

**ИНСТИТУТ ПО ИНЖЕНЕРНА ХИМИЯ БАН**

**ПОЛУЧАВАНЕ НА ЦЕННИ БИОПРОДУКТИ ОТ  
ИНУЛИН СЪДЪРЖАЩИ СУБСТРАТИ**

**ЛУИЗА ГЕОРГИЕВА ПОПОВА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА НАУЧНА И ОБРАЗОВАТЕЛНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ 4.2. “ПРОЦЕСИ И АПАРАТИ В ХИМИЧНАТА  
И БИОХИМИЧНАТА ПРОМИШЛЕНОСТ”

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. КАЛОЯН КИРИЛОВ ПЕТРОВ**

**СОФИЯ**

**2017**

Дисертационният труд съдържа 111 страници, 10 таблици и 29 фигури. В библиографската справка са включени 132 заглавия. Експерименталната работа е извършена в Институт по Инженерна Химия и Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“, БАН.

Официалната защита на дисертацията ще се проведе на ..... от ..... часа в заседателната зала на Институт по инженерна химия БАН– София, ул. „Акад. Георги Бончев“, блок 103. на открито заседание на научното жури в състав:

1. Проф. дбн Яна Топалова
2. Проф д-р Драгомир Янков
3. Проф. д-р Калоян Петров
4. Доц. д-р Златка Алексиева
5. Доц. д-р Людмила Кабаиванова

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

**ИНСТИТУТ ПО ИНЖЕНЕРНА ХИМИЯ БАН**

**ПОЛУЧАВАНЕ НА ЦЕННИ БИОПРОДУКТИ ОТ  
ИНУЛИН СЪДЪРЖАЩИ СУБСТРАТИ**

**ЛУИЗА ГЕОРГИЕВА ПОПОВА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА НАУЧНА И ОБРАЗОВАТЕЛНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ 4.2. “ПРОЦЕСИ И АПАРАТИ В ХИМИЧНАТА  
И БИОХИМИЧНАТА ПРОМИШЛЕНОСТ”

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. КАЛОЯН КИРИЛОВ ПЕТРОВ**

**СОФИЯ**

**2017**

## СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

ГОЗ - галактоолигозахариди

ЕМП – Ембден – Майерхоф - Парнас

ИОЗ – инулоолигозахариди

МК – млечна киселина

МКБ – млечнокисели бактерии

ОА – относителна активност

рРНК – рибозомна рибонуклеинова киселина (Ribosomal ribonucleic acid)

РНК – рибонуклеинова киселина (Ribonucleic acid)

ФОЗ – фруктоолигозахариди

bp – нуклеотидни двойки (base pairs)

CFU – колония образуваща единица (colony forming units)

DP – степен на полимеризация (degree of polymerization)

*fosE* ген- ген кодиращ инулиназа

GRAS – общоприет за безопасен (Generally Recognized as Safe)

HPLC – високо ефективна течна хроматография (High Performance Liquid Chromatography)

InuB41 – инулиназа ( $\beta$ -фруктозидаза), продуцирана от щам *Lactobacillus paracasei* B41

MRS – хранителна среда – de Man, Rogosa, Sharpe

PAGE – Полиакриламид гел електрофореза (Polyacrylamide gel electrophoresis)

PCR – полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction)

ПҮК - пируват киназа (pyruvate kinase)

rpm – обороти за минута (revolutions per minute)

SDS – натриев додецил сулфат (Sodium dodecyl sulfate)

SSF – едновременно озахаряване и ферментация (simultaneous saccharification and fermentation)

## ВЪВЕДЕНИЕ

С навлизането си в XXI век, днешната цивилизация се изправя пред назряващи екологични и енергийни проблеми без аналог в описаната ни история. Изчерпването на изкопаемите енергийни източници, както и непрекъснато нарастващите енергийни нужди, съпътстващи глобалният икономически растеж изискват нови, нестандартни решения за запазване на екологичната, социална и икономическа стабилност на планетата. Едно от тези решения е използването на биомаса за производство на суровини, горива и химикали, получавани досега от изкопаеми въглеводороди и/или по начини, неприемливи за екологичното равновесие в природата. Поради нейната широка достъпност и възобновяем характер, биомасата се разглежда като един от най-обещаващите източници за получаване на енергия или синтез на различни биопродукти.

В настоящият труд предлагаме използването на един нов възобновяем източник на енергия - инулин съдържащо цикориево брашно, като субстрат за получаване на два ценни биопrodukта – млечна киселина и фруктоза. И в двата случая продуктите се получават чрез ефективен, едностъпален процес на едновременно озахаряване и ферментация под действието на щам *Lactobacillus paracasei* B41, притежаващ силна инулиназна активност. Разработените две биотехнологии са оптимизирани така, че в първият случай максимално да бъдат засилени и двата процеса – на хидролиза и ферментация, така че да се получи максимално количество млечна киселина, а във втория – да бъде активиран единствено процеса на хидролиза, водещ до освобождаване на огромни количества фруктоза.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### ЦЕЛ:

Разработване на интегриран биотехнологичен процес за получаване на максимални добиви на фруктоза и млечна киселина от инулин съдържащи субстрати.

### ЗАДАЧИ:

1. Оптимизиране на условията за максимален добив на МК от инулин съдържащо цикориево брашно чрез щам *L. paracasei* B41:

- Изследване и установяване на оптималните параметри за максимално ускоряване на процесите на хидролиза и ферментация: (i) Избор на тип ферментация; (ii) Избор на азотен източник – вид и концентрация; (iii) Намиране на рН оптимум; (iv) Оптимизиране на разбъркването; (v) Установяване на влиянието на метални йони.

2. Оптимизиране на условията за максимален добив на фруктоза от инулин съдържащо цикориево брашно чрез щам *L. paracasei* B41:

- Изследване и установяване на оптималните параметри за ускоряване на процеса на хидролиза и затрудняване на процеса на ферментация: (i) Избор на тип ферментация; (ii) Установяване на оптимална температура; (iii) Намиране на рН оптимум; (iv) Оптимизиране на разбъркването; (v) Избор на азотен източник – вид и концентрация; (vi) Установяване на влиянието на метални йони.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## **1. Бактериален щам**

Използваният в дисертацията щам *Lactobacillus paracasei* B41 е изолиран от българска боза Бомакс, приготвена от пшеница (Хасково, България) (Petrova and Petrov, 2012). Депозиран е в немската колекция за микроорганизми и клетъчни култури (DSMZ) под регистрационен номер DSM 23505.

## **2. Хранителни среди и условия на култивиране**

### 2.1 Инокулационна MRS базирана среда

Вместо глюкоза като основен източник на въглерод се използва 20 g/L цикориево брашно Frutafit®CLR, предоставено от Sensus (Norben Company Inc., Холандия) със съдържание на инулин 89.3% (DP7 до DP9) и 10.7% смес от фруктоза, глюкоза и захароза).

2.2. Работни среди и условия на култивиране, оптимизирани за получаване на млечна киселина

2.2.1. Работни среди и условия на култивиране, използвани за оптимизиране на азотен източник и рН на средата

2.2.2. Работни среди и условия на култивиране, използвани при изследване на влиянието на метални йони

2.2.3. Работни среди и условия на култивиране, използвани при изследване на влиянието на нарастващи концентрации на  $Mn^{2+}$

2.3. Работни среди и условия на култивиране, оптимизирани за получаване на фруктоза

## **3. Аналитични методи**

3.1 Определяне на биомаса (брой живи клетки)

3.2. Определяне на концентрацията на разтворими метаболити

3.3. Определяне на инулиназна и инвертазна ензимна активност

3.4. Определяне на влиянието на метални йони върху ензимната активност

#### **4. Молекулярно-биологични методи**

4.1. Секвенции на гени и дизайн на праймерни двойки

4.2. Изолиране на тотална РНК от *L. paracasei* B41

4.3. Определяне на концентрацията на РНК

4.4. Третиране на РНК пробите с ензим ДНК-аза I

4.5. RT - PCR (синтез на копи-ДНК чрез обратна транскрипция)

4.6. Real Time PCR

4.7. Екстрахиране на стенна протеинова фракция на Грам (+) бактерии

4.8. Електрофоретични методи за разделяне на РНК, ДНК и протени

4.8.1. Хоризонтална агарозна гел електрофореза за разделяне на РНК и ДНК

4.8.2. SDS – PAGE (денатурираща полиакриламидна гел електрофореза)



## РЕЗУЛТАТИ

### **1. Получаване на млечна киселина чрез процес на едновременно озахаряване и ферментация на цикориево брашно от щам *L. paracasei* B41**

До момента са публикувани едва няколко съобщения за щамове *Lactobacillus*, притежаващи инулиназна активност. Всички те принадлежат към видовете *L. casei* или *L. paracasei* (Goh et al., 2006;. Choi et al., 2012), но никой от тях не е добър продуцент на млечна киселина.

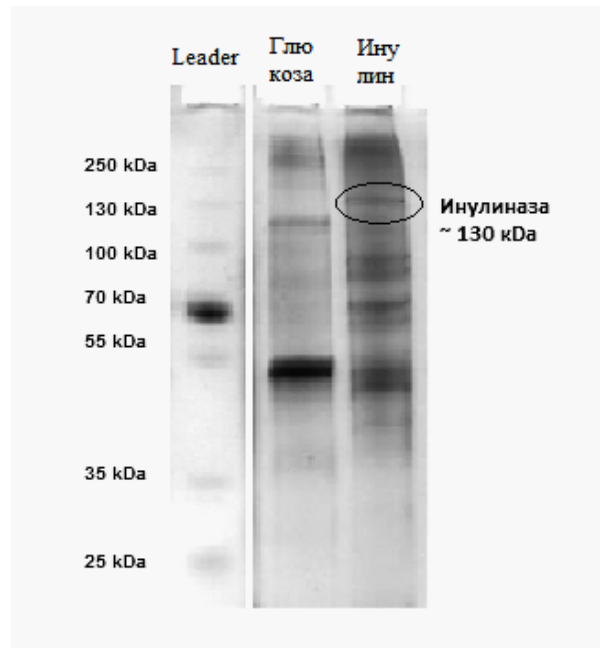
Изолираният от боза щам *L. paracasei* B41 (DSM 23505) е хомоферментативен независимо от субстрата – глюкоза, нишесте или инулин. Имайки предвид, че щамът е свръхпродуцент на млечна киселина от нишесте (Petrova and Petrov, 2012), той беше избран за изследване за инулиназна активност.

#### **1.1. Изолиране и характеризиране на инулиназа на щам *L. paracasei* B41**

За инулиназна активност бяха проверени супернатанти от развитата култура, центрофугирани клетки и фракция от клетъчни стени. Беше установено, че клетките и фракцията от клетъчните стени притежават силна инулиназна активност, което доказва, че *L. paracasei* B41 притежава клетъчно свързана инулиназа, подобно на вече изследвани инулиназни щамове от вида, като *L. paracasei* 1195 (Goh et al., 2006).

Пълната нуклеотидна секвенция на гена, кодиращ  $\beta$ -фруктозидаза в *L. paracasei* B41 е депозирана в ген-банката на NCBI под номер KP663715. Той се състои от 3645 нуклеотидни двойки и кодира полипептид от 1214 аминокиселини, принадлежащ към гликозид-хидролазната фамилия GH32 и е с молекулно тегло 130.3 kDa. Белтъчният профил на фракция от клетъчни стени на *L. paracasei* DSM 23505 (Фиг. 1) илюстрира присъствието на ензима при клетки, култивирани на среда с

инулин и липсата му в случай, че щамът е отглеждан на среда само с глюкоза като въглероден източник.



**Фиг. 1.** SDS-PAGE анализ на ензимна фракция от клетъчните стени на *L. paracasei* DSM 23505, отглеждани в MRS среда, съдържаща 20 g/L глюкоза (2), или в среда, съдържаща 20 g/L инулин като единствен въглероден източник (3). За стандарт е използван предварително оцветен Protein Ladder (Thermo Scientific). Наблюдава се ясно отсъствие на ивица за инулиназа на проба 2, съдържаща 20 g/L глюкоза.

Нуклеотидната секвенция на *inuB41* предполага, че става въпрос за екзоинулиназен ензим (ЕС 3.2.1.80), способен да откъсва крайната молекула фруктоза от инулиновия полимер.

Изследванията върху инулиназата на щам показват *L. paracasei* B41 предполагат неговата способност да конвертира инулинови субстрати и директно да ги разгражда до крайни метаболити (млечна киселина) чрез екзоинулиназната си активност.

## **1.2. Периодични процеси на едновременно озахаряване и ферментация**

### **1.2.1. Влияние на различните азотни източници**

Освен подходящ за метаболизиране въглероден източник, за ефективното получаване на целевия продукт е необходимо хранителната среда да съдържа подходящи растежни фактори (източници на азот), нужни за осъществяване на анаболитните процеси, както и елементи служещи като кофактори на ензимните реакции.

С цел да се получи максимален добив на млечна киселина, бяха съставени 10 различни хранителни среди, като бяха комбинирани различни органични и неорганични азотни източници, както и вариращи по вид и концентрация соли. С тези среди, при еднакви условия бяха проведени периодични култивирания на щам *L. paracasei* B41. Те бяха осъществени на ротационна клатачка при температура 37 °C , разбъркване 90 rpm, без рН контрол, в работни шишета с винтова капачка от по 250 mL. Всички среди съдържаха 20 g/L цикориево брашно (Frutafit®CLR, предоставено от Sensus (Norben Company Inc., Холандия), бяха инокулирани в съотношение 1/100 и с краен обем 200 mL.

След култивиране в продължение на 68 часа бяха взети проби, чиито супернатанти бяха изследвани на течен хроматограф за количествено определяне на млечна киселина. Резултатите са показани на Табл. 1. Прави впечатление, че при средите с неорганичен азотен източник ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), добивът е значително по-нисък. Соли като  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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 - 18.81 g/L, като веднага след него е добивът, получен в среда MRS-in (MRS с цикориево брашно вместо глюкоза) - 17.29 g/L. Този резултат е в съгласие с извода на Wang et al. (2013), че царевичните екстракти подпомагат метаболизирането на захари в процеса на млечно-кисела ферментация.

Поради това, че сравнително евтиният царевичен хидролизат се оказва най-подходящия азотен източник за получаване на млечна киселина от инулин, всички по-нататъшни оптимизации за получаване на млечна киселина бяха базирани на среда №7.

*Таблица 1. Оптимизиране на състава на хранителната среда при периодични процеси на едновременно озахаряване и ферментация на 20 g/L цикориево брашно от щам *L. paracasei* B41. Показан е състава на средите, както и получените количества млечна киселина след 68 часа.*

Състав (g/L)	Хранителна среда №									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	MRS-in*
Бактопептон	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 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	5	5	5	-	-	-	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-
NH <sub>4</sub> Cl	-	-	-	11	11	11	-	22	11	-
Амониев цитрат	-	-	-	-	2	2	2	2	2	2
Натриев ацетат	-	-	-	-	5	5	5	5	5	5
MgSO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
MnSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	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	13.00	14.96	14.04	18.81	12.58	16.79	17.29

\* MRS-in - MRS среда съдържаща цикориево брашно вместо глюкоза.

### 1.2.2. Влияние на киселинността на хранителната среда

Доколкото за получаване на млечна киселина от щам *L. paracasei* B41, процесни параметри като температура и разбъркване са вече установени (37 °C и 200 rpm без допълнително аериране) за ферментатор Biostat®A Plus, намирането на рН оптимума на цялостният процес, включващ хидролиза на цикориевото брашно до монозахари, както и последващото им ферментиране до млечна киселина, е от ключово значение.

Поради това, че рН оптимума на пречистената инулиназа (InuB41) 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. Процесите бяха проведени във ферментатор Biostat®A Plus, Sartorius с механично разбъркване и работен обем 1 L. Всички процеси бяха проведени при стандартни, микроаерофилни условия – разбъркване 200 rpm, без допълнително добавяне на кислород, при температура 37°C.

При начални концентрации на субстрата (цикориево брашно) от 90 g/L, след 114 часа 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. 2). 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 стойност на рН далеч от оптимума на активност на инулиназата. 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 увеличава и биомасата.

*Таблица 2. Влияние на рН върху образуването на млечна киселина при различни начални концентрации на цикориево брашно.*

рН	Начална концентрация на субстрат (g/L)	Биомаса (CFU/mL)	Инулиназна активност* (U/mL)	Инвертазна активност* (U/mL)	МК* (g/L)	Продуктивност (g/L/h)	Остатъчни захари**		
							Захароза (g/L)	Фруктоза (g/L)	Глюкоза (g/L)
4.8	90	2.6x10 <sup>11</sup> ±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 <sup>12</sup> ±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 <sup>12</sup> ±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 <sup>12</sup> ±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 <sup>12</sup> ±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 <sup>12</sup> ±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

За да се установи по-точно оптималното рН, бяха проведени процеси с по-висока концентрация на субстрат – 136 g/L. От показаните в Табл. 2 резултати се вижда, че в този случай, при рН 5.5 максималната достигната концентрация на млечна киселина е 123.7 g/L, което представляше и най-високата стойност, постигната до момента чрез SSF процес от инулин. В този процес, максималната измерена инулиназна активност достига 267 U/mL, а виталната биомаса -  $8.3 \times 10^{12} \pm 0.3$  CFU/mL.

При процеса, осъществен при рН 5.0 (Табл. 2), полученото количество млечна киселина е значително по-ниско – едва 97.2 g/L. Това се дължи на натрупване на неметаболизирана фруктоза в културалната течност. Всички следващи оптимизации бяха проведени при оптималното за добив на млечна киселина контролирано рН на средата 5.5.

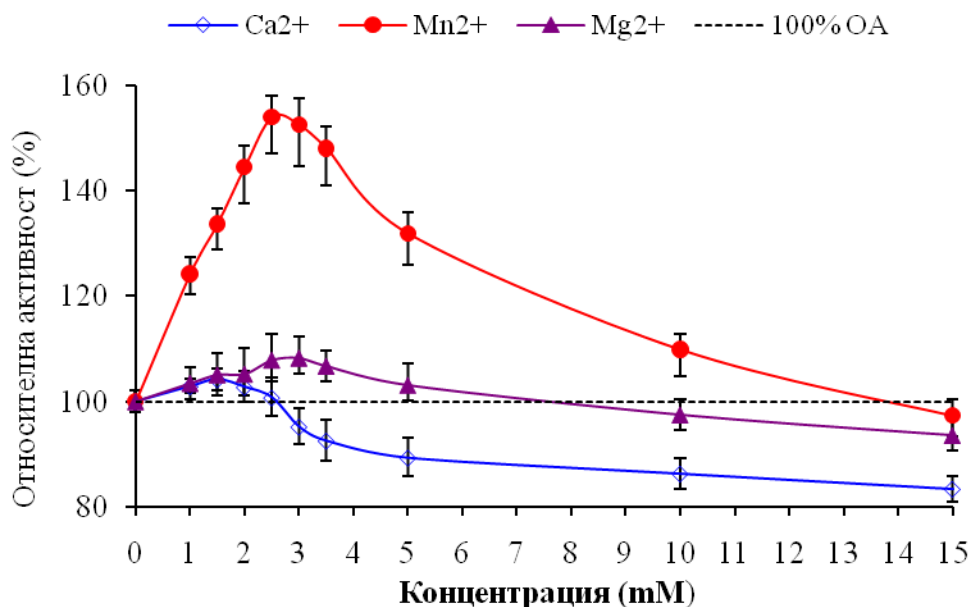
### **1.2.3. Влияние на метални йони върху инулиназната активност на чист ензим**

Известно е, че някои от металните йони в определени концентрации имат силно положително влияние върху каталитична функция на инулиназите от различни видове дрожди, гъби и бактерии. Поради това, с цел допълнително увеличаване на инулиназната активност и съответно, добива на млечната киселина, бяха проведени опити за установяване влиянието на 12 различни метални йона. За целта, след изолиране от клетъчно-стенна фракция и пречистване, бе анализирана активността на ензима инулиназа ( $\beta$ - фруктозидаза) на *L. paracasei* DSM 23505 (InuB41) след инкубиране в присъствието на вариращи концентрации от 1 до 15 mM на тези йони. Йони бяха добавяни под формата на соли, съответно  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $KCl$ ,  $CaCl_2$ ,  $ZnSO_4$ ,  $NaCl$ ,  $CuSO_4$ ,  $LiCl$ ,  $FeSO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $CdSO_4$ , и  $AgNO_3$ . За 100 % относителна активност бе приета активността на ензима в отсъствие на соли.

Увеличение на активността на чистия ензим беше наблюдавано при три двувалентни йона -  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  (Фиг. 2). Този ефект е най-силен



при добавянето на  $Mn^{2+}$ , като повишаване на активността се наблюдава в диапазона от 0 до 10 mM, с максимум при добавяне на 2.5 mM  $Mn^{2+}$  (54% увеличение на инулиназната активност) (Фиг. 2).



**Фиг. 2.** Влияние на различни концентрации на йоните на  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  върху инулиназната активност на пречистен ензим  $\beta$ -фруктозидаза от щам. *L. paracasei* DSM 23505. OA – относителна активност.

Добавянето на кобалт, литий, желязо и кадмий към ензимната фракция дори в ниски концентрации, оказва потискащо действие и намаляване на ензимната активност с до 40%. Пълна загуба на ензимната активност на инулиназата се наблюдава при добавяне дори на 1 mM  $Ag^+$ . Моновалентните метали натрий и калий, както и солите на двувалентните метали цинк и мед не оказват съществено влияние.

#### **1.2.4. Влияние на метални йони in vivo за получаване на млечна киселина**

След като беше доказано позитивното влияние на  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  върху инулиназната активност на чистия ензим, беше изследвано и тяхното влияние върху процеса на разграждане на инулин до 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 е или в стойността им, осигуряваща максимален позитивен ефект върху инулиназната активност (2.5 mM Mn<sup>2+</sup>, 3 mM Mg<sup>2+</sup>, 1.5 mM Ca<sup>2+</sup>) или тази, осигуряваща действието им като кофактори, отговаряща на наличието им в MRS средата (0.3 mM Mn<sup>2+</sup>, 0.83 mM Mg<sup>2+</sup>). За контролна среда беше използвана оптимизираната вече среда №7. Резултатите са показани на Табл. 3.

**Таблица 3.** Влияние на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  върху инулиназната активност и продуцирането на млечна киселина при процеси на едновременно озахаряване и ферментация на 40 g/L цикориево брашно от щам *L. paracasei* B41. Периодични процеси в среди с различни комбинации от три йона, бяха проведени без рН контрол, при 37 °C и разбъркване 100 грт в колби на ротационна клатачка. Представените стойности за инулиназната активност и генна експресия на *fosE* са измерени след 24 часа култивиране, тези за биомаса и млечна киселина – след 48 часа култивиране. биомаса върху образуването на млечна киселина при различни начални концентрации на цикориево брашно.  $\text{Mn}^{2+}$  беше добавен под формата на  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Mg}^{2+}$  като  $\text{MgSO}_4$ , и  $\text{Ca}^{2+}$  като  $\text{CaCl}_2$ .

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

<sup>a</sup> – За основна среда е взета среда № 7 .

<sup>b</sup> – Концентрации на  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  осигуряващите тяхното действие като кофактори.

<sup>c</sup> – Концентрации с максимален позитивен ефект върху пречистената инулиназа на *L. paracasei* DSM 23505.

След 48 часово култивиране са измерени концентрациите на млечна киселина и броя живи клетки във всички девет среди. Веднага се забелязва, че продуцирането на млечна киселина е много по-слабо, ако в средата не присъстват нито един от трите йона. Този резултат не е неочакван, поради вече известното влияние на катионите като кофактори в гликолитичния път на *L. paracasei*. При средите с максимална концентрация  $Mn^{2+}$  (2.5 mM) – среди 1, 2, 3 и 4 – концентрацията на 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 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 24ия час бяха взети проби за определяне на инулиназна активност и експресия на *fosE* гена. 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 3 тази стойност, като най-висока, е взета за 100% в изследването).

Резултатите показват, че  $Mn^{2+}$  е най-важния елемент за цялостния процес на разграждане на инулина до млечна киселина (хидролиза + ферментация), действайки вероятно не само като кофактор, но и като алостеричен активатор върху молекулите на ензима. 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.

### **1.2.5. Получаване на млечна киселина при нарастващи концентрации на $Mn^{2+}$**

За установяване на оптималната концентрация на  $Mn^{2+}$ , нужна за получаване на максимален добив млечна киселина, бяха проведени серия периодични процеси при вече оптимизираните състав (среда №7) 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.

Процесите бяха проведени във ферментатор Biostat®A Plus, Sartorius, с механично разбъркване и работен обем 1 L. Началната концентрация на цикориево брашно беше 182 g/L, а продължителността на процесите – 138 часа.

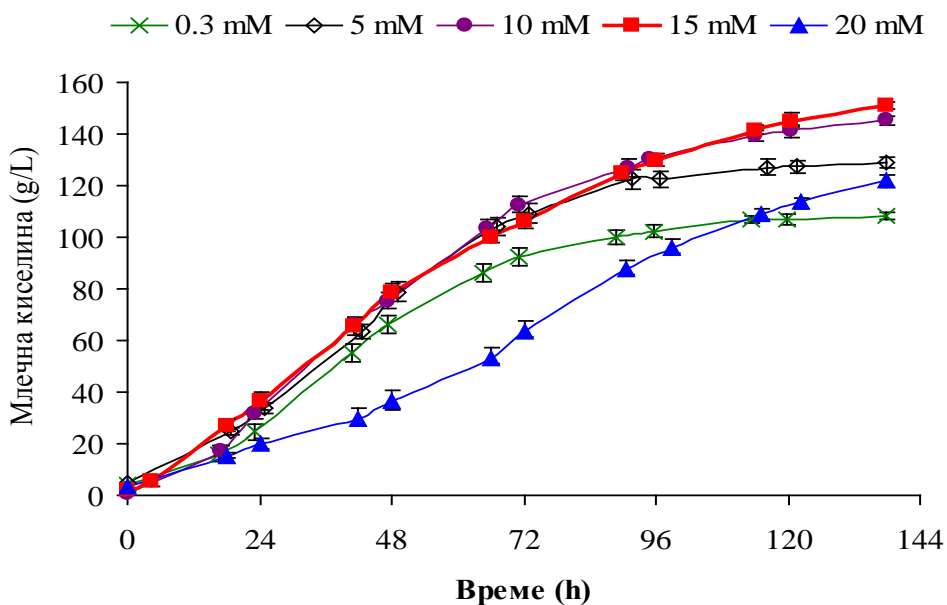
Резултатите са представени в Табл. 4. Средата с 0.3 mM  $Mn^{2+}$  (първи ред) представлява среда №7 от предишните изследвания. Вижда се, че при тази среда от 182 g/L субстрат се получават 107.9 g/L млечна к-на, докато от 136 g/L бяха получени 123.7 g/L само за 114 часа ферментация (виж Табл. 2 и Фиг. 2), което показва силно субстратно инхибиране.

Анализът на получените резултати показва (Табл. 4), че с увеличаване на концентрацията на  $Mn^{2+}$  в средата от 0.3 до 15 mM, позитивният ефект върху продуцирането на млечна киселина е все по-силен. Така, при среда съдържаща 15 mM  $Mn^{2+}$  е достигната максимална концентрация на продукта от 151 g/L, което е и най-високият резултат, получен в света до момента (предишният е 141.5 g/L (Ge et al., 2010)). При добавяне на 20 mM  $Mn^{2+}$  полученото количество МК е значително по-ниско (121.9 g/L) (Табл. 4, Фиг. 3).

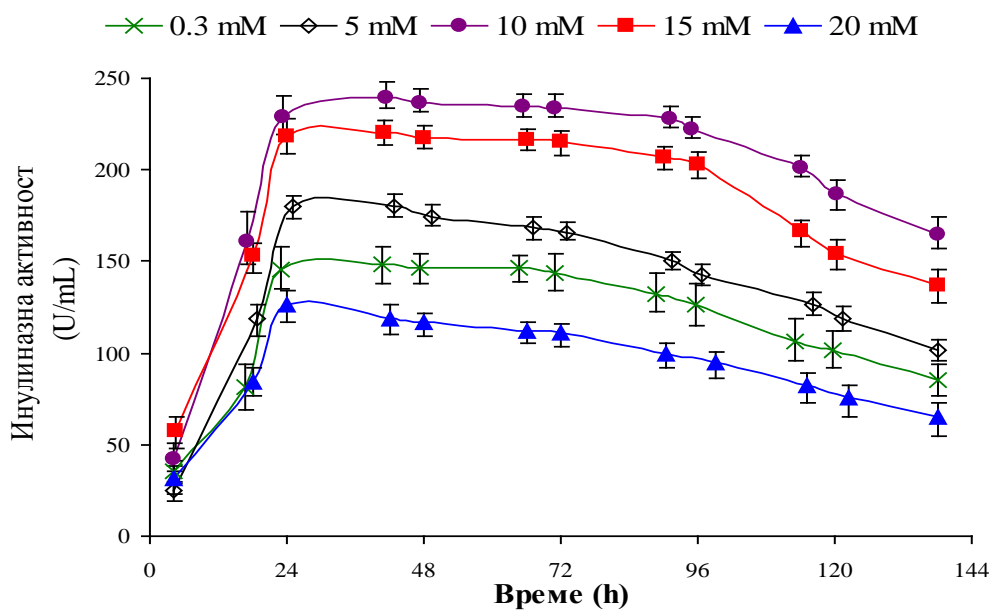
**Таблица 4.** Влияние на различните концентрации на  $Mn^{2+}$  върху продукцията на млечна киселина, растежа на биомаса, инулиназната активност и натрупване на нематаболизирани захари по време на едновременна хидролиза и ферментация на 182 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* B41 (DSM 23505).  $Mn^{2+}$  се добавя в средата под формата на  $MnSO_4$ .

$Mn^{2+}$ (mM)	Биомаса (CFU/mL)	Инулиназна активност (U/mL)	Млечна к-на (g/L)	Продуктивност (g/L/h)	Добив ( $Y_{LA}^*$ ) (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 получена млечна кна на грам разградено цикориево брашно.



**Фиг. 3.** Кинетика на получаване на млечна киселина при различни концентрации на  $Mn^{2+}$  в процес на едновременно озахаряване и ферментация (SSF) на 182 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* DSM 23505. Условия 37 °C, pH 5.5 и разбъркване при скорост 200 оборота в минута.



**Фиг.4.** Профил на изменението на инулиназната активност при различни концентрации на  $Mn^{2+}$  в процеси на едновременно озахаряване и ферментация (SSF)

на 182 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* DSM 23505. Условия 37 °C, pH 5.5 и разбъркване при скорост 200 оборота в минута.

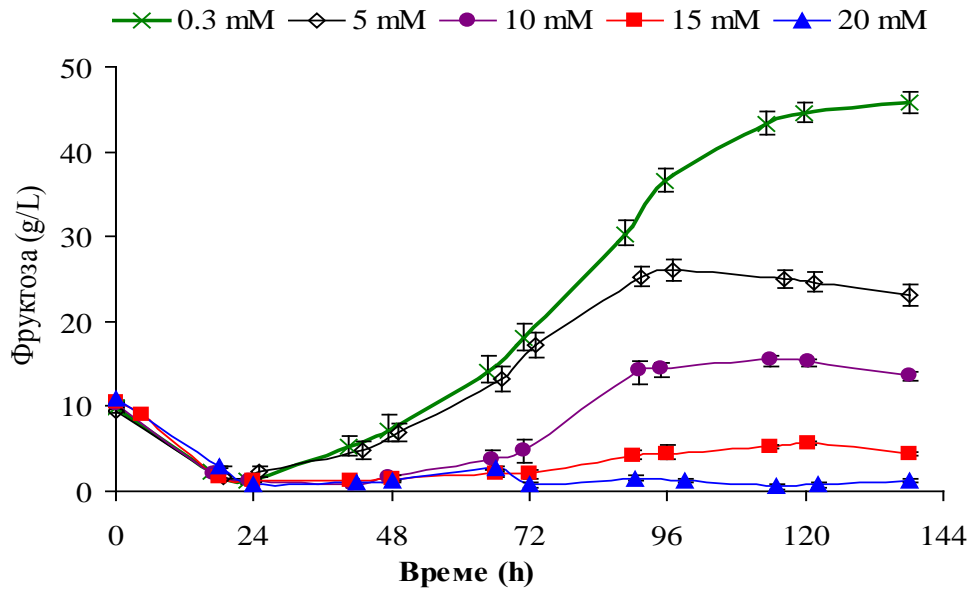
Прави впечатление, че за получаване на МК, оптималното съдържание на  $Mn^{2+}$  в средата (15 mM) е далеч по-високо от нужното за максимална активност на пречистената инулиназа (2.5 mM  $Mn^{2+}$ ). Това показва, че в цялостния процес на озахаряване и ферментация, влиянието на мангана не се ограничава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

На Фиг. 4 е показано изменението на инулиназната активност в съответните процеси. Инулиназната активност е най-висока по време на процеса с 10 mM  $Mn^{2+}$  в средата, а добавянето на 20 mM  $Mn^{2+}$  води както до понижаването на инулиназната активност, така и до по-нисък синтез на млечна киселина.

От Фиг. 5 се вижда, че  $Mn^{2+}$  влияе не само на процеса на хидролиза, но и на процеса на ферментиране на монозахарите до МК. Липсата му води до натрупване на фруктоза в културалната течност (Фиг. 5), която се метаболизира трудно (процеси при 5 и 10 mM  $Mn^{2+}$ ) или не се метаболизира (при 0.3 mM  $Mn^{2+}$ ). Причината е в комплексното влияние на  $Mn^{2+}$  както върху процеса на хидролиза (засилвайки инулиназната активност), така и върху процеса на ферментация (действайки на ензимите от гликолитичната верига и транспорта на фруктоза в клетката).

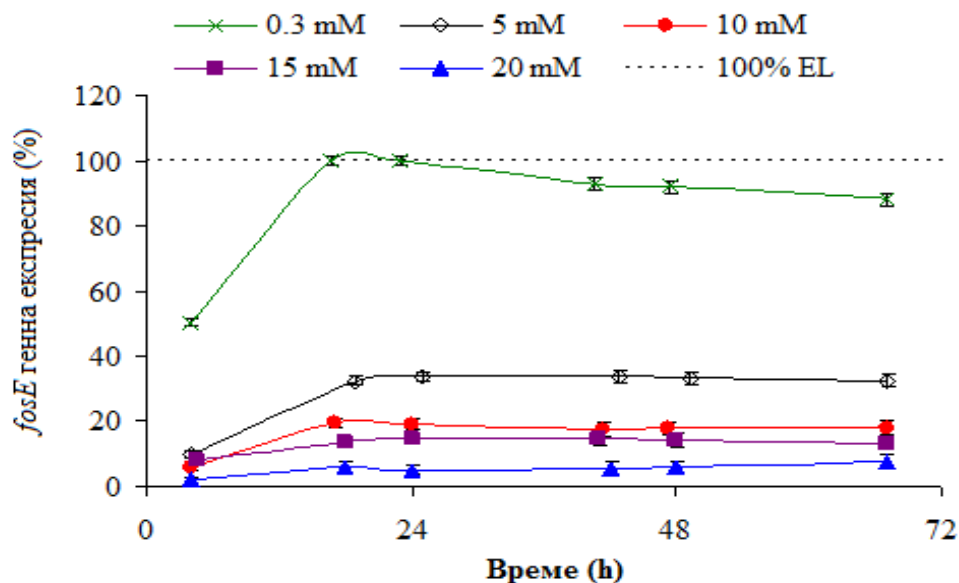
Изследвайки влиянието на различните концентрации на манган върху клетъчния растеж ясно се установява инхибиращият му ефект. В процеса с 0.3 mM  $Mn^{2+}$ , живата биомаса достига своя максимум около 90ия час ( $8.3 \times 10^{12} \pm 0.2$ ), след което бавно спада до  $7.3 \times 10^{12}$  в края на процеса (138и час). В края на процеса с 20 mM  $Mn^{2+}$  биомасата достига  $2.0 \times 10^{12}$  (CFU/mL).





**Фиг. 5.** Ефект от въздействието на различни концентрации на манган върху натрупването на фруктоза при периодичен ферментационен процес.

В унисон с предишните експерименти, с увеличаване концентрацията на манган в средата, нивата на генната експресия на инулиназата се понижават чувствително (Табл. 3, Фиг. 6). Това показва, че манганът във всякакви концентрации потиска експресията на гена, от което следва, че високата инулиназна активност не се дължи на количеството експресиран белтък. Като сравним процесите проведени в присъствието на 0.3 mM  $Mn^{2+}$  с тези, в които са добавени от 5 до 15 mM  $Mn^{2+}$ , се наблюдава 3 до 5-кратно понижаване на експресията на белтъка. Въпреки това, активността на инулиназата увеличава в границите между 0.3 и 10 mM  $Mn^{2+}$ , вероятно поради силен положителния алостеричен ефект на  $Mn^{2+}$  върху ензима.



**Фиг. 6.** Изменение генната експресията на *fosE* при различни концентрации на  $Mn^{2+}$  в процеси на едновременно озахаряване и ферментация (SSF) на 182 g/L цикориево брашно от *L. paracasei* DSM 23505. Условия 37 °C, pH 5.5 и разбъркване при скорост 200 оборота в минута.

## 2. Получаване на фруктоза чрез микробна хидролиза на цикориево брашно от щам *L. paracasei*

До момента получаването на фруктоза в промишлени количества, 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, се базират на методите на киселинна хидролиза на захароза или мултиензимна хидролиза на нишесте.

Днес се обръща все по-голямо внимание на получаването на фруктоза от инулин, тъй като той е евтин субстрат и има ниска хранителна стойност за човека и животните. Производството на фруктоза от инулин се осъществява по два метода - химичната или ензимната хидролиза. Базирайки се на досега използваните методи и описаните резултати за получаване на млечна киселина, в настоящата дисертация предлагаме лесен

и икономически изгоден метод за микробно получаване на фруктоза от цикориево брашно.

За да се осъществи този метод, е необходимо в цялостния процес на едновременно озахаряване и ферментация да бъде засилен процеса на хидролиза и да се затрудни максимално процеса на ферментация.

### **2.1. Избор на тип ферментация**

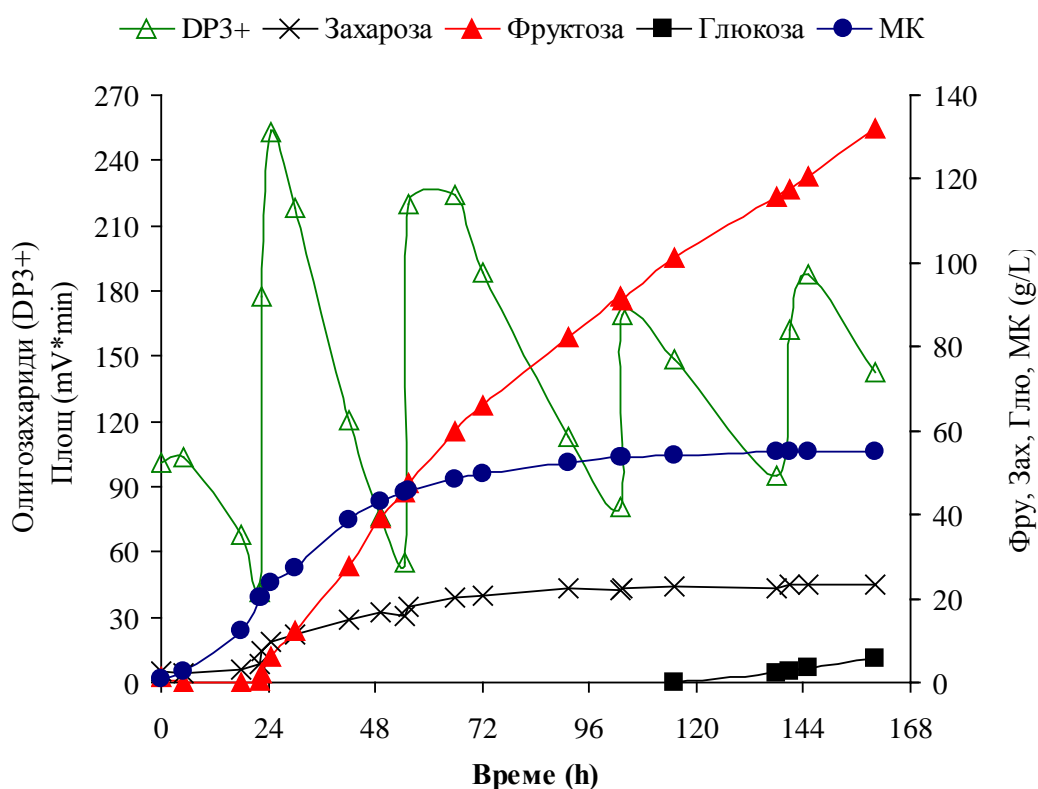
Получените досега резултати ясно показват, че намаляването на концентрацията на  $Mn^{2+}$  в хранителната среда води до акумулиране на фруктоза, трудна за метаболизиране (Табл. 4, Фиг. 5). От друга страна, ясно се забелязва, че ефектът на натрупване силно се увеличава при процесите с излишък на субстрат (цикориево брашно). Ако сравним двата процеса със среда №7, проведени при идентични условия, но с различни начални концентрации на субстрат - 136 g/L и 182 g/L, се вижда, че количеството акумулирана фруктоза е съответно 1.35 g/L (Табл. 2, последен ред) и цели 45.8 g/L (Табл. 4, първи ред). От друга страна, от Таблица 3 се вижда, че експресията на гена за инулиназа е най-висока в средата с липса и на трите метални йона, имащи иначе позитивно въздействие върху активността ѝ (Табл. 3, последен ред).

По тези причини, за максимален добив на фруктоза беше избран периодичен процес с подхранване на субстрат (цикориево брашно) в среда, лимитирана единствено до въглероден и азотен източник, с пълно изключване на всякакъв вид соли.

Проведеният процес беше осъществен във ферментатор при 37 °C, рН 4.9, и обороти на разбъркване 200 rpm, в среда, съдържаща единствено 10 g/L дрождев екстракт, 10 g/L бактопептон и първоначална концентрация на субстрат 25 g/L цикориево брашно. В хода на процеса, на порции от по 100 или по 50 грама, нестерилно, на прах, беше добавян субстратът цикориево брашно. На Фиг. 7 е представена кинетиката на хидролизиране на инулина и образуване на междинни и крайни метаболити. Вижда се, че цялото

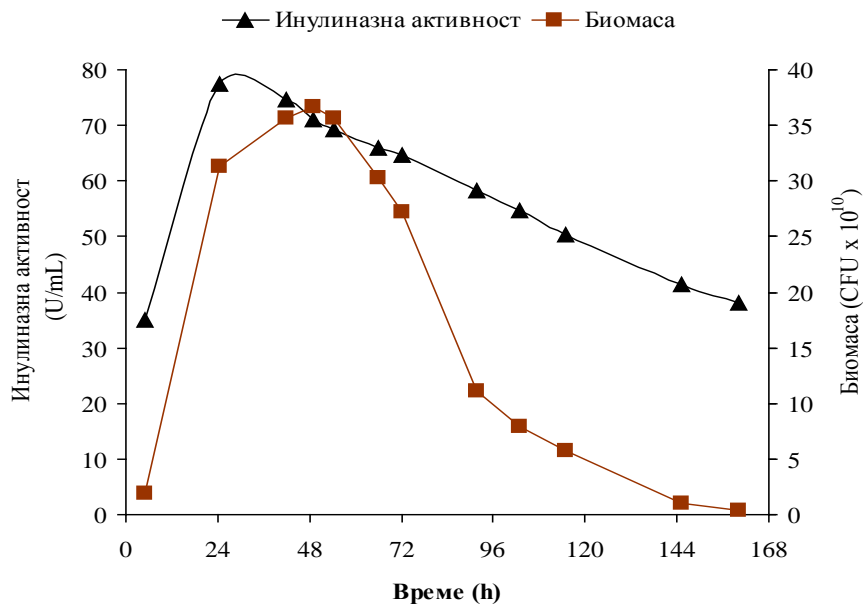
първоначално количество субстрат (25 g/L) се превръща в млечна киселина (20.2 g/L). От момента на първото добавяне на субстрат (100 g) на 22-рия час от ферментационния процес, започва акумулиране на фруктоза в културалната течност, докато продукцията на млечна киселина рязко намалява и почти напълно спира след 48-ия час.

Забелязва се също, че в културалната течност започва да се задържа глюкоза, едва когато концентрацията на фруктоза достигна 101.17 g/L (след повече от 100 часа хидролиза). Наличието на неметаболизирана глюкоза предполага пълното възпрепятстване на гликолизата в клетките.



**Фиг. 7.** Периодичен процес с подхранване за получаване на фруктоза чрез едновременна хидролиза и ферментация на инулин от *L. paracasei* DSM 23505 при 37 °C, рН 4.9 и разбъркване със скорост 200 оборота в минута. Изменението на количествата олигозахариди, състоящи се от 3 или повече монозахарида е показано като площ на общ хроматографският пик.

Представеният на Фиг. 8, профил на инулиназната активност показва, че тя достига своя пик (77.3 U/mL) малко преди първото подхранване със 100 g цикориево брашно и намалява плавно до края на процеса.



**Фиг. 8** Профил на инулиназната активност и растеж на биомаса по време на ферментационен процес подхранване за получаване на фруктоза от *L. paracasei* DSM 23505.

Получените над 130 g/L фруктоза показват, че избора на тип ферментация (периодичен процес с подхранване) е правилен.

## 2.2. Влияние на температурата

За установяване на оптималната за получаване на фруктоза, температура, 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. Резултатите са представени на Табл. 5.

**Таблица 5.** Влияние на температурата върху образуването на биомаса, инулиназната активност и продуцирането на метаболити при периодични процеси с подхранване. Всички процеси са проведени в среди с начален състав 25 g/L цикориево брашно, 10 g/L дрождев екстракт и 10 g/L бактопептон, осъществени при рН 4.9, разбъркване 200 rpm и инокуирани в съотношение 1/10.

Температура (°C)	ОС (g)	Биомаса <sup>a</sup> (CFU/mL)	Инул. активност <sup>b</sup> (U/mL)	Инул. активност <sup>c</sup> (U/mL)	Фруктоза (g/L)	Фруктоза <sup>d</sup> (g)	Y <sub>Fr</sub> <sup>e</sup> (g/g)	Захароза (g/L)	Глюкоза (g/L)	МК (g/L)
28	325	3.1 x 10 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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: ОС – общо количество използван субстрат; МК – млечна киселина; <sup>a</sup> Максимална стойност, получена на 48и час; <sup>b</sup> Максимална стойност получена между 17и и 24и час; <sup>c</sup> Крайна стойност (160и час); <sup>d</sup> Стойности , изчислени по краен обем; <sup>e</sup> Добивен коефициент – грам получена фруктоза на грам използвано цикориево брашно.

От представените резултати се вижда силното влияние на температурата върху процеса на хидролиза на цикориевото брашно. При 33 °C са добавени и разградени 450 g цикориево брашно, докато при 28 и 37 °C са добавени едва по 300 g. Освободеното количество фруктоза е 276.3 g (крайна концентрация 217 g/L) срещу 166.8 и 169.6 g/L, съответно.

Всички следващи процеси бяха проведени при вече оптимизираната температура от 33 °C.

### **2.3. Влияние на рН на средата**

Дотук всички периодични процеси с подхранване (за получаване на фруктоза) бяха проведени при рН на средата 4.9, защото при тази киселинност опитно 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. 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). Стойностите в края на процеса също са значително по-високи (виж Табл. 6).

Въпреки почти еднаквите стойности на инулиназната активност при процесите с рН 5.5 и рН 6.0, получените количества фруктоза и глюкоза са по-високи при рН 5.5. Пълното сравнение на процесите с различно рН на средата е показано на Табл. 6.

**Таблица 6.** Влияние на рН на средата върху образуването на биомаса, инулиназната активност и продуцирането на метаболити при периодични процеси с подхранване. Всички процеси са проведени в среди с начален състав 25 g/L цикориево брашно, 10 g/L дрождев екстракт и 10 g/L бактопептон, осъществени при 33 °C, разбъркване 200 грт и инокулирани в съотношение 1/10.

рН	ОС	Биомаса <sup>a</sup>	Инулиназна активност <sup>b</sup>	Инулиназна активност <sup>c</sup>	Фруктоза	Фруктоза <sup>d</sup>	Y <sub>Fr</sub> <sup>e</sup>	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 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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: ОС – общо количество използван субстрат; МК – млечна киселина; <sup>a</sup> Максимална стойност, получена на 48и час; <sup>b</sup> Максимална стойност получена между 17и и 24и час; <sup>c</sup> Крайна стойност (160и час); <sup>d</sup> Стойности, изчислени по краен обем; <sup>e</sup> Добивен коефициент – грам получена фруктоза на грам използвано цикориево брашно.



От показаните в Табл. 6 резултати се вижда, че за получаване на фруктоза е необходимо средата да е с рН 5.5. При тази стойност, след 160 часа SSF, културалната течност съдържа 325.3 g/L фруктоза, 56.8 g/L млечна киселина, 29.8 g/L глюкоза и 21.4 g/L захароза.

#### **2.4. Влияние на скоростта на разбъркване**

Друг важен параметър е скоростта на разбъркване на културалната течност. От нея зависи степента на конвекцията в средата, т.е. честотата на срещите между молекулите в целия ферментационен обем.

Всички процеси с подхранване до момента бяха проведени при скорост на механичната бъркачка от 200 rpm, скорост оптимална за цялостния процес на превръщане на инулина в млечна киселина. За максимален добив на фруктоза, при вече оптимизираните стойности на температура и рН, бяха проведени и аналогични процеси при скорост на разбъркване 100, 150 и 300 rpm. Сравнението им с вече проведения процес при 200 rpm, е показано на Таблица 7. При 100 и 150 оборота, получените крайни концентрации фруктоза са съответно 359 и 353.5 g/L, отговарящи на крайни количества от съответно 466.7 и 448.1 g (при финални работни обеми от 1.300 и 1.268 L.) Максимална инулиназна активност също е получена при разбъркване от 100 rpm -  $253.7 \pm 9.6$  U/mL (максимална стойност) и  $160.0 \pm 6.5$  U/mL (крайна стойност).

В процеса с получено най-високо съдържание на фруктоза, крайната ферментационна смес съдържа: фруктоза – 359 g/L ( $\approx 36\%$  p-p), млечна киселина – 55.2 g/L, глюкоза – 34.8 g/L, захароза – 17.9 g/L и около 25 g/L фруктоолигозахариди с  $DP \geq 3$  (фибри). По своя състав тази смес доближава комерсиалния високофруктозен сироп.

#### **2.5. Влияние на азотните източници**

При процесите на едновременно озахаряване и ферментация, за получаване на млечна киселина най-подходяща беше средата с азотни източници царевичен хидролизат (22 g/L) и дрождев екстракт (5 g/).

**Таблица 7.** Влияние на скоростта на разбъркване на средата върху образуването на биомаса, инулиназната активност и продуцирането на метаболити при периодични процеси с подхранване. Всички процеси са проведени в среди с начален състав 25 g/L цикориево брашно, 10 g/L дрождев екстракт и 10 g/L бактопептон, осъществени при 33 °C , рН 5.50 и инокулирани в съотношение 1/10.

Разбъркване (rpm)	ОС (g)	Биомаса <sup>a</sup> (CFU/mL)	Инулиназна активност <sup>b</sup> (U/mL)	Инулиназна активност <sup>c</sup> (U/mL)	Фруктоза (g/L)	Фруктоза <sup>d</sup> (g)	Y <sub>Fr</sub> <sup>e</sup> (g/g)	Захароза (g/L)	Глюкоза (g/L)	МК (g/L)
100 <sup>f</sup>	675	4.9 x 10 <sup>11</sup> ±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 <sup>f</sup>	675	5.0 x 10 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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: ОС – общо количество използван субстрат; МК – млечна киселина; <sup>a</sup> Maximal values obtained around 48<sup>th</sup> h of the fermentation; <sup>a</sup> Максимална стойност, получена на 48и час; <sup>b</sup> Максимална стойност получена между 17и и 24и час; <sup>c</sup> Крайна стойност (160и час); <sup>d</sup> Стойности , изчислени по краен обем; <sup>e</sup> Добивен коефициент – грам получена фруктоза на грам използвано цикориево брашно; <sup>f</sup> средна стойност, получена от 3 независими опита.

**Таблица 8.** Влияние на различни азотни източници върху образуването на биомаса, инулиназната активност и продуцирането на метаболити при периодични процеси с подхранване. Всички процеси са проведени в среди с начален състав 25 g/L цикориево брашно, осъществени при 33 °C , рН 5.50, скорост на разбъркване 100 rpm и инокулирани в съотношение 1/10.

Азотен източник (g/L)	ОС (g)	Биомаса <sup>a</sup> (CFU/mL)	Инул. активност <sup>b</sup> (U/mL)	Инул. активност <sup>c</sup> (U/mL)	Фруктоза (g/L)	Фруктоза <sup>d</sup> (g)	Y <sub>Fr</sub> <sup>e</sup> (g/g)	Захароза (g/L)	Глюкоза (g/L)	МК (g/L)
10 ДЕ + 10 БП <sup>f</sup>	675	4.9 x 10 <sup>11</sup> ±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 <sup>f</sup>	675	7.0 x 10 <sup>11</sup> ±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 <sup>f</sup>	675	6.4 x 10 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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 <sup>11</sup> ±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; ОС – общо количество използван субстрат; МК – млечна киселина; <sup>a</sup> Maximal values obtained around 48<sup>th</sup> h of the fermentation; <sup>a</sup> Максимална стойност, получена на 48и час; <sup>b</sup> Максимална стойност получена между 17и и 24и час; <sup>c</sup> Крайна стойност (160и час); <sup>d</sup> Стойности , изчислени по краен обем; <sup>e</sup> Добивен коефициент – грам получена фруктоза на грам използвано цикориево брашно; <sup>f</sup> средна стойност, получена от 3 независими опита.

За максимален добив на фруктоза бяха изпробвани общо 9 среди, съдържащи различни комбинации от следните органични азотни източници: дрождев екстракт (ДЕ), бактопептон (БП), пептон от казеин (ПК) и царевичен хидролизат (ЦХ).

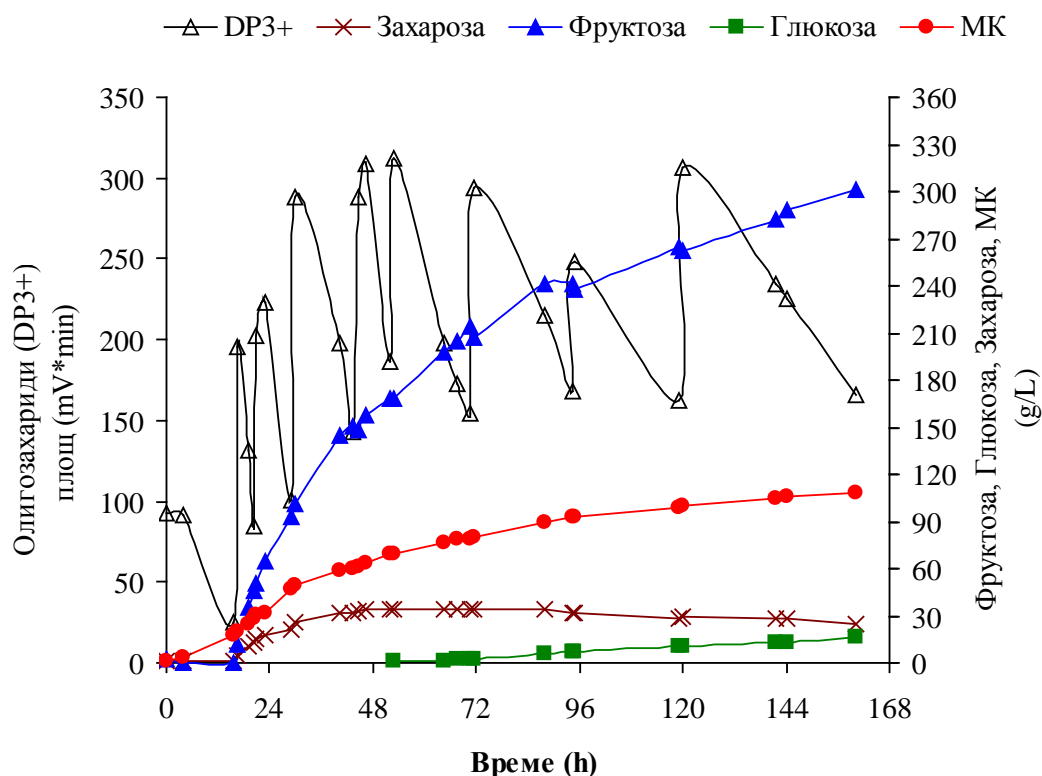
Резултатите са представени на Таблица 8. От тях се вижда, че за получаване на фруктоза, незаменимият азотен източник е дрождевият екстракт (ДЕ). Така например, в среда с 10 g/L ДЕ и 10 g/L БП, добивът е 359 g/L фруктоза, а в среда съдържаща 15 g/L ДЕ и 10 g/L БП – 357.8 g/L (отклонение в грешката на изследването). Като втори азотен източник, най-подходящ е БП, следван от ПК. Със сигурност царевичният хидролизат (ЦХ) е най-неподходящ за получаване на фруктоза. Но, в потвърждение на предишните ни резултати, в средите с добавен ЦХ концентрацията на МК е най-висока (68.5 – 69.2 g/L).

Най-висок резултат (359 g/L фруктоза) е полученият в среда с 10 g/L ДЕ и 10 g/L БП, проведен при температура 33 °C, рН 5.50 на средата и скорост на разбъркване 100 rpm.

## **2.6. Влияние на $Mn^{2+}$**

В периодичните процеси, имащи за цел максимален добив на млечна киселина, показахме ключовото и многостранно влияние на  $Mn^{2+}$  - да увеличава инулиназната активност, действайки алостерично на ензимните молекули, както и да намалява експресията на гена, кодиращ инулиназа. Като резултат, високите концентрации на  $Mn^{2+}$  водят до силно увеличение на продуцирането на МК, дължащо се на по-активните макромолекули на ензима, въпреки по-малкия им брой.

За да се изследва влиянието на  $Mn^{2+}$  при процесите с подхранване, беше проведен аналогичен на описания процес, 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). Резултат е показан на Фиг. 11.



**Фиг. 11.** Кинетика на процес на едновременна хидролиза и ферментация с подхранване, проведен при 33 °C, рН-5.5, разбъркване - 100 rpm, продължителност на процеса - 160 часа. Средата е с начален състав 25 g/L цикориево брашно, 10 g/L дрождев екстракт, 10 g/L бактопептон и магнезиев сулфат, осигуряващ 10 mM  $Mn^{2+}$ .

Добавката на  $Mn^{2+}$  води до двойно увеличение на млечната киселина в края на процеса – от 55.2 g/L до 108.7 g/L. От друга страна крайната концентрация на фруктоза е значително по-ниска - 301.3, спрямо 359 g/L. Това още веднъж показва ключовото значение на  $Mn^{2+}$  за получаване на МК.

Сравнявайки на инулиназната активност по време на двата процеса, не се забелязват съществени разлики. Въпреки сравнително близките стойности, ензимната активност в двата случая е висока по коренно различни причини.

При процеса с отсъствие на манган в средата, генната експресия на ензима е близо седем пъти по-висока. Това означава, че в този случай ензимната активност се дължи на голямото количество продуциран белтък, докато в присъствие на манган, високата ензимната активност се дължи на алостерично активиране.

При сравнение на профилите на изменение на микробният растеж се забелязва, че в условия без манган, клетъчната плътност е много по-ниска, като разликата достига близо два порядъка в края на процесите ( $7.0 \times 10^9$  срещу  $2.4 \times 10^{11}$ ).

## **ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

### **1. Обсъждане на процесите за получаване на млечна киселина**

Способността на *L. paracasei* да разгражда инулин съдържащи субстрати и директно да ги превръща в ценни биопродукти е обект на множество изследвания през последните години. До момента, обаче, не бе намерен щам, способен в единичен процес да осъществи озахаряване и ферментация на инулина до икономически изгодни количества млечна киселина.

Щам *Lactobacillus paracasei* B41 (DSM 23505) притежава всички необходими за това качества, а именно: (i) изключителна толерантност към киселинен шок; (ii) притежава  $\beta$ -фруктозидаза (EC 3.2.1.80) с екзоинулиназна активност. Поради тази причина, продуктивните възможности на щама бяха изследвани в редица хранителни среди, съдържащи като единствен въглероден източник инулин съдържащо брашно от цикория (Frutafit®CLR, предоставено от Sensus (Norben Company Inc., Холандия)). Този субстрат беше избран поради високото си съдържание на инулин – над 89%. Най-висок добив на млечна киселина беше получен при разграждането му в среда, съдържаща

азотните източници царевичен хидролизат (22 g/L) и дрождев екстракт (5 g/L) (Среда №7). В процес без рН контрол, от 20 g/L цикориево брашно, бяха получени 18.81 g/L МК. Това показва, че за получаване на МК от инулин, най-предпочитаният източник на азот е царевичния хидролизат. От друга страна, неговото използване води и до чувствително снижаване на себестойността на хранителната среда, изключвайки от нея скъпоструващите пептон и месен екстракт.

Чрез конверсия на по-високи концентрации на субстрат (90 и 136 g/L) в периодични процеси на ферментатор, беше установено оптималното рН на процеса. Въпреки, че рН оптимумът на действие на пречистената инулиназа на *L. paracasei* В41 е 4.8-4.9, за максимален добив на млечна киселина оптималното рН на средата е 5.50. При периодичен процес с рН 5.50 на средата, температура 37 °С и скорост на разбъркване 200 оборота в минута, от 136 g/L цикориево брашно, след 114 часа едновременно озахаряване и ферментация, бяха получени 123.7 g/L МК, т.е. беше получено почти пълно превръщане. Тази концентрация МК е и най-високата получена досега от инулин, в процес без предварителна хидролиза.

При още по-високи концентрации на субстрата, обаче, добивът на МК не се увеличава поради силно субстратно инхибиране. Вместо това, в културалната течност се натрупва неметаболизирана фруктоза. Така например, в среда №7, от 182 g/L цикориево брашно се получават едва 107.9 g/L МК.

Поради тази причина, предприехме допълнително оптимизиране на състава на хранителната среда. То беше насочено към изследване на влиянието на двувалентните метални йони, чието присъствие, по данни от литературата, има позитивно, макар и неустановено по вид, влияние върху инулиназната активност .

Първоначално влиянието на общо 12, едно- и двувалентни йона беше изследвано върху пречистената инулиназа на щам *L. paracasei* B41. Беше установено, че позитивно въздействие върху инулиназната активност имат три двувалентни йона -  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  като в присъствие на  $Mn^{2+}$  то е най-значително. При добавяне на различни концентрации на трите йона към среда № 7, беше установено, че *in vivo*, при разграждане на инулин от *L. paracasei* B41 за получаване на МК, влиянието на  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  е пренебрежимо или ограничава до действието им като кофактори ( $Mg^{2+}$ ). Обратно, при култивиране в среди с добавени 2.5 mM  $Mn^{2+}$  се наблюдава засилена инулиназна активност, респективно, ускорено продуциране на МК (Табл. 3). Също така, прави впечатление, че действието на  $Mn^{2+}$  като добавка в хранителната среда, не се изчерпва с ролята му на кофактор.

Имайки предвид позитивното влияние на  $Mn^{2+}$  върху цялостния процес на превръщане на инулин в МК, неговото влияние беше изследвано при високи концентрации на субстрат – 182 g/L цикориево брашно. Резултатите показаха, че максимална инулиназна активност се наблюдава при 10 mM  $Mn^{2+}$ , а максимален добив на МК – при 15 mM  $Mn^{2+}$ . Това показва, че действието на мангана не е само върху инулиназния ензим, но вероятно и върху ензимите от гликолитичната верига.

Така например, колкото по-висока е концентрацията на  $Mn^{2+}$  в средата, толкова по-малко е количеството на неметаболизирана фруктоза в средата. От друга страна, присъствието на манган не води до увеличение на нивата на експесия на гена, кодиращ инулиназния ензим, напротив, чувствително ги снижава. Това показва, че увеличението на инулиназната активност в присъствие на манган вероятно се дължи на алостерично въздействие, силно активиращо ензимните единици, въпреки по-малкият им брой.



Получените 151 g/L МК, при добавяне на 15 mM Mn<sup>2+</sup> към хранителната среда, е най-високият резултат, получен от инулин съдържащ субстрат до момента. Това подчертава решаващото значение на мангана в процеса на получаване на МК от инулин.

## 2. Обсъждане на процесите за получаване на фруктоза

Процесът на едновременно озахаряване и ферментация на инулин може 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 процеса 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, в настоящият труд 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.

Този на пръв поглед невероятен резултат има следното обяснение. Още от показаните резултати в Таблица 3 се вижда, че липсата на соли не само не намалява, но увеличава генната експресия на инулиназия ензим (Табл. 3, последен ред). Във всички процеси с подхранване се наблюдава висока инулиназна активност, но за разлика от процесите, оптимизирани за получаване на МК, тя не се дължи на алостеричното въздействие на Mn<sup>2+</sup>, 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:

1. Получаване на концентриран разтвор на фруктоза само в една технологична стъпка – периодична ферментация с подхранване в присъствие на МКБ. За сравнение, всички известни методи за получаване на фруктоза са многостепенни.
2. В сравнение с различните методи на химична хидролиза 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.
3. В сравнение с известните методи на ензимна хидролиза за получаване на фруктоза, при които субстратите се третират 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 настоящият метод.

### **3. Обсъждане на механизма на действие на $Mn^{2+}$**

#### **3.1. Влияние на $Mn^{2+}$ върху транспорта на фруктоза**

Транспорта на фруктозата в клетките на *L. paracasei* се осъществява чрез фосфоенолпируват-зависима фосфотрансферазна система (PTS). Клетъчен ензим-регулатор, известен като Ензим I взаимодейства с фосфоенолпируват и фосфорилира хистидинов остатък на протеина HPr (His-15). Фосфатният остатък на HPr-P се предава на специфичните транспортерни белтъци в мембраната, като се извършва каскадно фосфорилиране на IIА, IIВ и IIС компонентите на PTS-системата (Viana et al., 2000). Последният белтък IIС фосфорилира фруктозата извън клетката и я прехвърля през клетъчната мембрана под формата на фруктозо-1-фосфат. Началната стъпка на фруктозния транспорт - активирането на Ензим I чрез димеризиране и неговото авто-фосфорилиране в присъствието на фосфоенол-пируват се извършва единствено в присъствието на метални йони, обикновено  $Mg^{2+}$  (Ginsburg and Peterkofsky 2002). Обикновено обаче  $Mg^{2+}$ . Катионите на  $Mn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  действат по подобен начин върху ензимите (Muñoz and Ponce 2003) и обикновено заместването на  $Mg^{2+}$  с  $Mn^{2+}$  усилва каталитичното действие (Kehres and Maguire 2003). Този механизъм е доказан ин виво от получените резултати. При по-високи концентрации на  $Mn^{2+}$  (15 mM) се наблюдава усилен транспорт на фруктозата в сравнение с експериментите, проведени с 0.3 mM  $Mn^{2+}$  при които натрупването на фруктоза в средата е десетократно по-високо. При пълна липса на метални йони в средата настъпва блокиране на транспорта и оттам, натрупване на фруктоза в огромни количества.

### 3.2. Влияние на $Mn^{2+}$ върху експресията на *fosE*

Ключов белтък в регулацията на генната експресия на *fosE* е отново HPr. Фосфорилирането му от регулаторния белтък HPrK води до неговото активиране и формиране на комплекс с регулаторния белтък CsrA (регулатор на катаболитната репресия). Комплексът HPr-CsrA се свързва с промоторната област на *fosE* т.нар. *cre* сайт и не позволява да се извърши транскрипция на гена.

Известно е, че активността на отговорната за катаболитната репресия киназа-фосфатаза HPrK се влияе положително от бивалентни метални йони (Ramström et al., 2003). При отсъствие на  $Mn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  експресията на *fosE* е напълно „освободена”, което води до синтеза на неограничени количества иРНК и оттук - огромен брой молекули  $\beta$ -фруктозидаза. Описаните по-горе резултати напълно доказват, че магнезиевите йони регулират този механизъм за контрол *in vivo*. При периодичните процеси с подхранване и при отсъствие на катиони в средата се наблюдава няколкократно повишение на нивата на експресия на *fosE* заради ниската активност на HPrK, отговорна за фосфорилирането на репресора HPr. Същият ефект бе забелязан и по време на периодичните процеси без рН контрол и с отсъствие на  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ .

## ИЗВОДИ

- 1. Инулин съдържащото брашно от цикория може успешно да се използва като въглероден източник за получаване на ценни продукти чрез метаболизма на *L. paracasei* B41.*
- 2. Установени са оптималните параметри за получаване на МК от цикориево брашно, решаващо значение от които имат: присъствието на царевичен хидролизат като азотен източник в средата и рН оптимумът от 5,50.*
- 3. Експериментално е установено позитивното влияние на  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  върху ензимната активност на инулиназата на *L. paracasei* B41, 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%).*
- 4. При експерименти *in vivo* с клетки на *L. paracasei* B41 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.*
- 5. Влиянието на  $Mn^{2+}$  върху метаболизирането на инулин до млечна киселина не се ограничава само до увеличение на инулиназната активност, но и върху транспорта на фруктоза, както и на метаболизирането ѝ в клетката. Така например, максимална инулиназна активност е получена при концентрация на  $Mn^{2+}$  от 10 mM, докато максимален добив на МК е постигнат при 15 mM  $Mn^{2+}$ , поради липса на неметаболизирана фруктоза в културалната течност.*

6. *Процесът на едновременно озахаряване и ферментация, изпълнен като периодичен процес с подхранване в среда без солево съдържание, води до ускорение на хидролизния процес и до почти пълно възпрепятстване на ферментационния. В резултат, в средата се акумулират огромни количества неметаболизирана фруктоза.*
7. *Силната инулиназна активност при процесите в среда без метални йони се дължи на драстично увеличаване на експресията на инулиназния ген.*

## ПРИНОСИ

1. *За първи път, евтиният и широко разпространен в природата въглероден източник - инулин от цикория, е успешно използван като субстрат за получаване на млечна киселина.*
2. *За първи път за получаване на млечна киселина и фруктоза от инулин съдържащ субстрат е приложен интегриран процес на хидролиза и ферментация, осъществяващи се едновременно от един единствен организъм – *Lactobacillus paracasei* B41 (DSM 23505). Щамът се явява свръхпродуцент и на инулиназа и на млечна киселина.*
3. *Установено е ключовото значение на  $Mn^{2+}$  при метаболизирането на инулина от щам *L. paracasei* B41. Освен като кофактор,  $Mn^{2+}$  влияе алостерично върху инулиназния ензим, подпомага транспорта на фруктозата през клетъчната стена, и активира ензими от гликолитичния метаболитен*

*път. Обратно, липсата му увеличава експресията на инулиназния ген.*

4. *Разработеният метод за получаване на фруктоза е една обещаваща алтернатива на получаването и чрез третиране с пречистени ензими.*
5. *Получените крайни концентрации на млечна киселина (151 г/л) и фруктоза (359 г/л) са най-високите постигнати до момента, което предполага приложното значение на разработените процеси.*

### **ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА**

#### **Публикации в пълен текст по дисертацията:**

1. 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. **(ИФ 4.917)**
2. Petrov K., Popova L., Petrova P. (2017) High lactic acid and fructose production via Mn<sup>2+</sup> mediated conversion of inulin by *Lactobacillus paracasei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* (DOI: 10.1007/s00253-017-8238-0) **(ИФ 3.376)**
3. Popova L., Petrov K. (2017) “Production of platform chemicals from inulin” *Scientific works of University of Food Technologies*, vol. LXIII, (in press). (ISSN 1314-7102)

#### **Забелязани позовавания на публикациите:**

#### **Цитирана статия:**

1. 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. **(ИФ 4.917)**

#### Цитиращи статии:

1. Mladenović D. D., Djukić-Vuković A. P., Pejin J. D., Kocić-Tanackov S. D., Mojović L. V. (2016) “Mogućnosti, perspektive i ograničenja u proizvodnji mlečne kiseline na sporednim i otpadnim sirovinama” *Hemijska industrija*, vol. 70(4), 435-449.
2. Rawat H. K., Soni H., Treichel H., Kango N. (2016) Biotechnological potential of microbial inulinases: Recent perspective, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2016.1147419
3. Holyavka M., Artyukhov V., Kovaleva T. (2016) Structural and functional properties of inulinases: A review. *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 34(1), 1-17.
4. Xu Q., Zang Y., Zhou J., Liu P., Li X, Yong Q., Ouyang J. (2016) Highly efficient production of d-lactic acid from chicory-derived inulin by *Lactobacillus bulgaricus*. *Bioprocess Biosyst Eng* vol. 39(11), 1749-1757.
5. Farinha L.R.L. (2016) Efeito da composicao de bacterias laticas e da suplementacao do soro de leite na cinetica de acidificacao, crescimento celular e producao de nisina. PhD Thesis. Faculdade de Ciencias Farmaceuticas, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil.
6. Singh R. S., Chauhan K., Kennedy J. F. (2017) A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 96, 312-322. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.004>)

#### Публикации в пълен текст извън дисертацията:

1. 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)
2. 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.
3. 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)

4. 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. **(ИФ 1.523)**

#### **ЗАБЕЛЕЖКИ**

- Представянето на резултатите в автореферата се различава от представянето им в дисертацията.
- Номерацията на таблиците и фигурите в автореферата не са идентични с тези в дисертацията.