

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ
„СТЕФАН АНГЕЛОВ”

ИВАНКА ПЕТРОВА БОЯДЖИЕВА

БИОСИНТЕЗ И СВОЙСТВА НА СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗА ОТ
ТЕРМОФИЛНИ БАКТЕРИИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ БЪЛГАРСКИ
ГОРЕЩИ ИЗВОРИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”

Научна специалност 01.06.12 „Микробиология”

Научен ръководител: Доц. д-р Елка Емануилова

Официални рецензенти: Проф. Мария Ангелова, дбн
Доц. д-р Анна Куюмджиева

София, 2011

Използвани съкращения

EDTA – етилендиамидтетраацетат

kDa - килодалтони

MCC – минимална солева среда

NCBI – Национален център за биотехнологична информация.

NBT – нитро блу тетразолиум

NBIMCC – Национална банка за индустриални микроорганизми и клетъчни култури

OD₆₆₀ – оптическа плътност, измервана при 660 nm

PCR – полимеразна верижна реакция

SDS – натриев додецилсулфат

TEMED - тетраметилетилендиамин

SDS – натриев додецилсулфат

PAGE – полиакриламид гел електрофореза

СОД – супероксид дисмутаза

СОР – свободни окси-радикали

НАДН – никотинамид динуклеотид

УВОД

Супероксид дисмутази (ЕС 1.15.1.1) са металоензими, които със способността си да елиминират токсичните кислородни радикали, са важна част от антиоксидантната защитна система на клетките. Огромният интерес към тези ензими се определя от важната им физиологична роля и техния потенциален терапевтичен ефект като антиоксиданти, включени в превенцията и лечението на различни заболявания. В клиничната практика са натрупани значително количество експериментални данни, които потвърждават положителния ефект от използването на тези ензими при терапията на артрити, остеоартрити, инфекциозни заболявания, исхемия, мозъчни увреждания, ракови заболявания, както и за намаляване на цитотоксичния ефект от противотуморните лекарства и лъчетерапията при онкоболни пациенти.

Научният и практически интерес към супероксид дисмутази определят интензивното развитие на технологиите за получаване на тези ензими от различни източници, включващи животински и човешки еритроцити, растения и микроорганизми.

Известни са предимствата на микробните технологии за получаване на ензими - те предлагат лесни, не скъпи и високо ефективни методи за микробна продукция на различни ензими с промишлена стойност, включително получаване на супероксид дисмутази от широк кръг прокариотни продуценти.

Термалната денатурация е една от основните причини за ензимната инактивация и за това главното изискване за супероксид дисмутази, които се използват в индустриалните процеси, е те да бъдат термостабилни. И тъй като се очаква, че супероксид дисмутази, продуцирани от термофили, ще са по-термостабилни от техните мезофилни аналози, ние подложихме на скрининг микрофлората на хипертермалните извори в България с цел изолиране на такъв термофилен бактериален продуцент на термостабилна СОД.

В наличната литература няма данни за ефекта на абиотичния стрес (температурен шок, рН въздействие, редокс-активни съединения, йони на тежки метали) върху синтеза на СОД-и от термофилни бактерии, за способността на термофилните бактерии за адаптивен и кръстосан адаптивен отговор, както и за връзката между възрастта на културата и клетъчния отговор срещу стреса.

В дисертационния труд е изследван потенциала на термофилни бактерии от български горещи извори да продуцират термостабилна СОД, избран е перспективен продуцент, характеризирани са свойствата му, както и свойствата на неговата супероксид дисмутаза, получена като чист ензимен препарат, изследван е ефекта на различни видове стрес върху развитието на културата и биосинтезата на антиоксидантния ензим.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е изолиране на термофилни аеробни бактерии, синтезиращи термостабилни супероксид дисмутази, избор на перспективен продуцент, характеристика на свойствата му, както и на свойствата на неговата супероксид дисмутаза, получена като чист ензимен препарат.

За успешното изпълнение на тази цел се поставиха следните задачи:

1. Изолиране на термофилни аеробни бактериални щамове от вода, почва и гниеци вещества от хипертермални извори в България.
2. Скрининг на изолираните бактериални щамове за установяване способността им да продуцират СОД.
3. Определяне на термостабилността на синтезираните ензими.
4. Филогенетична, морфологична и физиологична характеристика на избрания щам–продуцент на термостабилна СОД и неговото таксономично определяне
5. Проучване влиянието на някои фактори върху синтезата на ензима и оптимизиране на ферментационните процеси за култивиране на щама с цел повишаване на ензимната продукция
6. Продукция на СОД в периодични и непрекъснати култури.
7. Проучване на някои свойства на ензима в безклетъчния екстракт
8. Проучване ефекта на някои стрес-фактори върху активността на СОД-ата
9. Разработване на схема за пречистването на СОД-ата до хомогенно състояние и проучване на свойствата на пречистения ензим.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В хода на изследванията са използвани материали и методи за:

1. Събиране на проби от различни горещи извори в България, обработка на събраните проби и получаване на чисти култури.
2. Изолиране на продуцент на термостабилна СОД.
3. Определяне на растежа
 - спектрофотометрично измерване на оптическата плътност
 - определяне на абсолютно сухо вещество (АСВ).
4. Методи за изследване на морфолого-културалните и физиолого-биохимичните свойства на избрания термофилен щам-продуцент.
5. Филогенетично характеризиране на изолирания термофилен щам.
6. Получаване на безклетъчен екстракт.
7. Анализ за определяне активността на СОД
8. Определяне концентрацията на белтък
9. Влияние на температурата и рН върху СОД активността в безклетъчен екстракт
10. Проучване биосинтезата на СОД
 - 10.1. Оптимизиране условията за култивиране на щама с цел получаване на СОД с висока активност
 - 10.1.1. Оптимизиране състава на хранителната среда
 - 10.1.2. Определяне на оптималната температура за култивиране
 - 10.1.3. Определяне на оптимални рН стойности за култивиране
 - 10.1.4. Влияние на концентрацията на разтворения в средата кислород
 - 10.2. Непрекъснато култивиране
11. Ефект на някои стрес-фактори върху активността на СОД-ата
 - 11.1. Температурен стрес, проведен по време на периодично култивиране на щама във ферментор и колби
 - 11.2. рН стрес
 - 11.3. Оксидативен стрес

- култивиране на щама в присъствие на H_2O_2
- култивиране на щама в присъствие на менадион (Витамин K_3)
- култивиране на щама в присъствие на $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

11.4. Влияние на някои метални съединения върху растежа на щама и биосинтезата на СОД

11.5. Адаптивен и „Кръстосан” протективен ефект

11.6. Зависимост между фазата на развитие на бактериалната култура и преживяемостта ѝ в условията на стрес.

12. Получаване на пречистен ензимен препарат на СОД и изследване на неговите свойства

12.1. Преципитация с амониев сулфат - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

12.2. Хидрофобна хроматография

12.3. Йоннообменна хроматография

12.4. Молекулно-ситова хроматография

13. Белтъчна електрофореза

13.1. SDS PAGE

13.2. Нативна електрофореза

13.2.1. Оцветяване с Coomassie Brilliant Blue R250

13.2.2. Оцветяване по активност – зимограма

14. Определяне на металния кофактор на СОД

14.1. Тест за инхибиция

14.2. Заместване на металният кофактор

15. Методи за характеризиране свойствата на пречистения ензим

15.1. Температурен оптимум

15.2. рН оптимум

15.3. Термостабилност и рН стабилност

15.4. Влияние на някои метални йони и инхибитори върху ензимната активност

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изолати и местообитанията им

За изолиране и характеризиране на термофилни микроорганизми, продуценти на термостабилна СОД са обработени 50 проби, съдържащи вода и водни суспензии от почва, кал и водораслови пелени. Пробите са събрани от районите на 16 горещи извора в България, с температура на водите, варираща от 40 до 92°C и рН в интервала от 5.8 до 10.2 (Табл. 1).

Таблица 1 СОД активност на новоизолирани термофилни щамове

Термален извор	Изолат	t° при взимане на пробата	рН при взимане на пробата	t° на култивиране	Оцветяване по Gram	OD _{660nm}	СОД U/mg
Хисар извор1	M1	46°C	7.98	50°C	+	1.36	163
Хисар извор2	M2	42°C	7.55	50°C	+	1.00	130
Хисар-баня	M3	52°C	7.82	55°C	+	1.10	247
Село Баня, Карловско	M6₁	52°C	7.45	55°C	+	0.96	230
Село Баня, Карловско	M6 ₂	49°C	7.45	50°C	+	1.00	140
Село Овощник	M8	45°C	7.99	50°C	+	1.20	155
Село Ягода	M9	42°C	10.14	50°C	+	1.40	136
Село Баня, Сливенско	M10	55°C	8.27	55°C	+	1.00	308
Панчарево-банята	M12	48°C	7.96	50°C	+	1.34	104
Сепарева баня	C1	47°C	7.5	50°C	+	1.14	118
	C2	33°C	7.0	50°C	+	1.15	140
Хасковски бани	M13	55°C	7.0	55°C	+	0.53	110
Ерма река (чешма)	M14	37°C	7.0	50°C	+	0.55	100
Ерма река (водохран)	M15	37°C	7.5	50°C	+	1.13	100
Беденска баня (разлив)	M16	52°C	7.85	55°C	+	1.15	200
Беденска баня (разлив)	M17	71°C	8.0	55°C	+	1.12	219
Беденска баня (тръби)	M18	50°C	8.0	55°C	+	1.20	205
Момин проход	M19	65°C	7.8	55°C	+	1.10	283
Долна баня	M20	62°C	8.0	55°C	+	1.05	533
Пчелин	M21	72°C	8.0	55°C	+	1.22	350
Варвара	M22	80°C	8.0	55°C	+	0.45	204

Като чисти култури са получени 21 изолата. За по-нататъшните експерименти са избрани шест изолата – M3, M6₁, M10, M19, M20, M21, показващи най-високи стойности на СОД активност. Определена е СОД активността (реакцията е проведена при 55°C), на всички проби, след което и термостабилността на СОД ензимите в безклетъчните екстракти на шестте изолата. Според направеният тест за инхибиция металните кофактори в активните центрове на ензимите от тези продуценти са или Mn- или Fe- , факт, който е обичаен за СОД-ите, изолирани от прокариоти. Присъствието на други два антиоксидантни ензима – пероксидаза и каталаза, както и наличието на протеазна активност в културалната течност и безклетъчния екстракт на всеки от шестте щама също е установено (Табл. 2).

Таблица 2 Изолати, продуценти на термостабилна СОД

Изолат	Термостабилност при 90°C, (t _{1/2}), min	Метален кофактор	Максимална установена СОД-активност	Протеазна активност		Каталазна активност		Пероксидазна активност	
				КТ	БЕ	КТ	БЕ	КТ	БЕ
M3	15	Mn	250	-	+	+	+	-	-
M6 ₁	<5	Fe	210	+	+	+	+	-	-
M10	5	Mn	308	+	+	-	-	+	+
M19	5	Fe	283	-	+	-	-	+	+
M20	30	Mn	533	+	+	+	+	+	+
M21	<5	Mn	350	+	+	+	+	+	+

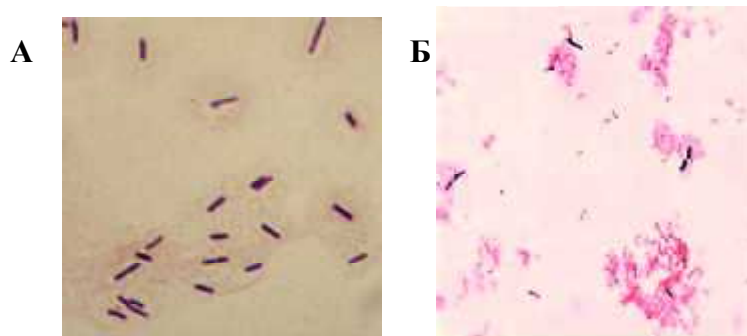
Както се вижда от таблицата, изолатът M20 показва най-висока термостабилност при 90°C - време на полуживот 30 min. Ензимът е активен с кофактор Mn, а изолатът е продуцент и на другите два антиоксидантни ензима и е избран като подходящ обект за разработката на дисертационния труд.

2. Характеристика на изолат M20

След направените морфологични, физиологични, биохимични и генетични анализи на изолат M20, е установено, че той се явява щам на вида *Bacillus licheniformis*.

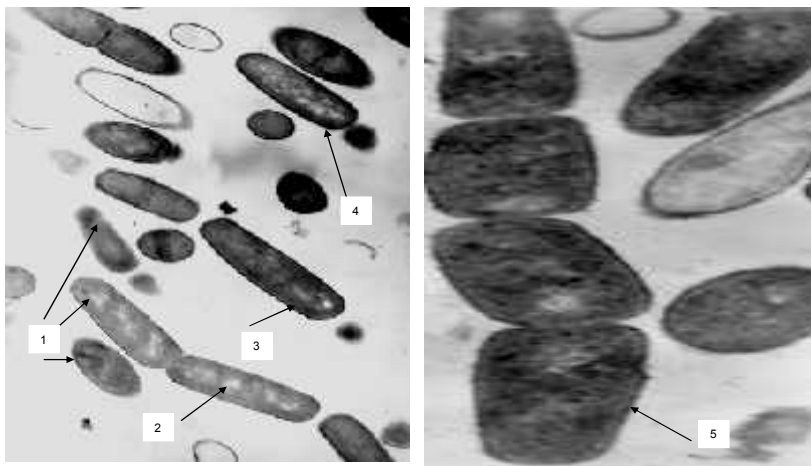
2.1. Морфология

Клетките на изолат M20 представляват Грам положителни, подвижни пръчици с размери 3.0-7.0 x 0.8-1.3 μm (Фиг. 1А, Б).



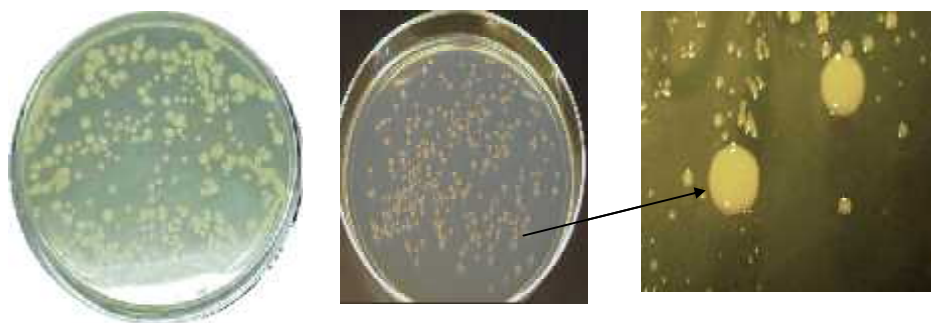
Фиг. 1 Оцветяване по Грам. Микроскопска картина на изолат M20 на 5-ти час, в края на експоненциалната фаза (**фиг. 1А**) и на 7-и час, в стационарна фаза (**фиг. 1Б**) от култивирането в течна среда № 4, 55°C, pH 7.5, 400 х

При изследване на ултратънки срези на щам M20 са наблюдавани пръчковидни клетки с дебели електронно-плътни стени, типични за Грам положителните бацили и с богата на рибозоми цитоплазма. В централната част на клетките е разположен голям нуклеоид. На електронно-микроскопската снимка могат да бъдат наблюдавани мембранни образувания от инвагинации на цитоплазмената мембрана, т.н. мезозоми, разположени периферно към клетъчната стена, до нуклеоида или в зоната на деление. Перитрихите, които осигуряват подвижността на клетките на M20 ясно се виждат на фиг. 2. Вегетативните клетки образуват по една елипсовидна и терминално разположена спора.



Фиг. 2 Електронно-микроскопска снимка (надлъжен срез) на щам M20, култивиран в течна среда № 4, 55°C, рН 7.5, 4-ти час от култивирането. 1- мезозоми; 2- нуклеоид; 3- клетъчна стена; 4-клетъчна мембрана, (3200х); 5- перитрихи, (6000х)

При растеж на твърда хранителна среда щамът образува кръгли, светло кафяви на цвят, лъскави, слизести колонии с размери до 2-3 mm в диаметър с правилен ръб и гладка повърхност (Фиг. 3).



Фиг. 3 Вид на колониите на 18-я час от култивирането на среда № 5, 55°C, рН 7.5

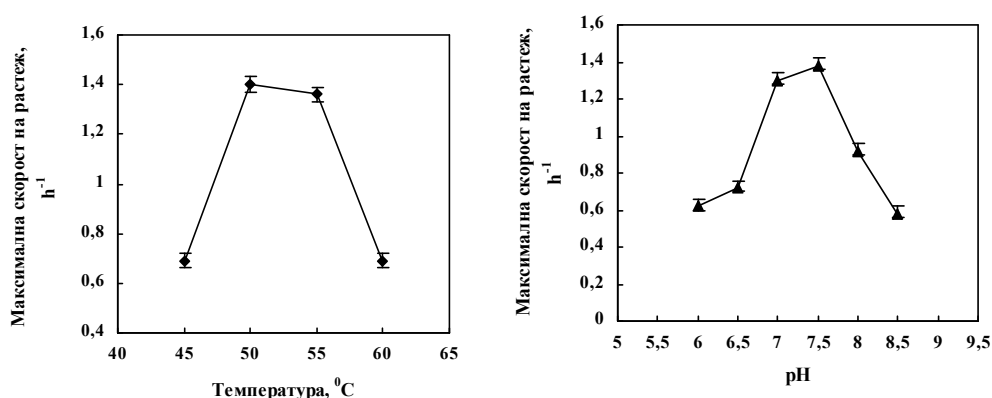
2.2. Физиолого-културални и биохимични свойства на изолирания щам M20

При изследване на температурната област за растеж на щама е установено, че минималната растежна температура е 30°C, а максималната - 65°C. От Фиг. 4 се вижда, че най-висока стойност за $\mu_{\max}$, е отчетена при 50°C

($\mu_{\max}=1.42 \text{ h}^{-1}$, $t_d=29.3 \text{ min}$), в същия порядък е и скоростта на растеж на бактериите при 55°C ($\mu_{\max}=1.36 \text{ h}^{-1}$, $t_d=30.6 \text{ min}$). Това означава, че максималната скорост на растеж на M20 не се повлиява в значителна и степен при повишената с 5°C температура за култивиране. Въз основа на това, може да се каже, че 50°C е оптималната растежна температура на щам. Тъй като разликата в $\mu_{\max}$, не е голяма, а освен това щамът продуцира СОД с по-висока активност при 55°C , бактериалните клетки в следващите експерименти са култивирани при по-високата температура.

Щамът расте в сравнително широка рН област от 5.5 до 8.5 с оптимален растеж при рН 7.5 ($\mu_{\max} = 1.38 \text{ h}^{-1}$)

В резултат на тези експерименти, щамът е отнесен към групата на факултативните термофили, които имат температурни граници за растеж $25-60^{\circ}\text{C}$, а оптимален растеж се наблюдава при температура 50°C (Bergey, 2009).

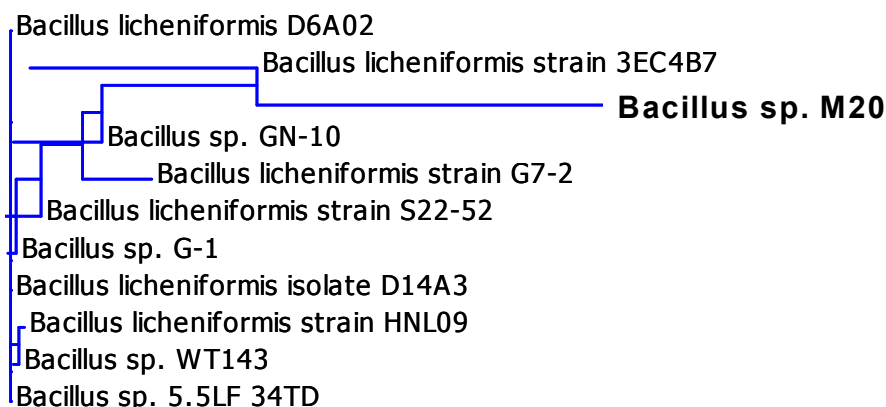


Фиг. 4 Влияние на температурата и рН за култивиране върху максималната скорост на растеж на щам M20

2.3. 16S рДНК анализ на щам M20

След генетичният анализ на 16S рДНК-гена на изолат M20 и обработка на получената секвенция, е извършено сравнение със секвенции, депозиранни в базата данни на NCBI. Установено е 99 % сходство с 16S рДНК-гена на *Bacillus licheniformis* D14A3. Тъй като сходството с най-близко родствения надвишава 97%, приема се, че изолат M20 се отнася към вида *Bacillus licheniformis*.

Секвенциите на 10-те най-близко родствени организми са въведени в програма Vector NTI и са използвани за създаване на филогенетично дърво:



16S рДНК секвенцията на щам *Bacillus sp.* M20 е депозирана в GenBank/EMBL под № FN597717. Щамът е депозиран в микробната колекция на Националната Банка за Промислени Микроорганизми и Клетъчни култури - NBIMСС под № 8389.

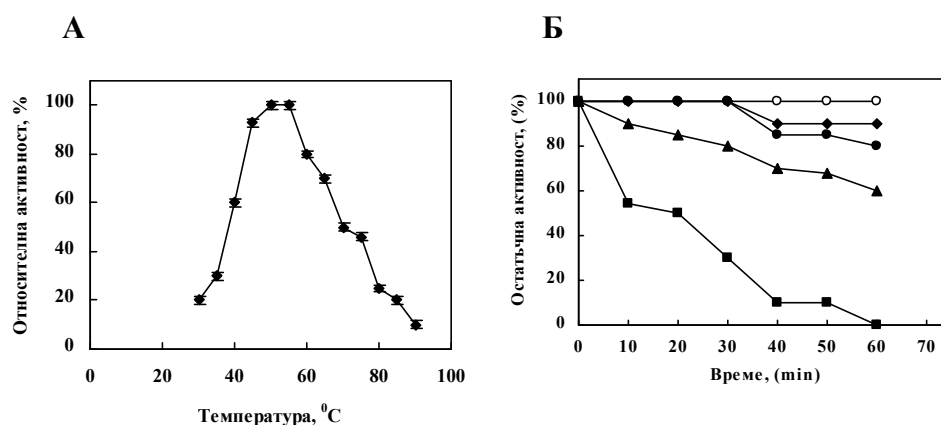
При сравняване на резултатите, получени при фенотипната характеристика на щам M20, може да се направи заключението, че като цяло профилът му съвпада с този на типовия щам *Bacillus licheniformis*. Установените разлики (фенотипни –размер на клетките и колонииите, и физиолого-културални – температурни и рН граници за растеж, способност за усвояване на някои захари) не са от съществено значение и те не биха били основание за съмнение към принадлежността на изолата към референтния щам. Още повече, че след генетичния анализ на базата на секвениране на 16S рДНК-гена, генетичното сходство на изолирания щам с *Bacillus licheniformis* е 99 %.

3. Влияние на температурата и рН върху СОД активността в безклетъчен екстракт

На Фиг. 5А е показан температурният оптимум на действие на СОД в безклетъчния екстракт от *B. licheniformis* M20. 100% относителна активност на ензима е установена при 50 и 55°C т.е. при температурата, осигуряваща максимална скорост на растеж на щама. Интересно е да се отбележи, че при

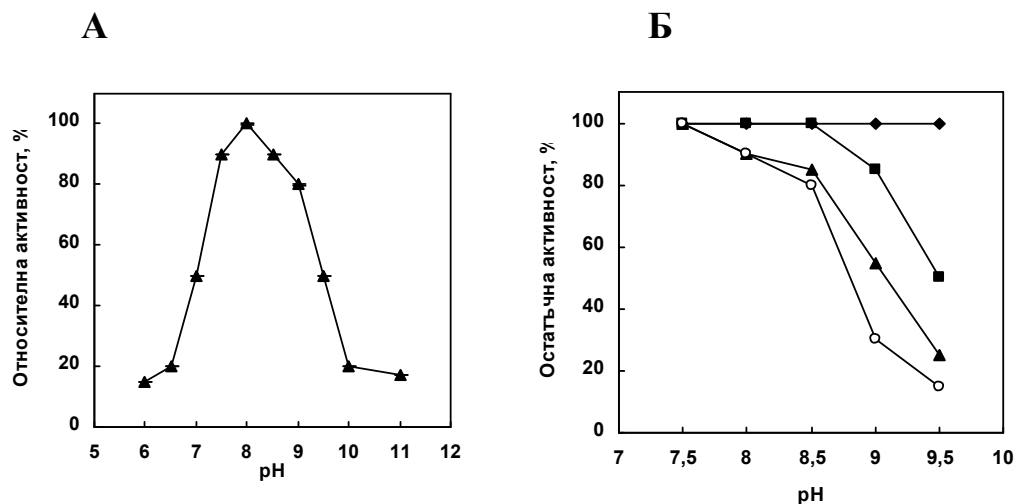
30°C (долната температурна граница на растеж на щама) ензима показва едва 20% от активността му при 50-55°C, а при 65°C (горната температурна граница на растеж на щама) активността на СОД-ата е 70% от максимално установената. Това свойство е характерно за ензимите, чиито продуценти са термофилните микроорганизми.

Термостабилността на ензима е висока и остатъчната активност на СОД-ата се запазва на 100% след нагряване в продължение на 30 min при 75°C. Времето на полуживот ($t_{1/2}$) на ензима при 95°C е 20 min (Фиг. 5Б).



Фиг. 5 (А) Температурен оптимум за действието на СОД в безклетъчния екстракт от *B. licheniformis* M20. **(Б)** Температурна стабилност на СОД в безклетъчен екстракт от *Bacillus licheniformis* M20; o - 55°C; ◆- 65°C; ●- 75°C; ▲ - 85°C; ■- 95°C

В безклетъчният екстракт оптималната стойност на рН за действието на ензима е 8.0 (Фиг. 6А). СОД-ата показва 60 % относителна активност при рН 9.5. При изследване рН-стабилността на ензима, е установено, че СОД-ата запазва 50% от активността си след третиране в продължение на 20 мин. при рН 9.5 (Фиг. 6Б).

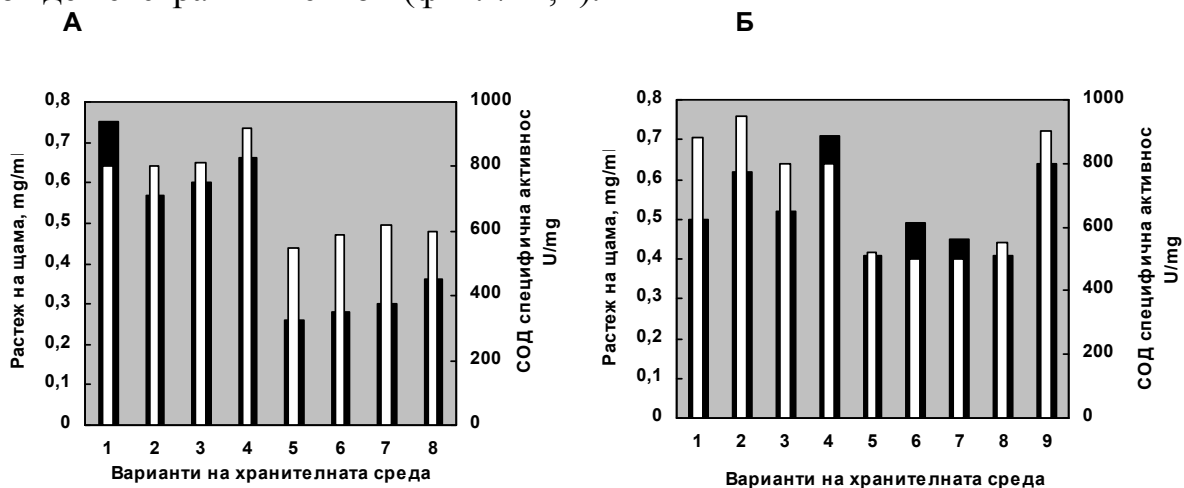


Фиг. 6 (А) pH оптимум за действието на СОД-ата в безклетъчния екстракт от *B. licheniformis* M20. **(Б)** pH стабилност на СОД-ата; ◆-нетретирана проба; ■-третирана 20 мин. при различни pH; ▲ - 40 мин.; ○ – 60 мин.

5. Оптимизиране условията за максимална ензимна биосинтеза

5.1. Оптимизация на хранителната среда

Въз основа на направените експерименти, като компоненти за качествения състав на средата, са избрани глюкоза и комбинацията от дрождев екстракт и пептон (фиг. 7 А,Б).



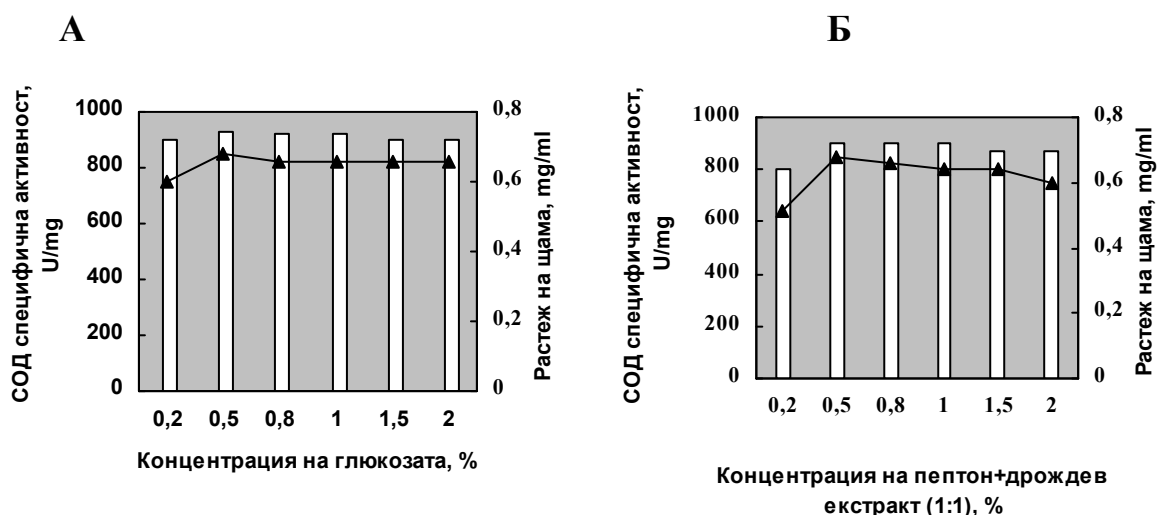
Фиг. 7 Влияние на различни въглеродни (А) и азотни (Б) източници върху растежа на *B. licheniformis* M20 (■) и активността на синтезираната от него СОД (□).

А- 1-нишесте, 2-захароза, 3-фруктоза, 4-глюкоза, 5-глицерол, 6-лактоза,

7-ксилоза, 8-декстран, в концентрация 1% и 1% пептон като азотен източник

Б- 1-пептон, 2-пептон+дрождев екстракт, 3- дрождев екстракт, 4- казеин, 5- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6- NH_4Cl , 7- NaNO_3 , 8- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 9-пептон+дрождев екстракт+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, в концентрация 1% и 1% глюкоза като въглероден източник.

За определяне количествения състав въглеродния и азотен източник в хранителната среда, избраните компоненти са изследвани в концентрации от 0.2 до 2 % (Фиг. 8 А, Б).



Фиг. 8 Определяне на най-подходящите концентрации на въглеродния и азотния източник за клетъчния растеж на *B.licheniformis* M20 и активността на синтезираната от него СОД. -▲-▲- растеж на щама, □ – специфична СОД активност

От резултатите на фиг. 8А се вижда, че е получена еднаква специфична СОД активност при всички използвани концентрации на глюкозата. Вероятно биосинтезата на СОД-ата се контролира от вътреклетъчните нива и скоростта на продукция на нейния субстрат – супероксида. Ферментацията на глюкозата се свързва с ниска степен на генерация на супероксидни

радикали, в сравнение с окислителния катаболизъм на аминокиселини и други органични субстанции. Ето защо всяко съединение, което може да доведе до вътреклетъчна продукция на супероксидни радикали, ще индуцира синтезата на СОД дори, когато глюкозата е енергиен източник (Hassan H. and Fridovich I., 1977). Изглежда, че при така избрания въглероден източник, отговорни за индукцията на ензима са азотните източници и техния метаболизъм, който вероятно води до супероксидна генерация. Най-добри резултати по отношение на сухо тегло и специфична СОД активност са получени при използването на концентрации на глюкозата и комбинацията пептон+дрождев екстракт (1:1) - 0.5 % (Фиг. 8Б).

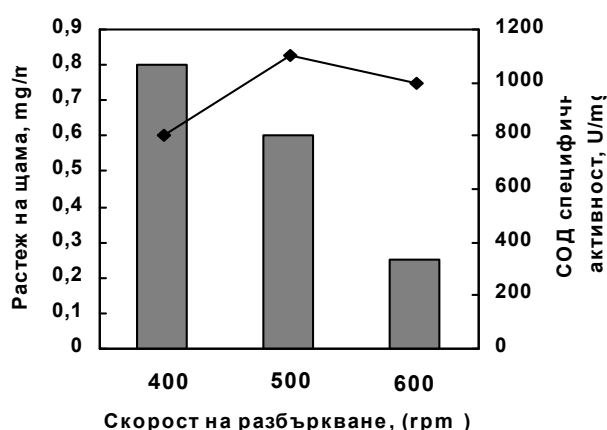
5.2. Определяне на оптималната температура и рН за култивиране

Максимална ензимна биосинтеза е наблюдавана при 55°C. Най-висока ензимна активност е измерена при рН 7.5 – (950 U/mg).

5.3. Влияние на концентрацията на разтворения в средата кислород

На Фиг. 9 е направено сравнение между стойностите на активността на СОД-ата и сухата биомаса, получени в края на експоненциалната фаза при различните скорости на разбъркване. От резултатите се вижда, че най-голямо количество суха биомаса се получава при скорост на разбъркване 400 rpm, но активността на ензима е най-висока в края на експоненциалната фаза на културата, растяща при скорост на разбъркване 500 rpm (1100 U/mg). В същите граници е и специфичната активност на ензима при 600 rpm-1000 U/mg. Може да се очаква, че увеличената скорост на разбъркване (600 rpm), осигуряваваща наличие на по-висок процент остатъчен кислород в средата (80 %), би довела до по-високи стойности на СОД активността. И в действителност такива резултати са отчетени. Слабият клетъчен растеж и краткият жизнен цикъл на бактериалната култура показват, че поддържането на високи нива на остатъчния кислород в средата при 600 rpm вероятно има ефекта на

оксидативен стрес върху бактериалните клетки. Два пъти и половина по-ниското количество суха биомаса - 0,25 mg/ml, получена при 600 rpm, е източник на ензима със същата активност, каквато е и активността на СОД-ата, получена от 0,6 mg/ml сухо тегло при 500 rpm. Следователно, за да преживее високите кислородни нива в средата при 600 rpm, шамът синтезира високо активна СОД.



■-Суша биомаса, mg/ml; -◆- Специфична СОД активност, U/mg

Фиг. 9 Сравнение между активността на СОД-ата и сухата биомаса получена в края на експоненциалната фаза при различните скорости на разбъркване

С увеличаване скоростта на разбъркване, се създават условия за по-бързо развитие на бактериалната култура. Промяната на специфичната активност на СОД-ата спазва общ профил – бързо нарастване по време на експоненциалната фаза и достигане на максимални нива в края на тази фаза, след което се запазва постоянна по време на стационарната фаза и слабо се повишава в края ѝ. В края на тази фаза, поради изчерпването на хранителните вещества в средата, оптичестката плътност на бактериалната култура намалява, но активността на СОД-ата остава в същите граници, дори леко се повишава. Този факт може да бъде обяснен с генерацията на супероксидни радикали, получени в резултат на процесите на автооксидация

и използването на вътреклетъчни източници на въглерод и азот от бактериите в тази фаза от жизнения им цикъл. Във фазата на отмиране на бактериалната култура, процента на разтворения кислород в средата започва да се повишава, но оптичестката плътност и СОД активността намаляват.

6. Непрекъснато култивиране

С цел повишаване на ензимната продукция са проведени изследвания върху влиянието на скоростта на разреждане, D (h^{-1}) върху ензимната активност в непрекъснати култури на щама (Табл. 3).

Таблица 3. Резултати от непрекъснато култивиране на щама, при скорост на разбъркване 500 rpm, 55°C, pH 7.5

D, h^{-1}	Суша биомаса (mg/ml)	Специфична активност (U/mg)
0.05	0.52	1500
0.1	0.58	1700
0.15	0.62	1800
0.2	0.8	2100
0.25	0.75	2350
0.3	0.6	2000

Максимална биосинтеза на СОД-ата от *B. licheniformis* M20 е установена при 55°C и pH 7.5. Измерената специфична активност на ензима в безклетъчния екстракт е в границите на 1000-1100 U/mg, а след оптимизация на условията за култивиране на щама и биосинтезата на ензима, СОД-активността се повишава до 2350 U/mg. Данните от литературата показват, че бактериите от групата на *Bacillus senso stricto*, която включва *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. roseus*, *B. brevis*, *B. pulmis*, *B. circulans* и други видове, между които и *B. licheniformis*, са продуценти на Mn-СОД-и, чиято специфична активност, преди пречистването на ензимите, е в границите на 40-120 U/mg. *B. circulans* е продуцент на Mn-СОД с 3.4 U/mg и е една от най-ниските СОД активности, които показват бактериите от тази

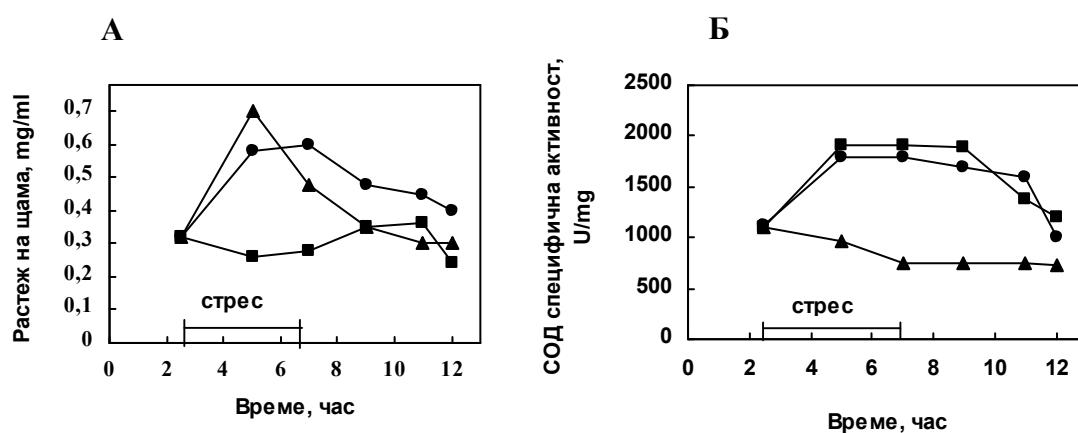
група (Lee T. and Lee S., 1988; Tsukuda K. et al., 1983; Ash F. et al., 1991). На основание тези данни от литературата може да се твърди, че щам *B. licheniformis* M20 е продуцент на СОД с изключително висока специфична активност, още преди ензимът да бъде пречистен. Същото твърдение може да бъде дадено, като се имат в предвид данни от литературата, за някои термофилни бактериални продуценти на антиоксидантния ензим. Щамове на *B. stearothermophilus* са продуценти на СОД със съотв. 500 и 1100 U/mg (Seatovic S. et al., 2000; Chen S. et al., 2002), термофилната бактерия *Thermothrix sp.* е продуцент на СОД с 87 U/mg (Seatovic S. et al., 2004), от термофилната, фотосинтезираща бактерия *Chloroflexus aurantiacus* е получена СОД с 224 U/mg (Lancaster V. et al., 2004), термофилната бактерия *Geobacillus kaustophilus* ATCC8005 е продуцент на ензим, който преди пречистването е с активност 186 U/mg (Huang S. et al., 2009). От термофилната цианобактерия *Thermosynechococcus elongatus* е изолирана СОД, която без да е получена в чист вид, показва активност в границите 2900-3000 U/mg. Тази висока активност се обяснява с местообитанията на тези бактерии, които съжителстват с фотосинтезиращи бактерии и образуват пелени на повърхността на водата. Клетките на *Thermosynechococcus elongatus* са подложени на постоянен оксидативен стрес, получен под действието на директната УВ-радиация и локалното освобождаване на кислород в средата от фотосинтезиращите бактерии през светлата част от денонощието.

7. Ефект на някои стрес-фактори върху активността на СОД-ата в безклетъчен екстракт от *B. licheniformis* M20

7.1. Температурен стрес

При повишаване на температурата за култивиране от 55°C на 65°C растежа на щама се забавя, оптичестката плътност на бактериалната култура е по-ниска от тази на контролния вариант, но по време на стреса остава постоянна. При топлинния шок, проведен при 75°C, клетъчният растеж е силно намален и промяна в оптичестката плътност, по време на стреса, също

не е наблюдавана. Забавянето в растежа на клетките от *B. licheniformis* M20 може да се дължи на акумулацията на свободни кислородни радикали, чиято продукция нараства с повишаването на оптималната температура за култивиране. Това води до смърт на една част от клетките, а също предизвиква и бърз отговор с цел адаптацията им в условия на топлинен шок. Така може да се обясни и повишената активност (около 2-2.3 пъти, в сравнение с контролата, при култивиране на ферментор, и около 2.5-2.7 пъти при култивиране на колби) на СОД в температурно стресирана клетъчна култура от *B. licheniformis* M20.



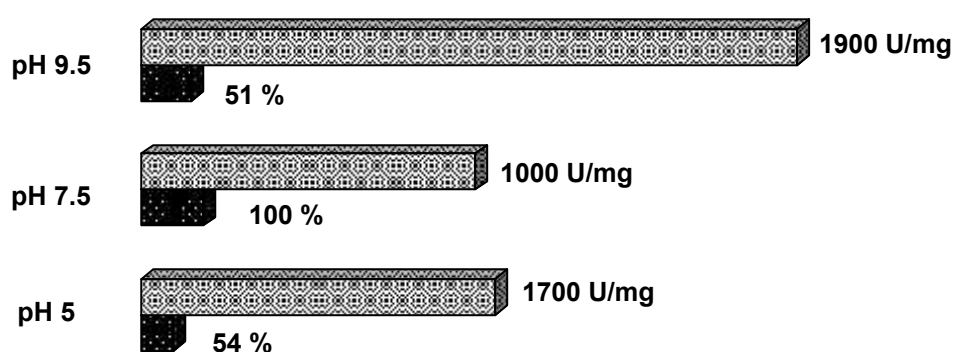
Фиг. 10 Ефект на топлинния стрес върху растежа (А) и активността на СОД (Б) от *B. licheniformis* M20 при култивиране на щам в биореактор “Bioflo”. ▲-▲-контрола (55°C), ●-● топлинен стрес при 65°C, ■-■ топлинен стрес при 75°C.

Получените резултати са в съответствие с данните, известни от литературата. Температурният шок индуцира и биосинтезата на СОД в *E. coli* с около 1.7 пъти (Benov L. and Fridovich I., 1995), на *Halobacterium halobium* с около 2 пъти (Begonia G. and Salin M., 1991), *Bacillus subtilis* също реагира с повишаване на ензимната активност на СОД-ата и каталазата (Mostertz J. et al., 2004).

Липсват данни в литературата, по отношение на термофилни бактерии, поставени в условия на температурен или друг вид стрес.

7.2. рН-стрес

Установена е 54 % преживяемост на клетките след 20 мин. третиране в условията на киселинен стрес и 1.7 пъти повишена активност на СОД-ата. При стойността на рН в алкалната област, обаче, клетките преживяват по-дълго и 51 % от тях са жизнени след 40 мин. от началото на експеримента, а отчетената активност на ензима е 1.9 пъти по-висока от контролната, измерена при рН 7.5 (Фиг. 11).

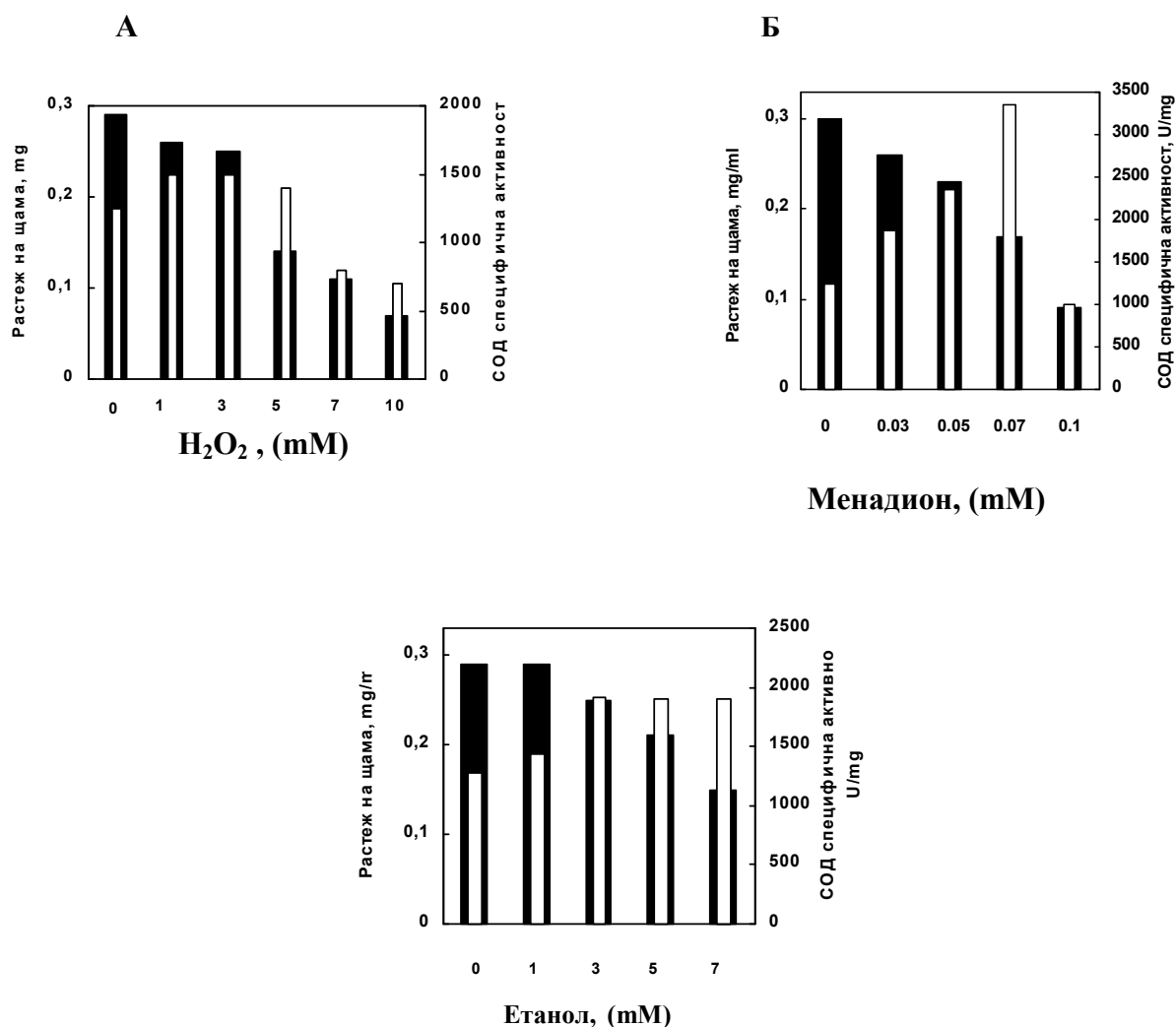


Фиг. 11 Сравнение на стойностите измерена СОД активност при киселинен и алкален стрес, предизвикващ 50 % клетъчна преживяемост. Резултатите са изчислени като е взета предвид активността на ензима и растежа на щама при рН 7.5.

Подобни на получените от нас резултати са съобщени в литературата - в условията на киселинен стрес, при средно-ниски стойности на рН (5.5), *B. cereus* ATCC 14579 реагира с индукция на СОД-ата и каталазата (съотв. с 30 и 50 %) (Mols, M., 2010), а оксидативен стрес и повишена СОД активност (с около 50 %), в отговор на алкалния стрес, е установен при *B. subtilis* (Wilks, C., 2009).

7.3. Оксидативен стрес

Влиянието на оксидативният стрес върху растежа на щама и активността на СОД-ата, е проучено при третиране на клетките на бактерията с различни концентрации водороден пероксид, менадион и етанол (фиг. 12).



Фиг. 12 Ефект от третирането при различни концентрации на H₂O₂, менадион и етанол върху растежа на щама и активността на СОД-ата.

Резултатите от фиг. 12А показват, че причината за високата клетъчна преживяемост, при сравнително високата концентрация на пероксида, не е увеличената СОД-активност. След 1 час третиране на клетките с 3 и 5 mM пероксид жизнеността на клетките е съотв. 87 и 48 %, а СОД активността не се променя, дори слабо се понижава. При всички изследвани концентрации

H₂O₂ не е установено значително повишение на СОД активността, сравнена с тази на контролно растящата култура. Може да се допусне, че клетките преживяват оксидативния стрес чрез повишаване активността на каталазата и пероксидазата, които катализират редукцията на пероксида до кислород и вода.

Повишаване на СОД активността не е установено и след поставяне на клетките на *Bacillus sp.* F26 в условията на пероксиден стрес (Yan G. 2006).

Концентрацията на менадион - 0.07 mM води до 49 % клетъчна преживяемост и повече от 3 пъти увеличена СОД-активност (фиг. 12Б). Концентрация от 0.1 mM менадион е причина за силно намаляване на клетъчния растеж и след 120 мин. инкубация едва 3 % от клетките са живи. Настъпват сериозни клетъчни увреждания в резултат на бързата генерация на окси-радикалите и това води до лизис и смърт на клетките. Това е очакван резултат, тъй като много автори в своите експерименти показват, че в резултат на метаболизма на менадиона в клетките, клетъчните мембрани и мембранни компоненти могат да бъдат увредени поради увеличена пероксидация на мембранните липиди. Този процес води до продукция на липидни радикали, които заедно със супероксидните силно повлияват клетъчния растеж и повишават СОД-активността.

Третирането на клетките на *Bacillus sp.* F26 с 0.05 mM менадион води до около 2 пъти повишаване на СОД активността и около 47 % клетъчна преживяемост (Yan G. 2006).

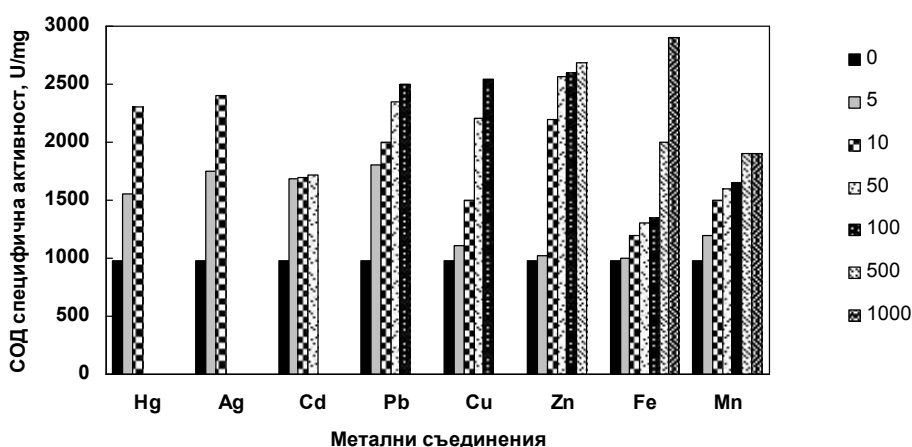
В литературата няма данни за поставяне на други видове от р. *Bacillus* в условия на пероксиден и супероксиден стрес.

На Фиг. 12В са показани получените резултати след третиране на щама с различни концентрации етанол. Увеличаването на концентрацията на етанола първоначално инхибира, а при над 10 % има летален ефект върху клетките на щама. При 3 % етанол растежа на щама не се повлиява в забележима степен, но активността на СОД-ата се увеличава около 1.5 пъти. При суб-леталната концентрация на етанола (7%), при която е установена 51

% преживяемост на клетките, не е наблюдавано значително повишаване в активността на ензима, напротив активността е същата, каквато е измерена след третиране на клетките с 3 % етанол.

7.4. Влияние на някои тежки метали върху растежа на щама и биосинтезата на СОД

От данните на фиг. 13 се вижда, че шамът е силно чувствителен към минимални концентрации Hg^{2+} и Ag^{2+} - отчетени са съотв. 48 % и 52% преживяемост на бактериалните клетки при концентрации 10 μM . Активността на СОД-ата е около 2.5 пъти по-висока от тази при контролно растящата култура и при двата метала. Cd^{2+} и Pb^{2+} също се отнасят към токсичните йони, но шамът е толерантен към по-високи концентрации – 50 % и 49 % жизненост е установена при концентрации съотв. 50 и 100 μM . Най-висока активност на ензима е отчетена при 1000 μM Fe^{2+} (3 пъти по-висока от контролната), при 47 % преживяемост на бактериалните клетки. Този факт може да бъде обяснен с възможността на желязните йони да служат като катализатор на *Haber-Weiss* реакцията (Fenton реакция), която се счита за *in vivo* генерация на високо реактивния хидроксилен радикал. В случая повишената им концентрация в бактериалните клетки способства протичането на тези реакции с висока скорост, което води до значителна генерация на различни окси-радикали.

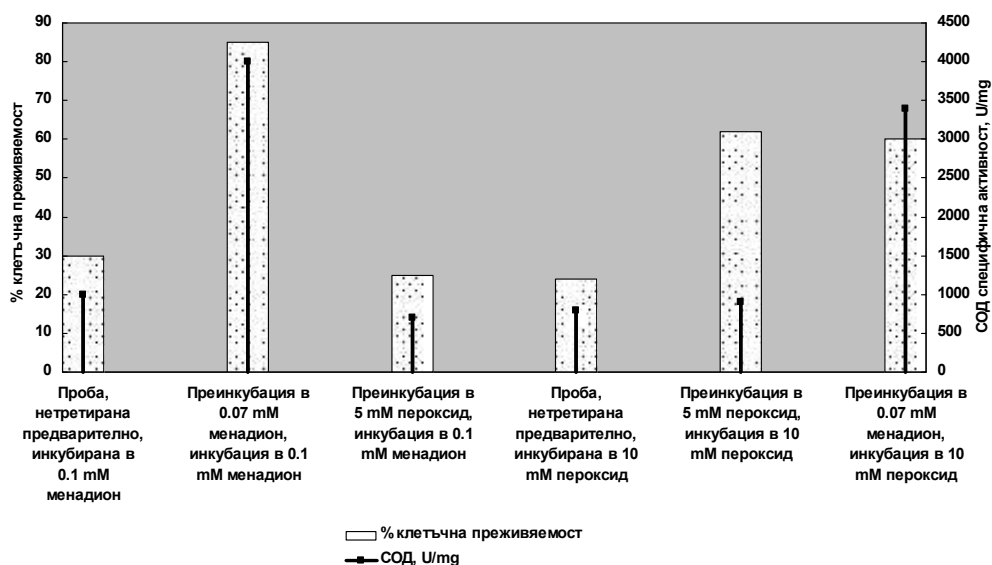


Фиг. 13 Супероксид дисмутазна активност на щам *B. licheniformis* M20, изложен на действието на различни концентрации (μM) на тежки метали

7.4. Адаптивен и „Кръстосан” протективен ефект

B. licheniformis M20 може да реагира с адаптивен отговор и да толерира оксидативен стрес, предизвикан от даден оксидант, след предварителна инкубация на щама със същия оксидант.

Резултатите на фиг. 14 показват, че преинкубацията на клетките със сублетална концентрация на менадион индуцира протекцията срещу леталния ефект на 10 mM водороден пероксид. Преинкубацията с пероксид не води до индукция на протекцията срещу леталния ефект на 0.1 mM менадион. Трябва да се отбележи, че степента на клетъчна преживяемост на менадион-индуцираната кръстосана протекция срещу пероксида е по-висока от тази наблюдавана при пероксид-адаптираните клетки. Вероятно адаптацията към пероксидния стрес чрез предварително третиране с менадион е резултат от генерацията на водороден пероксид, получен при дисмутацията на супероксидните радикали. Това означава, че клетките на щама когато са предварително третирани с ниски дози менадион са напълно протектирани срещу пероксидния стрес, докато пероксид-третираните клетки не са защитени от супероксидния стрес. Получените резултати от експериментите, проведени с *B. licheniformis* M20, напълно съвпадат с тези, получени при изследване способността на клетките на *Bacillus sp.* F26, (Yan G. 2006), да се адаптират в условията на пероксиден и супероксиден стрес, както и способността им за кръстосан протективен отговор. *B. licheniformis* M20, обаче, е толерантен към по-високи концентрации на изследваните стрес-фактори водороден пероксид и менадион.



Фиг. 14 Адаптивен и „кръстосан” протективен отговор, наблюдаван при клетките на *B. licheniformis* M20 в условията на супероксиден и пероксиден стрес

7.5. Зависимост между фазата на развитие на бактериалната култура и преживяемостта ѝ в условията на стрес.

Както се вижда от данните, представени на табл. 4, клетките в края на експоненциалната фаза са най-резистентни към влиянието на различни стрес-фактори. Това потвърждава хипотезата на Klancnik, A., 2008, че при повечето бактерии антиоксидантните ензими (вкл. СОД) се индуцират при преминаването от растеж към стационарна фаза, вероятно за протекция на генома и други важни клетъчни компоненти срещу окислителните процеси, протичащи в тази фаза. Клетките в експоненциална фаза са по-резистентни към действието на различни стрес-фактори, по-активни и способни са да синтезират протективни фактори. Протективните ензими могат да бъдат индуцирани чрез въздействие с ниски количества оксиданти (Mongkolsuk, S. and Helmann, D., 2002) и аеробите имат многобройни, често припокриващи се механизми за детоксикация на окси-радикалите.

Таблица 4 Зависимост между фазата на развитие на бактериалната култура и преживяемостта ѝ в условията на стрес

Стрес-фактори Фаза на растеж	Клетъчна преживяемост, %					СОД активност, U/mg				
	pH	pH	75°C	0.07 mM	5mM	pH	pH	75°C	0.07 mM	5mM
	5.0	9.5		менадион	H ₂ O ₂	5.0	9.5		менадион	H ₂ O ₂
Експоненциална фаза, (начало)	0	0	10	5	12	-	-	200	420	90
Експоненциална фаза, (среда)	8	25	48	55	49	100	400	2000	2800	980
Експоненциална фаза, (край)	5	25	46	50	47	215	450	2400	3100	1100
Стационарна фаза	3	10	22	20	23	165	400	520	900	400

8. Получаване на пречистен ензимен препарат на СОД

Разработената схема за пречистване на ензима до електрофоретично хомогенно състояние е представена на Табл. 5. Получено е над 10 пъти увеличение на специфичната активност с добив по отношение на активността от 11%. По същата схема за пречистване е получена в чист вид Mn-СОД от алкалофилен щам на *Bacillus sp.* Авторите получават 5 % добив и 10 пъти повишена специфична СОД активност – 229 U/mg (Hakamada, Y. and Koike K., 1997).

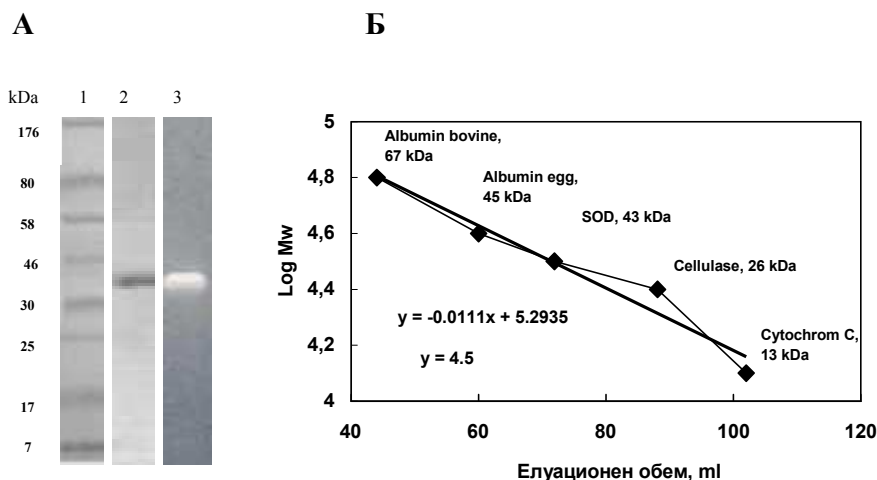
Таблица 5 Етапи на пречистването на СОД от *B. licheniformis* M20

Етапи на пречистване	Белтък (mg)	Активност, общо, (kU)	Специфична активност (U mg ⁻¹)	Добив (%)	Степен на пречистване
Безклетъчен екстракт	390	351	900	100	1
40%-60% (NH ₄) ₂ SO ₄	100	200	2000	57	2.2
Phenyl- Sepharose	40	168	4200	48	4.7
DEAE- Sepharose	10	60	6000	17	6.7
Sephadex G - 100	5	41.75	8350	11.8	9.2
Sephadex G - 50	4	39.12	9780	11.1	10.8

9. Свойства на пречистеният ензим

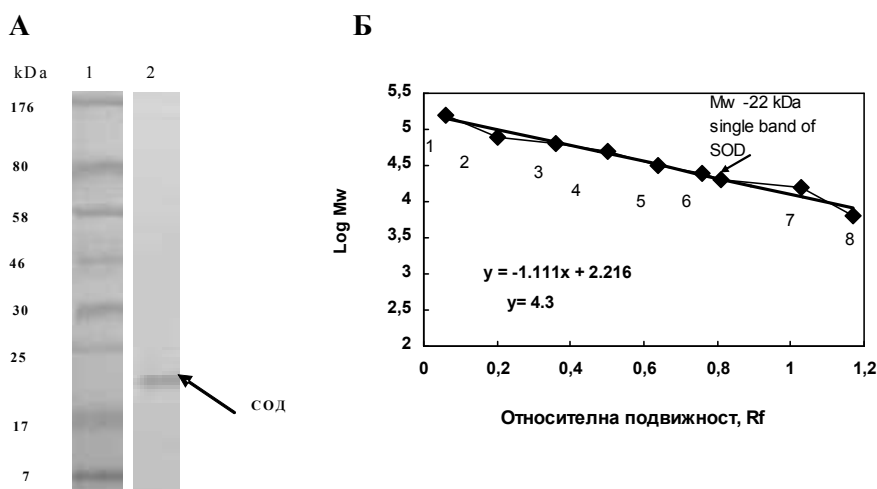
9.1 Молекулно тегло

Молекулното тегло на ензима, определено чрез нативна електрофореза и гел-филтрация е 43 kDa (Фиг. 15 А,Б). Това съответства на данните в литературата (Cannio et al., 2000), в която се съобщава, че бактериалните СОД-и са димери с молекулно тегло от 40 до 46 kDa, и тетрамери с 110 до 140 kDa, изградени от еднакви субединици.



Фиг. 15 Определяне на молекулното тегло на СОД от *B. licheniformis* M20 чрез нативна PAGE (А) и гел-филтрация (Б)

Доказателство за това, че ензима е димер е получено след провеждане на SDS-PAGE, а молекулното тегло на наблюдаваната протеинова ивица е определено чрез изчисляване на Rf – фактора (Фиг. 16 А, Б)



Фиг. 16 Определяне на молекулното тегло на белтъчната субединица, получена при SDS-PAGE (А) и чрез Rf – фактора

9.2. Тест за инхибиция

Ензимът не се повлиява от KCN и H_2O_2 , дори и в по-високи концентрации и за по-дълъг период от време. Инактивация на СОД се наблюдава след третиране с NaN_3 . Тези експерименти доказват, че металният кофактор в активния център на ензима СОД от *B. licheniformis* M20 е манган. Визуализация на действието на трите инхибитора върху ензимната активност е постигната чрез използване на нативна полиакриламидна гел-електрофореза (фиг. 17).



Фиг. 17

Нативна PAGE на 10 % гел –

- 1- контрола (нетретиран ензим)
- 2- ензим, третиран с 40 mM H_2O_2
- 3- ензим, третиран с 10 mM KCN
- 4- ензим, третиран с 20 mM NaN_3
- 5-СОД, оцветена с Coomassie

9.3. Заместване на металният кофактор

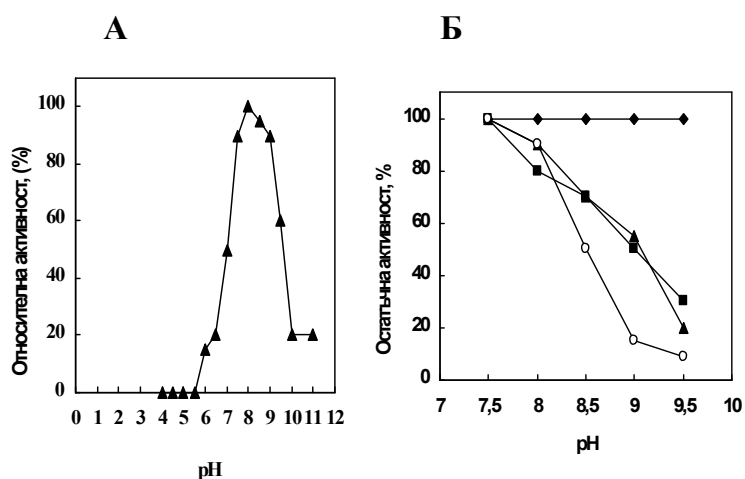
Експериментите, проведени с пречистената СОД от *B. licheniformis* M20, имат за цел да покажат дали този ензим има строга специфичност към металния йон в активния си център, или принадлежи към групата на камбиалистичните СОД. Резултатите са показани на табл. 14. Почти напълно възстановената активност на ензима след реконституцията с $MnSO_4$ и липсата на СОД активност след инкубацията с $FeSO_4$ показва, че СОД-ата има строга специфичност към металния йон в каталитичния си център и е активна само в присъствие на оригиналния за него метал – Mn.

Таблица 6 Реконституция на металния йон в активния център на СОД от *B. licheniformis* M20

Ензим	СОД активност, U/mg	Възстановена активност, %
Нативна СОД	9700	100
АпоСОД	<1	0
АпоСОД+10 mM FeSO ₄	<1	0
АпоСОД+ 10mM MnSO ₄	5200	54
АпоСОД+ 10mM FeSO ₄ + 10 mM MnSO ₄	5000	52

9.4. рН оптимум за действието на ензима. рН стабилност.

Пречистеният ензим е оптимално активен при стойности на рН 7.5-9 с максимална активност при рН 8.0 (Фиг. 18А). Ензимът запазва 55 % от специфичната си активност при стойности на рН 9.5, което показва, че СОД-ата е активна в алкални разтвори, за разлика от повечето СОД-и, които бързо се инактивират при стойности на рН по-високи от 7.8 (Seatovic et al., 2004). Остатъчната активност на ензима при рН 9.0 след 20 min е 50 % (Фиг. 18 Б).



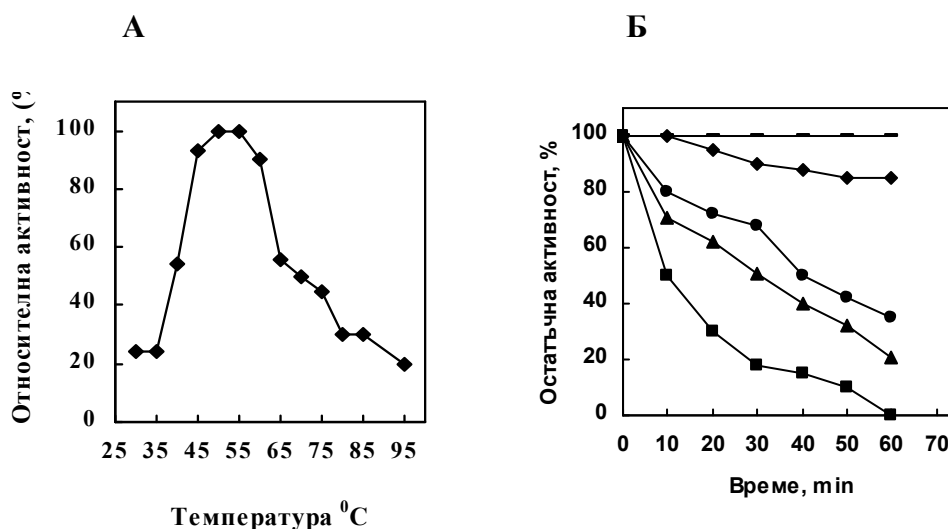
Фиг. 18А. рН оптимум за действието на пречистената СОД. **Б.** рН стабилност на ензима; ◆- нетретирана проба; ■-третирана 20 мин. при различни рН; ▲ - 40 мин.; о – 60 мин.

9.5. Влияние на металните йони и някои инхибитори върху активността на СОД-ата

СОД активността намалява до 30 - 40 % в присъствие на Cd^{2+} , Hg^{2+} , и Ag^{2+} йони в реакционната смес, което предполага наличието сулфхидрилни групи (SH-) в активния център на ензима. Тези йони имат висок афинитет към SH-групите в ензимите, което води до нарушаване в структурата на каталитичния им център. Всичките изпитани 6 инхибитори в концентрация 1mM, инхибират ензимната активност, като най-силен е ефектът в присъствие на N-bromsuccinimide и Na-lauryl sulphate. Това предполага наличието на триптофан и хистидин в активния център на ензима. Инхибирането на ензимната активност от p-chlormercurybenzoate предполага участието на сулфхидрилни групи в каталитичния участък на активния център. Частична инхибиция на ензимната активност (около 70 % остатъчна активност) е наблюдавана и в присъствие на хелатния агент EDTA, което предполага, че дивалентните катиони оказват влияние върху активността или стабилността на термостабилната СОД.

9.6. Температурен оптимум за действието на ензима. Термостабилност

В температурни граници от 45 до 60°C пречистената СОД от *B. licheniformis* M20 показва 90-100 % относителна активност и около 20 % при 95°C (Фиг. 19А). Ензимът показва изключително висока термостабилност и има време на полуживот 10 min при 95°C (Фиг. 19Б).



Фиг. 19А. Температурен оптимум на пречистената СОД.

Б. Термостабилност на ензима: - - 55°C; ◆- 65°C; ●- 75°C; ▲- 85°C; ■- 95°

До този момент има само едно съобщение в литературата за високо термостабилна СОД, получена от термофилен представител на р. *Bacillus* и свързания с него *Geobacillus*. Huang et al., (2009), откриват термофилната бактерия *Geobacillus kaustophilus* ATCC8005 като продуцент на термостабилна СОД и предлагат ензима като ценен за фармацевтичната индустрия в производство на медикаменти, свързани с лечението и превенцията на редица заболявания, както и в козметичната и хранително-вкусовата промишленост. Тази бактерия има оптимална температура на растеж - 55°C. Ензимът СОД, след инкубация при 65°C в продължение на 30 мин., запазва 100% специфичната си активност - 1786 U/mg пречистен ензим, а времето му на полуживот е 30 мин. при 90°C. Като продуцент на много активна СОД е установен *B. stearothermophilus*. Специфичната активност на пречистеният ензим, по литературни данни, е между 1387-10000 U/mg (Brehm J. et al., 1991). Мн СОД-ата от този продуцент, обаче, не е толкова термостабилна, колкото би могло да се очаква, като се има предвид, че *B. stearothermophilus* е термофилна бактерия и расте при температури до 70°C. Публикуваните данни са малко, но има съобщение, че този ензим бързо се

инактивира при температура 75°C. *B. caldotenax* е бактерия, която може да расте при температури до 85°C. и е изолирана за пръв път от такива местообитания, от които е изолиран и *Thermus aquaticus*. Генът, кодиращ Mn СОД-ата от този продуцент, е клониран в *E.coli* и е секвениран. Аминокиселинната секвенция на ензима от *B. caldotenax* показва високо хомологично сходство с този от *B. stearothermophilus*. И двете Mn СОД-и имат време на полуживот 30 мин. при 65°C и по-малко от 2 мин. при 75°C. В сравнение със тези СОД-и както и с тази от термофилния *Rhodothermus sp.* ХМН10, с време на полуживот 30 min при 80° (Wang et al., 2007), СОД-ата от *B. licheniformis* M20 има време на полуживот 10 мин. при 95°C. Специфичната активност на пречистения от нас ензим е 9780 U/mg и след 30 мин. при 75° ензима запазва 100% активността си. Този ензим е напълно конкурентен на ензима, изолиран от *Geobacillus kaustophilus* ATCC8005 и също като него, би могъл да бъде потенциален кандидат за биотехнологично приложение.

ИЗВОДИ

1. От 14 горещи минерални извори в България са получени 21 изолата, продуценти на СОД. От тях са избрани шест, показващи най-висока специфична СОД активност. Изолат М20 е избран като подходящ продуцент на термостабилна СОД с време на полуживот 20 мин. при 95°C.

2. Въз основа на направената таксономична (морфологична, биохимична и физиологична) характеристика и данните от 16S рДНК анализа, изолатът М20 е определен като представител на вида *Bacillus licheniformis*.

3. След оптимизация условията за култивиране на щама, специфичната активност на СОД-ата в безклетъчния екстракт се повишава с 2 пъти (от 533 U/mg до 1100 U/mg).

4. При провеждане на непрекъснато култивиране на щама е получена около два пъти по-висока ензимна активност (2350 U/mg) от тази измерена при периодичното култивиране (1100 U/mg).

5. В условията на проучваните видове стрес, щамът демонстрира няколкократно повишена СОД активност.

6. *B. licheniformis* М20 може да реагира с адаптивен отговор и да толерира оксидативен стрес, предизвикан от даден оксидант, след предварителна инкубация на щама със същия оксидант.

7. Клетките в края на експоненциалната фаза са по-резистентни към действието на различни стрес-фактори, по-активни и способни са да синтезират протективни фактори.

8. Изолираната и пречистена СОД от *B. licheniformis* М20 е с висока термостабилност и показва време на полуживот 10 мин. при 95°C. Пречистеният ензим запазва 60 % от специфичната си активност при рН 9.5, свойство, което го отличава от повечето бактериални МпСОД-и, които бързо губят активността си при стойности на рН над 7.8.

НАУЧНИ ПРИНОСИ

1. От български горещи извори са изолирани шест термофилни бактериални продуценти на термостабилни СОД-и, показващи време на полуживот от 5 до 30 мин. при 90°C. Продуцентът на СОД-ата, показваща най-висока термостабилност (време на полуживот 30 мин при 90°C) е идентифициран като щам на вида *B. licheniformis*. До този момент няма данни в наличната литература за изолирана и характеризирана СОД от *B. licheniformis*.

2. След оптимизация на условията за култивиране на щама и биосинтезата на ензима, СОД-активността се повишава с 2 пъти (от 1100 до 2350 U/mg).

3. Изследвания, свързани с поставянето в условия на различни видове абиотичен стрес на термофилни бактерии, продуценти на супероксид дисмутаза, се съобщават за първи път в литературата. Наблюдавана е повишена активност на антиоксидантния ензим СОД при проучването на всеки вид стрес.

4. За първи път в литературата се съобщават данни за ефекта на някои стресови фактори върху биосинтезата на ензима в различни фази от развитието термофилен бактериален продуцент. Резултатите са в съответствие със съществуващите данни в литературата, получени при изследване на ефекта на стрес-факторите върху биосинтезата на ензима в различни фази от развитието на мезофилни бактериални продуценти на СОД.

НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

За първи път от щам на *B. licheniformis* е изолирана, пречистена и характеризирана супероксид дисмутаза. Високата термостабилност и стабилността на ензима при високи стойности на рН го правят переспективен за фармацевтичната индустрия в производство на медикаменти, свързани с лечението и превенцията на редица заболявания, както и в козметичната и хранително-вкусовата промишленост.

Публикувани материали във връзка с дисертацията

Журнални статии

1. **Boyadzhieva I.**, Atanasova M., Emanuilova E. A novel, thermostable manganese-containing superoxide dismutase from *Bacillus licheniformis* Biotechnol. Lett. 32; 1893-1896, 2010, **IF 1.636/ 2009**
2. **Boyadzhieva I.**, Emanuilova E. Induction of superoxide dismutase in *B. licheniformis* M20 by heat shock and oxidative stress. Compt. rend. Acad. bulg. Sci., 63; 11; 1571- 1576, 2010 **IF 0.204/ 2009**
3. **Boyadzhieva I.**, Emanuilova E. Characteristics of bacterial strain, superoxide dismutase producer, isolated from Bulgarian thermal spring. Journal of culture collections, 4, 61-67, 2005

Участия в научни форуми, включени в дисертацията

1. Boyadzhieva I., Emanuilova E .

4th Balkan Conference of Microbiology, Bucharest, Romania, November 23-26, 2005,

Poster : Characteristics of bacterial strain superoxide dismutase produser, isolated from Bulgarian thermal spring

2. Boyadzhieva I., Emanuilova E

6th Balkan Congress of Microbiology, Ohrid, Macedonia October 28-31, 2009,

Poster: A thermostable manganese-containing superoxide dismutase from *B. licheniformis*