

Справка
за най-важните постижения на чл.-чл.-кор. проф. д-н Атанас Иванов
Павлов
Университет по хранителни технологии, Пловдив
Институт по микробиология – БАН

I. Научна и научно-приложна дейност

1. Биологично активни вещества и адитиви от растителни *in vitro* системи
с приложение в хранително-вкусовата промишленост

Растителна клетъчна суспензия *Nicotiana tabacum*

1. За пръв път в България е охарактеризиран метаболизмът на тютюнева растителна клетъчна суспензия. Доказано е, че клетъчна култура *N. tabacum* 1508 е свръх-продуцент на полизахариди [публикация 123] и свързаните с биосинтеза им ензими полигалактуроназа и пектинметил естераза [публикация 125]. Дефинирана е тяхната роля в ремоделирането на клетъчната стена и свързаните с това промени в количеството и характера на биосинтезираните полизахариди. Доказано е имуномодулиращо им действие [публикация 123]. Фенолните киселини и путресциновите им производни са установени като основните вторични метаболити, акумулирани в тютюневите суспензии [публикация 22], с което е свързана и антимикробната активност на водно-алкохолните екстракти на клетъчната биомаса [публикация 122].
2. Дефинирани са връзките в биологичната система между катаболизма (хранителните изисквания и биосинтез на фосфохидролази) и вторичния метаболизъм (биосинтез на фенолни вещества) на растителната клетъчна суспензия *N. tabacum* 1507 [публикации 22, 33 и

122]. Получените резултати я определят като подходяща за разработване на комплексна биотехнология за получаване на тютюнева клетъчна биомаса с приложение в тютюневата индустрия и биологично активни вещества с потенциал за приложение като хранителни добавки.

По същество, тези изследвания са първите в България, които очертават потенциала на растителните in vitro системи за комерсиализирането им в хранително-вкусовата промишленост и козметиката.

Растителна клетъчна суспензия *Helianthus annuus* 1805

3. Доказана е зависимост между ремоделирането на клетъчната стена в процеса на развитието на растителна клетъчна суспензия *Helianthus annuus* 1805 и свързаните с това промени в количеството и характера на синтезираните и секретирани полизахариди, полигалактуроназата и пектинметилестеразата [публикации 153 и 154].
4. Установено е, че клетъчната суспензия *Helianthus annuus* 1805 в процеса на развитието си синтезира външноклетъчни полизахариди и културалната среда е достъпен източник за получаването им [публикации 45, 124 и 154]. Разработен е алгоритъм за изолиране на изследваните полизахариди чрез дълбоко охлаждане при -18°C, при което се получава една нативна и стандартна полизахаридна фракция (MW 150 000). Полученият резултат е съществен принос към решаване на проблема за получаване на нативни и стандартизирани полизахариди за медицината и козметиката [публикация 124].

Растителна клетъчна суспензия *Lavandula vera* MM

5. Доказано е (чрез маспектроскопия и ядреномагнитен резонанс), че *L. vera* MM е първата клетъчна култура, получена от лавандулово растение, която биосинтезира розмаринова киселина [*публикации 24, 27 и 29*].
6. Доказано е, че водно-алкохолните екстракти от биомасата на *L. vera* MM притежават антиоксидантна (включително и антирадикалова) активност [*публикация 35*], както и антимикробна активност [*публикация 152*], което е база за приложението им като природни антиоксидантни и антимикробни адитиви в хранителната и козметична промишлености.
7. Дефинирано е влиянието на основните компоненти на хранителната среда върху развитието на културата и биосинтеза на розмаринова киселина, което е съществен принос към физиологията на клетъчната култура [*публикации 26, 29, 30 и 31*]. На тази база е разработен оптимизационен алгоритъм и са оптимизирани връзките в биологичната система “хранителна среда – *L. vera* MM - розмаринова киселина”, в резултат на което е предложена нова, модифицирана LS хранителна среда, с която се постига 27 пъти увеличение на добива на целевия метаболит [*публикация 32*].
8. Създаден е оригинален екстракционен алгоритъм за изолиране на розмариновата киселина, което е предпоставка за разработването на промишлен технологичен процес [*публикация 159*].
9. Разработена е оригинална концепция за селекцията на високопродуктивни линии, съчетана с елиситиране като интегрални части от оптимизационния процес за получаването на стопанско значими биологично активни метаболити, в частност розмаринова

киселина, от растителни клетъчни суспензии [*публикации 51, 52, 54 и 158*].

10. Оптимизиран е процесът на култивиране на *L. vera* ММ в лабораторен биореактор на база анализа на връзката между независимите променливи (концентрацията на разтворения кислород и температурата) и биосинтеза на розмаринова киселина от *L. vera* ММ [*публикации 41, 44, 65, 155 и 160*], както и взаимното влияние на условията на култивиране върху вторичния метаболизъм на клетъчната суспензия [*публикация 47*].

На тази база и на база приноси 5-10 е разработен първият в България лабораторен технологичен процес за биосинтез на биологично активно вещество на база растителни in vitro технологии – Розмаринова киселина от растителна клетъчна суспензия Lavandula vera ММ [публикация 9].

In vitro* култури от род *Salvia

11. За пръв път в света са получени калусни, суспензионни и трансформирани коренови култури от *S. tomentosa*, *S. officinalis*, *S. ringens*, *S. virgata*, *S. fruticosa* и *S. scabiosifolia* [*публикации 75, 76, 86, 87, 145 и 184*]. За пръв път е получен ризогенен калус от *S. scabiosifolia* [*публикация 76*].
12. За пръв път е доказан биосинтезът на маслинен и коросолева киселина в *S. tomentosa* и *S. ringens*, и бетулинова киселина в *S. ringens* [*непубликувани данни*]. Цитираните субстанции притежават висока антитуморна и имуномодулираща активност.
13. Разработен е метод за разделяне и количествено определяне на ди-, и тритерпени от екстракти на *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*

базиран на високоефективна течна хроматография [*публикации 86 и 173*].

14. За пръв път е осъществена комплексна характеристика на вторичния метаболизъм на изучаваните *in vitro* системи по отношение както на ди- и тритерпените, така и на полифенолите. Доказано е, че освен гореописаните терпени *in vitro* системите от *Salvia* биосинтезират и розмаринова киселина в стопанско значими количества [*публикации 75, 76, 86 и 88*]. Изучен е и съставът на етеричните масла на *Salvia scabiosifolia* [*публикация 77*] и *Salvia ringens* [*публикация 81*] и *Salvia tomentosa* [*публикация 140*]. Получените резултати са основа за разработването на комплексна биотехнология за получаването им, основана на интегриран подход за комплексна оптимизация на вторичния метаболизъм и следващо изолиране и пречистване, базирано на различните химически отнасяния на тритерпените, полифенолите и структурите, изграждащи етеричните масла.

2. Фармакологично значими вторични метаболити от растителни *in vitro* системи

In vitro* системи от *Leucjum aestivum

15. Разработен е нов HPLC метод за анализ на галантамин, норгалантамин и ликорин от *in vitro* системи на *Leucjum aestivum* и *Pancraticum maritimum* [*публикация 66*].
16. Разработени са протоколи за получаване на калус и „shoot” тип култури (за пръв път през калус фаза) от *Leucjum aestivum* [*публикация 53*]. На тази база е разработен оригинален алгоритъм за селекция на „shoot” тип култури *L. aestivum*, базиран на вътреклетъчната изменчивост на

вторичния метаболизъм на растителните клетки в калусните култури. Приноси 15 и 16 са методичната основа на следващите изследвания по проблема.

17. Чрез газхроматографско разделяне, съчетано с масспектрални анализи на алкалоидните фракции на интактни растения и различни *in vitro* култури *Leucojum aestivum* е доказано, че биосинтезът на галантамин зависи от степента на дефиниция на растителната тъкан [публикации 48 и 63].

18. На база принос 17 за пръв път „shoot” тип култури от *Leucojum aestivum* са дефинирани като подходяща технологична матрица за получаване на галантамин [публикация 53]. Чрез следващо оптимизиране на състава на хранителната среда [публикации 64 и 163], елиситиране [публикация 82] и анализ на биоинженерните системи за култивиране на такъв вид растителни *in vitro* системи [публикации 80, 91, 164, 174] е разработена първата лабораторна *in vitro* технология за получаване на галантамин, стратегически продукт на българската фармацевтична промишленост и основен медикамент в борбата с болестта на Алцхаймер. Технологията е разработена в рамките на съвместен проект със Софарма и е предадена на индустриалния партньор. Следващото мащабиране на тази технология ще реши проблема, свързан с изчерпването на естествените находища на *L. aestivum* и приближаващия дефицит на суровина за изолирането на галантамин.

***In vitro* системи от *Pancratiun maritimum*, *Datura stramonium*,
Harpagophytum procumbens и *Fumaria spp.***

19. Разработен е бърз денситометричен метод за анализ на тропанови алкалоиди от *Solanaceae* растения и техни *in vitro* системи [публикация 40], което е от съществено значение за следващото разработване на скрининг системи с промишлено приложение, както и за адаптиране и въвеждане на съвременни аналитични техники по време на теренните изследвания.
20. Разработен е оригинален протокол за получаване на „shoot” тип култури от *Pancratiun maritimum* и следваща селекция на линии с висока ацетилхолин естераза инхибираща активност [публикация 67]. За пръв път е изследван алкалоидният профил на тези *in vitro* системи, култивирани дълбочинно [публикация 74]. Резултатите от тези изследвания са съществен принос както в разбирането на биохимията на вторичния метаболизъм, така и в съхранението на този, застрашен от изчезване растителен вид. В допълнение, разработените протоколи са и база за откриването на нови алкалоиди с висока ацетилхолин естераза инхибираща активност.
21. Разработена е оригинална схема и за пръв път са получени трансформирани коренови култури *Datura stramonium* L. с различно плоидно ниво [публикации 12, 39]. С газхроматография-маспектроскопия е доказан биосинтезът на фармацевтично значимия алкалоид хиосциамин [публикация 60]. След оптимизиране на хранителната среда [публикация 62] и анализ на условията на култивиране в различни биореакторни системи [публикации 127 и 129] е анализиран потенциала за развитие на технологичен процес за получаване на тропанови алкалоиди на база *Solanaceae* трансформирани коренови култури.

22. За пръв път е получена трансформирана коренова култура от дяволски нокът (*Harpagophytum procumbens*) – важно медицинско растение, развиващо се в Южна Африка в района на пустинята Калахари [публикация 50].
23. Разработени са оригинални протоколи за получаване на *in vitro* системи от български видове от род *Fumaria*, като потенциални матрици за получаване на протопин и други биологично активни вещества [публикации 94 и 141]. Дефиниран е биосинтетичният потенциал на получените *in vitro* системи и на тази база е предложена технологична схема за биосинтез, изолиране и пречистване на кристални форми протопин от растителна клетъчна суспензия *F. rostellata* Knaf. Доказан е и потенциалът за биосинтез на фумарова киселина от растителни клетъчни суспензии на *Fumaria* spp. [публикация 149].

3. Нетрадиционни методи за култивиране на растителни *in vitro* системи

24. На база полиетиленгликол и декстран са разработени 10 оригинални водни двуфазни системи. Чрез моделни опити са определени основните им фазови характеристики и коефициентите на разпределение. За пръв път в световен мащаб са изследвани водните двуфазни системи като среда за култивиране на растителни клетъчни суспензии *Nicotiana tabacum* 1507 и *Lavandula vera* MM [публикации 23 и 25]. Получени са оригинални данни за развитието на суспензиите и за разпределението на фенолните вещества [публикация 25] и фосфохидролазите [публикация 23].
25. На база данните от принос 24 е изследван процеса на биосинтез на фосфохидролази от клетъчна суспенция *N. tabacum* 1507 при култивиране във водната двуфазна система. Доказано е, че при този тип култивиране се стимулира секрецията на фосфохидролазите и

успоредно с това се постига частично пречистване на ензимните активности чрез разпределението им в долната декстранова фаза, което води до получаване на високоактивни ензимни препарати в по-малък обем [публикации 28 и 34]. Тези резултати са съществени за следващото развитие на тази област от познанието, като в наши дни се съобщава за първите промишлени системи, използващи водните двуфазни системи за пречистване на различни белтъчни молекули.

26. Доказано е, че водните двуфазни системи са подходящи среди и за развитие на биосинтетични процеси за получаване на нискомолекулни вторични метаболити от растителни *in vitro* системи [публикации 25 и 36].
27. Разработена е концепцията за двуфазно култивиране на растителни *in vitro* системи в присъствие на адсорбционни смоли [публикации 22 и 152]. Доказано е, че този тип двуфазни системи са подходящи за биосинтез на полифеноли [публикации 22 и 152], а развиването на двуфазната система чрез включването в нея на DMSO повлиява секрецията им в културалната течност и води до значително повишаване на добивите [публикация 36].
28. За пръв път е разработена моделна двуфазна система за *in situ* екстракция на галантамин [публикация 167]. Разработена е двуфазна култивационна система [публикация 113] на база по-рано разработен в нашата група колонен биореактор с вътрешни секции чрез включването на изнесен циркулационен контур [публикация 78]. Доказано е, че при култивирането в новоразработената биореакторна система, биосинтетичният процес се насочва изключително към акумулирането на галантамин в *in vitro* растителната биомаса, което е от критично значение за структурирането на следващите процеси по изолиране и пречистване [публикация 113].

29. Разработена е имобилизационна матрица на базата на целулозната мрежа на зрелите плодове на *Luffa cylindrica* за имобилизация на растителните клетки. Постигната е клетъчна имобилизация чрез свободно навлизане на клетки от *L. vera* MM в порьозните кубчета от целулозната мрежа на *L. cylindrica* в процеса на култивирането на клетъчните суспензии [публикация 157].

4. Индуцирана полиплоидия и ендоредупликация и значението им за вторичния метаболизъм на растителната клетка. Проточно-цитометрични анализи на растителни *in vitro* системи

30. За пръв път е изучена връзката между генома (плоидното ниво) и качествения състав на алкалоидите, биосинтезирани от трансформирани коренови култури *Datura stramonium* [публикация 162]. Доказано е, че алкалоидните профили на трансформираните коренови култури *Datura stramonium* L. с различно плоидно ниво се различават от тези на изходните интактни растения. Доказан е биосинтезът на 3-тропоилокси-6-ацетокситропан, който е нов за род *Datura* и е идентифициран нов тропанов естер – 3-тиглоилокси-6-пропионилокси-7-хидрокси тропан [публикация 39]. Представеният резултат е оригинален и съществен фундаментален принос и е добра база за следващо изучаване на молекулярно-биохимичните механизми на биосинтеза на стопански важните тропанови алкалоиди.

31. Доказано е, че както увеличеното количество ядрена ДНК, така и оптималните условия за максималната му експресия са есенциални за получаването на максимални добиви от целевите метаболити от полиплоидни трансформирани коренови култури [публикации 39, 58, 60 и 62].

32. За пръв път е доказано, че плоидното ниво на трансформирани коренови култури е различно от плоидно ниво на интактната растителна тъкан, използвана за тяхното получаване вследствие на генетична трансформация с *Agrobacterium rhizogenes* [публикации 58, 70, 126, 168 и 169].
33. Предложена е корекция на референтната стойност, депозирана в базата данни „Royal Botanic Garden, Kew”, за съдържанието на ДНК в 2С ядрата на вида *Beta vulgaris* L [публикации 70].
34. Разработен е оригинален метод за екстракция и оцветяване на нативни клетъчни ядра от трансформирана коренова култура *B. vulgaris* L [публикация 59].
35. За пръв път е доказано, че ДНК профилът на първичен ризогенен калус, получен от трансформирана коренова култура *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red, не е сума от ДНК профили на клетките на двете линии вторичен калус, а е резултат от неизвестни понастоящем взаимодействия между двете субпопулации клетки, което води до протичането на повече цикли ендоредупликация [публикация 70].
36. Доказано е, че степента на ендоредупликация и плоидните профили на растителни клетки от интактни растения и техните *in vitro* системи се влияят от степента на диференциация и възрастта на растителните органи, от вида на растителната *in vitro* система, както и от присъствието на растежни регулатори в хранителната среда [публикации 58 и 70].
37. Доказано е, че степента на ендоредупликация на растителните *in vitro* култури корелира с полиплоидността на експланта, от който са получени [публикация 70].
38. Доказано е, че при биосинтетични процеси, при които като технологични матрици се използват растителни клетки с различна

плоидност, култивирани при *in vitro* условия, от съществено значение е не само количеството генетичен материал, но и оптимизацията на условията на култивиране и избора на най-подходящата система за култивиране [публикации 62 и 127].

5. Мултиметаболитни анализи (Метаболомикс)

39. Чрез мултиметаболитни анализи на полярните и летливите метаболити на *in vitro* системи от *Lavandula vera*, *Rosa damascena* Mill, *Nicotiana tabacum*, *Pancratium maritimum*, *Fumaria spp.* и *Helianthus annuus* и следващ принципен компонентен анализ е доказано, че метаболитните профили на изследваните *in vitro* системи пряко зависят от режима на култивиране [публикации 46, 68, 71, 136 и 175]. По същество това са [публикация 46] първите в България мултиметаболитни анализи на растителни клетки, развивали се при *in vitro* условия.
40. За първи път е приложен мултиметаболитен анализ (метаболомикс) на алкалоидните смеси от shoot култури на *L. aestivum* [публикации 63, 64, 78 и 60], shoot култури *P. maritimum* [публикация 74] и трансформирани коренови култури *D. stramonium* [публикации 60 и 62] като елемент от интегрирания подход за оптимизиране на биосинтетичния процес, а не само за фундаментални изследвания на вторичния метаболизъм. **Това е методичен принос, определящ една от насоките за развитие на растителните биотехнологии, а именно създаването на оптимизационни алгоритми, целящи моделирането на целия комплекс вторични метаболити с цел получаването на екстракти с желана и повишена биологична активност (Taylor Made Bioactivity).**

6. Нови и нетрадиционни биореакторни системи за култивиране на растителни *in vitro* системи

Бъдещото развитие на растителните биотехнологии, и по-специално промишленото им приложение е свързано както с получаването на високи добиви от целевите метаболити, така и с намаляване на производствените разходи. Важен елемент от този процес е разработването на ниско бюджетни култивационни системи, които да осигуряват пълноценното развитие на растителните *in vitro* системи и максимална експресия на вторичният им метаболизъм.

41. Разработена е концепцията за “Low-cost” биореактори със свободно подаване на въздушната фаза. Култивационната система е приложена при получаването на беталаинови пигменти от трансформирани коренови култури от *Beta vulgaris*. Първичните анализи показват, че себестойността на получаваните беталаини се доближава до тази на екстрахираните беталаини от нативните растения [*публикации 2 и 11*], но биологичната активност на екстрактите от трансформираните коренови култури е значително по-висока.
42. За пръв път в световен мащаб е използвана технологията с временно разбъркване за получаване на биологично активни вторични метаболити от диференцирани растителни *in vitro* системи [*публикация 49*]. Впоследствие култивационните системи с временно разбъркване са внедрени в работата на Института по високопланинско животновъдство и земеделие, Троян, където са получени впечатляващи резултати при микроразмножаването на боровинки, и в АгроБиоИнститут, София.
43. За първи път е използвана „технологията” с временно разбъркване за биосинтез на Amaryllidaceae алкалоиди от диференцирани растителни *in vitro* системи [*публикации 73, 80 и 90*]. Концепцията е развита чрез

комбиниране на култивирането при условия с временно разбъркване с двуфазното култивиране в присъствие на адсорбционна смола, при което се постига допълнително увеличаване на добивите от целевите метаболити [*публикация 174*].

44. Съществен принос в тази област на познанието е и прилагането на мултиметаболитните анализи за оценка на вторичния метаболизъм на растителните *in vitro* системи, култивирани при условията на временно разбъркване [*публикации 73, 80 и 90*]. Този подход е мощен инструмент както за фундаментални изследвания на промените на вторичния метаболизъм на растителната клетка, така и за откриването на синтезирани *de novo* вторични метаболити, вследствие на променените условия, при които е поставена растителната клетка, потенциални носители на нови и/или повишени биологични активности.

45. На база култивиране в течна среда и адсорбционната смола Amberlite XAD4 при условия на временно разбъркване са разработени два иновативни подхода за генетична трансформация с *A. rhizogenes*. Методите са приложени при получаването на трансформирани коренови култури от *Salvia* [*публикация 72*]. ***Получените резултати са съществен принос и пробив в генетичните трансформации на тъкани от растения – свръхпродуценти на полифеноли.***

46. Освен използването на нови култивационни техники от съществено значение за развитието на технологичните процеси, основани на култивирането на растителните клетки при *in vitro* условия, е модифицирането и адаптирането на наличните биореакторни системи към физиологичните и морфологичните особености на конкретната *in vitro* система. Съществен принос в това отношение е разработения колонен биореактор с вътрешни секции [*публикация 78*], който решава проблема с култивирането на “shoot” тип растителните *in vitro* системи.

Системата е приложена при култивирането на *L. aestivum* shoot култури с цел получаването на галантамин и е в основата на успеха при разработването на тази технология.

Съществените приноси в тази област на познанието са в основата на получената покана за публикуване на обзорна статия, свързана с използването на технологията с временно разбъркване от водещо списание в областта на биопроцесорното инженерство [публикация 89]. Очертани са и насоките на развитието на този тип биореакторни системи като основа за реализирането на концепцията за “scale-out” мащабирането. Успехът в тази насока би осмислил масовото приложение на растителната клетъчна агрономия.

7. Растителна клетъчна агрономия

Фундаменталните промени в земеделието и производството на храни са неизбежни. Осигуряването на храна за нарастващо население ще бъде голямо предизвикателство, което съвпада с натиска за намаляване на отрицателните въздействия върху околната среда от конвенционалното земеделие. Биотехнологичното производство на храни и хранителни компоненти вече бележи първите успехи на пилотно ниво, но разгръщането на тази философия ще изисква интензивна изследователска работа и агресивно финансиране. Концепцията за растителните клетки, отглеждани при *in vitro* условия, като храна предлага много атрактивна алтернатива за получаване на здравословна, богата на биологично активни вещества и протеини, и хранително балансирана хранителна суровина. Освен това отпадни продукти от растителната биомаса, получена по тази технология, може да бъдат преработени в широк спектър от биосинтетични материали. Натрупаният опит, получените резултати и високия авторитет поставя българските учени в позицията на пионери в това ново научно направление.

Трансформирани коренови култури *Beta vulgaris*, *in vitro* системи *Saturea montana*, черна и червена боровинка

48. Изследван е анаболизъмът на беталаинови пигменти при трансформирани коренови култури, получени от *Beta vulgaris* cv Bordo, *Beta vulgaris* cv Egyptian, *Beta vulgaris* cv Detroit 2, *Beta vulgaris* cv Detroit Dark Red. Доказано е, че трансформираната коренова култура *B. vulgaris* L. DDR е най-подходящия продуцент на беталаинови пигменти, тъй като притежава стабилни морфологични, растежни и биосинтетични характеристики, висока добивност, генетична стабилност, а екстрактите получавани от нея – висока биологична активност [публикации 37 и 43].
49. За пръв път е установена силната антирадикалова активност (83% инхибиране на DPPH• радикала) на етанолния екстракт, получен от коренова маса на *Beta vulgaris* cv Detroit Dark Red, култивирана при дълбочинни условия [публикация 37]. Установена е биодостъпността и стабилността на пигментния комплекс в човешкия стомашно-чревен тракт [публикация 42]. **Това определя потенциала за използване на пигментния комплекс като адитив за хранителната и фармацевтичната промишлености или за директна консумация,** носещ цвят и едновременно с това подобряващ биологичната ценност на продуктите, което е предпоставка за разработване на технологии за получаването, комерсиализирането и приложението му.
50. Изучена е връзката между вида и възрастта на инокулума, развитието и биосинтеза на беталаинови пигменти от трансформирана коренова култура *Beta vulgaris* [публикация 38]. Установени са оптималните параметри на инокулата. Този резултат е от важно практическо значение за всички следващи изследвания, свързани с трансформирани коренови култури.

51. Доказани са значими, неизвестни досега, различия във фенолните компоненти и в биологичната активност на екстрактите от трансформирани коренови култури и интактните растения, от които са получени. Те още един път показват широките възможности за изменения във физиологията и биохимията на растителните клетки и използването им в биотехнологията [**публикация 69**]. За пръв път е доказано, че беталаиновия екстракт от трансформирана коренова култура *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red притежава по-висока биологична активност (антиоксидантен потенциал) в сравнение с този, получен от интактните растения [**публикация 69**].
52. Дефиниран е метаболитният отговор на трансформираната коренова култура *B. vulgaris* L. DDR при елиситиране с ванадилсулфат и метилжасмонат [**публикации 2, 170 и 171**].
53. Доказано е, че колонният тип биореактор е най-подходящ за биосинтеза на беталаинови пигменти от трансформираната коренова култура *B. vulgaris* L. DDR [**публикации 2, 11, 55, 156 и 166**].
54. Беталаиновият екстракт от трансформирана коренова култура *Beta vulgaris* cv. Detroit Dark Red е определен като нов продукт, различен от екстракта от съответното интактно растение и притежаващ потенциал за широко приложение в хранително-вкусовата и фармацевтичната промишлености [**публикация 69**]. Предложен е метод за получаване на беталаинови пигменти от трансформирана коренова култура *B. vulgaris* L. DDR [**публикация 2**]. **По същество това е първата разработена в България лабораторна биотехнология за получаването на биологично активен растителен вторичен метаболит на базата на трансформирани коренови култури. Технологията е кандидат за “scale-out” мащабиране и следващо предлагане на масовия потребител.**

55. За пръв път е получена калусна линия от *B. vulgaris* L. cv. *Egyption*, продуцираща жълти бетаксантинови пигменти [**публикация 2**]. Този резултат е от особено значение за бъдещо развитие на технология с потенциал за приложение в хранително-вкусовата промишленост, защото добре известен факт е дефицита на водоразтворими адитиви, носещи жълт цвят.
56. За пръв път е създадена система за получаване на ризогенни калусни култури от *B. vulgaris* L [**публикация 2**]. **Резултатът е от особено значение за развитието на растителната клетъчна агрономия, защото ризогенните дедиференцирани клетки се култивират в среди, свободни от растежни регулатори, което е основа за широкото им приложение за директна консумация.**
57. Охарактеризирани са *in vitro* системи от *Capsicum chinense* по отношение приложимостта им в растителната клетъчна агрономия [**публикация 148**].
58. За пръв път са разработени и метаболитно охарактеризирани *in vitro* системи от балканска чубрица (*Satureja montana*) с различна степен на диференциация [**публикация 151**]. Доказано е, че получаваната биомаса е подходяща както за директна консумация, така и получаването на хранителни адитиви богати на антиоксиданти (розмаринова киселина) или етерично масло със стандартизиран състав [**непубликувани данни**].
59. Разработен е биотехнологичен процес, базиран на технологията с временно разбъркване, за микроразмножаване на червена и черна боровинки [**публикации 13 и 21**] и биологично активни вещества – полифеноли и пентациклични тритерпени [**непубликувани данни**]. Получените данни показват, че тези култури са следващите кандидати за развитието на технологии в областта на растителната клетъчна агрономия.

На база изследванията на биосинтеза на биологично активни вторични метаболити от растителни *in vitro* системи, нетрадиционните методи за култивиране, индуцираната полиплоидия и ендоредупликацията, мултиметаболитните анализи, новите и нетрадиционни биореакторни системи, както и растителната клетъчна агрономия е разработена концепцията за интегрирания подход за структуриране и оптимизиране на биосинтетичните процеси [публикации 2, 56, и 57]. Използването на тази експериментална матрица позволява практически разработването на процеси за биосинтез на всеки един нискомолекулен вторичен метаболит от всички известни видове растителни *in vitro* системи. Международната научна общност прие този подход и като пряко следствие списание Engineering of Life Sciences (IF=2,3) публикува поредица от специални броеве посветени на темата, чийто редактор е чл.-кор. Ат. Павлов [публикации 61, 92 и 112]. Селектираните публикации в тези специални издания привлякоха рекорден брой цитирания [виж приложената «препоръката-оценка» на проф. Томас Блей]. В същият контекст и издателството Springer-Nature покани чл.-кор. Павлов и проф. Томас Блей да организират и публикуват книга по темата – “Bioprocessing of Plant *in vitro* systems” [публикация 4].

Резултатите, представени до тук са обобщени в 4 книги/монографии [публикации 3, 4, 5, и 6], 13 глави от монографии [публикации 9-13 и 15-21], издадени от утвърдени чуждестранни издателства, както и са получени покани и са отпечатани поредица обзорни статии [публикации 56, 57, 61, 83, 87, 89, 91, 92, 105, 106, 112, 115 и 119]. Пряко следствие е и получената покана и двугодишен трудов договор за организиране на нова научна група от млади немски учени в областта на растителните биотехнологии и биопроцесорното инженерство на растителните *in vitro* системи в Института по хранителни технологии и биопроцесорно инженерство към Техническия университет на Дрезден, Германия. Тази група понастоящем е една от основните в института [приложен документ от ръководителят на института]. Този факт дефинира влиянието на научната тематика и приноси не само по отношение

на научните изследвания, но и в контекста на изграждането на Европейското научно пространство.

7. Анализ и биомониторинг на растения и хранителни системи

59. Разработена е методичната база за анализ и биомониторинг на растителни и хранителни системи. Адаптирани, модифицирани и новоразработени са редица аналитични методи: GC/MS метаболитно профилиране, денситометрични методи за анализ на тропанови, амаралида алкалоиди, HPLC метод за амаларида алкалоиди, HPLC метод за анализ на флоридзин, HPLC метод за анализ на тритерпенови киселини, денситометричен метод за анализ на протопин, тънкослойно-хроматографски метод за нанализ на ацетилхолин естераза инхибираща активност, HPLC метод за анализ на моно- и дизахариди, HPLC метод за определяне на токофероли, HPLC метод за определяне на ликопен, лутеин и бета-каротен, HPLC метод за анализ на органични киселини, HPLC-RID метод за анализ на инулин и фруктоолигозахариди, *in vitro* модел на гастро-интестинален тракт, изолиране на нативни клетъчни ядра и следващ проточно-цитометричен анализ, различни методи за *in vitro* анализ на антиоксидантната активност, методи за ултразвукова и микровълнова екстракция [публикации 40, 42, 46, 58, 59, 66, 69, 84, 85, 86, 98, 128, 131, 172, 176, 178, 179 и 180].

60. На база принос 59 са изследвани и охарактеризирани голям брой ядливи и медицински растителни видове, представители на българската флора: *Nepeta cataria*, *Haberlea rhodopensis*, *Cichorium intybus*, *Helianthus tuberosus*, *Fragaria vesca*, *Stevia rebaodiana*, *Achillea millefolium*, *Taraxacum officinale*, *Fumaria* spp., *Ficus carica*, *Nectaroscordum siculum* ssp. *Bulgaricum*, *Coridalis* spp., *Vaccinium* spp., *Inula helenicum*, *Fragara vesca*, *Rosa canina* [публикации 95, 96, 97, 100, 101, 109, 116, 117, 118,

120, 128, 130, 132, 133, 134, 136, 137, 139, 142, 143, 144, 177 и 181].

Определен е техният потенциал като източници на фармацевтични субстанции и хранителни адитиви.

61. Разработен е и алгоритъм за характеристика на представители на българската флора като източници на млечно-кисели бактерии [*публикации 16, 79, 135 и 183*].

62. Развита е тезата за използването на хитина (вторият по разпространение полизахарид на планетата) на база биотехнологичната му обработка с хитиназа [*публикации 14 и 93*].

63. В контекста на „зелената сделка“ е разработена и темата за оползотворяването на отпадните продукти, съпътстващи хранителните технологии [*публикации 103, 114 и 147*].

Развитата методична база е основа за разработването на алгоритми за комплексен (ОМИКС) анализ на традиционни за България хранителни системи. Първи стъпки в тази посока са финансираните проекти от Фонд Научни изследвания за ОМИКС анализи на българския пчелен мед и определяне на здравословният му потенциал и създаването на нови сортове български домати с повишена антиоксидантна активност на техните плодове [*публикации 99 и 138*].

8. Други

64. Разработени са оригинални системи за микроразмножаване на *Narcissus* spp. от Иверийския полуостров, ендемитът от Мароко *Lapiedra martinezii* и *Fabiana imbricata* [*публикации 108, 110, 111 и 121*].

9. Основни приноси, произтичащи от стопанските договори

65. Създадени и внедрени са поредица технологии за производство на активни козметични ingrediente - “InnovaStemCell Rosa damascena® EM”; “InnovaStemCell Rosa damascena® W”; “InnovaStemCell Rosa rugosa® EM”; “InnovaStemCell Rosa rugosa® W”; “InnovaStemCell Calendula® W”; “InnovaStemCell Calendula® EM”; “InnovaStemCell Rosa DUET® EM”; “InnovaStemCell Rosa DUET® W”; “InnovaBioTech Haberlea®”. Технологиите са внедрени и са интегрална част от производството на фирма „Инова БМ“ ООД. *Тези технологии очертават новата за българската индустрия област на биотехнологичната козметика.* Разработките са защитени с подадени две патентни заявки патента – една за патент със световно покритие световен, патентно ведомство в Женева (194 държави) и една за патент с българско покритие, както и с 1 регистриран полезен модел в България. *Продуктите се реализират на четири континента [приложени са съответните потвърждаващи документи].* Технологиите са разработени на база съответните растителни *in vitro* системи, в съчетание с принципите на зелената химия и използване на пълния потенциал на клетъчния метаболизъм – безекстракционно изолиране на активните съставки от растителната клетка, базирано на балистично наномизиране на клетъчната стена.
66. Създаден е оригинален екстракционен алгоритъм за успоредно извличане на хидрофилни и хидрофобни биологично активни вещества от растителни матрици. Методът е внедрен и е интегрална част от производството на продуктите на Багра Колор Къмпани ЕООД.
67. Разработена е технология за наноенкапсулиране на хидрофобни растителни биологично активни вещества, осигуряваща интегрирането им в хидрофилни хранителни системи и адитиви. Технологията е одобрена и е в процес на внедряване от Багра Колор Къмпани ЕООД.

II. Принос в укрепването на БАН и университетите

1. Като дългогодишен ръководител на Лабораторията по приложни биотехнологии при ИмикБ-БАН и впоследствие професор по биотехнологии към Университета по хранителни технологии в Пловдив, както и преподавател в Аграрния университет, е организирано съвместно извеждане на учебни дисциплини на територията на Лабораторията, разработване на дипломни работи, както и преддипломни стажове, като по този начин дейността и потенциала на БАН става видим за студентите с потенциал за научна кариера;
2. Активна работа в структурата на Регионален академичен център Пловдив, с което се допринася за утвърждаването на БАН като водеща национална научна структура;
3. Формирани са смесени научни колективи между учени от БАН и преподаватели от университетите, които успешно кандидатстват и работят по редица научни проекти.
4. Най-добрите студенти, завършващи свързани специалности в УХТ-Пловдив, традиционно продължават своето развитие като докторанти в БАН или съвместни докторанти между БАН и катедри от УХТ (към настоящия момент 5 докторантури);
5. Установени са връзки между БАН, пловдивските университети и бизнеса. Пряк резултат са дългосрочните договори за съвместна работа между ИмикБ-БАН, Багра Колор Къмпани ЕООД, Неофарма ООД и Инова БМ ООД – Лабораторията по приложни биотехнологии, впоследствие Лаборатория по клетъчни биосистеми, в сътрудничество с Университета по хранителни технологии се развива като аналитичен и консултантски център в областта на биологично активните вещества, което е от съществено значение за дребния бизнес, който не е в състояние да организира собствени аналитични звена;
6. *Създадена е ежегодна награда за „стойностна публикация“ на преподавател от Университета по хранителни технологии с цел популяризиране на стойностната наука сред университетските преподаватели. Пръв лауреат на наградата е проф. Аткарян, автор на научен труд, публикуван в списание с Импакт фактор=11,4. За наградата се даряват 1500 лв. ежегодно.*

III. Принос в създаването на нови лаборатории

1. Дългогодишното ръководство на Лабораторията по приложни биотехнологии при Института по микробиология при БАН резултира в създаването на две нови лаборатории - Лаборатория по клетъчни биосистеми и Лаборатория по метаболомика, ръководени от бивши докторанти на чл.-кор. Ат. Павлов. Тези лаборатории понастоящем се утвърждават като лидери в научните изследвания в рамките на Института по микробиология;
2. Създадена е нова лаборатория по растителни биотехнологии в УХТ, Пловдив;
3. В процес на създаване е лаборатория и научна група по „Механизъм и анализ на биологичната активност на хранителни системи“ в УХТ, Пловдив.

IV. Принос в създаването на нови научни школи, направления, учебни дисциплини

1. Създадена е нова научна група от млади немски учени в областта на биопроцесорното инженерство на растителни *in vitro* системи в Института по хранителни технологии и биопроцесорно инженерство към ТУ Дрезден, Германия [**приложени е документ**];
2. Развити са новите за България научни направления: „Индуцирана полиплоидия и ендоредупликация и значението им за вторичния метаболизъм на растителната клетка“; „Биопроцесорно инженерство на растителни *in vitro* култури“ и „Нови и нетрадиционни биореакторни системи за култивиране на растителни *in vitro* системи“;
3. Доказателство за развитие на научна школа в областта на биологично активните вещества от растителни *in vitro* системи е кариерното развитие на защитилите докторанти (1 професор, 2 доценти, двама главни асистенти в процедура за хабилитиране, 1 гл. асистент, 1 ръководител на звено „ферментационни процеси“ в групата фармацевтични фирми Хюефарма). Тези колеги и техните асистенти

представляват около 90% от учените, които работят в областта на растителните клетъчни биотехнологии в България;

4. Разработени са 9 нови учебни дисциплини и техните програми, 2 от които за немски университети;
5. Ръководител на международна магистърска програма «Анализ и контрол на хранителни продукти» - УХТ и Университет на Западна Македония, Гърция 2014-2021.

V. Приноси в популяризацията и разпространението на постиженията на науката в България

1. Организиран, редактиран, отпечатан и разпространен са два специални броя - Balkan Biotechnologies I и Balkan Biotechnologies II на едно от водещите списания в областта на биоинженерството - Engineering in Life Sciences, с което е популяризирано развитието на биотехнологичната наука в България.
2. ***Работата като член-кореспондент на Саксонката академия на науките, академия в която през годините са членували 11 Нобелови лауреати, измежду които и Макс Планк, поставя в центъра на вниманието на немската академична общност развитието на растителните биотехнологии в България и в частност в БАН и Университета по хранителни технологии – [приложени са материали от отзвука за избора за член на академията, както и мнение-становище на проф. Блей относно чл.-кор. Ат. Павлов].***