

Софийски университет “Св. Климент Охридски”  
Биологически факултет



Катедра “ Обща и промишлена микробиология”

---



**Явор Костадинов Рабаджиев**

**Изучаване на род *Lactobacillus* и род *Fructobacillus*  
в микробиотата на медоносни пчели**

**АВТОРЕФЕРАТ**

Професионално направление 4.3. Биологични науки  
(Микробиология)

**Научни ръководители: проф. Искра Иванова, дбн  
проф. д-р Илия Илиев**

София  
2018

Дисертационният труд съдържа 118 страници на формат А4, 21 таблици и 36 фигури. В библиографската справка са включени 121 литературни източника. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра „Обща и промишлена микробиология” на СУ „Св. Климент Охридски“ и Катедра “Биохимия и Микробиология” на ПУ “Паисий Хилендарски”.

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедрата по Обща и промишлена микробиология към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на 20.12.2017г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед..... на Ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

#### **Научно жури:**

1. Проф. дбн. Искра Иванова
2. Доц. д-р Траяна Спасова Недева
3. Проф. дбн. Мария Ангелова
4. Проф. дбн. Невена Стоянова Богацевска
5. Доц. д-р Венцислав Карамфилов

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа в сградата на Биологически факултет към СУ „Св. Климент Охридски.

Материалите по защитата се намират на сайта на Биологически факултет и в катедрата по Обща и промишлена микробиология.

**София**  
**2018 година**

Софийски университет “Св. Климент Охридски”  
Биологически факултет



Катедра “ Обща и промишлена микробиология”

---



**Явор Костадинов Рабаджиев**

**Изучаване на род *Lactobacillus* и род  
*Fructobacillus* в микробиотата на медоносни  
пчели**

**АВТОРЕФЕРАТ**

Професионално направление 4.3 Биологични науки  
(Микробиология)

Научни ръководители: проф. Искра Иванова, дбн  
проф. д-р Илия Илиев

София  
2018

## Списък на използвани съкращения

ГОЗ – глюкоолигозахариди

ГТФ – Глюкозилтрансферази

ЕПЗ – екзополизахариди

МКБ – Млечнокисели бактерии

НСД – нуклеотид свързващи домени

ОЗ - Олигозахариди

ПЕГ – полиетиленгликол

ПСП – Периплазменият свързващ протеин

ТМД – транс мембранен домейн

ФМКБ – фруктофилни млечнокисели бактерии

ФОЗ – фруктоолигозахариди

ФТФ – Фруктозилтрансферази

BLAST – базово локално сравняване на секвенции

Cfu – колоно образуваща единица

MF – Major Facilitator - Основни фасилиатори

MRS – хранителна среда – de Man, Rogosa, Sharpe

PTS – фосфотрансферазна система

SDS – PAGE – Натриев додецил сулфат – полиакриламидна гел електрофореза

## УВОД

Млечнокиселите бактерии са една от най-важните групи микроорганизми, познати на човечеството. Те се откриват в разнообразни екологични ниши и са част от състава на микрофлората по растенията, силажите и консервираните храни на растителна основа, млякото и млечните продукти, месото и месните продукти, гастро-интестиналния тракт на човека и животните и имат важно значение за нормалното функциониране на стомашно-чревната микрофлора (Dardir, 2012; Klaenhammer et al., 2005; Oprea and Zervos, 2007).

Млечнокиселите бактерии представляват голяма хетерогенна група микроорганизми, характеризирани от функционалното си свойство да продуцират млечна киселина чрез ферментация на органични субстрати. Млечнокиселите бактерии са използвани от векове насам за получаване на разнообразни ферментационни продукти. Първите проучвания върху млечнокиселата ферментация са проведени от Луи Пастър между 1857 и 1863, а 10 години по-късно J. Lister получава първата чиста култура от млечнокисели бактерии която нарича *Bacterium lactis* (König, et al., 2009). Днес, век и половина по-късно, разполагаме с множество научни факти и доказателства, разкриващи огромното значение и важност на млечнокиселите бактерии за хранителните ферментации, биоконсервирането на храни, химичната индустрия и медицината. Млечнокиселите бактерии са една от най-важните групи микроорганизми с приложение в хранителната индустрия, където се използват като стартерни култури за получаване на много ферментационни продукти. Заедно с бифидобактериите, МКБ поддържат баланса между отделните микробни видове в гастроинтестиналния тракт, чрез продуцираните от тях късоверижни киселини (млечна, оцетна и др.), бактериоцини и други метаболити (Moore and Moore, L., 1995; Salminen et al., 1993; Savage, 1992; Servin 2004.)

През последните години, богатите на фруктоза ниши се явиха като нов потенциален източник на млечнокисели бактерии (МКБ). Такива местообитания са цветя, плодове и др., свързани с естествени опрашители като медоносната пчела *Apis mellifera*, нейните пасища, стомашно чревният ѝ тракт и нейните продукти (пчелен прашец, пчелен хляб, пчелно млечице), които се класифицират като здравословна храна.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### ЦЕЛ

Целта на настоящата дисертация е да бъде проучено видовото разнообразие на фруктофилните млечнокисели бактерии изолирани от чревния тракт на медоносната пчела и да установи спецификата на техния метаболизъм.

### ЗАДАЧИ

За осъществяването на целта бяха поставени следните задачи:

1. Изолиране на фруктофилни млечнокисели бактерии от чревния тракт на медоносната пчела.
2. Биохимична характеристика на изолираните щамове по API 50 и API ZYM.
3. Проследяване растежа на изолираните щамове върху среди с глюкоза и фруктоза в различни концентрации (от 1 до 30%), като единствен въглероден източник.
4. Физиологична характеристика на щамовете, култивирани в присъствието на различни концентрации на фруктоза по отношение на:
  - крайни метаболити;
  - профил на ензимите фруктокиназа, лактат дехидригеназа, ацетат киназа и алкохол дехидрогеназа
5. Генетична идентификация на изолираните фруктофилни млечнокисели бактерии
6. Анализ нивата на генна експресия на ензимите фруктокиназа, лактат дехидригеназа, ацетат киназа и алкохол дехидрогеназа при усвояване на различни количества фруктоза;
7. Анализ нивата на генна експресия на ABC транспортери при култивиране на изолираните щамове *Lactobacillus kunkeei*;
8. Изследване профила на гликозилтрансферазните ензими и техните свойства при изолираните щамове *Lactobacillus kunkeei*.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## 1. Микроорганизми

Изследванията в настоящата работа са проведени с микроорганизми, изолирани от стомашно-чревния тракт на българска медоносна пчела *Apis mellifera* от различни региони на България. Изолатите са получени и селектирани на среди FYR и GYP с различен процент фруктоза и глюкоза. Събирането на пчели бе извършено от 3 региона на България: Гоце Делчев, Ботевград и Пловдив (с. Труд и гр. Баня). Изолатите бяха подбрани спрямо способността за развитие в среди с високо концентрация на фруктоза.

За осъществяване на поставената цел и конкретните задачи са използвани разнообразни методи:

## 2. Хранителни среди

2.2. Течни среди за получаване на изолати

2.3. Хранителни среди за продуциране на гликозилтрансфери.

2.3.1. Среда на Dols

2.3.2. Модифициран MRS

## 3. Условия за изолиране на фруктофилните бактерии

## 4. Условия на култивиране за лактобацилите

## 5. Характеристика на щамовете

5.1 Растежна характеристика

5.2. Определяне на антимикробна активност.

## 6. Аналитични методи

6.1 Определяне количеството на D-глюкоза и D-фруктоза

6.2. Определяне количеството на D/L-млечна киселина

6.3. Определяне на количество оцетна киселина

6.4. Определяне на количество етанол

6.5. Дезинтегриране на клетки от *Lactobacillus kunkeei*

6.6. Количествено определяне на белтък

6.7. Фракциониране и концентриране на екстрацелуларни гликозилтрансферазни ензими

6.8. Определяне на гликозилтрансферазна ензимна активност

6.9. Определяне на  $\beta$ -галактозидазната активност

6.10. SDS-полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE)

6.11. Ензимен синтез и анализ на екзополисахариди

6.11.1. Ензимен синтез и утаяване на синтезираните полизахариди

6.11.2. Хидролиза на синтезираните екзополисахариди с декстраназа и амилоглюкозидаза

6.12. Ензимен анализ на фруктокиназа (ЕС 2.7.1.4)

6.13. Ензимен анализ на D/L-лактат дехидрогеназа (ЕС 1.1.1.28; 1.1.1.27)

6.14. Ензимен анализ на алкохол дехидрогеназа (ЕС 1.1.1.1)

6.15. Ензимен анализ на ацетаткиназа (ЕС 2.7.2.1)

## **7. Молекулярно-генетична характеристика на щамове изолирани от интестиналния тракт на пчели.**

7.1. Изолиране на геномна ДНК

7.2. Групиране и идентифициране на изолати – фруктофилни млечнокисели бактерии

7.3. Електрофоретичен анализ на нуклеинови киселини

7.4. Идентификация на използваните щамове по 16 S рРНК

## **8. Анализ на генната експресия на ензими**



## РЕЗУЛТАТИ

Настоящата разработка е свързана с изолиране на фруктофилни млечнокисели бактерии от стомашно чревния тракт на българската медоносна пчела *Apis mellifera* от 3 в региона на България: гр. Гоце Делчев, Ботевград и Пловдивска област (гр Баня и с. Труд).

### **1. Изолиране на фруктофилни млечнокисели бактерии**

Изолирането на фруктофилни бактерии от интестиналния тракт на пчели беше извършено чрез предварителна дисекция, която започва с умъртвяването им чрез декапитиране. Процедурата се извършва в стерилен бокс върху предварително облъчена поставка. С помощта на карфици пчелите се фиксират върху поставката, като се прекарват през главогръда на пчелата. С малка ножица и игла със заострен край се извършва дисекцията като се прорязва тялото по дължина. Наблюдава се медоносен стомах, средно черво и задно черво. Медоносният стомах и червата се поставят в епруветка с физиологичен разтвор, сместа се хомогенизира. Полученият материал се прехвърля в среда FYR в присъствие на 1% фруктоза. Пробите се термостатират при 35°C. За да се изолират фруктофилните видове, изолатите се инокулират в течна mMRS среда с 1% фруктоза и се инкубират в термостат с разклащане при 30°C за 24 часа. От всяка колба се взема посевен материал и се инокулират течни хранителни среди, съответно с 10% фруктоза (FYR10) и 10% глюкоза (GYR10), които се култивират с разклащане при 150 об./мин. за 48 часа, 30°C. От развитите култури се посяват с щрихов посев твърди агарови среди с 10% фруктоза, глюкоза или захароза и се инокулират течни хранителни среди с 30% фруктоза (FYR30) (точка 2.2), които се култивират при вече споменатите условия. От твърдите агарови среди се изолират единични колонии и се посяват на твърда агарова среда с 30% фруктоза. От развитите култури на среди с 30% фруктоза се взема материал за щрихов посев за единични колонии на твърда агарова среда с 30% фруктоза. Всички изолирани единични колонии от агаровите среди с различен въглехидратен източник са посетени върху агарова mMRS среда с 5% захароза или среда на Dols за селекция на мукозни колонии, продуциращи екзополисахариди.

От развитите култури се препосяват на твърди агарови среди FYR с 1% в резултат на проведените експерименти се изолират единични колонии. От получените колонии бяха подбрани 14 изолата, които бяха обозначени както

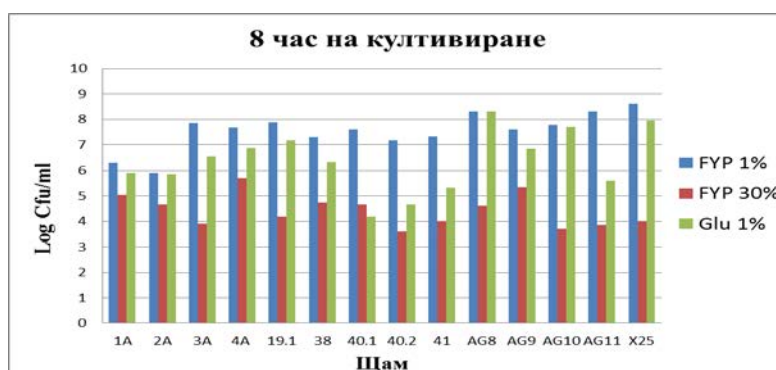
следва: 1A, 2A, 3A, 4A, 19.1, 38, 40.1, 40.2, 41, AG8, AG9, AG10, AG11, X25, X3.

## 2. Характеристика на изолатите

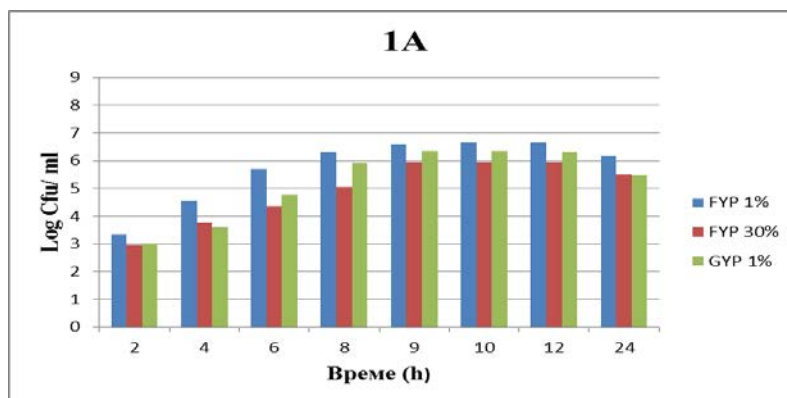
Първоначалният скрининг на щамовете показва, че изолатите са Грам-положителни пръчки, каталазо-отрицателни. Щамовете са култивирани в анаеробни условия в среда MRS, което ни дава основание да предположим, че те са млечнокисели бактерии.

За да установим оптималните концентрации необходими за развитието на фруктофилните млечнокисели бактерии бяха използвани концентрации фруктоза – 1%, 10% и 30% фруктоза среда FYP, за контрола бе използвана глюкоза 1% GYP. От получените резултати показани на Фиг.1 прави впечатление, че максималната численост изразена в колоно-образуващи единици е в интервала от 8 до 10 час от началото на култивирането независимо от началните концентрации глюкоза и фруктоза. Повечето от щамовете култивирани на 1% глюкоза се развиват по-слабо в сравнение с тези култивирани на 1% фруктоза.

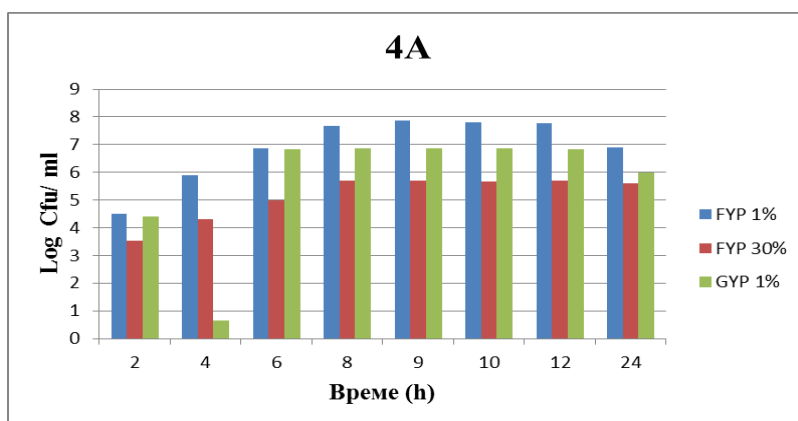
От друга страна всички щамове култивирани на 30% фруктоза се развиват относително добре, но максималната плътност от живи клетки, която достигат различните щамове варира от 50% (например при щам 40.2) до 11% (при щам 4A) от отчетената при използване на 1% фруктоза. На лице е инхибиране на клетъчния растеж при култивиране на среда с 30% фруктоза. Освен това максималните стойности на колоно-образуващи единици са отчетени по-късно между 10-я и 11-я час. От получените резултати може да се констатира, че изолираните от нас микроорганизми са фруктофилни.



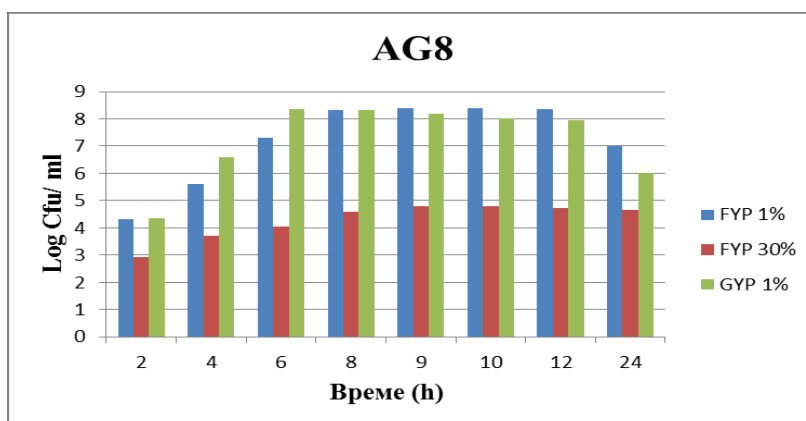
**Фиг. 1.** Сравняване броя на клетките на 8ми час от култивирането на щамовете на среди FYP с 1% и 30% фруктоза и среда GYP с 1% глюкоза.



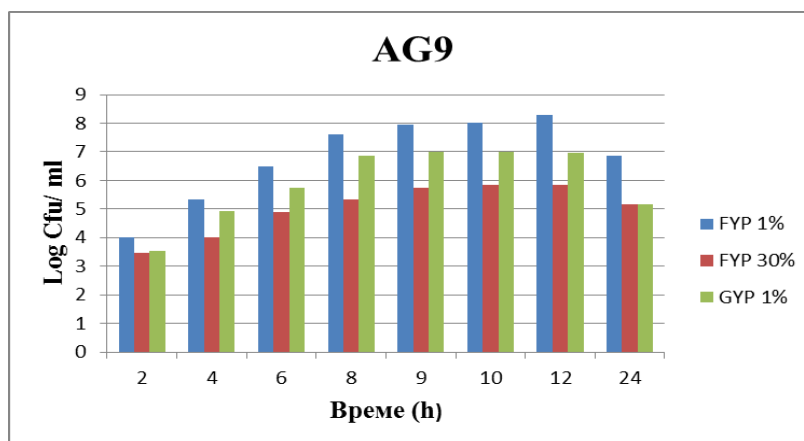
**Фиг. 2.** Динамика на растежа на щам 1А култивиран на среди FYP с 1% и 30% фруктоза и среда GYP с 1% глюкоза в продължение на 24 часа.



**Фиг. 3.** Динамика на растежа на щам 4А култивиран на среди FYP с 1% и 30% фруктоза и среда GYP с 1% глюкоза в продължение на 24 часа.



**Фиг. 4.** Динамика на растежа на щам AG8 култивиран на среди FYP с 1% и 30% фруктоза и среда GYP с 1% глюкоза в продължение на 24 часа.



**Фиг. 5.** Динамика на растежа на щам AG9 култивиран на среди FYP с 1% и 30% фруктоза и среда GYP с 1% глюкоза в продължение на 24 часа.

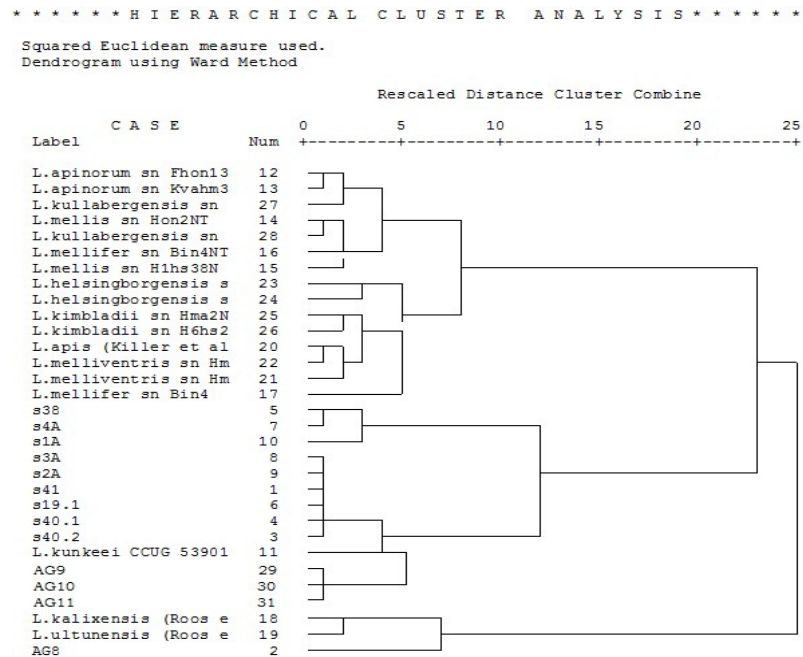
На фигури 2, 3, 4 и 5 е показана динамиката на клетъчния растеж при четири подбрани щамове, култивирани на среди с 1% глюкоза, 1% фруктоза и 30% фруктоза. Профилът на растежа на четирите изследвани щамове е сходен и при трите процента захари. Потвърди се, че максимален брой колоно-образуващи единици се поддържа между 6-ия и 12-ия час на култивирането. Интересен факт е, че при култивиране на среди с 1% глюкоза и 1% фруктоза броят на жизнеспособните клетки чувствително намалява след 12-ия час и до 24-ия час на култивирането. Вероятната причина е настъпил лизис на клетките поради изчерпване на въглехидратния източник. При култивиране на среда с 30% фруктоза се наблюдава обща тенденция на достигане на максималното количество колоно-образуващи единици на 6-ия час от началото на култивирането, като до края на процеса (24-ия час) броят им не намалява. Резултатите доказват осмотолерантността на изследваните щамове в присъствие на този висок процент фруктоза, като е на лице щамова специфичност. Щам AG8 достига максимум на клетъчен растеж до 50% от отчетения при 1% фруктоза и 1% глюкоза, докато при останалите три изследвани щамове той е над 85% от този при 1% фруктоза и 1% глюкоза.

В резултат на специално разработената схема за изолиране на фруктофилни микроорганизми от чревния тракт на пчели, успешно се детектира броят им и се отдиференцират сравнително лесно от останалата микрофлора, присъстваща в чревния тракт на пчелите. При сравнение на броя млечнокисели бактерии, изолирани на среда с 1% фруктоза и 30% фруктоза се установи, че в чревния тракт над 50% от тях са осмотолерантни и може да се предположи, че се отнасят към фруктофилните бактерии.

### 3. Въглехидратен профил API 50CHL

Въглехидратният профил на изследваните щамове беше определен посредством готови китове API 50 CHL, съгласно инструкциите от производителя. Пробите бяха култивирани за 7 дни при 35 градуса и отчетени.

Даниите от API 50 CHL са обработени и получените резултати от въглехидратния профил са показани на Фиг. 6.



**Фиг. 6.** Сродство на изолатите с други видове млечнокисели бактерии, на база въглехидратния профил от API 50CHL.

От проведения анализ, изследваните щамове могат да бъдат групирани по следния начин: група 1, включваща щамове 3A, 2A, 41, 19.1, 40.1, 40.2 AG9, AG10, AG11; група 2 са щамове 38 и 4A, и щам AG8, който се отделя в самостоятелна група, поради отдалеченост от останалите изолати. Щамовете от първа група: 3A, 2A, 41, 19.1, 40.1, 40.2 AG9, AG10, AG11 са близки до *Lactobacillus kunkeei*. От друга страна анализите показаха, че изследваните щамове имат нисък процент на идентификация, съгласно API 50 CHL (Таблица 1)

**Таблица 1.** Процент на иденетификация на изолатите проведен с API 50CHL.

Номер на щам	Предполагам вид	Процент на идентификация
41	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	67.7%
40.2	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	67.7%
40.1	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	67.7%
38	<i>Lactobacillus fermentum</i>	56.4%
19.1	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	67.7%
1A	<i>Leuconostoc lactis</i>	74.3
2A	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	67.7%
3A	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	67.7%
4A	<i>Lactobacillus fermentum</i>	56.4%
AG8	<i>Lactobacillus pentosus</i>	98.7%
AG9	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	67.7%
AG10	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	67.7%
AG11	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	67.7%
X25	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	67.7%

#### 4. Ензимен профил на изследваните щамове

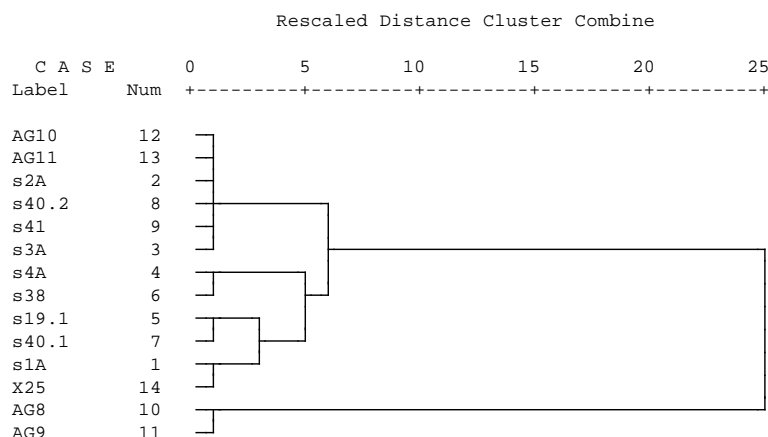
За установяване на ензимния профил на изследваните щамове бе използван готов кит API ZYM и конструирана дендограма.

Ензимният потенциал на млечнокиселите бактерии е важен фактор за характеризирането им. Ензимният профил на фруктофилните, предполагаеми млечнокисели бактерии беше определен в присъствие на 1% фруктоза. При анализ на резултатите се установи, че щамовете показват добра липолитична активност, а също и високи нива на фосфатазна активност. Амидазната им активност е относително постоянна за всички изследвани щамове. Голям интерес представляват ензимите от въгехидратния метаболизъм, които отсъстват при всички щамове с изключение на AG8 и AG9. Само тези щамове показват наличие на бета галактозидаза, алфа галактозидаза, алфа и бета глюкозидаза, бета глюкоронидаза, N- ацетил бета глюкозаминидаза.

Получените резултати са използвани за конструиране на дендограма (фиг. 7). Може да се отбележи, че както при въглехидратния профил така и при ензимния профил се наблюдава групиране на следните щамове AG10, AG11, 2A, 40.2, 41 и 3A, щамовете 3A и 4A формират втората обособена група. Щамове 19.1 и 40.1 са в трета група. Четвъртата група се формира от 1A и X25. Тези четири групи са свързани помежду си и може да се направи заключение, че са близки филогенетично. Докато щамове AG8 и AG9, образуващи пета група, се дистанцират от останалите 4 групи.

\*\*\*\*\* H I E R A R C H I C A L C L U S T E R A N A L Y S I S \*\*\*\*\*

Squared Euclidean measure used.  
Dendrogram using Ward Method



**Фиг.7.** Сродство на изолатите, на база ензимния профил от API ZYM.

След култивиране на изследваните щамове в продължение на 24 часа върху среда FYP с 1% фруктоза, 10% фруктоза и 30% фруктоза получените крайни метаболити лактат, ацетат и етанол показват, че с нарастване концентрацията на фруктоза се променя съотношението ацетат/ лактат в полза на ацетата. В метаболизма на тези бактерии количеството на фруктозата повлиява количеството на метаболитните продукти, което е особено характерно за щамове АГ8 и АГ9. При тези два щам се образува незначително количество етанол. Изключение прави щам 3А, при който съотношението ацетат/лактат е еквимоларно при фруктоза 10% и 30%. Изменението на крайните продукти потвърждава, че фруктофилните млечнокисели бактерии са хетероферментативни. Резултатите са показани на таблици 2, 3, 4, 5, 6 и 7.

**Таблица 2.** Стойности на метаболитите при култивиране на изолатите на среда FYP 1%.

Щам	Ацетат (г/л)	Лактат (г/л)	Съотношение	Етанол (г/л)
19.1	1,5	1,84	45% / 55%	0
AG11	2,6	1,3	67% / 33%	0
A1	1,03	1,6	39% / 61%	0
AG10	1,4	2,5	36% / 64%	0
3A	0,76	2,8	21% / 79%	0
AG8	1,62	0,54	75% / 25%	0
AG9	2,5	0,37	87% / 13%	0
40.2	1,5	0,26	85% / 15%	0
41	1,7	0,78	69% / 31%	0
4A	1,5	1,8	45% / 55%	0

**Таблица 3.** Активност на ключови ензими от въглехидратния метаболизъм след 24 часа от култивирането на изолатите на среда FYP 1%.

Щам	Ацетаткиназа (U/mg protein)	Лактат дехидрогеназа (U/mg protein)	Фруктокиназа (U/mg protein)	Алкохолдехидрогеназа (U/mg protein)
19.1	0,65	0,81	1,12	0
AG11	0,62	0,23	0,94	0
A1	0,42	0,46	0,47	0
AG10	0,49	0,95	0,63	0
3A	0,16	1,18	0,86	0
AG8	0,78	0,24	0,64	0
AG9	1,01	0,17	0,69	0
40.2	0,59	0,11	0,43	0
41	0,62	0,17	0,47	0
4A	0,73	0,81	0,54	0

**Таблица 4.** Стойности на метаболитите при култивиране на изолатите на среда FYP 10%.

Щам	Ацетат (г/л)	Лактат (г/л)	Съотношение	Етанол (г/л)
19.1	2,3	1,4	62% / 38%	0
AG11	3,1	0,90	78% / 22%	0
A1	1,8	0,95	65% / 35%	0
AG10	2,1	0,73	74% / 26%	0
3A	1,2	1,22	50% / 50%	0
AG8	2,1	0,09	96% / 4%	0
AG9	3,2	0,12	96% / 4%	0
40.2	2,6	0,4	87% / 13%	0
41	1,9	0,7	73% / 27%	0
4A	2,95	0,57	84% / 16%	0

**Таблица 5.** Активност на ключови ензими от въглехидратния метаболизъм след 24 часа от култивирането на изолатите на среда FYP 10%.

Щам	Ацетаткиназа (U/mg protein)	Лактат дехидрогеназа (U/mg protein)	Фруктокиназа (U/mg protein)	Алкохолдехидрогеназа (U/mg protein)
19.1	0,86	0,41	0,92	0
AG11	1,12	0,33	1,44	0
A1	0,76	0,69	1,22	0
AG10	1,04	0,42	0,93	0
3A	0,82	0,78	1,18	0
AG8	1,53	0,11	1,06	0
AG9	1,61	0,13	1,09	0
40.2	1,52	0,15	1,41	0
41	1,23	0,23	1,49	0
4A	1,65	0,12	1,57	0



**Таблица 6.** Стойности на метаболитите при култивиране на изолатите на среда FYP 30%.

Щам	Ацетат (г/л)	Лактат (г/л)	Съотношение	Етанол (г/л)
19.1	3,7	0,34	92% / 8%	0
AG11	3,69	0,43	90% / 10%	0
A1	2,32	0,62	79% / 21%	0
AG10	3,45	1,25	73% / 27%	0,010
3A	1,67	1,68	50% / 50%	0
AG8	3,22	0,023	99% / 1%	0,011
AG9	3,35	0,048	99% / 1%	0,049
40.2	3,5	0	100% / 0%	0
41	2,87	0	100% / 0%	0
4A	2,95	0,57	84% / 16%	0

**Таблица 7.** Активност на ключови ензими от въглехидратния метаболизъм след 24 часа от култивирането на изолатите на среда FYP 30%.

Щам	Ацетаткиназа (U/mg protein)	Лактат дехидрогеназа (U/mg protein)	Фруктокиназа (U/mg protein)	Алкохолдехидрогеназа (U/mg protein)
19.1	2, 14	0,42	1,96	0
AG11	2,18	0,41	2,16	0
A1	1,47	0,35	2,28	0
AG10	1,94	0,68	2,31	0
3A	0,96	0,88	1,67	0
AG8	1,81	0,06	1,96	0,11
AG9	1,95	0,05	1,98	0,25
40.2	2,06	0	2,17	0
41	1,88	0	2,29	0
4A	1,97	0,27	2,17	0

Данните за активността на ключови ензими от въглехидратния метаболизъм показват, че фруктокиназата се идуцира в присъствие на по-високо количество фруктоза, като нейната активност е два пъти по-висока при 30% фруктоза в сравнение с 10% фруктоза.

Алкохол дехидрогеназата не е активна при нито една от използваните концентрации на фруктоза, следователно на лице е особеност в крайните етапи от метаболизма на фруктозата при изследваните фруктофилни бактерии.

Активността на ацетат киназата и лактат дехидрогеназата е различна при различните проценти на фруктоза. Наблюдава се и разлика и в съотношението между двата ензима, като то е 1:1 при 1% фруктоза и чувствително се измества до 10:1 и дори до 15:1 при някои щамове в полза на ацетаткиназата. Данните недвусмислено говорят за настъпило трайно инхибиране на лактат дехидрогеназата при култивиране на среда с 30%

фруктоза, което обяснява и промяната в метаболитните продукти в края на ферментацията.

Фосфорилирането на монозахаридите е изключително важно за метаболизма на въглехидратите в прокариотната клетка. Фосфотрансферазната система включва два класа протеини, захароспецифични (EII) и общи (EI и HPr) ензими, които снабдяват клетката с фруктозо-1 фосфат (Feldheim, M. A. et al., 1990; Mitchell, W.J. et al., 1993; Nothhaft, H. et al., 2003). Фруктокиназите (Frk или ScrK; АТФ:β-D-fructose-6-phosphotransferase) катализират трансфера на γ-фосфата от АТФ до вътреклетъчната молекула на фруктозата, водещо до фруктозо-6 фосфат (Aulkemeyer, P. et al., 1991; Sabater, B. et al., 1972; Sabater, B. et al., 1975; Zembrzusi B. et al., 1992).

Повечето от бактериите, имащи гени за кодиране на на фруктокинази се намират на хромозомата (frk) (Fennington, G.J. et al., 1996; Weisser, P. et al., 1995; Weisser, P. et al., 1996; Zembruski, B. et al., 1992) или са част от захарозния генен клъстер (scrK, sacK или cscK) (Aulkemeyer, P. et al., 1991; Bockmann, J., et al., 1992; Bogs, J. and K. Geider, 2000; Luesink, E. J. et al., 1999; Reid, S. J. et al., 1999; Thompson, J. et al., 1991).

Следователно, микроорганизми, които използват фруктозата като единствен въглероден източник трябва да я включат в определен метаболитен път, което засега не е много добре изяснено. Предполага се, че фруктозо-6-фосфат фосфокетолазния път може да бъде използван (de Vries, W., 1967; Veerkamp, J. H. 1969). Субстратът за този катаболитен път фруктозо-6 фосфат свързва различни метаболитни пътища като N-ацетил хексозна ферментация, катаболизъм на галактоза (път на Leloir) и синтеза на пептидогликан.

Ензимите алкохол дехидрогеназа и ацеталдехид дехидрогеназа имат ключова роля в регенерацията на НАД<sup>+</sup> в метаболитните пътища на хетероферментативните млечнокисели бактерии. Предполага се, че недостатъчната регенерация на НАД<sup>+</sup> е ключът към фруктофилната характеристика на някои млечнокисели бактерии. Биоинформатични анализи на някои бактерии показват, че нито фруктозо специфичните фосфоенолпирурат фосфотрансферази нито захарозния генен клъстер могат да изпратят фосфорилираната фруктоза в клетката.

Получените от нас резултати, показващи увеличаване количеството на ацетат като краен метаболит, при култивиране на изследваните шамове в среда с 30% фруктоза от една страна и активността на ензимите фруктокиназа и ацетат киназа от друга, ни дават основание да предположим, че метаболитните реакции от фосфокетозлазния метаболитен път са

изместени в посока получаване на фруктозо-6- фосват и неговото трансформиране в ацетил фосфат с последващо редуциране до ацетат при липса на възможност за получаване на лактат.

Лактобацилите са изключително важни членове на микробиотата на човека и животните, както и на растителната филосфера. Еволюцията и екологията на лактобацилите се формира чрез адаптация в определени ниши и редукция на геномния размер. Много видове, например като *L. plantarum* имат генетично разнообразие, което им е позволило да заемат отдалечени екологични ниши (Siezen RJ and van Hylckama Vlieg JE, 2011). Други видове от млечнокиселите бактерии са високоспециализирани и редуцират екстензивно своя геном. Примери за това са свързаните с насекоми *L. fructivorans* (Wong CN et al., 2011), *L. iners*; видове специализирани в урогениталния тракт при жени (Mendes-Soares H et al., 2014); *L. reuteri* е интестинален симбионт при гръбначните животни (Oh PL et al., 2010). *L. delbrueckii* е претърпял много късна редукция на генома си при адаптацията си в млечнокиселите ферментации (van de Guchte M et al., 2006). От друга страна фруктофилните бактерии, *Fructobacillus* spp. притежават значително по-малко протеин кодиращи секвенции (CDSs) в техните малки геноми и липсват няколко метаболитни системи, включително респираторни вериги, фосфотрансферазни системи и ABC транспортери (Endo A. et al., 2015). В гените на *Fructobacillus* spp се съобщава, че липсата на бифункционалния ген алкохол/ацеталдехид дехидрогеназа (*adhE*) отсъства, което е от съществено значение за млечнокиселата ферментация. Загубата на гена *adhE* води до получаване на ацетат вместо етанол и води до дисбаланс на NAD<sup>+</sup>/NADH в пътя на хетероферментативния фосфокетолазен път (Endo, A., and Okada S. 2008).

Подобни геномни характеристики, като нисък брой на CDSs в малък геном, са съобщени наскоро за *L. kunkeei*, който има значително по-малък геном, сравнен с другите лактобацили (Tamarit, D. et al. 2015). Размерите на генома на 16 щама *L.kunkeei* варират от 1.41 до 1.58 Mbp (средно +/- SD, 1.54 +/- 0.05Mbp) и са значително по малки от тези на другите *Lactobacillus* spp. Размерът на генома и броя на CDSs в *L.kunkeei* са подобни на тези на *Fructobacillus* spp (средно ± SD, 1.49 ± 0.30 Mbp and 1387 ± 132) (Endo A. et al., 2015), които обединяват подобни биохимични характеристики и местообитания с *Lactobacillus kunkeei* (Endo A. et al., 2009).

Ацетат киназата се използва за получаване на ацетат от ацетилфосфата вместо етанол и не се използва активно в хетероферментативните МКБ за глюкозния метаболизъм, но се използва когато има допълнителен акцептор

на електрони (Zaunmuller, T., et al., 2006). Изследването на ензимната активност показват, че *L. kunkeei* притежава ALDH активност, но не и ADH активност. Това съответства и на генната характеристика на adhE гена и биохимичните характеристики в *L. kunkeei* (Endo A. et al., 2009; Endo A. et al., 2012).

*Lactobacillus kunkeei* първоначално е изолиран от вино (Edwards, C. G. et al., 1998), но по-късно и от някои богати на фруктоза източници, включително цветя и плодове (Endo A. et al., 2009) и се счита за един от основните видове, присъстващи в червата на пчелите (Endo, A. and Salminen, S. 2013; Vojvodic, S. et al., 2013). Биохимичните характеристики на бактериите от вида *L. kunkeei* разкриват, че вида е добре приспособен към богати на фруктоза субстрати, развиват се добре на фруктоза и слабо на глюкоза и по този начин се класифицират като единствени, облигатни, фруктофилни млечнокисели бактерии в род *Lactobacillus* (Endo A. et al., 2012). *L. kunkeei* живее в тясна връзка с пчелите (Rangberg, A. et al. 2015) и някои от щамовете продуцират бактериоцино-подобни субстанции, които са активни срещу *Melissococcus plutonius*, причиняващ фатална болест по ларвите на пчелите (Endo, A. And Salminen, S. 2013). Ето защо *L. kunkeei* се счита за обещаващ пробиотик за медоносните пчели (Endo, A. And Salminen, S. 2013).

## **5. Анти-микробна активност**

Способността на млечнокиселите бактерии да синтезират инхибиращи субстанции, наравно с продуцирането на млечна киселина и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, е един от факторите, потискащ развитието на патогенните микроорганизми от естествената микрофлора. Антагонистичните свойства на част от щамовете бяха изпитани спрямо пет тест култури: *E. coli* ATCC 11777, *E. aerogenes* ATCC 13048, *St. aureus* ATCC 12600, *S. chol. enteritidis* ATCC 13076 и *L. innocua* F(ONIRIS, France).

За да се диференцира различният антимикуробен ефект на млечната киселина от този на евентуално синтезирани други антимикуробни субстанции (напр. бактериоцини) бе изпитано действието на супернатанти, получени след култивиране на изолатите в течна среда FYP 1% фруктоза и след коригиране на рН до 6.0.

От получените резултати може да се заключи, че изследваните изолати нямат антимикуробна активност към тест щамовете.

## 6. Молекулна идентификация на щамове

За идентифицирането и охарактеризирането на изолираните щамове приложихме няколко молекулни техники, резултатите, от които са дискутирани по-долу.

### 6.1. PCR – амплификация със специфични праймери за род *Lactobacillus*

Родовата принадлежност на щамовете беше потвърдена чрез PCR амплификация с родовоспецифични двойки праймери проектиране от (Dubernet et al., 2002), който включва 21 мерен праймер LbLMA-1(СТСААААСТАААСАААААГТТС) (специфична за лактобацили последователност), свързан с 21 мерен универсална последователност R16-1 (СТТГТАСАСАССГСССГТСА) от фланкиращия краен участък на 16S рРНК гена (фиг. 8).



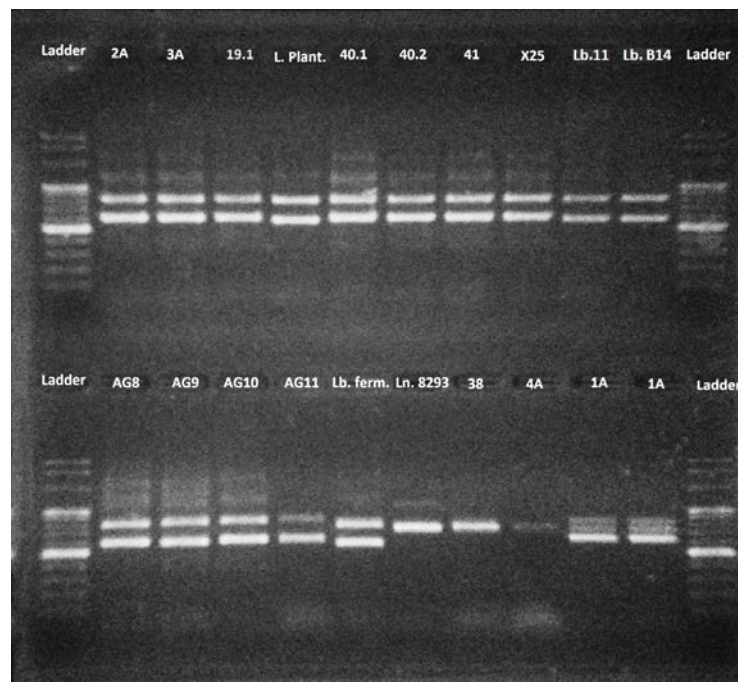
**Фиг.8.** Гел електрофореза на PCR продукти амплифицирани с родово специфични праймери за лактобацили (*LbLMA1*).

От показаните резултати, амплификация е протекла при контролния щам *Lactobacillus plantarum* и при два от изолатите – AG8 и AG9. Останалите тествани щамове не са амплифицирани, което може да се дължи на неспецифичност на праймерите към тези щамове изолирани от гастроинтестиналния тракт на пчели.

### 6.2. PCR – амплификация на 16S-23S ITS rDNA.

Молекулярните различия на изолираните фруктофилни млечнокисели бактерии на ниво род беше извършено чрез полимеразна верижна реакция (PCR) на 16S-23S ITS rDNA (фиг. 9). В повечето прокариоти, рибозомалните гени формират оперон с последователност 5`-16S-23S-5S-3`, а гените се разделят от две интергенни спейсърни региона (ISRs). Известно е, че ISRs,

особено тези, разположени между 16S и 23S rDNAs, са под по-слаб еволюционен натиск и следователно осигуряват по голяма генетична вариация от регионите кодиращи рРНК (Hain et al., 1997; Jagoueix et al., 1997). ISRs се амплифицират с универсални праймери 16S/p2 (СТТGTACACACCGCCCGTC) и 23S/p10 (ССТТТСССТСАСGGTACTG), които се свързват към позициите 1388 до 1406 на 16S rRNA гена и позициите 456 до 474 на 23S rRNA гена (E. coli numbering; GenBank accession number V00331) съответно.



**Фиг. 9.** Гел електрофореза на 16S - 23S ITS PSR продукти.

Два ISR фрагмента (приблизително 450-650 bp) се амплифицират при 10 от щамове: 2A, 3A, 19.1, 40.1, 40.2, 41, x25, AG8, AG9, AG10, които корелират с тест щамове от род *Lactobacillus*: *L. Plantarum*, *L. fermentum*, *Lactobacillus 11*, *Lactobacillus B14*. Един единичен амплифициран фрагмент (приблизително 600bp) беше получен при два щамове: 38, AG11, които корелират с тест щам *Leuconostoc 8293*. Профил с три фрагмента показва единствено щам 1A.

Сравнявайки нашите резултати с литературните данни, може да се предположи, че 11-те изолата с два фрагмента принадлежат към род *Lactobacillus*. Двата щамове с по 1 амплифициран фрагмент – към род *Leuconostoc*. И изолата с три амплифицирани фрагмента – вероятно към род *Weissella*. Щамът 4A не се амплифицира.

### 6.3. Секвениране на гените за 16S рРНК

Определените до род щамове бяха подложени на видова идентификация чрез 16S рРНК секвенционен анализ. Получените амплификационни продукти с големина ~1500 bp бяха пречистени и подложени на секвенционен анализ (Macrogen, Netherlands). Последваляят сравнителен анализ на получените секвенции с наличните данни в National Center for Biotechnology Information (NCBI) Blast Library позволи видовото определяне на щамовете. Резултатите са обобщени и представени в *Табл. 8* и *фиг. 10*.

**Таблица 8.** Резултати от 16S рРНК-секвенционен анализ на щамове от род *Lactobacillus*.

(Lane 1991)

Праймер	Последователност	Характеристика	П родукт
27F	(5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3)	Родово-специфичен PCR за р. <i>Lactobacillus</i> ; T° на хибридизация - 55 °C	~ 1530 bp
1492R	(5-GGTTACCTGTACGACTT-3)		

Номер на щам	Идентифициран вид	Процент на идентификация
AG9	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	90%
4A	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	92%
AG8	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	90%
2A	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	90%

В следващия експеримент проведохме експресия на гени от въглехидратния метаболизъм на система за генетичен анализ на американската фирма Beckman Coulter. Системата дава възможност за секвениране на генома, анализ на различни фрагменти в него и анализ на нивата на генна експресия. По тази причина бе направено повторно секвениране на някои от изолираните щамове. Резултатите от повторното секвениране, изпълнено по протокол на производителя, потвърдиха получените вече резултати, а именно: за целта бе изолирана тотална ДНК, чиято нативност и чистота бе предварително проверена. Изолираната ДНК бе използвана като матрица за PCR амплификация на гена за 16S рРНК с двойка универсални праймери (виж глава „Материали и методи“).

Резултатите потвърждават първоначалната идентификация на щамовете, което е видно от получените резултати в *таблица 9*.

**Таблица 9.** Резултати от 16S рРНК-секвенционен анализ на щамове от род *Lactobacillus*.

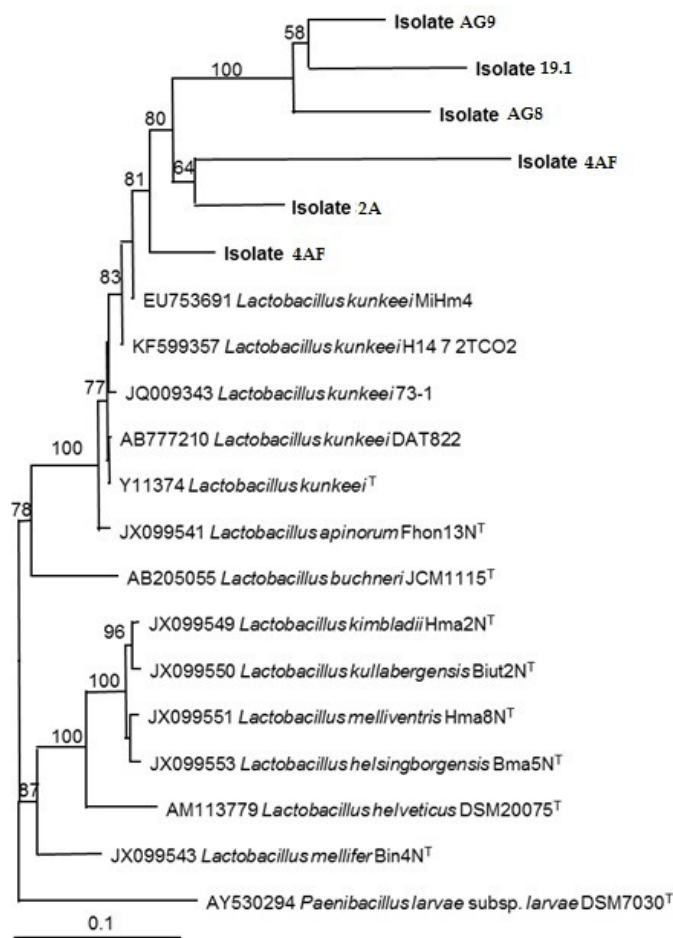
Прајмер	Последователност	Характеристика	П родукт
LactoF	5'-GGAAACAGRTGCTAATACCG-3'	Родово-специфичен PCR за р. <i>Lactobacillus</i> ; T° на хибридизација - 62 °C	~ 232 bp
LactoR	5'-GTCCATTGTGGAAGATTCCC-3'		

(Dowd et al. 2008; Sen et al. 2009; Ishak et al. 2011)

Прајмер	Последователност	Характеристика	П родукт
28F	(5-GAGTTTGATCNTGGCTCAG-3)	T° на хибридизација - 55 °C	~ 1530 bp
519R	(5-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3)	Амплификација на V1, V2 и V3 региони на 16S рРНК ген.	

Номер на щам	Предполагам вид	Процент на идентификација
19.1	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	97%
2A	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	94%
40.2	<i>lactobacillus pentosus</i>	98%
AG8	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	94%
AG9	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	96%
3A	<i>Lactobacillus iwatensis</i>	86%
4A	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	90%
40.1	<i>Lactobacillus iwatensis</i>	80%
1A	<i>Weissella confuse</i>	92%





**Фиг. 10.** Филогенетични връзки на генни клонингови секвенции (по 16 S RNA) на млечнокисели бактерии, изолирани от гастроинтестиналния тракт на пчели, култивирани на среда с фруктоза. Дървото е базирано на дистанционен анализ (алгоритъм за близкородствено свързване по модела на Juke-Cantor).

## 7. Анализ на генната експресия на ензими

Бяха подбрани 2 щама – AG8 и AG9, култивирани на среда FYP с 1% и 30% фруктоза и на среда GYP 1% глюкоза при температура 35°C за 12 часа. При двата щама AG8 и AG9 бяха изследвани нивата на генна експресия на ензимите, участващи в усвояването и транспорта на фруктоза (Таблица 11 и 12). За анализа на нивата на генна експресия на ензимите бе изолирана тотална РНК от “overnight” култура по протокол на производителя (Beckman Coulter).

РНК се екстрахира с GeneMATRIX универсален РНК пречистващ кит от “overnight” култура, съгласно инструкциите на производителя (EURx Poland). Мултиплексните праймери използвани в това изследване бяха проектирани с помощта на GeXP express Profiler софтуеър (Beckman Counter). Търсените ензими, за които са използвани праймерите, са описани на таблица 10.

**Таблица 10.** Ензими участващи в транспорта и усвояването на захари

ЕНЗИМ	РОЛЯ
Глюкозо-6-фосфат 1-дехидрогеназа	Ензим от пентозофосфатния път, осигуряващ енергия на клетките.
Лактат дехидрогеназа	Превръща пирувата в лактат.
Захарна пермеаза от ABC транспортера	Спомага навлизането на захари в клетката.
Захарен ABC транспортер, АТФ-свързващ протеин	Спомага навлизането на захари в клетката, свързана с хидролиза на АТФ
Ефлукс ABC транспортер, АТФ-свързващ и пермеазен протеин	Участва в транспорта на захарите през мембраната.
msmK2 мултизахарен ABC транспортер, АТФ-свързващ протеин	Участва в захващането на захарите извън клетката и експорта на вещества.
plnG бактериоцин ABC транспортер	Участва в износа на бактериоцини от клетката
msmK1 мултизахарен ABC транспортер, АТФ-свързващ протеин	Участва в захващането на захарите извън клетката
ABC транспортер АТФ-свързващ протеин	Осигурява енергията за преминаване на субстратите през клетъчната стена.

За нормализиране нивата на експресия се използваха *gluB* и KanR гени, house keeping гени – *gluB* – ген за глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа и вътрешна контрола KanR кодираща Kanamycin от GeXP starter kit.

RT-Minus контрола и външната контрола (NTC) не показаха експресия на ензимите, което е доказателство, че всеки пик показва точната експресия на ензимите, обект на настоящата работа.

**Таблица 11.** Нивата на експресия на гените отговорни за: *Gl6Ph dehydrogenase*, *Lactate dehydrogenase*, *Fructokinase*, *Alcohol dehydrogenase*, *Efflux ABC transporter*, *Sugar ABC permease*, *ABC transporter ATP binding protein* на два от изследваните щамове AG8 на среди – FYP 30%, FYP 1%, GYP 1%. Гените са показани “+” – слаба експресия (по-малко от 100 единици); “++” – средна експресия (между 100 и 300 единици); “+++” – висока експресия (повече от 300 единици).

ЩАМ	НИВА НА ЕКСПРЕСИЯ						
	Глюкозо-6-фосфат 1-дехидрогеназа	Лактат дехидрогеназа	Фруктокиназа	Алкохолдехидрогеназа	Ефлукс ABC транспортер	Захарна пермеаза от ABC транспортера	ABC транспортер ATP-свързващ протеин
1. AG8 1% G	+++	+++	+	+	++	++	-
2. AG8 1% F	+++	++	+	+	-	++	++
3. AG8 30%F	+++	+++	-	+	-	+++	-

**Таблица 12.** Нивата на експресия на гените отговорни за: *Gl6Ph dehydrogenase*, *Lactate dehydrogenase*, *Fructokinase*, *Alcohol dehydrogenase*, *Efflux ABC transporter*, *Sugar ABC permease*, *ABC transporter ATP binding protein* на два от изследваните щамове AG9 на среди – FYP 30%, FYP 1%, GYP 1%. Гените са показани “+” – слаба експресия (по-малко от 100 единици); “++” – средна експресия (между 100 и 300 единици); “+++” – висока експресия (повече от 300 единици).

ЩАМ	НИВА НА ЕКСПРЕСИЯ						
	Глюкозо-6-фосфат 1-дехидрогеназа	Лактат дехидрогеназа	Фруктокиназа	Алкохолдехидрогеназа	Ефлукс ABC транспортер	Захарна пермеаза от ABC транспортера	ABC транспортер ATP-свързващ протеин
4. AG9 1% G	+++	++	++	+	+++	+++	-
5. AG9 1% F	+++	+++	++	+	++	++	++
6. AG9 30%F	+++	++	+	+	++	-	++

От получените резултати в таблици 11 и 12 се вижда, че шамът AG9, показват добре изразена експресия на гена за ензима фруктокиназа, докато при AG8 експресията на този ген е значително по-слаба. Фруктокиназна активност се забелязва и при култивиране на FYP среда с 1% глюкоза и при двата щама, поради това не може да кажем, че експресията на ензимите, участващи в усвояването на фруктозата, се индуцират при растеж на фруктоза.

Алкохолдехидрогеназата и при двата щама е ниска, което напълно съответства с литературата като характеристика на фруктофилните млечнокисели бактерии. В настоящия анализ използвахме Gl6Ph дехидрогеназа като референтен ген, за да сравним експресията на изследваните от нас ензими. И при двата щама има висока експресия. Експресията на лактат дехидрогеназа и при двата щама е висока.

Анализът на експресията на гените кодиращи ензимите, част от ABC транспортерите, показват различни нива на експресия или липса на такава при различните щамове. При щамове AG9 и AG8 култивирани на среда GYP с 1% глюкоза не се наблюдава експресия на гена за ABC транспортерите АТФ свързващ протеин. Липсва експресия на гена за бактериоцин ABC транспортера и на двата щама. Това дава потвърждение на резултатите получени при анализа на антибактериалната активност на щама срещу тест култури.

В резултат на извършените анализи, както и от литературните източници, получените резултати се вписват в изследванията от последните години. Така например публикации за *Lactobacillus paracasei* насочват вниманието към факта, че една транспортна система ABC може да участва в усвояването на фруктоолигозахариди (Kaplan et al., 2003), която подкрепя хипотезата, че фруктоолигозахаридите се транспортират от ABC транспортери в *L. acidophilus* (Barrangou et al., 2003).

*Lactobacillus acidophilus* е пробиотичен организъм, който показва способността да използва пребиотични съединения, като например фруктоолигозахариди (FOS), които стимулират растежа на полезните обитатели в стомашно-чревния тракт. Въпреки това, малко се знае за механизмите и гените, участващи в усвояването на фруктоолигозахаридите, използвани от видовете *Lactobacillus*. Анализ на генома на *L. acidophilus* NCFM разкри *msm* локуса, който се състои от транскрипционен регулатор на семейството *LacI*, четири компонентна АТФ-свързващ касета (ABC) транспортна система, а фруктозидаза и захарна фосфорилаза. Транскрипционният анализ на този оперон показва, че генната експресия се

индуцира от захароза и фруктоолигозахариди, но не и от глюкоза или фруктоза, което предполага, някои специфичности за неферментиращи се захари. Допълнително, експресията се постиска от глюкоза, но не и от фруктоза, което предполага, катаболитна репресия чрез две *CRE*-подобни последователности, идентифицирани в областта на промотора-оператор. Инсерционното инактивиране на гените, кодиращи ABC транспортер субстрат-свързващия протеин и фруктозидазата намаляват способността на мутантите да растат на фруктоолигозахариди. Сравнителният анализ на генната структура в рамките на тази група разкри висока степен на сходство с оперони в *Streptococcus mutans* и *Streptococcus pneumoniae*. Въпреки това, асоциацията между фруктозидазата и ABC транспортер е необичайна и може да бъде специфична за *L. acidophilus*. Това е описание на предварително неописан генен локус, участващ в транспорта и катаболизма на фруктоолигозахаридни съединения, които могат да насърчат конкуренцията на полезните микроорганизми в стомашно-чревния тракт (Barrangou et al., 2003).

Наскоро бе показано, че  $\beta$ -глюканите от различни източници, за които се знае, че са потенциални пребиотици, стимулират растежа на бифидобактерии. За да се изучи метаболитния път на  $\beta$ -глюканите при широко използвания, като пробиотик *B. longum* subsp. *infantis*, бе направен сравнителен протеомен анализ, последван от двуизмерна гел електрофореза (2D-DIGE), PCR в реално време RT-PCR, и анализ на ензимната активност на щамове растящи на  $\beta$ -глюкани, получени от ечемик, водорасли и гъби. Резултатите показаха, че 77 продукта се експресират при различните култури, 17 от тях се предполага, че играят важна роля в катаболизма на  $\beta$ -глюканите, включително ABC транспортери за захари, енолаза и протеин от фосфотрансферазната система. Сред тях са открити 6 гена кодиращи 6 протеина, които се експресират в присъствие на  $\beta$ -глюкани. Анализът на ензимната активност показва, активност на вътреклетъчна глюканаза, при щамове растящи на  $\beta$ -глюкани от водорасли и гъби. На основа на гореизложеното, моделът на катаболизма на  $\beta$ -глюканите от *B. infantis* се предполага да е следният:  $\beta$ -глюкановите молекули в средата се пренасят в клетката от ABC транспортерите (АТФ захващащата касета) и PTS транспортната система (Фосфотрансферазната система), последвана от хидролиза от вътреклетъчна глюканаза до глюкоза, която влиза директно в централния ферментативен път – бифидо шънт. Този анализ за пръв път показва възможния път на разграждане на  $\beta$ -глюканите от *B. infantis*, който има значение за потенциалното използване на  $\beta$ -глюканите,

като нови пребиотици, при разработването на симбиотични продукти (Hell et al., 2015).

Експресията на *atp* оперона в *Lactobacillus acidophilus*, кодиращ *F1F0 ATPase*, се индуцира в ниския диапазон на рН (Kullen and Klaenhammer 1999). Наскоро бе показано, че  $H^+$ -АТФазната дейност свързана с мембраната в щамове *Bifidobacterium* се увеличава в отговор на жлъчни соли (Sanchez и др. 2005). Повишените нива на транскрипция на *F1F0 ATPase* генен клъстер в *Lactobacillus plantarum* в присъствието на жлъчни соли категорично показва, разсейване на силата на протонния мотив в присъствието на жлъчката. Очевидно, тази сила е решаващ фактор по време на жлъчният стрес, тъй като двете системи имат потенциала да допринасят за този процес ще бъдат експресирани и ще генерират сила за протонния мотив за сметка на АТФ (*F1F0 АТФазната* система) или глутамат (декарбоксилаза система глутамат) (P.A. Bron et al., 2005).

Специфични АВС транспортерни подсемейства са отговорни за износа на антимикробни пептиди (напр лантибиотици, бактериоцини и компетентни пептиди) (Navarstein и др., 1995 г.), също така тези транспортери са в състояние да експортират протеинови субстрати. Например, АВС експортерите са отговорни за секрецията на бактериоцини при *L. acidophilus* (Dobson и др., 2007) и *L. plantarum* (Dier и др., 1996). При използването на бактериоциновия предиктор BAGEL (de Jong et al., 2006), са идентифицирани 3-12 предполагаеми бактериоцини в генома на *Lactobacillus*. Повечето гени, кодиращи предполагаеми бактериоцини, са генетично свързани с гени, кодиращи АВС експортери, което подкрепя идеята, че пептидният износ чрез АВС експортерите често се среща при млечнокиселите бактерии.

Публикации свързани с утилизацията на ксилоолигозахаридите показваха, че се кодират от шест гена намиращи се в един единствен локус: *xylRABM-xynTV* при представители на вид *Lactobacillus lactis*. Предполага се, че отворената рамка на четене се намира по веригата на *xynB* и кодира ксилозиден транспортер, *XynT*. Охарактеризирането на олигоксилозидния транспорт показва, че важна роля играе АТФ-свързваща касета (АВС) транспортна система. Въпреки, че *XynT* не е хомоложен на тези АВС протеини, няколко доказателства подкрепят тази негова предполагаема функция. *XynT* е хомоложен на известни ди- и тризахаридни транспортери, както и  $\alpha$ -ксилозидния преносител (кодиран от гена *xylP*), наскоро описани от Chaillou et al. (1999). Тази констатация подкрепя хипотезата, че *XynT* участва в транспорта на ксилоза. Открита е нова функция, свързана с ксилановия метаболизъм и кодиращите гени, разположени непосредствено след *xylB* от

*xyIM* (Erlandson et al., 2001). *XynEFG* представлява ABC транспортер за ксилоолигозахариди. Гените *xynEFG* кодират ABC транспортна система, която принадлежи на *ER-1 (CUT1)* семейството за въглехидратен транспорт. Тази група съдържа предимно транспортери за ди- и олигозахариди, (<http://www.tcdb.org>; Dassa et al., 2001; Schneider, E. 2001) и се състои от два интегрални мембранни протеина, домейни / на АТРазната субединица, и извънклетъчния свързващ протеин. Специфичността на транспортера и при грам-положителните бактерии присъства или като липопротеин, върху външната повърхност на цитоплазмената мембрана, или като свързан протеин на клетъчната повърхност, чрез електростатични взаимодействия (van der Heide et al., 2002). Константите на свързване на *XynE* за различни ксилоолигозахариди съответстват на равновесната дисоциационна константи, KD (Davidson, A. L., and J. Chen. 2004, Saurin et al., 1994). При грам-отрицателните бактерии, гена за АТР-свързващия протеин обикновено е част от транспортния оперон за ABC транспортерите, докато при грам-положителните бактерии гена често се намира на друго място в хромозомата (Quentin et al., 1999; Schlosser, A. 2000; Shulami et al., 1999). Много вероятно е в този случай един единствен АТР-свързващ протеин да обслужва няколко ABC транспортни системи, както беше показано за *S. reticuli*, при която АТР свързващият протеин (*MsiK*) пренася както целобиоза, така и малтоза (Schlosser, A. 2000, Schlosser, A. 1997). Наскоро са клонирани и секвенирани предполагаеми АТР-свързващ протеин (*XynK*) от *G. Stearothermophilus T-6*. Тези протеини има значителна хомология *MsiK*, но остава да се определи дали те са ангажирани в преноса на ксилоолигозахариди. Гените на транспортната система ABC (*xynEFG*), се регулират от два гена *XylR* и *XynC*. Този тип регулиране позволява на клетките да усилят бързо експресията на транспортната система и по този начин ксилоолигозахаридите могат да се използват по-ефективно. Такъв механизъм се използва от ксилан-разграждащите микроорганизми (Miyazaki et al., 2003). *XynR* протеина от *Prevotella bryantii* В14 съдържа и двата домейна, както хистидин киназа, така и регулаторния домейн. За този протеин е установено, че активира експресията на гени, кодиращи за ксиланаза, ксилозидаза, и предполагаем симпортер (Shulami et al., 1999).

При направен преглед в литературата към момента има много малко налична информация за пребиотици и ABC транспортни системи (10 публикации), за ксилоолигозахариди и млечнокисели бактерии (15 документа) и ABC транспортери и ксилоолигозахариди.

При направена справка в търсачката Scopus към момента има налична информация за системи при млечнокисели бактерии (71 публикации), ABC транспортерни при фруктофилни млечнокисели бактерии (1 документа от 2008 г.).

## **8. Скрининг за фруктофилни млечнокисели бактерии, продуценти на гликозилтрансферази**

Млечнокиселите бактерии са известни продуценти на екзополизахариди (ЕПС) (Monsan, P. et al., 2001). Представителите на този род *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, и *Weissella* продуцират извънклетъчни и клетъчно-свързани не Leloir тип, които използват захарази като субстрат за синтезиране глюкозо или фрукто хомополизахариди – наречени глюкани и фруктани, съответно (Korakli, M. and Vogel, R.F., 2006; van Hijum et al. 2006). Синтезата на глюкановите ензими принадлежат към гликозид хидролазното семейство 70 (GH70) (<http://www.cazy.org/GH70.html>) и в зависимост от вида на връзките между глюкозните остатъци в полизахаридите, които са разпределени в 4 групи: 1) глюкан-захарази (ЕС 2.4.1.5) – синтезиране на декстран, съдържащ основно  $\alpha$  1-6 връзки; 2) мутанзахарази (ЕС 2.4.1.5) – синтезиране на мутан с  $\alpha$  1-3 връзки; 3) реутеранзахарази (ЕС 2.4.1.5) – синтезиране на реутеран с  $\alpha$  1-4 връзки в основната верига; и 4) алтернанзахарази (ЕС 2.4.1.140) – синтезира алтерана, съставен от редуващи се  $\alpha$  1-6 и  $\alpha$  1-3 свързани глюкозни единици (Monsan, P. et al., 2001; Monsan, P. et al., 2010). Фруктан-синтезиращи ензими (фруктанзахарази) продуцирани от млечнокисели бактерии принадлежат към семейство GH68 (<http://www.cazy.org/GH68.html>) и въз основа на връзки между фруктозните единици във фруктановия полизахарид се разделят на две групи: 1) Инулозахарази (ЕС 2.4.1.9) – синтезиране на инулин, съставен от  $\beta$  (2-1) свързани фруктозни остатъци и 2) леванзахарази (ЕС 2.4.1.10) – продуциращи леван с  $\beta$  (2-6) връзки между фруктозните единици (van Hijum et al. 2006; Ozimek, L.K. et al., 2005).

Според описанието, направено от Edwards и колеги, щамът *Lactobacillus kunkeei* YH-15 ферментира захароза, но екзополизахариди, като например декстриани не се продуцират от него (Edwards, C.G. et al., 1998). Това също се потвърждава от Endo и колеги, за други характеризирани щамове на *Lactobacillus kunkeei* (Endo A. et al., 2012).

Няколко проучвания показват, че съобществото от млечнокисели бактерии, обитаващи стомаха на пчелите или нейния продукт – медът, образува биофилм (Vasquez, A. Et al., 2012; Olofsson, T.C. and Vasquez, A., 2008). Основни адхезивни съединения на такива биофилми са



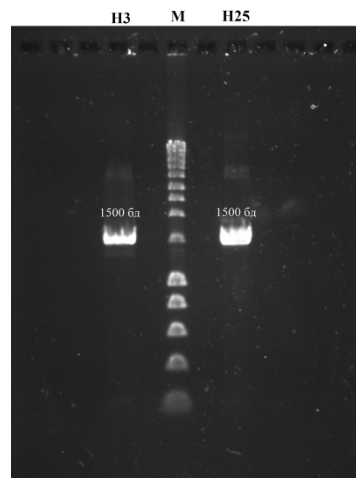
екзополизахаридите, секретирани в околната среда от бактерии, осигуряващи тяхната защита и способност да колонизират гостоприемника (Patel, S. Et al., 2012). В допълнение, екзополизахариди от млечнокисели бактерии са известни като полезни пребиотични и имуномодулиращи свойства за хората. Екзополизахаридите, съдържащи специфични гликозидни връзки (1-2, 1-3) се използват за съставна част на много функционални храни, фармацевтични и козметични продукти (Matsuzaki, C. et al., 2013; Patel, S. Et al., 2012). Знаейки, че са полезни, може да бъде използвани за съставяне на екзополизахаридни биофилми в стомашно-чревния тракт на пчелите. Така изолирането и характеризирането на специфични глюканзахарази, продуцирани от фруктофилни млечнокисели бактерии, биха могли да подобрят нашето разбиране за ролята на тези екзополизахариди за здравето на пчелите и от друга страна да разширят спектъра на методите за производство на ценни съединения с търговски приложения. В настоящата работа докладваме изолацията на два произвеждащи глюканзахарази щамове *Lb. kunkeei* от стомаха на пчели *Apis Mellifera*. Динамиката на растежа и производството на ензими по време на култивирането в захарозна среда, също са изследвани и сравнени. Глюканните полизахариди се синтезират от извънклетъчни глюканзахарази от щамове *Lb. kunkeei*, които бяха анализирани чрез ензимна хидролиза.

Бяха получени общо 36 изолата от стомашно-чревния тракт на Българска медоносна пчела *Apis mellifera rodopica* от Пловдивска област (гр. Бяня и с. Труд). Двадесет от тях показаха растеж на среда FYP30, съдържаща 30% фруктоза. От литературата е известно, че много млечнокисели бактерии продуцират екзополизахариди при култивиране в среди със захароза, като основен въглероден източник (Monsan et al., 2001). Фруктофилните изолати се селектираха по способността им да продуцират екзополизахариди при култивиране на mMRS агар с 5% захароза, където се отчита мукозен растеж. Формиране на мукозни колонии се установи при 2 от изследваните изолати – Н3 и Н25, които са Грам-положителни пръчковидни бактерии. Известно е, че в присъствие на захароза, гликозилтрансферазните ензими, продуцирани от МКБ, катализират синтезата на глюкозни и фруктозни полимери, които придават характерна мукозна консистенция на колониите на агарова среда (Korakli et al., 2001).

## **9. Охарактеризиране на изолати Н3 и Н25 посредством секвениране на гени за 16S рибозомна РНК.**

Изследваните изолати бяха подложени на идентификация посредством секвениране на гени за 16S рибозомна РНК. За целта се извърши PCR

амплификация на гените за 16S рибозомна РНК в геномните ДНК на изолати Н3 и Н25 с използване на праймери 8F и 15R, с които се получават амплимери на съответните гени, с дължина ~1500 бд (Фиг. 11.).



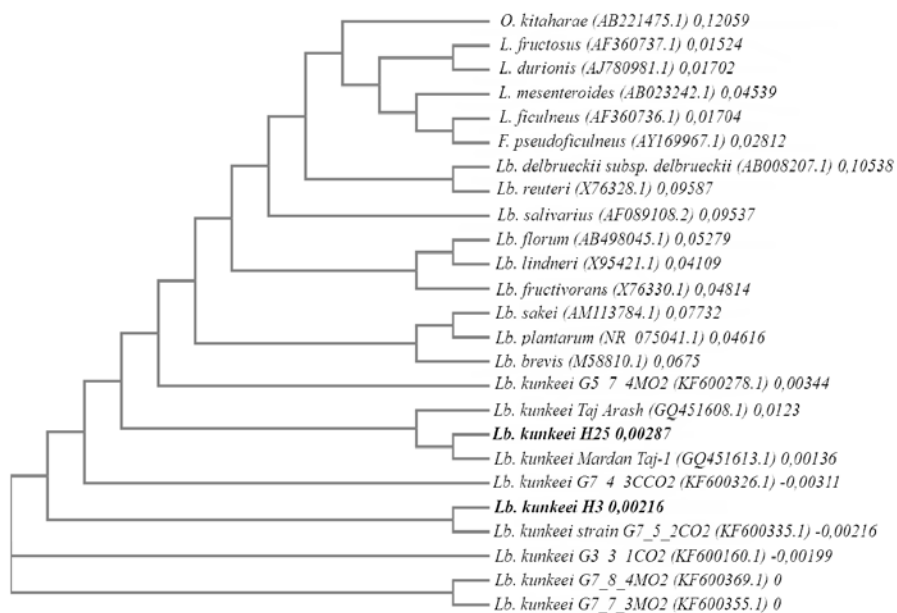
**Фиг. 11.** PCR амплификация на гени за 16S рибозомна РНК от изолати Н3 и Н25.

**Легенда:** М – ДНК стандарт (Eurogentec), 200 бд; 400 бд; 600 бд; 800 бд; 1000 бд; 1500 бд; 2000 бд; 2500 бд; 3000 бд; 4000 бд; 5000 бд; 6000 бд; 8000 бд; 10000 бд.

Получените амплимери от двата изолата бяха предоставени за секвениране на Eurofins Genomics (Германия), с използване на праймер 8F. Секвенираха се 500 бд от 5'-края на гените за 16S рибозомна РНК на изолати Н3 и Н25, а получените последователности се сравниха с базата данни на NCBI, посредством нуклеотиден BLAST. Установи се, че последователностите от изследваните изолати показват 99% идентичност с последователности на щамове *Lactobacillus kunkeei* – 40 щама с Н3 и 32 щама с Н25. При съпоставяне на припокриваща се област от 472 бд в последователностите от двата изолата, посредством EMBOSS Needle он-лайн услугата на EMBL-EBI се установи, че те показват 99,6% идентичност помежду си.

Проведе се филогенетичен анализ на последователностите от изолати Н3 и Н25, които се съпоставиха с 16S последователности от различни щамове *Lb. kunkeei*, както и с такива от други видове МКБ, като се построи филогенетично дърво (Фиг. 12). От дендрограмата се вижда, че изолати Н3 и Н25 се разполагат в групата на *Lb. kunkeei*. и се отдиференцират ясно от други фруктофилни МКБ, сред които са представители на род *Fructobacillus* (рекласифициран от род *Leuconostoc*) – *Fructobacillus durionis*, *F. ficulneus*, *F. fructosus*, *F. pseudoficulneus* и *F. tropaeoli*. Те са филогенетично близки с родовете *Leuconostoc*, *Oenococcus* и *Weissella* (Endo & Okada, 2008).

От литературата е известно, че само два вида от род *Lactobacillus* се класифицират като фруктофилни МКБ – *Lb. kunkeei* и *Lb. florum* (Nevelng et al., 2012). *Lb. kunkeei* е облигатно фруктофилен вид, който се изолира от богати на фруктоза хабитати – диви цветя, гроздов сок, пресен мед и други пчелни продукти, както и от гастро-интестиналния тракт на пчели и техни ларви (Endo et al., 2013).

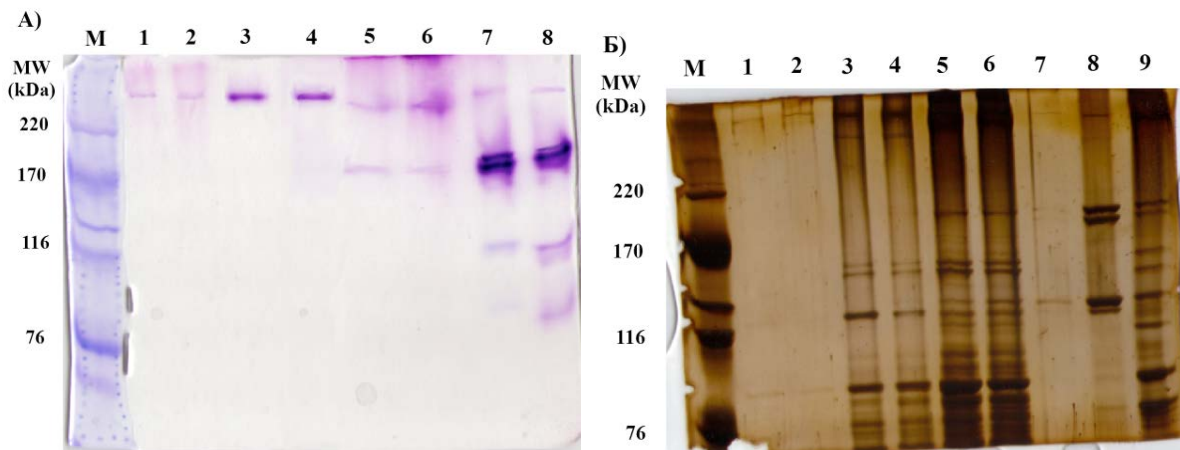


**Фиг. 12.** Филогенетично родство на изолати *Lb. kunkeei* H3 и H25 с други видове млечнокисели бактерии, на база последователности за 16S рибозомна РНК.

Различни изследвания са показали, че пчелните продукти и пчелните ларви са богат източник на фруктофилни МКБ, което прави последните добри потенциални кандидати за бъдещи пчелни пробиотици (Nevelng et al., 2012; Endo et al., 2013).

## 10. Изследване продуцирането на гликозилтрансферазни ензими от фруктофилни изолати H3 и H25.

Продуцирането на гликозилтрансферази от изследваните изолати, както и техните молекулни тегла, се провериха чрез провеждане на електрофоретичен *in situ* анализ на екстрацелуларни и клетъчно-свързани фракции от H3 и H25, след култивирането им в среда на Dols за продукцията на тези ензими (Фиг. 13).



**Фиг. 13.** *In situ* анализ на екстрацелуларни и клетъчно-свързани гликозилтрансферази от изолати Н3 и Н25.

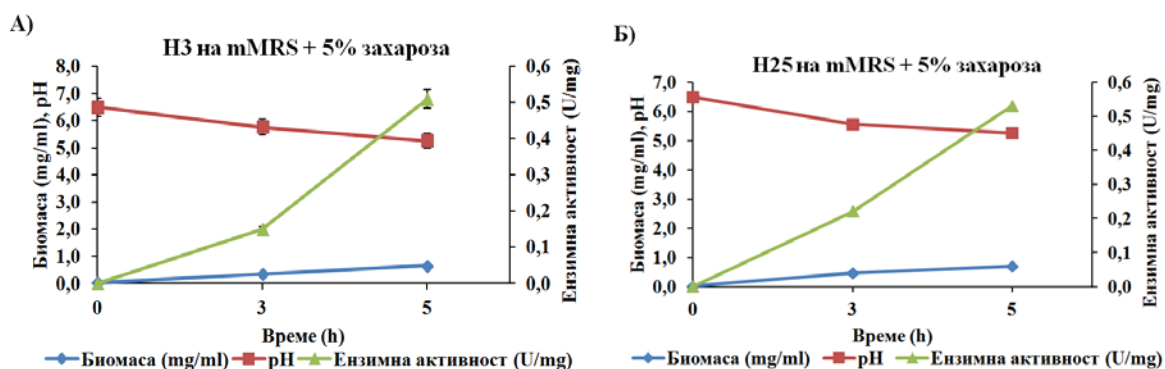
**Легенда:** М – протеинови стандарти (миозин (220 kDa),  $\alpha$ 2-макроглобулин (170 kDa),  $\beta$ -галактозидаза (116 kDa), трансферин (76 kDa), глутаматдехидрогеназа (53 kDa) Amersham, High Molecular Weight SDS Calibration Kit for Electrophoresis); **Гел А)** 1 – културална течност от Н3; 2 – културална течност от Н25; 3 – ПЕГ концентрат от Н3; 4 – ПЕГ концентрат от Н25; 5 – клетъчна фракция от Н3; 6 – клетъчна фракция от Н25; 7 – културална течност от *L. mesenteroides* ATCC 8293; 8 – клетъчна фракция от *L. mesenteoides* ATCC 8293 8 – ПЕГ концентрат от *L. mesenteoides* ATCC 8293; 9 – клетъчна фракция от *L. mesenteoides* ATCC 8293. **Гел Б)** 1 – културална течност от Н3; 2 – културална течност от Н25; 3 – ПЕГ концентрат от Н3; 4 – ПЕГ концентрат от Н25; 5 – клетъчна фракция от Н3; 6 – клетъчна фракция от Н25; 7 – културална течност от *L. mesenteroides* ATCC 8293; 8 – ПЕГ концентрат от *L. mesenteoides* ATCC 8293; 9 – клетъчна фракция от *L. mesenteoides* ATCC 8293.

*In situ* анализът на екстрацелуларни и клетъчно-свързани фракции от изолати Н3 и Н25, след оцветяване на гела с реагент на Шиф показва и при двата изследвани изолата ивица, съответстваща на гликозилтрансфераза с молекулна маса около 300 kDa, която се открива както в екстрацелуларната, така и в клетъчно-свързаната ензимна фракция (Фиг. 13А). Глюкозилтрансфераза с такава висока молекулна маса е установена и при референтен щам *L. mesenteroides* ATCC 8293. Допълнително, в клетъчно-свързаните ензимни фракции се детектира и ивица, съответстваща по молекулна маса (180 kDa) на декстранзахаразата от референтен щам *L. mesenteroides* ATCC 8293 (Фиг. 13А). По молекулна маса, отчетените ензимни ивици съответстват на тези от проведеното оцветяване на тотално количество белтък, посредством сребърен нитрат (Фиг. 13Б). От литературата е известно, че глюкозилтрансферази с молекулна маса 200-250 kDa, продуцирани от МКБ, съответстват на алтернанзахараза (Argüello-Morales, MA. et al., 2000). Fabre и съавтори съобщават за глюкозилтрансфераза DSR-E от *L.*

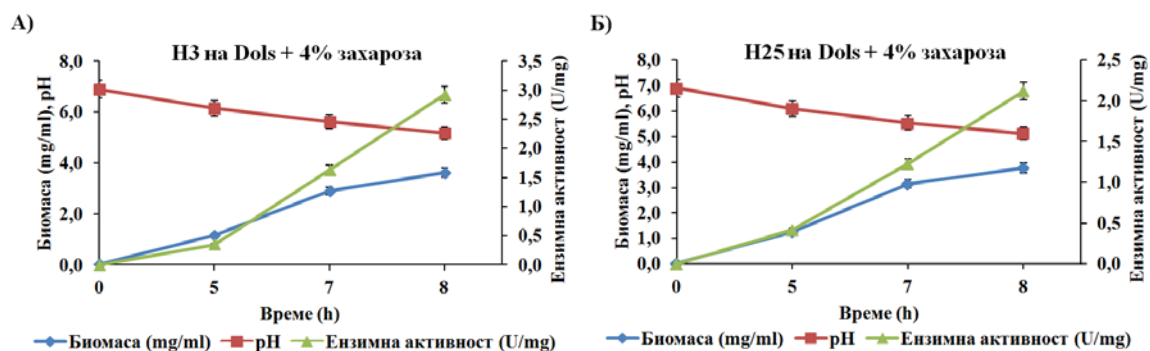
*mesenteroides* NRRL B-1299 с молекулна маса около 312 kDa, която притежава два каталитични домена и катализира синтезата на глюкан, в който се откриват както  $\alpha$ -1,6, така и  $\alpha$ -1,2 свързани глюкозни остатъци (Fabre et al., 2005).

В следващия етап от изследванията се проследи и сравни продукцията на гликозилтрансферази, при култивиране на изолати H3 и H25 в mMRS с 5% захароза и среда на Dols с 4% захароза, като основен въглероден източник (Фиг. 14 и 15).

Култивирането на изолатите в двата вида среди се прекрати при достигане на рН в границите 5,0 – 5,2. По литературни данни, рязкото понижаване на рН под 5,0 в хода на култивирането на продуцентите, инхибира продуцирането на гликозилтрансферази, чрез блокиране на транскрипцията на кодиращите ги гени (Miller, AW. et al., 1986).



**Фиг. 14.** Профил на рН, биомаса и екстрацелуларна гликозилтрансферазна активност при култивиране на изолати H3 и H25 в mMRS с 5% захароза.



**Фиг. 15.** Профил на рН, биомаса и екстрацелуларна гликозилтрансферазна активност при култивиране на изолати H3 и H25 в среда на Dols.

При култивирането на изолатите в mMRS среда се установи по-бързо понижаване на рН, като на 5<sup>-и</sup> час от култивирането се достигнаха стойности от 5,25 (изолат Н3) и 5,27 (изолат Н25). На среда на Dols, стойности на рН от 5,17 (изолат Н3) и 5,12 (изолат Н25) се отчетоха на 8<sup>-и</sup> час от началото на култивирането. По-краткото време за култивиране на изолатите в mMRS оказва влияние върху крайното количество натрупана биомаса, а от там и върху количествата на продуцираните ензими. Отчетената екстрацелуларна гликозилтрансферазна активност на 5<sup>-и</sup> час от култивирането на изолатите е съпоставима между тях – 0,51 U/mg (изолат Н3) и 0,53 U/mg (изолат Н25) (Фиг. 14). При култивиране на изследваните изолати в среда на Dols, отчетените крайни стойности на биомасата са около 5 пъти по-високи от измерените при култивирането в mMRS среда – 3,62 mg/ml (изолат Н3) и 3,77 mg/ml (изолат Н25). По-голямото количество натрупана биомаса корелира и с по-високата отчетена гликозилтрансферазна активност в края на култивирането – 2,92 U/mg (изолат Н3) и 2,12 U/mg (изолат Н25) (Фиг. 15).

Продуцираните от изследваните изолати гликозилтрансферази са почти изцяло екстрацелуларни, като при култивиране в mMRS и среда на Dols, клетъчно-свързаната ензимна активност е в рамките на 2% от общата отчетена при Н3 и Н25 на съответните среди.

### **11. Синтез на полизахариди с гликозилтрансферази от изолати Н3 и Н25.**

С гликозилтрансферази от изследваните изолати се проведоха синтезни реакции за получаване на екзоползахариди, в присъствие на субстрат 10% захароза. Интерес представляваше да се сравни типът на синтезираните полимери от двата изследвани изолата и декстран тип Т500. За целта се извърши ензимно разграждане на полимерите с декстраназа (ЕС 3.2.1.11) от *Chaetomium* spp. (Amano), хидролизираща  $\alpha$ -1,6 гликозидните връзки в състава на полимерите (Khalikova, E. et al., 2005) и амилоглюкозидаза (ЕС 3.2.1.3) от *Rhizopus* spp. (Sigma), хидролизираща  $\alpha$ -1,4 гликозидните връзки (Таблица 13).

По количеството на освободената глюкоза може да се предположи, че синтезираните с гликозилтрансферази от изследваните изолати екзоползахариди са с по-висока степен на разклоненост, като предполагаемото съдържание на  $\alpha$ -1,6 гликозидни връзки е 35,2% при Н3 и 62,0% при Н25. Съответно, предполагаемото съдържанието на  $\alpha$ -1,4 е 11,7% и 4,7%. В контраст, контролата (комерсиален декстран Т500), съдържа 96,5%  $\alpha$ -1,6 връзки.

**Таблица 13.** Хидролиза на екзополизахариди от изолати Н3 и Н25 с декстраназа и амилоглюкозидаза.

Полимер	Освободена глюкоза (mmol/ml)		Предполагаемо съдържание на $\alpha$ -(1,6) връзки (%)	Предполагаемо съдържание на $\alpha$ -(1,4) връзки (%)
	Декстраназа	Амилоглюкозидаза		
Н3	3,52	1,17	35,2	11,7
Н25	6,20	0,47	62,0	4,7
Декстран Т500	9,65	<0,06	96,5	<0,06

В литературата има малко данни за структурата на полимери, синтезирани с глюкозилтрансферази с високи молекулни маси. Пример за такъв ензим, синтезиращ разклонен полимер с високо съдържание на  $\alpha$ -1,2 връзки е DSR-E (312 kDa), продуциран от *L. mesenteroides* NRRL B-1299 (Fabre et al., 2005).

С неустановена структура е и полимера, синтезиран от високомолекулна глюкозилтрансфераза (313 kDa), продуцирана от референтен щам *L. mesenteroides* ATCC 8293 (Olvera et al., 2007). С висока степен на разклоненост се характеризира и полимерът синтезиран от алтернанзахаразата (245 kDa) на *L. mesenteroides* NRRL B-1355, съставен от редуващи се  $\alpha$ -1,6 и  $\alpha$ -1,3 свързани глюкозни остатъци (Joucla et al., 2006).

Възможността на глюкозилтрансферазите от МКБ да синтезират връзки, различни от  $\alpha$ -1,6 е от съществен интерес, от гледна точка на тяхното приложение в медицината и фармацевтичната индустрия (Naessens et al., 2005). В тази връзка е необходимо изясняване на структурата на синтезираните полимери от изолати Н3 и Н25, посредством ЯМР анализ, както и пълно охарактеризиране на ензимите, отговорни за тяхната синтеза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фруктофилните млечнокисели бактерии са специфична група млечнокисели бактерии, които предпочитат фруктозата пред глюкозата като хранителен субстрат. Те се намират в богати на фруктоза ниши, например цветя и плодове. Освен това микроорганизмите могат да бъдат намерени в ферментирани храни, включително вино, ферментирани какаови зърна и др. *Fructobacillus spp.* и *L. kunkeei* са представители на тази специфична микрофлора и наскоро бяха класифицирани някои нови видове като членове на тази интересна група. Наскоро бяха открити фруктофилни млечнокисели бактерии в стомашно-чревния тракт на няколко насекоми, свързани като начин на хранене с богати ниши на фруктоза, включително медоносните пчели, тропически плодови мухи и гигантски мравки, чиито диети са богати на фруктоза. От тези насекоми медоносните пчели са важни от икономическа и селскостопанска гледна точка за производството на мед и най-вече за опрашването на икономически значимите култури. От изключителна важност е да се предприемат мерки, тъй като популациите на пчелите значително намалява през последното десетилетие и все още намалява в световен мащаб, заради болести предизвикани от патогенни микроорганизми изместващи млечнокиселата флора от интестиналния тракт на пчелите. Установено е че един от доминиращите бактериални видове в няколко медоносните пчели, отглеждани или уловени в различни региони е *L. kunkeei*.

Други видове ФМКБ често срещани в интестиналния тракт на пчелите са от род *Fructobacillus*, наскоро обособен като отделен род, филогенетично близки с род *Leuconostoc spp.* Проучването разкрива, че *Fructobacillus spp.* притежават значително по-малко протеинови кодиращи секвенции (CDS) в техните малки геноми и липсват няколко метаболитни системи, включително респираторни вериги, фосфотрансферазни системи и АВС транспортери. Освен това се съобщава, че бифункционалният алкохол/ ацеталдехид-дехидрогеназен ген (*adhE*) липсва в генома на *Fructobacillus spp.*, което е от съществено значение за хетеро-млечна ферментация. Загубата на гена *adhE* води до получаване на ацетат вместо етанол и води до дисбаланс на  $NAD^+ / NADH$  в пътя на хетеро-млечния фосфокетолазаен път.

Липсата на *adhE* ген и произтичащата от това загуба на  $ADH / ALDH$  активност без производство на етанол причиняват недостатъчно  $NAD^+$  регенериране, тъй като системата за продукцията на етанол от ацетил-СоА, използвайки  $ALDH$  и  $ADH$  е ключова система за окисляване на  $NADH$  до  $NAD^+$  в фосфокетолазния път на хетероферментативните млечнокисели



бактерии. Генът *adhE* в *L. kunkeei* се експресира от ранна до късна логаритмична фаза на растеж, въпреки че детекцията е много по-слаба, отколкото при други гени, използвани в пътя на фосфокетолазата (т.е. гени за глюкокиназа (*glk*) и ацетат киназа (*ack*). Ацетат киназа се използва за получаване на ацетат от ацетилфосфат вместо етанол и не се използва активно при хетероферментативните МКБ при метаболизъм на глюкозата. Използва се когато се достави допълнителен акцептор на електрони. Анализите на ензимната активност при *L. kunkeei* показват, че има ALDH активност, но не и ADH. Липсата на ADH домейн в *adhE* води до липса на ADH активност и това е последвано от производство на ацетат и изискването за акцептор на електрони при глюкозния метаболизъм. Това е малко по-различно от ситуацията при *Fructobacillus* spp., тъй като при тях не се детектира активност на гена *adhE* и ALDH.

Подобни геномни характеристики, като нисък брой CDS в малък геном, са съобщени за *L. kunkeei*. От друга страна поведението на фруктофилните *L. kunkeei* не е изследвано досега на геномно ниво. *L. kunkeei* има значително по-малък геном в сравнение с други лактобацили. Функционалната гена класификация и тестовете за ензимна активност потвърдиха хипотезата за редуktivна еволюция сред ФМКБ, особено в гените, кодиращи ензими на метаболитните пътища.

При *L. kunkeei* са открити специфичен ензим – NAD (P) H оксидаза, за който се съобщава, че е специфичен за *Fructobacillus*. Интересното е, че предполагаем ген, кодиращ N-ацетилхексозаминидаза, също е открит като специфичен за *L. kunkeei*. Този ензим се характеризира с метаболизиране на определен тип олигозахарид в човешкото мляко и напоследък е идентифициран като основен автолизинов фактор в *Lactobacillus plantarum*. Въпреки това ролята на този ензим в *L. kunkeei* все още е ясна. Видът притежава декстранзахаразен ген, въпреки че не произвежда декстран. Гени за транспортиране на тейхоева киселина и устойчиви на стрес системи също са открити и се считат за специфични за *L. kunkeei*. От друга страна, 10 гена се характеризират като специфични липсващи гени в *L. kunkeei*, някои от тях са Heat-Shock протеин (*htpX*) и един ген (*xthA*), участващи в система за възстановяване на уврежданията на ДНК на прокариотите. Геномите на *L. kunkeei* притежават много по-голям брой гени, необходими за транспортиране на аминокиселини, но липсват гени за глутамин транспортна система.

*L. kunkeei* е единственият виден фруктофилен вид в род *Lactobacillus*. Известно е, че видът предпочита кислород за растеж и липсата на голяма част от гените, използвани за респираторни вериги, предполага, че кислородът се

използва като акцептор на електрони за метаболизма на глюкозата. Характеризирането на adhE гена, кодиращ бифункционален ADH / ALDH протеин AdhE, показва, че *L. kunkeei* притежава частичен adhE ген, който не притежава домен ADH. Това е първият солиден пример за наличието само на частичен adhE в МКБ, което води до липса на ADH активност и това е причината, поради която видовете изискват акцептор на електрони за метаболизма на глюкозата. Генетичните характеристики в *L. kunkeei* са доста сходни с тези на *Fructobacillus* spp., които имат сходни фруктофилни характеристики с *L. kunkeei*, въпреки че при *Fructobacillus* spp. напълно липсва adhE. Генетичните характеристики на *L. kunkeei* са много различни от тези на други лактобацили с малки геноми. Това би означавало, че всеки представител от род *Lactobacillus* с малък геном е последвал различен курс на редуktivна еволюция по време на своя процес на адаптация. Богатите на фруктоза ниши са индуцирали подобно генно редуциране във филогенетично отдалечени микроорганизми.

В резултат на проведените изследвания доказахме, на основата на генетичният анализ на изследваните щамове по 16S RNA, присъствието в интестиналния тракт на пчелите на *Lactobacillus kunkeei*, които представляват около 20% от изолираните щамове фруктофилни бактерии. Установи се при проведения анализ с API-ZYM, че ензимите от въгехидратния метаболизъм отсъстват при всички щамове с изключение на AG8 и AG9. Само тези щамове показват наличие на бета галактозидаза, алфа галактозидаза, алфа- и бета-глюкозидаза, бета-глюкоронидаза, N- ацетил бета глюкозаминидаза. Потвърди се, че при изолираните от нас щамове *L. kunkeei* се детектира активност на някои ензими от азотния метаболизъм.

Данните за активността на ключови ензими от въгехидратния метаболизъм показват, че фруктокиназата се идуцира в присъствие на по-високо количество фруктоза, като нейната активност е два пъти по-висока при 30% фруктоза в сравнение с 10% фруктоза. Алкохол дехидрогеназата не е активна при нито една от използваните концентрации на фруктоза, следователно налице е особеност в крайните етапи от метаболизма на фруктозата при изследваните фруктофилни бактерии.

Активността на ацетат киназата и лактат дехидрогеназата е различна при различните проценти на фруктоза. Данните недвусмислено говорят за настъпило трайно инхибиране на лактат дехидрогеназата при култивиране на среда с 30% фруктоза, което обяснява и промяната в метаболитните продукти в края на ферментацията.

Млечнокиселите бактерии са успешно приложени като пробиотици, които допринасят за здравето на хората и различни домашни и селскостопански животни. Тъй като млечнокиселите бактерии са важни компоненти в стомашно-чревния тракт с докладвано въздействие върху механизма на чревната бариера, не е изненадващо, че млечнокиселите бактерии, особено фруктофилните млечнокисели бактерии, могат да бъдат отговорни за здравето на пчелите.

Симбиозата е често срещана в природа, при която симбиотите като коменсалисти или мутуалисти са се развили, за да се възползват взаимно един от друг. Независими изследвания на човешката микрофлора наскоро идентифицираха сложна симбиотична среда с над 1000 бактериални фило типа, представляващи повече от 7 000 щамове (Rajilic-Stojanovic et al. 2007). Съставът на тази микрофлора се предполага, че е резултат от висока ко-еволюционна симбиоза и коменсализъм, повлияни от храненето, физиологията и имунологичните фактори.

Отдавна е известно, че голям брой млечнокисели бактерии от род *Leuconostoc*, изолирани от различни местообитания (захарен сок, ферментирани зеленчуци или млечни продукти), произвеждат полизахариди в присъствие на захароза. Ензимите, отговорни за синтезата на тези полимери са отнесени към GH70 семейството на глюканзахаразите, които катализират реакции на трансглюкозилиране чрез класическо двойно изместване. Сред GH70 активните ензими в присъствие на захароза, четири подгрупи от глюканскуразите могат да бъдат разграничени: декстранзахарази, алтернанзахарази, мутанзахарази и реутеранзахарази. Наскоро бе оповестена нова подгрупа към GH70, която съдържа 4,6-глюканотрансферази, тип-трансглюкозидази, катализиращ  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) гликозидни връзки. Според биохимичните и филогенетичните анализи на колектива на проф. П. Монсан, групата на разклоняващите захарази („branching sucrases“) могат също да сформират нова подгрупа към семейството на GH70. Досега пет ензима от тази група са били характеризирани, включващи конструираната  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) GBD-CD2 разклоняваща захараза от *L. citreum* NRRL B-1299, BRS-A от *L. citreum* NRRL B-1299, BRS-B от *L. citreum* NRRL B-742, BRS-C от *L. fallax* KCTC 3537 и BRS-D от *L. kunkeei* EFB6.

Откриването на природни разклоняващи захарази, чрез изолирането и охарактеризирането на BRS-A и BRS-B в *L. citreum*, повдигна въпроса за присъствието на такъв тип ензимна активност в млечнокиселите бактерии и тяхната роля. За да се хвърли малко светлина върху този проблем, се проведе скриниране на достъпните бази данни за наличните нуклеотидни

последователности и аминокиселинните последователности съответно на гените и активните центрове на разклоняващите захарази. Две нови предполагаеми разклоняващи захарази (BRS-C и BRS-D) бяха идентифицирани, едната в *Leuconostoc fallax* KCTC3537, а друга в *Lactobacillus kunkeei* EFB6 от колектива на проф. М. Ремауд. Тези данни напълно корелират с установените от нас щамове *Lactobacillus kunkeei* H3 и H25, за които доказахме наличието на глюканзахаразни ензими и на разклоняващ ензим с Мт 300 kDa. Присъствието на тези ензими в микроорганизми, спадащи към полезната микрофлора на стомашния тракт на пчелите, предполага частично трансформиране на захарозата и фруктозата в нектара на растенията и по-късно в пчелния мед в олигозахариди с предполагаем пребиотичен потенциал. Въз основа на подреждането на последователността, двете предполагаеми разклоняващи захарази се очаква да притежават каталитичната триада DED и петте структурни домейни, А, В, С, IV и V, специфични за GH70 ензимно семейство. Всички ново-идентифицирани гени, кодиращи предполагаеми разклоняващи захарази, са разположени на обратната верига на техния геном, наблюдавана както преди за *brsA* ген на *L. citreum* NRRL B-1299 и *brsB* в *L. citreum* NRRL B-742. Всички те са организирани в тандем с друга предполагаема глюканскураза.

Ензимите, кодирани от гените BRS-A, BRS-B и GBDCD2, и новооткритите BRS-C и BRS-D продуцират главно глюкоза, леукоза и късоверижни малки олигозахариди при използване за субстрат захароза. В края на реакцията, хроматографските и H1 NMR анализи показват, че се синтезира модифициран декстран от BRS-C и BRS-D. BRS-C от *L. fallax* KCTC 3537 катализира синтезата на  $\alpha$ -(1→3) тип гликозидни връзки в синтезираните полизахариди, докато BRS-D от *L. kunkeei* EFB6 е специфичен за  $\alpha$ -(1→2) трансглюкозилиране. Тези констатации разкриват за пръв път, че специфичността на разклонението не се ограничава до *L. citreum* sp. но е също характерно за *L. fallax*, както и в *L. kunkeei*.

Пътят сега е отворен за обещаващи изследвания върху структурно-функционалните взаимоотношения на новата подгрупа ензими разклоняващи захарази, към семейство GH70, които ще имат за цел идентифицирането на структурните елементи в техния активен център, отговорни за полимеризацията или способността за специфично разклоняване на веригите на полизахаридите. Въпреки общите структурни мотиви с GH70 глюканскурази, се появяват и ясни отличителни черти при разклоняващите ензими. Съгласно анализите на последователностите, разликите са били подчертани в субстрат-свързващия домен, което може да се използва за бързо

скриниране на разклоняващи захарази от геномни данни. Получените от нас данни за нови разклоняващи захарази при щамове *L. kunkeei* Н3 и Н 25 са предпоставка за бъдещи изследвания, чрез мутационни и структурни проучвания, необходими за по-добро разбиране на причината за възникване и спецификата на разклонението в структурата на полизахарида, както и да се осигурят данни за по-нататъшно разбиране на механизма на разклоняване веригата на полимерите.

Не на последно място настоящото проучване и съпоставянето на данните с други автори относно получаването на голямо разнообразие от разклонени декстри, вариращи по отношение на големина, типа гликозидна връзка и степен на разклоняване на структурата могат лесно да бъдат използвани за синтезиране на полизахариди и олигозахариди с нови свойства, представляващи биотехнологичен интерес.

## ИЗВОДИ

1. Доказано е наличието на фруктофилни млечнокисели бактерии в храносмилателния тракт на медоносната пчела *Apis mellifera* от различни райони на България.
2. Доказани са различия в растежните параметри на изолираните щамове фруктофилни млечнокисели бактерии при култивиране в среди с различни концентрации на фруктоза.
3. Установи се при проведения анализ с API-ZYM, че се наблюдава специфика в активността на ензимите от въглехидратния метаболизъм (бета галактозидаза, алфа галактозидаза, алфа- и бета-глюкозидаза, бета-глюкоронидаза, N- ацетил бета глюкозаминидаза).
4. Генетичният анализ на изследваните щамове по 16S RNA установи, че четири щамове се отнасят към вида *Lactobacillus kunkeei* – АГ8, АГ9, Н3 и Н25.
5. Съотношението на крайните продукти при ферментация на фруктоза (1%; 10% и 30%) доказва, че процесът е изтеглен към получаване на ацетат за сметка на лактат, като не се наблюдава образуване на етанол.
- 6 Активността на ензимите фруктокиназа и ацетат киназа се увеличава при култивиране на среда с 30% фруктоза и е доказателство за наличието на фосфокетолазен път.
7. Установи се наличие на генна експресия на ензими, свързани с усвояването на фруктозата (фруктокиназа, глюкозо-6 фосфат дехидрогеназа и лактат дехидрогеназа) от щамове А Г 8 и АГ 9, като експресията е в зависимост от концентрацията на фруктоза и глюкоза.
8. Доказано е, че щамове *Lactobacillus kunkeei* Н3 и Н25 продуцират екстрацелуларна и клетъчно-свързана глюкозилтрансфераза с молекулна маса около 300 kDa. Допълнително, в клетъчно-свързаните фракции се детектира и глюкозилтрансфераза с молекулна маса 180 kDa.

## ПРИНОСИ

1. Въз основа на проведените анализи на крайни метаболити и ензими от въглехидратния метаболизъм (фруктокиназа и ацетат киназа), както и експресията на гените им, може да бъде предложена хипотеза за участието на пентозо-фосфатен фосфокетолазен път за усвояването на високи концентрации фруктоза (концентрация 30%).
2. За първи път при фруктофилни изолати от гастро-интестинален тракт на пчели се детектират гликозилтрансферазни ензими при култивиране в среди със захароза. Щамовете *Lactobacillus kunkeei* H3 и H25 продуцират екстрацелуларна и клетъчно-свързана гликозилтрансфераза с молекулна маса около 300 kDa.
3. Създадена е колекция от фруктофилни лактобацили, изолирани от медоносна пчела, които биха могли да се използват при следващи изследвания.

## **.Списък на научните публикации**

1. Mayara Salgado Silva, Yavor Rabadzhiev, Monique Renon Eller, Ilia Iliev, Iskra Ivanova and Weyder Cristiano Santana, (2017). Microorganisms in Honey. Chapter 11. Chapter from the book Honey Analysis, Published by InTech.
2. Tonka Vasileva, Veselin Bivolarski, Galya Michailova, Ayshe Salim, Yavor Rabadjiev, Iskra Ivanova and Iia Iliev. Glucansucrases produced by fructophilic lactic acid bacteria *Lactobacillus kunkeei* H3 and H25 isolated from honeybees. *J. Basic Microbiol.* 2017, 57, 68–77.
3. Yavor Rabadjiev, Petya Christova, Ilia Iliev, Iskra Ivanova. Identification of a Lactic Acid Bacterial flora within the honey intestinal tract of *Apis mellifera* from different regions of Bulgaria. *J. BioSci. Biotechnol.* 2015, SE/ONLINE: 215-219.

## **Списък на участия в научни конференции и конгреси**

1. Rabadjiev Y., Christova P., Iliev I., Ivanova I., 2015. Identification of a Lactic Acid Bacterial Flora within the Honey Intestinal Tract of *Apis Mellifera* from Different Regions of Bulgaria. Втора национална конференция за млади учени „Биологически науки за по-добро бъдеще“, 30-31 Октомври, Пловдив, Биологически факултет.
2. Rabadjiev Y., Ananieva M., Iliev I., Ivanova I., 2014. Newly isolated fructophilic lactobacilli strains. Първа национална конференция по биотехнология „30 години биотехнология в България“, 17-18 октомври, София, биологически факултет.

## ***ЗАБЕЛЕЖКИ***

- Представянето на резултатите в автореферата се различава от представянето им в дисертацията.
- Номерацията на таблиците и фигурите в автореферата не са идентични с тези в дисертацията.



## Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are one of the most important groups of microorganisms known to mankind. They are found in a variety of ecological niches and are part of the composition of plant's microflora, silage and canned plant food, milk and dairy products, meat and meat products, human and animal gastrointestinal tracts, and are important for normal functioning of gastrointestinal microflora. In recent years, fructose-rich niches have emerged as a new potential source of LAB. Such habitats are flowers, fruits, etc. related to natural pollinators such as *Apis mellifera*, its pastures, its gastrointestinal tract and its products (bee pollen, bee bread, royal jelly) classified as healthy food.

## Purpose and tasks

The purpose of this thesis is to investigate the species diversity of fructophilic lactic acid bacteria (FMFB) isolated from the intestinal tract of the honey bee and to identify the specificity of their metabolism.

To accomplish the goal, the following tasks were set:

1. Isolation of fructophilic lactic acid bacteria from the intestinal tract of a honey bee.
2. Biochemical characterization of isolated strains by API 50 and API ZYM.
3. Tracking the growth of isolated strains on glucose and fructose media at different concentrations (from 1 to 30%), as the sole carbon source.
4. Physiological characterization of strains grown in the presence of different fructose concentrations in relation to:
  - end-metabolites;
  - the profile of the enzymes fructokinase, lactate dehydrogenase, acetate kinase and alcohol dehydrogenase;
5. Genetic identification of isolated fructophilic lactic acid bacteria;
6. Analysis of the levels of gene expression of the enzymes fructokinase, lactate dehydrogenase, acetate kinase and alcohol dehydrogenase, when absorbing different amounts of fructose;
7. Analysis of the levels of gene expression of ABC transporters in the cultivation of isolated strains of *Lactobacillus kunkeei*;
8. Study of the profile of glycosyltransferase enzymes and their properties in isolated strains of *Lactobacillus kunkeei*.

## Results

As a result of the studies and on the basis of the genetical analysis of the strains tested by 16S RNA, we have proved the presence of *Lactobacillus kunkeei* in the bees' intestinal tract, which represent about 20% of the isolated strains of FLAB. It was found in the API-ZYM assay that carbohydrate metabolism enzymes were absent in all strains except for AG8 and AG9. Only these strains show beta-galactosidase, alpha galactosidase, alpha and beta-glucosidase, beta-glucuronidase, N-acetyl beta glucosaminidase. It was confirmed that the isolates of *L. kunkeei* strains detect the activity of some enzymes from nitrogen metabolism.

Activity data for key enzymes from carbohydrate metabolism indicate that fructokinase induced in the presence of a higher amount of fructose and its activity is twice as high in 30% fructose as compared to 10% fructose. Alcohol dehydrogenase is not active at any of the fructose concentrations used, therefore there is a peculiarity in the final stages of the fructose metabolism in the studied FLAB.

The activity of acetate kinase and lactate dehydrogenase is different at different percentages of fructose. The results talk about sustained inhibition of lactate dehydrogenase in 30% fructose culture, which also explains the change in metabolic products at the end of fermentation.

The discovery of natural branching saccharases through isolation and characterization of BRS-A and BRS-B in *L. citreum* raised the question of the presence of this type of enzyme activity in lactic acid bacteria and their role. In order to shed some light on this problem, screening of available databases for the available nucleotide sequences and amino acid sequences of the genes and active centers of the branching saccharases, respectively, was carried out. Two new putative branching saccharases (BRS-C and BRS-D) were identified, one in *Leuconostoc fallax* KCTC3537 and one in *Lactobacillus kunkeei* EFB6 from the team of Prof. M. Remaud. These results fully correlate with the established strains of *Lactobacillus kunkeei* H3 and H25, for which we have demonstrated the presence of glucanasecharase enzymes and a branching enzyme with Mt 300 kDa. The presence of these enzymes in microorganisms belonging to the beneficial microflora of the bee intestinal tract, suggests the partial transformation of sucrose and fructose into the nectar of the plants, and later in honey in oligosaccharides with supposed prebiotic potential.

### Keywords:

Fructophilic lactic acid bacteria, *Lactobacillus kunkeei*, *Apis mellifera*, 16S RNA, carbohydrate metabolism, Alcohol dehydrogenase, acetate kinase, lactate dehydrogenase, branching saccharases.

### Abbreviations:

LAB – Lactic acid bacteria

FLAB – Fructophilic lactic acid bacteria