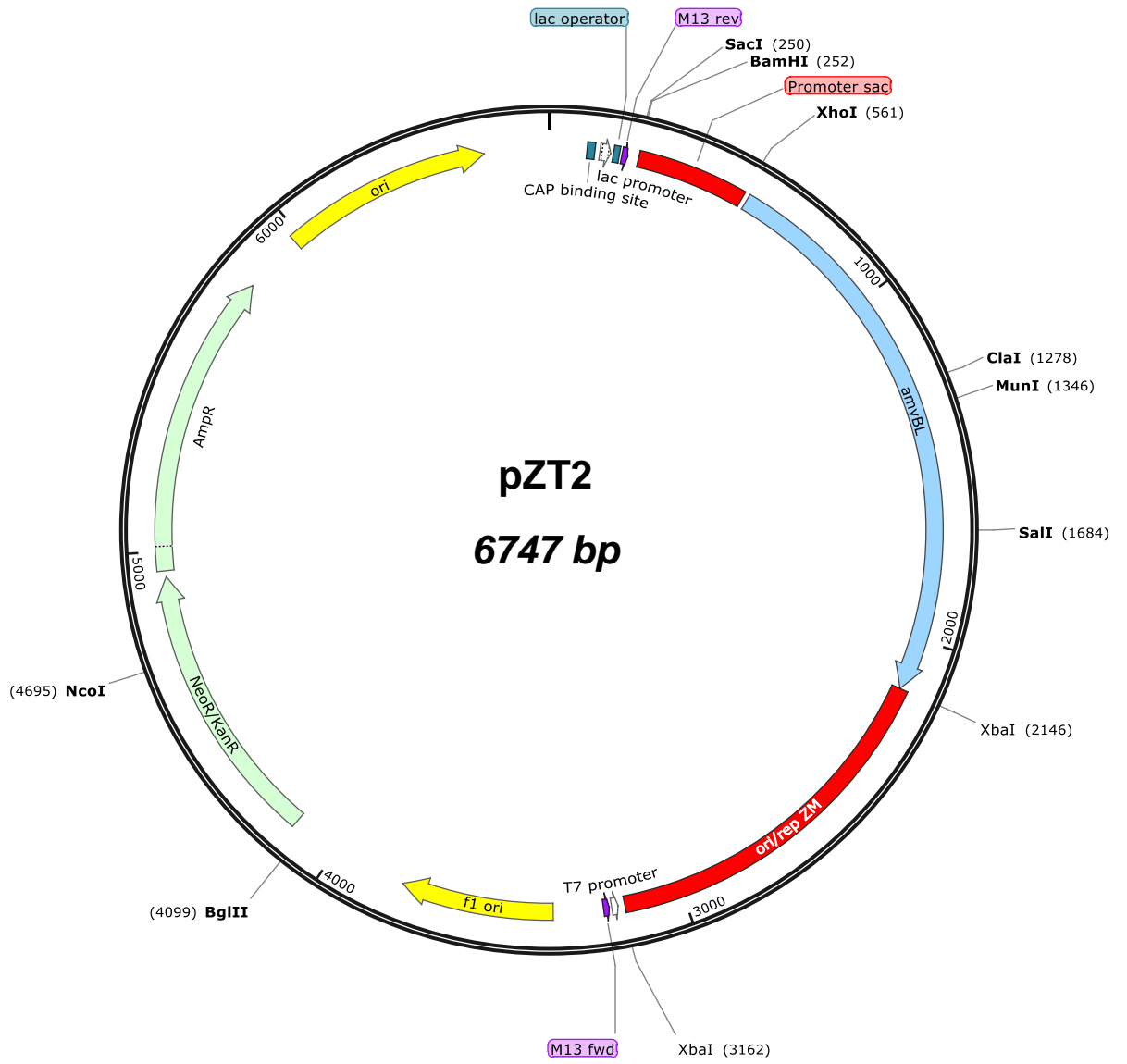
```

GGCACCGACCATCAAATTGGAATTGGTTGGCCATC
GCAGCTTCGTTACCGAAGTGAAGGGTTATGGCTAT
ATTCGCCACAGATCGAGTGGTTGGCAGAAGATGA
ATCTTCTAATTCTGCGGCAGCCSTGTCTTTATTGA
ATAAATAAGATTTATTCATTGTAATGACGTTTCT
GATTATGCTTGAATAAAGCATTATCATCTTTTGAG
TTTATTTCAACTTAAGGGTCATCAGGGCATTTTGC
                                     (-10)
CCTGATGACACCCTTCCTATTCCTAATAATAATTT
RBS
CAAGAAAGTGTATATTACTTTAAATGTTTAATTTT
AATGCCAGTCGCTGGACGCGAGCCCAAGCG

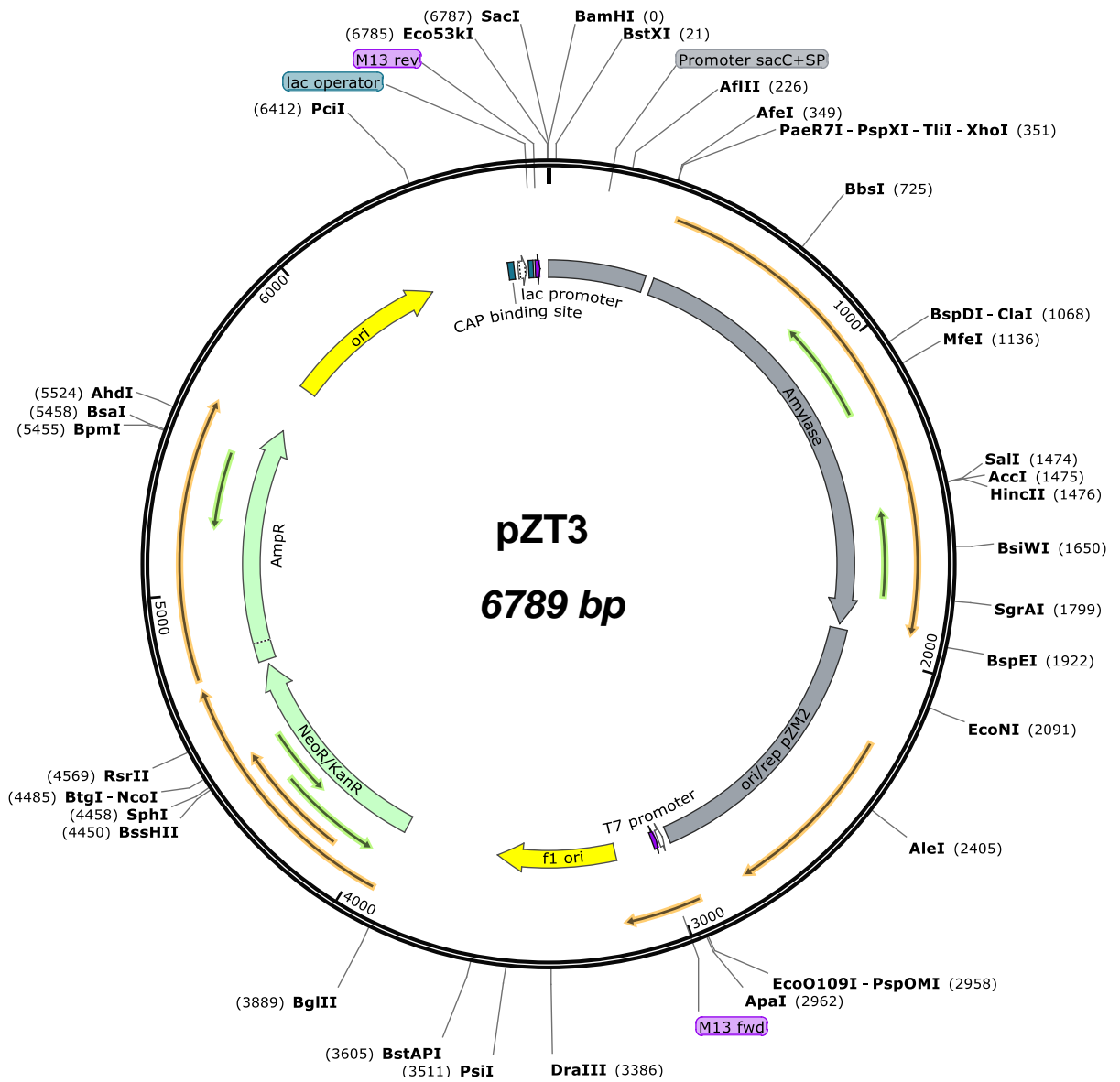
```

Фигура 44. Секвенция на промоторите *SacC* и *SacC+SP*, *SP* е в болт-италик. ТАТА-бокс (-10) и RBS районите са в цветно поле, праймерите са подчертани.

Последователностите на *SacC* и *SacC+SP* са въведени в конструкта pZT₁ по сайтове *Bam*HI/*Xho*I, формирайки съответно векторите pZT₂ (6747 bp) (Фиг. 45) и pZT₃ (6789 bp) (Фиг. 46).

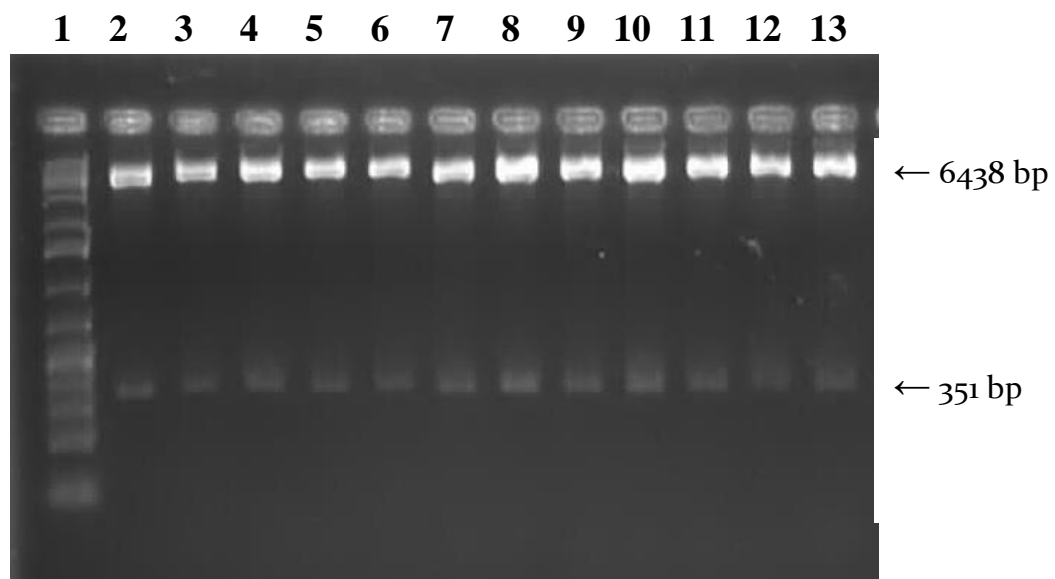


Фигура 45. Рестрикционна карта на pZT2.



Фигура 46. Рестрикционна карта на pZT3.

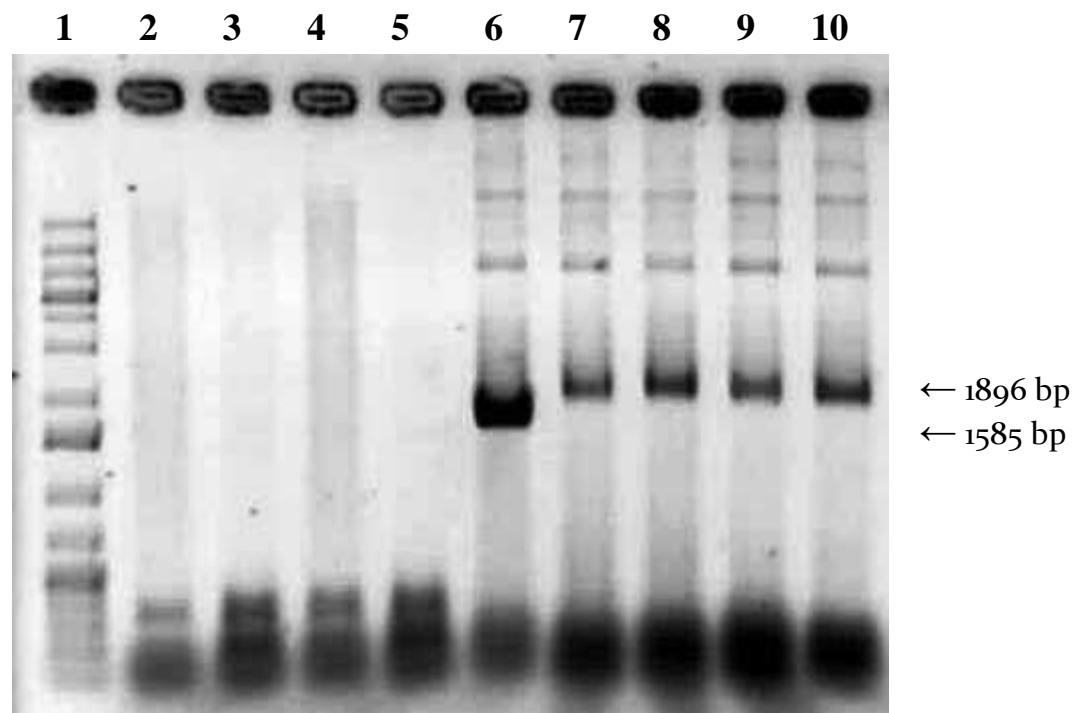
Като селективни маркери бяха използвани ампицилин (100 µg/mL) за *E. coli* DH5α и канамицин (200 µg/mL) за *Z. mobilis*. Рекombинантните клонове *E. coli* са култивирани на агарова среда с нишесте за 24 часа при 37 °C, след което колониите са изложени на йодни пари. Както и при колониите на рекомбинантите *E. coli* с pZT₁, около позитивните рекомбинанти с pZT₂ и pZT₃ се формират жълти зони от усвоено нишесте. Плазмидна ДНК, изолирана от тези клонове е рестрицирана и визуализирана за наличие на инсъртите *SacC* и *SacC+SP* (Фиг. 47, Фиг. 48), съответно. И в двата случая наличието на инсърти е потвърдено.



Фигура 47. Рестрикционен анализ по сайтове *Bam*HI/*Xho*I на рекомбинантни клонове на *E. coli* DH5α, съдържащи pZT₃. След рестрикцията се формират фрагменти с дължина 6438 bp и 351 bp.

Наличието на ген *amyL* в рекомбинантните клонове *Z. mobilis* е потвърдено чрез PCR амплификация на фрагментите *SacC+ amyL* и *SacC+SP+ amyL*, съответно.

Въпреки това, позитивните трансформанти *Z. mobilis* притежаващи векторите pZT₂ и pZT₃, за разлика от съответните трансформанти на *E. coli*, не формират зони при оцветяване на нишестен агар и показват изключително слаба екстрацелуларна амилазна активност – 0.13 – 0.15 U/mL.



Фигура 48. Анализ на рекомбинантни клонове на *E. coli* DH5 α , съдържащи pZT₂. 1. 1 kb генетичен маркер; 2 – 5. PCR с праймерни двойки *amyF/amyR*: негативен контрол; 6. – 10. *SacI/XbaI* рестрикция на плазмидна ДНК: 6. Клон *E. coli*, съдържащ само *amyL*, 7. – 10. Клонове *E. coli*, съдържащи *SacC+amyL*.

Рекомбинантните щамове *Z. mobilis* pZT₂ и *Z. mobilis* pZT₃, подобно на *Z. mobilis* pZT₁, не са подходящи за получаване на етанол от нишесте. Тези резултати показват изключителните трудности при въвеждането на гени в *Z. mobilis* и потвърждават, за съжаление, резултатите от описаните до момента изследвания. Първият опит за клониране и експресия на амилазен ген в *Z. mobilis* е извършен още през 90-те години на XX век (Brestic-Goachet et al., 1990). По-късно, Wang и съавт. (2012) се опитват да клонират друг амилазен ген – *amyE* от *B. subtilis* слят с два, доказано работещи сигнални белтъка (*zmo 130* и *zmo331*) от *Z. mobilis*, трансформирайки пет различни щама. Във всички тези случаи, както при рекомбинантите pZT₁, pZT₂ и pZT₃, авторите успяват да получат слаба амилазна експресия, но не и да синтезират етанол от нишесте. Вероятно, за получаването на етанол от нишесте чрез рекомбинантни щамове *Z. mobilis*, са нужни нови знания относно природата на този вид организъм, както и допълнително развитие в методологията на изследванията.

3.3.

Получаване на ценни продукти от инулин

3.3.1. Получаване на млечна киселина от инулин

Избор на субстрат и щам-продуцент

Цикорията е един от най-перспективните инулин съдържащи субстрати – растението е широко разпространено в цяла Европа, вирее на каменисти и неплодородни почви, годишно могат да се прибират до три реколти, а корените му съдържат около 68 % инулин. За сравнение, грудките на земната ябълка, най-използваният в биотехнологията инулин-съдържащ субстрат, съдържанието на инулин варира от 7 до 30 %. Екстрактът от изсушени корени от цикория съдържа до 98 % инулин, докато този от грудки от земна ябълка – около 50 % (Kim and Shin, 1996; Rubel et al., 2014). В допълнение, инулинът съдържащ се в цикорията е с по-ниска степен на полимеризация, което го прави по-разтворим във вода и по-удобен за ферментиране. По тези причини, като подходящ инулин съдържащ субстрат за получаване на млечна киселина беше избрано цикориево брашно на Sensus (The Netherlands), съдържащо 89.3 % инулин (с дължина на молекулите DP7 – DP9) и 10.7 % смес от захароза, фруктоза и глюкоза.

Избор на продуцент, притежаващ инулиназна активност

Способността да се усвоява инулин или фруктоолигозахариди се среща изключително рядко сред продуцентите на МК. До момента са известни едва няколко лактобацилни щамове, всички принадлежащи към видовете *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus paracasei* (Goh et al., 2006; Choi et al., 2012).

По тази причина, не е странно, че от всички изпробвани продуценти на МК, най-добри способности да усвоява цикориево брашно като единствен въглероден източник, притежава изолираният от боза български изолат *Lactobacillus paracasei* В41 (DSM 23505), свръхпродуцент на МК от глюкоза и нишесте. Независимо от използвания субстрат, включително и инулин, *L. paracasei* В41 остава хомоферментативен щам. Това го отличава рязко от известния щам *L. paracasei* 8700:2, който притежава инулиназна активност, но ферментира инулин по хетероферментативен път (Makras et al., 2005).

L. paracasei В41 притежава клетъчно-свързана инулиназа (β -фруктозидаза, ЕС 3.2.1.80) с молекулно тегло \approx 130 kDa. Ензимът (InuВ41) атакува връзката с крайната

молекула фруктоза в инулиновия полимер и се състои от 1214 аминокиселини. Кодира се от ген *inuB41* с дължина 3645 bp, чиято пълната нуклеотидна последователност е депозирана в ген-банката NCBI под номер KP663715.

Влияние на състава на хранителната среда

За увеличаване на добива и продуктивността на МК от инулин, както и за евентуално намаляване на себестойността на получения продукт, бяха изпробвани 10, различни по състав, хранителни среди (Табл. 25). Всички среди съдържат като единствен въглероден източник 20 g/L цикориево брашно, но различни по вид и концентрация азотни източници и соли. Средите бяха тествани в периодични процеси без рН контрол, проведени в работни шишета с винтова капачка (250 mL), на клатачен апарат при температура 37 °C и скорост на разбъркване 90 rpm. Инокулирането с култура на *L. paracasei* B41 беше извършено в съотношение 1 / 100, с краен обем 200 mL.

След 68 часа култивиране, най-висока концентрация на МК бе установена в среда № 7 (Табл. 13) – 18.81 g/L. За сравнение, при култивиране в производната на MRS среда (MRS-ин), са получени 17.29 g/L МК. От получените резултати се вижда, че в средите с неорганичен азотен източник ((NH₄)₂SO₄, NH₄Cl), добивът на МК е значително по-нисък. Соли като CaCl₂ и Na₂HPO₄ също нямат позитивно въздействие, докато амониевият цитрат и натриевият ацетат вероятно са от първостепенна важност за бързото протичане на хидролизата. Също така, очевидна е нуждата от соли на манган и магнезий. Въпреки значителното предимство на органичните азотни източници, наличието на пептон и месен екстракт би могло да бъде изключено от средата и заместено с далеч по-евтиния царевичен хидролизат. По този начин, най-висок добив на млечна киселина беше получен при среда № 7, съдържаща 22 g/L царевичен хидролизат и 5 g/L дрождев екстракт. Този резултат не е съвсем неочакван и е в съгласие с изводите на Wang и съавт. (2013), че царевичните екстракти подпомагат метаболизирането на захари в процеса на млечно-кисела ферментация. Изводите им обаче, се отнасят до ферментация осъществена от друг род бактерии - *Bacillus coagulans*.

Влияние на рН на средата

Намирането на рН оптимума на цялостния процес, включващ хидролиза на цикориевото брашно до монозахари, както и последващото им ферментиране до млечна киселина, е от ключово значение. Процесите за установяване на оптималното рН бяха проведени на ферментатор Biostat®A Plus с работен обем 1 L, при температура 37 °C (оптимална за щама) и обороти на механичната бъркачка 200 rpm, без допълнително аериране.

Таблица 13. Получаване на млечна киселина от *L. paracasei* В41, култивиран в различни хранителни среди. Представените стойности за МК са детектирани след 68 часа ферментация в периодични процеси без рН контрол.

Компонент (g/L)	Хранителна среда №									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	MRS-ин*
Пептон	10	5	-	-	-	-	-	-	10	10
Дрождев екстракт	5	2.5	5	5	5	5	5	5	5	5
Месен екстракт	10	5	-	-	-	10	-	-	10	8
Царевичен хидролизат	-	-	-	10	10	-	20	-	10	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	5	-	-	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-
NH ₄ Cl	-	-	-	11	11	11	-	22	11	-
Амониев цитрат	-	-	-	-	2	2	2	2	2	2
Натриев ацетат	-	-	-	-	5	5	5	5	5	5
MgSO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
MnSO ₄	-	-	-	-	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Цикориево брашно	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Млечна киселина (68 h)	11.79	10.48	8.11	13.0	14.96	14.04	18.81	12.58	16.79	17.29

* MRS-ин съдържа всички съставки на оригиналния MRS, с въглероден източник цикориево брашно вместо глюкоза.

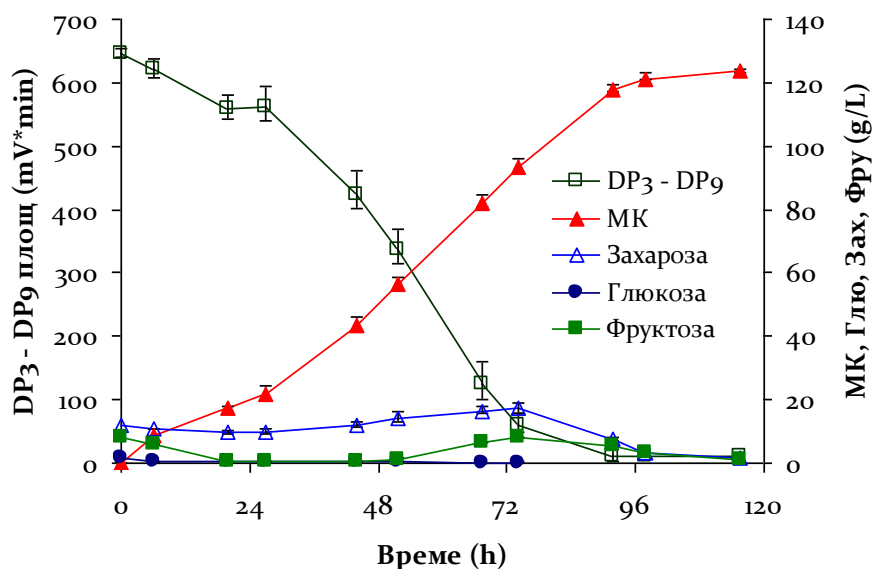
Поради това, че рН оптимума на пречистената инулиназа (InuV41) е 4.8 – 4.9, а най-силен клетъчен растеж се наблюдава при рН 6.0, бяха проведени експерименти с контролирано рН на средата 4.8, 5.0, 5.5 и 6.0.

При начални концентрации на субстрата (цикориево брашно) от 90 g/L, след 14 часа процес на едновременно озахаряване и ферментация, получените концентрации млечна киселина при рН 4.8, 5.0 и 5.5 бяха почти идентични – съответно 86.6, 87.6 и 87.5 g/L (Табл. 14). И в трите случая се наблюдава почти пълно превръщане на инулина в млечна киселина, като концентрацията на остатъчни захари в края на процеса е пренебрежима. При рН 6.0 полученото количество млечна к-на е значително по-ниско – 72.8 g/L, вероятно поради това, че тази

стойност на рН е далеч от рН оптимума на ензима. Тъй като и в този случай не се наблюдават остатъчни захари в културалната течност, ниският добив със сигурност се дължи на забавен процес на хидролиза. Най-висока максимална инулиназна активност е отчетена при процесите с рН 5.0 и 5.5 – 205 и 211 (U/mL), съответно. Въпреки това, прави впечатление, че с увеличаването на стойността на рН на средата, се наблюдава и увеличение на биомасата. Докато при рН 4.8 максималният брой живи клетки достига едва 2.6×10^{11} , то при рН 6.0 те са с повече от един порядък повече – 4.5×10^{12} .

За да се установи по-точно оптималната стойност на рН, бяха проведени процеси с по-висока концентрация на субстрат – 136 g/L, при рН 5.0 и 5.5. От показаните в Табл. 14 резултати се вижда, че при рН 5.5 максималната достигната концентрация на млечна киселина е 123.7 g/L (добив 0.91 g/g), с почти пълно усвояване на остатъчните захари (захароза – 1.47 g/L, фруктоза – 1.35 g/L, глюкоза напълно липсва). Това представлява и най-високата концентрация МК получена от инулин чрез SSF до момента. В този процес инулиназна активност достига 267 U/mL, а виталната биомаса – $8.3 \times 10^{12} \pm 0.3$ CFU/mL

Кинетики на процесите на продуциране на млечна киселина, хидролиза на олигозахариди (захарите с $DP \geq 3$ са представени като обща площ на хроматографски пик), натрупване и метаболизиране на моно- и дизахариди са представени на Фиг. 49. Изменението на инулиназната и инвертазната активности, както и растежа на биомасата са представени на Фиг. 50.



Фигура 49. Периодичен процес на едновременно озахаряване и ферментация на 136 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* В41 при рН 5.5. DP3 – DP9 – олигозахариди със степен на полимеризация 3 – 9, МК – млечна киселина, Глю – глюкоза, Зах – захароза, Фру – фруктоза.

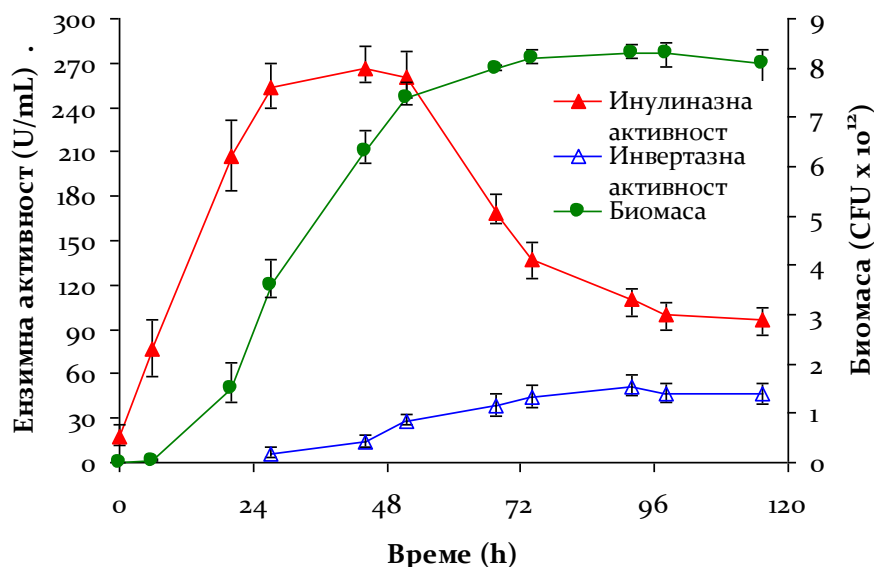
Таблица 14. Влияние на рН на средата за получаване на млечна киселина от *L. paracasei* В41 при усвояване на цикориево брашно с различни начални концентрации.

рН	Начална Концентрация (g/L)	Биомаса (CFU/mL)	Инулиназна активност*	Инвертазна активност*	Млечна к-на*	Млечна к-на*	Остатъчни захари**		
							Захароза (g/L)	Фруктоза (g/L)	Глюкоза (g/L)
4.8	90	2.6x10 ¹¹ ±0.3	180±8	36±4	86.6±0.8	0.95	2.23±1.2	1.34±0.9	-
5.0	90	1.9x10 ¹² ±0.3	205±11	38±5	87.6±0.2	1.31	1.40±0.6	0.66±0.2	-
5.5	90	3.1x10 ¹² ±0.3	211±6	47±6	87.5±0.3	1.31	1.51±0.5	0.55±0.2	-
6.0	90	4.5x10 ¹² ±0.2	158±7	66±3	72.8±1.5	0.74	1.41±0.5	0.66±0.5	-
5.0	136	6.9x10 ¹² ±0.3	232±5	39±4	97.2±3.5	0.82	8.41±1.5	23.77±5.6	-
5.5	136	8.3x10 ¹² ±0.3	267±8	51±5	123.7±1.0	1.08	1.47±1.1	1.35±1.0	-

* Представени са максималните стойности по време на процеса

** Наличие в края на процеса

От Фиг. 50 се вижда, че пикът на инулиназна активност е между 24-ти и 48-ми час (260 – 267 U/mL), след което плавно намалява до 90 U/mL в края на процеса. Обратно, инвертазна активност се детектира чак след 24-ти час, като пикът е чак около 90-ти час (51 U/mL), вероятно поради натрупването на по-високи концентрации захароза в културалната течност.



Фигура 50. Изменение на инулиназна, инвертазна активност и концентрация на биомаса в периодичен процес на едновременно озахаряване и ферментация на 136 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* V41 при рН 5.5.

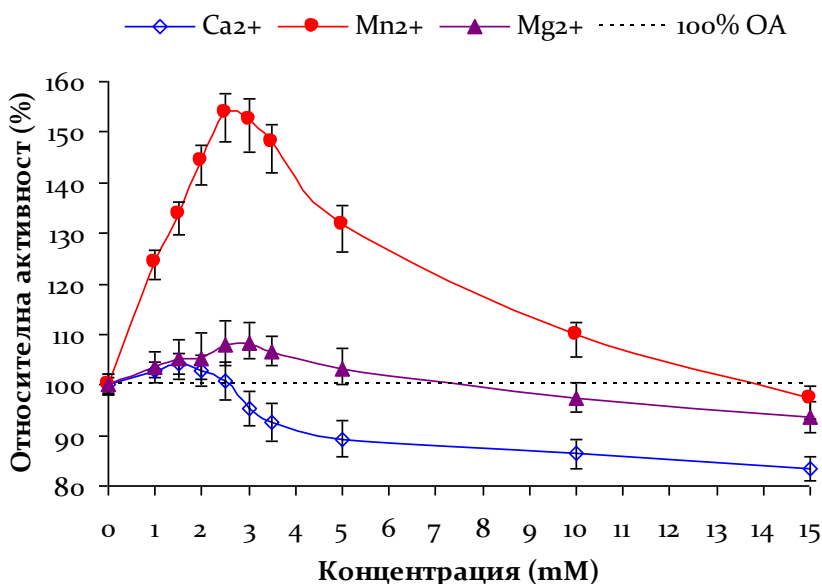
При процеса, осъществен при рН 5.0 (Табл. 14), полученото количество млечна киселина е значително по-ниско – едва 97.2 g/L. Това се дължи на натрупване на неметаболизирани захари, главно фруктоза, в културалната течност. В края на процеса (114-ти час), концентрацията на фруктоза достига концентрация 23.8 g/L, на захароза – 8.41 g/L. Измерените инулиназна и инвертазна активности в този процес са по-ниски от тези при рН 5.5, но разликите не са особено чувствителни (232 срещу 267 U/mL за инулиназните и 39 срещу 51 U/mL за инвертазните). Всичко това показва, че причината за значителните разлики в продуцираните количества МК не е в процеса на хидролиза, а в затрудненото метаболизиране на остатъчната захар фруктоза.

Влияние на металните йони върху инулиназната активност на InuV41

Известно е, че някои метални йони в определени концентрации могат да увеличат ензимната активност на инулиназите при различни видове дрожди, гъби и бактерии. За установяване на влиянието им върху клетъчно свързаната β -

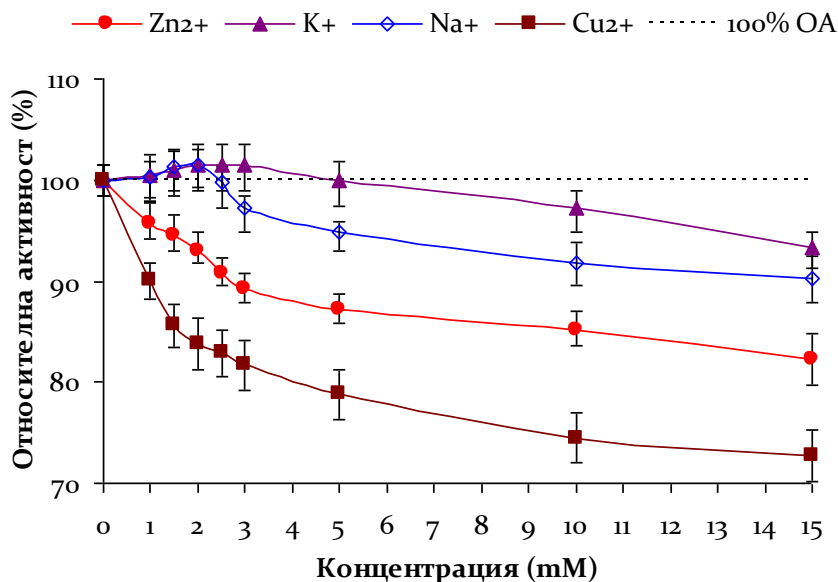
фруктозидаза на *L. paracasei* В41, ензимът (InuВ41) беше пречистен и тестван за активност след третиране с 12 различни метални йона. Беше изпробвано влиянието на металните йони при концентрации от 1 mM до 15 mM.

Резултатите показаха, че добавка в определени концентрации на три от бивалентните метални йони – Mn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+} , инулиназната активност може да се увеличи, в определени случаи – значително (Фиг. 51).



Фигура 51. Влияние на металните йони Mn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+} върху активността на пречистената инулиназа на *L. paracasei* В41 (InuВ41). Активността на ензима в дестилирана вода, без третиране с метални йони е взета за 100 %. OA – относителна активност.

Добавката на Mn^{2+} има позитивно въздействие върху активността в концентрации от 1 mM до 10 mM, на Mg^{2+} - от 1 mM до 5 mM, на Ca^{2+} от 1 mM до 2.5 mM. Най-силно е въздействието на мангановите йони, като при концентрация от 2.5 mM Mn^{2+} , ензимната активност се увеличава с цели 54 %, докато ефектът от добавяне на Mg^{2+} и Ca^{2+} е далеч по-незначителен – 8.2 % (при 3 mM Mg^{2+}) и 4.2 % (при 1.5 mM Ca^{2+}).

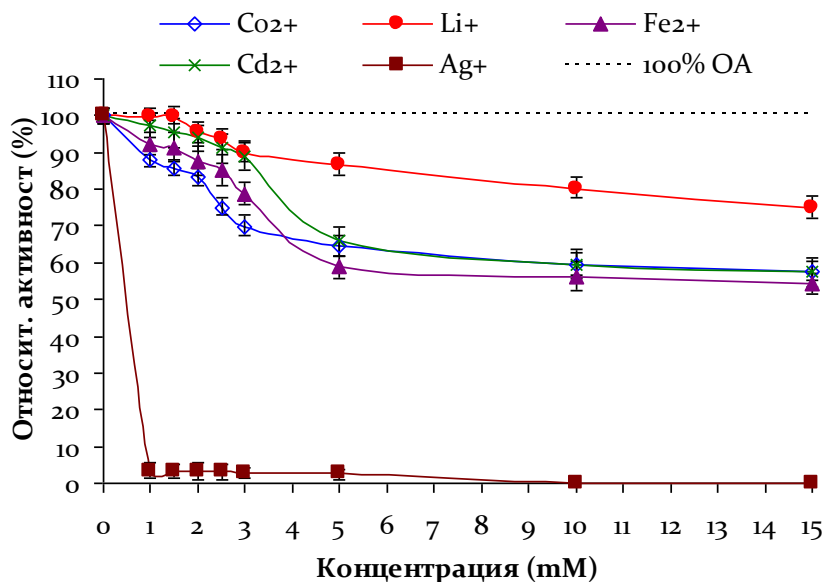


Фигура 52. Влияние на метални йони Zn²⁺, K⁺, Na⁺ и Cu²⁺ върху активността на пречистената инулиназа на *L. paracasei* B41 (InuB41). Активността на ензима без третиране с метални йони е взета за 100%. OA – относителна активност.

Други двувалентни метални йони, като Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ и Cd²⁺ оказват отрицателно влияние върху ензимната активност дори при ниски концентрации (Фиг. 52, 53), а моновалентните K⁺, Na⁺ и Li⁺ не оказват значително въздействие при концентрации под 3 mM (при K⁺ позитивният ефект е в статистическата грешка), а над тези концентрации отрицателният им ефект се задълбочава, както при двувалентните йони. Очаквано, при третиране със Ag⁺ се наблюдава пълна загуба на активност, още при концентрация от 1 mM.

Влияние на металните йони върху получаването на МК от инулин *in vivo*

След като беше доказано позитивното влияние на Mn²⁺, Mg²⁺ и Ca²⁺ върху инулиназната активност на чистия ензим InuB41, беше изследван ефекта на добавката им върху цялостния процес на превръщане на инулина в млечна киселина от щам *L. paracasei* B41. За да се изясни тяхното действие *in vivo*, бяха проведени 48 часови периодични процеси в среди с различни комбинации на йоните. Соли на трите метала бяха добавяни така, че крайната концентрация на металните йони да съответства на стойността им, осигуряваща максимален позитивен ефект върху инулиназната активност (2.5 mM Mn²⁺, 3 mM Mg²⁺, 1.5 mM Ca²⁺) или на тази, осигуряваща действието им като кофактори (0.3 mM Mn²⁺, 0.83 mM Mg²⁺). За контролна среда беше използвана оптимизираната вече среда №7. Резултатите са показани в Табл. 15.



Фигура 53. Влияние на метални йони Co^{2+} , Li^{+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} и Ag^{+} върху активността на пречистената инулиназа на *L. paracasei* B41 (InuB41). Активността на ензима без третиране с метални йони е взета за 100%. OA – относителна активност.

След 48 часово култивиране са измерени концентрациите на млечна киселина и броя живи клетки във всички девет среди. В средата без присъствие и на трите елемента (средата 8, Табл. 15) продуцирането на млечна киселина е много по-слабо – едва 14.39 g/L. Този резултат не е неочакван, поради вече известното влияние на катионите като кофактори в гликолитичния път на *L. paracasei*. Прави впечатление, обаче, че при средите с максимална концентрация на Mn^{2+} (2.5 mM) – среди 1, 2, 3 и 4 – концентрацията на продуцираната млечна киселина е по-висока (20.76 – 20.89 g/L) независимо от добавката на други метални йони в средата. При концентрации на Mn^{2+} нужни за действието му само като кофактор (0.3 mM), добивът на млечна к-на е по-слаб (20.40 – 20.48 g/L). Като се има предвид високата толерантност на щама към киселини, тези разлики не са за пренебрегване.

На 24-ти час бяха взети проби за определяне на инулиназна активност и експресия на *fosE* гена (кодиращ фруктан- β -фруктозидаза (или инулиназата InuB41)). Въпреки, че за различните процеси, стойностите на инулиназната активност корелират с добива на млечна киселина, обратно, максимална експресия на гена се забелязва при пълната липса на кофактори (в представената Таблица 15 тази стойност, като най-висока, е взета за 100% в изследването).

Тези резултати показват, че Mn^{2+} е най-важният елемент за цялостния процес на разграждане на инулина до млечна киселина (хидролиза + ферментация), действайки вероятно не само като кофактор, но вероятно оказващ и алостерично въздействие върху молекулите на ензима.

Таблица 15. Влияние *in vivo* на бивалентните метални йони Mn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+} върху процеса на едновременно озахаряване и ферментация на 40 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* В41. Сравнение на периодични процеси, проведени в различни хранителни среди, при 37 °С, разбъркване 100 rpm, без рН контрол, в продължение на 48 часа. Представените стойности за инулиназна активност и нива на експресия на гена *fosE* са измерени на 24-ти час. Концентрациите на биомаса и МК – на 48-ми час. Mn^{2+} са добавени като $MnSO_4 \cdot H_2O$, Mg^{2+} като $MgSO_4$, и Ca^{2+} като $CaCl_2$.

Среда	Mn^{2+} (mM)	Mg^{2+} (mM)	Ca^{2+} (mM)	Биомаса (CFU/mL)	Инулиназна активност (U/mL)	Експресия на <i>fosE</i> (%)	Млечна к-на (g/L)
Основна ^a	0.3 ^b	0.83 ^b	-	1.7 x10 ¹⁰ ±0.3	13.01±1.52	30.92±1.22	20.42±0.04
1	2.5 ^c	3 ^c	1.5 ^c	2.9 x10 ¹⁰ ±0.3	25.07±1.63	40.27±1.22	20.87±0.05
2	2.5 ^c	3 ^c	-	3.0 x10 ¹⁰ ±0.4	22.93±1.68	51.25±1.36	20.89±0.05
3	2.5 ^c	0.83 ^b	-	2.0 x10 ¹⁰ ±0.3	23.51±1.54	15.47±0.84	20.77±0.04
4	2.5 ^c	0.83 ^b	1.5 ^c	2.1 x10 ¹⁰ ±0.2	24.75±1.22	13.81±0.83	20.76±0.04
5	0.3 ^b	3 ^c	1.5 ^c	1.9 x10 ¹⁰ ±0.3	17.22±1.23	47.89±1.41	20.46±0.04
6	0.3 ^b	3 ^c	-	2.0 x10 ¹⁰ ±0.3	16.44±1.19	44.62±1.29	20.48±0.04
7	0.3 ^b	0.83 ^b	1.5 ^c	1.7 x10 ¹⁰ ±0.3	18.26±1.25	27.89±1.04	20.40±0.04
8	-	-	-	1.0 x10 ¹⁰ ±0.3	7.18±1.12	100	14.39±0.03

^a – Вече оптимизираната среда № 7

^b – Концентрации на Mn^{2+} и Mg^{2+} , които осигуряват действието им като кофактори (наличие в MRS).

^c – Концентрации с най-силно изразен позитивен ефект върху инулиназната активност на пречистената β -фруктозидаза (инулиназа) на *L. paracasei* В41 (InuВ41).

От друга страна, присъствието му намалява експресията на гена. Това означава, че в присъствие на Mn^{2+} се наблюдават по-малко на брой, но по-активни молекули инулиназа. Присъствието на другите два елемента (магнезий и калций) вероятно няма или има несъществено влияние върху инулиназната активност *in vivo* и продуцирането на млечна киселина.

Влияние на Mn^{2+} върху получаването на МК от инулин

За установяване на оптималната концентрация на Mn^{2+} , нужна за получаване на максимален добив млечна киселина, бяха проведени серия периодични процеси при вече оптимизирания състав (среда №7 от Табл. 13) и рН, като към тях бяха добавяни различни количества $MnSO_4$, осигуряващи крайна концентрация на Mn^{2+} съответно 0.3, 2.5, 5, 10, 15 и 20 mM. Среда №7, използвана в случая като контрола, съдържа Mn^{2+} и Mg^{2+} в концентрации, осигуряващи действието им като кофактори – 0.3 mM и 0.83 mM, съответно. В състава на останалите 5 хранителни среди, единствената разлика е по-високото съдържание на манганов сулфат. Процесите бяха проведени във ферментатор Biostat®A Plus, Sartorius, с механично разбъркване и работен обем 1 L. Началната концентрация на цикориево брашно беше 200 g/L (182 g/L след инокулиране), а продължителността на процесите – 138 часа.

Резултатите са представени в Табл. 16. При култивиране в базовата среда, съдържаща 0.3 mM Mn^{2+} , от 182 g/L субстрат, след 138-часова ферментация, са получени само 107.9 g/L млечна к-на. В същата среда, при по-ниски концентрации на субстрат (136 g/L), вече бяха получени 123.7 g/L само за 14 часа ферментация (виж Табл. 14 и Фиг. 49), което показва силно инхибиране на процеса от по-високите концентрации на субстрат.

В средите с по-високо съдържание на Mn^{2+} обаче, се забелязва намаляване на ефекта от субстратното инхибиране. Анализът на получените резултати показва (Табл. 28), че с увеличаване на концентрацията на Mn^{2+} в средата от 0.3 до 15 mM, концентрацията и добивът на МК от инулин расте. Най-висока концентрация на МК е достигната при култивиране в средата съдържаща 15 mM Mn^{2+} – 151 g/L (Табл. 16, Фиг. 54).

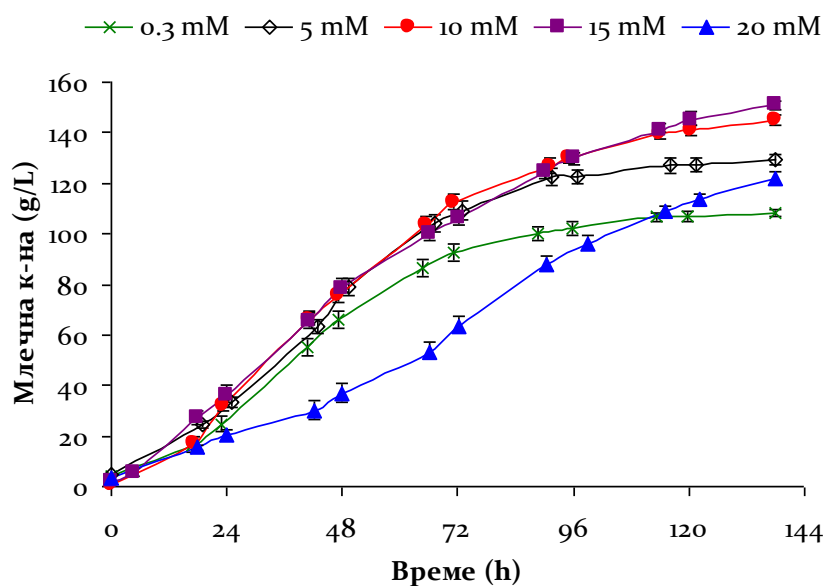
Това представлява и най-високата концентрация МК, получена от инулин съдържащ субстрат в света до момента (предишният рекорд е 141.5 g/L (Ge et al., 2010)). При добавяне на 20 mM Mn^{2+} обаче, полученото количество МК е значително по-ниско (121.9 g/L) (Табл. 16, Фиг. 54).

Прави впечатление, че за получаване на МК, оптималното съдържание на Mn^{2+} в средата (15 mM) е далеч по-високо от нужното за максимална активност на пречистената инулиназа (2.5 mM Mn^{2+}). Това показва, че в цялостния процес на озахаряване и ферментация, влиянието на мангана не се ограничава до засилване на инулиназната активност.

Таблица 16. Влияние на съдържанието на Mn^{2+} в хранителната среда при процеси на едновременно озахаряване и ферментация на 182 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* В41. Mn^{2+} беше добавен под формата на $MnSO_4$.

Mn^{2+} (mM)	Биомаса (CFU/mL)	Инулиназна активност (U/mL)	Млечна к-на (g/L)	Млечна к-на (g/L/h)	$Y_{МК}^*$ (g/g)	Захароза (g/L)	Фруктоза (g/L)
0.3	$8.3 \times 10^{12} \pm 0.2$	148.3 ± 9	107.9 ± 1.7	0.78	0.59	12.1 ± 2.2	45.8 ± 1.2
2.5	$8.2 \times 10^{12} \pm 0.2$	155.6 ± 8	115.6 ± 1.0	0.84	0.64	9.2 ± 2.0	38.3 ± 1.0
5	$7.5 \times 10^{12} \pm 0.2$	179.7 ± 6	129.2 ± 2.0	0.94	0.71	5.5 ± 0.6	23.0 ± 1.2
10	$5.7 \times 10^{12} \pm 0.2$	239.7 ± 9	145.3 ± 1.3	1.05	0.80	5.6 ± 1.2	13.7 ± 0.5
15	$5.7 \times 10^{12} \pm 0.2$	220.3 ± 10	151.0 ± 1.6	1.09	0.83	9.7 ± 2.0	4.4 ± 0.2
20	$4.4 \times 10^{12} \pm 0.3$	126.7 ± 10	121.9 ± 2.2	0.88	0.89	18.5 ± 2.3	1.3 ± 0.2

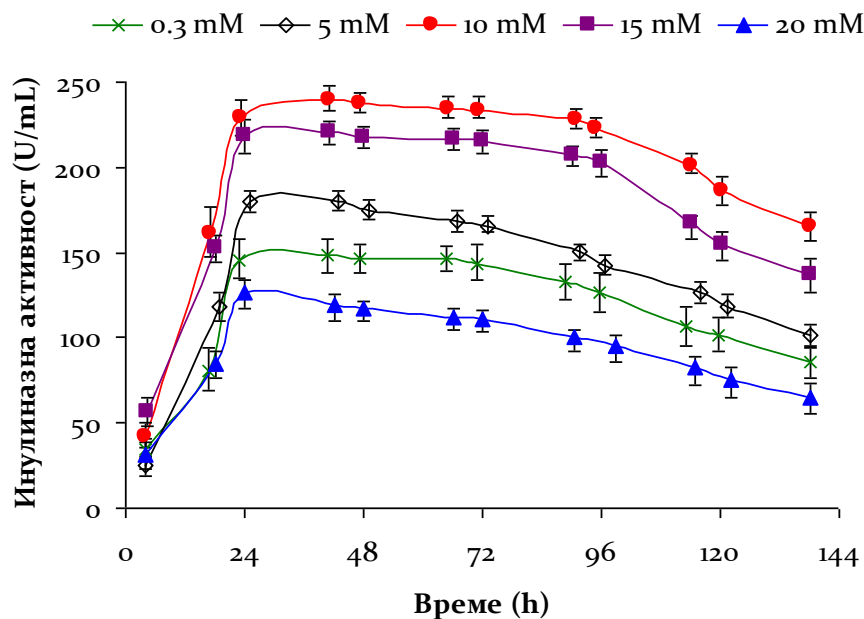
* Грам продуцирана млечна к-на, на грам конвертирано цикориево брашно



Фигура 54. Продуциране на млечна к-на при различно съдържание на Mn^{2+} в процеси на едновременно озахаряване и ферментация на 182 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* В41. Условия: температура 37 °C, рН 5.5, разбъркване 200 гртм.

Добавянето на 15 mM Mn^{2+} в средата води до цели 40 % увеличение на крайната концентрация на МК (спрямо базовата среда с 0.3 mM Mn^{2+}) - от 107.9 до 151 g/L. Въпреки това, максимална инулиназна активност е отчетена в процеса с добавка на 10 mM Mn^{2+} - 239.7 U/mL, докато при 15 mM Mn^{2+} тя е 220.3 U/mL (Табл.

16, Фиг. 55). Добавката на още по-висока концентрация Mn^{2+} (20 mM) води до намаляване и на инулиназната активност и на продуцираното количество МК.

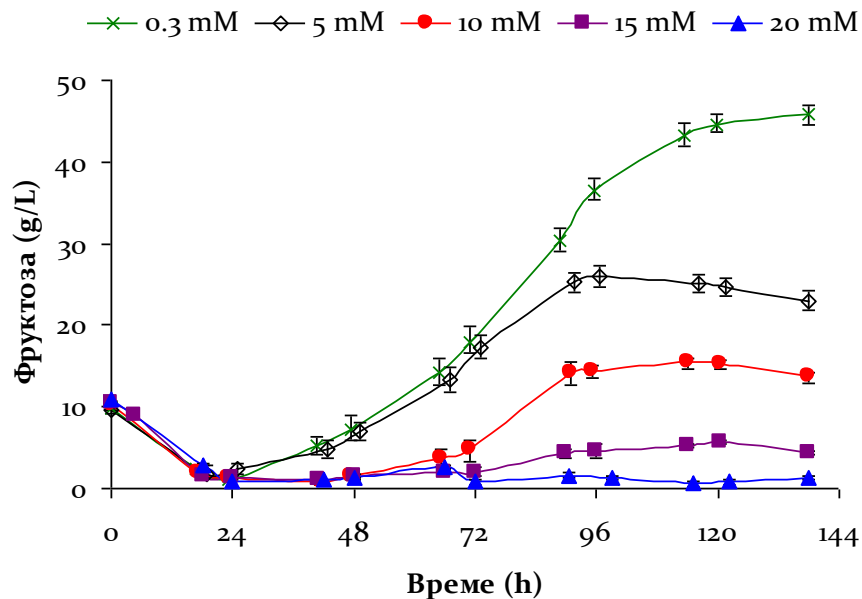


Фигура 55. Изменение на инулиназната активност при различно съдържание на Mn^{2+} в процеси на едновременно озахаряване и ферментация на 182 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* В41. Условия: температура 37 °C, pH 5.5, разбъркване 200 rpm.

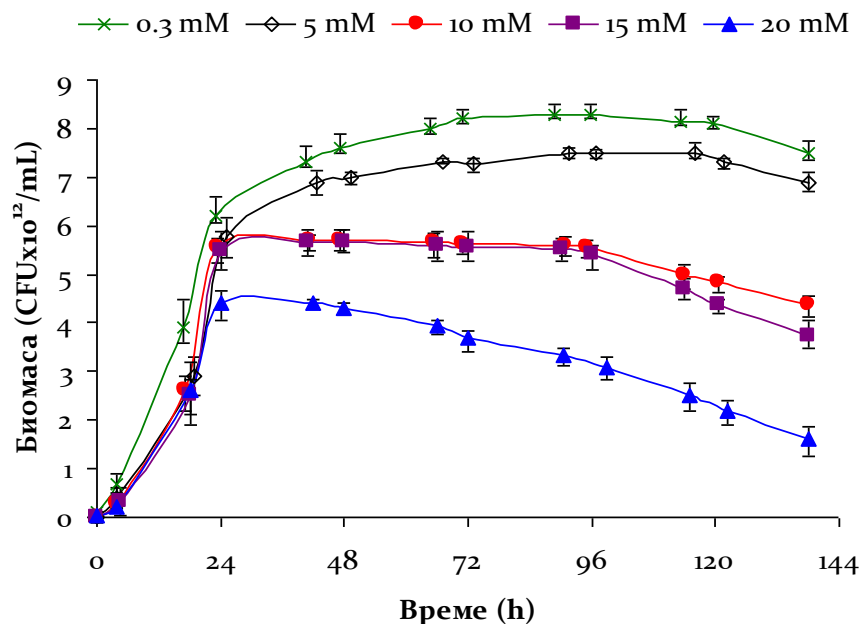
От друга страна, анализът на съдържанието на захари показва, че колкото по-ниско е съдържанието на Mn^{2+} в средата, толкова повече фруктоза се натрупва в културалната течност (Фиг. 56). Невъзможността да бъде метаболизирана фруктозата, впоследствие води до намаляване на крайната концентрация на МК (Табл. 16). Така например, в процеса с 0.3 mM Mn^{2+} , се акумулират 45.8 g/L фруктоза, докато при 15 и 20 mM Mn^{2+} фруктозата в края на процеса е едва 4.4 и 1.3 g/L, съответно. В процесите с най-ниско и най-високо съдържание на Mn^{2+} (0.3 и 20 mM), количеството нехидролизирана захароза е по-високо (12.1 и 18.5 g/L, съответно), поради по-слабата инулиназна активност.

Прави впечатление, че растежът на биомаса, както и експресията на *fosE* гена са обратно пропорционални на количеството добавен манган (Фиг. 57, 58).

В процеса с 0.3 mM Mn^{2+} , жизнеспособната биомаса достига своя максимум около 90-ия час ($8.3 \times 10^{12} \pm 0.2$), след което бавно спада до 7.3×10^{12} в края на процеса (138-ми час). С увеличаване на концентрацията на манган в средата, формираната биомаса е по-малко и отмира по-бързо. Така например, в края на процеса с 20 mM Mn^{2+} биомасата достига 2.0×10^{12} (CFU/mL) (Фиг. 57).

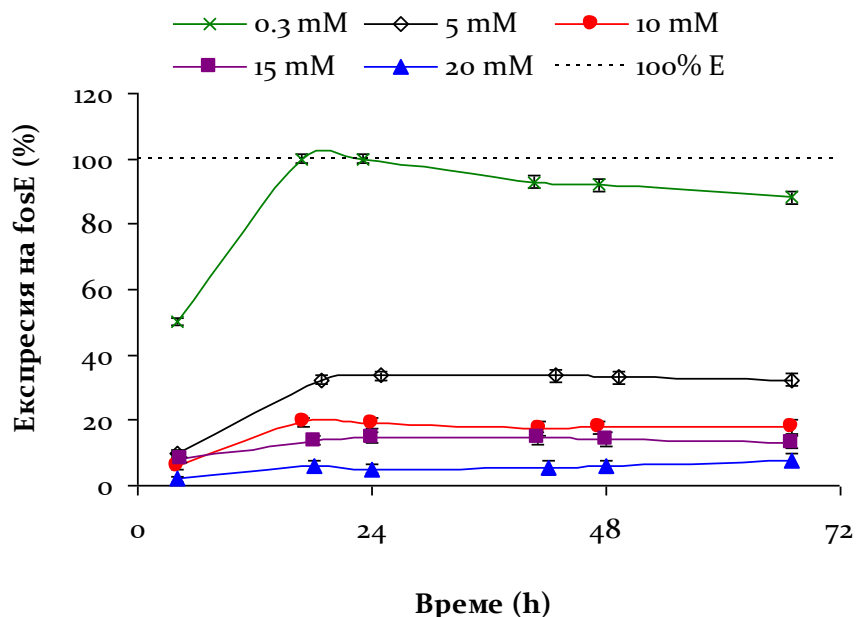


Фигура 56. Акумулиране на фруктоза при различно съдържание на Mn²⁺ в процеси на едновременно озахаряване и ферментация на 182 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* В41. Условия: температура 37 °С, рН 5.5, разбъркване 200 грт.



Фигура 57. Изменение на концентрацията на биомаса при различно съдържание на Mn²⁺ в процеси на едновременно озахаряване и ферментация на 182 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* В41. Условия: температура 37 °С, рН 5.5, разбъркване 200 грт.

Измерването на нивата на експресия на *fosE*, разкриват същият феномен, отчетен при експериментите с добавка *in vivo* на бивалентните метални йони Mn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+} (Табл. 15) – с увеличаване на добавката на Mn^{2+} , въпреки че инулиназната активност се увеличава, експресията на гена *fosE* чувствително намалява. В сравнение с процеса с 0.3 mM Mn^{2+} , добавка от 5 – 15 mM Mn^{2+} води от три до пет пъти по-ниски нива на експресия (Фиг. 58). Въпреки това, ензимната активност на инулиназата се увеличава в границите между 0.3 и 10 mM Mn^{2+} , вероятно поради силно положителен алостеричен ефект на Mn^{2+} върху ензима.



Фигура 58. Изменение на експресията на *fosE* при различно съдържание на Mn^{2+} в процеси на едновременно озахаряване и ферментация на 182 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* В41. Условия: температура 37 °C, рН 5.5, разбъркване 200 rpm.

Заклучение

За да има индустриално приложение, един биотехнологичен процес за получаване на МК трябва да изпълнява следните изисквания: продуктът да се получава в едностъпален процес, в концентрации поне 100 g/L; добивът на продукт да е близо до теоретичния максимум; използваната хранителна среда да е с възможно най-евтин състав, което включва както себестойността на въглеродния източник, така и тази на растежните фактори (Litchfield, 2009). Имайки предвид, че днес 90 % от световното производство на МК се осъществява чрез микробна ферментация на глюкоза (Mazzoli et al., 2014), използването на по-евтини субстрати (включително инулин), чувствително би понижило цената ѝ.

Инулин съдържащите субстрати са една перспективна възможност, но до момента не е намерен щам, способен в едностъпален процес да осъществи озахаряване и ферментация на инулина до високи концентрации млечна киселина. Поради това се прибегва до ферментиране на хидролизати на инулина (ензимно третирани), или се прилага кокултивиране. Тези процеси, обаче, не са икономически ефективни.

Предложената тук комбинацията от щам и нов източник на инулин (цикориево брашно) напълно покриват необходимите критерии за ефективност. Щамът *Lactobacillus paracasei* В41 (DSM 23505) е свръхпродуцент на МК от глюкоза и нишесте и притежава изключително висока толерантност към киселинен шок. Също така, щамът притежава β -фруктозидаза (ЕС 3.2.1.80) със силна екзоинулиназна активност, позволявайки му да конвертира инулин съдържащи субстрати директно до МК, в едностъпален процес на едновременно озахаряване и ферментация (SSF). От друга страна, използваният субстрат, цикория, принадлежи към групата от С4 – фотосинтезиращи растения, активно включени в процеса на азот-фиксация, расте на неплодородни и каменисти почви, неподходящи за отглеждане на хранителни култури. Допълнително предимство на проведените SSF процеси е замяната на скъпоструващите азотни източници пептон и месен екстракт с далеч по-евтиният царевичен хидролизат, който се оказва най-подходящ за получаване на МК от инулин. В този смисъл, осъществяването на процес на едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно до МК в индустриален мащаб, би представлявало една перспективна алтернатива на сегашното промишлено производство.

Конкретно, в настоящето изследване са оптимизирани редица параметри, допълнително повишаващи ефективността на процеса. При оптимизирани процесни параметри (рН 5.5, температура 37 °С, скорост на рязбъркване 200 rpm) и състав на средата (среда №7 от Табл. 13), от 136 g/L цикориево брашно, след 14 часа процес на едновременно озахаряване и ферментация, са получени 123.7 g/L МК, с добив близо до теоретичния – 0.91 g/g, т.е. беше получено почти пълно превръщане. Постигнатите концентрация и добив МК, са най-високите получени досега от инулин, в процес без предварителна хидролиза.

Съществен проблем на процеса, обаче, е че при още по-високи концентрации на субстрата (над 140 g/L), добивът на МК не се увеличава поради силно субстратно инхибиране. Вместо това, в културалната течност се натрупва неметаболизирана фруктоза. По този начин, в оптимизираната вече среда №7, от 182 g/L цикориево брашно се получават едва 107.9 g/L МК.

За разрешаването на този проблем беше изследвано влиянието на двувалентните метални йони, чието присъствие в по-високи концентрации, по данни от литературата, би могло да има позитивно, макар и неустановено по вид, влияние върху инулиназната активност.

Върху пречистената инулиназа на *L. paracasei* В41 беше тествано влиянието на 12 вида метални йони, но само при третиране с три от тях (Mn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+}) беше установено повишение на активността извън статистическата грешка. Този позитивен ефект беше силно изразен единствено при третиране на ензима с манганови соли.

Въпреки това, в *in vivo* експерименти с живи клетки беше тествано влиянието и на трите вида метални йони. Очаквано, влиянието на Mg^{2+} и Ca^{2+} беше пренебрежимо и се ограничаваше до действието им като кофактори (Mg^{2+}). Обратно, при култивиране в среди с добавени 2.5 mM Mn^{2+} се наблюдаваше засилена инулиназна активност, както и ускорено продуциране на МК (Табл. 15). Това показва, че действието на Mn^{2+} като добавка в хранителната среда далеч не се изчерпва с ролята му на кофактор.

Имайки предвид позитивното влияние на Mn^{2+} върху цялостния процес на превръщане на инулина в МК, неговото влияние беше изследвано при високи концентрации на субстрат – 182 g/L цикориево брашно. Към среда №7, съдържаща 0.3 mM Mn^{2+} (концентрация, осигуряваща действието на мангана като кофактор), допълнително беше добавян $MnSO_4$, така че крайната концентрация на манган да е 2.5, 5, 10, 15 и 20 mM. Резултатите показаха (Табл. 16), че максимална инулиназна активност се наблюдава при 10 mM Mn^{2+} , а максимален добив на МК – при 15 mM Mn^{2+} . Получената при добавяне на 15 mM Mn^{2+} концентрация - 151 g/L МК, представлява най-високият резултат, получен до момента от инулин съдържащ субстрат. Това подчертава решаващото значение на мангана в процеса на получаване на МК от инулин.

С какво може да се обясни този феноменален резултат? По-високите концентрации на манган не водят до увеличение на нивата на експресия на гена, кодиращ инулиназния ензим, напротив, чувствително ги снижават. Това показва, че увеличението на инулиназната активност в присъствие на манган вероятно се дължи на алостерично въздействие, вследствие на което отделните молекули на ензима стават по-активни, въпреки по-малкият си брой.

Отделно, вероятно действието на мангана не се изчерпва само с влияние върху инулиназния ензим, а и върху други ензими, участващи в цялостния процес на ферментация и транспорт. Факт е, че колкото по-висока е концентрацията на Mn^{2+} , толкова по-малко е количеството на неметаболизирана фруктоза в средата (Фиг. 56). Този резултат потвърждава тезата, че почти всяка стъпка в процеса на метаболизиране на инулина до млечна к-на или изисква метални йони като кофактори, или се влияе позитивно от тяхното присъствие.

Въпреки, че все още няма информация за влиянието на металните йони конкретно върху β -фруктозидазите на *L. paracasei*, известно е, че двувалентни метални йони като Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+} оказват позитивен ефект върху върху екзоинулинази на *Kluyveromyces marxianus* (Singh and Bhemi, 2008; Zhou et al.,

2016). Има сведения за позитивно въздействие на Mn^{2+} и при инулинази от *Bacillus subtilis*, *Aspergillus ficuum* и *Penibacillium* sp. (Zherebtsov et al., 2002; Chen et al., 2013; Rawat et al., 2015).

Също така, общоприето е мнението, че повечето ензими от гликолитичния път изискват Mn^{2+} и Mg^{2+} за осъществяване на своята активност. Lew и съавт. (2013) считат, че Mn^{2+} и Mg^{2+} подобряват афинитетното свързване със субстрата на ключови ензими, като глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа, фосфоенолпируват хидратаза и пируват киназа. Други автори твърдят, че Mn^{2+} увеличава активността на фруктозо-бифосфат алдолазата (Stolzenberger et al., 2013), а добре известна е и нуждата от следи Mn^{2+} като кофактор за действието на лактат дехидрогеназата при *L. casei* (Fitzpatrick et al., 2001).

Освен това, двувалентните метални йони участват в контрола на ензимите с киназо/фосфатазна активност. Например, и двете кинази Enzyme I и HPrK, управляващи, съответно, фосфоенолпируват фосфотрансферазната система (PTS) за транспорт на захари и въглеродната катаболитна репресия (CCR) чрез фосфорилиране на регулаторния протеин HPr, изискват метални йони за активността си (Ginsburg and Peterkofsky, 2002; Viana et al., 2000). CCR механизма включва два белтъка: фосфорилиран HPr и CsrA, които образуват активен комплекс с *cre* сайта (catabolite responsive element - TGAGAACG). Формираният комплекс спира експресията на всички *cre*-регулирани гени (включително *fosE*) (Monedero et al., 2007).

В заключение може да се каже, че силно увеличеното продуциране на МК в процесите с високо съдържание на манган се дължат на: (i) положително алостерично действие на Mn^{2+} върху инулиназата на В41 (увеличена инулиназна активност); (ii) влияние като кофактор на ензимите от гликолитичната верига; (iii) облекчен транспорт на фруктоза (действие върху PTS чрез фосфорилиране на HPr).

Фактът, че в процесите с високо съдържание на манган, въпреки увеличената инулиназна активност, се наблюдава намалена експресия на *fosE*, се обяснява с влиянието на Mn^{2+} върху CCR механизма (пак чрез фосфорилиране на HPr).

3.3.2. Получаване на фруктоза от инулин

Фруктозата се произвежда промишлено основно за нуждите на хранително-вкусовата индустрия като хранителна добавка, овкусител и подсладител (под формата на концентрирани фруктозни сиропи или кристална (чиста) фруктоза) в различни храни и напитки. В индустриален мащаб, до момента фруктозата се получава главно по два начина: (i) чрез киселинна хидролиза на захароза; (ii) чрез мултиензимна хидролиза на нишесте.

Днес се обръща все по-голямо внимание на получаването на фруктоза от инулин, тъй като инулинът е полифруктан с ниска хранителна стойност и не се

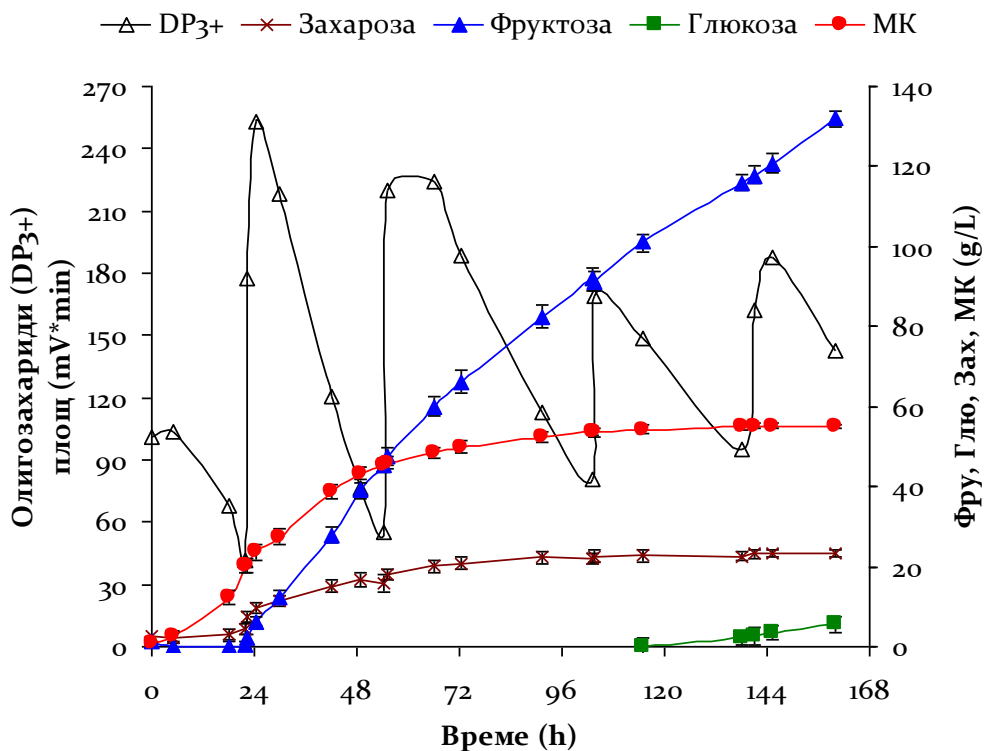
усвоява от човека и животните. Получаването на фруктоза от инулин се осъществява по два метода - химичната или ензимната хидролиза. Химичната се извършва в присъствие на киселини при висока температура, докато ензимната - чрез добавяне на пречистени ензими към разтвор на субстрата.

До момента, процес на микробно получаване на фруктоза от инулин не е осъществяван. За да бъде един такъв процес възможен, е необходимо да се намерят условия, в които използваният микоорганизъм да хидролизира инулина до фруктоза, без да се позволи последващо метаболизиране на фруктозата до крайни продукти.

Избор на тип ферментация и хранителна среда

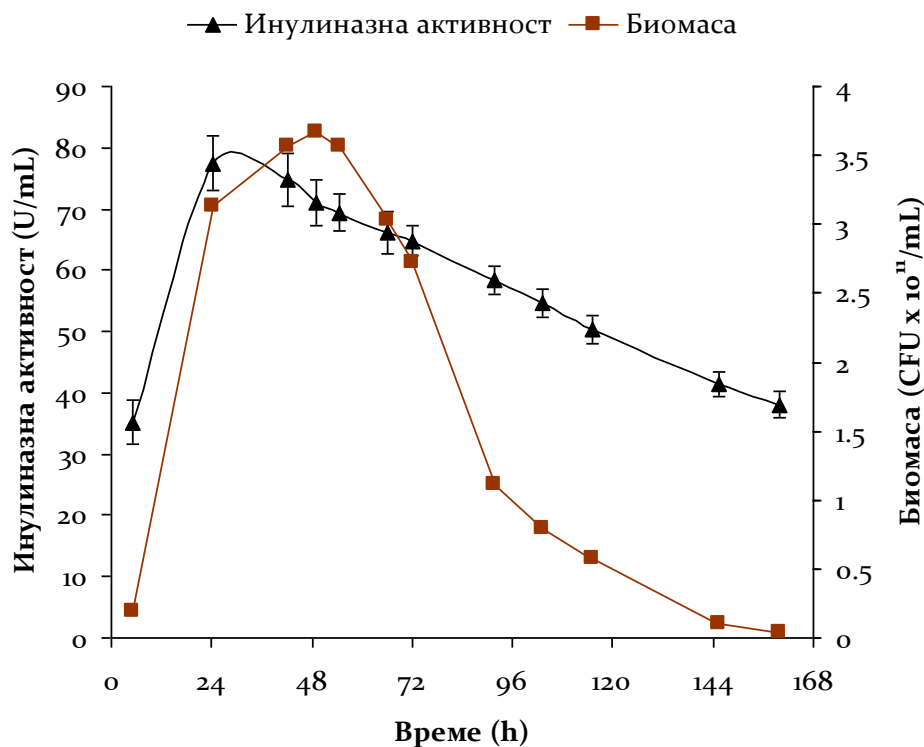
Описаните в предишната глава (3.3.1. – получаване на МК от инулин) резултати показват, че в определени случаи SSF-процесът на метаболизиране на инулин от *L. paracasei* В41 може да доведе до натрупване на сериозни количества фруктоза (Табл. 16, Фиг. 56). Това се случва при процеси с висока концентрация на субстрат и ниска концентрация на Mn^{2+} в хранителната среда. От друга страна, резултатите показват, че при липса на двувалентни метални йони в средата, експресията на гена *fosE*, кодиращ инулиназата на *L. paracasei* В41, се повишава многократно (Табл. 15 – среда 8). Оттук следва, че за да се създадат условия за натрупване на фруктоза, която впоследствие да се метаболизира трудно, е необходимо: (i) SSF-процесът да се проведе като периодичен с подхранване на субстрат (осигурява се излишък на субстрат); (ii) от състава на хранителната среда да се изключат всички соли и микроелементи (изключване на металните йони за увеличаване на експресията на *fosE*).

По тази причина, за получаване на високи концентрации фруктоза, *L. paracasei* В41 беше култивиран в периодичен процес с подхранване на субстрат (цикориево брашно), в среда, съдържаща освен въглероден източник, единствено 10 g/L дрождев екстракт и 10 g/L бактопептон. Процесът беше проведен във ферментатор с работен обем 1 L и механично ръзбъркване, при температура 37 °С, рН 4.9 (оптимум на инулиназата) и обороти на бъркачката – 200 грт. В първоначалната среда концентрацията на цикориево брашно беше 25 g/L, като по време на процеса, цикориевото брашно бе добавяно нестерилно, на прах, на порции от по 50 или 100 грама. За 160 часа ферментация бяха добавени общо 300 грама цикориево брашно (100 + 100 + 50 + 50).



Фигура 59. Консумация на субстрат и формиране на метаболити при едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от *L. paracasei* В41 в периодичен процес с подхранване. Условия: температура 37 °С, рН 4.9, разбъркване 200 грт. DP₃₊ – олигозахариди със степен на полимеризация 3 – 9, МК – млечна киселина, Глю – глюкоза, Зах – захароза, Фру – фруктоза.

На Фиг. 59 е показано изменението в количеството на субстрата (относително съдържание на олигозахариди DP₃ – DP₉ в културалната течност), продуктите на хидролизата – захароза, фруктоза и глюкоза, както и на крайния продукт на ферментацията – млечна к-на. Прави впечатление, че почти цялото начално количество субстрат (25 g/L) се конвертира директно в МК (20.2 g/L) за по-малко от 22 часа. След първото подхранване обаче (22-ри час), голяма част от цикориевото брашно се хидролизира до фруктоза, която, без да се метаболизира, започва да се акумулира в средата. Съответно, продуцирането на МК постепенно намалява и почти напълно спира след 48-ми час. Въпреки това, хидролизата на инулина продължава до края на процеса (160 часа), което води до натрупване на над 130 g/L фруктоза. Забелязва се също, че при концентрация на фруктоза от 100 g/L, в културалната течност започва да се натрупва и глюкоза. Наличието на неметаболизирана глюкоза в средата показва пълното преустановяване на процесите на гликолиза в клетките.



Фигура 60. Изменение на инулиназната активност и формиране на биомаса при едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от *L. paracasei* B41 в периодичен процес с подхранване. Условия: температура 37 °C, рН 4.9, разбъркване 200 rpm.

Инулиназната активност достига своя максимум (77.3 U/mL) още преди първото подхранване и постепенно намалява до края на процеса (Фиг. 60). Жизнеспособната биомаса е най-висока на 48-ми час (3.67×10^{11} CFU/mL), след което намалява с два логаритъма (3.3×10^9 CFU/mL на 160-ти час) (Фиг 60). В края на ферментацията, съдържанието на културалната течност е следното: фруктоза – 131.9 g/L, МК – 55.1 g/L, захароза – 23.5 g/L, глюкоза – 5.7 g/L и около 25 g/L олигозахариди (изчислени по площ на общ пик DP₃ – DP₉).

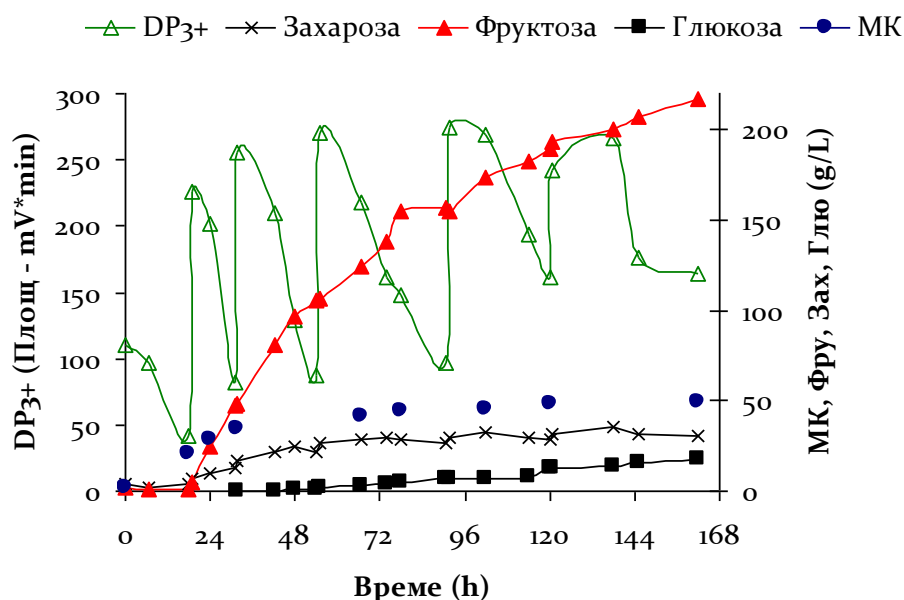
Влияние на температурата

За установяване на оптималната температура за натрупване на фруктоза, бяха проведени периодични процеси с подхранване при 28, 20, 33, 37 °C. Всички те бяха осъществени при рН 4.9 и разбъркване 200 rpm в продължение на 160 часа. От представените резултати на Табл. 17 се вижда, че температурата оказва много силно влияние върху хидролизния процес. При 33 °C са добавени и разградени 450 g цикориево брашно, докато при 28 °C и 37 °C са добавени едва по 300 g.

Освободеното количество фруктоза в първия случай е 276.3 g (крайна концентрация 217 g/L) срещу 166.8 и 169.6 g/L, съответно. Въпреки, че за образуване на биомаса и получаване на млечна киселина най-подходяща е температура 37 °C, оптималната температура за акумулиране на фруктоза е 33 °C (Фиг. 61) и всички следващи оптимизации са проведени при тази температура.

Влияние на рН на средата

Дотук всички периодични процеси с подхранване бяха проведени при рН на средата 4.9, киселинност при която беше установена максимална активност на чистата инулиназа. Имайки предвид, че при процесите *in vivo* върху ензимната активност оказват влияние множество допълнителни фактори, бяха проведени процеси с контролирано рН на средата 5.5 и 6.0. Тези процеси бяха осъществени при вече оптимизираната температура от 33 °C и при разбъркване 200 грт. На Фиг. 17 е показан профилът на изменение на инулиназната активност в тези два случая, сравнен с процеса при рН 4.9. Вижда се, че и в двата случая тя е по-висока, достигайки максимални стойности 227.6 U/mL (при рН 5.5) и 202.3 U/mL (при рН 6.0) (Табл. 18).



Фигура 61. Консумация на субстрат и формиране на метаболити при едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от *L. paracasei* В41 в периодичен процес с подхранване. Условия: температура 33 °C, рН 4.9, разбъркване 200 грт. DP3+ – олигозахариди със степен на полимеризация 3 – 9, МК – млечна киселина, Глю – глюкоза, Зах – захароза, Фру – фруктоза.

Таблица 17. Влияние на температурата за образуването на биомаса, изменението на инулиназната активност и формирането на продукти при едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от *L. paracasei* В41 в периодичен процес с подхранване. Представените стойности са детектирани след 160 часа ферментация. Всички процеси са проведени при рН 4.9 и разбъркване 200 грт

Т	ОКИС	Биомаса ^a	Инулиназна активност ^b	Инулиназна активност ^c	Фруктоза	Фруктоза ^d	Добив ^e	Захароза	Глюкоза	МК
(°C)	(g)	(CFU/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(g/L)	(g)	(g/g)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
28	325	3.1 x 10 ¹¹ ±0.1	72.3±4.2	45.0±2.3	131.4±1.7	166.8	0.51	31.9±1.1	0.7±0.5	53.3±0.5
30	375	3.3 x 10 ¹¹ ±0.2	90.7±4.8	51.7±3.1	187.3±2.3	237.8	0.63	24.8±1.5	8.1±2.0	54.6±0.4
33	475	3.6 x 10 ¹¹ ±0.1	94.7±4.9	65.0±3.6	217.0±2.7	276.3	0.58	30.9±1.5	17.8±1.8	49.7±0.4
37	325	3.7 x 10 ¹¹ ±0.3	77.3±4.3	38.0±2.1	131.9±2.0	169.6	0.52	23.5±0.8	5.7±1.8	55.1±0.6

Легенда: Т – температура; ОКИС – общо количество използван субстрат; МК – млечна киселина; ^a Максимални стойности получени около 48-ми час на ферментацията; ^b Максимални стойности получени около 17-ти - 24-ти час на ферментацията; ^c Стойности получени в края на ферментацията (160-ти час); ^d Стойности изчислени спрямо крайният обем; ^e Грам получена фруктоза на грам усвоено цикориево брашно. Представените стойности са средно аритметични с отклонения от два независими експеримента.

В процеса с рН 5.5 общо са добавени 650 g цикориево брашно, като максималната достигната концентрация на фруктоза е 325.3 g/L (почти 50 % повече от получената при рН 4.9), а при рН 6.0 – 600 g и са получени 298.7 g/L фруктоза (Табл. 18). Количествата акумулирана глюкоза, както при фруктозата, са най-високи при рН 5.5 (29.8 g/L), след това при рН 6.0 (26.5 g/L) и най-ниски при рН 4.9 (17.8 g/L) (Табл. 18). За продуциране на МК и образуване на биомаса, обаче, най-подходящо е рН 6.0. Най-висока концентрация на МК е получена при рН 6.0 (63.2 g/L), след това при рН 5.5 (56.8 g/L) и най-ниска при рН 4.9 (49.7 g/L) (Табл. 18). Образуването на биомаса също е най-силно при рН 6.0 и най-слабо при рН 4.9, като при всички изследвани процеси жизнеспособната биомаса достига максимални стойности около 48-ми час. След това, до 160-ти час, броят живи клетки намалява близо 100 пъти, вероятно поради изключително високата концентрация на захари в културалната течност.

От представените резултати се вижда, че за натрупване на максимално количество фруктоза, най-подходящото рН на средата е 5.5. В този случай, в края на ферментационния процес, културалната течност е със следния състав: 325.3 g/L фруктоза, 56.8 g/L млечна киселина, 29.8 g/L глюкоза и 21.4 g/L захароза. Показателно е, че при този процес са употребени общо 675 g цикориево брашно, от които, изчислено по крайния работен обем, са получени 414 g фруктоза.

Влияние на скоростта на разбъркване

Дотук, като оптимални за получаване на фруктоза от цикориево брашно, бяха определени температура 33 °C и рН на средата 5.5. Всички описани до момента процеси, обаче, бяха проведени при скорост на разбъркване на бъркачката от 200 оборота в минута, без допълнителна аерация, което осигурява микроаерофилни условия за *L. ragacasei* В41, оптимални за получаване на МК от инулин. За да се оптимизира и този параметър за максимален добив на фруктоза, бяха проведени процеси при скорост на разбъркване от 100, 150 и 300 оборота в минута. Резултатите от тези процеси (сравнени с тези от вече проведения процес при 200 rpm) са представени на Табл. 19. Очевидно, за процесите на хидролиза на инулина и получаването на фруктоза, скоростта на разбъркване има значително по-слаб ефект от температурата и киселинността на средата. Все пак, най-висока концентрация на фруктоза е получена при 100 rpm. В този процес, след 160 ферментация, културалната среда е със следния състав: 359 g/L фруктоза, 55.2 g/L млечна киселина, 34.8 g/L глюкоза и 17.9 g/L захароза и около 25 g/L олигозахариди (Фиг. 62). Общото количество използван субстрат е 675 g, а получената количество фруктоза в грамове е 467 (краен обем на културалната течност 1.3 L). Инулиназната активност достига своя максимум на 17-ти час – 253.7 U/mL, след което намалява до 160 U/mL в края на процеса (Фиг. 63).

Таблица 18. Влияние на рН на средата за образуването на биомаса, изменението на инулиназната активност и формирането на продукти при едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от *L. paracasei* В41 в периодичен процес с подхранване. Представените стойности са детектирани след 160 часа ферментация. Всички процеси са проведени при температура 33 °С и разбъркване 200 rpm

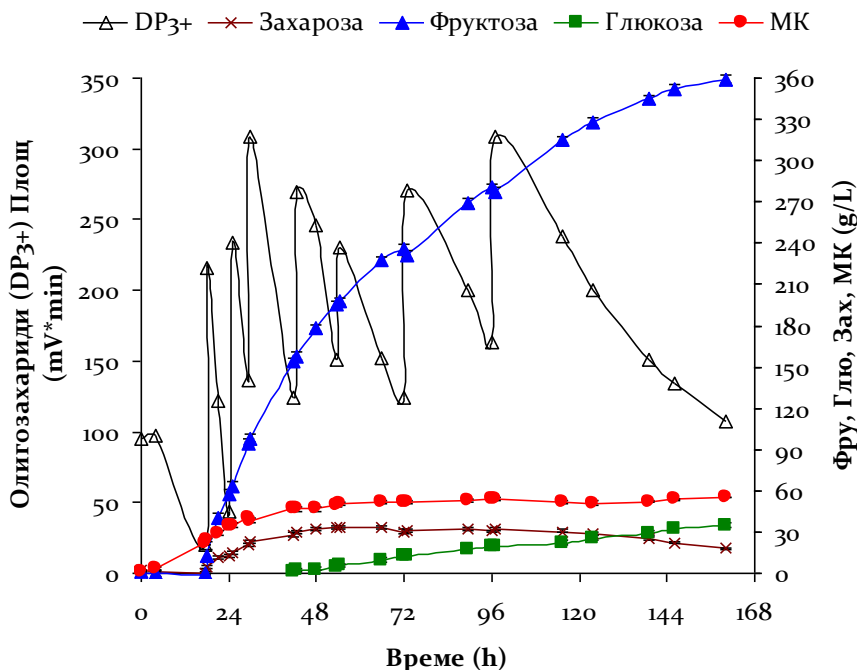
рН	ОКИС	Биомаса ^а	Инулиназна активност ^б	Инулиназна активност ^с	Фруктоза	Фруктоза ^д	Добив ^е	Захароза	Глюкоза	МК
	(g)	(CFU/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(g/L)	(g)	(g/g)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
4.9	475	3.6 x 10 ¹¹ ±0.2	94.7±4.9	65.0±3.6	217.0±2.7	276.3	0.58	30.9±1.5	17.8±1.8	49.7±0.4
5.5	675	5.0 x 10 ¹¹ ±0.3	227.6±6.2	112.2±5.3	325.3±2.5	414.0	0.61	21.4±2.3	29.8±2.2	56.8±0.8
6.0	625	5.6 x 10 ¹¹ ±0.2	202.3±8.2	136.3±6.8	298.7±2.8	373.4	0.60	22.1±2.5	26.5±2.1	63.2±0.7

Легенда: ОКИС – общо количество използван субстрат; МК – млечна киселина; ^а Максимални стойности получени около 48-ми час на ферментацията; ^б Максимални стойности получени около 17-ти - 24-ти час на ферментацията; ^с Стойности получени в края на ферментацията (160-ти час); ^д Стойности изчислени спрямо крайният обем; ^е Грам получена фруктоза на грам усвоено цикориево брашно. Представените стойности са средно аритметични с отклонения от два независими експеримента.

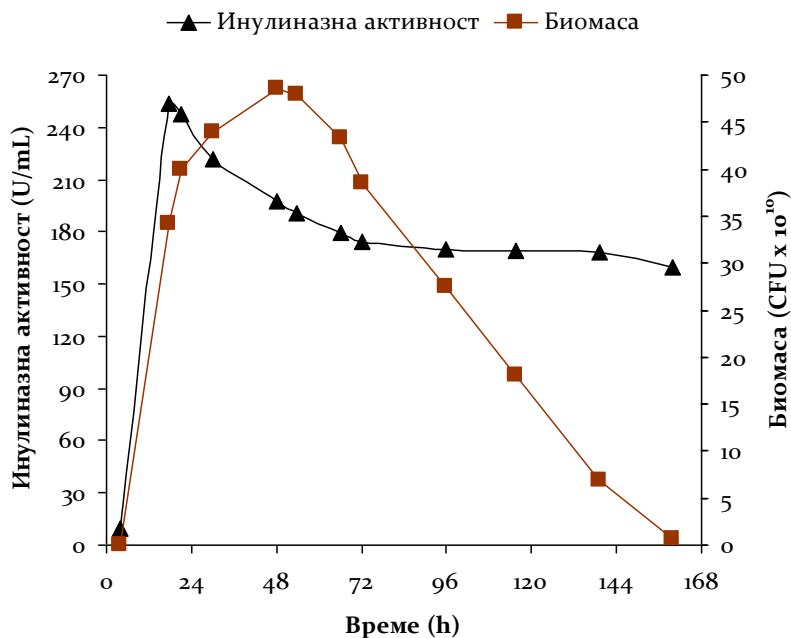
Таблица 19. Влияние на скоростта на разбъркване на средата за образуването на биомаса, изменението на инулиназната активност и формирането на продукти при едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от *L. paracasei* В41 в периодичен процес с подхранване. Представените стойности са детектирани след 160 часа ферментация. Всички процеси са проведени при температура 33 °С и рН 5.5.

СР	ОКИС	Биомаса ^a	Инулиназна активност ^b	Инулиназна активност ^c	Фруктоза	Фруктоза ^d	Добив ^e	Захароза	Глюкоза	МК
(rpm)	(g)	(CFU/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(g/L)	(g)	(g/g)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
100 ^f	675	4.9 x 10 ¹¹ ±0.2	253.7±9.6	160.0±6.5	359.0±2.8	466.7	0.69	17.9±0.7	34.8±1.8	55.2±0.4
150 ^f	675	5.0 x 10 ¹¹ ±0.3	246.3±8.9	167.0±6.6	353.5±3.5	448.1	0.66	17.4±0.6	34.4±2.5	55.5±0.7
200	675	5.0 x 10 ¹¹ ±0.3	227.6±6.2	112.2±5.3	325.3±2.5	414.0	0.61	21.4±1.0	29.8±1.6	57.8±0.5
300	675	6.8 x 10 ¹¹ ±0.3	182.0±6.8	96.0±4.8	320.7±3.6	408.9	0.61	23.3±1.3	32.5±1.5	56.0±0.7

Легенда: СР – скорост на разбъркване; ОКИС – общо количество използван субстрат; МК – млечна киселина; ^a Максимални стойности получени около 48-ми час на ферментацията; ^b Максимални стойности получени около 17-ти - 24-ти час на ферментацията; ^c Стойности получени в края на ферментацията (160-ти час); ^d Стойности изчислени спрямо крайният обем; ^e Грам получена фруктоза на грам усвоено цикориево брашно; ^f трикратно проведени експерименти. Представените стойности са средно аритметични с отклонения от два независими експеримента.



Фигура 62. Консумация на субстрат и формиране на метаболити при едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от *L. paracasei* В41 в периодичен процес с подхранване. Условия: температура 33 °С, рН 5.5, разбъркване 100 грт. DP₃₊ – олигозахариди със степен на полимеризация 3 – 9, МК – млечна киселина, Глю – глюкоза, Зах – захароза, Фру – фруктоза.



Фигура 63. Изменение на инулиназната активност и количеството биомаса при едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от *L. paracasei* В41 в периодичен процес с подхранване. Условия: температура 33 °С, рН 5.5, разбъркване 100 грт.

Влияние на азотните източници

За да се намали продуцирането на МК и съответно, да се увеличи количеството неметаболизирана фруктоза, съставът на хранителната среда бе ограничен единствено до въглероден и азотен източник. Известно е, че за действието на инулиназите силно предпочитани са органичните азотни източници.

Относно инулиназата на *L. paracasei* В41, при SSF-процесите за получаване на МК, най-подходящият азотен източник се оказва царевичният хидролизат (20 g/L царевичен хидролизат и 5 g/L дрождев екстракт), докато при всички процеси за получаване на максимално количество фруктоза до момента, бяха използвани дрождев екстракт (10 g/L) и бактопептон (10 g/L).

По тази причина, при вече оптимизираните параметри (температура 33 °C, рН 5.5 и разбъркване 100 rpm), бяха проведени периодични процеси с подхранване в още 8 хранителни среди съдържащи в различни съотношения и концентрации, следните азотни източници – дрождев екстракт (ДЕ), бактопептон (БП), пептон от казеин (ПК) и царевичен хидролизат (ЦХ).

Резултатите недвусмислено показват, че в среди, лимитирани единствено до въглероден и азотен източник, най-важен за процесите на хидролиза на инулин и образуване на биомаса е ДЕ (Табл. 20). За получаването на високи концентрации фруктоза е необходимо средата да съдържа 10 g/L ДЕ. По-високи концентрации на ДЕ почти не оказват влияние върху акумулирането на фруктоза, но способстват формирането на биомаса (ред 2 и ред 5, Табл. 20). Намалването обаче, на съдържанието на ДЕ в средата от 10 g/L на 5 g/L води до драстично забавяне на процеса на хидролиза, респективно на образуване на фруктоза. Този ефект се забелязва отчетливо, независимо от вида и концентрацията на съпътстващия азотен източник (ред 8 и ред 9, Табл. 32). Прави впечатление, че в среда с ДЕ (10 g/L) като единствен азотен източник, получената концентрация фруктоза е значителна – 289.7 g/L.

Втория по важност азотен източник е пептонът, като БП е за предпочитане пред ПК (добиви 0.69 g/g срещу 0.66 g/g), докато ЦХ определено е неподходящ за получаване на фруктоза. Все пак, в потвърждение на предишните ни резултати, в средите с добавен ЦХ концентрацията на МК е най-висока (68.5 – 69.2 g/L).

Таблица 20. Влияние на вида и концентрацията на азотните източници за образуването на биомаса, изменението на инулиназната активност и формирането на продукти при едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от *L. paracasei* V41 в периодичен процес с подхранване. Представените стойности са детектирани след 160 часа ферментация. Всички процеси са проведени при температура 33 °С, рН 5.5 и разбъркване 100 грт.

Азотен източник (g/L)	ОКИС (g)	Биомаса ^a (CFU/mL)	Инулиназна активност ^b (U/mL)	Инулиназна активност ^c (U/mL)	Фруктоза (g/L)	Фруктоза ^d (g)	Добив ^e (g/g)	Захароза (g/L)	Глюкоза (g/L)	МК (g/L)
10 ДЕ + 10 БП ^f	675	4.9 x 10 ¹¹ ±0.2	253.7±9.6	160.0±6.5	359.0±2.8	466.7	0.69	17.9±0.7	34.8±1.8	55.2±0.4
15 ДЕ + 10 БП ^f	675	7.0 x 10 ¹¹ ±0.3	279.3±11.4	131.0±5.1	357.8±3.3	468.7	0.69	18.6±1.2	32.9±2.5	57.8±0.9
10 ДЕ + 10 ПК ^f	675	6.4 x 10 ¹¹ ±0.3	227.3±9.5	89.0±4.5	345.8±3.0	442.6	0.66	17.9±0.9	34.6±2.3	53.2±0.8
10 ДЕ + 10 БП + 10 ЦХ	675	5.6 x 10 ¹¹ ±0.3	317.0±14.1	129.7±5.2	345.1±1.8	455.5	0.67	15.4±1.0	30.6±1.9	68.5±0.6
15 ДЕ + 5 БП	675	6.8 x 10 ¹¹ ±0.3	240.3±9.8	105.0±4.7	339.4±2.5	441.2	0.65	20.2±1.2	31.1±3.2	59.4±0.6
10 ДЕ + 20 БП	675	5.7 x 10 ¹¹ ±0.3	272.7±11.2	134.3±5.6	325.4±2.8	423.0	0.63	22.9±1.5	30.3±1.9	52.2±0.8
10 ДЕ	575	4.7 x 10 ¹¹ ±0.2	158.3±6.3	88.0±4.6	289.7±2.6	366.6	0.64	31.8±1.6	20.7±2.8	63.0±0.5
5 ДЕ + 20 БП	525	4.3 x 10 ¹¹ ±0.2	102.0±4.8	71.7±4.3	247.1±2.5	296.5	0.56	26.5±1.5	14.1±2.0	65.1±0.8
5 ДЕ + 20 ЦХ	325	3.9 x 10 ¹¹ ±0.1	71.7±4.4	38.2±2.4	132.6±1.9	152.5	0.47	33.2±1.7	2.7±1.8	69.2±1.0

Легенда: ДЕ – дрождев екстракт; БП – бактопептон; ПК – пептон от казеин; ЦХ – царевичен хидролизат; ОКИС – общо количество използван субстрат; МК – млечна киселина; ^a Максимални стойности получени около 48-ми час на ферментацията; ^b Максимални стойности получени около 17-ти - 24-ти час на ферментацията; ^c Стойности получени в края на ферментацията (160-ти час); ^d Стойности изчислени спрямо крайният обем; ^e Грам получена фруктоза на грам усвоено цикориево брашно; ^f трикратно проведени експерименти. Представените стойности са средно аритметични с отклонения от два независими експеримента.

Също така, резултатите показват, че обща концентрация на азотните източници над 20 g/L няма ефект върху формирането на фруктоза, въпреки че способства за допълнително увеличаване на инулиназната активност. Така например, най-висока инулиназна активност се наблюдава при процеса, проведен в среда с 10 g/L ДЕ, 10 g/L БП и 10 g/L ЦХ – 317 U/mL, което представлява и най-високата моментна стойност, получена досега от всички процеси. Тя е съпоставима с най-високите инулиназни активности, отчетени при ензими от дрожди (Silva-Santisteban et al., 2009; Ge et al., 2009; Singh et al., 2007; Singh and Bhemi, 2008; Chen et al., 2013) и е няколко пъти по-висока от тези, постигнати от инулинази на бактерии (Rawat et al., 2017). Въпреки това, получената крайна концентрация фруктоза е 345.8 g/L, което показва, че добавянето на ЦХ е излишно.

След направения анализ се вижда, че най-подходяща за получаване на фруктоза остава средата съдържаща 10 g/L ДЕ и 10 g/L БП.

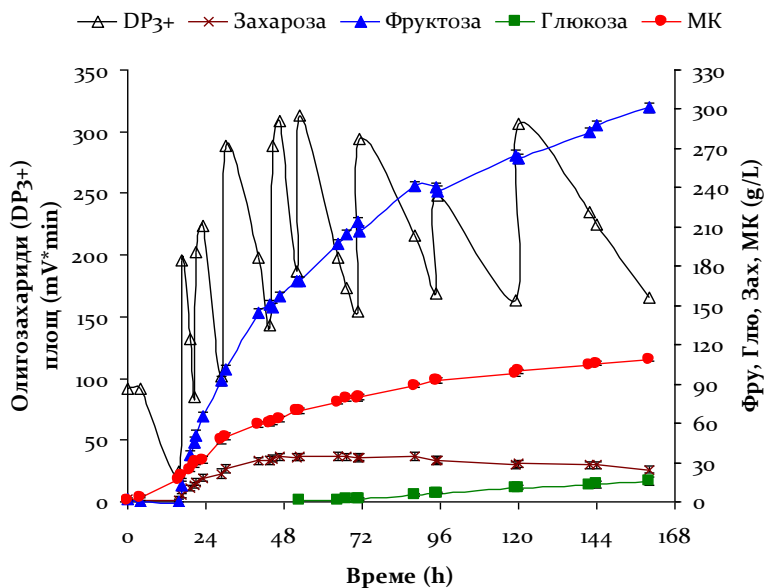
Влияние на Mn^{2+}

Интересно би било да се проследи и влиянието на Mn^{2+} при този вид процеси. В предишната глава (получаване на млечна к-на от инулин) беше установено, че присъствието на Mn^{2+} в хранителната среда води до увеличение на ензимната активност и съответно, способства продуцирането на МК.

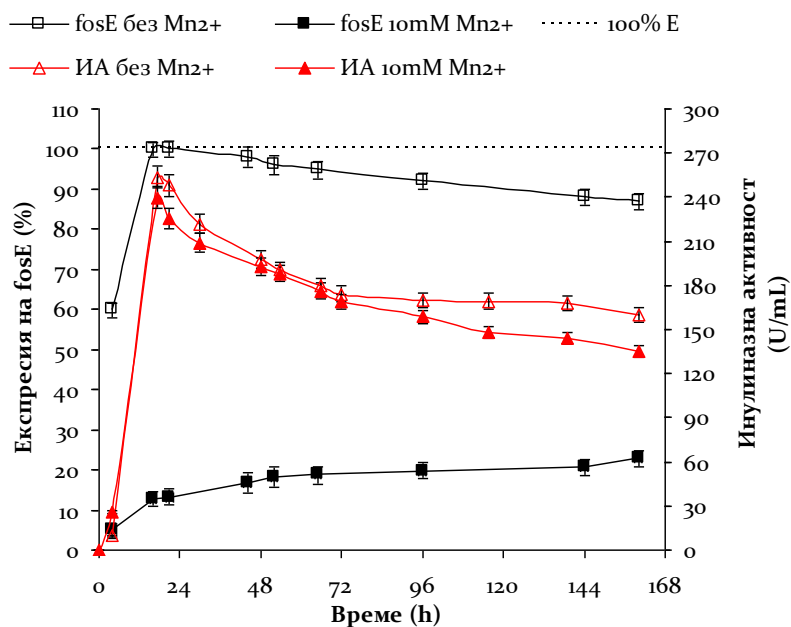
За да се изследва влиянието на Mn^{2+} при процесите с подхранване, беше проведен аналогичен на описания на Фиг. 122 процес (в среда съдържаща 25 g/L цикориево брашно, 10 g/L ДЕ и 10 g/L БП, и проведен при температура 33 °C, pH 5.5 и разбъркване 100 rpm), с единствената разлика, че към средата беше добавен $MnSO_4$, осигуряващ начална концентрация на Mn^{2+} в средата от 10 mM (концентрацията най-силно повишаваща инулиназната активност).

Кинетика на процеса е представена на Фиг. 64. В сравнение с аналогичния процес без манган (Фиг. 62), изконсумираното количество субстрат за 160 часа е приблизително същото (≈ 650 g). Въпреки това, разликата в количествата на получените продукти е значителна. Веднага прави впечатление, че добавката на Mn^{2+} води до двойно увеличение на продуцираното количество МК – 108.7 g/L, спрямо 55.2 g/L (виж Фиг. 62). Обратно, крайната концентрация на фруктоза е значително по-ниска – 301.3 g/L, спрямо 359 g/L в процеса без манган. Този резултат още веднъж потвърждава ключовото значение на Mn^{2+} за получаване на МК.

Сравнението на инулиназните активности в двата процеса не показва съществени разлики – максималните стойности са съответно 253.7 U/mL при процеса без манган и 239.7 U/mL, в процеса с добавяне на манган (Фиг. 65). Разликата в нивата на гена експресия на *fosE* обаче е огромна. Добавката на манган води до близо 7 пъти по-висока експресия на гена (Фиг. 65).



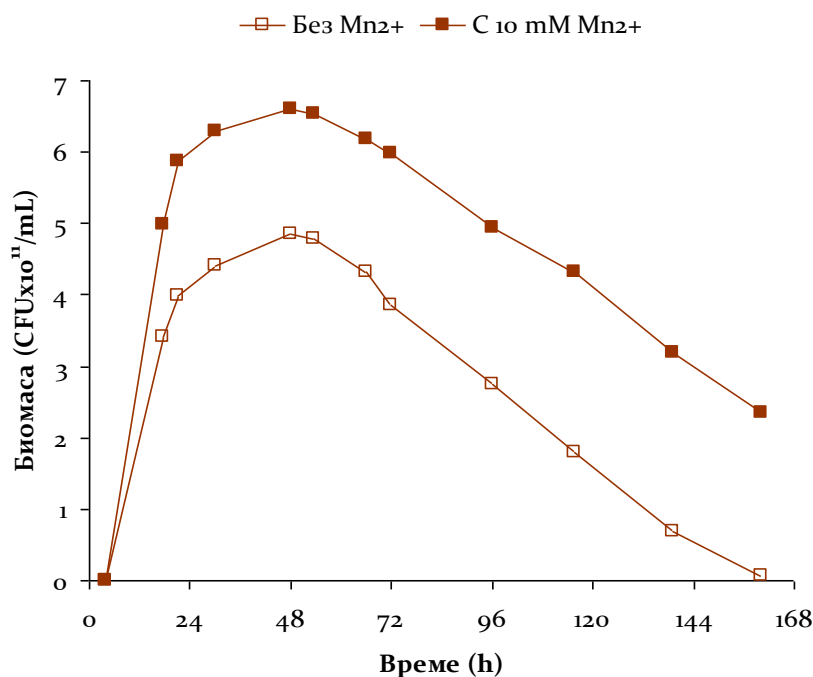
Фигура 64. Консумация на субстрат и формиране на метаболити при едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от *L. rarasensei* В41 в периодичен процес с подхранване. Условия: температура 33 °С, рН 5.5, разбъркване 100 грт. Среда с начален състав: 25 g/L цикориево брашно, 10 g/L ДЕ и 10 g/L БП и магнезиев сулфат, осигуряващ 10 mM Mn²⁺ DP₃₊ – олигозахариди със степен на полимеризация 3 – 9, МК – млечна киселина, Глю – глюкоза, Зах – захароза, Фру – фруктоза.



Фигура 65. Сравнение на инулиназната активност и генната експресия на *fosE* в процеси без Mn²⁺ и с добавка от 10 mM Mn²⁺. Условия: температура 33 °С, рН 5.5, разбъркване 100 грт. Среда с начален състав: 25 g/L цикориево брашно, 10 g/L ДЕ и 10 g/L БП.

Това означава, че въпреки сравнително близките стойности в ензимната активност, в двата случая тя се дължи на коренно различни причини. Наличието на Mn^{2+} води до увеличаване на инулиназната активност чрез алостерично активиране на β -фруктозидазата (инулиназата). Обратно, липсата на Mn^{2+} води до увеличаване на експресията на ензима, което също увеличава активността, компенсирайки липсата на алостерично въздействие. С други думи, високите концентрации на Mn^{2+} водят до малко на брой, но много активни ензимни молекули, докато липсата на Mn^{2+} води до по-малко активни, но повече на брой ензимни единици.

Добавянето на Mn^{2+} води и до силно увеличаване на биомасата (Фиг. 66).



Фигура 66. Изменение на количеството биомаса в процеси без Mn^{2+} и с добавка от 10 mM Mn^{2+} . Условия: температура 33 °C, рН 5,5, разбъркване 100 грт. Среда с начален състав: 25 g/L цикориево брашно, 10 g/L ДЕ и 10 g/L БП.

Заклучение

Процесът на едновременно озахаряване и ферментация на инулин може успешно да бъде използван и за получаване на фруктоза. За целта трябва да се създадат условия, в които процесът на хидролиза на фруктоолигозахарида до фруктоза и глюкоза да бъде засилен, а процесът на ферментация на монозахаридите – максимално затруднен. По този начин биха се освободили значителни количества фруктоза, за чието получаване не е необходимо допълнително ензимно третиране.

За тази цел беше използван периодичен процес с подхранване, осигуряващ излишество на субстрат, а процеса на ферментация беше възпрепятстван, като

съдържанието на хранителната среда беше лимитирано единствено до въглероден и азотен източник. Впоследствие, при оптимизиране на температурата, рН на средата и скоростта на разбъркване (рН 5.50, 33 °C и 100 rpm) беше получен 36% разтвор на фруктоза, с инулиназна активност (317 U/mL), дори по-висока от тази при процесите за получаване на МК. За разлика от процесите, оптимизирани за получаване на МК, тук инулиназната активност не се дължи на алостеричното въздействие на Mn^{2+} , а на изключително високата експресия на гена *fosE* и съответно, голямо количество секретирани белтък. По тази причина, процесът на хидролиза е изключително засилен.

От друга страна, липсата на соли и метални йони в средата възпрепятства както действието на ензимите от гликолитичния път, така и транспорта на фруктоза през клетъчната мембрана. В резултат ферментирането на захари (фруктоза) не се осъществява и те остават в извънклетъчното пространство.

Предимствата на разработеният метод за получаване на фруктоза са следните:

- Получаване на концентриран разтвор на фруктоза само в една технологична стъпка – периодична ферментация с подхранване в присъствие на *L. paracasei* V41. За сравнение, всички известни методи за получаване на фруктоза са многоетапни.
- В сравнение с химичните методи за получаване на фруктоза, предимство на настоящият метод е получаването на продукта във високо качество, без наличие на дифруктозо анхидрид и нежелателно оцветяване. Поради това, настоящият метод не изисква допълнителните и силно оскъпяващи етапи на преработка и пречистване на продукта, нужни при химичното му получаване.
- В сравнение с известните ензимни методи за получаване на фруктоза, при които субстратите се третира с получени в други процеси и впоследствие пречистени ензими, настоящият метод също има редица предимства: (i) Ензимната активност на произведената по време на ферментационния процес инулиназа достига много по-високи стойности и се запазва за много по-продължителен период от време, в сравнение с тази на пречистеният ензим; (ii) Процесът се извършва при по-меки условия и при по-ниски температури; (iii) Избягват се предварителните етапи на получаване, пречистване и съхранение на нужния за третиране ензим; (iv) Обикновено при ензимното получаване на фруктоза е необходимо мултиензимно третиране, което не е нужно при настоящия метод.

4. ИЗВОДИ

Получаване на ценни продукти от глицерол

Получаване на 2,3-БД и 1,3-ПД от глицерол

- Установени са оптималните биопроцесни параметри за получаване на 2,3-бутандиол от глицерол чрез щам *Klebsiella pneumoniae* G31: (i) периодичен процес с подхранване на субстрат; (ii) температура 37 °C; (iii) начално рН на средата 8.0 и неконтролирано рН по време на процеса; (iv) хранителната среда без наличие на Co^{2+} ; (v) микроаерофилни условия, осигурени с аерация на стерилен въздух от 2.2 vvm и скорост на разбъркване 200 rpm.
- Създаден е нов метод за рН контрол, т.н. «метод на изкуствените рН флуктуации», при който рН на средата циклично се променя. В едната посока промяната се осъществява изкуствено - чрез добавяне на основа, а в другата – естествено, вследствие на метаболизма на клетките. Изкуствените рН флуктуации могат да са с различната амплитуда (ΔpH), в зависимост от количеството добавена основа и да бъдат осъществявани през различен интервал от време (Δt).
- Установено е влиянието на ΔpH и Δt върху метаболизма на *Klebsiella pneumoniae* G31 в процеса на конверсия на глицерола до 2,3-бутандиол и 1,3-пропандиол. Общото при всички процеси с изкуствени рН флуктуации е значителното увеличение на получените количества диоли (2,3-бутандиол и 1,3-пропандиол) за сметка на продуцираните количества млечна, оцетна и сукцинова киселини.
- Определени са оптималните рН флуктуации за получаване на 2,3-бутандиол от глицерол в периодичен процес с подхранване: $\Delta pH=1.0$, $\Delta t=12h$ (флуктуации с амплитуда 1.0 рН, осъществени през 12 часа).
- Определени са оптималните рН флуктуации за получаване на 1,3-пропандиол от глицерол в периодичен процес с подхранване: $\Delta pH=1.0$, $\Delta t=3h$ – за получаване на максимална концентрация; $\Delta pH=1.5$, $\Delta t=3h$ – за получаване на максимална продуктивност.

Получаване на ценни продукти от нишесте

Получаване на 2,3-БД от нишесте

- Конструиран е рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A, с въведен ген за α -амилаза от *Bacillus licheniformis* 44MB82/G, под контрола на индуцируем промотор *Plac*.
- Определено е оптималното количество индуктор IPTG, нужно за получаване на максимални нива на експресия на гена *amyL* в *Klebsiella pneumoniae* G31-A - 1 mM.
- Установено е, че добавяне на кофактора Ca^{2+} в средата повишава амилазната активност, но поради натрупването на инхибиращи процеса малтоолигозахариди с DP3 и DP5, води до намаляване на продуцираните количества 2,3-бутандиол.
- Установено е, че добавянето на глицин към средата улеснява транспорта на α -амилаза през клетъчната стена на *K. pneumoniae* G31-A и в концентрации до 0.5 % подпомага продуцирането на 2,3-бутандиол. При по-високи концентрации обаче, глицинът води до разрушаване на клетъчните стени.
- Рекомбинантният щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A е способен напълно да метаболизира високо концентрирани разтвори на нишесте (до 30 % р-р). Най-висока концентрация 2,3-бутандиол (53,8 g/L) е постигната при метаболизирането на 200 g/L нишесте. В този процес получените добив и продуктивност са 0.3 g/g и 0.5 g/Lh. Получените концентрация и продуктивност са съответно 14 и 3 пъти по-високи от постигнатите в света до момента.

Получаване на млечна киселина от нишесте

- Изолиран и характеризирани е нов, естествен изолат *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84, способен да хидролизира нишесте директно до млечна киселина. До момента това качество не е наблюдавано при представители на вида. Въпреки това, получените количества млечна к-на (5.5 g/L) далеч не са достатъчни за провеждане на икономически ефективен процес. Новият изолат трудно би намерил приложно предназначение.

- Изолирани и характеризирани са три нови амилолитични лактобацилни щама – *Lactobacillus plantarum* Vom 816, *Lactobacillus pentosus* N3 и *Lactobacillus paracasei* B41. До момента няма данни за амилолитични представители на видовете *L. paracasei* и *L. pentosus*. От трите новоизолирани щама, единствено *L. paracasei* B41 има потенциал за промишлено приложение за получаване на млечна киселина от нишесте. От 40 g/L нишесте изолатът продуцира 26.9 g/L млечна к-на. При *L. plantarum* Vom 816 и *L. pentosus* N3 максималните получените концентрации са съответно 9.5 и 5.5 g/L.
- От тестваните за получаване на млечна к-на от нишесте пет щама *Rhizopus* (от видовете *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus* и *Rhizopus chinensis*), щамовете от вид *R. arrhizus* и *R. oryzae* показват значително по-добра способност да хидролизират и ферментират субстрата в млечна к-на. Максималните постигнати концентрации са съответно 25.3 и 16.88 g/L. За установяване на пълния капацитет на тези изолати като продуценти на млечна к-на от нишесте са нужни допълнителни изследвания.

Получаване на етанол от нишесте

- За директно получаване на етанол от нишесте, в *Zygomonas mobilis* DSM 424 е въведен ген за екстрацелуларна α -амилаза от *Bacillus licheniformis* 44MB82/G. Генът е клониран в совалкови вектори pZT1, pZT2 и pZT3, под контрола на промоторите *Plac* (*Escherichia coli*) и *SacC* (*Zygomonas mobilis*). Трансформираните и с трите вида конструктори компетентни клетки *E. coli* добиват очакваната екстрацелуларна амилазна активност. Въвеждането на конструкторите в *Z. mobilis* обаче, не води до секреция на амилаза и в трите случая.

Получаване на ценни продукти от инулин

Получаване на млечна киселина от инулин

- Установено е, че инулин-съдържащото брашно от цикория е изключително подходящ субстрат за получаване на ценни биопродукти.
- Осъществен е процес на директна конверсия на инулин в млечна киселина чрез едновременно озахаряване и ферментация,

осъществено чрез българския изолат *Lactobacillus paracasei* В41 (DSM 23505). Щамът е свръх-продуцент на млечна киселина и е способен да синтезира ензим с екзо-инулиназна и инвертазна активност.

- Установени са оптималните параметри за получаване на млечна киселина от инулин-съдържащо цикориево брашно чрез *Lactobacillus paracasei* В41: (i) провеждане на процеса като периодичен; (ii) оптимален състав на азотните източници в хранителната среда - 5 g/L дрождев екстракт и 22 g/L царевичен хидролизат; (iii) оптимално съдържание на Mn^{2+} в средата - 15 mM (iv) провеждане на процеса при температура 37 °C, рН на хранителната среда 5.50 и скорост на разбъркване 200 rpm.
- Експериментално е установено позитивното влияние на Mn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+} върху ензимната активност на инулиназата на *L. paracasei* В41, като максимално въздействие се наблюдава при концентрации 2,5 mM Mn^{2+} (увеличение на активността до 154%), 3 mM Mg^{2+} (до 108%), и 1,5 mM Ca^{2+} (до 104%).
- При експерименти *in vivo* с клетки на *L. paracasei* В41 е установено силното позитивно влияние на Mn^{2+} върху продуцирането на млечна киселина от инулин, за разлика от това на Mg^{2+} и Ca^{2+} , което е несъществено.
- Установено е многостранното влияние на Mn^{2+} в цялостния процес на метаболизиране на инулина от *L. paracasei* В41 до млечна киселина: (i) алостерично въздействие върху инулиназния ензим, повишаващо активността му; (ii) позитивно действие като кофактор на ензимите от гликолитичната верига; (iii) облекчен транспорт на фруктоза (действие върху PTS чрез фосфорилиране на HPr); (iv) инхибиращо действие върху експресията на *fosE*, чрез подпомагане на фосфорилирането на HPr и CcpA (формиращи във фосфорилирано състояние активен комплекс на *cre* сайта).

Получаване на фруктоза от инулин

- Процесът на едновременно озахаряване и ферментация на инулин, изпълнен като периодичен процес с подхранване в среда без съдържание на соли, води до ускорение на хидролизния процес и до почти пълно възпрепятстване на последващата го ферментация. В

резултат, в средата се акумулират огромни количества неметаболизирана фруктоза.

- Установени са оптималните условия за получаване на фруктоза от инулин-съдържащо цикориево брашно: (i) провеждане на процеса като периодичен с подхранване; (ii) липса на соли и микроелементи в хранителната среда; (iii) оптимален състав на азотните източници в хранителната среда - 10 g/L дрождев екстракт и 10 g/L бактопептон; (iv) провеждане на процеса при температура 33 °C, рН на средата 5.50 и скорост на разбъркване 100 грт.
- Установено е, че силната инулиназна активност при процесите в среда без метални йони се дължи на седемкратно увеличаване на нивата на експресията на инулиназнания ген.

5. ОСНОВНИ ПРИНОСИ

Приноси при получаването на ценни продукти от глицерол

1. При микробна ферментация на глицерол за първи път метаболитът 2,3-бутандиол е получен като основен продукт на ферментацията.
2. Въведен е нов метод на рН контрол, т.н. „метод на изкуствените рН флукутации“, чрез който при смесено-киселите ферментации, метаболитния поток се измества от продуциране на киселини, към продуциране на алкохоли.
3. Получените концентрации 2,3-бутандиол след оптимизирането на ферментационните параметри и прилагане на „изкуствени рН флукутации“, са многократно по-високи от постигнатите преди това от глицерол, което принципно отваря възможността за промишлено получаване на 2,3-бутандиол от глицерол.

Приноси при получаването на ценни продукти от нишесте

1. За първи път е извършена хетероложна експресия на ген за амилаза в свръхпродуцент на 2,3-бутандиол. По този начин за първи път е получен 2,3-бутандиол от нишесте в едностъпален SSF процес, под действието на един-единствен генетично модифициран организъм.
2. Получените концентрации 2,3-бутандиол от нишесте са многократно по-високи от постигнатите преди това, което принципно отваря възможността за промишлено получаване на 2,3-бутандиол от нишесте и нишестени материали.
3. За първи път е изолиран амилолитичен щам от род *Lactococcus*, както и амилолитични щамове от видовете *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus pentosus*. Използването на тези щамове осигурява получаването на млечна киселина от нишестени материали в икономически ефективен процес на едновременно озахаряване и ферментация.
4. Създадени са работещи в *Escherichia coli* совалкови вектори pZT₁, pZT₂ и pZT₃, носещи ген за силна екстрацелуларна амилаза (от *Bacillus licheniformis* 44MB82/G), съответно под контрола на промоторите *Plac* (*Escherichia coli*) и *SacC* (*Zymomonas mobilis*). Трансформантите *E. coli*, с въведен който и да е от трите вида конструкт, притежават силни амилолитични способности.

Приноси при получаването на ценни продукти от инулин

1. За първи път, като единствен въглероден източник за получаване на млечна киселина е използвано инулин-съдържащо цикориево брашно.
2. Разработен е нов биотехнологичен процес за директно получаване на млечна киселина от инулин, в едностъпален процес на едновременно озахаряване и ферментация.
3. Получените в този SSF-процес концентрация, добив и продуктивност на млечна киселина са най-високите постигнати до момента от инулин.
4. Разкрито е ключовото влияние на Mn^{2+} върху: (i) активността на ензима инулиназа; (ii) експресията на гена за инулиназа; (iii) транспорта на фруктоза през клетъчната стена; (iv) ключови ензими от гликолитичния път; (v) цялостният процес на метаболизиране на полизахарида инулин (хидролиза и ферментация).
5. Разработен е нов биотехнологичен процес за микробно получаване на фруктоза от инулин. Разработеният метод притежава редица предимства пред ензимните и химични методи за получаване на фруктоза от инулин.

6. ПУБЛИКАЦИИ В ПЪЛЕН ТЕКСТ ПО ПРЕДСТАВЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

1. Petrov K., Urshev Z., Petrova P. (2008) "L (+) - Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84", *Food Microbiology*, vol. 25 (4), 550-557. (IF 2.847)
2. Petrova P, Petrov K., Beschkov V. (2009) „Production of 1,3-propanediol from glycerol by newly isolated strains of *Klebsiella pneumoniae*”, *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, vol. 62 (2), 233-242. (IF 0.204)
3. Petrov K., Petrova P. (2009) "Isolation and molecular identification of *Klebsiella pneumoniae* strains, producing diols from glycerol", *Biotechnology & Biotechnological equipment*, vol. 23 (SE), 814-817. (IF 0.291)
4. Petrov K., Petrova P. (2009) "High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 84 (4), 659-665. (IF 2.896)
5. Petrova P., Gouliamova D., Petrov K., Stoyancheva G., Dimitrov R. (2009) "Starch-degrading activities of Bulgarian yeast isolates", *Biotechnology & Biotechnological equipment*, vol. 23 (SE), 651-654. (IF 0.291)
6. Petrova P., Emanuilova E., Petrov K. (2010) "Amylolytic *Lactobacillus* Strains from Bulgarian Fermented Beverage Boza", *Z. fur Naturforschung C*, vol. 65C (3/4), 218-224. (IF 0.718)
7. Petrov K., Petrova P. (2010) "Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 87 (3), 943-949. (IF 3.280)
8. Petrov K., Vasileva E., Petrova P., Beschkov V. (2010) "Bulk chemicals from glycerol – the Bulgarian contribution to bio-based diols production" *Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods & Technology* vol. 4 (1), 258-266.
9. Petrova P., Petrov K. (2010) "Amylolytic lactic acid bacteria and their industrial application" *Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods & Technology* vol. 4 (1), 349-358.
10. Petrova P., Petrov K. (2012) „Direct starch conversion into L (+) lactic acid by a novel amylolytic strain of *Lactobacillus paracasei* B41" *Starch-Starke* vol. 64 (1), 10-17. (ISSN 0038-9056) (IF 1.220)

-
11. Petrov K., Stoyanov A. (2012) "Accelerated production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using the method of forced pH fluctuations", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 35 (3), 317-321. (ISSN 1615-7591) (IF 1.869)
 12. Petrova P., Tsvetanova F., Petrov K. (2012) "Regulation of amylase genes expression in lactic acid bacteria" *New Trends in Microbiology*, In: 65th Anniversary of the Stephan Angeloff Institute of Microbiology, pp. 193-203. (ISBN 978-954-92882-1-6)
 13. Tsvetanova F.V., Petrov K.K. (2012) "Fermentative biofuels production" *Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods & Technology* vol. 6 (2), 425-439. (ISSN 1313-2563)
 14. Tsvetanova F.V., Petrov K.K. (2012) "Metabolic engineered pathways for branched-chain alcohols as biofuels" *Scientific works of UFT "Food science, engineering and technologies"* vol. LIX, pp.665-668. (ISSN 1314-7102)
 15. Tsvetanova F.V., Petrov K.K., Beschkov V.N. (2013) "Influence of the different media compounds on 2,3-butanediol production in glucose fermentation" *Journal of International Scientific Publications: Ecology and Safety* vol. 7 (1), 257-261. (ISSN 1313-2563)
 16. Popova L., Petrov K. (2013) "Optimized electroporation procedure for *Lactobacillus paracasei* transformation" *Scientific works of University of Food Technologies*, vol. LX, 925-929. (ISSN 1314-7102)
 17. Tsvetanova F., Petrova P., Petrov K. (2014) "2,3-butanediol production from starch by engineered *Klebsiella pneumoniae* G31-A" *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 98 (6), 2441-2451. (IF 3.337)
 18. Tsvetanova F., Petrov K. (2014) "Influence of pH and aeration on 2,3-butanediol production from glucose by *Klebsiella pneumoniae* G31" *Bulgarian Chemical Communication* vol. 46 (4), 784-787. (IF 0.201)
 19. Petrova P., Velikova P., Popova L., Petrov K. (2015) "Direct conversion of chicory flour into L(+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505" *Bioresource Technology* vol. 186, 329-333. (IF 4.917)
 20. Popova L., Petrov K., Petrova P. (2015) "Construction of a new shuttle vector pZT1 applicable to hosts *Escherichia coli* and the ethanol producing *Zymomonas mobilis*" *Ecological Engineering and Environment Protection* vol. 4 (2), 19-23.

-
21. Popova L., Petrova P., Petrov K. (2015) Heterologous expression of amylase in *E. coli* and *Zymomonas mobilis* under *sacC* promoter control for ethanol production from starch. *Scientific works of University of Food Technologies*, vol. LXII, 494-498. (ISSN 1314-7102)
 22. Velikova P., Stoyanov A., Blagoeva G., Popova L., Petrov K., Gotcheva V., Angelov A., Petrova P. (2016) Starch utilization routes in lactic acid bacteria: new insight by gene expression assay. *Starch-Starke* vol. 68 (9/10), 953-960. (IF 1.837)
 23. Popova L., Petrov K. (2016) "Production of platform chemicals from inulin" *Scientific works of University of Food Technologies*, vol. LXIII, (in press). (ISSN 1314-7102)
 24. Velikova P., Petrov K., Petrova P. (2017) The cell wall anchored β -fructosidases of *Lactobacillus paracasei*: overproduction, purification, and gene expression control. *Process Biochemistry*, vol. 52, 53-62. (IF 2.616)
 25. Petrov K., Popova L., Petrova P. (2017) High lactic acid and fructose production via Mn^{2+} mediated conversion of inulin by *Lactobacillus paracasei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 101 (11), 4433-4445. (IF 3.340)
 26. Petrov K., Petrova P. (2017) Sugar transport systems involved in fructooligosaccharides utilization by the probiotic bacterium *Pediococcus acidilactici*. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences* vol. 70 (9), 1263-1270. (IF 0.270)
 27. Калоян Петров, Венко Бешков (2009) "Метод за получаване на млечна киселина", патент №65664, Бюлетин на патентното ведомство, (05.2009)
 28. Петров К., Петрова П. (2010) „Влияние на изкуствената рН флуктуации върху биоразграждането на глицерол" Сборник доклади Лятна школа - Бургас 2010, 134-138.
 29. Цекова К., Денчева В., Петров К. (2010) "Интегриран биотехнологичен процес за получаване на биологично активни вещества от нативно нишесте и очистване на води, замърсени с тежки метали" *Екологично инженерство и опазване на околната среда* №2, с. 50-58.
 30. Калоян Петров, Пенка Петрова, Венко Бешков (2014) "Метод за получаване на 2,3-бутандиол", патент №66411, Бюлетин на патентното ведомство, (01.2014)