



Европейски съюз

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”  
BG051PO001-3.3.06 -0059



# ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ, СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ УЧЕНИ В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ И ИНОВАЦИОННИ БИОТЕХНОЛОГИИ

*Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси”  
2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд”*



Европейски съюз

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”  
BG051PO001-3.3.06 -0059



Европейски социален  
фонд

**Тема:**  
**Стереоспецифични синтези с нови  
биокатализаторни системи на основата на  
липази**

**Докторант:**

**инж. Борислав Борисов**

**Ръководител:**

**доц. д-р инж. Данчо Даналев**

**проф. д-р инж. Любов Йотова**



University of  
Chemical  
Technology and  
Metallurgy

**КАТЕДРА  
БИОТЕХНОЛОГИЯ**

*Инвестира във вашето бъдеще*



Европейски съюз

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”  
BG051PO001-3.3.06 -0059



## ***ЦЕЛИ И ПРАКТИЧЕСКО ПРИЛОЖЕНИЕ НА РАЗРАБОТКАТА***

***•Получаване и изолиране на външно клетъчни липази от различни микробиални източници, които ще бъдат използвани в реакции на стереоспецифичен синтез с участие на въглехидратсъдържащи молекули с физиологична активност.***

***•Приложение на получените външно клетъчни липази като специфични биокатализатори в реакции с участие на глицерол. Последните са обект на интензивни научни разработки във връзка с широкото им практическо приложение при получаването на биодизел.***

*Инвестира във вашето бъдеще*



Европейски съюз

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ“  
BG051PO001-3.3.06 -0059

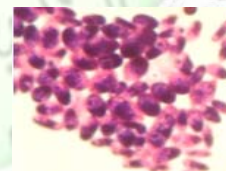
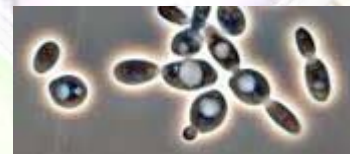
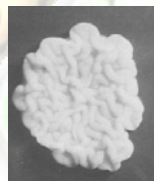


Европейски социален фонд

*Производството на липолитични ензими се осъществява с помощта на различни видове микроорганизми – бактерии, гъби, дрожди. Липазите представляват серинови хидролази, които катализират хидролизата на естерната връзка в молекулите на триглицероли, при което се освобождават мастни киселини, ди- и моноглицероли и глицерол. При подходящи условия липазите катализират и реакции на естерификация, трансестерификация и аминолиза.*

*Дрожди, щам продуценти на липази, които са обект на изследванията:*

- ❖ *Candida antarctica*
- ❖ *Yarrowia lipolytica*
- ❖ *Candida rugosa*
- ❖ *Candida blankii*



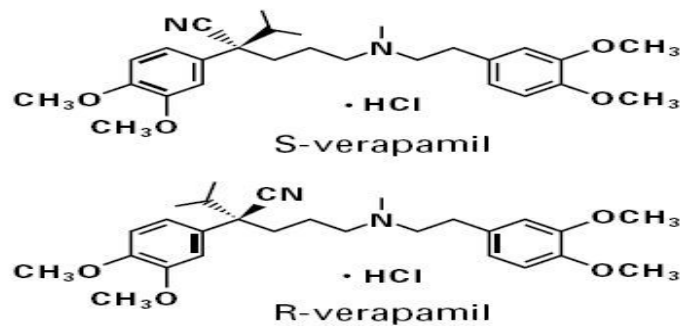
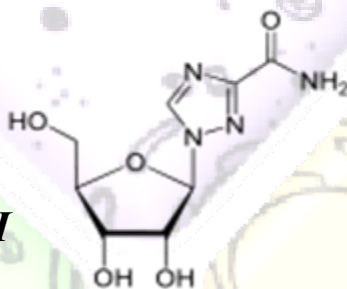
*Липолитичните ензими, получени от дрожди са обект на интензивни научни разработки, свързани с получаване на оптически чисти съединения, важни за фармацевтичната индустрия.*



Европейски съюз

***I. Липазите, получени от дрожди, показват много висока енантио- и стереоселективност при реакции с участието на първични, вторични и третични алкохоли.***

### ***РИБАВИРИН***



***Тези ензими се използват за специфичен и селективен биокаталитичен синтез на сърдечно-съдови лекарства (Verapamil, Galloramil), антивирусни агенти за третиране на хепатит и HIV и др.***

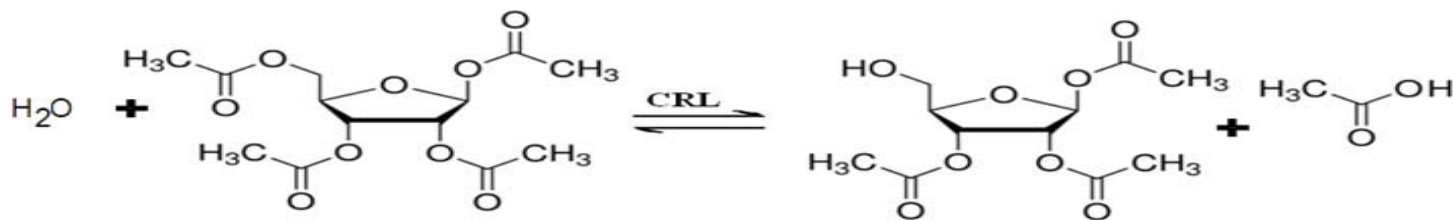
***Дрождите *Candida antarctica* са обект на огромен интерес в научните среди, поради способността им да продуцират два вида липази - А и Б. Доказано е, че те притежават стереоселективност спрямо различни видове хидроксилни групи на въглехидратни остатъци.***



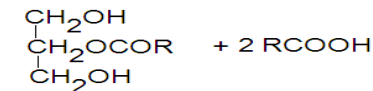
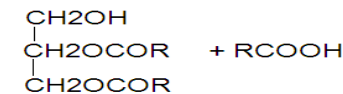
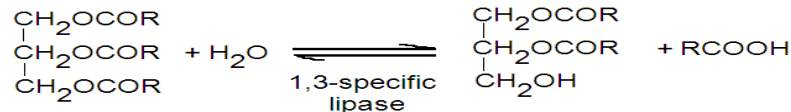
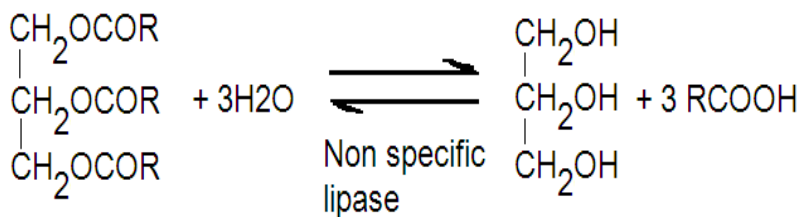
Европейски съюз



**II. Липазата продуцирана от *Candida rugosa* притежава стереоселективност към въглехидратните остатъци в 5-та позиция. Няма литературни сведения за стереоселективността на липазите, изолирани от *Yarrowia lipolytica* и *Candida blankii*, към въглехидратсъдържащи молекули.**



**III. Липазите са обект на интензивни научни разработки във връзка с тяхната висока стереоспецифичност и възможността да бъдат използвани като стереоспецифични биокатализатори за получаване на биодизел.**





Европейски съюз

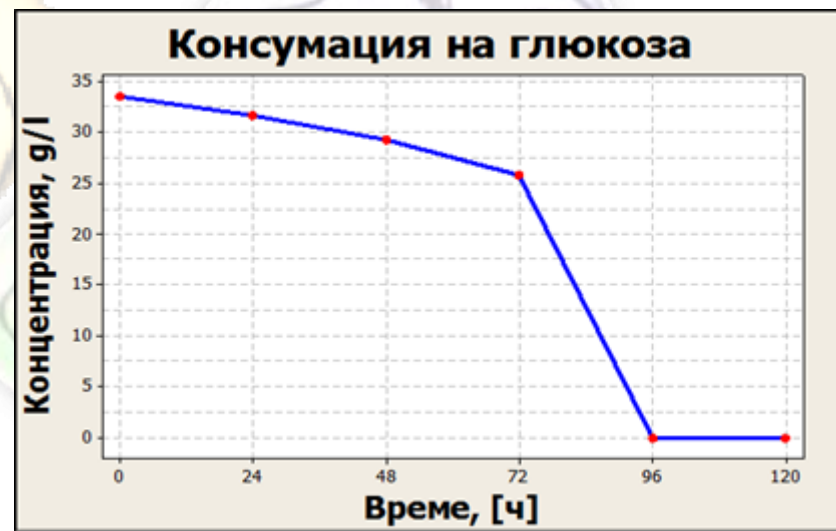
ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”



BG051PO001-3.3.06 -0059

## РЕЗУЛТАТИ

*Candida antarctica* е първият избран от нас обект от четирите щамове за култивиране и тестване за липазна активност. Щамът, от лиофилна форма беше рехидратиран, инокулиран и култивиран върху твърда, след това на течна хранителна среда. Култивирането беше направено при температура 25°C, с начално рН 6, 7 дни период на култивация и глюкоза като въглероден източник.



*Във връзка с намирането на оптималните условия за култивиране на щам продуцента до момента са тествани хранителни среди с различно съдържание на глюкоза. Консумацията на глюкоза е измервана с HPLC.*



Европейски съюз

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ“  
BG051PO001-3.3.06 -0059



**След 7 дни култивация на клатачка, културалната течност беше центрофугирана и получената супернатанта е анализирана титриметрично за липазна активност.**



**Изчислената активност на суровата липаза е 100U/mg, като е определен температурния оптимум 60°C и pH оптимума 8.1.**

**Получената сурова липаза беше тествана за активност в реакция на деблокиране на перацетилирана рибоза, която е моделен субстрат за синтеза на противовирусни агенти.**



**На снимката ясно се вижда хода на реакцията на деблокиране.**





Европейски съюз

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ“  
BG051PO001-3.3.06 -0059



Европейски социален фонд

## ***ПРЕСПЕКТИВИ***

- ❖ ***Намиране на оптималните условия за култивиране на останалите 3 щама дрожди***
- ❖ ***Изолиране и анализ на получените липази***
- ❖ ***Широкомащабен синтез на липази с помощта на ферментор под контролирани условия***
- ❖ ***Електрофоретичен анализ на получените липази, чрез SDS PAGE***
- ❖ ***Приложение на получените липази в стереоселективни синтези с моделни субстрати, чрез реакции на блокиране и деблокиране на хидроксилните им групи***



*Инвестира във вашето бъдеще*



Европейски съюз

## СПИСЪК С РЕАКТИВИ

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- $NaNO_3$
- $AgNO_3$
- *Glycerol*
- $(NH_4)_2SO_4$
- Тритон x 100
- HCL
- Акриламид
- *Lipase Substrate*
- *for the titrimetric determination of enzyme activity*
- 4- Nitrophenyl palmitate
- 4- Nitrophenyl decanoate
- МАРКЕР ЗА SDS PAGE
- *Lipase Activity Assay Kit II*
- *Ultrafiltration Discs, PLTK, Ultracel regenerated cellulose, 30kDa NMWL, 63.5mm*
- *Lipase A, Candida antarctica, CLEA*
- *SDS-, 98%, for biochemistry, suitable for electrophoresis*
- Tween 80
- TEMED
- *Lipase B Candida antarctica, recombinant from Aspergillus oryzae*



Европейски съюз

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”  
BG051PO001-3.3.06 -0059



Европейски социален  
фонд

**БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО!**

### БЛАГОДАРНОСТ

Тази работа е осъществена с подкрепата на Договор №BG051PO001-3.3.06-0059, финансиран от Европейския социален фонд и Оперативна програма Развитие на човешките ресурси (2007-2013) и съфинансирана от Министерството на образованието и науката в Република България.

*Инвестира във вашето бъдеще*