

Списък от резюмета на публикации на английски и български език

на гл. ас. д-р Надя Стойчева Радченкова

кандидат в конкурс за академична длъжност „Доцент“

обявен за нуждите на Департамент по „Обща микробиология“,

лаборатория „Екстремофилни бактерии“,

Професионално направление 4.3 Биологически науки,

ДВ бр. 12/12.02.2021 г.

(съгласно минималните национални критерии по ЗРАСРБ и

допълнителните изисквания на ИМикБ-БАН)

Група от показатели В

1. **Radchenkova, N.**, Hasköylü, M. E., Vassilev, S., Yıldız, S. Y., Boyadzhieva, I., Oner, E. T., **Kambourova, M.** Improved Exopolymer Production by *Chromohalobacter canadensis* Cultures for Its Potential Cosmeceutical Applications. *Microorganisms*. 8, 12, MDPI, 2020, 1935. JCR-IF (**Web of Science**):**4.125**

Abstract

Several exopolymers with different chemical composition and correspondingly variety in their physico-chemical properties from halophilic microorganisms have still been described, however, with a low production yield. *Chromohalobacter canadensis* 28 isolated from Pomorie saltern synthesized an unusual exopolymer (EP) containing 72% γ -polyglutamic acid (PGA), an essential cosmeceutical additive. Current work suggests a novel approach for effective EP synthesis by *C. canadensis* 28 using continuous cultures. Highest production was observed at low dilution rates reaching a level of 2.1 mg/mL at $D = 0.035$, similar to those in batch cultures (2.34 mg/mL), however avoiding all disadvantages of discontinuous fermentation processes. At steady state, the total quantities of the synthesized EP after 48 h cultivation for the given equipment volume in $D = 0.035 \text{ h}^{-1}$ and $D = 0.075 \text{ h}^{-1}$ were 8.67 and 12 g, correspondingly, while it was 2.9 g for batch culture. Process parameters did not change after a ten-day run at $D = 0.35 \text{ h}^{-1}$. A degree of purity of EP fraction received from continuous cultures was significantly increased up to 93–96%. A lack of cytotoxicity and high cell viability were observed for human dermal fibroblast cells after 24 h incubation with crude EP from *C. canadensis* 28 and purified PGA fraction that could suggest its high potential for cosmetic applications

Подобрена продукция на екзополимер от *Chromohalobacter canadensis* за неговото потенциално приложение в козметиката.

Резюме: Все още са описани само няколко екзополимера с различен химичен състав и съответно разнообразие на техните физико-химични свойства от халофилни микроорганизми, но с нисък добив. *Chromohalobacter canadensis* 28, изолиран от солници в Поморие, синтезира необичаен екзополимер (ЕП), съдържащ 72% γ -полиглутаминова киселина (PGA), съществена козметична добавка. Настоящата работа предлага нов подход за ефективен синтез на ЕП от *C. canadensis* 28, посредством непрекъснати култури. Най-висока синтеза беше наблюдавана при ниски скорости на разреждане, достигащи ниво от 2,1 mg / ml при $D = 0,035$, подобно на тези в периодичните култури (2,34 mg / ml), но избягвайки всички недостатъци на непрекъснатите ферментационни процеси. В стационарно състояние общите количества от синтезирания ЕП след 48 h култивиране за дадения обем на оборудването в $D = 0,035 \text{ h}^{-1}$ и $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$ са съответно 8,67 и 12 g, докато за периодичната култура е 2,9 g. Параметрите на процеса останаха непроменени след десетдневна работа при $D = 0,35 \text{ h}^{-1}$. Степента на чистота на фракцията на ЕП, получена от непрекъснати култури, беше увелена значително до 93–96%. Липса на цитотоксичност и висока клетъчна жизнеспособност бяха наблюдавани за човешки дермални фибробластни клетки след 24 часа инкубация с непречистен ЕП от *C. canadensis* 28 и пречистена PGA фракция, което предполага неговия висок потенциал за козметични приложения.

2. **Radchenkova, N.,** Boyadzhieva, I, Atanasova, N, Kambourova, M.S. High bioreactor production and emulsifying activity of an unusual exopolymer by *Chromohalobacter canadensis* 28. *Engineering in Life Sciences*, 20, 8, Wiley Online Library, 2020, DOI:<https://doi.org/10.1002/elsc.202000012>, 357-367. SJR (Scopus):0.559, JCR-IF (**Web of Science**):1.936

Abstract

Unusual composition of an exopolymer (EP) from an obligate halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28 has triggered an interest in development of an effective bioreactor process for its production. Its synthesis was investigated in 2-L bioreactor at agitation speeds at interval 600-1000 rpm, at a constant air flow rate of 0.5 vvm; aeration rates of 0.5, 1.0, and 1.5 vvm were tested at constant agitation rate of 900 rpm. EP production was affected by both, agitation and aeration. As a result twofold increase of EP yield was observed and additionally increased up to 3.08 mg/mL in a presence of surfactants. For effective scale-up of bioreactors mass transfer parameters were estimated and lowest values of K_La obtained for the highest productivity fermentation was established. Emulsification activity of EP exceeded that of trade hydrocolloids xanthan, guar gum, and cellulose. A good synergism between EP and commercial cellulose proved its potential exploration as an enhancer of emulsifying properties of trade emulsions. A pronounced lipophilic effect of EP was established toward olive oil and liquid paraffin. Cultivation of human keratinocyte cells (HaCaT) with crude EP and purified γ -polyglutamic acid (PGA) showed higher viability than control group.

Висока продукция и емулгираща способност получени в биореактор при необичаен екзополимер от *Chromohalobacter canadensis* 28

Резюме: Необичайният състав на екзополимер (ЕП) от облигатната халофилна бактерия *Chromohalobacter canadensis* 28 предизвика интерес към разработването на ефективен

биореакторен процес за неговата синтеза. Тя беше изследвана в 2-л биореактор при скорости на разбъркване в интервал 600-1000 об/мин, при постоянен дебит на въздуха от 0,5 об/об. мин; тествани бяха скорости на аерация от 0,5, 1,0 и 1,5 об/об. мин при постоянна скорост на разбъркване от 900 об/мин. Беше установено, че продукцията на ЕП се повлиява както от разбъркването, така и от аерацията. В резултат беше наблюдавано двукратно увеличение на добива на ЕП и допълнително увеличение до 3,08 мг / мл в присъствието на повърхностноактивни вещества. За ефективно разширяване на биореакторите бяха оценени параметрите на масообмен и бяха установени най-ниските стойности на KLa, получени за ферментация с най-висок добив. Емулгиращата активност на ЕП надвишава тази на търговските хидроколоиди ксантан, гуарова гума и целулоза. Добрият синергизъм между ЕП и търговската целулоза доказва потенциала му като подобрител на емулгиращите свойства на търговските емулсии. Беше установен подчертан липофилен ефект на ЕП спрямо зехтина и течния парафин. Култивирането на човешки кератиноцитни клетки (HaCaT) с неprecистен ЕП и пречистена γ -полиглутаминова киселина (PGA) показва по-висока жизнеспособност от контролната група.

3. **Radchenkova N**, Boyadzhieva I, Atanasova N,, Poli A, Finore I,, Di Donato P, Nicolaus B,, Panchev I, Kuncheva M,, Kambourova M. Extracellular polymer substance synthesized by a halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 102, 11, 2018, DOI:10.1007/s00253-018-8901-0, 4937-4949. SJR (Scopus):1.127, JCR-IF (Web of Science):3.42

Abstract

Halophilic microorganisms are producers of a lot of new compounds whose properties suggest promising perspectives for their biotechnological exploration. Moderate halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28 was isolated from Pomorie salterns as an extracellular polymer substance (EP) producer. The best carbon source for extracellular polymer production was found to be lactose, a sugar received as a by-product from the dairy industry. After optimization of the culture medium and physicochemical conditions for cultivation, polymer biosynthesis increased more than 2-fold. The highest level of extracellular polymer synthesis by *C. canadensis* 28 was observed in an unusually high NaCl concentration (15% w/v). Chemical analysis of the purified polymer revealed the presence of an exopolysaccharide (EPS) fraction (14.3% w/w) and protein fraction (72% w/w). HPLC analysis of the protein fraction showed the main presence of polyglutamic acid (PGA) (75.7% w/w). EPS fraction analysis revealed the following sugar composition (% w/w): glucosamine 36.7, glucose 32.3, rhamnose 25.4, xylose 1.7, and not identified sugar 3.9. The hydrogel formed by PGA and EPS fractions showed high swelling behavior, very good emulsifying and stabilizing properties, and good foaming ability. This is the first report for halophilic bacterium able to synthesize a polymer containing PGA fraction. The synthesized biopolymer shows an extremely high hydrophilicity, due to the simultaneous presence of PGA and EPS. The analysis of its functional properties and the presence of glucosamine in the highest proportion in EPS fraction clearly determine the potential of EP synthesized by *C. canadensis* 28 for application in the cosmetics industry

Извънклетъчна полимерна субстанция синтезирана от халофилната бактерия *Chromohalobacter Canadensis* 28

Резюме : Халофилните микроорганизми са продуценти на много нови съединения, чиито свойства предлагат обещаваща перспектива за тяхната биотехнологична експлоатация. Умерената халофилна бактерия *Chromohalobacter Canadensis* 28 беше изолирана от Поморийски солници като продуцент на извънклетъчна полимерна субстанция. Най-добър въглероден източник за полимерна синтеза беше лактозата, захар получена като страничен продукт в млечната индустрия. След оптимизиране на културалната среда и физикохимичните условия за култивиране биосинтезата на полимер беше увеличена повече от 2 пъти. Максималната синтеза на извънклетъчен полимер от *Chromohalobacter canadensis* 28 беше установена при необичайно висока концентрация на NaCl (15%). Химичните анализи на пречистения ЕП показаха присъствие на екзополизахаридна фракция (14.3%) и белтъчна фракция (72%). HPLC анализите на белтъчната фракция показаха присъствие основно на полиглутаминова киселина (PGA) (75.7%). Анализиранията фракция на ЕП показва следния монозахариден състав (%): глюкоза 36.7, рамноза 25.4, ксилоза 1.7 и неидентифицирани 3.9. Хидрогелът формиран от полиглутаминовата киселина и екзополизахаридната фракция показва добра набухваща способност, много добри емулгиращи и стабилизиращи свойства, както и пенообразуване. Това е първо съобщение за халофилна бактерия, синтезираща полимер, съдържащ PGA. Синтезираният полимер е с екстремно висока хидрофилност в присъствието едновременно на полиглутаминова киселина и полизахарид. Анализите на функционалните свойства в присъствието на глюкозамин в голяма част в ЕПЗ фракция, ясно очертава потенциала на ЕП от *Chromohalobacter canadensis* 28 като приложим в козметичната индустрия.

4. **Radchenkova N, Vassilev S, Panchev I, Kuncheva M, Kambourova M.** Continuous cultivation of a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418 for production of an exopolysaccharide applicable in cosmetic creams. *J Appl Microbiol.*, 2015, ISI **IF:2.4**

Abstract

Aims

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of continuous cultivation approach for exopolysaccharide (EPS) production by a thermophilic micro-organism and the potential of the synthesized EPS for application in cosmetic industry.

Methods and Results

Study on the ability of *Aeribacillus pallidus* 418, isolated as a good EPS producer, to synthesize the polymer in continuous cultures showed higher production in comparison with batch cultures. The degree of the EPS in the precipitate after continuous cultivation significantly increased. Non-Newtonian pseudoplastic and thixotropic behaviour of EPS determines the ability of the received cream to become more fluid after increasing time of application on the skin.

Conclusions

This study demonstrates a highly efficient way for production of EPS from a continuous growth culture of *A. pallidus* 418 that have many advantages and can outperform batch culture by eliminating time for cleaning and sterilization of the vessel and the comparatively long lag phases before the organisms enter a brief period of high productivity. The valuable

physico-chemical properties of the synthesized EPS influenced positively the properties of a commercial cream.

Significance and Impact of the Study

EPSs from thermophilic micro-organisms are of special interest due to the advantages of the thermophilic processes and nonpathogenic nature of the polymer molecules. However, their industrial application is hindered by the comparatively low biomass and correspondingly EPS yield. Suggested continuous approach for EPS could have an enormous economic potential for an industrial scale production of thermophilic EPSs.

Непрекъснато култивиране на термофилната бактерия *Aeribacillus pallidus* 418 за синтеза на екзополisahарид приложим в козметични кремове

Резюме

Цели

Целта на проучването беше да се оцени ефективността на подхода на непрекъснато култивиране за производството на екзополisahариди (ЕПЗ) от термофилен микроорганизъм и потенциала на синтезирания ЕПЗ за приложение в козметичната индустрия.

Резултати и методи

Беше изследвана способността на *Aeribacillus pallidus* 418, изолиран като добър продуцент на ЕПЗ, да синтезира полимер в непрекъснат режим на култивиране и беше установена по-висока продукция в сравнение с периодични култури. Беше наблюдавано значително увеличение на количеството ЕПЗ в утайката след продължително култивиране. Не-Нютоновото псевдопластично и тиксотропно поведение на ЕПЗ определи способността на получения крем да запазва плътността на консистенцията след продължителен престой върху кожата.

Заклучение

Проучването демонстрира високоефективен начин за синтеза на ЕПЗ при култивиране на *A. pallidus* 418 в условия на непрекъснат режим на работа, който има много предимства и подобрява резултатите получени при периодично култивиране, като се елиминират времето за почистване и стерилизация на съда. Ценните физико-химични свойства на синтезирания ЕПЗ влияят положително върху свойствата на търговския крем.

Значение и въздействие на изследването

ЕПЗ от термофилни микроорганизми представляват специален интерес поради предимствата на термофилните процеси и непатогенната природа на полимерните молекули. Промисленото им приложение обаче е възпрепятствано от сравнително ниската биомаса и съответно нисък добив на ЕПЗ. Предложеният непрекъснат подход за екзополisahаридна синтеза може да има огромен икономически потенциал за индустриално производство на термофилните полисахариди.

5. Kambourova, M., Radchenkova, N., Nicolaus, B., Tommonaro, G., Poli, A., Oner, E., Yildiz, S., Arga, K. Exopolysaccharides Synthesized by Thermophilic Microorganisms Isolated from Bulgarian Hot Springs. *Acta Microbiologica Bulgarica*. Vol. 34 / 2 (2018)

Abstract

High temperature in thermophilic niches determines unusual metabolic processes based on an ability of thermophilic microorganisms to synthesize unusual compounds. One of the

strategies for active growth of this type of extremophiles is a synthesis of exopolysaccharides (EPSs). EPSs from thermophiles are characterized by unknown before composition of their molecules and correspondingly unusual physico-chemical properties. Several thermophilic EPS producers were isolated from Bulgarian hot springs and three of them belonging to different genera were chosen for further work, namely *Geobacillus tepidamans* V264, *Aeribacillus pallidus* 418, and *Brevibacillus thermoruber* 423. Cultivation medium and conditions were optimized for each EPS producer. Influence of agitation and aeration rates on the bacterial growth and polymer synthesis were investigated in laboratory fermentors for some of them. Biosynthesis in continuous cultures revealed low increase of the yield and higher degree of purity of the EPS synthesized by *A. pallidus* 418. Productivity of one of the strains, *B. thermoruber* 423 was comparable with that of mesophilic bacteria. Investigations of their molecules revealed unknown before composition, high molecular weight, and thermostability. Physico-chemical analyses of their properties revealed a unique rheology like viscous solutions at low concentrations, good emulsifying properties, stability of emulsions, and good synergism with other hydrocolloids. EPS from *G. tepidamans* V264 expressed biological activity against cytotoxic compounds, while that from *B. thermoruber* 423 showed good compatibility with monkey fibroblast cell lines. The demonstrated functional properties and biological activities determine their possible future applications in cosmetics and medicine.

Екзополisahариди синтезирани от термофилни микроорганизми изолирани от Български горещи извори

Резюме: Високата температура, характерна за термофилни ниши определя необичайните метаболитни процеси основани на способността на термофилните микроорганизми да синтезират необичайни съединения. Една от стратегиите за активен растеж на този тип екстремофили е синтеза на екзополisahариди (ЕПЗ). ЕПЗ от термофили се характеризират с непознат състав на техните молекули и съответно с необичайни физико-химични свойства. Няколко термофилни продуцента бяха изолирани от български горещи извори и три от тях, принадлежащи към различни родове, бяха избрани за по-нататъшна работа, а именно *Geobacillus tepidamans* V264, *Aeribacillus pallidus* 418 и *Brevibacillus thermoruber* 423. Средите и условията за култивиране бяха оптимизирани за всеки ЕПЗ продуцент. Влиянието на скоростите на разбъркване и аериране върху бактериалния растеж и синтеза на полимери бяха изследвани в лабораторни ферментори. Биосинтезата при непрекъснати култури показва слабо повишаване на добива и по-висока степен на чистота на ЕПЗ, синтезирани от *A. pallidus* 418. ЕПЗ добив за един от щамовете, *B. thermoruber* 423, беше сравним с този от мезофилните бактерии. Изследванията на техните молекули показаха непознат състав, високо молекулно тегло и термостабилност. Физикохимичните анализи свойствата им разкриха уникална реология като вискозни разтвори при ниски концентрации, добри емулгиращи свойства, стабилност на емулсиите, добър синергизъм с други хидроколоиди. ЕПЗ от *G. tepidamans* V264 демонстрира биологична активност срещу цитотоксични съединения, докато този от *B. thermoruber* 423 показва добра съвместимост с фибробластни клетъчни линии от маймуни. Установените функционални свойства и биологична активност определиха възможността за тяхното бъдещо приложение в козметиката и медицината.

6. Kisov, H., Kuncheva, M., Panchev, I., Kambourova, M., **Radchenkova, N.** Study on the dispersive composition on model emulsions containing exopolymer synthesized from halophilic bacterium *Chromohalobacter canandesis*. Scientific researches of the Union of

Abstract

In this work are presented experimental data from the study of the dispersion composition of model emulsions containing biopolymer synthesized from halophilic microorganisms of the strain *Chromohalobacter canandesys* isolated from the Bulgarian salt niches (the Atanasovsko lake). The optimum temperature of the synthesis of the biopolymer is 300 C and pH 7.3 at a concentration of 15% NaCl. A model oil/water emulsion contains sunflower oil and biopolymer of various concentrations. The stability of the emulsions is determined by conventional methods (centrifugation and spectrophotometry). Dispersion characteristics of the emulsion (size distribution and average size) were examined by the instrument for measurement the size of particles contained within a sample.

Изследване на дисперсията на моделни емулсии, съдържащи биополимер, синтезиран от халофилен щам *Chromohalobacter canadensis*

Резюме: В тази работа са представени експериментални данни от изследването на дисперсията на моделни емулсии, съдържащи биополимер, синтезиран от халофилен щам *Chromohalobacter canadensis*, изолиран от българските солни ниши (Атанасовско езеро). Оптималната температура за синтеза на биополимера беше 30 С и рН 7,3 при концентрация 15% NaCl. Моделната емулсия масло / вода съдържа слънчогледово масло и различни биополимери концентрации. Стабилността на емулсиите беше определена по конвенционални методи (центрофугиране и спектрофотометрия). Бяха изследвани и дисперсията на емулсията.

7. Rusinova-Videva, S., **Radchenkova, N.**, Dobrev, G., Pavlova, K. (2015). Purification of arabinomannan synthesized by *Cryptococcus laurentii* AL100. Acta Microbiologica Bulgarica, 2015, 31, 2, 141 – 144

Abstract

The Antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL100 was selected as an active arabinomannan producer (Pavlova et al., 2011). The synthesized biopolymer was subjected to purification by two methods. In the application of molecular-sieve purification with Sephadex G75, two separate carbohydrate fractions were detected, while the use of gel-filtration system on Sepharose DEAE CL-6B showed three distinct carbohydrate fractions. The protein content of the fractions was also established

Пречистване на арабиноманан от *Cryptococcus laurentii* AL100

Резюме: *Cryptococcus laurentii* AL100 беше селектиран като активен продуцент на екзополisahарида арабиноманан (Pavlova et al., 2011). Синтезираният биополимер беше подложен на пречистване чрез използването на два метода. След прилагането на молекулно-ситово пречистване със Sephadex G75 бяха установени две отделни въглехидратни фракции. Използването на гел-филтрираща система със Sepharose DEAE CL-6B показва три отделни въглехидратни фракции. Определено беше и белтъчното съдържание във фракциите.

8. Kuncheva, M., Panchev, I., Kamburova, M., **Radchenkova, N.**, Boyadzhieva, I. (2015) Surface active properties of a newly synthesized biopolymer from halophilic microorganisms. Scientific works of university of food technologies . Vol LXII 2015

Abstract

The subject of this study were the surface active properties of an exopolysaccharide (EPS) synthesized from halophilic bacterial strains isolated from Bulgarian salty sea waters. The synthesized biopolymer was found to lower the surface tension of water, i.e. it showed surface activity. The emulsifying and stabilizing ability of EPS were tested in model systems with 50% oil phase of an oil-in-water emulsion. Emulsion dispersion and stability were followed at different concentrations of EPS. It was established that the newly synthesized EPS had 100% emulsifying and stabilizing activities. It was shown that the EPS had a high foaming ability and foam stability.

Повърхостно активни свойства на новосинтезиран биополимер от халофилни микроорганизми

Резюме: Предмет на това изследване бяха повърхостно активните свойства на екзополисахарид (ЕПЗ), синтезиран от халофилен бактериален щам, изолиран от български солници. Установено беше, че синтезият биополимер понижава повърхостното напрежение на водата, т.е. показва повърхостна активност. Емулгиращата и стабилизираща способност на ЕПЗ бяха тествани в моделни системи с 50% маслена фаза на емулсия масло във вода. Емулсионната дисперсия и стабилността бяха проследени при различни концентрации на ЕПЗ. Установено беше, че новосинтезият ЕПЗ има 100% емулгиращи и стабилизиращи свойства. Беше доказано, че ЕПЗ има висока способност за разпенване и стабилност на пяната.

9. Panchev, I., Kuncheva, M., Kovacheva, D., Kamburova, M., **Radchenkova, N.**, Boyadzhieva, I. (2015). Physical characteristics of exopolysaccharide synthesized from halophilic microorganisms of the *Chromohalobacter Canadensis* strain. Scientific works of Union of Scientists in Bulgaria – Plovdiv, series C. Technics and Technologies, Vol. XII., ISSN 1311-9419.

Abstract:

This work presents experimental data from DTA-TG, SEM, XRD, FT-IR analyses, intrinsic and dynamic viscosity, optical and surface activities of a newly synthesized biopolymer of the *Chromohalobacter canadensis* strain. It was found that the biopolymer is water-soluble, has a surface activity, but does not have optical activity. Its intrinsic viscosity is $[\eta] = 3.26 \text{ dl.g}^{-1}$ The thermal stability of its macromolecule is retained up to 170 °C after which pyrolysis processes of degradation take place.

Key words: biopolymer, *Chromohalobacter canadensis*, DTA-TG, SEM, XRD, FT-IR

Физически характеристики на полизахарид синтезиран от халофилни микроорганизми от щам *Chromohalobacter canadensis*

Резюме: В работата са представени експериментални данни от DTA – TG, SEM, XRD – IR анализи, динамичен вискозитет, оптична активност и повърхостна активност на новосинтезия биополимер от щам *Chromohalobacter canadensis*. Беше установено,

че полимерът е водоразтворим, има повърхностна активност, но няма оптична активност. Неговият вискозитет е $[\eta]=3.26 \text{ dl.g}^{-1}$. Термостабилността на макромолекулите се задържа над 170°C , след което заемат място пиролизисните процеси.

10. Radchenkova, N., Kambourova, M., Vassilev, S., Rene, A., Markov, S. (2014) On the mathematical modelling of EPS production by a thermophilic bacterium. *Biomath*, 3, 1, 2014, 121

Abstract

This paper presents experimental data coming from a batch fermentation process and theoretical models aiming to explain various aspects of these data. The studied process is the production of exopolysaccharides (EPS) by a thermophilic bacterium, *Aeribacillus pallidus* 418, isolated from the Rupi basin in South-West Bulgaria. The modelling approach chosen here is: first, biochemical reaction schemes are formulated, comprising several reaction steps; then the reaction schemes are translated into systems of ordinary differential equations (ODE) using the mass action law; then the ODE systems are studied by means of numerical simulations. The latter means that the ODE systems are parametrically identified in order to possibly fit the experimental data. A main peculiarity of the proposed reaction schemes, resp. models, is the assumption that the cell biomass consist of two dynamically interacting cell fractions (dividing and non-dividing cells). This assumption allows us to implement certain modelling ideas borrowed from enzyme kinetics. The proposed models are compared to a classical model used as reference. It is demonstrated that the introduction of the two cell fractions allows a much better fit of the experimental data. Moreover, our modelling approach allows to draw conclusions about the underlying biological mechanisms, formulating the latter in the form of simple biochemical reaction steps.

Математическо моделиране на производството на ЕПЗ от термофилна бактерия

Резюме: Статията представя експериментални данни, получени от процеса на периодична ферментация и теоретични модели, целящи да обяснят различни аспекти на тези данни. Изследван беше процесът на синтеза на екзополisahариди (ЕПЗ) от термофилната бактерия, *Aeribacillus pallidus* 418, изолирана от басейна на Рупи в Югозападна България. Избраният подход за моделиране е: първо, бяха формулирани схеми за биохимични реакции, включващи няколко етапа на реакция; след това реакционните схеми бяха преобразувани в системи с обикновени диференциални уравнения (ОДУ), използвайки закона за масовото действие; след това ODE системите бяха проучени с помощта на числени симулации. Последното означава, че ODE системите бяха параметрично идентифицирани, за да могат евентуално да се съберат експерименталните данни. Основна особеност на предложените реакционни схеми, resp. модели, е предположението, че клетъчната биомаса се състои от две динамично взаимодействащи клетъчни фракции. Това предположение ни позволява да реализираме определени идеи за моделиране, заимствани от ензимната кинетика. Предложените модели бяха сравнявани с класически модел, използван като еталон. Беше показано, че въвеждането на двете клетъчни фракции позволява много по-добро напасване на експерименталните данни. Нещо повече, нашият подход за моделиране позволява да се направят изводи за основните биологични механизми, формулирайки последните под формата на прости стъпки на биохимична реакция.

Група от показатели Г

1. Boyadzhieva, I., **Radchenkova, N**, Tomova, I., Kambourova, M., Poli, A., Vasileva-Tonkova, E.. Diversity of Heterotrophic Halophilic Bacteria Isolated from Coastal Solar Salterns, Bulgaria and Their Ability to Synthesize Bioactive Molecules with Biotechnological Impact. *Microbiology*, 87, 4, Springer, 2018, ISSN:0026-2617, DOI:10.1134/S0026261718040033, 519-528. SJR (Scopus):0.336, JCR-IF (Web of Science):**1.027**

Abstract

Biodiversity of heterotrophic aerobic bacteria isolated from two salterns, Pomorie salterns and Burgas salterns located at Burgas Bay, Black Sea coast, Bulgaria, as well as ability of the isolates to synthesize biotechnologically valuable compounds were investigated. The results revealed high taxonomic and metabolic bacterial diversity—we isolated 20 morphologically different moderately halophilic and two halotolerant strains affiliated with 11 species from eight genera referred to the phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*. Gram-negative bacteria belonged to the genera *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinivibrio*, *Cobetia*, and *Nesiotobacter*, and gram-positive strains were representatives of the genera *Virgibacillus*, *Salinicoccus*, and *Brevibacterium*. All isolates were found to be alkalitolerant, and 41% of them were psychrotolerant. The strains degraded nine of the tested 18 substrates; polygalacturonase, catalase, phytase, and lipase producers were predominant. This is the first reported detection of xanthan lyase, gellan lyase, arabinase, and phytase activities in halophilic bacteria. Nine of the strains belonging to five different genera were found to produce exopolysaccharides (EPS). The highest level of EPS was observed in *Chromohalobacter canadensis* strain 28. More than a half of the strains displayed antimicrobial activity against one to five test bacteria and yeasts. The present study is the first report on halophilic bacteria isolated from salterns at the Black Sea coast indicating that the investigated area is an untapped resource of halophilic bacteria with biotechnological potential.

2. Разнообразие от хетеротрофни халофилни бактерии изолирани от крайбрежни солници, България и тяхната способност да синтезират биоактивни молекули с биотехнологична значимост.

Резюме: Изследвано беше биоразнообразието на хетеротрофни аеробни бактерии, изолирани от два солника, Поморийски и Бургаски, разположени в Бургаския залив, България, както и способността на изолатите да синтезират биотехнологично ценни съединения. Резултатите показаха високо таксономично и метаболитно бактериално разнообразие - изолирани са 20 морфологично различни умерено халофилни и два халотолерантни щамове, отнесени към осем рода, от типовете *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Грам-отрицателните бактерии принадлежат към родовете *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinivibrio*, *Cobetia* и *Nesiotobacter*, а Грам-положителните щамове са представители на родовете *Virgibacillus*, *Salinicoccus* и *Brevibacterium*. Установено беше, че всички изолати са алкалотолерантни и 41% от тях са психротолерантни. Щамовете разградиха девет от тестваните 18 субстрата; продуцентите на полигалактуроназа, каталаза, фитаза и липаза бяха преобладаващи. Това е първото съобщение за откриване на ксантан лиаза, гелан-лиаза, арабиназна и фитазна активност при халофилни бактерии. Установено беше, че девет от щамовете, принадлежащи към пет различни рода, продуцират екзополisahариди (ЕПЗ). Най-високото ниво на ЕПЗ беше наблюдавано при щам 28 *Chromohalobacter canadensis*.

Повече от половината от щамовете проявяват антимикробна активност срещу една до пет тестови бактерии и дрожди. Настоящото проучване е първото съобщение за халофилни бактерии, изолирани от солени водопади по Черноморието, което показва, че изследваната зона е неизползван ресурс от халофилни бактерии с биотехнологичен потенциал.

3. Kambourova, M., Tomova, I., Boyadzhieva, I., **Radchenkova, N.**, Vasileva-Tonkova, E.. Phylogenetic analysis of the bacterial community in a crystallizer pond, Pomorie salterns, Bulgaria. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31, 2, 2017, DOI:10.1080/13102818.2016.1265900, 325-332. SJR (Scopus):0.36, JCR-IF (Web of Science):**1.227**

Abstract

The aim of this study was to investigate the bacterial community habituating P18, the biggest crystallizer pond in Pomorie salterns (34% salinity). The obtained results showed that the bacterial community differs from many previous reports of low bacterial diversity in hypersaline environments and demonstrates unusually high diversity of presented taxa, some unusual domination of diverse genera not reported before as dominant and identification of previously unknown 16S rRNA sequences. The retrieved 23 bacterial operational taxonomic units (OTUs) affiliated with 15 bacterial genera from four phyla – Firmicutes, 47.5%; Proteobacteria, 23.1%; Bacteroidetes, 22%; Deinococcus–Thermus, 2.4%; and one-candidate division SR1, 4.8%. Representatives of the phylum Firmicutes predominated in the bacterial community with almost half of the retrieved sequences. Almost all clones branched together with cultured halophiles or uncultured clones retrieved from saline niches. Despite of the high salt concentration, some of the closest phylogenetic neighbours were moderate halophiles. New sequences represented 42.3% of bacterial OTUs. Some of them formed separate branches with similarity less than 85%

Филогенетични анализи на бактериални съобщества в солено езеро, Поморийски солници, България

Целта на това проучване беше да се изследва бактериалното съобщество, обитаващо P18, най-голямото солено езеро в Поморийските солници (34% соленост). Получените резултати показват, че бактериалното съобщество се различава от много предишни доклади за ниско бактериално разнообразие в хиперсолени среди и демонстрира необичайно голямо разнообразие на представените таксони с доминиране на различни родове, които не са докладвани преди като доминиращи и идентифициране на неизвестни досега 16S рРНК секвенции. Те бяха групирани в 23 бактериални оперативни таксономични единици (OTU), отнесени към 15 бактериални рода от четири типа- *Firmicutes*, 47,5%; *Proteobacteria*, 23,1%; *Bacteroidetes*, 22%; *Deinococcus – Thermus*, 2,4%; и един-кандидат тип SR1, 4,8%. Представителите на типа *Firmicutes* преобладават в бактериалната общност с почти половината от идентифицираните секвенции. Новите секвенции представляват 42,3% от бактериалните OTU. Някои от тях образуваха отделни клонове с подобие по-малко от 85%.

4. Kambourova, M., Tomova, I., Boyadzhieva, I., **Radchenkova, N.**, Vasileva-Tonkova, E.. Unusually High Archaeal Diversity in a Crystallizer Pond, Pomorie Salterns, Bulgaria, Revealed

by Phylogenetic Analysis. Archaea, 2016, Article ID 7459679, 2016, DOI:10.1155/2016/7459679, SJR:1.185, ISI IF:2.132

Abstract

Investigations on the archaeal community composition in P18, the biggest crystallizer pond in Pomorie salterns (PS) (34% salinity), demonstrated unusually high number of presented taxa in hypersaline environment. Archaeal clones were grouped in 26 different operational taxonomic units (OTUs) assigned to 15 different genera from two orders, Halobacteriales and Haloferacales. All retrieved sequences were related to culturable halophiles or unculturable clones from saline (mostly hypersaline) niches. New sequences represented 53.9% of archaeal OTUs. Some of them formed separate branches with 90% similarity to the closest neighbor. Present results significantly differed from the previous investigations in regard to the number of presented genera, the domination of some genera not reported before in such extreme niche, and the identification of previously undiscovered 16S rRNA sequences

Необичайно високо археално разнообразие в солено езеро, Поморийски солници, България, установено чрез филогенетични анализи

Резюме: . Бяха проведени изследвания относно археалното съобщество, обитаващо P18, най-голямото солено езеро в Поморийските солници, което, демонстрира необичайно голям брой на представените таксони в хеперсолена среда. Археалните клонове бяха групирани в 26 различни таксономични единици, отнесени към 15 различни рода от два разреда, Halobacteriales и Haloferacales. Всички секвенции бяха свързани с култивируеми халофили или некултивируеми клонове от солени (предимно хиперсолени) ниши. Новите секвенции представляваха 53.9% от археалното OTUs. Някои от тях формираха отделни клонове с 90% степен на подобие с най-близкородствените им. Настоящото проучване значително се различава от от предишни изследвания по отношение броя на представените родове, доминирането на някои от тях не е докладвано за тези екстремни ниши, както и идентифицирането на неоткрити 16S рНК секвенции.

5. Yildiz, S. Y., **Radchenkova**, N., Arga, K. Y., Kambourova, M..(2015). Genomic analysis of *Brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(5), 2277-2289. **IF – 3. 337**

Abstract

Brevibacillus thermoruber 423 is a Gram-positive, motile, red-pigmented, spore-forming, aerobic, and thermophilic bacterium that is known to produce high levels of exopolysaccharide (EPS) with many potential uses in food, feed, cosmetics, and pharmaceutical and chemical industries. This bacterium not only is among the limited number of reported thermophilic EPS producers but also exceeds other thermophilic producers in light of the high level of polymer synthesis. By a systems-based approach, whole-genome analysis of this bacterium was performed to gain more insight about the biological mechanisms and whole-genome organization of thermophilic EPS producers and hence to develop rational strategies for the genetic and metabolic optimization of EPS production. Also with this study, the first genome analysis was performed on a thermophilic *Brevibacillus* species. Essential genes associated with EPS biosynthesis were

detected by genome annotation, and together with experimental evidences, a hypothetical mechanism for EPS biosynthesis was generated. *B. thermoruber* 423 was found to have many potential applications in biotechnology and industry because of its capacity to utilize xylose and to produce EPS, isoprenoids, ethanol/butanol, lipases, proteases, cellulase, and glucoamylase enzymes as well as its resistance to arsenic.

Геномни анализи на *Brevibacillus thermoruber* 423 разкриващи неговия биотехнологичен и индустриален потенциал

Резюме: *Brevibacillus thermoruber* 423 е Грам-положителна, подвижна, червено - пигментирана, спорообразуваща, аеробна и термофилна бактерия, за която е известно, че продуцира високи нива на екзополisahарид (ЕПЗ) с много потенциални приложения в хранителната, фуражната, козметичната, фармацевтичната и химическа промишлености. Тази бактерия не само е сред ограничен брой на докладваните термофилни продуценти на ЕПЗ, но също така надминава останалите в светлината на високото ниво на полимерен синтез. Чрез системен подход беше анализиран целият бактериален геном, за да се получи по-ясна представа за биологичните механизми и цялостната геномна организация на термофилните продуценти на ЕПЗ, както и да се разработят рационални стратегии за генетична и метаболитна оптимизация за синтеза на ЕПЗ. Това проучване беше първият анализ на генома на термофилен вид *Brevibacillus*. Основни гени, свързани с биосинтезата на ЕПЗ, бяха открити чрез аотиране на генома и заедно с експериментални доказателства беше генериран хипотетичен механизъм за биосинтеза на ЕПЗ. Установено беше, че *B. thermoruber* 423 има много потенциални приложения в биотехнологиите и промишлеността поради способността му да използва ксилоза и да синтезира ЕПЗ, изопреноиди, етанол / бутанол, липази, протеази, целулаза и глюкоамилазни ензими, както и неговата устойчивост на арсен.

6. Stefanova, K., Tomova, I., Tomova, A., **Radchenkova N.**, Atanassov I., Kambourova, M. (2015) Archaeal and bacterial diversity in two hot springs from geothermal regions in Bulgaria as demonstrated by 16S rRNA and GH-57 genes. Intern. Microbiol. 18(4), 217-223. ISSN: 1139-6709 (Print) 1618-1905 ISI **IF:1.635**

Abstract

Archaeal and bacterial diversity in two Bulgarian hot springs, geographically separated with different tectonic origin and different temperature of water was investigated exploring two genes, 16S rRNA and GH-57. Archaeal diversity was significantly higher in the hotter spring Levunovo (LV)(82 C); on the contrary, bacterial diversity was higher in the spring Vetren Dol (VD)(68 C). The analyzed clones from LV library were referred to twenty eight different sequence types belonging to five archaeal groups from Crenarchaeota and Euryarchaeota. A domination of two groups was observed, *Candidatus* Thaumarchaeota and Methanosarcinales. The majority of the clones from VD were referred to HWCG(Hot Water Crenarchaeotic Group). The formation of a group of thermophiles in the order Methanosarcinales was suggested. Phylogenetic analysis revealed high numbers of novel sequences, more than one third of archaeal and half of the bacterial phylotypes displayed similarity lower than 97% with known ones. The retrieved GH – 57 gene sequences showed a complex phylogenetic distribution. The main part of the retrieved homologous GH-57 sequences affiliated with bacterial phyla Bacteroidetes, Deltaproteobacteria, *Candidatus* Saccharibacteria and affiliation of almost half of the analyzed sequences is not fully resolved.

GH-57 gene analysis allows an increased resolution of the biodiversity assessment and in depth analysis of specific taxonomic groups.

Археално и бактериално разнообразие в два горещи извора от геотермален регион в България демонстрирани чрез 16S rRNA и GH-57 гени

Резюме: Изследвано беше археалното и бактериално разнообразие в два Български горещи извора, географски разделени от различен тектоничен произход и различни температури на водата, чрез използване на гена 16S рРНК и гликозилхидратазата от сем. 57 (GH-57). Археалното разнообразие беше значително по-голямо в по-топлия извор Левуново (ЛВ) (82°C), докато бактериалното разнообразие беше по-голямо при извор Ветрен Дол (ВД) (68°C). Анализиранияте клонови библиотеки от (ЛВ) се отнасяха до 21 различни секвенционни типа принадлежащи към пет археални групи от Crenarchaeota и Euryarchaeota. Беше наблюдавана доминацията на две групи *Candidata* Thaumarchaeota и Methanosarcinales. Мнозинството клонове от (ВД) бяха отнесени към топловодна група Crenarchaeotic. Предполага се формирането на термофилна група в Methanosarcinales. Филогенетичните анализи разкриха голям брой нови секвенции, повече от 1/3 от археалните и половината от бактериалните секвенции показаха по-малко от 97% степен на подобие с други познати. Основната част от идентифицираните хомоложни (GH – 57) секвенции са свързани с бактериалните типове - *Bacterioidetes*, *Deltaproteobacteria*, *Candidata* Saccharibacteria, като принадлежността на почти половината от анализиранияте секвенции не е напълно установена. Анализът на гена GH – 57 позволява повишена резолюция на оценка на биологичното разнообразие и задълбочен анализ на специфични таксономични групи

7. Yasar Yildiz, S., Anzelmo, G., Ozer, T., **Radchenkova, N**, Genc, S, Di Donato, P., Nicolaus, B., Toksoy Oner, E, Kambourova, M.(2014). *Brevibacillus thermoruber*: A promising microbial cell factory for exopolysaccharide production..Journal of Applied Microbiology, 116, 2, 2014, 314-324. **IF – 2.474**

Abstract

Aims

This study aims to identify a high level exopolysaccharide (EPS) producer thermophile that in turn could be used as a model organism to study the biological mechanisms and whole genome organization of EPS-producing thermophilic bacteria.

Methods and Results

Thermophilic isolates were screened, and then growth and EPS production of the best producer *Brevibacillus thermoruber* strain 423 were investigated under different carbon and nitrogen sources, temperature, pH and agitation rates. Rheological characterization revealed that the EPS behaved like a typical Newtonian fluid and viscosity of the EPS solution increased with increasing Ca²⁺ ion concentration. Chemical characterization by TLC, GC-MS, FT-IR and NMR suggested a heteropolymer structure with glucose as major monomer unit. High biocompatibility of pure EPS fractions suggested their potential use in biomedical applications.

Conclusions

This study reports on the comprehensive description of microbial production conditions as well as chemical, rheological and biological characterization of the EPS produced

by *B. thermoruber* strain 423. The bioreactor cultures were found to reach two times higher yields and three times higher productivities when compared with literature.

Significance and Impact of the Study

Brevibacillus thermoruber strain 423 combined the advantages of its nonpathogenicity with the advantages of fast productivity and hence proved to be a very promising model organism and cell factory for microbial EPS production.

Brevibacillus thermoruber: Обещаваща фабрика за синтеза на микробни екзополизахариди

Резюме

Цели

Целта на проучването беше да се идентифицира термофилен високопродуктивен щам на екзополизахарид (ЕПЗ), който от своя страна да бъде използван като моделен организъм за изследване на биологичните механизми и цялостната организация на генома на термофилните бактерии, способни да синтезират ЕПЗ.

Резултати и методи

Беше проведен скрининг за термофилни изолати, а след това растежът и синтезата на ЕПЗ от най-добрия щам - продуцент *Brevibacillus thermoruber* 423 бяха изследвани при различни източници на въглерод, азот, температура, рН и скорости на разбъркване. Реологичната характеристика показа, че ЕПЗ се държи като типичен Нe - Нютонов флуид и вискозитетът на ЕПЗ в разтвора се увеличаваше с увеличаване на концентрацията на Ca²⁺ + йони. Химическите характеристики бяха изследвани посредством TLC, GC-MS, FT-IR и NMR и установиха хетерополимерна структура с глюкоза като основна мономерна единица. Високата биосъвместимост на чистите ЕПЗ фракции предполагат тяхното потенциално използване в биомедицински приложения.

Заключения

Изследването описва условията за синтеза, както и химическата, реологичната и биологичната характеристика на ЕПЗ, получени от щам *B. thermoruber* 423. Установено беше, че културите в биореактор достигат два пъти по-високи добиви и три пъти по-висока синтеза в сравнение с описаните до сега в литературата.

Значение и въздействие на изследването

Щам *Brevibacillus thermoruber* 423 комбинира предимствата на своята непатогенност с предимствата на бърза синтеза и следователно се очерта като много обещаващ модел на организъм и клетъчна фабрика за микробен синтез на ЕПЗ.

8. **Radchenkova, N**, Tomova, A, Kambourova, M.. Biosynthesis of an exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2011, ISI IF:0.76

Abstract

A thermophilic bacterial strain 438 isolated from the Rupi basin, Bulgaria, was chosen as a perspective exopolysaccharide producer. It was taxonomically identified as *Brevibacillus thermoruber*. Among ten different carbon sources tested, maltose in a concentration of 1.8% provided the highest polymer production. (NH₄)₂ HPO₄ (0.1%) was chosen as the best

nitrogen source. The highest polymer concentration (78.1 mg/l) was synthesized at pH 8.0 and 55°C

Биосинтеза на екзополизахарид произведен от *Brevibacillus thermoruber* 438

Резюме: Термофилният бактериален щам 438 беше изолиран от басейна на Рупи, България и беше избран като перспективен продуцент на екзополизахарида. Той беше таксономично идентифициран като *Brevibacillus thermoruber*. Сред десетте различни тестовани източника на въглерод малтозата в концентрация от 1,8% осигуряваше най-високата синтеза на полимер. $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ (0.1%) беше избран за най-добрия източник на азот. Най-високата концентрация на полимер (78,1 mg / l) беше синтезирана при pH 8,0 и 55 °C.

9. Guncheva M., Zhiryakova D., Radchenkova N., Kambourova M. Properties of immobilized lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7. Acidolysis of triolein with caprylic acid. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25, 2009, 727-731. ISI IF:1.31

Abstract

Extracellular bacterial lipases are promising biocatalysts for industry, because they are stable and active enzymes from easily available sources. A lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7 was immobilized on four polymer carriers by physical adsorption: chitosan, DEAE-cellulose, polypropylene, and polyurethane. The four biocatalysts differ in their hydrolytic activity against long-chain and short-chain triglycerides. Lipase MC7 immobilized on polypropylene (PP-MC7) stands out with its high activity against tributirin. According to the preliminary data, all four preparations were suitable for application in the test reaction of acidolysis of triolein with caprylic acid. The highest degree of conversion of the initial triolein was achieved in the presence of PP-MC7 preparation—50%. But variation of the reaction conditions did not lead to synthesis of the target di-substituted product (dicapryloyl-oleoylglycerol, COC). Reaction proceeds as a selective mono-substitution in the glycerol backbone.

Свойства на имобилизирана липаза от *Bacillus stearothermophilus* MC7. Ацидолиза на триолеин с каприлова киселина.

Резюме: Извънклетъчните бактериални липази са обещаващи биокатализатори за промишлеността, тъй като те са стабилни и активни ензими от лесно достъпни източници. Липаза от *Bacillus stearothermophilus* MC7 беше имобилизирана върху четири полимерни носителя чрез физическа адсорбция: хитозан, DEAE-целулоза, полипропилен и полиуретан. Четирите биокатализатора се различаваха по своята хидролитична активност спрямо триглицеридите с дълга и къса верига. Липазата MC7 беше имобилизирана върху полипропилен (PP-MC7) и се открояваше с високата си активност срещу трибутин. . Получените данни показаха, че и четирите препарата са подходящи за приложение в тестовата реакция на ацидолиза на триолеин с каприлова киселина. Най-високата степен на конверсия на първоначалния триолеин беше постигната в присъствието на препарат PP-MC7 - 50%. Промяната в реакционните условия не водеше до синтез на целевия ди-заместен продукт (дикаприлоил-олеоилглицерол, СОС). Реакцията протече като селективно монозаместване в глицероловия скелет.

10. Guncheva, M., Zhiryakova, D., **Radchenkova, N.**, Kambourova, M.. Acidolysis of Tripalmitin with Oleic Acid Catalyzed by a Newly Isolated Thermostable Lipase.. Journal of the American Oil Chemists' Society, 85, 2008, 129-132. ISI IF:1.504

Abstract

The catalytic efficiency of a lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7 (lipase MC7) was evaluated in acidolysis of tripalmitin with oleic acid to yield dioleoylpalmitoylglycerol, a structured triglyceride used in health food. The immobilized enzyme exhibits good operational thermostability with a half-life of 50 days at 60 °C in a solvent-free system. The degree of conversion exceeded 50% after 48 h. The side reaction of hydrolysis was suppressed. However, the monosubstituted product was prevalent in the product mixture. Tested in a broad range of solvents, lipase MC7 showed tolerance towards medium polarity

Ацидолиза на трипалмитин с олеинова киселина, катализирана от новоизолирана термостабилна липаза

Резюме:Беше направена оценка на каталитичната ефективност на липаза от *Bacillus stearothermophilus* MC7 (липаза MC7) при ацидолиза на трипалмитин с олеинова киселина, за да се получи диолеоилпалмитоилглицерол, структуриран триглицерид, използван при здравословни храни. Имобилизираният ензим показва добра оперативна термостабилност с полуживот 50 дни при 60 °C в система без разтворители. Степента на конверсия надвишаваше 50% след 48 часа. Страничната реакция на хидролизата беше потисната. Монозаместният продукт беше преобладаващ в продуктовата смес. Тествана в широк спектър от разтворители, липазата MC7 показва толерантност към средна полярност

11. Guncheva, M, Zhiryakova, D, **Radchenkova, N**, Kambourova, M. Effect of nonionic detergents on the activity of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007 IF –1.97

Abstract

The influence of nonionic surfactants on the activity of a novel thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7 was investigated with a view to its potential for synthesis of structured lipids. A large number of modifiers within a broad concentration range were applied. The activity of the enzyme was measured at a relatively high reaction temperature. Highest degree of activation was observed when PEG₆₀₀₀ was applied (up to 2.3-fold increase). Modification essentially changed the performance of the lyophilised preparations—they keep up to 80% of the activity of the native enzyme in the presence of a detergent against 30% in its absence. The effect of sorbitan esters (spans) and polyoxyethylene derivatives of sorbitan esters (tweens) on lipase MC7 was estimated, their HLB value varying within the interval 2.1–16.7. Tweens were strong inhibitors at higher concentrations. For all spans, excepting span 60, an increase of enzyme activity with concentration was observed. All studied additives slow down the process of thermal denaturation. Lipase preparations preserve more than 60% of their activity after 30-min incubation at 75 °C in the presence of tween 60 or PEG₄₀₀₀.

Ефект на нейонни детергенти върху активността на термостабилна липаза от *Bacillus stearothermophilus* MC7.

Резюме: Проучено беше влиянието на нейонните повърхностноактивни вещества върху активността на новата термостабилна липаза от *Bacillus stearothermophilus* MC7 с оглед нейния потенциал за синтеза на структурни липиди. Бяха приложени голям брой модификатори в широк диапазон от концентрации. Активността на ензима беше измерена при относително висока реакционна температура. Най-висока активност беше наблюдавана, когато се прилага PEG₆₀₀₀ (до 2,3-кратно увеличение). Модификацията промени ефективността на лиофилизирани препарати - те поддържаха до 80% от активността на ензима в присъствието на детергент срещу 30% в негово отсъствие. Оценен беше и ефектът на сорбитанови естери и полиоксиетиленови производни на сорбитанови естери (туини) върху липаза MC7. Туините бяха силни инхибитори при по-високи концентрации. Всички изследвани добавки забавяха процеса на термична денатурация. Препаратите от липаза запазваха повече от 60% от активността си след 30-минутна инкубация при 75 ° C в присъствието на Tween 60 или PEG₄₀₀₀.

12. Kambourova, M, **Kirilova (Radchenkova)**, N, Mandeva, R., Dereкова, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, 22, 307-313 **IF:1.475**

Abstract

Extracellular thermostable lipase produced by the thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7 was purified to 19.25-fold with 10.2% recovery. The molecular weight of the purified enzyme determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was shown to be 62 500 Da. The purified enzyme expressed maximum activity at 75–80 °C and its half life was 30 min at 70 °C. The K_m and V_{max} were calculated to be, respectively, 0.33 mM and 188 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ with *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) as a substrate. Enzyme activity was inhibited by divalent ions of heavy metals, thiol and serine inhibitors, whereas calcium ion stimulated its activity. The most advantageous method for immobilization was found to be ionic binding to DEAE Cellulose. The enzyme was able to hydrolyze both soluble and insoluble emulsified substrates and was classified as a lipase, expressing some esterase activity as well

Пречистване и свойства на термостабилната липаза от термофилен *Bacillus stearothermophilus* MC 7

Резюме: Извънклетъчната термостабилна липаза, продуцирана от термофилния *Bacillus stearothermophilus* MC 7, беше пречистена до 19,25 пъти с 10,2% добив. Установено беше, че молекулното тегло на пречистения ензим, определено чрез електрофореза на натриев додецил сулфат-полиакриламиден гел (SDS-PAGE) е 62 500 Da.

Пречистеният ензим прояви максимална активност при 75–80 ° C и неговият полуживот е 30 минути при 70 ° C. Изчислено беше, че K_m и V_{max} са съответно 0,33 mM и 188 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ с *p*-нитрофенил палмитат (*p*NPP) като субстрат. Ензимната активност беше инхибирана от двувалентни йони на тежки метали, инхибитори на тиол и серин, докато калциевият йон стимулирше неговата активност. Ензимът беше в състояние да хидролизира както разтворими, така и неразтворими емулгирани субстрати и беше класифициран като липаза, показвайки и естеразна активност

Г.8. Публикувана глава от книга или колективна монография

13. Boteva, N., **Radchenkova, N.**, Bojadzieva, I., Stoilova-Disheva, M., Ljutskanova, D., Vasiveva – Tonkova, E., Kambourova. Diversity and biotechnological potential of extremophiles from Bulgarian extreme niches. The jubilee book “70th anniversary of the Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS”, 2017, ISBN: 978- 954- 92882-2-3, 129-140.

Abstract

Scientists from Laboratory of Extremophilic Bacteria in collaboration with scientists from the sections Microbial Genetics and Microbial Biochemistry in last five years concentrated their efforts on the investigation of several types of extremophiles, including thermophilic microorganisms inhabiting hot springs in Bulgaria, psychrophilic oligotrophs living in Magura cave, and halophiles from Bulgarian saline niches. Diversity of bacteria and archaea habituating Bulgarian extreme niches was studied and a large number of presented taxa belonging to about half of the recognized bacterial phyla was observed. Significant part of the retrieved 16S rRNA sequences from Bulgarian extreme niches referred as new, some of them showed more than 10% divergence from the closest phylogenetic neighbor, suggesting the existence of new taxa of at least genus level. Together with a characterization of bacterial and archaeal diversity by culture independent approach the experiments on cultivation of Archaea strains habituating Bulgarian hot springs. During last five year period study of exopolysaccharides from extremophiles was initiated. Good bacterial producers were isolated and unusual properties of the synthesized EPSs were established. The addition of the EPS in cosmetic cream results in increased foaming capacity and foam stability, enhanced mechanical hysteresis, higher viscosity of the creams and facilitated coating on skin.

Разнообразие и биотехнологичен потенциал на екстремофили от Български екстремни ниши

Резюме: През последните пет години учените от лаборатория Екстремофилни бактерии в сътрудничество с учени от секциите Микробна генетика и Микробна Биохимия са изследвали няколко вида екстремофили – термофилни микроорганизми, обитаващи горещи извори в България, психрофилни олиготрофи, обитаващи пещерата Магурата и халофили от български солени ниши. Установено беше значително разнообразие от бактерии и археи в българските екстремни ниши с голям брой представени таксони, принадлежащи към половината от признатите бактериални типове. Значителна част от идентифицираните 16S рНК секвенции от български екстремни ниши бяха определени като нови, като някои от тях показаха повече от 10% разлика с най-близкородствените секвенции, което предполага съществуването на нов таксон на ниво най-малко род. Едновременно с характеризирането на бактериалното и археално разнообразие чрез културално независими подходи бяха инициирани експерименти върху култивирането на археални щамове от български горещи извори. През последните пет години беше иницирано изследване на екзополisahариди от екстремофили. Изолирани бяха добри бактериални продуценти и бяха установени необичайни свойства на синтезираните екзополимери. Добавянето на ЕПС в козметичен крем води до повишен капацитет на разпенване и стабилност на пяната, подобрен механичен хистерезис, по-висок вискозитет на кремове и улеснено покритие върху кожата.

14. Kambourova, M, **Radchenkova, N**, Tomova, I, Bojadjieva. Thermophiles as a Promising Source of Exopolysaccharides with Interesting Properties. *Biotechnology of Extremophiles*, GCB, volume 1, Springer link, 2016, ISBN:978-3-319-13520-5, 117-139 Abstract

Abstract

Thermophilic niches offer diversity of prokaryotic microorganisms enormous part of which is still unknown. Thermophiles represent a vast natural resource of various bioactive compounds, among which exopolysaccharides (EPSs) attracted major interest and attention in last two decades due to the significant variety in their structural and functional properties despite of the limited knowledge in the field. Thermophilic EPS producers were isolated from both, *Bacteria* (*Thermotoga*, *Thermus*, *Bacillus* *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Aeribacillus*) and *Archaea* (*Thermococcus*, *Sulfolobus*) domains. Advantages in using thermophilic processes for EPS production and potential use of the synthesized EPSs are discussed. Their biotechnologically interesting properties, like high molecular weight, stability of their molecules, good synergism with other hydrocolloids, biological activity against cytotoxic compounds, antiviral and immunostimulating activities determine their possible future applications.

Термофилите като обещаващ извор на екзополisahариди с интересни свойства

Резюме: Термофилните ниши предлагат разнообразие от прокариотни микроорганизми, огромна част от които все още е неизвестна. Термофилите представляват богат природен ресурс от различни биоактивни съединения, сред които екзополisahариди (ЕПЗ) привличат голям интерес и внимание през последните две десетилетия поради значителното разнообразие в техните структурни и функционални свойства, въпреки ограничените познания в областта. Термофилните продуценти на ЕПЗ бяха изолирани както от редица бактериални родове (*Thermotoga*, *Thermus*, *Bacillus* *Geobacillus*, *Brevibacillus*, *Aeribacillus*), така и от археални (*Thermococcus*, *Sulfolobus*). Обсъдени бяха предимствата при използването на термофилни процеси за производство на ЕПЗ и потенциалното използване на синтезираните ЕПЗ. Техните биотехнологично интересни свойства, като високо молекулно тегло, стабилност на техните молекули, добър синергизъм с други хидроколоиди, биологична активност срещу цитотоксични съединения, антивирусни и имуностимулиращи дейности определят възможните им бъдещи приложения.