



## Информация за изпълнение на етап на проект

<b>Наименование на конкурса:</b>
Конкурс за финансиране на научни изследвания – 2017 г.
<b>Основна научна област:</b>
Технически науки
<b>№ на договор:</b>
ДН 17/1
<b>Начална и крайна дата на проекта:</b>
11.12.2017 – 11.06.2019
<b>Заглавие на проекта:</b>
Получаване на 2,3-бутандиол чрез ферментация на отпадна биомаса от новоизолирани и рекомбинантни щамове
<b>Базова организация:</b>
Институт по инженерна химия - БАН
<b>Партньорски организации:</b>
Институт по микробиология - БАН
<b>Ръководител на научния колектив (академична длъжност, научна степен, име):</b>
Проф. дн Калоян Петров
<b>Общ размер на отпуснатото финансиране за първи етап:</b>
60000
<b>Интернет страница на проекта (ако има такава):</b>
<b>Научни публикации по проекта:</b>
Публикации: <ul style="list-style-type: none"><li>• Petrova P., Velikova P., <u>Petrov K.</u> (2019) Genome sequence of <i>Bacillus velezensis</i> 5RB – an overproducer of 2,3-butanediol. <i>Microbiology Resource Announcements</i>, vol. 8(1), e01475-18. (<a href="https://doi.org/10.1128/MRA.01475-18">https://doi.org/10.1128/MRA.01475-18</a>) (SJR 0.553 - 2017)</li></ul>
Постерни съобщения: <ul style="list-style-type: none"><li>• Kaloyan K Petrov, Flora V Tsvetanova, Petya V Velikova, Penka M Petrova (2018) Novel Bacilli sp. isolates producing 2,3-butanediol have the potential to degrade lignocellulose. 21 th European Biotechnology Congress, 11-12 Oct. 2018, Moscow, Russia (J Biotechnol Biomater 2018 vol. 8)</li><li>• Penka M Petrova, Petya V Velikova, Flora V Tsvetanova, Kaloyan K Petrov (2018) De novo whole genome sequencing of 2,3-butanediol producing Bacillus sp. strain 5RB. 21 th European Biotechnology Congress, 11-12 Oct. 2018, Moscow, Russia (J Biotechnol Biomater 2018 vol. 8)</li></ul>



**Описание на очакваните резултати по проекта (до 1 стр. в рамките на полето по-долу):**

Очакваните резултати за Етап I са добре описани в проектното предложение. Свеждат се до изпълнението на 4 работни пакета:

- РП1 – Изолиране на нови продуценти на 2,3-БД
- РП2 – Идентификация на непатогенни продуценти
- РП3 – Подбор и анализ на химичния състав на отпадни продукти
- РП4 – Анализ на ензимни активности на новоизолираните непатогенни щамове

В този смисъл, крайният очакван резултат за първи етап е изолирането и идентифицирането на щам, отговарящ на следните условия: да е свръхпродуцент на 2,3-БД; да е непатогенен и да притежава подходящ субстратен спектър за усвояване на захари и полизахариди, съдържащи се в отпадната биомаса (лигноцелулоза, смесени целулозо-нишестени субстрати, отпаден глицерол или субстрати съдържащи ФОЗ).

През втория етап на проекта, в този щам ще бъдат въведени гени от други организми (с цел засилване на естествените му ензимни активности), като крайната цел на проекта е създаването на модифициран производствен щам за получаване на 2,3-БД от отпадна биомаса.

Очакваният резултат за Етап I е постигнат напълно. По конкретно за изпълнението - Вж. Стр. 4.



## Членове на научния колектив

<i>Организации/участници<sup>1</sup></i>	<i>Бележка<sup>2</sup></i>
<i>Базова организация:</i>	
Институт по инженерна химия - БАН	
<i>Ръководител на научния колектив</i>	
Проф. дн Калоян Петров	
<i>Участници:</i>	
Гл. ас. д-р Флора Цветанова Гл. ас. д-р Евгения Василева Гл. ас. д-р Грета Найденова Ас. Стефан Стефанов Маг. Деница Миленкова Ася Николова Деница Господинова	МУ  МУ МУ СТ СТ
<i>Партньорска организация:</i>	
Институт по микробиология - БАН	
<i>Участници:</i>	
Доц. д-р Пенка Петрова Гл. ас. д-р Петър Грозданов Гл. ас. д-р Румяна Енева Ас. д-р Антон Стоянов Катя Минкова	МУ СТ

<sup>1</sup> Отбележете академичната длъжност, научната степен, име и фамилия на всеки участник като включите и участниците, които са работили по проекта не през целия период за изпълнение на проекта

<sup>2</sup> Отбележете дали участникът в колектива е млад учен (МУ), постдокторант (ПД), докторанти (ДО) или студенти (СТ), или учен от чужбина (УЧ).



**Постигнати резултати от изпълнението на проекта и кратък анализ на тяхната приложимост (до 1 стр. в рамките на полето по-долу)**

Етап I съдържа четири работни пакета (РП1 – РП4), чиито срок за изпълнение завършва с приключването на етапа.

По РП1 (Изолиране на нови продуценти на 2,3-БД) беше извършено следното: Новоизолирани бяха от цялата страна 119 изолата. Към тях бяха прибавени още 21 колекционни щама и всичките 140 щама бяха тествани (чрез Voges-Proskauer тест и HPLC) за продуциране на 2,3-БД. Продуциращи бяха 77 от щамовете.

РП2 (Идентификация на непатогенни продуценти): 77-те продуцента бяха идентифицирани морфологично, физиологично и генетично (по секвенция на 16S rDNA). При 100 % идентичност на секвенциите с повече от един вид, беше използван биохимичен критерии за идентификация (API тест). По този начин бяха идентифицирани 65 продуцента на 2,3-БД, принадлежащи към напълно непатогенни видове.

РП3 – РП4: 65-те щама бяха изследвани за целулазна активност (разграждане на 0,01 % карбоксиметил целулоза в среда с червено багрило и отделно на хидроксиетил целулоза по стандартни процедури за целулазна активност), амилазна активност, способност за разграждане на инулин и глицерол. Също така, щамовете бяха изпробвани за активност към на практика всички захари и полизахариди, съдържащи се в лигноцелулозната биомаса – арабиноксилан, галактоманан, курдалан, разклонен арабинан, декстран, ксилоглюкан, бета-глюкан, ксилан и др. От захарите – активност към целобиоза, рафиноза, ксилоза, арабиноза, галактоза, малтоза и маноза. По този начин, на базата на специфичните им активности, непатогенните продуценти на 2,3-бутандиол бяха селектирани до 19.

Отделно, бяха изпробвани продуктивните възможности на всички 65 непатогенни щама. Те бяха култивирани на 5 различни хранителни среди (взети от литературата за получаване на 2,3-БД от различни бацили) с въглероден източник глюкоза. Чрез опити с нарастваща концентрация на субстрат, бяха селектирани 4 свръхпродуцента на 2,3-БД (*Bacillus velezensis* 5RB, *Bacillus licheniformis* 13, *Bacillus licheniformis* 24 и *Bacillus safensis* 14A), продуциращи го в концентрация над 25 г/л от 100 г/л глюкоза.

От друга страна, като щамове с най-силна целулазна активност бяха определени *Bacillus velezensis* 5RB и *Bacillus toyonensis* 11RA, с най-силна амилазна активност - *Bacillus licheniformis* 24, с най-силна инулиназна активност - *Bacillus toyonensis* 1RB, *Bacillus thuringiensis* 1RA, *Bacillus velezensis* 5RB, *Bacillus toyonensis* 11RA и *Bacillus safensis* 14A.

Като краен резултат, като хост за работа през втория етап на проекта, беше избран щам *Bacillus velezensis* 5RB. Той притежава най-силна целулазна активност от всички изследвани щамове, сравнително високи амилазна и инулиназна активност, както и активност към почти всички изследвани захари и полизахариди. Също така, 5RB е и 4-ти по продуциране на 2,3-БД от глюкоза (27,01 г/л от 100 г/л глюкоза).

Поради това, беше секвениран пълният му геном. Секвенирането разкри, че освен вече известните гени *alsS*, *alsD* и *bdhA*, кодиращи ацетолактат-синтаза, ацетолактат-декарбоксилаза и бутандиол-дехидрогеназа, 5RB притежава и седем пълни клъстера за синтез на антибиотици (макролактин, бацилаен, дефицидин, фенгицин, бацилбактин,



бацилисин и сърфактин), което е предпоставка за разработване на биотехнологичен процес за синтез на 2,3-БД в нестерилни условия. Резултатите бяха публикувани в американското списание *Microbiology Resource Announcements*.

Отделно, описаните резултати бяха представени на 21-вия конгрес по биотехнология в Москва (октомври 2018), като единият от постерите (Novel Bacilli sp. isolates producing 2,3-butanediol have the potential to degrade lignocellulose) спечели наградата за „Най-добър постер“ на конгреса (Best Poster Award).