

СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ

АГРОБИОИНСТИТУТ – гр. София

**Характеризиране на биоразнообразието на
аборигенни дрожди и ендофитни гъби и проучване
на ефекта от ферментация на отпадни води от
производство на розово масло**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на научната и образователна степен
„Доктор” по направление 4.3 Биологически науки (Генетика)

Мила Градева Русанова

Научен ръководител: проф. дн Иван Илиев Атанасов

София

2019 г.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

2D NMR - двуменсионален ЯМР

Abs - абсорбция

ATCC - American Type Culture Collection

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

DLRFR - Deposited liquid rose flower remedies- течни депозираны остатъци от розов цвят

DPPH - 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил

E.coli - *Escherichia coli*

GAE - еквиваленти галова киселина

HPLC - Високоэффективна течна хроматография

HPLC-PDA-ELSD - Високоэффективна течна хроматография с фотодиоден детектор и детектор с изпаряване и разсейване на светлина

HPLC-ESI-MS - Високоэффективна течна хроматография с електроспрей йонизация и масспектрометрия

HPLC-UV/Vis - Високоэффективна течна хроматография с детектор на абсорбция в ултравиолетовата и видимата област

HPTLC – Високоэффективна тънкослойна хроматография

IS - вътрешен стандарт

ITS - вътрешен транскрибируем спейсер

[M + H]⁺ - протониран молекулен йон

m/z - съотношение маса/заряд

OD - оптична плътност

OMW - отпадна вода от производство на зехтин

PCA - анализ на главните компоненти

PCR - полимеразна верижна реакция

PDA - картофено глюкозен агар

RF20 - resin fraction 20

RFE - rose flower endopytes – ендифити изолирани от цветни пъпки на *R. damascena*

RODW - отпадна вода от промишлена дестилация на розово масло

Rt - време на задържане

SD - стандартно отклонение

TBHQ - tert-Butylhydroquinone

TEF1 α – транслационен елонгационен фактор 1 α

TEF - транскрипционен елонгационен фактор

WF - водна фракция

UV - ултравиолетов

YPD - Yeast extract peptone dextrose

MW – молекулно тегло

НБПМКК - Националната банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури

РНК - рибонуклеинова киселина

рРНК - рибозомална рибонуклеинова киселина

тРНК - транспортна рибонуклеинова киселина

ЯМР - ядрено - магнитен резонанс

Дисертационният труд е написан на 160 страници, включва 38 фигури, 21 таблици, 1 диаграма и 364 заглавия в списъка на използваната литература. Защитата на дисертационния труд ще се състои на.....2019 година в Материалите по защитата са на разположение в.....

УВОД

Розовото масло се получава чрез водно-парна дестилация на цветовете на маслодайната роза (*Rosa damascena* Mill.). След всеки цикъл на дестилация в дестилериите се получават голямо количество отпадни продукти състоящи се от отработения розов цвят и водата, в която той е дестилиран. При производството на един килограм розово масло се генерират средно около 7 500 литра общи отпадъци.

Въпреки високото съдържание на голям набор фенолни съединения екстрахирани от цветовете на маслодайната роза, отпадната вода от промишлена дестилация на розово масло представлява все още не добре изследван и използван алтернативен източник на натурални фенолни съединения с ценна биологична активност. Наред с това, съдържащите се в нея захари, са предпоставка за протичане на ранни ферментационни процеси водещи до промяна на нейния състав.

Досега както в България, така и в другите страни производители на розово масло, не съществува разработена технология за преработване на отпадните води и оползотворяване на съдържащите се в тях полезни съединения.

В настоящия дисертационен труд е разработен метод за ефективна екстракция на фенолни съединения от отпадна вода от промишлено производство на розово масло с помощта на адсорбентни смоли, като съставът на получения екстракт е характеризирани посредством използване на широк набор от аналитични методи.

Установено бе, че ранната ферментация на отпадната вода се предизвиква от аборигенни щамове дрожди, вероятно присъстващи в розовия цвят още преди дестилацията на розово масло. Изолирани и характеризирани са аборигенни щамове дрожди от род *Cyberlindnera* притежаващи висок темп на растеж в отпадната вода и са анализирани промените във фенолния състав в резултат на протичащата ферментация. Демонстрирана е възможността за използване на ферментацията с аборигенни дрожди за насочено модифициране на състава на фенолните съединения преди тяхната екстракция и последваща преработка.

С цел разширяване на възможностите за оползотворяване на отпадната вода е изследван ефектът на ферментация на отпадна вода от промишлена дестилация на розово масло под въздействие на изолати на ендифитни гъби получени от лечебни и ароматни растения. Демонстриран е потенциалът за модифициране на състава и биосинтез на нови съединения чрез ферментация на отпадната вода с тествани изолати от изолираните ендифитни гъби.

Проучена е и възможността за използване на отпадната вода като култивационна среда за добив на гъбна маса от гъбен щам *Trichoderma asperellum* SL-45 и е анализирано влиянието върху фенолния състав след приключване на култивацията.

Получените резултати са важна стъпка към разработване и прилагане в промишлени обеми на технология за екстракция и добив на биологично активни фенолни съединения от отпадни води от производство на розово масло, и редуциране екологичния риск и негативен ефект от сега практикуваното директно освобождаване на тези отпадни води в околната среда.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел: Проучване и оценка на възможностите и разработване на методи за екстракция, биотрансформация и биоремедиация на фенолни съединения от промишлени отпадни води от дестилация на розово масло (RODW)

Задачи:

1. Разработване на метод за екстракция на фенолни съединения от RODW
2. Характеризиране на микробиалното биоразнообразие при ранна ферментация на RODW
3. Оценка на възможностите за биотрансформация и биоремедиация на фенолни съединения в RODW чрез ферментация с дрожди
4. Изолиране и характеризиране на ендофитни гъби от лечебни и ароматни растения
5. Оценка на възможностите за използване на ендофитни гъби за биотрансформация и биоремедиация на фенолни съединения от RODW
6. Изследване на потенциала на гъбен щам *Trichoderma asperellum* SL-45 за ферментация на RODW

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Разработване на метод за екстракция на фенолни съединения от RODW

Промишлената дестилация на етерично розово масло от цветовете на *R. damascena* Mill. е свързано с отделянето на големи количества отпадна вода (RODW) и отработен розов цвят. Към момента, съществува ограничена информация за химичния състав на отпадъчния отработен цвят (Schieber et al. 2005) и липсва детайлен анализ на състава на отпадната вода (RODW).

По време на процеса на водно-парната дестилация на розовото масло, летливите компоненти се улавят селективно и отвеждат от дестилационния казан, а нелетливите остават в отработения цвят и отпадната вода. Установено е, че след дестилацията, във венчелистчетата на отпадния цвят на *R. damascena* се съдържат полифеноли от групата на флавонолите, представени предимно от гликозиди на кемпферол и кверцетин, както и от самите агликони кемпферол и кверцетин (Schieber et al. 2005). Следователно, вследствие на продължителното нагриване по време на дестилацията, голяма част от съдържащите се в цветовете фенолни съединения преминават в отпадната вода, превръщайки я във воден екстракт, богат на феноли. Притежавайки широк спектър от биохимични и фармакологични свойства (антиоксидантни, противоракови, противовъзпалителни и др.) (Scalbert et al. 2005), полифенолите представляват източник на редица биологично-активни натурални продукти.

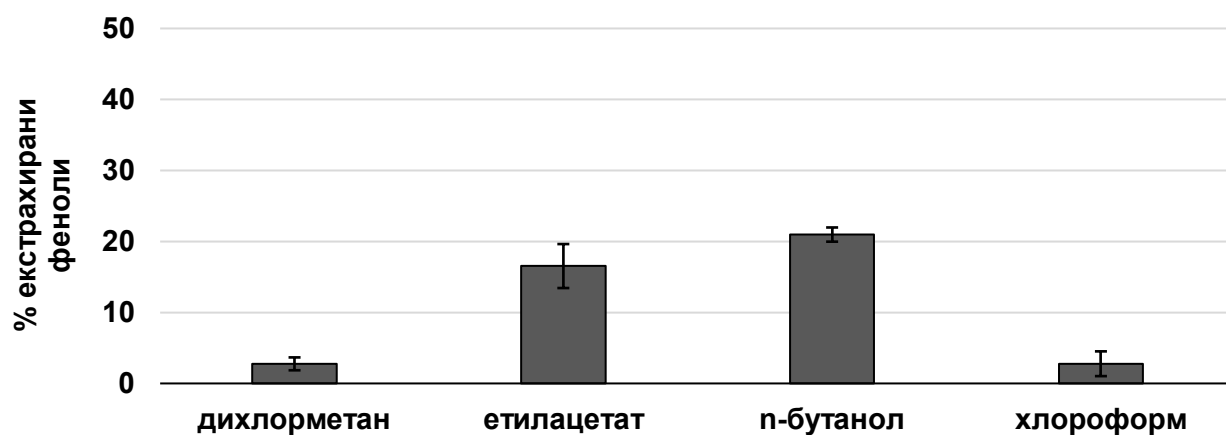
Една от задачите в настоящия дисертационен труд е разработване на метод за екстракция на фенолни съединения от RODW. За целта, бяха проучени възможностите за извличане на тези съединения чрез течни разтворители и чрез твърдофазна екстракция с адсорбентни смоли.

1.1. Съдържание на общи феноли и редуциращи захари, антиоксидантна активност и pH на RODW

Като начална стъпка от настоящото изследване, беше извършено характеризиране на партидите RODW, които са използвани при провеждането на експериментите. Установено беше, че киселинността на анализиранияте средни проби варира в границите pH 4.0 ÷ 4.5, количествата общи феноли и редуциращи захари варират в границите 600 – 1400 mg/L GAE и 2200 - 3000 mg/L глюкоза съответно, а антиоксидантната ѝ активност (DPPH) варира в границите 2300 – 3500 mg/L L-аскорбинова киселина. За оценяване на ефективността на процеса на екстракция на фенолни съединения от RODW при различните използвани методи, беше проследено количеството общи феноли, общи разтворими захари и антиоксидантната активност на получените екстракти.

1.2. Течно-течна екстракция на фенолни съединения от RODW с органични разтворители

С цел определяне на ефективността на течно-течна екстракция на фенолни съединения от RODW беше проведена екстракция с четири органични разтворителя използвани в публикувани изследвания за получаване на растителни екстракти обогатени с фенолни съединения - дихлорметан, етилацетат, *n*-бутанол и хлороформ (Khadraoui et al. 2015; KONAN et al. 2013; Gariboldi et al. 1986; Song et al. 2006; Khoufi et al. 2008). При всички разтворители бе използвано едно и също обемно съотношение на проба : разтворител равно на 4:1. След завършване на екстракцията и отделяне на органичния разтворител от обработената RODW, бе извършен анализ на количеството общи феноли преминали в органичния разтворител и оценена степента на екстракция. Получените резултати показват, че течно-течната екстракция с *n*-бутанол, етилацетат, хлороформ и дихлорметан води до екстрахирането на съответно $21 \pm 1\%$, $17 \pm 3\%$, $3 \pm 2\%$ и $3 \pm 1\%$ от общите феноли в изходната RODW, показващо една относително ниска ефективност на този метод и при четирите използвани разтворителя (фиг.4). Полученото в проведения експеримент количество общи феноли след екстракция с етилацетат е значително по-ниско от резултати при OMW с постигната екстракция на 90% от фенолните съединения (Khoufi et al. 2008). По-високата ефективност на етилацетат при екстракция на феноли от OMW е посочена и от други автори, сравняващи този разтворител със смес от хлороформ и изопропанол (Kalogerakis et al. 2013), дихлорметан (Paraphilippou et al. 2013) и *n*-бутанол (De Martino et al. 2007).



Фигура 4 Съдържание на общи феноли в екстракти от RODW ($\% \pm SD$), изчислени спрямо изходното им количество в отпадната вода и получени след екстракция с течни разтворители

Ниската ефективност на течно-течната екстракция на фенолни съединения от RODW с дихлорметан, етилацетат, *n*-бутанол и хлороформ, както и необходимостта от използване на голям обем от тези разтворители, някои от които са високо токсични, аргументираха търсенето на друг по-продуктивен, кономичен и щадящ околната среда метод за екстракция.

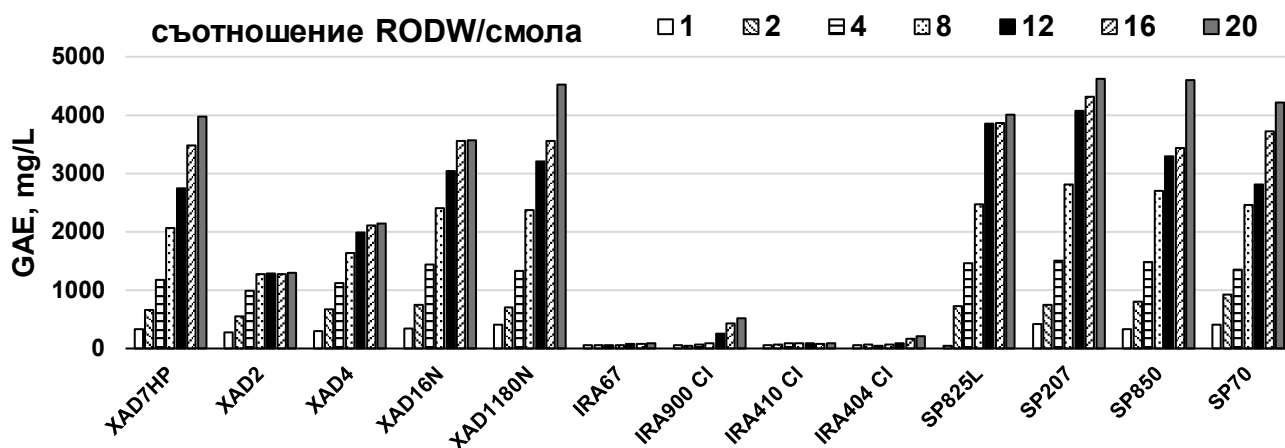
1.3. Екстракция на фенолни съединения от RODW със синтетични адсорбентни смоли

Екстракцията на фенолни съединения с помощта на адсорбентни смоли е метод, който се прилага успешно при отпадни продукти, богати на феноли, между които е OMW (Agalias et al. 2007; Bertin et al. 2011). Предимства на предлаганите понастоящем макропорести адсорбентни смоли са високият им капацитет и селективност на адсорбция, ефективността им на извличане на биоактивни фенолни съединения, химичната им стабилност и лесна регенерация (Soto et al. 2012). За проучване на възможността за екстракция на фенолни съединения от RODW, бяха тествани тринадесет различни адсорбентни смоли, Amberlite™: XAD2, XAD4, XAD7HP, XAD1180N, XAD16N, IRA67, IRA404 Cl, IRA410 Cl, IRA900 Cl и Sepabeads®: SP70, SP207, SP825L и SP850. Четири от тях принадлежат към групата на анионообменните сорбенти (IRA67, IRA404 Cl, IRA410 Cl и IRA900 Cl), а останалите девет са нейонни (неутрални).

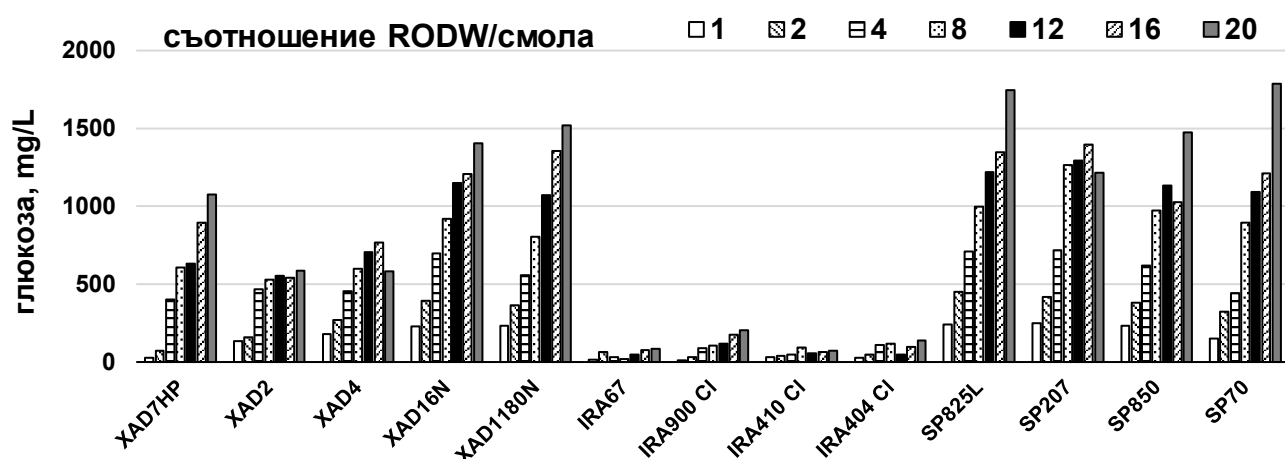
1.3.1. Сравнителен анализ на ефективността на екстракция на фенолни съединения от RODW с адсорбентни смоли

Тринадесет адсорбента (XAD2, XAD4, XAD7HP, XAD1180N, XAD16N, IRA67, IRA404 Cl, IRA410 Cl, IRA900 Cl, SP70, SP207, SP825L и SP850) бяха изпитани за тяхната ефективност на екстракция на фенолни съединения от RODW. С цел установяване на оптималното за екстракцията обемно съотношение между смолата и отпадната вода, беше проведен експеримент, при който единица обем смола (30 mL) бе смесена с 1, 2, 4, 8, 12, 16 и 20 пъти по-голям обем RODW. След адсорбиране на фенолните съединения върху повърхността на смолата, отпадната вода с намалено фенолно съдържание бе отстранена и смолите бяха измити с дестилирана вода за отстраняване на механични замърсявания. Адсорбираните феноли бяха елуирани с 90% воден разтвор на етанол от хранителен клас, с количество равно на два обема смола (60 mL). Получените при всеки един от изпитваните варианти етанолови екстракти бяха анализирани чрез измерване на количеството на общи феноли и общи захари, както и антиоксидантната активност срещу DPPH радикал.

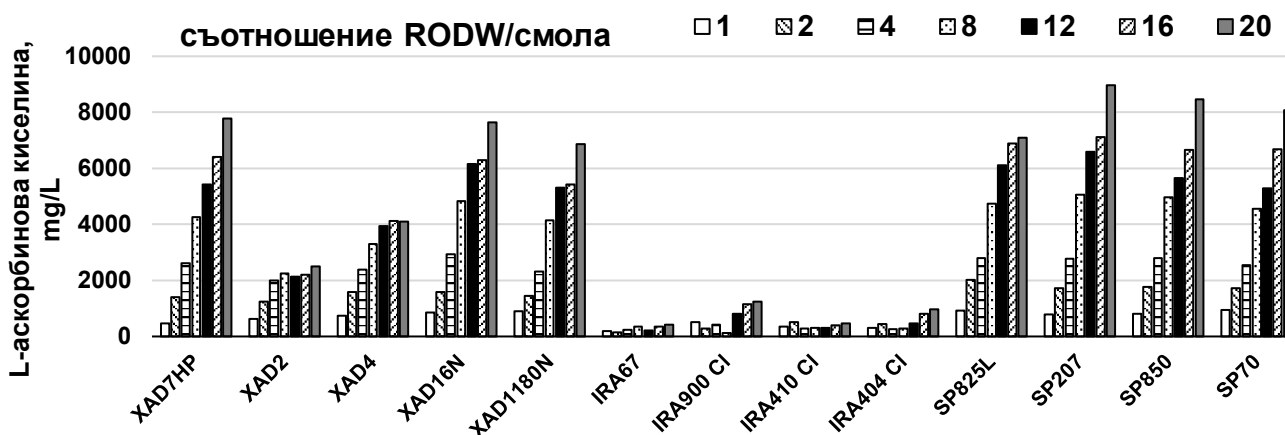
В екстрактите, получени с йонообменните смоли IRA67, IRA404 Cl, IRA410 Cl, IRA900 Cl, бяха отчетени ниски концентрации на общи феноли (под 600 mg/L GAE) (Фиг. 5) и захари (под 250 mg/L глюкоза) (фиг. 6), както и ниска антиоксидантна активност (под 1300 mg/L еквиваленти L-аскорбинова киселина) (фиг. 7), показващи ограничен капацитет на посочените смоли за адсорбиране на фенолни съединения. Аналогични резултати са получени при използване на йонни сорбенти при екстракция на феноли от OMW и отпадни продукти от винопроизводство (Pinelli et al. 2016; Trikas et al. 2017). При останалите тествани XAD и SP смоли, измерените количества на общи феноли, захари и антиоксидантната активност на получените екстракти нарастват пропорционално с нарастването на обема на RODW, прибавена към смолата. Изключение правят смолите XAD2 и XAD4, при които след третиране на обем RODW,



Фигура 5. Количество общи феноли (mg/L GAE) в етанолови екстракти на RODW при обемни съотношения RODW/смола равни съответно на: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/12, 1/16 и 1/20



Фигура 6. Количество общи захари (mg/L глюкоза) в етанолови екстракти на RODW при обемни съотношения RODW/смола равни съответно на: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/12, 1/16 и 1/20



Фигура 7. Антиоксидантна активност (mg/L еквиваленти L-аскорбинова киселина) в етанолови екстракти на RODW при обемни съотношения RODW/смола равни съответно на: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/12, 1/16 и 1/20

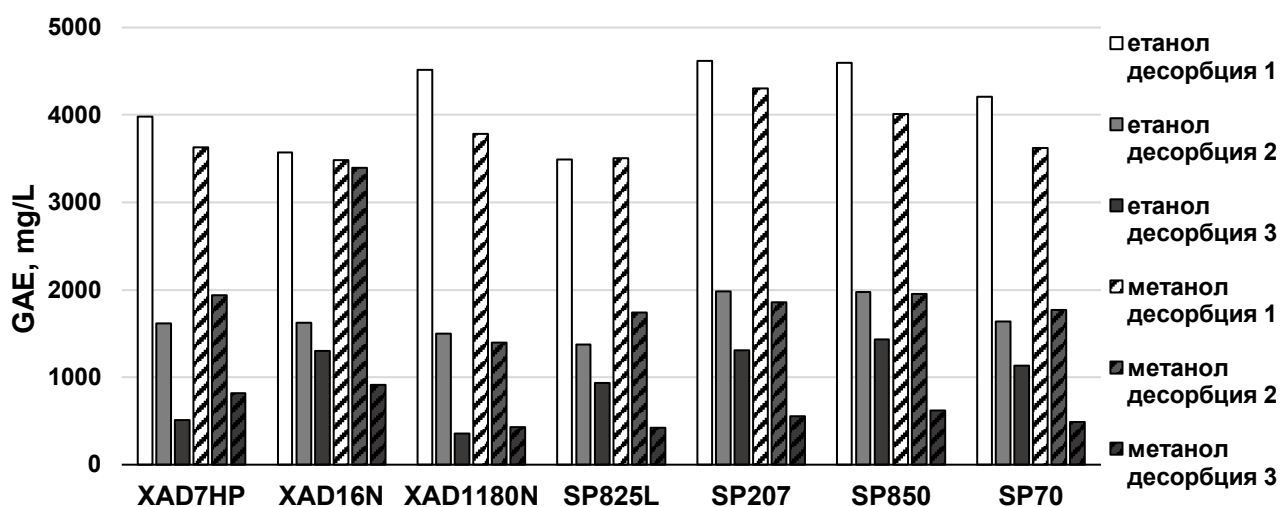
равен и по-голям от 8 пъти обема на смолата (XAD2) и 12 пъти обема на смолата (XAD4), не се наблюдава съществено повишаване на количеството екстрахирани феноли (фиг. 5). Това предполага по-нисък праг на насищане и относително по-нисък капацитет на екстракция на XAD2 и XAD4 в сравнение с XAD7HP, XAD1180N, XAD16N, SP70, SP207, SP825L и SP850, поради което двете посочени смоли не бяха използвани в следващи експерименти.

В рамките на тестваните условия, най-висок капацитет за екстракция беше наблюдаван при смолите SP850 и SP207, с които бяха постигнати съответно 4598 mg/L GAE и 4617 mg/L GAE общи феноли в екстракта (фиг. 5).

1.3.2. Сравнение на ефективността на етанол и метанол за десорбция на фенолни съединения при седем адсорбентни смоли

Метанолът е един от най-често използваните разтворители за елуиране на фенолни съединения от адсорбентни смоли като редица автори посочват по-висок добив на феноли при елуиране с метанол спрямо етанол при едни и същи концентрации (Kammerer et al. 2005). Въпреки докладваните предимства от редица автори, токсичността на метанола го прави по-малко атрактивен спрямо етанола от хранителен клас при евентуално приложение на получените екстракти в козметиката или хранително-вкусовата промишленост. Като част от разработването на метод за екстракция на фенолни съединения от RODW посредством използване на адсорбентни смоли си поставихме за цел да сравним ефективността на елуиране с 90% етанол от хранителен клас спрямо тази с 90% метанол.

Седем от смолите демонстрирали относително висок адсорбционен капацитет (XAD7HP, XAD1180N, XAD16N, SP70, SP207, SP825L и SP850) бяха изпитани с цел сравняване на десорбционните качества на два органични разтворителя - етанол и метанол. За десорбция на фенолите бяха използвани 90% водни разтвори на етанол и метанол, като след адсорбцията бяха проведени три последователни десорбирания. Използваното съотношение на смоля спрямо RODW беше 1:20.



Фигура 8. Количество общи феноли (mg/L GAE) в екстракти на RODW, десорбирани с 90% етанол и 90% метанол при три последователни десорбции

При всички изпитани смоли, резултатите показаха най-високо съдържание на общи феноли в екстрактите получени при първата десорбция, като във всяка следваща количеството им постепенно намалява (фиг. 8). В рамките на тестваните смоли, отчетените стойности за първата десорбция варират в границите между 3488 mg/L GAE и 4617 mg/L GAE при използването на 90% етанол и съответно - между 3481 mg/L GAE и 4306 mg/L GAE при използването на 90% метанол. Посочените най-високи стойности в съдържанието на феноли в екстракта (4617 mg/L GAE и 4306 mg/L GAE) бяха отчетени при смола SP207. Между двата използвани разтворителя, по-високи количества елуирани феноли в трите последователни десорбции бяха получени с 90% разтвор на етанол от хранителен клас. Получените по-висока ефективност на елуиране на фенолните съединения при RODW с етанол спрямо метанол може да се дължи на разликата в състава на екстракта спрямо този при други изследвания (Kammerer et al. 2005). Резултатите обосновават избора на етанол като по-ефективен нетоксичен десорбиращ агент, разширяващ възможностите за по-нататъшно приложение на екстрактите от RODW. Елуирането с 90% етанол от хранителен клас прави обогатения на феноли екстракт от RODW подходящ за потенциално приложение, както в козметичната и фармацевтичната, така и в хранително-вкусовата промишленост.

Въз основа на резултатите от проведените начални експерименти, като най-високо ефективна за получаване на обогатен на феноли екстракт от RODW бе избрана смола SP207. При използване на обемно съотношение 1:20 на смолата спрямо RODW и десорбция с 90% воден разтвор на етанол, екстрактът получен със смола SP207 и означен като RF20 (resin fraction 20) съдържа най-високо количество феноли (4617 mg/L GAE) и има най-висока антиоксидантна активност (8978 mg/L еквиваленти L-аскорбинова киселина). Допълнително технологично предимство на SP207 в сравнение с останалите тествани в настоящото изследване адсорбенти е по-високото ѝ относително тегло и по-бързо утаяване.

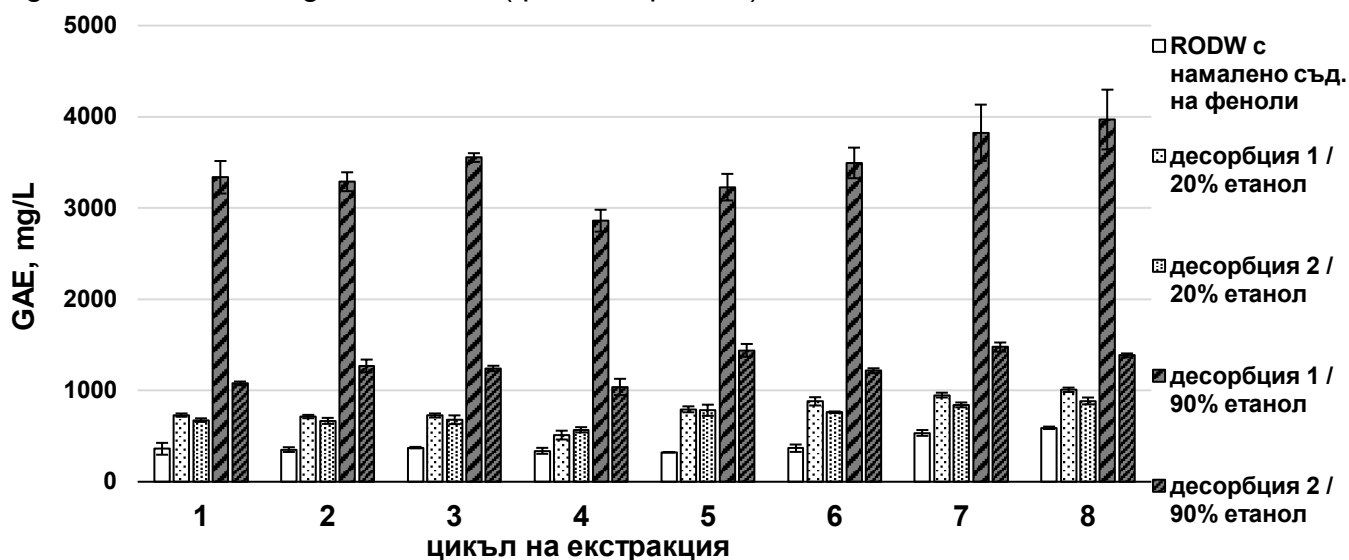
1.3.3. Анализ на ефективността на десорбция на фенолни съединения при циклична екстракция със смола SP207 и последователна десорбция с 20% и 90% етанол

Използването на твърдофазна екстракция позволява да се екстрахират и концентрират фенолните съединения от дадена растителна проба, като същевременно други водоразтворими съединения като захари или органични киселини се отделят от фенолната фракция. Това се постига чрез „измиване“ на твърдата фаза (адсорбента) с вода, преди елуиране на фенолите с органични разтворители (Dai and Mumper 2010). Чрез използване на същият подход, в настоящата работа бе проучена възможността за селективна десорбция предимно на свободни захари чрез относително ниска (20%) и предимно на феноли чрез по-висока (90 %) концентрация на етанол.

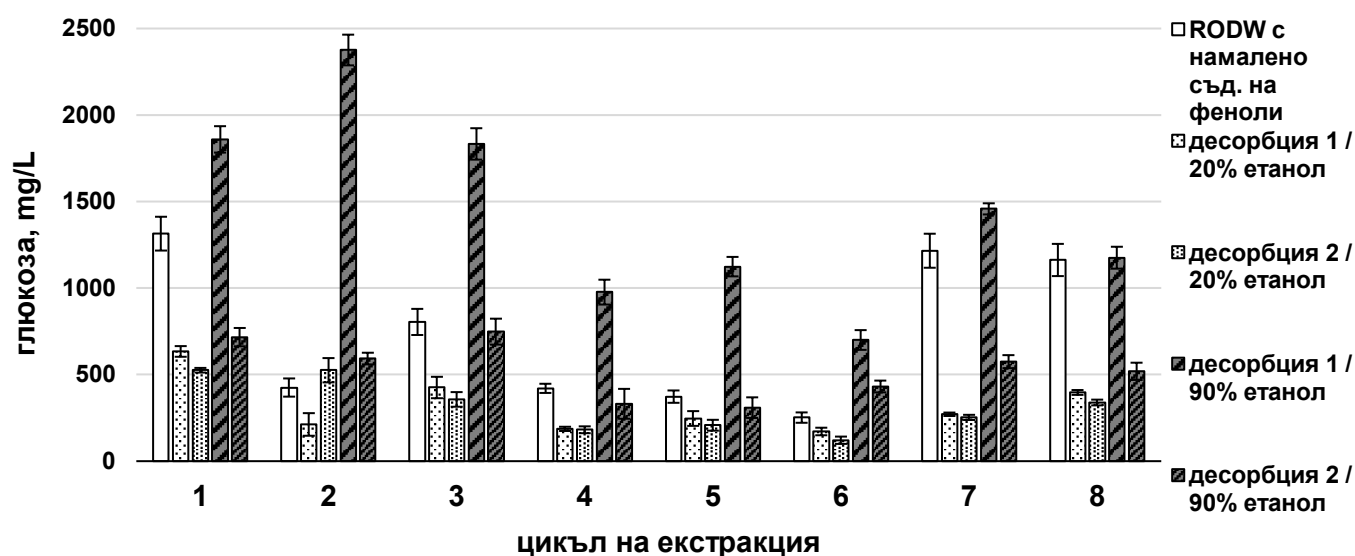
Проведени бяха осем последователни цикъла на екстракция на феноли от RODW със смола SP207, като бе използвано избраното обемно съотношение 1:20 между смолата и RODW. Във всеки отделен цикъл, десорбцията бе извършена в четири стъпки, като първата и втората бяха осъществени с 20% воден разтвор на етанол, а третата и четвъртата - с 90 % воден разтвор на етанол. Измерени бяха

количествата общи феноли, общи захари и антиоксидантната активност в екстрактите и RODW с намален фенолно съдържание при всяка една от стъпките на десорбция в осемте последователни цикли на екстракция.

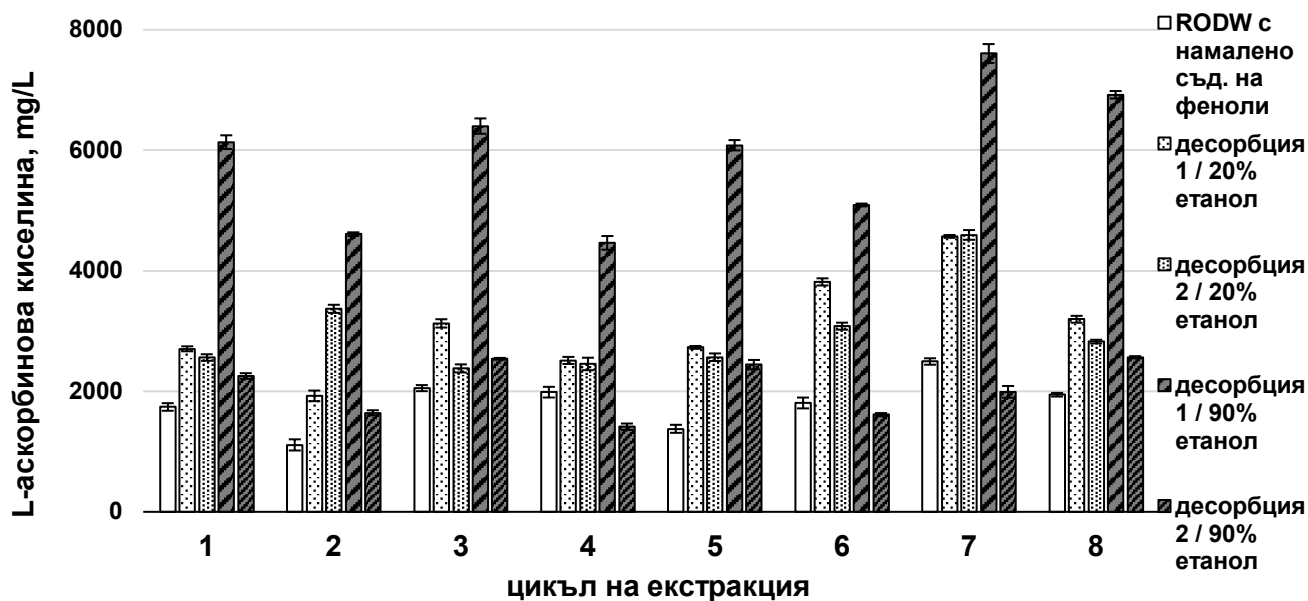
Резултатите показаха, че използването на 20% етанол като разтворител за елуиране в първите две стъпки на десорбция очаквано води до ниски нива на феноли в екстракта в диапазона от 511 ± 48 mg/L до 1008 ± 24 mg/L GAE (фиг. 9) и концентрация на захари в диапазона от 121 ± 21 mg/L до 634 ± 31 mg/L (фиг.10). Последващото покачване на концентрацията на етанола до 90% като разтворител за елуиране в стъпка 3 и 4 доведе до очаквано значително покачване на концентрацията на фенолни съединения в диапазона от 1039 ± 89 mg/L до 3970 ± 328 mg/L GAE, но също и до значително нарастване на концентрацията на захари в елуата в диапазона от 700 ± 57 mg/L до 2376 ± 89 mg/L глюкоза. (фиг. 9 и фиг. 10).



Фигура 9. Съдържание на общи феноли (mg/L GAE $\pm$ SD) при циклична екстракция със смола SP207 и две концентрации на десорбиращия разтвор



Фигура 10. Съдържание на общи захари (mg/L глюкоза $\pm$ SD) при циклична екстракция със смола SP207 и две концентрации на десорбиращия разтвор



Фигура 11. Антиоксидантна активност (mg/L еквиваленти L-аскорбинова киселина $\pm$ SD) при циклична екстракция със смола SP207 и две концентрации на десорбиращия разтвор

Антиоксидантната активност на екстрактите е най-висока при първото елуиране с 90 % разтвор на етанол и при осемте цикъла на екстракция и варира в границите от 4463 ± 114 до 7606 ± 156 mg/L еквиваленти L-аскорбинова киселина (Фиг. 11), което е в съответствие с високите концентрации на феноли измерени в тези екстракти. При второто елуиране с 90 % етанол, както и при двете елуирувания с 20% етанол, антиоксидантната активност на екстрактите е по-ниска (Фиг. 11), което е свързано с по-ниската концентрации на феноли в тези екстракти.

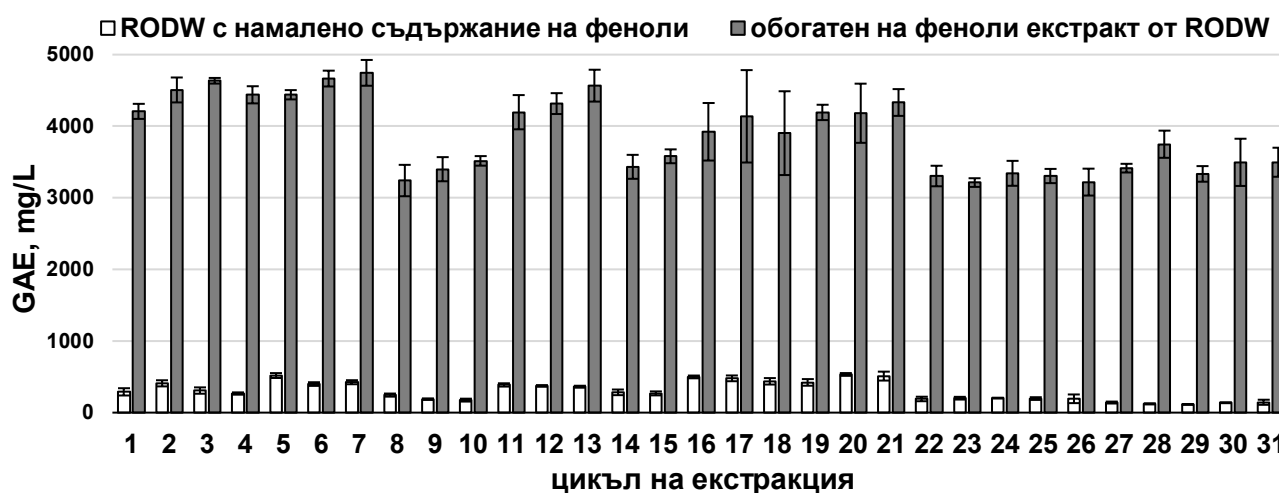
Резултатите показаха, че голяма част от фенолните съединения, адсорбирани върху смолата SP207 се десорбират съвместно със захарите чрез елуиране с 90 % етанол. Известно е, че растителните феноли могат да бъдат свързани с компоненти като въглехидрати и протеини (Dai and Mumper 2010) и вероятна причина за съвместната десорбция на феноли и захари в получения етанолов екстракт би могла да бъде присъствието в него на феноли, които са свързани със захарите под формата на гликозиди и които се освобождават при използвания метод за анализ на общи захари.

Като цяло постигнатият висок добив на фенолни съединения чрез десорбция с 90% етанол спрямо тази с 20% етанол, както и получената ниска ефективност на елуиране на феноли и захари поотделно, прави въвеждането на десорбция с две концентрации на десорбиращия разтвор неоснователно.

1.3.4. Анализ на ефективността на екстракция на фенолни съединения от RODW със смола SP207 при многократни цикли от адсорбция и десорбция

Капацитетът на смолата SP207 беше изпитан при многократна циклична екстракция с цел проучване възможността за използването ѝ при работа с големи обеми RODW без регенерация на смолата между отделните цикли на екстракция.

Използвано беше обемното съотношение 1:20 между смола и RODW, а за по-ефективно елуиране на фенолите, при всеки цикъл десорбцията беше извършена трикратно с 90 % етанол. Получените по този начин екстракти за всеки отделен цикъл бяха обединявани в общ пул. За оценяване на ефективността на екстракция на смолата SP207, беше измерено количеството общи феноли в екстрактите от всеки цикъл, както и в обеднената на феноли водна фракция на RODW, оставаща след екстракцията им. Измерените количества общи феноли в екстрактите от всеки един от тридесетте и един цикъла показаха средни стойности в диапазона от 4745 ± 180 mg/L GAE до 3213 ± 61 mg/L GAE (Фиг. 12), като средният добив на феноли в екстракта за проведената циклична екстракция е 3885 ± 516 mg/L GAE.



Фигура 12. Количество общи феноли (mg/L GAE $\pm$ SD) в етаноловите екстракти и RODW с намалено съдържание на феноли при 31 последователни цикъла на екстракция

Получените резултати показват, че избраният адсорбент SP207 е подходящ за използване при многократни цикли на адсорбция и десорбция без необходимост от междинна регенерация при сравнително запазване на високи нива на получените в екстракта общи феноли.

Въз основа на получените при проведените експерименти резултати, адсорбентната синтетична смола Sepabeads® SP207 бе избрана за екстракция на фенолни съединения от RODW. При обемно съотношение смола:RODW от 1:20, тя позволява висока ефективност на многократна екстракция без междинно регенериране на смолата. В проведения експеримент включващ тридесет и един последователни цикъла на адсорбция и десорбция използването на смолата Sepabeads® SP207 даде възможност за екстракция в рамките на 80% - 90% от фенолните съединения в RODW, съответно среден добив от 3885 ± 516 mg/L GAE общи феноли.

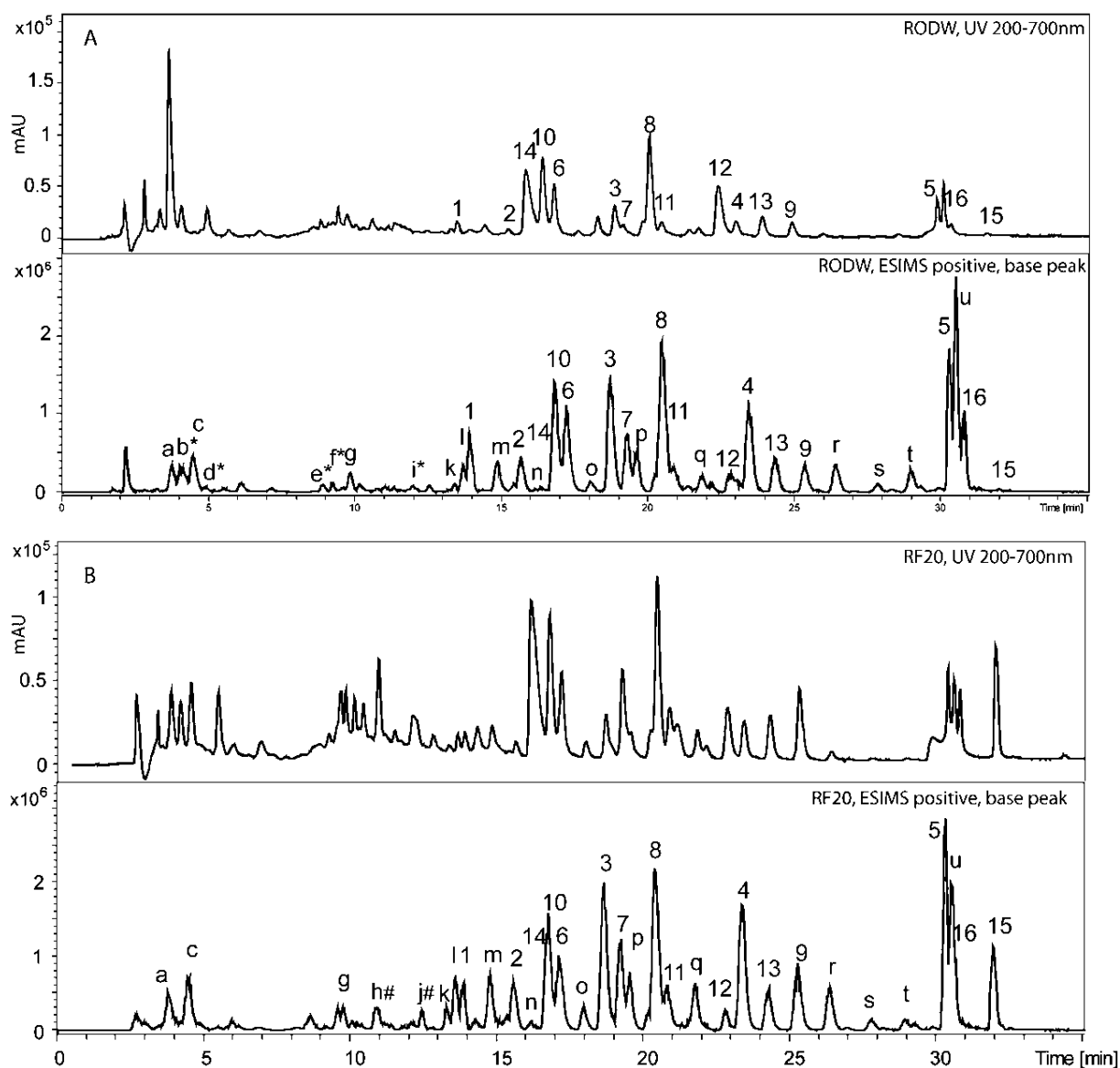
1.4. Идентификация на фенолни съединения влизащи в състава на RODW и обогатения на феноли екстракт (RF20)

1.4.1. HPLC-PDA-ESIMS анализ на RODW и RF20

Като начална стъпка за характеризиране на полифенолния профил на RODW, бе извършен HPLC-PDA-ESIMS анализ, с който бяха идентифицирани основните съединения, влизащи в състава на отпадната вода (Фиг. 13). Лиофилизирана проба от RODW беше разтворена във вода в концентрация 1mg/mL и бе подложена на разделяне и анализ чрез високоефективна течна хроматография с диоден арей детектор и масспектрометрия с електроспрей йонизация. Получените абсорбционни спектри с пикове, отчетени в UV областта (200 - 400 nm) показаха съответствие със спектри на флаван-3-оли, флаванони, флавоноли и флавонови аналози, публикувани след проведен HPLC анализ на екстракти от цвят на роза (Kumar et al. 2008). Бяха отчетени общо 35 съединения влизащи в състава на RODW. Съединенията а-с (Фиг. 12), показват само един основен максимум на UV абсорбция между 260-280 nm (бенд II), което е типично за флаван-3-оли и флаванони (Velioglu and Mazza 1991). UV спектрите на повечето други флавоноиди отчетени в RODW, показаха два основни абсорбционни бенда и бяха причислени към флавоноли (бенд I, 325-360 nm) и флавоноли (бенд I, 300-350 nm). Флавонолите са представени от гликозиди на кемпферол и кверцетин (Табл. 17).

Лиофилизираната проба от обогатения на фенолни съединения екстракт, получен чрез многократна циклична екстракция със смола Sepabeads® SP207 (означен като фракция RF20) бе разтворена във вода в концентрация 1mg/mL и беше подложена на качествен анализ чрез HPLC-PDA-ESIMS.

Анализът на RF20 показва присъствие в екстракта на общо 32 съединения, като всички главни флавоноиди, които бяха отчетени в RODW присъстваха и в екстракта (Фиг. 13 В, Табл. 17). Пет от съединенията в RODW (флаванон дизахарид, флавонол, флавонол дизахарид, флавонол галоилпентозид и флавонол галоилгликозид) не бяха отчетени в екстракта, а съединенията кверцетин-О-метил тризахарид и кверцетин-О-диметил тризахарид (h и j) бяха отчетени само в RF20.



Фигура 13. HPLC-PDA-MS и HPLC-ESIMS анализ на RODW (A) и екстракта от RODW (B) показват, че те съдържат основно флавоноиди, под формата на гликозиди на базата на кверцетин и кемпферол, фенилетил-глюкозид и елагова киселина

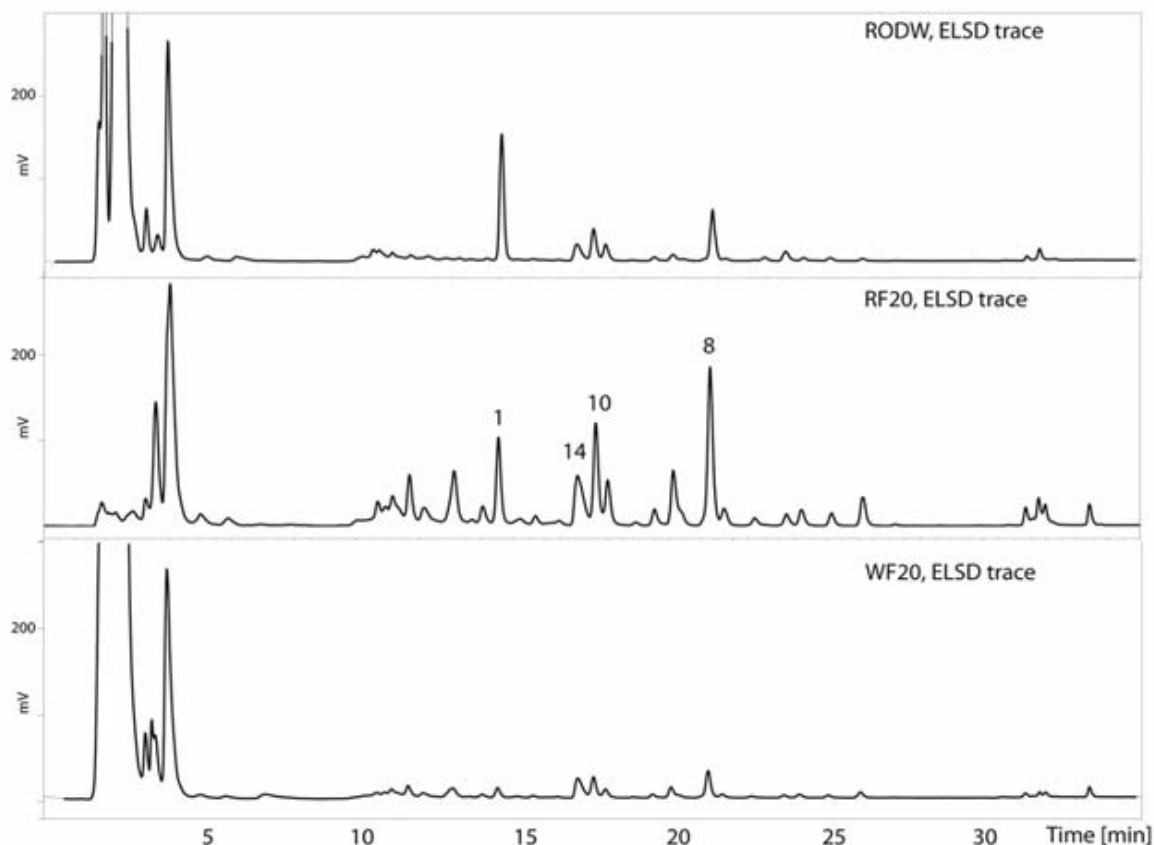
Таблица 17. Идентифицирани в RODW и екстракта от RODW съединения след провеждане на HPLC-PDA-MS анализ

Пик	Съединение	Тривиално наименование	Rt [min]	HPLC-DAD $\lambda_{\max}$ [nm]	[M + H] ⁺ m/z	Други фрагментни йони	[2M – H] [–] m/z	MW
a	Флаван-3-ол хексозид		3,8	215, 270	467,5	153,3		466,4
b*	Флаванон дизахарид		4,0	215, 275	611,3	153,2		610,6
c	Флаван-3-ол хексозид		4,5	215, 270	467,5	153,3		466,4
d*	Флавонол		4,8	220 sh, 310	467,5	153,3		466,4
e*	Флавонол дизахарид		8,9	210, 265, 350 sh	579,5			578,5
f*	Флавонол галоилпентозид		9,3	210, 270, 350 sh	599,4	467.7 [M-132] ⁺		598,5
g	Флавонол тризахарид		9,6	205, 225 sh, 275, 350 sh	787,2	579.6, 467.5, 153.2		786,7
h#	Кверцетин О-метил тризахарид		10,9	270, 350 sh	787,2			786,7
i*	Флавонол галоилгликозид		11,9	215, 270, 350 sh	737,2			736,6
j#	Кверцетин О-диметил тризахарид		12,1	255, 300 sh, 365	785,2	471,7		784,7
k	н.о.		12,4	260, 350 sh	434,9			
l	Кверцетин-О-метил-дихексозид		13,6	260, 300 sh, 350 sh	641,3	479.3 [M-162] ⁺ ; 317.3 [M-162-162] ⁺		640,5
1	Фенилетил-глюкопиранозид		13,8	250	285,5	307.4 [M + Na] ⁺		284,3
m	Кверцетин галоилхексозид		14,8	220, 255, 290 sh, 355	617,4			616,5
2	Кверцетин-3-О-рамнозил глюкозид	Рутин	15,8	220, 255, 350	611,2			610,5
n	Кверцетин ди-деокси-хексозо-пентозид		16,1	220, 250, 300 sh, 355	727,3	303,4		726,6
14	Елагова киселина		16,3	250, 300 sh, 370	303,5			302,2
10	Кверцетин-3-О-галактозид	Хиперозид	16,8	255, 265 sh, 300 sh, 355	465,2	303,3	927.5 [2M-H] [–]	464,4
6	Кверцетин-3-О-глюкозид	Изо-кверцитрин	17,1	255, 265 sh, 300 sh, 355	465,2	303,3		464,4
o	Кверцетин галоилхексозид		18,0	255, 265 sh, 302 sh, 355	617,3	303,4		616,5
3	Кемпферол-3-О-рутинозид		18,7	265, 290 sh, 350	595,2	449.3 [M-146] ⁺ ; 287.3		594,5
7	Кемпферол-3-О-галактозид		19,2	260, 295 sh, 350	449,1	287,2		448,4
p	Кверцетин О-метил дизахарид		19,5	265, 295 sh, 350	611,2	303,3		610,5
8	Кемпферол-3-О-глюкозид	Астрагалин	20,4	265, 295 sh, 350	449,1	287,2	895.5 [2M-H] [–]	448,4
11	Кверцетин-3-О-рамнозид	Кверцитрин	20,8	255, 265 sh, 295 sh, 345	449,1	303,3		448,4
q	Кемпферол галоилхексозид		21,8	265, 290 sh, 350	601,3	315.2 [M-286] ⁺ ; 287.2		600,5
12	Кемпферол-3-О-ксилозид		22,8	255, 300 sh, 355	419,1	287,5		418,4
4	Кемпферол-3-О-глюкозилрамнозид	Мулти-флорин В	23,4	260, 295 sh, 320 sh, 345	595,2	287,3		594,5
13	Кемпферол-3-О-арабинозид		24,3	260, 295 sh, 320 sh, 350	419,1	859.2 [2M + Na] ⁺ ; 287.3		418,4
9	Кемпферол-3-О-рамнозид		25,3	265, 295 sh, 320 sh, 345	433,1	887.1 [2M + Na] ⁺ ; 287.2	863.3 [2M-H] [–]	432,4
r	Кверцетин ацетилдизахарид		26,4	215, 260 sh, 345	653,4	303,3		652,6
s	Кемпферол ацетилдизахарид		27,8	215, 260 sh, 350	637,3	287,3		
t	Флавоон		29,0	220, 265, 315	611,3			610,5
5	Кемпферол-3-О-ацетилглюкозилрамнозид	Мулти-флорин А	30,3	215, 260 sh, 350	637,2	287,2		636,5
u	Флавоон		30,6	210, 265, 315	595,4			594,5
16**	Кверцетин		30,8	215, 255, 300 sh, 370	303,3			302,2
15**	Кемпферол		31,9	266, 298 sh, 320 sh, 365	287,2			286,2

* - Съединение идентифицирано само в RODW, # - Съединение идентифицирано само в RF20, **удебелен шрифт** - съединение, при което е използван ЯМР за структурен анализ, **н.о.** - флавоноид, който не може да бъде идентифициран с наличните данни, ** - агликон, идентифициран чрез ко-хроматография на референтни съединения

1.4.2. HPLC-PDA-ELSD анализ на RODW, RF20 и WF20

За допълване на данните, получени от HPLC-PDA-ESIMS анализа, беше проведен и HPLC-PDA-ELSD анализ на проби от RODW, RF20 и WF20 (водната фракция, получена след екстракцията на фенолите от RODW) (Фиг. 14)



Фигура 14. HPLC-ELSD хроматограми на проби от RODW, RF20 и WF20

И при трите анализирани проби в първите пет минути на елуиране бяха регистрирани значителни количества от силно полярни съединения, които не проявяват абсорбция в UV областта. Тези съединения вероятно принадлежат към групата на захарите. Хроматографският профил на екстракта RF20 след HPLC-ELSD анализа показва съответствие с този, получен чрез HPLC-UV-ESIMS (Фиг. 13). Хроматограмите от HPLC-ELSD анализа потвърдиха, че RF20 представлява обогатен на феноли екстракт от RODW.

1.4.3. Фракциониране на RF20 и идентифициране структурата на пречистените съединения

Като следваща стъпка в идентификацията на съединенията, присъстващи в екстракта, беше проведено фракциониране на RF20 чрез колонна хроматография върху стационарна фаза Sephadex LH-20. Половината от получените като резултат

триста фракции бяха анализирани чрез тънкослойна хроматография, при която бе извършено оцветяване с реагент за детекция на флавоноиди. На база на сходство в получените абсорбционни профили, анализите бяха групирани в общо дванадесет обединени фракции. Всяка от тях беше подложена на разделяне чрез препаративна обратнофазова високоефективна течна хроматография с цел получаване на пречистени съединения.

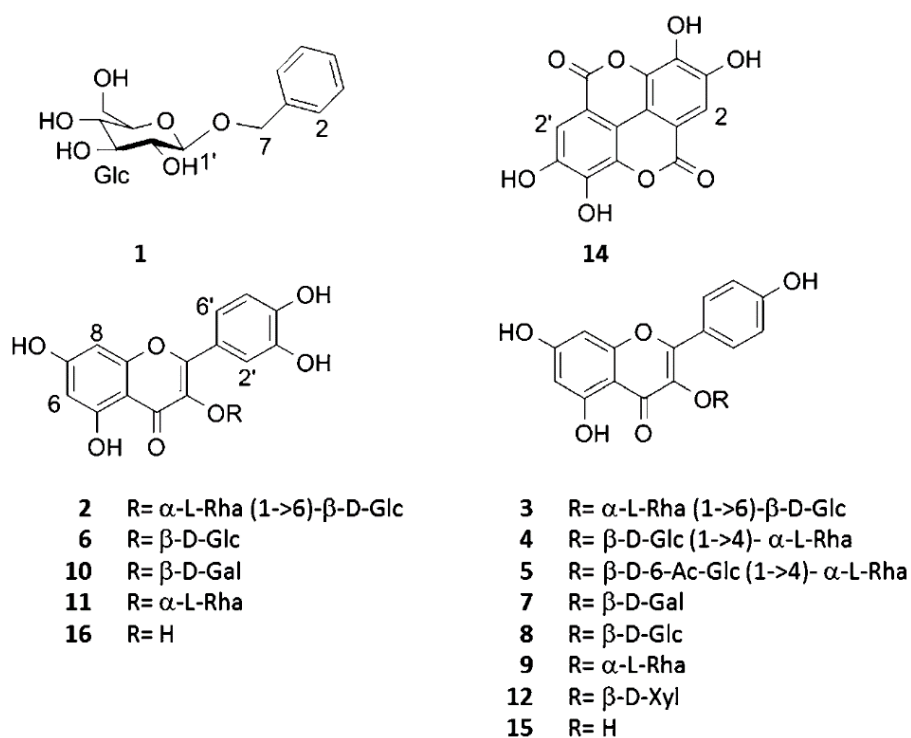
Получени бяха четиринадесет пречистени съединения (Фиг. 14), като дванадесет от тях проявиха характерни за флавоноидите UV спектри и бяха в съответствие с пиковите, отчетени при предходния HPLC-PDA-ESIMS анализ.

Присъствието на съединения 1 (фенилетил-глюкопиранозид) и 14 (елагова киселина) в RODW и RF20 беше доказано след тяхното изолиране като пречистени съединения, поради ниската им способност за йонизация по време на HPLC-ESIMS анализа и припокриването на пиковите им с тези на други съединения.

С цел потвърждаване на структурата, определена чрез HPLC-ESIMS анализа, четиринадесетте изолирани и пречистени от RF20 фенолни съединения (Табл. 17), бяха анализирани чрез ядрено-магнитен резонанс. Структурата на съединенията беше определена чрез сравняване на ¹H-ЯМР и ²D-ЯМР спектрите с данните от HPLC-ESIMS анализа и публикувани литературни данни (Markham et al. 1992; Markham and Ternai 1976; Markham et al. 1978; Nasr et al. 1987; Pauli et al. 1999; Sikorska and Matławska 2001; Yoshinari et al. 1990).

Девет от шестнадесетте флавонола (съединения с номера 2, 3, 6, 8, 9, 10, 6, 11, 15 и 16, Табл. 17) са били идентифицирани в предишни HPLC-PDA и масспектроскопски анализи на екстракти от свеж или отработен цвят на *R. damascena* (Schieber et al. 2005; Kumar et al. 2008; Kumar et al. 2009; Velioglu and Mazza 1991). Пет други флавонола (съединения 4, 5, 7, 12 и 13) не са докладвани при екстракти от цвят на *R. damascena* и бяха идентифицирани за първи път при розите. Елаговата киселина (съединение 14) беше идентифицирана като основно съединение в екстракта от RODW, получен със смола Sepabeads® SP207. Тя е била отчетена в състава на шипки и екстракти от листа при няколко видове рози (Nowak and Gawlik-Dziki 2007; Nowak et al. 2014), но до момента не е публикувано присъствието ѝ в екстракти от цвят на *R. damascena*. Съществуват изследвания, сочещи благотворния за здравето ефект на елаговата киселина (Sepúlveda et al. 2011; Vatterm and Shetty 2005), включително обещаващата ѝ противоракова активност (Mishra and Vinayak 2014b; Umesalma et al. 2014; Mishra and Vinayak 2014a; Vanella et al. 2013).

Структурните формули на основните групи фенолни съединения и техните гликозиди, присъстващи в състава на RODW и екстракта от RODW са представени на фигура 15.



Фигура 15. Структурни формули на основните групи фенолни съединения и техните гликозиди, присъстващи в състава на RODW и екстракта от RODW. Номерацията отговаря на съединенията представени в Таблица 17.

Анализът на състава на RODW и получения от нея екстракт (RF20) доказва, че отпадната вода от промишлена дестилация на розово масло представлява богат използваем източник на фенолни съединения като елагова киселина, 2-фенилетил-О- β -глюкопиранозид и гликозиди на кемпферол и кверцетин с потенциален благоприятстващ здравето ефект.

2. Молекулярно характеризиране на биоразнообразието на дрожди и плесени в проби, получени от ранна ферментация на RODW, течни проби от отработен депониран розов цвят (DLRFR) и ендوفити от цветни пъпки на *R. damascena* Mill (RFE)

Местата на депониране на отпадни продукти от дестилацията на розово масло (лагуни, места за твърди отпадъци, басейни за охлаждане на отпадни води) се характеризират с неприятна миризма и тъмна до черна повърхност, дължащи се на комплексни ферментационни процеси в отпадните продукти. Първоначалните наблюдения показаха, че ферментационните процеси в RODW започват в рамките на два-три дни след отвеждането ѝ към охлаждащите басейни или лагуните. Доколкото промишленото извличане на фенолни съединения от RODW се очаква да включва период на съхранение на RODW от минимум 1-2 дни след освобождаването ѝ от дестилаторите (необходимо за охлаждане и технологично време преди стартиране на процеса на екстракция), интерес за оползотворяването на RODW представлява и изучаването на процесите на ранна ферментация и свързаните с нея промени в състава на фенолните съединения. Процесът на ранна ферментация на RODW се обуславя от високото количество (около 3 g/L) редуциращи захари, представляващи лесно усвоим източник на енергия за микроорганизми, присъстващи в отпадната вода, дестилационната апаратура и отвеждащите отпадните продукти инсталации.

В богати на феноли отпадни води (напр. OMW) е установено, че доминиращите микроорганизми са дрожди, адаптирани към високото съдържание на феноли и притежаващи потенциал за тяхното метаболизиране (Bevilacqua et al. 2013). Имайки предвид високото съдържание на феноли в RODW (около 1.4 g/L), в настоящия дисертационен труд изследването беше фокусирано върху биоразнообразието на присъстващи в RODW видове дрожди и тяхното идентифициране.

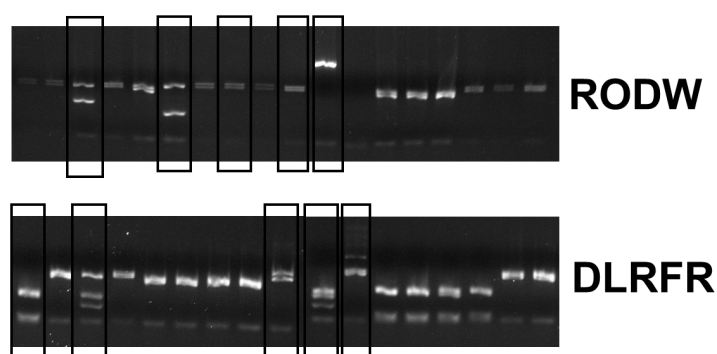
Изследването на биоразнообразието на микроорганизмите, отговорни за този процес и тяхната идентификация е необходимо условие за по-нататъшното проучване на потенциала им за биоремедиация и биотрансформация на съдържащите се в RODW натурални феноли.

2.1. Молекулярно характеризиране на биоразнообразието на аборигенни дрожди в RODW чрез метагеномен анализ

За характеризиране на биоразнообразието на аборигенни (т.е. присъстващи в RODW) дрожди участващи в ранната ферментация на RODW бяха анализирани два вида проби: проби от RODW след десетдневна ферментация в стерилни бутилки и течни проби от отработен депониран в лагуна общ отпадък включващ остатъци от розов цвят (DLRFR) и отпадна вода. От двете проби бе изолирана тотална ДНК и използвана за метагеномен анализ на биоразнообразието на присъстващи в пробите дрожди и гъби.

След амплификация с универсални праймери (ITS1 и ITS4) за вътрешния транскрибируем спейсър (ITS) на рДНК, амплифицираните и пречистени ITS

фрагменти бяха клонирани в плазмиден вектор pJET1.2/*E.coli*. Сто и тридесет ITS клона от бяха третирани с ендонуклеаза TaqI и след разделяне в агарозен гел, за всяка от пробите бяха избрани представителни клонове с различаващ се рестрикционен профил (Фиг. 16). След секвениране на избраните клонове, получените секвенции бяха използвани за BLAST търсене и сравняване с налични в GenBank ITS последователности. На база на установената хомология с ITS последователностите от базата с данни, беше конструирано филогенетично дърво (Фиг.17). Получените резултати показват, че всички ITS последователности (означени с RODW) от пробите от ферментиралата в стерилна бутилка RODW и голяма част от ITS последователностите (означени с DLRFR) на пробите от депонираните в лагуна общ отпадък формират общ клъстер с ITS последователности на дрожди от род *Cyberlindnera*, близко разположен до клъстер на ITS последователности на характеризирани щамове на дрожди от род *Pichia*. Останалите анализирани ITS- DLRFR последователности се групират с последователности на представители от родовете *Cladosporium* и *Candida*, както и с некултивирани дрожди и гъби, (Фиг.17).



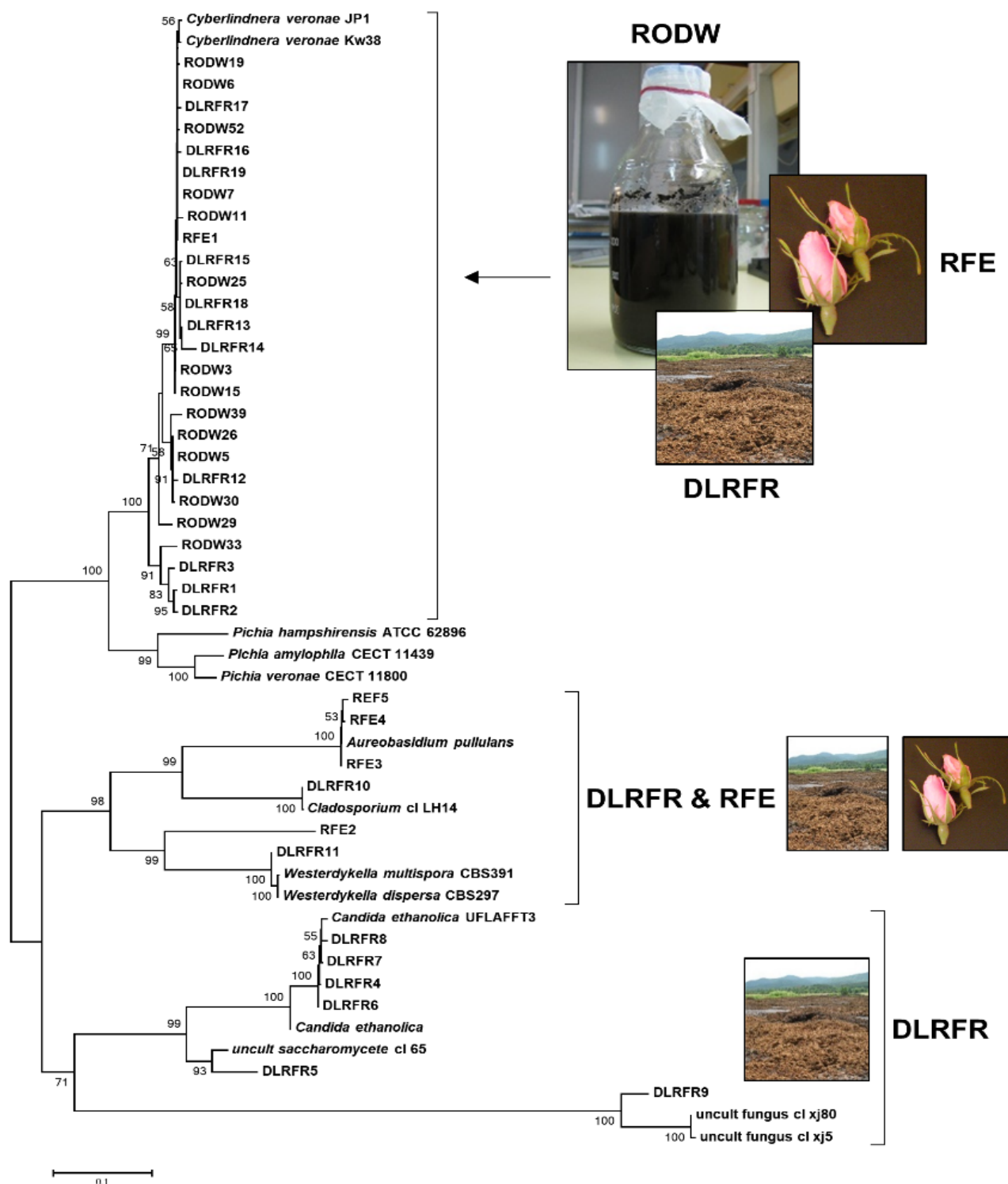
Фигура 16.Рестрикционни профили на ITS клонове след третиране с ендонуклеаза TaqI на проби от RODW и DLRFR

2.1.1. Филогенетичен анализ на изолати дрожди, получени от проби RODW след десетдневна ферментация, проби от депонирани в лагуна отпадни продукти от дестилация на розово масло и ендифитни дрожди, изолирани от цветни пъпки на *R. damascena* Mill

Биоразнообразието на дрожди и гъби присъстващи в проби от RODW след десетдневна ферментация в стерилна бутилка и течни проби от депонирани в лагуна отпадни продукти от дестилация на розово масло бяха характеризирани паралелно и чрез филогенетичен анализ на набор от изолати, получени след култивиране на посочените проби върху три вида среди съдържащи RODW, DLRFR, както и YPD/PDA среда. Освен посочените две проби, в експеримента бе включено и изолиране на ендифитни дрожди и гъби, чрез култивиране на повърхностно стерилизирани цветни пъпки от *R. damascena* Mill. От трите типа проби бяха получени и анализирани съответно: четиридесет изолата от RODW

(означени като RODW 1÷40), двадесет изолата от течни проби от отработени и депонирани в лагуна отпадни продукти включващи преработен розов цвят (означени като DLRFR 1 ÷ 20), както и пет изолата ендифитни дрожди и гъби получени след *in vitro* култивиране на цветни пъпки от *R. damascena* Mill (обозначени като RFE 1÷7).

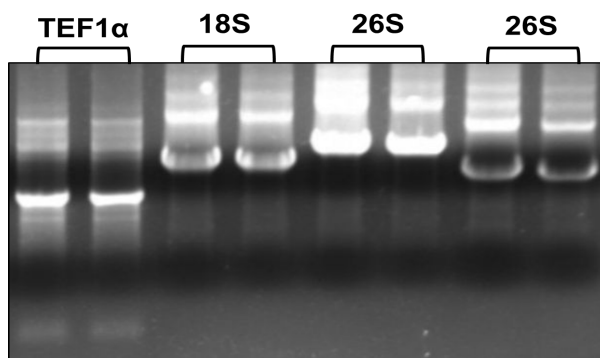
С цел молекулярна идентификация, изолатите бяха анализирани въз основа на секвенциите на вътрешния транскрибируем спейсър (ITS) на рДНК. Анализът на получените ITS последователности очаквано показва, че по-голяма част от тях са идентични или филогенетично много близки до ITS последователностите получени след проведения метагеномен анализ в т. 2.1. Всички получени ITS последователности, вкл. и тези от GenBank показващи висока хомология / идентичност с изследваните след BLAST анализ, бяха използвани за конструиране на общо филогенетично дърво (Фиг. 17). Както и при проведения метагеномен анализ, конструираното филогенетично дърво показва, че всички ITS-RODW последователности получени от пробата на ранна ферментация на RODW и по-голяма част от ITS-DLRFR последователностите, получени от пробите на депонираните в лагуна общ отпадък от дестилация на розово масло, формират общ клъстер с ITS последователности на дрожди от род *Cyberlindnera*, близко разположен до клъстера на ITS последователности на характеризирани шамове на дрожди от род *Pichia*. Останалите ITS-DLRFR последователности се групират в общи клъстери с GenBank последователности на шамове дрожди от родове *Cladosporium*, *Candida* и *Westerdykella*, както и с ITS последователности на некултивирани дрожди и гъби (Фиг.17). Интересен резултат от проведения филогенетичен анализ е групирането на ITS последователностите на анализирани ендифитни изолати. Съответно, три от ITS-RFE последователностите формират отделен клъстер, съвместно с последователност на *Aureobasidium pullulans*, един от изолатите (RFE2) се групира с изолата DLRFR11 и шамове от род *Westerdykella*, а петия ендифитен изолат (RFE1) е част от големия RODW/DLRFR клъстер. Наблюдаваното групиране в общ клъстер на изолати, получени от проби от ферментирала RODW, проби от „лагуната“ с депонирани отпадъци от розопроизводство и ендифитни изолати от цветни пъпки на промишлено отглеждана *R. damascena* Mill дава основание да се предположи, че ранната ферментация на RODW протича с участието на аборигенни ендифитни дрожди, които присъстват в розовия цвят на промишлено отглежданата маслодайна роза и вероятно са част от микробиалните съобщества обитаващи работните повърхности и части на дестилериите, басейните за събиране и охлаждане на отпадната вода и продукти, както и лагуните и местата за депониране на отпадните продукти от дестилацията на розово масло.



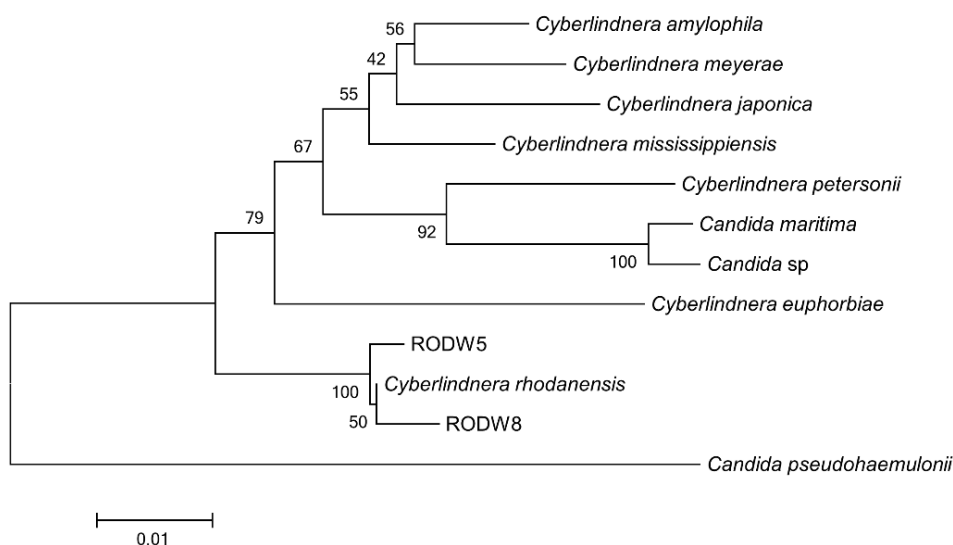
Фигура 17. Молекулярно характеризиране на биоразнообразието на дрожди и плесени в проби, получени от ранна ферментация на RODW, течни проби от отработен депониран в „лагуна“ розов цвят (DLRFR) и ендوفити от цветни пъпки на *R. damascena* Mill. (RFE). Филогенетичното дърво е конструирано на база на ITS последователностите на клоновете, получени след амплификация с универсални ITS1 и ITS4 праймери. Цифрите при разклоненията показват стойностите на bootstrap анализа.

Резултатите от паралелното култивиране на част от получените RODW изолати (представени в т.3. по-долу) не показват съществени различия между анализирани изолати, в резултат на което два произволно избрани изолата от RODW (RODW-5 и RODW-8) бяха избрани за по-детайлно филогенетично характеризиране въз основа на анализ на последователностите на гените за 26S, 18S рРНК и транслационния елонгационен фактор TEF1 α .

Геномна ДНК изолирана от двата RODW изолата бе използвана за амплифициране на участъци от 26S и 18S рРНК, и TEF1 α гени (Фиг. 18). След BLAST търсене и идентифициране на GenBank последователности показващи висока хомоложност/идентичност с изследваните, въз основа на обединена последователност на трите анализирани участъци от гени, бе конструирано филогенетично дърво включващо двата анализирани RODW изолата и щамове на близкородствени видове дрожди с последователности налични в Genbank (Фиг. 19). Конструираната дендрограма показва близко родство на двата анализирани изолата RODW-5 и RODW-8, а групирането им в общ клъстер с щам дрожди от вида *Cyberlindnera rhodanensis*, показва близката родственост на RODW изолатите с този вид.



Фигура 18. PCR амплификация на геномна ДНК от аборигенен изолат RODW-5 с праймери за 18S, 26S и TEF1 α



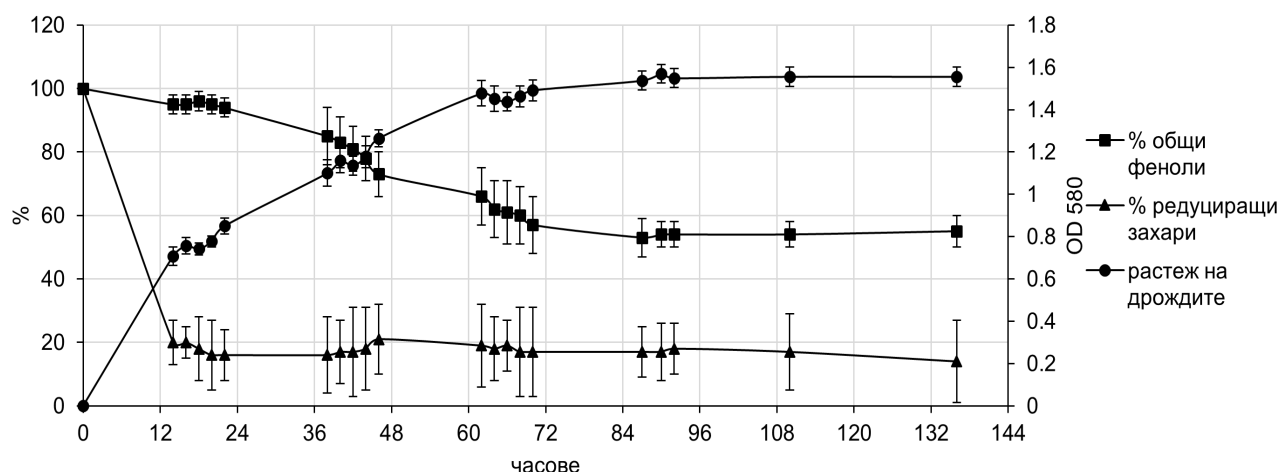
Фигура 19. Филогенетично дърво конструирано по метода Neighbor joining, включващо аборигенни изолати RODW-5, RODW-8 и няколко видове дрожди от род *Cyberlindnera* на база 18S, 26S и TEF1 α последователности.

3. Култивиране на аборигенни изолати и индустриални видове дрожди в среда от RODW

3.1. Ферментация на RODW и биотрансформация на фенолни съединения от аборигенни изолати дрожди

Двадесет и три аборигенни изолата дрожди получени от RODW, която е ферментирала в продължение на 10 дни, бяха тествани за способността им да бъдат култивирани на клатчка, в колби съдържащи 100 mL стерилна RODW без корекция на pH.

Фигура 20 показва средни стойности за скоростта на растеж и динамиката в съдържанието на общите феноли и редуциращи захари в културите за период от 136 часа след инокулирането. Паралелното култивиране на изследваните изолати от дрожди в RODW показва, че те имат сходна скорост на растеж, захарна ферментация и промени в общото съдържание на феноли. Активният растеж на тестваните щамове дрожди в RODW продължава около 62-64 часа, след което културите бавно навлизат в стационарна фаза. През първите 14 часа от култивирането около 80% от редуциращите захари в RODW се асимилират от култивираните изолати. Ферментацията/биоремедиацията на феноли се извършва в рамките на 68 часа след инокулацията, което води до тяхното намаляване до около 60% от първоначалното им съдържание, след което тяхното съдържание остава непроменено. Ефектът на биоремедиация свързан с редуциране на общото съдържание на фенолни съединения може да се дължи, както на тяхното разграждане и усвояване от микроорганизмите, така и на тяхното адсорбиране по повърхността на клетките (Lamia and Moktar 2003).



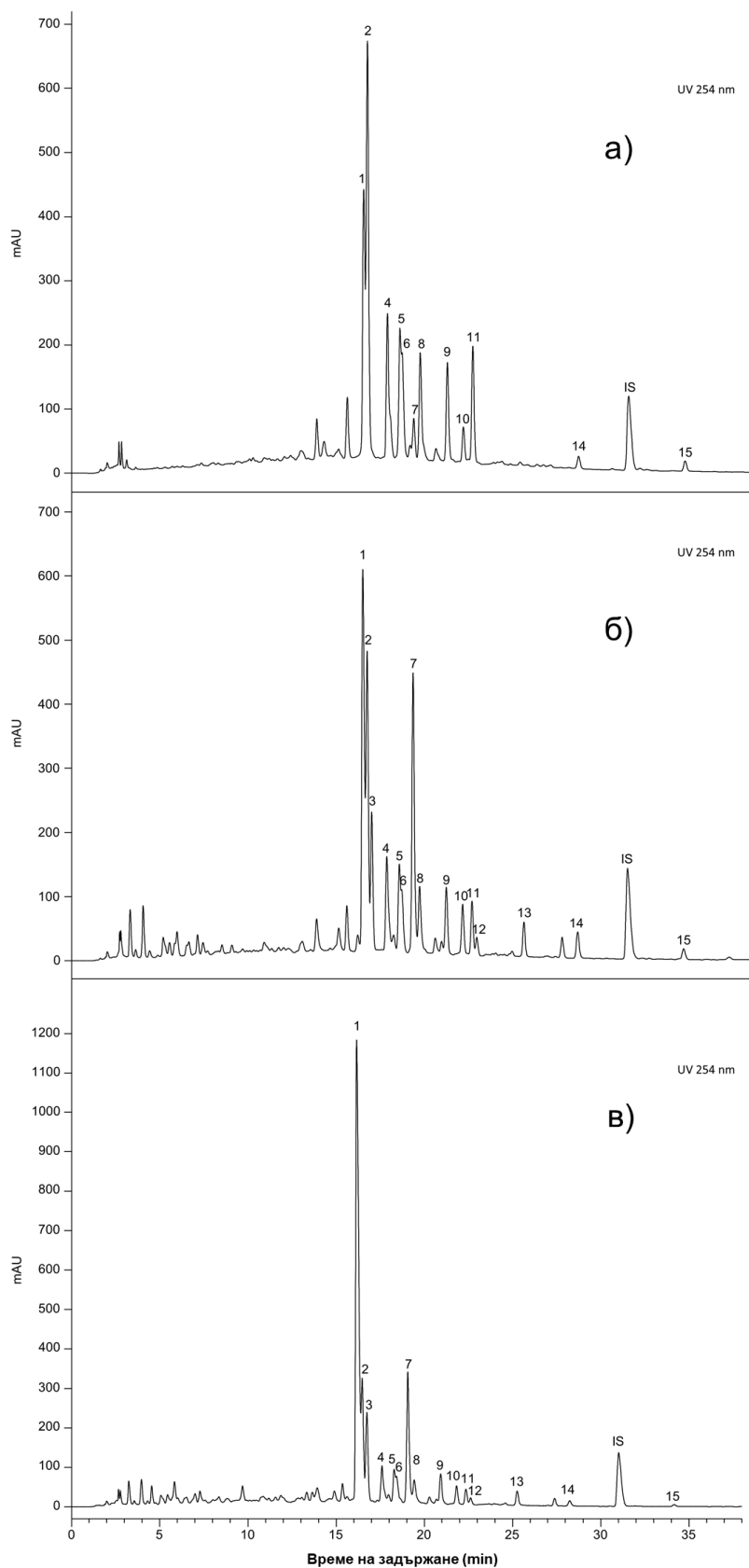
Фигура 20. Ферментация на RODW с аборигенни изолати на дрожди. Средни стойности за тестваните 23 щамове за период от 136 часа. Лявата ордината представя съдържанието на общи феноли и редуциращи захари като процент от началното им количество в RODW преди ферментацията (% $\pm$ SD). Дясната ордината представя оптичната плътност на културите (OD₅₈₀ $\pm$ SD).

Двадесет и три паралелни култури на аборигенни изолати от дрожди култивирани в RODW бяха използвани за екстракция на феноли и сравнителен

HPLC-UV анализ на фенолния профил. Получените данни показаха незначителни разлики в състава на екстрактите между анализираните аборигенни изолати. Фигура 21а показва сравнение на хроматографския профил на получения екстракт от RODW след ферментация с изолат RODW-5 сравнен с екстракт от неинокулирана контрола (Фиг. 21в). Промените във фенолния профил, представен като процент от неинокулираната контрола са представени в Табл. 18. Анализът на резултатите от HPLC-UV профила на екстракт получен след ферментация с аборигенния изолат RODW-5 показва около 3.4-кратно намаление на съдържанието на елагова киселина и около 6-кратно намаление на съдържанието на астрагалин, както и пълно асимилиране/изчерпване на съединенията изокверцитрин, кемпферол-3-О-рамнозид и Мултифлорин А. В същото време, в същият екстракт се наблюдава увеличение в съдържанието на двата агликони - кверцетин (1.7-кратно) и кемпферол (4.7-кратно), което очевидно се дължи на усвояването на захарния остатък на някои от съответстващите им гликозиди по време на ферментацията на дрождите. При осем от идентифицираните гликозиди на кверцетин и кемпферол се регистрира увеличение на съдържанието им в диапазона от 1.2 пъти (Мултифлорин В) до 5.5 пъти (Кемпферол-3-О-арабинозид).

Намаляване в съдържанието на определни глюкозиди и освобождаване на съответните им агликонни е фенолна биотрансформация дължаща се на глюкозидазна активност, която е доказана при множество микроорганизми - *Pichia*, *Candida*, *Brettanomyces* (Spagna et al. 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (Sirilun et al. 2016), *Aspergillus niger*, *A. niveus*, *A. awamori* (Georgetti et al. 2009), *Lactobacillus plantarum* (Muñoz et al. 2017), *Rhizopus* sp. (Huynh et al. 2018). Наблюдаваните аналогични промени в състава на RODW след ферментация с аборигенния изолат RODW-5 предполагат неговата глюкозидазна активност. Паралелно с това, поради намаляване съдържанието на рамнозидите на кемпферола в анализираният екстракт след ферментация, щамът вероятно притежава и рамнозидазна активност, докладвана при щамове на *Aspergillus niger* (You et al. 2010), *A. awamori* (Lin et al. 2014), *Lactobacillus plantarum* (Avila et al. 2009).

Получените в настоящото изследване резултати показват, че фенолната ферментация на RODW с участието на изолата RODW-5 води до промени в относителното количество на част от фенолните глюкозиди, повишаване на съдържанието на техните агликонни кверцетин и кемпферол и намаляване на съдържанието на елагова киселина. При анализа на фенолния профил на екстрактите не бе отчетен синтез на нови съединения, дължащи се на ферментация на RODW от аборигенен изолат RODW-5. Получените резултати демонстрират също и възможността ферментацията на RODW с аборигенни изолати дрожди да бъде използвана за насочено модифициране на състава на RODW преди екстракция на фенолните съединения.



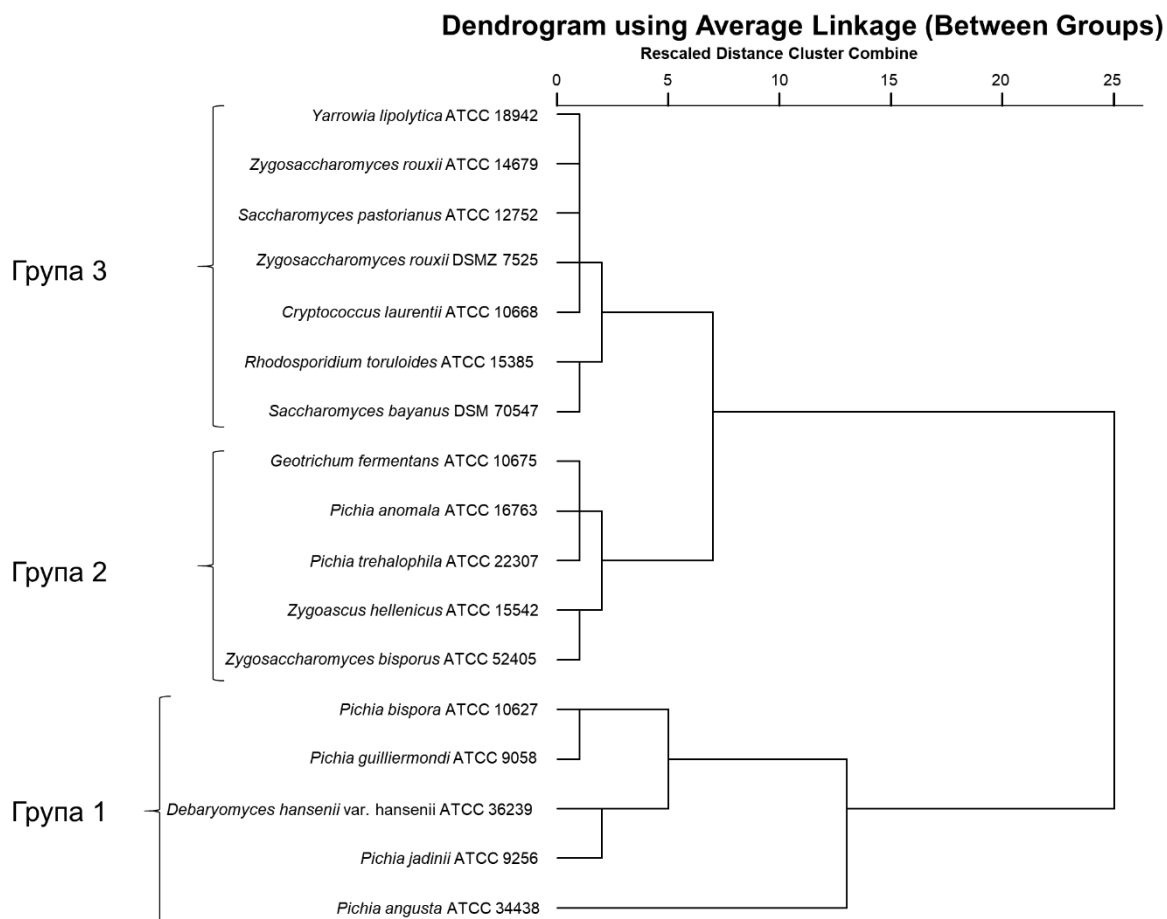
Фигура 21. HPLC UV хроматограми на фенолни екстракти получени със смола SP207 след ферментация на RODW за период от 136 часа с: а) аборигенен изолат RODW-5, б) индустриален щам *Geotrichum fermentans* ATCC 10675 и в) контрола без ферментация. Означените пикове отговарят на съединенията в **Таблица 18**. IS-вътрешен стандарт (TBHQ).

Таблица 18. Относителни количества (% $\pm$ SD) на 15 идентифицирани съединения в екстракти на проби от RODW получени след ферментация с индустриални щамове дрожди и аборигенен изолат RODW-5 съотнесени към количествата в екстракт от неферментирала RODW

№	Съединение	RODW-5	<i>Pichia angusta</i> ATCC 34438	<i>Pichia bispora</i> ATCC 10627	<i>Pichia guilliermondi</i> ATCC 9058	<i>Geotrichum fermentans</i> ATCC 10675	<i>Pichia anomala</i> ATCC 16763	<i>Zygoascus hellenicus</i> ATCC 15542
1	Елагова киселина	29 $\pm$ 12	102 $\pm$ 13	81 $\pm$ 14	93 $\pm$ 10	39 $\pm$ 8	92 $\pm$ 25	81 $\pm$ 8
2	Кверцетин-3-О-галактозид (Хиперозид)	237 $\pm$ 13	131 $\pm$ 22	149 $\pm$ 12	130 $\pm$ 8	150 $\pm$ 5	104 $\pm$ 13	99 $\pm$ 8
3	Кверцетин-3-О-глюкозид (Изокверцитрин)	0	127 $\pm$ 30	5 $\pm$ 11	117 $\pm$ 14	86 $\pm$ 5	95 $\pm$ 12	99 $\pm$ 7
4	Кемпферол-3-О-рутинозид	225 $\pm$ 13	133 $\pm$ 11	155 $\pm$ 12	135 $\pm$ 5	171 $\pm$ 5	108 $\pm$ 13	122 $\pm$ 7
5	Кемпферол- 3-О-галактозид	269 $\pm$ 13	145 $\pm$ 11	171 $\pm$ 12	140 $\pm$ 5	177 $\pm$ 5	106 $\pm$ 18	130 $\pm$ 7
6	Кверцетин-О-метил дизахарид	211 $\pm$ 15	115 $\pm$ 7	79 $\pm$ 9	128 $\pm$ 5	121 $\pm$ 6	132 $\pm$ 7	30 $\pm$ 7
7	Кемпферол -3-О-глюкозид (Астрагалин)	17 $\pm$ 18	130 $\pm$ 10	29 $\pm$ 10	109 $\pm$ 30	136 $\pm$ 5	101 $\pm$ 12	119 $\pm$ 8
8	Кверцетин-3-О-рамнозид (Кверцитрин)	264 $\pm$ 13	128 $\pm$ 11	184 $\pm$ 12	146 $\pm$ 26	175 $\pm$ 8	98 $\pm$ 14	185 $\pm$ 8
9	Кемпферол-3-О-ксилозид	213 $\pm$ 13	125 $\pm$ 7	67 $\pm$ 10	134 $\pm$ 6	131 $\pm$ 5	137 $\pm$ 10	40 $\pm$ 8
10	Кемпферол-3-О-глюкозил-рамнозид (Мултифлорин В)	119 $\pm$ 11	135 $\pm$ 12	157 $\pm$ 11	127 $\pm$ 10	173 $\pm$ 4	103 $\pm$ 12	122 $\pm$ 7
11	Кемпферол-3-О-арабинозид	545 $\pm$ 13	128 $\pm$ 12	316 $\pm$ 10	139 $\pm$ 8	231 $\pm$ 4	111 $\pm$ 11	275 $\pm$ 7
12	Кемпферол-3-О-рамнозид	0	125 $\pm$ 12	149 $\pm$ 10	124 $\pm$ 10	166 $\pm$ 4	61 $\pm$ 12	112 $\pm$ 8
13	Кемпферол-3-О-ацетилглюкозил-рамнозид (Мултифлорин А)	0	111 $\pm$ 11	127 $\pm$ 13	113 $\pm$ 7	141 $\pm$ 6	48 $\pm$ 15	137 $\pm$ 8
14	Кверцетин	174 $\pm$ 16	144 $\pm$ 13	626 $\pm$ 26	188 $\pm$ 11	354 $\pm$ 3	124 $\pm$ 12	116 $\pm$ 11
15	Кемпферол	470 $\pm$ 13	155 $\pm$ 14	1182 $\pm$ 51	406 $\pm$ 6	472 $\pm$ 6	136 $\pm$ 13	135 $\pm$ 14

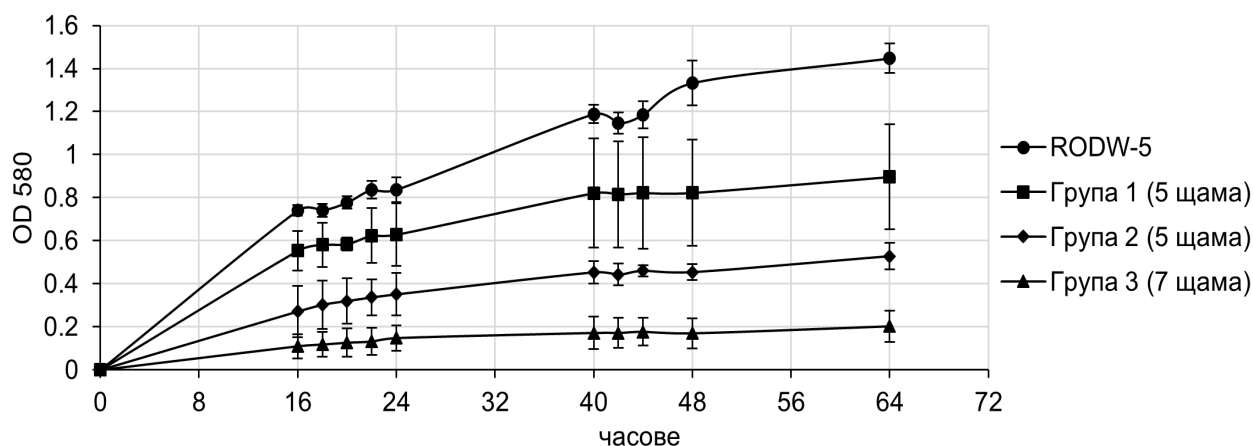
3.2. Ферментация на RODW и биотрансформация на фенолите в RODW от индустриални видове дрожди

За по-пълна оценка на капацитета на изолатите от RODW за ферментация и модифициране състава на RODW, бяха проведени сравнителен анализ включващ ферментация на RODW с различни видове дрожди от колекцията на НБПМКК, за част от които се съобщава, че растат върху богати на феноли субстрати (Mathew et al. 2007; Kunze et al. 2009; Karimi and Hassanshahian 2016; Gerginova et al. 2014; Hristov et al. 2012; Jarbouï et al. 2012; Schlüter and Schauer 2017). Изследваните видове дрожди бяха тествани за тяхната способност за ферментация на RODW и сравнени с аборигенния изолат RODW-5 чрез паралелно култивиране на клатачка, в колби съдържащи 100 mL стерилна RODW без корекция на pH. Седем от изследваните щамове не показаха растеж в RODW за изследвания период от 64 часа. Данните за динамиката на растеж (OD_{580}) на останалите 17 щамове бяха подложени на клъстерен анализ, който раздели щамовете на три групи спрямо потенциала им да се развиват в RODW (фиг. 22).



Фигура 22. Клъстерен анализ на 17 индустриални вида дрожди на основата на динамиката на техния растеж (OD_{580}) в RODW за период от 64 часа

На Фиг. 23 са представени осреднените криви на растеж за всяка една от групите в сравнение с тази на щам RODW-5. От фигурата се вижда, че само група 1 и група 2 се развиват относително добре в RODW, докато група 3 показва много бавен растеж. Получените резултати също показват, че скоростта на растеж на изследваните щамове е съществено по-ниска от скоростта на растеж на изолата RODW-5, което сочи по-високата степен на адаптация на аборигенния щам и по-високия му потенциал за ферментация на RODW в сравнение с тестваните промишлени щамове.



Фигура 23. Динамика на растеж на 17 индустриални щамове дрожди и аборигенен щам RODW-5 за период от 64 часа. Кривите на нарастване представят трите групи, формирани след клъстерен анализ базиран на степента на растеж на всеки щам и референтния щам RODW-5

За оценяване на промените във фенолния профил на RODW след култивирането на индустриалните видове дрожди, бе проведен сравнителен HPLC-UV анализ (Фиг. 216, Табл.18) на екстракти от RODW при 3 щамове принадлежащи на Група 1 (*Pichia angusta*, *P. bispora*, *P. guilliermondii*) и 3 щамове принадлежащи на Група 2 (*Geotrichum fermentans*, *Pichia anomala*, *Zygoascus hellenicus*). Анализът на резултатите показва значителна разлика във фенолния профил на получените екстракти във всяка група щамове (Табл. 18). Например, съдържанието на кемпферол за щамове от Група 1 е нараснало в широки граници - от 1.55 до 11.82 пъти, а на кверцетин - от 1.4 до 6.3 пъти, докато съдържанието на изокверцитрин варира от увеличение от 1.2 до намаление до 20 пъти. При щамовете от група 2, най-голямо вариране в състава е регистрирано при *Zygoascus hellenicus*, който предизвиква 3.3-кратно намаление в съдържанието на кверцетин-О-метил дизахарид и при щам *Geotrichum fermentans*, който води до 3.5- и 4.7-кратно увеличение в съдържанието съответно на кверцетин и кемпферол.

Подобно на ферментацията на RODW с аборигенни дрожди, ферментацията на RODW от тестваните индустриални щамове води главно до промени в относителното съдържание на част от фенолните съединения, но не и до биосинтез на нови съединения (Фиг. 216).

4. Изолиране и характеризиране на ендоеитни гъби от лечебни и ароматни растения и изследване на потенциалa им за ферментация на RODW и биотрансформация на фенолни съединения

4.1. Изолиране и ДНК характеризиране на ендоеитни гъби от лечебни и ароматни растения

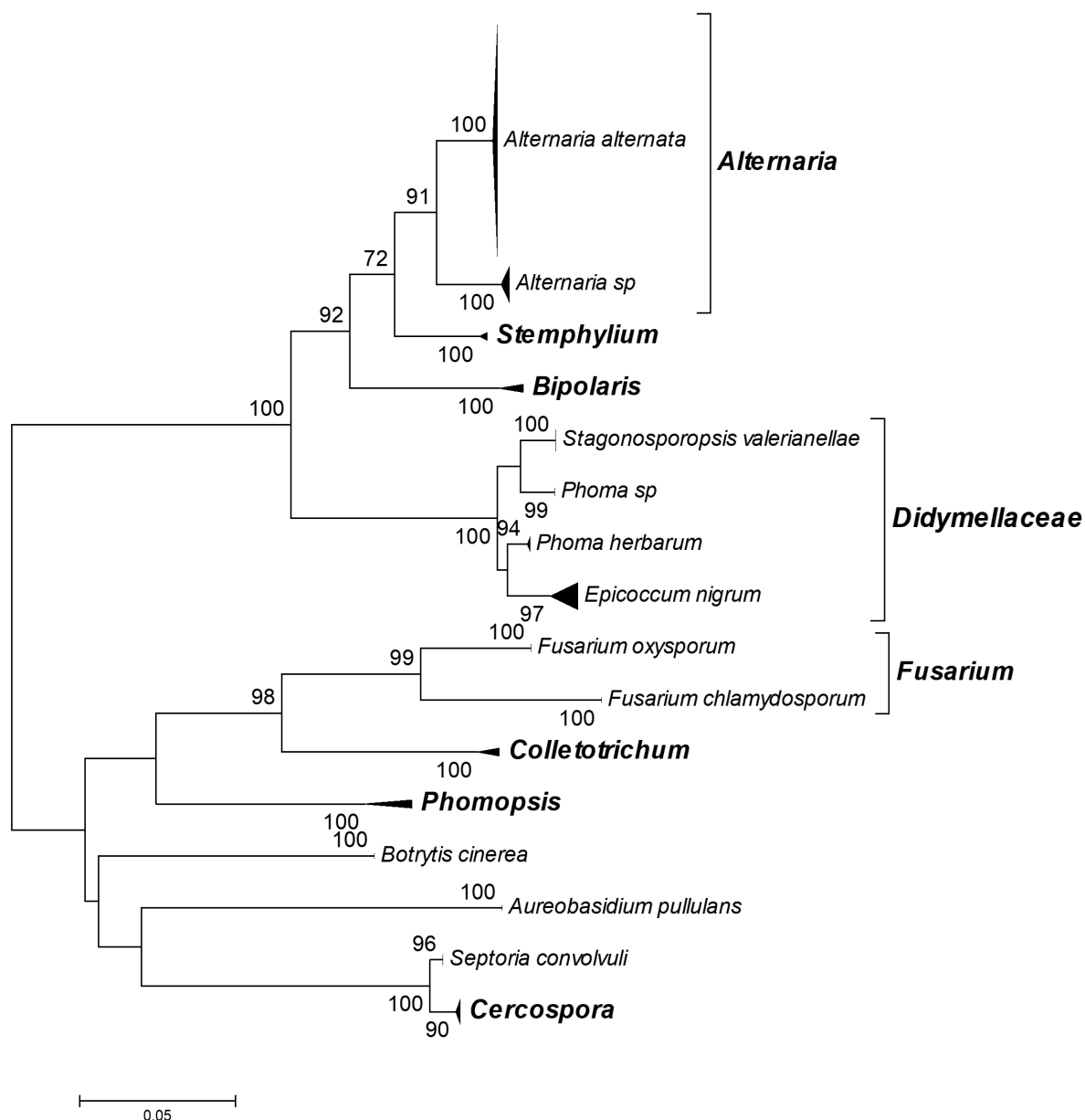
Редица съобщения сочат, че лечебните и ароматни растения са източник на изолиране на широк набор от ендоеитни гъби голяма част от които могат да бъдат използвани за получаване на биологично активни вещества с ценни свойства и приложения. Голяма част от ендоеитните гъби имат капацитет за растеж върху среди включващи фенолни съединения от растителен произход, както и модифициране на състава на фенолните съединения. Всичко това сочи ендоеитните гъби изолирани от лечебни и ароматни растения като ценен източник за изолиране и отбор на щамове с висок капацитет за ферментация и модифициране на RODW. Тази част от дисертационната работа представя резултати от изолиране и характеризиране на ендоеитни гъби от набор лечебни и ароматни растения, както и тестване на капацитета им за ферментация на RODW и модификация на фенолния състав. Проведени начални експерименти за директно култивиране на повърхностно стерилизирани листни експланти от различни лечебни и ароматни растения директно върху RODW среда не доведе изолиране на ендоеитни гъби поради сравнително бързото некротиране и загиване на експлантите и липса на гъбен растеж в *in vitro* културите. Затова, първоначалното изолиране на гъбни ендоеити бе извършено чрез *in vitro* култивиране на повърхностно стерилизираните листни експланти от двадесет вида лечебни и ароматни растения върху твърда PDA среда. След отчитане на гъбен растеж и прехвърляне на растящия мицел на свежа среда, от култивираните растителни експланти бяха получени общо сто тридесет и девет изолата на ендоеитни гъби (Табл. 19). Полученият общ брой изолати от *in vitro* културите от всеки растителен вид варира между два и дванадесет, като единствено след култивиране на експланти от *Ruta graveolens* (седефче), не беше отчетен растеж на ендоеитни гъби. Врърхчета на хифи от получените гъбни култури бяха няколкократно култивирани на свежи среди за получаване на ендоеитни изолати за следващите изследвания.

С цел молекулярна идентификация на получените ендоеитни изолати, изолирана от тях геномна ДНК беше използвана за амплифициране с универсални праймери на региона ITS1-5.8S-ITS2 на гени, кодиращи рибозомална РНК. Амплифицираните ITS фрагменти бяха секвенирани, като с помощта на BLAST сравняване, получените ITS нуклеотидни последователности бяха съпоставени с налични в GenBank ITS последователности от охарактеризирани щамове на различни гъбни видове. Получените ITS последователности на изследваните ендоеитни изолати и ITS последователностите от GenBank показващи висока хомоложност / идентичност

с тях бяха използвани за конструиране на филогенетично дърво. Филогенетичният анализ показва, че ITS последователностите на получените ендифитни изолати са групирани в шестнадесет отделни клъстера, чиято достоверност е подкрепена с високи стойности на Bootstrap анализа на конструираното филогенетично дърво (Фигура 24). Всеки от оформените клъстери включва налични в GenBank последователности от охарактеризирани гъбни щамове и изолати, причислени към определен гъбен вид или род, спрямо които е определена филогенетичната принадлежност на анализирани ендифитни гъбни изолати. Анализът показва, че ендифитните изолати принадлежат към общо 7 рода и 9 вида гъби (Таблица 19). По-детайлното наблюдение на конструираното филогенетично дърво показва, че двата малки клъстера от вида *Phoma herbarum* и рода *Phoma* (*Phoma* sp.) са разположени отделно в рамките на големия клъстер *Didymellaceae* (Фигура 24). Наблюдаваното разделяне на клъстерите "*Phoma herbarum*" и "*Phoma* sp." може да се обясни с проблемите в таксономията на многочисления и сложен род *Phoma* и филогенезата на *Didymellaceae*, докладвани в други проучвания (Aveskamp et al. 2010; Chen et al. 2015). Най-голям брой, над половината от ендифитните гъбни изолати, принадлежат към вида *Alternaria alternata* (83 изолата, 60%) и *Alternaria* sp. (11 изолата, 7.9%) (Таблица 19), което потвърждава съобщенията от други изследвания, че представители на видовете *Alternaria* се идентифицират с относително висока честота сред изолирани ендифитни гъби от различни растителни видове (Eram et al. 2018; Guo et al. 2004). От друга страна, по-голямата част от видовете и родовете от гъби, идентифицирани в настоящото изследване, се състоят само от един до четири различни изолата, например изолатите филогенетично близки до *Aureobasidium pullulans* и *Botrytis cinerea* (Таблица 19). Като цяло, резултатите показват и потвърждават тези на други изследвания (Kaul et al. 2012; Huang et al. 2007; Rajagopal et al. 2010; Nalini et al. 2014), че лечебните и ароматни растения са ценен източник за изолиране на ендифити принадлежащи към широк набор от видове гъби.

Таблица 19. Таксономична принадлежност на изолираните ендифитни гъби на базата на анализ на ITS последователностите

Растителни видове, използвани за изолиране на ендифитни гъби	Общ брой на изолатите	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Cercospora</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phoma herbarum</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Septoria convolvuli</i>	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	<i>Stemphylium</i> sp.
<i>Althaea rosea</i>	9	9															
<i>Calendula officinalis</i>	9		9														
<i>Centranthus ruber</i>	9	4					1									2	2
<i>Echinacea</i> sp.	5	2			1			2									
<i>Foeniculum vulgare</i>	2	2															
<i>Geranium macrorrhizum</i>	4	3												1			
<i>Glaucium flavum</i>	7	3			1				1		2						
<i>Hyssopus officinalis</i>	12	8					4										
<i>Lavandula angustifolia</i>	5	2		1					1					1			
<i>Leonurus cardiaca</i>	12	6					3		2				1				
<i>Levisticum officinale</i>	4	4															
<i>Melissa officinalis</i>	10	5	2												3		
<i>Mentha piperita</i>	5	5															
<i>Ruta graveolens</i>	0																
<i>Salvia officinalis</i>	9	7							1				1				
<i>Salvia sclarea</i>	6	2										4					
<i>Satureja montana</i>	10	10															
<i>Tanacetum vulgare</i>	2	2															
<i>Thymus</i> sp.	12	8				1			3								
<i>Valeriana officinalis</i>	7	1								1						5	
Общо:	139	83	11	1	2	1	8	2	8	1	2	4	2	2	3	7	2



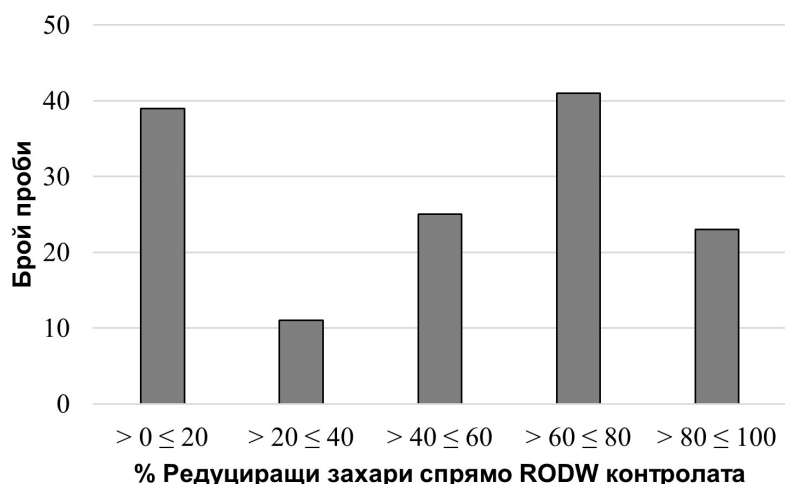
Фигура 24. Филогенетично дърво конструирано по метода Neighbor joining на база на ITS секвенции на 139 ендofитни гъбни изолата и на налични в GenBank ITS секвенции на охарактеризирани гъбни щамове, получени след BLAST търсене. Получените след Bootstrap анализа стойности по-високи от 70% са показани в точките на разклоняване (% от 1000 повторения). Всички филогрупи са представени като поддървета и са отбелязани с триъгълник. Поддърветата са определени в съответствие с таксономичната принадлежност на наличните в GenBank ITS секвенции на характеризирани гъбни щамове, разположени в съответното поддърво. Наименованията на референтните щамове и съответстващите номера на ITS секвенции в GenBank са показани в Табл. 20. Филогенетичната принадлежност на всеки от изследваните гъбни изолати към определено поддърво и съответната таксономична група е представена в Табл. 21.

Таблица 20. Списък на референтните гъбни щамове и съответстващите им ITS секвенции в GenBank, използвани за конструиране на филогенетичното дърво представено на фиг. 24.

Обозначение на поддървото	Наименование на референтния гъбен щам в GenBank	номер на ITS секвенцията в GenBank
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i> strain OUCMBI110145	KP269055
	<i>Alternaria alternata</i> strain BS14	KP985749
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i> IA305	AY154717
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> strain R124	HG532077
<i>Bipolaris</i>	<i>Bipolaris sp.</i> isolate Ta-BP2	KX867789
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i> isolate LGM002	KC683713
<i>Cercospora</i>	<i>Cercospora beticola</i> CBS 116456	NR_121315
<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum spinaciae</i> strain BBA 71333	AJ301973
<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	JN689342
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	<i>Fusarium chlamydosporum</i> isolate NW582B	EU520242
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate: TS08-137-1-1	AB470850
<i>Phoma herbarum</i>	<i>Phoma herbarum</i> strain IT36	KY947522
<i>Phoma sp.</i>	<i>Phoma sp.</i> JF-2013 isolate NLF02	KC005682
<i>Phomopsis sp.</i>	<i>Phomopsis sp.</i> isolate PG	GU086318
<i>Septoria convolvuli</i>	<i>Septoria convolvuli</i> culture strain CBS 102325	GU214697
<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i> CBS 329.67	NR_160109
<i>Stemphylium</i>	<i>Stemphylium sp.</i> 032	KR012910

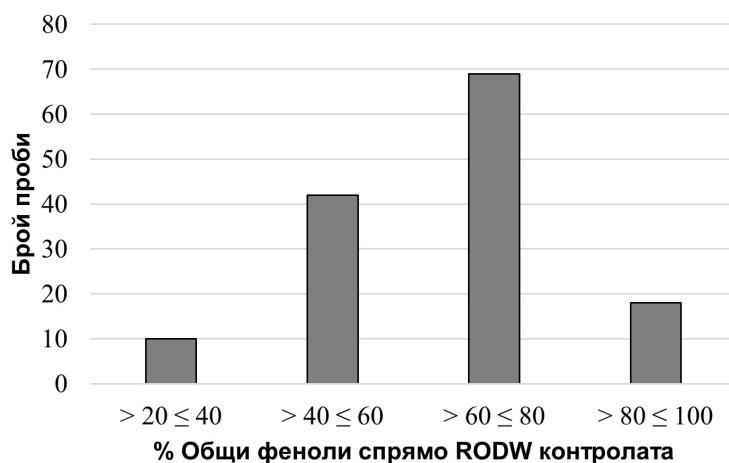
4.2. Тестване на капацитета на ендифитни гъбни изолати за ферментация на малък обем RODW среда

Във втората част на изследването, всичките получени 139 изолата от ендифитни гъби от лечебни и ароматни растения бяха тествани за тяхната способност да растат в малки обеми течна RODW среда и да метаболизират съдържащите се в нея захари и феноли. За целта, обеми от пет милилитра течна RODW среда бяха инокулирани с гъбен мицел от всеки от изследваните ендифитни изолати и след 96 h паралелно култивиране на клатачка, бяха измерени нивата на редуциращите захари и общи феноли в културалната среда на получените култури. Анализът на резултатите показва висока степен на вариране в способността на тестваните 139 гъбни изолата да се развиват и ферментират RODW. Степента на вариране обхваща от непроменени нива на начално съдържание на редуциращи захари (3054 ± 55 mg/L D-глюкоза) до намаляването им до 5% от първоначалното ниво в RODW. По подобен начин, общото съдържание на феноли в проби, взети от културите варира в граници от непроменено начално ниво (1490 ± 15 mg/L еквиваленти галова киселина) до спад до 22% от началното количество. Фигура 25 показва разпределението на броя на анализирани изолати според нивото на общото намаление на съдържанието на захари в RODW след ферментацията.

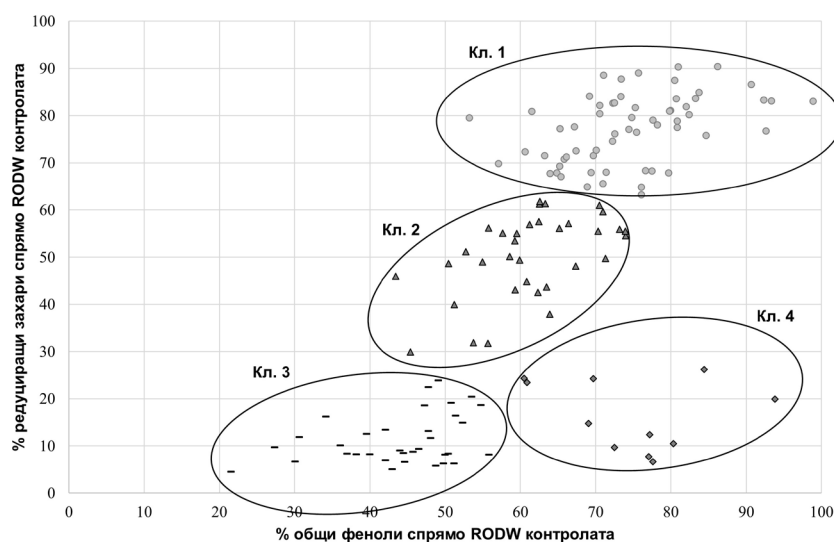


Фигура 25. Разпределение на гъбните изолати и предизвиканото от тях изменение в количеството редуциращи захари в RODW средата след култивиране от 96h, представено в %

Преобладаващата част от проби, взети след култивирането са свързани със значително (0-20% от изходното ниво на RODW) и относително по-слабо (60-80% от началното ниво на RODW) намаляване на общите захари в RODW, представени съответно от 39 и 41 от тестваните изолати. Интервалите от 40-60% и 80-100% захари спрямо контролата, включват съответно 25 и 23 проби, докато интервалът от 20-40% включва най-ниския брой от 11 изолата. По отношение на общото съдържание на феноли, най-голям брой от 69 проби показват умерено намаляване на общите феноли в RODW (60-80% от началните нива), докато най-нисък брой от 10 изолата е регистриран с най-силно изразен спад на фенолите (20-40% от началните нива на RODW). Интервалите от 40-60% и 80-100% феноли спрямо контролата са отчетени съответно при 42 и 18 изолата (фиг. 26).



Фигура 26. Разпределение на гъбните изолати и предизвиканото от тях изменение в количеството общите феноли в RODW средата след култивиране от 96h, представено в %

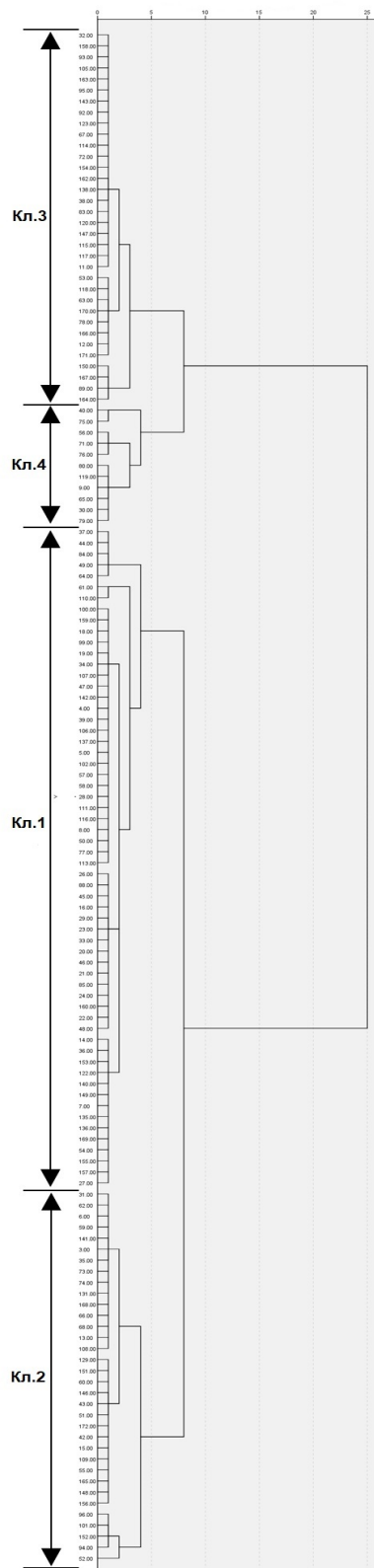


Фигура 27. Диаграма на разсейването (scatter plot) представящ резултатите от клъстерния анализ, извършен на базата на данните за съдържанието на захари и феноли при култивиране на изолатите в RODW за 96 часа, представени като % от началните им количества в средата.

Фигура 27 представя диаграма на разсейването (scatter plot) на тестваните 139 гъбни изолата на базата на данни за съдържанието на редуциращи захари и общи феноли представени в Таблица 21 при култивиране на изолатите в малък обем RODW за 96 часа. Допълнителен клъстерен анализ (Фиг. 28) с използване на комбинирани данни за съдържанието на редуциращи захари и общи феноли показва разпределяне пробите в 4 отделни клъстера, свързани с различните въздействия на ферментацията върху количеството на захари и феноли в RODW и обозначени на фигура 27 и фигура 28 като Кл.1, Кл.2, Кл.3 и Кл.4, включващи съответно 60, 34, 34 и 11 изолата. Фигура 29 представя средното съдържание на захари и феноли на RODW след ферментация за всеки клъстер, показани като процент от началните нива на RODW преди култивирането. Съответно, Кл.1 включва изолати с нисък капацитет за ферментация както на захарите, така и на фенолите в RODW. Изолатите от Кл.2 показват умерен капацитет за ферментация на RODW с понижаване на нивата на захари и феноли на RODW до $50 \pm 8\%$ и $61 \pm 6\%$ в края на ферментацията. И двете групи изолати от Кл.3 и Кл.4 демонстрират висока способност за ферментация на захари в RODW, с намаляване съответно до $11 \pm 5\%$ и $16 \pm 7\%$ от началните нива. Въпреки това, докато изолатите от Кл. 3 показват относително висок капацитет за фенолна ферментация/биооремедиация (спад до $44 \pm 8\%$ от първоначалното съдържание), ферментацията на RODW с изолати групирани в Кл.4 води до по-слабо понижение на общото ниво на фенолите на RODW, до $75 \pm 10\%$, което показва, че тези изолати ферментират преференциално захарите но не и фенолните съединения в RODW.

Проучването на данните за ферментацията според филогенетичната принадлежност на изследваните ендифитни гъбни изолати показва, че изолати

причислени към *Bipolaris* sp., *Botrytis* sp., *Septoria convolvuli* и *Stemphylium* sp. са групирани само в Кл.1, за който е характерен ограничен капацитет за ферментация на RODW (Табл. 21, фиг. 27). От друга страна, беше установено, че тестваните изолати на *Alternaria alternata* са свързани с четирите идентифицирани клъстера, което демонстрира широк диапазон на ферментационния капацитет на анализираните изолати от този вид. Последното е в съответствие с докладваната висока ферментационна и биотрансформационна способност на различни изолати на *Alternaria* sp (Eram et al. 2018; Lou et al. 2013), както и с докладваната в друго изследване висока степен на генетично вариране на ендوفитни изолати *Alternaria alternata*, получени от единични растителни видове (Guo et al. 2004). Също така, в настоящото изследване се наблюдават вариации на ферментационния капацитет и между изолати, принадлежащи към един и същ род, напр. тестваните представители на двата вида от род *Fusarium* - *F. oxysporum* и *F. chlamydosporum*. Докато всички изолати от род *Fusarium* показват висока способност за ферментация на захари в RODW, изолатът, причислен към *F. chlamydosporum*, е по-ефективен при ферментацията на феноли в RODW, в сравнение с умерената фенолна ферментационна способност на изолата на *F. oxysporum* (Табл. 21). По подобен начин, проведените експерименти показаха значителна разлика между ферментационния капацитет на тестваните изолати, включени в клъстерите „*Phoma herbarum*“ и „*Phoma* sp.“ (Фигура 24). Като се има предвид, че всички изолати на *Phoma herbarum* показват ниска способност да ферментират RODW и са групирани в Кл.1, двата изолата, причислени към *Phoma* sp. са разпределени в Кл.3 и Кл.4, които са свързани с висока способност за захарна и умерена до висока способност за фенолна ферментация на RODW. Данните за ферментацията на изследваните изолати *Cercospora* показват различен модел и са разпределени в Кл.1, Кл. 2 и Кл.3, но не и в Кл. 4, което показва вариации в тяхната способност да ферментират захарите в RODW и малък капацитет за ферментация на фенолите. Получените резултати показват голямо разнообразие в рамките на изследваната група ендوفитни гъби по отношение на способността им да ферментират RODW. Генерираните данни от проведените експерименти предлагат добра отправна точка за по-нататъшно тестване на различни подходи за ферментация и валоризация на RODW с участието на гъби. Резултатите показват също така, че първичното неселективно изолиране на по-голям брой ендوفитни гъбни изолати, последвано от изследване на тяхната ферментационна способност към специфични богати на феноли отпадни води или друг субстрат, е по-плодотворна стратегия в сравнение с директната селекция за отглеждане върху богата на феноли RODW среда, което не беше успешно в настоящото изследване.



Фигура 28. Дендрограма, конструирана на базата на клъстерен анализ на комбинирани данни за измереното количество редуциращи захари и общи феноли в средата след култивиране на изолатите в RODW за 96 часа. Имената на клъстерите означени на Фиг.3 са посочени със стрелки в дендрограмата. Номерата на отделните изолати съответстват на тези означени в Таблица 21.

Таблица 21. Списък на гъбните изолати, филогенетичната им принадлежност, растителните им източници и клъстерна принадлежност според потенциала им да ферментират захари и феноли в RODW

Ендофитен гъбен изолат	Растителен източник	Филогенетична принадлежност	Общи феноли спрямо RODW в края на култивирането (%)	Редуциращи захари спрямо RODW в края на култивирането (%)	Принадлежност към клъстер
EF3	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Cercospora sp.</i>	80	68	Кл.1
EF4	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Alternaria alternata</i>	88	91	Кл.1
EF5	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Alternaria alternata</i>	84	79	Кл.1
EF6	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Cercospora sp.</i>	77	75	Кл.1
EF7	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	91	97	Кл.1
EF8	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Alternaria alternata</i>	80	85	Кл.1
EF9	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Phoma sp.</i>	94	15	Кл.4
EF11	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Cercospora sp.</i>	42	20	Кл.3
EF12	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Alternaria alternata</i>	65	25	Кл.3
EF13	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	89	68	Кл.1
EF14	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Alternaria alternata</i>	82	95	Кл.1
EF15	<i>Leonurus cardiaca</i>	<i>Alternaria alternata</i>	71	61	Кл.2
EF16	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	95	95	Кл.1
EF18	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	95	83	Кл.1
EF19	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	97	83	Кл.1
EF20	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	98	99	Кл.1
EF21	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	100	100	Кл.1
EF22	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	99	100	Кл.1
EF23	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	99	96	Кл.1
EF24	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	100	100	Кл.1
EF26	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	98	107	Кл.1
EF27	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	84	103	Кл.1
EF28	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	79	83	Кл.1

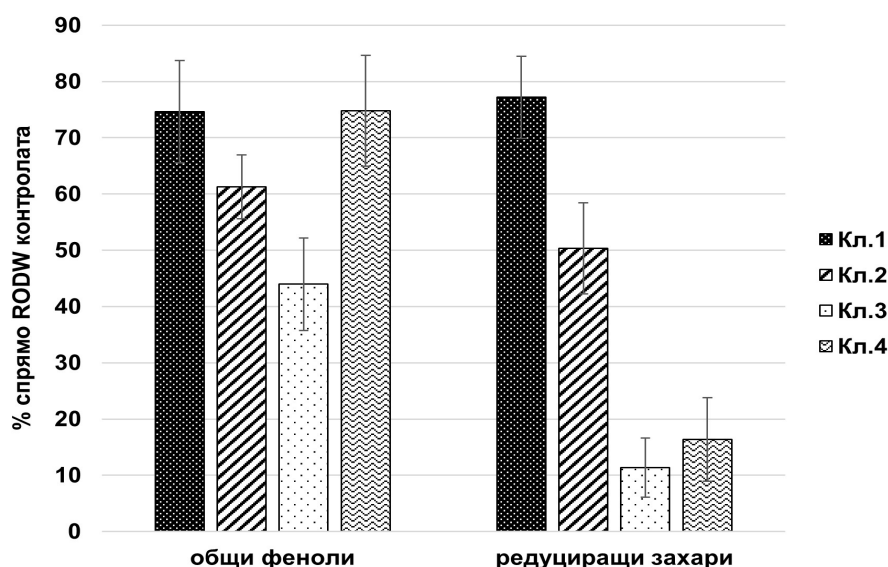
Ендифитен гъбен изолат	Растителен източник	Филогенетична принадлежност	Общи феноли спрямо RODW в края на култивирането (%)	Редуциращи захари спрямо RODW в края на култивирането (%)	Принадлежност към клъстер
EF29	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	95	96	Кл.1
EF30	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Phoma sp.</i>	88	12	Кл.4
EF31	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	76	75	Кл.1
EF32	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	61	10	Кл.3
EF33	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	99	94	Кл.1
EF34	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	85	87	Кл.1
EF35	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	81	70	Кл.1
EF36	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	80	94	Кл.1
EF37	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	100	100	Кл.1
EF38	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	48	15	Кл.3
EF39	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	88	93	Кл.1
EF40	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	100	32	Кл.4
EF42	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	67	60	Кл.2
EF43	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	78	46	Кл.2
EF45	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Septoria convolvuli</i>	100	100	Кл.1
EF46	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Septoria convolvuli</i>	97	99	Кл.1
EF47	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	92	93	Кл.1
EF48	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Cercospora sp.</i>	100	92	Кл.1
EF49	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100	100	Кл.1
EF50	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	80	86	Кл.1
EF51	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Cercospora sp.</i>	62	59	Кл.2
EF52	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Cercospora sp.</i>	53	56	Кл.2
EF53	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	60	29	Кл.3
EF54	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	88	100	Кл.1
EF55	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	70	67	Кл.2

Ендифитен гъбен изолат	Растителен източник	Филогенетична принадлежност	Общи феноли спрямо RODW в края на култивирането (%)	Редуциращи захари спрямо RODW в края на култивирането (%)	Принадлежност към клъстер
EF56	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	74	30	Кл.4
EF57	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	77	87	Кл.1
EF58	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Cercospora sp.</i>	74	88	Кл.1
EF59	<i>Althaea rosea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	75	69	Кл.1
EF60	<i>Althaea rosea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	74	55	Кл.2
EF62	<i>Althaea rosea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	76	75	Кл.1
EF63	<i>Althaea rosea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	58	23	Кл.3
EF66	<i>Althaea rosea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	90	67	Кл.1
EF67	<i>Althaea rosea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	56	11	Кл.3
EF68	<i>Althaea rosea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	90	68	Кл.1
EF69	<i>Althaea rosea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100	57	Кл.1
EF70	<i>Althaea rosea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100	78	Кл.1
EF71	<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	74	29	Кл.4
EF72	<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	54	11	Кл.3
EF73	<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	87	61	Кл.1
EF74	<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	82	59	Кл.1
EF75	<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100	24	Кл.4
EF76	<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	85	30	Кл.4
EF77	<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	82	88	Кл.1
EF78	<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	64	18	Кл.3
EF79	<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	84	18	Кл.4
EF80	<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	94	9	Кл.4
EF81	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	100	100	Кл.1
EF83	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Phoma herbarum</i>	51	16	Кл.3
EF84	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Phoma herbarum</i>	100	100	Кл.1

Ендифитен гъбен изолат	Растителен източник	Филогенетична принадлежност	Общи феноли спрямо RODW в края на култивирането (%)	Редуциращи захари спрямо RODW в края на култивирането (%)	Принадлежност към клъстер
EF85	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Phoma herbarum</i>	100	98	Кл.1
EF88	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Phoma herbarum</i>	99	100	Кл.1
EF89	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	37	8	Кл.3
EF92	<i>Mentha piperita</i>	<i>Alternaria alternata</i>	52	6	Кл.3
EF93	<i>Mentha piperita</i>	<i>Alternaria alternata</i>	62	8	Кл.3
EF94	<i>Mentha piperita</i>	<i>Alternaria alternata</i>	55	36	Кл.2
EF95	<i>Mentha piperita</i>	<i>Alternaria alternata</i>	58	16	Кл.3
EF96	<i>Mentha piperita</i>	<i>Alternaria alternata</i>	66	39	Кл.2
EF99	<i>Thymus sp.</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	93	83	Кл.1
EF100	<i>Thymus sp.</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	93	79	Кл.1
EF101	<i>Thymus sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	68	39	Кл.2
EF102	<i>Thymus sp.</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	87	80	Кл.1
EF105	<i>Thymus sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	61	8	Кл.3
EF106	<i>Thymus sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	87	83	Кл.1
EF107	<i>Thymus sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	86	89	Кл.1
EF108	<i>Thymus sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	86	68	Кл.1
EF109	<i>Thymus sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	73	60	Кл.2
EF110	<i>Thymus sp.</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	65	97	Кл.1
EF111	<i>Thymus sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	78	83	Кл.1
EF113	<i>Thymus sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	81	87	Кл.1
EF114	<i>Valeriana officinalis</i>	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	57	11	Кл.3
EF115	<i>Valeriana officinalis</i>	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	44	12	Кл.3
EF116	<i>Valeriana officinalis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	80	82	Кл.1
EF117	<i>Valeriana officinalis</i>	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	49	10	Кл.3
EF118	<i>Valeriana officinalis</i>	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	58	27	Кл.3

Ендофитен гъбен изолат	Растителен източник	Филогенетична принадлежност	Общи феноли спрямо RODW в края на култивирането (%)	Редуциращи захари спрямо RODW в края на култивирането (%)	Принадлежност към клъстер
EF119	<i>Valeriana officinalis</i>	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	95	8	Кл.4
EF120	<i>Valeriana officinalis</i>	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	47	10	Кл.3
EF122	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Alternaria alternata</i>	90	100	Кл.1
EF123	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Alternaria alternata</i>	51	8	Кл.3
EF129	<i>Levisticum officinale</i>	<i>Alternaria alternata</i>	77	53	Кл.2
EF131	<i>Levisticum officinale</i>	<i>Alternaria alternata</i>	86	74	Кл.1
EF135	<i>Levisticum officinale</i>	<i>Alternaria alternata</i>	92	100	Кл.1
EF136	<i>Levisticum officinale</i>	<i>Alternaria alternata</i>	86	98	Кл.1
EF137	<i>Echinacea sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	85	83	Кл.1
EF138	<i>Echinacea sp.</i>	<i>Colletotrichum sp.</i>	68	10	Кл.3
EF140	<i>Echinacea sp.</i>	<i>Colletotrichum sp.</i>	92	100	Кл.1
EF141	<i>Echinacea sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	76	70	Кл.1
EF142	<i>Echinacea sp.</i>	<i>Bipolaris sp.</i>	91	94	Кл.1
EF143	<i>Tanacetum vulgare</i>	<i>Alternaria alternata</i>	59	14	Кл.3
EF146	<i>Tanacetum vulgare</i>	<i>Alternaria alternata</i>	72	52	Кл.2
EF147	<i>Centranthus ruber</i>	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	45	10	Кл.3
EF148	<i>Centranthus ruber</i>	<i>Cercospora sp.</i>	72	65	Кл.2
EF149	<i>Centranthus ruber</i>	<i>Stemphylium sp.</i>	87	100	Кл.1
EF150	<i>Centranthus ruber</i>	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	37	14	Кл.3
EF151	<i>Centranthus ruber</i>	<i>Alternaria alternata</i>	76	52	Кл.2
EF152	<i>Centranthus ruber</i>	<i>Alternaria alternata</i>	62	49	Кл.2
EF153	<i>Centranthus ruber</i>	<i>Alternaria alternata</i>	75	99	Кл.1
EF154	<i>Centranthus ruber</i>	<i>Alternaria alternata</i>	54	10	Кл.3
EF155	<i>Centranthus ruber</i>	<i>Stemphylium sp.</i>	88	100	Кл.1
EF156	<i>Glaucium flavum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	73	67	Кл.2

Ендифтен гъбен изолат	Растителен източник	Филогенетична принадлежност	Общи феноли спрямо RODW в края на култивирането (%)	Редуциращи захари спрямо RODW в края на култивирането (%)	Принадлежност към клъстер
EF157	<i>Glaucium flavum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	89	100	Кл.1
EF158	<i>Glaucium flavum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	61	10	Кл.3
EF159	<i>Glaucium flavum</i>	<i>Bipolaris sp.</i>	93	77	Кл.1
EF160	<i>Glaucium flavum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	100	100	Кл.1
EF162	<i>Glaucium flavum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	54	8	Кл.3
EF163	<i>Glaucium flavum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	59	7	Кл.3
EF164	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	26	5	Кл.3
EF165	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Alternaria alternata</i>	68	68	Кл.2
EF166	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Alternaria alternata</i>	63	20	Кл.3
EF167	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Phomopsis sp.</i>	33	12	Кл.3
EF168	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	87	73	Кл.1
EF169	<i>Geranium macrorrhizum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	86	100	Кл.1
EF170	<i>Geranium macrorrhizum</i>	<i>Phomopsis sp.</i>	62	23	Кл.3
EF171	<i>Geranium macrorrhizum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	67	23	Кл.3
EF172	<i>Geranium macrorrhizum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	64	62	Кл.2



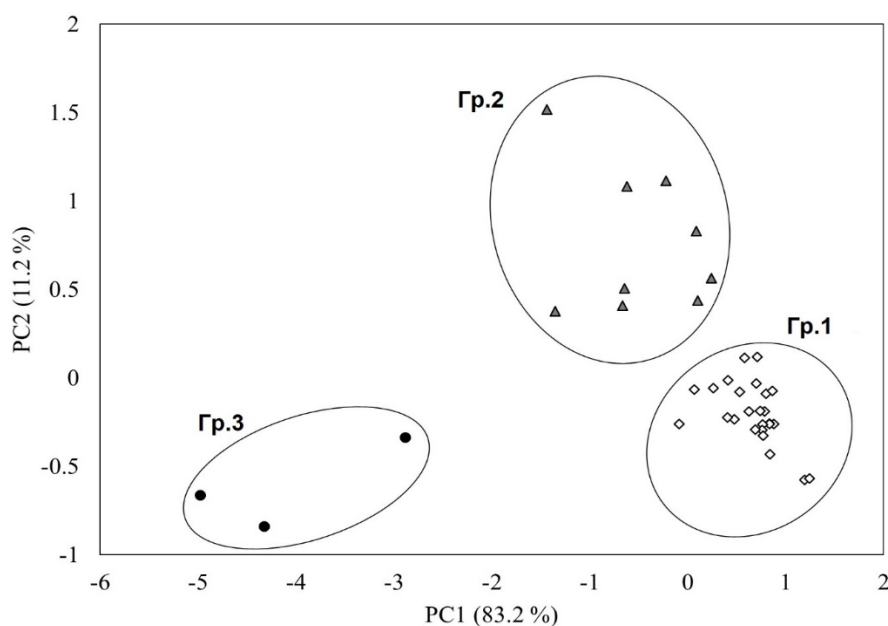
Фигура 29. Средно съдържание на редуциращи захари и общи феноли за подгрупите ендوفитни гъбни изолати, принадлежащи към клъстерите, означени на фигура 3. Съдържанието на захари и феноли е измерено в края на ферментациите и е представено като % от първоначалното съдържание в RODW

4.2.1. Динамика на захарната и фенолна ферментация в RODW под въздействието на селектирани ендوفитни гъбни изолати

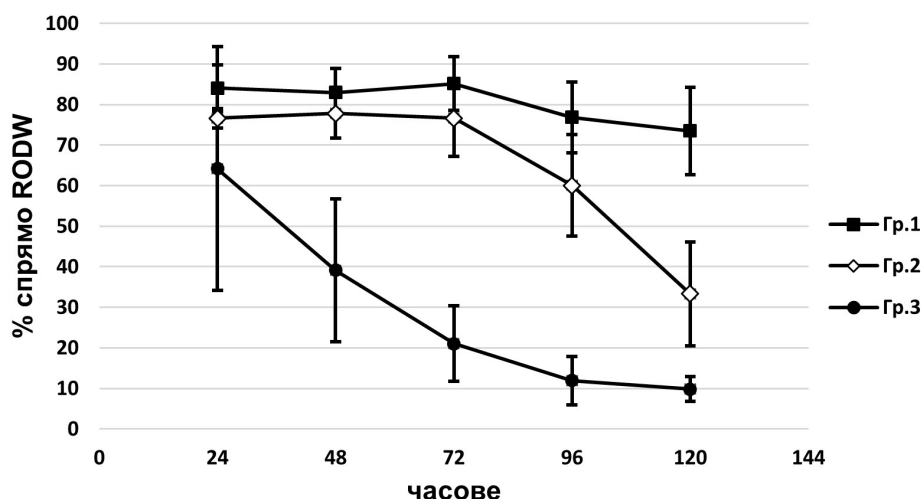
Влиянието на ферментацията на RODW с ендوفитни гъби върху съдържанието на захари и феноли беше оценено допълнително в по-голям обем на културите (100 mL), като за култивиране в колби на клатчка бяха избрани 37 изолата. От тях, 35 изолата (принадлежащи към Кл.3 и Кл.4) показват висока степен на изчерпване съдържанието на захари, а други 2 изолата (Кл.2) показват умерена степен на изчерпване на захарното съдържание след култивиране за 96 часа в култури с малък обем (5 mL) RODW среда. Избраните изолати бяха култивирани за период от 120 часа, като съдържанието на захари и феноли беше измервано на всеки 24 часа. Получените данни за динамиката на захарната и фенолната ферментация бяха подложени на анализ на главните компоненти (PCA), в резултат на който бяха идентифицирани три отделни групи - Група 1, Група 2 и Група 3, състоящи се съответно от 25, 9 и 3 изолата (Фигура 30). Средните стойности за динамиката на ферментацията на захари и феноли от членовете на всяка от идентифицираните групи са представени на фигури 31 и 32. Както може да се види от фигура 31, ферментацията на RODW при трите групи е показала относително бързо намаляване на съдържанието на захари по време на първите 24 часа, съответно до 84%, 77% и 64% за Гр.1, Гр.2 и Гр.3. Периодът след това ясно отделя културите от Гр.3, които продължават с високата степен на ферментация на захари, като изчерпват почти изцяло съдържанието им в RODW към края на култивирането. За разлика от това, след първоначалния двадесет и четири часов период на относително бърза захарна

ферментация, културите от Гр.1 и Гр.2 не показват значителни промени в общото съдържание на захари по време на следващите 24-72 часа култивиране. След това и двете групи показват повишена скорост на изчерпване на съдържанието на захари, като тя е по-висока за изолатите от Гр.2 (Фигура 31).

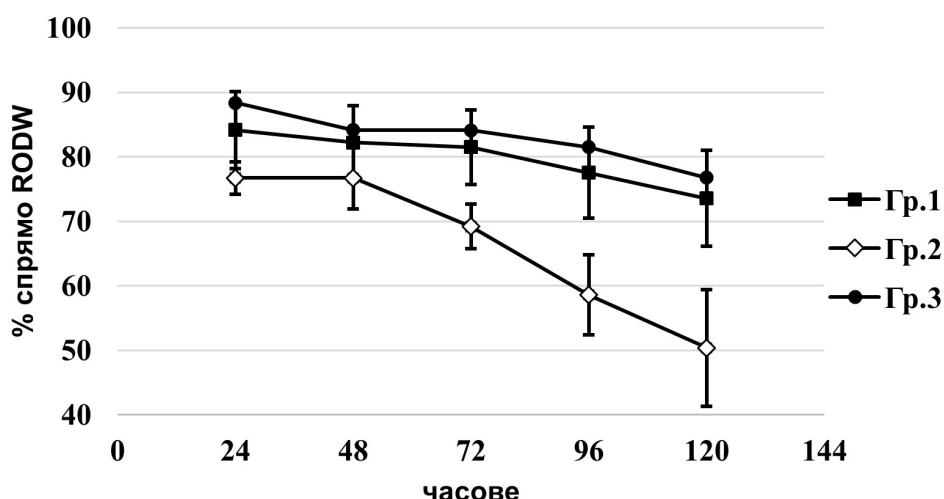
По отношение на изменението на съдържанието на фенолите по време на ферментацията, Гр.1 и Гр.3 показват сходно поведение на относително постепенно намаляване на общото съдържание на феноли до 73% - 76% от първоначалното им съдържание в RODW до края на култивирането. В същото време, изолатите от Гр.2 показват непрекъснато висока степен на фенолна ферментация, водеща до намаляване на фенолните количества до 50% от първоначалното съдържание на RODW (Фигура 32). Резултатите от тази част на изследването показват, че освен разнообразието на изпитваните изолати по отношение на цялостната им способност да ферментират захарите и фенолите в RODW, има и значителни разлики в динамиката на процеса. Тези характеристики трябва да се взимат под внимание при разработването на стратегия и оптимизация на ферментационните процеси, включващи ендофитна гъбна ферментация и целящи обработка и валоризация на RODW.



Фигура 30. Анализ на главните компоненти (PCA) базиран на данните за динамиката на ферментацията на захари и феноли при култивиране на гъбните изолати 100 mL RODW среда за 120 часа. Изолатите със сходен модел на ферментация са означени по групи.



Фигура 31. Динамика на промените в количеството редуциращи захари по време на ферментацията на RODW в колби с избраните гъбни изолати. Средните стойности за всяка група са определени след проведения анализ на главните компоненти, показан на Фиг 30.



Фигура 32. Динамика на промените в количеството общи феноли по време на ферментацията на RODW в колби с избраните гъбни изолати. Средните стойности за всяка група са определени след проведения анализ на главните компоненти, показан на Фиг 30.

4.3. Влияние на ферментацията с ендоефитни гъби върху фенолния профил на RODW

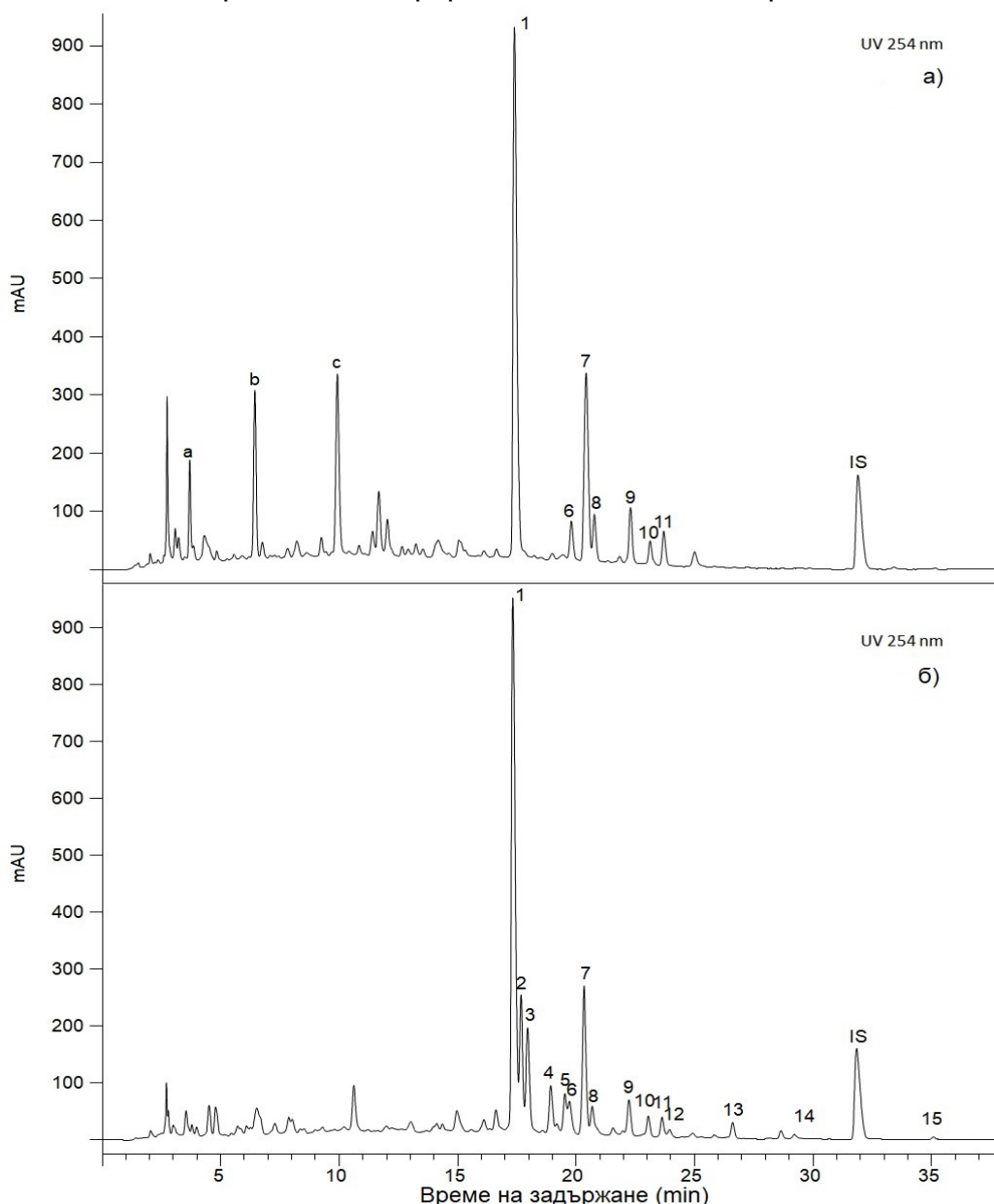
Успешното култивиране на определени микроорганизми в отпадни води без необходимост от корекция на състава и pH на водите, както и възможността за произвеждане на ценни биоактивни съединения вследствие жизнената дейност на микроорганизмите са ключови фактори, определящи потенциала на микроорганизмите за промишлено приложение в процеси на ферментация с цел валоризация на отпадни води. В тази връзка, възможността за насочена промяна

във фенолния състав на RODW чрез ферментация с определени ендифитни гъбни изолати и генерирането на ценни биоактивни съединения чрез биотрансформация и / или биосинтеза, би била фактор, определящ потенциала за промишлено приложение на ферментацията с гъби при валоризация на RODW. За оценяване на настъпилите промени във фенолния профил на RODW средата след култивиране в колби на 37 избрани ендифитни гъбни изолата, получени от културалната среда фенолни екстракти бяха подложени на HPLC-UV анализ.

При сравнение на хроматограмите, получени от фенолни екстракти от RODW след ферментация с ендифитни гъби и контролен фенолен екстракт от RODW, се наблюдават два основни вида изменения в профила на фенолните съединения. Първият вид изменения се състои в промени на относителното количество на част от фенолните съединения в RODW, което се изразява в изчерпване на захарните остатъци на определени фенолни гликозиди, често съпроводено с увеличаване на относителното количество на съответните агликони в анализирания екстракт. Вторият тип изменения се състои в биосинтеза на значително количество нови съединения с UV абсорбция, повечето от които са специфични за конкретния ендифитен гъбен изолат, използван за ферментация на RODW. Точната и подробна идентификация на новите съединения изисква по-нататъшно прилагане на допълнителен набор от аналитични методи. Промените, свързани с биосинтез на нови съединения в RODW са демонстрирани на хроматограмите на фигура 33.

Промислената дестилация на розово масло от цветовете на *Rosa damascena* се основава на сортове рози с ограничено генетично разнообразие (Rusanov et al. 2005), притежаващи розов цвят със сходен състав на съдържащите се в него летливи съединения (Rusanov et al. 2012). Наред с това, при производството на етерични масла се следват много сходни традиционни практики и технологии (Kovacheva et al. 2010; Rusanov et al. 2011). Като резултат, индустрията за производство на розово масло освобождава големи количества богати на феноли RODW с много сходен състав и параметри. Въпреки успешно проведената екстракция на феноли от RODW и докладваните биологични активности на получените от RODW фенолни екстракти (Wedler et al. 2016a; Wedler et al. 2016b; Solimine et al. 2016), потенциалът за валоризация на фенолните съединения в RODW остава все още неизползван. Резултатите от настоящото изследване откриват нов път за валоризация на RODW и подобни на нея богати на феноли отпадни води от агропромишлеността. Демонстрираното голямо разнообразие между тестваните ендифитни гъбни изолати по отношение на тяхната способност за ферментация на захари и фенолни съединения в RODW, както и динамиката на ферментационния процес, ги прави ценен инструмент за насочена модификация на състава на RODW. Като се имат предвид наличните големи количества RODW и възможностите за извършване на ендифитна гъбна ферментация в големи обеми на RODW при сравнително ниска цена, резултатите от настоящото изследване предлагат генериране на широк спектър от фенолни екстракти на RODW, които се

различават по състав и възможно приложение. От друга страна, наблюдаваната висока степен и сложност на промените във фенолния профил на RODW, след ендифитна гъбна ферментация, показва необходимостта от прилагане на адекватни експериментални подходи и методи за задълбочена оценка и характеризиране на биологичните активности на фенолните екстракти от ферментирала RODW, което понастоящем е основна пречка за широко приложение на ендифитна гъбна ферментация с цел валоризация на RODW.



Фигура 33. HPLC-UV хроматограми на а) фенолен екстракт от RODW след 120 часа ферментация с изолат EF123 (*Alternaria alternata*) и б) фенолен екстракт от RODW без култивиране с гъби. (1) Елагова киселина; (2) Хиперозид; (3) Изокверцитрин; (4) Кемпферол-3-О-рутинозид; (5) Кемпферол-3-О-галактозид; (6) Кверцетин-О-метил дизахарид; (7) Астрагалин; (8) Кверцитрин; (9) Кемпферол-3-О-ксилозид; (10) Мултифлорин В; (11) Кемпферол-3-О-арабинозид; (12) Кемпферол-3-О-рамнозид; (13) Мултифлорин А; (14) Кверцетин; (15) Кемпферол; (а), (b) и (с) неидентифицирани съединения отчетени след ферментация, IS-вътрешен стандарт (TBHQ)

5. Ферментация на RODW от гъбен щам *Trichoderma asperellum* SL-45.

Населяващите почвите гъби от род *Trichoderma* са известни с широк обхват на промишлени приложения. Едно от тях е използването им в органичното земеделие, тъй като редица представители на рода проявяват стимулиращо влияние върху растежа на културните растения и имат защитен ефект срещу растителни патогени (Błaszczuk et al. 2014; Waghunde et al. 2016).

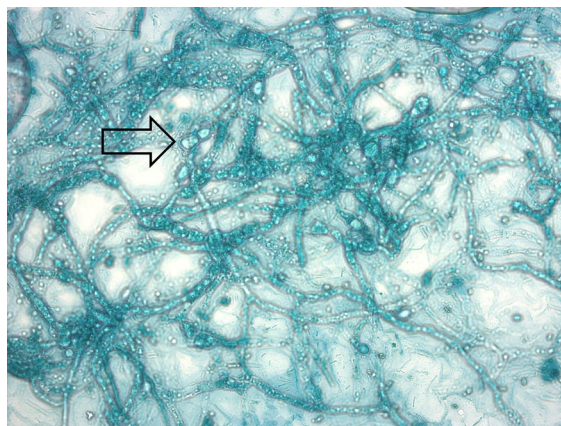
Trichoderma asperellum SL-45 е ризосферен микромикетен щам, широко изследван поради доказаната му способност за синтез и отделяне на ксиланази и целулази с потенциално приложение в хартиената промишленост (Badalova 2017; Evstatieva et al. 2013; Velichkova et al. 2014). Освен това, *T. asperellum* SL-45 синтезира подобни на фитохормони метаболити, за които е доказано, че влияят положително върху растежа на няколко вида растения, включително *Cyclamen persicum*, *Chrysanthemum grandiflorum* и *Euphorbia pulcherrima*. Стимулиращият ефект на течни култури на *T. asperellum* SL-45 върху растежа на растенията ги прави подходящи за приложение като течен микробен тор (Badalova 2017). Въпреки че *T. asperellum* SL-45 притежава редица желани характеристики с потенциални промишлени приложения, всички предишни проучвания, проведени с изолати в течни култури, включват използването на оптимизирани течни среди като средата на Mandel (Badalova 2017). Предшествващи проучвания успешно демонстрират култивирането на щамове и изолати от вида *T. asperellum* (с предишно наименование *T. viride*), използвайки редица различни течни и твърди отпадни продукти (Emerson and Mikunthan 2015; Bai et al. 2008; Ahuja and Bhatt 2018; Govindan et al. 2017).

Тази част от дисертационната работа представя изследване на потенциала за използване на RODW като източник на евтина течна среда за култивиране на *T. asperellum* SL-45. За целта, беше проведено култивиране на щам в течна RODW среда, успоредно с два изолата от ендифитни гъби, представляващи съответно *Phoma* sp. и *Fusarium chlamydosporum*, за които е установено, че асимилират в значителна степен захарите в RODW (т.4.1., табл.21). За оценяване на растежа на гъбните щамове беше проследена промяната в съдържанието на редуциращи захари и общи феноли в култивационната среда.

5.1. Култивиране на гъбен щам *T. asperellum* SL-45 и ендифитни гъбни изолати E119 (*Fusarium chlamydosporum*) и E30 (*Phoma* sp.) в течна RODW среда

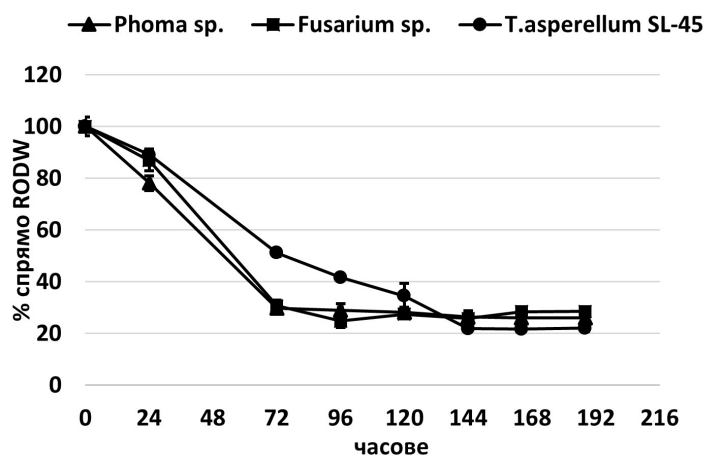
Способността на *T. asperellum* SL-45 да се развива в колби съдържащи 100 mL течна RODW среда на клатка без корекция на pH, беше проследена за период от 188 часа успоредно с два контролни ендифитни гъбни изолата - E119 (*Fusarium chlamydosporum*) и E30 (*Phoma* sp.). Микроскопското наблюдение на проба от мицел на тествания щам *T. asperellum* SL-45 след 140 часа култивиране (Фиг. 34) показва неговото успешно нарастване и развитие в RODW средата, съпроводено с формиране на вегетативни спори, което е индикация за добра

адаптираност на щамата към RODW средата. Подобен тип безполово спорообразуване в мицела на *T. asperellum* SL-45 е наблюдавано и при култивиране в оптимизирана среда на Mandel (Badalova 2017).



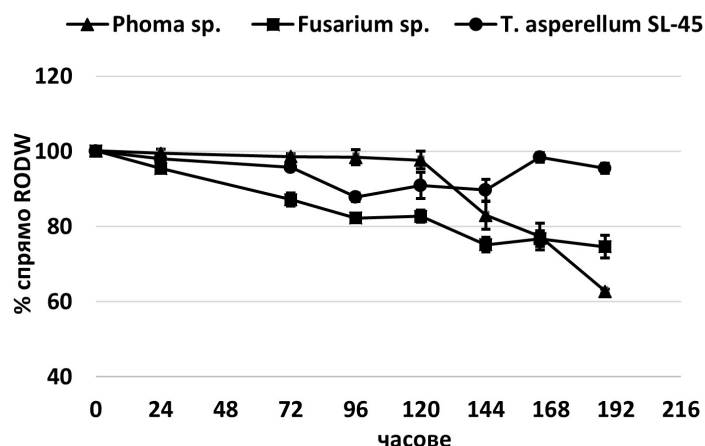
Фигура 34. Безполово спорулиране на *Trichoderma asperellum* SL-45 в RODW среда. Стрелката показва вегетативни спори, образувани в мицела на гъбния щам.

С цел проследяване на развитието на култивираните щамове за период от 188 часа, на всеки 24 часа беше измерено количеството на редуциращи захари в RODW средата. Двата контролни ендифитни изолата Е30 и Е119, показаха по-бързо асимилиране на редуциращите захари в RODW, като след култивиране в продължение на 72 часа, при тях беше отчетен спад до стабилно ниво от около 30% от началното количество захари в RODW (Фиг. 35). За разлика от тях, щамът *Trichoderma asperellum* SL-45 демонстрира по-бавен растеж, като значителен и стабилен спад в нивото на захарите беше отчетен едва след 144 часа култивиране, а асимилирането на захарите достига до 20% от началното им количество в средата.



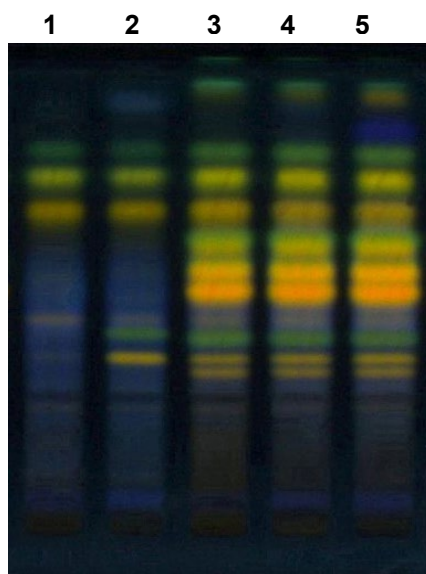
Фигура 35. Динамика на съдържанието на редуциращи захари в RODW средата по време на култивиране на гъбен щам *T. asperellum* SL-45 и два ендифитни гъбни изолата- *Phoma* sp. (E30) и *Fusarium* sp. (E119)

По отношение на изменението на количеството общи феноли в RODW по време на култивационния период, и двата ендифитни изолата показаха намаляване на съдържанието на общи феноли, което е индикация за възможна асимилация и биотрансформация на различни фенолни съединения (Фиг. 36). За разлика от тях, тестваният щам *T. asperellum* SL-45 показва незначителна промяна спрямо началното количество общи феноли, което е индикация, че култивирането на му не е свързано с асимилиране на фенолите в RODW.



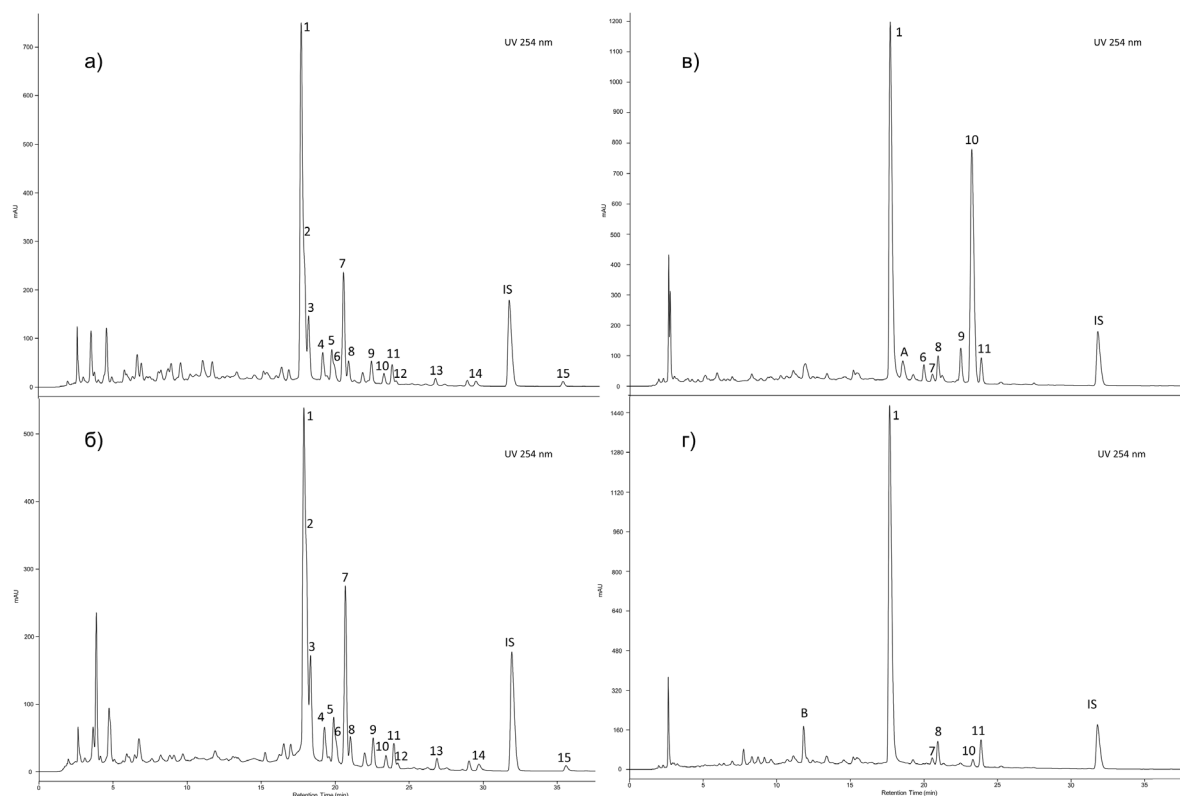
Фигура 36. Динамика на съдържанието на общи феноли в RODW средата по време на култивиране на гъбен щам *T. asperellum* SL-45 и два ендифитни гъбни изолата - *Phoma* sp. (E30) и *Fusarium chlamydosporum*. (E119)

5.2. Характеризиране и сравнение на фенолното съдържание на екстракти от RODW среда след култивиране на гъбен щам *T. asperellum* SL-45 и ендифитните гъбни изолати E30 (*Phoma* sp.) и E119 (*Fusarium chlamydosporum*)



Фигура 37. HPTLC анализ на екстракти от RODW среда, получени след култивиране на различни видове гъби. 1 - *Phoma* sp. (E30), 2 - *Fusarium chlamydosporum*. (E119), 3 и 4 - *T. asperellum* SL-45, 5 – екстракт от контролна RODW среда

За анализиране на промените във фенолния състав на RODW средата след култивиране с тестваните микроорганизми за 188 часа, беше проведен HPTLC анализ на фенолни екстракти от хранителната сред. В сравнение с контролния екстракт от RODW среда без култивиране на гъби (Фиг. 37, ред 5), фенолните екстракти, получени от RODW среда, след култивиране на изолатите от *Phoma* sp. и *Fusarium chlamydosporum* показаха значителни промени в наблюдаваните HPTLC профили (Фиг. 37, редове 1 и 2). Това е индикация за асимиляция/биотрансформация на фенолните съединения съдържащи се в RODW от страна на двата контролни изолата. За разлика от тях, фенолните екстракти на RODW след 188 h от култивирането на *T. asperellum* SL-45 (Фиг. 37, редове 3 и 4) показват идентичен на контролния HPTLC профил (Фиг. 37, ред 5), което показва ограничена способност на щама за усвояване на фенолните съединения присъстващи в състава на RODW.



Фигура 38. HPLC/UV хроматограми на екстракти от RODW среда а) Ферментация с *T. asperellum* SL-45. б) Контролна RODW среда без ферментация, в) Ферментация с *Fusarium chlamydosporum* (E119), г) Ферментация с *Phoma* sp. (E30). 1- Елагова киселина, 2- Хиперозид, 3- Изокверцитрин, 4- Кемпферол-3-О-рутинозид, 5- Кемпферол-3-О-галактозид, 6- Кверцетин-О-метил-дизахарид, 7- Астрагалин, 8- Кверцитрин, 9- Кемпферол-3-О-ксилозид, 10- Мултифлорин В, 11- Кемпферол -3-О-арабинозид, 12- Кемпферол-3-О-рамнозид, 13- Мултифлорин А, 14- Кверцетин, 15- Кемпферол, IS- вътрешен стандарт, А и В – новосинтезирани съединения

С цел по-детайлно анализиране на промените във фенолния състав на RODW средата вследствие на култивирането на изследваните гъби, фенолни екстракти от култивационната среда на трите гъбни щама бяха подложени на HPLC / UV анализ. Резултатите от анализа показват, че в сравнение с

контролната среда без ферментация с гъби (фиг. 38 б), култивирането на *T. asperellum* SL-45 в течна RODW среда за период от 188 часа не води до значителни промени в състава на фенолните ѝ съединения (фиг. 38 а). Същевременно, култивирането на контролните изолати E119 (*Fusarium chlamydosporum*) и E30 (*Phoma* sp.) води до съществени промени в състава на фенолите в RODW, включващи както промени в относителното съдържание на редица фенолни съединения присъстващи в RODW, така и синтез и наличие на нови съединения които не присъстват в изходната RODW (Фиг. 38 в, г).

Резултатите от ферментацията на RODW с щама *T. asperellum* SL-45 предполагат, че той може ефективно да се използва за производство на гъбна биомаса успоредно с екстракцията на фенолни съединения от RODW. Липсата на значителни промени във фенолния състав на RODW е предпоставка за възможното включване на ферментацията с *T. asperellum* SL-45 като междинна стъпка преди екстракция на феноли от RODW с помощта на адсорбентна смола SP207. От друга страна, екстракцията на феноли от RODW с помощта на адсорбция и десорбция с адсорбентна смола SP207 води до по-малко от 20% намаляване на съдържанието на захар в обработената RODW, което прави възможно ферментацията с *T. asperellum* SL-45 да бъде извършено и като последна стъпка, след екстракцията на фенолните съединения от RODW.

Успешното разширяване на екстракцията на феноли от RODW до полупромишлен мащаб предполага, че и двете възможности за въвеждане на ферментационната стъпка с *T. asperellum* SL-45 са осъществими и заслужават да бъдат тествани в полупромишлен мащаб на обемите RODW в последващо проучване.

Резултатите от проведените експерименти показват, че *T. asperellum* SL-45 може успешно да се култивира в течна RODW среда без необходимост от коригиране на параметрите и състава на RODW. Ферментацията на *T. asperellum* SL-45 не променя съществено състава на биологично активните фенолни съединения в RODW. Резултатите от проведените експерименти предполагат, че ферментацията на RODW с *T. asperellum* SL-45 може ефективно да се прилага с цел производството на гъбна биомаса от *T. asperellum* SL-45 с ниска себестойност, паралелно на процеса на екстракция на фенолни съединения от RODW с помощта на адсорбентна смола SP207.

ИЗВОДИ

1. Екстракцията на фенолни съединения от RODW с помощта на адсорбентни смоли е значително по-ефективна спрямо използването на течно-течна екстракция, като от изпитаните 13 адсорбентни смоли при използване на смола SP207 беше установена най-ефективна екстракция и съответно най-висок добив на фенолни съединения след обработка на RODW.
2. Десорбцията с 90 % етанол на фенолни съединения от RODW адсорбирани върху смола SP207 е по-ефективна и води до получаване на по-високи добиви на фенолни съединения спрямо десорбцията с 90% метанол
3. Последователната десорбция с 20% и 90% етанол не води до съществено намаляване на захарите в получения екстракт и преимуществено обогатяване на екстракта с фенолни съединения, спрямо използването само на 90% етанол за десорбция
4. Адсорбентната смола SP207 може да бъде използвана за многократни цикли на адсорбция и десорбция без необходимост от междинни етапи на регенерация
5. Използването на адсорбентна смола SP207 за екстракция на фенолни съединения от RODW води до успешната екстракция на всички основни фенолни съединения идентифицирани в RODW
6. Фенолните съединения влизащи в състава на RODW и полученият от нея екстракт са представени основно от флавоноли на основата на кемпферол и кверцетин, елагова киселина и фенилетил-глюкопиранозид
7. Ранната ферментация на RODW протича с участието на ендифитни аборигенни дрожди от родовете *Cyberlindnera* и *Pichia*, които присъстват в розовия цвят още преди дестилацията на розово масло
8. Ферментацията на RODW с аборигенни дрожди води до редуциране на съдържанието на фенолни съединения (ефект на биоремедиация), както и до биотрансформация дължаща се основно на консумиране на захарната компонента на фенолните гликозиди без отчитането на нови съединения получени в резултат на ферментацията
9. Аборигенните дрожди изолирани от RODW показват значително по-висок капацитет за култивиране в RODW и промяна на нейния фенолен състав, спрямо индустриално използвани видове дрожди от колекцията на НБПМКК, част от които се развиват успешно на среди богати на фенолни съединения
10. Лечебни и ароматни растения могат да бъдат използвани като богат източник на ендифитни гъби, като в резултат на проведените експерименти са изолирани 139 изолата след *in vitro* култивиране на листни експлантати от 20 медицински и етерично-маслени растения
11. Филогенетичният анализ на основа на ITS последователностите, получени от изолатите, ги групира в 16 отделни клъстера, които се доближават до

известни щамове на *Alternaria alternata*, *Alternaria sp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Bipolaris sp.*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium sp.*, *Phoma sp.*, *Phomopsis sp.*, *Septoria sp.*, *Stemphylium sp.*

12. RODW може да бъде използвана успешно като среда за култивиране на ендофитни гъби изолирани от лечебни и ароматни растения като ферментацията ѝ под въздействието на използваните изолати води до биотрансформация на фенолните съединения в RODW, изразяваща се, както в промяна на техните относителни количества, така и в синтез на нови съединения
13. Ферментацията на RODW с аборигенни дрожди и ендофитни гъби може да бъде използвана за целенасочена промяна на фенолния профил на получения екстракт с цел разширяване на неговото приложение, дължащо се на потенциална промяна в биологичната му активност
14. RODW може да бъде успешно използвана за култивиране на *Trichoderma asperellum SL-45*, като протичащата ферментация не води до промяна на фенолния профил на получения екстракт от RODW след нейното приключване и може да бъде използвана като допълваща стъпка към екстракцията на фенолни съединения

ПРИНОСИ

1. Разработен е метод за екстракция на фенолни съединения от отпадна вода, получена след промишлена дестилация на розово масло (RODW) чрез адсорбция/десорбция с адсорбентна смола SP207, позволяваща извличане на 80-90 % от съдържащите се в нея полифеноли.
2. Проучено е биоразнообразието на аборигенни дрожди, отговорни за ранната ферментация на RODW. Изолирани и характеризирани са аборигенни щамове дрожди *Cyberlindnera sp.* с висок темп на растеж в RODW.
3. Проучен е ефектът на ферментацията на аборигенни щамове на RODW върху състава на фенолните съединения. Демонстрирана е възможността за използване на ферментацията с аборигенни дрожди за насочено модифициране на състава на фенолите в RODW преди тяхната екстракция и следваща преработка.
4. Проучен е ефектът на ферментацията на RODW от ендофитни гъби изолирани от лечебни и ароматни растения. Демонстриран е потенциалът за модифициране на състава и биосинтез на нови съединения чрез ферментация на RODW с тествани изолати от ендофитните гъби.

УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Rusanova M**, Rusanov K, Butterweck V, Atanassov V (2015) Assessment the capacity of indigenous and common yeast for biotransformation of phenolics in industrial rose oil distillation wastewater. 2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf (ICNPU 2015), Plovdiv, Bulgaria, 14-17 October 2015 - постер
2. **Rusanova M**, Rusanov K, Butterweck V, Atanassov V (2015) Biotransformation of rose oil distillation wastewater phenolics by endophytic fungi isolated from medicinal plants. 2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf (ICNPU 2015), Plovdiv, Bulgaria, 14-17 October 2015 - постер

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ, ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Работата по проекто-дисертационния труд е извършена в рамките на проекти:

1. “Оползотворяване на биологично активни вещества от отпадни води от индустриално производство на розово масло“, финансиран от Swiss National Science Foundation (SNF) - **проект № IZEBZ0_143110/1** и Министерство на Образованието и Науката на България – **проект № D02–1148** в рамките на Българо-Швейцарска програма за сътрудничество (2011-2016 г.).
2. Център за компетентност: **BG05M2OP001-1.002-0012-C01** „Устойчиво оползотворяване на био-ресурси и отпадъци от лечебни и ароматични растения за иновативни биоактивни продукти“ (2018-2023 г.)

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Rusanov K, Garo E, **Rusanova M**, Fertig O, Hamburger M, Atanassov I, Butterweck V (2014) Recovery of polyphenols from rose oil distillation wastewater using adsorption resins – a pilot study. *Planta Medica* 80 (17):1657-1664
2. **Rusanova M**, Rusanov K, Butterweck V, Atanassov A (2019) Exploring the capacity of endophytic fungi isolated from medicinal plants for fermentation and phenolics biotransformation of rose oil distillation wastewater. *Biotechnol Biotec Eq* 33 (1) 651-663
3. **Rusanova M**, Rusanov K, Momchilova S, Zagorcheva T, Evstatieva Y, Nikolova D, Atanassov I (2019). Assessment the fermentation of rose oil distillation wastewater (RODW) by *Trichoderma asperellum* SL-45 as additional step for fungal biomass production, to the RODW phenolics extraction. *Annual of Sofia University, Faculty of Biology, Book 4 - Scientific sessions of Faculty of Biology, volume 104*, pp. 52-61

БЛАГОДАРНОСТИ

Бих искала да благодаря сърдечно на всички мои колеги от Агробииоинститут за подкрепата и отзивчивостта както през периода на работа по дисертацията, така и през целия период на работата ми в института.

Благодаря на групата по Молекулярна генетика за съдействието и помощта в работата ми, както и за множеството приятни моменти заедно.

Специални благодарности и признателност на научния ми ръководител проф. дн Иван Атанасов за това, че с доброжелателност и постоянство успя да ми вдъхне увереност, че написването на тази дисертация е постижима за мен цел. Благодаря му за компетентното ръководство, търпението и отделеното време, както и за всичко научено от него.

Разбира се, с много обич благодаря и на семейството ми – Краси и Емилиян, които ми бяха голяма подкрепа през целия процес на работа.

С любов и признателност благодаря на моите родители, които с много обич са ме подкрепяли във всичко и са се радвали на успехите ми.