

РЕЗЮМЕТА НА ОСНОВНИТЕ РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

в научните трудове на гл. ас. д-р инж. Михаил Неделчев Камбуров

Основни резултати и научни приноси са обобщени в следните направления:

I. Изолиране, пречистване и охарактеризиране на ензими и белтъчни ензимни инхибитори.

II. Имобилизирание на ензими и възможности за тяхното приложение.

III. Получаване и приложение на хитозан.

IV. Получаване и приложение на нано- и микрочастици за доставка на биологичноактивни вещества.

V. Приложение на хроматографски методи в аналитичната практика.

VI. Биометанизация.

Основни резултати и научни приноси в направление I. Изолиране, пречистване и охарактеризиране на ензими и белтъчни ензимни инхибитори

Изследванията в това направление са свързани с разработването както на лабораторни, така и на промишлено приложими методи за получаване на ензими и белтъчни ензимни инхибитори с необходимата чистота, в т.ч. и за фармацевтично приложение. Използвани са хроматографски методи както в аналитичен, така и в препаративен мащаб. Степента на тяхното пречистване е проследявано чрез определяне на: белтъчно съдържание, ензимна или инхибиторна активности, чистота (полиакриламидна дискова електрофореза, HPLC, UV-спектроскопия и др.). Постигнатите резултати са публикувани или предоставени на конкретния възложител.

Трипсиновият инхибитор тип „Kunitz” (Апротинин) е първият протеолитичен инхибитор от животински произход, който може да инхибира трипсина, α -химотрипсина и каликреина. Взаимодействието на апротинина и трипсина се основава на образуването на устойчив комплекс, за чиято стабилност са отговорни няколко фактора, между които е и солевата връзка, образувана между Lys-15 от инхибитора и Asp-177 от трипсина. Това специфично свързване е основание за имобилизирането на аспарагиновата киселина към активирана с бромциан Sepharose-4B и използването на полученият сорбент за пречистване на Апротинин. „Суров” трипсинов инхибитор е получен чрез водно-етанолова екстракция на говежди бял дроб и е подложен на афинитетна хроматография върху Asp-Sepharose-4B. Образуваният комплекс (лиганд-лигат) се разрушава при понижаване на pH, при което се получава инхибитора във високо пречистена форма - електрофоретично хомогенен, а неговата инхибиторна активност е 1560 AtpE/mg. Тези резултати са основа за разработване на технология за пречистване на инхибитора в полупромишлен вариант.

Предложен е патентно защитен метод за изолиране и пречистване на Апротинин при промишлени условия. Водно-етанолните екстракти от говежди бял дроб се

пропускат през колона, запълнена с макропорест сулфокатионит КУ-23. На този етап се постига фактор на пречистване 44,4 и 2500 АtpE/mg специфична инхибиторна активност. Последният етап на пречистване, т.н. „Polishing” се реализира чрез гелхроматография върху колона, „Stack” система, състояща се от 6 бр. секции, запълнени със Sephadex G-50. Полученият Апротинин е лиофилизиран и подробно анализиран: електрофоретична хомогенност, активност 3550 АtpE/mg и по всички други показатели залегнали в Регламента за производство на Апротил субстанция („Апротил” е наименованието на субстанцията произведена в ХФК „Софарма”). От произведената субстанция „Апротил” са приготвени ампули „Апротил-L” 50 000 АtpE и клиничните изследвания успешно са проведени във ВМА и МБАЛСМ „Н.И.Пирогов”.

Панкреатичният секреторен трипсинов инхибитор (тип „Kazal”) се съдържа в много малки количества в свинския панкреас, ето защо отпадните фракции след кристализацията на инсулина в процеса на производството му от същата суровина са използвани като изходна суровина за пречистването му. Инхибиторът е пречистен чрез комбиниране на гел- и йонообменна хроматографии. Използвана е и афинитетна хроматография за едностепенното пречистване на продукта.

И двата трипсинови инхибитори – тип „Kunitz” и тип „Kazal” са пречистени с помощта на афинитетна ултрафилтрация, метод, който комбинира големите възможности на афинитетния принцип и тези на ултрафилтрацията за разделяне по молекулна маса, обезсоляване и концентриране. Трипсинът или химотрипсинът са имобилизирани ковалентно към перйодатно окислен водоразтворим декстран (мол.маса 100 хил.D) и тези афинитетни лиганди са използвани за пречистване на съответните инхибитори. Инхибиторът тип „Kazal” предвид неговата ограничена инхибиторна способност (основно инхибира трипсина) е пречистен с помощта на трипсин-декстран, докато другият инхибитор - тип „Kunitz” чрез трипсин-декстран или химотрипсин-декстран. След дисоцииране на инхибиторите от комплексите им с високо молекулните афинитетни лиганди, те се разделят от тях с помощта на ултрафилтрационна мембрана с разделителна способност 10 хил.D.

Овомукоидът е специфичен инхибитор на трипсина и α -химотрипсина. Фрагментирането на кокошия овомукоид е извършено с бромциан при двата метионилови остатъци в позиции 68 и 84 в аминокиселинната му последователност. Фрагментите са подложени на разделяне с помощта на афинитетна хроматография с трипсин- Sepharose-4B. Тяхната хомогенност е доказана с аминокиселинен анализ и електрофореза. Сравнена е конформацията на нативния овомукоид и тази на фрагмент I (от 1 до 68 остатък) чрез флуоресцентна и UV-спектроскопии. Доказано е, че един от тирозиловите остатъци запазва аномалните си отнасяния при преминаване от неутрално към кисело рН и вероятно не е ангажиран в никакви стабилизиращи молекулата взаимодействия. КД-спектрите показват, че в този фрагмент са съсредоточени и α -спиралните участъци на нативния овомукоид.

Пречистеният с помощта на предложените методи апротинин е охарактеризиран чрез физикохимични, биохимични и кинетични методи и резултатите са сравнени с тези на фирмени образци („Novo” и „Calbiochem”). Резултатите от UV-спектри са използвани за предлагане на критерий за чистота на пробите чрез използване на характерното отношение на абсорбциите при 277 и 254 nm, така например тази стойност за високопречистените проби е от 1,9 до 2,1. Резултатите от електрофорезата

при нативни условия, представени след денситометриране показват високата степен на пречистване на пробите. Инхибиторната активност е основен показател за свойствата на природните инхибитори, а единиците чрез които се изразява (AtpE или KIU) зависят от използвания метод. От получените резултати е предложена емпирична зависимост за превръщане на KIU и AtpE ($1,75 \text{ KIU} = 1 \text{ AtpE}$). Съдържанието на апротинина в изследваните проби е определено и с метода за титруване на трипсин с нарастващи концентрации инхибитор. От получените криви на титруване е изчислено процентното съдържание на активен компонент, съответно за „Апротил” – 84% и за апротинин-“Novo” – 90%. Подобни са и резултатите от HPLC анализа на колона Nucleosil-IO C-18.

Стрептокиназата е белтък (активатор на плазминогена), продуциран от β -хемолитични стрептококи (*Streptococcus sp.* 2289). В съвременната медицина стрептокиназата, а също и урокиназата и тъканния плазминогенен активатор са ефективни тромболитични средства. За нуждите на НИХФИ-АД-София е разработена Лабораторна технология „Биосинтез, изолиране и пречистване на стрептокиназа от хемолитичен стрептокок”. Схемата включва: подготовка на качествен посевен материал, биосинтез на стрептокиназа, обработка на културалната течност и изолиране и пречистване на крайния продукт. Ферментацията е проведена в 1,5 l лабораторен ферментор върху среда на Todd Hewitt, съдържаща 5% глюкоза. По време на процеса се контролира pH 7-7,2, концентрацията на глюкозата и развитието на културата. В края на ферментацията активността на стрептокиназата е 2000-2500 IU/ml, определена чрез метода на т.н. фибринови плаки. След центрофугиране, биомасата се отделя, а от центрофугатът се получава „сурова” стрептокиназа чрез изсолване с амониев сулфат. По-нататъшното пречистване включва анионообменна хроматография върху DEAE-Sepharese. Фракциите, съдържащи стрептокиназна активност се обединяват и лиофилизират. Съдържанието на белтък е 92 mg, а активността е 28000 IU/mg.

Основните резултати от изследванията в направление свързано с изолиране, пречистване и охарактеризиране на ензими и белтъчни ензимни инхибитори са представени в следните материали:

М.Кръстева, М.Камбуров, И.Добрев, 1984, Изолиране и изучаване на фрагменти от протеиназния инхибитор овомукоид, Годишник на ВХТИ-София, XXIX, 258-262.

M.Krysteva, M.Kamburov, 1984, Purification of basic trypsin inhibitor by specific binding on aspartic acid-Sepharose, Compt.rend.Acad.bulg.Sci., 37, N° 6, 807-810.

М.Камбуров, С.Благов, Ст.Шкендеров, 1992, Сравнително охарактеризиране на „Апротил” – субстанция, Известия на Националния Институт по Лечебните средства, т. XXV, 33-41.

М.Камбуров, С.Благов, П.Ушев, Получаване на трипсинов инхибитор тип „Казал”, Научна постерна сесия на младите научни работници от: НИФФ, НИХФИ, ДИКЛС – гр.София, Паничище, февруари, 1981 г.

М.Кръстева, М.Камбуров, И.Добрев, Изолиране и изучаване на фрагменти от протеиназния инхибитор овомукоид, Юбилейна научна сесия „30 години ВХТИ-София, 27-28. X. 1983 г.

Kamburov M., Comparative characterization of “Aprotin”, Tenth Balkan Biochemical and Biophysical days, 22-25 May 1994, Varna, Bulgaria.

М.Кръстева, М.Камбуров и др. Метод за пречистване на инхибитор на трипсин и каликреин, Авторско свидетелство № 36807, 1983 г.

М.Камбуров, Н.Ларионова и др. Метод за пречистване на инхибитори на трипсин тип „Кунитц” и тип „Казъл”, Авторско свидетелство № 50890, 1990 г.

М.Камбуров, С.Благов и др. Метод за получаване на апротинин, Авторско свидетелство № 51100, 1990 г.

Х. Димитрова, М. Камбуров, Е. Кондакова, С. Петкова, Метод за получаване на стрептокиназа, Юбилейна научна сесия – НИХФИ-50, Разширени резюмета, 30-31 октомври 1997г, София.

Основни резултати и научни приноси в направление II. Имобилизиране на ензими и възможности за тяхното приложение

Пектолитичните ензими намират широко приложение в хранително-вкусовата промишленост, напр. за получаване на безпектинови плодови концентрати, а също и за избистряне на сокове и вина, при което колоидните пектинови вещества претърпяват хидролитична деструкция. Чрез имобилизирането на пектолитичният ензимен комплекс към гранулирана целулоза, активирани с карбамид и формалдехид се създава възможност за многократното приложение на биокатализатора в горепосочените области. Имобилизираният ензимен комплекс е охарактеризиран спрямо пектинови субстрати с различна степен на естерифициране. Оптимизирано е съотношението на полигалактуроноазната и пектинестерезната активности, а най-добри резултати са отчетени при рН на имобилизация 4.0. Изследвана е кинетиката на хидролиза на пектин в „бач” форма на процеса, при което е установено балансираното действие на пектолитичните ензими.

Създаден е лабораторен прототип на биореактор за конверсия на субстрати с имобилизирани ензими. Той осигурява възможност за действие в широк интервал от производителност по течност, опростено подменяне или промиване на дезактивирания ензим и ниско хидравлично съпротивление. Биореакторът е с цилиндрична форма, в който са оформени смесителна и утаителна камери, разделени с преграда. Четири последователно свързани биореактори оформят каскада, която е заредена с биокатализатор– ковалентно имобилизирана уреаза върху гранулирана микрокристална целулоза. Промислена отпадъчна вода от производството на карбамид (8 g/l карбамид) се подлага на биологично разграждане в каскадата до постигане на минимална концентрация – под 0,01%. Полученият амонак се сорбира в йонообменна колона.

През последните години някои ензими (целулази, амилази, ксиланази, пектинази, липази и др.) намират приложение при обработката на отпадъчна хартия. Важен етап при производството на хартия от отпадна хартия е отстраняването на мастилото. Офсетова хартия за рециклиране е хомогенизирана и подложена на флотация в лабораторна флофационна клетка в присъствие на Twin-80 и ксиланаза, или пектиназа, или амилаза, или трите ензима заедно. От така обработената суспензия са получени отливки, които са анализирани за белота, ефект на обезмастиляване, здравина и др. Определено е, че 0,1% добавен ензим е оптималното количество за обработка на отпадна хартия, като амилазата е най-ефективна, а комбинацията от трите ензима показва най-добри резултати. При ензимното третиране се постига баланс между здравината на целулозните влакна и добива на хартия.

Синтетичните органични носители показват най-голяма вариабилност по отношение на физични и химични свойства. Изследванията в това направление са свързани и със синтезирането на матрици на основата на винилови мономери чрез суспензионната им съполимеризация във водна среда, водоразтворими инициатори (калиев персулфат, водороден прекис и др.) и окислително редукиращи системи. Синтезирани са следните съполимери: поли(акрилонитрил-съ-акриламид) с различни съотношения на изходните мономери, поли(стирен-алт.-малеинов анхидрид), поли(стирен-съ-малеинов анхидрид), поли(стирен-съ-малеинов анхидрид-съ-дивинилбензен), поли(акриламид-съ-малеинова киселина-съ-метиленабисакриламид) и поли(акрилонитрил-съ-малеинова киселина). Получените продукти са анализирани с FTIR. Определени са граничните вискозитети на техни разтвори в диметилформамид с вискозиметър тип Ubbelodhe при 20°C и са изчислени молекулните им маси.

Синтезираните матрици са активирани с някои от следните методи: с формалдехид, с глутаров алдехид, чрез азидния метод и др. Имобилизирани са следните ензими: полигалактуроназа, пектинестераза, трипсин, глюкозооксидаза, каталаза и уреаза.

Оптимизирани са условията за ковалентно имобилизирание на трипсин към матрици от поли(акрилонитрил-съ-акриламид) с различно съдържание на мономерите. Варирани са още концентрацията на трипсина и рН (рН 4,0 и 5,0) при имобилизацията му. Имобилизирани са от 28.0 mg/g до 50 mg/g трипсин с относителни амидазни активности в диапазона 14-23% и 5% относителна протеолитична активност. Полученият имобилизиран трипсин е използван като афинитетен сорбент за пречистване на апротинин. Установено е, че 40% от имобилизираният трипсин е способен да свързва трипсиновият инхибитор при условията на експеримента, което го прави приложим за афинитетно разделяне на този скъп продукт само с една стъпка на пречистване, като се реализира висока степен на пречистване, благодарение на високото сродство между лиганда и лигата.

Моделният ензим трипсин е имобилизиран и към матрица на основата на синтезия поли(стирен-съ-малеинов анхидрид) с различно съдържание на мономерите. Получените поли(стирен-съ-малеинов анхидрид) са анализирани с FTIR, като са наблюдавани характерните абсорбционни ивици за нитрилната и карбоксилите групи. Формувани са сферични микрочастици с диаметър от 100 до 1000 μm . Допуска се, че трипсинът ковалентно се свързва към реактивоспособните анхидридни групи от носителя чрез ϵ -амино групите на лизиловите му остатъци (те не участват в активния център на ензима). Установено е, че имобилизацията на трипсина върху фракцията микрочастици с размер 100-200 μm е най-успешна по отношение на количество имобилизиран ензим (34 mg/g) и съответната му относителна активност (19%).

Синтезирани са поли(акрилонитрил-съ-акриламид) с различни съотношения на изходните мономери, от които са формувани сферични микрочастици с включен магнетит. Моделният ензим трипсин е имобилизиран ковалентно към ацил-азидно активираната матрица. Изследвано е влиянието върху процеса на имобилизирание на следните параметри: рН, съотношение на белтък:носител и съдържание на магнетит в микрочастиците. Максималното количество имобилизиран трипсин е 14,4 mg/g носител, а относителната му активност е 90% при 20% съдържание на магнетит в микрочастиците. рН оптимумът и кинетичните константи (V_{max} и K_m) на

имобилизираният ензим са съизмерими с тези на свободния ензим, което е доказателство, че не настъпват структурни промени в белтъчната молекула.

Съполимери, съдържащи реактивоспособни анхидридни групи са получени чрез суспензионна радикалова съполимеризация на стирен, малеинов анхидрид и дивинилбензен. При еквимоларни съотношения на стирена и малеиновия анхидрид се получава поли(стирен-алт.-малеинов анхидрид), при излишък на стирена - поли(стирен-съ-малеинов анхидрид), а в присъствие и на дивинилбензена като омрежващ трети мономер –пространствено омрежен гел от поли(стирен-съ-малеинов анхидрид-съ-дивинилбензен). Способността на получените матрици, ковалентно да свързват ензими е изследвана с помощта на трипсин. Относно кинетичните свойства на имобилизирания трипсин към различните носители се наблюдават две тенденции: с увеличаване на свързания ензим при рН 4,2 се намаляват специфичната и относителната активности спрямо синтетичния субстрат BANI и обратната тенденция при рН 7,8. Установената взаимовръзка между каталитичните свойства на имобилизирания ензим и условията на ковалентното му свързване към различните носители може да се обясни с участието на Ser-186 (участващ в активния център на трипсина) в образуването на естерна връзка с анхидридните групи от носителя при рН 4,2, докато в алкалната област преобладаващо се получават амидни връзки.

Носител за имобилизиране на ензими с висока степен на порьозност е синтезиран чрез суспензионна радикалова тройна съполимеризация на стирен, малеинов анхидрид и дивинилбензен (като омрежващ мономер). Химичната му структура е изследвана с FTIR, при $1854,6\text{ cm}^{-1}$ и $1771,7\text{ cm}^{-1}$ се наблюдават ивиците на анхидридните групи, а при $1632,2\text{ cm}^{-1}$, тази на бензеновото ядро. Порьозната структура на микрочастиците се наблюдава със сканиращ електронен микроскоп. Предложен е вероятен механизъм за ковалентното взаимодействие на глюкозооксидазата с анхидридните групи от носителя, който зависи от рН на средата за имобилизация; чрез образуване на амидни или естерни връзки. Всичките параметри, характеризиращи процесът на имобилизация показват много добри стойности, напр.: имобилизационният добив е 87,0%, капацитетът на полученият носител да свързва ензими е 87,1 mg/g и 69,4% относителна активност, най-вероятно поради гелната му структура и наличието на анхидридни реактивоспособни групи. Установена е повишена стабилност при съхранение на имобилизирания ензим в сравнение със свободния ензим. Полученият имобилизиран ензим е използван в процес на окисление на глюкозата в моделна смес на 97% полидекстроза и 3% глюкоза (имитираща „сурова“ полидекстроза) и в присъствие на каталаза. Изследвано е влиянието на скоростта на разбъркване и аерирането върху процеса на пречистване на „сурова“ полидекстроза. Хидродинамичните изследвания показват лимитиране на дифузионните процеси на субстратите (глюкоза и кислород) при скорост на разбъркване 60rpm в сравнение с по-големите скорости (300 rpm). Резултатите относно влиянието на аерирането върху скоростта на процеса показват, че необходимото количество разтворен кислород се осигурява при дебит на въздуха 2 l/min.

Основните резултати от изследванията в направлението свързано с имобилизиране на ензими и възможности за тяхното приложение са представени в следните материали:

Krysteva M., Kamburov M., Immobilization of pectic enzymes and their application for bioconversion of pectins, 31st International congress of pure and applied chemistry, 2, 4, 71, 13-18, 7, 1987, Sofia, Bulgaria.

М.Камбуров, Т.Иванов, Получаване на полимерни носители с магнитни свойства за имобилизиране на лиганди, XIV Национален симпозиум „Полимери-2002”, София, 3-4 октомври 2002 г.

М.Камбуров, Т.Иванов, Имобилизирани ензими към съполимери на основата на малеинов анхидрид, XIV Национален симпозиум „Полимери-2002”, София, 3-4 октомври 2002 г.

Kamburov M., Velkova R., Immobilization of glucose oxidase and catalase, 3rd International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries on Chemistry in the New Millennium-an Endless Frontier, 22-25 September, 2002, Bucharest, Romania.

М.Камбуров, И.Лалов, Изследване афинитета на апротинина към имобилизиран върху хитозан трипсин, Научни трудове т.LX „Хранителна наука, техника и технологии – 2013”, 18-19 октомври 2013, Пловдив, 1020-1024

М. Камбуров, Т. Иванов, И. Лалов, Пречистване на „сурова” полидекстроза с имобилизирана глюкозооксидаза, Научни трудове на университет по хранителни технологии – Пловдив, том LXI 2014 г. 474 – 479.

М. Камбуров, Т. Иванов, И. Лалов, Получаване на синтетични носители за имобилизиране на ензими, Научни трудове на университет по хранителни технологии – Пловдив, том LXI 2014 г. 480 – 484.

M. Kamburov, T. Ivanov, I. Lalov, Immobilization of glucose oxidase on porous copolymer, Bulg. Chem. Commun. 2014, vol. 47, Special issue, 69-73.

М.Кръстева, Г.Пеев, Т.Соколов, М.Камбуров, Л.Йотова, Биореактор за конверсия на субстрати с имобилизирани ензими, Авторско свидетелство № 42278, 1986 г.

Основни резултати и научни приноси в направление III. Получаване и приложение на хитозан

Хитозанът е нетоксичен, биологично активен, биосъвместим и биоразградим полимер, който се прилага в многобройни области. Индустриалното му производство от ракообразни, обаче, е свързано с получаването на продукт с редица трудно преодолими недостатъци. При изследванията свързани с получаването на микробен хитозан е разработен лабораторен метод за изолиране на хитозан от плесенна биомаса на *Absidia coerulea*. Култивирането на плесента върху среда получена на основата на спиртна шлемпа доказва възможността този отпадъчен продукт да се използва като потенциален източник за получаване на хитозан. При култивирането на *Absidia coerulea* върху среда от спиртна шлемпа с ХПК от 47,43 g O₂/L е постигнат добив на въздушно сух мицел от 4,46 g/L, съдържащ 1,28 % екстрахируем хитозан.

Изследвани са две основни области на приложение на хитозана. Първата е свързана с използването му за екологични цели, по-специално в процесите на пречистване на води замърсени с тежки метали и за получаване на композиции за

опаковъчни хартии. Второто приложение е свързано с получаването на подходящ носител за имобилизация на ензими и по-конкретно на трипсин и използването на този комплекс (хитозанова частица – трипсин) за афинитетно пречистване на апротинин.

Хитозанът има добър свързващ капацитет по отношение на тежки метали, но чистият хитозан не е особено устойчив в химично и механично отношение. Проведени са изследвания за подобряване на химическите и механичните му характеристики и за създаване на нов композитен биосорбент посредством отлагане на хитозан върху гранулиран активен въглен и стабилизация на отложения филм с омрежващ агент – оксалова киселина. Използването на този модифициращ агент (както и на активен въглен в ролята на носител-подложка) значително подобряват едновременно и механичните и адсорбционните характеристики на биосорбента, особено по отношение на катионните форми на тежките метали. Това е доказано посредством определяне на максималните капацитети на свързване на различни метали ($285,7 \text{ mgCu}^{2+}/\text{g}$, $277,7 \text{ mgZn}^{2+}/\text{g}$ и $270,3 \text{ mgNi}^{2+}/\text{g}$). Проведен е колонен процес за пречистване на синтетични отпадъчни води замърсени с тежки метали. Установено е значително подобряване на механичните характеристики на новополучения биосорбент в сравнение с немодифицирания хитозан. В последния етап на изследванията в това направление е създаден и биосорбент с магнитни свойства посредством покриване на магнитен композит с хитозанов филм.

Съвременната хранително-вкусовата промишленост е изправена пред различни предизвикателства, които изискват специфични подходи за преодоляването им. Търсенето на нови материали за опаковки (т.н. активни опаковки) е важна и актуална тема в хранително-вкусовата промишленост. Хитозанът е включен към дървесни пулпове с различно съдържание на мека и твърда дървесина на етапа на получаване на хартиените листове, които са изследвани по отношение на механичните им свойства. Друго важно свойство на предложената активна опаковка е, че с увеличаване от 0,2% до 2,0% на включения хитозан се установява намаляване адсорбцията на вода.

Във връзка с приложението на хитозана като носител за имобилизиране на трипсин и използването на получения комплекс за пречистване на апротинин е разработена процедура за получаване на омрежени с глутаров алдехид хитозанови макрочастици с контролирани размери вариращи между 1200-1500. Подробно е изследван процесът на омрежване на хитозановите частици, в т.ч. и чрез FTIR. Установено е, че пълното модифициране на хитозана се постига при 10 кратен излишък на глутаров алдехид. Предложен е механизъм, обясняващ стабилността на омрежените хитозанови частици, а именно чрез спрежение на нестабилната шифова база с двойната връзка в α, β положение. Този механизъм може да се приложи и в случаите на ковалентното свързване на ензими към активирана хитозанова матрица. Върху хитозанови частици с контролирани характеристики ковалентно е имобилизиран трипсин, като по този начин е създаден сорбент за афинитетно пречистване на апротинин. Чрез определяне на каталитичните и кинетични параметри на свободния и имобилизиран трипсин е установено влиянието на различни технологични параметри върху ензимната активност. Получените резултати показват, че оптималните рН и температура за хидролизата на нискомолекулен субстрат са съответно рН 8,0 и 50°C. Изследвано е и влиянието на субстратната концентрация, като стойностите на константите са съответно $K_m = 1,54 \text{ mM/L}$ и $V_{max} = 3.3 \text{ } \mu\text{M/min}$.

При охарактеризиране на трипсин-хитозановия комплекс по отношение на каталитичните характеристики на имобилизирания ензим, както и при изследване на афинитета на апротинина към свързания трипсин е установено, че процесът на ковалентно свързване не води до промяна на нативната конформация на участъка от белтъчната молекула отговорен за каталитичната му функция. Получените омержени частици притежават определена пространствена структура и представляват потенциални матрици за твърдофазната биохимия. Афинитетът на получените сорбенти е изследван чрез определяне констатите на инхибиране спрямо апротинин. Представен е математичен модел за образуване на здрав ензим-инхибиторен комплекс, какъвто е случая при трипсина и апротинина. Определянето на K_i се извършва чрез титруването на ензима с инхибитор съгласно методология предложена от Bieth. От резултатите получени при титруването на активния център на трипсин с увеличаващи се количества апротинин е изчислена $K_i = 0,41 \cdot 10^{-9}$ [M/l]. Резултатите от титруването на активния център на имобилизиран трипсин с апротинин са представени посредством нелинейна зависимост и с тяхна помощ е изчислена $K_i = 0,356 \cdot 10^{-7}$ [M/l]. Изчислено е %-ното съдържание на активните центрове в „свободен” и имобилизиран трипсин, откъдето може да се направи заключението, че процесът на ковалентно свързване на трипсина към омержени и активирани с глутаров алдехид хитозанови гелове не води до промяна на нативната конформация на активния център на ензима. С получения афинитетен сорбент на основата на ковалентно свързан към омержени хитозанови частици трипсин е осъществен процес на пречистване на апротинин до електрофоретична хомогенност, като е постигната 7,6 пъти степен на пречистване и много висока инхибиторна активност (3250 AtpE/mg).

Основните резултати от изследванията в направлението свързано с получаването и приложенията на хитозана са представени в следните публикации:

Лалов И., Камбуров М., Бозаджиев О., Иванова Х., Димитров И., (2011) Получаване на хитозан посредством микробиологична трансформация на спиртна шлемпа, “Хранителна наука, техника и технологии -2011”, 195-200, 14-15 октомври 2011, Пловдив.

Камбуров М., Лалов И., (2011) Получаване на хитозанови частици с имобилизиран трипсин и използването му за пречистване на апротинин, “Хранителна наука, техника и технологии -2011”, 189-194, 14-15 октомври 2011, Пловдив.

Лалов И., Камбуров М., Бозаджиев О., Иванов Т., Димитров И., Димитров Д., (2012) Пречистване на отпадни води замърсени с тежки метали с помощта на модифициран хитозанов биосорбент, Научни трудове на УХТ, “Хранителна наука, техника и технологии -2012”, 19-20 октомври 2012, Пловдив, т. LIX, 595-600.

Kamburov M., Lalov I., (2012). Preparation of chitosan beads for trypsin immobilization, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26, 156-163.

Камбуров М., Лалов И., (2012) Изследване омержването и активирането на хитозан с глутаров алдехид за имобилизиране на ензими, Научни трудове на УХТ, “Хранителна наука, техника и технологии -2012”, 19-20 октомври 2012, Пловдив, т. LIX, 579-583.

Камбуров М., Лалов И., (2013) Изследване афинитета на апротинина към имобилизиран върху хитозан трипсин, Научни трудове на УХТ, “Хранителна наука, техника и технологии -2013”, 18-19 октомври 2013, Пловдив, т. LX, 1020-1024.

Основни резултати и научни приноси в направление IV. Получаване и приложение на нано- и микрочастици за доставка на биологично активни вещества

Химиотерапията е един от основните методи за лечение в съвременната онкология. Прилагането, усвояването и отделянето на лекарствени препарати могат да бъдат регулирани чрез включването им в полимерни микро- и наночастици. Синтезирани са *in situ* полибутилцианакрилатни наночастици чрез анионна емулсионна полимеризация, като са определени оптималните стойности на pH и концентрацията на Pluronic F68 за получаването на наночастици с тясно разпределение по размери. Даунорубицинът и 5-флуороурацилът са включени в наночастиците в процеса на тяхното получаване, а изчерпателното им физикохимично охарактеризиране включва: определяне на диаметъра им чрез HPPS и GPC (от 125 до 192 nm), изследване на структурата им с FTIR и взаимодействието между лекарство и полимер с ^1H NMR спектроскопия. Определен е свързващия капацитет и ефективност на включване на даунорубицина в зависимост от концентрацията му. Във FTIR-спектрите се наблюдават две характерни ивици при 1617 и 1580 cm^{-1} съответно за хионовата карбонилна група и за виниловата група, което е доказателство за наличието на даунорубицина в полимерната структура на наночастиците. NMR анализите показват три възможни начина за взаимодействия между между лекарство и полимер: чрез образуване на водородни връзки, чрез физическо включване и чрез адсорбция. Изследвано е освобождаването на даунорубицина *in vitro*, като е определено, че 17% от него бързо се отделя, а останалото количество по-бавно в продължение на 500 min.

Цитотоксичността на наночастиците с включен даунорубицин е изследвана спрямо човешки туморни клетки (линия 8MGBA). Резултатите за преживяемостта на клетките след 48 часовото им инкубиране показват, че този процес е концентрационно зависим и че включването на даунорубицина в полибутилцианакрилатни наночастици не води до инактивиране на неговата цитотоксична активност.

Даунорубицинът е включен и в структурата на хитозанови микрочастици за получаване на система за доставяне и контролирано освобождаване на антибиотика. Към получените по суспензионния метод хитозанови микрочастици, омрежени и активирани с глутаров алдехид е включен даунорубицина. Изследвани са някои физико-химични свойства на така натоварените микрочастици: степен на набъбване, ефективност на включване, морфология и структура. От FTIR-спектрите може да се предположат следните възможни механизма за ковалентно свързване на даунорубицина към активираната хитозанова молекула: а) чрез нестабилна Шифова база, б) чрез имино връзка, стабилизирана с двойната връзка при α , β позиция, в) чрез образуване на вторичен амин и г) чрез комбиниране на трите механизма. Доказателство за предложените механизми за ковалентно свързване на даунорубицина към хитозана са получени при *in vitro* освобождаването му при условия, симулиращи гастроинтестиналния тракт (pH и лизозим). На първия етап (при pH 1,2) освобождаването зависи от степента на омрежване на микрочастиците поради влиянието на този параметър върху степента на набъбване. На втория етап (pH 7,5 и лизозим) освобождаването на даунорубицина може да се обясни с ензимната ерозия на микрочастиците, процес, също зависим от моларния излишък на глутаровия алдехид в процеса на омрежване и активиране на хитозановите микрочастици.

Приложението на белтъчните лекарствени средства в медицината се ограничава от протеолитичното им разграждане, което може да се преодолее чрез включването им

в подходящи носители. Изследвана е възможността за натоварване на полибутилцианакрилатни наночастици с трипсин. Ензимът е имобилизиран по два начина: чрез адсорбцията му върху предварително получен носител и чрез физическото му включване. Конюгатите от трипсин-полибутилцианакрилатни наночастици са пречистени чрез гел-хроматография за отделяне на свободния трипсин. Определена е ензимната активност при различни хидродинамични условия, установена е по-висока активност (4-5 пъти) при интензивно разбъркване, което показва наличието на дифузионни ограничения за ензимната реакция.

Основните резултати от изследванията в направление свързано с получаване и приложение на нано- и микрочастици за доставка на биологичноактивни вещества са представени в следните публикации:

Simeonova M., Alexandrova R., Kamburov M., Engineering of daunorubicin-loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles and preliminary evaluation of their cytotoxic activity, New Trends and Strategies in the Chemistry of Advanced Materials, 5-6 november 2009, Timisoara, Romania, 6 – 10.

Simeonova M., Ivanova G., Enchev V., Markova N., Kamburov M., Petkov C., Devery A., O., Connor R., Brougham D., Physicochemical characterization and in vitro behavior of Daunorubicin-loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles, Acta Biomaterialia (2009), 5, 2109-2121.

M. Kamburov, M. Simeonova , Daunorubicin-loaded chitosan microparticles - preparation and physicochemical characterization, Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 2015, in press

М. Камбуров, М. Симеонова, Полимерни наночастици като носители на трипсин, Юбилейна научна конференция 50 години ХТМУ, 4-5 юни, 2003, София, постер.

Основни резултати и научни приноси в направление V. Приложение на хроматографски методи в аналитичната практика

Характерният „букет” от ароматите на вината се дължи на химически съединения като: алкохоли, естери, алдехиди, киселини, терпеноиди и др. Екстрахирани са и е определено количеството на ароматообразуващите композиции на следните сухи бели трапезни вина: Варненски димят, Карловски мискет, Варненски мискет, Брезовски мискет, Тамянка и Ризлинг. С помощта на газов хроматограф е изследван съставът им и е определено наличието на повече от 58 компоненти, някои от които оказват благоприятно влияние на качеството на анализиранията вина. Сред тях може да се акцентира на: β -фенилетанол, естери и терпенови съединения като линалол, гераниол, α -терпинеол, фарнезол, геранилацетат и линалилацетат, чието съдържание е в незначителни количества, но имат силен аромат и влияят върху органолептичните свойства на вината. Определено е съдържанието на някои от тях, т.н. хексилмиристата варира от 18,4 до 66,1 mg/l при изследваните вина. От друга страна изобутанола и изопентанола придават грубост на аромата, но в изследваните образци тяхното съдържание е минимално.

Бялото трапезно вино Ризлинг е избистрено по класическата технология с бентонит и чрез предложения от колектива метод с ензим (пепсин). С помощта на

предложената по-горе методология е изследвано влиянието на процеса на избистряне върху състава на ароматообразуващата композиция. От алкохолите прави впечатление високото съдържание на i-амилов алкохол – 40-45%, докато при естерите преобладават: i-бутилбутирата, етиллактата и хексилмирилата. Съдържанието на терпеновите съединения е редуцирано, в сравнение с други изследвани вина. Проследен е процеса на стареене на контролата и ензимно стабилизираната проба Ризлинг. Особени промени в ароматообразуващата композиция след първия месец не са установени, но след една година е установено по-голямото количество на ароматообразуващата композиция на ензимно третираното вино и това на естерите (етиллактата, хексенилбутират, бутилмирилат, хексилмирилат), докато терпеновите съединения се редуцират както при контролата, така и при пробата.

Левамизолът се използва във ветеринарната медицина за лечение и контрол на паразитни инфекции. Съгласно Регламент (ЕС) № 37/2010 на Комисията, употребата му при животни е забранена. С цел осъществяване на контрола при употребата му е разработен метод за количествено определяне на левамизол в мляко чрез LC-MS/MS. Методът е валидиран, покривайки следните критерии: линейност, селективност, аналитичен добив, работен обхват, повтораемост, възпроизводимост, граница на несъответствие (СС α) и възможност за откриване (СС β). Подготовката на пробите чрез твърдофазна екстракция е съобразена с базичните свойства на левамизола (pK a =8.0) и е избран картридж с катионнообменен сорбент -Strata SCX. От получените резултати относно аналитичен добив, селективност, повтораемост и възпроизводимост би могло да се заключи, че приложената пробоподготовка е подходяща. Изследването е проведено с колона Phenomenex Synergi 4 μ POLAR-RP, разделянето е оптимизирано чрез състава и градиента на подвижната фаза. За да се избегне допълнителното „размиване” на зоната, максималният обем на инжектиране е 25 μ l. Полученият хроматографски пик е със симетрична форма и време на задържане 6,8 min.

Основните резултати от изследванията в направлението свързано с приложение на хроматографски методи в аналитичната практика са представени в следните публикации:

L.K.Yankov, M.N.Kamburov, 1981, Study on aroma compositions of some Bulgarian mistet wines, First International Conference on Chemistry and Biologically Active Natural Products, Varna, Bulgaria, 21-26, 09,177-181.

L.K.Yankov, M.A.Krysteva, M.N.Kamburov, 1981, Aroma compositions of riesling wine stabilized by bentonit and enzyme, First International Conference on Chemistry and Biologically Active Natural Products, Varna, Bulgaria, 21-26, 09,182-186.

Л.Янков, М.Крыстева, М.Камбуров, 1982, Исследование состава ароматобразующих веществ некоторых болгарских сухих белых вин, Прикладная биохимия и микробиология, XVIII,257.

М. Пейчева, Т. Янковска-Стефанова, М.Камбуров, Определяне на левамизол в мляко чрез течна хроматография с мас спектрометрия, Научни трудове на университет по хранителни технологии – Пловдив, том LXII 2015 г приета за печат.

Основни резултати и научни приноси в направление VI. Биометанизация

Изследвани са процесите на аеробно и анаеробно третиране на води, отпадащи при производството на дървесно-влакнести плоскости. Демонстриран е прост и надежден метод за селекция и адаптиране на естествено формиран метаногенен консорциум към различни субстрати. Показано е, че успешна адаптация на смесена метаногенна култура към водите отпадащи при производство на дървесно-влакнести плочи се постига когато в състава ѝ присъстват фенол разграждащи микроорганизми. Аеробното биологично третиране на отпадъчните води е осъществено с бактериален инокулат, получен от промишлена пречиствателна станция за обработка на този тип води. Показано е, че 73 %-но понижаване на ХПК се постига в продължение на 5 часа като по-нататъшното удължаване на времепрестоя води до пренебрежимо ниско увеличение на степента на пречистване. Организиран е полунепрекъснат процес на биометанизация с помощта на успешно адаптиран към индустриалните отпадъчни води метаногенен консорциум. След времепрестой от 25 дни и органично натоварване $0,29 \text{ kgXPK.m}^{-3}.24\text{h}^{-1}$ е постигнат специфичен добив на биогаз от $0,74 \text{ m}^3.\text{kg}^{-1}$ и степен на пречистване 74%.

Биохимичният метанов потенциал на органични субстрати се използва в няколко направления, но най-важно е да се оцени потенциалната ефективност на анаеробния процес по отношение на специфичен отпадък. Разработена е подходяща методика за определяне на биохимичен метанов потенциал на различни органични материали, като е демонстрирана спрямо спиртна шлемпа. Смесените метаногенни култури бяха изолирани от природни източници, съответно от дъното на язовир “Лобош” в района на гр. Радомир и от говежда тор. Смесените метаногенни култури бяха култивирани първоначално в модифицирана хранителна среда (смес в съотношение 1:1 от селективна за метаногените среда на Shelton и Tiedje и винаса). В конструираната Лабораторна инсталация е проследена кинетиката на процеса и е установено, че за периода от 16 дни езерния консорциум продуцира с около 20% по-голямо количество биогаз от торния консорциум и той бе избран като инокулат за провеждане на БМП-теста. БМП-теста бе демонстриран с 400 мл метаногенна култура, а като субстрат - 50 ml спиртна шлемпа. Процесът на биогазификация на спиртната шлемпа има сравнително кратка лаг фаза и затихване на газовата продукция след първите 120 часа. Изчисленият биохимичен метанов потенциал на спиртната шлемпа достигна стойност от $0,39 \text{ l CH}_4/\text{g XPK}$, което определя този промишлен отпадък и като суровина за генериране на биоенергия посредством анаеробната му трансформация в биогаз.

Основните резултати от изследванията в горното направление са представени в следните публикации:

Лалов И., Камбуров М., Бозаджиев О., (2013) Пречистване на води отпадащи от производството на дървесно-влакнести плоскости., Научни трудове на УХТ, “Хранителна наука, техника и технологии-2013”, 18-19 октомври 2013, Пловдив, т.LX, 911-916

И.Лалов, М.Камбуров, Т.Иванов, П.Величкова, Метод за оценка на биохимичния метанов потенциал на органични субстрати, Научни трудове на университет по хранителни технологии – Пловдив, том LXII, 2015 г., приета за печат.