



Българска академия на науките

Институт по инженерна химия

Лидия Пламенова Цигорийна

ПОЛУЧАВАНЕ НА 2,3-БУТАНДИОЛ ОТ ИНУЛИН
ЧРЕЗ МОДИФИЦИРАН НЕПАТОГЕНЕН
ПРОДУЦЕНТ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и
научна степен „доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки,
математика и информатика

Професионално направление: 4.2. Химически науки

Докторска програма: Процеси и апарати в химичната и
биохимичната технология

Научен консултант: проф. дн Калоян Петров

София, 2023 г.

Българска академия на науките

Институт по инженерна химия

Лидия Пламенова Цигорийна

ПОЛУЧАВАНЕ НА 2,3-БУТАНДИОЛ ОТ ИНУЛИН
ЧРЕЗ МОДИФИЦИРАН НЕПАТОГЕНЕН ПРОДУЦЕНТ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и
научна степен „доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки,
математика и информатика

Професионално направление: 4.2. Химически науки

Докторска програма: Процеси и апарати в химичната и
биохимичната технология

Научен консултант: проф. дн Калоян Петров

Научно жури:

1. проф. д-р Драгомир Янков
2. проф. д-тн Венко Бешков
3. проф. д-р Таня Пенчева
4. проф. д-р Людмила Кабаиванова
5. доц. д-р Мария Гергинова

Дисертационният труд съдържа: 102 страници, 19 фигури и 16 таблици. В библиографията са включени 206 литературни източника.

Експерименталната работа е извършена в Институт по Инженерна Химия и Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“

Защитата на дисертационният труд ще се проведе

на: от

часа в Институт по Инженерна Химия – БАН, София, ул.
“Акад. Георги Бончев“, блок 103

Тема: Получаване на 2,3-бутандиол от инулин чрез
модифициран непаогенен продуцент

Автор: Лидия Пламенова Цигорийна

Материалите по защитата са на разположение, в
канцеларията на Институт по Инженерна Химия – БАН.

Съдържание:

Съдържание:	3
Списък на използваните съкращения	4
1. Въведение	5
2. Цел и задачи	7
3. Материали и методи	8
4. Резултати.....	15
4.1. Получаване на 2,3-БД от глюкоза.....	15
4.2. Получаване на 2,3-БД от фруктоза	30
4.3. Получаване на 2,3-БД от инулин.....	33
5. Обсъждане на резултатите	41
5.1. Оптимизиране на хранителната среда за получаване на 2,3-БД.....	41
5.2. Оптимизиране на процесните параметри за получаване на 2,3-БД.....	42
5.3. Получаване на 2,3-БД от глюкоза.....	46
5.4. Получаване на 2,3-БД от фруктоза	47
5.5. Получаване на 2,3-БД от инулин.....	48
6. Изводи.....	49
7. Приноси	51
Литература.....	53

Списък на използваните съкращения

2,3-БД	2,3-бутандиол
BDH	2,3-БД дехидрогеназа
CCD	централен композитен дизайн
HPLC	високоэффективна течна хроматография
MOPS	3-морфолино пропан сулфонова киселина
RI детектор	рефрактометричен детектор
rpm	обороти в минута
UV детектор	ултравиолетов детектор
WT	див тип
DO	разтворен кислород
OD	оптична плътност
DNS реагент	3,5-динитросалицилова киселина

1. Въведение

Поради изчерпването на изкопаемите природни ресурси, непрекъснато нарастващото търсене на енергия както и повишената загриженост относно въглеродните емисии, опитите за промяната на базираното на петрол химическо производство в екологосъобразно, в момента имат стратегическо значение [1, 2, 3]. 2,3-бутандиолът (2,3-БД) е съединение с многостранно приложение, чието нарастващо търсене през последните десетилетия води до непрекъснато повишаване на обема на производството му. Както много други ценни химикали, 2,3-БД може да бъде получен химично и биологично, чрез метаболизма на редица бактерии.

В сравнение с химичните техники, микробиологичното производство на 2,3-БД има няколко предимства, включително относително висока ефективност и екологосъобразността на метода. Ефективното му получаване като метаболит е обект на интензивни научни изследвания през последните десетилетия, но и до момента по-рентабилно остава химичното му получаване от нефтопродукти. Причините са високата себестойност на използваните субстрати, патогенната природа на най-добрите продуценти, водеща до скъпоструващи мерки за обезопасяване на производството, както и енергоемкото и непълно извличане на 2,3-БД от ферментационната среда.

Изчисленията показват, че себестойността на биотехнологично получения 2,3-БД трябва да е под 1.2 \$/kg, за да може производството да се комерсиализира. За да бъде постигнат този резултат, изследванията са насочени към търсене на по-евтини източници на въглерод, разработване на нови методи за извличане, както

и на намиране на ефективни продуценти с непатогенна природа.

Целта на настоящия труд е да бъде разработен процес за получаване на 2,3-БД, който да спомогне за решаването на два от тези проблеми. Избран е непатогенен продуцент *Bacillus licheniformis* 24, а за субстрат е избран евтин и достъпен източник на въглерод–инулин съдържащо цикориево брашно. При тези условия, разработването на ефективен процес за получаване на 2,3-БД би било от съществено значение за комерсиализацията на процеса в индустриален мащаб.

2. Цел и задачи

2.1. Цел

Разработване на биотехнология за микробно получаване на 2,3-БД от инулин, чрез генетично модифициран щам *Bacillus licheniformis* 24.

2.2. Задачи

1. Оптимизиране на състава на хранителната среда за получаване на 2,3-БД;
2. Оптимизиране на процесните параметри за получаване на 2,3-БД;
3. Установяване на способността на дивия щам *B. licheniformis* 24 за конвертиране на инулин в 2,3-БД;
4. Клониране на ген за клетъчно свързана инулиназа (EC 3.2.1.80) от *Lactocaseibacillus paracasei* B41 (DSM 23505) в *B. licheniformis* 24;
5. Установяване на максималната възможност на модифицирания щам *B. licheniformis* 24 да продуцира 2,3-БД от съдържащо инулин цикориево брашно.

3. Материали и методи

Бактериален щам

Използваният щам *Bacillus licheniformis* 24 беше предварително изолиран от почвена проба, от брега на река Янтра (България), и се съхранява в микробиологичната колекция на Института по микробиология към БАН. Съхранява се под формата на 24 часови култури, замразени с добавен глицерол в съотношение 1:1 в епендорф-еппруветки с обем 2 mL във фризер при -80 °C.

Изолятът е идентифициран до вид чрез 16S рДНК секвенация (NCBI GenBank accession no. MK461938).

Състав на хранителната среда

Като основна хранителна среда беше използвана среда, първоначално разработена за *P. polymyxa* от Okonkwo и колектив [4], модифицирана от Petrova и колектив [5], със следното съдържание:

Глюкоза 20 g/L; Дрождев екстракт 5 g/L;
Триптон 5 g/L; (NH₄)₂SO₄ 3 g/L; KH₂PO₄ 3.5 g/L;
K₂HPO₄ 2.75 g/L; MgSO₄ 0.2 g/L; NH₄CH₃COO 1.5 g/L;
CoCl₂ x 6 H₂O 0.09 g/L; Солеви разтвор* 3 mL/L
*Солеви разтвор (g/L): FeSO₄ 0.4; H₃BO₃ 0.8;
CuSO₄*4H₂O 0.04; NaMoO₄*2H₂O 0.04; MnCl₂ 5; ZnSO₄ 0.1;
Co(NO₃)₂*6H₂O 0.8; CaCl₂*2H₂O 1; Биотин 0.01.

При ферментациите с инулин е използвано неразтворимо цикориево брашно Frutafit® HD (Sensus B.V., Roosendaal, The Netherlands), съдържащо минимум 90 % инулин с молекули със степен на полимеризация DP 8 – DP 13, и до 10 % захари – смес от захароза, фруктоза и глюкоза.

Условия на култивиране

Експериментите за оптимизация на хранителната среда чрез Plackett – Burman и централен композитен (CCD) дизайни бяха проведени в 500 mL колби Erlenmeyer със 100 mL среда, съдържаща 100 g/L глюкоза при 37 °C и 200 rpm, на ротационен шейкър (New Brunswick, Сан Диего, Калифорния, САЩ).

Като инокулум беше използвана 24 часова култура, развита в колби от 500 mL с 50 mL среда, съдържаща 20 g/L глюкоза, при 37 °C, 200 rpm, на ротационен шейкър. Инокулумът беше развит до OD = 2.400 (измерено при дължина на вълната $\lambda = 600$ nm), количеството използван инокулум беше 2% за Plackett – Burman и 1% инокулум за експериментите от централения композитен дизайн.

Експериментите за оптимизация на процесните параметри, както и тези за валидиране на оптималните стойности, бяха проведени на 1 L ферментатор (Biostat® A plus, Sartorius Stedim Biotech, Gottingen, Германия), допълнително оборудван с отбойници за осигуряване на по-аеробни условия. Използвани бяха и допълнителна въздушна помпа и ротаметър за осигуряване на по-високи нива на подаване на въздушен поток. Стойността на pH беше контролирана чрез добавяне на 6M NaOH или 5M HCl.

Периодичното култивиране беше проведено чрез използването на вече оптимизираната хранителна среда и 10% инокулум (развит до OD₆₀₀ = 2.400). При периодичните ферментации с подхранване, допълнителното количество субстрат беше добавяно под формата на стерилен воден разтвор.

Аналитични методи

Определяне на биомаса (брой живи клетки)

Концентрацията на биомасата беше определяна чрез измерване на екстинкцията на пробата на спектрофотометър (VWR® UV-1600 PC) при дължина на вълната $\lambda=600$ nm, до OD=2.400, съответстващо на началото на стационарната фаза.

Определяне на концентрацията на метаболити

За качествено и количествено определяне на концентрациите на субстрат и продукти беше използвана високоефективна течна хроматография (HPLC). Количествата на глюкоза, млечна киселина, глицерол, ацетоин, 2,3-БД и етанол бяха определяни количествено с помощта на YL Instrument 9300 HPLC система (YL Instrument Co., Ltd., An-yang, South Korea). След предварително филтриране на ферментационните проби с бактериален филтър, разделянето на компонентите на пробата беше осъществено посредством колона HPX-87H (BioRad Laboratories, California, USA) при температура 65 °C и подвижна фаза (елuent) 5 mmol H₂SO₄ с дебит 0.6 mL/min.

Детекцията на компонентите беше извършена на базата на специфичния им рефрактометричен индекс на RI детектор (Perkin-Elmer, series 10, Waltham, Massachusetts, USA). Количественото определяне на млечна киселина и ацетоин беше допълнително потвърдено чрез UV детектор (YL9120UV/Vis detector) при дължина на вълната от 210 и 190 nm, съответно.

Методи за статистически анализ

Статистическият анализ на експерименталните резултати беше осъществен чрез създаване на регресионни

модели с помощта на софтуерния пакет Minitab 17 (Minitab Inc., Pennsylvania, USA) (www.minitab.com).

Бактериални щамове, среда и условия на култивиране за клониране на ген

Lc. paracasei щам B41 е изолиран от боза [6] и е депозиран в Германската колекция за микроорганизми и клетъчни култури GmbH (DSMZ) под регистрационен номер DSM 23505. Използваният рекомбинантен конструктор JET1.2/blunte, е получен преди това от Petrova и колектив [7]. И двата гена (*inu* и *inu-tr*) бяха клонирани в pBE-S вектор, третиран с *Xho*I и *Xba*I рестриктази.

Рекомбинантните конструктори бяха трансформирани в *E. coli* STELLAR™ компетентни клетки, закупени от Clontech Laboratories Inc. (Takara Bio Company, Mountain View, Калифорния, САЩ). Плазмидна ДНК от *E. coli* беше получена с Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx®, Гданск, Полша).

Щамовете *E. coli* и *B. licheniformis* 24 бяха култивирани на LB среда (1% триптон, 0,5% дрожев екстракт, 0,5% NaCl), с 1,5% агар и канамицин (AppliChem GmbH, Дармщат, Германия) с концентрация от 50 µg/ mL в петри. *Lc. paracasei* B41 беше култивиран в среда MRS (Merck, Дармщадт, Германия). Щамовете бяха съхранявани в епруветки на наклонен агар при 4 °C или замразени при -80 °C, с глицерол (20% v/v).

Периодичното култивиране на *B. licheniformis* 24 беше провеждано в колби от 500 mL, съдържащи 100 mL среда. Като субстрат беше използвано цикориево брашно, което съдържа 90% неразтворим инулин и до 10% захари (Sensus B.V., Roosendaal, Холандия). Колбите бяха инкубирани на ротационен шейкър на 37 °C и 140 rpm.

Клониране на *Inu* гена в pBE-S *E coli* / *Bacillus* spp. свалков вектор

PCR амплификацията беше извършена в QB-96 Satellite Gradient Thermal Cyclер (LKB Vertriebs GmbH, Виена, Австрия). Използваните праймери, както и оптималните температури на нагряване, са изброени в Таблица 1.

Таблица 1. Праймери за амплификация на инулиназния ген от *Lc. paracasei* DSM 23505 с NCBI GenBank номер KP663715. Въведените места за ендонуклеазни ензими са подчертани. Въведените „стоп“ кодони са показани с удебелен и италик шрифт.

Праймер	Последователност 5'3'	Позиция в гена	T (°C)	Предназначение
InuF	atggatgaaaagaacattac aagatg	1-27	60	PCR
InuR	ttagactcgcttcacccgcctc	3617-3645	60	PCR
InuF- tr_ <i>Xho</i>	gtcaatctcgagatggatgaaa agaacattacaagatgat	1-30	60	Клониране
InuR- tr_ <i>Xba</i>	ggcattctagactatagatag ttaagtcgctgatctttgtcgtg cc	2163-2193	60	Клониране
InuF_Nhe	gatcagctagcatggatgaaa agaacattacaagat	1-26	57	Клониране
InuR_Nhe	cagtagctagcttagactcgct tcacccgcctcttaacc	3616-3645	57	Клониране

PCR реакциите се състоят от 15 ng ДНК матрица, 0.4 μ M праймери, Premix Ex Taq Hot Start Version (Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company, Mountain View, CA, USA) и стерилна вода до краен обем 25 μ L.

Между първоначалната денатурация от 3 мин и 30 сек при 98 °C и крайното удължаване за 5 мин при

72 °C, беше използван следният температурен профил за 38 цикъла: 10 сек денатурация при 98 °C, 45 сек нагряване при 57 °C или 60 °C и 2,5 минути удължаване при 72 °C.

Плазмидите и ДНК фрагментите бяха визуализирани с помощта на гел електрофореза върху 1% агароза (AlfaAesar, Kandel, Германия) в TAE буфер (40 mM Tris-база, 20 mM оцетна киселина, 1 mM EDTA) оцветени със SimplySafe™ флуоресциращо багрило (EURx®, Гданск, Полша).

Трансформация и избор на клонове

Трансформацията на *E. coli* STELLAR™ компетентни клетки беше извършена, следвайки протокол PT5055-2 от инструкциите на производителя.

Трансформацията на *B. licheniformis* 24 беше извършена чрез електропорация [8]. 24 часова култура в стандартна LB среда беше разрежена 16 пъти в LB среда с 0.5 M сорбитол в 500 mL Ерленмайерова колба и беше култивирана до OD₆₀₀ от 0.9. Колбата беше охлаждана върху лед за 10 минути и бактериите бяха промивани четири пъти с леденостудена среда за електропорация (0.5 M сорбитол, 0.5 M манитол, 10% глицерол). След последното центрофугиране (3350 g/10 min/4 °C), компетентните клетки бяха ресуспендирани в 625 µL среда за електропорация. Аликвоти от 60 µL бяха използвани за електропорация в ледено студени GenePulser кювети с 0.1 cm разстояние между електродите на електропоратор MicroPulser (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Прилаган беше импулс от 2.1 kV за 4–5 ms, след което възможно най-бързо беше добавян 1 mL среда за възстановяване (0.5 M сорбитол и 0.38 M манитол в LB). Културата беше прехвърляна в стъклени епруветки от 15 mL, инкубирани в продължение на 3 часа, разстлани

върху петрита с LB-агар и канамицин и оставени за една нощ на 37 ° C.

Компетентните клетки бяха съхранявани при -70 °C и бяха използвани повторно няколко пъти с минимална загуба на ефективност при електропорация.

Селекцията на клонове беше извършена върху среда с агар и 1% инулин. Оцветяване с йод и обезцветяване с вода беше използвано за визуализиране на зоните на хидролиза след 48 часово култивиране.

Анализ на инулиназна активност

Изследвана беше инулиназната активност на цели клетки, два пъти промити с вода и безклетъчни супернатанти. Пробите бяха разреждани по подходящ начин във фосфорно-цитратен буфер (0.16 M Na_2HPO_4 , 0.02 M цитрат, pH 5.0, съдържащ 1% инулин) и бяха инкубирани при 50°C за 60 минути.

Количеството на редуциращите захари беше оценено с DNS реагент (2.18% 3,5-динитрорсалицилова киселина в 0.4 M NaOH с 30% (w/v) Rochelle сол). Абсорбцията при 540 nm беше измервана на спектрофотометър Helios Omega UV-VIS (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) с отделна контрола за всяка реакция и беше използван фруктозен стандарт за оценка на увеличеното количество редуциращи захари. Една единица ензимна активност беше определена като количеството ензим, което освобождава 1 μmol фруктоза на минута.

4. Резултати

4.1. Получаване на 2,3-БД от глюкоза

Оптимизиране на компонентите на хранителната среда

За установяване на компонентите на хранителната среда със значимо въздействие върху процеса на формиране на 2,3-БД, е приложено планиране на експеримента от първи ред, като отделните експерименти са проведени по схемата на Plackett–Burman дизайн. Изследвано е влиянието на 10 компонента на хранителната среда, като те са варирани на две нива с централна точка. Царевичният хидролизат е добавен допълнително в схемата на дизайна, за да замени по-скъпите азотни източници – дрождев екстракт и триптон. Дизайнът включва 15 опита, от които 3 централни точки и 12 точки на две нива (+1, -1) (Таблица 2). Влиянието на всеки фактор върху производството на 2,3-БД се описва с линейно уравнение от първа степен:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i$$

където Y е прогнозираният отговор, β_0 е членът на отсечката, β_i е линейният коефициент и X_i е независима променлива.

Таблица 2. Компоненти на хранителната среда, избрани за вариране и експерименталния им диапазон на промяна в схемата на Plackett–Burman дизайн.

Компоненти на хранителната среда		Експериментални нива		
		-1	0	+1
Дрождев екстракт (g/L)	X ₁	0	5	10
Триптон (g/L)	X ₂	0	5	10
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	X ₃	1	3	5
KH ₂ PO ₄ (g/L)	X ₄	2	3.5	5
K ₂ HPO ₄ (g/L)	X ₅	2	2.75	3.5
MgSO ₄ (g/L)	X ₆	0.1	0.2	0.3
Амониев ацетат (g/L)	X ₇	0.5	1.5	2.5
Царевичен хидролизат (g/L)	X ₈	0	10	20
Солеви разтвор (mL)	X ₉	1	3	5
3-морфолино пропан сулфонова киселина (MOPS) (g/L)	X ₁₀	0	5	10

Като отговор (отклик) е използвана концентрацията на 2,3-БД след 24 часова ферментация. След провеждане на експериментите, получените резултати са подложени на статистически анализ за определяне на влиянието на отделните параметри. Статистическият анализ (Таблица 3) показва, че в рамките на изследваните диапазони, 4 от изследваните параметъра - екстрактът от дрожди, KH₂PO₄, MgSO₄ и триптонът имат значителен положителен ефект, докато един параметър, царевичният хидролизат, има значителен отрицателен ефект върху образуването на 2,3-БД (Р стойност < 0.05). Останалите променливи нямат значим ефект върху образуването на 2,3-БД в съответните диапазони (Р стойност > 0.05).

Таблица 3. Изчислени коефициенти в кодиран вид от линейното регресионно уравнение за получаване на 2,3-БД в десетфакторен Plackett–Burman дизайн.

Компонент	Ефект	Коефициент	<i>P</i> стойност
Константа		10.477	0.000
Дрождев екстракт (X_1)	12.362	6.181	0.001 ^a
Триптон (X_2)	2.842	1.421	0.047 ^a
(NH_4) ₂ SO ₄ (X_3)	-0.465	-0.233	0.629
KN ₂ PO ₄ (X_4)	-1.028	-0.514	0.321
K ₂ HPO ₄ (X_5)	9.462	4.731	0.002 ^a
MgSO ₄ (X_6)	5.515	2.758	0.008 ^a
Амониев ацетат (X_7)	-1.538	-0.769	0.174
Царевичен хидролизат (X_8)	-10.535	-5.268	0.001 ^b
Солеви разтвор (X_9)	-2.395	-1.197	0.070
MOPS (X_{10})	1.145	0.573	0.278

^aЗначителен положителен ефект;

^bЗначителен отрицателен ефект.

След премахване на членовете без значителен ефект върху получаването на 2,3-БД ($P > 0.05$) линейният модел добива следния вид:

$$Y = 10.48 + 6.18 X_1 + 1.42 X_2 + 4.73 X_5 + 2.76 X_6 - 5.27 X_8$$

Анализът на дисперсията на така изведения регресионен модел показва, че стойността на R^2 (коефициент на определяемост) на модела е 0.9953. Това показва, че моделът описва 99.53% от експерименталните данни. Изчислената стойност на P за модела (0.003) и стойността “Lack-of-Fit” (0.741) на модела също предполагат статистическата значимост на уравнението. Четирите компонента, имащи значителен

положителен ефект върху производството на 2,3-БД, са избрани за по-нататъшно изследване за определяне на техните оптимални стойности. Царевичният хидролизат и MOPS са изключени от състава на средата поради значителния им отрицателен ефект и липсата на влияние в диапазона 0–10 g/L за MOPS.

Оптимизиране на стойностите на значимите компоненти на хранителната среда

За намиране на оптималните стойности на значимите параметри е използвано планиране на експеримента по схемата на централен композитен дизайн (CCD), като параметрите са варирани на 5 нива ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$), в матрица, съдържаща 31 експеримента със 7 централни, 8 аксиални и 16 кубични точки. Всеки от тези 31 експеримента е проведен два пъти. Нивата на променливите и съответстващите им реални стойности са показани в Таблица 4.

Таблица 4. Кодирани нива и реални стойности на значимите компоненти на хранителната среда, избрани за оптимизиране чрез четири факторен CCD.

Фактори	Експериментални нива на промяна				
	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
Дрождев екстракт (g/L) (X_1)	5	7.5	10	12.5	15
Триптон (g/L) (X_2)	5	7.5	10	12.5	15
K_2HPO_4 (g/L) (X_5)	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
$MgSO_4$ (g/L) (X_6)	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4

* $\alpha = 2$.

Тъй като *B. licheniformis* 24 е свръхпродуцент, независимо от използваната среда той е способен напълно да усвои 100 g/L глюкоза. Поради това максималната концентрация на продукт при всички експерименти би

била приблизително еднаква и не би могла да се използва като отговор за оценяване на стойността на параметрите. По тази причина, като функция (отговор) на модела е избрана получената концентрация 2,3-БД след 24 часа ферментация. Диапазоните на вариране са подбрани така, че централните точки (ниво 0) за всяка променлива в CCD схемата да съответстват на горното им ниво (+1) от Plackett – Burman дизайна. Получените резултати и дизайнът на рандомизираната матрица са представени на Таблица 5.

Таблица 5. Експериментална матрица по схемата на централен композитен дизайн. Реални стойности на четирите променливи и наблюдаваната реакция (концентрация на 2,3-БД след 24 часова ферментация).

Run Order	Експериментални стойности				2,3-БД* (g/L)
	X_1	X_2	X_5	X_6	
1	7.5	7.5	3.0	0.25	17.595
2	12.5	7.5	3.0	0.25	18.990
3	7.5	12.5	3.0	0.25	21.725
4	12.5	12.5	3.0	0.25	20.680
5	7.5	7.5	4.0	0.25	22.245
6	12.5	7.5	4.0	0.25	24.955
7	7.5	12.5	4.0	0.25	24.780
8	12.5	12.5	4.0	0.25	23.130
9	7.5	7.5	3.0	0.35	15.975
10	12.5	7.5	3.0	0.35	20.665
11	7.5	12.5	3.0	0.35	21.555
12	12.5	12.5	3.0	0.35	22.870
13	7.5	7.5	4.0	0.35	20.950

14	12.5	7.5	4.0	0.35	25.305
15	7.5	12.5	4.0	0.35	22.060
16	12.5	12.5	4.0	0.35	25.150
17	5.0	10.0	3.5	0.30	17.300
18	15.0	10.0	3.5	0.30	23.170
19	10.0	5.0	3.5	0.30	20.390
20	10.0	15.0	3.5	0.30	25.140
21	10.0	10.0	2.5	0.30	15.620
22	10.0	10.0	4.5	0.30	23.850
23	10.0	10.0	3.5	0.20	21.780
24	10.0	10.0	3.5	0.40	21.465
25	10.0	10.0	3.5	0.30	24.680
26	10.0	10.0	3.5	0.30	24.595
27	10.0	10.0	3.5	0.30	24.365
28	10.0	10.0	3.5	0.30	23.820
29	10.0	10.0	3.5	0.30	25.125
30	10.0	10.0	3.5	0.30	24.340
31	10.0	10.0	3.5	0.30	25.400

* Средни стойности на повторенията.

Изследването на ефекта на променливите върху производството на 2,3-БД е извършено чрез регресионен модел от втора степен, използвайки следното уравнение:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

където Y е предсказаният отговор, β_0 е свободен член β_i е линейният коефициент, β_{ii} е квадратичният коефициент, β_{ij} е коефициентът на взаимодействие, а X_i и X_j са независими променливи.

Таблица 6. Кодирани коефициенти на регресионния модел от втора степен за синтез на 2,3-БД в четири факторен централен композитен дизайн.

Компонент	Ефект	Коефициент	<i>P</i> стойност
Константа		24.618	< 0.001
Дрождев екстракт (X_1)	2.217	1.108	< 0.001
Триптон (X_2)	2.064	1.032	< 0.001
K_2HPO_4 (X_5)	3.748	1.874	< 0.001
$MgSO_4$ (X_6)	-0.017	-0.008	0.955
X_1^2	-1.958	-0.979	< 0.001
X_2^2	-0.693	-0.347	0.019
X_5^2	-2.208	-1.104	< 0.001
X_6^2	-1.264	-0.632	< 0.001
X_1X_2	-1.430	-0.715	0.001
X_1X_5	0.269	0.134	0.461
X_1X_6	1.505	0.753	0.001
X_2X_5	-1.493	-0.746	0.001
X_2X_6	0.276	0.138	0.449
X_5X_6	-0.465	-0.233	0.209

Представените данни (Таблица 6) показват, че X_1 , X_2 , X_5 , всички квадратични членове и взаимодействията X_1X_2 , X_1X_6 и X_2X_5 оказват значителен ефект върху производството на 2,3-БД ($P < 0.05$). По този начин полиномното уравнение от втора степен приема следната форма:

$$Y = 24.62 + 1.11 X_1 + 1.03 X_2 + 1.87 X_5 - 0.98 X_1^2 - 0.35 X_2^2 - 1.10 X_5^2 - 0.63 X_6^2 - 0.72 X_1X_2 + 0.75 X_1X_6 - 0.75 X_2X_5$$

Моделът описва 96.59% от експерименталните данни ($R^2 = 0.9659$). Според Reddy и колектив [9] стойности на $R^2 > 0.75$ показват адекватността на модела. Р стойността на модела (< 0.001) и стойността “Lack-of-Fit” (0.155) показат, че моделът е адекватен и уравнението е подходящо за описване на процеса на производство на 2,3-БД. Процедурата за оптимизация предвижда максималното количество получен 2,3-БД след 24 часа ферментация (при максимизиране на регресионното уравнение) от 25.825 g/L, да се получи при следните стойности на променливите:

екстракт от дрожди (X_1) 13.38 g/L;
триптон (X_2) 6.41 g/L; K_2HPO_4 (X_5) 4.20 g/L;
 $MgSO_4$ (X_6) 0.32 g/L (Таблица 7).

Таблица 7. Оптимални стойности на значимите компоненти на хранителната среда.

Компоненти	Стойности (g/L)
Дрождев екстракт	13.38
Триптон	6.41
K_2HPO_4	4.20
$MgSO_4$	0.32

Валидиране на модела

За експериментално валидиране на модела е проведен процес с култивиране с хранителна среда 13.38 g/L дрождев екстракт, 6.41 g/L триптон, 4.20 g/L K_2HPO_4 и 0.32 g/L $MgSO_4$.

След провеждане на три независими експеримента средната получена стойност след 24 часово култивиране е 25.74 ± 0.8 g/L 2,3-БД. Тази стойност е близка до предсказаната - 25.825 g/L 2,3-БД, което означава, че моделът адекватно описва промените в полученото

количество 2,3-БД като функция от състава на хранителната среда. По този начин оптималната хранителна среда за получаване на 2,3-БД от *B. licheniformis* 24 добива следния вид: (g/L) дрождев екстракт 13.38, триптон 6.41, K_2HPO_4 4.2, $MgSO_4$ 0.32, $(NH_4)_2SO_4$ 1, KH_2PO_4 3.5, амониев ацетат 2.5, $CoCl_2 \times 6 H_2O$ 0.09 и соли разтвор 3 ml/L.

Оптимизиране на технологичните параметри на процеса чрез централен композитен дизайн

Най-важните параметри на процеса - температура, рН и скорост на аерация, са подложени на оптимизация чрез прилагане на същата методология, използвана и за оптимизиране на компонентите на средата. Приложен е трифакторен централен композитен дизайн, като трите променливи са зададени на 5 нива (-1.682, -1, 0, +1, +1.682), в матрица, съдържаща общо 20 опита с 6 централни, 6 аксиални и 8 кубични точки. По този начин експериментите ще бъдат описани с регресионен модел - полиномно уравнение от втора степен. Кодираните нива на тези 3 променливи и съответните им реални стойности са показани в Таблица 8.

Таблица 8. Избрани за вариране процесни параметри със съответните им експериментални диапазони.

Фактори за вариране	Експериментални нива				
	$-\alpha^*$	-1	0	1	α^*
Температура ($^{\circ}C$) (X_1)	28.9546	31	34	37	39.0454
рН (X_2)	5.1591	5.5	6.0	6.5	6.8409
Скорост на аерация (vvm) (X_3)	0.3182	1.0	2.0	3.0	3.6818

* $\alpha = 1.682$.

Оптимизирането на параметрите на процеса се извършва в серия от периодични ферментации, проведени

на ферментатор с оптимизираната хранителна среда, съдържаща 200 g/L глюкоза (Таблица 9).

Таблица 9. Експериментална матрица по схемата на CCD.

Run Order	Нива на промяна			2,3-БД ^a	2,3-БД ^a	Y _{2,3-БД} ^a
	X ₁	X ₂	X ₃	(g/L)	(g/L/h)	(g/g) ^b
1	37	5.50	3.0	76.90	1.71	0.41
2	31	6.50	1.0	58.50	0.56	0.34
3	31	5.50	3.0	80.20	1.64	0.48
4	37	5.50	1.0	68.42	1.51	0.38
5	39.0454	6.0	2.0	71.81	2.08	0.39
6	34	6.0	3.6818	90.86	1.34	0.49
7	34	6.8409	2.0	58.10	1.05	0.32
8	34	6.0	2.0	75.45	1.45	0.43
9	34	6.0	2.0	76.79	1.48	0.44
10	31	5.50	1.0	73.01	0.71	0.41
11	34	6.0	0.3182	72.70	1.36	0.40
12	34	5.1591	2.0	66.57	0.67	0.32
13	37	6.50	1.0	75.57	1.23	0.43
14	37	6.50	3.0	84.53	1.61	0.48
15	28.9546	6.0	2.0	55.72	0.55	0.47
16	31	6.50	3.0	59.15	0.78	0.39
17	34	6.0	2.0	76.08	1.46	0.43
18	34	6.0	2.0	76.81	1.49	0.44
19	34	6.0	2.0	76.10	1.46	0.43
20	34	6.0	2.0	75.49	1.45	0.43

^aСредни стойности на повторенията; ^bГрам продуциран 2,3-БД за грам консумирана глюкоза.

Като отклик (Y) е използвана максималната получена концентрация 2,3-БД след 48 часова ферментация. Статистическият анализ на получените експериментални данни и изчислените коефициенти на варираните параметри със съответстващата им вероятност са представени на Таблица 10.

Таблица 10. Изчислени коефициенти на регресионния модел в кодиран вид със съответната им значимост.

Параметър	Ефект	Коефициент	P стойност
Константа		76.018	<0.001
t (°C) (X_1)	9.024	4.512	<0.001
pH (X_2)	-5.129	-2.565	0.003
Скорост на аерация (vvm) (X_3)	8.175	4.087	<0.001
X_1^2	-7.404	-3.702	<0.001
X_2^2	-8.416	-4.208	0.001
X_3^2	5.334	2.667	0.002
X_1X_2	12.585	6.292	<0.001
X_1X_3	2.400	1.200	0.186
X_2X_3	-1.515	-0.757	0.391

От таблицата се вижда, че взаимодействията X_1X_3 и X_2X_3 не са статистически значими ($P > 0.05$) и след изключването им полиномното уравнение от втора степен приема следната форма:

$$Y = 76.02 + 4.51 X_1 - 2.57 X_2 + 4.09 X_3 - 3.70 X_1^2 - 4.21 X_2^2 + 2.67 X_3^2 + 6.30 X_1X_2$$

Коефициент на определеност на модела е $R^2 = 0.9659$, което означава, че този модел описва изключително добре получените експериментални данни.

След провеждане на оптимизационна процедура (максимизиране на Y), предсказаната максимална стойност за количеството синтезиран 2,3-БД е 93.77 g/L при следните условия: температура (X_1) - 37.82 °C; рН (X_2) - 6.23; скорост на аерация (X_3) - 3.68 vvm (Таблица 11).

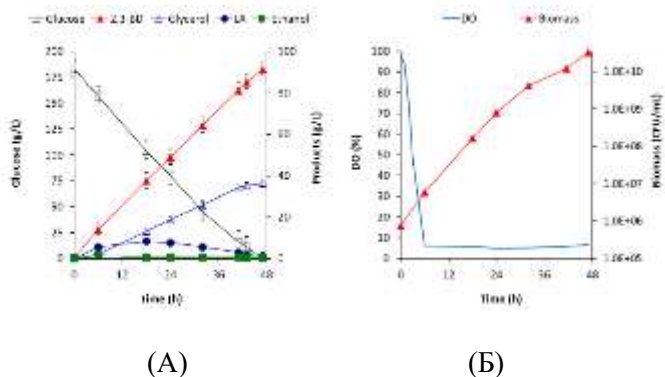
Таблица 11. Предсказани оптимални стойности на процесните параметри за максимален синтез на 2,3-БД.

Параметър	Стойност
t (°C)	37.82
pH	6.23
аерация vvm	3.68

Експериментално валидиране на модела

За валидиране на модела е извършена периодична ферментация с *B. licheniformis* 24 при оптимизирана среда и параметри на процеса.

Резултатите (средните стойности на три отделни експеримента) са представени на Фигура 1. Максималната получена концентрация на 2,3-БД е 91.23 ± 2.9 g/L. Тази стойност е по-висока от всички в проектната матрица и е близка до прогнозните 93.77 g/L. Това потвърждава адекватността на модела. Експериментално получената концентрация е постигната с продуктивност от 1.94 g/L/h 2,3-БД и добив от 0.488 g/g (98% от теоретичния максимум - 0.5 g/g), което показва, че при предсказаните оптимални условия процесът за получаване на 2,3-БД е изключително ефективен.



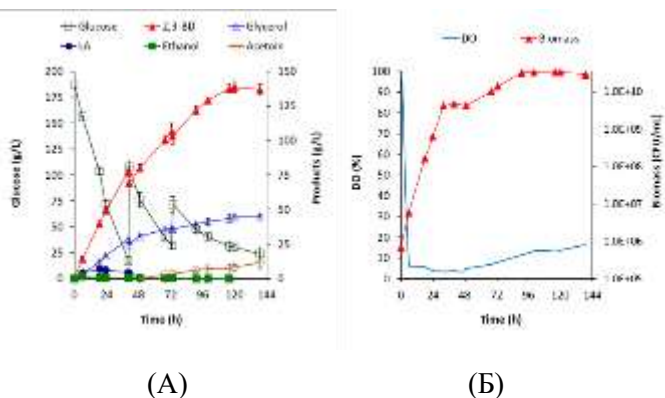
Фигура 1. Периодична ферментация от 200 g/L глюкоза чрез *B. licheniformis* 24 в оптимизирана среда и параметри на процеса: А) Консумация на глюкоза и натрупване на продукти (три повторения); Б) Стойности на разтворен кислород (DO) и образувана биомаса.

Основният страничен продукт на ферментацията е глицеролът - 35.20 g/L. Другите разтворими метаболити: млечна киселина – 1.2 g/L, ацетоин и етанол - под 1 g/L. По време на ферментацията млечната киселина достига най-висока концентрация на 18-ия час (8.37 g/L) и след това бавно намалява. Подобен профил се наблюдава и за етанола до 1.8 g/L на 6-ия час, след което намалява до 0.5 g/L в края на процеса (Фигура 1А). Ацетоинът се образува през първите няколко часа. След това, с намаляването на разтворения кислород в средата (Фигура 1Б), синтезът на ацетоин спира до пълното изчерпване на източника на въглерод. Глюкозата е изцяло консумирана след 47 часова ферментация (Фигура 1А).

Периодичен процес чрез подхранване с въглероден източник глюкоза при оптимизирани условия

За да се разкрие максималната толерантност на *B. licheniformis* 24 към 2,3-БД, която определя неговите

максимални възможности като продуцент, беше проведен периодичен процес с подхранване при вече установените оптимизирани условия. Най-високата постигната концентрация на 2,3-БД е 138.8 g/L, с продуктивност от 1.16 g/L/h и добив от 0.478 g/g. Наблюдава се силно инхибиране от продукта при концентрации над 100 g/L, което води до намаляване на скоростта на консумация на глюкоза. Консумацията на глюкоза спира напълно след 140-ия час. Основният страничен продукт на ферментацията е глицеролът, достигащ максимума си от 45.38 g/L след 120 часова ферментация. Ацетоинът се натрупва след 70-ия час на ферментацията, когато концентрацията на разтворения кислород леко се увеличава – от 6 на 14% в края на процеса (Фигура 2Б).

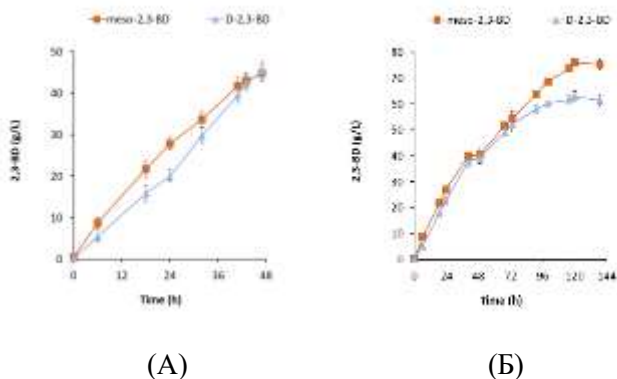


Фигура 2. Периодичен процес с подхранване, проведен в среда с оптимизиран състав и при оптимални процесни параметри: А) Консумация на глюкоза и натрупване на продукти (средни стойности от три повторения); Б) Стойности на разтворен кислород (DO) и образувана биомаса.

Изомерни съотношения на получения 2,3-БД

B. licheniformis 24 произвежда 2,3-БД в две изомерни форми – мезо-2,3-БД и D-2,3-БД, в съотношения от 1.6:1

до 1:1. Не е наблюдавано съотношението да зависи от използвания субстрат, но изглежда зависи от общата концентрация на произведения 2,3-БД. Например, в началото на всяка ферментация мезо-формата леко преобладава, докато с напредване на процеса съотношението се изравнява при обща концентрация на 2,3-БД от 80-90 g/L (Фигура 2А). Това явление се наблюдава при всички периодични ферментации. Въпреки това, при ферментациите чрез подхранване при оптимизирани параметри, след 70-ия час съотношението отново се променя в полза на мезо-формата и до края на процеса от 1.05:1 достига до 1.23:1 (Фигура 2Б). Възможно обяснение е производството на ацетон през този период (Фигура 3А), което не се наблюдава при нито една от останалите периодични ферментации, когато източникът на въглерод е наличен. От друга страна, при пълно изчерпване на субстрата, под действието на бутандиол дехидрогеназа BDH, D-формата бързо се превръща в ацетон, докато мезо-формата намалява бавно и се превръща в ацетон само частично.



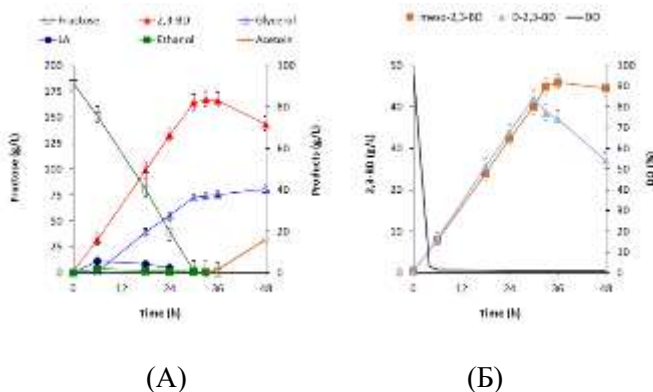
Фигура 3. Кинетика на получаване на мезо- и D-2,3-БД от *Bacillus licheniformis* 24 при: (А) Периодична ферментация при 200 g/L глюкоза; (Б) Периодична ферментация чрез подхранване.

4.2. Получаване на 2,3-БД от фруктоза

Периодичен процес с въглероден източник фруктоза при оптимизирани условия

Използвана е средата, оптимизирана за получаване на 2,3-БД от глюкоза, като тя е заменена от 200 g/L фруктоза. Процесните параметри рН, температура и аерация се поддържат при вече определените оптимални стойности от съответно 6.23, 37.8 °C и 3.68 vvm. Инокулиране от 10% е направено при достигане на оптична плътност ($OD_{600} = 2.300$) на инокулатите.

При провеждането на периодична ферментация от 200 g/L фруктоза, максималната концентрация 2,3-БД е постигната след 33 часа 83.5 ± 1.5 g/L, когато фруктозата е напълно изчерпана (Фигура 4А).



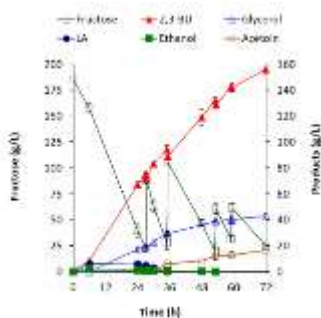
Фигура 4. Периодична ферментация на 200 g/L фруктоза от *Bacillus licheniformis* 24: А) Времеви профили на консумация на фруктоза и образуване на продукт; Б) Времеви профили на натрупване на мезо- и D-2,3-БД и наличност на разтворен кислород.

Фруктозата се усвоява със скорост 5.52 g/L/h, а основният съпътстващ продукт на ферментацията е глицерол. В момента, в който фруктозата е напълно консумирана, се образува 37 g/L глицерол и няма други открити разтворими метаболити, с изключение на незначителни количества етанол (около 0.1 g/L). Млечната киселина е временен продукт на ферментацията, достигайки максималния си титър от 5.67 g/L на 6^{-ия} час на ферментацията. След това концентрацията намалява и млечната киселина напълно изчезва след 24^{-ия} час. Етанолът достига своя максимум от 2.05 g/L на 6^{-ия} час, след което бавно намалява (Фигура 4А).

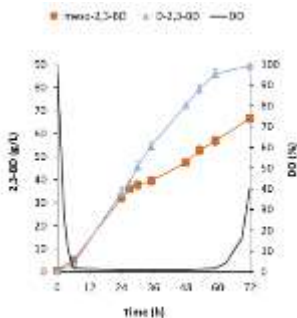
След 33^{-ия} час, когато източникът на въглерод вече не е наличен, 2,3-БД рязко се превръща в ацетоин. Количественото определяне на различните 2,3-БД изомерни концентрации показва, че в ацетоин се превръща основно D-2,3-БД формата, докато мезо-формата остава почти със същата концентрация най-малко 15 часа след пълното изчерпване на субстрата (Фигура 4Б). През този период концентрацията на ацетоин в средата се увеличава от 0 до 16.1 g/L, а концентрацията на разтворен кислород остава на най-ниското си ниво (1-2%), което показва, че все още има живи клетки (Фигура 4Б).

Периодичен процес чрез подхранване с въглероден източник фруктоза при оптимизирани условия

При проведения периодичен процес с подхранване допълнителни количества фруктоза са добавяни като стерилен воден разтвор, когато концентрацията на фруктоза в хранителната среда спадне под 50 g/L. По този начин, след 72 часова ферментация са изконсумирани общо 370 g/L фруктоза, при което е достигната максимална концентрация от 156.1 ± 3.6 g/L 2,3-БД (Фигура 5А).



(A)



(B)

Фигура 5. Периодичен процес с подхранване, проведен в среда с оптимизиран състав и оптимални процесни параметри: А) Времени профили на консумация на фруктоза и образуване на продукт; Б) Времени профили на натрупване на мезо- и D-2,3-БД и наличност на разтворен кислород.

Основни странични продукти са глицеролът (43.1 g/L) и ацетоинът (16.7 g/L). Млечната киселина и етанолът не се откриват след 48^{-ия} час, а ацетоинът започва да се натрупва в средата след 30^{-ия} час (Фигура 5 А). На 72^{-ия} час, когато е достигната максимална концентрация на 2,3-БД, съотношението на стереоизомерите е: мезо-2,3-БД:D-2,3-БД=1.00:1.35. До 24^{-ия} час и двата изомера се произвеждат приблизително в равни количества, след което количеството на D-2,3-БД се увеличава значително, като съотношението достига 1.00:1.51 (мезо:D-форма) на 60^{-ия} час. Между 60^{-ия} и 72^{-ия} час, когато започва натрупването на ацетоин, въпреки, че концентрациите на двата изомера продължават да се увеличават, съотношението им се връща към 1.00:1.35 (Фигура 5 Б). Това показва, че продуцирането на ацетоин е главно за сметка на D-2,3-БД. Нивото на разтворения кислород в средата рязко спада – от 95.8% на 1.7% през първите 6 часа на ферментацията и остава почти постоянно

до 60^{-ия} час, след което постепенно се увеличава от 1.7% на 40.9% на 72^{-ия} час, най-вероятно поради намаляването на броя на живи клетки (Фигура 5 Б).

В заключение може да се каже, че така получената концентрация от 156.1 g/L 2,3-БД при ферментация с въглероден източник фруктоза е най-високото количество, достигнато от непатогенен микроорганизъм до момента. Продуктивността от 2.17 g/L/h на *B. licheniformis* 24 е относително висока за представител на рода *Bacillus*.

4.3. Получаване на 2,3-БД от инулин

Периодичен процес с въглероден източник инулин при оптимизирани условия

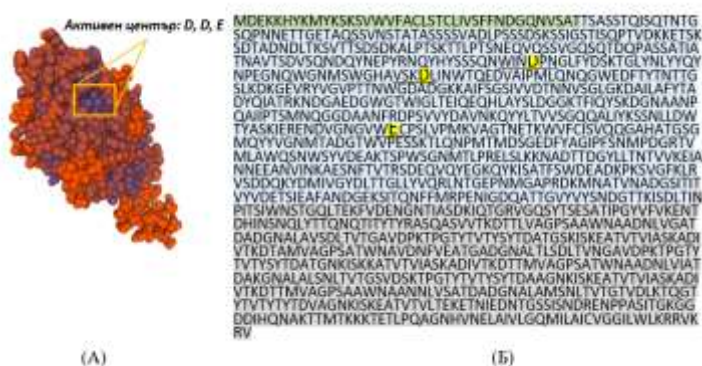
Резултатите, получени при култивирането на *B. licheniformis* 24 в среда с въглероден източник фруктоза дават основание да се счита, че шамът е изключително подходящ за конверсия на фруктозо-съдържащи субстрати до 2,3-БД. За установяване на способността на *B. licheniformis* 24 да конвертира инулин съдържащ субстрат във вече оптимизираната среда, шамът беше култивиран с въглероден източник цикориево брашно (Frutafit® HD (Sensus B.V., Roosendaal, The Netherlands)) с начална концентрация 100 g/L. Процесът беше проведен при вече оптимизираните процесни параметри: рН, температура и аерация от съответно 6.23, 37.8 °C и 3.68 vvm.

Въпреки, че *B. licheniformis* 24 притежава известна естествена инулиназна активност, шамът не е способен да хидролизира молекулите на инулина до ферментируеми захари, а общото получено количество ацетоин + 2,3-БД (около 6 g/L) по време на ферментацията е получено почти изцяло от намиращите се захари в цикориевото брашно (~10 g/L). Поради това, в шам 24 е необходимо да бъде

въведен допълнително ген, кодиращ ензим със силна инулиназна активност.

Клониране на *Inu* ген от *Lacticaseibacillus paracasei* DSM 23505

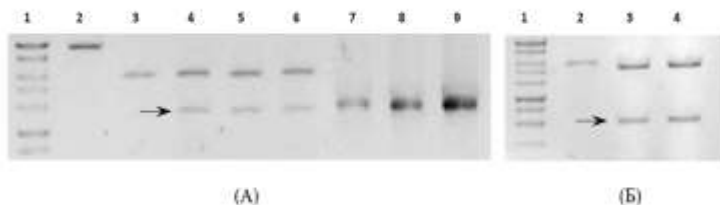
За тази цел беше избран *inu* генът на *Lacticaseibacillus paracasei* DSM 23505 (GenBank KP663715.1), кодиращ клетъчно свързана фруктан- β -фруктозидаза (EC 3.2.1.80) и съдържащ 3645нд (Фигура 6).



Фигура 6. (А) 3D модел на ензима (EC 3.2.1.80) на *Lc. paracasei* DSM 23505, аминокиселините на каталитичния център: два аспартата (D) и глутамат (E), са оградени и показани в лилаво. Моделът е направен чрез хомология в SWISS-MODEL Workspace, [10]. (Б) Схематично представяне на аминокиселинната последователност на ензима. Сигналният пептид е показан в зелено; полипептидът от 731 аминокиселини, принадлежащ към семейството на гликозид-хидролазите GH32, е показан в синьо; домейните Big3, отговорни за закрепването на клетъчната стена, са представени в сиво; аминокиселините на каталитичния център са подчертани в жълто, а консервативните региони са подчертани.

Ензимът съдържа теоретичен сигнален пептид от 38 аминокиселини, β -фруктозидазен каталитичен домен,

отделени след потвърждаване чрез PCR и секвениране (Фигура 8).



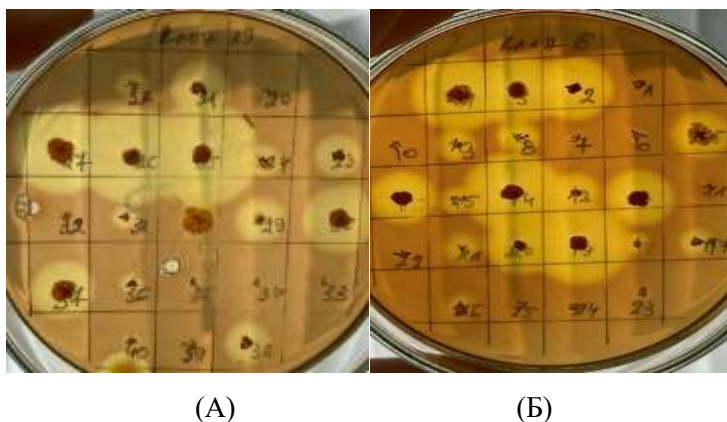
Фигура 8. Анализ на рекомбинантните конструкции, изолирани от *E. coli* STELLAR™: (А) Ред 2: линейаризирана конструкция pBES_Inu; Линия 3: линеен pBE-S вектор, Линии 4, 5 и 6: плазмидна ДНК на pBES_Inu клонове, срязани с *Xba*I и *Xho*I; Редове 7, 8 и 9: PCR амплификация на гена от 3.6 kb. (Б) Линия 2: линейаризиран pBE-S вектор; Редове 3 и 4: плазмидна ДНК на pBES_Inu-tr клонове 2.2 kb., срязани с *Xba*I и *Xho*I. За определяне на размера на фрагментите беше използван ДНК маркер Perfect Plus 1 kb (EURx, Гданск, Полша) със следните размери: 10.0, 8.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5 kb.

Всички рекомбинантни конструкции бяха въведени в *B. licheniformis* 24 чрез електропорация. Обобщение на резултатите, получени от анализа на трансформантите, са представени в Таблица 12. Клоновете *B. licheniformis* 24, резистентни към антибиотика канамицин, бяха подбрани на базата на хидролазната им активност (Фигура 9), която беше анализирана чрез култивиране на клоновете върху петрита с хранителна среда LB-агар съдържаща 1% неразтворим инулин и 50 µg/mL канамицин. Колониите, формиращи зони, по-големи от тези на дивия щам, бяха отчетени като положителни. По този начин бяха отчетени 7 позитивни клона, носещи конструкта pBES_Inu, 7 pBES_Inu-tr.

Таблица 12. Общ брой трансформанти, брой анализирани клонове и брой позитивни клонове, съдържащи трите вида конструкции.

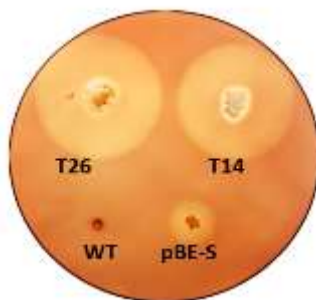
Конструкт	Брой трансформанти	Анализирани клонове	Позитивни клонове*
pBES_Inu	2638	89	7
pBES_Inu-tr	2415	62	7

* Хидролизни зони, анализирани в петрита, съдържащи среда LB, с 1% неразтворим инулин. Клоновете, образуващи зони, по-големи от тези на дивия щам *B. licheniformis* 24, съдържащи „празния“ вектор, се считат за положителни.



Фигура 9. Клонова селекция на *B. Licheniformis*, трансформиран с pBES_Inu (Фигура 9 А) и pBES_Inu-tr (Фигура 9 Б) култивирани на петри с 1% неразтворим инулин.

Най-големите по размер зони (2.5–2.7 cm) са образувани от клонове *B. licheniformis*, съдържащи pBES_Inu (Фигура 9 А). От тях клон T26 (Фигура 10А) беше избран за по-нататъшна работа. От клоновете, носещи конструкта pBES_Inu-tr (Фигура 9 Б) с най-голяма зона (2.2–2.3 cm) беше клон T14 (Фигура 10), който също беше селектиран за получаване на 2,3-БД.



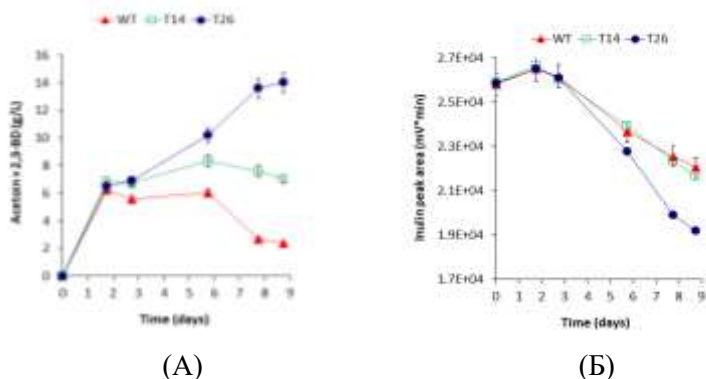
Фигура 10. Сравнение на зоните на хидролиза на инулин, получени от подбрани *B. licheniformis* трансформанти в петри Клон T26 *B. licheniformis*, съдържащ pBES_Inu конструкта; Клон T14 *B. licheniformis* с pBES_Inu-tr; pBE-S, *B. licheniformis* трансформиран с "празния" вектор; WT – див тип *B. licheniformis* 24 (не се развива в среда с канамицин).

Периодично култивиране с клонове *B. licheniformis* T14 и T26 на колби

Като субстрат е използвано цикориево брашно с начална концентрация 100 g/L, съдържащо 90% неразтворим инулин с DP8-DP13 и 10% смес от фруктоза, захароза и глюкоза. Инулинът се хидролизира най-ефективно от клон T26, като T14 и дивият тип показват близки профили. До 40^{-ия} час T26, T14 и дивият тип напълно усвояват свободните захари, синтезирайки около 6 g/L ацетоин+2,3-БД. След това, дивият тип и клон T14 не образуват повече продукт. Клон T26 синтезира приблизително 8 g/L повече 2,3-БД и ацетоин до 14 g/L (Фигура 11).

Оценката на инулиназната активност на рекомбинантните клонове показва значително увеличение спрямо дивия тип. Активността на T26 е повече от осем пъти по-висока (средно 8.7 U/mL) в сравнение с дивия тип

(варираща от 0.5 до 1.5 U/mL) и повече от три пъти по-висока от тази на клон T14 (2.7 U/mL). Установяването на локализацията на хетероложния ензим чрез изследване на клетки и свободни от клетки супернатанти показва предимно клетъчно свързана инулиназна активност на T26 и предимно извънклетъчна на T14 и дивия тип.

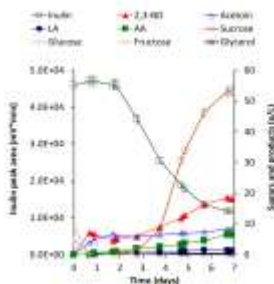


Фигура 11. Периодична ферментация чрез рекомбинантни клонове T26, T14 и див тип *B. licheniformis* 24 (А) Синтезирани ацетоин + 2,3-БД. (Б) Хидролизиран инулин (пикова площ на олигозахариди DP3 – DP9)

Периодична ферментация чрез *B. licheniformis* T26 при оптимизирани условия

Периодичното култивиране бе проведено с начална концентрация на субстрата от 200 g/L цикориево брашно. В този процес свободните захари са напълно изконсумирани в рамките на 16 часа, като се получават 7.22 g/L 2,3-БД и 3.96 g/L ацетоин. Биомасата нараства експоненциално до 72-ия час, до 8.8×10^7 CFU/mL и достига стационарната фаза след 96-ия час (1.2×10^8 CFU/mL). Не се наблюдава разграждане на инулина през първите 48 часа. В резултат на това, между 16-ия и 48-ия час известно количество от 2,3-БД се превръща в ацетоин. Когато

започва разграждането на инулина, концентрацията на 2,3-БД отново се повишава. Въпреки това се наблюдава рязко натрупване на захароза в културалната среда след 66-ия час. След 160 часова ферментация, въпреки че приблизително 140 g/L инулин се разграждат, се натрупват 53 g/L захароза и 18.5 g/L 2,3-БД (Фигура 12).



Фигура 12. Периодична ферментация от 200 g/L цикориево брашно чрез *B. licheniformis* T26.

5. Обсъждане на резултатите

5.1. Оптимизиране на хранителната среда за получаване на 2,3-БД

За оптимизиране на състава на хранителната среда за получаване на 2,3-БД, последователно бяха приложени скрининг дизайн (Plackett-Burman) за установяване на значимите компоненти на хранителната среда и централен композитен дизайн за установяване на оптималните концентрации на компонентите, показали значителен ефект върху получаването на 2,3-БД в скрининг дизайна. Резултатите от провеждането на Plackett-Burman дизайна показаха, че със значително положително влияние върху получаването на 2,3-БД са 4 от изследваните 10 компонента. Четири от тях: дрождев екстракт, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ и триптон, като най-силно влияние оказва концентрацията на дрождевия екстракт. Това наблюдение е в унисон с изказаното предположение на Song и колектив [11]. От друга страна, със значителен отрицателен ефект е добавянето на царевичен хидролизат. Поради тази причина царевичният хидролизат беше изключен от средата при следващия етап на оптимизация. От средата беше изключен и MOPS поради неговото незначително влияние в диапазона от 0 до 10 g/L. Това показва, че за разлика от *P. polyuxa* [4], *B. licheniformis* не се нуждае от MOPS, което прави хранителната среда по-евтина. Четирите компонента (дрождев екстракт, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ и триптон) показали значително позитивно действие върху процеса за получаване на 2,3-БД, бяха вариращи по схемата на централен композитен дизайн за установяване на техните оптимални концентрации. След провеждане на оптимизационна процедура за максимизиране на уравнието на регресия, получено от статистическия анализ, беше предсказано, че максимално количество 2,3-БД би се получило при следните стойности на

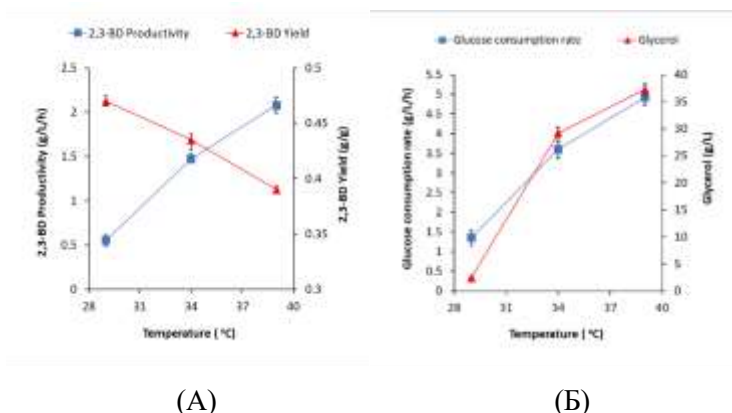
променливите: дрождев екстракт 13.38 g/L; K_2HPO_4 4.20 g/L; триптон 6.41 g/L; $MgSO_4$ 0.32 g/L. В последствие тези стойности бяха потвърдени като оптимални чрез трикратно експериментално валидиране на модела.

5.2. Оптимизиране на процесните параметри за получаване на 2,3-БД

На оптимизация по схемата на централен композитен дизайн (планиране от втори ред) бяха подложени температурата на култивиране (t °C), киселинността на хранителната среда (pH) и аерацията (дебит на стерилен въздух), като всички експерименти бяха проведени при скорост на разбъркване 500 rpm. Като оптимални стойности за параметрите на процеса бяха определени: температура 37.82 °C; pH 6.23; скорост на аерация 3.68 vvm. Тези стойности бяха валидирани експериментално.

Влияние на температурата

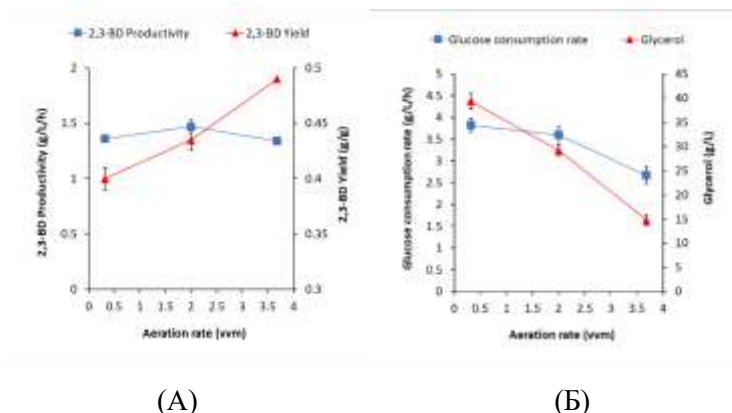
Температурата е параметърът с най-голямо въздействие, но очакваните оптимални стойности са доста различни за максимална 2,3-БД концентрация, 2,3-БД производителност и 2,3-БД добив. Сравнявайки централните и аксиалните точки от CCD дизайна се вижда, че по-високите температури ускоряват консумацията на глюкоза, което води до по-висока продуктивност в получаването на 2,3-БД. Например, при постоянно pH 6 и скорост на аерация 2 vvm, повишаването на температурата от 29 °C до 39 °C повишава продуктивността от 0.55 на 2.08 g/L/h. Въпреки това, поради увеличеното образуване на глицерол, добивът на 2,3-БД намалява от 0.47 на 0.39 g/g (Фигура 13 А). С увеличаване на скоростта на консумация на глюкоза (от 1.35 на 4.92 g/L/h), натрупването на глицерол нараства от 2.42 на 37.25 g/L (Фигура 13 Б).



Фигура 13. Влияние на температурата върху ферментацията при 200 g/L глюкоза чрез *B. licheniformis* 24 върху: (А) производителността и добива на 2,3-БД; (Б) скоростта на консумация на глюкоза и образуването на глицерол. Ферментациите са проведени при рН 6 и скорост на аерация 2 vvm. Представени са средни стойности от поне два индивидуални експеримента.

Влияние на аерацията

По-високите нива на аерация благоприятстват увеличаването на концентрацията на 2,3-БД и добива и нямат значителен ефект върху производителността (Фигура 14 А). По отношение на консумацията на глюкоза и натрупването на глицерол, увеличаването на аерацията има ефект, обратен на повишението на температурата (Фигура 14 Б). При напълно аеробни условия кислородът е акцепторът на електрона за НАД⁺ регенерацията и редукцията на ацетоин до 2,3-БД не настъпва. Наблюдението, че продуцирането на ацетоин е по-голямо при силно аеробни условия, определя развитието на сложни двустепенни режими на аерация в процесите за получаване на 2,3-БД чрез *B. licheniformis* [11, 12, 13, 14].



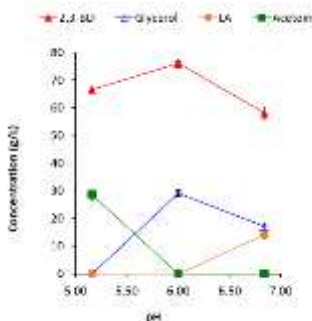
Фигура 14. Влияние на скоростта на аерация върху ферментацията при 200 g/L глюкоза чрез *B. licheniformis* 24 върху: (А) производителността и добива на 2,3-БД; (Б) скоростта на консумация на глюкоза и образуването на глицерол.

Ферментациите са проведени при pH 6 и температура 34 °C. Представени са средни стойности от поне два индивидуални експеримента. *B. licheniformis* 24 е изключително аеробен продуцент на 2,3-БД и е в състояние да консумира значителни количества кислород. Както е показано на Фигура 14 Б, количеството разтворен кислород в средата остава постоянно ниско – от 6^{-ия} час до края на ферментацията. Тази висока консумация на кислород предотвратява образуването на ацетон дори при най-високите тествани нива на аерация. Синтезът на глицерол обаче не може да бъде избегнат, дори при високи нива на аерация.

Влияние на pH

Специфична характеристика на *B. licheniformis* 24 е продуцирането на глицерол като основен страничен продукт. Поради образуването на глицерол, киселинността

на средата се променя слабо по време на ферментацията. Промените в рН влияят в по-малка степен на получаването на 2,3-БД (Фигура 15). При по-ниско рН (5.16), ацетоинът се явява като основен страничен продукт, достигайки концентрации от 28.64 g/L. Той се акумулира при ниска консумация на глюкоза, в този случай при условия, съчетаващи по-ниско рН (≤ 5.5) и по-ниска температура (≤ 31 °C). Този ефект води до силно акумулиране на ацетоин в културалната течност при ниско ниво на консумация на захари и е характерно за *B. licheniformis* 24 [5]. Другият значим страничен продукт, глицеролът, не се образува при по-ниско рН (5.16), а се увеличава при рН 6.0. Логично, млечната киселина е основен ко-продукт на ферментацията само при по-високи стойности на рН, достигайки 14.11 g/L при рН 6.84.



Фигура 15. Влияние на рН върху образуването на продукти при ферментацията на 200 g/L глюкоза чрез *B. licheniformis* 24. Ферментациите се провеждат при Т 34 °C и скорост на аерация 2 vvm. Представени са средни стойности от поне два индивидуални експеримента.

В заключение може да се каже, че ефектът от представената комплексна оптимизация на състава на средата и параметрите на процеса е най-очевиден, когато

се сравняват резултатите от периодичната ферментация от глюкоза преди и след оптимизацията. При усвояването на 200 g/L глюкоза, прилагането на оптимизирания състав на хранителната среда и процесни параметри увеличава максималната концентрация 2,3-БД с 28.9% от 70.8 g/L до 91.23 g/L. Добивът се увеличава с 6.8%, от 0.457 g/g до 0.488 g/g субстрат. Особено значително е увеличението на производителността на процеса 0.38 до 1.94 g/L/h (повече от 5 пъти).

5.3. Получаване на 2,3-БД от глюкоза

За да се установи максималното количество 2,3-БД, което *B. licheniformis* 24 може да продуцира от глюкоза, е проведен периодичен процес с подхранване. Процесът е проведен при вече оптимизирания хранителна среда и процесни параметри, като от общо 290 g/L са получени 138.8 ± 4.3 g/L 2,3-БД с производителност 1.16 g/L/h и добив близък до теоретичния (0.479 g/g). Този резултат нарежда *B. licheniformis* 24 сред най-добрите непатогенни продуценти. До момента най-високата получена концентрация 2,3-БД от непатогенен продуцент (*B. licheniformis* DSM 8785) е 144.7 g/L, получена с продуктивност от 1.14 g/L/h [15]. Това показва, че вероятно са достигнати лимитите на вида като продуцент. Сравнявайки постигнатите резултати с тези на патогенните продуценти, може да се каже, че *B. licheniformis* 24 продуцира 2,3-БД в почти същата концентрация, но със значително по-ниска продуктивност. Така например представители на патогенните видове *K. pneumoniae* или *K. oxytoca* продуцират 2,3-БД в концентрация до 150 g/L, но с продуктивност до 4 g/L/h [16].

5.4. Получаване на 2,3-БД от фруктоза

За установяване на способността на *B. licheniformis* 24 да продуцира 2,3-БД от фруктоза бяха проведени периодичен процес и периодичен процес с подхранване при вече оптимизираните условия. Сравнявайки периодичните процеси за получаване на 2,3-БД от глюкоза и фруктоза беше забелязано, че скоростта на усвояване на фруктоза (5.52 g/L/h) значително надвишава скоростта на усвояване на глюкоза (3.98 g/L/h) при аналогични условия. Въпреки, че полученият титър 2,3-БД от фруктоза е по-малък от този от глюкозата (83.5 срещу 91.2 g/L), той е получен със значително по-висока продуктивност 2.53 g/L/h, вместо 1.94 g/L/h от глюкоза. Добивът на 2,3-БД от фруктоза е 0.46 g/g, по-малък от този от глюкозата 0.488 g/g. При провеждане на периодични процеси с подхранване беше забелязана същата зависимост. Скоростта на усвояване на фруктоза (5.14 g/L/h) е повече от два пъти по-висока от тази на глюкоза (2.41 g/L/h), съответно продуктивността, с която се продуцира 2,3-БД от фруктоза е 2.17 g/L/h спрямо 1.16 g/L/h от глюкоза (увеличение от 87.1%). За разлика от направеното сравнение при периодичните процеси, тук и максималната концентрация 2,3-БД е по-висока с 12.5% 156.1 g/L срещу 138.8 g/L. Тези резултати показват, че фруктозата е по-подходящ въглероден източник за получаване на 2,3-БД чрез *B. licheniformis* 24. Тъй като глюкозата се счита за предпочитан източник на въглерод, едно възможно обяснение за това явление се крие в способността на *B. licheniformis* 24 да произвежда екзополизахариди (EPSs) [17]. При субстрат глюкоза произведения екзополизахарид е в изключително висока концентрация (12.6 g/L), което прави средата изключително вискозна и трудна за контролиране. Друга особеност, която се забелязва при ферментация на фруктоза, е засиленото продуциране на

D-2,3-БД, като фруктозата е единственият субстрат, при който *B. licheniformis* продуцира повече D-2,3-БД отколкото мезо-2,3-БД.

5.5. Получаване на 2,3-БД от инулин

При проведения процес за установяване на способността на *B. licheniformis* 24 да продуцира 2,3-БД от инулин беше установено, че щамът продуцира 2,3-БД единствено от захарите в цикорийовото брашно, но не може да хидролизира молекулите на инулина до ферментируеми захари. За повишаване на слабата естествена инулиназна активност на щам, ген за клетъчно свързана инулиназа от *Lactocaseibacillus paracasei* DSM 23505 беше успешно въведен чрез плазмид в щам 24. Бяха изпробвани два вида конструкта за прехвърлянето на гена. Най-успешен се оказа конструктът pBES_Inu, съдържащ домените на гена за закрепване към клетъчната стена. Модифицираният с този конструкт щам *B. licheniformis* T26, показва 8.7 пъти по-висока инулиназна активност от дивия тип. Въпреки това, получените 18.5 g/L 2,3-БД с добив 0.1 g/g не са достатъчни, за да се счита процесът за ефективен. От друга страна, трансформантът T26 хидролизира 140 g/L инулин, но повечето въглерод се натрупва в културалната течност под формата на захароза, която не се метаболизира. Поради това, рекомбинантите се нуждаят от допълнително „подобрене“, за да бъде процесът промишлено приложим.

6. Изводи

1. Чрез планиране на експеримента от първи ред е установено, че за получаване на 2,3-БД чрез *B. licheniformis* 24, най-важните компоненти на хранителната среда са органичните азотни източници дрождев екстракт и триптон, както и солите K_2HPO_4 и $MgSO_4$.
2. Чрез планиране на експеримента от втори ред е установено, че оптимални концентрации за получаване на 2,3-БД на тези компоненти са следните: 13.38 g/L дрождев екстракт, 6.41 g/L триптон, 4.20 g/L K_2HPO_4 и 0.32 g/L $MgSO_4$.
3. Чрез планиране на експеримента от втори ред е установено, че оптималните стойности на процесните параметри за получаване на 2,3-БД чрез *B. licheniformis* 24 са следните: температура 37.82 °C; pH 6.23; скорост на аерация 3.68 vvm.
4. При ферментирането на глюкоза от *B. licheniformis* 24, с увеличаване на температурата се повишават: (i) скоростта на усвояване на глюкоза; (ii) скоростта на формиране на 2,3-БД (продуктивността); (iii) продуцирането на страничния продукт глицерол, докато добивът на 2,3-БД намалява.
5. При ферментирането на глюкоза от *B. licheniformis* 24, с увеличаване на аерацията се повишава добивът на 2,3-БД, продуктивността му не се променя, а скоростта на усвояване на глюкоза и формирането на глицерол намаляват.
6. При ферментирането на глюкоза от *B. licheniformis* 24, 2,3-БД се явява основен продукт на ферментацията при pH от 5.00 до 7.00. В зависимост от киселинността на средата, обаче, главните странични продукти на ферментацията са различни: при pH < 5.50 ацетоин, при

- pH от 5.50 до 7.00 глицерол, при pH >7.00 млечна киселина.
7. В периодичен процес с подхранване, максималното количество 2,3-БД, който щам *B. licheniformis* 24 може да продуцира при оптимални условия от глюкоза е 138.8 g/L, с добив от 0.478 g/g и продуктивност 1.16 g/L/h.
 8. В периодичен процес с подхранване, максималното количество 2,3-БД, който щам *B. licheniformis* 24 може да продуцира при оптимални условия от фруктоза е 156.1 g/L, с добив 0.46 g/g и продуктивност 2.17 g/L/h.
 9. Причина за по-ефективното получаване на 2,3-БД от субстрат фруктоза, отколкото от глюкоза е, че *B. licheniformis* 24 продуцира от глюкоза повече и различен полизахарид, с който формира полизахаридна капсула. Това прави ферментационната среда вискозна и трудна за контролиране при субстрат глюкоза.
 10. Щам *B. licheniformis* 24 притежава естествена инулиназна активност, която не е достатъчна, за да хидролизира инулина от цикориево брашно Frutafit® HD до ферментируеми захари.
 11. Въвеждането на ген *inu* от *Lactocaseibacillus paracasei* DSM 23505 (GenBank KP663715.1), кодиращ клетъчно свързана фруктан- β -фруктозидаза (ЕС 3.2.1.80) в *B. licheniformis* 24 води до 8.7 пъти увеличение на ензимната активност (трансформант Т26).
 12. Въвеждането на ген *inu* от *Lactocaseibacillus paracasei* DSM 23505 в *B. licheniformis* 24 без домените му за свързване на ензима с клетъчната стена с цел ензимът да стане екстрацелуларен, води до 4.7 пъти увеличение на ензимната активност (трансформант Т14).
 13. Модифицираният щам *B. licheniformis* 24 Т26 е способен да хидролизира 140 g/L инулин, но полученото максимално количество 2,3-БД е едва 18.5 g/L, поради натрупване на захароза в културалната течност, която не се метаболизира до продукт.

7. Приноси

1. След комплексна оптимизация на хранителната среда и процесните параметри, щам *B. licheniformis* 24 продуцира от глюкоза 138.8 g/L 2,3-БД, втори най-добър резултат за непатогенен продуцент и 156.1 g/L 2,3-БД от фруктоза – най-висок резултат в света до момента.
2. Ген *inu* от *Lacticaseibacillus paracasei* DSM 23505 успешно е въведен в *B. licheniformis* 24 чрез вектора pBE-S в два варианта – като конструкт pBES_Inu, съдържащ целия ген и като конструкт pBES_Inu-tr, съдържащ гена без домените му за свързване с клетъчната стена на гостоприемника.
3. Чрез въвеждане на конструкта pBES_Inu, на така модифицирания щам *B. licheniformis* 24 T26 е придадено качеството да продуцира 2,3-БД от инулин в процес на едновременно озахаряване и ферментация.

Публикации по дисертацията

1. **Tsigoriyna L.**, Ganchev D., Petrova P., Petrov K. (2021) Highly efficient 2,3-butanediol production by *Bacillus licheniformis* via complex optimization of nutritional and technological parameters., Fermentation, 7, 3, 118 (IF 5.11) **Q1**
2. **Tsigoriyna L.**, Petrova P., Petrov K. (2021) Production of 2,3-butanediol from fructose by *Bacillus licheniformis* 24., Acta Microbiologica Bulgarica, 37,4,183-187 (IF 0.14) **Q4**
3. **Tsigoriyna L.**, Arsov A., Petrova P., Gergov E., Petrov K. (2023) Heterologous Expression of Inulinase Gene in *Bacillus licheniformis* 24 for 2,3-Butanediol Production from Inulin., Catalysts, 13, 5, (IF 4.501) **Q2**

Цитати:6

Участия на научни форуми

1. **Tsigoriyna L.**, Ganchev D., Petrova P., Petrov P. Optimization of the microbial production of 2,3-butanediol from glucose by *Bacillus licheniformis* 24 Conference “Modern Trends in Science” – FMNS-2021, 15 - 19.09.2021, Blagoevgrad, South-West University “Neofit Rilski” – Blagoevgrad.
2. **Tsigoriyna L.**, Arsov A., Petrova P., Gergov E., Petrov K. Heterologous expression of inulinase gene in *Bacillus licheniformis* 24 for 2,3-butanediol production from inulin - 2nd Symposium on Challenges in Chemical and Biochemical Technologies and Environmental Protection & 18th Workshop on Transport Phenomena in Two-Phase Flow, September 10 - 13, 2023, Sandanski, Bulgaria

Награди

1. Награда за най-добра работа на млад български микробиолог през 2021 на Фондация „акд. проф. д-р. Стефан Ангелов“
2. Награда на БАН “Иван Евстатиев Гешов“ за най-млади учени до 30 години за 2023

Литература

- [1] Y. Sohn, J. Son, S. Jo, S. Park, J. Yoo, K. Baritugo, J. Na, J. Choi, H. Kim, J. Joo, „Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: A review.,“ *Bioresource Technology*, 340, p. 340, 2021.
- [2] Y. Sohn, J. Son, H. Lim, S. Lim, S. Park, „Valorization of lignocellulosic biomass for polyhydroxyalkanoate production: Status and perspectives,“ *Bioresource Technology*, 360, 2022.
- [3] J. San, J. Joo, J. Baritugo, S. Jeong, J. Lee, H. Lim, S. Lim, J. Yoo, S. Park, „Consolidated microbial production of four-, five-, and six-carbon organic acids from crop residues: Current status and perspectives,“ *Bioresource Technology*, 351, 2022.
- [4] C.-C. Okonkwo, V. Ujor, T.-C. Ezeji, „Investigation of relationship between 2,3-butanediol toxicity and production during growth of *Paenibacillus polymyxa*,“ *New Biotechnology*, 25, pp. 23-31, 2017.
- [5] P. Petrova, P. Petlichka, P. Petrov, „New *Bacillus* spp. with potential for 2,3-butanediol production from biomass,“ *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130, № 1, pp. 20-28, 2020.
- [6] P. Petrova, K. Petrov, „Direct starch conversion into L-(+)-lactic acid by a novel amylolytic strain of *Lactobacillus paracasei* B41.,“ *Starch*, 64, pp. 10-17, 2012.

- [7] P. Petrova, P. Velikova, L. Popova, K. Petrov „Direct conversion of chicory flour into L(+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505.,” *Bioresource Technology*, 186, pp. 329-333, 2015.
- [8] G. Xue, J. Johnson, B. Dalrymple, „High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*.,” *Journal of Microbiological Methods*, 34, pp. 183-191, 1999.
- [9] L. Reddy, Y.-J. Wee, J.-S. Yun, H.-W. Ryu, „Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches,” *Bioresource Technology*, 99, № 7, pp. 2242-2249, 2008.
- [10] A. Waterhouse, M. Bertonni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gummienny, F. Heer, T. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, „SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes.,” *Nucleic Acids Research*, 46, pp. W296-W303, 2018.
- [11] C.-W. Song, C. Rathnasingh, J.-M. Park, J. Lee, H. Song, „Isolation and Evaluation of *Bacillus* Strains for Industrial Production,” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, № 3, pp. 409-417, 2018.
- [12] L. Li, L. Zhang, K. Li, Y. Wang, C. Gao, B. Han, C. Ma, P. Xu, „A newly isolated *Bacillus licheniformis* strain thermophilically produces 2,3-butanediol, a platform and fuel bio-chemical,” *Biotechnology for Biofuels*, 6, p. 123, 2013.

- [13] S. Rebecchi, D. Pinelli, G. Zanaroli, F. Fava, D. Frascari, „Effect of oxygen mass transfer rate on the production of 2,3-butanediol from glucose and agro-industrial byproducts by *Bacillus licheniformis* ATCC9789,“ *Biotechnology for Biofuels* , 11, p. 145, 2018.
- [14] L. Li, X. Wei, W. Yu, Z. Wen, S. Chen „Enhancement of acetoin production from *Bacillus licheniformis* by 2,3-butanediol conversion strategy: Metabolic engineering and fermentation control,“ *Process Biochemistry*, 57, pp. 35-42, 2017.
- [15] I. Jurchescu, J. Hamann, X. Zhou, T. Ortmann, A. Kuenz, U. Prüße, S. Lang, „Enhanced 2,3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785,“ *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, № 15, pp. 6715-23, 2013.
- [16] C. Ma, A. Wang, J. Qin, L. Li, X. Ai, T. Jiang, H. Tang, P. Xu, „Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM,“ *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, № 1, pp. 49-57, 2009.
- [17] P. Petrova, A. Arsov, I. Ivanov, L. Tsigoriyna, P. Petrov, „New Exopolysaccharides Produced by *Bacillus licheniformis* 24 Display Substrate-Dependent Content and Antioxidant Activity,“ *Microorganisms*, 9, № 10, 2021.