

Справка за най-важните постижения и тяхното значение за развитието за науката на проф. дн инж. Калоян Кирилов Петров

Въведение

Биотехнологичното получаване на ценни нискомолекулни съединения се разглежда като един от най-перспективните начини за осъществяване на смяната на икономическия модел от петрорафинерия към биорафинерия. До момента обаче, примерите за създадени биотехнологии, заменили в индустрията съответните химични методи на синтез, не са много. Една от причините е цената на основния въглерод източник, съставляваща в много случаи до над 50 % от цената на крайния продукт. Поради това, акцентът в биотехнологичните производства е насочен към намиране на все по-евтини субстрати. Усвояването на тези субстрати обаче, по правило е неефективно и се нуждае от разработване на нови методи за контрол на процеса и допълнително технологично оптимизиране.

Основната част от представените по-долу постижения имат значение за повишаването на ефективността на тези процеси, така, че използвайки евтини и възобновяеми субстрати (глицерол, нишесте, инулин и др.), целевия продукт да бъде получен с висок добив и продуктивност, обезпечавайки един икономически ефективен процес. Безспорни постижения са и разработените технологии за получаване на функционални храни и препарати за растителна защита.

Постижения при разработването и оптимизирането на биотехнологични процеси за получаване на ценни продукти

- 1. Разработен е биотехнологичен процес за получаване на 2,3-бутандиол от глицерол, при който за първи път в света 2,3-бутандиолът е получен като основен продукт на ферментацията.** Този резултат е постигнат след установяване на оптималните условия за провеждане на процеса: (i) тип ферментация: периодичен процес с подхранване на субстрат; (ii) температура 37 °C; (iii) начално рН на средата 8.0 и неконтролирано рН по време на процеса; (iv) хранителната среда без наличие на Co^{2+} ; (v) микроаерофилни условия, осигурени с аерация на стерилен въздух от 2.2 vvm и скорост на разбъркване 200 rpm. Разработената биотехнология отваря принципната възможност за промишлено производство на 2,3-бутандиол на базата на отпаден глицерол.
- 2. Създаден е нов метод за рН контрол на ферментационни процеси, т.нар. „метод на изкуствените рН флуктуации”,** при който рН на средата циклично се променя. В едната посока промяната се осъществява изкуствено, а в другата – естествено, вследствие на метаболизма на клетките. Изкуствените рН флуктуации могат да са с различната амплитуда (ΔpH), в зависимост от количеството добавена основа и да бъдат осъществявани през различен интервал от време (Δt). Прилагането на метода при смесено-киселите ферментации води до промяна в метаболизма на клетките, като ферментацията се измества от продуциране на киселини към продуциране на алкохоли. Конкретно при конверсията на глицерол до 2,3-бутандиол, прилагането на метода води до увеличаване на добива и крайната концентрация на продукта (от 49.2 г/л до 70 г/л). При конверсията на глицерол до 1,3-пропандиол – до увеличаване на продуктивността. Съответно, определени са оптималните рН флуктуации за получаване на 2,3-бутандиол от глицерол: $\Delta\text{pH}=1.0$, $\Delta t=12\text{h}$, както и за получаване

на 1,3-пропандиол - $\Delta pH=1.0$, $\Delta t=3h$ – за получаване на максимална концентрация; $\Delta pH=1.5$, $\Delta t=3h$ – за получаване на максимална продуктивност. Методът може да бъде приложен в широк кръг ферментационни процеси.

3. **Разработена е биотехнология за директно получаване на 2,3-бутандиол от нишесте**, базираща се на първата хетероложна експресия на ген за α -амилаза от *Bacillus licheniformis* 44MB82/G, под контрола на индуцируем промотор *Plac* в свръхпродуцент на 2,3-бутандиол. По този начин продуктът се получава директно от нишесте, в едностъпален процес на едновременно озахаряване и ферментация (SSF) чрез генетично модифициран щам (*Klebsiella pneumoniae* G31-A). След оптимизиране на процесните параметри са получени 53.8 г/л 2,3-бутандиол, с добив 0.3 г/г и продуктивност 0.5 г/лч. Получените концентрация и продуктивност са съответно 14 и 3 пъти по-високи от тези в света до момента. За постигането на този резултат са установени оптималните количества на индуктора IPTG, кофактора Ca^{2+} и на разрежавания клетъчната стена агент - глицин. Разработеният процес принципно отваря възможността за промишлено получаване на 2,3-бутандиол от нишесте и нишестени материали.
4. **Разработена е биотехнология за директно получаване на млечна киселина от нов субстрат – инулин съдържащо цикориево брашно**. Чрез метаболизма на естествения изолат *Lactobacillus paracesei* B41, получените в този SSF-процес концентрация, добив и продуктивност на целевия продукт млечна киселина са най-високите постигнати до момента от инулин - 151 g/L, 0.83 g/g и 1.09 g/Lh, съответно. След извършена комплексна оптимизация са установени оптималните параметри на процеса: (i) провеждане на процеса като периодичен; (ii) оптимален състав на азотните източници в хранителната среда - 5 g/L дрождев екстракт и 22 g/L царевичен хидролизат; (iii) оптимално съдържание на Mn^{2+} в средата - 15 mM;

(iv) провеждане на процеса при температура 37 °C, pH на хранителната среда 5.50 и скорост на разбъркване 200 rpm без допълнителна аерация.

Освен научноприложен, постижението има и фундаментален научен принос за изясняване на ключовото влияние на мангана в цялостния процес на метаболизиране на инулина от *L. paracasei* B41 до млечна киселина: (i) алостерично въздействие върху инулиназния ензим, повишаващо активността му; (ii) позитивно действие като кофактор на ензимите от гликолитичната верига; (iii) облекчен транспорт на фруктоза (действие върху PTS чрез фосфорилиране на HPr); (iv) инхибиращо действие върху експресията на *fosE*, чрез подпомагане на фосфорилирането на HPr и CsrA (формиращи във фосфорилирано състояние активен комплекс на *cre* сайта).

Промислено, към момента млечната киселина се получава биотехнологично, на базата на нишесте (царевица) или захароза (захарна тръстика). Разработената технология отваря възможността за нов начин на производство – на базата на инулин съдържащи материали.

- 5. Разработен е нов биотехнологичен процес за микробно получаване на фруктоза от инулин.** Процесът на едновременно озахаряване и ферментация на инулин, изпълнен като периодичен процес с подхранване в среда без съдържание на соли, води до ускорение на хидролизния процес и до почти пълно възпрепятстване на последващата го ферментация. В резултат, в средата се акумулират огромни количества неметаболизирана фруктоза. Установени са оптималните условия за получаване на фруктоза от инулин-съдържащо цикориево брашно: (i) провеждане на процеса като периодичен с подхранване; (ii) липса на соли и микроелементи в хранителната среда; (iii) оптимален състав на азотните източници в хранителната среда - 10 g/L дрождев екстракт и 10 g/L бактопептон; (iv) провеждане на процеса при температура 33 °C, pH на средата 5.50

и скорост на разбъркване 100 грт. При тези условия, от 675 g цикориево брашно са получени 467 g фруктоза (36 % разтвор).

Научния принос на постижението е установяването на факта, че силната инулиназна активност при процесите в среда без метални йони се дължи на седемкратно увеличаване на нивата на експресия на инулиназния ген.

Разработеният метод притежава редица предимства пред ензимните и химични методи за получаване на фруктоза, включително на фруктоза от инулин: (i) Ензимната активност на произведената по време на ферментационния процес инулиназа достига много по-високи стойности и се запазва за много по-продължителен период от време, в сравнение с тази на пречистеният ензим; (ii) Процесът се извършва при по-меки условия и при по-ниски температури; (iii) Избягват се предварителните етапи на получаване, пречистване и съхранение на нужния за третиране ензим; (iv) Обикновено при ензимното получаване на фруктоза е необходимо мултиензимно третиране, което не е нужно при настоящия метод.

Друго важно приложение на разработения процес е използването на ферментационната среда, след отделяне на клетките, за получаване на високо концентрирани фруктозни сиропи в хранителната промишленост.

- 6. Разработен е биотехнологичен процес за получаване на ацетоин от отпаден глицерол.** След селекция на щам продуцент (щам *Bacillus subtilis* 35, депозиран в Немската колекция за микроорганизми и култури като DSM 113 620) и технологично оптимизиране на процеса по схемите на Placket-Burman и централен композиционен дизайн, от отпаден глицерол (използван е отпаден глицерол от производството на биодизел от фабрика в Русе) като единствен въглероден източник бяха получени 78 г/л ацетоин. Този резултат има изключително значение по следните причини (i) до момента не са известни продуценти на ацетоин от глицерол, а само от захари; (ii)

получените максимални количества ацетоин от глюкоза са приблизително същите – до 80 – 82 г/л, но цената на използвания отпаден глицерол е пренебрежима в сравнение с цената на простите захари; (iii) липса на алтернативни евтини производства, вследствие на което ацетоинът е изключително скъп продукт (около 140 долара за килограм чист ацетоин). В допълнение, по ювелирен начин беше доказано, че концентрации на ацетоин от 75 – 80 г/л определят крайната толерантност на клетките към ацетоин, независимо от използвания субстрат. В този смисъл, не е възможно последващо технологично оптимизиране на процеса.

Според доклад на Министерството на енергетиката на САЩ от 2004 г., ацетоинът е сред 30-те химични съединения, изискващи в най-висока степен спешно и приоритетно производство по биотехнологичен път, поради липса на ефективни алтернативи. В този смисъл, представения биотехнологичен процес е изключително подходящ за промишлено получаване на ацетоин.

7. **Разработен е биотехнологичен процес за получаване на 2,3-бутандиол от инулин съдържащо цикориево брашно.** За първи път 2,3-бутандиолът е получен в значителни количества в едностъпален процес на микробна хидролиза и ферментация, без добавяне на пречистени ензими (инулинази). За целта е селектиран щам (*Bacillus liccheniformis* 24), свръхпродуцент на 2,3-бутандиол, притежаващ силна инулиназна активност и е извършена комплексна оптимизация на технологичните параметри. Установено е, че за усвояване на разтворимо цикориево брашно, ключов параметър е рН на средата, както и е доказано, че хидролизният процес се осъществява главно от ензима фруктан β -фруктозидазата SacC (екзоинулиназа, ЕС 3.2.1.80), чиято експресия силно зависи от рН на културалната течност. Предимствата на разработения процес са следните: (i) за получаване на целевия продукт е използван нов, възобновяем и изключително евтин субстрат – инулин съдържащо

цикориево брашно; (ii) получените количества 2,3-бутандиол (67.5 г/л) са най-високите постигнати до момента от инулин съдържащ субстрат; (iii) тези количества са получени в процес на едновременно озахаряване и ферментация, под действието на един организъм, без добавяне на скъпо струващи ензими.

- 8. Установени са ключови фактори за толерантността на клетките към бутанол.** Основна пречка пред биотехнологичното получаване на бутанол е ниската толерантност на продуцентите към продукта. Поради това, основно внимание се обръща на факторите, определящи толерантността на организмите към бутанол.

Установено е, толерантността на клетките към бутанол се определя от степента на хидрофилност на клетъчната стена, като колкото по-хидрофобна е тя, толкова по-ниска концентрация на бутанол е летална за клетката. Също така, изследвайки генната експресия на над 300 гена, са установени множество генетични фактори, водещи до повишена толерантност – действието на централните регулаторни гени, гените отговорни за поправката на протеини и за изпомпване на токсичния бутанол извън клетката са определящи за това как клетката ще се справи с бутаноловия стрес. Тези постижения имат значителен научен принос за създаването на щамове с подобрена толерантност, способни да издържат на високи концентрации бутанол и, съответно, да могат да го продуцират в значителни количества. Разрешаването на проблема с толерантността е единствения начин за осъществяване на ефективно биотехнологично производство бутанол.

- 9. Разработен е нов метод за имобилизация на клетки в полиакриламиден гел.** Методът е приложен при имобилизацията на клетки на *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 за получаване на млечна киселина от суроватка. Методът осигурява повишена здравина на включването на клетките в гелната матрица, многократно по-нисък теч на клетки и възможност за многократно

използване на имобилизираната култура. Осигурената по този начин висока клетъчна плътност води до повишаване на добива на млечна киселина.

Постижения при разработването на препарат за растителна защита

10. Разработен е препарат за растителна защита „Фитобактин“ на базата на българския изолат *Bacillus velezensis* R22. Препаратът е с тройно действие – фунгициден ефект срещу най-значимите гъбни патогени *Phytophthora infestans* и *Botrytis cinerea*, бактерициден ефект срещу причинителя на т.нар. кафяво гниене, бактерията *Ralstonia solanacearum*, и общо стимулиращо действие върху растителния организъм, продуцирайки летливи органични съединения като ацетон и 2,3-бутандиол. За повишаване на ефективността на препарата са оптимизирани хранителната среда и процесните параметри, така че в течната си форма, той да съдържа максимално количество жизнеспособни спори на щам R22 и максимална концентрация на основните фунгицидни и бактерицидни агенти – фенгизин и сурфактин. Като биопестицид, предимствата на препарата са следните: (1) препаратът е евтин – производството се базира на хранителна среда, съдържаща захар и соев шрот, (2) екологично чист е като технология на производство и съдържание, (3) предлага се в течен и лиофилизиран вариант с голяма трайност – над 2 години на течния вариант и над 5 години за лиофилизираната формулировка.

05.06.2024 г.

София

С уважение:

/проф. Калоян Петров/