БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ”

ИВАН ДИМИТРОВ ИВАНОВ

НОВИ ПРОДУЦЕНТИ НА ПРЕБИОТИЧНИ ВЪГЛЕХИДРАТИ ОТ БЪЛГАРСКО КИСЕЛО МЛЯКО

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ Професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност „Микробиология“

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ: ПРОФ. ДН ПЕНКА ПЕТРОВА
ПРОФ. ДН КАЛОЯН ПЕТРОВ

София, 2025

Настоящата дисертация е разработена в Департамент „Обща микробиология, Лаборатория „Микробна генетика“, Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“ БАН. Дисертационният труд съдържа 121 страници и е илюстриран с 13 таблици и 27 фигури. Библиографската справка включва 218 литературни източника. Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Националния семинар по обща микробиология на Института по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН на 16.09.2025 г. и с Протокол на НС №10/30.09.2025 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание на научно жури на .....год. от ..... часа в залата на Институт по Микробиология „Стефан Ангелов”, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, София. Материалите по защитата са на разположение в кабинет 218 (Деловодство) на Институт по Микробиология „Стефан Ангелов”, БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, София, както и са публикувани съгласно ЗРАСРБ на адрес www.microbio.bas.bg.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ
„СТЕФАН АНГЕЛОВ”

ИВАН ДИМИТРОВ ИВАНОВ

НОВИ ПРОДУЦЕНТИ НА ПРЕБИОТИЧНИ ВЪГЛЕХИДРАТИ ОТ БЪЛГАРСКО КИСЕЛО МЛЯКО

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ Професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност „Микробиология“

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ: ПРОФ. ДН ПЕНКА ПЕТРОВА
ПРОФ. ДН КАЛОЯН ПЕТРОВ

НАУЧНО ЖУРИ:

проф. д-р Людмила Кабаиванова-Миланова
проф. д-р Геновева Начева
доц. д-р Галина Стоянчева
доц. д-р Елена Кръчмарова
доц. д-р Иван Иванов

София, 2025

Списък на използваните съкращения

МКБ - млечнокисели бактерии (Lactic acid bacteria)
ГИТ - гастро-интестинален тракт
ГОЗ - галактоолигозахариди
lacZ - ген, кодиращ ензима бета-галактозидаза
CFU/мл - колония образуващи единици за мл (colony forming units/ml)
ЕС номер – нумерична класификационна схема на ензимите (Enzyme Commission number)
SDS - натриев додецил сулфат (sodium dodecyl sulfate)
PAGE - полиакриламидна гел електрофореза (polyacrylamide gel electrophoresis)
ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина
РНК - рибонуклеинова киселина
иРНК - информационна рибонуклеинова киселина
bp - базови двойки (base pair)
GH - гликозид-хидролаза (glycoside hydrolase)
DP - степен на полимеризация (degree of polimerization)
ATCC - Американска колекция за типови култури (American Type Culture Collection)
DSMZ - Немска колекция за микроорганизми и клетъчни култури

Увод

Ферментиралите храни заемат важно място в хранителната култура на човека още от дълбока древност и продължават да бъдат обект на интензивни изследвания в областта на нутригеномиката, микробиологията и биотехнологията. Особено значение има млечнокиселата ферментация, която не само консервира храните, но и обогатява тяхната хранителна стойност, биологична активност и безопасност.

Българското кисело мляко е емблематичен продукт с международно признание, чиято уникалност се дължи на специфичната микрофлора – *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, както и на съпътстващите автохтонни микробни общности. Тези микроорганизми не само участват в процеса на ферментация, но и синтезират биоактивни съединения с пребиотичен ефект. Сред тях особено място заемат галактоолигозахаридите (ГОЗ) – въглехидрати с доказан пребиотичен потенциал, които стимулират растежа на полезни бактерии в гастроинтестиналния тракт и подобряват здравния статус на човека.

Настоящата дисертация е посветена именно на изследването на нови продуценти на ГОЗ, изолирани от традиционни български кисели млека, на хетероложната експресия на отговорния за това ген и на биохимичната характеристика на ензима β-галактозидаза. Високата активност и уникалните свойства на ензима на *L. bulgaricus* дават възможност за развиването на успешен биотехнологичен процес за синтез на ГОЗ.

Литературният обзор в дисертацията разглежда: биологията на млечнокиселите бактерии, български ферментирали млечни продукти, структурата и свойствата на ГОЗ, индустриалното приложение на олигозахаридите.

МКБ са грам-положителни микроорганизми, които метаболизират въглехидрати до млечна киселина. Те включват родовете *Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus* и др. Особено място заема *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, който заедно със *S. thermophilus* образува симбиотична закваска за кисело мляко. Тази симбиоза определя вкуса, аромата, консистенцията и полезните свойства на продукта. В обзора е представена богата историческа и технологична информация за кисело мляко, бяло саламурено сирене, кашкавал, катък, кефир, кумис и брано мляко. Те са не само храни, но и културно наследство, носители на разнообразна микробиота и биоактивни вещества. МКБ синтезират органични киселини, бактериоцини, екзополизахариди, витамини от група В, антиоксидантни и антихипертензивни пептиди. Те са свързани с пробиотичния и постбиотичния потенциал на млечните продукти.

Галактоолигозахариди (ГОЗ): въглехидрати, изградени от молекула глюкоза, свързана с 2–8 галактозни единици. Те действат като пребиотици, стимулирайки растежа на бифидобактерии и лактобацили в дебелото черво. Имат доказани ефекти върху усвояването на минерали, метаболизма на липидите и имунния отговор. Биосинтезата на ГОЗ се катализира от β-галактозидази, способни да извършват трансгалактозилиране.

ГОЗ се използват в детски храни, пробиотични добавки и функционални продукти. Съвременната биотехнология търси нови ензими с висока активност и стабилност, което прави щамовете от българско кисело мляко особено ценни като източник на биокатализатори.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертацията е молекулярна характеристика на гена *lacZ* и β-галактозидазата от български щам *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, с оглед оптимизиране на ин витро синтеза на пребиотични галактоолигозахариди (ГОЗ).

Изпълнението на целта е свързано с последователната експериментална работа по следните

ЗАДАЧИ:

1. Да се съберат проби от домашно приготвени кисели млека от различни географски райони на България и микробиотата да се анализира чрез метагеномно секвениране.

2. Да се идентифицират и сравнят видовете млечнокисели бактерии (МКБ) и да се оценят специфичните съотношения на *L. bulgaricus* и *S. thermophilus* в киселите млека.

3. Да се установи наличието на съпътстващи, нетипични или пробиотично значими щамове и евентуални замърсители.

4. Да се секвенира генът *lacZ* от щам *L. bulgaricus* 43 и да се анализира молекулярната структура на кодирания от този ген ензим β-галактозидаза.

5. Да се осъществи хетероложна експресия на *lacZ* в *E. coli* и да се проучат активността и биохимичните характеристики на ензима β-галактозидаза (оптимуми на pH и температура, влияние на метални йони).

6. Да се оцени потенциала на новата β-галактозидаза за индустриално производство на ГОЗ.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микробиологични методи

- Събиране на проби от кисело мляко
- Изолиране на щамове МКБ
- Други бактериални щамове
- Хранителни среди и методи за култивиране

2. Аналитични методи

- Изследване на клетъчния растеж
- Определяне на ензимната активност
- Количествено определяне на белтък по Bradford
- Определяне на pH и температурен оптимум на ензими
- Изследване ефекта на йони и ЕДТА върху ензимната активност
- Количествено определяне на получените метаболити чрез HPLC
- Течна хроматография с мас-спектрометрия (LC/MS)

3. Молекулярно-биологични методи

- Изолиране на тотална ДНК от кисело мляко
- Изолиране на хромозомна ДНК от *L. bulgaricus*
- Изолиране на плазмидна ДНК
- Определяне качеството и количеството на изолираните НК
- Секвениране и биоинформатичен анализ
- Клониране на ген *lacZ* от *L. bulgaricus* 43 във вектор pET41(b)
- Екстракция на ензима β-галактозидаза
- Пречистване на β-галактозидаза от *L. bulgaricus* 43
- Синтез на GOS *in vitro*
- Електрофоретичен анализ на ДНК и белтъчни молекули

III. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Бактериални съобщества в домашни български кисели млека – метагеномен анализ

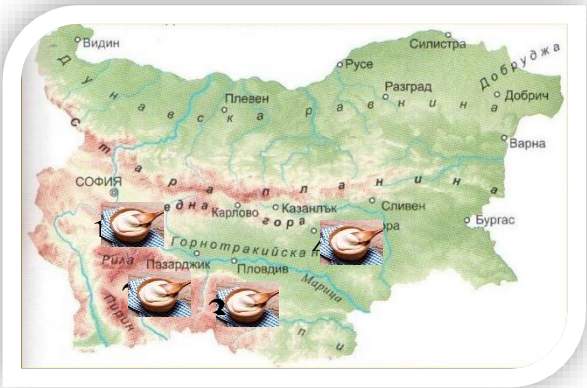
Забележителните свойства на българското кисело мляко се дължат изключително на неговото микробно съдържание. Микробната флора на киселото мляко не е случаен набор от видове, а уникална микроекологична ниша [156]. Най-изследваните закваски за кисело мляко разчитат на симбиозата между *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* [157,158]. Според дефиницията на Кодекс алиментариус на Организация по прехрана и земеделие на ООН (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) и Световната здравна организация (WHO), киселото мляко трябва да съдържа не по-малко от 10^7 жизнеспособни колония-образуващи единици (CFU) на грам продукт. Заквасните произвеждат летливи вещества, които са отговорни за типичния аромат на киселото мляко (ацеталдехид, диацетил, ацетоин, ацетон, етанол и 2-бутанон), органични киселини и пребиотици като галактоолигозахариди (ГОЗ) [159].

Българското кисело мляко е емблема на нашата страна и е един от най-популярните видове кисело мляко в световен мащаб. Настоящото изследване добавя нова, изчерпателна информация за микрофлората на българското кисело мляко, в допълнение към откритието на *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* преди 120 години [25].

Колекция от домашно приготвени български кисели млека от отдалечени места разкрива уникално съдържание на бактериална микрофлора. Като се има предвид значителното влияние както на стартерните култури, така и на съпътстващите ги щамове МКБ върху полезните свойства на киселото мляко [160], настоящата работа има за цел да

разкрие биоразнообразието на българските кисели млека, използвайки метагеномика, да изолира и идентифицира нови стартери и съпътстващи щамове МКБ чрез използване на съвременни генетични подходи и да изследва биоактивните метаболити чрез прецизни аналитични методи.

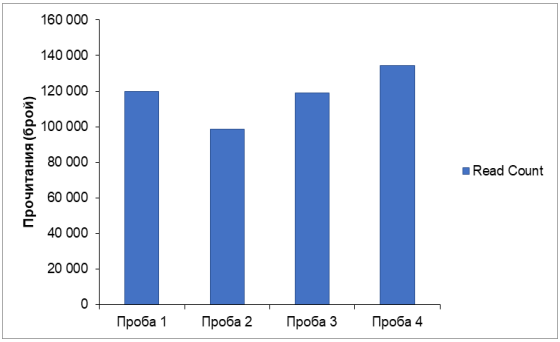
Известно е, че няколко региона в България съдържат ендемична микрофлора: високите планини на Рила, Пирин и Родопите, както и Горнотракийската низина. На Фиг. 1 са означени географските локации, от които са взети пробите от домашно кисело мляко, включени в метагеномния анализ.



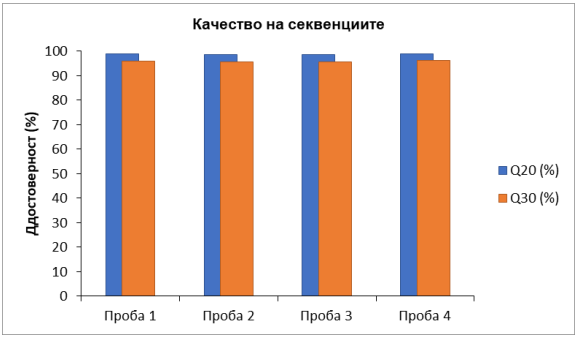
Фигура 1. Географски райони на събиране на проби домашно кисело мляко и подложени на метагеномен анализ

Изготвянето на 16S метагеномните библиотеки и секвенирането на пробите бяха осъществени в Macrogen Inc. (Корея) с използване на Herculase II Fusion ДНК полимераза и комплекта Nextera XT Index Kit V2. Чрез платформата Illumina беше проведено секвениране във вид на прочитания с дължина 301 bp, като за контрол на качеството данните бяха записани във формат FastQ. След филтрация на суровите

данни, асемблираните метагеноми съдържаха между 73 209 822 и 82 104 372 базови двойки и над 100 000 прочитания на проба (Фиг. 2). Делът на прочитанията с качество над Q20 и Q30 е представен на Фиг. 3.

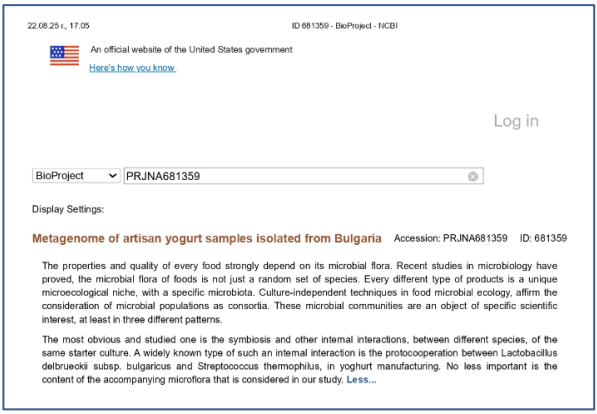


Фигура 2. Брой прочитания при секвенционния анализ на пробите.



Фигура 3. Качествен контрол на метагеномното секвениране.

Суровите данни за секвениране (SRA-архив) бяха депозирани в GenBank на NCBI със следните номера за достъп: BioProject ID PRJNA681359, BioSample: SAMN16961356, Sequence Read Archive (SRA) SUB8652830 (Фиг. 4).



Фигура 4. Депозираните метагеномни секвенции, публикувани на сайта на Националния център за биотехнологична информация (NCBI) на САЩ.

Между 68,4% и 99,6% от общата млечнокисела микробиота в четирите изследвани проби се състоеше от два вида: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *S. thermophilus*, като съотношението между тях вариране в широки граници. В Проба 2 (Рила), *S. thermophilus* беше най-разпространеният вид, докато в Проба 4 (Родопи), преобладаваше *L. bulgaricus*.

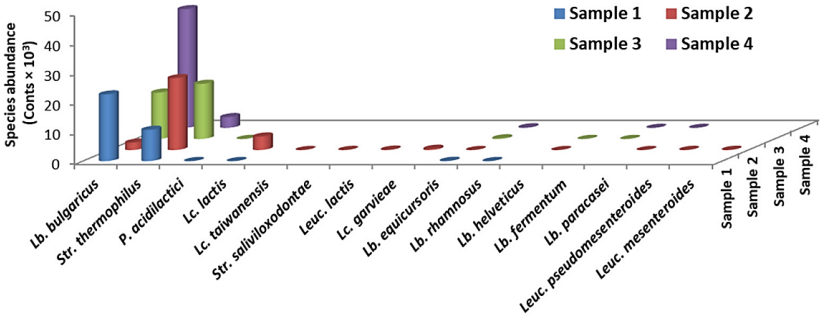
Като се има предвид разпределението по региони, симбиозата между *L. bulgaricus* и *S. thermophilus* съществува във всички проби, но препоръчителното съотношение от ~1:1 между щамовете се наблюдава само в Проба 3 (от Горнотракийската низина). Това съотношение в закваската силно влияе върху качествата на киселото мляко, като текстура, цвят, вкус и последващо подкиселяване.

Видовото биоразнообразие на бактериите в проби от кисело мляко, събрани от тези места, бе проучено след изолиране на общата ДНК от пробата и метагеномно секвениране (Табл. 1, Фиг. 5).

Таблица 1. Метагеномно проучване на изобилието на видове млечнокисели бактерии в четири проби от българско домашно приготвено кисело мляко, приготвено с помощта на собствена (домашна) закваска. Произход на киселото мляко: Проби 1 и 2 - от села в планините Рила и Пирин, Проба 3 - от Горнотракийската низина, Проба 4 - от Родопите.

Вид	**Относително изобилие на вида в пробата (брой копия)**			
	Проба 1	**Проба 2**	**Проба 3**	**Проба 4**
L. bulgaricus	22472	2500	15626	40010
Streptococcus thermophilus	10544	24249	18569	3603
Pediococcus acidilactici	314		649	-
Lactococcus lactis	98	4546	-	-
Lactococcus taiwanensis	-	3	-	-
Streptococcus saliviloxodontae	-	24	-	-
Leuconostoc lactis	-	116	-	-
Lactococcus garvieae	-	414	-	-
Lactobacillus equicursoris	78	0	208	175
Lacticaseibacillus rhamnosus	716	-	-	-
Lactobacillus helveticus	-	450	804	-
Limosilactobacillus fermentum	-	-	657	606
Lacticaseibacillus paracasei	-	395	-	524
Leuc. pseudomesenteroides	-	314	-	-
Leuc. mesenteroides	-	188	-	-

Родопското кисело мляко е най-богатият източник на *L. bulgaricus*, а този вид е типичен за българското кисело мляко и не е толкова разпространен в съседните страни. Например, в гръцко проучване е съобщено за изолирането само на един щам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* от девет анализирани кисели млека [161]. Сравнително по-ниският брой на *L. bulgaricus* в Проба 2 вероятно се дължи на многократното прехвърляне на същата закваска в нестерилна домашна среда. Обяснението на този факт дават Уршев и съавт. (2006): при домашни и нестерилни условия бактериофагите биха могли да унищожат част от закваската [162], като по този начин доведат до увеличаване на микробния брой на съпътстващата микрофлора [163].



Фигура 5. Метагеномно изследване на видовото изобилие в четири проби от българско кисело мляко, приготвено с помощта на домашна закваска. Произход на киселото мляко: Проби 1 и 2, от села в Рила и Пирин; Проба 3, от Горнотракийската низина; Проба 4, от Родопите.

Според Sieuwerts и съавт. (2008), традиционната култура на кисело мляко е съставена от *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *S. thermophilus*, а наименованието „кисело мляко“ е разрешено само за продукти, които съдържат заквaски от тези видове [164]. Скорошни метагеномни изследвания, посветени на съпоставянето на микробиотата на киселото

мляко и чревния микробиом, разкриха наличието на *Lacticaseibacillus paracasei, Lacticaseibacillus rhamnosus, L. parabuchneri, L. parafarraginis, Lactiplantibacillus plantarum, Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides* и *Pediococcus acidilactici* и в двете ниши [165,166]. Нашите резултати частично потвърдиха тези наблюдения, тъй като сред автохтонните лактобацили в българските домашни кисели млека бяха открити *L. rhamnosus* и *L. paracasei*. Освен това, бяха открити и щамове на *L. helveticus, Limosilactobacillus fermentum* и *L. equicursoris* (Табл. 1). Въпреки това, докато *L. helveticus* често се наблюдава в български кисели млека и се идентифицира с помощта на генетични техники [167,168], наличието на *L. fermentum, L. paracasei* и *L. rhamnosus* е необичайно. *L. plantarum*, типичен за гръцкото кисело мляко, не беше открит в изследваните проби. Въпреки че *L. equicursoris* принадлежи към филогенетичния клон на *L. delbrueckii*, нашето проучване е първото, което съобщава за неговото наличие в кисели млека. Този вид първоначално е изолиран от изпражненията на чистокръвен състезателен кон от Morita и съавт. (2010) [169] и наскоро е открит в кефир [170]. Други съпътстващи МКБ видове са *Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, *Lc. taiwanensis, P. acidilactici, Leuc. lactis, Leuc. mesenteroides* и *Leuc. paramesenteroides*. Известно е, че част от тези видове допринасят за сладкия, плодов или ванилов аромат чрез производството на етанол, 2-бутанон, 2-пентанон и 2,3-пентандион [171] и понастоящем са предпочитани от потребителите. Други желани качества на тези видове са синтеза на извънклетъчни екзополизахариди и високата протеолитична активност.

На Фиг. 6 и Табл. 2 са представени откритите чрез метагеномен анализ представители на нежелана и дори патогенна бактериална микробиота в пробите от домашно кисело мляко. *Acinetobacter* spp. и *Chryseobacterium* spp. бяха идентифицирани като основни видове, причиняващи

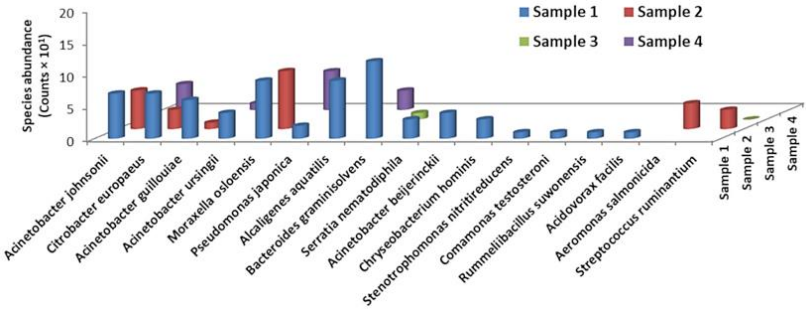
разваляне на киселите млека. Тези Грам-отрицателни бактерии, замърсители след обработката на прясното мляко, силно ограничават срока на годност на продукта. Те преодоляват етапите на микрофилтрация и последваща пастьоризация, и са открити също в кисели млека в Германия, Австрия и Швейцария [172]. Наличието на Грам-отрицателния, облигатен анаероб *Bacteroides graminisolvens* в две проби от крави от различни региони (проби 1 и 3) е показателно за замърсяване на почвата по време на доене и/или транспортиране на суровото мляко. Този вид е повсеместно разпространен в оборите и селските райони.

Таблица 2. Метагеномно проучване на изобилието на видове-замърсители в четири проби от българско домашно приготвено кисело мляко. Произход на киселото мляко: проба 1 и 2, от села в Рила и Пирин, проба 3, от Горнотракийската низина, проба 4, от Родопите.

Вид	**Относително изобилие на вида в пробата (брой копия)**			
	Проба 1	**Проба 2**	**Проба 3**	**Проба 4**
Acinetobacter johnsonii	7	6	-	**4**
Citrobacter europaeus	7	3	-	**-**
Acinetobacter guillouiae	6	1	-	**1**
Acinetobacter ursingii	4	-	-	**-**
Moraxella osloensis	9	9	-	**6**
Pseudomonas japonica	2	-	-	**-**
Alcaligenes aquatilis	9	-	-	**3**
Bacteroides graminisolvens	12	-	1	**-**
Serratia nematodiphila	3	-	-	**-**
Acinetobacter beijerinckii	4	-	-	**-**
Chryseobacterium hominis	3	-	-	**-**

Stenotrophomonas nitritireducens	1	-	-	-
Comamonas testosteroni	1	-	-	-
Rummeliibacillus suwonensis	1	-	-	-
Acidovorax facilis	1	-	-	-
Aeromonas salmonicida	-	4	-	-
Str. ruminantium	-	**3**	**0**	-

Други микробни видове, като *Moraxella osloensis, Alcaligenes aquatilis, Str. ruminantium* и *Str. saliviloxodontae*, бяха открити в количество между 0,1% и 0,01% или по-малко. Ниският брой на замърсяващите видове (Табл. 2) показва, че единични клетки от околната среда са замърсили млякото, но тези видове не са се размножили поради антагонистичната активност на млечнокиселите бактерии [173].



Фигура 6. Метагеномно изследване на видовото изобилие на замърсяващата микрофлора в четири проби от българско домашно приготвено кисело мляко. Произход на киселото мляко: Проби 1 и 2, от села в Рила и Пирин; Проба 3, от Горнотракийската низина; Проба 4, от Родопите.

Нашите наблюдения са в съответствие с изследванията на други автори, съобщаващи за наличието на замърсители от Грам-отрицателни психротрофи в кисели млека, като *Pseudomonas* sp. и *Klebsiella* sp. [174]. По подобен начин, българските кисели млека бяха замърсени, но с незначителни количества *Ps. japonica* и *Citrobacter europaeus*. Въпреки това, опасни зоонотични патогени, като колиформни бактерии, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica, Brucella* sp., *Mycobacterium bovis* или *Enterobacter sakazakii*, не бяха открити в нито една от пробите. Наличието тези видове в прясно мляко е споменавано по-рано от други изследователи [175-177], но в киселото мляко те не присъстват.

Съвременните културално-независими техники, като метагеномиката, позволяват цялостно изследване на консорциумите от кисело мляко и разкриват, че те съдържат широк спектър от съпътстваща микрофлора с не по-малко полезни свойства [166].

Тези микробни общности са обект на нарастващ научен интерес, поне в три различни посоки:

(1) Изследване на симбиозата и други вътрешни взаимодействия между млечнокиселите бактерии (МКБ) за избор на закваски с по-добро качество;

(2) Изясняване на специфичните диетични свойства на киселото мляко;

(3) Определяне на специфичните съединения, произведени от млечнокиселите бактерии (МКБ), които могат да решат здравословни проблеми без употреба на лекарства.

Проучване, включващо здрави доброволци, разкрива, че ежедневният прием на кисело мляко, обогатено с *L. paracasei* (*L. casei* 431®), подобрява имунния отговор чрез повишаване на активността на NK клетките и повишаване на нивата на интерлевкин (IL)-12 и имуноглобулин (Ig) G1, както и концентрацията на IFN-γ [172]. Друг щам от този вид, *L.*

paracasei CNCM I-1518, намалява бактериалната транслокация, чревната дисбиоза и илеалното оксидативно увреждане, и увеличава експресията на илеалния β-дефензин-1 при плъхове, което предполага подобрение в целостта на чревната бариера [179].

Киселото мляко съдържащо *L. helveticus* H9 притежава отлична ACE-инхибиторна (ACE I) активност с високи нива на антихипертензивни пептиди, като Val-Pro-Pro и Ile-Pro-Pro [180,181]. Известно е, че *L. helveticus* LH-B02 благоприятства образуването на биоактивни пептиди, като αS1-CN f(24–32) и β-CN f(193–209) [182].

Защитеният с патент *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) е най-изучаваният пробиотичен вид в света с повече от 800 научни изследвания. Авторите твърдят, че щамът издържа присъствието на жлъчни соли, има голям афинитет към клетките на чревната лигавица на човека и допринася за различни ползи за здравето, като например облекчаване на гастроентерит, диария, екзема и много други заболявания [183-185].

2. Генно секвениране и молекулярна структура на β-галактозидаза от *L. bulgaricus* щам 43

При предишни проучвания на колектива бяха идентифицирани няколко щама *L. bulgaricus* с β-галактозидазна активност. Един от тях, *L. bulgaricus* щам 43 е показал необичайно висока трансгалактозидазна активност, като синтезираните количества ГОЗ в лактозна среда и в кисело мляко са достигнали съответно 2.72 г/л и 2.83 г/л ГОЗ след 48 ч. [25].

Ето защо цел на настоящата дисертация бе секвенирането на отговорния за тази функция ген *lacZ*, хетероложната му експресия и молекулярната характеристика на ензима β-галактозидаза.

Секвенирането на гена бе извършено след получаване на PCR-продукт с двойка праймери, амплифициращи *lacZ* (базирани на *lacZ* на референтните щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20080 и ATCC 11842). Полученият ДНК фрагмент е с големина 3027 bp и неговата секвенция бе депозирана в NCBI GenBank с номер за достъп OP617280.

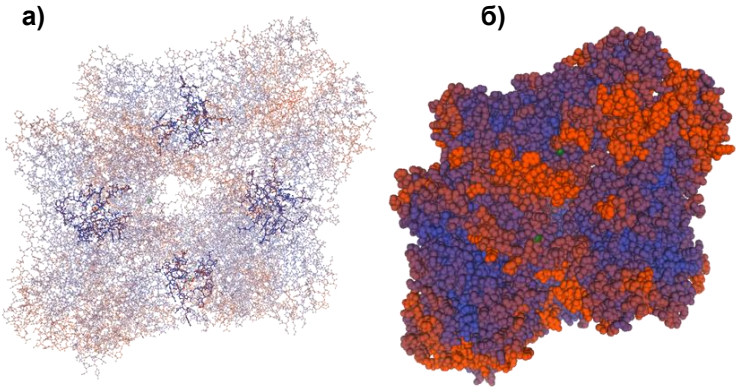
```
LB43  121   IPSKNPLASYVRYFDLDEAFPEQTRLLLEDLIRTANVDRQNGHFVGYGEDSFTPSEFMVT  180
            IPSKNPLASYVRYFDLDEAF ++   L  D   TA    NGHFVGYGEDSFTPSEFMVT
L3    121   IPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKEVSLKFDGAATAIYVWLNGHFVGYGEDSFTPSEFMVT  180

LB43  181   KFLKKENNRLGVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGLSGSVNLQAKPRLHLEDLKLTASLTDN  240
            KFLKKENNRL VALYKYSSASWLEDQDFWRMSGL  SV LQAKPRLHLEDLKLTASLTDN
L3    181   KFLKKENNRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGLFRSVTLQAKPRLHLEDLKLTASLTDN  240
```

Фигура 7. Сравнение на аминокиселинната последователност на региона с най-ниска хомология с други β-галактозидази на *L. bulgaricus*. Представеното сравнение е със последователността на добре проучена β-галактозидаза от щам *L. bulgaricus* L3 [148], NCBI GenBank ACE06986.

Сравнението на нуклеотидните последователности показа 98,32% хомология с *lacZ* на референтния *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842, като съответната протеинова последователност съдържаше 97,52% идентични аминокиселини с тези на останалите β-галактозидази, срещани при този вид. Най-ниска идентичност притежаваха последователностите в региони 140 – 160 и 214 – 220 (Фиг. 7), където се наблюдават 21 аминокиселинни замествания спрямо характеризирания ензим на *L. bulgaricus* щам L3.

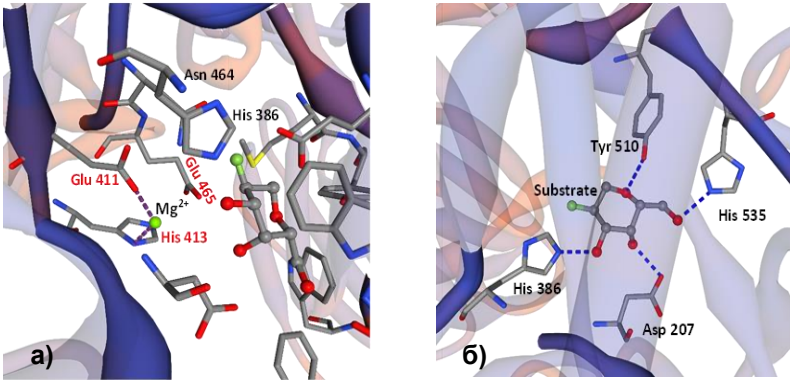
Анализът на протеиновата последователност на молекулата β-галактозидаза чрез SWISS-MODEL разкри, че ензимът е хомо-тетрамер (Фиг. 16). Всяка от четирите вериги съдържа 1008 аминокиселини и има изчислено молекулно тегло от 114,17 kDa.



Фигура 8. 3D модел на β-галактозидаза от щам 43 на *L. bulgaricus*, направен от SWISS-MODEL Workspace. (a) Представяне „топка и пръчка“ на веригите, разкриващо образуването на четири активни центъра около субстрата; (b) Повърхностен модел на тетрамера.

В рамките на 4 Å, дванадесет аминокиселинни остатъка са от съществено значение за образуването на активния център и свързването на субстрата: Асп207, Хис386, Асн464, Глу465, Мет509, Тир510, Глу532, Хис535, Три562, Фен590, Асн593 и Три980. Каталитичният център се образува от Глу465 и Глу532 (които действат като нуклеофилни и киселинно-основни катализатори) и Тир510, който отдава протон на Глу532, за да атакува субстрата. Остатъците Три562, Фен590 и Три980 най-вероятно действат като аналози на Три570, Фен616 и Три593 в β-галактозидазата на Bacillus circulans ATCC 31382, т.е. те образуват ароматния джоб, който определя типа на връзките и размера на продукта.

Два хистидинови остатъка (Хис386, Хис535), Асп207 и Тир510 образуват водородни връзки със субстрата като част от активния център.(Фиг. 9).

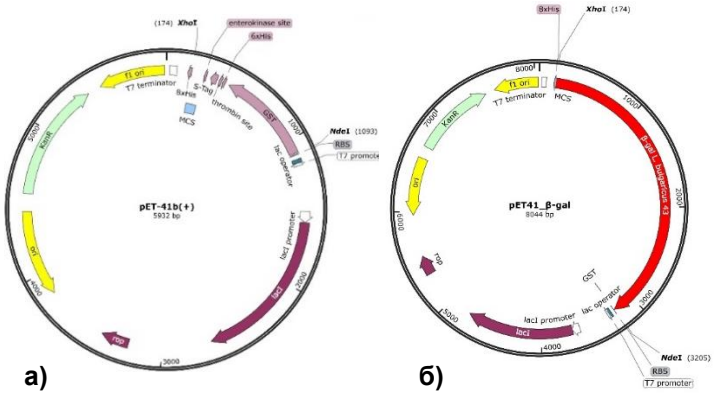


Фигура 9. SWISS-MODEL Workspace/GMQE прогноза за взаимодействия между аминокиселини в активния център на β-галактозидаза от *L. bulgaricus* щам 43. (а) Според модела, Глу411, Глу465 и Хис413, се свързват с метални катиони; (б) два хистидинови остатъка (Хис386, His535), Асп207 и Тир510 образуват водородни връзки със субстрата.

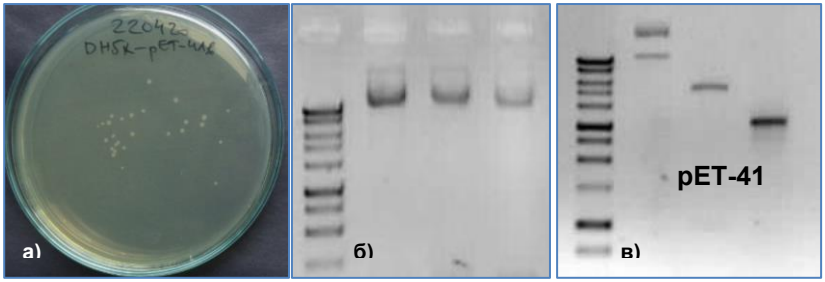
3. Клониране, хетероложна експресия в *E. coli* BL21(DE3) и пречистване на β-галактозидаза от *L. bulgaricus* 43

Генът β-gal (*lacZ*) от *L. bulgaricus* 43 (3024 bp, без стоп кодона) беше амплифициран чрез PCR с праймери с краища, съдържащи сайтове за съответните рестриктази. Полученият фрагмент беше клониран между *Xho*I и *Nde*I сайтовете на вектора pET-41b(+), заместващи *gst* гена за получаването на рекомбинантния конструкт с големина 8044 bp (Фиг. 10). Генът бе поставен под контрола на T7 индуцируем промотор и – поради целенасочената липса на стоп кодон – слят с последователност His-tag, кодираща „опашка“ от 8 хистидинови остатъка. След трансформация на компетентни клетки *E. coli* DH5α (Фиг. 11), подходящите клонове бяха

потвърдени чрез рестрикционен анализ на изолираните плазмиди (Фиг. 12), както и чрез секвениране.

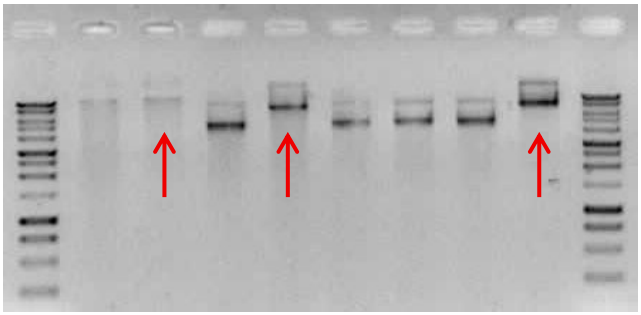


Фигура 10. Физически карти на: а) изходния вектор pET-41b(+); и б) рекомбинантния конструкт pET41_β-gal, базиран на вектор и съдържащ β-галактозидазния ген на *L. bulgaricus* щам 43.

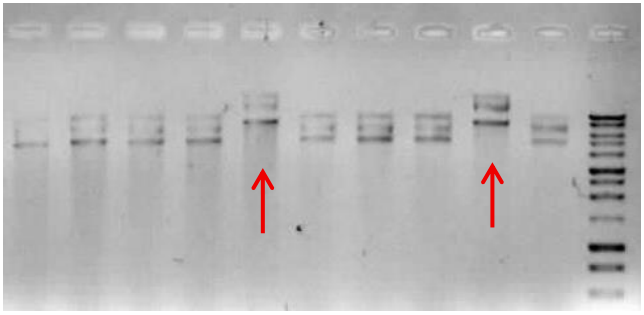


Фигура 11. Трансформация на *E. coli* DH5α: а) трансформанти с вектора pET-41(b); б) нативен вектор след изолиране от клетките; в) вектор и ген: пречистени фрагменти, готови за лигиране (нативен вектор на първия старт след маркера за сравнение). Молекулен маркер: Perfect Plus Ladder (EURx).

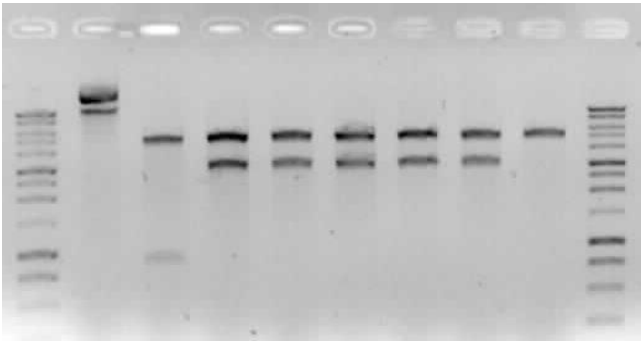
а)



б)



в)

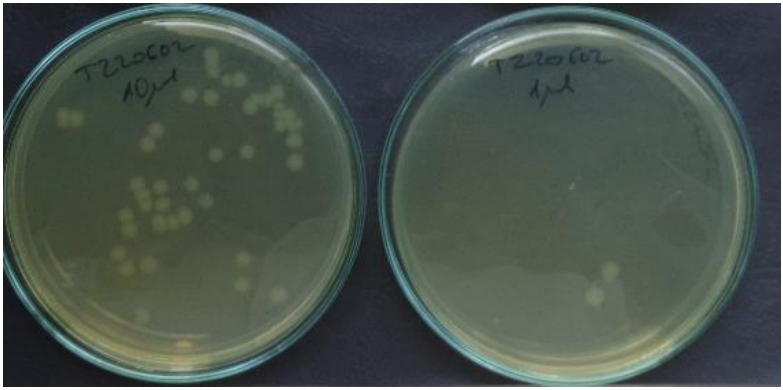


Фигура 12. Анализ на клоновете в *E. coli* DH5α. а) и б) плазмиди изолирани от трансформанти; клоновете, съдържащи гена *β-gal* са отбелязани със стрелка; в) същите пет клона след рестрикция с *Xho*I и *Nde*I; за сравнение: празен вектор нативен и нарязан (отляво) и празен вектор (без ген, отдясно). Маркер: Perfect Plus Ladder (EURx).

На Табл. 3 са показани концентрациите и чистотата на рекомбинантните конструкти pET41_β-gal използвани за трансформация на *E. coli* BL21(DE3) чрез електропорация (Фиг. 13).

Таблица 3. Измерени концентрации на плазмидна ДНК, изолирана от рекомбинантни клонове, съдържащи конструкта pET41_β-gal.

Клон №	A260	A280	260/280	ng/μL
1	0.933	0.549	1.7	46.7
2	0.872	0.515	1.69	43.6
3	0.99	0.583	1.7	49.5
4	0.888	0.544	1.63	44.4
5	0.92	0.532	1.73	46.1

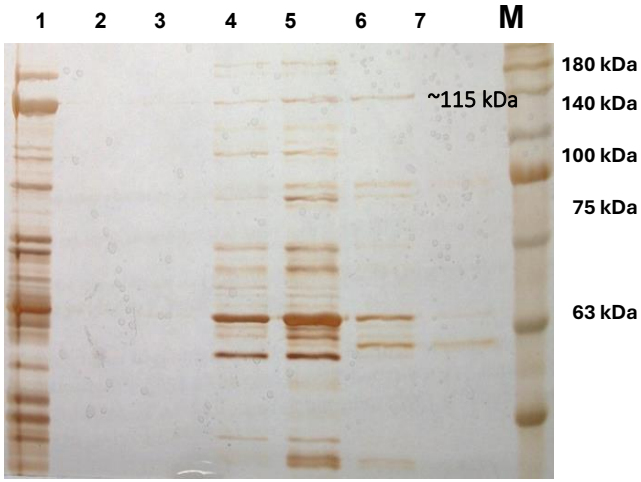


Фигура 13. *E. coli* щам BL21(DE3) трансформанти, съдържащи конструкт pET41_β-gal. Условия на електропорация: електропоратор *BioRad*, Ec1 program 1.8 kV/mm, 5.7 ms.

Свръхекспресия на рекомбинантния протеин в *E. coli* BL21(DE3)бе постигната чрез индукция на T7 промотора с 1 mM IPTG за 24 ч. след достигане на OD_{600} около 0,8. След

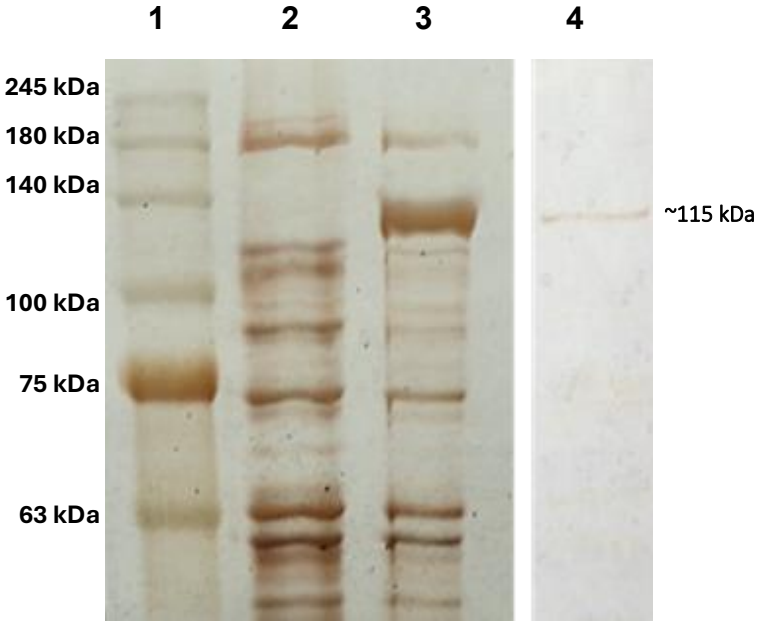
разреждане от 1200 пъти, безклетъчните лизати бяха тествани за β-галактозидазната активност в калиево-фосфатен буфер, при pH 7,2, на 37 °C и с ONPG като субстрат. Максималната β-галактозидазна активност достигна 3015±28 U/мл, което отговаря на 2011±16 U/мг специфична активност.

Допълнително пречистване на ензима беше извършено чрез афинитетна хроматография с гравитационни колони, съдържащи Ni-сефароза (His Gravi Trap™). Оптимизация на елуирането с различни концентрации на имидазол от 100 до 1000 mM показа, че най-ефективна е концентрацията 150 mM имидазол (Фиг. 14).



Фигура 14. Етапи на пречистване на рекомбинантна β-галактозидаза чрез афинитетна хроматография с никелово-сефарозни колонки His Gravi Trap™ (GE Healthcare). Молекулен маркер: PerfectTM Tricolor Protein Ladder. Номер на старт и проба: 1) клетъчен екстракт, 2), 3) всички белтъци са изгубени от елуата, 4) елуиране при 200 mM имидазол, 5) 300 mM имидазол, 6) 150 mM имидазол, 7) 100 mM имидазол.

Електрофореза в денатуриращ полиакриламиден гел (SDS-PAGE) показа наличието на протеин с очакваната молекулна маса от приблизително 115 kDa (Фиг. 15), който липсва при контролните клетки – нетрансформирани *E. coli* BL21(DE3). Пречистването на целевия протеин обаче беше съпроводено с големи загуби по време на елуирането, както и от нежелани протеини. Ето защо, част от следващите експерименти бяха проведени с непречистен ензим.



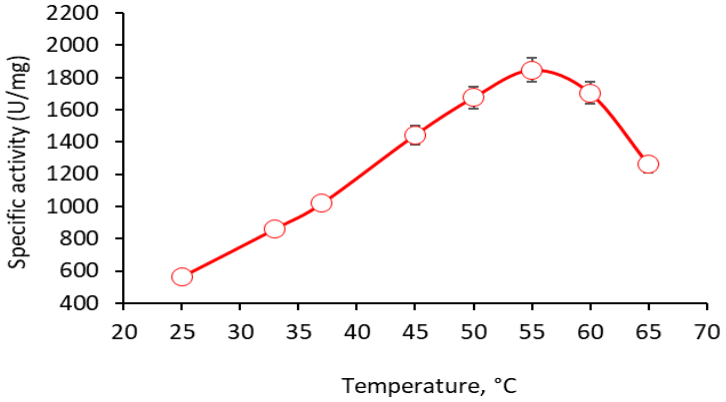
Фигура 15. Свръхекспресия и пречистване на рекомбинантна β-галактозидаза от *L. bulgaricus* 43 в *E. coli* BL21(DE3), демонстрирана чрез SDS-PAGE в 10% разделящ гел, след сребърно оцветяване. Легенда: (1) PerfectTM Tricolor Protein Ladder; (2) екстракт от клетки на нетрансформирани *E. coli* BL21(DE3) като контрола; (3) екстракт от клетки на *E. coli* BL21(DE3), съдържащи конструкт pET-41_β-gal и индуцирани с 1 mM IPTG за 24 часа, (4) пречистеният ензим β-галактозидаза.

4. Биохимични характеристики на рекомбинантната β-галактозидаза

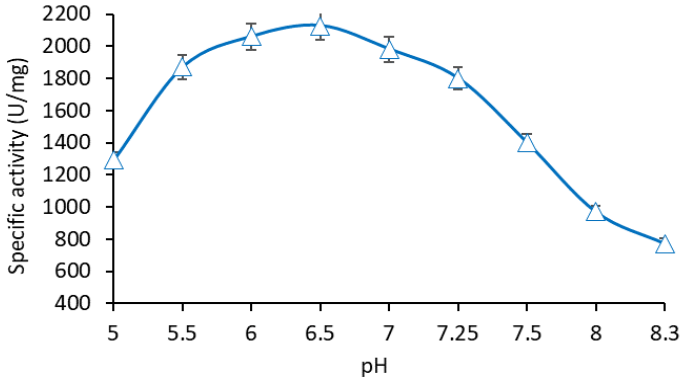
4.1. Влияние на температурата и pH върху ензимната активност

Рекомбинантната β-галактозидаза показа оптимална хидролазна активност при 55°C (Фиг. 16, а). В диапазона от 45 до 65 °C се наблюдава не повече от 25% загуба на активност. При 37 °C оптималната активност беше почти наполовина (51,7%). Ензимът притежава относително висока термостабилност, тъй като около 20% от активността му се запазват след 24 часа при 55°C и около 15% след 60 минути при 60°C.

По отношение на pH, рекомбинантният ензим показва оптимална активност при pH 6,5 (Фиг. 16, б). Бе наблюдавана по-малко от 25% загуба на активност в относително широкия диапазон от pH 5,5 до 7,5. Активността спада рязко при pH 5 и pH 8, достигайки съответно само 61% и 46% от оптималните стойности.



а)



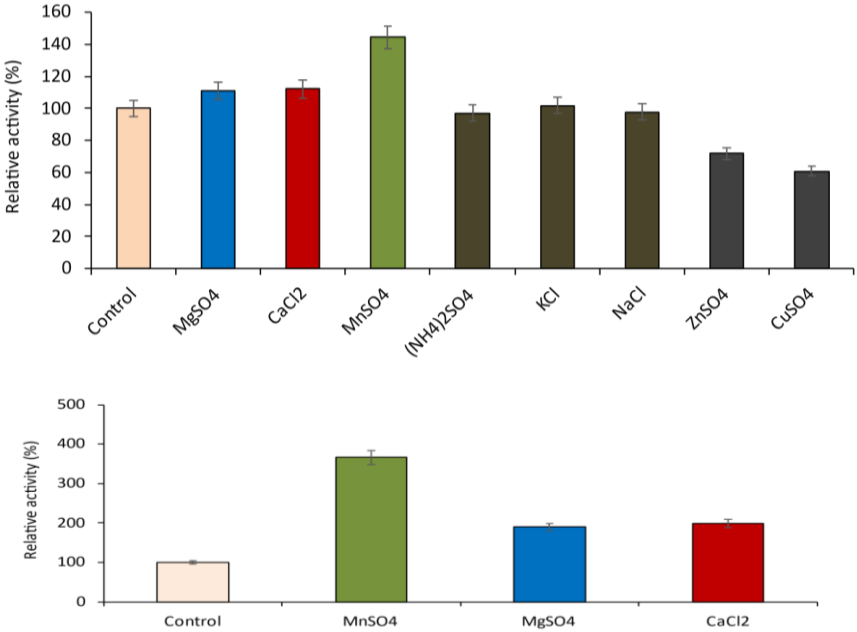
б)

Фигура 16. Влиянието на температурата и pH върху ензимната активност на рекомбинантната β-галактозидаза от *L. bulgaricus* 43.

4.2. Влияние на катионите върху ензимната активност на рекомбинантната β-галактозидаза

Осем различни катиона: амониеви, едно- и двувалентни метални йони, бяха изследвани за евентуалното им влияние върху хидролитичната активност на рекомбинантната β-галактозидаза с ONPG като субстрат (Фиг. 17). Амониевият йон $(NH_4)^+$, K^+ и Na^+ (като 10 mM соли) не влияят на ензима, докато същите концентрации на Cu^{2+} и Zn^{2+} слабо го инхибират. Mn^{2+}, Mg^{2+} и Ca^{2+} бяха избрани за по-нататъшно изследване, тъй като действаха като ензимни активатори. При оптимални условия мангановите йони причиняват най-силно повишаване на ензимната активност, повече от 3,5 пъти (в сравнение с контролата), докато пробите,

съдържащи магнезий и калций показват почти два пъти (съответно 90 и 98%) по-висока активност (Фиг. 17).



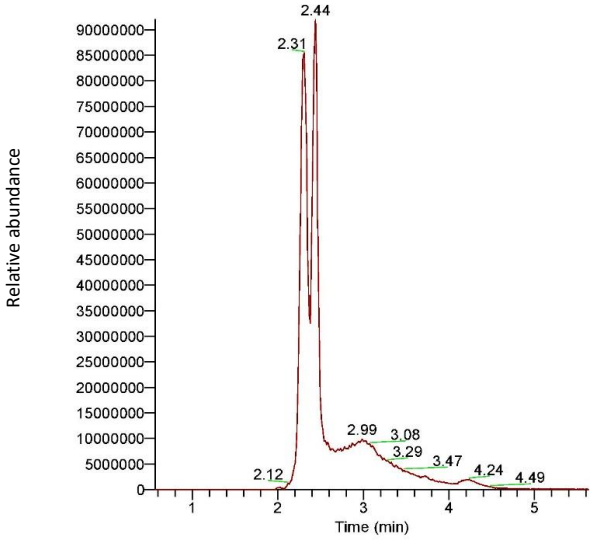
Фигура 17. Влияние на различни катиони върху активността на рекомбинантната β-галактозидаза при 10 mM соли; (а) условия на анализа: 37 °C и pH 7,0; (б) условия на анализа: 55 °C и pH 6,5.

4.3. Структура на получените галактоолигозахариди (ГОЗ)

Мас-спектралното качествено изследване на ГОЗ, произведен от β-галактозидаза на *L. bulgaricus* 43 от 40 г/л лактоза, разкри, че ензимът произвежда предимно ГОЗ с DP3.

Открити са два вида DP3 молекули в приблизително равни количества.

Тези структурни изомери съдържат галактозен остатък, свързан с лактозата чрез β-(1→3) или β-(1→4) връзки. HRAMS анализът (както и резултатите от HPLC за хетероложно експресирания ензим) показаха, че ГОЗ с DP4 се произвеждат в незначителни количества.



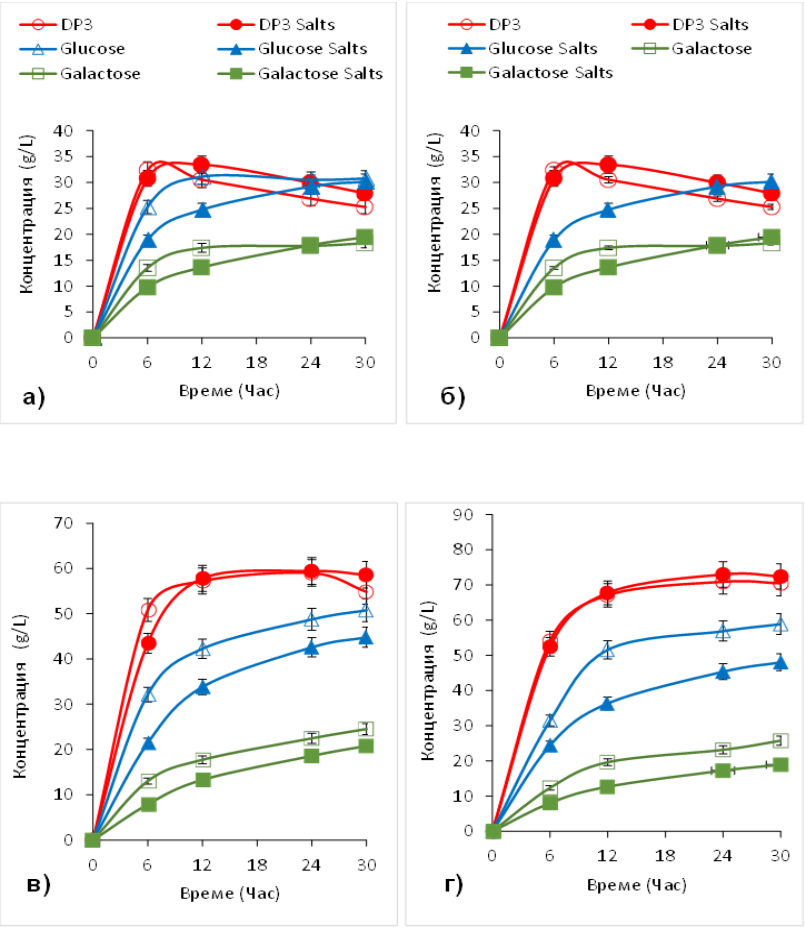
Фигура 18. Екстрахирана йонна хроматограма за галактоолигозахариди с DP3 (тризахариди), получени чрез β-галактозидаза от *L. bulgaricus* 43. Пикът при 2,31 мин. съответства на ГОЗ с β-(1→3) връзка, докато пикът при 2,44 мин. – на ГОЗ с β-(1→4) връзка.

5. *In vitro* продукция на ГОЗ от рекомбинантната β-галактозидаза

За да се установи потенциалът на рекомбинантната β-галактозидаза да произвежда ГОЗ, различни концентрации на лактоза бяха инкубирани с 40 U/мл суров ензим, а продуктите от ензимната реакция бяха подложени на HPLC анализ. Способността на рекомбинантната β-галактозидаза да синтезира ГОЗ *in vitro* бе значителна и пряко зависима от концентрацията на субстрата (Фиг. 19).

Продукцията на ГОЗ достигна пикови стойности от 70,91 г/л ГОЗ с DP3 след 24 часа инкубация с начална концентрация на лактоза от 200 г/л (Фиг. 19, г). Тази стойност не само беше значително по-висока от стойностите в същия момент за 160 и 120 г/л лактоза (съответно 20 и 67%), но и остана стабилна през следващите шест часа. По-ниските концентрации на субстра увеличиха скоростта на ензимната реакция; при 120 и 80 г/л лактоза, пикът на DP3 ГОЗ беше достигнат съответно след 12 или дори само 6 часа.

Ефектите на металните катиони върху трансгалактозидазната активност на рекомбинантната β-галактоза бяха коренно различни от наблюдаваните при тяхната хидролитична активност. Положителният комбиниран ефект на 10 mM Mn^{2+}, Mg^{2+} и Ca^{2+} при получаването на ГОЗ беше най-изразен при 80 г/л лактоза, където се наблюдаваше увеличение на синтеза на DP3 ГОЗ (около 10%). При по-високи концентрации на лактоза (120–200 г/л) обаче този ефект практически изчезва. Концентрации на Mn^{2+}, Mg^{2+} и Ca^{2+} по-високи от 10 mM показаха инхибиращ ефект върху получаването на DP3 ГОЗ както поотделно, така и комбинирани.



Фигура 19. Времеви профили на образуване на продукти от действието на рекомбинантната β-галактозидаза с различни концентрации на лактоза: (a) 80 г/л; (b) 120 г/л; (c) 160 г/л; (d) 200 г/л лактоза. Легенда: кръгове, DP3; триъгълници, глюкоза; квадрати, галактоза. Отворени символи, лактоза + 1 mM $MrSO_4$; затворени символи, лактоза + 10 mM $MrSO_4$, 10 mM $MnSO_4$ и 10 mM $CaCl_2$.

Галактоолигозахаридите (ГОЗ) са сред редките въглехидрати, които напълно отговарят на изискванията за пребиотик [120]. Те не се хидролизират в горния стомашно-чревен тракт на човека [186], причиняват значително намаляване на броя на вредните бактерии, засилват растежа на бифидобактериите в дебелото черво [187,188] и предизвикват изразен благоприятен ефект върху здравето на потребителя [189]. Освен подобряване на чревното състояние [190], консумацията на ГОЗ благоприятства абсорбцията на калций и минерализацията на костите [191,192], облекчава лактозната непоносимост и предотвратява запек [193], облекчава атопичния дерматит [194], регулира липидния метаболизъм, предотвратява затлъстяването [195,196] и намалява риска от колоректален рак [197].

Пребиотичните ГОЗ включват несмилаеми олигомери, съдържащи β-свързани галактозни остатъци, с изключение на дизахаридите лактоза и мелибиоза [121,122]. Те варират както по дължината на веригата, така и по начина, по който са свързани мономерните единици, като обикновено съдържат терминална глюкоза и от 2 до 8 галактозни остатъка. В природата, ГОЗ присъстват в малки количества в кравето, камилското и човешкото мляко и в големи количества – в млякото на кенгуру [198].

Поради голямото търсене на млечни формули за кърмачета и пребиотици, търговското производство на ГОЗ се увеличава с 6% годишно [186], а печалбата на световния пазар се очаква да достигне 10,55 милиарда щатски долара към 2025 г. [154]. ГОЗ се получават търговски чрез химични методи, които не са за предпочитане, защото генерират нежелани допълнителни съединения [148], или чрез ензимен синтез от лактоза посредством β-галактозидази с гъбичен или бактериален произход. Най-често използваните ензими са тези на *Kluyveromyces lactis* и *Aspergillus oryzae*, произвеждащи главно β-(1→6)-свързани ГОЗ, и тези на

Bacillus circulans за β-(1→4)-свързани ГОЗ. Въпреки това, някои пробиотични видове растат по-ефективно върху върху ГОЗ произведени от техните собствени β-галактозидази, в сравнение с търговските ГОЗ [154]. Освен това, ензимите на лактобацилите и бифидобактериите напоследък получават специално внимание по отношение на трансгалактозилиращата активност, тъй като те имат склонността да катализират предимно тази реакция [154,199].

Според базата данни CAZy [200], β-галактозидазите (EC 3.2.1.23) са структурно разнообразни ензими. Въз основа на техните аминокиселинни последователности, хидрофобни клъстери, реакционен механизъм и запазването на каталитичните остатъци, те се класифицират в първо, второ, трийсет и пето (GH35) и четиридесет и второ семейство (GH42) гликозид-хидролази.

Бета-галактозидази от фамилия GH2 са установени при различни представители на *Lactobacillus*. Сред тях се включват традиционно описаните видове *L. acidophilus, L. coryniformis* и *L. johnsonii*, както и новите таксономични групи – *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri* и *Latilactobacillus sakei*. Те са кодирани от гените *lacL* и *lacM* и образуват хетеродимери от типа *LacLM* [200-202]. За разлика от тях, β-галактозидазите на *L. helveticus* и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* се кодират от един ген (хомомерни, от тип *LacZ*) и са много по-малко изследвани [123,203-206]. Освен, че наличните данни за β-галактозидазите на *L. bulgaricus* бяха доста оскъдни до момента, те бяха и заблуждаващи: допреди десетина години се смяташе, че щамовете *L. bulgaricus* обикновено синтезират скъсен, неактивен ензим [204]. Едва с натрупването на данни от секвенирането на цели геноми на *L. bulgaricus* пълната последователността на отговорните гени стана ясна [213].

Нашите резултати показват, че новоизолираният *L. bulgaricus* щам 43 може спонтанно да образува големи

количества ГОЗ с DP3 в кисело мляко. Освен това, тези ГОЗ структури съдържат β-(1→4) връзки между галактозните мономери, което се докладва за първи път при ГОЗ образувани от този вид.

Причините за тази необичайна ензимна активност са генетично детерминирани: генът *lacZ* на *L. bulgaricus* 43 кодира нов ензим, който притежава 21 аминокиселинни замени в сравнение с известните β-галактозидази от *L. bulgaricus*. Тези заместванията са от съществено значение за свойствата на ензима, тъй като са разположени в непосредствена близост до активния център в N-края. 3D моделът на молекулата разкри, че ензимът от щам 43 действа като тетрамер, което досега не е докладвано за вида *L. bulgaricus* и най-вероятно се дължи на множеството аминокиселинни замени в региона 140–220. Според Weber и Schneider [207], протеиновите димери се стабилизират от участъци богати на аминокиселини с малки странични вериги като глицин, аланин или серин, като много от тях съдържат Gx-подобни мотиви. В последователността на β-gal на *L. bulgaricus* 43 се появяват 3 нови такива аминокиселини остатъка – два глицина на позиции 191 и 215 и един серин на позиция 214. Като се има предвид, че в *E. coli* активните центрове на ензима се образуват от взаимодействията на веригите и че мотивите „SV“, „GV“ и „SG“ стабилизират димерните структури [208], тези заместванията най-вероятно са причината за тетрамерната структура на ензима в щам *L. bulgaricus* 43 и неговата висока активност. Структурата на каталитичния център на β-gal е в съответствие с биоинформатичния анализ на Bultema и съавт. [209], които са изследвали структурата на BgaD от *B. circulans*, подобен ензим от същото семейство на гликозид хидролазите (GH2). В сравнение с BgaD, ензимът на *L. bulgaricus* 43 съдържа консервативен остатък Glu532, който е нуклеофилът в ензимната реакция; ролята на киселинно/основен катализатор

в β-gal се играе от Glu465 (Glu447 при *B. circulans*). По подобен начин, два хистидинови остатъка His386 и His535 присъстват в активния център. Забележително е, че подобно на β-gal, BgaD на *B. circulans* образува тризахариди с β-(1→4)-връзки като основен трансгалактозиден продукт [210]. Една разлика обаче е, че BgaD на *B. circulans* е Mg^{2+}-независим ензим, докато β-gal на *L. bulgaricus* 43 се нуждае от Mg^{2+} (поне 0,5 mM) за своята активност, тъй като този двувалентен метален катион действа като кофактор в каталитичния център. Магнезиевият йон може често да бъде заместен с Mn^{2+}, което нашите резултати потвърждават с 366% повишена ензимна активност на β-gal в присъствието на 10 mM $MnSO_4$.

Влиянието на металните йони върху ензимната активност е много различно от това, докладвано за другите известни β-галактозидази от *L. bulgaricus*. Например, Nguyen и съавт. [203] са клонирали и свръхекспресирали гена *lacZ* от *L. bulgaricus* DSM 80021 в *L. plantarum*. Полученият ензим се активира от K^+ и Na^+ (съответно повече от 5 и 10 пъти при 10 mM) и се инхибира от Ca^{2+} и Mg^{2+} (повече от 60% при 10 mM), което е в контраст с β-gal на щам 43. Подобна чувствителност към метали е докладвана и за β-галактозидази от други видове, например ензимът на *L. leichmannii* 313, който също се активира от Na^+ (5 пъти при 10 mM), инхибира се от Ca^{2+} (почти 50%) и Mn^{2+} (близо 70%, и двата при 10 mM), но не се влияе от K^+ (Табл. 13). Като се имат предвид другите параметри, pH оптимумът на ензима на *L. leichmannii* 313 е 5,5 и е с много тесни граници: авторите докладват за повече от 50% загуба на активност в рамките на половин единица pH във всяка посока [217]. Отново, pH оптимумът е значително различен при нашия ензим, който губи същата активност в три пъти по-широк диапазон от pH стойности. Температурният оптимум от 55 °C на ензимът на щам 43 позволява производството на ГОЗ при повишени температури, което увеличава разтворимостта на лактозата и оттам, производителността на процеса.

Таблица 13. Ензимна активност, производство на ГОЗ и влияние на метални йони върху специфичната ензимна активност на избрани микробни β-галактозидази. СЕА = специфична ензимна активност. Субстрати: О = ONPG; L = лактоза.

Вид, щам	Ензим	Лактоза (г/л)	ГОЗ (г/л)	ГОЗ (%)	СЕА (U/мг)	Йони
Lactobacillus bulgaricus						
43	Екстракт	200	70,91 (DP3)	34,0 (DP3)	2011 (O)	↑ Mn^{2+}, Mr^{2+}, Ca^{2+} ↓ Zn^{2+}, Cu^{2+}
CRL450	Безклетъчен екстракт	300	-	41,3	2.06 (O)	-
DSM 20081	Пречистен	205	102	50,0	317 (O) 123 (L)	↑ Na^{+}, K^{+} ↓ Mr^{2+}, Ca^{2+}
WCH9901	Екстракт	-	-	-	6.2 (O)	-
***L. acidophilus* R22**	Пречистен	205	-	38,5	361 (O) 28.8 (L)	↑ Mr^{2+} ↓ Mn^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}
***Lim. fermentum* K4**	Пречистен	200-400	-	37,0	184 (O) 41 (L)	↑Na^{+}, K^{+}, Mr^{2+}
***L. helveticus* DSM 20075**	Пречистен	205	-	-	476 (O) 11,1 (L)	↑ K^{+}, Na^{+} ↓ Mn^{2+}, Mr^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}
***L. leichmannii* 313**	Пречистен	-	-	-	31,28 (O)	↑Na^{+} ↓ Ca^{2+}, Mn^{2+}
***Bifidobacterium breve* DSM 20213**	Пречистен (2 ензима)	200	-	33-44	489,0 (O) 59 (L)	-
Bif. longum, Bif. pseudocatenulatum	Пречистен (2 ензима)	-	-	-	2020 (O) 0,058 (O)	↑Zn^{2+}, Na^{+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} ↓ Al^{3+}
B. circulans	Търговски продукт	400	198	41	-	-
Pyrococcus woesei	Пречистен	-	-	-	5400 (O)	-
Aspergillus oryzae	Търговски продукт	400	107	26.8	-	-

Тъй като ензимната активност на β-галактозидазата в *L. bulgaricus* е като цяло ниска [30], хетероложната експресия на съответния ген в различни микробни гостоприемници е предпочитан метод за изучаване на ензима, както и за неговото приложение в синтеза на пребиотични ГОЗ [203]. Въпреки това, най-високите активности на рекомбинантни ензими, докладвани досега, са малко над 300 U/мг (Табл. 13), повече от шест пъти по-слаби от β-галактозидазата на *L. bulgaricus* 43.

Рекомбинантни ензими получени от други *Lactobacillus* spp., като *L. helveticus* и *Limosilactobacillus fermentum*, имат специфична активност почти 500 U/мг. Много от тези проучвания съобщават за значителни разлики, свързани със субстрата, като активността с ONPG е от 3 до 40 пъти по-висока от тази, получена с лактоза. Това несъответствие трябва да се вземе предвид, когато се разглеждат евентуални промишлени приложения на ензима. Същото може да се каже и за твърденията, че рекомбинантните ензими с хистидинова опашка обикновено показват 20-30% по-ниска активност [203]. Що се отнася до добивите на ГОЗ, щамовете на *L. bulgaricus* имат предимство пред другите лактобацили, въпреки че дори при тях половината от общото съдържание на захар остава неусвоено. Настоящото изследване е показателен пример за успешното превръщане на лактоза до голямо количество ГОЗ. Уникалната чувствителност на β-галактозидазата на щам 43 към метални катиони открива възможности за оптимизация, които трябва да бъдат проучени в бъдеще.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработването на функционални храни представлява едно от най-актуалните и динамично развиващи се направления в съвременната наука и практика, което обединява познания от области като микробиология,

нутригеномика, биотехнология и хранителна химия. Под функционални храни се разбират онези продукти, които освен традиционната си хранителна стойност, оказват доказано благоприятно въздействие върху физиологичните функции на организма и допринасят за превенцията на различни заболявания. В този контекст изследването на традиционните български ферментирали млечни продукти има особено значение, тъй като те са уникален източник на естествено формирана и богата микробиота, натрупвана и съхранявана през вековете. Тази микробиота не само придава характерния вкус и аромат на продуктите, но и е носител на биологична активност, която продължава да бъде обект на научно изследване.

Сред всички български млечни продукти, киселото мляко заема централно място – както в националната културна идентичност, така и в научния интерес. Въпреки че неговата микробиологична основа е описана още преди повече от 120 години, то продължава да разкрива нови аспекти на своето значение за човешкото здраве. Симбиозата между двата основни вида в закваските – *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* – остава българска традиция, но съпътстващите микроорганизми в домашните и регионални варианти на киселото мляко очертават една неизчерпаема палитра от биоразнообразие, чиито потенциал тепърва предстои да бъде системно изследван. Настоящата дисертация допринася именно в тази насока, като предоставя нови данни за състава, ензимния профил и метаболитните способности на щамове, произхождащи от автентични български продукти.

В този труд бе постигнато разкриването на нови аспекти от генетичното и функционално разнообразие на *Lactobacillus bulgaricus* – микроорганизъм, който отдавна е преминал националните граници и е превърнал българската научна и кулинарна традиция в световно призната.

В заключение, научните новости на дисертационния труд могат да бъдат систематизирани така: (1) за първи път са описани специфични щамови различия в ензимния профил на *L. bulgaricus*, които обуславят различен потенциал за синтез на функционални олигозахариди; (2) предоставени са данни за съпътстващата микрофлора на домашно произведени кисели млека от различни региони на България, което подчертава богатството и уникалността на националното микробно наследство; (3) демонстрирани са нови перспективи за използване на изолираните микроорганизми в разработването на храни с добавена стойност, насочени към укрепване на чревното здраве.

Получените резултати имат за цел да обогатят фундаменталните знания в областта на микробиологията на МКБ, но и да разширят практическите приложения на тези щамове в хранителната индустрия и здравеопазването. Анализът може да бъде основа за бъдещи научни изследвания, както и за разработването на нови продукти с висока добавена стойност, които да съхраняват и надграждат националната традиция, като същевременно отговарят на глобалните тенденции за здравословно и устойчиво хранене.

V. ИЗВОДИ

1. Метагеномният анализ потвърди, че *L. bulgaricus* и *S. thermophilus* са доминиращи в домашните кисели млека, но в различни региони на България съотношението им варира значително.

2. В домашните кисели млека като съпътстващи видове млечнокисели бактерии бяха установени *L. rhamnosus, L. paracasei, L. helveticus, L. fermentum*.

3. Открити бяха редки видове МКБ, включително *L. equicursoris*, съобщен за първи път в кисело мляко.

4. Генът *lacZ* от *L. bulgaricus* щам 43 кодира нов ензим β-галактозидаза с 21 уникални аминокиселинни замествания, осигуряващи по-високата му активност спрямо други подобни ензими при вида.

5. Аминокиселините Глицин 191, Глицин 215 и Серин 214 обуславят тетрамерната структура на β-галактозидазата на *L. bulgaricus* щам 43.

6. Успешната хетероложна експресия на ензима в *E. coli* BL21 (DE3) доведе до получаването на рекомбинантен ензим с огромна активност (над 3000 U/мл).

7. Рекомбинантният ензим проявява специфична чувствителност към Mg^{2+}, Mn^{2+} и Ca^{2+} и достига активност над 2000 U/мг, значително по-висока от всички известни до момента.

8. Поради мощна трансгалактозидазна активност, ензимът синтезира до 70,9 г/л ГОЗ (главно DP3), което показва голям потенциал за индустриално приложение.

9. β-Галактозидазата на *L. bulgaricus* щам 43 формира нетипични, β-(1→4) връзки между мономерите в ГОЗ, което способства за повишено пребиотично действие на спонтанно синтезираните ГОЗ в българското кисело мляко.

VI. ПРИНОСИ

1. За първи път е представен метагеномен профил на домашни български кисели млека от различни географски региони, който разкрива както доминиращи, така и редки и нови видове МКБ.

2. Документирано е присъствието на *L. equicursoris* в кисело мляко – новост за научната литература.

3. Идентифициран е щам *L. bulgaricus* 43 с необичайно висока трансгалактозидазна активност.

4. Секвениран и охарактеризиран е генът *lacZ* на щама, показващ 21 уникални аминокиселинни заместявания, свързани с тетрамерна структура и висока ензимна активност.

5. Успешната хетероложна експресия на рекомбинантната β-галактозидаза е довела до значителен индустриален потенциал на ензима за производство на ГОЗ с пребиотични свойства.

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Ivanov, I.;** Petrov, K.; Lozanov, V.; Hristov, I.; Wu, Z.; Liu, Z.; Petrova, P. Bioactive Compounds Produced by the Accompanying Microflora in Bulgarian Yoghurt. Processes 2021, vol. 9, 114. https://doi.org/10.3390/pr9010114
(Q2, цитирана 19 пъти в SCOPUS)

2. Petrova, P.; **Ivanov, I.;** Tsigoriyna, L.; Valcheva, N.; Vasileva, E.; Parvanova-Mancheva, T.; Arsov, A.; Petrov, K. Traditional Bulgarian Dairy Products: Ethnic Foods with Health Benefits. Microorganisms 2021, vol. 9, 480. https://doi.org/10.3390/microorganisms9030480
(Q2, цитирана 42 пъти в SCOPUS)

3. Arsov, A.; **Ivanov, I.;** Tsigoriyna, L.; Petrov, K.; Petrova, P. In Vitro Production of Galactooligosaccharides by a Novel β-Galactosidase of Lactobacillus bulgaricus. Int. J. Mol. Sci. 2022, vol. 23, 14308. https://doi.org/10.3390/ijms232214308
(Q1, цитирана 12 пъти в SCOPUS)

ДРУГИ ПУБЛИКАЦИИ:

4. Petrova, P.; Arsov, A.; **Ivanov, I.;** Tsigoriyna, L.; Petrov, K. New Exopolysaccharides Produced by Bacillus licheniformis 24 Display Substrate-Dependent Content and Antioxidant Activity. Microorganisms 2021, 9, 2127. https://doi.org/10.3390/microorganisms9102127
(Q2, цитирана 24 пъти в SCOPUS)

ПРЕДСТАВЯНИЯ НА КОНГРЕСИ И ДР. НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Ivanov, I., Petrova P. „Prebiotics producing Lactobacillus bulgaricus strains isolated from Rhodope yogurts“ 69-та Научна конференция с международно участие „Хранителна наука, техника и технологии - 2022”, 29.09.2022 - 30.09.2022, Пловдив, България (Постерен доклад)

2. Ivanov, I., Arsov., A., Petrova P., Petrov K. „New Beta-galactosidases from Lactic Acid Bacteria“, XVth Congress of the Bulgarian Microbiologists with International Participation, 05.10.2022 - 08.10.2022, Копривщица, България (Доклад)

3. Ivanov, I., Arsov, A., Tsigoriyna, L., Petrov K., Petrova P. „Novel β-Galactosidase of Lactobacillus bulgaricus: a molecular study of its dual enzyme activity“, Годишна среща на ННП "Здравословни храни за силна биоикономика и качество на живот", 12.06.2023 - 13.06.2023, Пловдив, България (Постерен доклад).

4. Petrova P., Arsov A., Ivanov I., Tsigoriyna L., Valcheva N., Petrov K. Cloning and heterologous expression of exo-cellulase gene cbhA in Bacillus licheniformis for direct production of 2,3-butanediol from biomass. ORAL Presentation 3BO.14.2, Section "Biochemical Production of Alcohols and Chemicals", 29-th European Biomass Conference & Exhibition (EUBCE), 26 - 29 April, 2021, (Доклад).

5. Petrov K., Valcheva N., Tsigoriyna L., Arsov A., Ivanov I., Petrova P. Bacillus velezensis, Bacillus toyonensis, and Bacillus safensis are able to produce 2,3-butanediol from lignocellulosic sugars. Poster presentation 3AV.6.14, Section "Biochemical Production of Alcohols and Chemicals", 29th European Biomass Conference & Exhibition (EUBCE), 26 - 29 April 2021, (Постерен доклад).

6. Arsov A., Petrova P., Ivanov I., Tsigoriyna L., Petrov K. Heterologous expression of cellulosome genes of Hungateiclostridium thermocellum in Bacillus strains. Poster presentation PP-13, 13-th International Conference on Protein Stabilization (PROTSTAB), 07 - 09 October, 2021, (Постерен доклад).