

## СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ, С АБСТРАКТИ

(на български и на английски език) на доц. д-р Светла Трифонова Данова, дбн, представени за участие в конкурса за заемане на академичната длъжност Професор по професионално направление 4.3. Биологически науки (Микробиология- Млечно кисели бактерии и Пробиотици), обявен в ДВ. Брой 47 /22.05.2020 г.; съгласно минималните национални критерии по ЗРАСРБ

### **I. ГРУПА А – показател 1:**

1. Дисертация за присъждане на научната и образователна степен „Доктор” (Шифър Микробиология 01.06.12) на тема “Проучвания върху някои аспекти на първичния матаболизъм на *Streptomyces albobogriseolus* 444 и неговия нископродуктивен вариант във връзка с регулацията на антибиотикообразуването” Автореферат 1997 г. Катедра по Обща и промишлена микробиология, Биологически факултет Софийски Университет “Св. Климент Охридски”, София.

Специализиран научен съвет по микробиология, вирусология и имунология при ВАК, публична защита на 07.07.1997 г.

### **II. ГРУПА Б-показател 2:**

2. Дисертационен труд за присъждане на научната степен „Доктор на науките” направление Биологични науки 4.3 ( с научна специалност Микробиология) на тема: „Биоразнообразие и пробиотичен потенциал на млечно кисели бактерии от различни екологични ниши”, 389 стр, Автореферат 140 стр. Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, публична защита на 15.05.2015 г. в Нац. Семинар по Микробиология, ИмикБ - БАН.

### **III. ГРУПА В:**

Научни публикации в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus), които не повтарят представените за придобиване на образователната и научна степен "доктор", на научната степен "доктор на науките" и за заемане на академичната длъжност "доцент.

3. Stoylov, S. P., Gyurova, A., Georgieva, R. & Danova, S. 2008, "Do bacteria have an electric permanent dipole moment?", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 64, no. 2, pp. 255-259.

Link: <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=26590&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** In the scientific literature in the last 40 years, some data for the permanent dipole moment and the electric polarizability of *Escherichia coli* can be found [S.P. Stoylov, Colloid Electro-Optics – Theory, Techniques and Application, Academic Press, London, 1991]. In this

paper the data based mainly on electro-optic investigation is considered as much as some dipolephoretic (most often called dielectrophoretic) studies. Serious grounds are found to doubt the conclusions made for the electric dipole moments of bacteria by one of the authors of this paper (SPS) and by some other researchers. This concerns both the permanent dipole moment and the electric charge dependent polarizabilities of *E. coli*. Here, along with the discussion of the old experimental data, new experimental data are shown for a strain of *E. coli* HB101. The conclusions from the analysis of the old and the new experimental data is that they do not provide correct evidence for the presence of a permanent dipole moment. It seems that all statements for the existence of electric permanent dipole moment in bacteria [S.P. Stoylov, Colloid Electro-Optics – Theory, Techniques and Application, Academic Press, London, 1991; S.P. Stoylov, S. Sokerov, I. Petkanchin, N. Ibroshv, Dokl. AN URSS 180 (1968) 1165; N.A. Tolstoy, A.A. Spartakov, A.A. Trusov, S.A. Schelkunova, Biofizika 11 (1966) 453; V. Morris, B. Jennings, J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 71 (1975) 1948; V. Morris, B. Jennings, J. Colloid Interface Sci. 55 (1978) 313; S.P. Stoylov, V.N. Shilov, S.S. Dukhin, S. Sokerov, I. Petkanchin, in: S.S. Dukhin (Ed.), Electro-optics of Colloids, Naukova Dumka, Kiev, 1977 (in Russian).] based on electro-optic studies are result of incorrect interpretation. Therefore, they should be further ignored. /© 2008 Elsevier B.V. /

**Резюме:** В научната литература през последните 40 години могат да бъдат намерени някои данни за постоянния диполен момент и електрическата поляризуемост на *Escherichia coli* [S.P. Стойлов, Колоидна електрооптика - теория, техники и приложение, Academic Press, Лондон, 1991]. В тази статия се разглеждат данните, базирани главно на електрооптично изследване, както и някои диполофоретични (най-често наричани диелектрофоретични) изследвания. Намерени са сериозни основания да се съмняват в заключенията, направени за електрическите диполни моменти на бактериите от един от авторите на тази статия (SPS) и от някои други изследователи. Това се отнася както за постоянния диполен момент, така и за поляризуемостта на *E. coli*, зависима от електрическия заряд. Тук, заедно с обсъждането на старите експериментални данни, са показани нови експериментални данни за щам на *E. coli* HB101. Изводите от анализа на старите и новите експериментални данни са, че те не предоставят правилни доказателства за наличието на постоянен диполен момент. Изглежда, че всички твърдения за съществуването на електрически постоянен диполен момент в бактериите [S.P. Стойлов, Колоидна електрооптика - теория, техники и приложение, Academic Press, Лондон, 1991; С. П. Стойлов, С. Сокеров, И. Петканчин, Н. Иброшев, Докл. AN URSS 180 (1968) 1165; Н. А. Толстой, А. А. Спартаков, А.А. Трусов, С. А. Щелкунова, Биофизика 11 (1966) 453; V. Morris, B. Jennings, J. Chem. Soc. Фарадей Транс. II 71 (1975) 1948; V. Morris, B. Jennings, J. Colloid Interface Sci. 55 (1978) 313; С. П. Стойлов, В. Н. Шилов, С. С. Духин, С. Сокеров, И. Петканчин, в: С. С. Духин (Ред.), Електрооптика на колоидите, Наукова думка, Киев, 1977 г. (на руски език). интерпретация. Следователно те следва да бъдат пренебрегвани. © 2008 Elsevier B.V. Всички права запазени.

4. Stoylov, S. P., Gyurova, A.Y., Bunin, V., Angersbach, A., Georgieva, R.N. & Danova, S.T. 2009, "Electric dipole moments of *Escherichia coli* HB 101", *Bioelectrochemistry*, vol. 75, no. 1, pp. 50-54.

LINK: [https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=Stoylov%2C+S.P.%2C+Gyurova%2C+A.Y.%2C+Bunin%2C+V.%2C+Angersbach%2C+A.%2C+Georgieva%2C+R.N.+%26+Danova%2C+S.T.+2009%2C+%22Electric+dipole+moments+of+Escherichia+coli+HB+101%22%2C+Bioelectrochemistry%2C+vol.+75%2C+no.+1%2C+pp.+50-54.+https%3A%2F%2Fhttps://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=16890&tip=sid&clean=0](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Stoylov%2C+S.P.%2C+Gyurova%2C+A.Y.%2C+Bunin%2C+V.%2C+Angersbach%2C+A.%2C+Georgieva%2C+R.N.+%26+Danova%2C+S.T.+2009%2C+%22Electric+dipole+moments+of+Escherichia+coli+HB+101%22%2C+Bioelectrochemistry%2C+vol.+75%2C+no.+1%2C+pp.+50-54.+https%3A%2F%2Fhttps://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=16890&tip=sid&clean=0)

**Abstract:** The theoretical and experimental studies of the particles' electric dipole moments in the microscopic and submicroscopic size range show that in the case of polar and conductive media the interfacial components of the dipole moments are of greatest importance. While in the range of manometer's sizes there seems to be no important problems in the identification and in the estimation of the values of the dipole moments at present, in the micrometer range there are serious problems. In this communication these problems are considered and illustrated by electro-optic investigations of *Escherichia coli* HB 101.

**Резюме:** Теоретичните и експерименталните изследвания на електрическите диполни моменти на частиците в микроскопичния и субмикроскопичния размер показват, че в случая на полярни и проводими среди интерфациалните компоненти на диполните моменти са от най-голямо значение. Докато в обхвата на размерите на манометъра изглежда няма важни проблеми при идентифицирането и оценката на стойностите на диполните моменти в момента, в микрометърния диапазон има сериозни проблеми. В тази комуникация тези проблеми се разглеждат и илюстрират чрез електрооптични изследвания на *Escherichia coli* HB 101.

5. Remichkova, M., Danova, S., Tucureanu, C., Lerescu, L., Salageanu, A. & Dimitrova, P. 2009, "Effect of *Candida albicans* dsDNA in gastrointestinal *Candida* infection", *Mycopathologia*, vol. 167, no. 6, pp. 333-340.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11046-009-9185-9>  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19833&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Tyrphostin AG490 is a Janus kinase (JAK) 2 inhibitor that is clinically used as an anticancer agent and is also effective in various models of inflammatory and autoimmune diseases. In this study, we examined the effects of tyrphostin AG490 on the development of collagenase-induced osteoarthritis (CIOA). Our results showed that tyrphostin ameliorated cartilage and bone destructions. This effect was associated with decreased expression of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3), phosphorylated JAK2, Dickkopf homolog 1, and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) in the joints of arthritic mice. Tyrphostin AG490 suppressed STAT3 phosphorylation and the expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and RANKL by synovial fluid cells. The drug inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation in vitro. Molecules, such as tyrphostin AG490 that limit bone erosion and influence osteoclast generation, might have therapeutic utility in joint degenerative disorders.

**Резюме:** Тирфостин AG490 е инхибитор (JAK) 2, който се използва клинично като противораково средство и е ефективен при различни модели възпалителни и аутоимунни заболявания. В това проучване изследвахме ефектите на тирфостин AG490 върху развитието на индуциран от колагеназа остеоартрит (CIOA). Нашите резултати показваха, че тирфостинът подобрява хрущялите и костните деструкции. Този ефект е свързан с намалена експресия на сигнални преобразуватели и активатори на транскрипция 3 (STAT3), фосфорилиран JAK2, хомолог Dickkopf 1 и рецепторен активатор на ядрен фактор κВ лиганд (RANKL) в ставите на артритни мишки. Тирфостин AG490 потиска фосфорилирането на STAT3 и експресията на свързания с тумор некротизиращ фактор апоптоза индуциращ лиганд и RANKL от клетки на синовиалната течност. Лекарството инхибира индуцирана от RANKL диференциация на остеокластите *in vitro*. Молекулите, като тирфостин AG490, които ограничават ерозията на костите и влияят върху генерирането на остеокласти, могат да имат терапевтична полза при дегенеративни изменения на ставите.

6. Gyurova, A.Y., Doltchinkova, V., Georgieva, R., **Danova, S.** & Stoylov, S.P. 2013, "Low frequency electric polarizability and zeta-potential of *Escherichia coli* HB101 (K-12) cells during inactivation with ethanol", Central European Journal of Chemistry, vol. 11, no. 5, pp. 801-810. ISSN: 1895-1066 (Print) 1644-3624  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=145739&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** The electric properties of bacteria determine their non-specific interactions with the environment, in particular their pathogenic activity. The electric polarizability of *Escherichia coli* HB101 (K-12 strain) was studied while inactivation with ethanol (20-40 vol.%). The current investigation might be regarded as a continuation of previous research on the polarizability of *E. coli* at lower ethanol concentration ( $\leq 20$  vol.%) and higher frequencies ( $\geq 20$  kHz).

**Резюме:** Електрическите свойства на бактериите определят тяхното неспецифично взаимодействие с околната среда, по-специално тяхната патогенна активност. Изследвана е електрическата поляризуемост на *Escherichia coli* HB101 (щам K-12) при инактивиране с етанол (20-40 об.%). Настоящото изследване може да се разглежда като продължение на предишни изследвания на поляризуемостта на *E. coli* при по-ниска концентрация на етанол ( $\leq 20$  об.%) и по-високи честоти ( $\geq 20$  kHz).

7. Tropcheva, R., Lesev, N., **Danova, S.**, Stoitsova, S. & Kaloyanova, S. 2015, "Novel cyanine dyes and homodimeric styryl dyes as fluorescent probes for assessment of lactic acid bacteria cell viability", Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, vol. 143, pp. 120-129. Link paper:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134415000068>  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=17622&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Innovations in labeling techniques and in the design and synthesis of dye structures are closely related to the development of service equipment such as light sources and detection methods. Novel styryl homodimers and monomethine cyanine dyes were synthesized and their staining abilities for discrimination between live and dead lactic acid bacterial cells were investigated. The dyes were combined in pairs based on their excitation and emission maxima and the capacity to penetrate through cell membranes of viable bacterial cells. The absorption maxima in the same region and the large Stokes shifts of the styryl derivatives allowed viability analysis to be done with epifluorescent microscope with a very basic configuration – one light source about 480 nm and one filter for the fluorescent emissions. A staining protocol was developed and applied for live/dead analysis of Bulgarian yoghurt starters. The live cells quantification by the fluorescence dyes coincided well with the results of the much more time-consuming tests by plate counting. Thus, the proposed dye combinations are appropriate for rapid viability estimation in small laboratories that may have conventional equipment.

**Резюме:** Иновациите в техниките за етикетиране и в проектирането и синтеза на багрилни структури са тясно свързани с развитието на сервизно оборудване като източници на светлина и методи за откриване. Бяха синтезирани нови стирилни хомодимери и монометинови цианинови багрила и бяха изследвани техните оцветяващи способности за дискриминация между живи и мъртви млечнокисели бактериални клетки. Багрилата се комбинират по двойки въз основа на техните възбудителни и емисионни максимуми и способността да проникват през клетъчните мембрани на жизнеспособни бактериални клетки. Максимумите на абсорбция в същия регион и големите промени в запасите на стироловите производни позволиха да се направи анализ на жизнеспособността с епифлуоресцентен микроскоп с много основна конфигурация - един източник на светлина около 480 nm и един филтър за флуоресцентните емисии. Разработен е протокол за оцветяване, който се прилага за анализ на живо / мъртво на предястия от българско кисело мляко. Количественото определяне на живите клетки от флуоресцентните оцветители съвпада добре с резултатите от много по-трудоемките тестове чрез броене на плочки. По този начин предложените комбинации от багрила са подходящи за бърза оценка на жизнеспособността в малки лаборатории, които могат да разполагат с конвенционално оборудване.

8. Pavlova Hristova, I., Danova, S., Naidenski, H., Tropcheva, R. & Milanova, A. 2015, "Effect of probiotics on enrofloxacin disposition in gastrointestinal tract of poultry", Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, vol. 38, no. 6, pp. 549-555.

**Link:** <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvp.12232>  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=23129&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Expression of peptide transporter 1 (PepT1) and liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) in chickens can be influenced by food deprivation, pathological conditions and drug administration. Effect of three putative probiotic Lactobacillus strains and enrofloxacin on the expression of PepT1 and LEAP-2 mRNA was investigated in Ross 308 chickens. One- day-old chicks (n = 24) were allocated to following groups: control (without

treatment); group treated with probiotics via feed; group treated with a combination of probiotics and enrofloxacin; and a group given enrofloxacin only. The drug was administered at a dose of 10 mg kg<sup>-1</sup>, via drinking water for 5 days. Samples from liver, duodenum and jejunum were collected 126 h after the start of the treatment. Expression levels of PepT1 and LEAP-2 were determined by real-time polymerase chain reaction and were statistically evaluated by Mann–Whitney test.

Enrofloxacin administered alone or in combination with probiotics provoked a statistically significant up-regulation of PepT1 mRNA levels in the measured organ sites. These changes can be attributed to a tendency of improvement in utilization of dietary peptide and in body weight gain. LEAP- 2 mRNA expression levels did not change significantly in enrofloxacin-treated chickens in comparison with control group.

**Резюме:** Експресията на пептиден транспортер 1 (PepT1) както и експресията в черния дроб на антимикробен пептид 2 (LEAP-2) при пилета може да бъде повлияна от лишаването от храна, от патологичните състояния и прилагането на лекарства. Влиянието на три кандидат-пробиотични *Lactobacillus* щамове и енрофлоксацин върху експресията на иРНК, PepT1 и LEAP-2 е изследвано при пилета Ross 308. Еднодневни пилета (n = 24) бяха разпределени в следните групи: контрола (без лечение); група, лекувана с пробиотици подавани чрез фуража; група, лекувана с комбинация от пробиотици и енрофлоксацин; и група, на която е даден само енрофлоксацин. Лекарството се прилага в доза от 10 mg x kg<sup>-1</sup>, чрез питейна вода в продължение на 5 дни. Пробиотици от черен дроб, дванадесетопръстник и йеюнум бяха събрани 126 часа след началото на лечението. Експресионните нива на PepT1 и LEAP-2 са определени чрез полимеразно - верижна реакция в реално време и са оценени статистически чрез тест на Ман-Уитни.

Енрофлоксацин, прилаган самостоятелно или в комбинация с пробиотици, провокира статистически значимо повишаване на нивата на иРНК, PepT1 в измерените места на органите. Тези промени могат да се отдадат на тенденцията за подобряване на използването на диетичния пептид за увеличаването на телесното тегло. Нивата на експресия на LEAP-2 и иРНК не се променят значително при пилета, лекувани с енрофлоксацин в сравнение с контролната група.

9. Yakovlieva, M., Tacheva, T., Mihaylova, S., Tropcheva, R., Trifonova, K., Tolekova, A., Danova, S. & Vlaykova, T. 2015, "Influence of *Lactobacillus brevis* 15 and *Lactobacillus plantarum* 13 on blood glucose and body weight in rats after high-fructose diet", *Beneficial Microbes*, vol. 6, no. 4, pp. 505-512.

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19700201534&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** In recent years, many authors have investigated the possible antidiabetic effect of lactic acid bacteria. *Lactobacillus* species constitute a major part of the lactic acid bacteria group and have been found to exhibit beneficial effects on the development of diabetes and its complications. In the current study, we investigated the effects of newly characterised Bulgarian *Lactobacillus* strains, *Lactobacillus brevis* 15 and *Lactobacillus plantarum* 13, on blood glucose levels and body weight of rats fed a fructose-enriched diet. An experiment was conducted over a period of 8 weeks with 24 2-month-old Wistar rats randomly assigned to receive a standard diet (Con, control group), fructose-enriched diet (Fr group), standard diet

with probiotics given twice a week (Pro group), and fructose-enriched diet with probiotics given twice a week (Pro+Fr group). At the end of the experimental period, a statistically significant increase in body weight was observed in all experimental groups ( $P < 0.0001$ ). The highest rise was seen in the fructose group (Fr,  $169 \pm 19$  g), followed by the Pro+Fr group ( $153 \pm 15$  g), Pro group ( $149 \pm 13$  g), and Con group ( $141 \pm 5$  g). Moreover, the final blood glucose levels had risen significantly in the groups receiving fructose either without (Fr;  $P < 0.0001$ ) or with lactobacilli (Pro+Fr;  $P = 0.002$ ), while the rise was insignificant in the group of rats given probiotic supplementation only (Pro,  $P = 0.071$ ) and inexistent in the Con group ( $P = 0.999$ ). The highest elevation of blood glucose levels was observed in the Fr group ( $3.18$  mmol/l), followed by the Pro+Fr group ( $2.00$  mmol/l) whereas the Pro group showed the lowest levels ( $0.60$  mmol/l). The results of our study suggest that the newly characterised Bulgarian *Lactobacillus* strains, *L. brevis* 15 and *L. plantarum* 13, could be considered as possible probiotics and might be able to prevent some metabolic disturbances..

**Резюме:** През последните години много автори изследваха възможния антидиабетен ефект на млечнокиселите бактерии. Видовете от род *Lactobacillus* представляват основна част от групата на млечнокиселите бактерии и е установено, че имат благоприятни ефекти относно развитието на диабета и неговите усложнения. В настоящото проучване изследвахме ефектите на новохарактеризирани български щамове *Lactobacillus* - *Lactobacillus brevis* 15 и *Lactobacillus plantarum* 13, върху нивата на глюкоза в кръвта и телесното тегло на плъхове, хранени с обогатена с фруктоза диета. Проведен е експеримент за период от 8 седмици с 24 броя, 2-месечни плъхове Wistar, произволно назначени да получават стандартна диета (Con, контролна група), обогатена с фруктоза диета (Fr група), стандартна диета с пробиотици, давана два пъти седмично (Pro група), и обогатена с фруктоза диетас пробиотици, давани два пъти седмично (група Pro + Fr). В края на експерименталния период статистически значимо нарастване на телесното тегло се наблюдава при всички експериментални групи ( $P < 0,0001$ ). Най-голямото покачване се наблюдава при фруктозата група (Fr,  $169 \pm 19$  g), последвана от групата Pro + Fr ( $153 \pm 15$  g), групата Pro ( $149 \pm 13$  g) и групата Con ( $141 \pm 5$  g). Освен това крайните нива на глюкоза в кръвта са се повишили значително в групите, приемащи фруктоза, (Fr;  $P < 0,0001$ ) или с лактобацили (Pro + Fr;  $p = 0,002$ ), докато покачването е незначително в групата на плъхчета, на които е даден само пробиотични добавки (Pro,  $P = 0,071$ ) и несъществени в групата Con ( $P = 0,999$ ). Най-високото ниво на нивата на глюкоза кръвта се наблюдават в групата Fr ( $3,18$  mmol / l), последвана от групата Pro + Fr ( $2,00$  mmol / l), докато Pro групата показва най-ниските нива ( $0,60$  mmol/l). Резултатите от нашето проучване показват, че новоохарактеризираните български щамове, *L. brevis* 15 и *L. plantarum* 13, биха могли да се разглеждат като възможни пробиотици и може да бъде в състояние да предотврати някои метаболитни нарушения.

**10.** Nemska Veronika, Georgieva Nelly, Lazarova, Nevena, **Danova Svetla** (2016). Isolation and identification of *Lactobacillus* spp., from traditional Bulgarian dairy products. 51, Issue 6, University of Chemical Technology and Metallurgy, 2016, ISSN:ISSN 1314-7471 (print) or ISSN 1314-7978 (on line), 693-704. SJR:0.19

**Abstract:** Over the last few years the traditional dairy products have been gaining much more popularity among scientists and consumers. They are a part of the nutritional diet of people since ancient times and are a proven source of lactic acid bacteria (LAB) with confirmed and beneficial effects on human health. LAB are the main cause of lactic acid fermentation and determine the specific properties of the resulting products. Home-made fermented dairy products are a part of the daily diet and tradition is saved in several rural regions of Bulgaria. However, the beneficial microbiota of some of them is poorly characterized. Therefore, any research aimed at the isolation and identification of LAB from traditional foods helps to define the autochthonous microbiota, which is typical for the area/product. With these aims 26 artisanal samples of 4 types Bulgarian dairy products: yoghurt, white-brined cheese, yellow cheese and curd, were collected. Their lactic microflora was studied and 74 pure cultures were isolated. They were identified as *Lactobacillus* spp. using classical approaches for identification. For this reason further characterization of the created collection of lactobacilli is considered perspective.

**Резюме:** През последните няколко години традиционните млечни продукти придобиват много по-голяма популярност сред учените и потребителите. Те са част от хранителната диета на хората от древни времена и са доказан източник на млечнокисели бактерии (LAB) с потвърдени и полезни ефекти върху човешкото здраве. LAB са в основата на млечнокиселата ферментация и определят специфичните свойства на получените продукти. Домашно приготвените ферментирани млечни продукти са част от ежедневната диета и традициите се съхраняват в няколко селски района на България. Полезната микробиота на някои от тях обаче е слабо характеризирана. Следователно, всяко изследване, насочено към изолирането и идентифицирането на LAB от традиционните храни, помага да се определи автохтонната микробиота, която е типична за района / продукта. С тези цели бяха събрани 26 домашно-приготвени проби от 4 вида български млечни продукти: кисело мляко, бяло саламурено сирене, кашкавал и извара. Изследвана е млечната им микрофлора и са изолирани 74 чисти култури. Те бяха идентифицирани като *Lactobacillus* spp. използвайки класически подходи за идентификация. Поради тази причина по-нататъшното характеризизиране на създадената колекция от лактобацили се счита за перспективно.

**II.** Nemska, V., Logar, P., Rasheva, T., Sholeva, Z., Georgieva, N., **Danova, S.** Functional characteristics of lactobacilli from traditional Bulgarian fermented milk products. Turkish Journal of Biology, 43, Academic Journals, 2019, ISSN:ISSN: 1300-0152, DOI:doi:10.3906/biy-1808-34, 148-153.

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=4700152284&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** After oral administration, probiotic lactobacilli meet a number of protection systems in the human body, such as exposure to gastric, pancreatic, and small intestinal juices. Overcoming these detrimental barriers allows living bacteria to adhere to the intestinal epithelium and permanently colonize the gastrointestinal tract (GIT), providing health benefits to the host. Based on this, the transit tolerance of 25 candidate probiotic lactobacilli from katak,



yoghurt, and white-brined and yellow cheese to simulated bile and small intestinal juices of variable pH was investigated. To establish their resistance, *in vitro* model systems based on modified MRS media and a longer duration of action (up to 24 h of incubation) were designed. Six of the strains studied were found to show strain-specific survival capacity with low viability in conditions simulating stomach acidity and high resistance to bile and intestinal juices. In addition, the adherence capability (autoaggregation and hydrophobicity) of the strains was determined. Obtained results allowed to select *Lactobacillus* strains with high survival ratios while passing through the GIT and good adherence properties, which make them suitable for the development of new probiotics.

**Резюме:** След перорално приложение пробиотичните лактобацили са подложени на въздействието на редица защитни системи в човешкото тяло, като излагане на стомашни, панкреатичен и чревни сокове. Преодоляването на тези увреждащи микробите бариери позволява на живите МК да достигнат и да се прикрепят към чревния епител като трайно да колонизират стомашно-чревния тракт (ГИТ), осигурявайки трайни ползи за здравето на гостоприемника. Въз основа на това бе изследван транзитният толеранс на 25 кандидат-пробиотични лактобацили от катак, кисело мляко, бяло саламурено и кашкавал към симулирани сокове на жлъчката и тънките черва с променливо рН. За да се установи пробиотичната устойчивост на изпитваните МКБ, са дизайнвани *in vitro* моделни системи, базирани на модифицирана MRS среда и по-голяма продължителност на действие (до 24 часа инкубация). Установено е, че шест от изследваните щамове показват специфичен за щамата капацитет за оцеляване с ниска жизнеспособност в условия, симулиращи стомашна киселинност и висока устойчивост на жлъчни и чревни сокове. В допълнение бе оценена способността за адхезия (по показателите автоагрегация и хидрофобност) на щамовете. Получените резултати позволиха да се изберат *Lactobacillus* щамове с високи съотношения на оцеляване при преминаване през ГИТ и добри адхезионни свойства, което ги прави подходящи за разработването на нови пробиотици.

12. Nemska V., Georgieva N., Miteva-Staleva J., Krumova E., **Danova S\***. Antifungal activity of *Lactobacillus* ssp. from traditional Bulgarian dairy products. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, Издателство на БАН "Проф. Марин Дринов", 2019, <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=31728&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Recently, biopreservation has been used as an alternative to chemical additives for increasing shelf-life storage and enhancing safety of food by using its natural microflora and its antimicrobial products. The aim of this study was to investigate the antifungal activity of different lactobacilli, isolated from home-made dairy products (katak, yoghurt, white-brined and yellow cheeses), against test cultures of *Candida* and *Aspergillus* spp. Thirty-three acid cellfree supernatants (aCFS) of *Lactobacillus* strains were investigated for their anti-*Candida* activity, using the agar-diffusion method. Results showed that 9% of them were active against *Candida albicans* 72 and *C. albicans* 74. Furthermore, the inhibitory effect of 12 of the *Lactobacillus* strains was examined against *Aspergillus niger* MIC05/26 in a model system with 24-well-microplates and in model yoghurts fermented with the investigated lactobacilli. A

strainspecific effect of lactobacilli on the growth and sporulation of the moulds was observed. In addition, two of the *Lactobacillus* strains, alone and in combination, showed index of inhibition of 92.5% against *A. niger* MIC05/26 using a modified protocol of the agar-diffusion method.

**Резюме:** Напоследък био-консервацията се използва като алтернатива на химическите добавки за увеличаване на срока на съхранение и повишаване на безопасността на храните чрез използване неговата естествена микрофлора и нейните антимикробни продукти. Целта на това проучване бе да се изследва противогъбичната активност на различни лактобацили, изолирани от домашно приготвени млечни продукти (катак, кисело мляко, бяло саламурено и кашкавал), срещу тест - култури на *Candida* и *Aspergillus* spp. Тридесет и три кисели безклетъчни супернатантите (кСФС) от щамовете *Lactobacillus* са изследвани за тяхната анти-*Candida* активност, използвайки метода на дифузия в агар-. Резултатите показаха че едва 9% от тях са активни срещу *Candida albicans* 72 и *C. albicans* 74. Освен това, бе изследван инхибиторния ефект на 12 от щамовете *Lactobacillus* срещу *Aspergillus niger* MIC05/26 в моделна система с микроплаки с 24 ямки и в моделни кисели млека, ферментирани с изследваните лактобацили. Щамово -специфичен ефект на лактобацилите върху растежа и спорообразуването на плесените беше наблюдаван. В допълнение, два от *Lactobacillus* щамовете, самостоятелно и в комбинация, показа индекс на инхибиране от 92,5% срещу *A. niger* MIC05 / 26, използвайки модифициран протокол на агар-дифузионния метод.

#### IV. ГРУПА Г: НАУЧНИ ТРУДОВЕ, КОИТО ИЗПЪЛНЯВАТ ИЗИСКВАНИЯТА НА ЧЛ. 26 ОТ ЗРАСРБ

##### МОНОГРАФИИ , ГЛАВИ ОТ КНИГИ, СТУДИЯ, СТАНОВИЩА:

I Данова С\*. (2011) „Пробиотици –за функционални храни и здраве», експертно становище, публикувано на сайта на Българския фокален център представител на European Food Safety Authority (EFSA).

[http://focalpointbg.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=630%3A2011-12-05-15-49-25&catid=45%3A2010-01-15-12-09-13&Itemid=93&lang=bg](http://focalpointbg.com/index.php?option=com_content&view=article&id=630%3A2011-12-05-15-49-25&catid=45%3A2010-01-15-12-09-13&Itemid=93&lang=bg) (Д2)

**Abstract:** The probiotics are a concept from the beginning of the 20<sup>th</sup> century, which is increasingly encountered by the modern consumer. Moreover, today they are an accepted and scientifically proven valuable component of the food chain, with an important role for good physiological status, healthy balance and disease prevention in humans and animals. Probiotics, from the ancient Greek "Pro" (for) and "Bio" (life), are "Living organisms that, when taken in appropriate amounts, have a healthy effect on the body" (WHO, 2002). Probiotics are not a panacea, however a biological approach that naturally turns "food into medicine and medicine into food" and helps us to stay healthy. The role of scientists and experts is to make the right selection and control of their application so that there is no risk and to ensure health. This

opinion addresses key issues related to probiotics (definition, application and selection criteria) as well as health claims and probiotics (current issues and prospects) in the light of the existing European Community regulatory framework (history, policy and key provisions). New challenges in probiotic research are the creation of modern forms of food, supplements and therapeutics that meet the safety requirements - safety, convenience and usefulness according to European regulatory frameworks, as well as to provide knowledge about the genetic basis and molecular mechanisms of action, to ensure optimal health for each individual. This will allow the creation of the so-called. targeted probiotic preparations that will best meet the needs of the target groups of consumers, without risk in their application.

**Резюме:** Пробиотиците са понятие от началото на 20 век, с което все по-често се среща съвременният консуматор. Нещо повече днес те са приети и научно доказан полезен компонент от хранителната верига, с важна роля за добрия физиологичен статус, здравословен баланс и превенция на заболяванията при хора и животни. Пробиотици, от старогръцки „Pro” (за) и „Bio” (живот), са „Живи организми, които приети в съответните количества оказват здравословен ефект върху организма” (СЗО, 2002 г.). Пробиотиците не са панацея, но са биологичен подход, който по естествен начин превръща „храната в лекарство, а лекарството в храна” и ни помага да бъдем здрави. Ролята на учени и експерти е да осъществят правилния подбор и контрол на прилагането им за да няма риск и да се гарантира здравето. Настоящото становище разглежда основни въпроси, свързани с пробиотиците (дефиниция, приложение и критерии за подбор), както и здравни претенции и пробиотици (проблеми на настоящето и перспективи) в светлината на съществуващите регулаторни рамки на Европейската общност (история, политика и ключови разпоредби). Новите предизвикателства в научните изследвания на пробиотиците са създаването на модерни форми на храни, добавки и терапевтици, покриващи изискванията за сигурност - безопасност, удобство и полезност съгласно Европейските регулаторни рамки, както и да се предоставят знания за генетичните основи и молекулни механизми на полезно действие, които да осигуряват оптимално здраве за всеки индивид. Това ще позволи създаването на т.нар. целеви пробиотични препарати, които най-точно ще отговарят на нуждите на целевите групи от консуматорите, без риск при тяхното прилагане.

2 **Danova S\***, Tropcheva R., Ivanovska N., Georgieva R., Dobрева-Yosifova G., Petrova M., Koleva P., Dermendvjieva J. and Dimitonova S. (2012) Characterisation of Bulgarian lactobacilli as probiotics. Jubilee book: New trends in microbiology, ISBN 978-954-92882-1-6, p.177-192.

**Abstract:** The consumption of fermented foods has increased greatly since the 1970s. This includes not only common foods such as dairy products (yogurt, cheese, buttermilk, and cream), fermented sausages, sourdoughs, fermented alcoholic beverages, vegetables, fruits, and sauces but also ethnic foods such as kefir and koumiss. Lactic acid bacteria (LAB) are among the first organisms to be used in the manufacture of these appetizing and well-accepted foods by consumers (Holzapfel, 2002). Today LAB play a crucial role in the production of fermented

foods, vegetables, and meat, as well as drugs against intracellular targets. One of the reasons for the increase in consumption of fermented dairy products is customer's consideration that these foods are healthy and natural. The presence of billions of live cells of desirable microorganisms and their metabolic products in fermented foods does not cause any panic or distress among safety-concerned consumers. These foods have been used for thousands of years and therefore have withstood the test of time. For this reason, an important task for microbiologists is to investigate fermentation processes and microbiota responsible for their production and preserve them for further application in functional foods.

**Резюме:** Консумацията на ферментирани храни се е увеличила значително от 70-те години на миналия век. Това включва не само често срещани храни като млечни продукти (кисело мляко, сирене, мътеница и сметана), ферментирани колбаси, закваски, ферментирани алкохолни напитки, зеленчуци, плодове и сосове, но и етнически храни като кефир и кумис. Млечнокиселите бактерии (LAB) са сред първите организми, които се използват при производството на тези апетитни и добре приети от потребителите храни (Holzapfel, 2002). Днес LAB играят решаваща роля в производството на ферментирани храни, зеленчуци и месо, както и лекарства срещу вътреклетъчни цели. Една от причините за увеличаване на консумацията на ферментирани млечни продукти е съображението на клиента, че тези храни са здравословни и естествени. Наличието на милиарди живи клетки от желани микроорганизми и техните метаболитни продукти във ферментиралите храни не предизвиква никаква паника или стрес сред загрижените за безопасността потребители. Тези храни се използват от хиляди години и следователно издържат на изпитанието на времето. Поради тази причина важна задача за микробиолозите е да изследват ферментационните процеси и микробиотите, отговорни за тяхното производство, и да ги консервират за по-нататъшно приложение във функционални храни.

3 **Danova. S. \***, V Nemska, R Tropcheva (2017) Yogurt in Health and Disease Prevention, edited by: Nagendra P. Shah, Chapter 18 Bulgarian Yogurt-Like Product "Katak", 307-329., Elsevier, 2017, ISBN: 978-0-12-805134-4

**Abstract:** Dairy products supplemented with probiotic cultures are a widely accepted approach in the development of functional foods. Moreover, this is the easier way to administrate and to deliver a probiotic culture to the consumers. With this aim, four potential probiotic strains, belonging to the species *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* were preselected as probiotic adjuncts to Bulgarian yogurt. The sensory properties of fermented products, enriched with these cultures, were evaluated using descriptive analyses. The tests were conducted to establish the differences between probiotic and standard yogurts and to estimate the technological relevance of preselected strains. At the end of the storage period, a high ratio of survival and strain-specific effects on sensory quality of the obtained fermented milks were detected with greater influence on the flavor/taste. The *L. plantarum* was estimated as the most appropriate adjunct, with a positive effect on sensory properties of typical Bulgarian yogurt.

**Резюме:** Млечните продукти, допълнени с пробиотични култури, са широко приет подход при разработването на функционални храни. Освен това това е по-лесният начин

за администриране и за доставяне на пробиотична култура на потребителите. С тази цел четири потенциални пробиотични щама, принадлежащи към видовете *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus brevis* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* са предварително избрани като пробиотични добавки към българското кисело мляко. Сензорните свойства на ферментиралите продукти, обогатени с тези култури, бяха оценени с помощта на описателни анализи. Тестовете бяха проведени, за да се установят разликите между пробиотичните и стандартните кисели млека и да се оцени технологичното значение на предварително избраните щамове. В края на периода на съхранение беше установено високо съотношение на оцеляване и специфични за щама ефекти върху сензорното качество на получените ферментирани млека с по-голямо влияние върху вкуса / вкуса. *L. plantarum* е оценен като най-подходящото допълнение, с положителен ефект върху сензорните свойства на типично българско кисело мляко.

**4 Danova S\***. and Nemska V. (2017) Lactic acid microbiota of traditional Bulgarian cheese and yogurt - 70 years The Stephan Angeloff Institute of Microbiology Jubilee Book: ‘*Microbiology for a better health and industry*’, София, 2017, pp. 51-61; ISBN 978-954-92882-2-3

**Abstract.** The eternal aspiration of people for health and longevity stimulates the necessity of a change in the contemporary nutrition habits and industrial practices of modern societies. This increases the interest towards the lactic acid bacteria (LAB). They play a major role in determining the organoleptic properties and healthy effects of fermented milks and related products. However, little is known on the biodiversity and beneficial role of autochthonous lactic microbiota of artisanal milk products. With this aim, several home-made samples of cheeses and yogurt are collected from Western; North-Western and Central part of Bulgaria. A rich microbiota has been estimated, together with high sanitary quality of the tested dairy products. As a result a collection of more than 100 LAB cultures was created. 72 strains, isolated from artisanal samples of cheese and yogurt, were characterised. Two major axes were followed: biodiversity and food bio-preservation and/or possible beneficial effects on consumers' health. Thus, the antimicrobial activity against *Escherichia coli* and food-spoilage bacteria was a pre-selective criterion. Selected active lactobacilli were identified according to the modern polyphasic taxonomy to the species *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus fermentum*. The stable domination of species from *L. plantarum* and *L. casei* group were shown in artisanal samples of cheese, prepared according to tradition, without industrial starters.

**Резюме:** Вечният стремеж на хората за здраве и дълголетие стимулира необходимостта от промяна в съвременните хранителни навици и промишлени практики в модерните общества. Това повишава интереса към млечнокиселите бактерии (МКБ). Те играят важна роля при определяне на органолептичните свойства и здравните ефекти на ферментационните млечни продукти. Независимо от биотехнологичната значимост на МКБ, малко се знае за биоразнообразието и полезната роля на автохтонната млечна микрофлора на традиционните млечни продукти. За целта са събрани различни домашни проби бяло саламурено сирене и кисело мляко, приготвени по традиционна технология в Западна, Северозападна и в Централната част на България. Установена е богата микрофлора, заедно с високо санитарно качество на изследваните традиционни за българина продукти. От различните морфотипове са подбрани и изолирани над

100 МКБ. От тях 72 щамове, от домашни проби сирене и кисело мляко, са характеризирани. В комплексната оценка на създадената колекция от МКБ са изследвани две основни направления: (1) биоразнообразие и био-консервиране на храни и/или (2) възможни *благоприятни ефекти* върху здравето на потребителите. Предварителен критерий за подбор на щамове е антимикробната активност срещу *Escherichia coli* и причиняващи развала на храните бактерии. Избраните активни лактобацили са идентифицирани в съответствие с изискванията на модерната полифазна таксономия като представители на видовете *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus fermentum*. В допълнение е създаден оригинален протокол за директен PCR анализ на виталната микробиота в изследваните продукти. С негова помощ е доказано стабилното доминиране на видове от групата на *L. plantarum* и *L. casei* в домашни проби от сирене, получено съгласно традиционните рецепти, без добавка на индустриални закваски. Получените данни допълват информацията за микрофлора на млечни продукти, традиционни за Югоизточна Европа и в частност Балканите.

4. **Danova S\***, Nemska V. P., Georgieva N. V., Tropcheva R. V. Bulgarian White - brined Cheese: Beneficial Microbiota and Technology for Development of New Functional Foods. Verma D. K., Patel A., Nihir P. Shah N. P., Srivastav P. P. (Eds.) Functional Food and Potential Health Benefits- Recent Trends and Advances, Apple Academic Press, 2020 (in press).

**Abstract:** The food culture of the Balkan Peninsula depends on common historical, geographical, climatic, social and religious elements which determine the high similarity in consumed traditional fermented products. The most popular and daily consumed ones are yoghurt and cheese. The cheese market in Balkan countries is dominated by white-brined cheese. The white-brined cheese is a typical Bulgarian product with a characteristic taste and quality. This cheese belongs to the group of semi-hard cheeses, ripened in brine. In the present review, we summarized the existing data on the old Bulgarian tradition and technology of white-brined cheese-making and its functional characteristics. Simultaneously, we present new data on the biodiversity and vitality of the non-starter or autochthonous microbiota of this type of cheese. Genetic characterization of species affiliation, including at the strain level, of more than 100 lactic acid bacteria, isolated in our lab from samples of Bulgarian white-brined cheese, was shown. *Lactobacillus plantarum* was found to be the most dominant species in the non-starter microbiota of the Bulgarian white-brined cheese. Some functional and technological characteristics of the newly isolated lactobacilli were studied as well. The assessment of prebiotics utilization was estimated in a model system. As a very important criterion in the selection of candidate probiotic strains, the antibacterial activity of our isolates was studied in details. Broad spectrum of antibacterial activity of our lactobacilli, was demonstrated against reference bacterial cultures and human pathogens, including out-patient multi-resistant strains. The results were obtained during 20 years of research on lactic acid bacteria in our scientific institutions in Bulgaria. Presented data on vitality, biodiversity and beneficial properties of lactic acid microbiota in one not well-studied artisanal product allows us to conclude that together with the worldwide accepted probiotic product – the famous Bulgarian yoghurt, the white-brined cheese can probably be the other dairy product which can answer to the new consumers` demands for a consumption of healthier foods or to be a source of lactobacilli which can be applied in different probiotic formulas, synbiotic products or as a bio-preservatives.

**Резюме:** Културата на хранене на Балканския полуостров зависи от общи исторически, географски, климатични, социални и религиозни елементи, които определят голямото сходство в консумираните традиционни ферментирани продукти. Най-популярните и ежедневно консумирани са киселото мляко и сиренето. Пазарът на сирене в балканските страни е доминиран от бяло саламурено сирене. Бялото саламуреното сирене е типичен български продукт с характерен вкус и качество. Това сирене принадлежи към групата на полутвърдите сирена, узрели в саламура. В настоящия обзор обобщаваме съществуващите данни за старата българска традиция и технология за производство на бяло саламурено сирене и неговите функционални характеристики. Едновременно с това представяме нови данни за биологичното разнообразие и жизнеността на не-стартерната или автохтонна микробиота от този вид сирене. Показана е генетичната характеристика на видовата принадлежност, включително на ниво щам, на повече от 100 млечнокисели бактерии, изолирани в нашата лаборатория от проби от българско бяло саламурено сирене. Установено е, че *Lactobacillus plantarum* е доминиращият вид в нестартерната микробиота на българското бяло саламурено сирене. Изследвани са и важни функционални и технологични характеристики на новоизолираните лактобацили. Оценката на използването на пребиотици беше оценена в моделна система. Като много важен критерий при избора на кандидат пробиотични щамове, антибактериалната активност на нашите изолати беше изследвана в детайли. Широк спектър на антибактериална активност на нашите лактобацили бе демонстриран срещу референтни бактериални култури и човешки патогени, включително амбулаторни мулти-резистентни щамове. Резултатите са получени по време на 20-годишно изследване на млечнокисели бактерии в 3те научни институции в България. Представените данни за жизнеността, биологичното разнообразие и полезните свойства на млечнокиселата микробиота в един непроучен занаятчийски продукт ни позволяват да заключим, че заедно с общоприетия пробиотичен продукт - известното българско кисело мляко, сиренето с бяло саламура може би може да бъде другата млечна продукция продукт, който може да отговори на изискванията на новите потребители за консумация на по-здравословни храни или да бъде източник на лактобацили, които могат да се прилагат в различни пробиотични формули, синбиотични продукти или като биоконсерванти.

#### **СТАТИИ В РЕФЕРИРАНИ МЕЖДУНАРОДНИ И БЪЛГАРСКИ ИЗДАНИЯ**

5. Stoyancheva, G.D., **Danova, S.T\***. & Boudakov, I.Y. 2006, "Molecular identification of vaginal lactobacilli isolated from Bulgarian women", Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, vol. 90, no. 3, pp. 201-210. <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=14944&tip=sid&clean=0> (Д2) ИФ1.964; Q1 0.851

**Abstract:** Lactobacilli play an important role in maintaining the vaginal health of women. The development of suitable bacterial replacement therapies for the treatment of vaginosis requires knowledge of the vaginal lactobacilli species representation. The aim of this study was to identify at the species level vaginal *Lactobacillus* isolates obtained from Bulgarian women in

childbearing age by using different molecular methods. Twenty-two strains of lactobacilli isolated from vaginal samples were identified and grouped according to their genetic relatedness. A combined approach, which included amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), ribotyping and polymerase chain reaction (PCR) with species-specific oligonucleotide primers was applied. All vaginal isolates were grouped into 5 clusters in comparison with a set of 21 reference strains based on the initial ARDRA results, which was then confirmed by ribotyping. Finally, the strains were subjected to PCR analysis with eight different species-specific primer pairs, which allowed most of them to be classified as belonging to one of the following species: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum*. In conclusion, this study suggests that the most straightforward identification strategy for vaginal lactobacilli would be grouping by ARDRA or ribotyping, followed by PCR specific primers identification at species level.

**Резюме:** Лактобацилите играят важна роля за поддържане на вагиналното здраве на жените. Разработването на подходящи бактериални заместителни терапии за лечение на вагиноза изисква познание върху представянето на вагиналните лактобацили. Целта на това проучване бе да се идентифицират на видово ниво вагинални *Lactobacillus* изолати, получени от български жени в детородна възраст чрез използване на различни молекулярни методи. Двадесет и два щамове лактобацили, изолирани от вагинални проби, бяха идентифицирани и групирани според тяхната генетична свързаност. Приложен бе комбиниран подход, който amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), риботипиране и полимеразно верижна реакция (PCR) с видово-специфични олигонуклеотидни праймери. Всички вагинални изолати бяха групирани в 5 клъстера в сравнение с набор от 21 референтни щамове въз основа на първоначалните резултати от ARDRA, което след това бе потвърдено чрез риботипиране. Накрая щамове бяха подложени на PCR анализ с осем различни видоспецифични двойки праймери, което позволи повечето от тях да бъдат класифицирани като принадлежащи към един от следните видове: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus plantarum*. В заключение, това проучване предполага, че най-ясната стратегия за идентифициране на вагиналните лактобацили ще бъде групиране чрез ARDRA или риботипиране, последвано от видово-специфична PCR идентификация със съответните праймери на ниво вид.

6. Angelova, L., Dalgarrondo, M., Minkov, I., **Danova, S.**, Kirilov, N., Serkedjieva, J., Chobert, J.-., Haertlé, T. & Ivanova, I. 2006, "Purification and characterisation of a protease inhibitor from *Streptomyces chromofuscus* 34-1 with an antiviral activity", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1760, no. 8, pp. 1210-1216, <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=16829&tip=sid&clean=0> (Д2) ИФ 2.146 Q2 0.975

**Abstract:** The aim of this study was to purify and characterise a novel protease inhibitor (PISC-2002) isolated from culture supernatants of *Streptomyces chromofuscus*. PISC-2002 was purified by anion-exchange chromatography, and RP-HPLC analysis. PISC-2002 had a molecular mass of 11.2 kDa and a high content of hydrophobic amino acids and proline. N-terminal sequence gave two sequences



differing by one residue. The main sequence is ASLPAVSALVLTV and the shorter sequence is SLPAVSALVLTV. This shows its homology to *Streptomyces subtilisin inhibitor* family. Besides its large spectrum of powerful inhibitory activities against various serine proteases, PISC-2002 displayed significant antiviral effect against influenza virus A/Rostock/34 (H7N7). © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Резюме:** Целта на това проучване е да се пречисти и характеризира нов протеазен инхибитор (PISC-2002), изолиран от супернатантите на култура на *Streptomyces chromofuscus*. PISC-2002 се пречиства чрез анионообменна хроматография и RP-HPLC анализ. PISC-2002 има молекулна маса 11,2 kDa и високо съдържание на хидрофобни аминокиселини и пролин. N-терминалният край дава две последователности, различаващи се по един остатък. Основната последователност е ASLPAVSALVLTV, а по-късата е SLPAVSALVLTV. Това показва неговата хомология с фамилията инхибитори на *Streptomyces subtilisin*. Освен широкия си спектър от мощни инхибиторни действия срещу различни серинови протеази, PISC-2002 показва значителен антивирусен ефект срещу грипния вирус А / Rostock / 34 (H7N7).

7. Todorov, S.D., **Danova, S.T.**, Van Reenen, C.A., Meincken, M., Dinkova, G., Ivanova, I.V. & Dicks, L.M.T. 2006, "Characterization of bacteriocin HV219, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 isolated from human vaginal secretions", *Journal of Basic Microbiology*, vol. 46, no. 3, pp. 226-238. <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=20221&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Bacteriocin HV219, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219, is active against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Activity was lost when treated with proteolytic enzymes, SDS, Triton X-114 and Triton X-100, but not at pH 2.0 to 10.0 or after 20 min at 121 °C. Growth in the presence of yeast extract as sole nitrogen source yielded 3200 AU/ml. No bacHV219 activity was recorded in MRS broth with maltose, mannose, lactose or sucrose as sole carbohydrate, but fructose yielded 1600 AU/ml. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at 10.0 g/l yielded 3200 AU/ml. Addition of 1.0 mg/l cyanocobalamin, L-ascorbic acid and thiamine to MRS broth yielded 3200 AU/ml, 1600 AU/ml and 1600 AU/ml, respectively. The mode of activity is bacteriolytic, as confirmed by atomic force microscopy. A number of lactic acid bacteria, mainly *Lactobacillus* spp., have been isolated from the human vagina (FERNANDES et al. 1987, LIDBECK and NORD 1993, SILVESTER and DICKS 2003). Several papers have been published on the antimicrobial activity of vaginal lactic acid bacteria, mostly *Lactobacillus* spp. (COLLINS and HARDT 1980, MCGROARTY 1993, MITAL and GARG 1995, OKKERS et al. 1999, REDONDO-LOPEZ et al. 1990). In most cases microbial inhibition was attributed to the production of organic acids, diacetyl and hydrogen peroxide (NES and JOHNSBORG 2004). Lactic acid bacteria are known for their production of antimicrobial peptides, including bacteriocins (DE VUYST and VANDAMME 1994). Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* is probably the best studied and belongs to the class II bacteriocins (BERTRAND et al. 2001, MATSUSAKI et al. 1996, NOONPAKDEE et al. 2003). Bacteriocin 481, produced by *L. lactis* CNRZ 481 (PIARD et al. 1992); a nisin-like bacteriocin, produced by *L. lactis* A164 (CHEIGH et al. 2002); lactococcin MMFII, produced by *L. lactis* MMFII (FERCHICHI et al. 2001); a bacteriocin produced by *L. lactis* KSA2386 (KO and AHN 2000) and lacticin NK24, produced by *L. lactis* NK24 (LEE and PAIK 2001) are less well studied. Little is known about the influence of medium composition on the production of bacteriocins produced by *Lactococcus* spp., except for the studies conducted on nisin (DE VUYST 1995, DE VUYST and VANDAMME 1993), lacticin 481 (PIARD 1994) and bacteriocin ST34BR (TODOROV and DICKS 2004). Of all mentioned bacteriocins, only KSA2386, ST34BR and

lacticin NK24 have a broad-spectrum of activity, which includes the inhibition of Gram-negative bacteria (KO and AHN 2000, LEE and PAIK 2001, TODOROV and DICKS 2004).

Bacteriocin production does not always correlate with the increase in cell mass or growth rate of the producer strain (BOGOVIC-MATIJASIC and ROGELJ 1998, KIM et al. 1997). Higher bacteriocin levels are often recorded in the absence of growth stimulating nutrients, or at temperatures and pH conditions lower than required for optimal growth (AASEN et al. 2000, KRIER et al. 1998, MATSUSAKI et al. 1996, TODOROV et al. 2000). Optimal bacteriocin production is often recorded in medium with limiting concentrations of sugars, nitrogen sources, vitamins and potassium phosphate, or when the medium pH is regulated (VIGNOLO et al. 1995). In this study we report the isolation and characterization of *L. lactis* subsp. *lactis* HV219, a strain isolated from vaginal secretions. The antimicrobial properties of bacteriocin HV219 is described and the growth conditions and medium composition required for optimal bacteriocin production are listed.

**Резюме:** Бактериоцин HV219, продуциран от *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219, е активен срещу Грампозитивни и Грам-отрицателни бактерии. Активността е загубена при третиране с протеолитични ензими, SDS, Triton X-114 и Triton X-100, но не при pH 2,0 до 10,0 или след 20 минути при 121 ° C. Ръстът в присъствието на дрожден екстракт като единствен източник на азот дава 3200 AU / ml. Не е регистрирана активност на bacHV219 в MRS бульон с малтоза, маноза, лактоза или захароза като единствен въглехидрат, но фруктозата дава 1600 AU / ml. К<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> при 10.0 g / l дава 3200 AU / ml. Добавянето на 1,0 mg / l цианокобаламин, L-аскорбинова киселина и тиамин към MRS бульон дава съответно 3200 AU / ml, 1600 AU / ml и 1600 AU / ml. Начинът на активност е бактериолитичен, както се потвърждава от атомно-силовата микроскопия. Редица млечнокисели бактерии, главно *Lactobacillus* spp., Са изолирани от човешката вагина (FERNANDES et al. 1987, LIDBECK and NORD 1993, SILVESTER and DICKS 2003). Публикувани са няколко статии за антимикробната активност на вагиналните млечнокисели бактерии, най-вече *Lactobacillus* spp. (COLLINS и HARDT 1980, MCGROARTY 1993, MITAL и GARG 1995, OKKERS et al. 1999, REDONDO-LOPEZ et al. 1990). В повечето случаи инхибирането на микробите се дължи на производството на органични киселини, диацетил и водороден прекис (NES и JOHNSBORG 2004). Млечнокиселите бактерии са известни с производството на антимикробни пептиди, включително бактериоцини (DE VUYST и VANDAMME 1994). Низин, лантибиотик, произведен от *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* е може би най-добре проучен и принадлежи към клас II бактериоцини (BERTRAND et al. 2001, MATSUSAKI et al. 1996, NOONPAKDEE et al. 2003). Бактериоцин 481, произведен от *L. lactis* CNRZ 481 (PIARD et al. 1992); низин-подобен бактериоцин, произведен от *L. lactis* A164 (CHEIGH et al. 2002); лактококцин MMFII, произведен от *L. lactis* MMFII (FERCHICHI et al. 2001); бактериоцин, произведен от *L. lactis* KSA2386 (KO и AHN 2000) и лактицин NK24, произведен от *L. lactis* NK24 (LEE и PAIK 2001) са по-слабо проучени. Малко се знае за влиянието на състава на средата върху производството на бактериоцини, произведени от *Lactococcus* spp., С изключение на проучванията, проведени върху низин (DE VUYST 1995, DE VUYST и VANDAMME 1993), лактицин 481 (PIARD 1994) и бактериоцин ST34BR (TODOROV и DICKS 2004). От всички споменати бактериоцини, само KSA2386, ST34BR и лактицин NK24 имат широк спектър на действие, който включва инхибиране на грам-отрицателни бактерии (KO и AHN 2000, LEE и PAIK 2001, TODOROV и DICKS 2004). Продукцията на бактериоцин не винаги корелира с

увеличаването на клетъчната маса или скоростта на растеж на продуциращия щам (BOGOVIC-MATIJSIC and ROGELJ 1998, KIM et al. 1997). По-високи нива на бактериоцин често се регистрират при липса на хранителни вещества, стимулиращи растежа, или при температури и рН условия, по-ниски от необходимите за оптимален растеж (AASEN et al. 2000, KRIER et al. 1998, MATSUSAKI et al. 1996, TODOROV et al. 2000 ). Оптималното производство на бактериоцин често се регистрира в среда с ограничителни концентрации на захари, източници на азот, витамини и калиев фосфат, или когато рН на средата се регулира (VIGNOLO et al. 1995). В това проучване ние докладваме за изолирането и характеризирането на *L. lactis* subsp. *lactis* HV219, щам, изолиран от вагинален секрет. Описани са антимикробните свойства на бактериоцин HV219 и са изброени условията на растеж и съставът на средата, необходими за оптималното производство на бактериоцин.

8. Dimitonova, S.P., **Danova, S.T\***, Serkedjieva, J.P. & Bakalov, B.V. 2007, "Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women", *Anaerobe*, vol. 13, no. 5-6, pp. 178-184.

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19607&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** The role of vaginal *Lactobacillus* as an efficient barrier against invading pathogens is of considerable interest. The purpose of the present study was to assess *in vitro* the ability of 20 recently identified vaginal lactobacilli to protect the vagina. In order to evaluate their significance, the antimicrobial, hemagglutination (HA) and aggregation (Agg) activities, as well as acid and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production, were estimated. The cell-free cultures of eight strains showed a stable antimicrobial activity after elimination of the putative effects of lactic acid and  $H_2O_2$ . Three of the isolated vaginal lactobacilli expressed a broad spectrum of anti-bacterial activity including Gram-negative pathogens. Strains with anti-*Gardnerella* and anti-herpes simplex virus type 2 activities were found. All tested isolates were  $H_2O_2$  producers, actively acidifying the growth media to pH 3.9, which is presumed to neutralize sexually transmitted infection pathogens. The major part (75%) expressed an HA activity and different Agg phenotypes, estimated as important properties in the competition with invading pathogens and in host defense. These results are encouraging and prompt further research of the characterized active strains and their possible application in prophylaxis of vaginal disorders. © 2007 Elsevier Ltd.

**Резюме:** Ролята на вагиналните лактобацили като ефективна бариера срещу нахлуващи патогени представлява значителен интерес. Целта на настоящото проучване е да се оцени *in vitro* способността на 20 наскоро идентифицирани вагинални лактобацили да предпазват влагалището. За да се оцени тяхното значение, бяха оценени антимикробните, хемаглутинационните ( $H_2O_2$ ) и агрегационните (Agg) дейности, както и производството на киселина и водороден пероксид ( $H_2O_2$ ). Безклетъчните култури от осем щамове показват стабилна антимикробна активност след елиминиране на предполагаемите ефекти на млечна киселина и  $H_2O_2$ . Три от изолираните вагинални лактобацили изразяват широк спектър на антибактериална активност, включително Грам-отрицателни патогени. Открити са щамове с активност на анти-гарднерела и анти-херпес симплекс вирус тип 2. Всички тествани изолати са производители на  $H_2O_2$ , които активно подкисляват растежната среда до pH 3.9, за което се предполага, че неутрализира

патогените, предавани по полов път. По-голямата част (75%) изразява НА активност и различни Agg фенотипове, оценени като важни свойства в конкуренцията с нахлуващи патогени и в защитата на гостоприемника. Тези резултати са окуражаващи и ускоряват по-нататъшни изследвания на характеризираните активни щамове и тяхното възможно приложение в профилактиката на вагинални разстройства. r 2007 Elsevier Ltd.

9. Tzvetkova, I., Dalgalarondo, M., Danova, S., Пиев, I., Ivanova, I., Chobert, J.-. & Haertlé, T. 2007, "Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from Bulgarian yogurts", Journal of Food Biochemistry, vol. 31, no. 5, pp. 680-702.

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=20580&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Twenty-one *Lactobacillus* strains isolated from three types of Balkan homemade yogurts were grown on sodium caseinate, b-casein or whey proteins, and the proteolysis was followed by electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography. The best conditions allowing obtaining proteolysis without casein precipitation are 0.8% casein in 50-mM phosphate buffer. The strains tested showed a relatively high proteolytic activity despite the limited conditions for bacterial growth. Within 72 and 96 h of incubation, 80–90% of B-casein was consumed. They showed also a proteolytic activity toward a-lactalbumin (ALA), being able to reduce its concentration between 5 and 55%, depending on the strains used. The capacity of the strains to hydrolyze b-lactoglobulin was lower as compared with hydrolysis of ALA. Hydrolysis of casein by all strains produced peptides with an antibacterial effect against *Escherichia coli*. Consequently, to obtain a maximal hydrolysis of the dairy proteins seconded by appearance of antimicrobial peptides, a combination of strains with different beneficial properties to be used as starters was proposed.

**Резюме:** Двадесет и един щам *Lactobacillus*, изолирани от три вида балкански домашно приготвени кисели млека, бяха отгледани върху натриев казеинат, b-казеин или суроватъчни протеини, а протеолизата бе проследена от електрофореза и високоефективна течна хроматография с обърната фаза. Най-добрите условия, позволяващи получаване на протеолиза без утаяване с казеин, са 0,8% казеин в 50-тМ фосфатен буфер. Тестваните щамове показаха относително висока протеолитична активност въпреки ограничените условия за бактериален растеж. В рамките на 72 и 96 часа от инкубацията се консумират 80–90% от B-казеин. Те също така показаха протеолитична активност спрямо а-лакталбумин (ALA), като успяха да намалят концентрацията му между 5 и 55%, в зависимост от използваните щамове. Капацитетът на щамовете да хидролизират b-лактоглобулин е по-нисък в сравнение с хидролизата на ALA. Хидролиза на казеин от всички щамове води до продукция на пептиди с антибактериален ефект срещу *Escherichia coli*. Следователно, за да се получи максимална хидролиза на млечните протеини, водещо до появата на антимикробни пептиди, бе предложена комбинация от щамове с различни полезни свойства, които да се използват.

10. Todorov, S.D., Botes, M., Danova, S.T. & Dicks, L.M.T. 2007, "Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions", Journal of Applied

microbiology, vol. 103, no. 3, pp. 629-639.  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=20217&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Aims: To determine the resistance of *Lactococcus lactis ssp. lactis* HV219 to acids, bile, antibiotics, inflammatory drugs and spermicides, compare adsorption of the strain to bacteria and Caco-2 cells under stress, and evaluate the antimicrobial activity of bacteriocin HV219. Methods and Results: Bacteriocin HV219 activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria was confirmed by leakage of DNA and b-galactosidase, and atomic force microscopy. Adsorption of bacteriocin HV219 to bacteria is influenced by pH, temperature, surfactants and salts. Initially, only 3% of HV219 cells adhered to Caco-2 cells. However, after 2 h, adherence increased to 7%. Strain HV219 and *Listeria monocytogenes* ScottA did not compete for colonization. Strain HV219 is sensitive to most antibiotics tested, but resistant to amikacin, ceftazidime, nalidixic acid, metronidazole, neomycin, oxacillin, streptomycin, sulphafurazole, sulphamethoxazole, sulphonamides, tetracycline and tobramycin. Ibuprofen, ciprofloxacin, diklofenak and nonoxylol-9 inhibited the growth of strain HV219. Conclusion: Strain HV219 is resistant to hostile conditions in the intestinal tract, including therapeutic levels of specific antibiotics and binds to Caco-2 cells, but not in competition with *L. monocytogenes*. Significance and Impact of the Study: Strain HV219 will only be effective as probiotic if taken with specific antibiotics and not with anti-inflammatory drugs and spermicides.

**Резюме:** Цели: Да се определи устойчивостта на *Lactococcus lactis ssp. lactis* HV219 към киселини, жлъчка, антибиотици, възпалителни лекарства и спермициди, сравнете адсорбцията на щама с бактерии и Caco-2 клетки при стрес и оценете антимикробната активност на бактериоцин HV219. Методи и резултати: Активността на бактериоцин HV219 срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии е потвърдена чрез изтичане на ДНК и б-галактозидаза и атомно-силова микроскопия. Адсорбцията на бактериоцин HV219 към бактериите се влияе от рН, температура, повърхностноактивни вещества и соли. Първоначално само 3% от клетките HV219 се придържат към клетките Caco-2. След 2 часа обаче прилепването се е увеличило до 7%. Щам HV219 и *Listeria monocytogenes* ScottA не се състезават за колонизация. Щамът HV219 е чувствителен към повечето тествани антибиотици, но е устойчив на амикацин, цефтазидим, налидиксинова киселина, метронидазол, неомицин, оксацилин, стрептомицин, сулфафуразол, сулфаметоксазол, сулфонамиди, тетрациклин и тобрамицин. Ибупрофен, ципрофлоксацин, диклофенак и ноноксилол-9 инхибираха растежа на щама HV219. Заключение: Щамът HV219 е устойчив на враждебни условия в чревния тракт, включително терапевтични нива на специфични антибиотици и се свързва с Caco-2 клетки, но не в конкуренция с *L. monocytogenes*. Значение и въздействие на проучването: Щамът HV219 ще бъде ефективен като пробиотик само ако се приема със специфични антибиотици, а не с противовъзпалителни лекарства и спермициди.

11. Dimitonova, S.P., Bakalov, B.V., Aleksandrova-Georgieva, R.N. & Danova, S.T\*. 2008, "Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions", Journal of Microbiology, Immunology and Infection, vol. 41, no. 6, pp. 469-477. (Д2) ИФ-1.774 Q2 0.664  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=20238&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** *Background and Purpose:* Twenty lactobacilli isolated from vaginal samples of healthy volunteers were characterized according to polyphasic taxonomy. A broad spectrum of activity and protective properties of these vaginal isolates has been reported. *Methods:* Phenotypic and genotypic methods such as random amplified polymorphic DNA (RAPD), species-specific and BOX polymerase chain reaction (PCR), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), and 16S rRNA sequence analyses were applied for *Lactobacillus* spp. identification. *Results:* On the basis of carbohydrate utilization profiles using API 50 CHL kits (fermentation pattern), the strains were divided into 7 groups. RAPD- and BOX-PCR analyses revealed heterogeneity within the established phenotypic groups and discriminated successfully between the vaginal strains. The combination of species-specific PCR, ARDRA, and 16S rRNA sequence analyses allowed the species identification of 7 strains as *Lactobacillus fermentum*, 2 as *Lactobacillus gasseri*, 1 as *Lactobacillus brevis*, and 1 as *Lactobacillus salivarius*. These results were not in agreement with data obtained by classical and molecular methods for some clinical isolates. *Conclusion:* This is the first polyphasic taxonomy study on vaginal lactobacilli from Bulgarian women of reproductive age. These data add to the limited information existing in Bulgaria on the true identity of *Lactobacillus* spp. in the vaginal microbiota.

**Резюме:** *Предшестващо състояние и цели:* Двадесет лактобацили, изолирани от вагинални проби на здрави доброволци, се характеризират съгласно полифазната таксономия. Съобщава се за широк спектър на активност и защитни свойства на тези вагинални изолати. *Методи:* Фенотипни и генотипични методи като произволна амплифицирана полиморфна ДНК (RAPD), видоспецифична и BOX полимеразна верижна реакция (PCR), усилен анализ на рибозомна рестрикция на ДНК (ARDRA) и 16S рРНК анализи са приложени за *Lactobacillus* spp. идентификация. Резултати: Въз основа на профилите за използване на въглехидрати, използващи API 50 CHL комплекти (модел на ферментация), щамовете бяха разделени на 7 групи. RAPD- и BOX-PCR анализите разкриват хетерогенност в рамките на установените фенотипни групи и успешно дискриминират между вагиналните щамове. Комбинацията от специфични за видовете PCR, ARDRA и 16S рРНК анализи на последователности позволява да се идентифицират видовете на 7 щамове като *Lactobacillus fermentum*, 2 като *Lactobacillus gasseri*, 1 като *Lactobacillus brevis* и 1 като *Lactobacillus salivarius*. Тези резултати не бяха в съгласие с данните, получени чрез класически и молекулярни методи за някои клинични изолати. *Заключение:* Това е първото многофазно изследване на таксономията върху вагинални лактобацили от български жени в репродуктивна възраст. Тези данни допълват съществуващата в България ограничена информация за истинската идентичност на *Lactobacillus* spp. във вагиналната микробиота.

12. Georgieva, R.N., Piev, I.N., Chipeva, V.A., Dimitonova, S.P., Samelis, J. & Danova, S.T\*. 2008, "Identification and in vitro characterisation of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses", Journal of Basic Microbiology, vol. 48, no. 4, pp. 234-244. DOI: 10.1002/jobm.200700355  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=20221&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** *Lactobacillus plantarum* strains were isolated from fully ripened, white brined Bulgarian homemade cheeses. Strains were derived from phenotypically homogenous *Lactobacillus* group and were identified as *L. plantarum* based on both phenotypic and molecular identification (species-specific and multiplex PCR) methods. Heterogeneity of *L. plantarum* isolates was evaluated by Rep-PCR

analysis. Further antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and transit tolerance of the strains were evaluated. Most of them showed broad spectrum of activity against Gram-negative bacteria (including human pathogens) independent on the presence of organic acids or hydrogen peroxide. All strains were sensitive to amoxicillin and sulfamethoxazole/trimethoprim, resistant to clinically relevant  $\beta$ -lactame antibiotics (penicillin and ampicillin) and to nalidixic acid, ciprofloxacin, streptomycin, and vancomycin. Significant variability in the sensitivity to tetracycline was noted. The tolerance to low pH, bile salts, pepsin and pancreatin at concentrations similar to those in the gastrointestinal tract was strain-dependent. The exposure to bile salts was less destructive than exposure to pH 2.0 for all tested strains. Based on their combined responses to the above selection criteria, four *L. plantarum* strains, RL29, RL34, RL36 and RL37, were selected as potential probiotics for in vivo studies.

**13.** Kirilov, N., Dimov, S., Dalgalarondo, M., Ignatova, T., Kambarev, S., Stoyanovski, **S. Danova, S.**, Plev, I., Haertlé, T., Chobert, J.-. & Ivanova, I. 2011, "Characterization of enterococci isolated from homemade Bulgarian cheeses and katuk", European Food Research and Technology, vol. 233, no. 6, pp. 1029-1040. <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=23068&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** A collection of 107 lactic acid bacteria (LAB) isolates was obtained from traditional Bulgarian dairy products—homemade cheeses and katuk samples, produced from heat-treated cow, goat, ewe and buffalo milk without the addition of any bacterial starter culture. The samples were collected from mountain region of Rhodope (south part of Bulgaria), Tracian valley and mountain region of Stara Planina (west part of Bulgaria). These LAB produced bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) and proteinases. Preliminary strain determination was performed according to their fermentation ability using API 50CHL and API 20 Strep. Most of the characterized strains (58) belong to genus *Enterococcus*; 21, 20 and 11 strains were identified as *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.* and *Lactococcus sp.*, respectively. Isolated enterococcal strains were characterized using phenotypic features as well as by DNA typing. The strains were identified as *Enterococcus faecium* (34), *Enterococcus durans* (22) and *Enterococcus faecalis* (2). The proteolytic activity varied from 0.094 to 0.455 mM/L Gly into the group of *E. faecium* and from 0.109 to 0.487 mM/L Gly into the group of *E. durans* strains, while both *E. faecalis* strains showed relatively high proteolytic activity. The samples obtained after 3 h of hydrolysis of b-casein by *E. faecalis* B1 strain were further used for mass spectrometry analysis, and 31 peptides were identified.

**Резюме:** Колекция от 107 изолата на млечнокисели бактерии (LAB) е получена от традиционни български млечни продукти - домашни сирена и проби от катук, произведени от термично обработено краве, козе, овче и биволско мляко без добавяне на каквато и да е бактериална стартерна култура. Пробите са събрани от планинския район на Родопите (южната част на България), Тракийската долина и планинския регион на Стара планина (западната част на България). Тези LAB произвеждат бактериоцин-подобни инхибиторни вещества (BLIS) и протеинази. Предварителното определяне на щама беше извършено според тяхната ферментационна способност, като се използва API 50CHL и API 20 Strep. Повечето от характеризираните щамове (58) принадлежат към род *Enterococcus*; 21, 20 и 11 щамове са идентифицирани като *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.* и *Lactococcus sp.*, съответно. Изолираните ентерококови щамове се характеризират с използване на фенотипни характеристики, както и чрез типизиране на ДНК. Щамовете бяха идентифицирани като *Enterococcus faecium* (34), *Enterococcus durans* (22) и *Enterococcus faecalis* (2). Протеолитичната активност варира от 0,094 до 0,455 mM / L Gly в групата на *E. faecium* и от 0,109 до 0,487 mM / L Gly в групата на щамовете *E. durans*, докато двата щамове на *E. faecalis* показват относително

висока протеолитична активност. Пробите, получени след 3 h хидролиза на b-казеин от щам *E. faecalis* B1, бяха допълнително използвани за анализ на маспектрометрия и бяха идентифицирани 31 пептида.

**14.** Dimitrova, P., Danova, S. & Ivanovska, N. 2012, "Pro-inflammatory action of *Candida albicans* DNA in zymosan-induced arthritis", *Inflammation Research*, vol. 61, no. 6, pp. 649-656. <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=22410&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** *Objective* This study was designed to examine the potential ability of *Candida albicans* DNA to influence joint inflammation in a mouse model of zymosan-induced arthritis (ZIA) relating to Toll-like receptor-9 (TLR9) expression and cytokine production in different compartments. *Methods* To induce ZIA, mice were injected in the ankle joint with 180 µg zymosan. TLR9 expression in synovial extracts, peritoneal macrophages, splenocytes and popliteal lymph node cells was analyzed by flow cytometry. The levels of interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukin (IL)-6 and IL-10 in synovial fluid and sera were measured by ELISA. The expression of TLR9 in the joints was determined by immunohistochemistry. *Results* A single intraperitoneal injection of *C. albicans* DNA did not elevate TLR9 expression and cytokine levels in the joints. It increased TLR9 expression by peritoneal macrophages isolated from healthy and arthritic mice and elevated the IFN- $\gamma$  level in circulation. In-vitro stimulation with DNA enhanced IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-10 production by different cells isolated from mice with ZIA. *Conclusion* These results suggest that small quantities of *C. albicans* DNA can provoke a pro-inflammatory systemic response rather than locally in the joint.

**Резюме:** Цел Това проучване е предназначено да изследва потенциалната способност на ДНК на *Candida albicans* да влияе на възпалението на ставите в миши модел на индуциран от zymosan артрит (ZIA), свързан с експресията на Toll-подобен рецептор-9 (TLR9) и производството на цитокини в различни отделения. *Методи* За индуциране на ZIA, мишките се инжектират в глезенната става с 180 µg zymosan. Експресията на TLR9 в синовиални екстракти, перитонеални макрофаги, спленоцити и клетки на подколен лимфен възел се анализира чрез поточна цитометрия. Нивата на интерферон (IFN) - $\gamma$ , интерлевкин (IL) -6 и IL-10 в синовиалната течност и серумите бяха измерени чрез ELISA. Експресията на TLR9 в ставите се определя чрез имунохистохимия. *Резултати* Единична интраперитонеална инжекция на ДНК на *C. albicans* не повишава експресията на TLR9 и нивата на цитокини в ставите. Той повишава експресията на TLR9 от перитонеални макрофаги, изолирани от здрави и артритни мишки и повишава нивото на IFN- $\gamma$  в циркулацията. Стимулиране in vitro с ДНК усилено производство на IL-6, IFN- $\gamma$  и IL-10 от различни клетки, изолирани от мишки със ZIA. *Заключение* Тези резултати предполагат, че малки количества ДНК на *C. albicans* могат да провокират провъзпалителен системен отговор, а не локално в ставата.

**15. Danova S. T.\***, Ivanovska N.D. and Tropcheva R.V., 2014, Newly characterised probiotic lactobacilli for naturally protected and functional foods, *Beneficial Microbes*; 5 Supplement 1, Wageningen Academic Publishers, ISSN 1876-2833 print, ISSN 1876-2891 online, DOI 10.3920/BM2014.S1 <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19700201534&tip=sid&clean=0>



<https://www.researchgate.net/publication/285731069> Characterisation of Bulgarian lactobacilli as probiotics

### **Abstract:**

Since the food safety and functionality become priority of the modern society, there is a rising interest in study lactic acid bacteria (LAB) from different habitats. With this aim a collection of LAB from traditional Bulgarian dairy products (yoghurt, cheeses, 'katak') was established. 25 lactobacilli were *in vitro* evaluated as candidate probiotics. The strains which possess transit tolerance in the gut conditions, growth ability in the presence of prebiotics and antimicrobial activity were evaluated as immunomodulators. They were identified as species *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus bulgaricus*, by classical API tests and molecular methods – species-specific and RAPD-PCR, and 16S rDNA sequencing. *in vitro* and *in situ* a broad spectrum of activity against food deteriorative and toxigenic micromycetes from the genera *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* and bacterial pathogens *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and *Enterobacter* was established and 4 promising strains were selected. They were successfully applied as bio-protective adjuncts to industrial starters for Bulgarian yoghurt. Different effects from partial to fully suppression of fungal growth were observed in experimental samples of new fermented milks, supplemented with variants of bio-protective adjuncts added as live, thermally-treated or lyophilised LAB cultures. In addition, the lactobacilli demonstrate a high viability of  $\sim 10^6$ - $10^7$  cfu/ml during the production and the cold storage period (28 days) combined with positive effects on the sensory properties of the products. The obtained results seemed promising for further application of selected probiotic strains and for design of new safety and functional foods, able to fulfil different consumers' demands.

**Резюме:** Тъй като безопасността и функционалността на храните стават приоритет на съвременното общество, нараства интересът към изследване на млечнокиселите бактерии (LAB) от различни местообитания. С тази цел е създадена колекция от LAB от традиционни български млечни продукти (кисело мляко, сирена, 'katak'). 25 лактобацили бяха оценени *in vitro* като кандидат пробиотици. Щамовете, които притежават толерантност към транзит в условията на червата, способност за растеж в присъствието на пребиотици и антимикробна активност бяха оценени като имуномодулатори. Те бяха идентифицирани като видове *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* и *Lactobacillus bulgaricus*, чрез класически API тестове и молекулярни методи - специфични за видовете и RAPD-PCR и 16S rDNA секвениране. *in vitro* и *in situ* е установен широк спектър на действие срещу хранителни деградации и токсигенни микромицети от родовете *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* и бактериални патогени *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* и *Enterobacter* и са избрани 4 обещаващи щамове. Те бяха успешно приложени като биозащитни добавки към индустриални предястия за българско кисело мляко. Различни ефекти от частично до пълно потискане на растежа на гъбичките са наблюдавани в експериментални проби от нови ферментирали млека, допълнени с варианти на биозащитни добавки, добавени като живи, термично обработени или лиофилизирани LAB култури. В допълнение, лактобацилите демонстрират висока жизнеспособност от  $\sim 10^6$ - $10^7$  CFU /ml по време на

производството и периода на студено съхранение (28 дни), съчетани с положителни ефекти върху сензорните свойства на продуктите. Получените резултати изглеждаха обещаващи за по-нататъшно приложение на избрани пробиотични щамове и за проектиране на нови безопасни и функционални храни, способни да отговорят на различни изисквания на потребителите.

16. Gyurkovska, V., Stefanova, T., Dimitrova, P., **Danova, S.**, Tropcheva, R. & Ivanovska, N. 2014, "Tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 retards chronic joint inflammation in mice", *Inflammation*, vol. 37, no. 4, pp. 995-1005.  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=14688&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Tyrphostin AG490 is a Janus kinase (JAK) 2 inhibitor that is clinically used as an anticancer agent and is also effective in various models of inflammatory and autoimmune diseases. In this study, we examined the effects of tyrphostin AG490 on the development of collagenase-induced osteoarthritis (CIOA). Our results showed that tyrphostin ameliorated cartilage and bone destructions. This effect was associated with decreased expression of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3), phosphorylated JAK2, Dickkopf homolog 1, and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) in the joints of arthritic mice. Tyrphostin AG490 suppressed STAT3 phosphorylation and the expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and RANKL by synovial fluid cells. The drug inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation in vitro. Molecules, such as tyrphostin AG490 that limit bone erosion and influence osteoclast generation, might have therapeutic utility in joint degenerative disorders.

**Резюме:** Тирфостин AG490 е инхибитор на Janus киназа (JAK) 2, който се използва клинично като противораково средство и е ефективен при различни модели възпалителни и автоимунни заболявания. В това проучване изследвахме ефектите на тирфостин AG490 върху развитието на индуциран от колагеназа остеоартрит (CIOA). Нашите резултати показваха, че тирфостинът подобрява хрущяла и костните деструкции. Този ефект е свързан с намалена експресия на сигнални преобразуватели и активатори на транскрипция 3 (STAT3), фосфорилиран JAK2, хомолог Dickkopf 1 и рецепторен активатор на ядрен фактор  $\kappa$ B лиганд (RANKL) в ставите на артритни мишки. Тирфостин AG490 потиска фосфорилирането на STAT3 и експресията на свързания с тумор некротизиращ фактор апоптоза индуциращ лиганд и RANKL от клетки на синовиалната течност. Лекарството инхибира индуцирана от RANKL диференциация на остеокластите in vitro. Молекули, като тирфостин AG490, които ограничават ерозията на костите и влияят върху генерирането на остеокласти, могат да имат терапевтична полза при дегенеративни разстройства на ставите.

17. Tropcheva, R., Georgieva, R., Paskov, V., Karsheva, M., & **Danova, S\***. (2014). Sensory properties of Bulgarian yogurts, supplemented with lactobacilli as probiotic adjuncts. *Journal of Texture Studies*, 45(3), 187-194. DOI 10.1111/jtxs.12065, 2014  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=20634&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Filamentous moulds are common food and feed spoiling organisms and cause great economic losses worldwide. Furthermore, the moulds with the concomitant production of allergenic spores and/or mycotoxins become serious potential health hazards and theirs

reduction in nutrient formulas is thus of primary importance. Lactic acid bacteria (LAB) occur naturally in various fermented milk products and have been used as natural biopreservatives from centuries. The aim of present work was to evaluate the activity of lactobacilli from traditional Bulgarian dairy products, against representative spoilage organisms of economic significance. Two isolates from "katak" completely inhibited the growth of molds from genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma*. They were characterized as obligately heterofermentative lactobacilli and the strong antifungal activity probably was due to the synergistic effect of different active metabolites (including organic acids). While 3 homofermentative and 3 facultatively heterofermentative strains, from homemade yogurts and white brined cheese, significantly repressed the mold's growth in comparison with the controls in 5 days agar plate assays. Such preservative effects could relate to the production of organic acids, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and bacteriocins, during the fermentation and will be evaluated in food related model system. The taxonomic characterization of active isolates is also very important and is still in progress. Key words: *Lactobacillus*, antifungal activity, traditional milk products

**Резюме:** Филаментозните гъби- плесени са обичайни организми, развалящи храната и фуражите и причиняващи големи икономически загуби по целия свят. Освен това плесените с едновременното производство на алергенни спори и/или микотоксини представляват сериозна опасност за здравето и намаляването им в хранителните формули е от първостепенно значение. Млечнокиселите бактерии (LAB) се срещат естествено в различни ферментирани млечни продукти и се използват като естествени биоконсерванти от векове. Целта на настоящата работа бе да се оцени активността на лактобацили от традиционни български млечни продукти срещу представители на такива развалящи микроорганизми, които имат икономическо значение. Два изолата от „katak“ напълно инхибираха растежа на плесени от родовете *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma*. Те се характеризират като задължително хетероферментативни лактобацили и силната противогъбична активност вероятно се дължи на синергичния ефект на различни активни метаболити (включително органични киселини). Докато 3 хомоферментативни и 3 факултативно хетероферментативни щамове, от домашно приготвени кисели млека и от бяло саламурено сирене, значително потискат растежа на плесените в сравнение с контролите в 5-дневни анализи с агар дифузионен метод. Такива консерванти могат да бъдат свързани с производството на органични киселини, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и бактериоцини, по време на ферментацията и ще бъдат оценени в моделна система, свързана с храните. Таксономичната характеристика на активните изолати също е много важна и все още е в ход.

18. Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y. & Danova, S\*. 2014, "Antifungal activity and identification of Lactobacilli, isolated from traditional dairy product "katak"", *Anaerobe*, vol. 28, pp. 78-84. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.05.010 ISSN 1075-9964;;

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19607&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Filamentous moulds are the main spoilage microorganisms, responsible for significant economic losses and several healthy risks in human food chain. The lactic acid bacteria (LAB), especially lactobacilli could be a natural antagonist of these dangerous organisms. In Bulgaria, a very limited data exists on the antifungal activity of LAB microbiota of fermented dairy products. In the

present study, four active strains were isolated from traditional fermented curd/yogurt-like product "katak", produced in Bulgaria from centuries. The new isolates KR3, KR4, KR51 and KR53 were identified by API 50 CH biochemical test and different molecular methods (species-specific PCR, RAPD-PCR and 16S rDNA sequence analysis) as *Lactobacillus brevis*. According to our knowledge, this is the first data on the molecular characterization of the *Lactobacillus* microbiota of "katak". A broad spectrum of antifungal activity of the four *L. brevis* KR strains against test-cultures representatives of carcinogenic, toxigenic, deteriorative and allergenic fungi from the genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Trichoderma* was estimated. Strains *L. brevis* KR3, KR4 and KR51 completely suppress the growth of *Penicillium claviforme*, *Aspergillus awamori* and *Aspergillus niger*. With regard to *Aspergillus flavus* and *Trichoderma viride*, a lower and strain-specific inhibitory activity was observed. The antifungal activity of our new *L. brevis* isolates seems to be a promising advantage of these four strains, suggesting their potential applications in different food technologies as bio-preservative agents against moulds.

**Резюме:** Нишковидните плесени са основните развалящи се микроорганизми, отговорни за значителни икономически загуби и няколко здравословни риска в хранителната верига на човека. Млечнокиселите бактерии (LAB), особено лактобацилите, могат да бъдат естествен антагонист на тези опасни организми. В България съществуват много ограничени данни за противоъбичната активност на LAB microbiota на ферментирали млечни продукти. В настоящото проучване бяха изолирани четири активни щама от традиционния ферментирал извара / подобен на кисело мляко продукт "кatak", произвеждан в България от векове. Новите изолати KR3, KR4, KR51 и KR53 бяха идентифицирани чрез API 50 CH биохимичен тест и различни молекулярни методи (специфичен за видовете PCR, RAPD-PCR и 16S rDNA анализ на последователността) като *Lactobacillus brevis*. Според нашето знание това са първите данни за молекулярната характеристика на *Lactobacillus* microbiota на "katak". Оценен е широк спектър на противоъбична активност на четирите щама *L. brevis* KR срещу тестови култури, представители на канцерогенни, токсигенни, влошаващи се и алергенни гъби от родовете *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* и *Trichoderma*. Щамовете *L. brevis* KR3, KR4 и KR51 напълно потискат растежа на *Penicillium claviforme*, *Aspergillus awamori* и *Aspergillus niger*. По отношение на *Aspergillus flavus* и *Trichoderma viride* се наблюдава по-ниска и специфична за щама инхибиторна активност. Противоъбичната активност на нашите нови изолати на *L. brevis* изглежда е обещаващо предимство на тези четири щама, което предполага потенциалното им приложение в различни хранителни технологии като биоконсерванти срещу плесени.

19. Milanova A., Pavlova I., Yordanova V., **Danova S.** (2016) Effect of doxycycline and *Lactobacillus* probiotics on mRNA expression of ABC2 in small intestines of chickens . Iranian journal of veterinary research 17 (4), 265-267, <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=11800154543&tip=sid&clean=0> 0.171

**Abstract:** Probiotics and antibiotics are widely used in poultry and may alter drug bioavailability by affecting the expression of intestinal ATP-binding cassette (ABC) efflux transporters. Therefore the aim of the present investigation was to evaluate the effect of *Lactobacilli* probiotics, administered alone or in combination with doxycycline, on the expression of ABCB1 (gene, encoding P- glycoprotein), ABC2 (gene, encoding multidrug

resistance protein 2, MRP2) and ABCG2 (gene, encoding breast cancer resistance protein) mRNAs in chicken using RT-PCR. Due one-day-old chicks (n=24) were divided equally in four groups: untreated control, probiotics supplemented group, probiotics plus doxycycline treated chickens and antibiotic administered group. Expression of ABCC2 mRNA was affected by doxycycline or by combination of *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* and *L. bulgaricus* and the antibiotic in the intestines. These results can be used as a basis for further functional studies to prove the beneficial effect on limitation of the absorption of toxins and improvement of efflux of endogenous substances and xenobiotics when the combination of doxycycline and *Lactobacillus* spp. probiotics are administered to poultry.

**Резюме:** Пробиотиците и антибиотиците се използват широко при домашните птици и могат да променят бионаличността на лекарствата, като влияят върху експресията на чревни АТР-свързващи касетни транспортери (АВС). Следователно целта на настоящото разследване е да се оцени ефектът на пробиотицичните *Lactobacilli*, прилагани самостоятелно или в комбинация с доксициклин, върху експресията на ABCB1 (ген, кодиращ Р-гликопротеин), ABCC2 (ген, кодиращ мултирезистентност протеин 2, MRP2) и ABCG2 (ген, кодиращ протеин на резистентност към рак на гърдата) и РНК в пилешко месо, използвайки RT-PCR. Поради едnodневни пилета (n = 24) бяха разделени по равно в четири групи: нелекувана контрола, група с добавени пробиотици, пробиотици плюс пилета, третирани с доксициклин и група, прилагана с антибиотици. Експресията на ABCC2 и РНК се повлиява от доксициклин или от комбинация от *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* и *L. bulgaricus* и антибиотика в червата. Тези резултати могат да се използват като основа за по-нататъшни функционални проучвания, за да се докаже благоприятният ефект върху ограничаването на абсорбцията на токсини и подобряването на изтичането на ендогенни вещества и ксенобиотици, когато комбинацията от доксициклин и *Lactobacillus* spp. пробиотиците се прилагат на домашни птици.

20. Pavlova Ivelina; Milanova Aneliya, **Danova Svetla**, Fink-Gremmels Johanna, (2016) Enrofloxacin and Probiotic *Lactobacilli* Influence PepT1 and LEAP-2 mRNA Expression in Poultry . *Probiotics & Antimicrobial Prot.* DOI 10.1007/s12602-016-9225-y December 2016, Volume 8, Issue 4, pp 215–220  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19400158544&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Expression of peptide transporter 1 (PepT1) and liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) in chickens can be influenced by food deprivation, pathological conditions and drug administration. Effect of three putative probiotic *Lactobacillus* strains and enrofloxacin on the expression of PepT1 and LEAP-2 mRNA was investigated in Ross 308 chickens. One-day-old chicks (n = 24) were allocated to following groups: control (without treatment); group treated with probiotics via feed; group treated with a combination of probiotics and enrofloxacin; and a group given enrofloxacin only. The drug was administered at a dose of 10 mg kg<sup>-1</sup>, via drinking water for 5 days. Samples from liver, duodenum and jejunum were collected 126 h after the start of the treatment. Expression levels of PepT1 and LEAP-2 were determined by real-time polymerase chain reaction and were statistically evaluated by Mann–Whitney test. Enrofloxacin administered alone or in combination with probiotics provoked a statistically significant up-regulation of PepT1 mRNA levels in the measured organ sites. These changes can be attributed to a tendency of improvement in utilization of dietary

peptide and in body weight gain. LEAP2 mRNA expression levels did not change significantly in enrofloxacin-treated chickens in comparison with control group.

**Резюме:** Експресията на пептиден транспортер 1 (PerT1) и експресиран в черния дроб антимикробен пептид 2 (LEAP-2) при пилета може да бъде повлияна от лишаването от храна, патологичните състояния и прилагането на лекарства. Ефектът на три предполагаеми пробиотични щамове *Lactobacillus* и енрофлоксацин върху експресията на иРНК PerT1 и LEAP-2 е изследван при пилета Ross 308. Еднодневни пилета (n = 24) бяха разпределени в следните групи: контрол (без лечение); група, лекувана с пробиотици чрез фураж; група, лекувана с комбинация от пробиотици и енрофлоксацин; и група, на която е даден само енрофлоксацин. Лекарството се прилага в доза от 10 mg kg<sup>-1</sup>, чрез питейна вода в продължение на 5 дни. Проби от черен дроб, дванадесетопръстник и йеюnum бяха събрани 126 часа след началото на лечението. Експресионните нива на PerT1 и LEAP-2 се определят чрез верижна реакция на полимераза в реално време и се оценяват статистически чрез тест на Mann-Whitney. Енрофлоксацин, прилаган самостоятелно или в комбинация с пробиотици, провокира статистически значимо повишаване на нивата на иРНК PerT1 в измерените места на органите. Тези промени могат да се отдадат на тенденцията за подобряване на използването на диетичния пептид и увеличаването на телесното тегло. Нивата на експресия на иРНК на LEAP2 не се променят значително при пилета, лекувани с енрофлоксацин, в сравнение с контролната група.

21. Dimova I., Danova S, Nikolova E., Koprinarova M. Aloe-emodin triggers ROS and Ca<sup>2+</sup> production and decreases the levels of mitochondrial membrane potential of human brain capillary endothelial cells. International Journal of Phytomedicine, 9, 3, 2017, 507-511. <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19700188355&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** The aim of this work was to investigate the mechanisms of cytotoxicity of phytohydroxyanthraquinone aloe-emodin (AE) on human brain microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 and to assess the cellular response in the early stage of treatment in order to extend the knowledge of AE's anti-angiogenic properties. The immortalized human brain capillary endothelial cells hCMEC/D3 were treated with a series of AE concentrations (5 - 200 μM) for a period of 24 hours. The cell viability was determined by MTS assay. The cellular adenosine triphosphate (ATP) levels were evaluated by CellTiter-Glo® luminescent assay. The intracellular reactive oxygen species (ROS) were determined by 2',7'-dichlorofluorescein (CM-H2DCFDA) fluorescence assay. The mitochondrial membrane potential (MMP) was assessed using tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) staining, while Fluo-4 was used to measure the intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentrations inside living cells analysed by High Content Analysis using the Arrayscan VTI 740. Twenty-four-hour treatment of hCMEC/D3 cells with AE, in concentrations between 50 and 200 μM, decreased the cell viability as well as the intracellular ATP levels in a dose-dependent manner. Increased ROS production and disruption of the mitochondrial membrane potential have also been detected. Notably, AE at a concentration greater than 5 μM dramatically increased intracellular calcium levels. Our results collectively indicate that AE inhibits proliferation of human brain microvascular cells via a mechanism involving ROS generation, disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondrial damage.

**Резюме:** Целта на тази работа е да се изследват механизмите на цитотоксичност на фитохидроксиантрахинон алоемодин (АЕ) върху човешкия мозъчен микроваскуларен ендотелен клетъчен кръг hCMEC / D3 и да се оцени клетъчният отговор в ранния етап на лечението, за да се разширят знанията на антиангиогенните свойства на АЕ.

Обезсмъртените човешки мозъчни капилярни ендотелни клетки hCMEC / D3 се третират с поредица от концентрации на АЕ (5 - 200  $\mu\text{M}$ ) за период от 24 часа. Клетъчната жизнеспособност се определя чрез MTS анализ. Клетъчните нива на аденозин трифосфат (АТФ) бяха оценени чрез луминесцентно изследване CellTiter-Glo®. Вътреклетъчните реактивни кислородни видове (ROS) се определят чрез 2', 7'-дихлорофлуоресцеин (CM-H2DCFDA) флуоресцентен анализ. Потенциалът на митохондриалната мембрана (ММР) беше оценен с оцветяване с тетраметилродамин метилов естер (TMRM), докато Fluo-4 беше използван за измерване на 2 вътреклетъчни концентрации на свободен  $\text{Ca}^{2+}$  вътре в живите клетки, анализирани чрез анализ на високо съдържание с помощта на ArgaScan VTI 740. Двадесет-четиричасово лечение на hCMEC/D3 клетки с АЕ, в концентрации между 50 и 200  $\mu\text{M}$ , намалява клетъчната жизнеспособност, както и вътреклетъчните нива на АТФ по зависим от дозата начин. Установено е също така повишено производство на ROS и нарушаване на митохондриалния мембранен потенциал. Забележително е, че АЕ при концентрация по-голяма от 5  $\mu\text{M}$  драстично повишава вътреклетъчните нива на калций. Нашите резултати колективно показват, че АЕ инхибира пролиферацията на човешки мозъчни микросъдови клетки чрез механизъм, включващ генериране на ROS, нарушаване на хомеостазата на  $\text{Ca}^{2+}$  и митохондриални увреждания.

22. Gyurova-Chausheva, A.J., Velichkova, E., Georgieva, R., **Danova, S.** & Stoylov, S.P. 2007, "Electric dipole moments of Escherichia coli revisited", Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, vol. 60, no. 7, pp. 763-768. [https://www.researchgate.net/publication/287918499\\_Electric\\_dipole\\_moments\\_of\\_Escherichia\\_coli\\_-\\_Revisited](https://www.researchgate.net/publication/287918499_Electric_dipole_moments_of_Escherichia_coli_-_Revisited)  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=31728&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** In the literature there is a considerable amount of experimental data for the permanent dipole moment and the electric polarizability of Escherichia coli. In this paper the data based mainly on electro-optic investigations is considered although that some dipolephoretic (more often called dielectrophoretic) are also taken into account. Serious grounds are found to doubt some of the conclusions made by one of the authors of this investigation and by some other researchers. This concerns both the permanent dipole moment and the electric charge dependent polarizabilities of Escherichia coli. Here along with the old experimental data are shown new experimental data for two strains of Escherichia coli - HB101 and XL-1-blue. The conclusion from the analysis of the old and new experimental data is that they do not prove the presence of permanent dipole moment and that the charge dependent electric polarizabilities are only smaller parts (less than 0.5 of the absolute value) of the total electric polarizability of Escherichia coli, the main component being the Maxwell-Wagner-Sillars electric polarizability.

**Резюме:** В литературата има значително количество експериментални данни за постоянния диполен момент и електрическата поляризуемост на *Escherichia coli*. В тази статия се разглеждат данните, базирани главно на електрооптични изследвания, въпреки че някои диполофоретици (по-често наричани диелектрофоретици) също са взети под внимание. Намерени са сериозни основания да се съмняват в някои от заключенията, направени от един от авторите на това изследване и от някои други изследователи. Това

се отнася както за постоянния диполен момент, така и за поляризуемостта на *Escherichia coli*, зависима от електрическия заряд. Тук заедно със старите експериментални данни са показани нови експериментални данни за два щамове на *Escherichia coli* - HB101 и XL-1-blue. Заключение от анализа на старите и новите експериментални данни е, че те не доказват наличието на постоянен диполен момент и че електрическите поляризуемости, зависими от заряда, са само по-малки части (по-малко от 0,5 от абсолютната стойност) от общата електрическа поляризуемост на *Escherichia coli*, основният компонент е електрическата поляризуемост на Maxwell-Wagner-Sillars. Изисквания на потребителите.

23. Nikolova D., Y. Evstatieva, R. Georgieva, S. Danova, V. Savov, S. Piieva, P. Dalev, (2009) Molecular taxonomic characterisation of probiotic strain *Lactobacillus* sp. 50P1, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23SE, 779-782 ISSN 1310-2818  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=15483&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** In recent years interest in the probiotic lactobacilli has been stimulated by the use of these bacteria in products that are claimed to confer health benefits on the consumer. The probiotic effects are usually strain-specific, meaning that a correct identification is important to link the strain to the specific health effect. Taxonomical characterization of probiotic strains only in phenotypic and physiological characteristics is often with low level of discrimination, probably due to their co-evolution in the same ecological niches. Thus, the nucleotide base techniques provide an accurate basis for phylogenetic analysis and identification. With this aim a probiotic strain *Lactobacillus* spp. 50P1 was studied. Through the physiological characterization with API 50 CH the strain 50P1, was determined as *Lactobacillus helveticus*, with low probability- 77,5%. Three PCR-based methods, species-specific PCR, of 16S rRNA gene sequencing, and restriction enzyme of 16S rDNA ARDRA analysis were used for reliable taxonomic characterization of probiotic strain *Lactobacillus* sp. 50P1. The sequence obtained from the strain was compared to those of *Lactobacillus* species held in GenBank and the belonging of the strain 50P1 to the species *Lactobacillus helveticus* was confirmed.

**Резюме:** През последните години интересът към пробиотичните лактобацили се стимулира от използването на тези бактерии в продукти, за които се твърди, че предоставят ползи за здравето на потребителя. Пробиотичните ефекти обикновено са специфични за щамове, което означава, че правилната идентификация е важна, за да се свърже щамът със специфичния здравен ефект. Таксономичната характеристика на пробиотичните щамове базирана само на фенотипни и физиологични характеристики често е с ниско ниво на дискриминация, вероятно поради тяхната коеволуция в същите екологични ниши. По този начин ДНК техниките предоставят точна основа за филогенетичен анализ и идентификация. С тази цел пробиотичен щам *Lactobacillus* spp. 50P1 беше проучен. Чрез физиологичната характеристика с API 50 CH щамът 50P1 се определя като *Lactobacillus helveticus*, с ниска вероятност - 77,5%. За надеждна таксономична характеристика на пробиотичния щам *Lactobacillus* sp. Са използвани три PCR-базирани метода, специфични за видовете PCR, на 16S rRNA генно секвениране и рестрикционен ензим на 16S rDNA ARDRA анализ. 50P1. Получената последователност



от щама е сравнена с тази на видовете *Lactobacillus*, държани в GenBank и е потвърдена принадлежността на щама 50P1 към вида *Lactobacillus helveticus*.

24. Petrova M., R. Georgieva, S. Dimitonova, N. Ivanovska, N. Hadjieva and **S. Danova\***, (2009) "Inhibitory activity of vaginal lactobacilli against human pathogens", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23SE, 627-631 ISSN 1310-2810  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=15483&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Lactic acid bacteria have long been considered as protective microflora, able to displace and kill different pathogens. Twenty vaginal strains, pre-selected as probiotics, were additionally characterized as effective antagonists against human pathogens. Four clinical reference strains-*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 39592, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922 were used as test-cultures in initial screening procedure. The active strains belonging to the species *L. fermentum*, *L. gasseri* and *L. salivarius* were tested against 10 antibiotic-resistant and problematic clinical isolates. In vitro the growth inhibition of two *Acinetobacter baumannii* and two *Pseudomonas aeruginosa* out-patient strains was observed. The active antimicrobials were the lactic acid and hydrogen peroxid produced during the cultivation of ten vaginal strains, in combination with thermo and proteinase-sensitive bacteriocin-like metabolites. Our results provide a promising base for further characterization of active compounds synthesized from Bulgarian vaginal *Lactobacillus* strains.

**Резюме:** Млечнокиселите бактерии отдавна се считат за защитна микрофлора, способна да измести и убие различни патогени. Двадесет вагинални щамове, предварително избрани като кандидат-пробиотици, бяха допълнително характеризирани като ефективни антагонисти срещу човешки патогени. Четири клинични референтни щамове - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 39592, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *E. coli* ATCC 25922 бяха използвани като тестови култури в първоначалната скринингова процедура. Активните щамове, принадлежащи към видовете *L. fermentum*, *L. gasseri* и *L. salivarius*, бяха тествани срещу 10 устойчиви на антибиотици и проблемни клинични изолати. In vitro се наблюдава инхибиране на растежа на два извънболни щамове на *Acinetobacter baumannii* и два *Pseudomonas aeruginosa*. Активните антимикробни средства са млечната киселина и водородният пероксид, получени по време на култивирането на десет вагинални щамове, в комбинация с термо- и протеиназно-чувствителни бактериоциноподобни метаболити. Нашите резултати осигуряват обещаваща основа за по-нататъшно характеризиране на активни съединения, синтезирани от български вагинални щамове *Lactobacillus*.

25. Dobрева-Yosifova G., L. Yocheva, A. Mehmed, **S. Danova** and **S. Antonova-Nikolova**, (2009) In vitro characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria from Bulgarian rye sourdoughs *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2009, 23SE, 801-805 ISSN 1310-2818  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=15483&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Lactic acid bacteria play a key role in human health. These friendly bacteria as a part of the microflora of the gastrointestinal tract (GIT) have a beneficial influence on microbial balance. The probiotic cultures stimulate the growth of beneficial microorganisms, crowd out potentially harmful bacteria and reinforce the body's natural defense mechanisms. Recent data improve the positive effects of probiotics and stimulate research for discovering of new lactic acid bacteria strains with probiotic properties. In present work the probiotic potential of 23 strains lactic acid bacteria, isolated from Bulgarian rye sourdoughs from different geographical regions was studied *in vitro*. Their affiliation to the genus *Lactobacillus* and *Pediococcus* was determined by classical phenotyping methods. Screening of the strains at selecting factors high acidity and different concentrations of bile salts was first accomplished. In addition, susceptibility to antibiotics, production of hydrogen peroxide and spectrum of antimicrobial activity were determined. After primary selection, 8 strains were chosen and they were tested in a model system for *in vitro* simulation of the conditions into the human GIT. As a result, two strains with high probiotic potential were found.

**Резюме:** Млечнокиселите бактерии играят ключова роля за човешкото здраве. Тези приятелски бактерии като част от микрофлората на стомашно-чревния тракт (GIT) имат благоприятно влияние върху микробния баланс. Пробиотичните култури стимулират растежа на полезните микроорганизми, изтласкват потенциално вредните бактерии и подсилват естествените защитни механизми на организма. Последните данни подобряват положителните ефекти на пробиотиците и стимулират изследванията за откриване на нови щамове млечнокисели бактерии с пробиотични свойства. В настоящата работа е изследван *in vitro* пробиотичният потенциал на 23 щамове млечнокисели бактерии, изолирани от закваски от българска ръж от различни географски региони. Принадлежността им към рода *Lactobacillus* и *Pediococcus* се определя чрез класически методи за фенотипизиране. Първо бе извършен скрининг за преживяемост на щамовете при избор на фактори с висока киселинност и различни концентрации на жлъчни соли. В допълнение бяха определени чувствителността към антибиотици, производството на водороден пероксид и спектърът на антимикробна активност. След първична селекция бяха избрани 8 щамове и те бяха тествани в моделна система за *in vitro* симулация на условията в човешкия GIT. В резултат бяха открити два щамове с висок пробиотичен потенциал.

26. Koleva P., R. Georgieva, D. Nikolova, **S. Danova\*** (2009), "Lactic acid microflora of Bulgarian milk products from mountain regions", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23SE, 856-860 ISSN 1310-2818  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2009.10818557>  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=15483&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** This study aimed to isolate and characterize viable lactic acid bacteria (LAB) from the most popular in Bulgaria fermented milk products. Different samples from home-made cheeses, yoghurt and katak, from ecological regions of Stara Planina, Rila and Rodopi mountains were collected. A total of 25 LAB cultures (coci and rods) were isolated and

polyphasic taxonomic characterization was performed. Eight of the strains from yoghurt were phenotypically similar to *Lactobacillus delbrueckii*. Other seven isolates from cheese and yoghurt were identified as *Lactobacillus plantarum*, according to classical tests and API LAB profiles. Their species affiliation was confirmed by species-specific and multiplex PCR. The molecular-based methods allowed reclassifying two cheese isolates determined as *L. paracasei*. *L. plantarum* was the predominant species in cheese samples and referred as member of non-starter lactic acid bacteria. Two of the new isolated *L. plantarum* strains showed anti-*E. coli* activity.

**Резюме:** Настоящото проучване има за цел да изолира и характеризира жизнеспособни млечнокисели бактерии (LAB) от най-популярните в България ферментирани млечни продукти. Бяха събрани различни проби от домашно приготвени сирена, кисело мляко и катак от екологичните райони на Стара планина, Рила и Родопи. Изолирани са общо 25 LAB култури (коки и пръчки) и е извършена полифазна таксономична характеристика. Осем от шамовете от кисело мляко са фенотипно подобни на *Lactobacillus delbrueckii*. Други седем изолати от сирене и кисело мляко са идентифицирани като *Lactobacillus plantarum*, според класически тестове и API LAB профили. Тяхната видова принадлежност е потвърдена чрез специфични за видовете и мултиплекс PCR. Методите, базирани на молекули, позволиха да се прекласифицират два изолата на сирене, определени като *L. paracasei*. *L. plantarum* е преобладаващият вид в пробите от сирене и е посочен като член на нестартерната млечнокисела микрофлора. Два от новите изолирани шамове *L. plantarum* показват анти-*E. coli* активност.

27. Georgieva R., P. Koleva, D. Nikolova, D. Yankov, **S. Danova\***, "Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese". *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2009, 23SE, 861-865  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=15483&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Different aspects, including safety, functional and technological characteristics, have to be taken into consideration in the selection of each probiotic microorganism. The aim of the present work was to determine the kinetic growth parameters of *L. plantarum* strain after cultivation in media with different carbon sources. The strain was isolated from traditional Bulgarian white cheese and previously characterized as putative probiotic, based on commonly accepted in vitro criteria. For further biotechnological implementation was necessary to select a suitable and economically relevant growth media. Thus, reconstituted permeate (6% w/v) and the following modification of de Man, Rogose Sharpe media (MRS): (i) MRS-glucose; (ii) MRS-lactose; (iii) MRS-galactooligosaccharide; (iv) MRS-fructooligosaccharide were used. The strain growth, lactic acid production and carbon source utilization were monitored by pH and cell number determination, and HPLC analysis at different time points of the cultivation process. The highest cell growth and carbohydrate conversion were detected in the presence of glucose and lactose. The main product of the fermentation was lactate with detectable level of acetate. The permeate and MRS-galactooligosaccharide also support good growth and lactic acid production, which indicate a great potential for industrial applications of studied *L. plantarum* strain into the food system.

**Резюме:** При избора на всеки пробиотичен микроорганизъм трябва да се вземат предвид различни аспекти, включително безопасност, функционални и технологични характеристики. Целта на настоящата работа е да се определят кинетичните параметри на растеж на щам *L. plantarum* след култивиране в среда с различни източници на въглерод. Щамът е изолиран от проба на традиционно българско бяло сирене и преди това е характеризирани като предполагаем пробиотик, въз основа на общоприети ин витро критерии. За по-нататъшно биотехнологично изпълнение е необходимо да се избере подходяща и икономически значима среда за растеж. По този начин, разтвореният пермеат (6% w/v) и следните модификации на de Man, Rogose Sharpe media (MRS): (i) MRS-глюкоза; (ii) MRS-лактоза; (iii) MRS-галактоолигозахарид; (iv) MRS-fructooligosaccharide са използвани. Растежът на щама, производството на млечна киселина и използването на източника на въглерод се наблюдават чрез определяне на рН и броя на клетките и HPLC анализ в различни моменти от процеса на култивиране. Най-висок клетъчен растеж и катаболитно превръщане на въглехидрати се отчитат в присъствието на глюкоза и лактоза. Основният продукт на ферментацията е лактат с откриваемо ниво на ацетат. Пермеатът и MRS-галактоолигозахаридът също поддържат добър растеж и производство на млечна киселина, което показва голям потенциал за промишлено приложение на изследвания щам *L. plantarum* в хранителната система.

28. Kirilov, H., T. Petkova, J. Atanasova, Sv. Danova, I. Iliev, Y. Popov, T. Haertle and I. V. Ivanova. Proteolytic activity in lactic acid bacteria from Iraq, Armenia and Bulgaria *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2009, 23SE, 643-646  
<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/13102818.2009.10818506>  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=15483&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Functional foods hold a great promise for future trends in human nutrition. Consumption of milk and milk products has a pronounced probiotic effects together with the expected modification of allergenic properties of milk due to the process of fermentation. The proteolytic system of lactic acid bacteria consists a cell wall bound proteinase and several intracellular peptidases, and can contribute to the liberation of bioactive peptides. Food-derived bioactive peptides are claimed to be health-enhancing components, which can be used for functional food. In this study the attention was focused on homemade milk products from the Balkan region and also from Armenia and Iraq, as a source of newly potential starters for application in the food industry. In this context the aim of this study was to screen the proteolytic activity of newly isolated strains, by determination of the optimal conditions of proteolysis for reducing the milk proteins allergenicity. The proteolytic activity of 50 lactic acid strains was tested against major milk proteins. Some of the studied strains showed relatively high proteolytic activity towards  $\kappa$ -casein,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin reducing their concentration proved by the HPLC analysis and Tricine-PAGE. Hydrolysis of milk protein generated peptides with antimicrobial effect against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus avium* and *Salmonella choleraesuis*. Consequently to obtain a maximal effect of the product, a combination of strains with different properties could be used as starters in milk industry.

**Резюме:** Функционалните храни имат голямо обещание за бъдещите тенденции в човешкото хранене. Консумацията на мляко и млечни продукти има подчертан пробиотичен ефект заедно с очакваното изменение на алергенните свойства на млякото поради процеса на ферментация. Протеолитичната система на млечнокиселите бактерии се състои от свързана с клетъчната стена протеиназа и няколко вътреклетъчни пептидази и може да допринесе за освобождаването на биоактивни пептиди. Твърди се, че биоактивните пептиди, получени от храна, са подобряващи здравето компоненти, които могат да се използват за функционална храна. В това проучване вниманието беше съсредоточено върху домашно приготвените млечни продукти от Балканския регион, а също от Армения и Ирак, като източник на нови потенциални начални продукти за приложение в хранителната индустрия. В този контекст целта на това проучване е да се провери протеолитичната активност на новоизолирани щамове, чрез определяне на оптималните условия на протеолиза за намаляване на алергенността на млечните протеини. Протеолитичната активност на 50 млечнокисели щамове беше тествана срещу основните млечни протеини. Някои от изследваните щамове показват относително висока протеолитична активност спрямо а-казеин, а-лакталбумин и а-лактоглобулин, намалявайки тяхната концентрация, доказана чрез HPLC анализ и Tricine-PAGE. Хидролиза на генерирани пептиди от млечен протеин с антимикробен ефект срещу *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus avium* и *Salmonella choleraesuis*. Следователно, за да се получи максимален ефект на продукта, комбинация от щамове с различни свойства може да се използва като начало в млечната промишленост.

29. Stoyanovski S., S. Danova, L. Yocheva, I. Dimitrova, S. Antonova, I. Ivanova, Characterization of lactic acid bacteria from dried sausages, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23SE, (2009). ISSN: 1310 - 2818  
[https://www.researchgate.net/publication/266259554\\_Characterization\\_of\\_Lactic\\_Acid\\_Bacteria\\_from\\_Dry\\_Sausages](https://www.researchgate.net/publication/266259554_Characterization_of_Lactic_Acid_Bacteria_from_Dry_Sausages)  
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=15483&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** Eight genera (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*) are most commonly used meat starter cultures. The Lactobacilli associated with meat fermentation and the efforts to accurate classification and identification of them are becoming more important as various isolates of LAB become more commonly used as starter cultures. The present work deals with characterization of the microflora associated with naturally fermented Bulgarian sausages (Lukanka) and sausages (Lukanka) with defined starter culture produced by “Tandem”. More than 200 strains of genera *Lactobacillus* were isolated during the different stages of the fermentation process of the naturally fermented sausages. The morphological, cultural and physiological and biochemical analysis were performed. In such a system such as meat with a wide variety of complex substrates serving as sources of peptoses, organic acid and other fermentable compounds different end products are formed. Research on the production of lactic acid, determination of pH, screening for producers of antimicrobials was performed.

**Резюме:** Представителите на осем рода (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*) са най-често използваните в месни закваски. Лактобацилите, свързани с ферментацията на месото, и усилията за точна класификация и идентификация на тях стават все по-важни, тъй като различните изолати на LAB стават все по-често използвани като начални култури. Настоящата работа се занимава с характеризиране на микрофлората, свързана с естествено ферментирани български колбаси (Луканка) и колбаси (Луканка) с определена стартерна култура, произведена от „Тандем“. По време на различните етапи от ферментационния процес на естествено ферментирани колбаси бяха изолирани повече от 200 щамове от родове *Lactobacillus*. Извършен е морфологичен, културен и физиологичен и биохимичен анализ. В такава система като месо с голямо разнообразие от сложни субстрати, служещи като източници на пептози, органична киселина и други ферментиращи съединения се образуват различни крайни продукти. Извършени са изследвания върху производството на млечна киселина, определяне на рН, скрининг за производители на антимикробни средства.

30. Тropicheva, R., Georgieva, R. & Danova, S\*. 2011, "Adhesion ability of *Lactobacillus plantarum* AC131", *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 25, no. SUPPL. 4, pp. 121-124.

**Abstract:** Adhesion of lactic acid bacteria (LAB) to mucosal surfaces and their ability to prevent pathogenic invasion of the epithelium are among the most beneficial properties of probiotic lactobacilli. The molecular mechanisms of lactobacillus adhesion have not been fully studied and understood yet. Therefore, a current task is to reveal the genetic and biological factors that determine the adhesion of probiotic LAB cultures. A dairy product originating strain AC131 was selected for the present study, based on its broad-spectrum antimicrobial activity. It was identified as *Lactobacillus plantarum* by 16S rDNA sequence analysis. The presence of genes *Map*, *Mub* and *EF-Tu*, as genetic determinants of the adhesion factors in *Lactobacillus plantarum* AC131, was established by PCR analyses. In addition, *in vitro* tests for adhesive ability of the strain AC131 were carried out. Positive results in tests with two different cell lines were obtained and the strain AC131 was classified as strongly adhesive to HeLa and moderate adhesive to HT-29 cell line. Our results provide a promising basis for further characterization of *Lactobacillus plantarum* AC131, as a potential probiotic.

**Резюме:** Адхезията на млечнокисели бактерии (LAB) към лигавичните повърхности и способността им да предотвратяват патогенна инвазия на епитела са сред най-полезните свойства на пробиотичните лактобацили. Все още не са напълно проучени и разбрани молекулярните механизми на адхезия на лактобацили. Следователно настоящата задача е да разкрие генетичните и биологични фактори, които определят адхезията на пробиотичните LAB култури. За настоящото проучване е избран млечен продукт с произход щам AC131 въз основа на неговата широкоспектърна антимикробна активност. Той беше идентифициран като *Lactobacillus plantarum* чрез анализ на 16S рДНК последователност. Наличието на гени *Map*, *Mub* и *EF-Tu* като генетични детерминанти

на адхезионните фактори в *Lactobacillus plantarum* AC131 е установено чрез PCR анализи. В допълнение бяха проведени *in vitro* тестове за адхезивна способност на щам AC131. Получени са положителни резултати при тестове с две различни клетъчни линии и щамът AC131 е класифициран като силно адхезивен към HeLa и умерен адхезив към клетъчна линия HT-29. Нашите резултати осигуряват обещаваща основа за по-нататъшно характеризиране на *Lactobacillus plantarum* AC131, като потенциален пробиотик.

31. Karsheva, M., Paskov, V., Tropcheva, R., Georgieva, R. & Danova, S.\* 2013, "Physicochemical parameters and rheological properties of yoghurts during the storage", *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, vol. 48, no. 5, pp. 483-488.

**Abstract:** The aim of this study is to investigate the changes in different physicochemical, texture and sensory properties of milk fermented with different strains during the storage. An experimental study of the effect of the storage time on the physicochemical and rheological properties of milk fermented with commercial starter (St-Lb) and the same starter with a probiotic *Lactobacillus salivarius* LS adjunct was carried out. The effect of the storage on the pH, titrable acidity, lactic acid concentration, microorganisms count, gel firmness and rheological parameters is investigated. During the fermentation a stable decrease of the pH values and increase in the titrable acidity was observed. Through the whole storage period at 4°C (till 28<sup>th</sup> day) the both fermented milks kept stable rheological and organoleptic properties. This determines the fermented milk as a suitable form for oral administration of tested probiotic strain LS. The rheological tests showed that the products studied demonstrated non-Newtonian behaviour, which could be described with Herschell-Bulkley rheological model. A correlation between the model parameters and the results of the penetration test was found. The results of this study can be used in production of new fermented milk products with functional properties.

**Резюме:** Целта на това проучване е да изследва промените в различните физикохимични, структурни и сензорни свойства на млякото, ферментирало с различни щамове по време на съхранението. Експериментално е проследен ефекта от времето на съхранение върху физикохимичните и реологични свойства на млякото, ферментирало с търговско стартер (St-Lb) и същото със стартер пробиотик *Lactobacillus salivarius* LS добавка. Изследван е ефектът от съхранението върху рН, киселинността на титруване, концентрацията на млечна киселина, броя на микроорганизмите, твърдостта на гела и реологичните параметри. По време на ферментацията се наблюдава стабилно намаляване на стойностите на рН и повишаване на титруемата киселинност. През целия период на съхранение при 4 ° C (до 28-ия ден) и двете ферментирали млека запазват стабилни реологични и органолептични свойства. Това определя ферментиралото мляко като подходяща форма за перорално приложение на тестван пробиотичен щам LS. Реологичните тестове показаха, че изследваните продукти демонстрират не-нютонново поведение, което може да бъде описано с реологичен модел на Herschell-Bulkley. Установена е корелация между параметрите на модела и резултатите от теста за

проникване. Резултатите от това проучване могат да бъдат използвани при производството на нови ферментирани млечни продукти с функционални свойства.

32. Tropcheva, R., Hristova, J., Georgieva, R., Salageanu, A., Sgouras, D.N. & Danova, S\*. 2013, "In vitro assessment of prebiotic utilization by dairy lactobacilli", Bulgarian Journal of Agricultural Science, vol. 19, no. SUPPL. 2, pp. 105-107.

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19400157213&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** The new consumers' demand for healthy products on the market enhances intensive researches on lactic acid bacteria (LAB) and prebiotics. Individually and in combinations (in a synbiotic form), they can be effective microbial modulators, with a positive impact on human health and wellbeing. Thus, the selection of successful combinations LAB strain-prebiotic is a milestone in the development of new functional foods and products. With this aim, the potential of 33 Bulgarian LAB strains to growth in the presence of galactooligosaccharide (GOS), glucooligosaccharide (GLOS) and fructooligosaccharide (FOS) were estimated. Thirty-three original LAB strains, from traditional Bulgarian dairy products have been identified and pre-selected on the base of widely accepted in vitro criteria for probiotics. The in vitro assessment of prebiotic's utilization was evaluated in a mini-plate model system with a modified MRS broth. The major part of tested LAB was able to growth in medium containing 10% v/v GLOS (69-76% of the tested strains) and GOS (88-99.82%) as a single carbon source. About the FOS, approximately 67% of the tested strains utilized it partially, and only 3% of them - completely. A higher metabolic activity has been proved for LAB strains belonging to the species *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis*. A strict correlation has been reported between the ability of different *Lactobacillus plantarum* to ferment GOS and their  $\beta$ -galactosidase activity. The results revealed that the oligosaccharide utilization patterns are strain-specific and they do not depend from the origin of the tested LAB. Obtained data is promising for further development of new synbiotic formulas.

**Резюме:** Търсенето на новите потребители на здравословни продукти на пазара засилва интензивните изследвания върху млечнокиселите бактерии (LAB) и пребиотиците. Индивидуално и в комбинации (в синбиотична форма), те могат да бъдат ефективни микробни модулатори, с положително въздействие върху човешкото здраве и благосъстояние. По този начин изборът на успешни комбинации LAB + щам-пребиотик е крайъгълен камък в разработването на нови функционални храни и продукти. С тази цел бе оценен потенциалът на 33 български LAB щамове за растеж в присъствието на галактоологозахарид (GOS), глюкоолигозахарид (GLOS) и фруктоолигозахарид (FOS). Тридесет и три оригинални щамове LAB от традиционни български млечни продукти са идентифицирани и предварително избрани въз основа на широко приети in vitro критерии за пробиотици. Оценката *in vitro* на употребата на пребиотик беше оценена в модел на мини-плоча с модифициран MRS бульон. По-голямата част от тестваните LAB да расте в среда, съдържаща 10% v/v GLOS (69-76% от тестваните щамове) и GOS (88-99.82%) като единичен източник на въглерод в средата. Що се отнася до FOS, приблизително 67% от тестваните щамове го използват частично и само 3% от тях - напълно. Доказана е по-висока метаболитна активност за LAB щамове, принадлежащи към видовете *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus brevis*. Съобщава се за строга корелация между способността на различните *Lactobacillus plantarum* да ферментират



GOS и тяхната  $\beta$ -галактозидазна активност. Резултатите разкриха, че моделите на използване на олигозахаридите са специфични за щама и те не зависят от произхода на тестваната LAB. Получените данни са обещаващи за по-нататъшно разработване на нови синбиотични формули.

33. Nemska, V., **Danova, S.**, Georgieva, N. Enzyme profile of lactobacilli from traditional Bulgarian fermented milk products. Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 54, 6, University of Chemical Technology and Metallurgy, 2019, ISSN:13143859, 13147471, 1157-1164. <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100239852&tip=sid&clean=0>

**Abstract:** In recent years, scientific community has focused the attention on the non-starter lactic acid microbiota of home-made dairy products as a source of new candidate-probiotic strains. Lactic acid bacteria (LAB) and in particular *Lactobacillus* spp. play a major role in acquiring the specific taste and aroma of the final product during the fermentation. For this purpose, 43 *Lactobacillus* strains, isolated from traditional Bulgarian katak, curd, yoghurt, white-brined and yellow cheese, were subjected to screening of their enzyme capacity. Twenty-five of the strains were pre-selected for determination of their enzyme profile by API ZYM system. It was established that most of the strains showed high leucine and valine arylamidase,  $\beta$ -galactosidase and  $\alpha$ -glucosidase activity. Only a few strains showed N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase and Naphtol-AS-BI-phospho-hydrolase activity. Alkaline phosphatase, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -mannosidase, lipase (except *L. lactis* OC2),  $\beta$ -glucuronidase (except *L. salicinus* KC2) and  $\alpha$ -fucosidase (except *L. plantarum* BS41 and *L. lactis* OC2) activity were not observed. In order to complete the obtained results, two qualitative tests for determination of the  $\beta$ -galactosidase and proteolytic activity of more than 30 *Lactobacillus* strains were also applied. Most of the investigated lactobacilli showed moderate proteolytic activity. According to their  $\beta$ -galactosidase activity, 34 % could be defined as active lactose fermenters, 23 % - as late lactose fermenters and 43 % - could not ferment lactose. The investigated *Lactobacillus* strains showed strain-specific enzyme capacity.

**Резюме:** През последните години научната общност фокусира вниманието върху неподготвената млечнокисела микробиота на домашно приготвени млечни продукти като източник на нови кандидат-пробиотични щамове. Млечнокисели бактерии (LAB) и по-специално *Lactobacillus* spp. играят важна роля при придобиването на специфичния вкус и аромат на крайния продукт по време на ферментацията. За тази цел 43 щамове *Lactobacillus*, изолирани от традиционния български катак, извара, кисело мляко, бяло саламурено и кашкавал, бяха подложени на скрининг на техния ензимен капацитет. Двадесет и пет от щамовете бяха предварително избрани за определяне на техния ензимен профил чрез API ZYM система. Установено е, че повечето щамове показват висока активност на левцин и валин ариламидаза,  $\beta$ -галактозидаза и  $\alpha$ -глюкозидаза. Само няколко щамове показват N-ацетил- $\beta$ -глюкозаминидаза,  $\alpha$ -галактозидаза,  $\beta$ -глюкозидаза и нафтол-AS-BI-фосфо-хидролазна активност. Активността на алкална фосфатаза, трипсин,  $\alpha$ -химотрипсин,  $\alpha$ -манозидаза, липаза (с изключение на *L. lactis* OC2),  $\beta$ -глюкуронидаза (с изключение на *L. salicinus* KC2) и  $\alpha$ -фукозидаза (с изключение на *L. plantarum* BS41 и *L. lactis* OC2) не се наблюдава. За да бъдат завършени получените

резултати, бяха приложени и два качествени теста за определяне на  $\beta$ -галактозидазата и протеолитичната активност на повече от 30 щамове *Lactobacillus*. Повечето от изследваните лактобацили показват умерена протеолитична активност. Според тяхната  $\beta$ -галактозидазна активност 34% могат да бъдат определени като активни ферментатори на лактоза, 23% - като късни ферментатори на лактоза и 43% - не могат да ферментират лактоза. Изследваните щамове *Lactobacillus* показват специфичен за щамове ензимен капацитет. Т на нови синбиотични формули.