



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“

Пенка Младенова Петрова

**Молекулярно-биологични изследвания на нови
бактериални гликозид-хидролази с промишлено
приложение**

Автореферат

на дисертационен труд
за присъждане на научната степен „Доктор на науките“
Професионално направление 4.3. Биологически науки

Научно жури:

проф. дн Тодор Кантарджиев
проф. дн Иван Атанасов
проф. д-р Румяна Миронова
проф. д-р Мариела Оджакова
проф. д-р Пенка Мончева
доц. д-р Людмила Кабаиванова
доц. д-р Милен Георгиев
(Резерви: чл.-кор. дн Христо Найденски, проф. д-р Нели Георгиева)

София 2019

Дисертационният труд съдържа разделите въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, заключение, изводи, приноси, списък на използваните литературни източници и списък на авторските публикации по темата дисертацията. Обемът му е 358 страници, включва 52 таблици и 140 фигури. Списъкът на цитираната литература наброява 625 източника. Публикациите, свързани с темата на дисертацията са 33. От тях, две са глави от книги, 18 са статии в списания с импакт фактор, една статия е в списание с SJR, а 4 публикации са доклади, публикувани в сборници от международни конференции. Публикациите по дисертацията са цитирани 268 пъти.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Националния семинар по обща микробиология на 18.11.2019 г. и е насочен към защита на заседание на Научния съвет на ИМикБ с Протокол №12/28.11.2019 г. Защитата на дисертационния труд ще се проведе на2020 г. Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Института по микробиология "Стефан Ангелов" , ул. "Акад. Г. Бончев", бл. 26, каб. 218.

Съдържание

Списък на използваните съкращения	4
Въведение	5
Преглед на литературния обзор	7
Цел и задачи	8
Материали и методи	9
Резултати и обсъждане	10
Молекулярно-биологични изследвания на гликозид-хидролазни ензими при МКБ	10
Гликозид-хидролазни ензими при род <i>Bacillus</i>	71
Молекулярно-биологични изследвания на гликозид-хидролазни ензими със субстрат сиалова киселина (CAZy GH33)	101
Молекулярни изследвания на β -глюкуронидаза (CAZy GH2)	105
Заклучение	109
Изводи	111
Приноси	113
 Списък на научни публикации, свързани с темата на дисертацията	 115

Списък на използваните съкращения

МКБ - млечнокисели бактерии
аМКБ - амилалитични млечнокисели бактерии
ГИТ - гастро-интестинален тракт
ФОЗ - фруктоолигозахариди
ГОЗ - галактоолигозахариди
Dig - дигоксигенин (digoxigenin)
PTS - фосфоенолпируват-зависима фосфотрансферазна система
amy1 - ген, кодиращ α -амилаза (α -amylase)
glgP - ген, кодиращ гликоген-фосфорилаза (glycogen-phosphorilase)
glgB - ген, кодиращ 1-4- α -глюкан разклоняващ ензим
agl - ген, кодиращ α -глюкозидаза (α -glucosidase)
mall - ген, кодиращ олиго-1-6-глюкозидаза
treC - ген, кодиращ олиго-1-6-глюкозидаза (трехалозо-6-фосфат-хидролаза)
dexC - ген, кодиращ неопулуланаза (neopullulanase)
DEPC - диетилпирокарбонат (diethylpyrocarbonate)
CFU/мл - колония образуващи единици за мл (colony forming units/ml)
CRISPR - клъстер от равномерно прекъснати къси палиндромни повтори
ЕС номер – нумерична класификационна схема на ензимите (IUPAC)
SDS - натриев додецил сулфат (sodium dodecyl sulfate)
ПАГЕ - полиакриламидна гел електрофореза (polyacrylamide gel electrophoresis)
ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина
РНК - рибонуклеинова киселина
иРНК - информационна рибонуклеинова киселина
bp - базови двойки (base pair)
InuB41 - β -фруктозидаза, продуцирана от щам *Lactobacillus paracasei* B41
InuLC1 - β -фруктозидаза, продуцирана от щам *Lactobacillus paracasei* LC1
Km - Константа на Михаелис-Ментен
V_{max} - максимална скорост на ензимната реакция
RT-PCR - обратно-транскриптазна полимеразна верижна реакция
cre - катаболитно отговорен елемент (catabolite responsive element)
GH - гликозид-хидролаза (glycoside hydrolase)
DP - степен на полимеризация (degree of polymerization)
ATCC - Американска колекция за микроорганизми (American Type Culture Collection)
DSMZ - Немска колекция за микроорганизми и клетъчни култури (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)
SBD – домен за свързване със субстрата (substrate binding domain)
rpm – обороти за мин (rotation per minute)
RAPD – случайно амплифициране на полиморфни ДНК секвенции (Randomly amplified polymorphic DNA)
ARDRA – рестрикционен анализ на амплифицирана рДНК (Amplified rDNA restriction analysis)
RFLP – полиморфизъм в дължината на рестрикционните фрагменти

Въведение

Ензимни препарати под формата на екстракти от растителни и животински тъкани се използват от хилядолетия, много преди да се установи съществуването на самите ензими. Съвременното производство на хляб и тестени изделия, месо и колбаси, пиво, вино, получаването на разнообразна гама от млечни продукти, модификацията на хранителни протеини, избистрянето на сокове и преработката на плодове и зеленчуци изискват добавката на тонове ензими от семейството на гликозид-хидролазите.

След разкриването на икономическите ползи от употребата на ензимни препарати за подобряване на вкусовете и хранителни качества и удължаване на срока на годност на продуктите, през втората половина на XX век започва развитието на редица биотехнологии за промишлено производство на ензими от гъбни и бактериални щамове-свърхпроизводители. Отговаряйки на тогавашните нужди на промишлеността, Институтът по микробиология „Стефан Ангелов“ също развива интензивно това направление. Разработени са технологии за получаване на термостабилни амилази, липази, инулинази и пулуланизи, а част от тях са защитени с български патенти.

Нов фокус върху изследванията на гликозид-хидролазите през последното десетилетие дават новите тенденции в медицината, диетологията и *нутрициологията* (науката за храненето), екологията и валоризацията на отпадъците. Настоящата дисертация разглежда богатия спектър от бактериални гликозид-хидролазни ензими, изучени с похватите на съвременните омикс-технологии. Най-обширни в нея са изследванията на ензимите, отговорни за разграждането или синтеза на пребиотичните въглехидрати (инулин, фруктоолигозахариди, галактоолигозахариди и нишесте) от млечнокисели бактерии, тъй като те имат огромно приложение в хранителната промишленост и медицината. Съчетанието на синергичното действие на пребиотичните бактерии и пребиотичните въглехидрати винаги се основава на специфични молекулярни взаимодействия между бактериите и полизахаридните молекули. Синбиотиците са съвременен терапевтично средство за лечение и превенция на гастро-интестинални проблеми при човека, а тяхното приложение води до много по-успешни резултати в сравнение със самостоятелната употреба на пробиотици. Разработването на такива препарати обаче, изисква изолирането на нови щамове МКБ, способни да разграждат или синтезират пребиотици.

В десетилетието на провеждане на изследванията бяха натрупани нови данни за гликозидазите на МКБ. Представените в настоящата дисертация изследвания на амилазните и фруктозидазни ензими бяха едни от първите и значително допринесоха за развитието на световното

знание в областта. В дисертационния труд са представени иновативни изследвания на биохимичните пътища и механизмите на пребиотичната микробна хидролиза. Изяснени са генетичните предпоставки, на които се основават взаимоотношенията между бактериалните видове и пребиотиците. Разкрити са нови биоинформатични данни, свързани с гените и ензимите, участващи в хидролизата на въглехидратите от МКБ. Данните за хетероложната експресия и регулацията на генната активност при МКБ разкриват сложни механизми, чието познаване открива нови възможности за индустриални приложения.

Друго успешно направление в работата бе свързано с изолирането на нови ензими с циклодекстрин-глюканотрансферазна активност. Световният интерес към тези ензими е продиктуван от широкото приложение на техните продукти циклодекстрини в различни отрасли като средство за „капсулиране“, пренос и съхранение на биологично активни вещества. Представените в този раздел резултати имат значителен принос, тъй като са свързани със създаването на една от първите рекомбинантни ЦГТ-ази. Освен това, успешното имобилизиране на тези ензими в природни магнитно-модифицирани носители и разработването на нов метод за многократно използване на биокатализаторите доведе до получаването на най-високите добиви на циклодекстрини в света, като продукцията им бе многократно по-ефективна в сравнение с употребата на природни ензими.

Един от разделите в дисертацията е посветен на първото в света изследване на ген *nanH*, кодиращ ензим неураминидаза при нетоксигенен щам *Vibrio cholerae*. Тези резултати дават възможност за първото промишлено производство на сиалидаза от безвреден бактериален продуцент. Не на последно място, представените изследвания имат принос към екологията и оползотворяването на органичните отпадъци от селското стопанство и целулозо-преработвателната промишленост. В настоящата работа е изследван биохимичният и генетичен потенциал на нови бацилни продуценти на ензими, разграждащи целулоза и лигноцелулоза за получаване на ценни продукти от възобновяеми природни ресурси. Геномът на щам *Bacillus velezensis*, представен в дисертацията е първият бактериален геном, секвениран и аотиран от български екип от учени.

Представянето на щамове-продуценти и генетичните и биохимични характеристики на продуцираните от тях гликозид-хидролази в систематичен вид е основа за следващи перспективни начинания като био-банкиране, разработване на нови системи за клониране и експресия на гени и напредък в биоинформатичните изследвания на прокариоти.

Преглед на литературния обзор

Тъй като хидролазните ензими стоят в основата на катаболизма, еволюцията на бактериалните гликозид-хидролази е една от причините за разпространение на бактериите във всички известни хабитати. Изучаването на ензимното разнообразие и кодиращите гени допринася за допълване на знанието за генетичните адаптивни и еволюционните механизми и за филогенетичните връзки между различни микробни групи. От друга страна, към гликозид-хидролазите спадат едни от най-важните индустриални ензими с приложения в хранително-вкусовата промишленост, медицината, фармацията и биотехнологиите. Грам-положителните бактерии са главни продуценти в промишлените производства на амилази, пулуланизи, ЦГТ-ази и инулинази. Макар, че бацилните продуценти на амилази и пулуланизи са добре изучени, малко информация има за гените, кодиращи ЦГТ-ази при някои групи бацили, особено алкалофилни бацили.

Бактериите играят важна роля в природния кръговрат на въглерода заради способността им да разграждат сложни полизахариди, част от растителната биомаса. Приложението им в процеси на валоризация на селскостопански отпадъци в едностъпални процеси на хидролиза на възобновяеми субстрати и синтез на ценни продукти засега има голям потенциал и е слабо проучено.

Макар, че млечнокиселите бактерии са широко използвани в зърнени хранителни ферментации, за МКБ доскоро се считаше, че нямат амилазна или инулиназна активност и изолираните щамове с такъв фенотип бяха голяма рядкост. Генетичните основи на тези нетипични за МКБ ензимни активности са неясни, като са изолирани отделни гени с малка степен на сходство помежду им. Днес МКБ се употребяват широко като пробиотици и при създаването на нови синбиотични формули - комбинация между пробиотичен щам и пребиотични въглехидрати, които да поддържат неговото мултиплициране в ГИТ. Това налага изясняване на механизмите на усвояване на пребиотични фибри от пребиотичните щамове, в основата на които са гликозид-хидролазите, синтезирани от МКБ. Проучването на генетичните и биохимични "взаимоотношения" между пробиотичния щам и пребиотичните фибри биха дали нова информация за способността на бактериите да усвояват фибрите, както и потенциално да синтезират такива. Селекцията на МКБ с амилазна активност би дала възможност за разработването на нов клас амилотични пробиотици с важни приложения при пациенти с хранителни алергии.

Структурният и функционален анализ на гените и ензимите, отговорни за усвояването на ФОЗ и инулин допринасят за разбиране на механизма на този процес, което е важно при разработването на синбиотични продукти. Характеризирането на ензими с амилазна, β -фруктозидазна или β -галактозидазна активност от щамове МКБ са

изключително ценни за изясняването на фината синбиотична връзка между про- и пребиотиците. В научната литература липсват данни за пречистване на подобни ензими, техните биохимични отнасяния, или за отговорните гени.

Цел и задачи

Гликозид-хидролазните ензими принадлежат към различни по своята протеинова структура ензимни семейства. Многообразието на ензими и бактериални продуценти изисква интердисциплинарен подход, съчетаващ познания в областта на микробиологията, биохимията, ензимологията и молекулярната биология, рекомбинантните ДНК технологии, транскриптомиката и биоинформатиката. Базирайки се на прилагането на новите технологии в тези научни области, настоящата разработка си постави следната

Цел:

Молекулярно-биологично характеризиране на нови гликозид-хидролази и създаване на рекомбинантни ензими с подобрени свойства и приложение в индустрията и медицината.

Постигането на целта бе извършено в хода на изпълнение на следните **основни задачи**:

1. Изучаване на гликозид-хидролазни ензими при млечнокисели бактерии

1.1. Молекулярно-биологични изследвания на гликозид-хидролазни ензими със субстрат α -глюкани. Изолиране и идентификация на млечнокисели бактерии-продуценти на ензими с амилазна активност. Идентифициране, секвениране и транскрипционен анализ на гените, кодиращи ензими, участващи в хидролизата на нишесте. Клониране и хетероложна експресия на гени, кодиращи нови ензими с амилазна активност.

1.2. Молекулярно-биологични изследвания на гликозид-хидролазни ензими със субстрат инулин и фрукто-олигозахариди. Изолиране, клониране и секвениране на гени, кодиращи фруктан- β -фруктозидази при *L. paracasei*. Екстрахиране, пречистване и характеризиране на ензимите. Анализ на генната експресия в среда, съдържаща смесени субстрати нишесте/инулин. Изучаване на белтъчните системи за транспорт на захари при *Pediococcus acidilactici*.

1.3. Молекулярно проучване на ензими с β -галактозидазна активност (синтез на галактоолигозахариди).

1.4. Изследване на пробиотични и технологични характеристики на МКБ.

2. Изучаване на ензими, проявяващи гликозид-хидролазна активност при видове от род *Bacillus*

2.1. Нови и рекомбинантни цикломалтодекстрин-глюканотрансферази (ЦГТ-ази). Изолиране на бацилни щамове с

циклодестрин-глюканотрансферазна активност, пречистване на ензима, секвениране на отговорния ген и хетероложна експресия. Имобилизирани на ензима с ЦГТ-азна активност в магнитно-модифицирани носители. Разработване на метод за многократно използване на биокатализатора, съдържащ рекомбинантна ЦГТ-аза.

2.2. Изолиране на бактериални продуценти на ензими, разграждащи целулоза и хемицелулоза.

3. Молекулярно-биологични изследвания на неураминидаза при нетоксигенен щам *Vibrio cholerae*.

4. Хетероложна експресия на β -глюкуронидаза от *Escherichia coli* в дрожди от вида *O. polymorpha*.

Материали и методи

1. Микробиологични методи

- Бактериални щамове, хранителни среди, култивиране и съхранение
- Количествена оценка на L (+) и D (-) млечна киселина
- Тест за протеазна активност
- Тест за продукция на екзополисахариди
- Анализ на антибактериална активност

2. Биохимични и аналитични методи

- Усвояване на моно-, ди-, три- и полизахариди
- Измерване количеството на редуциращи захари и белтък
- Количествено определяне на ензимни активности: амилазна, β -фруктозидазна, ЦГТ-азна, β -глюкуронидазна
- Определяне на рН и температурен оптимум на ензими
- Влияние на различни метални йони и ЕДТА върху ензимната активност
- Определяне на субстратна специфичност на ензимите
- Количествено определяне на получените метаболити чрез HPLC
- Високоэффективен LC-MS анализ (HRAMS)

3. Молекулярно биологични методи

- Изолиране на тотална ДНК и РНК от грам-положителни бактерии
- Изолиране на плазмидна ДНК от *E. coli*
- PCR-амплификация и RT-PCR
- RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA-PCR)
- Мултилокусен анализ MLST (Multi Locus Sequence Typing)
- Пулсова електрофореза PFGE (Pulse field gel electrophoresis)
- Пречистване на амплификационни продукти
- Клониране на пречистен PCR продукт
- Трансформация на *E. coli*
- Секвениране и филогенетични анализи
- Екстракция на клетъчно-свързани протеини
- Пречистване на екстрахирани клетъчно-свързани протеини
- Пречистване на ЦГТ-азни ензими
- Електрофоретичен анализ на ДНК и белтъчни молекули
- ДНК- и РНК- хибридизационни методи

Резултати и обсъждане

В настоящата работа са включени десетки видове и щамове бактерии, някои от които са използвани като продуценти на ензими, а други - като гостоприемници при хетероложната експресия на гени, кодиращи гликозид-хидролази. По-долу в детайли е разгледана активността, субстратната специфичност и структурата на ензими със субстрат въглехидрати при Грам-положителни млечнокисели бактерии и такива от род *Bacillus*, като фокусът в изследванията е върху разкриване на генетичните детерминанти, определящи ензимната активност - секвениране на гените и проучване на механизмите, влияещи върху генната експресия. Някои от щамовете с проучени ценни ензимни активности имат доказано потенциално приложение при разработване на биотехнологии, синбиотични продукти и функционални храни.

1. Молекулярно-биологични изследвания на гликозид-хидролазни ензими при млечнокисели бактерии (МКБ)

Уникалните природни и климатични условия в България са допринесли за спонтанната еволюция на щамове млечнокисели бактерии (МКБ) с доказано пробиотично въздействие върху човешкото здраве. Пробиотичните МКБ най-често са с хранителен или с човешки произход и се развиват само в богата среда, с високо съдържание на моно- и дизахариди. Те обикновено са неприложими при ферментацията на други субстрати, напр. нишесте или инулин-съдържащи суровини, тъй като не проявяват ензимни активности, необходими за разграждането на полизахариди. Съвременните тенденции в разработването на нови бактериални препарати обаче, са насочени към употребата на синбиотици - лекарствени средства, които съдържат пребиотични щамове, способни да консумират или да произвеждат пребиотични въглехидрати. Ето защо характеризирането на щамове МКБ с нови или рядко проявявани гликозид-хидролазни активности дава възможност за разработване на нови синбиотични препарати и функционални храни с нови качества и разширява научните познания за генетичните и биохимични механизми за адаптация на МКБ.

1.1. Изолиране и идентификация на млечнокисели бактерии

През последното десетилетие в Лабораторията по генна експресия на Департамента по обща микробиология на ИМикБ бе създадена богата микробна колекция от щамове МКБ. Щамовете бяха изолирани от ферментирали млечни и зърнени храни и напитки - брашна, боза, кисели млека от цялата страна, зърнени култури, ръжено тесто и др., като цел бе изолирането на щамове, проявяващи нетипични за МКБ ензимни активности. Изолирането на чисти култури от българско кисело мляко и зърнени храни и напитки бе върху селективни хранителни среди MRS и M17 агар, след последователни десетократни разреждания на изследваните продукти. Идентификацията на щамовете

до вид и подвид бе първоначално извършена по морфологични, физиологични, биохимични и генетични критерии.

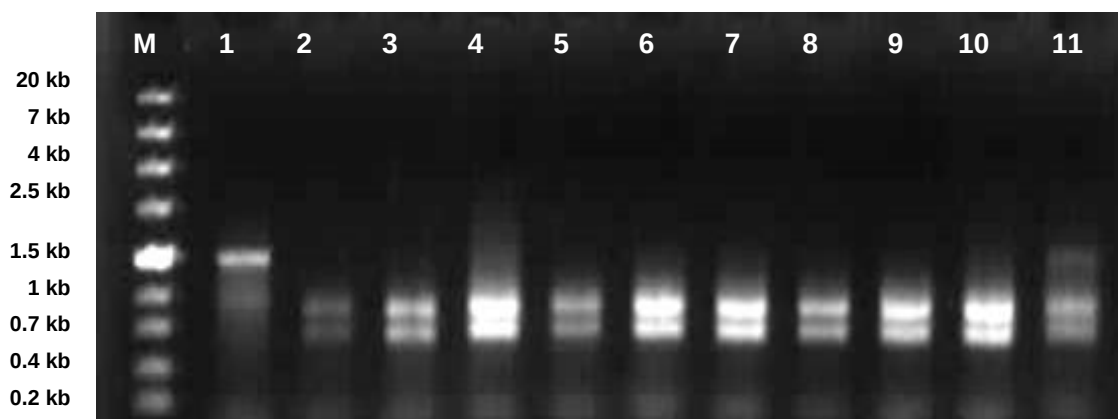
1.1.1. Морфологични, физиологични и биохимични характеристики на новоизолираните щамове МКБ

Всички новоизолирани щамове бяха определени като Грам-положителни, неподвижни и неспорообразуващи. Щамовете са мезофилни, с най-добър растеж при оптимална температура 37°C и са микроаерофили. В период от десет години бяха събрани деветдесет и седем различни проби от ферментирали млечни и зърнени продукти; бяха закупени и кисели млека от търговската мрежа, които да бъдат използвани за сравнение. Киселите млека (77 проби) бяха краве, овче, козе и биволско, приготвени по древни национални рецепти и събрани след посещения в отдалечени села, градове-музеи, манастири и високопланински мандри в България. Освен факта, че са каталазо-отрицателни и образуват млечна киселина (МК) от глюкоза, важни критерии при идентификацията на щамовете МКБ бяха способността им да усвояват други въглехидрати освен глюкоза, количеството на синтезираната млечна киселина и % на L(+)/D(-) стереоизомерите. Последните гликозид-хидролазни активности бяха определени след култивиране на МКБ в среда, съдържаща полизахариди (вж. 1.1.3).

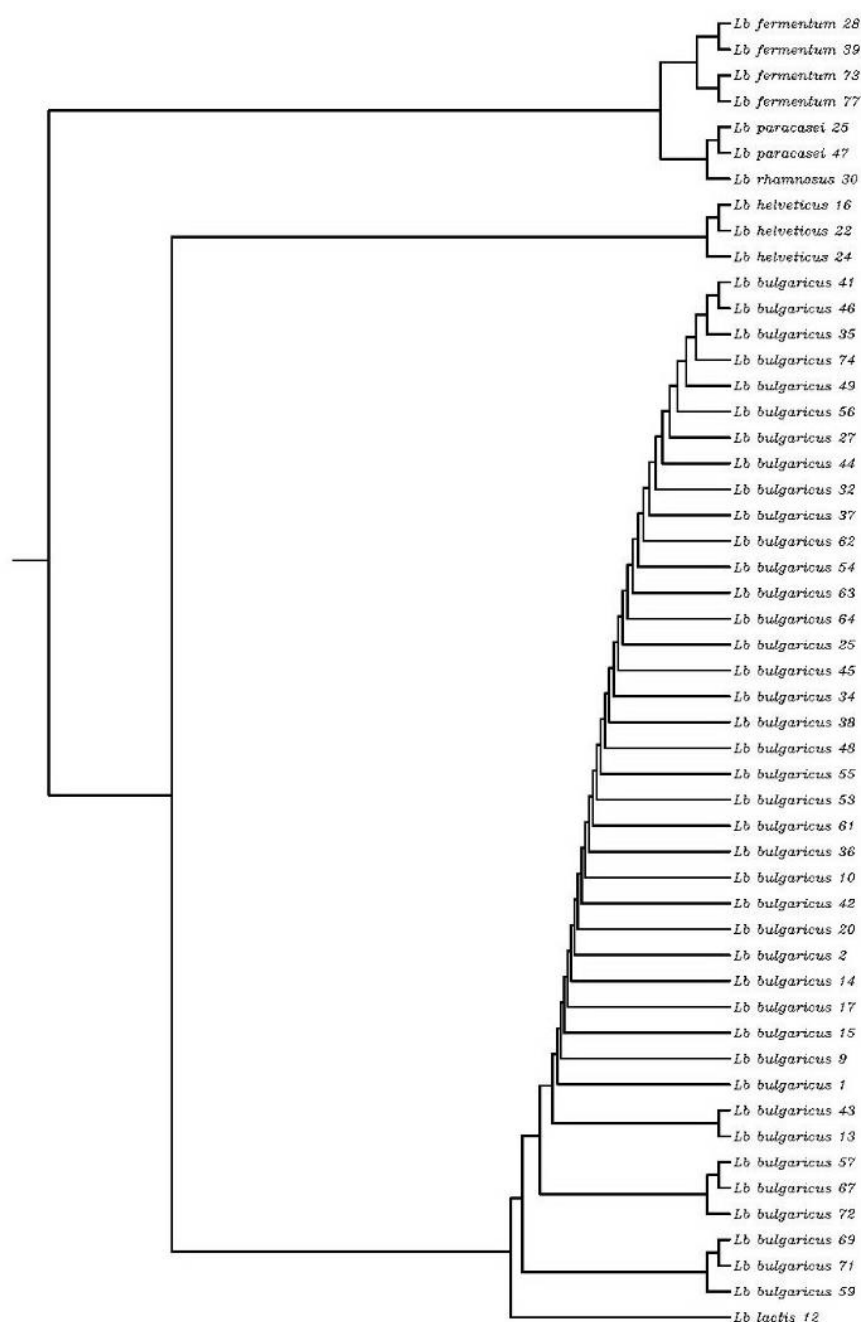
1.1.2. Молекулярно-генетична идентификация на МКБ

1.1.2.1. Идентификация на *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*/lactis

Генетичните подходи за идентификация на щамовете включиха PCR амплификация на 16S рДНК фрагмент, ARDRA, секвениране на 16S рДНК фрагмент, под-видово-специфичен PCR, RAPD, MLST и PFGE.



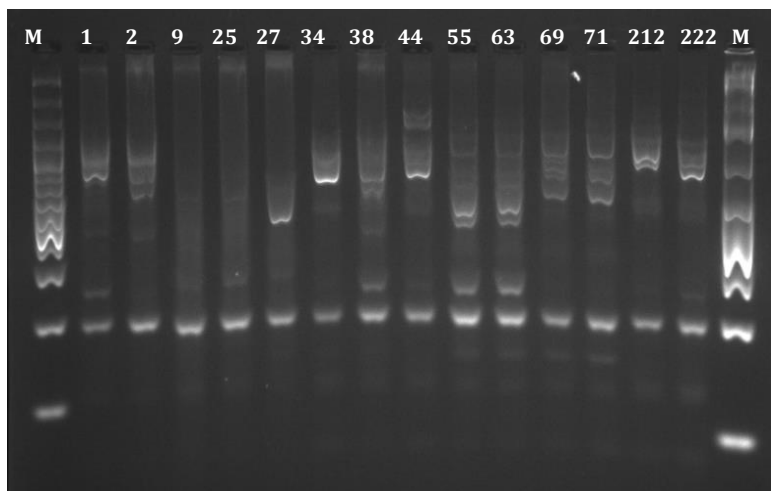
Фигура 1. ARDRA анализ с рестриктаза *EcoRI* на ДНК на щамове, изолирани от кисело мляко. № на старт и проба: М) Маркер Zip Ruler, 1) *L. delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 12315™, 2) *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842™, 3) 37, 4) 41, 5) 42, 6) 44, 7) 53, 8) 54, 9) 55, 10) 63, 11) 69.



Фигура 2. Филогене-тично дърво на щамове лакто-бацили, изолирани от кисели млека на базата на секвенцията на 16S rRNA ген по Neighbour - joining мет-од (MEGA 7 софтуер) след сравнение на секвенциите с Clustal W. Анализираните сек-венции са депозирани в GenBank на NCBI под номера от MG437344 - MG437394.

ARDRA анализът с рестриктаза *EcoRI* бе подходящ при идентифицирането на изолатите от вида *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. В 16S рРНК секвенцията на три от подвидовете на *L. delbrueckii* съществува един сайт за рестрик-тазата (в позиция 59 от началото на 16S рРНК гена), докато

вследствие мутация при *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* се е появил втори *EcoRI* сайт. Получаването на характерни ДНК фрагменти с големина 44, 621 и 811 bp дава възможност за недвусмислено отнасяне на част от изолатите към подвида *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* само на базата на резултатите от ARDRA анализ (Фиг. 1). Част от изолатите (12 щам), принадлежащи към вида *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* бяха анализирани за тяхната щамова специфичност чрез допълнителни молекулярно-генетични методи: RAPD, мултилокусен анализ (MLST) и електрофореза в пулсиращо електрично поле (PFGE).

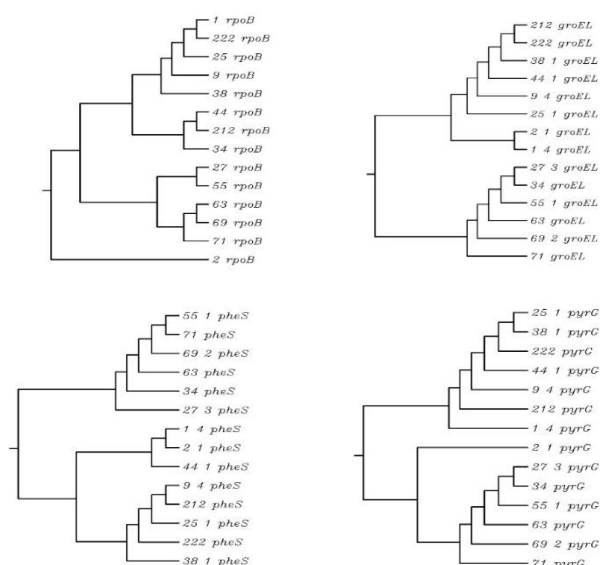


Фигура 3. RAPD анализ (по Cebeci et al., 2011) на 12 новоизолирани щамове *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и сравнение с щамове *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, изолирани от търговски кисели млека (212 – Домлян, 222 – "На баба" на Данон).

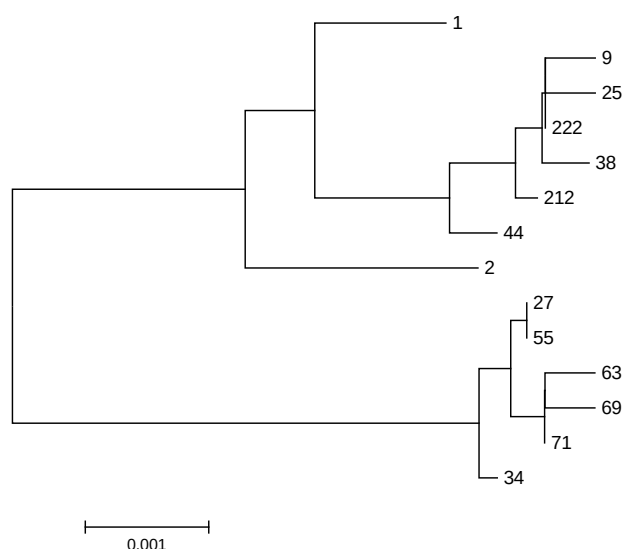
RAPD анализът бе проведен с 5 различни праймера: 1254: 5'CCGCAGCCAA3' (10-мер), rpd1: 5'CCCGACTGA3' (9-мер), rpd2: 5'CCGAGACAC3', rpd3: 5'GCCTGTTCTT3' и rpd4: 5'-GCCAGAACAA-3'. Най-добро разграничение между щамовете бе получено при прилагането праймерна двойка 1254 и rpd1 (Фиг. 3).

Резултатите доказват, че новоизолираните щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* са генетично различни и се различават от стартерните култури на едни от най-популярните български кисели млека в търговската мрежа. Методът RAPD обаче не е напълно ефективен, когато се прилага за толкова генетично близки щамове, принадлежащи към един и същи вид. Две двойки изолати не дават достатъчно добри профили (9, 25, 55 и 63). Тяхната генетична уникалност бе доказана с използването на друг генетичен подход. MLST (*Multi locus sequence typing*), обикновено считан за метод на бактериална идентификация, в зависимост от свойствата на геномите или експерименталния дизайн (като видовете анализирани гени) осигурява по-висока разделителна способност от RAPD. В MLST-анализите бяха включени четири гена: *rpoB*, *groEL*, *pheS* и *pyrG*, кодиращи съответно β -субединицата на бактериална РНК полимераза, протеин от семейството на шаперонините, α -субединица на фенилаланин тРНК синтетаза и СТР синтаза. Фрагменти от тези гени бяха амплифицирани, секвенирани и сравнени (Фиг. 4). Чрез секвениране на гените и сравняване на техните последователности с програмата ClustalW, бе извършено групиране на щамовете *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Сред

секвенциите на генните фрагменти от 14-те щамове бяха открити 10 различни алела за *rpoB*, 11 за *groEL*, 11 за *pheS* и 12 за *pyrG*. След комбиниране на четирите локуса би могло да се заключи, че всеки щам е генетично различен от останалите. На Фиг. 5 е показана еволюционната връзка между щамове.



Фигура 4. Филогенетично родство между 12 новоизолирани щамове на *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, базирано на секвенциите на фрагменти от гените *rpoB*, *groEL*, *pheS* и *pyrG*.

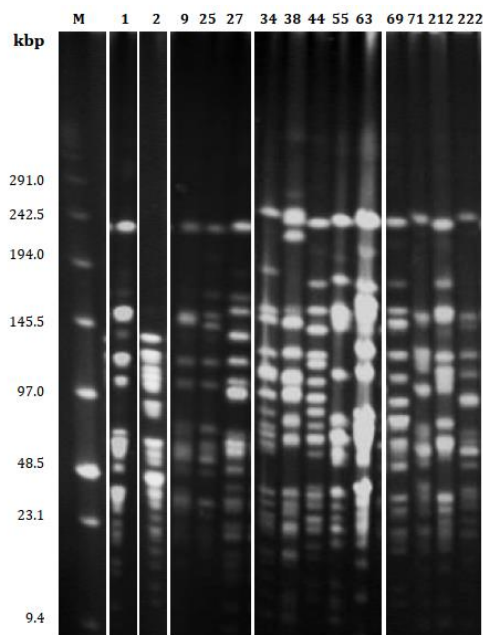


Фигура 5. Еволюционни взаимоотношения между ново-изолирани щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, изследвани чрез мултилокусен анализ (MLST), изчислени по метода Minimum Evolution (MEGA 6). Еволюционната отдалеченост е изчислена по метода Maximum Composite Likelihood и е в единици брой базови замени за сайт. Еволюционното дърво е изградено чрез алгоритъм CNI (Close-Neighbor-Interchange).

Пулсовата гел-електрофореза (PFGE) е електрофоретичен метод, който позволява разделянето на големи хромозомни фрагменти в агарозен гел, поставен в електрическо поле, което периодично сменя посоката си (Dimitrov et al., 2005).

Бяха проведени експерименти с ензимите *NotI*, *ApaI*, *XhoI*, като последният доведе до получаването на най-дискриминативни профили (Фиг. 6). PFGE потвърди резултатите, получени от MLST – изследваните щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* са генетично различни и не

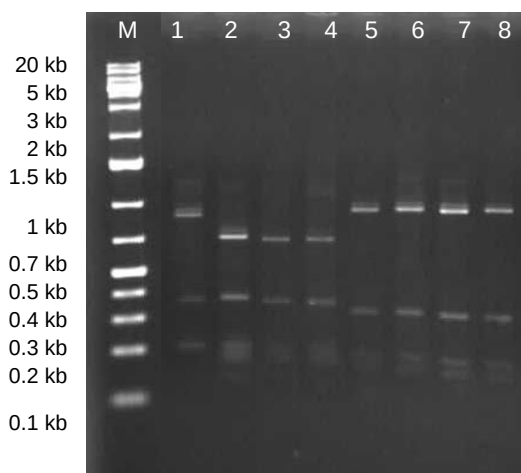
принадлежат към закваските, които се използват при производството на две от разпространените търговски марки кисели млека.



Фигура 6. Макрорестрикционни профили на щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* с рестрикционна ендо-нуклеаза *Xho*I. Условия на електро-форезата: напрежение 5 v/cm, начален пулс 3 сек, краен - 25 сек, продължителност 24 ч.

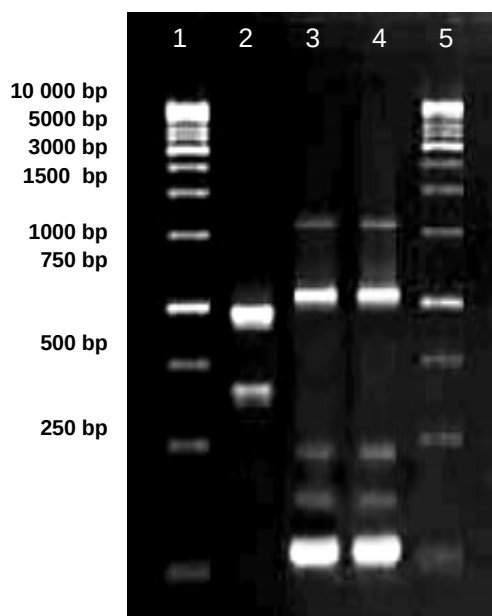
1.1.2.2. Разграничаване на видовете *L. casei* и *L. paracasei* с прилагане на молекулярно-генетични методи

За успешното разграничаване на щамове от видовете *L. casei* и *L. paracasei* бе приложен ARDRA анализ с рестрикционна ендонуклеаза *Sau*3A (Фиг. 7). Рестрикционният профил на 16S рДНК фрагмента на *L. casei* се състои от фрагменти 700 bp и 340 bp, докато при *L. paracasei* е от 900 bp, 310 bp и фрагменти под 100 bp.

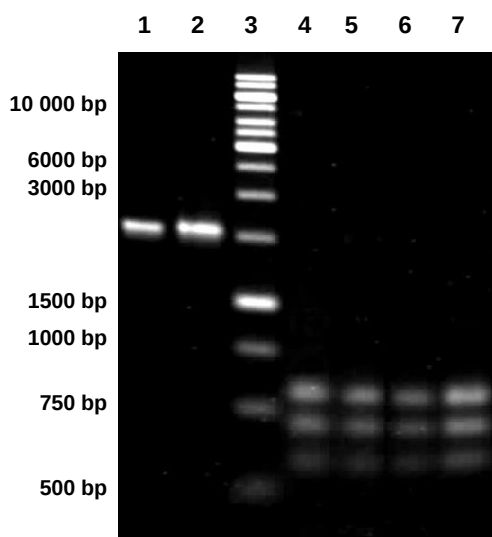


Фигура 7. ARDRA анализ на 16S рДНК на щамове *L. casei* и *L. paracasei* с рестрикционна ендонуклеаза *Sau*3A. № на старт и проба: М) Маркер 1 kb Plus, 1) *L. paracasei* DSM 23505, 2) *L. casei* ATCC 27139, 3) Da3, 4) A1, 5) Ya1, 6) ED1, 7) 7 и 8) LC1.

Видовата принадлежност на *L. paracasei* B41 бе потвърдена чрез техниката RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA). Беше използван праймер 0955-03 (Brousseau et al., 1993), оригинално създаден за доказване на принадлежност на щамове към вида *Bacillus thuringiensis*. В RAPD експериментите с лактобацилите от групата на *L. casei/paracasei* праймер 0955-03 даде отчетливи разлики в профилите на изследваните щамове - два ДНК фрагмента при *L. casei* и пет при *L. paracasei* (Фиг. 7).



Фигура 8. Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) анализ с праймер 0955-03, фрагментите са разделени в 2% агарозен гел: 1), 5) GeneRuler™ 1 kb, 2) *L. casei* ATCC 27139, 3) *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 25302 и 4) *L. paracasei* B41.



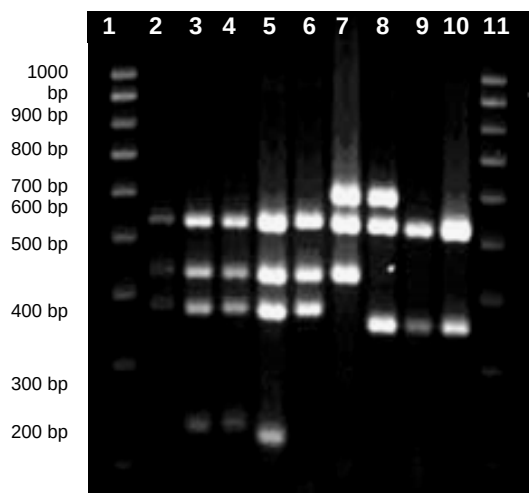
Фигура 9. PCR амплификация и ARDRA анализ на 16S рДНК на щамове *L. plantarum* Bom 816 and *L. pentosus* N3. № на старт и проба: 1) Bom 816 – 16S rDNA, PCR продукт, 2) N3 – 16S rDNA, PCR продукт 3) Маркер, 4) *L. plantarum* ATCC 14917 – 16S рДНК/*HaeIII*, 5) *L. pentosus* ATCC 8041 – 16S рДНК/*HaeIII*, 6) Bom 816 – 16S рДНК/*HaeIII*, 7) N3 – 16S рДНК/*HaeIII*.

ARDRA с ензим *HaeIII* се оказа неподходящ метод за разграничаване на изолати от видовете *L. plantarum* и *L. pentosus* (Фиг. 9), тъй като сравнението на ARDRA профилите с тези на типовите щамове *L. plantarum* ATCC 14917 и *L. pentosus* ATCC 8041 показва, че изолатите Bom 816 и N3 принадлежат към един от тези два вида, но не и към кой вид. ARDRA не е достатъчно надежден метод и за идентификация на щамове, принадлежащи към видовете *Ent. faecalis*, *Ent. faecium* и *Ent. durans* (Фиг. 10).

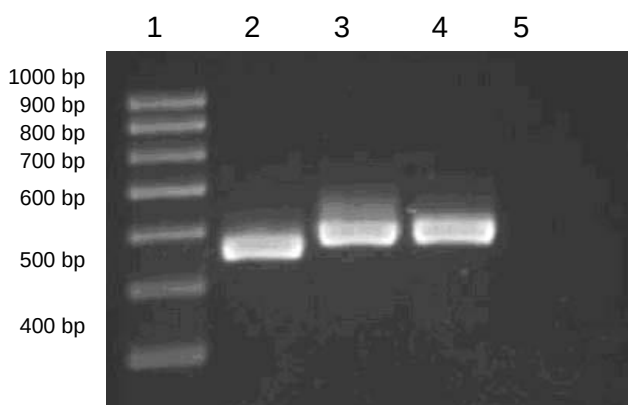
1.1.2.3. Молекулярно-генетично разграничаване на подвидовете на *Lc. lactis*

Разграничение на подвидовете на *Lc. lactis* беше получено чрез ARDRA с рестриктаза *HhaI*. Профилът на *Lc. lactis* subsp. *lactis* се състои от два типични ДНК фрагмента с големина 360 bp и 550 bp, докато този на *Lc. lactis* subsp. *cremoris* показва допълнителна ивица от 600 bp. Родовете

Enterococcus и *Leuconostoc* показват 16S рДНК рестрикционни профили съвсем различни от тези на лактококите (Фиг. 10).



Фигура 10. PCR амплификация и ARDRA анализ на 16S рДНК на щам *Lc. lactis* B84 и референтни щамове с *Hha*I. № на старт и проба: 1) Маркер 100 bp, 2) *Ent. faecium* LMG 11423, 3) *Ent. faecalis* LMG 2937, 4) *Ent. durans* LMG 10746, 5) *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMG 6893, 6) *Leuc. lactis* LMG 8894, 7) *Str. thermophilus* DSM 20617, 8) *Lc. lactis* subsp. *cremoris* DSM 20069; 9) *Lc. lactis* subsp. *lactis* DSM 20481, 10) *Lc. lactis* B84, 11) Молекулен маркер 100 bp.

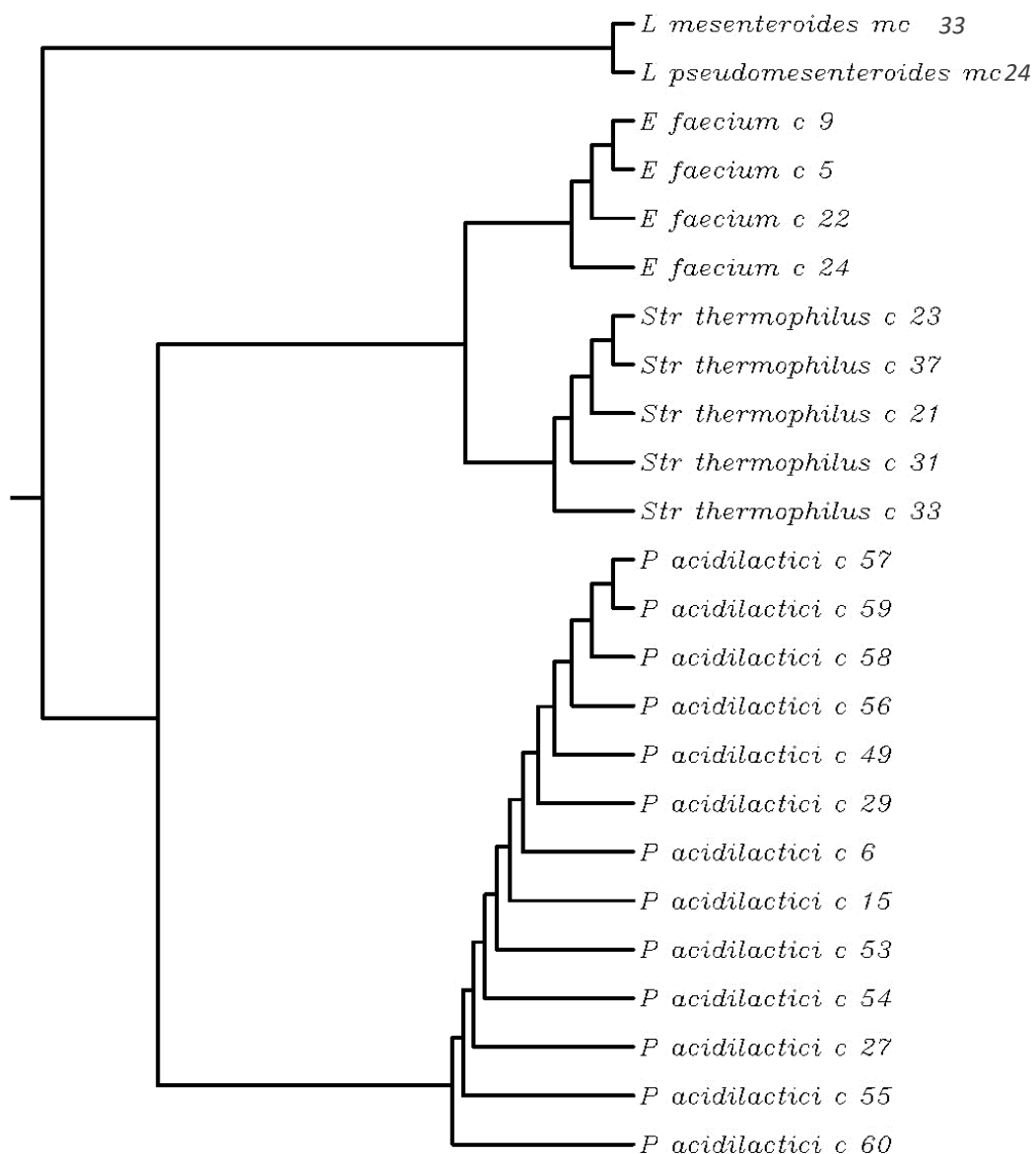


Фигура 11. Специфични продукти, получени след PCR амплификация с матрица хромозомна ДНК на лактококови щамове, с праймерите *gadB21* и *GAD7* (Nomura et al., 2002). № на старт и проба: 1) Маркер 100 bp, 2) *Lc. lactis* subsp. *cremoris* DSM 20069, 3) *Lc. lactis* subsp. *lactis* DSM 20481, 4) *Lc. lactis* B84, 5) (-) контрола.

За идентификацията на изолата *Lc. lactis* B84 бе приложен и подвигово специфичен PCR. Методът на Nomura et al. (2002) дава възможност за разграничаване на подвиговете на *Lc. lactis* - subsp. *lactis* и subsp. *cremoris* на базата на полиморфизъм в гена за глутамат декарбоксилазата. При *Lc. lactis* subsp. *lactis* 20481 и българския изолат B84 бе получен PCR фрагмент от 580 bp, докато при *Lc. lactis* subsp. *cremoris* DSM 20069 - от 540 bp (Фиг. 11).

1.1.2.4. Молекулярна идентификация на други видове МКБ

Идентификацията на останалите МКБ бе на базата на секвениране на PCR-продукти на 16S рРНК рибозомалния ген.



Фигура 12. Филогенетично дърво на част от щамове коки, изолирани от кисели мляка, на базата на секвенцията на 16S rRNA гени, по метода Neighbor-joining (програма BioEdit) след сравнение ClustalW. Анализираниите секвенции са депозирани в GenBank на NCBI под номера от MG438466 до MG438490.

Като резултат от тези изследвания до вид и подвид бяха идентифицирани 75 щам пръчковидни МКБ и 40 - млечнокисели коки (Фиг. 12). Повече от век след откриването на *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Grigoroff, 1905), настоящото проучване включва ново цялостно изследване на микрофлората на киселото мляко, бозата, ръженото тесто и др. Като се има предвид разпределението по региони, най-голямото биоразнообразие на МКБ се наблюдаваше при киселите млека от Родопите, много от които съдържаха няколко вида МКБ с

различна морфология. Симбиотичните взаимоотношения между *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* и *Str. thermophilus* щамове са най-добре запазени в киселите млека от селата на Централна и Западна Стара планина. Трябва да се отбележи, че *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* не е толкова разпространен в гръцките йогурти. Georgalaki et al. (2017) съобщават за изолирането само на един *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* щам от 9 анализирани кисели млека.

Други видове *Lactobacillus*, открити в българските проби бяха *L. lactis* (един щам) и *L. helveticus* (3 щам), както е докладвано и от Dimitrov et al. (2005). *L. fermentum* беше типичен за бозата, но напълно необичаен за българското кисело мляко. Присъствието му в домашно приготвено китайско кисело мляко е докладвано от Zhang et al. (2006). По отношение на вида *L. paracasei* и *L. rhamnosus*, изолирането им като съпътстваща микрофлора от кисело мляко е показана за първи път. *L. plantarum*, типичен за гръцкото кисело мляко (Georgalaki et al., 2017), не е открит в български проби от кисело мляко.

Наличието на *Ent. faecium* сред млечнокиселите коки е почти очаквано, тъй като този вид е бил открит в киселото мляко преди век от Григоров (Grigoroff, 1905) и е описан като „Micrococcus B“. Няколко щамове от вида се считат за пробиотични и са открити и в гръцкото кисело мляко, а *Ent. faecium* с антимикробна активност, открит в домашно приготвено монголско кисело мляко, е докладван от Hadji-Sfahi et al. (2011). „Класическият“ симбиотичен партньор на *L. bulgaricus* в българското кисело мляко, *Str. thermophilus* е открит само в 5 от 77 анализирани проби. По-често срещана комбинация с *P. acidilactici* бе открита в 8 домашни кисели млека и докато през XIX-ти век българското кисело мляко е съдържало изобилие от щамове *Str. thermophilus*, днес този вид е до голяма степен изместен от по-малко претенциозния, но не по-малко полезен *P. acidilactici*.

1.1.3. Изследване на метаболизма на въглехидрати при МКБ

Усвояването на ди- и тризахариди бе показател за наличието на изучаваните в настоящия труд ензими. Най-често срещаните предполагаеми ензимни активности бяха амилазна (37 щамове усвояваха нишесте като единствен въглероден източник) и β -глюкозидазна (хидролиза на 1,4- β -D-глюканите - целобиоза, Табл. 1). Сред изолатите бяха открити 12 щамове, усвояващи рафиноза, което бе свидетелство за проявата на β -фруктофуранозидазна (инвертазна, ЕС 3.2.1.26) активност, а 11 щамове бяха способни да разграждат дизахарида мелибиоза, т.е. проявяваха α -галактозидазна активност. От данните на Табл. 2 се вижда, че почти всички представители на млечнокиселите пръчковидни бактерии разграждаха лактоза (β -галактозидазна активност).

Таблица 1. Усвояване на въглехидрати от новоизолирани щамове МКБ. Легенда: Фру - фруктоза, Гал - галактоза, Кси - ксилоза, Ман - маноза, Ара - арабиноза, Рам - рамноза, Цел - целобиоза, Мел - мелизитоза, Раф - рафиноза, Ину - инулин, Ксн - ксилан, КМЦ - карбоксиметил-целулоза, Ниш - нишесте, Пул - пулулан.

Щам	Фру	Гал	Кси	Ман	Ара	Рам	Цел	Мел	Раф	Ину	Ксн	КМЦ	Ниш	Пул
Ya1	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
Da3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
A1	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
LC1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+/-
7	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Pr3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
B41	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
BX1	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
BX2	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
BB2	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
8.1	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
93	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
BX3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
N3	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
BX4	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
2	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
3/30	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Lin1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Bom3	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
PD3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
95	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
73	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
65	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
91	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
M1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
S1	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
H	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
1.2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
87	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
84	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B41	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+/-

Таблица 2. Хомо/хетероферментативна конверсия на лактоза при МКБ.

Вид	Щам	Хомо/Хетеро ферментативност	L(+)/D(-) МК	Усвоява лактоза	Коагулира млякото
<i>L. delbrueckii</i>	1	Хомоферментативен	100% D(-)	+	√
<i>L. delbrueckii</i>	2	Хомоферментативен	100% D(-)	+	√
<i>L. delbrueckii</i>	9	Хомоферментативен	100% D(-)	+	√
<i>L. delbrueckii</i>	10	Хомоферментативен	100% D(-)	+	√
<i>L. delbrueckii</i>	12	Хомоферментативен	100% D(-)	+	√
<i>L. delbrueckii</i>	13	Хомоферментативен	100% D(-)	+	√
<i>L. delbrueckii</i>	14	Хомоферментативен	100% D(-)	+	√
<i>L. delbrueckii</i>	15	Хомоферментативен	100% D(-)	+	√
<i>L. helveticus</i>	16	Хомоферментативен	71.2% L(+)	+	√

<i>L. delbrueckii</i>	17	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	20	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. helveticus</i>	22	Хомоферментативен	97.6% L(+)	+	✓
<i>L. helveticus</i>	24	Хомоферментативен	96.2% L(+)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	25	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	27	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. fermentum</i>	28	Хетероферментативен	94.7% L(+)	+	✓
<i>L. rhamnosus</i>	30.3	Хомоферментативен	95.5% L(+)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	32	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	34	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	35	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	36	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	37	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	38	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. fermentum</i>	39	Хетероферментативен	99.9% L(+)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	41	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	42	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	43	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	44	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	45	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	46	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. paracasei</i>	47	Хомоферментативен	94.8% L(+)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	48	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	49	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	53	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	54	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	55	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	56	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	57	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	59	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	61	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	62	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	63	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	64	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	67	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	69	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	71	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	72	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	73	Хетероферментативен	93.6% L(+)	+	✓
<i>L. delbrueckii</i>	74	Хомоферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>L. fermentum</i>	77	Хетероферментативен	86.8% L(+)	+	✓
<i>Enterococcus faecium</i>	с 5	Хомоферментативен	56.9% L(+)	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 6	Хетероферментативен	60.4% L(+)	+	не
<i>Enterococcus faecium</i>	с 9	Хомоферментативен	ND	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 15	Хомоферментативен	89.8% L(+)	+	не
<i>Str. thermophilus</i>	с 21	Хомоферментативен	99.9% L(+)	+	✓
<i>Ent. faecium</i>	с 22	Хомоферментативен	75.8% L(+)	+	не
<i>Str. thermophilus</i>	с 23	Хомоферментативен	99.9 L(+)	+	✓
<i>Leuc. pseudomesenteroides</i>	мс 24	Хетероферментативен	83.8% L(+)	+	✓
<i>Enterococcus faecium</i>	с 24	Хомоферментативен	100% L(+)	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 27	Хомоферментативен	93.3% L(+)	+	не
<i>P. acidilactici</i>	мс 27	Хомоферментативен	92.6% L(+)	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 29	Хомоферментативен	ND	+	не

<i>Str. thermophilus</i>	с 31	Хомоферментативен	100% L(+)	+	✓
<i>Leuc. mesenteroides</i>	mc 33	Хетероферментативен	100% D(-)	+	✓
<i>Str. thermophilus</i>	с 33	Хомоферментативен	100% L(+)	+	✓
<i>Str. thermophilus</i>	с 37	Хомоферментативен	100% L(+)	+	✓
<i>P. acidilactici</i>	с 49	Хомоферментативен	99.8% L(+)	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 53	Хомоферментативен	ND	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 54	Хомоферментативен	100% L(+)	+	✓
<i>P. acidilactici</i>	с 55	Хомоферментативен	ND	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 56	Хомоферментативен	64.2% L(+)	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 56	Хомоферментативен	64.6% L(+)	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 57	Хомоферментативен	100% L(+)	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 58	Хомоферментативен	100% L(+)	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 59	Хомоферментативен	50.8% L(+)	+	не
<i>P. acidilactici</i>	с 60	Хомоферментативен	86.3% L(+)	+	✓
<i>Weissella confusa</i>	14n	Хетероферментативен	ND	не	не
<i>Lactococcus lactis</i>	В 84	Хомоферментативен	98% L(+)	+	✓
<i>L. paracasei</i>	В 41	Хомоферментативен	93% L(+)	+	✓

ND - не е изследван.

Анализът на получените течни метаболити (Табл. 2) разкри образуването на тризахариди като продукт на метаболизма на някои от щамове, което доказва проявата на рядката *трансферазна активност* на β -галактозидазата и натрупване на пребиотика галакто-олигозахарид (ГОЗ). Новоизолираните щамове усвояват разнообразни моно- ди- и тризахариди. Четири щамове бяха способни да разграждат инулин и притежаваха предполагаема инулиназна (ЕС 3.2.1.7) или фруктан- β -фруктозидазна активност (ЕС 3.2.1.80). Всички изолати усвояват глюкоза, галактоза, и фруктоза (единствено *E. faecium* 95 не усвоява фруктоза), което е в пълно съответствие с изследванията на други колективи. Например, от 10 щамове, принадлежащи към род *Lactobacillus* (сред които *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. plantarum* и др.) всички с изключение на *L. acidophilus* IBV 801 усвояват фруктоза и галактоза (Makras *et al.*, 2005).

Таблица 3. Течни метаболити, образувани при разграждането на лактоза от щамове МКБ.

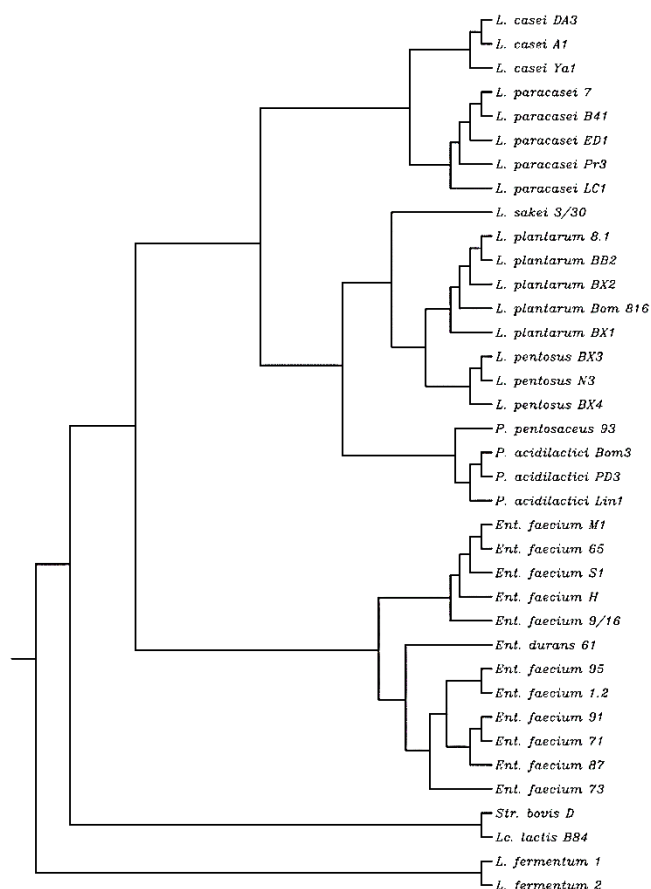
Щам	Лактоза		Глюкоза		Галактоза		МК		Етанол		ГОЗ	
	(г/л) 24 ч	(г/л) 48 ч	(г/л) 24 ч	(г/л) 48 ч	(г/л) 24 ч	(г/л) 48 ч	(г/л) 24 ч	(г/л) 48 ч	(г/л) 24 ч	(г/л) 48 ч	(Площ) 24 ч	(Площ) 48 ч
1	19.36	15.06	-	-	7.45	9.47	9.07	11.55	-	-	5.8405	5.2183
2	15.69	11.69	-	-	8.99	13.91	10.70	15.30	-	-	-	-
9	13.40	10.90	-	-	10.18	13.67	11.56	14.31	-	-	2.3960	2.1703
10	17.14	10.78	-	-	8.51	11.22	11.73	13.27	-	-	2.2563	2.2424
12	13.85	11.32	-	-	4.13	3.96	15.39	16.00	-	-		
13	22.08	16.44	-	-	9.98	12.41	11.51	14.13	-	-	-	-
14	21.78	15.98	0.91	0.89	12.31	13.49	9.58	12.82	-	-	-	-
15	23.86	18.76	-	-	5.15	9.54	6.73	11.03	-	-	2.4854	2.4473
16	26.51	22.71	1.43	-	2.88	2.71	4.18	10.37	-	-	3.5274	3.3296
20	13.30	11.65	0.74	0.14	6.67	6.94	6.99	8.70	-	-	10.1633	9.7352
22	21.30	17.12	-	-	1.47	2.37	15.94	18.88	-	-	-	-
24	28.41	22.21	-	-	-	-	10.27	17.64	-	-	-	-
25	16.73	12.93	-	-	8.60	9.69	10.87	11.56	-	-	1.9669	1.6696

27	15.58	12.69	-	-	8.20	9.66	11.13	12.10	-	-	3.0049	2.8928
28	17.75	14.47	-	-	-	0.20	12.06	14.19	6.10	6.31	-	-
30.3	28.02	24.29	-	-	-	-	10.31	18.13	-	-	-	-
32	27.61	22.47	-	-	7.55	11.51	12.59	13.42	-	-	-	-
34	11.93	11.12	-	-	13.15	13.29	15.29	15.60	-	-	-	-
35	22.11	19.55	-		8.75	11.87	9.94	13.79	-	-	2.6150	3.0889
36	21.17	18.61			9.69	12.81	10.88	14.13				
37	23.09	21.32	0.05	0.02	6.35	8.87	7.33	10.01	-	-	2.0417	2.0916
38	15.40	12.19	-	-	10.73	10.51	11.75	11.78	-		1.8775	1.4117
39	13.09	12.22	-	-	0.11	0.09	12.49	12.30	6.09	5.62	-	-
41	14.49	13.15	-	-	6.42	9.94	7.78	11.34	-	-	4.6156	6.5442
42	16.92	14.20	-		7.26	10.35	8.61	12.19	-	-	-	-
43	16.90	15.14	0.60	0.21	5.19	7.35	5.77	9.51	-	-	9.8664	11.2184
44	15.46	11.16	-	-	9.04	10.40	10.59	12.53	-	-	10.5502	8.9188
45	18.43	11.08	0.12	-	4.38	10.92	5.50	12.64	-	-	5.4879	8.2621
46	17.58	11.48	-	-	11.26	12.89	11.54	14.58	-	-	1.7249	1.9004
48	18.12	11.91	-	-	14.32	17.03	12.81	15.39	-	-	-	-
49	21.52	15.93	-	-	11.00	9.88	11.08	10.77	-	-	2.1056	1.6735
53	15.18	10.68	-	-	10.07	12.40	12.09	13.83	-	-	-	-
54	21.82	12.54	-	-	4.96	8.33	6.86	9.96	-	-	1.4187	-
55	22.58	13.33	-	-	4.21	7.57	7.62	10.72	-	-	-	-
56	16.66	11.48	-	-	14.82	12.02	13.55	14.86	-	-	3.5677	3.8887
57-1	18.60	14.53	-	-	6.30	8.76	7.94	10.23	-	-	2.2574	2.6077
59	20.12	10.56	-	-	6.46	9.83	8.36	11.46	-	-	-	-
62	28.68	15.77	-	-	2.79	12.69	4.09	15.77	-	-	1.4343	2.2900
63	15.16	12.24	-	-	10.58	12.56	11.20	13.37	-	-	1.9013	1.7447
64	14.95	12.03			10.79	12.77	11.42	13.65				
67	16.01	12.74	-	-	10.26	11.00	10.70	13.54	-	-	1.7157	1.6069
69	22.00	15.02	-	-	3.01	10.00	4.30	11.25	-	-	-	-
71	23.69	15.66	-	-	4.98	7.68	6.21	9.37	-	-	5.8914	4.9700
73	13.66	13.13	0.29	0.16	0.13	0.10	12.97	13.21	6.75	6.32	-	-
74	22.18	13.79	-	-	6.19	10.48	7.51	11.58	-	-	2.4310	2.3887
77	18.73	13.13	-	-	0.08	-	9.39	12.17	5.09	5.77	-	-
212*	21.70	13.50	-	-	3.51	7.21	5.43	8.72	-	-	3.8135	3.5056

*212 - щам *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, изолиран от кисело мляко „Домлян” - контрола.

По отношение на ксилозата, само половината от изследваните щамове усвояват този монозахарид (15 от 31 изолата). Целобиозата се усвоява от почти всички изследвани щамове, което е доказателство, че част от изолатите проявяват β -(1 $\rightarrow$ 4) хидролазна активност. β -глюкозидазната активност, отговорна за хидролизата на 1,4- β -D-глюканите (целобиоза) е широко застъпена сред представителите на *L. plantarum* (Spano et al., 2005). Интересен е и фактът, че сред изследваните щамове МКБ са установени 11, които са способни да разграждат дизахарида мелибиоза, както и 12, които усвояват тризахарида рафиноза. Рафинозата или т. нар мелитоза (мелитриоза) е съставена от галактоза, глюкоза и фруктоза. Връзката между глюкоза и фруктоза е α -(1 $\rightarrow$ 2) както в захарозата. За разграждане на α -(1 $\rightarrow$ 6) връзката между галактоза и глюкоза е необходимо действието на α -галактозидаза. Наличието на този

ензим е необходимо и за усвояването на мелибиоза - дизахарид, съставен от галактоза и глюкоза, свързани с α -(1 $\rightarrow$ 6) връзка.



Фигура 13. Амилолитични МКБ - филогенетично дърво на щамове аМКБ въз основа на сравнение на 16S рДНК секвенции с програмата Clustal W. Част от секвенциите са депозирани в GenBank под номера KU513392, KU513393, KU513394, KU513395, KU513396, KU513397, KU513398, KU513399, KU513400, KU513401, KU513402, KU513403, KU513404, KU513405, KU513406, KU513407, KU513408, KU513409, KU513410, KU513411, KU513412, KU513413, KU513414, KU513415, KU513416.

Не е изненадващо, че щамове, усвояващи рафиноза, ферментират също така и мелибиоза заради проявата на α -галактозидазна активност. Обикновено щамове, които усвояват мелибиоза, хидролизират и рафиноза. Например, при изследвания на щамове, принадлежащи към вида *L. ruminis* е установено, че всички усвояват и мелибиоза, и рафиноза (O'Donnell et al., 2011).

1.2. Изследване на ензими, участващи в усвояването на нишестето при амилолитични МКБ (аМКБ)

От общо 115 новоизолирани МКБ, 37 бяха способни да ферментират субстрат нишесте, тяхната видова принадлежност е показана на Фиг. 13.

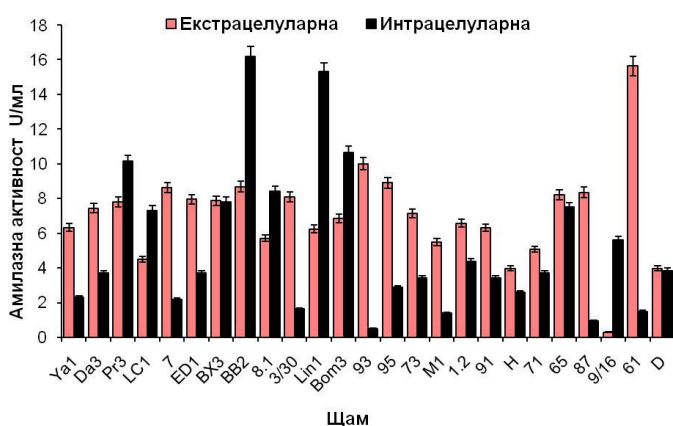
Филогенетичният анализ на амилолитичните изолати в колекцията разкри принадлежността на амилолитичните МКБ към 4 главни групи бактерии: *L. casei/paracasei* (8 щам), *L. plantarum/pentosus* (8 щам), *P. acidilactici/pentosaceus* (4 щам) и *E. faecium/durans* (12 щам).

Освен тях, бяха идентифицирани амилолитични представители на видовете *L. fermentum* (2 щам), *Str. bovis*, *L. sakei* и *Lc. lactis*.

Главен продукт на конверсията на нишестето от аМКБ бе млечната киселина. След 48-часова ферментация на среда MRS, съдържаща 20 г/л нишесте вместо глюкоза, различните изолати синтезираха между 5 и 18.6 г/л лактат, като най-високи стойности бяха постигнати от щамове от видове *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* и *P. acidilactici*.

1.2.1. Амилазна активност на новоизолираните аМКБ

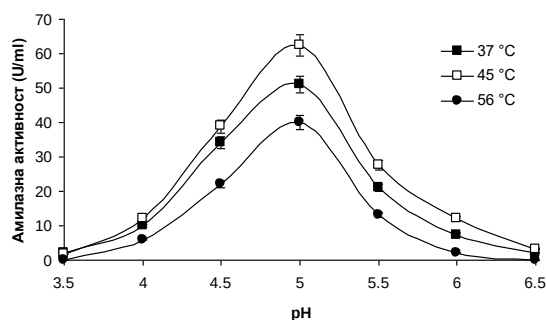
В зависимост от вида и щам, амилазната активност на а МКБ варира в широки граници. В настоящите експерименти бе проверена ензимната активност на безклетъчни супернатанти (екстрацелуларна), на цели клетки (клетъчно-свързана) и на клетъчни лизати (вътреклетъчна).



Фигура 14. Извънклетъчна и вътреклетъчна амилазна активност на новоизолирани щамове аМКБ.

Амилазната активност бе сравнително ниска, като извънклетъчната варираше в интервала 0.3 U/мл (*E. faecium* 9/16) - 15.6 U/мл (*E. durans* 61), а вътреклетъчната от 0.5 U/мл (*P. pentosaceus* 93) до 16.2 U/мл (*L. plantarum* BB2) (Фиг. 14). Представителите на лактобацилите проявяват типична клетъчно-свързана амилазна активност, наблюдавана при *L. plantarum* Bom 816 и *L. pentosus* N3. Те проявиха ниска извънклетъчна - съответно 0.5 и 1.5 U/мл, но значителна клетъчно-свързана активност (13 и 21 U/мл) при експериментално определени оптимални стойности на pH и температура: pH 5.5 и 45°C.

Присъствие на клетъчно-свързани амилази е докладвано и от други автори, които ги откриват в амилолитични щамове *L. fermentum* и *L. manihotivorans*, изолирани от зърнени храни и нишесте от маниока (Agati et al., 1998; Guyot et al., 2000).



Фигура 15. Извънклетъчна амилазна активност (безклетъчни супернатанти) на *L. paracasei* B41 при различни температури и стойности на pH.

За разлика от всички останали, българският щам, изолиран от боза *L. paracasei* B41 прояви висока извънклетъчна амилазна активност, като максималната ѝ стойност достигна 62 U/мл. Ензимът бе частично пречистен и бяха определени оптималните условия за неговото действие: pH 5.0 и температура 45°C (Фиг. 15).

Данните, получени за амилазната активност на лактобацилите потвърждават наблюденията на други учени. *L. amylophilus* е първият описан амилолитичен вид МКБ, (Nakamura & Crowell, 1979), с щамове JCM 1125, NCIB 11546, NRRL B-4437, последван от *L. amylovorus* (Nakamura, 1981). По-късно са били пречистени и анализирани амилази от *L. amylovorus* и *L. amylophilus*. От 6 анализирани субстрата, амилазите на лактобацилите имат най-висока активност към разтворимо нишесте. Нито един от ензимите не хидролизира пулулан или циклодекстрини (Pompeyo et al., 1993).

През 1983 година са изолирани два щама *L. acidophilus* LEM 220 и LEM 207 и е доказано присъствието на вътреклетъчна амилаза в среда, съдържаща амилопектин или нишесте, но не и при култивиране на щам на среда с глюкоза или малтоза (Champ et al., 1983). По-късно са изолирани два други амилолитични щамове: *L. acidophilus* A-4 и L23. Ензимната активност на L23 е клетъчно-свързана, докато щам A-4 притежава и екстрацелуларна амилазна активност (Lee et al., 2001). *L. cellobiosus* D-39 е изолиран като нов вид амилолитична млечнокисела бактерия през 1984 година (Sen и Chakrabarty, 1986). По-късно се предлага видът да бъде прекласифициран в *L. fermentum*. Само няколко години по-късно са изолирани два нишесте-разграждащи щамове *L. fermentum* - OgiE1 и Mw2 и е изследвана амилазната им активност. При щам Mw2 е доказано наличието на клетъчно-свързана α -амилаза (Agati et al., 1998). При други щамове *L. fermentum* също са установени гени, кодиращи амилазни и неопулуланазни ензими (Turpin et al., 2011). Отговорният ензим при щам *L. amylophilus* GV6 е екстрацелуларна амилопулуланаза с молекулна маса 90 kDa, която хидролизира разтворимо и сурово нишесте, амилоза, гликоген и пулулан (Vishnu et al., 2006).

L. plantarum е най-разпространения вид аМКБ във ферментиралите храни. *L. plantarum* A6 е изолиран от групата на Giraud, които са доказвали наличието на екстрацелуларен амилазен ензим и са го получили в пречистен вид (Giraud et al., 1991, 1993). Двадесет нови амилолитични щамове *L. plantarum* и *L. paraplantarum* са изолирани от Turpin et al. (2011). Olympia et al. откриват нишесте-хидролизиращ щам *L. plantarum* L137. Ензимът при този щам е свързан с 33 kb ендегенен плазмид pLTK13, който кодира извънклетъчна α -амилаза с максимална активност при неутрално pH и при 50°C (Olympia et al., 1995). Ензимът хидролизира нишесте, амилопектин, гликоген и пулулан, по-слабо амилоза, но няма активност към декстран и циклодекстрини. *L. amylolyticus* е амилолитична млечно кисела бактерия, изолирана от бирен

малц (Bohak et al., 1998). Генотипирани са 25 щам, подобни на *L. amylovorus*. След изследване на ДНК-ДНК подобие и 16S и 23S рДНК анализите генните секвенции на тези щамове са определени като нови видове и като типов щам е предложен DSM 11664.

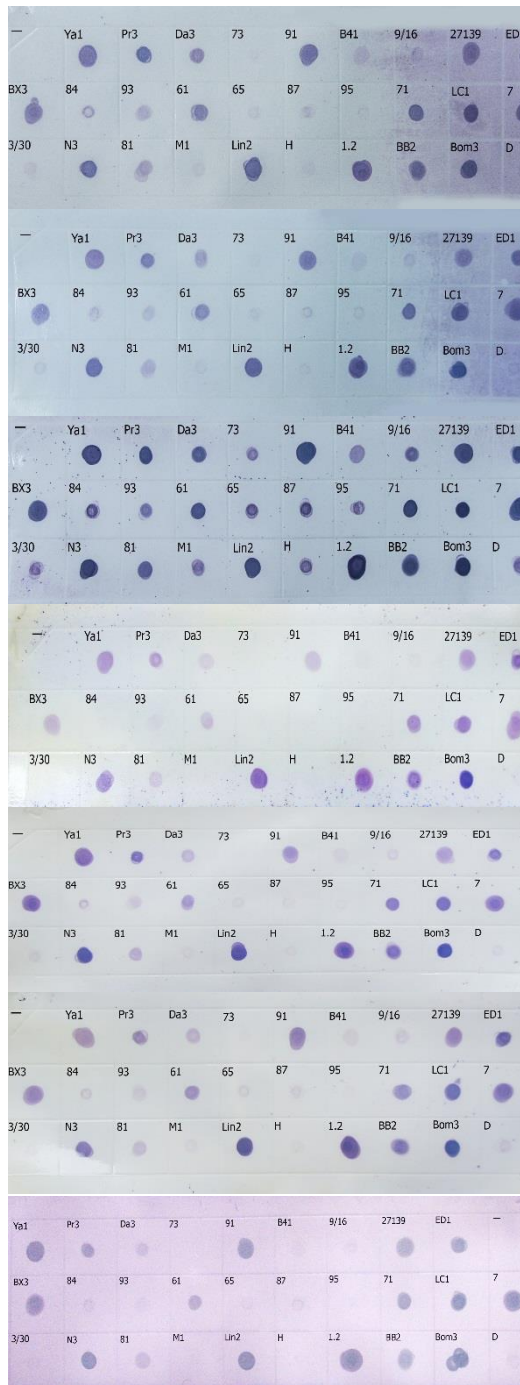
L. amylophilus е тясно свързан вид с *L. amylophilus*. През 2006 година Naser et al. изучават първите изолирани от Nakamura и Crowell шест щам *L. amylophilus* (NRRL B-4435, LMG 11400, LMG 6900, NRRL B-4438, NRRL B-4439, NRRL B-4440) с помощта на мултилокусни секвенционни анализи. Доказано е, че два щам: LMG 11400 и NRRL B-4435 заемат различни таксономични позиции. По нататък геномните и фенотипни проучвания доказват, че принадлежат към новия вид *L. amylophilus* с типов щам LMG 11400 (NRRL B-4436) (Naser et al., 2006). *L. manihotivorus* също е открит като нов хомоферментативен вид аМКБ (Morlon-Guyot et al., 1998). По-късно са изучени 6 нови амилолитични изолата *L. manihotivorus*, като повечето от тях включват плазмиди и е установено, че генът *amyA* е плазмидно локализиран.

Всички тези данни показват голямото разнообразие от потенциални гликозид-хидролазни ензими, които са включени в процеса на усвояване на нишестето от аМКБ. До този момент не бе предприемано системно проучване на колекция от аМКБ за установяване на отговорните за амилолитичната активност гени.

1.2.2. Транскрипционен анализ на усвояване на нишестето от амилолитични млечнокисели бактерии

Амилолитичните млечнокисели бактерии притежават различни пътища за разграждане на нишесте-съдържащите субстрати. Под действието на гликозид-хидролазите протича хидролиза на вътрешни или крайни връзки в молекулата на нишестето и като продукти се получават α -(1 $\rightarrow$ 4) свързани малтодекстрини, малтоза или глюкоза. Други ензими, модифициращи нишестето са трансферазите - гликоген-фосфорилазата извършва едновременно хидролиза и фосфорилиране на крайния глюкозен остатък, а глюкан-разклоняващият ензим извършва пренос на сегмент от (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-глюкан към хидроксилна група на подобна α -D-глюканова верига, което води до формирането α -1,6-разклонения (Goh and Klaenhammer, 2013). На базата на биоинформатичен анализ бяха генерирани двойки праймери, специфично разпознаващи прицелните гени, а продуктите на амплификацията бяха използвани за конструирането на нерадиоактивни сонди, белязани с дигоксигенин. Транскрипцията на изследваните гени бе доказана чрез Northern-хипридизация на тотална РНК (изолирана от клетки, култивирани за 48 ч в среда с нишесте) със съответната ДНК-сонда. Във всички проведени експерименти като позитивна контрола беше използвана тотална РНК на щам *L. paracasei* B41 (DSM 23505), а като негативна – РНК от *E.coli* DH5 α . При представителите от различни таксономични групи бе отчетена експресия на различни гени (Фиг. 16).

Dig-белязана сонда:



Фигура 16. РНК-ДНК хибризация на тотална РНК, изолирана от амилотични щамове млечнокисели бактерии с dig-белязани сонди.

1.2.2.1. Транскрипционен анализ на аМКБ от род *Lactobacillus*

При изолатите от род *Lactobacillus* се транскрибират и седемте изследвани гена (Табл. 4). При представителите от род *Lactobacillus* екстрацелуларните амилази са ендоамилази, които хидролизират както

α -(1→6), така и α -(1→4) гликозидните връзки в амилоза, амилопектин и пулулан.

Таблица 4. Експресия на гените, включени в усвояването на нишесте при представителите от род *Lactobacillus*.

Вид	Щам	<i>amy1</i>	<i>glgP</i>	<i>glgB</i>	<i>agl</i>	<i>malL</i>	<i>treC</i>	<i>dexC</i>
<i>L. casei</i>	Ya1	++	++	++	++	++	++	++
<i>L. casei</i>	Da3	++	++	++	+	++	++	+
<i>L. paracasei</i>	Pr3	++	++	++	++	++	++	++
<i>L. paracasei</i>	LC1	++	+	++	+	++	++	++
<i>L. paracasei</i>	7	++	+	++	+	++	++	++
<i>L. paracasei</i>	B41	++	+	++	+	+	+	+
<i>L. paracasei</i>	ED1	++	+	++	+	++	++	+
<i>L. pentosus</i>	N3	++	++	++	+	++	++	+
<i>L. pentosus</i>	BX3	++	++	++	+	++	++	+
<i>L. plantarum</i>	BB2	++	++	++	++	++	+	+
<i>L. plantarum</i>	8.1	++	++	+	+	+	+	+
<i>L. sakei</i>	3/30	ND	ND	±	-	-	+	ND

По-високите стойности на вътреклетъчна амилазна активност (най-висока при щам *L. plantarum* BB) може да се обясни с експресията на гените *malL*, *agl* и *dexC*. Транскрипцията на анализирани гени разкрива последователното действие на екстрацелуларни и вътреклетъчни амилолитични ензими по време на хидролизата на субстрата. Гените, кодиращи гликоген-фосфоорилаза и (1→4)- α -глюкан разклоняващ ензим (*glgP* и *glgB*, част от *glg* оперона) се експресират при всички изследвани представители от род *Lactobacillus* в присъствие на нишесте. Субстрати на гликоген-фосфоорилазата са малтотриозата и по-високо молекулните малтодекстрини, но не и малтозата (Alonso-Casajus et al., 2006). Едновременната транскрипция на *glgP* и *glgB* гените е показател, че при представителите от род *Lactobacillus* синтезата на гликоген и хидролизата на нишесте протичат паралелно. Възможно е този механизъм на ко-транскрипция да играе роля в регулацията на процеса на усвояване на въглеродни източници в клетката (Møller et al., 2012, 2014).

От всички изследвани щамове, представители на род *Lactobacillus* щам *L. sakei* 3/30, се отличава с експресия само на три от изследваните гени (*glgB*, *agl* и *treC*). При него не беше наблюдавана транскрипция на гените *amy1*, *glgP*, *malL* и *dexC*, а измерената екстрацелуларна амилазна активност (7 - 8 U/мл) най-вероятно се дължи на експресия на гена *amy1*.

В хибридизационните експерименти бе отчетен най-силен позитивен сигнал за гена *treC*, чийто продукт е ензим с две различни активности при щамове от видовете *L. paracasei*, *L. rhamnosus* и *Listeria monocytogenes*. От една страна, ензимът проявява олиго-1,6-глюкозидазна активност (ЕС 3.2.1.10), а от друга - трехалозо-6-фосфат-хидролазна активност (ЕС 3.2.1.93). Други автори допускат, че декстран-глюкозидазата (глюкан 1,6- α -глюкозидаза, кодирана от гена *dexB* също има отношение към усвояването на нишесте от *L. sakei* (Gänzle и Folador, 2012). Тъй като и двата гена - *treC* и *dexB* кодират вътреклетъчни ензими, а при щам *L. sakei* 3/30 е отчетена висока екстрацелуларна амилазна активност и по-слаба интрацелуларна (1.64 U/мл), може да се допусне, че отговорните ензими при изолат 3/30 са все още неясни и се нуждаят от бъдещи изследвания.

Sun et al. (2015) отбелязват, че голяма част от гликозид-хидролазите при лактобацилите са все още неизучени, макар че известна светлина хвърлят проучванията на Turpin et al. (2011). Колекция от 152 аМКБ от *ben-saalga* и метагеномни библиотеки на ферментирали храни са проверени за присъствието на 6 гена, кодиращи ензимите, участващи в разграждането на нишестето и гликолитичния път. Разпространението на гените сред изолатите е следното: 79% притежават *agl* (α -глюкозидаза), 76% *glgP* (гликоген-фосфорилаза), 75% α -*amy* (α -амилаза), 66,5% *malP* (малтозо-фосфорилаза), 54% *dexC* (неопулуланаза) и 19% *malL* (олиго-1,6-глюкозидаза). Само 8% от тестваните изолати са позитивни по всички гени, докато 3% са негативни по всички гени (Turpin et al., 2011).

1.2.2.2. Транскрипционен анализ на аМКБ от род *Pediacoccus*

Сред изолатите, принадлежащи към род *Pediacoccus*, бяха изследвани два щам *P. acidilactici* - Bom3 и Lin1, и един представител на *P. pentosaceus* – щам 93 (Табл. 5).

Таблица 5. Експресия на гените, включени в усвояването на нишесте сред представителите от род *Pediacoccus*.

Вид	Щам	<i>amy1</i>	<i>glgP</i>	<i>glgB</i>	<i>agl</i>	<i>malL</i>	<i>treC</i>	<i>dexC</i>
<i>P. acidilactici</i>	Lin1	++	++	+	+	++	++	+
<i>P. acidilactici</i>	Bom3	++	+	+	+	++	+	+
<i>P. pentosaceus</i>	93	++	+	+	-	+	+	-

Щамовете *P. acidilactici* Bom3 и Lin1 експресират гена *malL* и не е изненадващо, че достигат най-високи стойности за вътреклетъчна амилазна активност (10.66 и 15.3 U/мл) сред изследваните изолати. Ензимът, кодиран от гена *malL* е интрацелуларна олиго-1,6-глюкозидаза с афинитет към късоверижни субстрати, което е в пълно съответствие с наличната експресия на отговорния ген. Щам *P. pentosaceus* 93 прояви сравнително висока екстрацелуларна амилазна активност - 10 U/мл, което се потвърждава от транскрипцията на гена *amy1*, отговорен за

синтеза на екстрацелуларна амилаза. От друга страна, при изследвания щам не беше наблюдавана транскрипция на гените *agl*, (интрацелуларна α -глюкозидаза), и *dexC*, (неопулуланаза). Тези резултати потвърждават отчетените изключително ниски стойности за вътреклетъчната амилазна активност – едва 0.5 U/мл. Въпреки, че са изолирани от традиционни ферментирали нишесте-съдържащи храни и напитки представителите на род *Pediosoccus* не притежават и/или не експресират по-голямата част от гените, отговорни за хидролизата на нишесте при аМКБ. Turpin et al. (2011) също отбелязват, че в генома на представителите на род *Pediosoccus* присъстват само три от гените, отговорни за усвояването на нишесте - *amy*, *dexC* и *mall*.

1.2.2.3. Транскрипционен анализ на аМКБ от род *Enterococcus* и *Streptococcus*

Представителите на род *Enterococcus* (*E. faecium*) намират приложение в биотехнологичната индустрия като обещаващи продуценти на млечна киселина от нишестени хидролизати, но досега не бяха изолирани амилолитични представители на рода (Nolasco-Hipolito et al., 2012).

Таблица 6. Експресия на гените, включени в усвояването на нишесте сред представителите от род *Enterococcus* и *Str. bovis*.

Вид	Щам	<i>amy1</i>	<i>glgP</i>	<i>glgB</i>	<i>agl</i>	<i>mall</i>	<i>treC</i>	<i>dexC</i>
<i>E. faecium</i>	95	++	+	+	-	-	+	ND
<i>E. faecium</i>	73	+	-	+	-	-	-	ND
<i>E. faecium</i>	M1	+	-	+	-	+	-	ND
<i>E. faecium</i>	1.2	++	+	+	++	+	+	ND
<i>E. faecium</i>	91	+	+	+	-	+	+	±
<i>E. faecium</i>	H	+	-	+	-	-	-	ND
<i>E. faecium</i>	71	+	+	+	+	+	+	±
<i>E. faecium</i>	65	+	-	+	-	-	+	ND
<i>E. faecium</i>	87	++	+	+	-	-	+	ND
<i>E. faecium</i>	9/16	+	+	+	-	+	+	ND
<i>E. durans</i>	61	++	++	+	-	+	+	±
<i>Str. bovis</i>	D	±	±	+	-	±	+	±

В нашите изследвания бяха открити 11 амилолитични щамове ентерококи, като резултатите от Northern-хипризацията (Табл. 6) показват, че щамове *E. faecium* - 65, 91, 9/16, 87, 71, 73, 1.2, M1, H, 95 и *E. durans* 61 експресират 6 от изучаваните амилолитичните гени (*amy1*, *glgP*, *glgB*, *agl*, *mall* и *treC*). Единствено за гена *dexC* не беше наблюдаван положителен геномен или транскрипционен сигнал, което може да бъде обяснено със сравнително по-ниската степен на хомология (67%) между гена, кодиращ неопулуланаза при *Enterococcus* и използваната сонда. Всички останали амилолитични гени се експресират в различни

комбинации при отделните изолати, разкривайки щамова специфичност на продукцията на амилолитични ензими при рода *Enterococcus*.

Независимо, че представители от род *Enterococcus* са открити в царевичната напитка *pozol* (Díaz-Ruiz et al., 2003), а *E. faecium* е изолиран от африканските напитки *bushera* и *kisra*, досега не е била установена способността на бактериите от рода да разграждат нишесте (Shibata et al., 2007). Както в нашата колекция, така и по света, не са изолирани амилолитични щамове *Oenococcus*.

При част от представителите на род *Enterococcus* не беше отчетена експресия на *agl*, *mall*, *treC*, или *glgP*. Забележително е, че при всички ентерококи най-силен сигнал иРНК/ДНК беше отчетен за гена, кодиращ α -амилаза, като това корелира с доказаната най-висока екстрацелуларна амилазна активност при щам *E. durans* 61 - 15.63 U/мл.

Единственият изолат, принадлежащ към род *Streptococcus* - *Str. bovis* щам D не показва ясна експресия на по-голямата част от търсените гени. Отчетените ниски стойности на извън- и вътреклетъчна амилазни активности (3.97 U/мл и 3.84 U/мл) бяха в унисон с наблюдаваната слаба транскрипция на гените *amy1*, *glgP* и *mall* и *dexC*, както и с липсата на транскрипция на *agl* гена.

Анализите на пълната геномна секвенция на *Str. thermophilus* показват, че способността му да разгражда нишесте е ограничена. Геномът включва амилазен ген (*amyI*) и два псевдогена (*ΨdexT* и *ΨpulaA*), кодиращи декстраназа и пулуланаза, но тези гени кодират неактивни ензими.

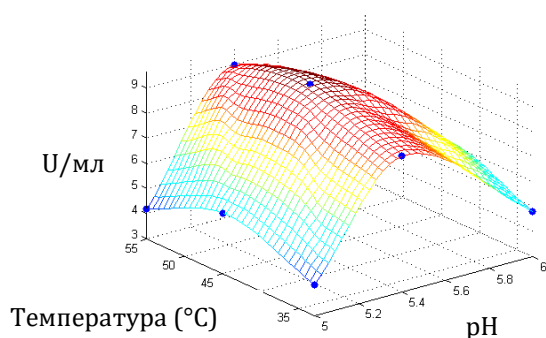
Според Satoh et al. (1997), амилазата на щамове *S. bovis* обаче, осигурява бърз клетъчен растеж на вида при субстрат нишесте. Два различни щама *S. bovis* разграждат нишестето - JB1 и 148 с помощта на извън- и вътреклетъчни амилазни ензими. Интрацелуларната амилаза на *Str. bovis* 148 хидролизира разтворимото нишесте до голямо количество малтотриоза и малко количество малтоза, докато екстрацелуларната напълно хидролизира нишесте до малтоза и глюкоза. Екстрацелуларната амилаза може да разгражда сурово нишесте, докато интрацелуларната – няма такава активност. За щамове *Str. bovis* 25124 и *Str. macedonicus* също се съобщава амилолитична активност, но няма информация за техните нишесте-разграждащи ензими (Satoh et al., 1997).

1.2.2.4. Амилолитични ензими при *Lactococcus lactis*

Относно представителите на *Lc. lactis*, в литературата има единични съобщения за предполагаеми амилолитични свойства (Østergaard et al., 1998; Díaz-Ruiz et al., 2003; Mulyanjan et al., 2003), както и за вероятното отнасяне на тези свойства към плазмиди, тъй като подлежат на загуба в зависимост от условията на култивиране (*Lc. lactis* IBV500, Doman et al., 2000; Wasko et al., 2010, 2011). До 2008 г., когато от ръжено кисело тесто бе изолиран българския щам *Lc. lactis* B84, амилазната активност на вида не бе изследвана и за изолат B84 бе

доказано, че е първият представител на вида *Lc. lactis*, способен да конвертира нишестето в млечна киселина чрез едновременна хидролиза и ферментация (Петров, 2018).

Бяха проведени изследвания за установяване на действащите амилазни ензими и кодиращите ги гени. Безклетъчната супернатанта след култивиране на B84 прояви ниска амилазната активност (под 1 U/ml), докато активността на цитоплазмената амилаза на щам B84 бе десетократно по-висока. Оптималните стойности на pH и температура за действието на цитоплазмената амилаза бяха pH 5.4 и 45 °C, а достиганата максималната активност бе 9.6 U/ml.



Фигура 17. Влияние на температурата и pH върху активността на цитоплазмена амилаза на *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84.

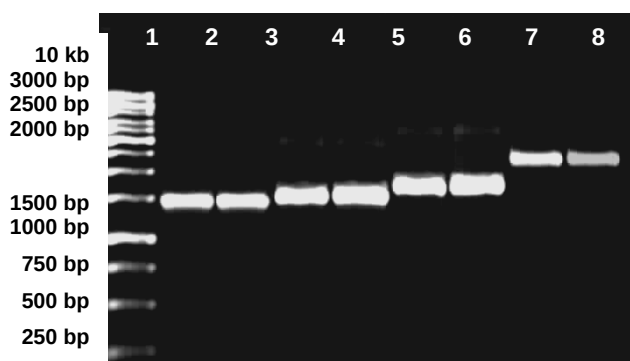
Наличието на четирите изследвани гена в генома на *Lc. lactis* subsp. *lactis* B84 бе доказано чрез PCR (Фиг. 19). Чрез RT-PCR - обратна транскрипция с матрица тотална РНК и PCR със специфичните праймери, бе проследена експресията на гените в щамове *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL 1403, DSM 20481 и B84, култивирани в среди с въглероден източник глюкоза или нишесте.

Резултатите от транскрипционния анализ показаха, че два от гените, *amyL* и *amyY*, кодиращи съответно цитоплазмена и извънклетъчна α -амилаза, се транскрибират при щам B84, но не и при *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL 1403 и DSM 20481 (Фиг. 19). Генът *glgP* (кодиращ гликоген-фосфорилаза) не се експресира в никой от изследваните щамове, докато генът *ari* (за амилопулулаза) се транскрибира само в IL 1403. Следователно, алтернативният път на разграждане на нишестето от гликоген-фосфорилазата най-вероятно не действа при лактококите, а амилопулулазата, кодирана от гена *ari* също най-вероятно няма отношение към хидролизата на нишесте при *Lc. lactis*.

Контролът върху експресията на действащите гени бе проверен, като описаните RT-PCR експерименти бяха повторени с клетки, култивирани в MRS (20 г/л глюкоза). Бе установено, че гените *amyL* и *amyY* на B84 се транскрибират само в случай, че клетките са култивирани в среда, съдържаща нишесте. В присъствието на глюкоза гените не се експресират поради явлението катаболитна репресия.

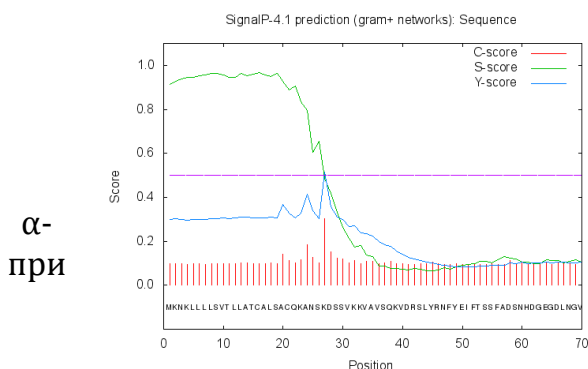
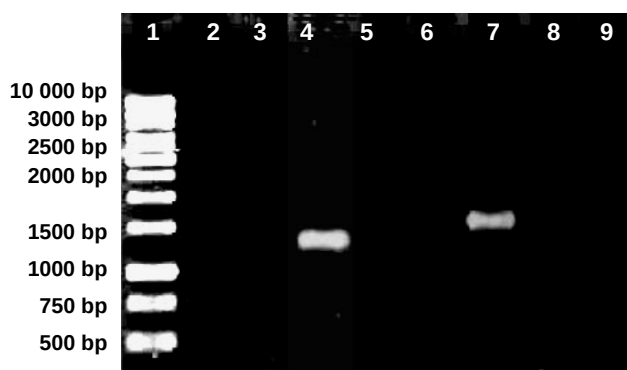
Анализът на транслираната аминокиселинна последователност на AmyY (Фиг. 21) разкрива наличието на сигнален пептид от 28 aa с хидрофобна област KLLLL, което предполага транспорт на ензима през клетъчната мембрана. Получените резултати водят до извода, че

амилазната активност на българския изолат *Lc. lactis* B84 се дължи на комбинираното действие на извънклетъчна α -амилаза, кодирана от *amyY*, а по-късите олигозахариди се доразграждат вътрешноклетъчно под действието на цитоплазмената амилаза, кодирана от *amyL*.



Фигура 18. PCR детекция на гени, свързани с хидролизата на нишестето при *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. № на старт и проба: 1) Маркер 1 kb, 2) B84 (*amyL*), 3) IL 1403 (*amyL*), 4) B84 (*amyY*), 5) IL 1403 (*amyY*), 6) B84 (*apu*), 7) IL 1403 (*apu*), 8) B84 (*glgP*), 9) IL 1403 (*glgP*).

Фигура 19. Изследване на транскрипцията на гени *amyL* and *amyY* чрез RT-PCR. № на старт и проба: 1) Маркер 1 kb, 2) IL 1403 (*amyL*), 3) DSM 20481 (*amyL*), 4) B84 (*amyL*), 5) IL 1403 (*amyY*), 6) DSM 20481 (*amyY*), 7) B84 (*amyY*), 8) 9) отрицателна контрола.



Фигура 20. Предсказване на наличието на сигнален пептид в аминокиселинната секвенция на амилаза, кодирана от ген *amyY* *Lc. lactis* subsp. *lactis* с програмата SignalP-4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP).

Разкриването генетичните основи на амилазна активност при *Lc. lactis* subsp. *lactis* B84 допринесе за разбирането на процеса на хидролиза на нишесте при лактококи. Безопасният статут прави щам перспективен за разработване на нови ферментирани храни и техните модификации, напр. частично хидролизирани нишестени каши (Nguyen et al., 2007).

1.2.3. Клониране и експресия на ген *amy41*, кодиращ амилопулулазен ензим в *L. paracasei* subsp. *paracasei* B41

Данните за наличието на висока извънклетъчна амилазна активност на *L. paracasei* subsp. *paracasei* B41 и проучването на усвояваните субстрати показват, че щамът разгражда малтоза, нишесте и

пулулан. След биоинформатичен анализ на пълните геноми на родните *L. paracasei* ATCC 25302, *L. casei* BL23 и *L. casei* щам Zhang (www.genome.ad.jp) бяха генерирани специфични праймери с прицелен ген, кодиращ ензим амилопулулаза.

```

1  ACACTCGACG TAGAATAGCA TCTGATCAGC ATGCCTTGGC GCTCATTGTTA
                                     (-35)
52  TCAATCCAG CTATCGGTG CGTGATTAAT GAAGGTTTCAT TTATCGGTTT
                                     (-10)

CRE-MOTIF
101  TGAGAACGTT TCGTGTACAT GACACATGGA GGAACACA ATG TTTCAATTT
                                     RBS      M F Q F
151  GATTCATTTA CCGATCGCCG ACCTTTTGGC GCGGTGCAAA AAGGCACGGC
      D S F T D R R P F G A V Q K G T
201  TGTGACATTG ACGGCACAGG CTGATGGTGC GGTGACACAA GCCACACTTG
      A V T L T A Q A D G A V T Q A T L
251  TCATCATGCC AGACGAACAT TCGGATCAAA CGCAATCCTT GCCGATGACG
      V I M P D E H C D Q T Q S L P M T (...)

L. casei BL23      GGNLTGIQKQLPLLAARGINALYLSPIFQARSNHRYDTGDYFAIDEVLGSLHDFKQFLAA 240
L. casei Zhang     GGNLTGIQKQLPLLAARGINALYLSPIFQARSNHRYDTGDYFAIDEVLGSLHDFKQFLAA 240
L. paracasei ATCC 25302 GGNLTGIQKQLPLLAARGINALYLSPIFQARSNHRYDTGDYFAIDEVLGSLHDFKQFLAA 240
L. paracasei B41    GGNLTGIQKQLPLLAARGINALYLSPIFQARSNHRYDTGDYFAIDEVLGSLHDFKQFLAA 240
*****

L. casei BL23      AHQLGMHVILDGVFNHVGADSRVFNAVNEYSDVGAANSL DSPYASWF SFKRFPPDDYNSWW 300
L. casei Zhang     AHQLGMHVILDGVFNHVGADSRVFNAVNEYSDVGAANSL DSPYASWF SFKRFPPDDYNSWW 300
L. paracasei ATCC 25302 AHQLGMHVILDGVFNHVGADSRVFNAVNEYSDVGAANSL DSPYASWF SFKRFPPDDYNSWW 300
L. paracasei B41    AHQLGMHVILDGVFNHVGADSRVFNAVNEYSDVGAANSL YSPYDSWF SFKRFPPDDYNSWW 300
*****

L. casei BL23      GVKDLPAINKDNQDFHD FIAAKKGSVISYWTDLGVDGWRLDVADELMDDFIRQIRSTLDQ 360
L. casei Zhang     GVKDLPAINKDNQDFHD FIAAKKGSVISYWTDLGVDGWRLDVADELMDDFIRQIRSTLDQ 360
L. paracasei ATCC 25302 GVKDLPAINKDNQDFHD FIAAKKGSVISYWTDLGVDGWRLDVADELMDDFIRQIRSTLDQ 360
L. paracasei B41    GVKDLPAINKDNQDFHD FIAAKKGSVISYWTDLGVDGWRLDVADELMDDFIRQIRSTLDQ 360
*****

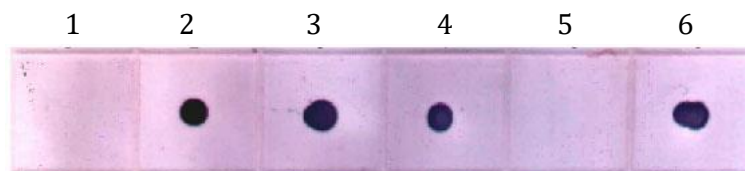
```

Фигура 21. Транскрибирана аминокиселинна последователност на амилопулулазата на *L. paracasei* B41. Консервативните райони за амилазните ензими са подчертани.

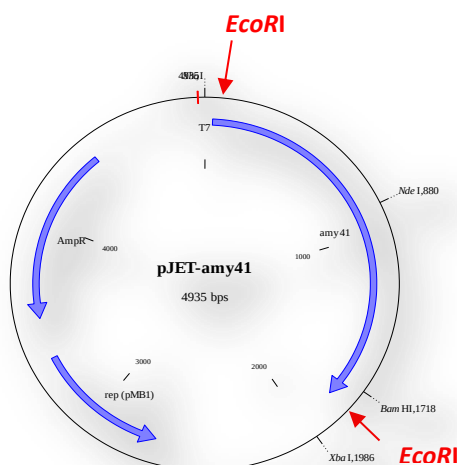
Чрез PCR амплификация с двойката праймери amyF: 5' GGT TCA TTT ATC GGT TTT GAG AA 3' и amyR: 5' GCT ATA ACA AAT CAC AGC ATT C 3' бе получен фрагмент ДНК, съдържащ потенциално отговорния за амилазната активност ген, който бе секвениран. Пълната нуклеотидна секвенция на *amy41* бе депозирана в базата данни на NCBI под номер NM955701. Генът е с дължина 1778 нуклеотида, започва с ATG-кодон, а транслираният полипептид се състои от 592 аминокиселини, с изоелектрична точка pI 5.0 и молекулна маса 67 kDa. ППВ съдържа сигнален пептид от 28 преобладаващо хидрофобни аминокиселини с типично място за срязване AQA (L-Ala, L-Gln, L-Ala) между позиции 26 и 29.

В амилазните промотори при Грам-(+) бактерии обикновено присъства cis-действащ сайт *cre* за контакт с глобалния регулаторен протеин CsrA. CsrA се свързва с промотора при ниски нива на глюкоза и активира експресията на съответния ген. Промоторният район на *amy41* съдържа консенсуса *TGNNANCGNT* след (-10) района (Фиг. 21).

С цел да се изяснят условията, които позволяват експресията на *amy41*, беше проучено влиянието на различни въглехидрати върху генната експресия. Чрез Northern дот-блот хибридизация бе изследвана транскрипцията на *amy41* в присъствието на глюкоза, малтоза, нишесте или пулулан (Фиг. 22) и бе доказано, че генът е индуцируем и се експресира само в среда, съдържаща 20 г/л нишесте, малтоза или пулулан, докато глюкозата като субстрат потиска генната транскрипция.



Фигура 22. Northern хибридизация на 200 ng тотална РНК с *amy41*, белязан с дигоксигенин. № на старт и проба: 1) глюкоза; (2) малтоза; (3) нишесте; (4) пулулан. За негативна контрола послужи тотална РНК, изолирана от *L. casei* ATCC 27139 (5), а като позитивна -хромозомна ДНК от *L. paracasei* B41 (6).

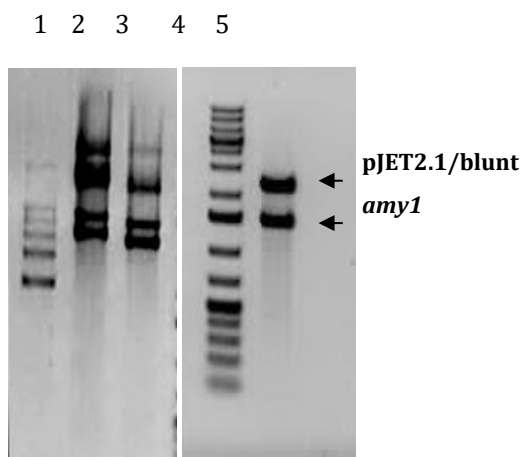


Фигура 23. Конструктът pJET-*amy41*.

Тези резултати бяха в съгласие с описаната катаболитна репресия на експресията на гена за амилаза при *L. amylovorus* (Lokman et al., 1997) и на галактозния оперон при *Lc. lactis* (Luesink et al., 1998).

С помощта на праймерна двойка *amyF'*/*amyR'* (с добавен рестрикционен сайт за рестриктазата *EcoRI*), фрагмент от ДНК, съдържащ гена *amy41* и регулаторните райони преди него, бе амплифициран чрез PCR и клониран във вектор pJET 2.1/blunt (2974 bp) под контрола на T7 фагов промотор (Фиг. 23). С получения конструкт pJET-*amy41* бе трансформиран щам *E. coli* DH5 α . Анализът на рекомбинантните клонове продължи с проверка на способността на трансформантите да разграждат нишесте в агаризирана среда. Четири от трансформантите консумираха в най-голяма степен субстрата нишесте,

за което свидетелстват получените зони на просветляване около съответните колонии. Трансформантите бяха селектирани според тяхната амилазна активност на агаризирана среда LB с добавени 50 мкг/мл ампицилин, 0.5% нишесте и индуктор 0.5 mM IPTG. За да се получи свръх-експресия на амилазния ген *amy41* с конструкт рJET-*amy41* бе трансформиран експресионен щам *E. coli* BL21(DE3), съдържащ ген за T7 фагова полимераза, интегриран в хромозомата.

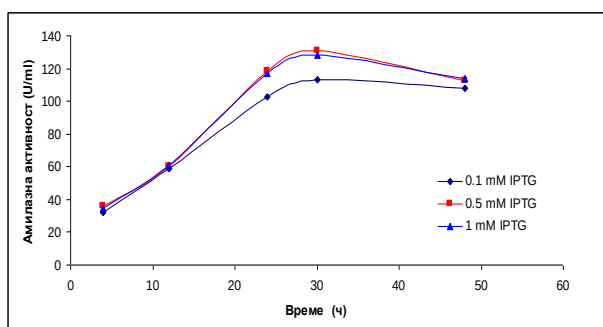


Фигура

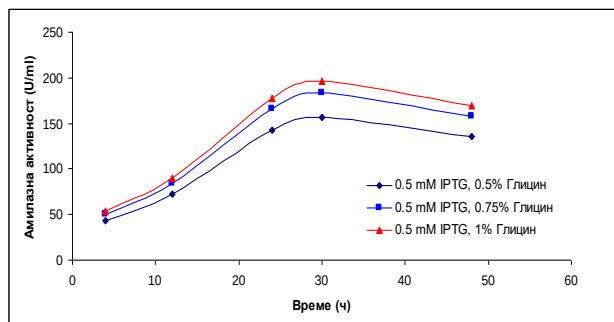
24.

Рестрикционен анализ на рекомбинантни клонове *E. coli* DH5 α , съдържащи конструкт рJET-*amy41*. № на старт и проба: 1) рJET 2.1/blunt, 2) Плазмидна ДНК - клон 2; 3) Плазмидна ДНК - клон 8, 4) М) маркер 1 kb, 5) Рестрицирана плазмидна ДНК - клон 8/*EcoRI*.

Фигура 25. Трансформанти *E. coli* BL21(DE3), съдържащи конструкт рJET-*amy41*. Като отрицателна контрола (К) е използван щам *E. coli* DH5 α .

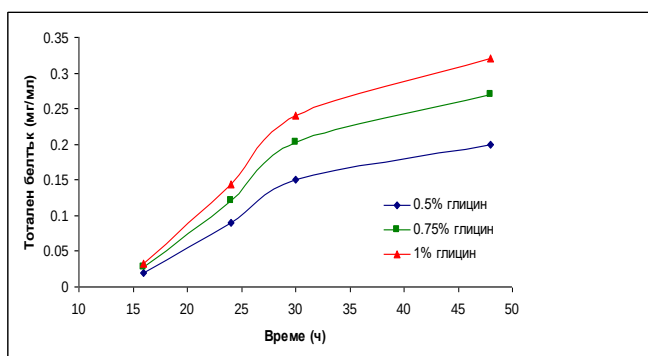


Фигура 26. Влияние на количеството индуктор IPTG върху екстрацелуларната амилазна активност на *E. coli* BL21(DE3), трансформиран с конструкт рJET-*amy41*.



Фигура 27. Влияние на количеството глицин в средата (клон 8).

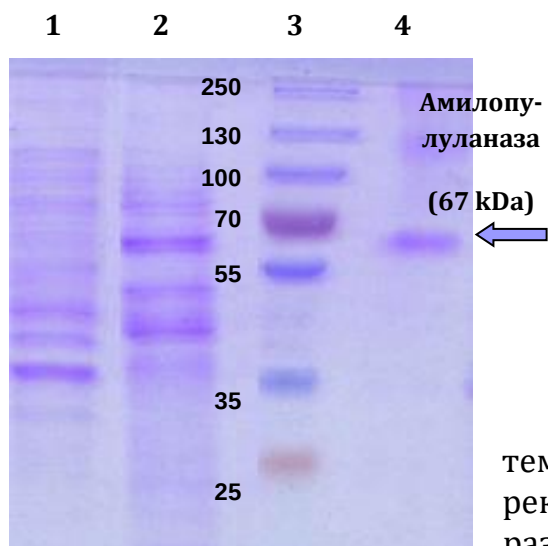
С цел усилване на хетероложната експресия на клонираната амилопулуланаза в *E. coli* BL21(DE3), бяха проведени периодични процеси в колби за оптимизиране на концентрацията на индуктора IPTG, фазата на растеж при индукция на T7-промотора, температурата на култивиране след индукция и добавка на глицин в средата, като бе изследвана екстрацелуларната амилазна активност на безклетъчни супернатанти. Най-висока амилазна активност бе отчетена при 0.5 mM IPTG, като максималната стойност от около 130 U/мл бе постигната на 30-я час (Фиг. 27), при добавка на IPTG при OD₅₀₀=0.9 и култивиране при 37°C, 100 rpm.



Фигура 28. Общ извънклетъчен белтък при различна концентрация на глицин.

Влиянието на добавянето на глицин върху амилазната активност бе проследено при оптималната за експресията концентрация на IPTG - 0.5 mM. Най-висока амилазна активност (и най-високо количество тотален белтък в супернатантата) бяха установени при добавката на 1% глицин. Амилазната активност на рекомбинантния ензим достигна 202 U/мл на 30-я час (Фиг. 28). Измерването на количеството на общия извънклетъчен белтък на *E. coli* BL21(DE3)-pJET-amy41 и визуализацията чрез денатурираща белтъчна полиакриламидна гел-електрофореза (SDS-PAGE) доказаха, че при липса на индукция на T7 промотора не се наблюдава експресия на гена *amy41* (Фиг. 29, старт 1).

След индукция с 0.5 mM IPTG и добавка на глицин, в средата се секретира значително количество рекомбинантен протеин. След пречистването и концентрирането на 300 мл културална течност през мембрана с големина на порите 50 kDa, бе получена частично пречистена амилопулуланаза (Фиг. 29, старт 4). Нейната молекулна маса е 67 kDa и отговаря на очакваната, изчислена след секвенирането на гена *amy41*.



Фигура 29. Денатурираща белтъчна полиакриламидна гелелектрофореза на извънклетъчни протеини на *E. coli* BL21(DE)-pJET-amy41 (клон №8). № на старт и проба: 1) Клон 8, без IPTG; 2) Клон 8, 0.5 mM IPTG, 1% глицин; 3) молекулен маркер; 4) частично пречистена амилопулулаза.

Оптималните стойности на рН и температура за действието на рекомбинантната амилопулулаза не се различават от тези на ензима на *L. paracasei* - рН 5.5 и 45°C. Влиянието на други фактори върху ензимната активност не бе изследвано. Секвенционният анализ на гена *amy41* разкрива нови данни за амилазните ензими от групата видове от клана *L. casei/paracasei*. При сравняването на секвенциите на генни ортолози в различни видове *Lactobacillus* става ясно, че гените, кодиращи амилаза присъстват в геномите, но рядко някой от тези щамове го експресира *in vivo*. Сравнението на транслираната аминокиселинна секвенция на амилопулулазата Amy41 показва много ниска степен на подобие (само 82% идентичност) с потенциалните (по данни от секвенираните геноми) α -амилази на щамовете *L. plantarum* ATCC 14917, WCFS1 и JDM1 (Acc. № ZP04015242, NP783889 и YP003061609). Висока бе степента на идентичност (99%) с транслирани протеини на *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 25302 (ZP04672920), *L. casei* ATCC 334 (YP807232), *L. casei* BL23 (YP001988126), *L. casei* Zhang (YP003789035) и 96% с *L. rhamnosus* (ZP04441904). Важно е да се отбележи, че никой от изброените щамове, независимо от наличието на гени за амилази или амилопулулази в генома, не проявява амилолитични свойства. Оказа се, че при амилопулулазата *amy41* на *L. paracasei* B41 съществуват три аминокиселинни замени в амилазния каталитичен домен, в близост до активния център. Аспартат (L-Asp280), аланин (Ala 284) и фенилаланин (Phe287) са заменени съответно с тирозин, L-аспартат и тирозин. Две важни aa замени бяха забелязани и в лидерния пептид: на позиция 10 в Amy41 присъства аргинин, вместо хистидин, а на позиция 20 - треонин, вместо аланин, както е при останалите ензими при всички останали щамове. Наличието на сигнален пептид е задължително условие ензимът да действа като извънклетъчен, тъй като той осигурява транспорта на полипептида извън клетката преди ензимното зреене. Винаги съдържа предимно хидрофобни аминокиселини (36 в *L. amilovor*us и *L. plantarum* A6). Вероятно aa замените в този район имат сериозно положително влияние върху транспорта на Amy41 извън клетката и върху неговото успешно зреене.

AmyA гените на *L. amilovor*, *L. plantarum* A6 и *L. manihotivorans* са с 98% идентичност помежду си и са напълно различни от съответните амилазни гени в други лактобацили. При сравняването на техните аминокиселинни секвенции е установено, че ензимите са организирани в два функционални домена: каталитичен (аминокиселини от 1 до 474) и нишесте-свързващ домен – SBD (от aa 475 до aa 953). Каталитичният домен включва всички консервативни райони за семейството GH13. Характерна особеност на ензимите, проявяващи висока активност е присъствието на обширен район за свързване със субстрата SBD - почти 500 aa. Той съдържа тандемни повтори от 91 аминокиселини: 4 повтора в *L. manihotivorans* и *L. plantarum* A6 и 5 повтора в *L. amilovor*. SBD играе роля в адсорбцията на ензима към суровите нишестени гранули, осигурява прикрепването към субстрата и увеличаване на концентрацията на субстрат в активния сайт на ензима (Sanni et al., 2002).

1.3. Молекулярно-биологични изследвания на гликозид-хидролазни ензими със субстрат инулин и фрукто-олигозахариди (CAzY GH32)

През последното десетилетие бе доказано, че инулинът и фруктоолигозахаридите са пребиотични въглехидрати - хранителни съставки, устойчиви на стомашните ензими, които стимулират селективно растежа на пробиотичните бактерии в дебелото черво и така имат благоприятно въздействие върху здравето на консуматора (Davis et al., 2011; Blatchford et al., 2013). Над две десетилетия *Lactobacillus paracasei* е широко известен и използван пробиотичен вид, особено подходящ за приложение в медицината и хранителната промишленост заради неговата жизнеспособност и функционалност (Crittenden et al., 2002). Известно е, че щамове от този вид подобряват състоянието при стомашно-чревни инфекции и диария (Chouraqui et al., 2008), модулират различни аспекти на имунитета на гостоприемника, предотвратяват появата на алергии и др.

След първите доказателства за хидролиза на фруктан от *L. paracasei* 8700:2 (Makras et al., 2005), потенциалните механизми за усвояване на инулин и ФОЗ са подложени на интензивни изследвания.

Бактериалните гликозидази със субстрат инулин и ФОЗ бяха проучени при различни български щамове млечнокисели бактерии. При проверка на колекцията от 115 новоизолирани щамове МКБ бяха открити четири, които бяха способни да разграждат дълговерижен инулин (DP 23): *L. paracasei* B41, LC1 и 7 и *P. acidilactici* PD3.

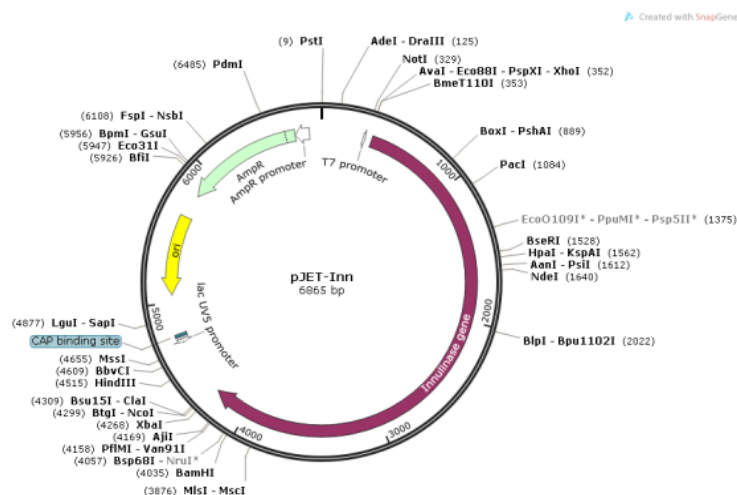
Изясняването на генетичните основи и механизмите на разграждането на инулин, както и характеризиране на отговорните за това ензими е описано в следващия раздел в дисертационния труд.

1.3.1. Клониране и секвениране на гени, кодиращи фруктан- β -фруктозидаза при *L. paracasei*

PCR-продуктът, получен от щам *L. paracasei* B41 беше клониран във вектор pJET 2.1/blunt под контрола на T7 промотор. Полученият конструкт pJET-Inn (Фиг. 30) бе с големина 6865 bp и беше използван за трансформация на щам *E. coli* DH5 α .

Фигура 30.

Рестрикционна карта на конструкт pJET-Inn.



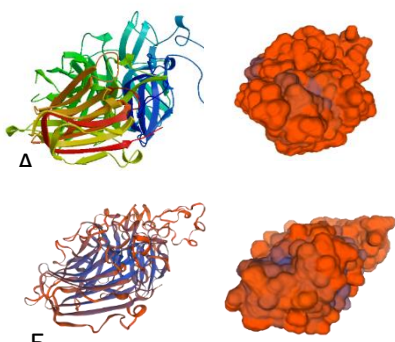
След трансформация на компетентни клетки *E. coli* DH5 α с конструкта pJet-Inn бяха получени два позитивни клона. Наличието на желаня фрагмент и неговата правилна ориентация бяха доказани след рестриктазна реакция с ензимите: *XhoI* и *NdeI*.

Секвенирането на гена, кодиращ фруктан- β -фруктозидаза при щам *L. paracasei* LC1 беше извършено по метода „хромозомна разходка“. Нуклеотидните секвенции на β -фруктозидазните гени при двата изследвани щама са депозираны в ген-банката на NCBI под номера KP663715 и KU666517. При щам *L. paracasei* B41 генът *inu* е с големина 3645 базови двойки, започва със старт кодон ATG и кодира полипептид, съставен от 1214 аминокиселини, който съдържа всички консервативни райони, характерни за протеините от семейството на гликозид-хидролазите GH32. Молекулната маса на инулиназия ензим при щам *L. paracasei* B41 е 130.3 kDa, а сигналният пептид е съставен от 38 аминокиселини. При сравняване на секвенциите щам *L. paracasei* DSM 23505 показва 99% идентичност с *L. casei* Zhang (CP0108498) и 98% с ген, кодиращ леваназа при *L. casei* LOCK919 (AGP67222).

При щам *L. paracasei* LC1 генът *fosE*, е съставена от 3885 bp и кодира полипептид с големина 1294 аминокиселини. Изчислената молекулна маса на инулиназия ензим при щам *L. paracasei* LC1 е 138.7 kDa, като сигналният пептид е със същата големина – 38 аминокиселини. Сравнението на нуклеотидните секвенции на гена *fosE* при *L. paracasei* LC1, показва 99% идентичност с щам *L. paracasei* 8700:2 (CP002391), както и с *L. casei* LOCK919 (CP005486), 98% идентичност с гена *levH1* при щам *L. casei* IAM 1045 (AB185852) и 96% идентичност с гена *fosE* при *L. paracasei* 1195 (DQ396803).

Хомологията между нуклеотидните секвенции на двата изследвани инулиназни гена при щамове *L. paracasei* B41 и *L. paracasei* LC1 е 97%.

Метаболизирането на ФОЗ от различните видове на род *Lactobacillus* става по един от двата катаболитни пътя. По първия, ФОЗ се транспортират през клетъчната стена в цитозола и се хидролизират от цитоплазмени GH32 β -фруктозидази. Начинът на транспортиране на олигозахариди в клетката е различен в зависимост от вида: при *L. acidophilus*, *L. crispatus* и *L. jensenii* транспортирането на ФОЗ се медира от четири-компонентна ABC-транспортна система, свързана с аденозин трифосфат (АТР). В *L. plantarum* транспортът на ФОЗ се извършва от фосфоенолпируват - зависима фосфо-трансферазна система (PTS). Вторият начин за преобразуване на ФОЗ е чрез ензим фруктан- β -фруктозидаза, свързан с клетъчната повърхност, който извършва извънклетъчна хидролиза на ФОЗ, последвана от транспортиране на хидролитичните продукти (т.е. фруктоза, захароза и глюкоза) от един или повече мембранни преносители (Goh et al., 2015). Този път е уникален за видовете *L. casei* / *paracasei*. Вътреклетъчните ензими за хидролиза на ФОЗ са кодирани от *msm* оперон (multiple sugar metabolism); а извънклетъчните - от *fos* оперон, състоящ се от гени *fosE* за β -фруктозидаза и PTS-транспортери (FosABCDX). *Fos* оперонът е описан за първи път в щам *L. paracasei* 1195 (Goh et al., 2006, 2007; Martel et al., 2010), а по-късно в *L. casei* IAM 1045 (Kuzuwa et al., 2012). Лактобацили, които синтезират извънклетъчни ензими с фруктозидазна (инвертазна) активност са *L. pentosus* B235 (Paludan-Müller et al., 2002), *L. acidophilus* NCFM (Barrangou et al., 2003), *L. plantarum* WCFS1 (Saulnier et al., 2007), *L. ruminis* ATCC 25644/ATCC 27782 (O'Donnell et al., 2011) и *L. plantarum* ST-III (Chen et al., 2014).

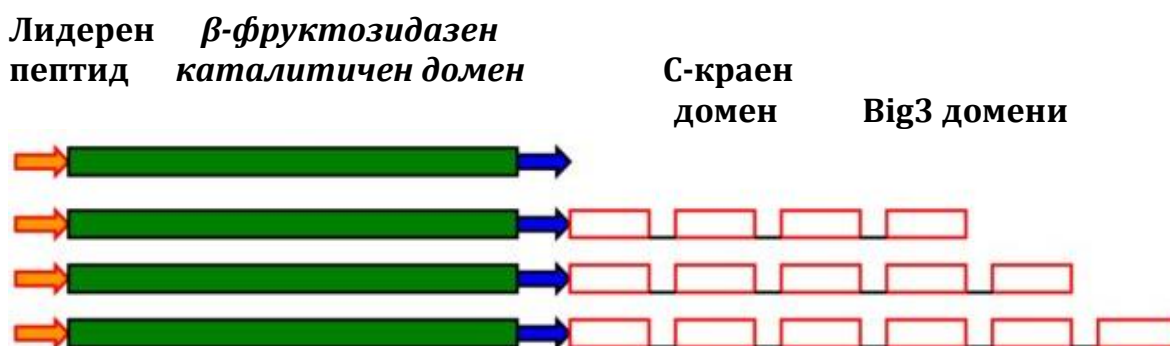


Фигура 31. Триизмерно изображение на модел на клетъчно-свързани фруктан- β -фруктозидази. А) InuB41 Модел на нагъване на ППВ и модел на повърхността на молекулата, Б) InuLC1 - Модел на нагъване на ППВ и модел на повърхността на молекулата. Моделите са генерирани със софтуер на SWISS-MODEL Workspace (Waterhouse et al., 2018).

И при двата изследвани ензима след втория Big3 домен в аминокиселинните секвенции се откриват т. нар. „горещи бримки" (hot loops). Това са райони, в които вероятността за скъсване в белтъчната молекула е голяма. „Горещите бримки" представляват динамични структури, чиято висока степен на подвижност се определя от

температурните фактори C-α (Linding et al., 2003). Те съдържат секвенцията TDA(A/T)GNKIS, разположена между позиции 951 и 960. Модификациите в “горещата бримка” водят до скъсвания в протеиновата молекула. Сравнението на аминокиселинните секвенции при ензимите от фамилията GH32 потвърждават присъствието на три консервативни мотива, изграждащи активния център на ензима – WINDPNG, RDP и ECP, всеки от които съдържа аминокиселина от каталитичната триада (Ma et al., 2015).

При новоизолираните екзо-инулинази на щамове *L. paracasei* се открива замяна на аминокиселината метионин с изолевцин в първия консервативен район. Замяната на аминокиселина в активния център дава основание да се твърди, че изолираните ензими от щамове B41 и LC1 представляват нови ензими. На Фиг. 31 са представени моделни триизмерни изображения на двата ензима на базата на техните транслирани аминокиселинни секвенции (Waterhouse et al., 2018). Анализът на напълно секвенираните геноми на представители от групата на *L. casei/paracasei* показва, че в рамките на *fos* оперона съществува голямо генетично разнообразие (Фиг. 32).



Фигура 32. Структура на фруктан-β-фруктозидаза от семейство GH32 при *L. casei/L. paracasei*.

Доказано е, че четири различни гена са отговорни за кодирането на клетъчно-свързаните β-фруктозидази (Zhang et al., 2010; Chen et al., 2011; Koryszewska-Bagińska et al., 2013), като разликите са в района, отговорен за свързването с клетъчната стена. Последният участък е съставен от вариращ брой (средно между 4 и 6) пептидоглюкан-свързващи (Big3) домени. При *L. paracasei* 1195 (ABD57319), *L. paracasei* L9 (AKU58488) и *L. paracasei* SO1 (CRL16999) β-фруктозидазните ензими съдържат шест Big3 домена. Пет Big3 домена са характерни за *L. paracasei* 8700:2 (EEQ67110), *L. casei* IAM1045 (BAD88632), *L. paracasei* LOCK919 (AGP67222) и *L. paracasei* LC1 (KU666517). Четири Big3 домена са установени в структурата на инулиназните ензими при *L. casei* Zhang (ADK17699) и *L. paracasei* B41 (AKA87712). Щам *L. paracasei* ATCC 334 (ABJ69412) не съдържа Big3 домени. Последният регион от структурата на ензима е вариабелен и влиянието му върху свойствата на β-

фруктозидазните ензими е неясен досега. В научната литература липсват данни и за получаването на ензимите в пречистен вид.

1.3.2. Продукция и пречистване на β -фруктозидазни ензими от щамове *L. paracasei*

Свързването на β -фруктозидазите към клетъчната стена винаги поражда затруднения при изолирането на ензимите в чист вид, като обикновено рефлектира в нисък добив. Поради тези ограничения данните в научната литература често се основават на клониране на каталитичния домен на β -фруктозидазните ензими в гостоприемник *Escherichia coli* (Martel et al., 2010; Kuzuwa et al., 2012). При тези манипулации самото скъсяване на белтъчната молекула, както и ефектите, произтичащи от хетероложната експресия, повлияват свойствата на протеина и в повечето случаи ефектите дори не могат да бъдат предвидени.

Въпреки, че са анализирани нуклеотидните секвенции на β -фруктозидазния прекурсор – *fosE* при щам *L. paracasei* 1195 (Goh et al., 2007; Monedero et al., 2007), както и аналогът му *levH1* при щам *L. casei* IAM 1045 (Kuzuwa et al., 2012), никой от отговорните ензими досега не е бил получаван в пречистен вид.

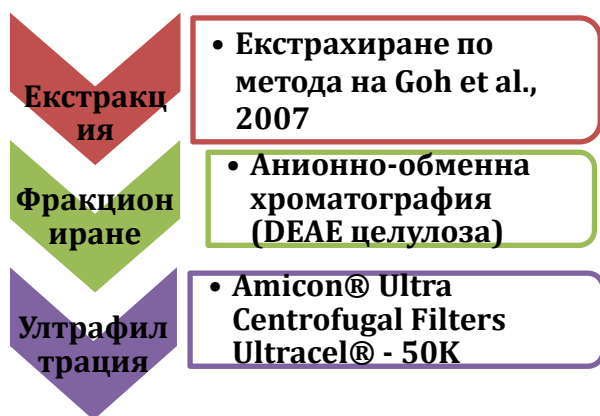
Таблица 7. Ензимна активност на различни клетъчни фракции при щамове *L. paracasei* B41 и *L. paracasei* LC1, изолирани и сравнени по два различни метода Goh et al., (2007)/ ReadyPrep™ Protein Extraction Kit-Membrane I (BioRad).

Метод	Щам	β -фруктозидазна активност (U/мл)	
		Клетъчна стена	Цитозол
Goh et al. (2007)	<i>L. paracasei</i> B41	457.3	6.33
	<i>L. paracasei</i> LC1	722.4	5.67
ReadyPrep™ Protein Extraction Kit-Membrane I (BioRad)		Клетъчна стена	Хидрофилна мембранна фракция
	<i>L. paracasei</i> B41	252.7	50.67
	<i>L. paracasei</i> LC1	216.2	37.15

За изолирането на β -фруктозидазите на изследваните щамове *L. paracasei* бяха използвани два различни подхода – (1) модифицираният метод на Goh et al. (2007), който се основава на утаяване на протеините посредством центрофугиране и (2) изолиране с търговски кит - Ready

Prep™Protein Extraction Kit - Membrane I (BioRad). В този случай се осъществява температурно-зависимо разделяне на протеините с помощта на детергент Triton X-114 (Bordier, 1981; Santoni et al., 2000). Получените клетъчно-стенни белтъци бяха разтворени в 0.1 М калиево-фосфатен буфер, pH 6.6.

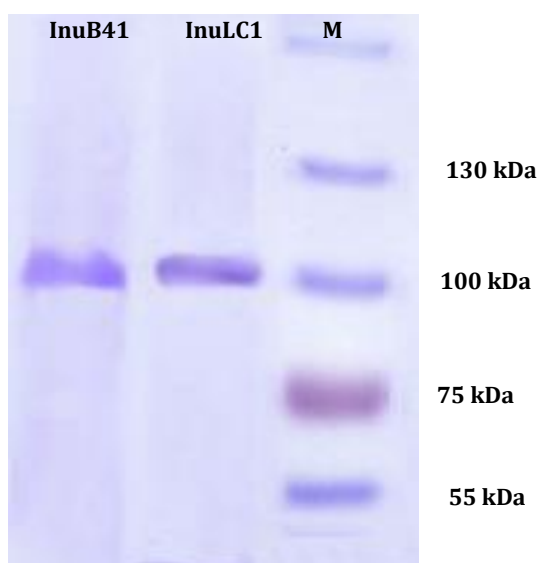
От представените в Табл. 7 резултати става ясно, че при използване на търговски кит във фракцията, съдържаща стенни белтъци бяха отчетени стойности на β -фруктозидазна активност съответно 252.7 U/мл за InuB41 и 216.2 U/мл за InuLC1. Значителни количества от добитите по тази процедура ензими останаха в хидрофилната и хидрофобната фракция. Ето защо, за последващите процедури по пречистване на белтъците, грубият клетъчно-стенен екстракт бе изолиран по метода на Goh *et al.*, който показва по-висока продуктивност, при по-ниски загуби на ензим.



Фигура 33. Етапи на пречистване на клетъчно-свързани фруктан- β -фруктозидази от *L. paracasei* B41 и LC1.

Предварителното оптимизиране на средата и условията на култивиране с контролирано pH 5.5 предостави възможност за получаване на

клетъчно-свързани инулиназни ензими в количества, които бяха няколко пъти по-високи от получените за щам *L. paracasei* 1195 (Goh et al., 2007).



Фигура 34. Визуализация на пречистените фруктан- β -фруктозидази чрез SDS-ПАГЕ в 10% полиакриламиден гел.

Таблица 8. Етапи на пречистване на клетъчно-свързани β -фруктозидази при щамове *L. paracasei* B41 и *L. paracasei* LC1.

Стъпки на пречистване	Ензим	Обем (мл)	Активност (U/мл)	Тотална активност (U)	Белтък (мг/мл)	Специфична активност (U/мг)	Добив (%)	Степен на пречистване (x)
Груб екстракт	InuB41	55	457.3	2286.5	11.3	40.5	100	1
	InuLC1	55	722.4	3612	16.4	44.0	100	1
Колона с DEAE целулоза	InuB41	554	14.3	722.2	0.2	71.5	31.6	1.8
	InuLC1	558	22.6	1310.8	0.2	113.0	36.3	2.6
Ултрафилтрация	InuB41	33.2	218.9	700.5	1.4	159.1	30.6	3.9
	InuLC1	22.9	297.5	862.8	1.8	165.3	23.9	3.8

Всички процедури по пречистването бяха извършени с 5 мл груб клетъчен екстракт от всеки щам (с установена специфична активност 40.5 U/мг при B41 и 44 U/мг при LC1).

В първата стъпка изследваните ензими бяха подложени на анионно-обменна хроматография чрез фракциониране в колона, съдържаща DEAE целулоза. Елюирането беше извършено с помощта на буфери с различна концентрация: 0.05 M и 0.2 M калиево-фосфатен буфер с pH 7.5, като ензимите бяха изцяло елюирани с първия буфер.

На следващия етап, чрез ултрафилтрация бе постигнато елиминиране на белтъчната фракция под 50 kDa и концентриране на елюатите с помощта на Amicon® Ultra Centrifugal Filters Ultracel® - 50K. След двустепенната процедура специфичната активност на белтъците достигна до 159.1 U/мг при щам B41 и 165.3 U/мг при LC1.

От представените резултати става ясно, че при фракционирането на ензима след DEAE целулоза е постигнато 2.5-кратно пречистване, а след ултрафилтрацията – 4-кратно, като след двустепенната процедура на пречистване бе получен чист протеин. В повечето случаи за пречистване на фруктан-хидролазите е необходима 5-степенна процедура, или използването на SDS, което води до получаване на неактивен протеин (Gatti et al., 1997).

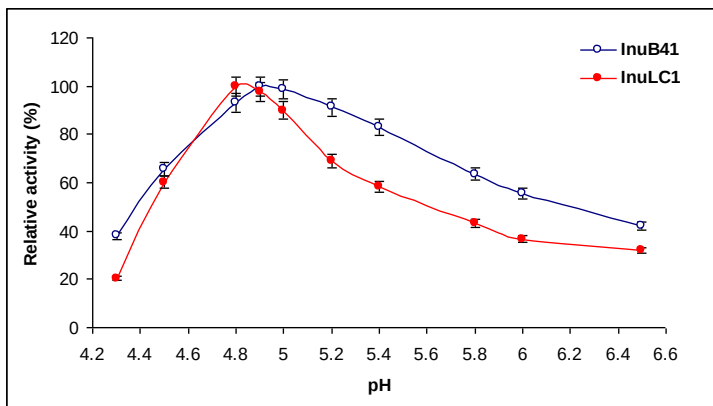
Схема на пречистване в три стъпки е приложена от Paludan-Müller *et al.* (2002), като е било извършено пречистване на екстрацелуларна фруктан-β-фруктозидаза на щам *L. pentosus* B235, а стъпките на пречистване са: ултрафилтрация (30 kDa), анионно-обменна хроматография и разделяне на база хидрофобни взаимодействия в колона с фенил-сефароза. Едностепенно пречистване чрез никелово-йонна афинитетна хроматография е докладвано при щам *L. plantarum* ST-III, но е осъществено след свръхекспресия на рекомбинантния протеин в *E. coli* (Chen et al., 2014). Високата активност на пречистените ензими (218.9 U/мл при InuB41 и 297.5 U/мл при InuLC1) ги очертава като перспективни за потенциално индустриално приложение.

В условията на оптимизиран състав на хранителната среда и pH 5.5 клетките на двата щамове проявяват инулиназна активност между 156.4 и 213.7 U/мл, което е от 4 до 6 пъти по-високо в сравнение с екстрацелуларната екзо-инулиназна активност при *Kluyveromyces marxianus*YS-1 (Singh et al., 2007, 2008), *B. safensis* (Singh et al., 2013, 2014) или *Nocardiopsis* sp. DN-K15 (Liu et al., 2013). Съгласно отношението ензимни единици (U) за грам субстрат (gds) при пречистените β-фруктозидази от щамове принадлежащи към вид *L. paracasei* е отчетен по-нисък добив в сравнение с инулиназите при гъби. След екстракция *A. niger* AUMC 9335 продуцира 300 U/gds (Housseiny, 2014), *A. tubingensis* CR16 – 257 U/gds (Trivedi et al., 2012), *K. marxianus* NRRLY-7571 – 586 U/gds (Astolfi et al., 2012), докато добивът на пречистени ензими при *L. paracasei* варира от 114.3 до 180.6 U/gds (като груби екстракти). Прикрепването към клетъчната стена на β-фруктозидазите при щамове от вида *L. paracasei* е сериозно препятствие за тяхното пречистване тъй като е необходимо разрушаване на клетъчната стена в съчетание с последващи процедури на центрофугиране при високи обороти. Поради тази причина е по-перспективно използването на целите клетки с инулиназна активност като „микробна фабрика” за продукцията на метаболити от инулин.

В голяма част от научната литература, свързана с изследването на инулиназните ензими, продуцирани от *L. casei/paracasei* се съобщава, че е много трудно молекулното тегло да бъде определено с точност. Установено е, че то варира от 100 до 165 kDa, като зависи от условията на култивиране на щамове-продуценти (Goh et al., 2007; Kuzuwa et al., 2012). Опитите за пречистване на белтъка LevH1 от щам *L. casei* IAM 1045 от културална супернатанта води до получаването на белтък с големина, съответстваща на протеин, съдържащ два домена за прикрепване към клетъчната стена, докато нуклеотидната секвенция на гена предполага пет Big3 домена (Kuzuwa et al., 2012). В същото време, клонирането на района, кодиращ каталитичния домен показва, че активността на скъсения протеин е подобна на тази на нативния ензим. Клонирането и хетероложната експресия на *fosE* гена при щам *L. paracasei* 1195 също потвърждава, че най-важната част за ензимното действие на представители от фамилията GH32 е каталитичният домен (Martel et al., 2010). Несъответствие между очакваната и получената молекулна маса на ензима е наблюдавано и при рекомбинантна β -фруктозидаза, описана при *L. plantarum* ST-III. Въпреки, че изчислената молекулна маса е 59.5 kDa, след SDS-ПАГЕ пречиственият ензим е с молекулна маса 66 kDa, като разликата от почти 6 kDa според авторите се дължи на включването на нетипични аминокиселини, тъй като белтъкът е експресиран от гостоприемник *E. coli* (Chen et al., 2014). Изчислените молекулни тегла на изследваните от нас инулинази изолирани от *L. paracasei* B41 и LC1 са съответно 130.3 kDa и 138.7 kDa, но при резултатите от полиакриламидната гел електрофореза бяха визуализирани по-ниски стойности и при двата ензима. Пречистените белтъци имаха почти равни молекулни маси от около 100 kDa (Фиг. 34). Получените резултати позволяват формулирането на нова хипотеза, обясняваща несъответствието между изчислените молекулни маси и тези на пречистените инулиназни ензими. Това най-вероятно се дължи на скъсване на молекулите в т. нар. „гореща точка” с аминокиселинна секвенция TDA(A/T)GNKIS (951-960), намираща се след втория Big3 домен. Изчисленото молекулно тегло на β -фруктозидазата в този случай - без сигнален пептид и с два Big3 домена е 100.21 kDa и 100.33 kDa при *L. paracasei* B41 и LC1 и напълно отговаря на получените чрез SDS-ПАГЕ. Следователно, по време на процедурите по пречистването на ензимите, протича скъсване на молекулите след втория Big3 домен. Ефектите, върху качествата на ензимите, които произтичат от това явление са обсъдени по-долу.

1.3.3. Биохимични свойства на клетъчно-свързани β -фруктозидази при представители на *L. paracasei*

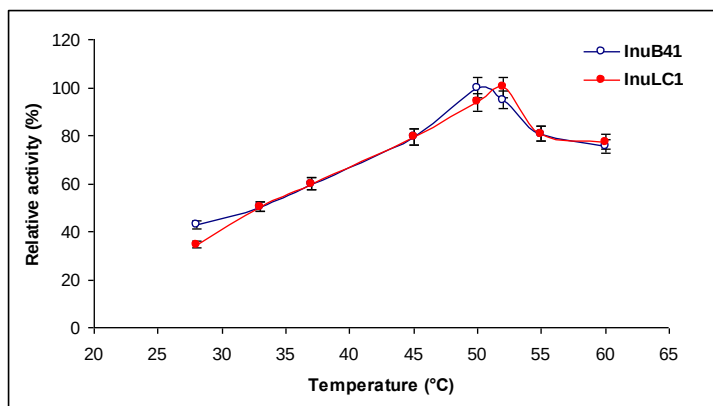
С цел установяване на оптималното рН за ензимното действие беше проследена промяната на инулиназната активност и при двата щама при



стойности в интервала 4.3 - 6.6. Отчитането на инулиназната активност при рН стойности 4.3, 4.5, 4.8, 4.9, 5.0, 5.2 и 5.4 беше извършено по описаната в раздела „Материали и методи“ процедура, като субстратът инулин (1%) беше разтворен в 0.1 М натриево-ацетатен буфер (рН диапазон 3 – 6). За

отчитане на рН стойностите 5.8, 6.0 и 6.5 разтворът на изследвания субстрат беше приготвен с помощта на 0.1 М калиево-фосфатен буфер (рН диапазон 5.8 – 8.0).

Фигура 35. Влияние на рН върху инулиназната ензимната активност на InuB41 и InuLC1.



Фигура 36. Влияние на температурата върху инулиназната активност на InuB41 и InuLC1.

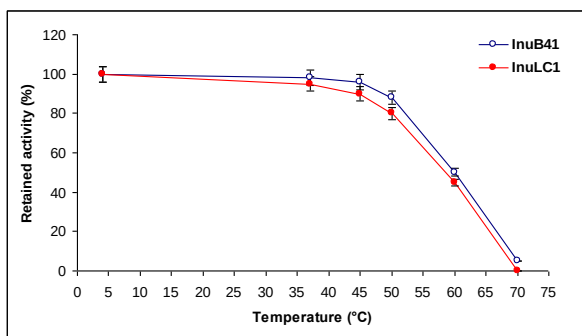
Установеният рН оптимум за β -фруктозидазата InuB41 бе 4.9, а за LC1 - 4.8. Ензимите запазват съответно 38% (при *L. paracasei* B41) и 20%

(при *L. paracasei* LC1) от активността си при най-ниското рН - 4.3. Други лактобацилни β -фрукто-фуранозидози, напр. тази на *L. plantarum* ST-III също имат оптимално рН 6.0, но активността им спада драстично при рН под 5.5 (Chen et al., 2014). Получените резултати за рН оптимум 4.8 - 4.9 позволяват използването на ензимите, директно пречистени от клетъчната стена. Докладваният от Martel et al. (2010) рН оптимум за TfosEr, експресиран в *E. coli*- 5.0 - 5.5 е съчетан с чувствителна загуба на ензимната активност, когато рН е по-ниско от 5.0. Продуцираният от *E. coli* LevH1 е с рН оптимум 6.0 (Kuzuwa et al., 2012), което вероятно е повлияно от гостоприемника.

Температурният оптимум на инулиназните ензими беше изследван в диапазона 4 - 70°C при вече установеното оптимално рН за всеки един от тях.

Оптималната температура за действие на двата ензима е близка - 50°C за InuB41 и 52°C за InuLC1 (Фиг. 36) и е по-висока в сравнение с данните, получени от други автори. Експресираният в *E. coli* LevH1 има температурен оптимум 45°C, при щам *L. pentosus* B235 той е 25°C (Paludan-Müller et al., 2002), а при щам *L. plantarum* ST-III - 37°C, като активността рязко спада над 40°C (Chen et al., 2014).

Температурната стабилност бе изследвана при третиране на ензими с активност 100 U/мл (Фиг. 37) И двата пречистени ензимни препарата запазват 50% от своята активност след инкубация при 60°C за 20 мин.



Фигура 37. Температурна стабилност на InuB41 и InuLC1. Третирането е проведено при съответната температура за 20 мин в буфер с рН 5.0, при начална ензимна активност 100 U/мл. Пречистените ензими запазват 50% от своята активност след инкубация при 60°C за 20 мин.

Таблица 9. Изследване на субстратната специфичност на β -фруктозидази InuB41 InuLC1 на щамове *L. paracasei* B41 и *L. paracasei* LC1

Ензим	Субстрат	Тип връзка	Мм (Da)	Km (mM)	Vmax (μ мол/мин мг)
InuB41	Леван	β -(2 $\rightarrow$ 6)	12000	0.34	26.9
	Инулин	β -(2 $\rightarrow$ 1)	6000	1.57	43.7
	ФОЗ	β -(2 $\rightarrow$ 1)	1810	0.33	68.0
	Захароза	α -(1 $\rightarrow$ 2)	342	55.37	74.9
InuLC1	Леван	β -(2 $\rightarrow$ 6)	12000	0.21	14.0
	Инулин	β -(2 $\rightarrow$ 1)	6000	3.97	66.4
	ФОЗ	β -(2 $\rightarrow$ 1)	1810	9.37	10.5
	Захароза	α -(1 $\rightarrow$ 2)	342	-	-

В сравнение, други подобни лактобацилни ензими показват малко по-добра термостабилност. При ензимът на щам *L. plantarum* ST-III 50% от

активността се запазва след инкубация за 2 часа при 50°C, но при 60°C за 30 мин активността се загубва напълно (Chen et al., 2014).

Като критерии за преценка на субстратната специфичност на пречистените ензими послужиха K_m (Константа на Михаелис) и максималната скорост на ензимната реакция V_{max} . Изследваните субстрати бяха инулин от цикория, Ф03 (Frutafit®HD) (β -(2-1)-свързана фруктоза); леван (β -(2-6) връзка) и захароза α -(1-2)-връзка (Табл. 9). InuB41 показва еднакво висок афинитет към късоверижен инулин (Ф03) и бактериален леван, за което свидетелстват изключително близките стойности на K_m при двата субстрата.

Много по-нисък бе афинитетът на InuB41 към захароза (160 пъти по-нисък в сравнение с този към Ф03). InuLC1 прояви значително по-голям афинитет към β -(2→6) връзките в левана, отколкото към β -(2→1) връзките в молекулата на инулина и фруктоолигозахаридите. Подобна субстратна специфичност е докладвана за други β -фруктозидазни ензими при лактобацили (Paludan-Müller et al., 2002). При щам *L. plantarum* ST-III отчетените стойности на K_m очертават най-висок афинитет на рекомбинантният протеин към Ф03, и по-слабо предпочитание към инулин, захароза и леван (Chen et al., 2014).

Наблюдаваната разлика в субстратната специфичност между InuB41 и InuLC1, както и невъзможността на InuLC1 да хидролизира захароза, не са изненадващи. Те се дължат на разликите в секвенциите на кодиращите ги гени, които с 97% хомология – достатъчна, за да има фенотипни различия в биохимичните характеристики на ензимите. В процеса на разграждане на инулин като крайни метаболити бяха установени захарите захароза и фруктоза. HPLC профилът на продуктите на хидролизата доказаха, че клетъчно-свързаните ензими при *L. paracasei* B41 и *L. paracasei* LC1 са екзо- β -фруктозидази (EC 3.2.1.80), които откъсват крайните фруктозни остатъци от полизахаридната верига.

1.3.4. Контрол над генната експресия

Щамовете *L. paracasei* B41 и *L. paracasei* LC1 бяха изолирани от ферментирали храни на зърнена основа. И двата щама проявяват инулиназна и амилазна активност. За да бъде установен контролът над експресията на гените, кодиращи инулиназа и амилаза, бе проведено изследване в среда, съдържаща смесен субстрат инулин/нишесте чрез обратна транскрипция (RT-PCR) с подходящи специфични праймерни двойки: amyF 5'CAT TAT TGG CAG CCC GTG G3'/amyR 5'ATC CTG CCG CGT TTA ACT GA 3' и inuF 5'CAG ACA AAG CGC TCC CC 3'/inuR 5'ATC CGT CTT CAG CAC CAT CAT T3'.



Фигура 38. RT-PCR на тотална РНК, изолирана от щамове *L. paracasei* B41 и *L. paracasei* LC1 при култивиране върху смесени субстрати. Означения: 1), 16) Маркер ZipRuler™ Express DNA Ladder; 2), 3) (+) контроли - *inu* (618 bp), *amy1* (675 bp); от 4) до 9) експресия на гените в *L. paracasei* B41; 10) – 15) LC1.

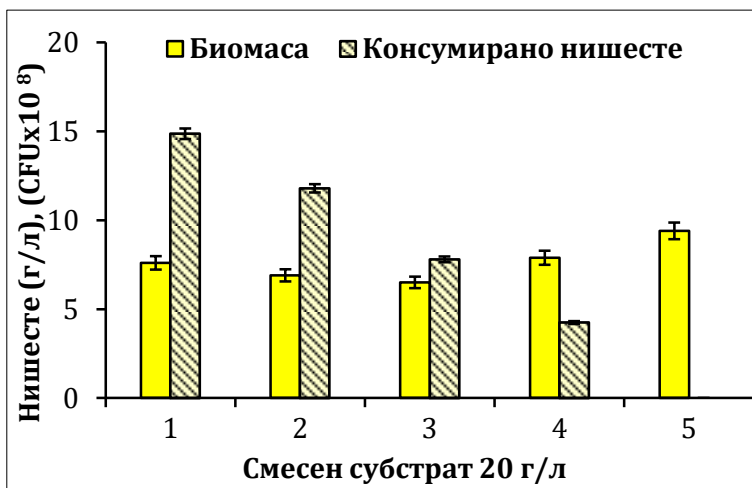
Въглероден източник: 4) и 10): 20 г/л глюкоза; от 5) до 9) и от 11) до 15) Frutafit®HD/нишесте в съотношения: 20/0, 15/5, 10/10, 5/15 и 0/20 г/л.

Представените на Фиг. 38 резултати показват едновременна експресия на гените, кодиращи амилопулуланаза и инулиназа при култивиране в среда със смесени субстрати (инулин и нишесте в различно съотношение). Транскрипцията и на двата гена изцяло се потиска в присъствието на глюкоза (позиции 4 и 10), което е доказателство за катаболитна репресия като механизъм на контрол върху промоторите на гените. Известно е, че контролът на генната експресия при *fos* оперона се репресира в присъствието на глюкоза в хранителната среда в съчетание с диауксичен растеж при наличието на ФОЗ и глюкоза (Goh & Klaenhammer, 2015).

Потвърждение на тези резултати дадоха и експериментите, включващи Northern-хипридизация на изолираната тотална РНК от същите проби с нерадиоактивно белязани с дигоксигенин сонди за гените *inu* и *amy1*.

Чрез проследяване експресията на гените, които кодират амилопулулазни и β -фруктозидазни ензими беше потвърдено, че те се намират под общ експресионен контрол. Това вероятно се дължи на действието на катаболитния репресорен протеин СсрА, който представлява АТФ-зависима HPr киназа/фосфорилаза (Monedero et al., 2007).

Експресията и на двата изследвани гена - *amy1* и *inu* се потиска от присъствието на глюкоза, тъй като комплексът СсрА/HPr (във фосфорилирана форма) се свързва към палиндромната секвенция TGNNANCGNT в ДНК, наречена катаболитно отговорен елемент - *cre*. Това взаимодействие не позволява гените, които са под контрола на СсрА да се експресират при наличието на глюкоза в средата. Когато глюкозата се изчерпи СсрА-регулираните гени, кодиращи хидролази за съответните полизахариди - нишесте и инулин се експресират заедно, независимо от въглеродния източник. Присъствието на секвенцията *cre* в 5'-некодиращия регион на изследваните гени, кодиращи амилаза и инулиназа потвърждават наличието на този тип контрол върху генната експресия.



Фигура 39. Биомаса и степен на конверсия на нишесте при щам *L. paracasei* B41, в хода на 48-часово култивиране в среда, съдържаща смесени въглеродни източници в различно съотношение: 1) Нишесте, 2) 3/1 - Нишесте/Frutafit®HD, 3) 1/1 - Нишесте/Frutafit®HD, 4) 1/3 - Нишесте/Frutafit®HD, 5) Frutafit®HD.

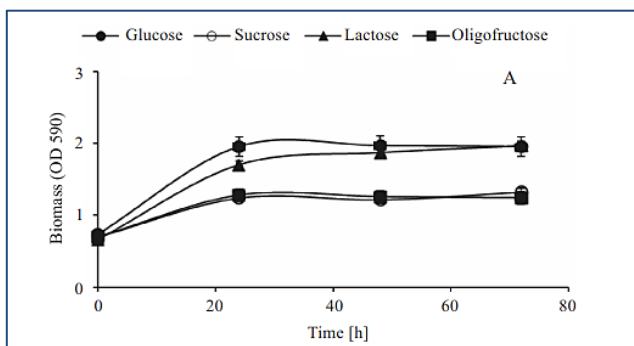
Едновременното усвояване на смес от полизахаридите нишесте и инулин от щам *L. paracasei* B41 беше изследвано в условията на периодично култивиране в моделна среда без рН контрол, която съдържа разтворимо картофено нишесте и Frutafit®HD в различни съотношения. Както бе вече доказано, щам B41 е способен да синтезира едновременно ензимите амилопулуланаза и β-фруктозидаза. Най-голямото количество биомаса (9.4×10^8 CFU/мл) бе акумулирано в хранителната среда, съдържаща 20 г/л инулин, но биомасата бе значителна и при всички съотношения на смесените субстрати (Фиг. 39), което разкрива възможностите *L. paracasei* B41 да бъде прилаган в хранителни ферментации, за създаване на функционални храни и в нови синбиотични продукти. Получените резултати са първото съобщение за едновременната хидролиза на смесени субстрати от МКБ.

В опити за разработване на функционални храни през 2014 година е докладвано ко-култивиране на амилалитични и пробиотични щамове с цел получаване на пробиотичен продукт, подобен на мляко. В качеството на амилалитични щамове са използвани изолатът от царевична ферментирала напитка от Бенин *L. fermentum* OgiE1 (Agati et al., 1998) и изолатът от маниока *L. plantarum* A6 (Giraud et al., 1993). Като пробиотични са използвани комерсиални щамове, способни да ферментират соево мляко - *L. acidophilus* Lafti L10, *L. casei* Lafti L26 и *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Lafti B94 (Espirito-Santo et al., 2014).

1.3.5. Транспортни системи, свързани с усвояването на ФОЗ от *Pediococcus acidilactici* PD3

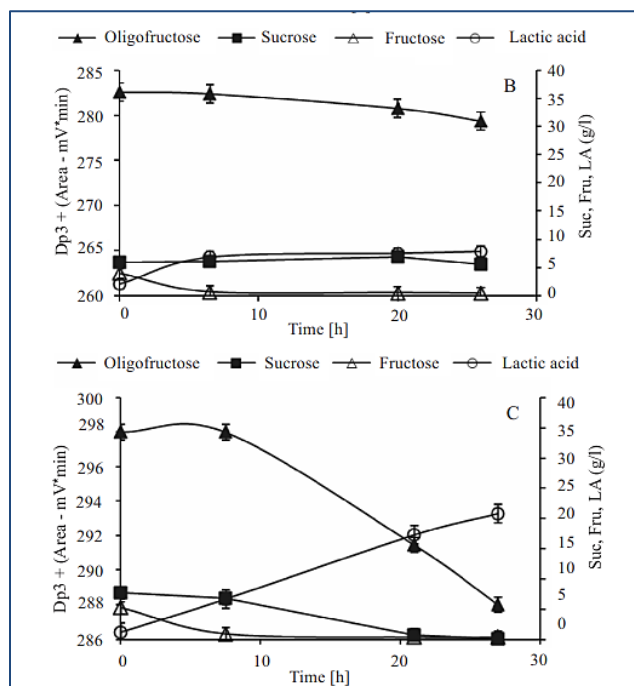
Освен популярните с полезните си качества представители на рода *Lactobacillus*, през последните двадесет години доста щамове от вида *Pediococcus acidilactici* бяха оценени като кандидати за пробиотици. Много рядко явление обаче е способността на педиококите да ферментират

пребиотици. Досега са били открити само два щама *P. pentosaceus*, които са способни да усвояват пребиотичния соев тризахарид рафиноза и един – инулин от цикория (Gonzalez & Kunka 1986; Mei et al., 2011). До момента на настоящата работа нямаше данни, доказващи усвояването на ФОЗ или инулин от *P. acidilactici*. Българският изолат *P. acidilactici* PD3 усвоява мелибиоза, рафиноза и инулин. С цел по-пълно изясняване на спектъра от усвоявани захари, бяха проведени процеси на периодично култивиране на щам без контрол на рН в среда, съдържаща различни въглеродни източници (Фиг. 40).



Фигура 40. Растежна кинетика на *P. acidilactici* PD3 в среда MRS, съдържаща 20 г/л различни въглеродни източници. Култивирането е проведено при 37°C, без рН контрол.

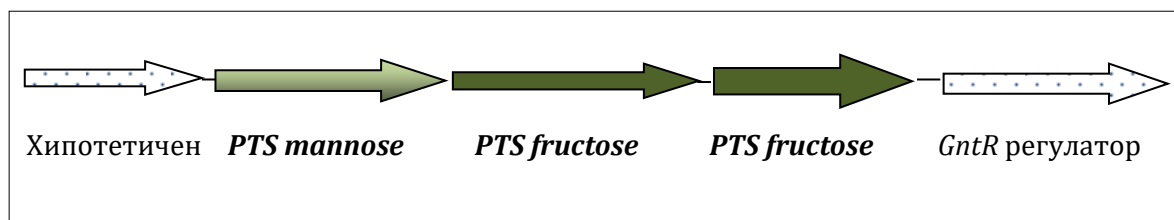
се разви добре и при субстрат захароза и ФОЗ (Фиг. 40). По време на периодичните процеси във ферментатор при оптималните за вида условия (рН 6.3 и 37°C) и субстрат инулин, щамът разграждаше слабо субстрата и успя да синтезира едва 7.9 г/л млечна киселина до 26-ия час (Фиг. 41, А).



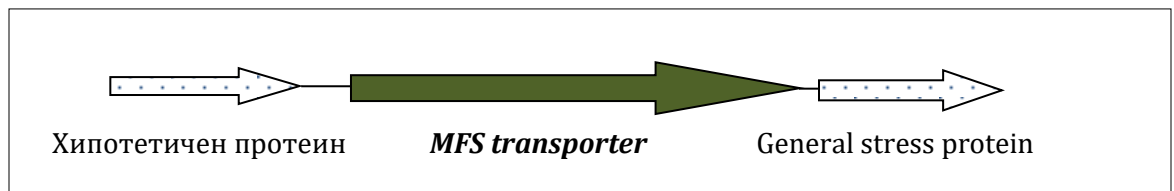
Фигура 41. А) Усвояване на захарите и количество образувана млечна киселина от щам *P. acidilactici* PD3 по време на периодичен процес с рН контрол при рН 6.3. Б) Периодичен процес при рН 6.0 и 30°C. Анализът на метаболити е извършен чрез HPLC. Означения: Dp3+ - площ на олигозахаридите със степен на полимеризация над DP3.

Изненадващо, понижението на стойностите на процесните параметри - рН 5.0 и температура 30°C, доведоха до рязък скок в усвояването на ФОЗ и захароза. Образованата

млечна киселина бе 20.8 г/л и послужи като сигурен индикатор за успешното усвояване на захарите (Фиг. 41, Б). Така способността на щама да хидролизира ФОЗ, захароза и инулин бяха доказани *in vivo*. За да бъдат идентифицирани гените и протеините, участващи в усвояването на ФОЗ, бе конструирана геномна библиотека на *P. acidilactici* PD3. Тотална геномна ДНК от щама бе подложена на непълна рестрикция с ензим *Sau*3A, а получените случайни фрагменти бяха лигирани към линейаризираната молекула на вектора pJET2.1/blunt (2974 bp). С лигазните смеси бе трансформиран гостоприемник *E. coli* DH5 α . Клоновете бяха селектирани според придобиването на способност да се развиват в среда, съдържаща ФОЗ. Бяха анализирани 530 клона, които съдържаха включен хетероложен фрагмент от хромозомата на *P. acidilactici* PD3. Два клона, наречени JF1 и JF2 притежаваха повишена способност за усвояване на фруктоза или ФОЗ.



А

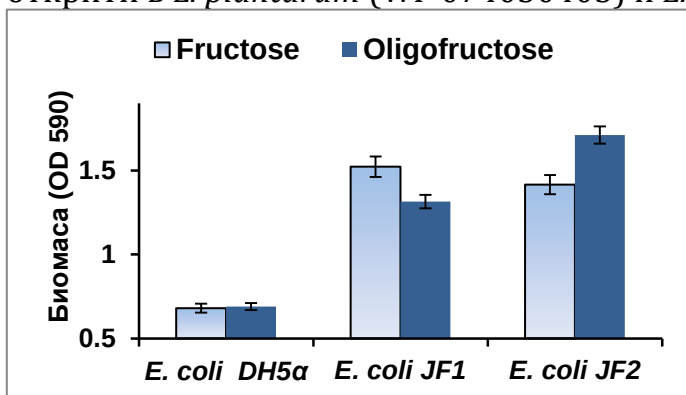


Б

Фигура 42. Секвенционен анализ на клонове *E. coli* JF1 и *E. coli* JF1 с повишена консумация на ФОЗ и фруктоза спрямо *E. coli* DH5 α . А) Хетероложен фрагмент в *E. coli* JF1, Б) Хетероложен фрагмент в *E. coli* JF2.

Секвенционният анализ на изолирана плазмидна ДНК от клон pJF1 показва, че съдържа инсерт от 3693 bp с 3 отворени рамки за четене (ORF), кодиращи част от фосфоенол-пируват-зависима фосфотрансферазна (PTS) система за транспорт на захари. Нуклеотидната секвенция на фрагмента показва 99% хомология със съответната част от напълно секвенирания геном на *P. acidilactici* щам 7_4 (GenBank NZ ACXB000000000) и 98% хомология с генома на пробиотичния щам *P. acidilactici* MA18/5M (AGKB000000000), (Barreau et al., 2012). Сравнение на транслираните аминокиселинни

последователности с протеиновата база данни (NCBI, BLASTP) показва, че трите ORF в pJF1 кодират маноза/сорбоза IIB субединица (159 aa), PTS-фруктозен транспортер IID (283 aa) и PTS-фруктозен транспортер IIC (262 aa) (Фиг. 42, А). Инсера в pJF2 бе с големина 2014 bp (Фиг. 42, Б). Секвенирането му показва, че той съдържа ген от 1371 bp, кодиращ MSF транспортер (456 aa) с 99% хомология подобни молекули-преносители открити в *L. plantarum* (WP 074030405) и *L. brevis* (WP 069360286).



Фигура 43. Сравнение на формираната биомаса на *E. coli* DH5α и клоновете *E. coli* JF1 и *E. coli* JF2 в среда LB, съдържаща 20 г/л фруктоза или Ф03. Култивирането е проведено при температура 37°C, 100 rpm, за 18 ч.

Ефектът на включените хетероложни фрагменти върху растежа на щам-гостоприемник *E. coli* DH5α бе изследвано чрез периодично култивиране в среда, съдържаща фруктоза или Ф03 като единствен въглероден източник (Фиг. 43). Двата клона натрупаха значително повече биомаса в сравнение с *E. coli* DH5α, тъй като *E. coli* JF1 показва повишено усвояване на фруктоза, а *E. coli* JF2 - очевидно ускорено усвояване на Ф03. Получените резултати разкриват, че механизмът на усвояване на Ф03 при *P. acidilactici* е подобен на този, срещан при *L. plantarum*: транспортът на олигозахариди и фруктоза се извършва от фосфоенол-пируват-зависима фосфотрансферазна система (PTS), кодирана от три последователни гена..

В генома на *P. acidilactici* PD3 беше открит и още един важен транспортен протеин от суперфамилията MFS (major facilitator superfamily), разпространена сред много видове МКБ и бифидобактерии. Наличието на две различни MFS пермеази, свързани с усвояването на Ф03 е доказано при *Bifidobacterium longum* (Goh & Klaenhammer, 2015). *In silico* анализ е разкрил, че MFS-фамилията е вероятно ангажирана в транспорта на олигозахариди при *L. ruminis* (O'Donnell et al., 2011), но никога досега не е била откривана в педиококи. При *L. ruminis* обаче, е открит пълен оперон, който отговаря за транспорта и хидролизата на Ф03. Той е изграден от ген, кодиращ β-фруктозидаза и съседен H⁺-симпортер (MFS-транспортер), докато генът, кодиращ MFS транспортер при *P. acidilactici* е в съседство с хипотетичен протеин с неизвестна функция и ген, кодиращ "стресов" белтък (Фиг. 42, Б). В геномната библиотека не бе открит клон, който да съдържа ензим с β-фруктозидазна активност. Най-вероятно хидролизата на β-връзките се извършва от ензим инвертаза (EC 3.2.1.26). От получените резултати може

да се заключи, че PTS системата на *P. acidilactici* PD3 е тази, която осигурява фруктозния транспорт в клетките, докато MFS е ангажирана главно с транспорта на олигозахариди. Известно е, че ФОЗ-индуцируемите транспортни системи се индуцират и от други субстрати, което показва широка субстратна специфичност на транспортните белтъци (Goh & Klaenhammer, 2015). Това явление позволява разширяване на субстратния спектър и диференцирана регулация в зависимост от конкуриращите се хранителни съставки. Способността на *P. acidilactici* PD3 да ферментира изцяло фруктозата дава възможност за прилагането му като пробиотик в случаи на малабсорбция на фруктоза, предизвикваща синдром на раздразненото черво (Nakov et al., 2013).

1.4. Молекулярно проучване на ензими с β -галактозидазна активност (CAZy GH1, GH2)

Ензимът β -галактозидаза (ЕС 3.2.1.23), още известен като лактаза, принадлежи към семействата GH1 и GH2 в класификацията на CAZy. Той е гликозид-хидролаза, която разгражда лактозата до мономерите глюкоза и галактоза и има широко приложение в хранително-вкусовата промишленост. Поради ниските нива на ензима в червата на човека, част от населението показва лактозна непоносимост и има проблеми с консумацията на мляко и млечни продукти. Лактозата има ниска относителна сладост и разтворимост и прекомерното количество на лактозата в дебелото черво може да доведе до дехидратация на тъканите поради осмотични ефекти, слаба абсорбция на калций и ферментация от патогенни микроорганизми, което води до диария и подуване (Panesar et al., 2010). Третирането на млякото и млечните продукти с β -галактозидаза е подходящ метод за намаляване на лактозното съдържание за справяне на проблемите с ниската лактозна разтворимост в продуктите и лактозната нетолерантност. Хидролизата на суроватката превръща лактозата в полезен продукт като сладък сироп, който може да бъде влаган в сладкарски изделия и за безалкохолни напитки и така да разреши екологичния проблем с изхвърлянето на суроватката (Pivarnik et al., 1995).

Много по-важно и перспективно приложение на β -галактозидазата обаче е използването ѝ в реакции на транс-гликозилиране на лактоза за синтезиране на галактоолигозахариди (ГОЗ) – пробиотични олигозахариди с ниска кариогенност, ниски калорични стойности и ниска сладост (Maischberger et al., 2008; Grosova et al., 2009). ГОЗ са в състояние да реорганизируют чревната флора чрез повишаване на растежа на *Bifidobacterium* sp., имат положителен ефект върху чревната имунна система, инхибират адхезията на патогени; предотвратяват инфекции и рак, засилват усвояването на минерали, използват се в специализирани храни за лица с лактозна непоносимост (Markowiak & Slizewska, 2017). В *L. delbrueckii*

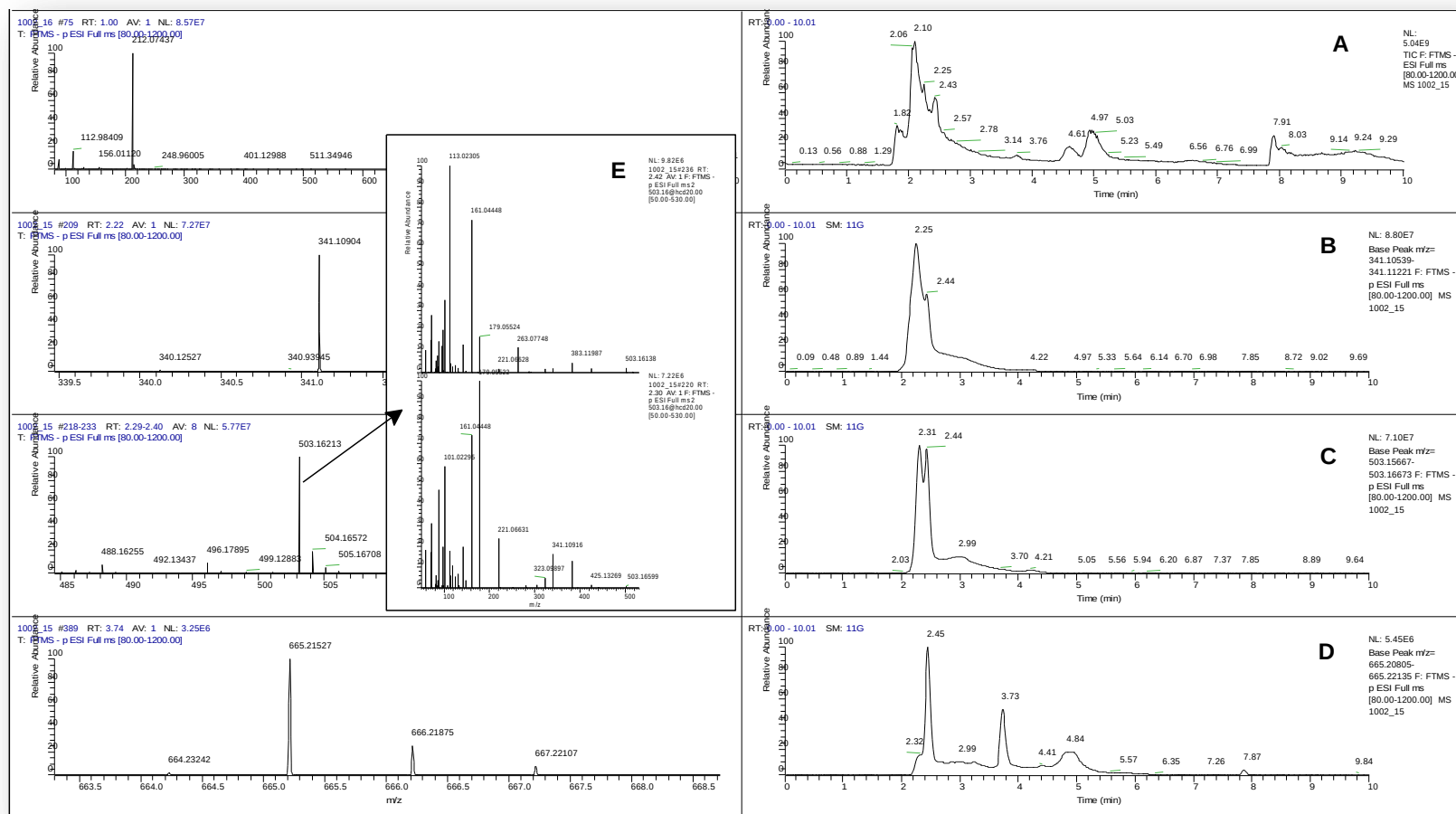
subsp. *bulgaricus* Г03 са продукт на ензимно транс-гликозилиране от β -галактозидази от семейството на гликозид-хидролазите GH2 (*LacZ*). Г03 съдържат от два до осем β -свързани галактозни остатъци, завършващи с глюкоза в редуциращия край. В настоящата работа са анализирани крайните метаболити на действието на ензима β -галактозидаза на част от новоизолираните щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* – галактоолигозахаридите. Седем щам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, култивирани в мляко или в Лактозна среда, образуваха Г03 със степен на полимеризация DP3. Освен тях, бяха открити още три щам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* които образуваха Г03 само в лактозна среда. Най-голямо количество Г03 с DP3 бяха синтезирани от *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 41, 43 и 44 (Табл. 10).

Таблица 10. Продуцирани Г03 от щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, култивирани за 24 - 48 ч в мляко или Лактозна среда.

Щам	Галактоолигозахариди (мг/мл)*			
	Мляко		Лактозна среда	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
1	-	-	1.42±0.1	1.27±0.1
15	0.58±0.05	0.54±0.05	0.60±0.05	0.59±0.05
20	0.20±0.05	0.17±0.05	2.46±0.1	2.36±0.1
27	0.66±0.05	1.07±0.1	0.73±0.05	0.70±0.05
35	0.52±0.05	0.63±0.05	0.70±0.05	0.75±0.05
41	1.74±0.1	3.05±0.1	1.12±0.1	1.59±0.1
43	2.53±0.1	2.83±0.1	2.39±0.1	2.72±0.1
44	1.83±0.1	2.05±0.1	2.56±0.1	2.16±0.1
45	-	-	1.33±0.1	2.00±0.1
69	-	-	0.29±0.05	0.32±0.05

*Количествена оценка на Г03 с DP3.

Количественото определяне на Г03 показва, че *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* щам 41 достига 3.05 мг/мл в кисело мляко след 48 часа ферментация, следван от *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* щам 43 (2.83 мг/мл). С цел да се докаже синтезата на Г03 и да се установи тяхната структура, културалните течности бяха подложени на мас-спектрален анализ с предварително разделяне на метаболитите чрез течна хроматография (LC-MS, High resolution analysis by mass-spectrometry, HRAMS). Резултатите от LC-MS анализа на кисело мляко след инокулиране с чистия щам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 43 са представени на Фиг. 44.



Фигура 44. Хроматографски и мас-спектрален анализ на състав и структура на галактоолигозахариди, синтезирани от щам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 43, култивиран 24 ч в Лактозна среда. А) Пълна йонна хроматограма; В) Дизахариди; С) Тризахариди; D) Тетразахариди; Е) MS спектър на двата главни тризахариди с молекулна маса 503.16.

Структурният анализ разкри, че произвежданите ГОЗ са тризахариди и тетразахариди, като последният галактозен остатък е свързан или чрез β -(1→4), или с β -(1→6) гликозидна връзка с молекула лактоза. Получените количества ГОЗ с DP4 бяха няколко пъти по-ниски от тези с DP3; ГОЗ с по-висока степен на полимеризация от DP4 не бяха наблюдавани. Информацията за синтез на ГОЗ в кисело мляко е много оскъдна. Venica et al. (2015) съобщават, че количеството на ГОЗ в ацидофилно търговско мляко със стартерна култура *L. acidophilus* La-5 може да се увеличи с добавянето на β -галактозидаза на *Kluyveromyces lactis*. Единственото съобщение за кисели млека досега е за анализ на съдържанието на ГОЗ на йогурт, продаван в търговската мрежа в Испания. Martinez-Villaluenga et al. (2008) откриват, че търговските йогурти съдържат между 0.2 и 0.5% ГОЗ в зависимост от стартерната култура. За сравнение, българският щам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 43 синтезира пет пъти по-голямо количество ГОЗ.

Настоящото проучване представлява първи анализ на образуването на ГОЗ от щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Резултатите разкриха, че няколко щамове спонтанно образуват тетразахариди и относително високи количества тризахариди, които са стабилни след 48-часова ферментация. Структурният анализ на ГОЗ, продуцирани от *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 43 чрез LC-MS (Фиг. 44, Е) доказва, че получените тризахариди съдържат β -(1→4) и β -(1→6) гликозидни връзки, като β -(1→4) свързаната галактозна единица е в много необичайна позиция и се отчита в ГОЗ за първи път. Досега описваните ГОЗ, продукт на транс-галактозидазата LacZ от *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, хетероложно експресирани в *L. plantarum* съдържат олигомери с единствено с β -(1→6) и β -(1→3) връзки между лактозата и галактозните остатъци (Nguyen et al., 2012). β -галактозидазата на *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* щам L3, използвана за получаване на изкуствения подсладител галактозил сукралоза (трихлоро-сукралоза, E955) също формира само β -(1→6) гликозидни връзки (Lu et al., 2012). Уникалната способност на българските щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* да образува β -(1→4) връзки между галактозилните остатъци и лактозата вероятно са свързани с нови функционални свойства на ГОЗ, които се нуждаят допълнителни изследвания.

1.5. Изследване на пробиотични и технологични характеристики на МКБ

1.5.1. Пробиотични характеристики

Основното приложение на МКБ е в различни клонове на хранителната промишленост, като стартерни култури и като доказани пробиотици, влагани в храни и напитки с претенции за функционалност - боза, кисели теста и др.

Таблица 11. Антимикробна активност на новоизолирани щамове от род *Lactobacillus* срещу Грам (-) патогенни бактериални видове, зоната на инхибиране на растежа е представена в mm.

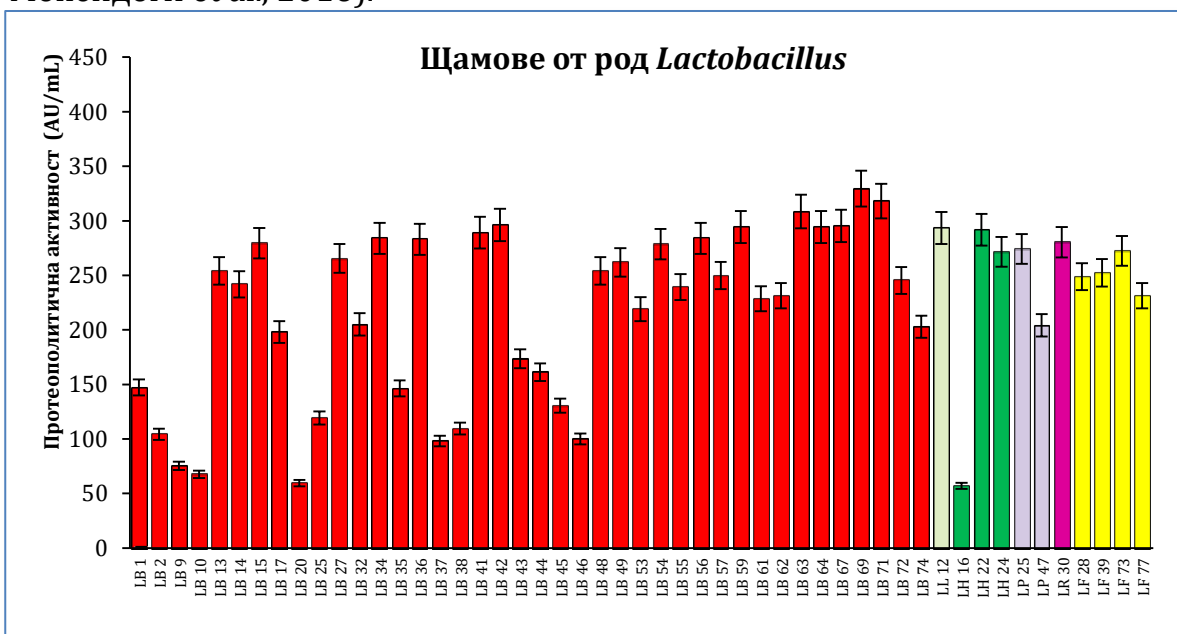
Вид	Щам	<i>E. coli</i> ATCC® 25922™		<i>K. pneumoniae</i> G31		<i>V. cholerae</i> Non-O1	
		pH 4.0	pH 6.0	pH 4.0	pH 6.0	pH 4.0	pH 6.0
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	1	19±1.5	-	15±0.5	-	16±1	-
	2	22±2	-	14±0.5	-	17±1	-
	9	20±2	-	16±1	-	16±1	-
	10	23±2.5	-	14±0.5	-	16±1	-
	25	17±1	-	14±0.5	-	15±0.5	-
	27	24±2.5	-	17±1	-	18±1.5	-
	32	20±2	-	16±1	-	15±0.5	-
	34	28±2.5	-	15±0.5	-	18±1.5	-
	35	21±2	-	14±0.5	-	16±1	-
	36	17±1	-	14±0.5	-	15±0.5	-
	38	20±2	-	15±0.5	-	17±1	-
	42	16±1	-	14±0.5	-	15±0.5	-
	44	21±2	16±1	17±1	15±0.5	19±1.5	16±1
	45	20±2	-	15±0.5	-	15±0.5	-
	46	25±2.5	18±1.5	15±0.5	15±0.5	18±1.5	16±1
	48	23±2.5	-	16±1	-	19±1.5	-
	49	24±2.5	-	18±1.5	-	15±0.5	15±0.5
	54	19±1.5	-	14±0.5	-	16±1	-
	55	22±2	-	17±1	-	15±0.5	-
	57	17±1	-	17±1	-	15±0.5	-
	62	21±2	-	15±0.5	-	17±1	-
	63	20±2	17±1	16±1	15±0.5	17±1	15±0.5
	64	18±1.5	-	15±0.5	-	16±1	-
	67	20±2	-	14±0.5	-	17±1	-
	69	21±2	-	16±1	-	16±1	14±0.5
	71	17±1	-	17±1	-	15±0.5	-
	72	19±1.5	-	15±0.5	-	16±1	-
<i>L. lactis</i>	12	22±2	18±1.5	18±1.5	15±0.5	19±1.5	16±1
<i>L. paracasei</i>	25	27±2.5	-	20±2	-	18±1.5	-
<i>L. rhamnosus</i>	30	19±1.5	-	15±0.5	-	16±1	-
<i>L. fermentum</i>	28	21±2	-	16±1	-	15±0.5	-
	39	19±1.5	-	16±1	-	16±1	-
	73	16±1	-	11±0.5	-	18±1.5	-

Таблица 12. Антимикробна активност на новоизолирани щамове млечнокисели коки срещу Грам (-) патогенни бактериални видове, зоната на инхибиране на растежа е представена в mm.

Вид	Щам	<i>E. coli</i> ATCC® 25922™		<i>K. pneumoniae</i> G31		<i>V. cholerae</i> Non-O1	
		pH 4.0	pH 6.0	pH 4.0	pH 6.0	pH 4.0	pH 6.0
<i>P. acidilactici</i>	c 6	17±1	-	14±0.5	-	17±1	-
	c 15*	17±1	-	14±0.5	-	15±0.5	-
	c 27	17±1	22±2	16±1	21±2	18±1.5	15±0.5
	c 29	23±2.5	-	18±1.5	-	18±1.5	-
	c 49	18±1.5	-	15±0.5	-	17±1	15±0.5
	c 53*	18±1.5	-	16±1	-	22±2	-
	c 54	20±2	-	15±0.5	-	16±1	-
	c 55	19±1.5	-	15±0.5	-	16±1	-
	c 56	21±2	-	14±0.5	-	17±1	-
	c 57	21±2	-	14±0.5	-	17±1	14±0.5
	c 58	21±2	-	15±0.5	-	17±1	-
	c 59	20±2	16±1	16±1	14±0.5	16±1	14±0.5
	c 60	19±1.5	-	14±0.5	-	16±1	-
<i>Ent. faecium</i>	c 5	19±1.5	-	15±0.5	-	16±1	-
	c 9	18±1.5	-	15±0.5	-	17±1	-
	c 22	17±1	-	14±0.5	-	15±0.5	-
	c 24	22±2	-	14±0.5	-	17±1	-
<i>Str. thermophilus</i>	c 21	20±2	-	16±1	14±0.5	16±1	14±0.5
	c 23	19±1.5	-	15±0.5	-	16±1	-
	c 31	-	-	14±0.5	-	16±1	-
	c 33	18±1.5	-	16±1	-	16±1	-
	c 37	16±1	-	-	-	16±1	-
<i>L. mesenteroides</i>	mc 33	15±0.5	-	14±0.5	-	16±1	-
<i>L. pseudomesenteroides</i>	mc 24	18±1.5	-	15±0.5	-	17±1	-

Не по-малко важни са технологичните характеристики на МКБ, които позволяват производството на продукти с желани органолептични свойства. Възможностите на МКБ да разграждат или синтезират пребиотици бе вече разгледано в предходните глави – едни от тях са способни да хидролизират резистентно нишесте (поради амилазна, амилопулуланазна и др. активности), други – разграждат инулин и ФОЗ, трети – синтезират ГОЗ в мляко и лактозна среда. Друго важно пробиотично качество на МКБ е способността им да потискат развитието

на патогенни микроорганизми чрез синтез на нискомолекулни съединения (млечна киселина, H_2O_2 и др.), както и чрез продуцирането на къси олигопептиди бактериоцини (Boyanova et al., 2017). В тази връзка, безклетъчни културални супернатанти на новоизолираните щамове МКБ бяха проверени за тяхната антимикробна активност. Три от щамовете, изолирани от боза (*L. paracasei* B41, *L. pentosus* N3 и *L. plantarum* Bom 816) се оказаха амилолитични пробиотици, тъй като освен амилазната си активност, те демонстрираха висока антибактериална активност срещу *Escherichia coli* HB101, *Vibrio cholerae* V13, *Klebsiella pneumoniae* G31 и *Bacillus subtilis* WB800N. В същото време, тези щамове не потискат развитието на дрождите от видове, срещани в бозата (*Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia*). Тези наблюдения потвърждават факта, че българските щамове МКБ, изолирани от боза имат пробиотичните свойства (Kabadjova et al., 2000; Ivanova et al., 2000; Todorov et al., 2005; von Mollendorff et al., 2016).



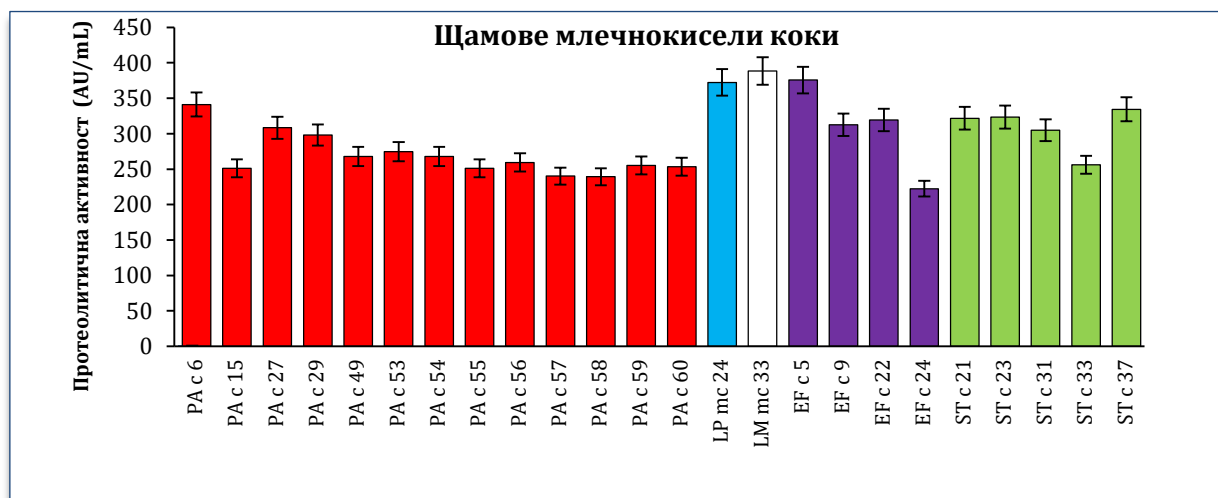
Фигура 45. Извънклетъчна протеолитична активност на нови щамове от род *Lactobacillus*, AU - Anson Units.

Щамовете МКБ, изолирани от кисели млека показаха впечатляваща активност срещу Грам-отрицателни патогени от видовете *E. coli*, *K. pneumoniae* и *V. cholerae* (Табл. 11, 12). Безклетъчните супернатанти на *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 44, 46 и 63 запазиха своя бактерициден ефект, дори когато бяха неутрализирани до рН 6.0 и третирани с каталаза, което предполага продуцирането на бактериоцини. Същото се отнася за щамовете *P. acidilactici* c27 и c59 и *Str. thermophilus* c21. Интересно е, че единствените два щам, които притежават активност срещу патогена в храните *Listeria monocytogenes* ATCC®19115™, са от видовете *P. acidilactici* - c15 и c53. Техните културални течности (както кисели, така и неутрални) силно инхибират патогена, като получените стерилни зони

варира от 14 до 17 mm (Табл. 12, със * са означени щамове *P. acidilactici*, които инхибират растежа на *Listeria monocytogenes* ATCC®19115™).

С цел да се изясни потенциала на щамове да продуцират биоактивни пептиди, бе разгледана тяхната протеолитична активност, като бе направена количествена оценка на активността на извънклетъчните протеази, измерена в световно приетите AU (Anson Units). Голяма част от щамове *Lactobacillus* притежават висока протеолитична активност със стойности над 250 AU/мл. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 63, 71 и 69 показаха най-висока активност, достигайки съответно 308.4, 318 и 329.4 AU/мл (Фиг. 45).

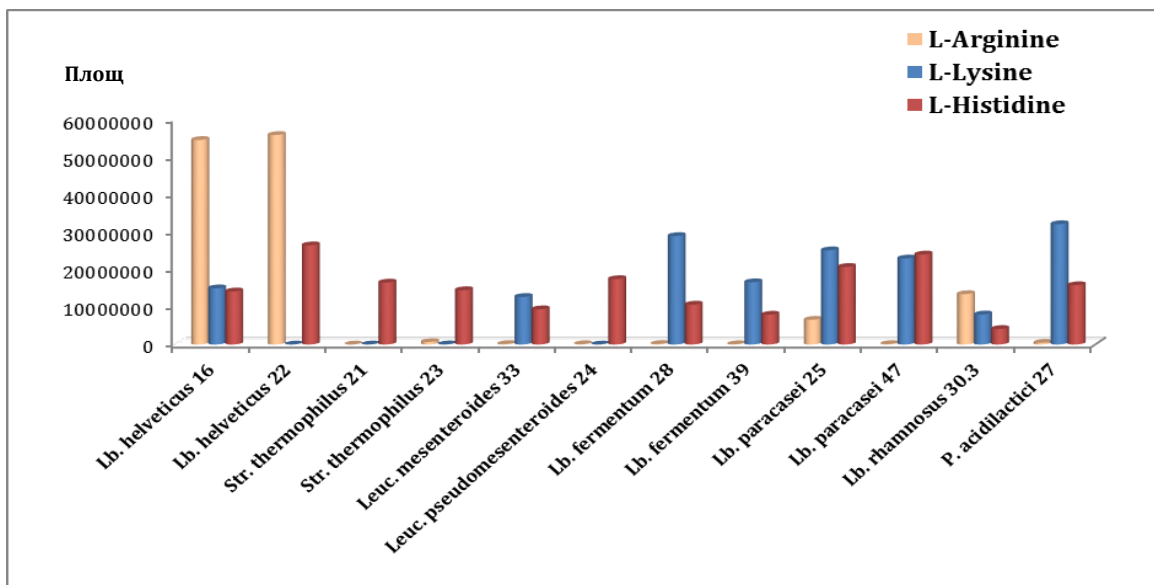
Остатъчната активност в присъствието на протеазни инхибитори (PMSF или EDTA) подсказва, че протеолитичната активност на щамове се дължи на продуцирането на серинови и металопротеази. Протеолитичната активност на млечнокиселите коки бе с много високи стойности.



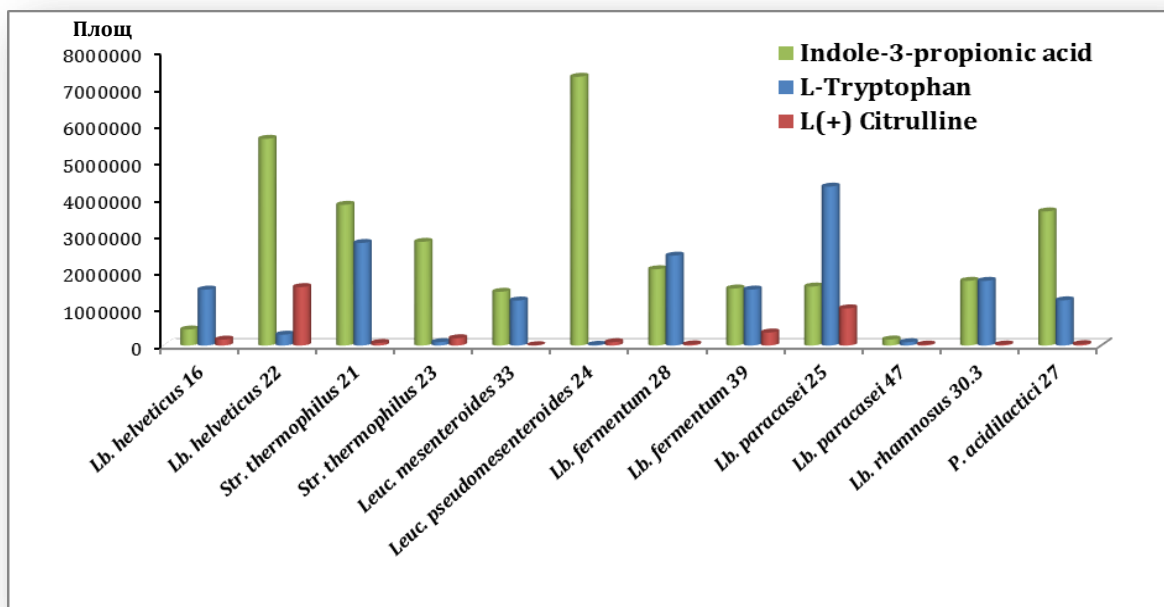
Фигура 46. Извънклетъчна протеолитична активност на нови щамове млечнокисели коки. Означения: PA - *P. acidilactici*, LP - *L. pseudomesenteroides*, LM - *L. mesenteroides*, EF - *Ent. faecium*, AU - Anson Units.

Щамове *Leuconostoc* mc 24 и mc 33 достигнаха 372.4 и 388.4 AU/мл, следвани от *Ent. faecium* c 5 (375.7 AU/мл) и *Str. thermophilus* c 37 (334.5 AU/мл, Фиг. 46). Подобна висока протеолитична активност е била наблюдавана при *Ent. faecalis* VB63F, изолиран от биволско прясно мляко (Biscola et al., 2016). Авторите са доказали, че щамът е перспективен за намаляване на имунореактивността на млякото поради способността си да разгражда успешно α S1-, α S2- и β -казеин. Високата протеолитична активност и значителния биосинтетичен потенциал на щамове води до синтезата на съединения с потенциално полезно действие, открити за първи път в кисело мляко. Такива са напр. различните видове аминокиселини и циклични антимикробни пептиди, чийто синтез бе

изследван чрез LC-MS (HRAMS). Щамовете *L. helveticus* 16 и 22 произвеждат значителни количества аргинин, докато *L. fermentum* 28, *L. paracasei* 25 и 47 и *P. acidilactici* 27 натрупват лизин. Почти всички изследвани щамове синтезираха хистидин.



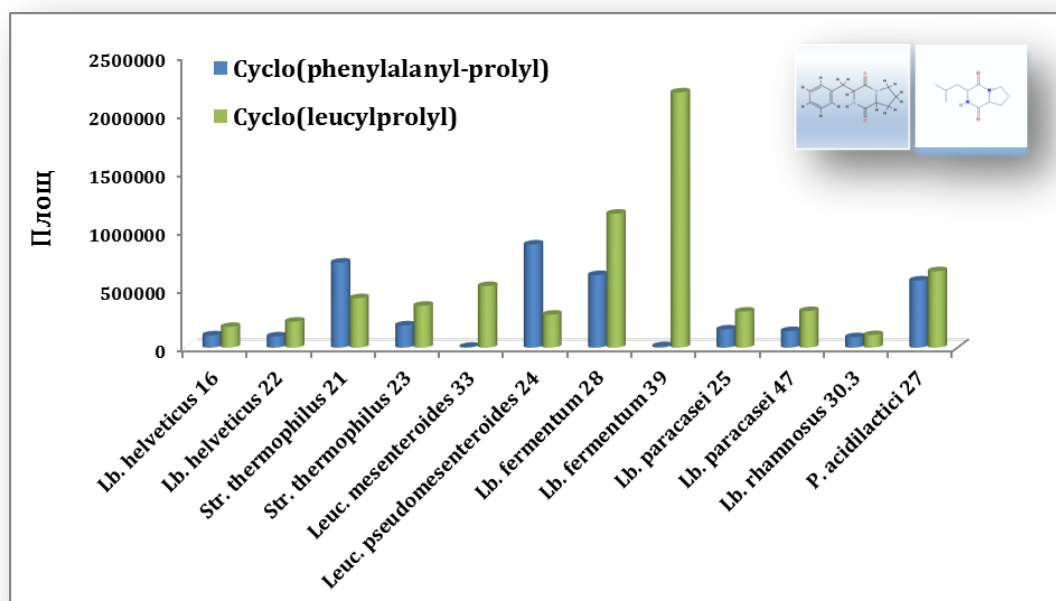
Фигура 47. Продуциране на аминокиселините аргинин, лизин и хистидин от МКБ щамове от съпътстващата микрофлора в киселото мляко.



Фигура 48. Продуциране на индол-3-пропионова киселина (IPA), триптофан и цитрулин от МКБ щамове от съпътстващата микрофлора в киселото мляко.

Ново, за първи път докладвано полезно качество на изследваните щамове беше способността им за синтез на индол-3-пропионова киселина - IPA (Фиг. 48). Тя е мощен невро-протективен антиоксидант и естествен терапевтик. Натурално се синтезира единствено от човешката микробиота. Има терапевтичен ефект при хора, поразени от болестта на Алцхаймер и при диабет тип 2. IPA има по-високо сродство към хидроксилните радикали в сравнение с мелатонина и се счита за най-мощният антиоксидант, произвеждан в човешкото тяло. Подобно на мелатонина, но за разлика от другите антиоксиданти, IPA свързва радикалите, без впоследствие да генерира реактивни и про-оксидантни междинни съединения. През 2017 г. е било установено, че повишените концентрации на IPA в човешка кръвна плазма са свързани с по-висока консумация на храни, богати на фибри.

Способността на изследваните МКБ да произвежда L-цитрулин също е много ценна характеристика. Цитрулинът е известен като лаксатив и като кръвно-плазмен маркер за синдрома на раздразненото черво на човека. Оралния прием на L-цитрулин подобрява ерекцията при мъже с лека еректилна дисфункция (Cormio et al., 2011).



Фигура 49. Синтез на антимикробни циклични пептиди от съпътстващата МКБ микрофлора в кисело мляко. Анализът е извършен чрез LC-MS.

Други полезни метаболити, произведени от МКБ на съпътстващата микрофлора са два циклични пептида: циклофенилаланил-пролил и циклолевцил-пролил. Циклофенилаланил-пролил е цикличен пептид с молекулна маса 244 Да с антимикробна активност с широк спектър на действие, включително антибактериална, противогъбична, антивирусна,

антипротозоална, антипаразитна и антитуморна. Бе установено, че се синтезира в значителни количества от щамовете *Leuc. pseudomesenteroides* 24, *Str. thermophilus* 21, *L. fermentum* 28 и *P. acidilactici* c27.

Циклолевцил-пролил пък, е известен още като антибиотик - Gandicin W и бива синтезиран в голямо количество от *L. fermentum* и *Leuc. mesenteroides*, но също и от *Str. thermophilus* и *P. acidilactici* (Фиг. 49). Той е биоактивен природен продукт, алкалоид, който се съдържа също в сакето и допринася за аромата на бирата. През 2017 г. е доказано противораковия ефект на Gandicin W срещу рак на гърдата (Ravi et al., 2017).

Досега и за двете антимикробни съединения е докладвано, че се продуцират само от морски бактерии (и са наречени "лекарства от океана"). Нашето изследване съобщава за първи път присъствието им в киселото мляко.

1.5.2. Технологични характеристики

Освен полезните си качества за здравето на консуматора, щамовете МКБ, които влизат в състава на промишлените закваски трябва да отговарят на редица условия. Тук, като най-важни, накратко ще разгледаме част от тях: синтеза на екзополisahариди, синтез на нискомолекулни метаболити, допринасящи за вкуса и мириса на крайния продукт и устойчивост към индустриален стрес.

Продукцията на екзополisahариди (ЕПЗ) от МКБ е желано качество на щамовете, които влизат в състава на промишлените закваски. ЕПЗ придават по-висок вискозитет и по-плътна текстура на продукта и са желана характеристика на щамовете, тъй като производителят би могъл да избегне добавянето на стабилизатори от животински или растителен произход към естествени йогурти (Lamothe et al., 2002). Щамовете *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* произвеждат ЕПЗ в среда, съдържаща лактоза и я предпочитат пред MRS (с въглероден източник глюкоза). Patel et al. (2012) съобщават, че ЕПЗ на *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* обикновено са хетерополisahариди, образувани от глюкоза и галактоза (и рядко рамноза). Тъй като добрите ЕПЗ-добиви, докладвани в литературата варират между 50 и 350 мг/л за *Str. thermophilus* и от 60 до 150 мг/л за *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, изследваните щамове могат да бъдат оценени много добри продуценти на ЕПЗ, с рекорд на *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 69 (154 мг/л). Най-добрите продуценти на ЕПЗ обаче, бяха сред щамовете на съпътстващата микрофлора: *L. fermentum* 77 (153 мг/л от захароза) и *Leuc. mesenteroides* mc33 (139.6 мг/л от лактоза). Способността на щамовете да произвеждат екзополisahариди разкри технологичния потенциал на новоизолираните щамове.

Въпреки че основните полезни ефекти от консумацията на българско кисело мляко са свързани с щамовете *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* и *Str. thermophilus*, не по-малко важен е микробният състав на

съпътстващата микрофлора. Анализът на специфичните течни метаболити, напр. ниско молекулни летливи съединения, произведени от минорно представените видове на съпътстващата микрофлора, често разкриват причината за автентичния аромат и вкус на този легендарен продукт.

Таблица 13. Биосинтез на екзополизахариди (ЕПЗ) от нови МКБ изолати в среда, съдържаща различни въглехидрати - глюкоза (20 г/л), лактоза (2 г/л) или захароза (2 г/л).

Вид	Щам	Екзополизахариди (мг/л)		
		Глюкоза	Лактоза	Захароза
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	23	47.69±0.25	59.88±0.25	-
	44	76.25±0.5	96.26±0.5	-
	53	91.03±1	114.95±0.5	-
	54	99.34±1	125.45±1	-
	63	80.12±0.5	131.15±1	-
	69	104.44±1	154.26±1	-
<i>L. helveticus</i>	22	38.86±0.1	120.44±1	139.47±1
<i>L. rhamnosus</i>	30	45.17±0.25	140.37±1	86.02±0.25
<i>L. fermentum</i>	28	36.31±0.1	112.84±0.5	134.79±1
	77	98.60±1	128.15±1	153.02±1
<i>P. acidilactici</i>	с 6	66.05±0.5	98.75±0.5	124.15±1
	с 15	60.62±0.5	110.82±0.5	111.05±0.5
	с 27	55.67±0.25	87.82±0.25	88.9±0.25
	с 49	36.26±0.1	115.35±0.5	125.5±1
	с 56	128.47±1	129.56±1	79.32±0.25
<i>Str. thermophilus</i>	23	47.69±0.25	83.32±0.25	134.56±1
<i>L. mesenteroides</i>	mc 33	65.20±0.5	139.57±1	127.25±1

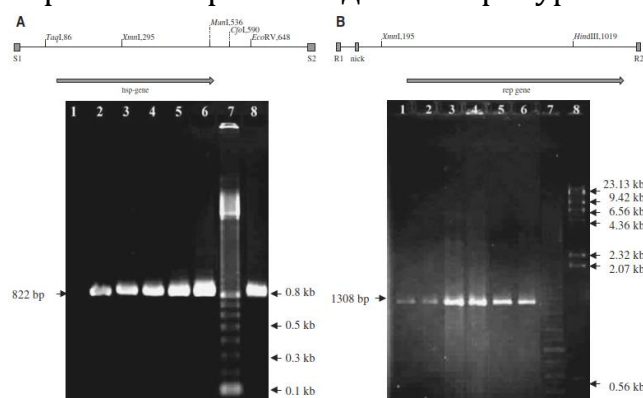
Най-ценните за аромата са ацеталдехид и ацетоин (3-хидроксипутанон или ацетил метил карбинол), образувани от щамове *Str. thermophilus*; етанолът, образуван от *L. fermentum*, и ацетоин, образуван от щамове *P. acidilactici*. Ацетонът присъства само в смесените култури и се дължи главно на лактобацилите, но също влияе върху аромата и вкусовите качества на киселото мляко. Известно е обаче, че разнообразието от аромати в различните йогурти се дължи основно на разликата в съотношението ацеталдехид / диацетил. Продуцирането на диацетил се открива главно в култури на *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Всички хетероферментативни МКБ образуват оцетна, маслена и капронова киселини. Щамове *Str. thermophilus* образуват също кафеена и валерианова киселини. Поради техния силен аромат най-вероятно летливите мастни киселини C2 – C10 участват във формирането на специфичните вкусово-ароматни свойства на закваските за българското кисело мляко (Beshkova et al., 1998).

Устойчивостта към индустриален стрес е важна характеристика на щамове в състава на закваските. Топлинният и киселинният шок активират продуцирането на т.нар. „стресови“ протеини с молекулно тегло, вариращо от 12 до 100 kDa.

В настоящата работа бяха анализирани термошоковите Hsp-протеини с ниска молекулна маса (12 - 20 kDa), които функционират като молекулни шаперони, като възстановяват увредените белтъци в клетките без участието на АТФ и участват в поддържането на конформацията на новосинтезираните протеини в условия на стрес (El Demerdash et al., 2003). Точният механизъм на действие на Hsp-протеините не е известен, а доказателство за тяхната функция е дадено по-долу.

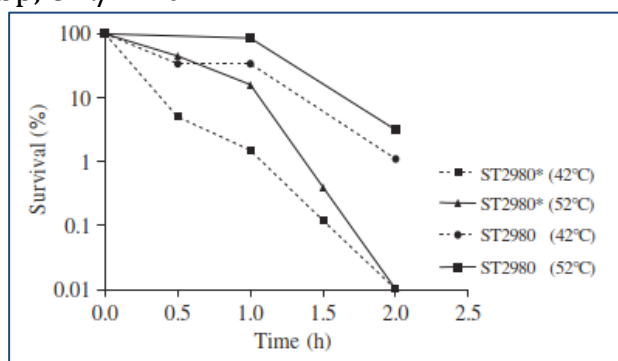
Моделна система за изследване на Hsp бяха щамове *Str. thermophilus* от колекцията на ЕЛБИ-Булгарикум. По време на различни етапи на промишлени ферментации, *Str. thermophilus* бива подлаган на термична обработка до температури 50 – 70°C.



Фигура 50. PCR-продукти, получени след анализ на колонии на щамове *Str. thermophilus* strains. (A) *hsp* гени (822 bp), (S1/S2 праймери). № на старт и проба:

1-отрицателна контрола, 2-ST2779, 3-ST2784, 4-ST2980, 5-ST2991, 6-ST2992,

7-Молекулен маркер 100 bp, 8-pt38 (положителна контрола). (B) *dso/rep* район (1308 bp), (R1/R2 праймери). № на старт и проба: 1-ST2779, 2-ST2784, 3-ST2980, 4-ST2991, 5-ST2992, 6 pt38, Молекулни маркери: 7-100 bp, 8-λ/HindIII.

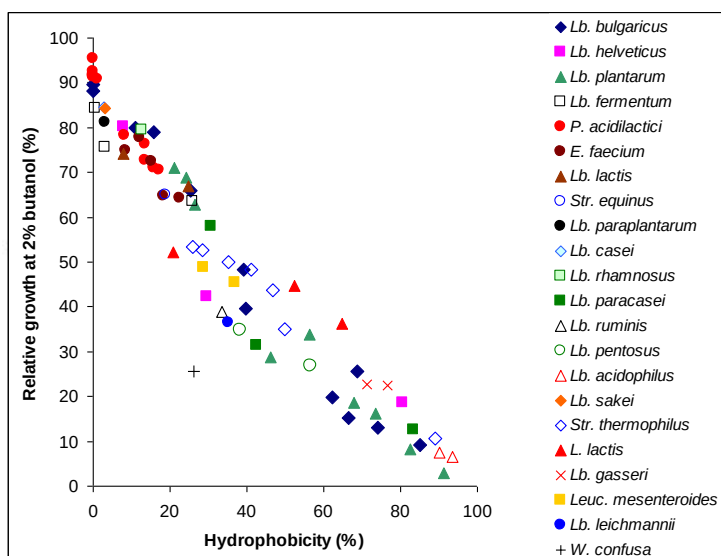


Фигура 51. Загуба на жизнеспособност на щамове *Str. thermophilus* ST2980и неговия безплазмиден вариант ST2980* в условия на термичен шок. Преди излагане на 65°C клетките бяха предварително инкубирани при 42°C или 52°C.

Сред 49-те анализирани щамъа бяха открити пет, които съдържат нови плазмиди с *hsp*-ген. Всички те притежават плазмиди с големина под 3 кб. Щамът ST2980 и неговият плазмидно-елиминиран вариант ST2980* бяха сравнени по показател преживяемост на клетките в условия на температурен шок от 65°C (Фиг. 51). Бяха наблюдавани значителни разлики в преживяемостта между вариантите на щамъа, особено когато клетките се прехвърлят от 42°C направо на 65°C. След 1 час само 1% от ST2980* клетките остават жизнеспособни в сравнение с 50% на плазмидния вариант ST2980. Предшестваща инкубация при 52°C (предшок) дава възможност на без-плазмидните клетки да оцелеят по-ефективно. Въпреки това, след 2 часа третиране при повишена температура, около 7% от ST2980 клетки останаха жизнеспособни, докато при ST2980* нямаше оцелели клетки.

Разработеният бърз PCR-метод за откриване на щамове, устойчиви към индустриален стрес позволява бърз скрининг на големи промишлени колекции без използване дълги процедури на изолиране на плазмидна ДНК, хибридизация и секвениране. Други автори също са разработвали успешни техники за детекция на *hsp*-гени чрез Southern blot с биотин-белязани сонди (Somkuti & Steinberg, 1999; Geis et al., 2003).

МКБ бяха използвани и като моделна система за проучване и на стрес към органични разтворители. Бе направена количествената оценка на хидрофобността на клетъчната повърхност на 74 млечнокисели бактериални щамъа от нашата колекция, като същевременно бе измерена тяхната поносимост към различни концентрации на бутанол. Получените резултати разкриха, че хидрофобността на щамовете е обратно пропорционална на тяхната преживяемост в среда с органичен разтворител (Фиг. 52).



Фигура 52. Корелация между относителната скорост на растеж на щамове МКБ в MRS среда, съдържаща 2% бутанол и хидрофобността на тяхната клетъчна повърхност (CSH) в MRS, изчислена по метода МАТН. Като 100% се възприема растежът на съответния щам в MRS. Анализирани са 74 щамъа,

Всички силно устойчиви на бутанол щамове се оказаха хидрофилни (CSH индекс<1%), а колкото по-хидрофобна бе тяхната повърхност,

толкова по-чувствителни бяха щамовете към бутанол. Тъй като резултатите обхванаха 23 различни вида млечнокисели бактерии от седем рода, бе направен извода, че независимо от вида, по-ниската степен на хидрофобност на клетките ясно корелира с по-високото ниво на преживяемост в условия на алкохолен стрес.

Освен това, култивирането при повишаване на концентрациите на бутанол показва ясно тенденция за намаляване на нивото на хидрофобност във всички тествани организми, което предполага възможни механизми за адаптация. Част от хидрофобността на клетъчната повърхност на лактобацилите се дължи на т.нар слой от повърхностни протеини – SLP (S-layer proteins). Те съдържат голям брой положително-заредени аминокиселини, имат сравнително малка молекулна маса (40–50 kDa) и не са гликозилирани (Avall-Jääskeläinen & Palva, 2005).

Всички видове, които имат хидрофобна повърхност притежават SLP, напр. *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. brevis*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. crispatus*, *L. johnsonii* (Papadimitriou et al., 2016; Bönisch et al., 2018). Обратно, МКБ, които не притежават SLP като *L. casei* и *L. rhamnosus* обикновено имат хидрофилна повърхност (Avall-Jääskeläinen et al., 2005).

След доказването на наличието на SLP при шест от щамовете, бяха направени експерименти по целенасочено намаляване на хидрофобността чрез отстраняване на протеините от S-слоя от клетъчната обвивка и също бе наблюдавано увеличаване на устойчивостта към алкохол.

С това проучване още веднъж бе доказано, че МКБ са устойчиви към алкохолен стрес, което е наблюдавано и от други автори за *L. brevis* (McKarns et al., 1997), *Enterococcus faecium* (Ting et al., 2012), *Ent. faecalis* (Kanno et al., 2013), *P. acidilactici* (Pomaranski & Tiquia-Arashiro, 2016), *P. pentosaceus* и *L. plantarum* (Li et al., 2010). Сред българските изолати, особено резистентни към алкохолен стрес се оказаха щамовете амилолитичните щамове *P. acidilactici* и *L. sakei*, както и някои от щамовете *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

2. Гликозид-хидролазни ензими при род *Bacillus*

2.1. Нови и рекомбинантни циклодекстрин-глюканотрансферази (ЦГТ-ази)

Бактериалните ЦГТ-ази катализират хидролизата на нишесте и декстрини и реакции на трансгликозилиране, които могат да бъдат вътре-молекулни (циклизиране) или междумолекулни (диспропорционално свързване). В резултат на ензимното действие се получават цикличните молекули циклодекстрини (ЦД) с множество промишлени приложения.

През последното десетилетие в Института по микробиология бе създадена голяма колекция от нови алкалофилни щамове *Bacillus*, продуценти на ЦГТ-аза. Щамовете бяха изолирани от 17 български

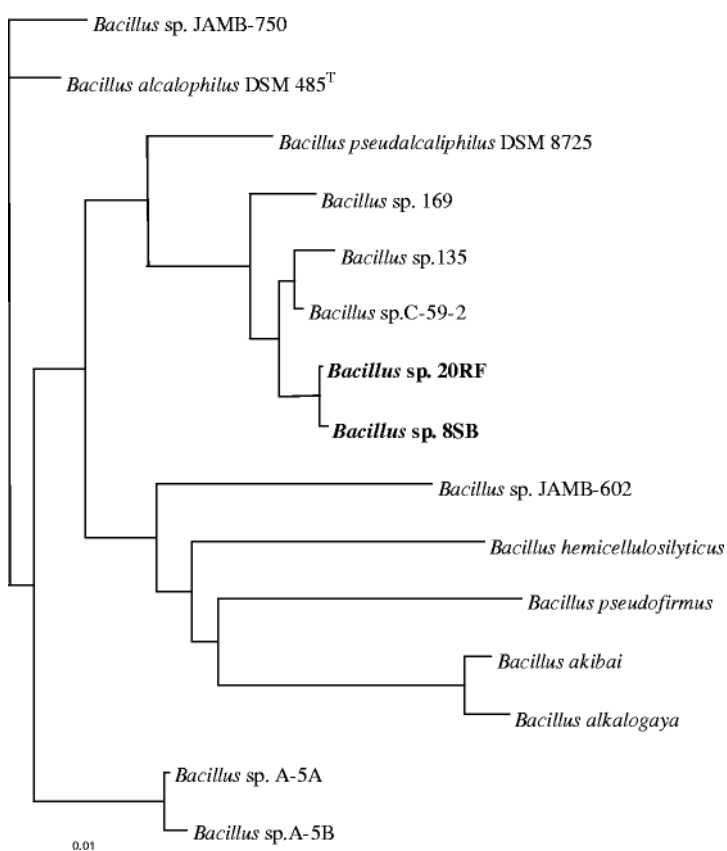
алкални и нормални местообитания (извори и почви). От 107 щам, анализирани за ЦГТ-азна активност, 27 синтезират ензима в значителни количества, а два от тях са особено перспективни: 20RF, който достига стойности на ензимната активност от 230–250 U/мл и 8SB (130–160 U/мл).

2.1.1. Идентификация на бацилни продуценти на ЦГТ-аза

По морфологични и физиологични критерии новоизолираните продуценти на ЦГТ-аза 20RF и 8SB бяха определени като принадлежащи към род *Bacillus*, тъй като бяха Грам-положителни, каталазо-положителни, аеробни и образуваха елипсоидни ендоспори. Типичните за рода *Bacillus* фенотипни характеристики на 20RF и 8SB са включваха и хидролиза на нишесте, редукция на нитрати до нитрит и образуване на индол, казеинова хидролиза, образуване на дихидроксиацетон, дезаминиране на фенилаланин и разграждане на тирозин.

И двата щам бяха облигатни алкалофили и се развиваха в среда Nutrient broth с рН между 9.0–11.0, оптимално при рН 9.8–10.3. Изолатите бяха отрицателни по теста на Voges – Proskauer и усвояваха глюкоза, арабиноза, ксилоза, манитол и цитрат.

20RF и 8SB показаха и някои разлики помежду си, напр. 20RF се развиваше при по-алкално рН, между 10,0 и 11,0, но толерира до 2% (w/v) NaCl, за разлика от изолата 8SB, който показва добър растеж при концентрации 2, 5, 7 и 10% (w/v).



Фигура 54. Филогенетично родство между щамове алкалофилни бацили, продуценти на ЦГТ-аза.

Идентификацията на щамовете 20RF и 8SB до вид бе осъществена чрез секвениране на фрагмент от рибозомалния оперон, кодиращ 16S рРНК. Секвенциите на 16S рРНК гените бяха депозирани в Ген-банката на NCBI под номера EF589779 (*Bacillus* sp. 20RF) и EF589780 (*Bacillus* sp. 8SB).

Сравнението с налични подобни секвенции в базата данни (Фиг. 54) показва висока степен на

сходство с други алкалофилни бацили. Въз основа на 99% идентични нуклеотиди и двата щама бяха групирани с *Bacillus* sp. 169 (Acc.№AB043841), *Bacillus* sp. 135 (AB043840) и *Bacillus* sp. C-59-2 (AB043848). Степента на хомология с *B. pseudalcaliphilus* DSM 8725 бе 98%, а с всички останали изследвани щамове - *B. alcalophilus* DM 485^T (Nielsen et al., 1994), *Bacillus* sp. JAMB-750 (AB128830), *Bacillus* sp. A-5A (AY914066) и *Bacillus* sp. A-5B (AY914067) - 97% и така, двата щама бяха определени до вид като *B. pseudalcaliphilus*.

2.1.2. Биохимична характеристика на ЦГТ-аза на щам 8SB

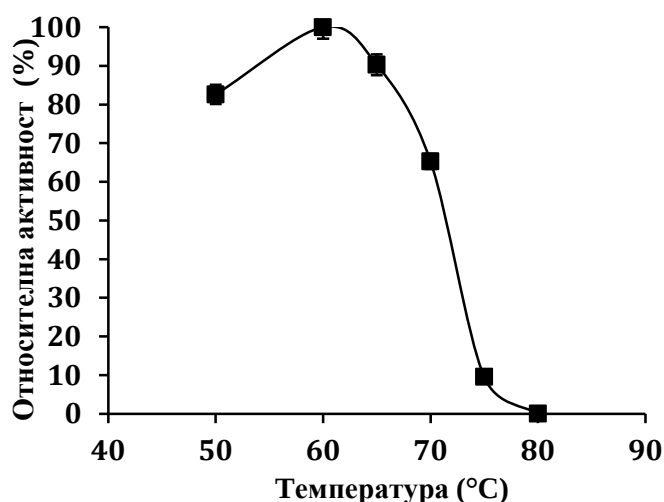
Щам *B. pseudalcaliphilus* 8SB беше изолиран от проба, съдържаща минерална вода и почва от Сапарева баня и бе депозиран в Националната банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури (НБИМКК) под номер 8703. Пречистването на ензима бе в две стъпки: адсорбцията на суровия ензим към неразтворимо царевично нишесте (оптимизирана чрез вариращи концентрации на нишесте и амониев сулфат) и елуиране с фосфатни буфери с рН 6,0 или 8,0, съдържащи β - или γ -ЦД. Установените оптимални условия за адсорбция на нишесте бяха 10% (w / v) неразтворимо царевично нишесте, 30% (w/v) амониев сулфат и двойно елуиране с 67 mM фосфатен буфер (рН 6.0), съдържащ 1 mM β -ЦД.

Използваният щам *B. pseudalcaliphilus* 8SB е халотолерантен облигатен алкалофил и култивирането в алкална среда, съдържаща 8% NaCl доведе до синтез на почти чист ензим в културалната течност. Етапът на ултрафилтрация в този случай може да се избегне и да се извърши директна адсорбция на центрофугираната супернатанта върху нишесте. В този случай пречистеният ензим е с много висока специфична активност (92.3 U/мг) и добивът е по-висок (65.2%) в сравнение с резултатите, получени след култивиране на щам в алкална среда без NaCl (62.4%). При изследвани от други учени γ -ЦГТ-ази пречистването се извършва на няколко етапа, включително ултрафилтрация; адсорбция на нишесте; и DEAE Sephadex, DEAE-сефароза, DEAE-целулофин и октил-целулофинова хроматография (Hirano et al., 2006). Прави впечатление, че пречистеният ензим проявява висока специфична γ -ЦГТ-азна активност, която е много по-висока от тази на други щамове бацили. Например, *Bacillus clarkii* 7364 проявява 5.41 U/мг протеин специфична γ -ЦГТ-азна активност (Takada et al., 2003), а рекомбинантна ЦГТ-аза на *Bacillus subtilis* KN2 - 5.57 U/мг протеин (Hirano et al., 2006), докато *B. pseudalcaliphilus* 8SB достига 92.3 U/мг протеин, което разкрива огромните възможности на щам да продуцира предимно γ -циклодекстрини.

Молекулната маса на ензима бе определена чрез SDS ПАГЕ като 71 kDa. Това наблюдение предполага, че ензимът е мономер и има подобно молекулно тегло като други описани в литературата ЦГТ-ази, чиято молекулна маса варира между 64 и 78 kDa (Takada et al., 2003; Hirano et al., 2006; Gimenez et al., 2019).

Таблица 14. Стъпки на пречистване на ЦГТ-аза на щам *B. pseudocaliphilus* 8SB.

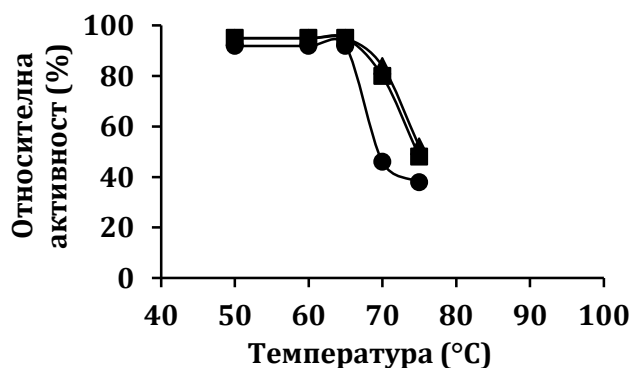
Стъпка на пречистване	Обем (мл)	Активност (U/мл)	Общ протеин (мг/мл)	γ-ЦГТ-азна специфична активност (U/мг белтък)	Степен на пречистване	Добив (%)
Културална течност	40	2.55±0.14	0.09±0.005	28.3	1.0	100.0
Нишестена адсорбция Елуат 1+2	24	2.77±0.11	0.03±0.001	92.3	3.3	65.2



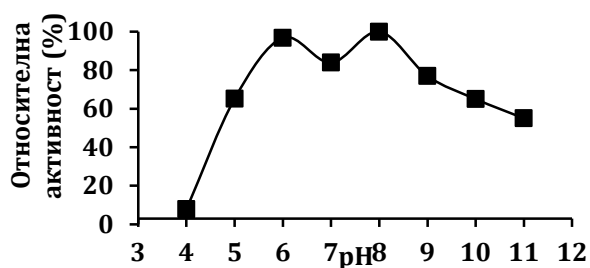
Фигура 55. Температурен профил на пречиствена ЦГТ-аза на *B. pseudocaliphilus* 8SB.

Температурният профил на ензима бе изследван при стандартни условия. Ензимът е оптимално активен при 60°C (Фиг. 56), подобно този при

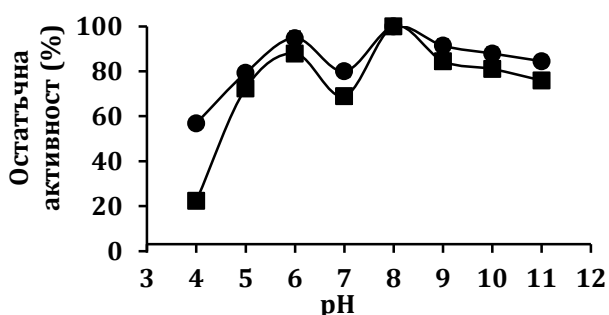
Bacillus clarkii 7364 и с по-висок оптимум от ЦГТ-азата на *Bacillus macorou* WSH02-06 и *Bacillus* sp. G-825-6. Неговата термостабилност се увеличава в присъствието на калциеви йони и нишесте.



Фигура 56. Температурна стабилност на пречистена ЦГТ-аза на *B. pseudocaliphilus* 8SB. Нетретраният ензим се счита за 100% (5.54 U/мл). Черно кръгче: ЦГТ-азен ензим; квадрат: ензим + 5 mM Ca²⁺; триъгълник: ензим + 5 mM Ca²⁺ и 1% нишесте.



Фигура 57. pH оптимум на пречистена ЦГТ-аза на *B. pseudocaliphilus* 8SB.



Фигура 58. pH стабилност на пречистена ЦГТ-аза на *B. pseudocaliphilus* 8SB. Означения: кръг: след третиране за 1 час, квадрат: след третиране за 2 часа.

pH оптимумите на ензима са два (Фиг. 57), при 6,0 и 8,0, подобно на ЦГТ-азата на *Bacillus* sp. G-825-6 и *Bacillus* sp. AL-6 (Takada et al., 2003; Hirano et al., 2006). Ензимът запазва 80% от началната си активност в широки граници на pH - от 5,0 до 11,0 (Фиг. 58). Изследваната ЦГТ-аза показва значителна стабилност в присъствието на различни метални йони и реактиви с концентрация 5 mM след 1 час третиране. Ензимът беше силно инхибиран от 15 mM Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ag^{+} и Zn^{2+} след 2-часово третиране. Някои метални йони, като Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} и Mo^{7+} , оказаха стимулиращ ефект в концентрация 5 mM.

2.1.3. Секвениране на ген, кодиращ ЦГТ-аза в *B. pseudocaliphilus* 8SB

Освен високата активност, предимство на ЦГТ-азата на щам 8SB бе продукцията на γ -циклодекстрини в голямо количество. Към 2012 г., когато бяха извършени изследванията бе установено, че алкалофилните бацили са главните продуценти на γ -ЦГТ-ази, но имаше едва четири налични секвенции на гени, кодиращи тези ензими и то, в доста отдалечени видове бацили (Lee et al., 2007; Leemhuis et al., 2010).

Секвенирането на генът *cgt* на *B. pseudocaliphilus* 8SB бе осъществено, като бяха генерирани праймери с прицелни секвенции в консервативни райони на гена, които са задължителни за всички ензими от семейство GH13 (Материали и методи). Бе извършена PCR-амплификация на различни припокриващи се части от гена чрез комбиниране на праймерни двойки. Получените секвенции изградиха цялостната последователност на *cgt*, която бе депозирана в Ген-банката на NCBI под номер JF280088.

1 TTT **TATAAT** TTT ATC TTT AT**AGG** **G**GGG ATA AAT **TTG** AAA AAA TTA AGG TTT TTA ATG AAA
 (-10) SD M K K L R F L M K

61 ACG ATT CCA CTA AGT TTA TTT CTT TTA TTA CTT CTT TCT TTA ACT ACA GTC GCT GAG GCT
 T I P L S L F L L L L S L T T V A E A

Сайт за срязване на сигналния пептид ↑

121 GAC GTT ACA AAC AAA GTC GAT TAT TCC AAG GAT GTT ATT TAC CAA ATT GTA ACC GAT CGT
 D V T N K V D Y S K D V I Y Q I V T D R

(...)

2104 TCA CCT CCT GCT GGA ACC GAC ACC GTC ATC GTC GAC TGG CAA TAG CAC GTT CCA TTA
 S P P A G T D T V I V D W Q .

2161 TAA AAG GTT AAT TAA AGC ATA CAA CTT AAG GGC AAT GCA TTG TGA CAA CAC ACA

2216 CAA CAA CCC CAT TTT CCC GTA TTG GAA AAT AGG GTT GTT
 ТЕРМИНАТОР

Фигура 59. Промоторна и терминаторна област на *cgt* на *B. pseudocaliphilus* 8SB.

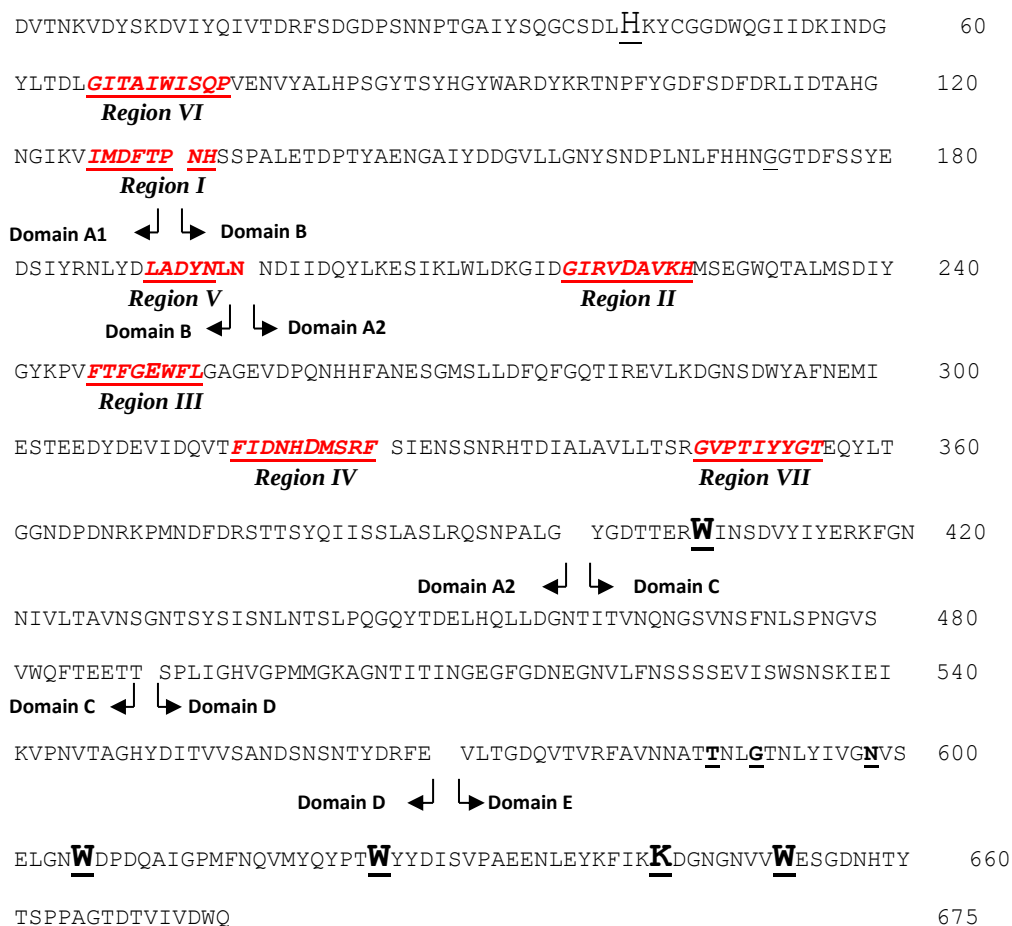
Анализът на нуклеотидната последователност показва наличие на отворена рамка за четене (ORF) от 2112 bp, кодираща полипептид от 704 аминокиселинни остатъци, съставен от 29-аа сигнална последователност и 675-аа зрял ензим. Начален кодон е TTG (Фиг. 61), известен с това, че функционира като инициаторен кодон в *E. coli* и други прокариоти, но е доста необичаен за гените на бацили, като само 11.2% от гените на *B. subtilis* започват с TTG (Hannenhalli *et al.*, 1999). TTG старт кодон обаче имат и другите *cgt*-гени при род *Bacillus*, при щамовете A2-5a, G1, и TS-1 (Ohdan *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2006; Ong *et al.*, 2008). Предполагамата (-10) промоторната последователност (TATAAT) е намерена 30 bp преди инициаторния кодон. Типичен Shine – Dalgarno (SD) сайт AGGGGG беше открит на позиция (-12). Генът завършваше с TAG стоп кодон, последван от палиндромна последователност, която предполага р-независим механизъм на терминиране.

	Амино(н-)-краен район	Хидрофобен (h-) район	С-краен (с-) район
<i>Bacillus</i> sp. A2-5a	MKNLTVLLKT	IPLALLLFILL	SLPTAAQA
<i>B. ohbensis</i>	MKNLTVLLKT	IPLALLLFILL	SLPTAAQA
<i>B. pseudocaliphilus</i> 8SB	MK KLR FLMKT	IPLSLF LLLLL	SLTTV AEA
	** * * **	*** * *	*** * * *
	-++-+---++	---+-----+	-+-+--+

Фигура 60. Сигнален пептид на ЦГТ-аза на *B. pseudocaliphilus* 8SB.

Транслираната аминокиселинна последователност на ЦГТ-азата на *B. pseudocaliphilus* 8SB предсказва молекулно тегло на ензима 75.5 kDa с pI 4.13. Дължината на сигналния пептид беше същата като тази на *Bacillus* sp. A2-5a и *B. ohbensis* (Фиг. 61). Мястото на скъсване на сигналния

пептид е АЕА, за разлика от АQА или АNА, докладвани за други ЦГТ-ази (Costa et al., 2012). Аминокиселинната последователност на сигналния пептид се състои от няколко положително заредени аа, последвани от няколко хидрофобни.



Фигура 61. Транслирана аминокиселинна секвенция на ЦГТ-аза на *B. pseudocaliphilus* 8SB. Открити са 11 консервативни аа остатъка, участващи в контакта на ензима със сурово нишесте. Четири от тези 11 аминокиселини - със съответни позиции при ЦГТ-азата на *Bacillus* sp. TS1-1 и при *B. pseudocaliphilus* 8SB (Trp616 (605), Lys651 (644), Trp662 (652) и Asn667 (657)) са част от сайта MBS1 за свързване с малтоза, докато други три (Thr598 (587), Gly601 (590) и Trp636 (625)) са част от сайт MBS2. Последните четири консервативни остатъка Gly608 (597), Leu613 (602), Gly614 (603) и Pro634 (623) са необходими за структурната стабилност на нишесте-свързващия домен.

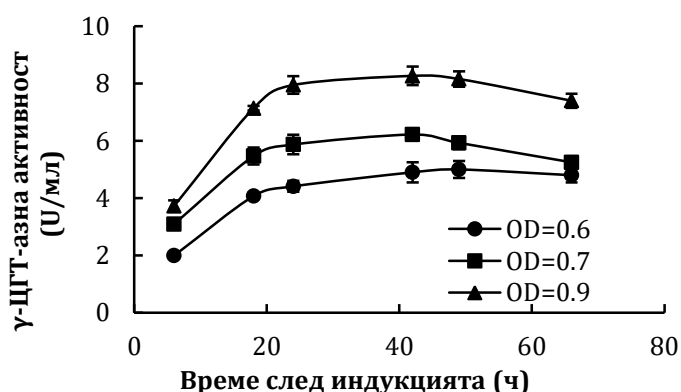
Сравнението на аминокиселинната последователност на изследвания ензим с тези на *Bacillus* sp. A2-5a и *B. ohbensis* разкри две важни замени в н-края: неутралните Asn и Thr са заменени с положително заредени Lys и Arg. Освен това в хидрофобния район били Phe и Ile са заместени с Leu, което значително засилва взаимодействията между клетъчната мембрана и сигналния пептид и позволява безпрепятствен транспорт на ЦГТ-азата до периплазмата.

Разглеждайки цялостната структура на ензима, могат да бъдат открити всички седем консервативни за ЦГТ-азите райони (I – VII) и пет консервативни за домена (A – E), (Фиг. 61). Каталитичната триада се състои от Glu, Asp, Asp и е консервативна за всички ЦГТ-ази (Ong et al., 2008). Тези остатъци в ензима на *B. pseudocaliphilus* 8SB са Glu250, Asp222 и Asp321 и са еквивалентни на Glu257, Asp229 и Asp328 в ензима на *Bacillus cirilans* 251, който служи за еталон (Lawson et al., 1994). Трябва да се отбележи, че позицията 172 е заета от Gly, т.е. еквивалентен на Gly179 в ЦГТ-аза от *B. cirilans* 251. Съгласно изследвания на Costa et al. (2012), този остатък е изключително важен за γ -специфичността на ензима и осигурява ефективен процес на циклизация. Остатъкът His43 (His47 в *B. cirilans* 251) също влияе върху специфичността на ЦГТ-азите (Van der Veen et al., 2000). Известно е, че в позиция 47, в α - и β -ЦГТ-азите се среща Arg или Lys, докато в γ -ЦГТ-азите - His. Консервативните райони, отговорни за връзката със сурово нишесте бяха наблюдавани в домейн E на ензима на *B. pseudocaliphilus* 8SB.

2.1.4. Клониране и хетероложна експресия на ген, кодиращ ЦГТ-аза

Ниската степен на хомология между ЦГТ-азата на *B. pseudocaliphilus* 8SB с ензима на *Bacillus* sp. A2-5a (87%), с този на *B. ohbensis* (86%) и с ензима на *Bacillus* sp. G1 (80%), свидетелстват, че *cgt* гена на *B. pseudocaliphilus* 8SB кодира нов ензим от ензимната група на KC201 (Kitamoto et al., 1992; Martins et al., 2003).

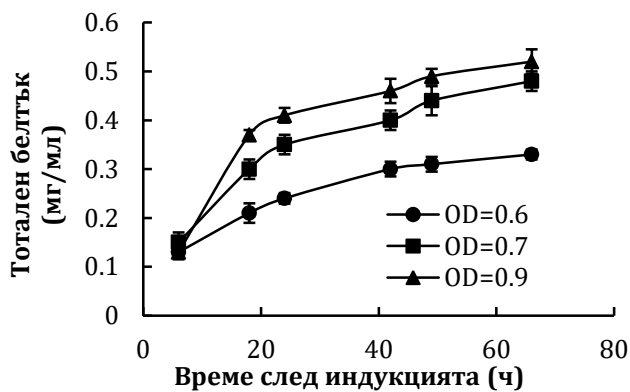
Cgt-гена на *B. pseudocaliphilus* 8SB беше клониран като PCR продукт (2151 bp) във вектор pJET2.1/blunt (2974 bp) под контрола на T7промотор. Клонирането на *cgt* в гостоприемника *E. coli* DH5 α беше потвърдено чрез рестрикционен анализ. Правилната ориентация на инсерта бе доказана с рестрициране на плазмидна ДНК на конструкта с ензимите *Xho*I и *Kpn*I, а като резултат бяха получени фрагменти с големина ~3200 и ~1800 базови двойки.



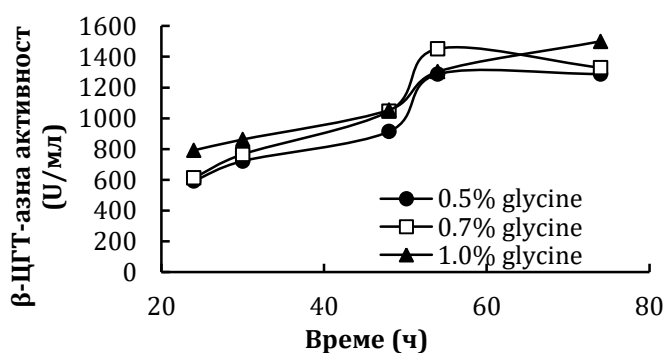
Фигура 63.

Влияние на индукцията с IPTG върху β -ЦГТ-азната активност на извънклетъчна ЦГТ-аза JCGT8-5. Култивиране: 6 часа в среда LB с 0.2% нишесте и 0.3% глицин при 37°C. При OD₆₀₀ 0.6 (1%, v/v инокулум), 0.7 (2%, v/v

инокулум), или 0.9 (4%, v/v инокулум), температурата беше намалена на 30°C и беше добавено 1 mM IPTG.

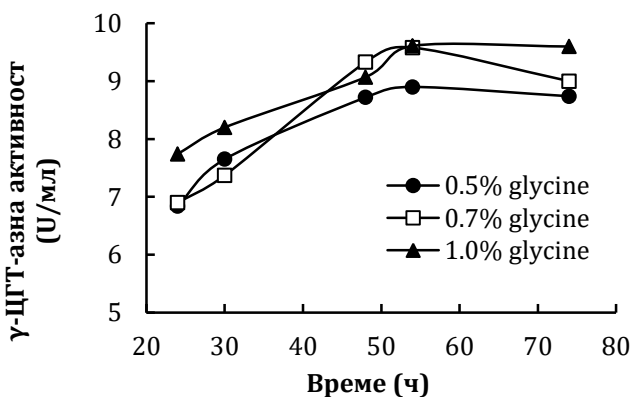


IPTG.

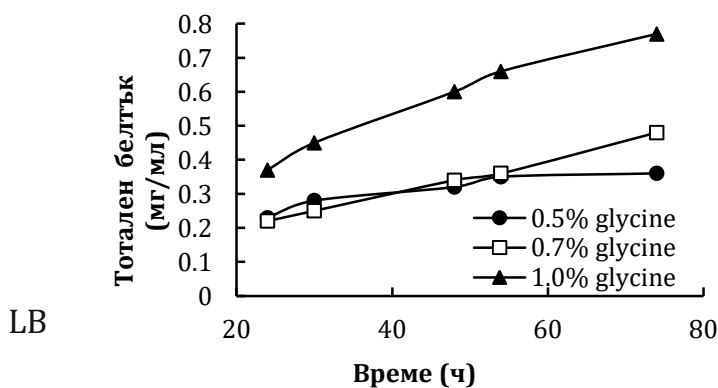


Фигура 64. Влияние на индукцията с IPTG върху общия извънклетъчен белтък при продукцията на ЦГТ-аза от *E. coli* BL21(DE3), клон pJCGT8-5. Култивиране: 6 часа в среда LB с 0.2% нишесте и 0.3% глицин при 37°C. Когато OD₆₀₀ достигне 0.6 (1% инокулум), 0.7 (2% инокулум), или 0.9 (4%, инокулум), 30°C, 1 mM

Фигура 65. Влияние на концентрацията на глицин върху β -ЦГТ-азната активност на извънклетъчна ЦГТ-аза, синтезирана от *E. coli* BL21(DE3), клон pJCGT8-5. Култивиране 6 ч в среда LB с 0.2% нишесте (w/v) и 1 mM IPTG, при 37°C.



Фигура 66. Влияние на концентрацията на глицин върху γ -ЦГТ-азната активност на извънклетъчна ЦГТ-аза, синтезирана от *E. coli* BL21(DE3), клон pJCGT8-5. Култивиране 6 ч в среда LB с 0.2% нишесте (w/v) и 1 mM IPTG, при 37°C.



LB

Фигура 67. Влияние на концентрацията на глицин върху общото количество извънклетъчен белтък, синтезиран от *E. coli* BL21(DE3), клон pJCGT8-5. Култивиране: 6 ч в среда с 0.2% нишесте (w/v) и 1 mM IPTG, при 37°C.

С конструкта pJCGT8 бяха трансформирани клетките на *E. coli* BL21 (DE3). За по-нататъшната работа бе избран рекомбинантния клон с най-висока извънклетъчна активност на ЦГТ-аза (pJCGT8-5). Важно е да се отбележи, че в настоящата работа pJET2.1/blunt за първи път е успешно използван като експресионен вектор. ЦГТ-азата на *B. pseudocaliphilus* 8SB бе извънклетъчен ензим, секретиран в средата от гостоприемника *E. coli* BL21 (DE3), което доказва функционалността на сигналния пептид на ЦГТ-азата в *E. coli*.

Избраният рекомбинант синтезираше ензим, наречен JCGT8-5 със следните начални параметри: 56.10 U/мл β -ЦГТ-азна и 2.12 U/мл γ -ЦГТ-азна активност. Продукцията на извънклетъчна рекомбинантна ЦГТ-аза зависи от условията на култивиране и индукция (Jemli et al., 2008; Li et al., 2009). Бяха направени редица предварителни експерименти: (1) избор на подходяща хранителна среда; (2) оптимизиране на количеството инокулум (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0%, w/w); (3) добавяне на индуктор 1 mM IPTG (на 3, 4, 6-ти час от началото на процеса); (4) понижаване на температурата на култивиране след индукция на IPTG (до 30, 25, 20°C); (5) добавяне на глицин (в началото на процеса или едновременно с IPTG). Тъй като генът *sgt* беше клониран под контрола на индуцируемия T7 РНК полимеразен промотор, експресията му в *E. coli* BL21(DE3) беше пряко зависима от всички параметри на индукцията с IPTG. Като най-добри условия бяха определени култивирането при 37°C в среда LB, съдържаща 0.2% нишесте и 0.3% глицин, при инокулум 1, 2 и 4% (w/w) пред-култура.

Извънклетъчната експресия на рекомбинантни протеини често се затруднява от образуването на включени телца в клетките на *E. coli* (Kim et al., 2005). Добре известна техника за предотвратяване на агрегацията на рекомбинантните протеини е намаляването на температурата на култивиране след индукцията (Lo et al., 2007). При понижаване на температурата след индукция от 37 на 30°C бе постигнато увеличение от 22.75 пъти за β -ЦГТ-азната и 4.52 пъти за γ -ЦГТ-азна активност. Известно е, че ниската пропускливост на външната мембрана на клетките е бариера, ограничаваща извънклетъчната секреция. Тъй като често рекомбинантните ЦГТ-ази се натрупват в периплазмата, са правени различни опити за улесняване на секрецията (Ong et al., 2008; Ismail et al., 2011). Глицинът е известен като средство за повишаване на секрецията на рекомбинантни ензими в културалната среда на *E. coli* (Tang et al., 2008; Li et al., 2009), което бе потвърдено от получените резултати. Засилената извънклетъчна секреция на рекомбинантните ензими чрез добавка на глицин се обяснява с увеличаването на пропускливостта на клетъчната мембрана. Добавянето на глицин в началото на процеса на култивиране обаче, доведе до значително повишаване на общия протеин и намалена специфична ензимна активност. Бяха изследвани различни концентрации на глицин (0.5, 0.7 и 1.0%), добавен към културата едновременно с IPTG (6-ти час).

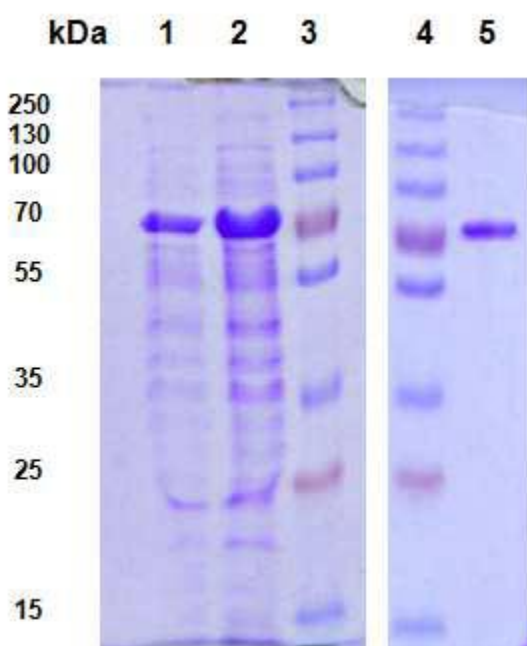
Установената оптимална концентрация на глицин бе 0.7%. В края на процеса, 48 часа след индукцията, β - и γ -ЦГТ-азните активности достигнаха 1275,1 U/мл и 9,58 U/мл, което съответства на 3541,94 U/мг и 26,61 U/мг специфична активност. Добавянето на 1% глицин доведе до повишена продукция на ензим и след 68 ч след индукцията: 1318.20 U/мл β -ЦГТ-азна и 9.60 U/мл γ -ЦГТ-азна активност. Тези стойности обаче съответстваха на значително намалени специфични ензимни активности: 1711.95 U/мг и 14,56 U/мг, поради високото съдържание на общ протеин. Сравнението на ензимните активности на рекомбинантния pJCGT8-5 (1275.1 U/мл β -ЦГТ-азна и 26.61 U/мг γ -ЦГТ-азна активност с тези на други подобни рекомбинантни ЦГТ-ази показва, че ензимът, синтезиран от клон pJCGT8-5 е перспективен за промишлен синтез на циклодекстрини. Например, ЦГТ-азите на *Bacillus* sp. TS1-1 и *Bacillus* sp. G1, клонирани в *E. coli* са достигнали стойности на β -ЦГТ-азна активност съответно 17.80 U/мл (Rahman et al., 2006) и 35.71 U/мл (Ong et al., 2008). Генът, кодиращ ЦГТ-аза при *Bacillus* sp. G-825-6, клониран в *B. subtilis* бива експресиран до ензим с едва 0.140 U/мг γ -ЦГТ-азна активност (Hirano et al., 2006). За да се установи количеството на формираните циклодекстрини и тяхното съотношение, културални супернатанти бяха използвани като ензимен източник за директна продукция на ЦД. Получените резултати показаха съотношение на β -ЦД към γ -ЦД около 83:17%. В сравнение с пречистения естествен ензим, рекомбинантният ензим почти няма промяна спрямо натуралния по този показател. Рекомбинантната ЦГТ-аза бе концентрирана чрез ултрафилтрация и частично пречистена от безклетъчна супернатанта с добив от 94.7% (Табл. 16).

Таблица 15. Съотношение на получените β към γ -циклодекстрини (ЦД) след 20 минутна ензимна реакция при 60°C, pH 6.0, и 4.0% нишесте (Fluka) с културални супернатанти на *E. coli* BL21(DE3), клон pJCGT8-5 в присъствието на 0.5, 0.7 и 1.0% глицин.

Час	Добавен 0.5% глицин				Добавен 0.7% глицин				Добавен 1% глицин			
	β -ЦД (мг/мл)	γ -ЦД (мг/мл)	β/γ ЦД (%)	Конв. ниш. (%)	β -ЦД (мг/мл)	γ -ЦД (мг/мл)	β/γ ЦД (%)	Конв. ниш. (%)	β -ЦД (мг/мл)	γ -ЦД (мг/мл)	β/γ ЦД (%)	Конв. ниш. (%)
18	4.260 $\pm$ 0.097	0.887 $\pm$ 0.020	82.8:17.2	12.9	4.600 $\pm$ 0.158	0.963 $\pm$ 0.032	82.7:17.3	13.9	4.975 $\pm$ 0.058	1.029 $\pm$ 0.017	82.9:17.1	15.0
24	4.917 $\pm$ 0.286	0.997 $\pm$ 0.023	83.1:16.9	14.8	5.443 $\pm$ 0.229	1.093 $\pm$ 0.078	83.3:16.7	16.2	5.520 $\pm$ 0.093	1.082 $\pm$ 0.019	83.6:16.4	16.5
42	5.685 $\pm$ 0.098	1.133 $\pm$ 0.065	83.8:16.2	16.7	5.788 $\pm$ 0.081	1.178 $\pm$ 0.004	83.1:16.9	17.4	5.980 $\pm$ 0.117	1.214 $\pm$ 0.018	83.1:16.9	17.9
48	5.640 $\pm$ 0.211	1.195 $\pm$ 0.020	82.5:17.5	17.1	5.833 $\pm$ 0.016	1.199 $\pm$ 0.023	83.0:17.0	17.6	5.636 $\pm$ 0.147	1.094 $\pm$ 0.028	83.7:16.3	16.8
68	5.929 $\pm$ 0.094	1.180 $\pm$ 0.010	83.4:16.6	17.8	5.990 $\pm$ 0.003	1.161 $\pm$ 0.028	83.8:16.2	17.9	5.741 $\pm$ 0.098	1.165 $\pm$ 0.024	83.1:16.9	17.3

Таблица 16. Частично пречистване на рекомбинантна ЦГТ-аза рJCGT8.

Обем (мл)	β -ЦГТ-азна активност (U/мл)	Белтък (мг/мл)	Спец. акт. (U/мг)	Степен на преч. (пъти)	Добив (%)
Културална супернатанта 30-сти час	144 820.90	0.34	2414.41	1.0	100.0
Ензим след ултрафилтрация	28 3999.60	1.00	3999.60	1.7	94.7

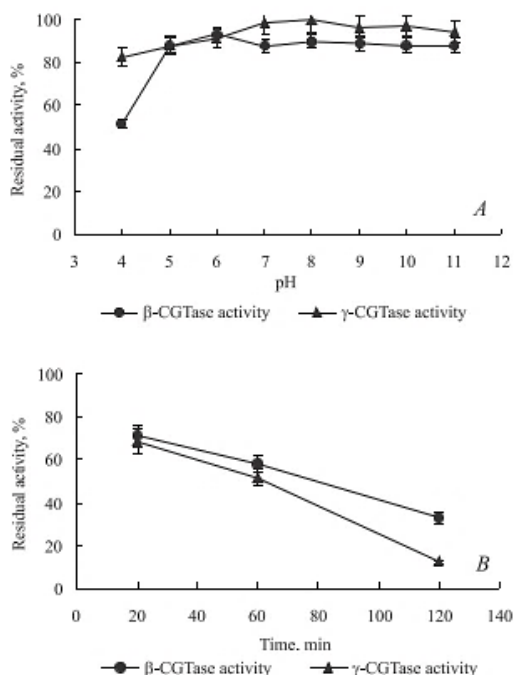


Фигура 68. Етапи на пречистване на рекомбинантна ЦГТ-аза. Частично пречистени и пречистени проби от ензима са разделени в 10% ПААГ. № на старт и проба: (1) и (2) Ултраконцентрати на JCGT8-5, (3) и (4) Молекулен маркер PAGE Ruler™ Plus protein ladder, с червени ивици - 70 и 25 kDa (Thermo Scientific), (5) Пречистен ензим JCGT8-5.

SDS-ПАГЕ анализът показва, че ензимът е с молекулно тегло като очакваното от транслираната аминокиселинна последователност: 75.5 kDa. При следващите етапи на пречистване, след първата стъпка на ултрафилтрация бяха вариращи различни концентрации на нишесте (от 20 до 60%, w/v) и амониев сулфат (от 30 до 70%, w/v). Поради силно увеличеното извънклетъчно белтъчно съдържание оптималните стойности - 40 и 50% - бяха по-високи в сравнение с подходящите концентрации на тези компоненти за пречистването на изходния ензим на *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB (10 и 30%). Свързаната с неразтворимото нишесте ЦГТ-аза беше успешно елуирана чрез добавянето на 22 mM β -ЦД към елуиращия буфер поради високия афинитет на циклодекстрините към нишесте-свързващия домен. Грубо пречистеният ензим, получен чрез ултрафилтрация, бе допълнително 13 пъти пречистен чрез адсорбция към нишесте и гел филтрация с добив 34.1%. Пречистената ЦГТ-аза бе визуализирана чрез SDS-ПАГЕ.

Таблица 17. Етапи на пречистване на рекомбинантна ЦГТ-аза JCGT8-5.

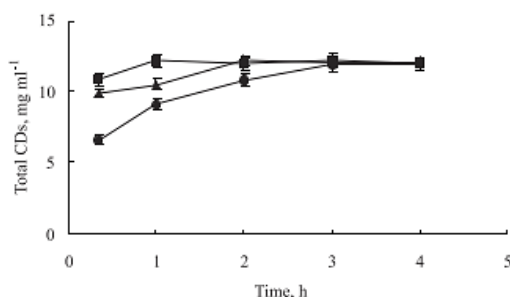
Стъпка на пречистване	Обем (мл)	β -ЦГТ-азна активност (U/мл)	Белтък (мг/мл)	Специфична активност (U/мг)	Активност (U)	Степен на пречистване (пъти)	Добив (%)
Културална супернатанта	96	1308 $\pm$ 26.1	0.48 $\pm$ 0.01	2725	125568	1.00	100
Ултрафилтрация	12.6	9633 $\pm$ 120	2.3 $\pm$ 0.06	4188	121376	1.5	96.7
Адсорбция към нишесте	7	9601 $\pm$ 132	0.77 $\pm$ 0.015	12469	67207	4.6	53.5
Гел-филтрация (Sephadex G100)	10	4282 $\pm$ 29.9	0.12 $\pm$ 0.004	35683	42820	13.1	34.1



Фигура 69. pH стабилност на пречистена рекомбинантна ЦГТ-аза JCGT8-5. Температурна стабилност на пречистена рекомбинантна ЦГТ-аза JCGT8-5. Ензимни проби с начална активност 4000 U/мл β- и 24 U/мл γ-, приети за 100%, бяха инкубирани за в буфери с различно pH при 25°C, или при температура 70°C, pH 6. Символи: инкубиране 1 час (кръг), 2 часа (триъгълник).

По отношение на термостабилността, ензимът запази 52–58% от първоначалната си активност след термичната обработка при 70°C в продължение на 1 час. Ензимът JCGT8-5 бе по-

термостабилен в сравнение с други рекомбинантни ЦГТ-ази. Например, рекомбинантният ензим на *B. clarkii* 7364 запазва своята активност при нагряване до 40°C (Takada et al., 2003), а ЦГТ-азата на *Bacillus* TS1-1 запазва 90% от първоначалната активност след третиране при 60°C в продължение на едва 30 мин (Rahman et al., 2006). С пречистената рекомбинантна ЦГТ-аза бяха проведени експерименти за получаване на циклодекстрини. Добивът бе значителен: 12–12.2 мг/мл за 1–3 ч хидролиза на 4% сурово нишесте.



Фигура 70. Получаване на циклодекстрини под действието на пречистена рекомбинантна ЦГТ-аза JCGT8-5. Символи: кръг – 100 U/г субстрат, триъгълник – 200 U/г субстрат, квадрат – 300 U/г субстрат, като е измервана β-ЦГТ-азна активност.

В процеса на синтез на ЦД бе постигната 31% конверсия на нишесте в циклодекстрини. Бързата хидролиза на нишестето за 1-2 часа и преобладаващото образуване на β- и γ-ЦД (съотношение 21.8% γ-ЦД/1.3% α-ЦД/76.9% β-ЦД) прави изследвания ензим особено перспективен за индустриално приложение. За сравнение, други рекомбинантни ензими образуват значително по-малко общо количество ЦД, напр. 3.5 мг/мл (Rahman et al., 2006), или 10.7 мг/мл след ензимна реакция от 24 часа (Hirano et al., 2006).

2.1.5. Имобилизирание на рекомбинантната ЦГТ-аза JCGT8 и нейното приложение за получаване на циклодекстрини

Имобилизацията е подход, който позволява многократното използване на ензимите като биокатализатори. Тази техника бе приложена и за рекомбинантната ЦГТ-аза JCGT8-5, като ензимът бе имобилизиран в магнитно-модифицирани частици.

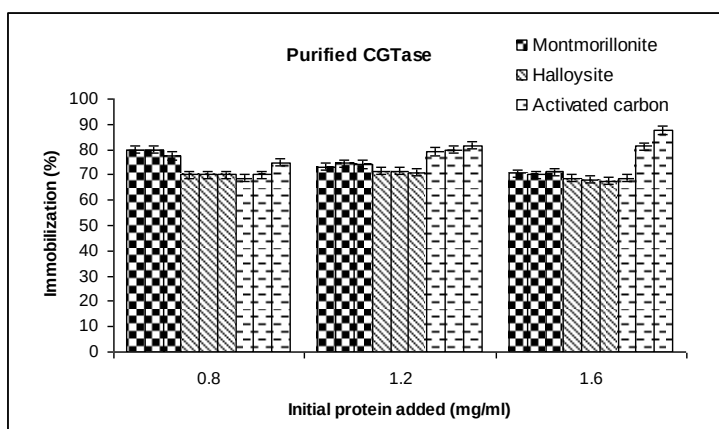
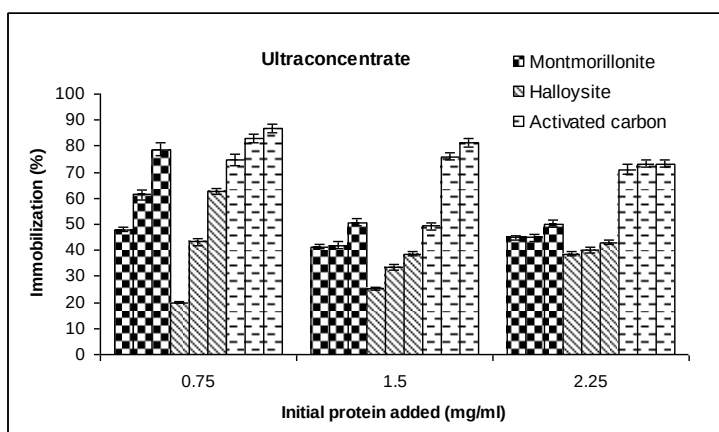
Като нано-носители бяха използвани силикатите монтморилонит (бентонит) и халоизит, активен въглен, овесена слама, пшенични трици, бананова кора, стърготини, лешник и фъстъчена черупка, кафе на зърна, чаени листа, и водорасли *Chlorella vulgaris*, като частиците са с различни размери: от фин прах (черупка от лешник) до над 3 мм (овесена слама).

Всички нано-носители бяха предварително обработени с разтвор на фeroфлуидни наночастици със среден диаметър 12.5 - 14 nm, приготвен по метода на Massart (Massart, 1981) и ни бяха любезно предоставени от проф. Шафарик от Департамента по нанобиотехнология на Института по нанобиология и структурна биология на Чешката академия на науките.

Ензимни препарати с различна степен на чистота бяха използвани в експериментите за имобилизация: (1) полупречистен ензимен ултраконцентрат със специфична активност на 3000 U/мг протеин и (2) пречистен ензим със специфична активност 5820 U/мг.

Между повърхността на нано-носителите и магнитните наночастици от магхемит възникват Вандервалсови, електростатични и хидрофобни сили. Имобилизирани в такива носители, целевият ензим може да бъде лесно отделен от разтвора под действието на постоянни магнити или електромагнитен сепаратор.

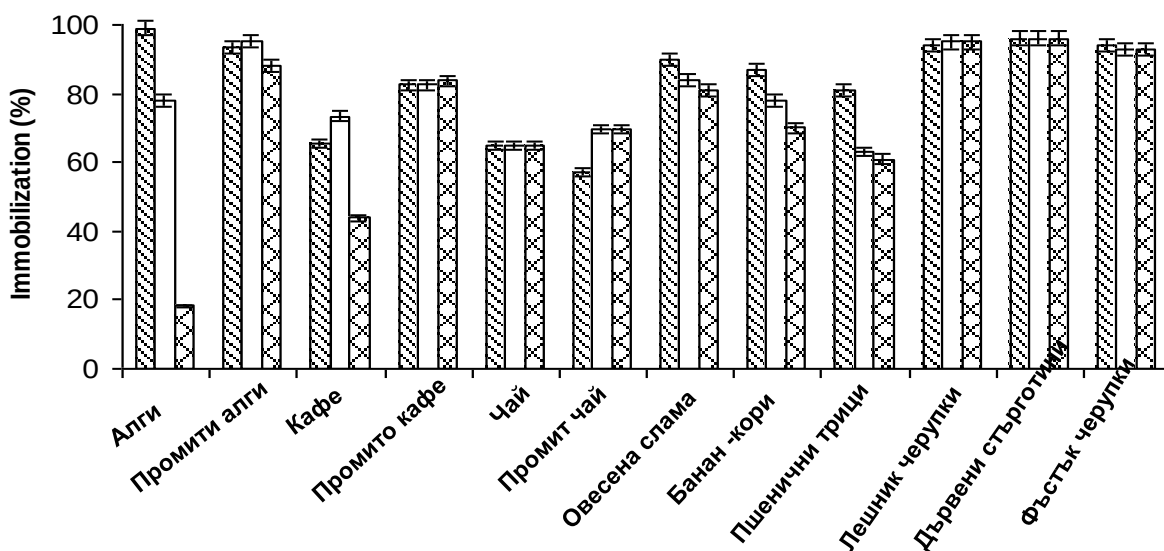
Два от параметрите имаха най-силно влияние върху ефективността на адсорбцията: концентрация на протеин (ензим) и времето на инкубация. Най-голямо количество адсорбиран ултраконцентрат беше получен при носител активен въглен. Имобилизацията на 0.75 мг/мл протеин за 24 ч водят до 86.7% адсорбция върху активен въглен, докато използването на монтморилонит и халоизит осигуряват 78.7 и 62.7% адсорбция. Адсорбцията на ензима се увеличаваше с удължаването на времето на инкубация. Адсорбцията на пречистения ензим беше по-ефективна в сравнение с ултраконцентрата и варираше между 75 и 80%, като стойностите на имобилизирания ензим бяха между 1.0 и 1.65 мг/г протеин. Всички изследвани носители са подходящи, но все пак, халоизитът може да бъде предпочетен като адсорбент на pJCGT8-5, тъй като ензимът попада във вътрешността на материала, за разлика от монтморилонит и активен въглен, които го задържат предимно на повърхността.



Фигура 71. Степен на адсорбция на JCGT8-5 - ултраконцентрат на ЦГТ-аза (А) и пречистена ЦГТ-аза (Б) в магнетизирани наночастици на монтморилонит, халоизит и активен въглен. Първата колонка за всеки носител отговаря на имобилизация за 4 ч, втората – за 18 ч, третата – за 24 ч.

Природните носители бяха използвани с или без предварително промиване с гореща вода. Отпадни продукти като изразходвани смлени кафени зърна и листа от чай и клетките на алгите *Chlorella vulgaris* могат да бъдат

използвани като носители при ензимна имобилизация след ферофлуидна магнитна модификация.



Фигура 72. Степен на адсорбция на JCGT8-5 в магнетизирани природни носители. Първата колонка за всеки носител отговаря на имобилизация за 4 ч, втората – за 18 ч, третата – за 24 ч.

Таблица 18. Продукция на ЦД от ултраконцентрат и пречистен ензим JCGT8-5, имобилизирани върху наночастици след 20 мин реакция на хидролиза на нишесте.

Носител	Време за имобилизация (ч)	Свързан белтък (mg/g)	γ-ЦД (мг/мл)	α-ЦД (мг/мл)	β-ЦД (мг/мл)	Общи ЦД (мг/мл)	Конверсия на нишесте (%)	γ-: α-: β-ЦД (%)
Имобилизиран ултраконцентрат								
Монтморилонит	24	1.13	0.298	0	1.255±0.021	1.553	3.9	19.2:0.0:80.8
Халоизит	24	0.98	1.116	0.044	5.174±0.033	6.334	15.8	17.6:0.7:81.7
Активен въглен	24	1.65	0.391	0	2.045±0.009	2.436	6.1	16.1:0.0:83.9
Имобилизирана пречистена ЦГТ-аза								
Монтморилонит	24	1.14	0.128	0.138	0.619±0.024	0.885	2.2	14.5:15.6:69.9
Халоизит	24	1.10	1.793	0.446	7.830±0.006	10.069	25.2	17.8:4.4:77.8
Активен въглен	24	1.40	0.566	0.350	2.702±0.023	3.618	9.0	15.6:9.7:74.7

Таблица 19. Количество циклодекстрини, образувани от пречистена ЦГТ-аза JCGT8-5 имобилизирана върху магнитно-модифицирани природни носители след 20-минутна реакция на хидролиза на нишесте.

Носител	Време за имобилизация (ч)	Свързан белтък (мг/г)	γ -ЦД (мг/мл)	α -ЦД (мг/мл)	β -ЦД (мг/мл)	Общо ЦДs (мг/мл)	Конверсия нишесте (%)	γ -: α -: β -ЦД (%)
Алги	8	1.16	1.115 $\pm$ 0.009	0.161 $\pm$ 0.005	4.605 $\pm$ 0.080	5.881	14.7	19.0:2.7:78.3
Промити алги	24	1.05	1.579 $\pm$ 0.015	0.076 $\pm$ 0.005	6.506 $\pm$ 0.010	8.161	20.4	19.4:0.9:79.7
Кафе - зърна	8	0.90	1.237 $\pm$ 0.017	0.073 $\pm$ 0.006	4.905 $\pm$ 0.227	6.215	15.5	19.9:1.2:78.9
Промито кафе	24	1.44	1.314 $\pm$ 0.016	0.068 $\pm$ 0.002	4.672 $\pm$ 0.131	6.054	15.1	21.7:1.1:77.2
Чаени листа	18	1.1	1.495 $\pm$ 0.036	0.122 $\pm$ 0.009	6.512 $\pm$ 0.204	8.129	20.3	18.4:1.5:80.1
Чаени листа	24	0.77	1.153 $\pm$ 0.109	0.079 $\pm$ 0.008	5.501 $\pm$ 0.210	6.733	16.83	17.1:1.2:81.7
Варени чаени листа	18	1.04	1.535 $\pm$ 0.028	0.090 $\pm$ 0.008	6.102 $\pm$ 0.162	7.727	19.3	19.9:1.1:79.0
Варени чаени листа	24	0.81	1.210 $\pm$ 0.047	0	5.140 $\pm$ 0.293	6.350	15.9	19.1:0:80.9
Овесена слама	8	2.02	1.081 $\pm$ 0.041	0.060 $\pm$ 0.004	5.347 $\pm$ 0.153	6.488	16.2	16.7:0.9:82.4
Пшенични трици	8	1.21	0.867 $\pm$ 0.043	0	4.442 $\pm$ 0.064	5.309	13.3	16.3:0:83.7
Дървени стърготини	8	1.43	0.902 $\pm$ 0.020	0.038 $\pm$ 0.001	4.238 $\pm$ 0.098	5.178	12.9	17.5:0.7:81.8
Дървени стърготини	18	0.90	1.575 $\pm$ 0.030	0.134 $\pm$ 0.011	6.868 $\pm$ 0.233	8.577	21.4	18.4:1.6:80.1
Лешник - черупки	8	1.26	1.490 $\pm$ 0.023	0.119 $\pm$ 0.004	6.378 $\pm$ 0.017	7.987	19.97	18.6:1.5:79.9
Лешник - черупки	24	2.13	1.309 $\pm$ 0.042	0.047 $\pm$ 0.006	5.497 $\pm$ 0.017	6.853	17.1	19.1:0.7:80.2
Фъстъци - черупки	18	1.11	1.311 $\pm$ 0.029	0	5.135 $\pm$ 0.160	6.446	16.1	20.3:0:79.7
Фъстъци - черупки	24	1.68	1.503 $\pm$ 0.063	0.089 $\pm$ 0.004	6.633 $\pm$ 0.185	8.225	20.6	18.3:1.1:80.6

С трите най-надеждни носители – халоизит, дървени стърготини и промити алги, бяха предприети експерименти за многократна употреба на имобилизираната ЦГТ-аза (Табл. 21) в хода на 6 последователни 20-минутни реакции. След провеждане на всяка реакция магнитният носител, заедно с ензима бе утаяван с помощта на постоянен магнит и беше отново използван.

Таблица 20. Количество циклодекстрини, формирани в хода на многократна употреба на пречистена рекомбинантна ЦГТ-аза JCGT8-5, имобилизирана върху магнитни наночастици от халоизит, промити алги и дървени стърготини. Количеството имобилизиран ензим е близко за различните носители (между 1.1 and 1.4 мг/мл). Всеки от циклите (ензимни реакции) продължи 20 мин

Цикъл №	γ-ЦД (мг/мл)	α-ЦД (мг/мл)	β-ЦД (мг/мл)	Общо ЦД* (мг/мл)	γ-: α-: β-ЦД (%)
Халоизит					
1	1.679±0.031	0.322±0.012	8.022±0.265	10.024	16.7:3.2:80.0
2	1.169±0.025	0.076±0.010	5.169±0.204	6.414	18.2:1.2:80.6
3	0.690±0.016	0	3.066±0.243	3.755	18.4:0:81.6
4	0.587±0.014	0	2.645±0.093	3.232	18.2:0:81.8
5	0.534±0.012	0	2.349±0.074	2.883	18.5:0:81.5
6	0.515±0.014	0	2.215±0.081	2.730	18.9:0:81.1
Общо ЦД	5.175	0.399	23.465	29.038	17.8:1.4:80.8
Промити водорасли					
1	1.476±0.045	0.032±0.012	7.258±0.273	8.765	16.8:0.4:82.8
2	1.429±0.062	0.026±0.011	6.908±0.228	8.363	17.1:0.3:82.6
3	1.155±0.038	0	5.607±0.209	6.762	17.1:0:82.9
4	0.867±0.018	0	4.207±0.206	5.074	17.1:0:82.9
5	0.658±0.021	0	3.185±0.185	3.842	17.1:0:82.9
6	0.541±0.014	0	2.535±0.098	3.076	17.6:0:82.4
Общо ЦД	6.126	0.058	29.698	35.882	17.1:0.1:82.8
Дървени стърготини					
1	1.451±0.061	0	6.884±0.238	8.335	17.4:0:82.6
2	1.281±0.042	0	5.923±0.203	7.204	17.8:0:82.2
3	0.901±0.026	0	4.343±0.194	5.243	17.2:0:82.8
4	0.650±0.019	0	3.030±0.171	3.680	17.7:0:82.3
5	0.444±0.016	0	2.134±0.183	2.579	17.2:0:82.8
6	0.358±0.012	0	1.720±0.075	2.077	17.2:0:82.8
Общо ЦД	5.084	0	24.034	29.118	17.5:0:82.5

При втората реакция общото съдържание на ЦД бе между 86.4% и 95.4% спрямо първата, а в следващите цикли количествата на формираните

ЦД постепенно намаля. Биокатализаторът промити водорасли поддържа най-високо ниво на произведените ЦД в сравнение с другите два използвани носителя. Като сума, след 120 мин продължителност на процеса (шести цикъл), ЦГТ-азата имобилизирана върху промити алги, образува 35.882 мг/мл ЦД, докато ензимът, адхезиран върху дървени стърготини и халоизит, продуцира 29 мг/мл. ЦД съответно. Трябва да се отбележи, че по време на втория цикъл на реакцията на ЦГТ-аза върху промити алги, бяха образувани изключително ниски количества на α -ЦД (0.027-0.078 мг/мл, съответстващи на 0.3 – 1.2%), или дори не бяха образувани. В следващите цикли бяха образувани само γ - и β -ЦД.

Таблица 21. Сравнение на формираните ЦД под действието на природния ензим на *B. pseudocaliphilus* 8SB, свободния рекомбинантен ензим JCGT8-5 и имобилизираните в магнитни наночастици ензими.

Проба	Общо ЦД (мг/мл)	Хидролиза нишесте (време)	γ -: α -: β -ЦД (%)
Природна ЦГТ-аза (<i>B. pseudocaliphilus</i> 8SB)	20.3	24 ч	18.4:0.0:81.6
Свободна рекомбинантна ЦГТ-аза JCGT8-5	12.2	2 ч	21.8:1.3:76.9
JCGT8-5 имобилизирана в халоизит (6 цикъла)	29.0	6 x 20 мин	17.8:1.4:80.8
JCGT8-5 имобилизирана в дървени стърготини (6 цикъла)	29.1	6 x 20 мин	17.5:0.0:82.5
JCGT8-5 имобилизирана в промити алги (6 цикъла)	35.9	6 x 20 мин	17.1:0.1:82.8

Резултатите от повторната употреба на ЦГТ-азен магнитен биокатализатор показват възможността за получаване на три до четири пъти по-голямо количество ЦД за 120 мин в сравнение с добива на еднократно използваните ензимни препарати. Сравнение на получените количества ЦД от природния ензим на *B. pseudocaliphilus* 8SB, свободния рекомбинантен ензим JCGT8-5 и имобилизираните биокатализатори е

представено на Табл. 21. Най-голямо количество формирани ЦД бяха получени под действието на пречистена рекомбинантна ЦГТ-аза, имобилизирана върху магнитно-модифицирани промити алги. Използването на този биокатализатор доведе до получаването на 36 мг/мл общо количество ЦД за 120 мин, при отсъствие на образувани α -ЦД. Като природен носител, тези магнитно модифицираните клетки на алги са желани и много обещаващи. Освен голямата им повърхност, подвижност и добър масопренос, те притежават отлична екологична съвместимост. Разработеният метод за имобилизация може да бъде отнесен към подходите на „зелената химия“ (Netto et al., 2013; Pospiskova et al., 2013). Поради своите възможности имобилизираната ЦГТ-аза може да има промишлено приложение.

2.2. Изолиране на бактериални продуценти на ензими, разграждащи целулоза и хемицелулоза

Биотехнологичният сектор е с първостепенна важност в развитието на кръговата икономика. В момента в страните от ЕС са актуални т. нар. "бели биотехнологии" - алтернативно биотехнологично производство на ценни химикали и горива, които понастоящем се произвеждат само чрез химичен синтез на базата на нефт и нефтени деривати (Frazzetto, 2003). За повишаване на конкурентноспособността на биотехнологиите, на първо място се налага търсенето и използването на евтини, възобновяеми, широко разпространени и лесно достъпни субстрати. При всички процеси свързани с конверсия на биомаса, цената на използвания субстрат е главният фактор определящ себестойността на продукта (Willke & Vorlop, 2007).

Мелничарската и хлебна индустрии, както и селското стопанство се нуждаят от сериозна валоризация на отпадъчни възобновяеми суровини. Целулозата е най-разпространеният биополимер в природата, съставени от линейно свързани β -D-глюкозни остатъци. Хемицелулозите са разклонени полизахариди с „гръбнак“, съставен от β -(1-4)-свързани β -D-пиранозни остатъци с O-4 разклонения от глюकोзни, манозни, ксилозни, арабинозни и др. остатъци. Най-често срещаните хемицелулози са ксилотглюкан, глюкуроноксиан, арабиноксиан и глюкоманан.

Полизахаридите се съдържат в огромни количества в растенията и представляват неограничен източник на възобновяем природен субстрат. Смилането на пшенични зърна води до получаването на три основни фракции: трици (богат източник на целулоза, лигноцелулози и фибри), зародиш (с високо съдържание на нишесте и мазнини) и ендосперм - с високо съдържание на протеини и въглехидрати (El Mekawy et al., 2013). Първите две фракции се считат за копродукти на процеса на смилане, а

белите брашна включват само ендосперма (нишесте). Следователно, триците и зародишите, богат източник на хемицелулоза и въглехидрати, са зърнени отпадъци, потенциално подходящи за производство на ферментативни продукти (Liguori et al., 2016).

Поради ниската си цена и широкото разпространение, лигноцелулозната биомаса се разглежда като възможно най-перспективния субстрат. Бактериални щамове, които притежават гликозид-хидролази, способни да деградира целулоза и хемицелулоза, съчетани с конверсията на тези полизахариди в ценни продукти и горива са търсени и към тях има особено повишен интерес.

2.2.1. Изолране и идентификация на щамове от род *Bacillus*

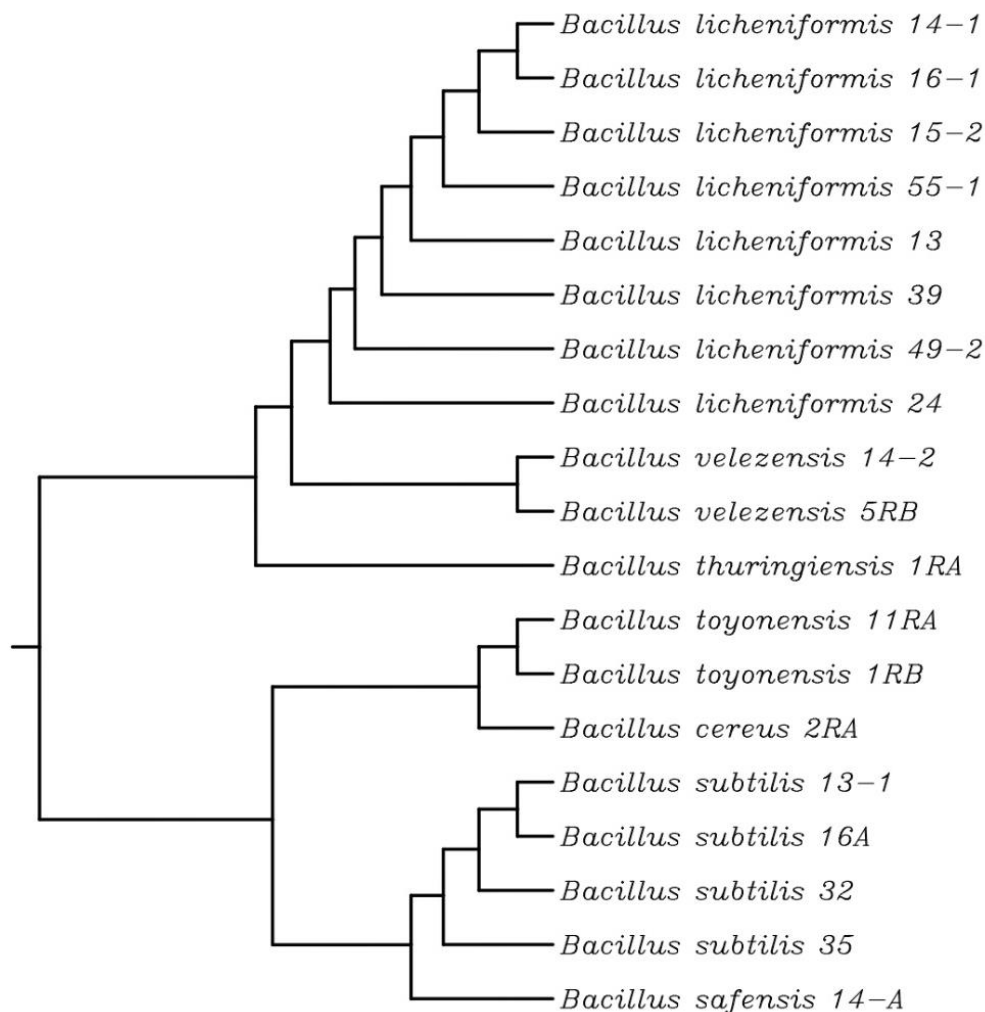
С цел селекция на щамове-продуценти на целевите ензими се насочихме към създаването на микробна колекция от природни изолати *Bacillus*, известни с възможностите за биосинтеза на широк спектър от гликозид-хидролазни ензими.

Бяха взети проби от различни източници: почва, ризосферна зона на царевица, езерни утайки, гнили пера, гнили зърнени отпадъци, утайки от минерални басейни, както и от кисело мляко, което е известен източник на *B. licheniformis* като замърсител. Бяха селектирани 57 нови щама Грам (+), пръчковидни, каталазо-положителни бактерии, с морфология на колонии, типична за видовете, принадлежащи към род *Bacillus*.

Родът *Bacillus* днес се състои от 288 вида и поради напредъка в методите за геномното секвениране непрекъснато се регистрират нови видове. За определяне на видовата принадлежност на някои от новоизолираните щамове секвенцията на 16S рибозомалния ген не е достатъчен таксономичен белег, тъй като тези секвенции за някои видове са 100% еднакви. Такива щамове бяха: 1RA, 1RB, 2RA, 11RA, 14-2, 15-2 и др. Анализите за усвояване на 40 различни захари, включени в теста API подпомогнаха видовата им идентификация.

Бацилната таксономия е една от най-сложните и проблематични сред бактериалните класификации в момента. Сред идентифицираните бацилни видове, най-много принадлежаха към групата на *B. subtilis*, която се състои от видовете *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* и *B. amyloliquefaciens*. Днес тази група непрекъснато се попълва с нови представители поради рекласификация на наскоро откритите видове въз основа на генетично родство между техните пълни геноми. Например, след дълги спорове за тяхното родство (Dunlap et al., 2016), за част от вида *B. velezensis* („хетеротипични синоними“) вече са определени *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (Borriss et al., 2011), *B. methylophilus* (Madhaiyan et al., 2010), *B. siamensis* и *B. oryzae* (Chung et al., 2015). Все пак, според някои автори, по-близките

помежду им *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. velezensis* и *B. siamensis* е редно да бъдат обединени в т.нар. оперативна група на *B. amyloliquefaciens* в рамките на „комплекса“ на *B. subtilis* (Fan et al., 2017).



Фигура 73. Филогенетично дърво на част от изолатите, изградено на базата на секвенцията на 16S рРНК ген. Секвенциите са депозирани в Ген-банката на NCBI под номера MK461932-MK461950.

Българският изолат *B. velezensis* 5RB бе причислен към вида едва след пълно геномно секвениране и *in silico* анализ на степента на ДНК-ДНК хибридизация с пълни геноми на всеки един от изброените видове. Някои от новооткритите видове бацили са нови за нашата страна и с нетипично местообитание. Например, *B. safensis* досега е бил изолиран от космическия кораб Одисей (Satomi et al., 2006) и от солена пустиня в Гуджарат (Kothari et al., 2013), а в България е обикновен обитател на Софийската пречиствателна

станция. *B. toyonensis* е изолиран от TOYOCERIN® - микробен препарат, хранителна добавка за животни. Оригинално е определен като *B. cereus*, а през 2013 година е рекласифициран като нов вид на базата на ниската степен на ДНК хомология с всички останали. Днес бива изтъкван като един от пробиотичните видове бацили (Roos et al., 2017; Pan et al., 2019).

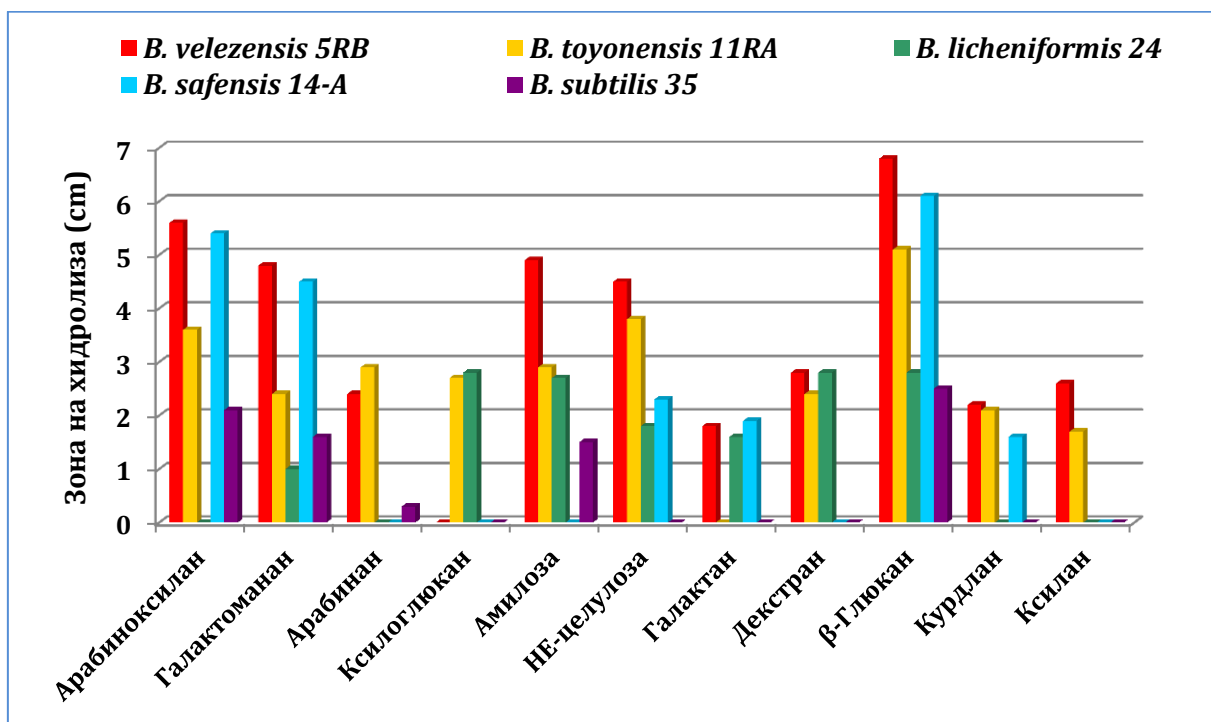
Пет от новоизолираните щамове *B. licheniformis*, са открити в проби домашно кисело мляко. Все повече автори откриват пробиотични качества в този вид, а се налага и употребата на някои щамове *B. licheniformis* като хранителна добавка за животни поради продукцията на извънклетъчни ензими, които подобряват храносмилането и адсорбцията на вещества (Latorre et al., 2016; Jeong et al., 2017; Niu et al., 2019). В състава на лигноцелулозата участват захари като целобиоза, галактоза, ксилоза, арабиноза, маноза, и рафиноза. Способността на щамове-продуценти на ензими да усвояват тези захари предполага успешното усвояване на лигноцелулозни отпадъци и тяхната конверсия.

2.2.2. Анализ на гликозид-хидролазни ензимни активности на новоизолираните щамове от род *Bacillus*

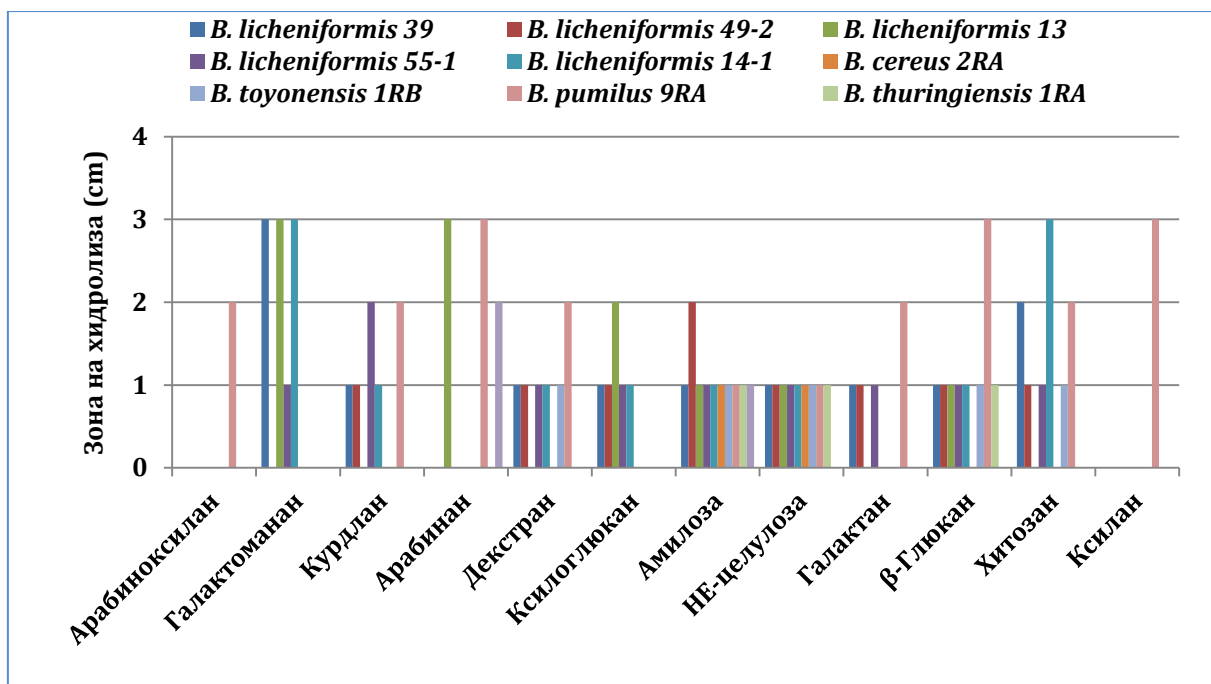
Способността на щамове да продуцират извънклетъчни ензими с гликозид-хидролазна активност, които да имат отношение към разграждането на лигноцелулозни субстрати бе извършено, като в твърда среда Nutrient broth бяха добавени 0.1% AZCL - *Azurine cross-linked* субстрати (Megazyme). Това са въглехидрати, конюгирани с цветното съединение азурин. При разграждането им в средата, в момента на разкъсване на веригите на съответния въглехидрат, азуриновата боя се освобождава и това води до появата на син ореол около ямката, индикатор за положителен сигнал за съответната гликозид-хидролазна ензимна активност. Изследвана бе проявата на 12 различни хидролазни активности. Целулазната активност бе доказана по два метода: 1) чрез обезцветяване на хранителна среда, съдържаща 0.01% Карбоксиметил целулоза (СМС) и оцветена с Конго-червено, и 2) измерване на зони, образувани от безклетъчни културални супернатанти в резултат на хидролизата на азурин-свързана хидроксиетил-целулоза (AZCL-HE-Cellulose, Megazyme). Целулазна активност проявиха 17 щамове, от които два бяха от колекцията на Институт Пастьор - Париж: *B. subtilis* BRB1 и *B. thuringiensis* Thompson и 15 бяха новоизолирани: *B. licheniformis* 13, *B. licheniformis* 14-1, *B. licheniformis* 24, *B. licheniformis* 39, *B. licheniformis* 49-2, *B. licheniformis* 55-1, *B. thuringiensis* 1RA, *B. cereus* 2RA, *B. velezensis* 5RB, *Bacillus toyonensis* 11RA, *B. subtilis* 18, *B. subtilis* 22, *B. subtilis* 32, *B. subtilis* 35, *B. subtilis* 47.

Таблица 22. Усвояване на захари в състава на лигноцелулозата, глицерол и инулин от новоизолирани щамове *Bacillus*. Анализът е проведен в 96-ямкови плаки, в среда NB, с добавено багрило бромкрезол лилаво.

Щам	(D+) Целобиоза	(D+) Рафиноза	(D+) Ксилоза	(L+) Арабиноза	(D+) Галактоза	(D+) Маноза	(D+) Малтоза	Глицерол	Инулин
<i>B. velezensis</i> 5RB	++	+	+	+	+	+	+	+	++
<i>B. toyonensis</i> 11RA	++	+	+	+	+	+	+	+	++
<i>B. licheniformis</i> 13	+	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>B. licheniformis</i> 14-1	+	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>B. safensis</i> 14A	+	+	+	+	+	+	+	+	++
<i>B. licheniformis</i> 16-1	+	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>B. licheniformis</i> 24	+	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>B. licheniformis</i> 39	+	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>B. licheniformis</i> 49-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. licheniformis</i> 55-1	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>B. thuringiensis</i> 1RA	+	+	+	++	+	+	+	+	++
<i>B. toyonensis</i> 1RB	+	+	+	+	+	+	+	+	++
<i>B. subtilis</i> 32	+	+	-	+/-	-	+	+	+	-
<i>B. subtilis</i> 35	+	+	-	+/-	-	+	+	+	-



Фигура 74. Сравнение на големината на образуваните зони на хидролиза на азурин-свързани субстрати (AZCL субстрати, Megazyme) от безклетъчни супернатанти (50 мкл) на съответния щам.



Фигура 75. Сравнение на големината на образуваните зони на хидролиза на азурин-свързани субстрати (AZCL субстрати, Megazyme) от безклетъчни супернатанти (50 мкл) на съответния щам.

В научната литература има съобщения за представители на род *Bacillus*, които могат да разграждат различни видове лигноцелулозни

субстрати, включително лигнин (Bandounas et al., 2011; Huang et al., 2013; Zhu et al., 2014) целулоза и хемицелулоза (Khelil et al., 2016; Gong et al., 2017b).

Някои от новоизолираните от нас щамове показаха ензимни активности, които им позволяват да разграждат хемицелулозни субстрати. Най-често срещаните полизахариди в хемицелулозата са арабиноксилан, галактоманан, разклонен арабинан, ксилоглюкан, глюкуроноксилан и ксилан, затова като най-перспективни за бъдещи изследвания бяха определени *B. velezensis* 5RB, *B. safensis* 14A, *B. toyonensis* 11RA, както и представителите на *B. licheniformis*. Изследванията на техните геноми би осигурило повече информация за разграждане на лигноцелулоза, данни за което досега няма (Gong et al., 2017a).

2.2.3. Секвениране на генома на *Bacillus velezensis* 5RB

Тъй като *B. velezensis* 5RB бе определен като един от най-перспективните продуценти на извънклетъчни гликозид-хидролази и проявява ензимни активности, които му позволяват да усвоява захарите, влизащи в състава на лигноцелулозата, подложихме генома му на пълно секвениране.

Геномното секвениране обхваща следните етапи: изолиране на тотална ДНК, създаване на геномна библиотека чрез фрагментиране на ДНК и присъединяване на адаптери към фрагментите от ДНК (тагментиране), секвениране на геномната библиотека, качествен контрол на суровите данни, *De novo* асемблиране, анотация на получените секвенции.

Изолираната ДНК на щамата бе 5134.5 ng (5.1 µg) и с чистота $\lambda 260/\lambda 280=1.71$. Геномната библиотека TruSeq DNA Library prep съдържаше инсерти от по 350 bp. Прочетеният брой бази бе 43,639,513,900, които с помощта на софтуера SOAP denovo 2 бяха разделени на 26 контига с обща дължина 3,910,395 bp, което представлява 134,22% покритие на генома. Съдържанието на базите G и C е 46,5%.

Анализът на генома показва, че той съдържа 4 605 гена, като 3 745 от тях кодират протеини, 81 - tРНК и 8 - рРНК. Щам 5RB принадлежи към групата на *Bacillus amyloliquefaciens* и показва 99% сходство с генома на щам, изолиран наскоро от соя *B. velezensis* YJ11-1-4 (NZ_CP020874, Lee et al., 2017).

In silico ДНК-ДНК хибридизацията (DDH) бе извършена със софтуер на немската банка за микроорганизми DSMZ, (Meier-Kolthoff et al., 2013). Резултатите показаха 90.20% сходство с генома на *B. velezensis* FZB42 (GenBank CP000560, Fan et al., 2017) и относително по-ниска DDH от 85.7% с тази на типовия щам NRRL B-41580 (LLZC000000000), изолиран през 2005 г. от водите на река Велез, Испания (Ruiz-Garcia et al., 2005). В наличните няколко пълни генома на щамове *B. velezensis* има данни за гени, кодиращи ензими, свързани с разграждането на лигноцелулозите

(Chen et al., 2009; Onilude et al., 2013; He et al. 2013; Niazi et al., 2014; Chen, 2017; Kim et al. 2017a,б; Liu et al. 2017). Някои от тях са типични за свързаните с растенията ризобактериални геноми (He et al., 2013; Dunlap et al., 2016; Gao et al., 2018).

Анализът на генома на *B. velezensis* 5RB разкри, голяма част от гените са отговорни за въглехидратния метаболизъм (225 гена). Открити са гени за амилаза - *amyE*, олиго-глюкозидаза - *malL*, инвертаза - *sacA*, четири гена за различни ксиланази - *xynA*, *xynB*, *xynD*, *xynC* и ген за ендоцелулаза *eglS*. Този богат ензимен спектър потвърди възможностите на щам за разграждането нишесте, инулин и множество гени, свързани с хидролизата и модификацията на полизахариди от състава на хемицелулозата (Табл. 23).

Таблица 23. Ензими, кодирани от гени на *B. velezensis* 5RB, свързани с хидролиза и модификации на целулоза и въглехидрати в състава на хемицелулозата

ЕС №	Ензим	CAZy семейство
Ензими, свързани с конверсията на целулозата		
3.2.1.4	ендо-1,4-β-глюканаза	GH5
ЕС 3.2.1.-	глюкан ендо-1,6-β-глюкозидаза	GH30
3.2.1.86	6-фосфо-β-глюкозидаза	GH4
3.2.1.-	6-фосфо-α-глюкозидаза	GH4
3.2.1.85	6-фосфо-β-галактозидаза	GH1
3.2.1.-	β-глюканаза	GH16
2.4.1.-	захарозо-6-фосфат хидролаза	GH32
3.2.1.65	леваназа	GH32
3.2.1.20	α-глюкозидаза	GH13
Ензими, свързани с конверсията на хемицелулозата		
3.2.1.8	ендо-1,4-β-ксиланаза	GH11
2.1.78	β-манозидаза	GH26
3.2.1.-	арабинан ендо-1,5-α-L-арабинозидаза	GH43
3.2.1.-	арабиноксилан арабинофуранохидролаза	GH43
3.2.1.37	1,4-β-ксилозидаза	GH43
3.2.1.55	α-N-арабинофуранозидаза	GH51
3.2.1.-	глюкуроноксиланаза	GH30
3.2.1.89	арабиногалактан ендо-1,4-β-галактозидаза	GH53

Гените, кодиращи ензими, способни да разграждат лигноцелулозата, са открити и в други щамове *B. velezensis* (Chen et al., 2018б). Ендоглюканазите (ЕС 3.2.1.4) при *Bacillus* принадлежат по своята структура към GH5 семейството (Pandey et al., 2014). Освен ендоглюканазата, кодирана от гена *eglS*, в генома на щам 5RB открихме и ензим глюкан ендо-1,6-β-глюкозидаза (GH30), и β-глюкозидаза, принадлежаща към GH1-семейството на CAZy по своята структура. Присъствието на последния ензим в генома е особено важно, тъй като той хидролизира целобиозата. Други ензими в генома с възможности да

разграждат целулозата са от семейството GH4: 6-фосфо- β -глюкозидаза, 6-фосфо- α -глюкозидаза), 6-фосфо- β -галактозидаза (GH1) и β -глюканаза (GH16). Важен ензим, отговорен за хидролизата на хемицелулозни субстрати е енд-1,4- β -ксиланазата (GH11, EC 3.2.1.8) - ключов ензим, катализиращ хидролизата на β -1,4-ксилозидни връзки в ксилана и в късите ксилоолиго-захариди (Bai et al., 2015).

В генома на щам 5RB присъстват и два гена, кодиращи „ксилазнази“ ензими от семейство GH43 (арабинан-енд-1,5- α -L-арабинозидаза и арабиноксилан арабино-фуранохидролаза), един от семейство GH51 (α -N-арабинофуранозидаза) и един GH30 (глюкуроноксиланаза).

Възможностите за разграждане на растителна биомаса са потвърдени от присъствието на гени, кодиращи леваназа, захарозо-6-фосфат хидролаза, арабиногалактан енд-1,4- β -галактозидаза, която хидролизира (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-галактозидни връзки при арабиногалактани (Vanholme et al., 2009), както и β -манозидаза от GH26 семейството, която хидролизира крайната маноза на мананови полизахариди (Onilude et al. 2013).

Синтезът на вторични метаболити бе анализиран чрез софтуера anti SMASH v4.2.0 (Weber et al., 2015). Геномът съдържа 29 клъстера, кодиращи антимикробни вещества, от които седем съдържат пълните оперони, свързани с продуциране на антибиотици. Три клъстера кодират синтеза на поликетидите макролактин, бацилаен и дифицидин, четири кодират нерибозомален синтез на фенгицин, бацилбактин и бацилизин, а един клъстер кодира синтеза на цикличния липо-пептиден антибиотик сърфактин. Синтезът на вещества с антибиотичен характер би позволил прилагането на щама в промишлеността за провеждане на микробни ферментации в нестерилни условия.

Интересът към използването на *B. velezensis* като биопестицид в растителната защита е голям, тъй като щамовете от вида са способни да засилват развитието на растенията и да генерират вторични метаболити, които потискат пролиферацията на патогенни микроорганизми (Molinatto et al., 2016; Jin et al. 2017; Chen et al., 2018a; Kim et al., 2017a; Pan et al., 2017; Belbahri et al., 2017).

Поради разнообразните му метаболитни възможности, *B. velezensis* е вид с огромен потенциал за нови приложения в биотехнологиите. Задълбоченият анализ на генома на щам 5RB доведе до изясняване на потенциала за разграждане на компонентите на лигноцелулозата и възможностите за конверсия на растителна биомаса до ценни продукти.

3. Молекулярно-биологични изследвания на гликозид-хидролазни ензими със субстрат сиалова киселина (CAZy GH33)

Значението на неураминидазите (сиалидазите) за човека е на първо място като фактори на вирулентност при някои вируси (грип) и редица патогенни бактерии (*Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* и др. (Vimr, 2013). Повечето производители на неураминидаза са силно патогенни, а *V. cholerae* е един от най-утвърдените промишлени продуценти на този ензим (*V. cholerae* neuraminidase, VCNA, Zhao et al., 2019).

V. cholerae е грам-отрицателна факултативно анаеробна бактерия, която най-често се среща в различни водни среди. Серотиповете O1 и O139, които произвеждат холерен токсин причиняват епидемии от холера (Singh et al., 2001). Щамове на всички останали над 200 серотипа причинят ограничени огнища на холероподобни заболявания в по-лека форма и са известни като *V. cholerae* non-O1/non-O139. Ензимът действа синергично с холерния токсин, катализирайки разграждане на ганглиозиди от по-висок порядък до моносиало-ганглиозид (GM1), който е рецепторът за холерния токсин *in vivo* (Kaper et al., 1995).

Токсигенните вибриони са силно патогенни организми, които причиняват остра чревна инфекция, водеща до дехидратация и смърт, ако не се лекува адекватно. Повече от 2000 смъртни случая от холера са докладвани на Световната здравна организация само за 2013 г., а независимо от превенцията за 2018 г. са регистрирани 4 милиона случая на болни от холера в света. Пречистените препарати от бактериални и вирусни неураминидази са широко използвани в биохимичните и медицински изследвания. Те се използват при определяне на гликановата структура и при идентифицирането на вирусни рецепторни структури на клетъчни повърхности (Estrella et al., 2009). Метод за лечение на широк диапазон от туморни заболявания чрез приемане на разтвори на неураминидаза под различни форми е патентован през 2010 г. (Kline, 2010).

През последните години се разработват различни подходи за увеличаване на сиаловото съдържание на рекомбинантни гликопротеини. Един от тях е ензимното сиалилиране от сиалилтрансфериози или неураминидази, които притежават транс-сиалидазна активност. Друго приложение на неураминидази е в процеси за получаване на хомогенни сиалови съединения (Kim et al., 2011). Трето, тези ензими се използват във фармацевтичната индустрия при производството на важни терапевтични протеини, чиято ефикасност *in vivo* се повишава чрез гликозилиране, напр., лекарствени продукти като Ovidrel® (за лечение на безплодие при жени), Pulmozyme® (срещу муковисцидоза), Xigris® (за лечение на остър сепсис) и много други лекарства (Solá & Griebenow, 2010).

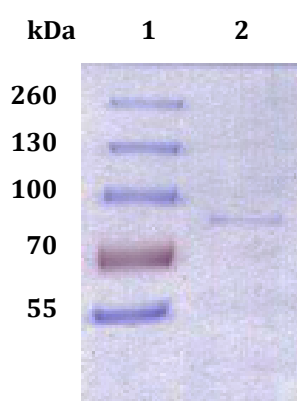
Неураминидазата от токсигенните щамове *V. cholerae* O1 е добре проучена и характеризирана и се предлага като търговски продукт от няколко компании. Трябва да се отбележи, че за разлика от другите търговски продукти на неураминидаза, VCNA не е рекомбинантна и тези препарати винаги се основават на употребата на токсигенни вибриони, което определено носи риск за здравето на участниците в производството.

Единствената алтернатива е прилагането на непатогенни щамове, но до настоящото изследване в света нямаше налична добре охарактеризирана неураминидаза от нетоксигенен щам *V. cholerae* и метод за ензимното пречистване. Българският нетоксигенен изолат *V. cholerae* non-O1/13 (Eneva et al., 2011) бе избран като най-подходящ за такива изследвания. Пълното секвениране на геном на non-O1 щам *V. cholerae* PS15 разкри, че някои non-O1 изолати са загубили т. нар. „остров на патогенност“ VPI-2 (с големина 57 kb), открит във всички токсигенни щамове на *V. cholerae*, но са запазили интактен гена *nanH*, кодиращ неураминидаза (Kumar et al., 2013).

Ензимът неураминидаза на *V. cholerae* non-O1/13 бе извънклетъчен и бе изолиран след оптимизирана процедура на култивиране и индукция (30 ч в среда NB, с добавен индуктор глюкомакропептид (ГМП) с концентрация 0.5%, до получаване на ензим с активност 47 U/мл.

Пречистването на ензима обхващаше следните етапи: преципитация с амониев сулфат, йонообменна хроматография в DEAE целулоза, ултрафилтрация и йонообменна хроматография в колона с Q-Sepharose. Крайната степен на пречистване бе 504 пъти, а пречистената сиалидаза бе с молекулно тегло около 90 kDa (Фиг. 76).

За да бъде осъществено сравнение на гените, кодиращи ензима при българския изолат с тези на токсигенните продуценти, пристъпихме към секвениране на *nanH* на *V. cholerae* non-O1/13, а пълната нуклеотидна секвенция на *nanH* беше депозирана в NCBI Gene Bank, Acc. № KJ875802.



Фигура 76. Визуализиране на пречистена неураминидаза на щам *V. cholerae* non-O1/13 чрез 10% SDS ПААГЕ. 1) Молекулен маркер PAGE Ruler™ Plus protein ladder (Thermo Scientific), 2) пречистен ензим.

```

1      TTATTTTTTTTTCGATCGCAGTTCATGAAGAAAATATTTTTTAATGAGAATCTACAACCTG
61     GAAATGTGAACGTTTCCAAGCCTTACATTCGATGGAGACTTGTCAATCAAGATGACTTCA

121     CAACGAAGAAGAGCATCGATTACACAAGGAAACAGATTCTAATATAAGGGAGTAGAT
                                         (-10)      SD

178     ATGCGTTTCAAAAACGTAAAGAAAACCGCTTTAATGCTTGCTATGTTCCGGTATGGCGACA
      M R F K N V K K T A L M L A M F G M A T

238     AGCTCAAACGCCGCACTTTTGGACTATAACGCAACGGGTGACACTGAGTTTGACAGCCCT
      S S N A A L F D Y N A T G D T E F D S P

(...)

2458    AATATGCGAATTCTTCGTATGCCTATCACATTGCTAAACAGAAGCTGACCTTATCGCAA
      N M R I L R M P I T L L K Q K L T L S Q

2518    AACTAAGAGCAGCTTAACGTGTTAAAGCTGATAGCACATCAAATGA
      N Stop      ρ-independent terminator

```

Фигура 77. Частична нуклеотидна последователност на ген *nanH* на *Vibrio cholerae* non-O1/13.

Лидерният пептид съдържа положително заредени (R, K) и хидрофобни aa (M, V, L, F) и осигурява

успешен транспорт на ензима в периплазмата. Бяха генерирани двойки праймери за консервативни райони в *nanH* и с тях бяха получени PCR амплифицирани фрагменти, които бяха секвенирани. Генът *nanH* е с големина 2346 bp и кодира полипептид от 781 aa, който се състои от сигнален пептид от 24 aa и „зрял“ ензим от 757 aa. *NanH* започва с ATG-старт кодон, преди който се наблюдава типичната (–10) промоторна секвенция TCTAAT, на позиция (–21). Бе идентифициран и сайт за свързване с рибозомата с последователност AGGGAG (Shine–Dalgarno, SD) на позиция (–11), (Фиг. 77). Генът завършва с типичен TAA стоп-кодон и бримковидна структура, предполагаща ρ-независим механизъм на терминация на транскрипцията. Според транслираната aa секвенция на гена, предполагаемата големина на ензима неураминидаза бе 83.0 kDa. По-късни изследвания на колектива доказаха, че ензимът е гликозилиран, което води до разминаване между предположената и действителната молекулна маса. Дължината на протеина NanH, както и наличието на сигнален пептид със сайт за откъсване между остатъците на аланин A23 и A24, бяха идентични с ензима на O1 изолатът *V. cholerae* O395 (Vimr et al., 1988).

На Фиг. 78 в сиво са показани районите с пълна идентичност на сиалидазата NanH, изолирана от *V. cholerae* non-O1 щам 13 и токсигенни щамове *V. cholerae*. Задължителната аргининовата триада на каталитичния център (224, 635, 712) (означена с червени стрелки), както и остатъците глутамат (619), тирозин (740) и глутамат (756), участващи в активния център са запазени и в неураминидазата на нетоксигенния *V. cholerae* non-O1/13. Зрелият пептид съдържа домените, типични за неураминидазите при вида – сиалидазен и два лектинови домена. В сиалидазния домен, освен aa на активния център, се наблюдават типичния RIP мотив и Asp-боксове, четири от които са с последователност Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr/Asn-Trp, а един съдържа Tyr-Asp-Val-Ala-Ser-Gly-Asn-Trp.


```

non01_13 : -----MRFKNVKKTALMLAMFGMATSSNAALFDYNATGDTFEDSPAKQGMQDNTNNGSGVLTNADGMP : 64
01_Amaz : MSIKMTSQRRRASIHKETDSNIKGVDMRFKNVKKTALMLAMFGMATSSNAALFDYNATGDTFEDSPAKQGMQDNTNNGSGVLTNADGMP : 90
0395 : MSIKMTSQRRRASIHKETDSNIKGVDMRFKNVKKTALMLAMFGMATSSNAALFDYNATGDTFEDSPAKQGMQDNTNNGSGVLTNADGMP : 90
IEC224 : -----MRFKNVKKTALMLAMFGMATSSNAALFDYNATGDTFEDSPAKQGMQDNTNNGSGVLTNADGMP : 64
ET_N16961 : MSIKMTSQRRRASIHKETDSNIKGVDMRFKNVKKTALMLAMFGMATSSNAALFDYNATGDTFEDSPAKQGMQDNTNNGSGVLTNADGMP : 90

----->
non01_13 : AWLVQGNNGGRAQWTYSLSTNQHAQASSFGWRMTTEMKVLSSGGMITNYANGTQRVLP IISLDSSGNLVVEFEGQTGRITLATGTAATEYH : 154
01_Amaz : AWLVQGNNGGRAQWTYSLSTNQHAQASSFGWRMTTEMKVLSSGGMITNYANGTQRVLP IISLDSSGNLVVEFEGQTGRITLATGTAATEYH : 180
0395 : AWLVQGNNGGRAQWTYSLSTNQHAQASSFGWRMTTEMKVLSSGGMITNYANGTQRVLP IISLDSSGNLVVEFEGQTGRITLATGTAATEYH : 180
IEC224 : AWLVQGNNGGRAQWTYSLSTNQHAQASSFGWRMTTEMKVLSSGGMITNYANGTQRVLP IISLDSSGNLVVEFEGQTGRITLATGTAATEYH : 154
ET_N16961 : AWLVQGNNGGRAQWTYSLSTNQHAQASSFGWRMTTEMKVLSSGGMITNYANGTQRVLP IISLDSSGNLVVEFEGQTGRITLATGTAATEYH : 180

<-----
<----->
non01_13 : KFELVFLPGSNPSASFYFDGKLIRDNIQPTASKQNMIVWNGSSNTDGVAAAYRDIKFEIQGDVIFRGP IIPISIVASSVTPGVVTAFAEK : 244
01_Amaz : KFELVFLPGSNPSASFYFDGKLIRDNIQPTASKQNMIVWNGSSNTDGVAAAYRDIKFEIQGDVIFRGP IIPISIVASSVTPGVVTAFAEK : 270
0395 : KFELVFLPGSNPSASFYFDGKLIRDNIQPTASKQNMIVWNGSSNTDGVAAAYRDIKFEIQGDVIFRGP IIPISIVASSVTPGVVTAFAEK : 270
IEC224 : KFELVFLPGSNPSASFYFDGKLIRDNIQPTASKQNMIVWNGSSNTDGVAAAYRDIKFEIQGDVIFRGP IIPISIVASSVTPGVVTAFAEK : 244
ET_N16961 : KFELVFLPGSNPSASFYFDGKLIRDNIQPTASKQNMIVWNGSSNTDGVAAAYRDIKFEIQGDVIFRGP IIPISIVASSVTPGVVTAFAEK : 270

<----->
non01_13 : RVGGGDPGALSNTNDIITR SRDGGITW TELNLTEQINVSDEFDFSDPRPIYDPSTNTVLVSYARWPTDAAQNGRIKPMWPNNGIFYSV : 334
01_Amaz : RVGGGDPGALSNTNDIITR SRDGGITW TELNLTEQINVSDEFDFSDPRPIYDPSTNTVLVSYARWPTDAAQNGRIKPMWPNNGIFYSV : 360
0395 : RVGGGDPGALSNTNDIITR SRDGGITW TELNLTEQINVSDEFDFSDPRPIYDPSTNTVLVSYARWPTDAAQNGRIKPMWPNNGIFYSV : 360
IEC224 : RVGGGDPGALSNTNDIITR SRDGGITW TELNLTEQINVSDEFDFSDPRPIYDPSTNTVLVSYARWPTDAAQNGRIKPMWPNNGIFYSV : 334
ET_N16961 : RVGGGDPGALSNTNDIITR SRDGGITW TELNLTEQINVSDEFDFSDPRPIYDPSTNTVLVSYARWPTDAAQNGRIKPMWPNNGIFYSV : 360

<----->
non01_13 : YDVASGNWAPIDVTDQVKERSFQIAGWGGSELYRRNTNLNSQQDQWQSNAKIRIVDGAANQIQVADGGRKYVFTLSIDESGSLVANLNGV : 424
01_Amaz : YDVASGNWAPIDVTDQVKERSFQIAGWGGSELYRRNTNLNSQQDQWQSNAKIRIVDGAANQIQVADGGRKYVFTLSIDESGSLVANLNGV : 450
0395 : YDVASGNWAPIDVTDQVKERSFQIAGWGGSELYRRNTNLNSQQDQWQSNAKIRIVDGAANQIQVADGGRKYVFTLSIDESGSLVANLNGV : 450
IEC224 : YDVASGNWAPIDVTDQVKERSFQIAGWGGSELYRRNTNLNSQQDQWQSNAKIRIVDGAANQIQVADGGRKYVFTLSIDESGSLVANLNGV : 424
ET_N16961 : YDVASGNWAPIDVTDQVKERSFQIAGWGGSELYRRNTNLNSQQDQWQSNAKIRIVDGAANQIQVADGGRKYVFTLSIDESGSLVANLNGV : 450

<----->
non01_13 : SDPIILQSERAKVHSFHDYELQYSALNRSTTLFVDGQAITTWTEGEVSGENNIQFGNADAQIDGRHLVQNIALTQQQGNLVEFDAFYLAQQ : 514
01_Amaz : SDPIILQSERAKVHSFHDYELQYSALNRSTTLFVDGQAITTWTEGEVSGENNIQFGNADAQIDGRHLVQNIALTQQQGNLVEFDAFYLAQQ : 540
0395 : SDPIILQSEHAKVHSFHDYELQYSALNHTTLFVDGQAITTWTEGEVSGENNIQFGNADAQIDGRHLVQNIALTQQQGNLVEFDAFYLAQQ : 540
IEC224 : SDPIILQSEHAKVHSFHDYELQYSALNHTTLFVDGQAITTWTEGEVSGENNIQFGNADAQIDGRHLVQNIALTQQQGNLVEFDAFYLAQQ : 514
ET_N16961 : SDPIILQSEHAKVHSFHDYELQYSALNHTTLFVDGQAITTWTEGEVSGENNIQFGNADAQIDGRHLVQNIALTQQQGNLVEFDAFYLAQQ : 540

<----->
non01_13 : TPEVEKDEKLGWTKIKTGNTMSLYGNASVNP GP GHGITLTRQQNISGSQNGRLIYPAIVLDRFFLNVMSI SDDGGSNWTGSTLPIPF : 604
01_Amaz : TPEVEKDEKLGWTKIKTGNTMSLYGNASVNP GP GHGITLTRQQNISGSQNGRLIYPAIVLDRFFLNVMSI SDDGGSNWTGSTLPIPF : 630
0395 : TPEVEKDEKLGWTKIKTGNTMSLYGNASVNP GP GHGITLTRQQNISGSQNGRLIYPAIVLDRFFLNVMSI SDDGGSNWTGSTLPIPF : 630
IEC224 : TPEVEKDEKLGWTKIKTGNTMSLYGNASVNP GP GHGITLTRQQNISGSQNGRLIYPAIVLDRFFLNVMSI SDDGGSNWTGSTLPIPF : 604
ET_N16961 : TPEVEKDEKLGWTKIKTGNTMSLYGNASVNP GP GHGITLTRQQNISGSQNGRLIYPAIVLDRFFLNVMSI SDDGGSNWTGSTLPIPF : 630

↓ ↓
non01_13 : RWKSSSILETLEPSEADMVELQNGDLLLTARLDNFQIVNGVNSPRQQFLSKDGGITW LLEANNANVFSNISTGTVDASITRFEQSDGS : 694
01_Amaz : RWKSSSILETLEPSEADMVELQNGDLLLTARLDNFQIVNGVNSPRQQFLSKDGGITW LLEANNANVFSNISTGTVDASITRFEQSDGS : 720
0395 : RWKSSSILETLEPSEADMVELQNGDLLLTARLDNFQIVNGVNSPRQQFLSKDGGITW LLEANNANVFSNISTGTVDASITRFEQSDGS : 720
IEC224 : RWKSSSILETLEPSEADMVELQNGDLLLTARLDNFQIVNGVNSPRQQFLSKDGGITW LLEANNANVFSNISTGTVDASITRFEQSDGS : 694
ET_N16961 : RWKSSSILETLEPSEADMVELQNGDLLLTARLDNFQIVNGVNSPRQQFLSKDGGITW LLEANNANVFSNISTGTVDASITRFEQSDGS : 720

↓ ↓ ↓
non01_13 : HFLLFTNPQGNPAGTNGRQNLGLWFSFDEGVTVKGP IQLVNGASAYS DIYQLDSENAIVIVETDNSNMRLRMPITLLKQKLTLSQN : 781
01_Amaz : HFLLFTNPQGNPAGTNGRQNLGLWFSFDEGVTVKGP IQLVNGASAYS DIYQLDSENAIVIVETDNSNMRLRMPITLLKQKLTLSQN : 807
0395 : HFLLFTNPQGNPAGTNGRQNLGLWFSFDEGVTVKGP IQLVNGASAYS DIYQLDSENAIVIVETDNSNMRLRMPITLLKQKLTLSQN : 807
IEC224 : HFLLFTNPQGNPAGTNGRQNLGLWFSFDEGVTVKGP IQLVNGASAYS DIYQLDSENAIVIVETDNSNMRLRMPITLLKQKLTLSQN : 781
ET_N16961 : HFLLFTNPQGNPAGTNGRQNLGLWFSFDEGVTVKGP IQLVNGASAYS DIYQLDSENAIVIVETDNSNMRLRMPITLLKQKLTLSQN : 807

```

Фигура 78. Транслирана аминокиселинна секвенция на *nanH* на *V. cholerae* non-01 щам 13, сравнена със сиалидази на патогенни (O1) щамове. Означения: 01_Amaz—*V. cholerae* O1 Amazonia 3509 (EU272902), 0395 - *V. cholerae* O1 0395 (ACP 09894), IEC224 - *V. cholerae* O1 IEC 224 (NC 016944), ET_N16961 - *V. cholerae* O1 biovar El Tor N16961 (NP 231419). Лектиновите домени са подчертани.

В изследвания ензим NanH присъстват всички задължителни за ензимното действие компоненти: аргининовата триада (224, 635, 712), глутаматът, стабилизиращ първия аргинин (756), тирозин 740, глутамат 619 и триптофан 311, като последният е част от хидрофобен „джоб“,

осигуряващ връзката с N-ацетилната група на сиаловата киселина (Crennell et al., 1994).

Нуклеотидната последователност на *nanH* ген е 99% идентична с тези на *V. cholerae* щам Amazonia 3509 (Figueiredo et al., 2005) и *V. cholerae* O1 biovar El Tor N16961 (Heidelberg et al., 2000), като и двата щамата принадлежат към серогрупа O1. Изследването на хомологията на aa секвенция също разкри 99% сходство със съответните сиалидази. В сравнение с Amazonia 3509, V13 NanH има само една aa замяна в позиция 320 - консервативна замяна на Asn от Asp. Секвенирането на *nanH* на българския изолат е първото в света описано молекулярно-биологично проучване на non-O1 *Vibrio*, което дава възможност за приложението му в бъдещи безопасни производства на ензима сиалидаза VCNA.

4. Молекулярни изследвания на β -глюкуронидаза (CAZy GH2)

Един от подходите за изучаване на ензимите е чрез тяхната експресия в различни хетероложни експресионни системи, които могат да бъдат използвани за анализ на основни ензимни структури и функции.

Тук представяме експресията на ензима β -глюкуронидаза (3.2.1.31) от семейството GH2 на CAZy в експресионна система метилотрофни дрожди от вида *Ogataea (Hansenula) polymorpha* - предпочитан при производството на различни рекомбинантни протеини в индустриален мащаб. Примерите за продукти варират от терапевтични средства като ваксини срещу хепатит В (Schaefer et al., 2002), до индустриални ензими като фитаза за добавки към фуражите (Mayer et al., 1999).

Популярността на *O. polymorpha* като експресионна система се дължи на няколко предимства: (1) наличието на силни индуцируеми промотори на метаболитни гени, (2) способност на щамовете да растат до много висока клетъчна плътност дори в минерални среди, (3) висока стабилност на експресионните плазмиди в клетките (Gellisen et al., 2005; Kang & Gellissen, 2005). Забелязано е също, че N-свързаните олигозахаридни вериги на гликопротеините на *O. polymorpha* са доста по-къси от тези от *Saccharomyces cerevisiae* (Kang et al., 1998).

Добре разработените методи за класически генетичен анализ на *O. polymorpha* (Lahtchev et al., 2002) улесняват генното инженерство и експресията на протеини. Досега обаче производството на хетероложни протеини в *O. polymorpha* е постигнато главно с използване на хаплоидни щамове и са избягвани диплоиди, тъй като битува погрешното схващане, че диплоидната фаза на *O. polymorpha* е много кратка и нестабилна.

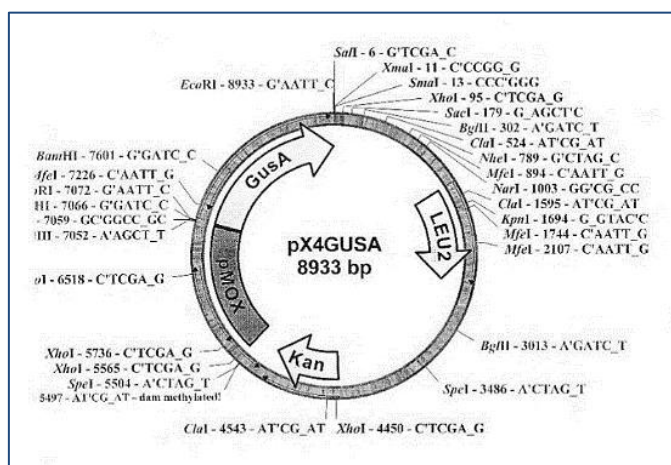
Изследването на влиянието на плоидността на дрождите от вида върху експресията на хетероложния бактериален ензим β -глюкуронидаза (GusA) с произход *E. coli* бе извършено като експресията на репортерния ген бе сравнена в хаплоидни и диплоидни клетки на *O. polymorpha*.

4.1. Молекулярно изследване на множествено маркирани щамове на *O. polymorpha*

В работата, свързана с хетероложната експресия бе използвана колекция от множествено маркирани щамове дрожди, деривати на типовия щам *O. polymorpha* CBS 4732^T (Табл. 24). Ауксотрофните мутации *arg1*, *pur2,5*, *leu2-2*, *ura3-11* водят до необходимост от добавка в средата на аргинин, аденин, левцин, или урацил, за да може щамът да се развива. Щам ADE3 бе резултат на ауксотрофна мутация в неизвестен ген с отношение към пуриновия метаболизъм, в резултат на която щамът изискваше добавяне на аденин в средата за култивиране.

Таблица 24. Генотип на хаплоидни щамове, използвани като гостоприемници за хетероложната експресия на гена *gusA* на *E. coli* (почернени) и генотип на трансформантите (хаплоидни и диплоидни, курсив).

Щам	Генотип
ADE3	<i>pur2,5 leu2 ura3</i>
11A	<i>leu2 arg1</i>
1- <i>Leu2 Gus+</i>	<i>pur2,5 ura3 leu2:: LEU2 GUSA</i>
1- <i>Arg1 Gus+</i>	<i>arg1 leu2:: LEU2 GUSA</i>
1- <i>Pur2,5 Gus+</i>	<i>pur2,5 leu2:: LEU2 GUSA</i>
2- <i>Pur2,5 Gus+</i>	<i>pur2,5 leu2:: LEU2 GUSA</i>
3- <i>Pur2,5 Gus+</i>	<i>pur2,5 leu2:: LEU2 GUSA</i>
1- <i>GUSD</i>	<i>arg1/+ leu2:: LEU2 GUSA/ arg1 leu2:: LEU2 GUSA +/pur2,5</i>
2- <i>GUSD</i>	<i>+/pur2,5 arg1/+ leu2:: LEU2 GUSA/ arg1 leu2:: LEU2 GUSA</i>
3- <i>GUSD</i>	<i>+/pur2,5 arg1/+ leu2:: LEU2 GUSA/ arg1 leu2:: LEU2 GUSA</i>
1- <i>ALGus</i>	<i>pur2,5/+ leu2/ leu2:: LEU2 GUSA ura3/+ +/ arg1 +/rpm1</i>



Фигура 79. Карта на совалков вектор pX4GusA (*E. coli/O. polymorpha*) с клониран ген *gusA* на *E. coli*. Означения: Kan - ген за канамицинова резистентност, *LEU2* - ген от *S. cerevisiae*, кодиращ изопропропил малат дехидрогеназа, pMOX - промотор на гена, кодиращ алкохол-оксидаза при *O. polymorpha*, *gusA* - ген,

кодиращ β -глюкуронидаза в *E. coli*.

Генетичната база на мутация ADE(-) бе доказана след трансформация на клетки на мутантния щам с геномна библиотека, съдържаща случайни фрагменти от хромозомата на *O. polymorpha* CBS 4732^T, клонирани в совалковия вектор за дрожди и *E. coli* pYT3. Бе получен единствен клон, в който бе осъществено комплементарно допълване на ауксотрофния маркер.

4.2. Хетероложна експресия на β -глюкуронидаза (*Gus*) в хаплоидни и диплоидни щамове *O. polymorpha*

Генът *gusA*, кодиращ ензима β -глюкуронидаза в *E. coli* бе предварително клониран в плазмид pX4GusA (Suppi et al., 2013, Фиг. 79) и ни беше предоставен за провеждане на експерименти за хетероложна експресия от проф. Алмае от Университета в Тарту, Естония. Генът, кодиращ β -глюкуронидаза, се използва широко като репортерен ген за анализ на силата на промоторите и нивата на експресия в дрожди, бозайници и растителни клетки. В случая, *gusA* бе клониран под контрола на силен индуцируем промотор pMOX. Промоторът се репресира от висока концентрация на глюкоза и се дерепресира и индуцира в присъствие на метанол или глицерол, като в клетки, отглеждани в глицерол, нивата на експресия на гените достигат максимални стойности (Van der Klei et al., 2006). β -глюкуронидазната активност бе определена качествено (растеж на дрождеви клонове в 96-ямкови плаки) и количествено (спектрофотометрично), като бяха използвани клетъчни екстракти и хромофорния субстрат p-нитрофенил β -D-глюкуронид (pNPG).

Щам ADE3 (*pur2,5 ura3 leu2*) беше трансформиран със совалковия вектор pX4GusA чрез електропорация (Faber et. al., 1994). Получените трансформанти бяха проверени за наличие на β -глюкуронидазна активност чрез провеждане на качествен тест с пермеабилizирани дрождеви клетки. Leu⁺ трансформантите бяха култивирани върху твърди глицерол-съдържащи среди за дерепресия на pMOX и след това инкубирани върху твърди метанол-съдържащи среди за индукция на pMOX. Един от трансформантите (1-LeuGus+) показва повишена глюкуронидазна активност (Фиг. 80).



Фигура 80. Качествен тест за β -глюкуронидазна активност на трансформанти на *O. polymorpha*.

Следващият етап от изследването включваше кръстосването на получения щам 1-LeuGus+ (*pur2,5 ura3 leu2::LEU2GUSA+*) с хаплоидния щам 11-A (*leu2-2 arg1-11*). Полученият диплоид 1-ALGus беше подложен на последващ генетичен анализ. Получените резултати от анализирането на 223 мейотични сегреганта са представени в Табл. 25.

Таблица 25. Мейотични сегреганти на диплоид 1-ALGus.

Алелна двойка	Сегрегиране на маркерите		Отклонение
	(+)	(-)	
<i>PUR2,5+ : pur2,5-</i>	73	150	38.5
<i>LEU2+ : leu2-</i>	118	105	6.5
<i>URA3+ : ura3-</i>	83	140	28.5
<i>ARG1+ : arg1-</i>	110	113	1.5
<i>GUS+ : gus+</i>	118	105	6.5

Ауксотрофните маркери сегрегираха в съотношение 1+/1-, което потвърждава хаплоидната природа на двата родителски щам. Във всички изследвани мейотични сегреганти маркерите LEU2+ и GusA+ ко-сегрегират и показват стабилна интеграция на гена *gusA* в хромозомния локус на гена *LEU2*.

Таблица 26. Количествена оценка на β -глюкуронидазна активност на хибридни диплоидни щамове на *O. polymorpha*.

Щам	Плоидност	Ензимна активност (EU)*
1 Leu2 Gus+	N	10.15
1 Arg Gus+	N	19.40
1 Pur2,5 Gus+	N	15.50
2 Pur2,5 Gus+	N	12.02
3 Pur2,5 Gus+	N	16.53
1 GUSD	2N	65.54
2 GUSD	2N	116.81
3 GUSD	2N	111.43

*EU – количество ензим, което освобождава 1 μ mol pNP за 1 мин при стандартни условия (37°C).

Мейотични сегреганти бяха изследвани за глюкуронидазна активност и четири от тях показаха повишени ензимни активности (Фиг. 140, Б). Тези сегреганти носеха комплементарни ауксотрофни маркери и бяха наименовани 1-Arg1Gus+, 1-Pur2,5Gus+, 2-Pur2,5Gus+ и 3-Pur2,5Gus+. Те бяха кръстосани помежду си във всички възможни комбинации. След кръстосването бяха изолирани три хибридни диплоидни щам, които обозначихме като 1-GUSD, 2-GUSD и 3-GUSD, които също бяха изследвани качествено и количествено за наличието на глюкуронидазната активност.

Качествения анализ върху ямки показва наличието на висока глюкуронидазна активност (Фиг. 80, В), а количествения анализ беше

проведен чрез анализ на активността на клетъчни екстракти (Табл. 25). Диплоидът 2 GUSD показва най-високи стойности на β -глюкуронидазна активност – 116.81 EU.

Използването на диплоидни щамове е ефективен подход за подобряване на хетероложна генна експресия в дрождите *O. polymorpha*. Спорообразуването при диплоиди, които са хетерозиготни по интегрирания плазмид дава възможност за получаване на мейотичен продукт с повишена генна експресия. Причината за такова увеличение (10.15 EU за родителски трансформанти и средно 15.9 EU за изолирани мейотични сегреганти) е, че по време на мейозата протичат явленията реципрочна или неречипрочна (неравномерна) рекомбинация, като при втората може да протече удвояване на гени.

Удвояването на броя на хромозомите в рекомбинантните клетки от дрожди, обаче води до много по-голямо повишение на активността на β -глюкуронидазата (до 111.4 – 116.8 EU). Подходът за създаване на диплоидни щамове, носещи хетероложни гени, е обещаващ за подобряване на продуктивността на щамове от вида *O. polymorpha*, а получените положителни резултати позволяват да се създадат нови стратегии за повишаване нивата на хетероложната експресия в метилотрофните дрожди.

5. Заключение

След индустриалната революция през XIX в. и технологичната през XX в., XXI-вото столетие е посветено на развитие на системната биология, медицината и омикс-подходите за проучване на живите организми. Известно е, че човешкото тяло се обитава от трилиони бактерии, които активно участват в неговия метаболизъм, а през 2012 г. в хода на проекта "Човешки микробиом" (NIH, САЩ), за първи път бе дефиниран състава на микробиома на здравия човек. Днес човечеството все повече се нуждае от изследвания, свързани с взаимоотношенията между макро- и микро-организмите, а главна задача пред науката е получаването на знания, които да доведат до подобряване на качеството на живот, здраве и дълголетие чрез контрол над микробиома.

Други предизвикателства, пред които е изправена цивилизацията през XXI век са изчерпването на енергийните ресурси, необходимостта да се търсят алтернативни пътища за синтез на органични съединения чрез развитие на разнообразни биотехнологии и нуждата от евтини и възобновяеми природни субстрати за тези производства.

Съвременната микробиология може да отговори на част от тези проблеми чрез изясняването на молекулярните механизми на разграждане и конвертиране на субстрати от микроорганизмите. Гликозид-хидролазите са ензимите, които стоят в основата на катаболизма, а тяхното разнообразие определя степента на адаптивност на видовете към тяхното местообитание и обуславя множеството приложения на микроорганизмите в промишлеността или медицината.

В настоящата работа са изолирани и идентифицирани десетки бактериални щамове-продуценти на гликозид-хидролазни ензими, които са анализирани с подходите на геномиката, транскриптомиката, ензимологията и биоинформатиката. По-задълбочено е изследването на ензимите, продуцирани от две групи Грам-положителни бактерии: групата на млечнокиселите бактерии и тази на представителите на род *Bacillus*.

Изучаването на млечнокиселите бактерии като част от микробиотата на храните дава възможност за по-добро разбиране на връзката между микроорганизмите и човека. Нарастващите изисквания на европейския потребител към консумираните продукти обуславят развитието на хранително-вкусовата промишленост в посока към производството на храни, съчетаващи пълноценност и полезност. Разработването на нови функционални храни с пробиотични характеристики е актуално за съвременните хранителни наука и индустрия. Изолирането, надеждната идентификация и разкриването на пробиотичния потенциал на млечнокиселите бактерии, способни да разграждат пребиотици са все още недостатъчно изследвана територия, а съчетаването на пробиотични и пребиотични свойства е предпоставка за разработването на нови функционални храни и напитки, които в допълнение към здравословните им свойства, да са с уникален вкус, текстура и аромати.

В дисертацията за първи път са описани качествата на изолати МКБ като амилалитични пробиотици. Изследването доказва, че български щамове МКБ, изолирани от ферментирали зърнени храни и напитки имат пробиотични свойства и могат да се развиват в среда, съдържаща нишесте като единствен въглероден източник - факт, който бе поставян под съмнение досега. С подходите на транскриптомиката бе доказана стабилната генетична основа за синтез на ензими, способни да модифицират нишестето при МКБ. Някои от щамове лактобацили освен амилазна, притежават и фруктозидазна активност, а тук за първи път бе доказано, че двата ключови за усвояването на пребиотици ензими се намират под общ контрол над експресията.

Освен, че усвояват пребиотици, българските изолати МКБ са способни и да продуцират такива. В настоящия труд бе направено детайлно изследване на способността на родопски щамове *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* да синтезират галакто-олигозахариди (за които е доказан бифидогенен ефект). С прецизна аналитична техника бе измерено количеството на ГОЗ, синтезирани в процеса на подквасване на мляко. Рекордното количество ГОЗ (най- високото в света), както и нетипичното свързване β -(1→4) на последната галактозна единица може да се окаже един от отговорите на въпроса за уникалните полезни за човека свойства на българското кисело мляко. Нещо повече, съпътстващата микрофлора в него има не по-малко значима биологична активност. Бе разкрит потенциала на щамове МКБ да синтезират циклични пептиди с

антимикробно действие, аминокиселини, невромедиатори и антиоксиданти. Всичко това, съчетано с добри технологични характеристики превръща новоизолираните МКБ в добра база за разработването на синбиотични продукти и функционални храни.

Видовете от род *Bacillus* са едни от най-разпространените бактерии в природата. Благодарение на широкия си гликозид-хидролазен спектър, те имат незаменима роля в кръговрата на растителния въглерод. Ризосферните бацили в кореновата система подпомагат развитието на растенията, като образуват растителни хормони и антибиотици. Все повече представители на рода като *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. toyonensis* биват причислявани към групата на пробиотичните щамове.

Микробното разграждане на растителна биомаса, наречено "зелена биорафинерия" дава възможност за промяна на отношението на човечеството към отпадните субстрати. Приложението на лигноцелулозата в различни индустрии - храни, фуражи, производство на пребиотици, ценни нискомолекулни съединения и биогорива разкрива нова ера в биотехнологиите, базирани на научното знание за неограничените хидролитични възможности на бактериалните щамове.

Друго, особено ценно за промишлеността и медицината качество на бацилите, е тяхната способност да синтезират циклодекстрини. В настоящия труд бе постигната най-успешната досега в света хетероложна експресия на ген, кодиращ ЦГТ-аза, а рекомбинантният ензим бе имобилизиран в магнитно-модифицирани нано-носители на минерална и растителна основа. Освен рекордната степен на задържане на рекомбинантния ензим, чрез създаването на иновативен метод за многократно употреба на биокатализатора бе получено най-високото в света количество циклодекстрин (36 мг/мл за 120 мин).

В дисертацията са разгледани и качествата на ензим с приложение в медицината - неураминидаза, синтезирана от *Vibrio cholerae*. За разлика от патогенните си родственици, българският щам е нетоксигенен продуцент на ензима, а генетичната и биохимична характеристика на продуцента и ензима позволяват бъдещото му напълно безопасно промишлено производство.

Изводи

1. Изолираните нови бактериални щамове са продуценти на ензими, принадлежащи към 14 различни гликозид-хидролазни семейства (GH1, GH2, GH3, GH4, GH5, GH11, GH13, GH16, GH26, GH32, GH33, GH43, GH51 и GH53). Два от изследваните ензими освен хидролазна, проявяват и трансферазна активност.
2. Щамовете-продуценти на нови ензими принадлежат към родовете *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Leuconostoc* и вида *Vibrio cholerae*. Тяхната видова и щамова принадлежност е доказана

чрез прилагането на широк набор от молекулярно-биологични подходи (16S рДНК секвениране, ARDRA, RAPD, MLST, PFGE, пълно геномно секвениране).

3. Част от българските щамове МКБ усвояват пребиотичните въглехидрати инулин, фруктоолигозахариди и резистентно нишесте.

4. При представители на МКБ, култивирани в среда с нишесте се експресират поне седем различни гена, кодиращи α -глюканази (извънклетъчни и цитоплазмени α -амилази, амилопулуланаза, α -глюкозидаза, олиго-1,6-глюкозидаза и неопулуланаза).

5. Гените *amyY* и *amyL*, кодиращи извънклетъчна и цитоплазмена амилаза са отговорни за проявата на амилазна активност при амилолитичен щам *Lactococcus* subsp. *lactis* B84. Регулаторният механизъм катаболитна репресия участва в контрола на генната експресия на *amyY* и *amyL*.

6. Ген *amy41* с дължина 1778 базови двойки кодира нова амилопулуланаза при вида *Lactobacillus paracasei*. Частично пречистеният белтък е с молекулна маса 67 кДа. Добавката на 0.5 М IPTG и 1% глицин в средата водят до усиление на хетероложна експресия и секрецията на амилопулуланазата в гостоприемник *E. coli* BL21(DE3).

7. Гените *inu* и *fosE* кодирај две нови клетъчно-свързани фруктан- β -фруктозидази при щамове от вида *Lactobacillus paracasei*. След успешно пречистяване са определени биохимичните параметри на ензимите – молекулно тегло, рН и температурен оптимум и стабилност, субстратна специфичност. Детайлният анализ на гените и пречистените стенно-локализиранни ензими разкри наличието на различен брой домени за връзка с клетъчната стена.

8. Гените *amy41* и *inu*, кодиращи амилопулуланаза и β -фруктозидаза при *L. paracasei* се намират под общ контрол над генната експресия. При конверсия на инулин, нишесте и техни смеси се експресират и двата гена без влияние на състава на субстрата.

9. Видът *Pediococcus acidilactici* притежава две различни системи за транспорт на захари. Доказаните PTS и MSF транспортери в геномна библиотека на *P. acidilactici* в *E. coli* участват в транспорт на захароза и ФОЗ.

10. Българските щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* синтезират галакто-олигозахариди (ГОЗ) в мляко и лактозна среда поради проявата на рядко срещана трансферазна активност на ензима β -галактозидаза.

11. Част от новоизолираните щамове МКБ имат значителна антимикробна ефективност срещу патогенните видове *E. coli*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae* и *Listeria monocytogenes*. Те са добри продуценти на аминокиселини, цитрулин, индол-3-пропионова киселина и циклични пептиди с пробиотично действие, както и нискомолекулни летливи вещества.

12. Българските щамове МКБ притежават добри технологични характеристики. Най-перспективни за приложение в хранително-вкусовата промишленост са щамовете, синтезиращи екзополisahариди и устойчиви на индустриален стрес като термичен шок и устойчивост към алкохоли.

13. Нов ген, кодиращ ензим циклодекстрин-глюканотрансфераза при щам *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB е клониран и свърх-експресиран в гостоприемник *E. coli* BL21(DE3). Пречистеният рекомбинантен ензим е с молекулна маса 75.5 кДа, два рН оптимума (рН 6.0 и 8.0) и Т-оптимум 60°C. Имобилизирани в магнитно-модифицирани носители рекомбинантният ензим води до продукцията на 36 мг/мл циклодекстрини.

14. Българските изолати от род *Bacillus* имат потенциал за директна хидролиза на възобновяеми природни субстрати. Щамовете продуцират ензими, разграждащи целулоза, арабиноксилан, ксилоглюкан, разклонен арабинан, ксилан, галактоманан, β-глюкан, амилоза, галактан и курдлан.

15. В генома на *Bacillus velezensis* 5RB (NCBI GenBank №QXJL000000000) са налични 225 гена, отговорни за конверсията и транспорта на въглехидрати. Щам *B. velezensis* 5RB има генетичната база да конвертира целулоза, лигноцелулоза, нишесте и инулин директно в ценни нискомолекулни продукти.

16. В генома на *Bacillus velezensis* 5RB присъстват седем пълни клъстера за синтез на антибиотици (макролактин, бацилаен, дефицидин, фенгицин, бацилбактин, бацилисин и сърфактин).

17. Щам *Vibrio cholerae* non-O1/13, изолиран от българско местообитание, притежава ген, кодиращ ензима неураминидаза.

18. В дрождева система за експресия с гостоприемник *Ogataea polymorpha* е успешно въведен ген, кодиращ β-глюкуронидаза. Доказани са повишени нива на експресия при диплоиди и мейотични сегреганти.

Приноси

Научни приноси

1. За първи път са идентифицирани гените, отговорни за хидролизата на α-глюкани при видовете *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus paracasei*. Изолирани са първите в света амилолитични представители на вида *Lactobacillus sakei* и рода *Enterococcus*.

2. За първи път са пречистени клетъчно-свързани фруктан-β-фруктозидази на *Lactobacillus paracasei*. Нуклеотидната последователност на кодиращите ги гени доказва, че ензимите са нови, с аминокиселинна замяна в съседство с каталитичната триада на активния център.

3. Идентифицирани са нов ген *cgt* и ензим циклодекстрин глюканотрансфераза при *Bacillus pseudocalophilus*, като хомологията на аминокиселинната секвенция с досега известните ензими е под 87%.
4. За първи път е извършена хетероложна експресия на β -глюкуронидаза в диплоидни щамове дрожди *Ogataea polymorpha*.
5. Секвениран е пълен геном на *Bacillus velezensis* 5RB, а анализът на гените разкрива възможностите на щама да конвертира лигноцелулозни субстрати в ценни продукти.
6. За първи път е доказана връзката между хидрофобността на клетъчната повърхност и устойчивостта към органични разтворители.

Научно-приложни приноси

1. Създаден е метод за бърз транскрипционен анализ на гени, отговорни за усвояването на нишесте от амилолитични млечнокисели бактерии.
2. За първи път рекомбинантен ензим циклодекстрин глюканотрансфераза е имобилизиран в магнитно-модифицирани носители с цел получаване на циклодекстрини. Повторната употреба на ЦГТ-азен магнитен биокатализатор показват възможността за получаване на три до четири пъти по-голямо количество ЦД за 120 мин в сравнение с добива на еднократно използваните ензимни препарати.
3. За първи път е осъществено детайлно молекулярно-биологично изследване на неураминидаза от нетоксигенен щам *Vibrio cholerae*. Секвенирането и характеризирането на гена *nanH* и кодирания от него ензим дават възможност за разработване на безопасно производство на сиалидаза.
4. За първи път *in vivo* е доказан синтез на ензими, хидролизиращи целулоза и хемицелулоза при видовете *B. safensis*, *B. toyonensis* и *B. velezensis*.
5. Създаден е нов PCR-базиран метод за детекция на къси термошокови гени в *Str. thermophilus*, което дава възможност за бърза селекция на щамове за влагане в стартерни култури.
6. За първи път е демонстрирано съдържанието на пребиотичните въглехидрати ГОЗ, индол-3-пропионова киселина и циклични антимикробни пептиди в българско кисело мляко.

Списък на научни публикации, свързани с темата на дисертацията

1. Petrova, P., Velikova, P., Petrov, K. **(2019)** Genome sequence of *Bacillus velezensis* 5RB - an overproducer of 2,3-butanediol. Microbiology Resource Announcements (Genome Announcements), American Society for Microbiology, 8:e01475-18, **SJR 0.486**.
2. Petrova, P., Tsvetanova F., Petrov, K. **(2019)** Low cell surface hydrophobicity is one of the key factors for high butanol tolerance of Lactic acid bacteria. Engineering in Life Sciences, 19, 2, John Wiley & Sons, Inc. ISSN:1618-2863, DOI:10.1002/elsc.201800141, pp. 133-142. SJR:0.648, **IF 1.936**.
3. Velikova, P., Petrov, K., Lozanov, V., Tsvetanova F., Stoyanov A., Wu, Z., Liu, Z., Petrova, P. **(2018)** Microbial diversity and health-promoting properties of the traditional Bulgarian yogurt. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 32 (5), pp.1205-1217, Taylor and Francis Group, ISSN:1310-2818, **IF 1.097**.
4. Tsvetanova F., Petrova P., Petrov K. **(2018)** Lactic acid production from polysaccharides-containing raw materials. Journal of International Scientific Publications, Ecology & Safety, 12, ISSN:1314-7234, pp. 197-211.
5. Petrova P., Petrov K. **(2017)** Traditional Cereal Beverage Boza - Fermentation Technology, Microbial Content and Healthy Effects. Chapter 13 In: Ramesh C. Ray & Didier Montet (Eds.), Fermented Food—Part II: Technological Interventions, Publisher: CRC PRESS, Boca Raton, FL, USA, pp. 284-305. (ISBN 9781138637849).
6. Petrova P., Petrov K. **(2017)** Prebiotic-Probiotic Relationship: The Genetic Fundamentals of Polysaccharides Conversion by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Genera. Chapter 7 In: Grumezescu A.M. & Holban A.M (Eds.) Handbook of Food Bioengineering, Volume 2, Academic Press, Elsevier Inc., pp. 237-278, (ISBN: 978-0-12-811413-1).
7. Petrov K., Petrova P. **(2017)** Sugar transport systems involved in fructooligosaccharides utilization by the probiotic bacterium *Pediococcus acidilactici*. Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, Tome 70, vol. 9, 1263-1270, **IF 0.270**
8. Velikova, P., Petrov, K., Petrova, P. **(2017)** The cell wall anchored β -fructosidases of *Lactobacillus paracasei*: overproduction, purification, and gene expression control. Process biochemistry, 52, Elsevier Ltd., ISSN:1359-5113, DOI:10.1016/j.procbio.2016.10.010, pp. 53-62, **IF 2.616**.
9. Velikova, P., Petrov, K., Tsvetanova, F., Petrova, P. **(2017)** Novel isolates of lactic acid bacteria display combined glycoside hydrolase activities.

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

10. Petrova P. **(2017)** Current content and unique properties of lactic acid bacteria in indigenously homemade yogurt in Bulgaria. International Dairy Sci-Tech & Innovation Conference, 17-18 November, 2017, Shanghai, China, Conference Reports, pp. 147-155, <http://www.idstic.com/en/node/18>.
11. Velikova P., Stoyanov A., Blagoeva G., Popova L., Petrov K., Gotcheva V., Angelov A., Petrova P. **(2016)** Starch utilization routes in lactic acid bacteria: New insight by gene expression assay. *Starch - Stärke*, 68, 9-10, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, ISSN:1521-379X, DOI:10.1002/star.201600023, pp. 953-960, **IF 1.837**.
12. Eneva, R., Engibarov, S., Petrova, P., Abrashev, R., Strateva, T., Kolyovska, V., Abrashev, I. **(2015)** High Production of neuraminidase by a *Vibrio cholerae* Non-O1 strain — the first possible alternative to toxigenic producers. *Appl Biochem Biotechnol*, 176, Springer, ISSN:0273-2289, DOI 10.1007/s12010-015-1584-4, pp. 412-427, **IF 1.606**.
13. Stoyanov A., Petrova P., Lyutskanova D., Lahtchev K. **(2014)** Structural and functional analysis of PUR2,5 gene encoding bifunctional enzyme of *de novo* purine biosynthesis in *Ogataea (Hansenula) polymorpha* CBS 4732T. *Microbiological Research*, 169, 5-6, Elsevier GmbH, DOI:10.1016 /j.micres.2013.08.008, pp. 378-387, **IF 2.561**.
14. Ivanova, V., Petrov, K., Safarikova M., Petrova, P., Tonkova A., Delchev N. **(2014)** Immobilization of recombinant CGTase JCGT8-5 on magnetically – modified silicates and natural supports. *International Review of Chemical Engineering (IRECHE)*, 6, 1, Praise Worthy Prize Publishing House, ISSN:2035-1755, pp. 1-8.
15. Stoyanov A., Petrova P., Lahtchev K. **(2014)** Enhanced heterologous gene expression in diploid cells of methylotrophic yeast *Hansenula (Ogataea) polymorpha*. *Journal of BioScience and Biotechnology*, Plovdiv University press "Paisii Hilendarski", 3, pp. 247-252, ISSN:1314-6246.
16. Velikova, P. V., Blagoeva, G. I., Gotcheva, V. G., Petrova, P. M. **(2014)** Novel Bulgarian *Lactobacillus* strains ferment prebiotic carbohydrates. *Journal of BioScience and Biotechnology*, SE-2014, Plovdiv University press "Paisii Hilendarski", ISSN:1314-6246, pp. 55-60.
17. Petrova P., Petrov K., Stoyancheva, G. **(2013)** Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria – structures, properties, and

- applications. Starch-Starke, 65, 1/2, ISSN:0038-9056, DOI:10.1002/star.201200192, pp. 34-47, **IF 1.401**.
18. Petrova, P., Tomova, I., Petrov, K., Nikov, I., Tonkova, A. **(2013)** Purification and properties of a new recombinant cyclodextrin glucanotransferase from *E. coli* BL21 (DE3) pJCGT8-5. Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 66, 10, ISSN:1310-1331, pp. 1437-1444, **IF 0.198**.
 19. Petrova P., Tonkova A., Petrov, K. **(2012)** Sequence analysis, cloning and extracellular expression of cyclodextrin glucanotrasferase gene from the alkaliphilic *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB in *E. coli*. Process biochemistry, vol. 47, (12), pp. 2139-2145, Elsevier Ltd., ISSN:1359-5113, DOI:10.1016/j.procbio.2012.08.001, **IF 2.414**.
 20. Lachtchev K., Petrova, P., Lyutskanova D., Stoyanov A. **(2012)** Biotechnological potential of methylotrophic yeasts. New Trends in Microbiology. In: 65th Anniversary of the Stephan Angeloff Institute of Microbiology, ISBN:978-954-92882-1-6, 15, pp. 265-279.
 21. Ivanova, V., Tonkova, A., Petrov, K., **Petrova, P.**, Gencheva, P. **(2012)** Covalent attachment of cyclodextrin glucanotransferase from genetically modified *Escherichia coli* on surface functionalized silica coated carriers and magnetic particles. Journal of BioScience and Biotechnology, vol. 1, SE, pp. 7-13, Plovdiv University press "Paisii Hilendarski", ISSN:1314-6246.
 22. Kitayska, Ts., Petrova, P., Ivanova, V., Tonkova, A. **(2011)** Purification and properties of a new thermostable cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB. Applied Biochemistry and Biotechnology, 165, 5, Humana Press Inc., ISSN:0273-2289, DOI:10.1007/s12010-011-9346-4, pp. 1285-1295, **IF 1.943**.
 23. Petrova P., Petrov, K. **(2012)** Direct starch conversion into L (+) lactic acid by a novel amylolytic strain of *Lactobacillus paracasei* B41. Starch-Starke, 65, 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, DOI:10.1002/star.201100074, 10-17. ISSN:0038-9056, **IF 1.220**.
 24. Petrova, P., Petrov, K. **(2011)** Antimicrobial activity of starch-degrading *Lactobacillus* strains isolated from boza. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 25, 4, Taylor and Francis Group, ISSN:1310-2818, DOI:10.5504/BBEQ.2011.0124, pp. 114-116, **IF 0.760**.
 25. Петрова П. **(2011)** Амилолитични пробиотици с приложение в хранително-вкусовата промишленост. Втори работен семинар "Кои сме ние и какво постигнахме" по проект "Ефективно обучение на докторанти и подпомагане на развитието и реализацията на пост-докторанти и млади учени в приоритетни области на микробиологията", 29-30 юни 2011, София, Сборник доклади, стр. 5-7.

26. Petrova, P., Emanuilova, M., Petrov, K. **(2010)** Amylolytic *Lactobacillus* Strains from Bulgarian Fermented Beverage Boza. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65C vol. 3/4, 218-224, **IF 0.718**.
27. Петрова П. **(2010)** Генетични детерминанти и активност на амилазните ензими в български млечнокисели бактерии. Първи работен семинар "Кои сме ние и какво работим" по проект "Ефективно обучение на докторанти и подпомагане на развитието и реализацията на пост-докторанти и млади учени в приоритетни области на микробиологията", 24-25 юни 2010, София, Сборник доклади, стр. 24-27.
28. Ishlimova D., Urshev Z., Stoyancheva, G., Petrova, P., Minkova S., Doumanova L. **(2009)** Genetic diversity of bacteriophages highly specific for *Streptococcus thermophilus* strain Lbb.A. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23, 3, pp. 1340-1345. **IF 0.291**.
29. Petrov, K., Urshev, Z., Petrova, P. **(2008)** L(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. *Food Microbiology*, 25, 4, Elsevier Ltd., ISSN: 0740-0020, DOI:10.1016 /j.fm.2008.02.005, pp. 550-557, **IF 2.847**.
30. Atanasova, N., Petrova, P., Ivanova, V., Yankov, D., Vassileva, A., Tonkova, A. **(2008)** Isolation of novel alkaliphilic *Bacillus* strains for cyclodextrin glucanotransferase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149, 2, Humana Press Inc, ISSN:0273-2289, DOI:10.1007/s12010-007-8128-5, pp. 155-167, **IF 1.040**.
31. Petrova, P., Petrov, K., Stoyancheva, G. **(2007)** Probiotic properties of Bulgarian vaginal *Lactobacillus* isolates. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 60, 8, ISSN:1310-1331, pp. 871-878.
32. Petrova, P. M., Gouliamova, D. **(2006)** Rapid screening of plasmid-encoded small *hsp*-genes in *Streptococcus thermophilus*. *Current Microbiology*, 53, 12, Springer-Verlag, ISSN:0343-8651, DOI:10.1007/s00284-006-0175-6, pp. 422-427, SJR:0.581, **IF 1.007**.
33. Petrova, P., Gouliamova D., Stoyancheva, G. **(2006)** Heat shock response of *Streptococcus thermophilus* industrial strains, XI congress of Microbiology, 4-7 October 2006, Varna, Bulgaria, Proceedings book, pp. 105-108.