

Конкурс за академична длъжност "професор" в професионално направление 4.3.
Биологически науки /Микробиология – геномика и регулация на генната експресия при прокариоти/ за нуждите на Департамент „Обща микробиология“

Резюмета на английски и български език на публикации на доц. дн Пенка Младенова Петрова

Публикации по критерий Б на ППЗРАСРБ

1. Sugar transport systems involved in fructooligosaccharides utilization by the probiotic bacterium *Pediococcus acidilactici*

Kaloyan Petrov, Penka Petrova

Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 70(9), 2017, 1263-1270.

Abstract

Fructooligosaccharides (FOS) are prebiotic carbohydrates consisting of fructose residues connected by β -(2-1) bonds. Since they are widely used as dietary fibres, the mechanism of their utilization by lactic acid bacteria (LAB) is of great scientific interest. Novel strain of *P. acidilactici* PD3 was isolated and identified by 16S rDNA sequencing. In vivo ability of the strain to ferment FOS was demonstrated during batch fermentations of 100 g/l chicory flour at different pH and temperatures. Aiming to determine the genes putatively involved in FOS utilization, a genome library of *P. acidilactici* in *Escherichia coli* DH5_α was constructed. Two clones possessed significantly enhanced growth in medium, containing FOS. The sequence analysis of the inserted heterologous fragments revealed that two different sugar transport systems are involved in FOS uptake: Phosphoenolpyruvate-dependent Phosphotransferase system (PTS), and Major Facilitator Superfamily permease (MFS transporter). The obtained results showed that the oligomers of fructose are transported via alternative ways into the cell, thus achieving good growth of *P. acidilactici* in prebiotic environment.

Резюме

Фруктоолигозахаридите (FOS) са пребиотични въглехидрати, състоящи се от остатъци от фруктоза, свързани чрез β -(2-1) връзки. Тъй като те се използват широко като диетични фибри, механизмът на тяхното използване от млечнокисели бактерии (МКБ) е от голям научен интерес. Новият щам на *P. acidilactici* PD3 беше изолиран и идентифициран чрез секвениране на 16S rPHK. In vivo способността на щама да ферментира FOS е демонстрирана по време на периодична ферментация на 100 g/l брашно от цикория при различни рН и температури. С цел да се определят гените, предполагаемо участващи в използването на FOS, е изградена геномна библиотека на *P. acidilactici* в *Escherichia coli* DH5 α . Два клона притежават значително засилен растеж в среда, съдържаща FOS. Анализът на последователността на вмъкнатите хетероложни фрагменти разкрива, че в усвояването на FOS участват две различни системи за транспорт на захари: фосфоенолируват-зависима система на фосфотрансфераза (PTS) и MFS транспортер. Получените резултати показват, че олигомерите на фруктоза се транспортират по алтернативни начини в клетката, като по този начин се постига добър растеж на *P. acidilactici* в пребиотична среда.

2. The cell wall anchored β -fructosidases of *Lactobacillus paracasei*: Overproduction, purification, and gene expression control

Petya Velikova, Kaloyan Petrov, Penka Petrova

Process biochemistry, Elsevier Ltd., 2017, vol. 52, 53-62.

Abstract

Cell wall bound β -fructosidases (exo-inulinases, EC 3.2.1.80) of the probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* are the key enzymes involved in fructo-oligosaccharide (FOS) prebiotic fiber utilization. They consist of conservative catalytic region and large variable part with different number of Big3 domains for peptidoglycan binding. In this study, the first overproduction and purification of two different enzymes of this class (InuB41 and InuLC1) was reported. The biochemical features analysis showed similar pH, temperature optima and stabilities of both enzymes, not influenced by the cell-wall anchoring part. Substrate specificity revealed that InuB41 has the highest affinity to short-chain inulin, while InuLC1 possess highest affinity to levan. Despite the predicted difference of 80 amino acids, the molecular weight of both purified exo-inulinases is equal (~ 100 kDa), probably due to enzyme truncation at the "hot loop" structure formed after the second Big3 domain. New data revealing the putative mechanism of catabolite repression on fos operon were obtained by engagement of the unique capability of the studied *L. paracasei* strains to utilize starch-inulin mixed polysaccharide sources. The performed combined gene transcription assay proved that starch and inulin are utilized simultaneously, since the genes encoding amylopullulanase and β -fructosidase fall under common expression control.

Резюме

Свързаните с клетъчните стени фруктозидази (екзо-инулинази, EC 3.2.1.80) на пробиотичната бактерия *Lactobacillus paracasei* са ключовите ензими, участващи в използването на пребиотични влакна на фрукто-олигозахаридите (FOS). Те се състоят от консервативна каталитична област и голяма променлива част с различен брой Big3 домейни за свързване на пептидогликана. В това проучване се съобщава за първото свръхпроизводство и пречистване на два различни ензима от този клас (InuB41 и InuLC1). Анализът на биохимичните характеристики показва сходни рН, температурни оптимуми и стабилности на двата ензима, които не се влияят от закрепващата част на клетъчната стена. InuB41 има най-висок афинитет към късоверижния инулин, докато InuLC1 притежава най-голям афинитет към леван. Въпреки прогнозираната разлика от 80 аминокиселини, молекулното тегло на двете пречистени екзо-инулинази е равно (~ 100 kDa), вероятно поради съкращаване на ензими в структурата на „горещия контур“, образувана след втория домейн Big3. Нови данни, разкриващи предполагаемия механизъм на катаболитната репресия върху fos оперона са получени чрез демонстриране на уникалната способност на изследваните щамове *L. paracasei* да използват смесени нишесте-инулин полизахаридни субстрати. Проведеният комбиниран анализ на генната транскрипция доказва, че нишестето и инулинът се използват едновременно, тъй като гените, кодиращи амилопулуланаза и β -фруктозидаза попадат под общ експресионен контрол.

3. Starch utilization routes in lactic acid bacteria: New insight by gene expression assay

Petya Velikova, Anton Stoyanov, Galya Blagoeva, Luiza Popova, Kaloyan Petrov, Velitchka Gotcheva, Angel Angelov, Penka Petrova
Starch - Stärke, 2016, vol. 68 (9-10), 953-960.

Abstract

The annotation of full genomes of amylolytic lactic acid bacteria (ALAB) leads to conviction that many of them contain a basic pool of chromosomal genes, responsible for starch hydrolysis. However, only the strains that are forced to survive in starchy environment are able to display these genetically determined properties. The aim of the present work is to investigate the genes actually engaged in starch utilization by ALAB using gene transcription assay. Twenty five new ALAB strains, belonging to 11 distinct species of four genera were isolated and analyzed. Among them, the first amylolytic *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium*, and *E. durans* were reported. The presence and expression of the genes *amy1*, *glgP*, *glgB*, *agl*, *malL*, *treC*, and *dexC* were examined. Although all strains possessed extracellular and cell-bound amylase activity and produced lactic acid from starch, high genus and species specificity in the gene expression was observed. ALAB strains of genus *Lactobacillus* (except *L. sakei*) and *P. acidilactici* own and express all the tested genes, while *E. faecium* and *E. durans* strains expressed predominantly the gene, encoding amylase. The co-transcription of *glgP* and *glgB* genes indicates that glycogen synthesis and starch degradation occur in parallel, which is another example for dual metabolic role of biochemical paths.

Резюме

Анотирането на пълни геноми на амилолитични млечнокисели бактерии (ALAB) води до убеждението, че много от тях съдържат основен набор от хромозомни гени, отговорни за хидролизата на нишестето. Само щамове, които са принудени да оцеляват в скорбялна среда, са в състояние да покажат тези генетично обусловени свойства. Целта на настоящата работа е да се изследват гените, реално ангажирани с използването на нишесте от ALAB, като се използва анализ на генната транскрипция. Двадесет и пет нови щамове ALAB, принадлежащи към 11 различни вида от четири рода, бяха изолирани и анализирани. Сред тях са съобщени първите амилолитични *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium* и *E. durans*. Присъствието и експресията на гените *amy1*, *glgP*, *glgB*, *agl*, *malL*, *treC* и *dexC* бяха изследвани. Въпреки че всички щамове притежават извънклетъчна и свързана с клетки амилазна активност и произвеждат млечна киселина от нишесте, се наблюдава висока родова и видова специфичност в генната експресия. ALAB щамове от род *Lactobacillus* (с изключение на *L. sakei*) и *P. acidilactici* own and express експресират всички тествани гени, докато щамове *E. faecium* и *E. durans* експресират предимно гена, кодиращ амилаза. Съвместната транскрипция на *glgP* и *glgB* гени показва, че гликогеновият синтез и разграждането на нишестето се появяват паралелно, което е друг пример за двойна метаболитна роля на биохимичните пътища.

4. Structural and functional analysis of PUR2,5 gene encoding bifunctional enzyme of de novo purine biosynthesis in *Ogataea (Hansenula) polymorpha* CBS 4732T

Anton Stoyanov, Penka Petrova, Dimitrinka Lyutskanova, Kantcho Lahtchev
Microbiological Research, 169, 5-6, Elsevier GmbH, 2014, 378-387.

Abstract

We describe the cloning, sequencing and functional characterization of gene PUR2,5, involved in de novo purine biosynthesis of the yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. This gene (2369 bp) was cloned by genetic complementation of adenine requiring mutation. It encodes a bifunctional enzyme of 789 amino acids (85 kDa) that catalyzes the second and the fifth steps of de novo purine biosynthesis pathway and shows dual enzymatic activity – of glycinamide ribotide synthetase (GARS, EC 6.3.4.13) and of aminoimidazole ribotide synthetase (AIRS, EC 6.3.3.1). Nucleotide sequence analysis revealed the presence of putative regulatory elements located in the adjacent 5'-region. Canonical motives that function as binding sites for BAS1 transcription activator were found at positions (-593) and (-389). The putative TAATTA-box was located at (-20) to (-14) and AT-rich heteroduplex was found in the 3'-non-translated region. We compared the amino acid sequence of OpPUR2,5p with those of the corresponding enzymes of other yeast species as well as with distant organisms like bacteria *Escherichia coli* and human *Homo sapiens*. A successful disruption of OpPUR2,5 gene was done. It was found that OpPUR2,5::LEU2 replacement affects both mating and sporulation processes. OpPUR2,5 sequence is deposited in the GenBank of NCBI with accession no. JF967633.

Резюме

Описваме клонирането, секвенирането и функционалната характеристика на ген PUR2,5, участващ в de novo пуринова биосинтеза на дрождите *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. Този ген (2369 bp) е клониран от генетично допълване на аденин, изискващо мутация. Той кодира бифункционален ензим от 789 аминокиселини (85 kDa), която катализира втората и петата стъпка на пътя на новосинтеза на пуринови новородени и показва двойна ензимна активност - на глицинамид риботид синтетаза (GARS, EC 6.3.4.13) и на аминокимидазол риботид синтетаза (AIRS, EC 6.3.3.1). Анализът на нуклеотидната последователност разкри наличието на предполагаеми регулаторни елементи, разположени в съседния 5' регион. Канонични мотиви, които функционират като обвързващи са открити сайтове за активатор на транскрипция BAS1 в позиции (-593) и (-389). Предполагаемата TAATTAbox се намира на (-20) до (-14) и богат на АТ хетеродуплекс е намерен в 3'-нетранслирания регион. Сравнихме аминокиселинната последователност на OpPUR2,5p с тази на съответните ензими на други видове дрожди, както и с далечни организми като бактерии *Escherichia coli* и човека *Homo sapiens*. Беше направено успешно разрушаване на гена OpPUR2,5. Установено е, че заместването на OpPUR2,5 :: LEU2 влияе както процесите на кръстосване, така и на спорообразуване. Последователността OpPUR2,5 се депозира в GenBank на NCBI с присъединяване бр. JF967633.

5. Purification and properties of a new recombinant cyclodextrin glucanotransferase from E. coli BL21 (DE3) pJCGT8-5

Penka Petrova, Iva Tomova, Kaloyan Petrov, Iordan Nikov, Alexandra Tonkova
Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 66(10), 2013, 1437-1444

Abstract

A new recombinant cyclodextrin glucanotransferase JCGT8-5 (CGTase, EC 2.4.1.19) produced by E. coli BL21(DE3) cells was purified by ultrafiltration, starch adsorption and gel filtration with a yield of 34% and displayed a specific activity 35683 U mg⁻¹. The purified recombinant CGTase exhibited molecular weight of 75.5 kDa estimated by SDS-PAGE. It was active at 60–65 °C, stable at a broad pH range (5.0–11.0) and retained more than 50% of its original activities after a heat treatment at 70 °C for 1 h without additives. The enzyme produced high amounts of cyclodextrins (CDs) from raw starch (12.0–12.2 mg ml⁻¹) and the products formed were 22% γ-cyclodextrin (CD), 1% α-CD and 77% β-CD after 2 h incubation at 60 °C, without adding any selective agents.

Резюме

Нова рекомбинантна циклодекстрин глюканотрансфераза JCGT8-5 (CGTase, EC 2.4.1.19), произведена от клетки E. coli BL21 (DE3), се пречиства чрез ултрафилтрация, адсорбция на нишесте и гел филтрация с добив 34% и показва специфична активност 35683 U mg⁻¹. Пречистената рекомбинантна CGTase показва молекулно тегло от 75,5 kDa, изчислено чрез SDS-PAGE. Той беше активен при 60–65 °C, стабилен при широк диапазон на pH (5,0–11,0) и запази повече от 50% от първоначалната си активност след термична обработка при 70 °C за 1 h без добавки. Ензимът произвежда големи количества циклодекстрини (CD) от сурово нишесте (12,0–12,2 mg ml⁻¹) и образуваните продукти са 22% γ-циклодекстрин (CD), 1% α-CD и 77% β-CD след 2 часа инкубация при 60 °C, без добавяне на никакви селективни агенти.

Публикации по критерий В на ППЗРАСРБ

1. Lactic acid fermentation of cereals and pseudocereals: ancient nutritional biotechnologies with modern applications

Petrova P., Petrov K.
Nutrients, 2020, 12(4), 1118.

Abstract

Grains are a substantial source of macronutrients and energy for humans. Lactic acid (LA) fermentation is the oldest and most popular way to improve the functionality, nutritional value, taste, appearance and safety of cereal foods and reduce the energy required for cooking. This literature review discusses lactic acid fermentation of the most commonly used cereals and pseudocereals by examination of the microbiological and biochemical fundamentals of the process. The study provides a critical overview of the indispensable participation of lactic acid bacteria (LAB) in the production of many traditional, ethnic, ancient and modern fermented cereals and beverages, as the analysed literature covers 40 years. The results reveal that the functional aspects of LAB fermented foods are due to significant molecular changes in macronutrients during LA fermentation. Through the action of a vast microbial enzymatic pool, LAB form a broad spectrum of volatile compounds, bioactive peptides and oligosaccharides with prebiotic potential. Modern

applications of this ancient bioprocess include the industrial production of probiotic sourdough, fortified pasta, cereal beverages and “boutique” pseudocereal bread. These goods are very promising in broadening the daily menu of consumers with special nutritional needs.

Резюме

Зърнените храни са съществен източник на хранителни вещества и енергия за хората. Млечнокиселата ферментация е най-старият и най-популярен начин за подобряване на функционалността, хранителната стойност, вкуса, външния вид и безопасността на зърнените храни и намаляване на енергията, необходима за готвене. Този преглед на литературата обсъжда млечнокиселата ферментация на най-често използваните зърнени и псевдозърнени култури чрез изследване на микробиологичните и биохимичните основи на процеса. Изследването предоставя критичен преглед на задължителното участие на млечнокиселите бактерии (МКБ) в производството на много традиционни, етнически, древни и съвременни ферментирани зърнени храни и напитки, тъй като анализираната литература обхваща 40 години. Резултатите разкриват, че функционалните аспекти на МКБ-ферментиралите храни се дължат на значителни молекулярни промени по време на ферментацията. Чрез действието на обширен микробен ензимен пул, МКБ образуват широк спектър от летливи съединения, биоактивни пептиди и олигозахариди с пребиотичен потенциал. Съвременните приложения на този древен биопроцес включват промишленото производство на пробиотична закваска, подсилени тестени изделия, зърнени напитки и „бутиков“ псевдозърнен хляб. Тези стоки са много обещаващи за разширяване на ежедневното меню на потребителите със специални хранителни нужди.

2. Microbial biodegradation as an option for waste utilization during long-term manned space missions

Hr. Najdenski, V. Hubenov, I. Simeonov, V. Kussovski, L. Dimitrova, P. Petrova, P. Angelov, L. Kabaivanova

Bulgarian Chemical Communications, 2020, vol. 52 (3)

Abstract

Planned space flights in foreseeable future to Mars pose many important issues to be solved by nowadays science, especially the problem of organic wastes accumulated in large quantities. The flight from Earth to Mars takes about 520 days. The crew possibly could consist of 6 cosmonauts, each of them needing daily: oxygen (1 kg of liquid), water (1-2 litres), food (2-3 kg). The total weight is about 5 kg/day or 30 kg/day for the entire crew. During long-term manned missions, the wastes are prohibited to be disposed of in space. They must be recycled. It is known that specific bacteria are able to convert waste substrates into usable nutrients and minerals. The enormous challenge is: reducing the volume of wastes to generate liquid and gaseous fractions which could be used in the production of food, water and oxygen. Simultaneously, some biogas is obtained as a source of energy. We present the development of a process of biodegradation of cellulose containing substrates similar to personal hygiene materials for cosmonauts by selected non-pathogenic bacteria. Experiments were conducted in terrestrial conditions where a degree of biodegradation of 72% of cellulose containing substrates at anaerobic, mesophilic conditions was realized. The selected bacterial community was genetically identified. The most abundant species were *Bacteroides oleiciplenus*, *Clostridium*

butyricum, and *Ruminiclostridium papyrosolvens*. Concentration and profile of volatile fatty acids accompanying the biodegradation process in a bioreactor were also followed.

Резюме

Планираните космически полети в обозримо бъдеще до Марс поставят много важни въпроси, които трябва да бъдат решени от днешната наука, особено проблема с органичните отпадъци, натрупани в големи количества. Полетът от Земята до Марс отнема около 520 дни. Екипажът може да се състои от 6 космонавти, всеки от които се нуждае ежедневно: кислород (1 кг течност), вода (1-2 литра), храна (2-3 кг). Общото тегло е около 5 кг/ден или 30 кг/ден за целия екипаж. По време на дългосрочни пилотирани мисии отпадъците са забранени да се изхвърлят в космоса. Те трябва да бъдат рециклирани. Известно е, че специфичните бактерии са в състояние да превърнат отпадъчните субстрати в използвани хранителни вещества и минерали. Огромното предизвикателство е: намаляване на обема на отпадъците за генериране на течни и газообразни фракции, които могат да бъдат използвани за производството на храна, вода и кислород. Едновременно с това се получава биогаз като източник на енергия. Представяме развитието на процес на биоразграждане на субстрати, съдържащи целулоза, подобни на материали за лична хигиена за космонавти от избрани непатогенни бактерии. Експериментите бяха проведени в земни условия, където беше реализирана степен на биоразграждане на 72% от субстрати, съдържащи целулоза при анаеробни, мезофилни условия. Избраната бактериална общност е генетично идентифицирана. Най-разпространените видове са *Bacteroides oleiciplenus*, *Clostridium butyricum* и *Ruminiclostridium papyrosolvens*. Концентрацията и профилът на летливите мастни киселини, придружаващи процеса на биоразграждане в биореактор, също бяха проследени.

3. Microbial production of 1-butanol – recent advances and future prospects

Tsvetanova F., Petrova, P., Petrov, K.

Journal of Chemical Technology and Metallurgy, University of Chemical Technology and Metallurgy, Bulgaria, 2018, vol. 53 (4), 683-696

Abstract

Butanol is an alcohol that can be obtained by fermentation of organic feedstocks sugars. Biobutanol is soon expected to surpass ethanol as a renewable fuel due to the intensive scientific efforts aimed at substrates broadening, process parameters improvement and genetic manipulations of butanol producing bacteria. This review focuses on the biotechnological synthesis of 1-butanol by natural isolates (*Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*) and recombinant producers (*E. coli*, *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum*, *C. thermocellum*, *S. cerevisiae*, etc.). Concerning the economical butanol fermentation, the contemporary utilization of cheap renewable and non-food substrates (lignocellulosic materials, glycerol, syngas, and algae) is described. Different strategies for advanced 1-butanol production

are considered. Along with media optimizations, immobilization, and co-culturing, the exploration of the strains' tolerance to butanol, and their genetic improvement is widely applied. The recombinants obtained in case of naturally producing strains application as hosts possess enhanced metabolic flux, shifted towards higher butanol titer, yield, and productivity. Another approach refers to the insertion of "butanol pathway" genes in a non-solvent producing host, which is resistant to high butanol concentrations. The

present review analyses and summarizes the problems and the future prospects of the development of economically feasible bio-processes for butanol production.

Резюме

Бутанолът е алкохол, който може да се получи чрез ферментация на захари от органични суровини. Скоро се очаква биобутанолът да надмине етанола като възобновяемо гориво поради интензивните научни усилия, насочени към разширяване на субстратите, подобряване на параметрите на процеса и генетични манипулации на бактерии, произвеждащи бутанол. Този преглед се фокусира върху биотехнологичния синтез на 1-бутанол от естествени изолати (*Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*) и рекомбинантни продуценти (*E. coli*, *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum*, *C. thermocellum*, *S. cerevisiae* и др.). По отношение на икономичната ферментация на бутанол е описано съвременното използване на евтини възобновяеми и нехранителни субстрати (лигноцелулозни материали, глицерол, сингаз и водорасли). Различни стратегии за напреднало производство на 1-бутанол

са считани. Заедно с оптимизацията на медиите, обездвижването и съвместното култивиране, широко се прилага изследването на толерантността на щамовете към бутанол и тяхното генетично подобрене. Рекомбинантите, получени в случай на естествено продуциране на щамове като гостоприемници, притежават засилен метаболитен поток, изместен към по-висок титър на бутанол, добив и производителност. Друг подход се отнася до вмъкването на гени за "път на бутанол" в гостоприемник, който не произвежда разтворител, който е устойчив на високи концентрации на бутанол. Настоящият преглед анализира и обобщава проблемите и бъдещите перспективи за развитието на икономически осъществими биопроцеси за производство на бутанол.

4. High lactic acid and fructose production via Mn²⁺ mediated conversion of inulin by *Lactobacillus paracasei*.

Petrov, K., Popova, L., Petrova, P.

Applied Microbiology and Biotechnology, Springer Verlag, 2017, vol. 101, 4433-4445.

Abstract

Lactobacillus paracasei DSM23505 is able to produce high amounts of lactic acid (LA) by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of inulin. Aiming to obtain the highest possible amounts of LA and fructose, the present study is devoted to evaluate the impact of bivalent metal ions on the process of inulin conversion. It was shown that Mn²⁺ strongly increases the activity of the purified key enzyme β -fructosidase. In vivo, batch fermentation kinetics revealed that the high Mn²⁺ concentrations accelerated inulin hydrolysis by raise of the inulinase activity, and increased sugars conversion to LA through enhancement of the whole glycolytic flux. The highest LA concentration and yield were reached by addition of 15 mM Mn²⁺—151 g/L (corresponding to 40% increase) and 0.83 g/g, respectively. However, the relative quantification by real-time reverse transcription assay showed that the presence of Mn²⁺ decreases the expression levels of *fosE* gene encoding β -fructosidase. Contrariwise, the full exclusion of metal ions resulted in *fosE* gene expression enhancement, blocked fructose transport, and hindered fructose conversion thus leading to huge fructose accumulation. During fed-batch with optimized medium and fermentation parameters, the fructose content reached 35.9% (w/v), achieving yield of 467 g fructose from 675 g inulin containing chicory flour powder (0.69 g/g). LA received in course of the batch fermentation and fructose gained by the fed-batch

are the highest amounts ever obtained from inulin, thus disclosing the key role of Mn^{2+} as a powerful tool to guide inulin conversion to targeted bio-chemicals.

Резюме

Lactobacillus paracasei DSM23505 е способен да произвежда големи количества млечна киселина (LA) чрез едновременно захарифициране и ферментация (SSF) на инулин. С цел да се получат възможно най-високи количества LA и фруктоза, настоящото изследване е посветено на оценката на въздействието на двувалентни метални йони върху процеса на превръщане на инулин. Показано е, че Mn^{2+} силно повишава активността на пречистения ключов ензим β -фруктозидаза. *In vivo*, кинетиката на периодичната ферментация разкрива, че високите концентрации на Mn^{2+} ускоряват инулиновата хидролиза чрез повишаване на инулиназната активност и увеличават превръщането на захарите в LA чрез подобряване на целия гликолитичен поток. Най-високата концентрация на LA и добив са постигнати чрез добавяне на 15 mM Mn^{2+} — 151 g / L (съответстващо на 40% увеличение) и 0.83 g / g, съответно. Въпреки това, относителното количествено определяне чрез анализ на обратна транскрипция в реално време показва, че присъствието на Mn^{2+} намалява нивата на експресия на *fosE* ген, кодиращ β -фруктозидаза. Обратно, пълното изключване на метални йони доведе до подобряване на експресията на гена *fosE*, блокира транспорта на фруктоза и възпрепятства конверсията на фруктоза, което води до огромно натрупване на фруктоза. По време на подаване на субстрат при оптимизирана среда и параметри на ферментация, съдържанието на фруктоза достига 35,9% (w/v), като се постига добив от 467 g фруктоза от 675 g инулин, съдържащ брашно от цикория на прах (0,69 g/g). Млечната киселина и фруктозата, получени по време на периодичната ферментация са най-високите количества, получавани някога от инулин, като по този начин разкрива ключовата роля на Mn^{2+} като мощен инструмент за насочване на превръщането на инулина в целеви биохимикали.

5. Direct conversion of chicory flour into L(+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505

Petrova P., Velikova P., Popova L., Petrov K.

Bioresource Technology, 2015, vol. 186, 329-333.

Abstract

Highly effective bio-process for lactic acid (LA) production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of chicory flour was developed. The strain used, *Lactobacillus paracasei* DSM 23505 produced natural inulinase (EC 3.2.1.80) with molecular weight 130 kDa, located in the cell wall fraction. In batch fermentation with optimized medium content and fermentation conditions, a complete conversion of 136 g/L chicory flour (89.3% inulin and 10.7% mix of sucrose, fructose and glucose) into 123.7 g/L LA was achieved. These yield and conversion rate are the highest obtained by SSF for LA production from inulin. The high efficiency, the cheap fermentation broth and the simple process performance disclose the promising use of the chicory flour in industrial biotechnology for LA production.

Резюме

Разработен е високоефективен биопроцес за производство на млечна киселина чрез едновременно озахаряване и ферментация (SSF) на брашно от цикория. Използваният щам, *Lactobacillus paracasei* DSM 23505 произвежда естествена инулиназа (EC 3.2.1.80) с молекулно тегло 130 kDa, разположена във фракцията на

клетъчната стена. При периодична ферментация с оптимизирано средно съдържание и условия на ферментация се постига пълно превръщане на 136 g/L брашно от цикория (89,3% инулин и 10,7% смес от захароза, фруктоза и глюкоза) в 123,7 g/L млечна киселина. Тези добив и степен на конверсия са най-високите, получени от SSF за производство на млечна киселина от инулин. Високата ефективност, евтиният ферментационен бульон и опростеното изпълнение на процеса разкриват обещаващото използване на брашното от цикория в индустриалната биотехнология за производство на млечна киселина.

Публикации по критерий Г на ППЗРАСРБ

1. New *Bacillus* spp. with potential for 2,3-butanediol production from biomass

Petrova, P., Petlichka, S., Petrov, K.

J. Biosci. Bioeng. 2020, vol. 130 (1), 20-28.

Abstract

2,3-Butanediol (2,3-BD) is a valuable platform chemical with extensive industrial applications. The demand for its safe and economic microbial synthesis resulted in increased interest in the isolation of non-pathogenic producers capable of converting cheap and renewable materials. This study reports the isolation of 62 new non-pathogenic *Bacillus* strains producing 2,3-BD. Three strains were found, including *Bacillus velezensis* 5RB, *B. toyonensis* 11RA and *B. safensis* 14A, which belonged to species not previously reported as 2,3-BD producers. Seventeen strains displayed cellulolytic activity, degrading carboxymethyl cellulose, HE-cellulose and b-glucan, whereas 5 strains were also able to hydrolyze arabinoxylan, arabinan, galactomannan, xyloglucan, xylan and galactan (included in hemicellulose), as well as starch and fructans. The strain capacity to ferment lignocellulosic sugars to 2,3-BD corresponded to the activities of CAZymes engaged in the hydrolysis of the relevant polysaccharides. Regardless of species, *Bacillus* strains converted glucose, cellobiose, and mannose to 2,3-BD with higher concentration, productivity and yield than arabinose, xylose, and galactose. *B. velezensis* 5RB was the only strain, which was capable to produce 2,3-BD from all lignocellulosic sugars which corresponded to the presence of the highest extracellular endo- α -(1/5)-L-arabinanase, endo-1,4- β -xylanase, 1,4- β -xylosidase, and endo- β -1,4-galactanase activity. The annotation of its genome showed the presence of 26 genes encoding glycoside-hydrolases allowing biomass degradation. In conclusion, the non-risk new isolated *Bacillus* strains are promising for 2,3-BD production from agro-industrial residues. When lignocellulose is used, the process would be more efficient if the substrate content is rich in cellulose and low in hemicelluloses.

Резюме

2,3-бутандиол (2,3-BD) е ценен химикал на платформа с широко промишлено приложение. Търсенето на неговия безопасен и икономически микробен синтез доведе до повишен интерес към изолирането на непатогенни производители, способни да конвертират евтини и възобновяеми материали. Това проучване съобщава за изолирането на 62 нови непатогенни щамове *Bacillus*, продуциращи 2,3-BD. Открити са три щамове, включително *Bacillus velezensis* 5RB, *B. toyonensis* 11RA и *B. safensis* 14A, които принадлежат към видове, които не са докладвани

преди това като производители на 2,3-BD. Седемнадесет щамове показваха целулолитична активност, разграждаща карбоксиметил целулоза, HE-целулоза и б-глюкан, докато 5 щамове също бяха в състояние да хидролизират арабиноксилан, арабинан, галактоманан, ксилоглюкан, ксилан и галактан (включени в хемицелулозата), както и нишесте и фруктани. Капацитетът на щамове да ферментират лигноцелулозни захари до 2,3-BD съответства на дейностите на CAZymes, ангажирани с хидролизата на съответните полизахариди. Независимо от видовете, щамове *Bacillus* превръщат глюкозата, целобиозата и манозата в 2,3-BD с по-висока концентрация, производителност и добив от арабинозата, ксилозата и галактозата. *B. velezensis* 5RB е единственият щам, който е способен да произвежда 2,3-BD от всички лигноцелулозни захари, което съответства на присъствието на най-високата извънклетъчна ендо- α - (1/5) -L-арабиназа, ендо-1-4- β -ксилаза, 1,4- β -ксилозидаза и ендо- β -1,4-галактаназа. Аноатацията на неговия геном показва наличието на 26 гена, кодиращи гликозид-хидролази, позволяващи разграждане на биомасата. В заключение, безопасните новоизолирани щамове *Bacillus* са обещаващи за производство на 2,3-BD от селскостопански остатъци. Когато се използва лигноцелулоза, процесът би бил по-ефективен, ако съдържанието на субстрата е богато на целулоза и ниско на хемицелулози.

2. Low cell surface hydrophobicity is one of the key factors for high butanol tolerance of Lactic acid bacteria

Petrova, P., Tsvetanova F., Petrov, K.

Engineering in Life Sciences, 2019, vol. 2, 133-142.

Abstract

Highly butanol-tolerant strains have always been attractive because of their potential as microbial hosts for butanol production. However, due to the amphiphilic nature of 1-butanol as a solvent, the relationship between the cell surface hydrophobicity and butanol resistance remained ambiguous to date. In this work, the quantitatively estimated cell surface hydrophobicity of 74 Lactic acid bacteria strains were juxtaposed to their tolerance to various butanol concentrations. The obtained results revealed that the strains' hydrophobicity was inversely proportional to their butanol tolerance. All highly butanol-resistant strains were hydrophilic (cell surface hydrophobicity<1%), whereas the more hydrophobic the strains were, the more sensitive to butanol they were. Furthermore, cultivation at increasing butanol concentrations showed a clear tendency to decrease the level of hydrophobicity in all tested organisms, thus suggesting possible adaptation mechanisms. Purposeful reduction of cell surface hydrophobicity (by removal of S-layer proteins from the cell envelope) also led to an increase of butanol resistance. Since the results covered 23 different Lactic acid bacteria species of seven genera, it could be concluded that regardless of the species, the lower degree of cells' hydrophobicity clearly correlates with the higher level of butanol tolerance.

Резюме

Силно толерантните към бутанол щамове винаги са били привлекателни поради техния потенциал като микробни гостоприемници за производството на бутанол. Въпреки това, поради амфибилната природа на 1-бутанола като разтворител, връзката между хидрофобността на клетъчната повърхност и резистентността към бутанол остава неясна към днешна дата. В тази работа количествено оценената хидрофобност на клетъчната повърхност на 74 щамове млечнокисели

бактерии се съпоставя с тяхната толерантност към различни концентрации на бутанол. Получените резултати разкриват, че хидрофобността на щамове е обратно пропорционална на тяхната толерантност към бутанол. Всички силно устойчиви на бутанол щамове бяха хидрофилни (хидрофобност на клетъчната повърхност <1%), докато колкото по-хидрофобни бяха щамове, толкова по-чувствителни бяха към бутанол. Освен това, култивирането при увеличаване на концентрациите на бутанол показва ясна тенденция към намаляване на нивото на хидрофобност във всички тествани организми, като по този начин предполага възможни механизми за адаптация. Целенасоченото намаляване на хидрофобността на клетъчната повърхност (чрез отстраняване на протеини от S-слой от клетъчната обвивка) също доведе до повишаване на резистентността към бутанол. Тъй като резултатите обхващат 23 различни вида млечнокисели бактерии от седем рода, може да се заключи, че независимо от вида, по-ниската степен на хидрофобност на клетките ясно корелира с по-високото ниво на толерантност към бутанол.

3. Genome sequence of *Bacillus velezensis* 5RB - an overproducer of 2,3-butanediol.

Petrova, P., Velikova, P., Petrov, K.

Microbiology Resource Announcements, American Society for Microbiology, 2019, vol. 8 (1), Art. no. e01475-18, SJR:0.553.

Abstract

Bacillus velezensis 5RB is capable of producing large amounts of 2,3-butanediol. Whole-genome sequencing revealed that the strain contains one circular chromosome of 3.91 Mbp without plasmids. A large part of the genome is devoted to carbohydrate metabolism, encoding an abundance of enzymes participating in polysaccharide utilization pathways.

Резюме

Bacillus velezensis 5RB е способен да произвежда големи количества 2,3-бутандиол. Последователността на целия геном разкрива, че щамът съдържа една кръгла хромозома от 3,91 Mbp без плазмиди. Голяма част от генома е посветена на въглехидратния метаболизъм, кодиращ изобилие от ензими, участващи в пътищата за използване на полизахариди.

4. Microbial diversity and health-promoting properties of the traditional Bulgarian yogurt

Velikova, P., Petrov, K., Lozanov, V., Tsvetanova F., Stoyanov A., Wu, Z., Liu, Z., Petrova, P. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2018, vol. 32 (5), 1205-1217, Taylor and Francis Group, ISSN: 1310-2818, SJR: 0.36.

Abstract

Bulgarian yogurt is usually associated with good health and longevity. This study aimed to analyse the current microbial content of homemade Bulgarian yogurt. Identification by 16S rDNA sequencing revealed that out of 76 isolated strains, 53% belonged to *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 14% to other lactobacilli, and 32% to lactic acid cocci (*Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc*). All isolates inhibited the growth of pathogenic bacteria (10% of them by the putative action of bacteriocins); 18 isolates were able to produce extracellular exopolysaccharides (EPS), whereas 24% of them demonstrated extremely high proteolytic activity. Remarkably, 10 *Lb. bulgaricus* strains produced prebiotic

galactooligosaccharides (GOS). High-resolution accurate mass spectrometry (HRAMS) analysis revealed production of tri- and tetrasaccharides containing atypical b(1!4) glycosidic bonds, reported for the first time for *Lb. bulgaricus*. Based on the beneficial features, along with good technological behaviour, we recommend several isolates as highly promising for Bulgarian yogurt starters.

Резюме

Българското кисело мляко обикновено се свързва с добро здраве и дълголетие. Това проучване има за цел да анализира настоящото микробно съдържание на домашно българско кисело мляко. Идентифицирането чрез 16S rDNA секвениране разкри, че от 76 изолирани щамове, 53% принадлежат на *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 14% за други лактобацили и 32% за млечнокисели коки (*Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* и *Leuconostoc*). Всички изолати инхибираха растежа на патогенни бактерии (10% от тях чрез предполагаемото действие на бактериоцините); 18 изолати успяха да произведат извънклетъчни екзополisahариди (EPS), докато 24% от тях демонстрираха изключително висока протеолитична активност. Забележително, 10 *Lb. bulgaricus* щамове произвеждат пребиотични галактоолигозахариди (GOS). Анализът с точна масова спектрометрия с висока разделителна способност (HRAMS) разкрива производството на три- и тетразахариди, съдържащи атипични b (1-4) гликозидни връзки, съобщени за първи път за *Lb. bulgaricus*. Въз основа на полезните характеристики, наред с доброто технологично поведение, ние препоръчваме няколко изолати като силно обещаващи за българските преджестия с кисело мляко.

5. Petrova, P., Petrov, K. **Prebiotic–Probiotic Relationship: The Genetic Fundamentals of Polysaccharides Conversion by Bifidobacterium and Lactobacillus Genera.** Handbook of Food Bioengineering Volume 2: Food Bioconversion, A.M. Grumezescu, A. Holban (Eds.), Academic Press, Elsevier Inc., 2017, ISBN:978-0-12-811413-1, DOI:10.1016/B978-0-12-811413-1.00007-3

6. Petrova, P., Petrov, K. **Traditional Cereal Beverage Boza - Fermentation Technology, Microbial Content and Healthy Effects. Fermented Foods, Part II: Technological Interventions**, Eds. R. C. Ray, D. Montet, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2017, ISBN:9781138637849.

7. High Production of neuraminidase by a Vibrio cholerae Non-O1 strain — the first possible alternative to toxigenic producers.

Eneva, R., Engibarov, S., Petrova, P., Abrashev, R., Strateva, T., Kolyovska, V., Abrashev, I. Appl Biochem Biotechnol, 176, 412-427.

Abstract

Vibrio cholerae neuraminidase (VCNA) is widely used in biochemical and medical research, in processes for preparing homogenous sialoconjugates, and in the pharmaceutical industry. Its production by non-toxigenic strains is quite desirable, in order to avoid the expensive safety measures. Here, we report the first method for highly effective production of a novel, purified *V. cholerae* extracellular neuraminidase from a non-toxigenic strain. The enzyme is highly active, and its properties, as well as the responsible gene *nanH*, are practically identical with those of the toxigenic strains. It cleaves $\alpha,2\rightarrow3$ and $\alpha,2\rightarrow6$ glycosidic bonds with highest affinity (K_M 1.7×10^{-5} μM) for

human transferrin. The deduced amino acid sequence of the enzyme reveals three binding sites for Ca^{2+} and one for sialic acid. The sequence analysis of the nanH gene, being the first for a *V. cholerae* non-O1 strain, shows 99 % identity with a new nanH allele of an O1 *Vibrio* strain. The simple laboratory technology for efficient production of the new VCNA is based on the use of common and cheap nutrient media and easily available inducer—glycomacropeptide. The rapid purification consists of salting-out and diethylaminoethanol (DEAE) and Q-Sepharose chromatography steps. Purified preparation contains no aldolase and protease, which gives the production scheme a great potential for industrial application.

Резюме

Невраминидазата на *Vibrio cholerae* (VCNA) се използва широко в биохимични и медицински изследвания, в процеси за получаване на хомогенни сиалоконюгати и във фармацевтичната индустрия. Нейното производство от нетоксигенни щамове е доста желателно, за да се избегнат скъпите мерки за безопасност. Тук докладваме първия метод за високоефективно производство на нова, пречистена извънклетъчна невраминидаза на *V. cholerae* от нетоксигенен щам. Ензимът е силно активен и неговите свойства, както и отговорният ген nanH, са практически идентични с тези на токсигенните щамове. Той разцепва $\alpha,2\rightarrow3$ и $\alpha,2\rightarrow6$ гликозидни връзки с най-висок афинитет ($\text{KM } 1,7 \times 10^{-5} \text{ }\mu\text{M}$) към човешкия трансферин. Изведената аминокиселинна последователност на ензима разкрива три места за свързване за Ca^{2+} и едно за сиалова киселина. Анализът на последователността на гена nanH, който е първият за щам *V. cholerae*, който не е O1, показва 99% идентичност с нов алел nanH на щам O1 *Vibrio*. Простата лабораторна технология за ефективно производство на новата VCNA се основава на използването на обикновени и евтини хранителни среди и леснодостъпен индуктор - гликомакропептид. Бързото пречистяване се състои от етапи на осоявяване и диетиламиноетанол (DEAE) и Q-Sepharose хроматография. Пречистеният препарат не съдържа алдолаза и протеаза, което дава на производствената схема голям потенциал за промишлено приложение.

8. 2,3-Butanediol production from starch by engineered *Klebsiella pneumoniae* G31-A

Tsvetanova F., Petrova P., Petrov K.

Applied Microbiology and Biotechnology, 98 (6), 2014, 2441-2451.

Abstract

2,3-Butanediol (2,3-BD) is an organic compound, which is widely used as a fuel and fuel additive and applied in chemical, food, and pharmaceutical industries. Contemporary strategies for its economic synthesis include the development of microbial technologies that use starch as cheap and renewable feedstock. The present work encompasses the metabolic engineering of the excellent 2,3-BD producer *Klebsiella pneumoniae* G31. In order to perform direct starch conversion into 2,3-BD, the amyL gene encoding quite active, liquefying α -amylase in *Bacillus licheniformis* was cloned under lac promoter control in the recombinant *K. pneumoniae* G31-A. The enhanced extracellular over-expression of amyL led to the highest extracellular amylase activity (68 U/ml) ever detected in *Klebsiella*. The recombinant strain was capable of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of potato starch to 2,3-BD. In SSF batch process by the use of 200 g/l starch, the amount of total diols produced was 60.9 g/l (53.8 g/l 2,3-BD and 7.1 g/l acetoin), corresponding to 0.31 g/g conversion rate. The presented results

are the first to show successful starch conversion to 2,3-BD by *K. pneumoniae* in a one-step process.

Резюме

2,3-бутандиол (2,3-BD) е органично съединение, което се използва широко като гориво и добавка към гориво и се прилага в химическата, хранителната и фармацевтичната промишленост. Съвременните стратегии за неговия икономически изгоден синтез включват развитието на микробни технологии, които използват нишестето като евтина и възобновяема суровина. Настоящата работа обхваща метаболитно инженерство на отличния производител на 2,3-BD *Klebsiella pneumoniae* G31. За да се извърши директно преобразуване на нишесте в 2,3-BD, гена, кодиращ втечняваща α -амилаза в *Bacillus licheniformis* е клониран под lac промоторен контрол в рекомбинантната *K. pneumoniae* G31-A. Засилената извънклетъчна свръхекспресия на amyL доведе до най-високата извънклетъчна активност на амилаза (68 U/ml), открита някога в Клебсиела. Рекомбинантният щам е способен едновременно да озахарява и ферментира (SSF-процес) картофено нишесте до 2,3-BD. В периодичен процес на SSF с използване на 200 g/l нишесте, количеството на общо произведените диоли е 60,9 g/l (53,8 g / l 2,3-BD и 7,1 g/l ацетоин), съответстващи на конверсия от 0,31 g/g. Представените резултати са първите, които показват успех при превръщане на нишесте в 2,3-BD от *K. pneumoniae* в едностъпален процес.

9. Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria – structures, properties, and applications

Petrova P., Petrov K., Stoyancheva, G.

Starch-Starke, 65, 1/2, 34-47.

Abstract

In spite that lactic acid bacteria (LAB) are used for production of fermented foods and drinks for millennia, their ability to grow using starch as a sole carbon source was noticed by the scientists in the last 30 years. A number of amylolytic LAB (ALAB) strains were isolated and several detailed investigations of biochemical and genetic basis of starch hydrolysis were performed. The purpose of this review is to summarize for the first time the available data about the starch-modifying enzymes in ALAB. The most important amylolytic representatives of the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, and *Weissella* are described. Amino acid sequences, corresponding to ALAB amylase enzymes are compared and some features of the gene expression are analyzed. The possible application of ALAB strains for direct production of lactic acid from starch, as well as their participation in food manufacturing is discussed.

Резюме

Въпреки че млечнокиселите бактерии (МКБ) се използват за производство на ферментирали храни и напитки в продължение на хилядолетия, способността им да растат използвайки нишесте като единствен източник на въглерод е забелязана от учените през последните 30 години. Бяха изолирани редица амилолитични МКБ (аМКБ) щамове и бяха извършени няколко подробни изследвания на биохимичната и генетичната основа на хидролизата на нишестето. Целта на този преглед е да обобщи за първи път наличните данни за нишесте-модифициращите ензими в аМКБ. Описани са най-важните амилолитични представители на родовете *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* и *Weissella*. Сравняват се аминокиселинните последователности, съответстващи на

амилазните ензими и се анализират някои характеристики на генната експресия. Обсъжда се възможното приложение на щамовете за директно производство на млечна киселина от нишесте, както и тяхното участие в производството на храни.

10. Sequence analysis, cloning and extracellular expression of cyclodextrin glucanotransferase gene from the alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB in *E. coli*

Petrova P., Tonkova A., Petrov, K. Process biochemistry, 47, 12, 2012.

Abstract

The cgt-gene from the alkaliphilic halotolerant *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB was isolated and sequenced. An open reading frame (ORF) of 2112 bp encoding a polypeptide of 704 amino acids, composed of a 29-amino acid signal sequence and a 675-amino acid mature enzyme was found. The established low level of homology with nucleotide sequences of other *Bacillus* CGTases (less than 82%) suggested that the cgt-gene from *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB encodes a new enzyme. The cgt-gene was cloned as a PCR amplicon and thereby the construction of genome library was avoided. This is the first evidence for the use of pJET vector as an expression vector. The opportunity to apply its T7 promoter for efficient extracellular production of heterologous proteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3) was demonstrated. The expression of extracellular recombinant CGTase improved 23-fold, concerning β -CGTase activity and 4.5-fold concerning γ -CGTase activity after IPTG induction and glycine supplementation was achieved.

Резюме

Cgt-генът от алкалофилен халотолерантен *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB беше изолиран и секвениран. Открита е рамка за четене (ORF) от 2112 bp, кодираща полипептид от 704 аминокиселини, съставен от 29-аминокиселинна сигнална последователност и 675-аминокиселинен зрял ензим. Установеното ниско ниво на хомология с нуклеотидни последователности на други *Bacillus* CGTases (под 82%) предполага, че cgt-генът от *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB кодира нов ензим. Cgt-генът е клониран като PCR ампликон и по този начин е избегнато изграждането на геномна библиотека. Това е първото доказателство за използването на pJET вектор като експресионен вектор. Демонстрирана беше възможността да се приложи неговият T7 промотор за ефективно извънклетъчно производство на хетероложни протеини в *Escherichia coli* BL21 (DE3). Експресията на извънклетъчна рекомбинантна CGTase се подобрява 23 пъти, по отношение на активността на β -CGTase и 4,5 пъти по отношение на активността на γ -CGTase след индукция на IPTG и добавяне на глицин.

11. Purification and Properties of a New Thermostable Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB

Kitayska, Ts., Petrova, P., Ivanova, V., Tonkova, A.

Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165, 5, 1285-1295.

Abstract

A new cyclodextrin glucanotransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) from an alkaliphilic halotolerant *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB was studied in respect to its γ -cyclizing activity. An efficient conversion of a raw corn starch into only two types of cyclodextrins (β - and γ -CD) was achieved by the purified enzyme. Crude enzyme obtained by ultrafiltration was purified up to fivefold by starch adsorption with a recovery of 62%

activity. The enzyme was a monomer with a molecular mass 71 kDa estimated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and native PAGE. The CGTase exhibited two pH optima, at pH 6.0 and 8.0, and was at most active at 60 °C and pH 8.0. The enzyme retained more than 80% of its initial activity in a wide pH range, from 5.0 to 11.0. The CGTase was strongly inhibited by 15 mM Cu²⁺, Fe²⁺, Ag⁺, and Zn²⁺, while some metal ions, such as Ca²⁺, Na⁺, K⁺, and Mo⁷⁺, exerted a stimulating effect in concentration of 5 mM. The important feature of the studied CGTase was its high thermal stability: the enzyme retained almost 100% of its initial activity after 2 h of heating at 40–60 °C; its half-life was 2 h at 70 °C in the presence of 5 mM Ca²⁺. The achieved 50.7% conversion of raw corn starch into 81.6% β- and 18.4% γ-CDs after 24 h enzyme reaction at 60 °C and pH 8.0 makes *B. pseudocaliphilus* 8SB CGTase industrially important enzyme for cyclodextrin production.

Резюме

Изследвана е нова циклодекстрин глюканотрансфераза (CGTase, EC 2.4.1.19) от алкалофилен халотолерантен *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB с γ-циклизираща активност. Ефективното превръщане на сурово царевично нишесте в само два вида циклодекстрини (β- и γ-CD) е постигнато от пречистения ензим. Суровият ензим, получен чрез ултрафилтрация е пречистен до пет пъти чрез адсорбция върху нишесте с възстановяване на 62% активност. Ензимът е мономер с молекулна маса 71 kDa, изчислена чрез електрофореза на полиакриламиден гел натриев додецил сулфат (SDS-PAGE) и естествен PAGE. Ензимът показва два pH оптимума при pH 6.0 и 8.0 и е най-активен при 60 °C и pH 8.0. Ензимът запазва повече от 80% от първоначалната си активност в широк диапазон на pH, от 5,0 до 11,0. ЦГТазата се инхибира силно от 15 mM Cu²⁺, Fe²⁺, Ag⁺ и Zn²⁺, докато някои метални йони, като Ca²⁺, Na⁺, K⁺ и Mo⁷⁺, оказват стимулиращ ефект в концентрация от 5 mM. Важната характеристика на изследваната ЦГТаза беше нейната висока термостабилност: ензимът запази почти 100% от първоначалната си активност след 2 h нагряване при 40–60 °C; неговият полуживот е 2 h при 70 °C в присъствието на 5 mM Ca²⁺. Постигнатото 50,7% превръщане на сурово царевично нишесте в 81,6% β- и 18,4% γ-CD след 24 h ензимна реакция при 60 °C и pH 8,0 прави *B. pseudocaliphilus* 8SB CGTase индустриално важен ензим за производството на циклодекстрин.

12. Antimicrobial activity of starch-degrading *Lactobacillus* strains isolated from boza

Petrova, P., Petrov, K.

Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2011, 25, 4, 114-116.

Abstract

The proved probiotic effects of boza consummation prompted the increasing interest in the microflora taking part in its fermentation. Boza is a rich source of probiotic lactic acid bacteria that are able to produce bacteriocins active against a number of pathogens. In the present study, three strains – *Lactobacillus paracasei* B41, *Lactobacillus plantarum* Bom 816, and *Lactobacillus pentosus* N3, isolated from boza and possessing significant amylolytic activity, were studied for their ability to repress the growth of common foodborne pathogens. All strains demonstrated antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae* and *Bacillus subtilis*. The results indicated possible bacteriocin production and made the strains desirable starters with application in cereals processing. None of the tested lactobacilli inhibited the growth of

Saccharomyces cerevisiae or *Pichia* strains, suggesting the existence of stable microbial community of yeasts and lactobacilli in boza starters.

Резюме

Доказаните пробиотични ефекти от консумацията на боза доведоха до нарастващия интерес към микрофлората, участваща в нейната ферментация. Бозата е богат източник на пробиотични млечнокисели бактерии, които са способни да произвеждат бактериоцини, активни срещу редица патогени. В настоящото проучване са изследвани три щама - *Lactobacillus paracasei* B41, *Lactobacillus plantarum* Bm 816 и *Lactobacillus pentosus* N3, изолирани от боза и притежаващи значителна амилолитична активност, за способността им да потискат растежа на често срещаните хранителни патогени. Всички щамове демонстрират антимикробна активност срещу *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae* и *Bacillus subtilis*. Резултатите показват възможно производство на бактериоцини и правят щамовете желани в преработката на зърнени култури. Нито един от тестваните лактобацили не инхибира растежа на щамовете *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia*, което предполага съществуването на стабилна микробна общност от дрожди и лактобацили при стартери от боза.

13. Патент Калоян Петров, Пенка Петрова, Венко Бешков (2014) “Метод за получаване на 2,3-бутандиол”, патент №66411, Бюлетин на патентното ведомство, (01.2014).

14. Lactic acid production from polysaccharides-containing raw materials

Tsvetanova F., Petrova P., Petrov K. Journal of International Scientific Publications, 12, 2018, ISSN:1314-7234, 197-211.

Abstract

To date, more than 90% of global lactic acid production is achieved by microbial fermentation of sugars. Despite the significant advantages of microbial production process over the chemical means, the final production cost is relatively high and still limits product application. In commercial scale, it is considered that a significant part of production cost is determined by the substrate cost, so the use of sugars is not so economically feasible. A promising alternative to overcome this problem is the development of new strategies for utilizing cheaper and abundant in nature materials, such as biomass or polysaccharides containing industrial residues. In this review are summarized the current problems and limitations of biological production process like the last achievements in lactic acid production from renewable raw resources, such as lignocelluloses, starchy materials and inulin-containing substrates. Although all these attempts are still on laboratory scale, they receive extensive attention because of their potential possibilities to replace sugars utilization in microbial lactic acid production and to provide an economically competitive and eco-friendly production process.

Резюме

Към днешна дата над 90% от световното производство на млечна киселина се постига чрез микробна ферментация на захари. Въпреки значителните предимства на микробния производствен процес пред химическите средства, крайните производствени разходи са относително високи и все още ограничават приложението на продукта. В търговски мащаб се счита, че значителна част от производствените разходи се определят от разходите за субстрата, така че използването на захари не е толкова икономически осъществимо. Обещаваща

алтернатива за преодоляване на този проблем е разработването на нови стратегии за използване на по-евтини и богати в природата материали като биомаса или полизахариди, съдържащи промишлени остатъци. В този преглед са обобщени актуалните проблеми и ограничения на биологичния производствен процес като последните постижения в производството на млечна киселина от възобновяеми суровини, като лигноцелулози, нишестени материали и субстрати, съдържащи инулин. Въпреки че всички тези опити са все още в лабораторен мащаб, те получават голямо внимание поради потенциалните им възможности да заместят използването на захари в производството на микробна млечна киселина и да осигурят икономически конкурентен и екологичен производствен процес.

15. Novel isolates of lactic acid bacteria display combined glycoside hydrolase activities

Velikova, P., Petrov, K., Tsvetanova, F., Petrova, P.

Microbiology for a better health and industry, 70th anniversary of the Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, 2017, ISBN:978-954-92882-2-3, 71-80.

Abstract

Modern trends in food industry require the development of functional foods that combine probiotic microbial content with prebiotic ingredients. Here we report a comprehensive study of strains, members of novel Bulgarian lactic acid bacteria collection that inhabit the special niche of the fermented cereals. The strains were identified, characterized and evaluated in terms of their capability to utilize prebiotic carbohydrates inulin, resistant starch, and soy oligosaccharides (raffinose). By gene transcription assay, it was found that seven different genes are engaged in starch degradation by *Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Enterococcus* isolates, as the gene expression levels were species and strain specific. The ability of *L. paracasei* strains to grow in media containing starch, inulin, or mix of them, as well as the elucidation of the genetic basis of these features, revealed that hydrolytic enzymes belonging to GH13 and GH32 families took part in the process of carbohydrates degradation. This opens the opportunity for strains advanced applications in prospective beneficial consumers' formulae.

Резюме

Съвременните тенденции в хранителната индустрия изискват разработването на функционални храни, които съчетават пробиотично микробно съдържание с пребиотични съставки. Тук докладваме цялостно изследване на щамове, членове на нова българска колекция млечнокисели бактерии, които обитават специалната ниша на ферментиралите зърнени култури. Щамовете бяха идентифицирани, характеризирани и оценени по отношение на способността им да използват пребиотични въглехидрати инулин, устойчиво нишесте и соеви олигозахариди (рафиноза). Чрез анализ на генната транскрипция беше установено, че седем различни гена участват в разграждането на нишестето чрез изолати на *Lactobacillus*, *Pediococcus* и *Enterococcus*, тъй като нивата на генна експресия са специфични за вида и щама. Способността на щамовете *L. paracasei* да растат в среда, съдържаща нишесте, инулин или смес от тях, както и изясняването на генетичната основа на тези характеристики разкриха, че хидролитичните ензими, принадлежащи към семейства GH13 и GH32, са участвали в процеса на разграждане на въглехидратите. Това отваря възможността за напрежение на напредналите приложения във формулите на потенциалните ползотворни потребители.

16. Construction of a new shuttle vector pZT1 applicable to hosts *Escherichia coli* and the ethanol producing *Zymomonas mobilis*

Popova, L., Petrov, K., Petrova, P.

ECOLOGICAL ENGINEERING AND ENVIRONMENT PROTECTION, 5, 2, National Society of Ecological Engineering and Environment Protection, 2015, 19-23.

Abstract

Zymomonas mobilis is a bacterium with high potential to produce ethanol via fermentation of glucose, sucrose or fructose. The need for broadening of its substrate spectrum requires the development of suitable host-vectors systems for gene cloning. Here we report the construction of a new shuttle vector, applicable to hosts *Escherichia coli* DH5 α and *Zymomonas mobilis* DSM424. It was based on pCR2.1-TOPOTM (*E. coli*) and contained the amplified and cloned replicon fragment (dso ori and repA gene) of 2.7 kb plasmid of *Z. mobilis*. As a reporter gene, cloned under Plac promoter control, was used amyBL encoding α -amylase in *Bacillus licheniformis* strain 44MB82/G. The obtained results revealed good stability of the shuttle vector pZT1 in both hosts, as *E. coli* DH5 α possessed also a high amylase activity due to the extracellular expression of the reporter gene. *Z. mobilis* DSM424 was able to maintain the shuttle vector, but amyBL was very poorly expressed, thus indicating that Plac promoter is rather not suitable for gene expression in this organism.

Резюме

Zymomonas mobilis е бактерия с висок потенциал да произвежда етанол чрез ферментация на глюкоза, захароза или фруктоза. Необходимостта от разширяване на неговия субстратен спектър изисква разработването на подходящи системи вектори-гостоприемници за клониране на гени. Тук описваме конструирането на нов совалков вектор, приложим за *Escherichia coli* DH5 α и *Zymomonas mobilis* DSM424. Той се основава на pCR2.1-TOPOTM (*E. coli*) и съдържа амплифицирания и клониран фрагмент (dso ori и repA ген) от 2.7 kb плазмид на *Z. mobilis*. Като репортерен ген, клониран под контрола на Plac промотор, беше използван amyBL, кодиращ α -амилаза в щам *Bacillus licheniformis* 44MB82 / G. Получените резултати разкриват добра стабилност на вектора pZT1 и при двата гостоприемника, като *E. coli* DH5 α притежава и висока амилазна активност поради екстрацелуларната експресия на репортерния ген. *Z. mobilis* DSM424 успя да поддържа вектора, но amyBL беше много слабо експресиран, което показва, че Plac промоторът по-скоро не е подходящ за генна експресия в този организъм.

17. Heterologous expression of amylase in *E. coli* and *Zymomonas mobilis* under sacC promoter control for ethanol production from starch

Popova, L., Petrova, P., Petrov, K.

НАУЧНИ ТРУДОВЕ НА УНИВЕРСИТЕТ ПО ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ - ПЛОВДИВ, LXII, 2015, ISSN:1314-7102, 494-498

Abstract

Z. mobilis is known as a promising economical alternative to presently used yeasts for ethanol production. When *Z. mobilis* is grown in sucrose medium, the extracellular sucrases hydrolyze the substrate. SacC was found to be the major responsible gene, and the strong sacC promoter was identified. In the present study, the shuttle vector pZT1, based on pCR2.1 vector and the replicon of 2.7 kb plasmid of *Z. mobilis* was used as a platform for cloning and expression of amyL encoding α -amylase under sacC promoter

control. PCR-amplified fragments containing either SacC promoter, or those followed by the sequence encoding signal peptide of *Z. mobilis* sucrase, were inserted upstream amyL. The obtained constructs were named pZT2 and pZT3. After transformation, both constructs were stably maintained in *E. coli* and *Z. mobilis*. The enzyme activity assay revealed a moderate extracellular expression of amyL in *E. coli* (0.07 and 0.09 U/ml) and 0.13 - 0.15 U/ml in *Z. mobilis*.

Резюме

Z. mobilis е известен като обещаваща икономическа алтернатива на използваните в момента дрожди за производство на етанол. Когато *Z. mobilis* се отглежда в захарозна среда, извънклетъчните захари хидролизират субстрата. Установено е, че SacC е основният отговорен ген и е идентифициран силният промотор на sacC. В настоящото проучване совалковият вектор pZT1, базиран на pCR2.1 вектор и репликонът на 2.7 kb плазмид на *Z. mobilis*, беше използван като платформа за клониране и експресия на amyL, кодираща α -амилаза под контрола на промотора sacC. PCR-амплифицирани фрагменти, съдържащи или SacC промотор, или тези, последвани от секвенция, кодираща сигналния пептид на гена за захараза на *Z. mobilis*, бяха вмъкнати преди гена amyL. Получените конструктори бяха наречени pZT2 и pZT3. След трансформацията и двата конструктора се поддържаха стабилно в *E. coli* и *Z. mobilis*. Изследването на ензимната активност разкрива умерена извънклетъчна експресия на amyL в *E. coli* (0,07 и 0,09 U / ml) и 0,13 - 0,15 U/ml в *Z. mobilis*.

18. Immobilization of recombinant CGTase JCGT8-5 on magnetically – modified silicates and natural supports

Ivanova, V., Petrov, K., Safarikova M., Petrova, P., Tonkova A., Delchev N.

International Review of Chemical Engineering (IRECHE), 6, 1, Praise Worthy Prize Publishing House, 2014, ISSN:2035-1755, 1-8

Abstract

Recombinant cyclodextrin glucanotransferase JCGT8-5 (CGTase, EC 2.4.1.19) was effectively immobilized by adsorption on magnetically-modified particles. Silicates (montmorillonite and halloysite), natural supports (oat straw, wheat bran, banana peel, sawdust, hazelnut and peanut shell, coffee beans, tea leaves, algae *Chlorella vulgaris*) and activated carbon were engaged as carriers, as the most of them were used for the first time for enzyme adsorption. The immobilization capacities of the carriers entrapping ultra-concentrate or purified enzyme were determined. Binding yields reached from 50% to 90% of the initial enzyme quantity. The analysis of the formed cyclodextrins (CDs) revealed that the highest amount of total CDs was obtained by the use of halloysite particles (10.1 mg/ml), followed by sawdust (8.6 mg/ml), algae (8.6 mg/ml) and peanut shell (8.2 mg/ml). A high degree of starch conversion into CDs, ranging from 21 to 25% was achieved for 20 min starch hydrolysis. Variations in γ -CD: α -CD: β -CD ratios due to the immobilization on the different carriers were observed. The six-fold reuse of the magnetic biocatalysts containing purified recombinant CGTase bound to halloysite, washed algae or sawdust provided 29-36 mg/ml CD yield without presence of α -CD for 120 min starch hydrolysis.

Резюме

Рекомбинантната циклодекстрин глюканотрансфераза JCGT8-5 (CGTase, EC 2.4.1.19) беше ефективно имобилизирана чрез адсорбция върху магнитно модифицирани частици. Като носители бяха ангажирани силикати

(монтморилонит и халоизит), естествени носители (овесена слама, пшенични трици, кори от банани, дървени стърготини, черупки от лешник и фъстъци, кафе на зърна, чаени листа, водорасли *Chlorella vulgaris*) и активен въглен, като повечето от тях бяха използвани за първи път за ензимна адсорбция. Определени бяха имобилизационните способности на носителите, улавящи ултраконцентрат или пречистен ензим. Добивът на свързване достига от 50% до 90% от първоначалното количество ензим. Анализът на образуваните циклодекстрини (CD) разкри, че най-голямо количество от общите CDs е получено чрез използване на халоизитни частици (10,1 mg/ml), последвано от дървени стърготини (8,6 mg/ml), водорасли (8,6 mg/ml) и черупка от фъстъци (8,2 mg/ml). Постигната е висока степен на преобразуване на нишесте в CD, варираща от 21 до 25% за 20-минутна хидролиза на нишесте. Наблюдавани са вариации в съотношенията γ -CD: α -CD: β -CD поради имобилизацията върху различните носители. Шесткратното повторно използване на магнитните биокатализатори, съдържащи пречистена рекомбинантна CGTase, свързана с халоизит, измити водорасли или дървени стърготини, осигурява 29-36 mg/ml CD добив без наличие на α -CD за 120 минути нишестена хидролиза.

19. Enhanced heterologous gene expression in diploid cells of methylotrophic yeast *Hansenula (Ogataea) polymorpha*

Stoyanov A., Petrova P., Lahtchev K.

Journal of BioScience and Biotechnology, 3, 3, PLOVDIV UNIVERSITY PRESS "PAISII HILENDARSKI", 2014, ISSN:1314-6246, 247-252

Abstract

The expression of bacterial *gusA* gene encoding for *E. coli* enzyme β -glucuronidase in haploid and diploid cells of methylotrophic yeast *Hansenula (Ogataea) polymorpha* was studied. Haploid strains were transformed with plasmid carrying *gusA* gene under the control of strong alcohol oxidase (AOX) promoter and several *Gus*⁺ transformants were isolated. They were crossed with wild type strains lacking *Gus* activity. The resulting diploids were sporulated and several meiotic segregants with increased *Gus* activity were isolated. Some of these segregants were crossed and the corresponding diploid strains were obtained. It was found that *Gus* activity of diploid strains was twice higher compared to haploids, whereas *Gus* activity of diploids was increased about six fold compared to those of haploids. Our results can be used as an approach for development of yeast strains with elevated expression of heterologous proteins.

Резюме

Изследвана е експресията на бактериален *gusA* ген, кодиращ ензим β -глюкуронидаза на *E. coli* в хаплоидни и диплоидни клетки на метилотрофни дрожди *Hansenula (Ogataea) polymorpha*. Хаплоидните щамове бяха трансформирани с плазмид, носещ *gusA* ген под контрола на промотор на силна алкохолна оксидаза (AOX) и бяха изолирани няколко *Gus*⁺ трансформанти. Те бяха кръстосани с щамове от див тип, които нямат активност на *Gus*. Получените диплоиди бяха спорообразни и бяха изолирани няколко мейотични сегреганти с повишена *Gus* активност. Някои от тези сегреганти бяха кръстосани и бяха получени съответните диплоидни щамове. Установено е, че *Gus* активността на диплоидните щамове е била два пъти по-висока в сравнение с хаплоидите, докато *Gus* активността на диплоидите е била увеличена около шест пъти в сравнение с тази на хаплоидите. Нашите резултати могат да се използват като подход за развитие на щамове на дрожди с повишена експресия на хетероложни протеини.

20. Novel Bulgarian *Lactobacillus* strains ferment prebiotic carbohydrates

Velikova, P. V., Blagoeva, G. I., Gotcheva, V. G., Petrova, P. M.

Journal of BioScience and Biotechnology, SE-2014, Plovdiv University Press "Paisii Hilendarski", 2014, ISSN:1314-6246, 55-60

Abstract

Prebiotics are non-digestible food ingredients that stimulate the growth or activity of the beneficial to human health bacteria in the digestive system. Generally, the prebiotic should increase the number of potentially probiotic lactic acid bacteria if they could convert it. The aim of this study is to isolate strains belonging to genus *Lactobacillus* and to examine their capability to grow in media containing prebiotic carbohydrates as a sole carbon source. Thus, thirty two *Lactobacillus* strains were checked for its ability to convert the following mono-, di-, and trisaccharides: xylose, galactose, mannose, arabinose, fructose, rhamnose, cellobiose, melibiose, and raffinose, and also the polysaccharides inulin, xylan, carboxymethyl cellulose and pullulan. Our results revealed that all strains ferment to lactic acid galactose and mannose, and most of them - arabinose, cellobiose or fructose. Eleven strains convert melibiose (gal-glu), twelve - raffinose (gal-glu-fru). Observing the strains' capacity to hydrolyze long-chain carbohydrates, 2 strains were found to be able to ferment carboxymethyl cellulose, 4 – inulin, and no one converted xylan and pullulan. The putative gene responsible for the inulin degradation by two *Lactobacillus* strains was identified by PCR with specific primer pair. These results are important for the future application of the tested *Lactobacillus* strains in food industry. They may be useful for the development of functional foods containing prebiotic carbohydrates as well.

Резюме

Пребиотиците са несмилаеми хранителни съставки, които стимулират растежа или активността на полезните за човешкото здраве бактерии в храносмилателната система. Като цяло пребиотикът трябва да увеличи броя на потенциално пробиотичните млечнокисели бактерии, ако могат да го преобразуват. Целта на това проучване е да се изолират щамове, принадлежащи към род *Lactobacillus* и да се изследва способността им да растат в среда, съдържаща пребиотични въглехидрати като единствен източник на въглерод. По този начин бяха проверени тридесет и два щамове *Lactobacillus* за способността му да конвертира следните моно-, ди- и тризахариди: ксилоза, галактоза, маноза, арабиноза, фруктоза, рамноза, целобиоза, мелибиоза и рафиноза, а също и полизахаридите инулин, ксилан, карбоксиметил целулоза и пулулан. Резултатите ни разкриха, че всички щамове ферментират до млечнокисела галактоза и маноза, а повечето от тях - арабиноза, целобиоза или фруктоза. Единадесет щамове превръщат мелибиоза (gal-glu), дванадесет - рафиноза (gal-glu-fru). Наблюдавайки способността на щамовете да хидролизират дълговерижни въглехидрати, беше установено, че 2 щамове могат да ферментират карбоксиметил целулоза, 4 - инулин и никой не е преобразувал ксилан и пулулан. Предполагаемият ген, отговорен за разграждането на инулина от два щамове *Lactobacillus*, е идентифициран чрез PCR със специфична двойка праймери. Тези резултати са важни за бъдещото приложение на тестваните щамове *Lactobacillus* в хранителната промишленост. Те могат да бъдат полезни и за развитието на функционални храни, съдържащи пребиотични въглехидрати.

21. Regulation of amylase genes expression in lactic acid bacteria

Petrova P., Tsvetanova F., Petrov, K.

New Trends in Microbiology, In: 65th Anniversary of the Stephan Angeloff Institute of Microbiology, 2012, ISBN:978-954-92882-1-6, 11, 193-203.

Abstract

The enzymes α -amylases (EC 3.2.1.1) are endo-glycosyl hydrolases that randomly cleave the α -1, 4-glycosidic bonds in starch. Their family in lactic acid bacteria (LAB) consists of several enzymes with unclear structures, because of the long-term opinion that this type of bacteria lack starch-degrading ability. On the other hand, the sugar utilization has been extensively studied in LAB, because of its significant role in the industrial fermentations. Most genes involved in sugar catabolism are organized into operons that are strongly expressed and controlled at the level of transcription initiation and are subjected to CcpA-dependent catabolite repression.

In the present study the molecular structures of different amylase genes, presented in the genomes of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* B84 and *Lactobacillus paracasei* B41, are described. Four genes for enzymes, involved in starch degradation were detected in B84 genome: *amyL*, *amyY*, *glgP* and *apu*, coding cytoplasmic and extracellular alpha-amylases, glycogen phosphorylase and amylopullulanase. Reverse transcription PCR experiments showed that both genes, encoding alpha-amylases (*amyL* and *amyY*), were expressed into mRNAs. The genetic basis of *Lactobacillus paracasei* B41 amylolytic properties were investigated and discussed. CRE-site for CcpA-recognition was found and the putative mechanism of gene expression regulation was proved by Northern hybridization experiments.

Резюме

Ензимите α -амилази (EC 3.2.1.1) са α -глюканази, които късат α -1-4 връзките във вътрешността на нишестето на случаен принцип. Тази група ензими при млечнокиселите бактерии се състои от няколко различни ензима с неясна структура. Макар че досега се считаше, че МКБ нямат амилазна активност, усвояването на различни захари при тази група микроорганизми беше добре изучено. Повечето от гените, участващи в захарния метаболизъм са организирани в оперони под контрола на CcpA-зависима катаболитна репресия. В настоящото изследване се разкриват молекулните структури на различни амилазни гени, присъстващи в геномите на *Lactococcus lactis* B84 и *Lactobacillus paracasei* B41. Четири гена за ензими, свързани с хидролизата на нишестето са доказани при *Lactococcus lactis* B84: *amyY*, *amyL*, *glgP* и *apu*, кодиращи цитоплазматични и извънклетъчни амилази, гликоген-фосфорилаза и амилопулуланаза. RT-PCR експерименти доказаха, че и двата гена, кодиращи амилази се експресират в иРНК. Генетичните основи на амилазната активност на *Lactobacillus paracasei* B41 също са разгледани и дискутирани. Разкрито е наличието на CRE-сайт за разпознаване на CcpA белтъка, а посочения механизъм на контрол над експресията бе доказан чрез Northern-хипридизация.

23. Covalent attachment of cyclodextrin glucanotransferase from genetically modified Escherichia coli on surface functionalized silica coated carriers and magnetic particles

Ivanova, V., Tonkova, A., Petrov, K., Petrova, P., Gencheva, P.

Journal of BioScience and Biotechnology, pp. 7-13, SE, Plovdiv University Press "Paisii Hilendarski", 2012, ISSN:1314-6246, 7-13.

Abstract

Recombinant cyclodextrin glucanotransferase JCGT8-5 (CGTase, EC 2.4.1.19) was effectively immobilized by formation of chemical bounds on polyethylenimine (PEI)-activated silica particles, on silanized Spherosils 5, XOA200, XOC 005, Arylamine CPG and magnetite Fe₃O₄ (Fe(II)O.Fe(III)2O₃) micro-particles and by adsorption on magnetite/activated carbon support. The immobilization capacities of the carriers were determined. Binding yields reached from 50% to 93%. The amount of bound enzyme was considerably higher when this protein was immobilized on polyethylenimine (PEI)-activated silica particles and silanized Spherosil 5, XOA and XOC micro-particles and reached 1.33-1.77 mg/g support. Arylamine CPG and the activated carbon/magnetite support also possessed high binding capacities – 0.73-0.78 mg enzyme/g carrier. Analysis of formed CDs revealed changes in the β-cyclodextrin: γ-cyclodextrin ratio due to immobilization.

Резюме

Рекомбинантната циклодекстрин глюканотрансфераза JCGT8-5 (CGTase, EC 2.4.1.19) беше ефективно имобилизирана чрез образуване на химически граници върху активирани с полиетиленмин (PEI) частици силициев диоксид, върху силанизирани сферозили 5, XOA200, XOC 005, ариламин CPG и магнетит Fe₃O₄ (Fe(II) O.Fe(III) 2O₃) микрочастици и чрез адсорбция върху подложка от магнетит / активен въглен. Определени бяха имобилизационните способности на носителите. Добивите на свързване достигат от 50% до 93%. Количеството на свързания ензим беше значително по-високо, когато този протеин беше имобилизиран върху активирани с полиетиленмин (PEI) частици силициев диоксид и силанизирани микрочастици Spherosil 5, XOA и XOC и достигна подкрепа от 1,33-1,77 mg / g. Ариламин CPG и поддържащият активен въглен / магнетит също притежават висок капацитет на свързване - 0.73-0.78 mg ензим / g носител. Анализът на формираните CDs разкрива промени в съотношението β-циклодекстрин: γ-циклодекстрин поради имобилизация.

24. Current content and unique properties of Lactic acid bacteria in indigenously homemade yogurt in Bulgaria

Petrova, P.

Conference Reports, International Dairy Sci-Tech & Innovation Conference, November, 17 - 18, 2017, Shanghai, China, p. 147-154.

Abstract

The specific natural and climatic conditions in Bulgaria had contributed for the spontaneous evolution of starter cultures, usually associated with the good health and the longevity of the yogurt consumers. Aiming to isolate unique strains of Lactic acid bacteria (LAB) that have acquired special properties over the centuries, about eighty distinct yogurt samples from remote territories (towns-museums, small villages, monasteries) in

the country were collected. Although there are many regions, known to contain endemic micro flora (Tran, Balkan Mountain, Thracian and Rose valleys), the largest biodiversity of LAB was observed in the samples from Rhodope Mountains. The strains isolated from cow's, sheep's, goat's, or buffalo's products, derived from homemade yogurt according to the ancient national receipts. The results obtained by 16S rRNA gene's sequencing showed that the new isolates belong to the species *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, and genera *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella*. The strains were characterized in terms of their acidifying ability (in skimmed milk, or in lactose medium); the percentage of the optical isomers of lactic acid; exopolysaccharides production; proteolytic activity and the capability to produce antimicrobial substances. Several *L. bulgaricus* strains were found to synthesize galacto oligosaccharides (GOS), which are well known as valuable prebiotic carbohydrates. The comprehensive genetic characterization of particular LAB strains and the further analysis of the liquid and volatile metabolites are in progress. These results would uncover the traits bringing the authentic Bulgarian yogurt fragrance and would reveal the reason for the proven beneficial effects of the product. The known origin and the good technological properties of the new isolated strains would allow their successful application in starters, developed for the "Original Bulgarian type yogurt" manufacturing.

Резюме

Специфичните природни и климатични условия в България допринесоха за спонтанното развитие на закваските, обикновено свързани с доброто здраве и дълголетието на консуматорите на кисело мляко. С цел изолиране на уникални щамове млечнокисели бактерии (МКБ), които са придобили специални свойства през вековете, са събрани около осемдесет различни проби кисело мляко от отдалечени територии (градове-музеи, малки села, манастири) в страната. Въпреки че има много региони, за които е известно, че съдържат ендемична микрофлора (Трън, Стара планина, Тракийска и Розова долини), най-голямото биоразнообразие на МКБ е наблюдавано в пробите от Родопите. Щамовете, изолирани от краве, овце, кози или биволски продукти, получени от домашно кисело мляко според древните национални рецепти. Резултатите, получени чрез секвениране на ген 16S рПНК, показват, че новите изолати принадлежат към видовете *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. paracasei* и родовете *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* и *Weissella*. Щамовете се характеризират по отношение на тяхната подкиселяваща способност (в обезмаслено мляко или в лактозна среда); процентът на оптичните изомери на млечната киселина; производство на екзополисахариди; протеолитична активност и способността да произвеждат антимикробни вещества. Установено е, че няколко щама *L. bulgaricus* синтезират галакто олигозахариди (GOS), които са добре известни като ценни пребиотични въглехидрати. В ход е цялостната генетична характеристика на определени LAB щамове и по-нататъшният анализ на течните и летливи метаболити. Тези резултати биха разкрили чертите, донасящи автентичния български аромат на кисело мляко и биха разкрили причината за доказаните полезни ефекти на продукта. Известният произход и добрите технологични свойства на новите изолирани щамове биха позволили тяхното успешно приложение в предястия, разработени за производството на „Оригинален български тип кисело мляко“.